

Strukturoptimierung einer
 α -Aminooxyessigsäure-basierten Leitstruktur
mit antimykobakterieller Aktivität

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Oliver Michel

aus München

Düsseldorf, März 2023

Aus dem Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Erstgutachter: Prof. Dr. Thomas Kurz
Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Zweitgutachter: Prof. Dr. Rainer Kalscheuer
Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Tag der Disputation: 06.07.2023

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass diese Dissertation von mir selbstständig, ohne unzulässige Hilfe, im Rahmen der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Diese Dissertation wurde weder in vorgelegter noch in ähnlicher Form bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine anderweitigen Promotionsversuche unternommen (weder erfolgreich noch erfolglos).

Düsseldorf, den _____

Oliver Michel

Die vorliegende Dissertation wurde im Zeitraum von April 2019 bis März 2023 am Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter Aufsicht von Herrn Prof. Dr. Thomas Kurz angefertigt.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den Personen danken, die mich während meiner Promotionsarbeit unterstützt haben und ohne deren Mithilfe die Anfertigung dieser Dissertation niemals zustande gekommen wäre:

Zunächst bedanke ich mich ganz besonders bei Herrn Prof. Dr. Thomas Kurz für die Betreuung dieser Arbeit, das entgegengebrachte Vertrauen, die fachliche Inspiration sowie freundliche Unterstützung. Der steige konstruktive Austausch auf intellektueller Ebene hat mir einen kritischen Zugang zur Thematik eröffnet und der vertrauensvolle Umgang ermöglichte individuelle Freiräume bei der Planung und Durchführung der experimentellen Laborarbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Rainer Kalscheuer möchte ich mich für seine Hilfsbereitschaft sowie die wissenschaftliche Betreuung als Zweitgutachter bedanken.

Mein Dank gilt außerdem Dr. Lasse van Geelen und Anna-Lene Kiffe-Delf für die Durchführung der biologischen Testungen sowie die Bereitstellung der resultierenden Forschungsergebnisse im Rahmen einer äußerst harmonischen Kooperation. Auch bei Dr. Björn Burckhardt und Alena Moritz möchte ich mich für die freundliche Zusammenarbeit und die Bereitstellung ihrer Forschungsergebnisse bedanken.

Beim gesamten Team des „*Center for Molecular and Structural Analytics an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (CeMSA@HHU)*“ bedanke ich mich für die Aufnahme der NMR-Spektren sowie die Durchführung der Massenspektrometrie.

Ich möchte mich bei allen aktuellen sowie ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für eine angenehme Arbeitsatmosphäre sowie angeregte Diskussionen auf intellektueller und persönlicher Ebene bedanken. Besonderer Dank gilt dabei Beate Lungerich und Petra Stahlke für ihre hervorragende technische und experimentelle Unterstützung.

Tief verbunden und außerordentlich dankbar bin ich meiner Familie, meiner Partnerin sowie Freunden, die mich während meiner Promotionsarbeit motiviert, beraten und emotional unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	I
1 Einleitung.....	1
1.1 Tuberkulose.....	1
1.1.1 Epidemiologie.....	2
1.1.2 Pathogenese.....	4
1.1.3 Prävention, Diagnose und Behandlung.....	6
1.2 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	9
1.3 Arzneistoffe zur Therapie der Tuberkulose (Antituberkulotika).....	12
1.3.1 Wirkmechanismen	12
1.3.2 Resistenz.....	17
1.4 Forschungsstand	21
1.4.1 Entdeckung der α -Aminooxyessigsäure-basierten Leitstrukturen.....	27
1.4.2 Antimykobakterielle Eigenschaften von α -Aminooxyessigsäure-Derivaten	29
1.4.3 Synthese und Derivatisierung der KSK-Leitstrukturen	31
1.4.4 Erste Struktur-Aktivitäts-Beziehungen.....	33
2 Zielsetzung.....	36
3 Ergebnisse und Diskussion	39
3.1 Strukturmodifikationen und SAR	39
3.1.1 Synthese und biologische Evaluation der KSK-Analoga: Region A.....	40
3.1.2 Synthese und biologische Evaluation der KSK-Analoga: Region B	56
3.1.3 Synthese und biologische Evaluation der KSK-Analoga: Region C	60
3.1.4 Zusammenfassung der SAR.....	79
3.2 Identifizierung des Wirkstoffziels und der aktiven Wirkform	84
3.2.1 Affinitätsmarkierung	87
3.2.2 Fluoreszenzmarkierung.....	89
3.3 Untersuchung der Stabilität	95
3.3.1 Chemische Stabilität.....	96

3.3.2	Plasmastabilität	97
3.4	Wasserlöslichkeit und präklinische Formulierung	98
4	Zusammenfassung.....	102
5	Experimenteller Teil	106
5.1	Material und Methoden.....	106
5.2	Allgemeine Synthesevorschriften (ASV).....	109
5.2.1	ASV1 – Alkylierung von Ethyl-4-hydroxybenzoat (WILLIAMSON-Synthese)	109
5.2.2	ASV2 – Alkalische Hydrolyse von Carbonsäureestern.....	110
5.2.3	ASV3 – Kupplungsreaktion mit EDC	111
5.2.4	ASV4 – Kupplungsreaktion mit HATU.....	112
5.2.5	ASV5 – Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin 1,3-dipolare Cycloaddition (CuAAC)	113
5.3	Synthesevorschriften	114
5.3.1	Carbonsäureester	114
5.3.2	Carbonsäuren	124
5.3.3	KSK-Analoga: Region A	137
5.3.4	KSK-Analoga: Region B	157
5.3.5	KSK-Analoga: Region C	164
5.3.6	Wirkstoffsonden.....	193
6	Literaturverzeichnis.....	196

Abkürzungen

A

Abs.	absolut
ADH	Alkoholdehydrogenase
ADME	Absorption, Distribution, Metabolismus, Elimination
AG	Arabinogalactan
AGP	Arabinogalactan-Peptidoglycan Komplex
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
ALDH	Aldehyddehydrogenase
Å	Angström [10^{-10} m]
Äq.	Äquivalent
ASV	Allgemeine Synthesvorschrift
ATP	Adenosintriphosphat
AU	<i>Absorbance units</i>
AUC	<i>Area under curve</i> (Fläche unter der Kurve)

B

BCG	<i>Bacillus CALMETTE-GUÉRIN (M. bovis)</i>
BDQ	Bedaquilin
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
br s	breites Singulett

C

CDI	1,1'-Carbonyldiimidazol
CFU	<i>Colony forming units</i> (koloniebildende Einheiten)
CLSI	<i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i>
COVID-19	Coronavirus SARS-CoV-2
COX	Cytochrom-c-Oxidase
CSA	Camphersulfonsäure
CuAAC	Kupfer-katalysierte Azid-Alkin 1,3-dipolare Cycloaddition
CYP	Cytochrom P450

D

δ	Chemische Verschiebung [ppm]
DC	Dünnschichtchromatographie
<i>d</i>	deutero

DHPS	Dihydropteroat-Synthase
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
4-DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMD	Delamanid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DPPA	Diphenylphosphorylazid
DST	<i>Drug susceptibility test</i>
d	Dublett
E	
EAB	Europäisches Arzneibuch
EDC	3-(Ethyliminomethylidenamino)- <i>N,N</i> -dimethyl-propan-1-amin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMB	Ethambutol
EmbA-C	Arabinosyltransferase A-C
ESI	Elektrosprayionisation
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
ESIPT	<i>Excited-state intramolecular proton transfer</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
EtOH	Ethanol
F	
6-FAM	6-Carboxyfluorescein
FAS-I	Typ I Fettsäure-Synthase
FAS-II	Typ II Fettsäure-Synthase
FAB	Fettsäurebiosynthese
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
G	
Gl.	Gleichung
H	
h	Stunde(n)
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorophosphat
hept.	Heptett
HepG2	<i>Human liver cancer cell line</i>
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus

HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRMS	Hochauflösende Massenspektrometrie
Hz	Hertz
I	
IBCF	Isobutylchloroformiat
IFN- γ	Interferon- γ
IGRA	Interferon- γ -Freisetzungstest
INH	Isoniazid
InhA	Enoyl-Acyl-Trägerprotein Reduktase
J	
J	Kopplungskonstante
K	
KatG	Katalase-Peroxidase
kat.	Katalytisch
konz.	konzentriert
K_s	Säurekonstante
KZN	Kwazulu-Natal Region (Südafrika)
L	
LAM	Lipoarabinomannan
LC-MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
LM	Lipomannan
$\log P_{O/W}$	Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
log	Logarithmus
LTBI	Latente Tuberkulose-Infektion
M	
m	Multipllett
M	Molare Masse
M	molar [mol/L]
mol	Mol
μ	Mikro [10^{-6}]
<i>m</i>	<i>meta</i>
<i>M</i>	Mittelwert
<i>m</i> CPBA	<i>meta</i> -Chlorperbenzoesäure
MDR	<i>Multidrug-resistant</i>
Me	Methyl

MHz	Megahertz [10^6 Hz]
MHK ₉₀	Minimale Hemmkonzentration für 90 % der getesteten Stämme
min	Minute(n)
mRNS	<i>messenger</i> -Ribonukleinsäure-Einzelstrang
MRC-5	<i>Medical Research Council cell strain 5</i>
MTBK	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> Komplex
M.	<i>Mycobacterium</i>
N	
Na ₂ EDTA	Dinatriummethyldiamintetraacetat
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NCS	<i>N</i> -Chlorosuccinimid
NEt ₃	Triethylamin
NHPI	<i>N</i> -Hydroxyphthalimid
NMR	Kernspinresonanz
nm	Nanometer [10^{-9} m]
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
NTM	Nicht-tuberkulöse Mykobakterien
O	
<i>o</i>	<i>ortho</i>
OM	äußere Membran
P	
<i>p</i>	<i>para</i>
PABS	<i>para</i> -Aminobenzoesäure
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PDIM	Phthioceroldimykcerosate
PEG	Polyethylenglykol
PFA	<i>para</i> -Formaldehyd
PG	Propylenglykol
PG	Peptidoglycan
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PIMs	Phosphatidylinositolmannoside
pK _s	Negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante K _s
PM	Plasmamembran
PMD	Pretomanid
POS	Pyrazincarbonsäure

Pr	Propyl
PZA	Pyrazinamid
PZase	Pyrazinamidase/Nicotinamidase
Q	
q	Quartett
quin.	Quintett
R	
RIF	Rifampicin
RNS	Ribonukleinsäure-Einzelstrang
RNSP	RNS-Polymerase
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
S	
s	Singulett
SAR	<i>Structure-activity relationship</i> (Struktur-Aktivitäts Beziehung)
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SD	Standardabweichung
Ser	Serin
SI	Selektivitätsindex
SM	Streptomycin
S _N 2	Nucleophile Substitution zweiter Ordnung
SPR	<i>Structure-property relationship</i>
<i>Staph.</i>	Staphylococcus
T	
t	Triplett
TB	Tuberkulose
TDM	Trehalose Dimycolat
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
THP-1	<i>Human monocytic cell line</i>
THP	Tetrahydropyran
THT	<i>Tuberkulin</i> -Hauttest
TMM	Trehalose Monomycolat
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
t _R	Retentionszeit

tRNS *transfer*-Ribonukleinsäure-Einzelstrang

U

UN *United Nations*

UV Ultraviolett

W

WHO *World Health Organization* (Weltgesundheitsorganisation)

X

XDR *Extensively drug-resistant*

1 Einleitung

1.1 Tuberkulose

Tuberkulose (TB) ist eine weltweit verbreitete bakterielle Infektionskrankheit, deren Spuren sich bis in die Jungsteinzeit zurückverfolgen lassen.¹ Mit Beginn der modernen menschlichen Existenz und der einhergehenden Bildung dichter Populationszentren nahm der unrühmliche Erfolg der TB ihren Lauf, bis sie im 18. Jahrhundert in Westeuropa erstmals epidemische Ausmaße annahm. Zu der Zeit war sie mit einer Mortalität von mehr als 900 Toten pro 100.000 Einwohnern pro Jahr für rund 25 % aller Todesfälle verantwortlich.^{2,3} Die Lage verschlimmerte sich im Zuge der industriellen Revolution aufgrund schlechter Lebens- und Arbeitsverhältnisse der Arbeiterklasse in Großstädten. Hohe Bevölkerungsdichten, mangelhafte Belüftung und sanitäre Einrichtungen sowie Unterernährung waren entscheidende Risikofaktoren, die zu einer erfolgreichen Verbreitung der Tuberkulose beitrugen. Aufgrund der weiten Verbreitung der Krankheit in Kombination mit der anämischen Blässe, die mit einer TB-Erkrankung einherging, etablierte sich der Ausdruck *weiße Pest*. Ein weiteres Jahrhundert waren Auslöser und Ursprung der Erkrankung unbekannt und Thema intensiver Diskussionen in Medizin und Wissenschaft.⁴ Erste Erkenntnisse zur Pathogenese und zu physischen Anzeichen der TB gewährte die Arbeit des französischen Arztes THÉOPHILE LAENNEC im frühen 19. Jahrhundert. Einige Jahre später konnte der französische Militäarchirurg JEAN-ANTOINE VILLEMEN die infektiöse Natur der Krankheit demonstrieren.⁵

Entscheidenden Einfluss auf die weitere Geschichte der TB nahm der deutsche Mediziner und Mikrobiologe Dr. ROBERT KOCH, als er am 24. März 1882 seine Forschungsergebnisse zur Entdeckung, Isolierung und erfolgreichen Kultivierung des *Tuberkelbazillus* veröffentlichte.⁶ Er identifizierte diesen erstmals als Erreger der Tuberkulose und definierte damit einen bahnbrechenden Meilenstein im Kampf gegen TB. Kurz nach seiner Entdeckung wurde der Erreger in *Mycobacterium tuberculosis* umbenannt und in den folgenden Jahren beschäftigte sich KOCH mit der weiteren Charakterisierung des Bakteriums und der Ätiologie der Tuberkulose. Für seine Forschung erhielt er im Jahr 1905 den Nobelpreis für Medizin und einen weltweiten Ruf als Mitbegründer der modernen Bakteriologie und Mikrobiologie.^{4,7}

Auch heute ist die Tuberkulose noch eine der führenden Todesursachen weltweit und bis zum Beginn der Coronavirus (COVID-19) Pandemie war sie sogar die tödlichste Krankheit, die durch einen einzelnen Erreger ausgelöst wird.⁸

1.1.1 Epidemiologie

Nach Einschätzung der Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organization*, kurz: WHO) war im Jahr 2020 knapp ein Drittel der Weltbevölkerung mit dem Erreger der Tuberkulose infiziert. Von diesen rund zwei Milliarden latent erkrankten Menschen entwickeln etwa 5 – 10 % im Verlauf ihres Lebens eine aktive Tuberkulose-Erkrankung. Diese Chance ist durch Komorbidität mit HIV/AIDS oder durch diverse Risikofaktoren wie Luftverschmutzung, Unterernährung, Diabetes, Rauchen und Alkoholkonsum um ein Vielfaches erhöht. Unabhängig von Alter oder Geschlecht kann jeder an Tuberkulose erkranken, wobei Männer mit 56 % aller Fälle am häufigsten und Frauen (33 %) sowie Kinder (11 %) seltener betroffen sind.⁸⁻¹⁰

Weltweit forderte die Tuberkulose im Jahr 2020 rund 1.3 Millionen Leben HIV-negativer und 214.000 Leben HIV-positiver Menschen, wodurch sie nach Einschätzung der WHO auf Platz 10 der häufigsten Todesursachen weltweit einzuordnen ist.⁸

Tuberkulose ist eine Erkrankung, deren Auftreten sowie Mortalität stark mit geringem Wohlstand, mangelhafter Infrastruktur und Hygiene sowie niedriger Qualität des Gesundheitssystems korrelieren. Daraus resultieren besonders hohe Fallzahlen in Regionen Südostasies und Afrikas von bis zu zwei Millionen Erkrankten im Jahr 2020 (Abbildung 1) und ein globaler Anteil von 85 % aller TB-Erkrankungen mit Todesfolge in diesen Regionen.^{8,11}

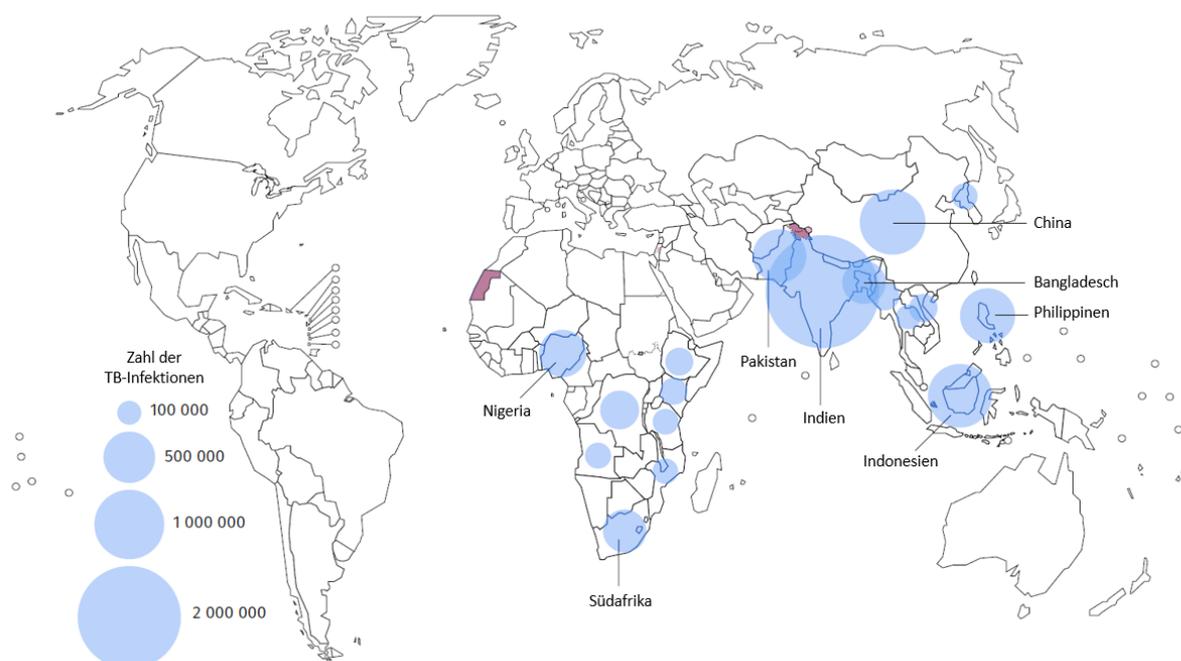


Abbildung 1: Geschätzte Zahl der TB-Infektionen im Jahr 2020 für Länder mit wenigstens 100.000 Fällen (die acht benannten Länder machten dabei zwei Drittel der weltweiten Fälle aus).⁸

Alle WHO-Mitgliedsstaaten sowie Mitglieder der Vereinten Nationen (UN) einigten sich in den Jahren 2014 und 2015 auf eine *End TB Strategy* mit dem Ziel, die globale TB-Epidemie bis zum Jahr 2035 zu beenden. Diese Strategie sieht neben der Verringerung von Inzidenz und Todesfällen auch die Kostenregulierung für Diagnostik und Behandlung vor und basiert auf drei Grundpfeilern: (1) Patienten-bezogene Pflege und Prävention; (2) strenge Richtlinien und unterstützende Systeme; (3) intensivierete Forschung und Innovation (Tabelle 1).^{12,13}

Tabelle 1: Die 2014/15 vereinbarte End TB Strategy der WHO- und UN-Mitgliedsstaaten.^{12,13}

Indikatoren	Meilensteine		Ziele	
	2020	2025	2030	2035
Prozentuale Verringerung der Todesfälle	35 %	75 %	90 %	95 %
Prozentuale Verringerung der Inzidenz	20 %	50 %	80 %	90 %
Prozente der Haushalte, die durch TB hohe Kosten haben	0 %	0 %	0 %	0 %

Das Aufkommen der Coronavirus (COVID-19) Pandemie im Jahr 2020 hat allerdings jahrelangen, globalen Fortschritt zur Einhaltung der gesetzten Ziele deutlich beeinträchtigt. Von 2019 bis 2020 konnte zwar ein Rückgang der registrierten Neuerkrankungen um 18 % festgestellt werden, der jedoch laut WHO als Folge pandemischer Zustände anzusehen ist. Sowohl das Angebot als auch die Nachfrage an TB-Diagnostik und Behandlung ist durch Pandemie-induzierte Faktoren deutlich beeinträchtigt worden. Dazu zählen unter anderem die allgemeine Belastung des Gesundheitssystems, die Einschränkung der Mobilität im Zuge von Lockdowns, das Risiko einer Ansteckung in Einrichtungen des Gesundheitswesens während einer Pandemie und nicht zuletzt das Stigma der ähnlichen Symptomatik von TB und COVID-19. Als direkte Konsequenz aus dem Rückgang der diagnostizierten Neuerkrankungen sei ein Anstieg der Todesfälle durch TB (ca. 10 %) anzusehen, wodurch die COVID-19 Pandemie ebenfalls den Fortschritt, in Bezug auf Verringerung der Mortalität, rückgängig gemacht hat.⁸

Die Meilensteine für das Jahr 2020 (Tabelle 1) konnten nicht erreicht werden und dieser Trend wird Prognosen der WHO zufolge in den kommenden Jahren fortgesetzt, sodass auch das Erreichen der nächsten Meilensteine nicht erwartet werden kann.⁸

1.1.2 Pathogenese

Im Jahr 1882 identifizierte ROBERT KOCH das *Mycobacterium tuberculosis* erstmalig als verantwortlichen Erreger der humanen Tuberkulose.⁶ Dabei handelt es sich um ein Pathogen, welches aufgrund seiner aerogenen Übertragbarkeit primär die Lunge befällt (pulmonale TB). Durch Husten oder Niesen einer infizierten Person wird pathogenhaltiges Sputum ausgeworfen und kann als Aerosol inhalativ in die Lunge eines neuen Wirtes gelangen (Abbildung 2). In den Lungenbläschen (Alveolen) begegnet das Bakterium den ansässigen Makrophagen und kann dort durch Rezeptor-medierte Phagozytose internalisiert werden. Nachfolgende Fusion des entstandenen Phagosoms mit einem Lysosom führt schließlich zur Eliminierung des Bakteriums.^{14–16}

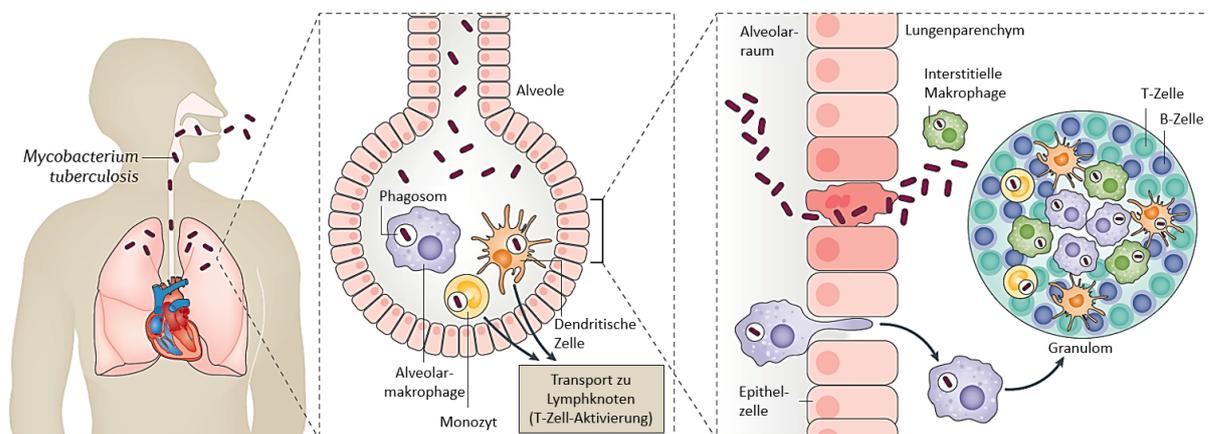


Abbildung 2: Beginn einer TB-Infektion durch Inhalation des *Mycobacterium tuberculosis* und Bildung eines Granuloms.¹⁴

Läuft diese erste Immunreaktion nicht bzw. unvollständig ab, gelangt das Bakterium entweder durch Infizierung von Epithelzellen oder durch Migration infizierter Makrophagen ins Lungenparenchym, wo es schließlich auch interstitielle Makrophagen befällt (Abbildung 2).¹¹

Zeitgleich wird der Erreger zu pulmonalen Lymphknoten transportiert, wo im Zuge einer zweiten Immunreaktion die Aktivierung weiterer Immunzellen (T- und B-Zellen) stattfindet.^{17,18} Diese werden ebenfalls ins Lungenparenchym rekrutiert und lagern sich dort sukzessive an infizierte Zellen an. Das entstehende Granulom isoliert die Erreger zwar von der Umgebung, führt aber nicht zu deren Eliminierung.¹⁹ Die genaue Funktion und der Mechanismus hinter der Bildung von Granulomen sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Durch Kombination von Lasermikrodissektion, massenspektrometrischer Untersuchung und Konfokalmikroskopie konnten allerdings entzündungsfördernde Enzyme im Zentrum und ein vergleichsweise entzündungshemmender Charakter im äußeren Bereich nachgewiesen werden.²⁰

Das *Mycobacterium tuberculosis* kann im Granulom für mehrere Wochen bis zu Jahrzehnten überdauern (Dormanz) und vermag sich währenddessen sogar zu vermehren (intrazelluläre Pathogenese). In diesem Stadium spricht man von einer nicht-infektiösen, latenten TB-Infektion (LTBI) ohne Symptomatik (Abbildung 3).¹⁴

In Folge einer Immunschwäche oder wachsender bakterieller Last kann ein Granulom kollabieren und die darin enthaltenen Bakterien freisetzen. Die zuvor im Granulom isolierten Bakterien verteilen sich nun über den Blutkreislauf im Körper und können weitere Organe befallen (extrapulmonale TB) oder zurück in den Atemtrakt gelangen.^{11,19} Der betroffene Wirt entwickelt milde bis schwere Symptome, ist nun infektiös und leidet an einer aktiven TB-Erkrankung (Abbildung 3). Zu den gängigen Symptomen einer pulmonalen TB-Erkrankung zählen anhaltender bis blutiger Husten, Fieber, Müdigkeit, Appetitlosigkeit, Gewichtsverlust und Nachtschweiß. In einigen Fällen ist die bakterielle Last so gering, dass zunächst eine asymptomatische, subklinische TB-Erkrankung vorliegt, die meist noch nicht infektiös ist.¹⁴

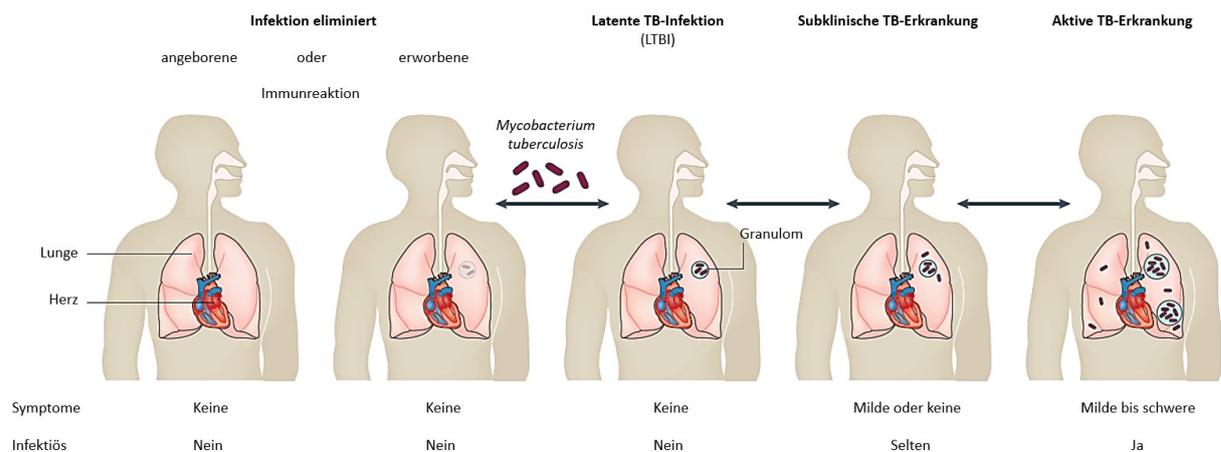


Abbildung 3: Spektrum der Tuberkulose (TB) – von der Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis* bis zur aktiven pulmonalen TB-Erkrankung.¹⁴

Nicht selten verläuft eine TB-Erkrankung tödlich; insbesondere die Abwesenheit einer angemessenen Behandlung führt für 70 % der erkrankten Personen zum Tod, wobei Alter und HIV-Infektion (neben weiteren Risikofaktoren) die Mortalität sogar auf 83 % steigern. Die Dauer einer unbehandelten TB-Erkrankung, von Beginn bis zum Tod oder Selbstheilung, beträgt dabei ca. drei Jahre.²¹

Durch rechtzeitige Diagnose und adäquate Behandlung lässt sich die Mortalität allerdings auf unter 25 % reduzieren.²²

1.1.3 Prävention, Diagnose und Behandlung

ROBERT KOCH stellte im Jahr 1890 erstmals einen potenziellen Impfstoff gegen Tuberkulose vor – das *Tuberkulin*. Es bestand aus einem (zunächst geheimen) Extrakt gereinigter und selektierter Proteine aus dem *Mycobacterium tuberculosis* in Glycerin und wurde, aufgrund der prekären Lage in Deutschland, mit Hoffnung und großer Euphorie angenommen.²³ Schnell wurde das *Tuberkulin* am Menschen getestet und nach anfänglichen Heilerfolgen auch auf den Markt gebracht. Als sich Meldungen von Todesfällen häuften (*Tuberkulin*-Skandal), sah sich KOCH gezwungen, die Zusammensetzung des *Tuberkulins* zu veröffentlichen und nur wenig später wurden die Impfungen mit dem vermeintlichen Heilmittel eingestellt.²⁴

Im Jahr 1921 veröffentlichten die französischen Immunologen ALBERT CALMETTE und CAMILLE GUÉRIN Ergebnisse zur fortlaufenden Subkultivierung des *Mycobacterium bovis* (zoonotisch übertragbarer TB-Erreger bei Rindern) und dem Resultat eines attenuierten Bakteriums (*Bacillus CALMETTE-GUÉRIN*, BCG). Durch ausreichend abgeschwächte Virulenz im Verlauf von 13 Jahren konnte das BCG erfolgreich als Lebendimpfstoff für den Einsatz am Menschen eingeführt werden und wird bis heute als einziger Impfstoff zur TB-Prävention bei Neugeborenen eingesetzt.²⁵ Die WHO empfiehlt die BCG-Impfung in Form einer Einzeldosis auch für Kinder in Ländern mit einer hohen TB-Inzidenz bzw. anderen Risikofaktoren.⁸ Die Impfung schützt Neugeborene und Kinder in 19 – 27 % der Fälle vor einer Infektion und verringert die Chance zur Entwicklung einer aktiven TB-Erkrankung um 71 %.²⁶ Für Erwachsene sind diese Chancen sehr inkonsistent und variieren zwischen 0 und 80 %. Gründe für diese große Schwankung sind nicht vollständig geklärt und werden in der Fachliteratur diskutiert.^{27–30} Der Schutz durch eine BCG-Impfung konnte für eine Dauer von 15 Jahren nachgewiesen werden, wobei die Abwesenheit eines Beweises für den Schutz über eine längere Zeit nicht gleichzeitig dessen Abwesenheit impliziert.³¹

Die Diagnostik für TB findet in Abhängigkeit des Krankheitsstadiums statt – latente TB-Infektion (LTBI) oder aktive TB-Erkrankung.

Zur Identifizierung einer LTBI existieren zwei valide Methoden: der *Tuberkulin*-Hauttest (THT) und der Interferon- γ -Test (IGRA).^{32,33} Mit ersterem wird eine Immunreaktion von T-Lymphozyten auf Antigene des *Mycobacterium tuberculosis* geprüft. Dazu wird ein international standardisiertes *Tuberkulin*-Extrakt intrakutan verabreicht und die resultierende Hautreaktion nach 72 Stunden ausgewertet. Liegt im Bereich der Injektion eine Verhärtung des Gewebes vor (Immunreaktion auf die injizierten, mykobakteriellen Antigene), ist der THT als positiv anzusehen.³⁴ Durch eine vorangegangene BCG-Impfung oder Infektion mit nicht-tuberkulösen Mykobakterien (NTM) kann dieser Nachweis falsch-positiv ausfallen.³⁵

Im Zuge des IGRA wird die Aktivität von T-Gedächtniszellen im Blut eines Probanden (*in vitro*) durch Zugabe spezifischer, mykobakterieller Antigene geprüft. Hatten die Gedächtniszellen in der Vergangenheit bereits Kontakt zu diesen Antigenen, kann innerhalb eines Tages die Sekretion von Interferon- γ (IFN- γ) festgestellt und eine LTBI diagnostiziert werden.³⁴ Der IGRA weist eine deutlich höhere Spezifität auf, da die gewählten Antigene sowohl im BCG-Impfstamm als auch in anderen NTM fehlen.³⁶ Beide Test-Verfahren können allerdings nicht zwischen Neu- oder Reinfektion differenzieren und tragen auch nicht zur Vorhersage des Krankheitsverlaufs einer aktiven TB-Erkrankung bei.^{37,38}

Die Diagnose einer aktiven TB-Erkrankung erfolgt hauptsächlich durch eine Kombination vier verschiedener Methoden: Mikroskopie des Sputums^{39,40}, Kultivierung des Bakteriums⁴¹, molekulare Tests^{42,43} und bildgebende Verfahren.⁴⁴ Aufgrund guter Verfügbarkeit und geringer Kosten ist die mikroskopische Untersuchung des Sputums die meistgenutzte Methode in Ländern mit hoher Inzidenz, wobei die WHO die Verwendung molekularer Tests mit deutlich größerer Präzision empfiehlt.⁹

Auch in Bezug auf die medikamentöse Behandlung unterscheiden sich LTBI und die aktive TB-Erkrankung. In beiden Fällen erstreckt sich eine effektive Therapie zwar über mehrere Monate, sieht dabei allerdings verschiedene Kombinationen mehrerer Antibiotika vor. Zur Behandlung der LTBI empfiehlt die WHO vier verschiedene Therapien, deren Wirksamkeiten bei strikter Einhaltung nachweisbar und wohl bekannt sind:^{38,45}

- Isoniazid (6 – 9 Monate)
- Rifapentin und Isoniazid (3 Monate)
- Rifampicin und Isoniazid (3 – 4 Monate)
- Rifampicin (3 – 4 Monate)

Die Dauer der Behandlung in Kombination mit meist milder Symptomatik einer LTBI kann die Therapietreue der Patienten auf die Probe stellen. Die Missachtung der vorgeschriebenen Therapie hat allerdings massiven Einfluss auf die Krankheitsentwicklung, weshalb adäquate Aufklärung und begleitende Beratung unabdingbar sind, um einen Therapieerfolg gewährleisten zu können.^{38,46}

Die Behandlung einer aktiven TB-Erkrankung erstreckt sich über mindestens sechs Monate und setzt sich aus einer komplexeren Antibiotika-Kombination, den sogenannten Mitteln erster Wahl, zusammen. Die Therapie beginnt in der Regel mit einer zweimonatigen Intensivphase – tägliche Einnahme von Isoniazid, Pyrazinamid, Ethambutol und Rifampicin – und wird ergänzt durch eine viermonatige kontinuierliche Phase – tägliche Einnahme von Isoniazid und Rifampicin (Abbildung 4).⁴⁷ Die Frequenz der Dosierung kann variieren und hängt dabei von Risikofaktoren, Vorerkrankungen oder der Art der Erkrankung (Neu- oder Reinfektion) ab.⁴⁸

Der Heilungsverlauf wird dabei meist durch Sputum-Abstrich, Kultivierung des Bakteriums und Röntgenaufnahmen des Thorax verfolgt. Die realistische Erfolgschance einer sechsmonatigen Therapie wird auf 86 % geschätzt.¹²

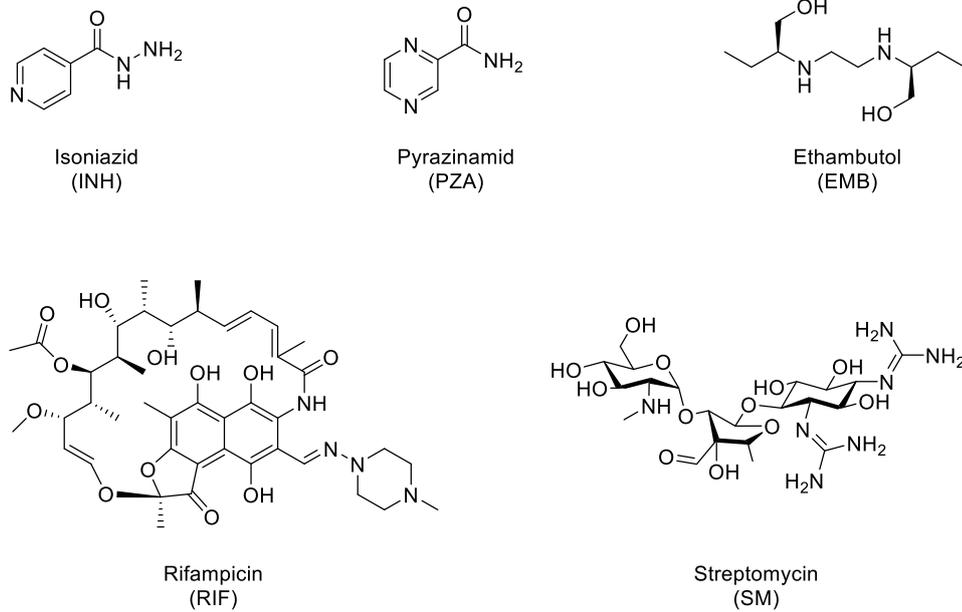


Abbildung 4: Empfohlene Mittel der ersten Wahl zur Behandlung einer aktiven pulmonalen TB.⁴⁷

Nicht selten kommt es zu Nebenwirkungen milder Natur (Hautausschlag, Magen-Darm-Probleme, Kribbeln der Extremitäten oder Gelenkschmerzen), die symptomatisch und ohne Unterbrechung der Therapie behandelt werden können. Zu den stärkeren Nebenwirkungen zählen Hepatitis, Blutungsstörung, Rückgang weißer und roter Blutkörperchen, Nierenversagen, Entzündung des Sehnervs und Beeinträchtigung des Hör- und Gleichgewichtsorgans.^{49,50} Etwaige Nebenwirkungen können die Therapietreue eines Patienten zusätzlich untergraben, weshalb kontinuierliche Beratung an Bedeutung gewinnt.⁵¹

1.2 *Mycobacterium tuberculosis*

Mykobakterien (*Mycobacterium*, *M.*) stellen die einzige Gattung aus der Familie der *Mycobacteriaceae* dar. Es handelt sich um aerobe, unbewegliche und meist stäbchenförmige Bakterien, die sich durch einen besonders hohen Gehalt an Wachsen und Fetten in der Zellwand von den meisten anderen Bakterien unterscheiden. Dieser stark hydrophobe Charakter sorgt für eine inhärente Festigkeit gegenüber Säuren und Basen, weshalb besondere Färbemethoden, wie die Ziehl-Neelsen- oder Auramin-Färbung zur adäquaten mikroskopischen Darstellung notwendig sind.⁵² Durch die herkömmliche Gram-Färbung sind Mykobakterien nur sehr schlecht anzufärben, obwohl ihr Aufbau weitgehend dem Gram-positiver Bakterien entspricht.⁵³ Mykobakterien wachsen mit einer Generationszeit von 12 – 24 Stunden nur sehr langsam, da die Nährstoffversorgung durch die hydrophobe Ummantelung stark beeinträchtigt ist.⁵⁴ In wässrigen Kulturmedien bilden sie nach ca. 7 Tagen sichtbare, pilzähnliche Kolonien an der Oberfläche; eine namensgebende Eigenschaft (*Myko-*, griech. *mýkēs* = Pilz).⁵²

Mykobakterien werden in Abhängigkeit von ihrer Epidemiologie und Pathogenese in drei Gruppen unterteilt:⁵⁵

- *Mycobacterium tuberculosis* Komplex (MTBK)
- *Mycobacterium leprae*
- Nicht-tuberkulöse Mykobakterien (NTM)

Der MTBK fasst alle Erreger zusammen, die bei Mensch und Tier verantwortlich für die Ausbildung einer TB-Erkrankung sind. Populäre Vertreter des MTBK, mit einer DNS-Homologie von > 95 %, sind unter anderem *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* und *M. microti*.⁵² Sie existieren Koaleszenz-Analysen zufolge seit ungefähr 70.000 Jahren und expandierten durch Migration des anatomisch modernen Menschen sowie Bildung dichter Populationszentren und Tierhaltung.²

Das *Mycobacterium leprae* ist Erreger der Lepra und unter NTM versteht man alle weiteren fakultativ pathogenen Mykobakterien, die vielfältig in der Umwelt vorkommen, aber deutlich geringere Virulenz aufweisen.^{52,56}

Aus der Gesamtheit aller Mykobakterien sticht das *M. tuberculosis* aufgrund seiner unübertroffenen Ausbreitung in der Weltbevölkerung in Kombination mit hoher Mortalität hervor. Wegen seiner außergewöhnlichen Anpassungs- und Widerstandsfähigkeit gegenüber äußeren Umwelteinflüssen

chemischer oder physikalischer Natur (bspw. pH-Wert, Kälte, Nährstoffmangel, Hypoxie) gilt das *M. tuberculosis* als eines der erfolgreichsten bakteriellen Pathogene der Menschheitsgeschichte.^{57,58}

Dieser unrühmliche Erfolg basiert maßgeblich auf dem einzigartig komplexen Aufbau der mykobakteriellen Zellhülle sowie den daraus resultierenden Eigenschaften (Abbildung 5).⁵⁹

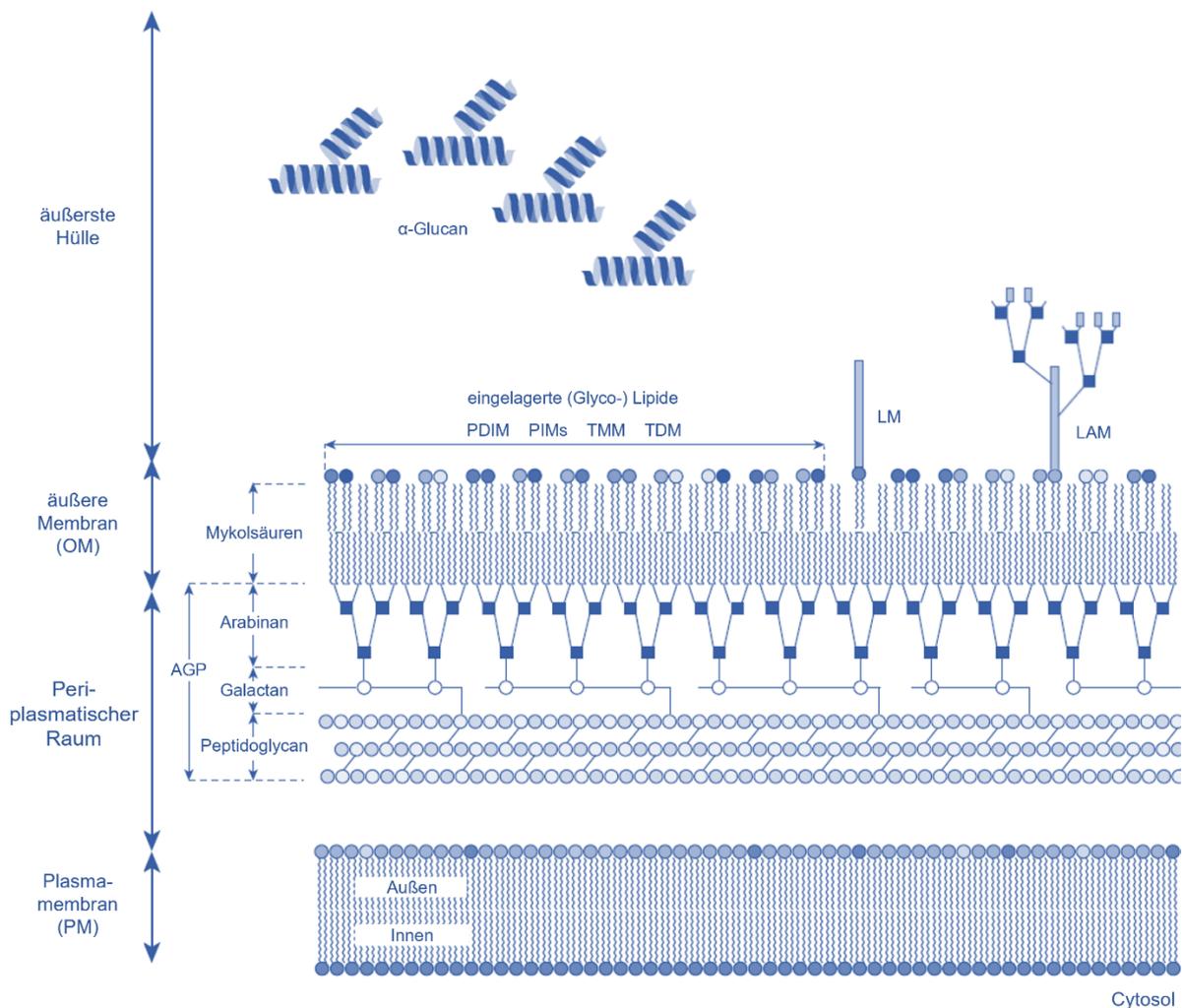


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Zellhülle des *M. tuberculosis* – 1. innere Plasmamembran (PM), 2. Arabinogalactan-Peptidoglycan Komplex (AGP), 3. asymmetrische, äußere Membran (OM) oder Mykomembran, 4. äußerste Hülle.⁵⁹

Die typische bakterielle Plasmamembran (PM) ist zusätzlich von einem Arabinogalactan-Peptidoglycan Komplex (AGP) umgeben, der wiederum kovalent mit der asymmetrischen äußeren Membran (OM) oder Mykomembran verbunden ist. Zusammen stellen AGP und Mykomembran den Kern der mykobakteriellen Zellwand dar und sind verantwortlich für die meisten Eigenschaften der Bakterien.

Abschließend wird das Mykobakterium von einer äußersten Hülle aus nicht-kovalent gebundenen Lipiden, neutralen Polysacchariden wie α -Glucan und (porenbildenden) Proteinen umgeben.^{56,59,60}

Der AGP besteht aus Peptidoglycan (PG), welches kovalent mit dem Heteropolysaccharid Arabinogalactan (AG) verbunden ist. Die Mykomembran setzt sich aus langkettigen ($C_{70} - C_{90}$) α -Alkyl, β -Hydroxyfettsäuren (Mykolsäuren) und aus nicht-kovalent eingelagerten (Glyco-) Lipiden bzw. Lipoglycanen zusammen. Dazu zählen Phosphatidylinositolmannoside (PIMs), Phthioceroldimykocerosate (PDIM), Trehalose Mono- (TMM) und Dimycolat (TDM), Lipomannan (LM) und Lipoarabinomannan (LAM).^{60,61} Sie regulieren die Immunreaktion des Wirts und sichern ultimativ das Überleben im Phagosom durch Beeinträchtigung der Signaltransduktion.⁶²⁻⁶⁴ Zusätzlich tragen die Mykolsäuren als Hauptbestandteil der mykobakteriellen Zellhülle durch ihren stark hydrophoben Charakter erheblich zur Widerstandsfähigkeit und Virulenz des Bakteriums bei.⁶⁵ Die Biosynthese der Mykolsäuren erfolgt durch ein komplexes Zusammenspiel der Fettsäure-Synthasen I und II (FAS), weiterer Enzyme (Methyltransferasen, Desaturasen, Carboxylasen, Isomerasen) und abschließender CLAISEN-Kondensation.^{65,66} Als Trehaloseester werden die Mykolsäuren ins Periplasma transportiert und dort entweder mit AG verestert oder mit einem weiteren Molekül Trehalose Monomycolat (TMM) zu Trehalose Dimycolat (TDM) umgesetzt und eingelagert.⁶⁷

Der einzigartige Aufbau und die hohe Lipophilie der Zellhülle führen zusätzlich zu sehr geringer Permeabilität und somit einer intrinsischen Resistenz gegenüber diversen Arzneistoffen und Antibiotika.⁶¹

1.3 Arzneistoffe zur Therapie der Tuberkulose (Antituberkulotika)

1.3.1 Wirkmechanismen

Seit den 1940er Jahren werden Antibiotika intensiv und weit verbreitet zur Behandlung bakterieller Infektionen genutzt.⁶⁸ Sie werden in Abhängigkeit von ihrer Wirkung als bakteriostatisch oder bakterizid definiert. Erstere inhibieren das Zellwachstum und somit die Vervielfältigung des Pathogens, sodass das Immunsystem des Wirtes in der Lage ist, den Erreger aus eigener Kraft zu eliminieren. Im Gegensatz dazu tötet ein bakterizides Arzneimittel den pathogenen Mikroorganismus aktiv ab. Der Erfolg antibakterieller Wirkstoffklassen basiert auf dem Unterschied zwischen humanen und bakteriellen Zellen. Fundamentale Abweichungen im Aufbau und in Stoffwechselprozessen ermöglichen das selektive Eliminieren bakterieller Erreger neben humanen Zellen.⁶⁹ Zur Darstellung der Selektivität eines Wirkstoffes kann der Quotient aus der Konzentration, bei der Zytotoxizität gegenüber menschlichen Zellen besteht, und der Konzentration, bei der bakterielles Wachstum im gewünschten Maß inhibiert wird, gebildet werden – Selektivitätsindex (SI).⁷⁰

Die üblichen antibiotischen Wirkstoffziele sind (1) Zellwandbiosynthese, (2) Membranpotential, (3) ribosomale Proteinbiosynthese, (4) Metabolismus sowie (5) Transkription und Replikation.^{68,69,71,72}

(1) Zellwandbiosynthese

Die Zellwand ist eine robuste Hülle, die das Bakterium vor äußeren Umwelteinflüssen wie physikalischem bzw. chemischem Stress oder osmotischem Druck schützt. Sie ist ein Heteropolymer, das aus quervernetzten Peptid- und Zuckereinheiten (Peptidoglycan) besteht. Humane Zellen besitzen keine Zellwand, weshalb sich die Biosynthese bakterieller Zellwände ausgezeichnet als Ziel für antibakterielle Wirkstoffe anbietet.⁶⁹ Antibiotika, die mit der Zellwandbiosynthese interagieren, blockieren entweder den Transport von Peptidoglycan-Monomeren ins Periplasma, inhibieren Transpeptidasen und verhindern somit die Bildung von Peptidvernetzung, inhibieren Transglycosidasen, die für glycosidische Bindungen zwischen Zuckern verantwortlich sind, oder inhibieren die Fettsäurebiosynthese (FAB).⁷¹ Durch den Verlust der strukturellen Integrität der Zellwand tritt Wasser in die Zelle ein, das Bakterium schwillt an und erliegt letztendlich dem osmotischen Druck. Populäre Antibiotika dieser Klasse sind β -Lactame, wie bspw. Penicilline oder Carbapeneme, mit bakterizider Wirkung auf proliferierende Organismen. Sie binden kovalent an das Serin im aktiven Zentrum von Transpeptidasen und blockieren das Enzym irreversibel.^{69,73}

Zur Behandlung einer aktiven pulmonalen TB werden u.a. Isoniazid (INH) und Ethambutol (EMB) als Mittel erster Wahl eingesetzt.⁴⁷

INH ist ein bakterizides Antituberkulotikum und interagiert mit der mykobakteriellen Fettsäuresynthese durch Inhibition der Enoyl-Acyl-Trägerprotein Reduktase (InhA). Dabei handelt es sich um ein Schlüsselenzym vom Typ II Fettsäuresynthese (FAS) System, welches die NADH-abhängige Reduktion von Doppelbindungen in zweiter Position einer wachsenden Fettsäurekette katalysiert und so für die Biosynthese essenzieller Mykolsäuren mitverantwortlich ist. INH ist ein *Prodrug* und gelangt zunächst durch passive Diffusion ins Zellinnere. Intrazellulär wird es durch das Enzym Katalase-Peroxidase (KatG) in das reaktive Isonicotinoylradikal überführt und bildet mit dem Cofaktor Nicotinamidadenindinukleotid (NAD⁺) ein kovalentes Isonicotinacyl-NADH Addukt. Dieses bindet als kompetitiver Inhibitor an InhA und hemmt die Synthese der für die Bakterien überlebensnotwendigen Mykolsäuren.⁷⁴

EMB ist ein bakteriostatisches Antituberkulotikum und interagiert mit der Zellwandbiosynthese durch Inhibition der Arabinosyltransferasen EmbA, EmbB und EmbC. EmbA und EmbB sind für die Synthese von Arabinogalactan (AG), einem Hauptbestandteil des Zellwandkerns, verantwortlich und EmbC inhibiert die Synthese des Oberflächen-Glycolipids Lipoarabinomannan (LAM). Deren Inhibition führt zu einem Mangel an AG-Einheiten (Bindungsstelle für Mykolsäuren), der die strukturelle Integrität der Zellwand schwächt, und zusätzlich zu einem Mangel an LAM, welches als wichtiger Virulenzfaktor die Interaktion zwischen Wirt und Pathogen steuert.⁷⁵

(2) Membranpotential

Die Plasmamembran ist eine schützende innere Doppellipidschicht und grenzt das Cytoplasma von der extrazellulären Umgebung ab.⁷⁶ Der Transport von Ionen durch die Plasmamembran ist von essenzieller Bedeutung für die Zelle und wird von spezifischen Membranproteinen reguliert. Durch sogenannte Ionophore kann dieser hochempfindliche Prozess gestört werden. Sie beeinflussen das Membranpotential durch die direkte (Transport) oder indirekte (Kanalbildung) Vermittlung von Ionen durch die Plasmamembran.⁷⁷ Das infolge der gesteigerten Membranpermeabilität gestörte ionische Gleichgewicht führt zum Absterben des bakteriellen Erregers. Wichtige Vertreter der Ionophore sind Polymyxin B, Valinomycin und Gramacidin A.⁶⁹

Seit den 1950er Jahren wird Pyrazinamid (PZA) als Mittel erster Wahl zur Behandlung einer TB-Erkrankung genutzt.⁷⁸ Lange waren Ziel und Mechanismus unbekannt, aber im Verlauf der Jahre konnten Studien zeigen, dass PZA und seine Metabolite mehrere biochemische Stoffwechselforgänge im Bereich von NAD- und Energie-Metabolismus sowie das Membranpotential durch Acidifizierung

beeinflussen.⁷⁹ PZA ist ein *Prodrug*, welches durch passive Diffusion ins Zellinnere gelangt, dort durch die Pyrazinamidase/Nicotinamidase (PZase) in die aktive Wirkform Pyrazincarbonsäure (POS) überführt wird und zunächst den bakteriellen Membrantransport durch Verschiebung des Protonengradienten hemmt. Aktiver Efflux sorgt für die Exkretion von POS, woraufhin es im sauren extrazellulären Milieu zu HPOS protoniert wird und anschließend erneut in die Zelle diffundiert. In Folge der Akkumulation von HPOS im Zellinneren sinkt der cytosolische pH-Wert, wodurch überlebensnotwendige Enzyme inhibiert werden und der Protonengradient weiter verschoben wird.^{79,80}

(3) Ribosomale Proteinbiosynthese

Die Proteinbiosynthese erfolgt durch makromolekulare Komplexe in Zellen – den Ribosomen. Sie übersetzen den genetischen Code (Nukleotidsequenz) eines *messenger*-Ribonukleinsäure-Einzelstrangs (mRNS) in die Aminosäuresequenz der Polypeptidkette eines Proteins (Translation).⁸¹ Prokaryotische Ribosomen sind mit einem Sedimentationskoeffizienten von 70S kleiner als eukaryotische (80S) und setzen sich aus einer 50S- und einer kleineren 30S-Untereinheit zusammen. Die 30S-Untereinheit bindet mRNS und initiiert die Proteinbiosynthese. Die Verbindung mit der 50S-Untereinheit führt zur Bildung des Ribosoms, welches anschließend *transfer*-RNS (tRNS) bindet und die Bildung einer Proteinkette katalysiert.^{69,82} Die 50S-Untereinheit besitzt drei Bindungsstellen für tRNS. Die Aminoacyl (A)-Stelle bindet tRNS mit der nächsten Aminosäure und die Peptidyl (P)-Stelle bindet tRNS mit der wachsenden Peptidkette. An der Exit (E)-Stelle wird freie tRNS ausgeschleust.⁸³ Die Elongation der Proteinkette erfolgt durch oszillierende Translokation der tRNS-Reste von P- und A-Position. Die wachsende Kette passiert einen Tunnel in der 50S-Untereinheit und gelangt so ins Cytoplasma, wo die Faltung des Proteins stattfindet.^{83,84}

Aufgrund der strukturellen Unterschiede zwischen pro- und eukaryotischen Ribosomen ist die Inhibition der Proteinbiosynthese ein mögliches Ziel für selektive, antibakterielle Wirkstoffe. Alle bekannten Wirkstoffe inhibieren die Proteinbiosynthese durch Bindung an das Ribosom und Hemmung verschiedener Stadien der Translation.^{69,85}

Dazu zählen Aminoglycoside (bakterizid) und Tetracycline (bakteriostatisch), die durch Bindung an die 30S-Untereinheit Ablesefehler der mRNS hervorrufen^{86,87} bzw. die Anlagerung von Aminoacyl-tRNS verhindern.^{88,89} Der bekannteste Vertreter der Aminoglycoside, das Streptomycin, wurde im Jahr 1943 erstmals erfolgreich isoliert (*Streptomyces griseus*) und als erstes Antituberkulotikum eingesetzt.⁹⁰ Im Vergleich dazu binden Makrolide (bakteriostatisch) an die 50S-Untereinheit und verhindern die Translokation des Peptidyl-Restes zwischen P- und A-Stelle.^{91,92}

Während die meisten Proteinbiosynthese-Hemmer in den Prozess der Translation eingreifen, verhindern Oxazolidinone (bakteriostatisch) die Proteinbiosynthese bereits vor Bildung der 70S Ribosomen und Beginn der Translation. Sie binden an die 50S-Untereinheit und blockieren diese, bevor sie sich mit dem Komplex aus mRNA und 30S-Untereinheit verbinden kann.^{69,93} Bis in den 1980er Jahren erstmals von antibakteriellen Eigenschaften der Oxazolidinone berichtet wurde, waren sie primär im Agrarwesen als Pflanzenschutzmittel im Einsatz. Linezolid ist eines der neueren Oxazolidinon-Antibiotika und wird seit dem Jahr 2000 erfolgreich zur Behandlung der aktiven pulmonalen TB-Erkrankung eingesetzt.^{94,95}

(4) Metabolismus

Die Inhibition des bakteriellen Zellmetabolismus erfolgt u.a. durch Antimetabolite. Dabei handelt es sich um Substanzen, die natürlichen Metaboliten chemisch und strukturell ähneln und deren Metabolisierung infolgedessen kompetitiv hemmen. Sie verdrängen die umzusetzenden Metabolite aus den aktiven Zentren der Enzyme, werden jedoch aufgrund struktureller Unterschiede selbst nicht umgesetzt. In seltenen Fällen allerdings findet eine Umsetzung dennoch statt, wobei die Produkte häufig ebenfalls Antimetabolite darstellen bzw. nicht verwertet werden können und sich anhäufen. Antimetabolite gelten als bakteriostatisch, da sich das Verhältnis der konkurrierenden Substanzen kontinuierlich zugunsten des natürlichen Metaboliten verschiebt, bis die kompetitive Inhibition zum Erliegen kommt.^{69,96}

Sulfone und Sulfonamide sind historische Antimetabolite, deren entzündungshemmenden und antibakteriellen Eigenschaften seit über 90 Jahren bekannt sind.⁹⁷ Im Jahr 1939 erhielt GERHARD DOMAGK den Nobelpreis für Medizin für die Entdeckung von *Prontosil*, dem ersten Sulfonamid, welches mit außerordentlichem Erfolg in klinischer Praxis zur Behandlung verschiedener Infektionskrankheiten eingesetzt wurde.⁹⁸ Die antibiotische Wirksamkeit von Sulfonen und Sulfonamiden beruht auf der Hemmung aerober sowie anaerober Respiration von Bakterien sowohl im Ruhezustand als auch während aktiver Zellteilung.⁹⁹ Sie sind Strukturanaloga der *para*-Aminobenzoesäure (PABS) und interferieren daher mit dem bakteriellen Folsäurestoffwechsel durch kompetitive Inhibition der Dihydropteroat-Synthase (DHPS). Über Zwischenschritte wird so die Bildung des Coenzym Tetrahydrofolsäure gestört, welches zur Synthese bakterieller DNS benötigt wird.¹⁰⁰ Eukaryotische Zellen sind nicht von der endogenen Synthese von Folsäure abhängig und ihnen fehlt das Enzym DHPS, weshalb sie nicht beeinträchtigt werden.¹⁰¹ Diese inhärente Selektivität macht Sulfone und Sulfonamide zu beliebten Strukturmotiven in Arzneimitteln.^{98,100}

(5) Transkription und Replikation

Transkription ist ein essenzieller Prozess, der die Synthese von RNS anhand einer DNS-Vorlage umfasst. Die RNS-Polymerase (RNSP) ist das verantwortliche Enzym und stellt aus verschiedenen Gründen ein vielversprechendes Ziel für Antiinfektiva dar: (1) die Transkription ist ein überlebensnotwendiger Prozess; (2) die Nukleotidsequenz bakterieller und humaner RNSP unterscheidet sich und ermöglicht Selektivität; (3) bakterielle RNSP ist stark konserviert und ermöglicht daher die Entwicklung von Breitbandantibiotika; (4) zahlreiche hochaufgelöste Molekülstrukturen ermöglichen gezielte, strukturbasierte Wirkstoffentwicklung.¹⁰² Die bakterielle RNSP besteht aus fünf Untereinheiten (α , α , β , β' , σ) und die Inhibition erfolgt durch Bindung an eine dieser Einheiten. Derzeit sind nur zwei Substanzklassen als Inhibitoren der bakteriellen Transkription zugelassen: Rifamycine und Fidaxomicin/Lipiarmicin.^{69,102}

Eines der erfolgreichsten Antituberkulotika ist das halbsynthetisch aus Rifamycin B gewonnene Rifampicin (RIF). Es hat bereits bei äußerst geringen Konzentrationen (10 ng/mL) einen stark bakteriziden Effekt und ergänzt die etablierte Antibiotika-Kombination um ein essenzielles Wirkstoffziel. Es bindet nicht-kovalent an die β -Untereinheit der bakteriellen DNS-abhängigen RNSP, bewirkt deren Konformationsänderung und verhindert so die Elongation der naszierenden RNS.^{103,104}

Replikation ist ebenfalls ein essenzieller Prozess, der für die Vervielfältigung des zellulären Erbgutes (DNS) verantwortlich ist.¹⁰⁵ Im Wesentlichen durchläuft die Replikation drei Phasen: (1) Während der Initiation wird die DNS-Doppelhelix durch eine Helikase aufgebrochen und die DNS-Polymerase III lagert sich an eine markierte Stelle (Primase) der aufgebrochenen DNS;¹⁰⁶ (2) in der folgenden Elongations-Phase findet die gleichzeitige Verdopplung der komplementären DNS-Einzelstränge durch die DNS-Polymerase III statt;¹⁰⁵ (3) die Termination beendet die Replikation.¹⁰⁷ In einer prokaryotischen Zelle liegt die helikale DNS zu sogenannten *supercoils* verdrillt vor. Erfolgreiche Replikation bedarf zuvor der Entwindung dieser *supercoils* durch Topoisomerasen. Sie trennen das Zucker-Phosphat-Gerüst der DNS, entwinden die Einzelstränge und verknüpfen sie erneut.¹⁰⁸

Topoisomerasen sind das Ziel bekannter Replikations-Hemmer, die auch zur Behandlung der TB genutzt werden – Chinolone und Fluorchinolone.¹⁰⁹ Diese Wirkstoffklassen binden an den Komplex aus DNS und Topoisomerasen vom Typ II und IV, blockieren in Folge das Zusammenfügen der entwundenen Einzelstränge und verhindern somit bakterielle Replikation. Ihr bakterizider Effekt auf ein breites Spektrum Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien kann allerdings nicht ausschließlich auf die Hemmung von Topoisomerasen zurückgeführt werden, weshalb zusätzliche Wirkmechanismen vermutet werden.^{69,108}

1.3.2 Resistenz

Im Jahr 2020 waren rund 20 % aller neuen TB-Erkrankungen auf resistente Stämme des *M. tuberculosis* zurückzuführen, wobei Südafrika, Indien, China und die Russische Föderation zusammen 50 % der Fälle ausmachten (Abbildung 6).²²



Abbildung 6: Geschätzte Zahl der resistenten TB-Infektionen im Jahr 2020 für Länder mit wenigstens 100.000 Fällen (50 % aller Fälle waren auf Südafrika, Indien, China und die Russische Föderation zurückzuführen).²²

In diesen Regionen sind Gesundheitseinrichtungen durch die Größe der infizierten Kohorte besonders ausgelastet und es kommt vermehrt zu Engpässen in der Bereitstellung einer adäquaten Therapie.^{14,22} Adhärenz und Therapietreue sind entscheidende und beeinflussbare Faktoren in Bezug auf die Vermeidung resistenter Populationen.¹¹⁰ Wird ein Antibiotikum inkonsequent eingenommen, kann die minimale Wirkstoffkonzentration am Wirkort nicht erreicht werden und die Bakterien werden nicht vollständig abgetötet. Bakterien, die einer subletalen Wirkstoffkonzentration ausgesetzt sind, neigen zur Ausbildung einer Resistenz und können sich im weiteren Verlauf der Therapie erfolgreich vermehren.¹¹¹ Bei Mykobakterien ist die Gefahr der Resistenzentwicklung besonders groß, da sich die Erreger nur langsam teilen und zusätzlich über lange Zeit in tuberkulösen Granulomen überleben können.⁵² Die unkontrollierte Ausbreitung resistenter Populationen kann und muss durch Entwicklung neuer Antibiotika-Klassen eingedämmt werden. Seit Jahren ist allerdings ein konträrer Trend mit potenziell verheerenden Auswirkungen zu beobachten: die Zahl neu zugelassener Antituberkulotika nimmt ab und die Zahl neuer resistenter Pathogene nimmt zu.^{112–115}

Primäre und sekundäre Resistenz

Eine Antibiotikaresistenz lässt sich als primär oder sekundär klassifizieren.¹¹⁶ Eine primäre (intrinsische) Resistenz besteht, sofern ein Antibiotikum bei einer bestimmten Spezies keine initiale Wirkung besitzt. Grund dafür ist meist das synergistische Zusammenspiel von geringer Permeabilität der äußeren Membran und aktivem Efflux. Die Struktur der prokaryotischen äußeren Membran verlangsamt die Permeation von Antibiotika, kann den Influx allerdings nicht vollständig aufhalten. Bakterien können die intrazelluläre Konzentration eines Antibiotikums zusätzlich durch aktiven Efflux regulieren. Dabei sind fünf verschiedene Familien von Membranproteinen (Effluxpumpen) für das Ausschleusen von strukturell unverwandten Substraten aus der Zelle verantwortlich.^{117,118}

Eine sekundäre Resistenz zeichnet sich durch den Verlust der Wirksamkeit eines Antibiotikums bei zuvor nicht resistenten Bakterien aus und kann durch spontane Mutation oder Übertragung (horizontaler Gentransfer) chromosomaler Gene entstehen. Die zugrundeliegenden Mechanismen beruhen dabei auf der (1) Modifikation der biomolekularen Zielstruktur oder der (2) Inaktivierung des Wirkstoffs.^{119,120}

(1) Modifikation der biomolekularen Zielstruktur

Die Resistenzbildung durch Modifikation des Wirkstoffziels ist ein weit verbreiteter Mechanismus verschiedener Bakterienarten. Punktmutationen in ausgewählten Genen resultieren dabei in schneller und einfacher Resistenz, ohne das Bakterium in seiner Funktion zu beeinträchtigen.¹¹⁹ So kommt es beispielsweise durch Mutationen in der *hot-spot* Region von *rpoB* des *M. tuberculosis* zur Resistenz gegenüber Rifampicin. Das Gen *rpoB* codiert für die β -Untereinheit der DNS-abhängigen RNS-Polymerase. Mutationen in den Codons 516, 526 und 531 führen zu Konformationsänderungen und einem Verlust der Affinität gegenüber Rifampicin.⁷⁸ Auch gegen Ethambutol hat das *M. tuberculosis* Resistenz ausgebildet. Die meisten resistenten Isolate weisen eine Punktmutation im Gen *emb306* auf, welche zu einer Reduktion der Affinität gegenüber Ethambutol führt. Rund 30 % der Ethambutol-resistenten Isolate weisen allerdings keine Mutation in *emb306* auf, weshalb weitere unbekannte Mechanismen hinter der Resistenzbildung vermutet werden.^{121,122}

(2) Inaktivierung des Wirkstoffs

Die Enzym-katalysierte Inaktivierung eines Wirkstoffs ist ein äußerst effektiver Resistenzmechanismus von Bakterien. Durch Modifizierung eines Wirkstoffes kann der therapeutische Effekt entweder direkt oder indirekt, durch Verlust der Bindungsaffinität zur biomolekularen Zielstruktur, nachlassen.¹¹⁹ Zu den verantwortlichen Enzymen gehören Hydrolasen, Oxidoreduktasen und Transferasen, die ebenfalls

essenziell für den bakteriellen Metabolismus sind.¹²³ In Anwesenheit von Antibiotika können diese allerdings zu modifizierten Äquivalenten mit gesteigerter Affinität für die entsprechenden Antibiotika mutieren. Diese Mutation verschafft Bakterien einen evolutionären Vorteil und ist ein Sinnbild für den starken Selektionsdruck, dem sie unterliegen.^{118,119}

Die Entdeckung von β -Lactamasen im Jahr 1940 war der erste Beweis für diese Art von modifizierten Enzymen. Sie inaktivieren β -Lactam-Antibiotika wie Penicilline und Carbapeneme durch hydrolytische Ringöffnung. Dies geschieht entweder durch Ser- β -Lactamasen und die Bildung eines kovalenten Substrat-Enzym-Intermediates oder durch Zink-abhängige Metallo- β -Lactamasen und die nukleophile Aktivierung eines Wasser-Moleküls.^{124,125}

Umgekehrt kann auch die ausbleibende Aktivität eines bioaktivierenden Enzyms verantwortlich für einen inaktiven Wirkstoff sein. So ist es der Fall für Pyrazinamid-resistente Isolate des *M. tuberculosis*. Durch verschiedene Mutationen des Gens *pncA* wird die Aktivität der *Prodrug*-aktivierenden PZase drastisch reduziert. Infolgedessen kommt es zur Akkumulation des inaktiven *Prodrugs* und somit zur Ausbildung einer Resistenz gegenüber Pyrazinamid.^{78,126} Auch Isoniazid ist ein *Prodrug* und bedarf einer Aktivierung durch das mykobakterielle Enzym KatG. Entsprechend führen Mutationen im codierenden Gen *katG* auch hier zur Resistenzbildung.¹²⁷ Zusätzlich können Mutationen in der Promotor-Region von *inhA* auftreten, welche entweder zur Überexpression von InhA oder zu Konformationsänderung des aktiven Zentrums und verringerter Bindungsaffinität führen.¹²⁸

MDR- und XDR-TB

In Abhängigkeit von der Ausprägung wird hauptsächlich zwischen zwei verschiedenen Typen der Antibiotika-resistenten TB-Erkrankung unterschieden: *multidrug-resistant* TB (MDR-TB) und *extensively drug-resistant* TB (XDR-TB).¹²⁹

Als MDR-TB wird die Erkrankung bei Resistenz gegen mindestens zwei der potentesten Mittel der ersten Wahl – Isoniazid und Rifampicin – bezeichnet. Bei Resistenz gegen weitere Mittel erster Wahl sowie Mittel zweiter Wahl wird die Erkrankung als XDR-TB eingestuft. Mittel zweiter Wahl sind Reservetherapeutika, die in verschiedenen Kombinationen erst zur Behandlung der MDR- und XDR-TB eingesetzt werden. Alle Antituberkulotika wurden in Abhängigkeit ihrer Effizienz und Toxizität in hierarchischer Reihenfolge in fünf Gruppen unterteilt (Tabelle 2).^{129,130}

Tabelle 2: Einteilung der Antituberkulotika im Einsatz gegen (MDR- und XDR-) TB in die Gruppen 1 - 5.¹²⁹⁻¹³¹

Gruppe	Bezeichnung	Antituberkulotikum	Wirkstoffziel
1	Mittel der ersten Wahl	Isoniazid	Zellwandbiosynthese
		Pyrazinamid	Membranpotential
		Ethambutol	Zellwandbiosynthese
		Rifampicin	Transkription
		Streptomycin	Proteinbiosynthese
2	Aminoglycoside	Kanamycin, Amikacin	Proteinbiosynthese
	Polypeptide	Capreomycin, Viomycin	
3	Fluorochinolone	Ciprofloxacin, Levofloxacin, Moxifloxacin	Transkription und Replikation
4	Orale Bakterioostatika	Cycloserin	Zellwandbiosynthese
		Ethionamid, Protionamid	Zellwandbiosynthese
		<i>para</i> -Aminosalicylsäure	Metabolismus
5	Substanzen mit umstrittener Wirksamkeit oder Toxizität	Bedaquilin	Metabolismus
		Delamanid, Pretomanid	Zellwandbiosynthese
		Linezolid	Proteinbiosynthese
		Clofazimin	Metabolismus
		Amoxicillin/Clavulansäure	Zellwandbiosynthese

Kombinationstherapien aus Mitteln erster und zweiter Wahl zur Behandlung einer MDR-/XDR-TB erstrecken sich, verglichen mit der Behandlung einer sensitiven TB, über einen wesentlich längeren Zeitraum – 6 Monate intensive und 18 Monate kontinuierende Phase – und die Erfolgchancen sind mit durchschnittlich 57 % signifikant verringert. Hinzu kommen deutlich erhöhte Kosten sowie stärkere Nebenwirkungen, weshalb der Einsatz von Mitteln zweiter Wahl sorgfältig abgewägt und sukzessive in eine Therapie eingegliedert wird.^{22,47}

Die WHO warnt vor der globalen Ausbreitung der MDR- und XDR-TB sowie der damit einhergehenden Gefahr für Gesundheitseinrichtungen und das öffentliche Leben. Patienten im Vorfeld gezielt auf deren Sensitivität gegenüber Antibiotika zu testen (*drug susceptibility test*, kurz: DST) und verstärkte Forschung an neuen Antibiotika-Klassen zu betreiben, seien der einzige Weg die Ausbreitung erfolgreich aufzuhalten bzw. zu verlangsamen.^{8,10,22}

1.4 Forschungsstand

Im Jahr 1943 wurde Streptomycin als erstes Antibiotikum zur Behandlung einer TB eingesetzt. In den folgenden Jahren der regen Wirkstoffentwicklung wurden Isoniazid, Pyrazinamid, Ethambutol und Rifampicin – heute als Mittel erster Wahl bekannt – sowie entsprechende Kombinationstherapien etabliert (Abbildung 7). Die initialen Erfolge der bestehenden Antibiotika-Kombinationen führten zu einem starken Einbruch in der Forschung und in der Zulassung neuer Antibiotika.¹³² In Folge der unvermeidlich zunehmenden Ausbildung von Resistenzen und dem Mangel an Reservetherapeutika, konnten sich zahlreiche multi- und extensiv resistente Stämme des *M. tuberculosis* ohne adäquate Gegenwehr erfolgreich ausbreiten.¹³³ Erst rund 50 Jahre nach der Entdeckung von Rifampicin (1963) haben die Zulassungen von Bedaquilin (2012), Delamanid (2014) und Pretomanid (2019) durch die *Food and Drug Administration* (FDA) eine erneute, intensive Phase der Wirkstoffentwicklung initiiert.^{134,135}

Das ideale Ziel der modernen TB-Wirkstoffentwicklung sind potente Inhibitoren mit neuartigem Wirkmechanismus, die eine kürzere, sicherere und simplere Therapie ermöglichen. Zwar besitzen die jüngst zugelassenen Antibiotika gute Potenz und einen neuartigen Wirkmechanismus, verkürzen die Therapiedauer allerdings nicht und weisen zusätzlich ein breites Spektrum unerwünschter Nebenwirkungen auf.^{135,136} Bedaquilin (BDQ) gehört zur Gruppe der Diarylchinolin-Antibiotika und übt einen bakteriziden Effekt auf replizierende und latente Bakterien aus. Es bindet an die c-Untereinheit der ATP-Synthase und hemmt den bakteriellen Energiestoffwechsel.¹³⁷ Ein erster Resistenzmechanismus konnte bereits im Jahr 2005 von Andries *et al.* festgestellt werden.¹³⁸ Sie konnten zwei Punktmutationen im Gen *atpE* identifizieren, die zu einer Konformationsänderung des codierten ATP-Synthase Membranproteins führen und somit für den Verlust der Bindungsaffinität Bedaquilins zur c-Untereinheit verantwortlich sind.¹³⁹ Delamanid (DMD) ist ein Dihydro-Nitroimidazooxazol und schwächt die strukturelle Integrität der mykobakteriellen Zellwand durch Inhibition der Mykolsäuresynthese. Es handelt sich um ein *Prodrug* welches durch eine Enzymkaskade des bakteriellen Metabolismus in die aktive Form überführt wird.¹⁴⁰ Auch Pretomanid (PMD), aus der Gruppe der Nitroimidazole, ist ein *Prodrug* und wird ebenfalls metabolisch, unter Freisetzung reaktiver Stickstoff-Spezies, aktiviert. Es tötet replizierende Bakterien durch Inhibition der Mykolsäuresynthese und latente Bakterien durch Stickstoffmonoxid-induzierte Hemmung der Zellatmung ab.¹⁴¹ Genaueres zum Mechanismus ist für DMD und PMD noch nicht bekannt und wird in der Fachliteratur diskutiert. Resistenzen bilden sich in beiden Fällen zügig durch Mutation eines oder mehrerer der zahlreich beteiligten (Co-) Enzyme aus und zu den gängigen Nebenwirkungen zählen hämatologische Symptome, Hepatotoxizität, Nierenversagen und die Verringerung der Herzfrequenz.^{135,142}

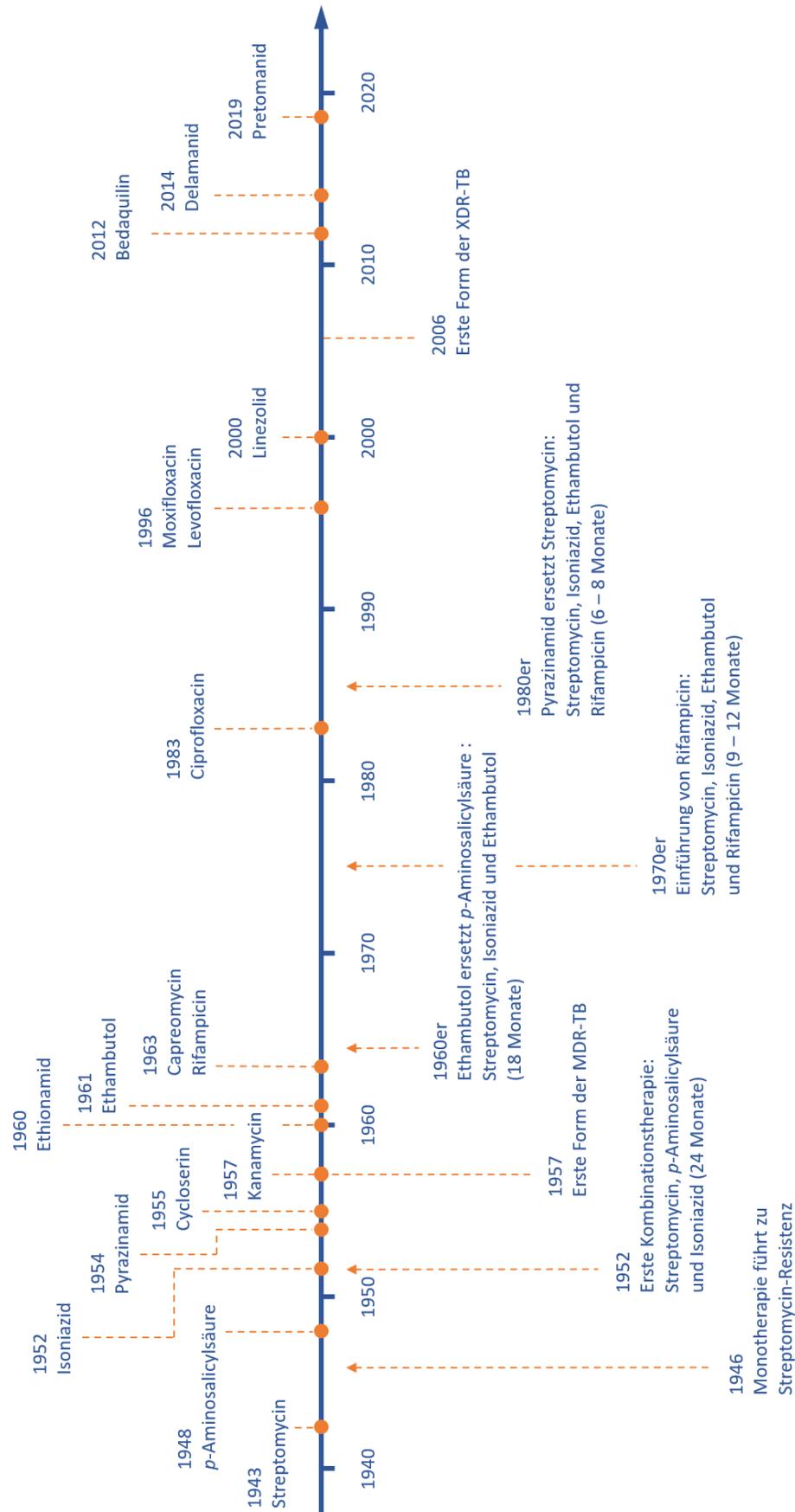


Abbildung 7: Historie der TB-Wirkstoffentwicklung – Wirkstoffe und entsprechende Kombinationstherapien.^{132,133}

Derzeit befinden sich 22 Wirkstoffkandidaten in fortgeschrittenen Phasen (I-III) klinischer Studien (Abbildung 8).¹³⁵ Darunter beispielsweise TBAJ-587 (Phase I), ein Bedaquilin-Analogon mit gesteigerter Potenz und reduzierter Toxizität, mit dem Potential, Bedaquilin im Einsatz in Kombinationstherapien zu ersetzen.¹⁴³ TBI-223 (Phase I) ist ein Oxazolidinon-Derivat, inhibiert als solches die bakterielle Proteinbiosynthese und hat aufgrund verkürzter Therapiedauer und geringerer Toxizität das Potential, Linezolid zu ersetzen.¹⁴⁴ BTZ-043 und Q203 sind potente Kandidaten der Phase II klinischer Studien und stellen Inhibitoren mit neuartigen Wirkstoffzielen dar. BTZ-043, aus der Gruppe der Benzothiazinone, interagiert mit der Biosynthese von Arabinogalactanen durch Inhibition der Phosphoribose-2'-epimerase (DprE1) und das Imidazopyridinamid Q203 inhibiert den Cytochrom *bc1* Komplex und nimmt somit Einfluss auf die bakterielle Elektronentransportkette.^{144,145} In Phase III klinischer Studien befinden sich derzeit neue Kombinationstherapien sowie auch BDQ, DMD und PMD zwecks medizinischer Indikation und Untersuchung möglicher Langzeitfolgen.^{135,144}

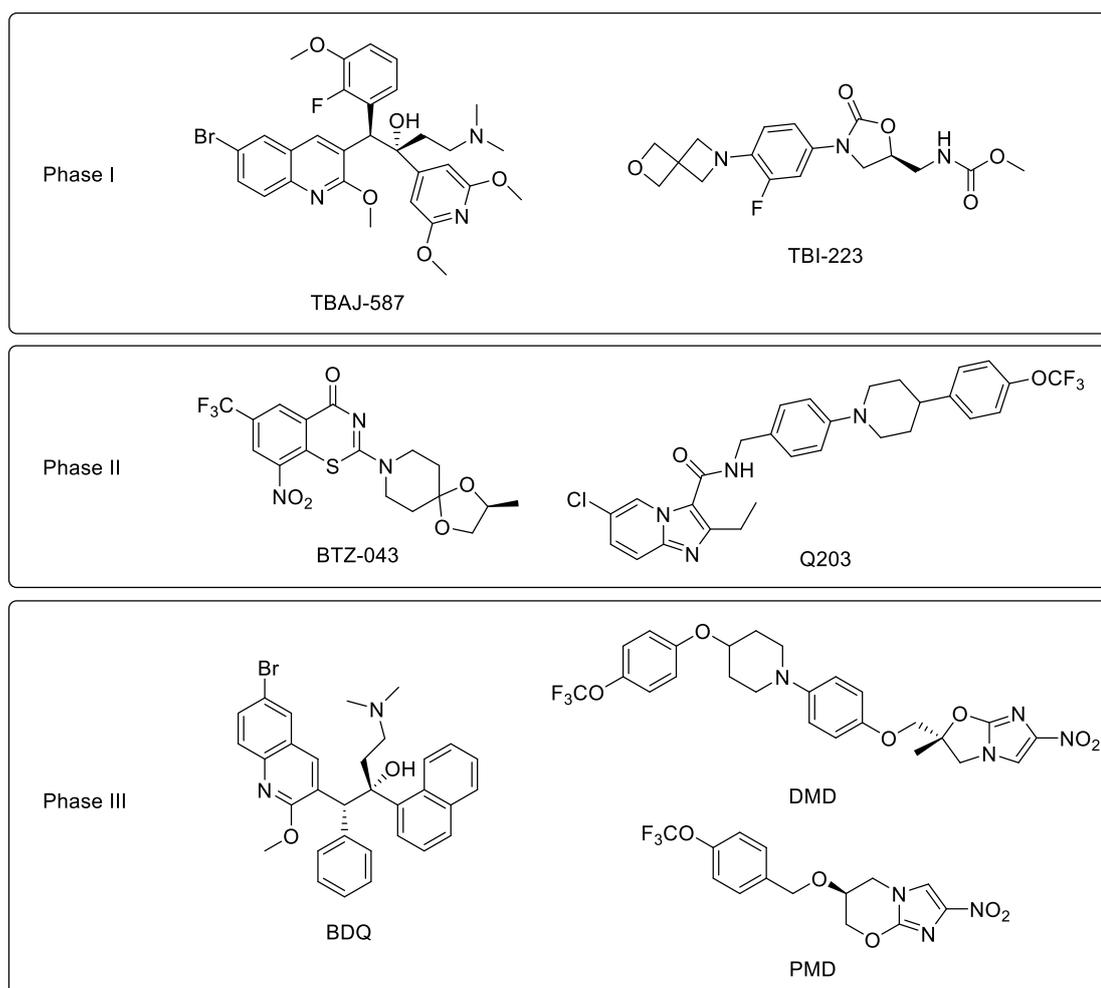


Abbildung 8: Strukturen einiger ausgewählter Kandidaten der TB-Wirkstoffentwicklung. TBAJ-587 und TBI-223 befinden sich in Phase I klinischer Studien. BTZ-043 und Q203 befinden sich in Phase II. Bedaquilin (BDQ), Delamanid (DMD) und Pretomanid (PMD) werden in Phase III Langzeitstudien unterzogen.^{135,144}

Im Kampf gegen TB werden neben neuen Wirkstoffen und Wirkmechanismen ebenfalls (1) neue Kombinationstherapien, (2) die Umfunktionierung etablierter Wirkstoffe, (3) neue Impfstoffe, (4) Wirts-bezogene Therapien sowie (5) Nanopartikel erforscht.¹³⁵

(1) Neue Kombinationstherapien

Die Entdeckung neuer Wirkstoffe ist nur ein Teil der TB-Wirkstoffentwicklung. Zusätzlich müssen bestehende und neu entdeckte Wirkstoffe in einer synergistischen Kombinationstherapie erprobt sein, um gute Ergebnisse zu erzielen. Durch adäquate Anpassung der Therapien können Erfolgchancen und Adhärenz gesteigert werden, während Nebenwirkungen und Dauer verringert werden.¹⁴⁶

Derzeit sind besonders zwei Kombinationstherapien zur Behandlung einer XDR- oder MDR-TB im Fokus klinischer Studien: BPaL und BPaMZ. Erstere setzt sich aus Bedaquilin (B), Pretomanid (Pa) und Linezolid (L) zusammen und wird über einen Zeitraum von 6 Monaten auf Wirksamkeit und Verträglichkeit getestet. Bisher wurden Heilungserfolge in 90 % der Fälle erzielt. Die BPaMZ-Therapie sieht im Vergleich dazu die Behandlung mit Bedaquilin, Pretomanid, Moxifloxacin (M) und Pyrazinamid (Z) vor und konnte im Verlauf einer 14-tägigen Studie bereits 99 % der Bakterien abtöten.^{133,135}

(2) Umfunktionierung bekannter Wirkstoffe

Die konventionelle Entwicklung eines Wirkstoffkandidaten von der Identifizierung der Leitstruktur bis zu klinischen Studien dauert rund 10 – 15 Jahre und benötigt intensive Finanzierung.¹⁴⁷ Um diesen essenziellen Prozess zu ergänzen, werden etablierte Wirkstoffe oder Kandidaten der Phasen II und III umfunktioniert und neue klinische Anwendungen identifiziert (*drug repurposing*). Dieses Vorgehen hat im letzten Jahrzehnt viel Aufmerksamkeit erregt, da nicht nur Zeit und Geld gespart, sondern auch hohe Erfolgsquoten erzielt und niedrige Sicherheitsrisiken eingegangen wurden.^{147,148} Battah *et al.* testeten 3000 von der FDA zugelassene Wirkstoffe auf ihre Aktivität gegenüber *M. tuberculosis* H37Rv und zwei weitere klinische Isolate (resistente Phänotypen) und identifizierten Eltrombopag (Thrombopoietin-Rezeptor-Agonist) und Arotinolol (α - und β -Blocker) als potente Inhibitoren mykobakteriellen Wachstums.¹⁴⁹

(3) Neue Impfstoffe

Das *Mycobacterium bovis bacillus CALMETTE-GUÉRIN* (BCG) ist seit über einem Jahrhundert der einzige bekannte Impfstoff mit nachgewiesener Wirksamkeit und der Mechanismus der Impfstoff-induzierten Resistenz ist immer noch nicht vollständig verstanden. Der BCG-Impfstoff ist zwar kostengünstig, sicher und effektiv gegen schwere Formen der TB bei Kindern, weist allerdings stark eingeschränkte Wirksamkeit gegenüber pulmonaler TB bei Erwachsenen auf (s. Kapitel 1.1.3, S. 6).²⁵

Fortschritte im Bereich der Immunologie und molekularen Genetik des *M. tuberculosis* sowie erhebliche technische Weiterentwicklungen in der Molekularbiologie trugen zur rationalen Entwicklung neuer Impfstoff-Kandidaten bei. Dabei wurden drei Ansätze verfolgt: Totimpfstoffe (gereinigte Antigene oder DNS), lebendige mykobakterielle Impfstoffe (rational attenuierte Stämme des *M. tuberculosis* oder rekombinantes BCG) und virale Vektoren (Adenovirus oder Vacciniavirus).¹⁵⁰ Diverse Impfstoffe befinden sich derzeit in Phasen I und II klinischer Studien am Menschen – darunter vier adjuvantierte Totimpfstoffe, drei rekombinante BCG und zwei Vektor-basierte Impfstoffe.^{151,152}

(4) Wirts-bezogene Therapien

Bisherige Therapien zur Behandlung einer TB adressieren primär bakterielle Überlebensmechanismen im internalisierten Zustand. Wirts-bezogene Therapien hingegen haben das Ziel, zelluläre Vorgänge des Wirtes, die das Wachstum von Bakterien eindämmen, zu unterstützen und somit konventionelle, Pathogen-bezogene Therapien zu komplementieren. Diese Therapieform umfasst meist die Immunmodulation zur Stärkung der zellulären Abwehrmechanismen oder die Wiederherstellung verschiedener, durch Mykobakterien gestörten, Signaltransduktionen.^{153–155} Ein beliebtes Ziel einer solchen Therapie ist das Granulom, dessen Zerfall durch Inhibition der TNF- α Produktion eingeleitet wird, sodass anwesende Antituberkulotika ihre Wirkung voll entfalten können. Bekannte TNF- α Inhibitoren, deren Einsatz im Zusammenhang mit TB erforscht wird, sind Etanercept und Enbrel.^{156,157} Auch die Aktivierung von Autophagozytose ist ein geeigneter Mechanismus für eine Wirts-bezogene Therapie. Durch Wiederherstellung der entsprechenden Signaltransduktion könnten phagosomale Reifung und Eliminierung des Bakteriums unterstützt werden.¹⁵⁸ Zu den untersuchten Wirkstoffkandidaten zählen Rapamycin, Gefitinib und Metformin.^{159,160} Ein weiterer Ansatz – die Zell-basierte Therapie – stammt aus dem Bereich der Krebsforschung.¹⁵⁴ Durch Modulierung der zellulären Immunabwehr könnte die Rekrutierung spezifischer T- und B-Zellen reguliert werden und zu einer Eliminierung des Pathogens beitragen.¹⁵⁷

(5) Nanopartikel

Nanopartikel mit einer Größe von 1 bis 100 nm umfassen diverse Materialien auf atomarem bzw. molekularem Level, die als Kapsel oder Träger für Wirkstoffe fungieren können.¹⁶¹ Sie ermöglichen eine verbesserte Bioverfügbarkeit mit erhöhter Stabilität und Löslichkeit und können zusätzlich den Membrantransport hydrophober sowie hydrophiler Substanzen verbessern.¹⁶² Wirkstoffbeladene Nanopartikel können ihr Ziel entweder passiv erreichen oder aktiv gesteuert werden.¹⁶³ Im ersteren Fall wird der Partikel unspezifisch von Makrophagen, Monozyten oder dendritischen Zellen phagozytiert und nach Fusion des Phagosoms mit einem Lysosom wird der Wirkstoff im Zellinneren freigesetzt. Da Makrophagen kontinuierlich in den Bereich der TB-Infektion rekrutiert werden, steigt passiv die Zahl der internalisierten Wirkstoffe und somit auch der therapeutische Effekt.^{164,165} CARRERA *et al.* berichten am Beispiel von Bedaquilin von einer Steigerung der antimykobakteriellen *in vitro* Aktivität durch passiven Transport wirkstoffbeladener Nanopartikel im Vergleich zum freien Wirkstoff.¹⁶⁶ Eine aktive Steuerung bedarf der Markierung eines Nanopartikels mit spezifischen Liganden. Diese Liganden werden von entsprechenden Rezeptoren am Wirkort erkannt und infolgedessen wird der Nanopartikel zielgerichtet und schnell aufgenommen.^{161,165} COSTA *et al.* konnten zeigen, dass die Mannosylierung von Nanopartikeln zu einer beschleunigten und zielgerichteten Internalisierung durch Alveolarmakrophagen führt.¹⁶⁷

Die Zulassungen von Bedaquilin und Delamanid haben die TB-Wirkstoffentwicklung 50 Jahre nach der Entdeckung von Rifampicin endlich erneut aufblühen lassen.¹³⁴ Dieser Trend muss nun weitergeführt und die komplementären Ansätze ausgebaut werden, da XDR- und MDR-TB weiterhin eine zunehmende Gefahr für das öffentliche Leben darstellen. Kombinierte Anstrengungen industrieller und akademischer Forschung sind unverzichtbar, um zunächst die Ziele der WHO *End TB Strategy* zu erreichen und letztendlich die globale TB-Epidemie zu beenden.^{8,10,22,129}

1.4.1 Entdeckung der α -Aminoxyessigsäure-basierten Leitstrukturen

Im Jahr 2017 wurden 100 Inhibitoren der Substanzbibliothek der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. KURZ durch die kooperierende Arbeitsgruppe von Prof. Dr. KALSCHUEER im Rahmen eines phänotypischen Ganzzell-basierten Aktivitäts-Assays auf ihre antimykobakterielle *in vitro* Aktivität gegen *M. tuberculosis* H37Rv untersucht. Bei diesen Untersuchungen überzeugte eine α -Aminoxyessigsäure-basierte Verbindungsklasse, hergestellt von Dr. KATHARINA STENZEL, durch eindrucksvolle inhibitorische *in vitro* Aktivität mit minimalen Hemmkonzentrationen bis in den submikromolaren Bereich. Die beiden vielversprechendsten Vertreter aus dieser Verbindungsklasse – KSK 104 (**1a**) und KSK 106 (**1b**) – hemmen das mykobakterielle Wachstum (MHK_{90}) selbst bei Konzentrationen von 0.78 μM bzw. 0.39 μM (Abbildung 9) und sind somit von vergleichbarer Aktivität wie Rifampicin ($MHK_{90} = 0.19 \mu\text{M}$).¹⁶⁸

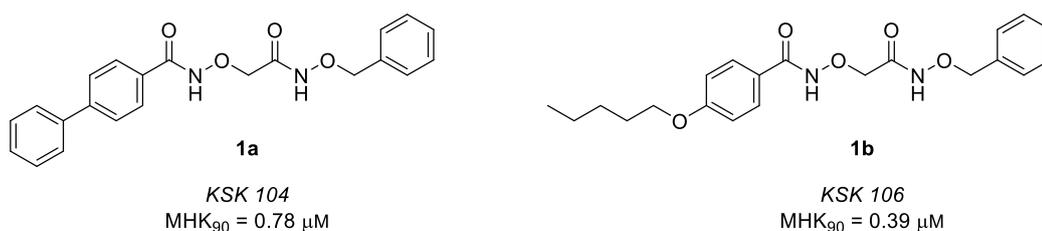


Abbildung 9: Lewis-Strukturen und MHK_{90} -Werte der Leitstrukturen KSK 104 (**1a**) und KSK 106 (**1b**).¹⁶⁸

Beide Leitstrukturen wurden in weiteren Experimenten auf Zytotoxizität gegenüber den humanen Zelllinien THP-1, MRC-5 und HepG2 untersucht. Mit einem hervorragenden Selektivitätsindex von $SI > 100$ konnten bis zur höchsten getesteten Konzentration von 100 μM keine zytotoxischen Effekte festgestellt werden.¹⁶⁹

In einer Monotherapie zeigten sie einen starken bakteriziden Effekt innerhalb der ersten 10 Tage mit einer 2.5-log Reduktion der bakteriellen Lebensfähigkeit. Außerdem konnten additive Effekte in Kombination mit Isoniazid, Ethambutol, Rifampicin und Delamanid nachgewiesen werden.¹⁶⁹

Die Leitstrukturen KSK 104 (**1a**) und KSK 106 (**1b**) zeigten ebenfalls mikromolare *in vitro* Aktivität gegen klinische, extensiv resistente *M. tuberculosis* KZN-Isolate aus der Kwazulu-Natal Region in Südafrika. Auch gegen internalisierte Mykobakterien in Makrophagen (THP-1) wiesen beide Leitstrukturen eine vergleichsweise starke Wachstumsinhibition auf. Sie führten bei einer Konzentration von 0.5 μM zu einer 100- bzw. 1000-fachen Reduktion internalisierter, bakterieller Last, wohingegen Rifampicin bzw. Streptomycin bei Konzentrationen von 3 μM bzw. 20 μM lediglich eine 50-fache Reduktion erzielten.

In weiteren *in vitro* Aktivitäts-Assays gegen eng verwandte Mykobakterien (bspw. *M. smegmatis* und *M. marinum*) und andere Gram-positive sowie Gram-negative Bakterien (bspw. *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* und *Pseudomonas aeruginosa*) konnte darüber hinaus eine hohe Selektivität gegenüber *M. tuberculosis* demonstriert werden.¹⁶⁹

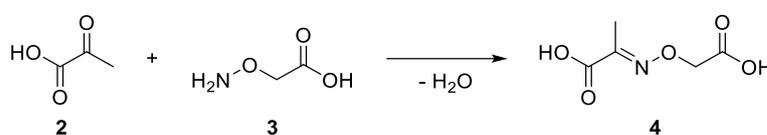
Durch Gesamtgenomsequenzierung von spontan KSK-resistenten Mutanten (Resistenzrate 10^{-8} – 10^{-10}) konnte gezeigt werden, dass Einzelnukleotid-Polymorphismen in den Genen *Rv0552* sowie *AmiC* vorliegen. Diese Gene sind nicht essenziell für *in vitro* Wachstum und codieren für Proteine mit bisher unbekannt Funktionen. Auf Basis der Aminosäuresequenz konnte in beiden Fällen eine Aktivität als Amidohydrolase prognostiziert werden. Diese Enzymklasse ist üblicherweise verantwortlich für die katalysierte Hydrolyse von Amid-Bindungen.¹⁷⁰ Es ist also anzunehmen, dass eine mutierte Amidohydrolase die Ursache für die Ausbildung eines KSK-resistenten *M. tuberculosis* Phänotyps darstellt. Die beobachteten Einzelnukleotid-Polymorphismen führen, neben dem Austausch von Aminosäuren, auch zu einer Verschiebung des Leserasters (*frameshift-mutation*), wodurch sich ein Stopcodon ergibt. Dieses führt zu einem frühzeitigen Abbruch der Proteinsequenz und das entstehende Protein ist vermutlich nicht funktional. Basierend auf diesen Entdeckungen postulierte die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. KALSCHUEER eine vorläufige Hypothese zum Wirkmechanismus. Demnach könnten die KSK-Leitstrukturen *Prodrugs* sein und durch intrazelluläre, enzymatische Hydrolyse in eine aktive Wirkform überführt werden (*Prodrug-Theorie*).¹⁶⁹

KSK 104 (1a) und *KSK 106 (1b)* sind also in der Lage, mykobakterielles Wachstum sensitiver und extensiv resistenter Stämme selbst bei submikromolarer Konzentration zu inhibieren, weisen keine Zytotoxizität gegenüber menschlichen Zelllinien bis zu Konzentrationen von über 100 μM auf, zeigen additive Effekte mit bekannten Wirkstoffen erster und zweiter Wahl und besitzen eine äußerst hohe Selektivität gegenüber *M. tuberculosis*. Zudem verstoßen sie gegen keine der Bedingungen von LIPINSKIS *Rule of Five*: Die Molekulargewichte liegen unter 500 g/mol, es sind in beiden Fällen nicht mehr als fünf Wasserstoffbrücken-Donoren und nicht mehr als zehn Wasserstoffbrücken-Akzeptoren vorhanden und die Verteilungskoeffizienten zwischen *n*-Octanol und Wasser liegen für beide Verbindungen unter fünf. Die Berechnung des $\log P_{o/w}$ nach *Swiss ADME* ergibt für *KSK 104 (1a)* einen Wert von 3.10 und für *KSK 106 (1b)* einen Wert von 3.06.

Beide KSK-Leitstrukturen sind damit vielversprechende Kandidaten für die weitere Wirkstoffentwicklung, um eine neue Klasse von Antituberkulotika bereitzustellen, die bestehende Chemotherapien für sensitive, aber auch MDR- und XDR-TB ergänzen könnte.

1.4.2 Antimykobakterielle Eigenschaften von α -Aminooxyessigsäure-Derivaten

Seit Mitte des 20. Jahrhunderts sind die bakteriostatischen Eigenschaften von α -Aminooxyessigsäure gegenüber verschiedenen Gram-positiven sowie Gram-negativen Bakterien und auch gegenüber *M. tuberculosis* bekannt. FAVOUR deutete sie 1948 als metabolischen Inhibitor, der mit entscheidenden zellulären Metaboliten wie α -Ketocarbonsäuren interagiert. Der wichtigste Vertreter in lebenden Organismen sei dabei die Brenztraubensäure (**2**) – ein essenzieller Bestandteil des Citratzyklus – die durch intrazelluläre Kondensation mit α -Aminooxyessigsäure (**3**) in das entsprechende Ketoxim **4** überführt wird (Schema 1).¹⁷¹



Schema 1: Kondensationsreaktion von Brenztraubensäure (**2**) und α -Aminooxyessigsäure (**3**).¹⁷¹

Nur wenige Jahre später veröffentlichten MCHALE *et al.* Ergebnisse zu α -Aminooxycarbonsäuren und α -Aminooxyhydraziden. Sie beschrieben schwache antibakterielle *in vitro* Aktivität der Carbonsäuren gegenüber *Staph. aureus* und *E. coli* jedoch eine stärkere Aktivität gegenüber *M. tuberculosis*. Die Hydrazide waren in der Regel aktiver als die entsprechenden Carbonsäuren.¹⁷² TESTA *et al.* konnten die Ergebnisse zur antimykobakteriellen *in vitro* Aktivität von α -Aminooxycarbonsäuren gegen *M. tuberculosis* H37Rv bestätigen.¹⁷³ Aufbauend auf diesen Publikationen konnten KISFALUDY *et al.* im Jahr 1971 schließlich rund 100 Derivate von α -Aminooxyalkoxyamiden, -aniliden und -hydraziden darstellen und deren antimykobakterielle *in vitro* Aktivität evaluieren (Abbildung 10).

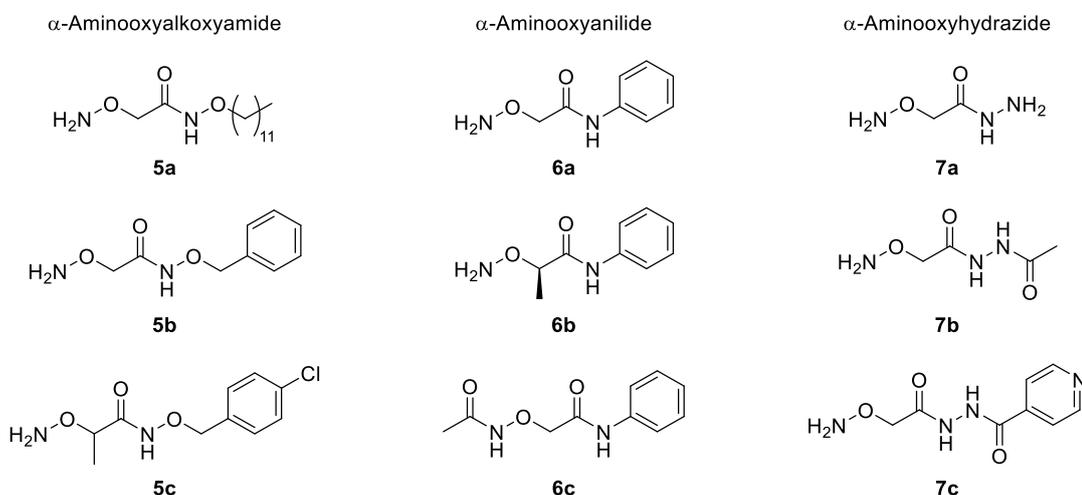


Abbildung 10: Ausgewählte Vertreter der von KISFALUDY *et al.* dargestellten α -Aminooxyessigsäure-Derivate.¹⁷⁴

Die potenteste Verbindung, das α -Aminooxyhydrazid **7c** ($\text{MHK}_{90} = 0.33 \mu\text{M}$), wurde zusätzlich in einem dreimonatigen *in vivo* Modell an Meerschweinchen und Mäusen getestet. Hier konnte gezeigt werden, dass Hydrazid **7c** in der Lage war, die Ausprägung einer *M. tuberculosis* Infektion ohne signifikante Toxizität zu verhindern.¹⁷⁴

In den Jahren 1971 und 1974 berichteten KISFALUDY *et al.* außerdem von der Synthese weiterer α -Aminooxycarbonsäure-Derivate, die antimykobakterielle *in vitro* und *in vivo* Aktivität gegenüber *M. tuberculosis* H37Rv, aber auch gegenüber Streptomycin- und INH-resistenten Stämmen des *M. tuberculosis* aufwiesen. Sie entdeckten darüber hinaus neue Struktur motive wie z.B. die α -Aldoxim-substituierten Amide **8** und **9**, die sehr vielversprechende antimykobakterielle Eigenschaften zeigten (Abbildung 11).^{175,176}

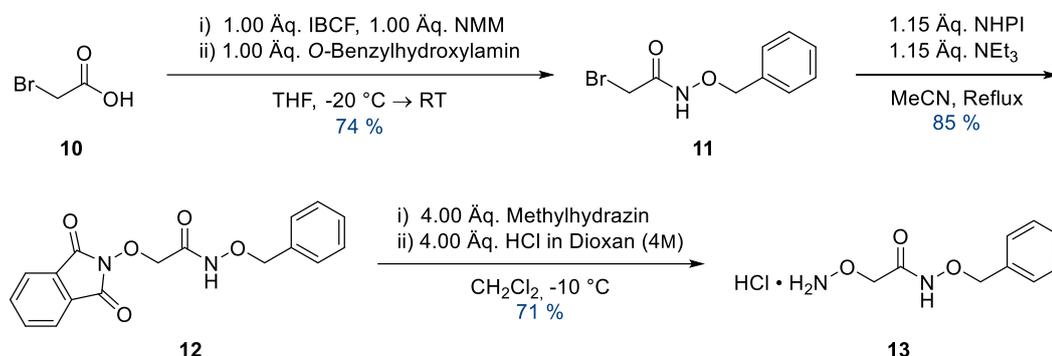


Abbildung 11: Potente Vertreter der α -Aldoxim-substituierten Amid-Derivate aus einem Patent von KISFALUDY *et al.*¹⁷⁶

Für die Substanzen aus Abbildung 10 und Abbildung 11 wurden weder potenzielle Wirkmechanismen diskutiert noch Untersuchungen zu möglichen biomolekularen Zielstrukturen durchgeführt. Es wurden keine weiteren Ergebnisse veröffentlicht und die Forschung an den gezeigten Derivaten der α -Aminooxyessigsäure nicht weiterverfolgt.

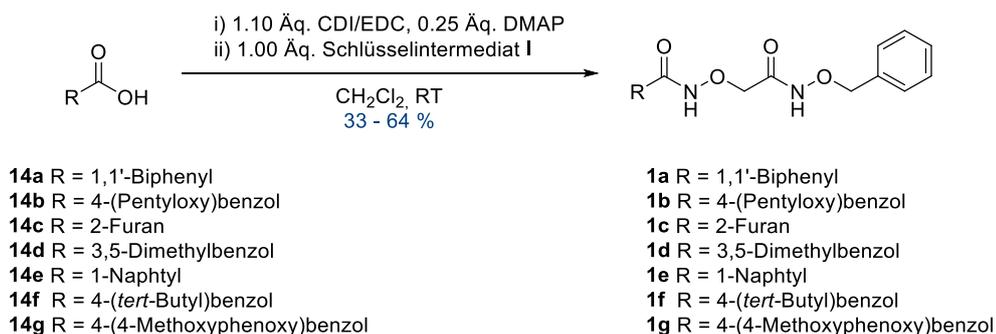
1.4.3 Synthese und Derivatisierung der KSK-Leitstrukturen

Die initiale Syntheseroute wurde von Dr. KATHARINA STENZEL (Arbeitsgruppe Prof. Dr. KURZ) etabliert und beginnt mit einer Isobutylchloroformiat (IBCF) und *N*-Methylmorpholin (NMM) medierten Kupplungsreaktion von Bromessigsäure (**10**) mit *O*-Benzylhydroxylamin über ein gemischtes Anhydrid als acylierendes Zwischenprodukt. Nachfolgende nucleophile Substitution mit *N*-Hydroxyphthalimid (NHPI) lieferte das Phthaloyl-geschützte Hydroxylamin **12** und die abschließende Freisetzung des *O*-substituierten Hydroxylamins **13** erfolgte hydrazinolytisch durch Methylhydrazin (Schema 2). Über drei Schritte konnte eine Gesamtausbeute von 45 % erzielt werden.¹⁶⁸



Schema 2: Darstellung des *O*-substituierten Hydroxylamins **13** nach Vorschrift von Dr. KATHARINA STENZEL.¹⁶⁸

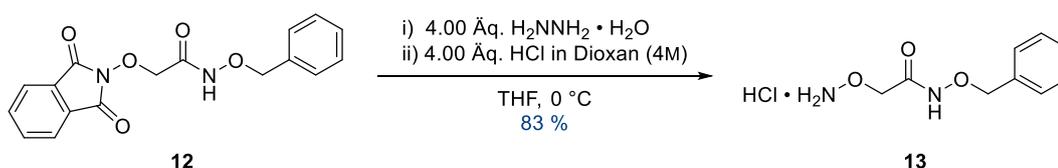
Zur Darstellung der α -Aminoxyessigsäure-basierten Verbindungen **1a-g** wurde das *O*-substituierte Hydroxylamin **13** (Schlüsselintermediat **I**) einer abschließenden Kupplungsreaktion mit den Carbonsäuren **14a-g** unterzogen. Dazu wurden die jeweiligen Carbonsäuren mit 1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI) oder im Sinne einer STEGLICH-Veresterung mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) in Kombination mit 4-(Dimethylamino)pyridin (DMAP) aktiviert und anschließend mit Schlüsselintermediat **I** (**13**) umgesetzt (Schema 3).¹⁶⁸



Schema 3: Darstellung der KSK-Verbindungen **1a-g** nach Vorschrift von Dr. KATHARINA STENZEL.¹⁶⁸

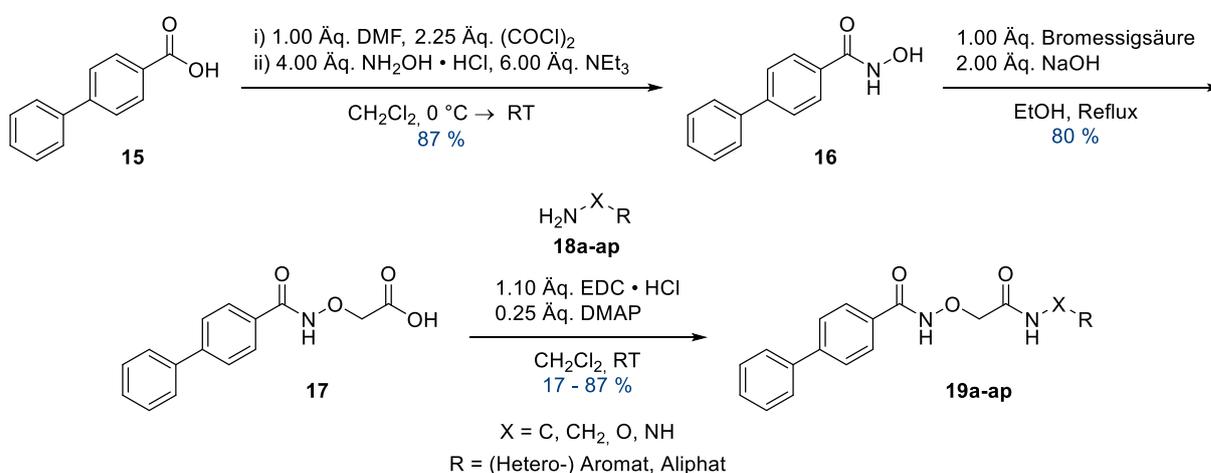
Dr. ALEXANDER BERGER (Arbeitsgruppe Prof. Dr. KURZ) befasste sich intensiv mit der Derivatisierung der α -Aminoxyessigsäure-basierten KSK-Leitstrukturen – speziell *KSK 104* (**1a**) – und der Optimierung entsprechender Synthesen.

Er konnte beispielsweise die Hydrazinolyse von **12** durch Einsatz von Hydrazin Monohydrat und Reaktionsführung in Tetrahydrofuran (THF) bei 0 °C optimieren und steigerte so die Ausbeute des Schlüsselintermediates **I** (**13**) um 12 % (Schema 4). Nach dem Vorbild von Dr. KATHARINA STENZEL (Schema 3) nutzte er dieses zur Modifikation der Benzoyl-Struktur der KSK-Leitstrukturen.¹⁷⁷



Schema 4: Reaktionsoptimierung der Synthese des *O*-substituierten Hydroxylamins **13** (Schlüsselintermediat **I**) nach Vorschrift von Dr. ALEXANDER BERGER.¹⁷⁷

Zur effizienten Modifikation der entgegengesetzten Molekülregion (*O*-Benzylhydroxylamin-Einheit) synthetisierte er außerdem Carbonsäure **17** (Schema 5). Dazu wurde 1,1'-Biphenylcarbonsäure (**15**) mit Oxalylchlorid *in situ* zum entsprechenden Carbonsäurechlorid umgesetzt, welches durch Zugabe von Hydroxylamin-Hydrochlorid und Triethylamin abgefangen wurde. Die resultierende Hydroxamsäure **16** wurde anschließend mit Bromessigsäure in Gegenwart von Natriumhydroxid *O*-alkyliert, um die Carbonsäure **17** zu erhalten. Eine abschließende Kupplungsreaktion mit diversen *N*-Nucleophilen **18a-ap** unter Verwendung von EDC lieferte die KSK-Analoga **19a-ap**.¹⁷⁷



Schema 5: Synthese der Carbonsäure **17** und der KSK-Analoga **19a-ap** nach Vorschrift von Dr. ALEXANDER BERGER.¹⁷⁷

1.4.4 Erste Struktur-Aktivitäts-Beziehungen

Im Rahmen seiner Promotionsarbeit war Dr. ALEXANDER BERGER in der Lage über 80 Analoga der Leitstruktur *KSK 104* (**1a**) zu synthetisieren. Zur effektiven Strukturoptimierung von *KSK 104* (**1a**) erfolgte die Einteilung der Struktur in die Regionen A, B und C sowie die Benennung der verbrückenden Teilstrukturen (Abbildung 12).¹⁷⁷

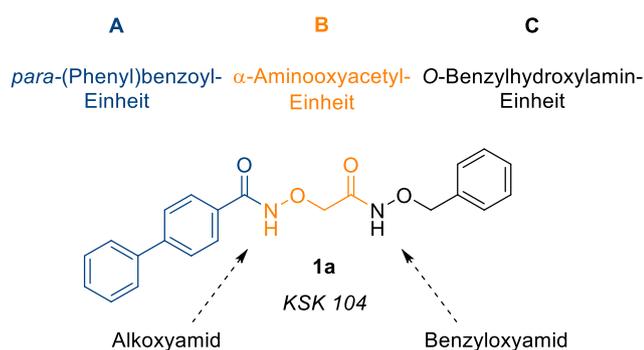


Abbildung 12: Einteilung der Leitstruktur *KSK 104* (**1a**) in die Regionen A, B und C.

Die Strukturmodifikationen wurden in den Regionen A, B und C unabhängig voneinander durchgeführt und die minimale Hemmkonzentration (MHK_{90}) der resultierenden Analoga wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. KALSCHUEER bestimmt. Anhand der Hemmkonzentrationen der *KSK*-Leitstrukturen sowie der zusätzlich entwickelten *KSK*-Analoga konnten erste Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (*structure-activity-relationship*, kurz: SAR) abgeleitet werden.

Region A

Für Region A hat sich herausgestellt, dass eine *para*-substituierte Benzoyl-Struktur entscheidend für die antimykobakterielle *in vitro* Aktivität ist (Abbildung 13). Substitutionen in *ortho*- oder *meta*-Stellung (**20**) führten, ebenso wie das Einführen von Stickstoff-Heteroaromaten, zu einer Verringerung der antimykobakteriellen *in vitro* Aktivität. Große und rigide Substituenten wie 1-Naphthyl (**1e**) oder 9*H*-Fluoren in Region A wurden schlecht bis gar nicht toleriert und führten zum Verlust der *in vitro* Aktivität. Auch die Einführung basischer Funktionalitäten wie Piperazin oder unsubstituierter Ringsysteme (Benzol, Furan) führte zu einer drastischen Verringerung bzw. zum Verlust der antimykobakteriellen *in vitro* Aktivität.¹⁷⁷

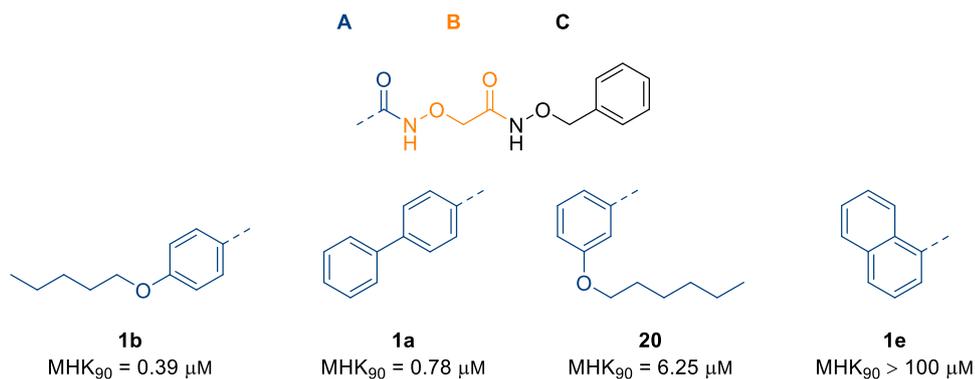


Abbildung 13: Strukturen und antimykobakterielle *in vitro* Aktivitäten einiger KSK-Analoga mit modifizierter Benzoyl-Einheit (Region A).¹⁷⁷

Region B

Die α -Aminooxyacetyl-Einheit der KSK-Leitstrukturen zeigte für nur wenige Strukturmodifikationen Toleranz (Abbildung 14). Die Methylierung in α -Stellung wurde gut toleriert (**21**), wohingegen die *N*-Methylierung der Alkoxyamid-Struktur zur Reduktion der antimykobakteriellen *in vitro* Aktivität führte (**22**). Die Einführung von Substituenten mit größerem sterischen Anspruch führte zum Verlust der antimykobakteriellen *in vitro* Aktivität (**23**) und auch der bioisostere Austausch der Alkoxyamid-Struktur gegen ein Trifluormethyl-substituiertes Ketoxim (**24**) lieferte keinen aktiven Inhibitor. Die α -Aminooxyacetyl-Einheit in Region B scheint ein essenzielles Strukturmotiv für die inhärente antimykobakterielle *in vitro* Aktivität der KSK-Leitstrukturen zu sein.¹⁷⁷

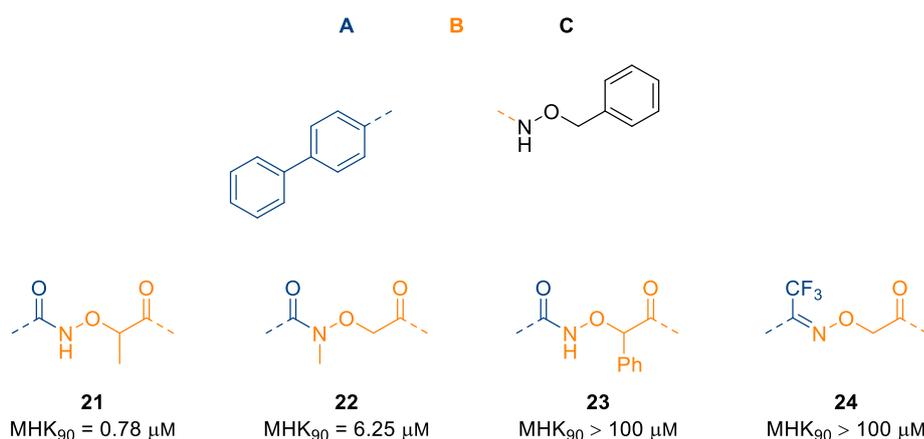


Abbildung 14: Strukturen und antimykobakterielle *in vitro* Aktivitäten einiger KSK-Analoga mit modifizierter α -Aminooxyacetyl-Einheit (Region B).¹⁷⁷

Region C

Strukturmodifikationen der *O*-Benzylhydroxylamin-Einheit (Region C) wurden gut toleriert und konnten die antimykobakterielle *in vitro* Aktivität der resultierenden KSK-Analoga in einigen Fällen verbessern (Abbildung 15). Die Einführung diverser Heteroaromaten wie Thiophen (**19a**), Thiazol und Pyridin sowie deren halogenierte Äquivalente führten beispielsweise zu einer Verbesserung der Aktivität. Unterschiedlichste Substitutionsmuster am Benzol-Ring (mono- und di-Halogenierung, Methylierung, Methoxylierung) sowie die Einführung linearer (**19c**) oder cyclischer Aliphaten in Region C lieferten ebenfalls Inhibitoren mit akzeptabler antimykobakterieller *in vitro* Aktivität. Auch die Verzweigung in Benzyl-Stellung und *N*-Alkylierung (Me, *n*-Pr, *i*-Pr) wurden toleriert. Region C bietet sich darüber hinaus hervorragend zur Einführung einer Propargyl-Einheit an (**19b**). Diese kann zur Synthese von Wirkstoffsonden für mechanistische Studien bzw. zur Identifizierung einer biomolekularen Zielstruktur genutzt werden.¹⁷⁷

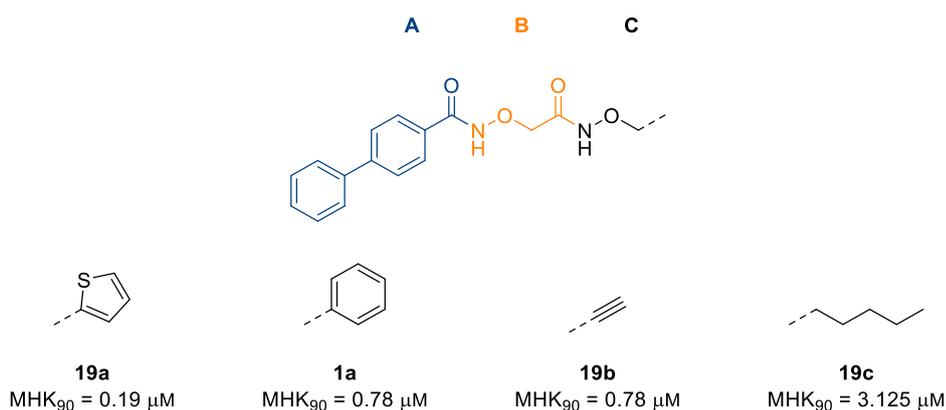


Abbildung 15: Strukturen und antimykobakterielle *in vitro* Aktivitäten einiger KSK-Analoga mit modifizierter *O*-Benzylhydroxylamin-Einheit (Region C).¹⁷⁷

2 Zielsetzung

Die chemische Optimierung von Leitstrukturen hat neben der Verbesserung von Wirksamkeit und Selektivität auch das Ziel, wünschenswerte Änderungen physikochemischer Eigenschaften (z. B. Stabilität und Löslichkeit) sowie pharmakokinetischer Eigenschaften (z. B. Bioverfügbarkeit und Metabolisierung) zu bewirken. Vor diesem Hintergrund wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. KURZ bereits Strukturoptimierungen sowie Untersuchungen zu physikochemischen Eigenschaften für die Leitstruktur *KSK 104* (**1a**) durchgeführt.¹⁷⁷ Im Rahmen dieses weiterführenden Projektes sollte ein entsprechendes Vorgehen für die zweite Leitstruktur *KSK 106* (**1b**) folgen.

Zur effektiven Strukturoptimierung von *KSK 106* (**1b**) erfolgte ebenfalls die Einteilung der Struktur in die Regionen A, B und C sowie die Benennung der verbrückenden Teilstrukturen (Abbildung 16). Region A besteht aus einer *para*-(Pentyloxy)benzoyl-Einheit, welche über eine Alkoxyamid-Struktur mit der α -Aminoxyacetyl-Einheit (Region B) verbunden ist. Die Benzoyloxyamid-Struktur erweitert das bestehende Gerüst aus den Regionen A und B um eine *O*-Benzylhydroxylamin-Einheit (Region C).

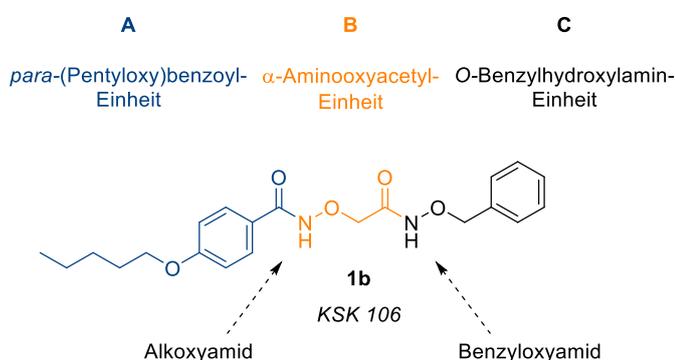


Abbildung 16: Einteilung der Leitstruktur *KSK 106* (**1b**) in die Regionen A, B und C.

Das primäre Ziel der Strukturmodifikationen war die Verbesserung der antimykobakteriellen *in vitro* Aktivität von *KSK 106* (**1b**). Durch Synthese einer umfangreichen Substanzbibliothek, biologische Testung im Rahmen eines Ganzzell-basierten Aktivitäts-Assays und anschließender Analyse der resultierenden SAR sollten die Inhibitoren sukzessive optimiert werden. Im Hinblick auf *in vivo* Studien im Tiermodell sollten die Strukturmodifikationen unter zusätzlicher Berücksichtigung der metabolischen Stabilität sowie der Wasserlöslichkeit durchgeführt werden.

Region A

Der nicht-substituierte Phenoether der *para*-(Pentyloxy)benzoyl-Einheit stellt eine potenzielle metabolische Schwachstelle dar. Dessen Phase I Metabolisierung durch oxidative *O*-Desalkylierung und nachfolgende Phase II Konjugation an der entstandenen phenolischen Hydroxylgruppe könnten Gründe für einen Aktivitätsverlust und die frühzeitige Eliminierung sein. Mit dem Ziel diese potenzielle Schwachstelle zu eliminieren und die Aktivität von *KSK 106* (**1b**) zu verbessern, sollte die Toleranz gegenüber Funktionalisierung (Alkylkette und Benzenkern) und der Einfluss des verbrückenden Heteroatoms ermittelt werden (Abbildung 17). Zusätzlich sollte die optimale Kettenlänge evaluiert und der Benzenkern gegen Heteroaromaten sowie Aliphaten ausgetauscht werden.

Region B

Aus Vorarbeiten von Dr. ALEXANDER BERGER war bekannt, dass die α -Aminooxyacetyl-Einheit von *KSK 104* (**1a**) nur geringe Toleranz für Modifikationen zeigt. Aus diesem Grund sollte für *KSK 106* (**1b**) lediglich die Bedeutung der Alkoxyamid-Struktur für die antimykobakterielle *in vitro* Aktivität, im Hinblick auf deren Hydrolyse und Wasserstoffbrückenbindungen, untersucht werden (Abbildung 17).

Region C

Analog zur Alkoxyamid-Struktur sollte auch die Bedeutung der Benzyloxyamid-Struktur für die antimykobakterielle *in vitro* Aktivität untersucht werden. Außerdem sollte die Benzyloxyamid-Struktur nach dem Vorbild von KISFALUDY *et al.* durch Anilid- sowie Hydrazid-Strukturen ersetzt werden (Abbildung 17).

Der nicht-substituierte Benzenkern der *O*-Benzylhydroxylamin-Einheit könnte im Zuge der Phase I Metabolisierung einer aromatischen Oxidation sowie nachfolgender Phase II Konjugation unterliegen und stellt damit eine weitere potenzielle metabolische Schwachstelle dar. Zur Erhöhung der metabolischen Stabilität sollte der Benzenkern funktionalisiert und durch verschiedene Aliphaten bzw. bioisostere fünf- oder sechsgliedrige Heteroaromaten ersetzt werden.

Mit Bezug auf die postulierte Hypothese zum Wirkmechanismus (*Prodrug*-Theorie, s. Kapitel 1.4.1, S. 27) sollte die Leitstruktur *KSK 106* (**1b**) in hydrolysierbare, potenzielle *Prodrugs* überführt werden. Ziel war es, den ionischen Charakter der involvierten Hydrolysefragmente bei physiologischem pH-Wert zu maskieren und lipophilere Derivate zu entwickeln. Um die *Prodrug*-Theorie zusätzlich zu stärken, sollte die Benzyloxyamid-Struktur durch bioisostere Heteroaromaten ersetzt werden, die nicht das Ziel hydrolytischer Bioaktivierung sein können.

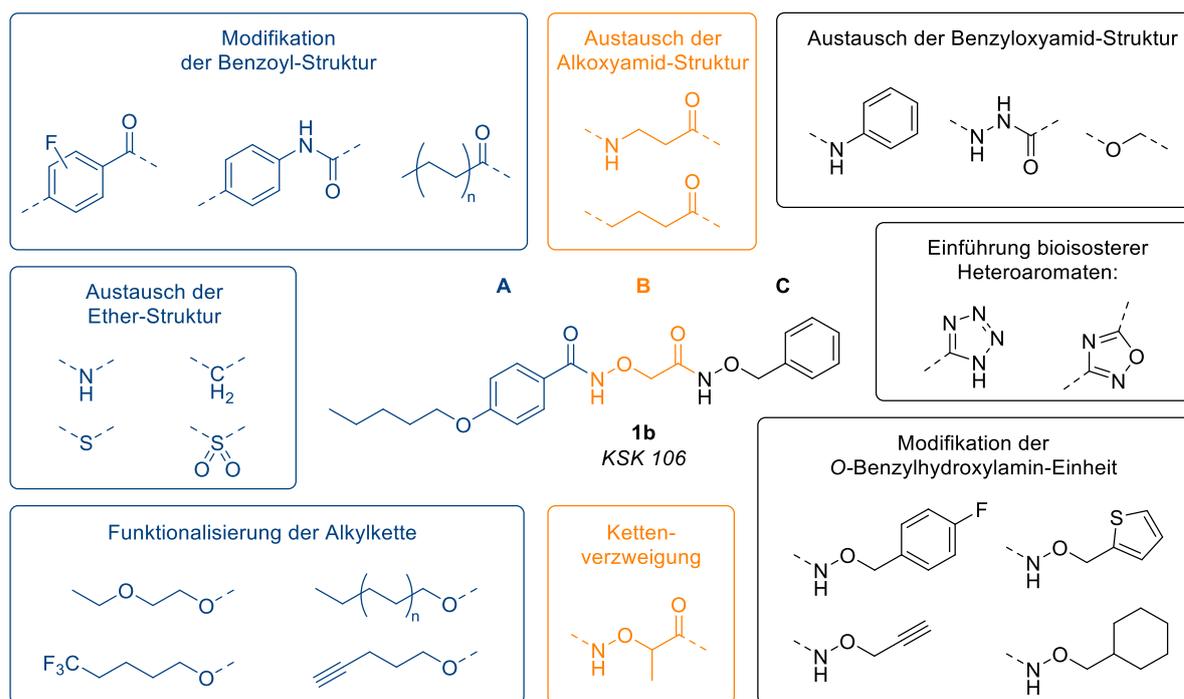


Abbildung 17: Auswahl geplanter Strukturmodifikationen für die Leitstruktur KSK 106 (**1b**) in den Regionen A, B und C.

Identifizierung des Wirkstoffziels und der aktiven Wirkform

Zur Identifizierung des Wirkstoffziels sowie der aktiven Wirkform von **KSK 106 (1b)** sollte die Leitstruktur sowohl mit Biotin als auch fluoreszierend markiert werden. Die synthetisierten Wirkstoffsonden werden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. KALSCHUEER im Rahmen eines *Pulldown*- bzw. Lokalisierungs-Assays eingesetzt.

Untersuchung der Stabilität

Sowohl die chemische Stabilität unter Nachahmung physiologischer Bedingungen als auch die Plasmastabilität von **KSK 104 (1a)** und **KSK 106 (1b)** sollten untersucht werden, um deren Eignung für die weitere präklinische Entwicklung zu prüfen.

Wasserlöslichkeit und präklinische Formulierung

Im Hinblick auf *in vivo* Studien im Tiermodell sollte die Wasserlöslichkeit von **KSK 104 (1a)** und von **KSK 106 (1b)** ermittelt werden und in Abhängigkeit davon verschiedene Vehikel zur Löslichkeitsvermittlung erprobt werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Strukturmodifikationen und SAR

Die Generierung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (SAR) und deren ausführliche Analyse ist von essenzieller Bedeutung für die präklinische Optimierung von Leitstrukturen. Aus diesem Grund wurde eine umfangreiche Substanzbibliothek von über 100 KSK-Analoga dargestellt, die Auskünfte über den Einfluss vielfältiger Strukturmodifikationen auf die antimykobakterielle Aktivität liefert. Aufgrund mangelnder Kenntnis über eine biomolekulare Zielstruktur bzw. einen Wirkmechanismus, wurden die Analoga Liganden-basiert, ergänzt durch die bestehenden SAR der Leitstruktur *KSK 104 (1a)*, entwickelt. Die Molekülregionen A, B und C wurden dabei separat behandelt und ausgewertet.

Neben der Verbesserung der antimykobakteriellen *in vitro* Aktivität adressierten einige Modifikationen zusätzlich die metabolische Stabilität sowie die Wasserlöslichkeit von *KSK 106 (1b)* mit dem Ziel, dessen pharmakokinetisches Profil bewerten und verbessern zu können.

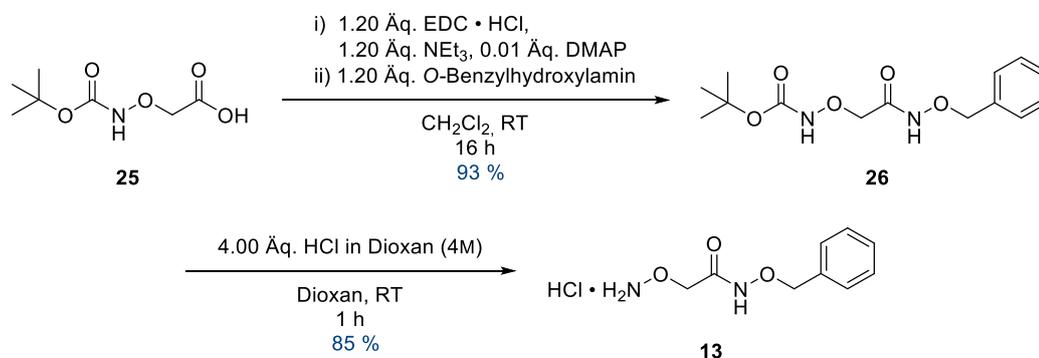
Im Folgenden werden sämtliche Strukturmodifikationen der Leitstruktur *KSK 106 (1b)* in den Regionen A, B und C vorgestellt. Alle dargestellten Analoga wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. KALSCHUEER im Rahmen eines phänotypischen Ganzzell-Assays auf ihre antimykobakterielle *in vitro* Aktivität gegenüber *M. tuberculosis* H37Rv untersucht. Dabei handelt es sich um einen Mikrobouillonverdünnungs-Assay, welcher von Dr. LASSE VAN GEELEN und M. Sc. ANNA-LENE KIFFE-DELFT mit drei Replika ($n = 3$) und einer sequenziellen Verdünnungsreihe von 100 – 0.048 μM (Verdünnungsfaktor: 2) entsprechend der Richtlinien des *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI) durchgeführt wurde.¹⁷⁸

Die Auswertung der biologischen Aktivität (MHK_{90}) ermöglichte die Erhebung der dargestellten SAR. Ohne das Wissen über eine biomolekulare Zielstruktur sind keine konkreten Wechselwirkungen bekannt und daher basieren die SAR auf der antimykobakteriellen *in vitro* Aktivität.

Die Lipophilie der Inhibitoren wurde anhand des Verteilungskoeffizienten P zwischen *n*-Octanol und Wasser eingeordnet ($\log P_{O/W}$) – je größer der $\log P_{O/W}$ ist, desto höher ist die Lipophilie. Die angegebenen Werte wurden nicht experimentell bestimmt, sondern computergestützt berechnet (*SwissADME*).¹⁷⁹

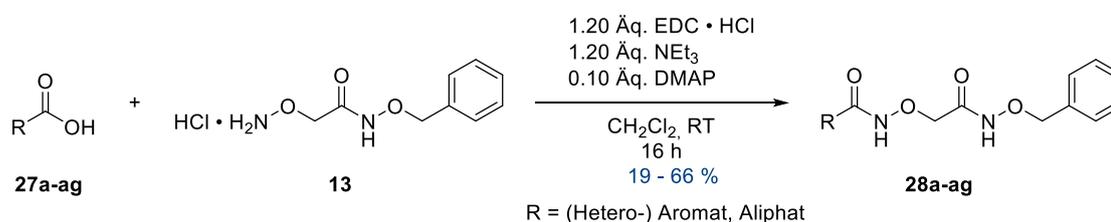
3.1.1 Synthese und biologische Evaluation der KSK-Analoga: Region A

Zur effizienten Modifikation der *para*-(Pentyloxy)benzoyl-Einheit (Region A) von *KSK 106* (**1b**) wurde zunächst die Synthese des Schlüsselintermediates **I** (**13**) optimiert. Durch EDC-Kupplung von Boc-geschützter Aminoxyessigsäure (**25**) mit *O*-Benzylhydroxylamin und anschließender Freisetzung des *O*-substituierten Hydroxylamins **13** durch Chlorwasserstoff in Dioxan konnte die bestehende Synthese um einen Reaktionsschritt verkürzt werden (Schema 6). Nach säulenchromatographischer Reinigung und Umkristallisation wurde das Schlüsselintermediat **I** (**13**) mit einer Reinheit von $\geq 99.9\%$ (HPLC) und mit 35 % mehr Gesamtausbeute erhalten (vgl. Kapitel 1.4.3, S. 31).



Schema 6: Optimierte Synthese von Schlüsselintermediat **I** (**13**).

Abschließend wurde Schlüsselintermediat **I** (**13**) EDC-vermittelt mit den Carbonsäuren **27a-ag** gekuppelt (Schema 7). Nach säulenchromatographischer Reinigung und Umkristallisation wurden die KSK-Analoga **28a-ag** mit modifizierter Benzoyl-Einheit in einer Reinheit von $> 95\%$ (HPLC) erhalten.



Schema 7: EDC-medierte Kupplung zur Darstellung der KSK-Analoga **28a-ag** mit modifizierter Benzoyl-Einheit (Region A).

Mit Ausnahme der kommerziell erhältlichen Carbonsäuren **27h**, **27w-z**, **27ac**, **27ae** und **27af** wurden die Carbonsäuren **27a-ag** nach Literaturvorschriften synthetisiert (s. Kapitel 3.1.1.1 – 3.1.1.4).

3.1.1.1 Variation der Kettenlänge

Die Länge der Alkylkette in Region A von KSK 106 (**1b**) kann neben einem Einfluss auf die Lipophilie des Inhibitors auch Einfluss auf potenzielle (hydrophobe) Wechselwirkungen mit einer biomolekularen Zielstruktur haben. Zur Ermittlung der optimalen Länge wurden KSK-Analoga mit Kettenlängen von C₄ – C₁₀ dargestellt (Abbildung 18).

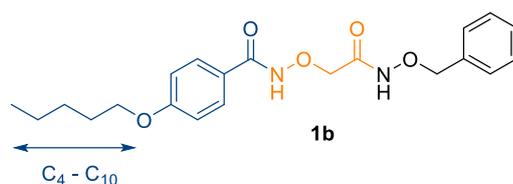
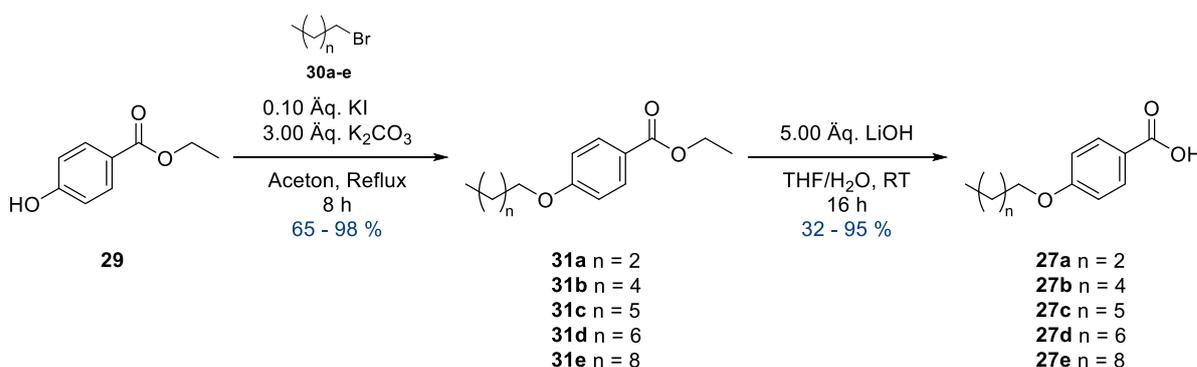


Abbildung 18: Variation der Kettenlänge in Region A von KSK 106 (**1b**).

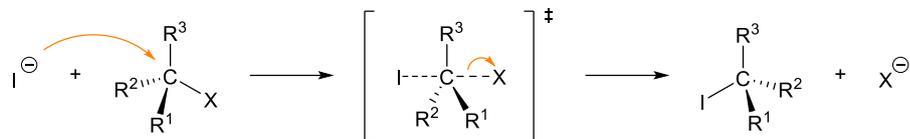
Unter FINKELSTEIN-Bedingungen wurde Ethyl-4-hydroxybenzoat (**29**) mit den Bromalkanen **30a-e** im Sinne der WILLIAMSON-Synthese verethert. Durch anschließende alkalische Esterhydrolyse wurden die Alkyloxybenzoesäuren **27a-e** erhalten (Schema 8) und nach Schema 7 zu den KSK-Analoga **28a-e** mit unterschiedlichen Kettenlängen in Region A umgesetzt (s. Kapitel 3.1.1, S. 40).^{180,181}



Schema 8: Darstellung der Alkyloxybenzoesäuren **27a-e** mit Kettenlängen zwischen C₄ und C₁₀.^{180,181}

Die FINKELSTEIN-Reaktion wird in der organischen Synthese zur *in situ* Generierung eines Alkyljodids genutzt, da dessen Reaktivität im Vergleich zum entsprechenden Chlorid bzw. Bromid gesteigert ist.^{182,183} Es handelt sich um eine konzertierte Reaktion, die nach einem S_N2-Mechanismus unter Inversion der Konfiguration (WALDEN-Umkehr) verläuft (Schema 9).

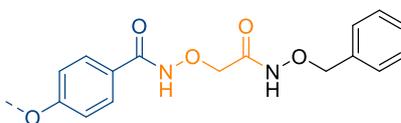
Durch Reaktionsführung in Aceton wird das Gleichgewicht aufgrund der schlechteren Löslichkeit von Chlorid- und Bromid-Salzen im Vergleich zu Iodid-Salzen auf Seiten des Alkyljodids verschoben.¹⁸⁴



Schema 9: Reaktionsmechanismus der FINKELSTEIN-Reaktion unter Inversion der Konfiguration.

Anhand der minimalen Hemmkonzentrationen (MHK_{90}) der KSK-Analoga **28a-e** ist ein deutlicher Trend zu erkennen (Tabelle 3). Sowohl die Verlängerung der Kohlenstoffkette ($C_6 - C_{10}$) als auch deren Verkürzung (C_4) liefern sukzessive Inhibitoren mit geringerer antimykobakterieller *in vitro* Aktivität im Vergleich zur Leitstruktur KSK 106 (**1b**). In Gegenwart eines Phenoleters-Sauerstoffs ist die optimale Länge der Alkylkette in Region A mit fünf Kohlenstoffatomen erreicht.

Tabelle 3: Minimale Hemmkonzentrationen (MHK_{90}) von KSK 106 (**1b**) und den KSK-Analoga **28a-e** mit unterschiedlichen Kettenlängen in Region A gegenüber *M. tuberculosis* H37Rv (erhoben von M. Sc. ANNA-LENE KIFFE-DELFF).¹⁸⁵



Struktur	C_5 1b	C_4 28a	C_6 28b	C_7 28c	C_8 28d	C_{10} 28e
MHK_{90} [μM]	0.39	0.78	1.56	1.56	1.56	3.125

3.1.1.2 Austausch der Ether-Struktur

Der Sauerstoff des Phenoethers in Region A könnte eine entscheidende Rolle für die antimykobakterielle *in vitro* Aktivität, aber auch für die physikochemischen Eigenschaften sowie die metabolische Stabilität von KSK 106 (**1b**) spielen. Neben seiner Fähigkeit als Wasserstoffbrücken-Akzeptor zu fungieren, hat er Einfluss auf die Lipophilie des Inhibitors und stellt eine potenzielle metabolische Schwachstelle durch oxidative *O*-Desalkylierung dar.

Verglichen mit der Ether-Struktur kann die Fähigkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken durch Einführung eines basischen sekundären Amins (Aza-Analogon) invertiert oder die Lipophilie durch Einführung eines Thioethers (Thia-Analogon) gesteigert werden (Abbildung 19). Ein reines Carba-Analogon könnte neben gesteigerter Lipophilie zusätzlich verbesserte metabolische Stabilität zeigen, da es keiner oxidativen Desalkylierung unterliegen würde.

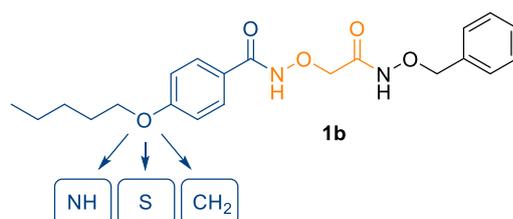
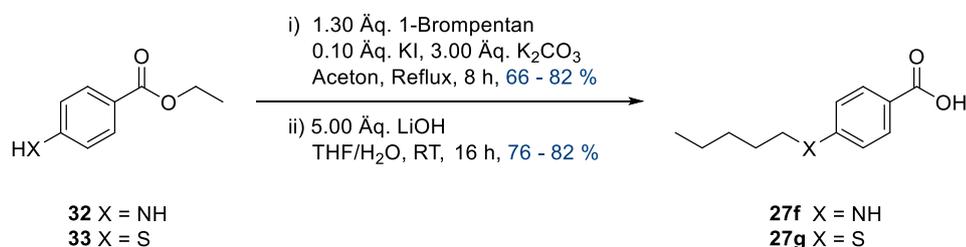


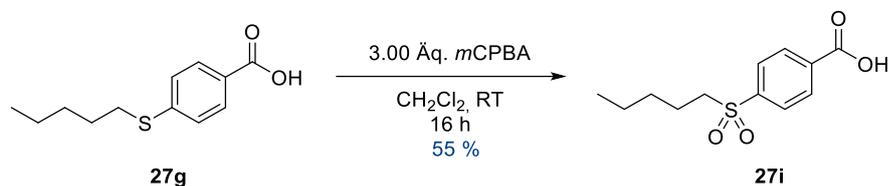
Abbildung 19: Austausch der Ether-Struktur in Region A von KSK 106 (**1b**).

Durch Alkylierung von Benzocain (**32**) bzw. Ethyl-4-mercaptobenzoat (**33**) mit 1-Brompentan unter FINKELSTEIN-Bedingungen und anschließender alkalischer Hydrolyse konnten 4-(Pentylamino)benzoesäure (**27f**) bzw. 4-(Pentylthio)benzoesäure (**27g**) erhalten werden (Schema 10).^{186,187}



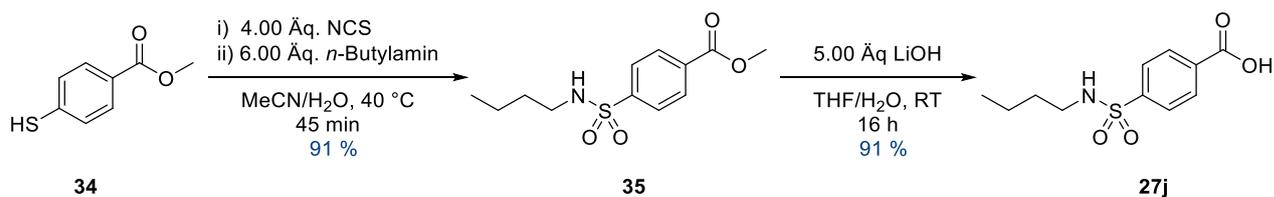
Schema 10: Darstellung der Carbonsäuren **27f** und **27g** durch Alkylierung von Benzocain (**32**) bzw. Ethyl-4-mercaptobenzoat (**33**) und anschließender alkalischer Hydrolyse.^{186,187}

Durch Oxidation mit *meta*-Chlorperbenzoesäure (*m*CPBA) konnte 4-(Pentylthio)benzoesäure (**27g**) zusätzlich in das entsprechende Sulfon **27i** überführt werden (Schema 11).¹⁸⁸



Schema 11: Darstellung von 4-(Pentylsulfonyl)benzoesäure (**27i**).¹⁸⁸

Zur Darstellung eines analogen Sulfonamids wurde das Thiol **34** nach einer Vorschrift von Xu *et al.*¹⁸⁹ mit *N*-Chlorosuccinimid (NCS) in Acetonitril/Wasser (7:1) oxidativ chloriert. Das entstandene Sulfonylchlorid konnte *in situ* mit *n*-Butylamin abgefangen werden, um Sulfonamid **35** zu erhalten. Die abschließende alkalische Hydrolyse des Methylesters lieferte Carbonsäure **27j** (Schema 12).¹⁸⁹

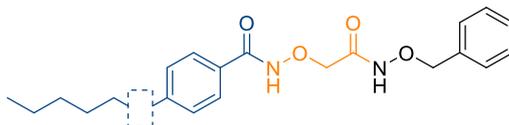


Schema 12: Darstellung der Carbonsäure **27j**.¹⁸⁹

Die synthetisierten Carbonsäuren **27f**, **27g**, **27i** und **27j** sowie die kommerziell verfügbare 4-(Hexyl)benzoesäure (**27h**) wurden nach Schema 7 zu den KSK-Analoga **28f-j** mit modifizierter Ether-Struktur in Region A umgesetzt (s. Kapitel 3.1.1, S. 40).

In Bezug auf den Austausch der Ether-Struktur in Region A von KSK 106 (**1b**) ist ein Zusammenhang zwischen Lipophilie und antimykobakterieller *in vitro* Aktivität zu beobachten (Tabelle 4).

Tabelle 4: Minimale Hemmkonzentrationen (MHK_{90}) von KSK 106 (**1b**) und den KSK-Analoga **28f-j** mit modifizierter Ether-Struktur in Region A gegenüber *M. tuberculosis* H37Rv (erhoben von M. Sc. ANNA-LENE KIFFE-DELF) sowie berechneter Lipophilie ($\log P_{O/W}$) der Inhibitoren.¹⁸⁵



Struktur	CH ₂ 28h	S 28g	O 1b	NH 28f	SO ₂ 28i	SO ₂ NH 28j
MHK_{90} [μM]	0.19	0.19	0.39	1.56	25	50
$\log P_{O/W}$ *	3.92	3.61	3.06	2.94	2.81	1.90

*berechnet nach SwissADME¹⁷⁹

Durch Steigerung der Lipophilie (Carba- und Thia-Analoga, **28h** und **28g**) konnten Inhibitoren mit leicht verbesserter antimykobakterieller *in vitro* Aktivität erhalten werden ($MHK_{90} = 0.19 \mu\text{M}$). Im Vergleich dazu sinkt die Aktivität der Inhibitoren sukzessive durch Verringerung der Lipophilie (**28f**, **28i** und **28j**).

Die verbesserte *in vitro* Aktivität des Carba-Analogons **28h** ($MHK_{90} = 0.19 \mu\text{M}$) zeigt, dass die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen in dieser Region keine essenzielle Rolle für die antimykobakterielle Wirksamkeit spielt.

3.1.1.3 Funktionalisierung der Alkylkette

Die unsubstituierte Alkylkette in Region A von KSK 106 (**1b**) stellt eine weitere potenzielle metabolische Schwachstelle dar (Hydroxylierung durch Oxidoreduktasen). Die Funktionalisierung der Alkylkette könnte somit nicht nur die antimykobakterielle *in vitro* Aktivität und die physikochemischen Eigenschaften der resultierenden Inhibitoren beeinflussen, sondern potenziell auch deren metabolische Stabilität (Abbildung 20).

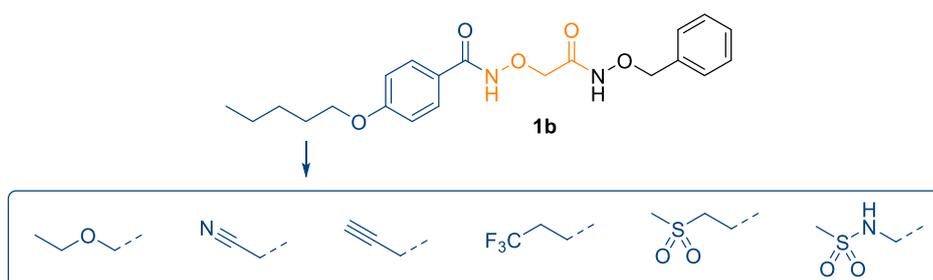
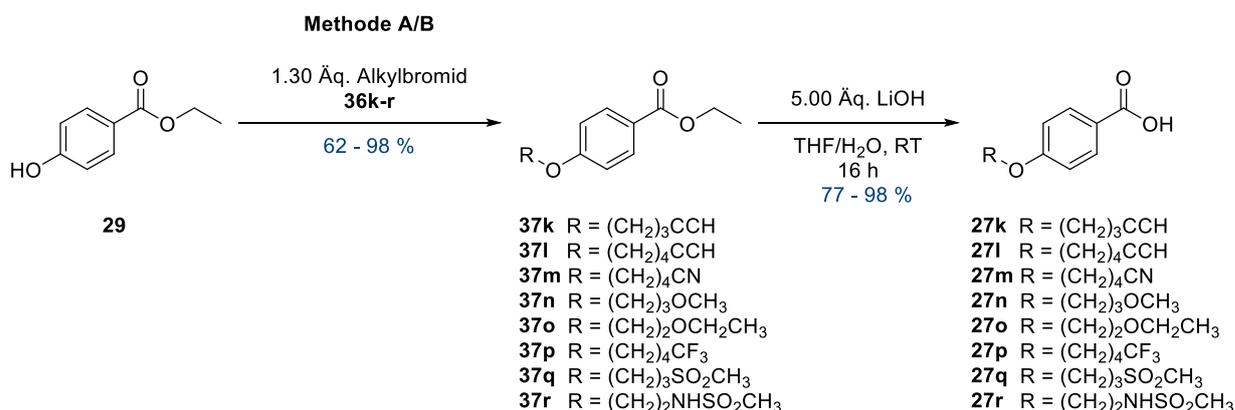


Abbildung 20: Funktionalisierung der Alkylkette in Region A von KSK 106 (**1b**).

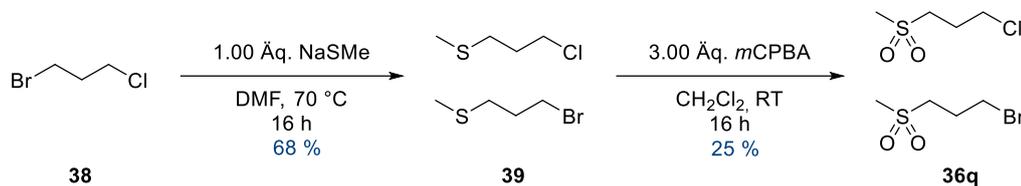
Die Synthese der benötigten Carbonsäuren erfolgte durch Veretherung von Ethyl-4-hydroxybenzoat (**29**) mit den Alkylbromiden **36k-r** (WILLIAMSON-Synthese) und nachfolgender alkalischer Hydrolyse (Schema 13).¹⁹⁰ Die Carbonsäuren **27k-r** wurden anschließend nach Schema 7 zu den KSK-Analoga **28k-r** mit funktionalisierter Alkylkette in Region A umgesetzt (s. Kapitel 3.1.1, S. 40).



Schema 13: Veretherung von Ethyl-4-hydroxybenzoat (**29**) und anschließende alkalische Hydrolyse zur Darstellung der Carbonsäuren **27k-r**. **Methode A:** K₂CO₃, DMF, 80 °C, 16 h; **Methode B:** K₂CO₃, KI, Aceton, Reflux, 8 h.^{190,191}

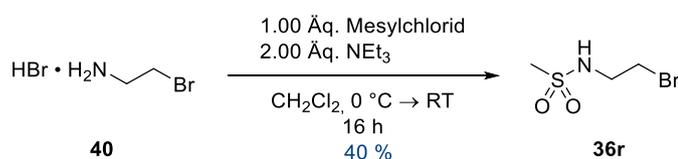
Die Alkylbromide **36k-p** waren kommerziell erhältlich und wurden ohne weitere Aufreinigung zur Synthese der Carbonsäuren **27k-p** genutzt.

Das Alkylsulfon **36q** konnte durch Methylthiolierung von 1-Brom-3-chlorpropan (**38**) mit dem Natriumsalz des Methylmercaptans und anschließender Oxidation mit *meta*-Chlorperbenzoesäure (*m*CPBA) erhalten werden (Schema 14).¹⁸⁸



Schema 14: Darstellung des Alkylsulfons **36q** nach Li et al.¹⁸⁸

Das entsprechende Alkylsulfonamid **36r** wurde durch Mesylierung von 2-Bromoethylamin-Hydrobromid (**40**) erhalten (Schema 15).¹⁹²



Schema 15: Darstellung des Alkylsulfonamids **36r** nach LEE et al.¹⁹²

Die minimalen Hemmkonzentrationen (MHK₉₀) der KSK-Analoga **28k-r** (Tabelle 5) bestätigen den bisher beobachteten Trend: Die Verringerung der Lipophilie durch terminale Funktionalisierung der Alkylkette (Region A) mit polaren Strukturmotiven führt zur Reduktion der antimykobakteriellen *in vitro* Aktivität (vgl. KSK 106 (**1b**) mit log *P*_{O/W} = 3.06).

Tabelle 5: Minimale Hemmkonzentrationen (MHK₉₀) von KSK 106 (**1b**) und den KSK-Analoga **28k-r** mit funktionalisierter Alkylkette in Region A gegenüber *M. tuberculosis* H37Rv (erhoben von M. Sc. ANNA-LENE KIFFE-DELF).¹⁸⁵

Struktur					
MHK ₉₀ [μM]	0.19	0.39	0.39	0.78	3.125
Struktur					
MHK ₉₀ [μM]	12.5	12.5	> 100	> 100	

Diesem Trend entsprechend sind die Sulfon- bzw. Sulfonamid-basierten Inhibitoren **28q** und **28r** ($\log P_{O/W} < 2$) mit einer MHK_{90} von über $100 \mu\text{M}$ als inaktiv anzusehen. Im Vergleich dazu liefert die Einführung von Ether-Strukturen zumindest Inhibitoren mit geringfügiger (**28o**, $MHK_{90} = 12.5 \mu\text{M}$) bis moderater (**28n**, $MHK_{90} = 3.125 \mu\text{M}$) Aktivität bei einem $\log P_{O/W} \approx 2$. Der direkte Vergleich von Nitril **28m** ($\log P_{O/W} = 2.35$, $MHK_{90} = 12.5 \mu\text{M}$) und dem entsprechenden terminalen Alkin **28l** ($\log P_{O/W} = 3.08$, $MHK_{90} = 0.39 \mu\text{M}$) in Bezug auf Lipophilie und antimykobakterielle *in vitro* Aktivität veranschaulicht den beobachteten Trend deutlich. Das C_5 -Propargyl-Analogon **28k** ist mit einer MHK_{90} von $0.19 \mu\text{M}$ sogar aktiver (Faktor 2) als *KSK 106* (**1b**) und eignet sich zur bioorthogonalen Markierung der KSK-Leitstruktur in Region A zur Darstellung von Wirkstoffsonden (s. Kapitel 3.2, S. 84). Das Trifluormethyl-Analogon **28p** könnte neben guter *in vitro* Aktivität ($MHK_{90} = 0.78 \mu\text{M}$) zusätzlich verbesserte metabolische Stabilität zeigen.

3.1.1.4 Modifikation der Benzoyl-Struktur

Ein weiteres Ziel struktureller Optimierung in Region A von *KSK 106* (**1b**) war die *para*-substituierte Benzoyl-Struktur. Dabei wurde die Funktionalisierung des Benzenkerns sowie dessen Austausch gegen Heteroaromaten und Alkylketten vorgenommen, um die Toleranz gegenüber diversen Strukturelementen zu evaluieren und damit die Bedeutung der Benzoyl-Struktur für antimykobakterielle *in vitro* Aktivität zu bewerten (Abbildung 21).

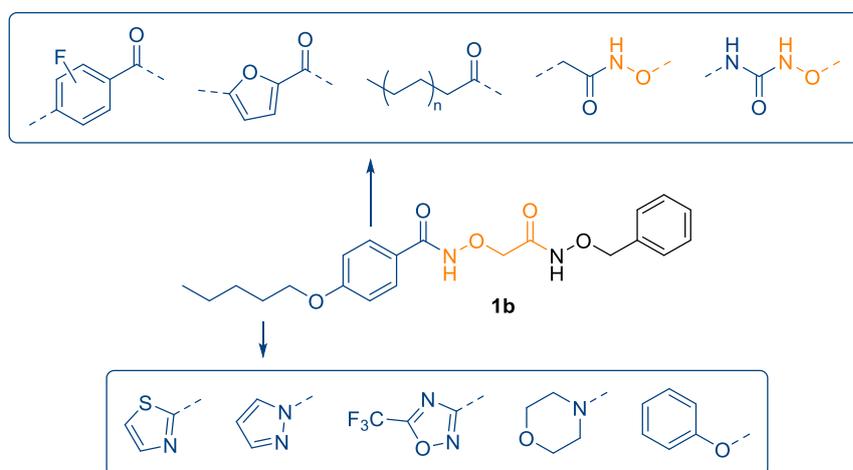
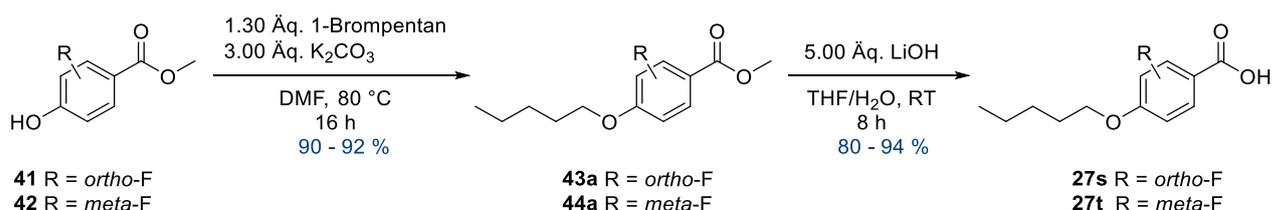


Abbildung 21: Modifikation der Benzoyl-Struktur in Region A von *KSK 106* (**1b**).

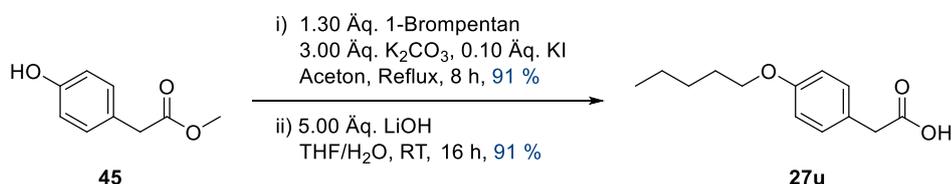
Im Rahmen der Strukturmodifikationen wurde der Benzenkern gegen fluorierte Äquivalente ausgetauscht. Die kommerziell erhältlichen fluorierten Methyl-4-hydroxybenzoate **41** und **42** wurden durch die WILLIAMSON-Synthese mit 1-Brompentan verethert. Nach alkalischer Hydrolyse wurden die Carbonsäuren **27s-t** erhalten (Schema 16)^{193,194} und gemäß Schema 7 zu den *KSK*-Analoga **28s-t** mit fluorierte Benzoyl-Struktur in Region A umgesetzt (s. Kapitel 3.1.1, S. 40).



Schema 16: Darstellung der fluorierten Carbonsäuren **27s-t** nach WEI bzw. HIRAI et al.^{193,194}

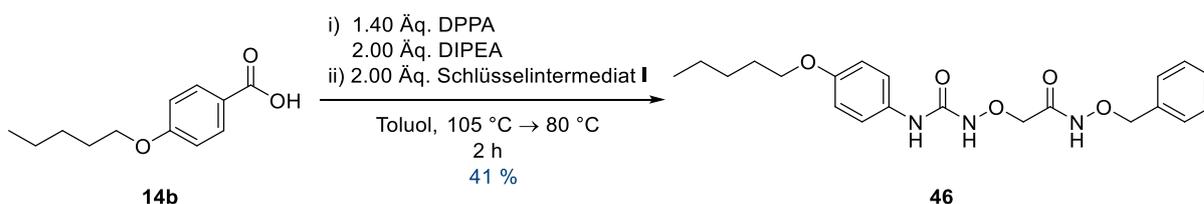
Fluorierte Verbindungen haben einen bemerkenswerten Ruf im Bereich der medizinischen Chemie und spielen eine bedeutende Rolle für Leitstrukturen in der therapeutischen Anwendung. Fluor ist das elektronegativste aller Elemente und übt einen stark negativen induktiven (–I) Effekt aus. Während sich C–F und C–H Bindungen bezogen auf den sterischen Anspruch nur geringfügig unterscheiden, ist deren Reaktionsverhalten hingegen in vielen Belangen konträr. Der Austausch einer schwachen C–H Bindung (411 kJ/mol)¹⁹⁵ durch eine stärkere C–F Bindung (485 kJ/mol)¹⁹⁵ kann der oxidativen Metabolisierung entgegenwirken und die einhergehende Umkehr der Bindungspolarität kann zusätzliche Wechselwirkungen mit einer biomolekularen Zielstruktur ermöglichen, bei denen Fluor als Wasserstoffbrücken-Akzeptor fungiert. Ergänzt durch einen Einfluss auf Lipophilie und pK_s kann die Einführung eines Fluoratoms einen positiven Einfluss auf die orale Bioverfügbarkeit und die Aktivität eines Wirkstoffkandidaten haben.^{196–199}

Neben der Toleranz gegenüber aromatischer Fluorierung wurde ebenfalls der Austausch der Benzoyl-Struktur gegen eine Phenylacetyl-Struktur untersucht. Die Synthese der zugrundeliegenden Phenyllessigsäure **27u** erfolgte durch Alkylierung von Methyl-4-(hydroxy)phenylacetat (**45**) und nachfolgender Hydrolyse des Methylesters (Schema 17). Die erhaltene Carbonsäure **27u** wurde nach Schema 7 zum KSK-Analogon **28u** umgesetzt (s. Kapitel 3.1.1, S. 40).



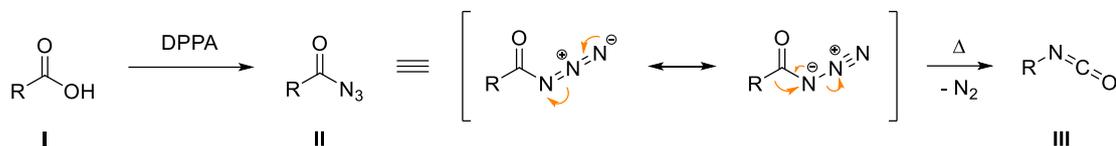
Schema 17: Darstellung der *para*-substituierten Phenyllessigsäure **27u**.

Nach diesem Vorbild wurde zusätzlich das Alkoxy-Harnstoff-Analogon **46** ausgehend von 4-(Pentyloxy)benzoesäure (**14b**) nach der Vorschrift von SİR *et al.* dargestellt (Schema 18).²⁰⁰ Der Einsatz von Diphenylphosphorylazid (DPPA) ermöglichte die *in situ* Generierung des korrespondierenden Isocyanats, welches durch Zugabe von Schlüsselintermediat **I** (**13**) zum Alkoxy-Harnstoff-Analogon **46** abreagierte.



Schema 18: Darstellung des Alkoxy-Harnstoff-Analogons **46** durch *in situ* Generierung eines Isocyanats nach SİR *et al.*²⁰⁰

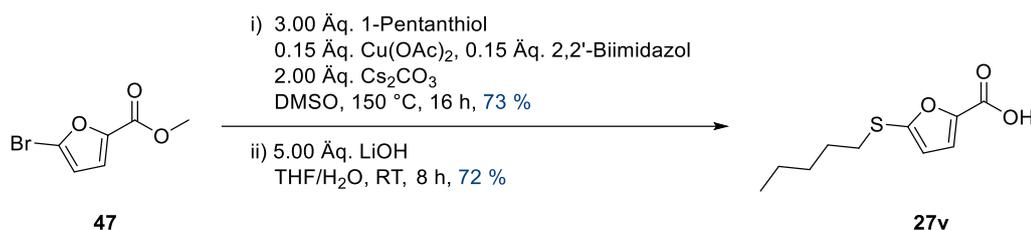
Mit Hilfe von DPPA können Carbonsäuren (**I**) in die entsprechenden Azide (**II**) umgewandelt werden und die nachfolgende Curtius-Reaktion zum korrespondierenden Isocyanat **III** ermöglicht die Erzeugung von primären Aminen, Carbamaten oder auch Harnstoffen (Schema 19).^{201,202}



Schema 19: Darstellung eines Carbonsäure-Azids (**II**) und Curtius-Umlagerung zum entsprechenden Isocyanat **III**.^{201,202}

Der Ring-zu-Ring-Austausch des Benzenkerns in Region A ermöglichte Rückschlüsse über die Notwendigkeit eines sechsgliedrigen, carbocyclischen Aromaten für die antimykobakterielle *in vitro* Aktivität. Zu diesem Zweck eignete sich der fünfgliedrige Heteroaromat Furan aufgrund seiner Bioisosterie zu Benzol.²⁰³ Zur Kompensation der leicht erhöhten Hydrophilie durch Furan wurde die verbrückende Ether-Struktur durch einen stärker lipophilen Thioether ersetzt.

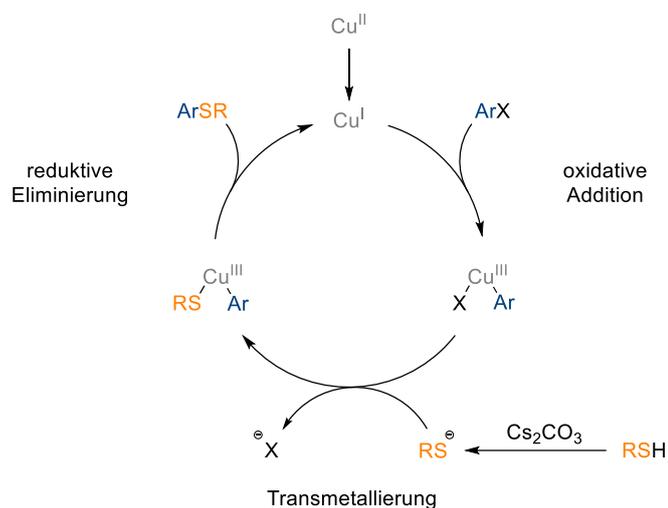
Die Synthese der Carbonsäure **27v** gelang durch Kupplung von Bromofuran **47** und 1-Pentanthiol im Sinne einer modifizierten ULLMANN-Reaktion²⁰⁴ und nachfolgender Hydrolyse des Methylesters (Schema 20). Durch anschließende Kupplungsreaktion mit Schlüsselintermediat **I** (**13**) unter Verwendung von EDC wurde das KSK-Analogon **28v** erhalten (Schema 7, s. Kapitel 3.1.1, S. 40).



Schema 20: Darstellung der Carbonsäure **27v** im Sinne einer modifizierten ULLMANN-Reaktion.²⁰⁴

Unter der ULLMANN-Reaktion versteht man die Kupfer-katalysierte Kupplung von zwei Arylhalogeniden zum entsprechenden Biaryl. Allerdings existieren auch diverse Varianten, wie z. B. die JOURDAN-ULLMANN-Reaktion, bei der ein Arylhalogenid mit einem Anilin-Derivat zum entsprechenden Biarylamin umgesetzt wird. In der Literatur werden hauptsächlich zwei mögliche Mechanismen für Reaktionen des ULLMANN-Typs beschrieben: Katalysezyklen, die entweder auf oxidativer Addition sowie reduktiver Eliminierung oder auf Bildung eines aktivierenden π -Komplexes basieren.²⁰⁵

Die Synthese der Carbonsäure **27v** basiert auf einer modernen Variante der ULLMANN-Reaktion. Im Jahr 2014 beschrieben ZENG *et al.* die C – S Kreuzkupplung von aliphatischen Thiolen mit Arylhalogeniden als Reaktion des ULLMANN-Typs.²⁰⁴ Sie postulierten dabei einen homogenen Katalysezyklus, der auf oxidativer Addition und reduktiver Eliminierung basiert (Schema 21).



Schema 21: Reaktionsmechanismus der C – S Kreuzkupplung des ULLMANN-Typs nach ZENG *et al.*²⁰⁴

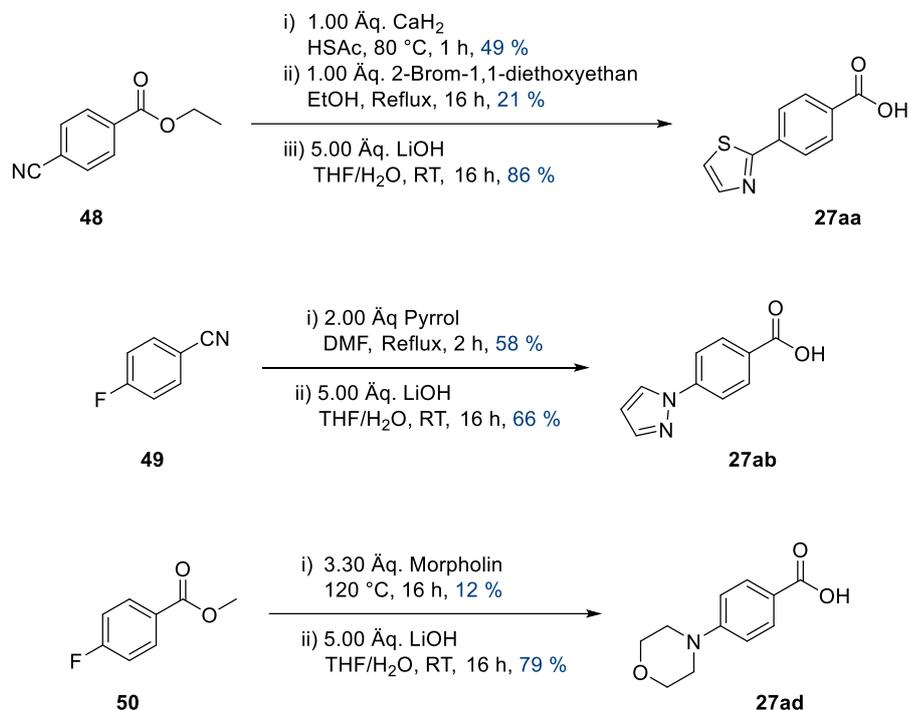
Um die Bedeutung der Benzoyl-Struktur in Region A für die antimykobakterielle *in vitro* Aktivität von KSK 106 (**1b**) weiter zu untersuchen, wurde diese im Rahmen der Strukturmodifikationen zusätzlich gegen gesättigte Aliphaten ausgetauscht.

Die Synthese der entsprechenden KSK-Analoga **28w-z** mit rein aliphatischer Struktur in Region A erfolgte durch EDC-Kupplung der kommerziell erhältlichen Monocarbonsäuren Pentansäure (**27w**), 2-Propylpentansäure (**27x**), Nonansäure (**27y**) und Decansäure (**27z**) mit Schlüsselintermediat **I** (**13**) (Schema 7, s. Kapitel 3.1.1, S. 40).

In Abwesenheit der Benzoyl-Struktur ist die Ausbildung von π,π -Wechselwirkungen in Region A nicht möglich. Diese Wechselwirkungen treten zwischen π -Systemen von Molekülen auf und können beispielsweise verantwortlich für die Ausbildung eines Enzym-Substrat-Komplexes sein, sofern eine aromatische Aminosäureseitenkette (Phe, Trp, Tyr, His) im aktiven Zentrum vorhanden ist.^{206,207}

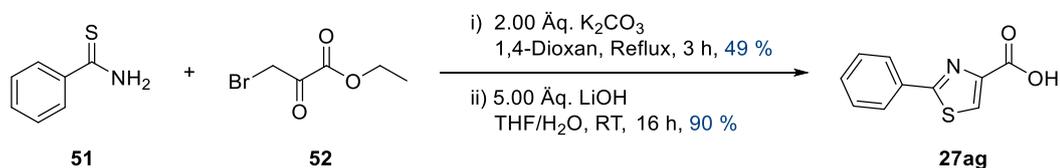
Um mögliche π,π -Wechselwirkungen zu maximieren wurden nach dem Vorbild der Leitstruktur KSK 104 (**1a**) verschiedene KSK-Analoga mit Biaryl-Struktur in Region A dargestellt. Dazu wurde die Benzoyl-Struktur in *para*-Stellung mit fünfgliedrigen Heterocyclen (**28aa-ac**), Morpholin (**28ad**) oder Phenol (**28ae**) substituiert bzw. gegen 1*H*-Indol (**28af**) ausgetauscht.

Die benötigten Carbonsäuren waren entweder kommerziell erhältlich (**27ac**, **27ae** und **27af**) oder wurden nach etablierten Literaturvorschriften synthetisiert (**27aa**, **27ab** und **27ad**, Schema 22).^{208–210}



Schema 22: Darstellungen der Carbonsäuren **27aa**, **27ab** und **27ad**.^{208–210}

Ein weiteres KSK-Analogon mit Biaryl-Struktur in Region A wurde ausgehend von Thiobenzamid (**51**) durch die HANTZSCH-Thiazolsynthese dargestellt. Nach *N*-Alkylierung mit Ethyl-3-Bromopyruvat (**52**), intramolekularer Cyclokondensation zum 2-Phenylthiazol und abschließender Hydrolyse des Ethylesters konnte die Thiazol-4-Carbonsäure **27ag** erhalten werden (Schema 23).²¹¹



Schema 23: Darstellung der Thiazol-4-Carbonsäure **27ag**.²¹¹

Die EDC-vermittelte Kupplungsreaktion der Carbonsäuren **27aa-ag** und Schlüsselintermediat **I (13)** liefere die KSK-Analoga **28aa-ag** mit Biaryl-Struktur in Region A (Schema 7, s. Kapitel 3.1.1, S. 40).

Die antimykobakterielle *in vitro* Aktivität der KSK-Analoga **28w-z** mit rein aliphatischer Struktur in Region A bestätigt, dass hydrophobe Wechselwirkungen für eine ausgeprägte antimykobakterielle *in vitro* Aktivität notwendig sind (Tabelle 6). Sofern die Lipophilie der Leitstruktur *KSK 106* (**1b**, $\log P_{O/W} = 3.06$) nicht verringert wurde, lieferte der Austausch der Benzoyl-Struktur gegen lineare Alkylketten (C₉ und C₁₀) potente Inhibitoren mit MHK₉₀ von 0.39 μM (**28y**, $\log P_{O/W} = 3.05$ und **28z**, $\log P_{O/W} = 3.36$). Die Einführung einer kürzeren Alkylkette (C₅, **28w**, $\log P_{O/W} = 1.48$) führte bereits zu einer deutlichen Reduktion der antimykobakteriellen *in vitro* Aktivität (MHK₉₀ = 6.25 μM) und eine Kettenverzweigung (**28x**, $\log P_{O/W} = 2.50$) führte letztlich zum Aktivitätsverlust (MHK₉₀ > 100 μM).

Tabelle 6: Minimale Hemmkonzentrationen (MHK₉₀) von *KSK 106* (**1b**) und den *KSK*-Analoga **28s-ag** mit modifizierter Benzoyl-Struktur in Region A gegenüber *M. tuberculosis* H37Rv (erhoben von M. Sc. ANNA-LENE KIFFE-DELFF).¹⁸⁵

Struktur		 28y n = 5 28z n = 6		
MHK ₉₀ [μM]	0.39	0.39	0.78	1.56
Struktur				
MHK ₉₀ [μM]	1.56	3.125	3.125	3.125
Struktur				
MHK ₉₀ [μM]	6.25	6.25	25	> 100
Struktur				
MHK ₉₀ [μM]	> 100	> 100	> 100	> 100

Der Austausch der Benzoyl-Struktur in Region A von *KSK 106* (**1b**) gegen eine homologe Phenylacetyl-Struktur (**28u**) resultierte in einer Verringerung der Aktivität um den Faktor 8 ($\text{MHK}_{90} = 3.125 \mu\text{M}$) und das entsprechende Alkoxy-Harnstoff-Analogon **46** zeigte keinerlei antimykobakterielle *in vitro* Aktivität ($\text{MHK}_{90} > 100 \mu\text{M}$).

Auch der bioisostere Austausch des Benzenkerns gegen Furan führte zu einer Reduktion der antimykobakteriellen *in vitro* Aktivität (**28v**, $\text{MHK}_{90} = 3.125 \mu\text{M}$), wohingegen dessen Fluorsubstitution gut toleriert wurde und nur zur geringfügigen Reduktion der antimykobakteriellen *in vitro* Aktivität führte (**28s**, $\text{MHK}_{90} = 0.78 \mu\text{M}$ und **28t**, $\text{MHK}_{90} = 1.56 \mu\text{M}$).

Die Inhibitoren **28aa-ag**, die nach dem Vorbild der Leitstruktur *KSK 104* (**1a**) mit einer Biaryl-Struktur in Region A entwickelt wurden, konnten nicht durch die Verbesserung der antimykobakteriellen *in vitro* Aktivität überzeugen. Einzig das Diphenylether-Analogon (**28ae**, $\text{MHK}_{90} = 1.56 \mu\text{M}$) und das Trifluormethyloxadiazol (TFMO)-Analogon (**28ac**, $\text{MHK}_{90} = 3.125 \mu\text{M}$) zeigten moderate *in vitro* Aktivität, wohingegen alle weiteren Biaryl-Analoga als wenig aktiv bis inaktiv anzusehen sind ($\text{MHK}_{90} = 6.25 - 100 \mu\text{M}$).

3.1.2 Synthese und biologische Evaluation der KSK-Analoga: Region B

Aus der Dissertation von Dr. ALEXANDER BERGER geht hervor, dass die α -Aminooxyacetyl-Einheit (Region B) der KSK-Leitstrukturen ein entscheidendes Strukturmotiv für die Inhibition mykobakteriellen Wachstums ist und wenig Raum für strukturelle Modifikationen bietet. Für ein tiefgreifenderes Verständnis der SAR in Region B wurden dennoch ausgewählte Modifikationen der α -Aminooxyacetyl-Einheit von KSK 106 (**1b**) durchgeführt (Abbildung 22).

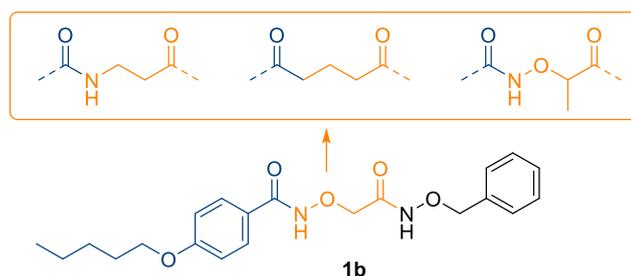
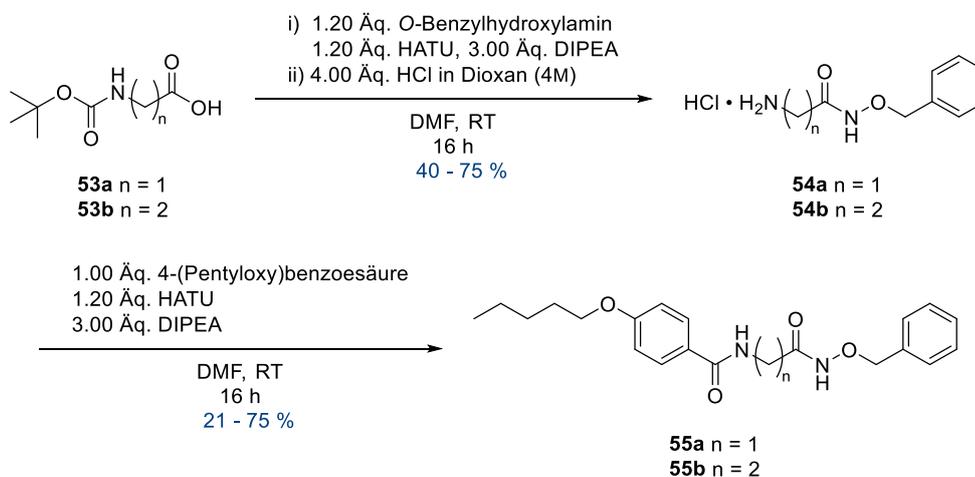


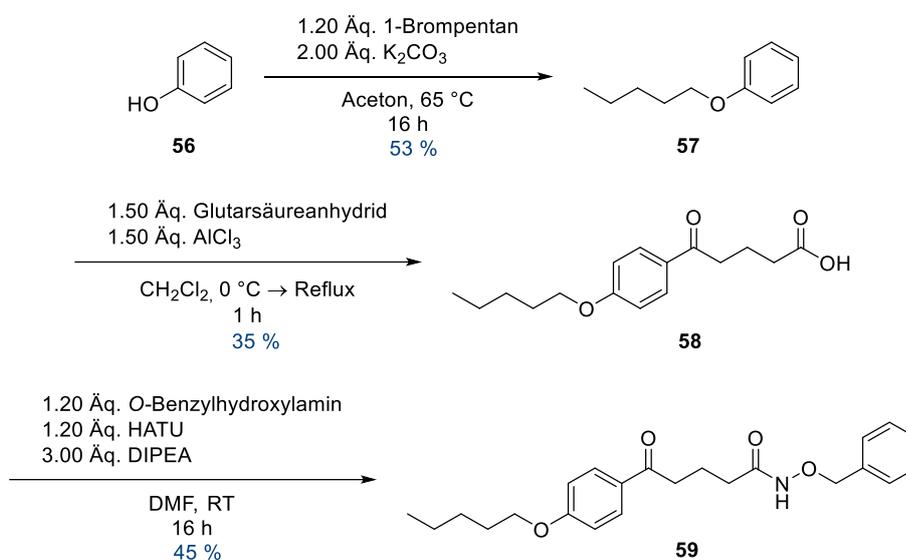
Abbildung 22: Strukturmodifikationen der α -Aminooxyacetyl-Einheit (Region B) von KSK 106 (**1b**).

Zunächst wurde die Alkoxyamid-Struktur von KSK 106 (**1b**) durch Amid-Strukturen ersetzt. Durch die Kupplungsreaktion (HATU) von Boc-geschütztem Glycin (**53a**) bzw. Boc-geschütztem β -Alanin (**53b**) mit *O*-Benzylhydroxylamin und anschließender Entschützung durch Chlorwasserstoff in Dioxan konnten die Amine **54a** bzw. **54b** als Hydrochloride erhalten werden. Diese wurden durch erneute HATU-Kupplung mit 4-(Pentyloxy)benzoesäure in die KSK-Analoga **55a-b** mit Amid-Struktur in Region B überführt (Schema 24).



Schema 24: Darstellung der KSK-Analoga **55a-b** mit Amid-Struktur in Region B ausgehend von Boc-Glycin (**53a**) und Boc- β -Alanin (**53b**).

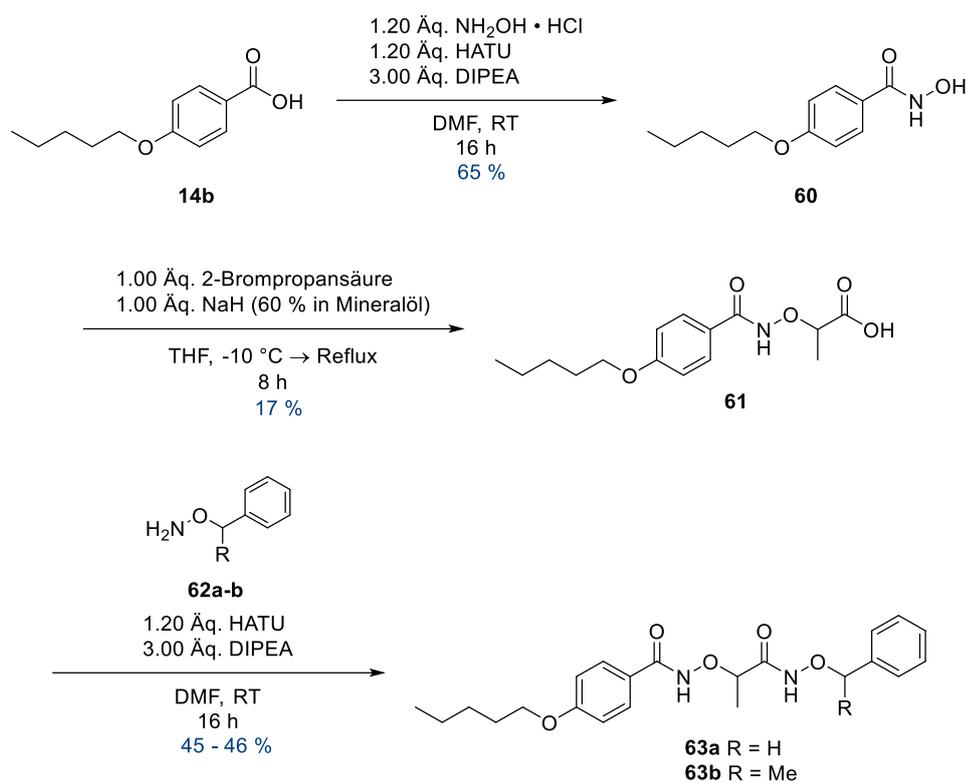
Um die Bedeutung der Alkoxyamid-Struktur für antimykobakterielle *in vitro* Aktivität weiter zu untersuchen, wurde zusätzlich das KSK-Analogon **59** mit Keton-Struktur in Region B dargestellt. Ausgehend von Phenol (**56**) wurde es über drei Schritte synthetisiert (Schema 25). Nach der Veretherung mit 1-Brompentan (WILLIAMSON-Synthese)²¹² wurde der Phenoether **57** im Sinne einer FRIEDEL-CRAFTS-Acylierung mit Glutarsäureanhydrid umgesetzt. Die entstandene δ -Ketocarbonsäure **58** wurde abschließend einer Kupplungsreaktion mit *O*-Benzylhydroxylamin unter Verwendung von HATU unterzogen, um das KSK-Analogon **59** mit Keton-Struktur in Region B zu erhalten.



Schema 25: Darstellung des KSK-Analogons **59** mit Keton-Struktur in Region B.²¹²

Das KSK-Analogon **59** sollte im Vergleich zu *KSK 106* (**1b**) und auch zu den KSK-Analoga **55a-b** mit Amid-Struktur in Region B ein zunehmend eingeschränktes Verhalten in Bezug auf die Ausbildung intermolekularer Wechselwirkungen zeigen. Durch Abwesenheit der beiden Alkoxyamid-Heteroatome (Stickstoff und Sauerstoff) mangelt es **59** an potenziell bedeutsamen Wasserstoffbrücken-Donoren bzw. -Akzeptoren, die verantwortlich für Interaktionen mit einer biomolekularen Zielstruktur sein könnten. Auch vor dem Hintergrund des postulierten Wirkmechanismus (s. Kapitel 1.4.1, S. 27) ist der Austausch der Alkoxyamid-Struktur gegen eine Keton-Struktur von Interesse, da eine Biotransformation durch Amidohydrolasen an dieser Stelle unterbunden ist.

Es folgte die Darstellung von KSK-Analoga mit Kettenverzweigung durch Einführung einer Methylgruppe in α -Stellung zur Benzyloxyamid-Struktur (Region B, **63a**) sowie einer zusätzlichen Methylgruppe in Benzyl-Stellung (Region C, **63b**). Die HATU-basierte Kupplungsreaktion von 4-(Pentyloxy)benzoesäure (**14b**) und Hydroxylamin-Hydrochlorid lieferte zunächst Hydroxamsäure **60**. Nach *O*-Alkylierung mit 2-Brompropansäure und erneuter Kupplungsreaktion (HATU) mit den *O*-substituierten Hydroxylaminen **62a-b** konnten die KSK-Analoga **63a-b** mit Kettenverzweigung in den Regionen B und C erhalten werden (Schema 26).



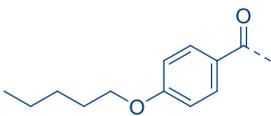
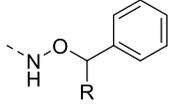
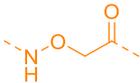
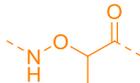
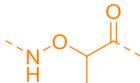
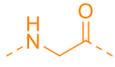
Schema 26: Darstellung der KSK-Analoga **63a-b** mit Kettenverzweigung in den Regionen B und C.

In der Fachliteratur wird die α -Methylierung und ihr Einfluss auf die metabolische Stabilität von Amiden und verwandten Stoffklassen vielfältig diskutiert. So zeigten beispielsweise einige methylierte Derivate von Anandamid, einem endogenen Cannabinoid-Rezeptor Ligand, eine gesteigerte Stabilität gegenüber der Degradierung durch Amidasen.²¹³ Im Bereich der Malaria-Forschung entdeckten STRAUSS *et al.* die erhöhte Stabilität des α -Methyl-Derivates von Pantothenamid gegenüber Amidohydrolasen.²¹⁴ Die Einführung einer Methylgruppe in räumlicher Nähe zu einer enzymatisch hydrolysierbaren Funktionalität kann deren Metabolisierung also verlangsamen und somit die *in vivo* Halbwertszeit steigern. Mit Bezug auf die postulierte *Prodrug*-Theorie ist also eine Verringerung der antimykobakteriellen *in vitro* Aktivität für **63a** und **63b** zu erwarten.

Mit $MHK_{90} > 100 \mu\text{M}$ betonen die biologischen Aktivitäten von **55a** und **55b** die Wichtigkeit des Alkoxyamid-Sauerstoffs in Region B als Wasserstoffbrücken-Akzeptor bzw. zur Bindungspolarisierung und Steigerung der N – H Azidität (Tabelle 7). Auch die fehlende biologische Aktivität des Keton-Analogons **59** ($MHK_{90} > 100 \mu\text{M}$), dem es darüber hinaus an einem Wasserstoffbrücken-Donor mangelt, untermauert die Bedeutung der Alkoxyamid-Struktur als essenzielles Strukturmotiv für antimykobakterielle *in vitro* Aktivität. Diese Ergebnisse legen nicht-kovalente Interaktionen mit einer biomolekularen Zielstruktur nahe.

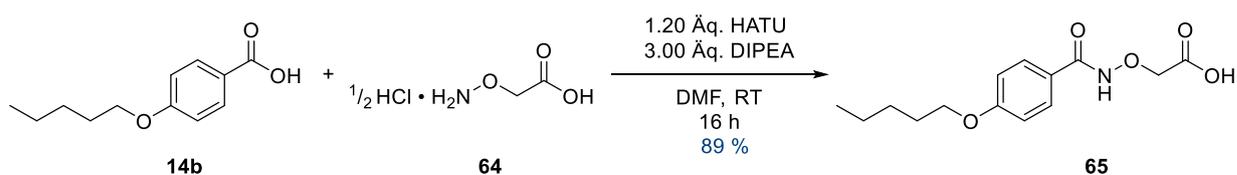
Die Methylierung in α -Stellung zur Benzyloxyamid-Struktur (Region B) führte erwartungsgemäß zu einer Reduktion der Aktivität (**63a**, $MHK_{90} = 3.125 \mu\text{M}$) und eine zusätzliche Methylgruppe in Benzyl-Stellung (Region C) verschlechterte diese weiter (**63b**, $MHK_{90} = 12.5 \mu\text{M}$). Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese zum Wirkmechanismus: Die KSK-Leitstrukturen sind vermutlich *Prodrugs*, die einer hydrolytischen Bioaktivierung bedürfen (*Prodrug*-Theorie, s. Kapitel 1.4.1, S. 27). Umgebende Methylgruppen, vor allem die Kombination aus α - und Benzyl-Stellung, schirmen die Benzyloxyamid-Struktur sterisch ab, wodurch eine Hydrolyse durch Amidohydrolasen und die damit einhergehende Bioaktivierung eingeschränkt abläuft.

Tabelle 7: Minimale Hemmkonzentrationen (MHK_{90}) von KSK 106 (**1b**) und den KSK-Analoga mit modifizierter α -Aminoxyacetyl-Einheit (Region B) gegenüber *M. tuberculosis* H37Rv (erhoben von M. Sc. ANNA-LENE KIFFE-DELF).¹⁸⁵

			
Struktur	 1b R = H	 63a R = H	 63b R = Me
MHK_{90} [μM]	0.39	3.125	12.5
Struktur	 55a R = H	 55b R = H	 59 R = H
MHK_{90} [μM]	> 100	> 100	> 100

3.1.3 Synthese und biologische Evaluation der KSK-Analoga: Region C

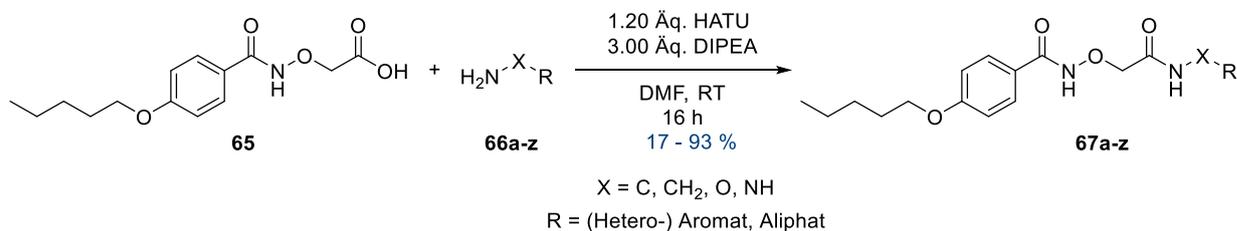
Zur effizienten Modifikation der *O*-Benzylhydroxylamin-Einheit (Region C) von *KSK 106* (**1b**) wurde die Carbonsäure **65** als zweites Schlüsselintermediat im großen Maßstab hergestellt. Sie konnte in guter Ausbeute durch Kupplungsreaktion von 4-(Pentyloxy)benzoesäure (**14b**) und α -Aminooxyessigsäure-Hemihydrochlorid (**64**) unter Verwendung von HATU erhalten werden (Schema 27).



Schema 27: Darstellung von Schlüsselintermediat II (**65**) durch HATU-medierte Kupplungsreaktion.

Die Aufarbeitung konnte durch Überführung des Reaktionsansatzes in kalte 1 M Salzsäure bedeutend vereinfacht werden. Nur die Carbonsäuren **14b** und **65** (Schlüsselintermediat II) bildeten einen Niederschlag, welcher durch Vakuumfiltration und Waschen mit entmineralisiertem Wasser sowie *n*-Hexan isoliert werden konnte. Nach Umkristallisation konnte das Schlüsselintermediat II (**65**) mit einer Reinheit von 99.3 % (HPLC) erhalten werden.

Abschließend wurde Schlüsselintermediat II (**65**) HATU-vermittelt mit verschiedenen *N*-Nucleophilen **66a-z** gekuppelt (Schema 28). Nach säulenchromatographischer Reinigung und Umkristallisation konnten die KSK-Analoga **67a-z** mit modifizierter *O*-Benzylhydroxylamin-Einheit (Region C) in einer Reinheit von > 95 % (HPLC) erhalten werden.



Schema 28: HATU-medierte Kupplung zur Darstellung der KSK-Analoga **67a-z** mit modifizierter *O*-Benzylhydroxylamin-Einheit (Region C).

Die benötigten Amine, Hydroxylamine bzw. Hydrazide **66a-z** wurden käuflich erworben bzw. der Substanzbibliothek der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. KURZ entnommen.

3.1.3.1 Modifikation der Benzyl-Struktur

Nach Schema 28 (s. Kapitel 3.1.3, S. 60) erfolgte die Synthese der KSK-Analoga **67a-o** mit modifizierter Benzyl-Struktur durch HATU-Kupplung von Schlüsselintermediat **II** (**65**) und den (Hydroxyl-) Aminen **66a-o** aus der Substanzbibliothek der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. KURZ (Abbildung 23).

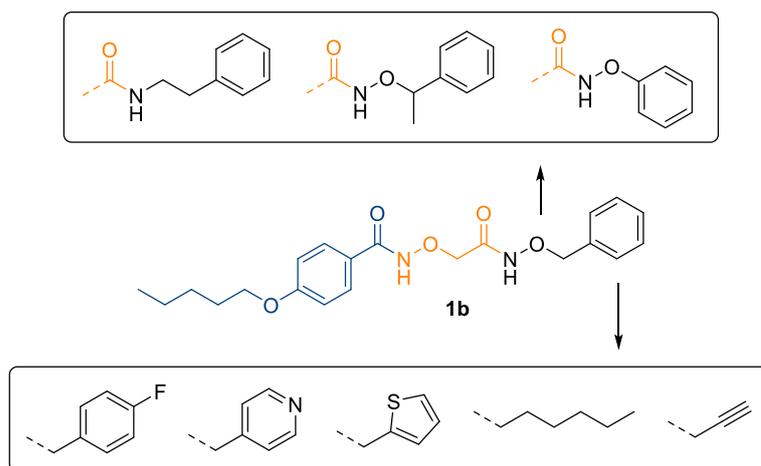


Abbildung 23: Modifikation der Benzyl-Struktur in Region C von KSK 106 (**1b**).

Zur Identifizierung der optimalen endständigen Funktionalität in Region C wurden zunächst die KSK-Analoga **67a-j** mit funktionalisiertem Benzenkern, Heteroaromaten oder Aliphaten dargestellt. Eines davon trägt eine Propargyl-Einheit, die zur bioorthogonalen Darstellung von Wirkstoffsonden genutzt werden kann (s. Kapitel 3.2, S. 84).

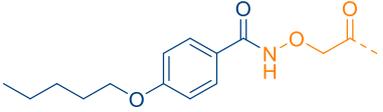
Einige Modifikationen wurden analog zu denen der α -Aminoxyacetyl-Einheit (Region B) durchgeführt. Um den Einfluss einer Verzweigung auf die Hydrolysierbarkeit zu untersuchen, wurde eine Methylgruppe in Benzyl-Stellung eingeführt (**67k**) und die Fähigkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken-Bindungen wurde durch Entfernung des Benzyloxyamid-Sauerstoffs beeinflusst (Phenylethylamid **67m** und Benzylamid **67n**). Durch die Abwesenheit des Sauerstoffs (**67m**) fehlt ein Wasserstoffbrücken-Akzeptor und die N – H Bindung erfährt eine weniger starke Polarisierung. Als Resultat könnte die Interaktion mit biomolekularen Zielstrukturen verhindert bzw. das Reaktionsverhalten gegenüber einer Hydrolyse verändert sein. Die zusätzliche Verringerung der Kettenlänge (**67n**) könnte durch geringere Flexibilität zu einem höheren sterischen Anspruch und einer damit einhergehenden Abschirmung der Amid-Struktur führen.

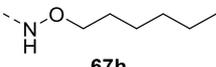
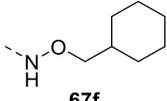
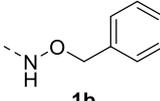
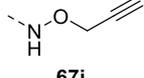
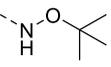
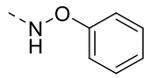
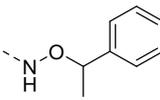
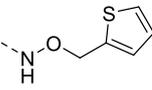
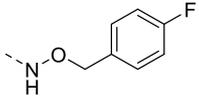
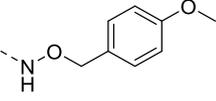
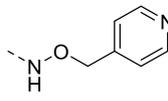
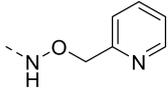
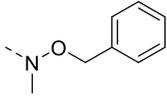
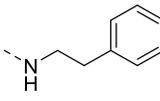
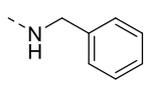
Das Motiv der Abschirmung wurde darüber hinaus durch *N*-Methylierung der Benzyloxyamid-Struktur (**67o**) und dessen Überführung in Phenyl-Stellung (**67l**) bedient.

Mit herausragender antimykobakterieller *in vitro* Aktivität ($MHK_{90} = 0.048 \mu\text{M}$) kann das KSK-Analogon **67h** mit Hexyloxyamid-Struktur in Region C überzeugen (Tabelle 8). Im Vergleich zur Leitstruktur *KSK 106* (**1b**) besitzt es eine deutlich flexiblere Gestalt und erhöhte Lipophilie ($\log P_{O/W} = 3.53$). Beide Eigenschaften könnten die ausgeprägte Aktivität von **67h**, im Einklang mit der Hypothese zum Wirkmechanismus (*Prodrug*-Theorie, s. Kapitel 1.4.1, S. 27), erklären: Die enzymatische Hydrolyse der Hexyloxyamid-Struktur könnte aufgrund des geringeren sterischen Anspruchs der flexiblen *n*-Hexyl-Kette erleichtert sein und zudem ist möglicherweise die Permeabilität durch erhöhte Lipophilie gesteigert.

Als weiteres KSK-Analogon mit aliphatischer Struktur in Region C zeigt auch **67f** ($MHK_{90} = 0.19 \mu\text{M}$) gesteigerte Aktivität im Vergleich zur Leitstruktur *KSK 106* (**1b**). Die antimykobakterielle *in vitro* Aktivität dieser Inhibitoren korreliert erneut mit deren Lipophilie: **1b**, $\log P_{O/W} = 3.06$; **67f**, $\log P_{O/W} = 3.48$; **67h**, $\log P_{O/W} = 3.53$.¹⁷⁹

Tabelle 8: Minimale Hemmkonzentrationen (MHK_{90}) von *KSK 106* (**1b**) und den *KSK*-Analoga **67a-o** mit modifizierter Benzyl-Struktur gegenüber *M. tuberculosis* H37Rv (erhoben von M. Sc. ANNA-LENE KIFFE-DELFI).¹⁸⁵



Struktur				
MHK_{90} [μM]	0.048	0.19	0.39	0.78
Struktur				
MHK_{90} [μM]	0.78	0.78	0.78	0.78
Struktur				
MHK_{90} [μM]	0.78	0.78	1.56	3.125
Struktur				
MHK_{90} [μM]	6.25	6.25	6.25	6.25

Die KSK-Analoga **67g** ($\log P_{O/W} = 2.40$) und **67i** ($\log P_{O/W} = 2.71$) mit kurzketziger Methoxyamid- bzw. *tert*-Butyloxyamid-Struktur in Region C zeigen mit einer MHK_{90} von $0.78 \mu\text{M}$ verringerte Aktivität im Vergleich zum Hexyloxyamid-Analogon **67h** ($MHK_{90} = 0.048 \mu\text{M}$) und bestätigen damit ebenfalls die beobachtete Korrelation zwischen Lipophilie und *in vitro* Aktivität. Der unterschiedliche sterische Anspruch hat hier keinen Einfluss auf die antimykobakterielle *in vitro* Aktivität.

Fluorierung (**67a**, $MHK_{90} = 0.78 \mu\text{M}$) oder die Einführung einer Methoxygruppe (**67b**, $MHK_{90} = 1.56 \mu\text{M}$) in *para*-Stellung des Benzenkerns haben nur wenig Einfluss auf die antimykobakterielle *in vitro* Aktivität. Auch der Austausch gegen Heteroaromaten wie Thiophen (**67c**) und Pyridin (**67d**) wurde ohne drastischen Aktivitätsverlust toleriert ($MHK_{90} = 0.78 - 3.125 \mu\text{M}$). Diese Strukturmodifikationen könnten einen positiven Einfluss auf die Wasserlöslichkeit (Pyridin) oder die metabolische Stabilität (Fluorbenzol und Thiophen) des Inhibitors haben.

Die Methylierung in Benzyl-Stellung (Region C, **67k**, $MHK_{90} = 0.78 \mu\text{M}$) wurde im Vergleich zur α -Stellung (Region B, **63a**, $MHK_{90} = 3.125 \mu\text{M}$, Tabelle 7) besser toleriert; vermutlich aufgrund der größeren Entfernung zum Ort der hydrolytischen Bindungstrennung. Die *N*-Methylierung der Benzyloxyamid-Struktur führte schließlich zur deutlichen Reduktion der *in vitro* Aktivität (**67o**, $MHK_{90} = 6.25 \mu\text{M}$). Neben sterischer Hinderung kommt dabei auch ein ausgeprägter elektronischer Einfluss in Form des positiven induktiven (+I) Effektes auf die C – N Bindung hinzu, der zu deren Stabilisierung gegenüber einer enzymatischen Hydrolyse beiträgt.

Die deutlich verringerten *in vitro* Aktivitäten beider Amid-Analoga **67m** und **67n** ($MHK_{90} = 6.25 \mu\text{M}$) betonen die Bedeutung der Benzyloxyamid-Struktur für die Wirksamkeit der KSK-Inhibitoren. Der Benzyloxyamid-Sauerstoff steigert die N – H Acidität durch seine starke Elektronegativität sowie die damit einhergehende Bindungspolarisierung und begünstigt vermutlich die Freisetzung einer aktiven Wirkform durch enzymatische Hydrolyse. Außerdem könnte der Benzyloxyamid-Sauerstoff als Wasserstoffbrücken-Akzeptor fungieren und intermolekulare Wechselwirkungen mit einer biomolekularen Zielstruktur ermöglichen.

Die Überführung der Benzyloxyamid-Struktur in Phenyl-Stellung sowie die damit einhergehende sterische Abschirmung haben nur einen geringen Einfluss auf die antimykobakterielle *in vitro* Aktivität (**67l**, $MHK_{90} = 0.78 \mu\text{M}$).

Die Einführung einer Propargyl-Struktur in Region C von *KSK 106* (**1b**) wurde ebenfalls gut toleriert (**67j**, $MHK_{90} = 0.78 \mu\text{M}$) und bietet eine weitere Funktionalität, mit der die bioorthogonale Markierung der Leitstruktur zur Darstellung von Wirkstoffsonden möglich ist (s. Kapitel 3.2, S. 84).

3.1.3.2 Einführung von Anilid-Strukturen

Bereits im Jahr 1971 konnten KISFALUDY *et al.* zeigen, dass auch α -Aminoxyanilide ausgeprägte antimykobakterielle Eigenschaften besitzen (s. Kapitel 1.4.2, S. 29).¹⁷⁴ Nach diesem Vorbild wurden verschiedene KSK-Analoga mit Anilid-Struktur in Region C dargestellt (Abbildung 24).

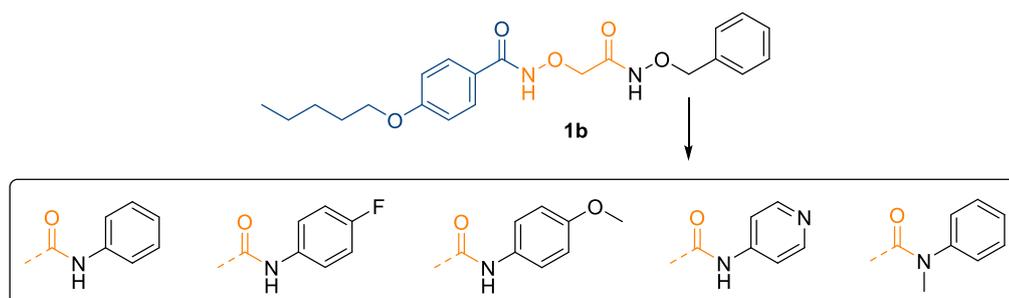


Abbildung 24: Einführung von Anilid-Strukturen in Region C von KSK 106 (**1b**).

Zur Synthese der Anilid-Analoga **67p-x** wurde sich der kommerziell erhältlichen Anilin-Derivate **66p-x** bedient, welche HATU-mediert nach Schema 28 (s. Kapitel 3.1.3, S. 60) mit Schlüsselintermediat **II (65)** gekuppelt wurden. Die Elektronendichte des unsubstituierten Aromaten (**67p**) wurde dabei durch *o*-, *m*-, *p*-Fluorierung gesenkt (**67q-s**) bzw. durch *o*-, *m*-, *p*-Methoxylierung gesteigert (**67t-v**). Die Einführung eines Heteroaromaten wie Pyridin (**67w**) könnte einen positiven Einfluss auf die Wasserlöslichkeit haben und die *N*-Methylierung des Anilid-Stickstoffs (**67x**) sorgt für sterische Abschirmung, wodurch eine enzymatische Hydrolyse beeinträchtigt sein könnte.

Einige Anilid-Analoga überzeugten mit exzellenter Wachstumsinhibition (Tabelle 9). Sowohl das *meta*- als auch das *para*-fluorierte Anilid (**67r** und **67s**) zeigten mit einer MHK_{90} von $0.048 \mu\text{M}$ eine bemerkenswerte antimykobakterielle *in vitro* Aktivität und sind um den Faktor 8 aktiver als KSK 106 (**1b**). Auch das *ortho*-fluorierte sowie das nicht-substituierte Anilid (**67q** und **67p**, $MHK_{90} = 0.097 \mu\text{M}$) überzeugten mit deutlich gesteigerter *in vitro* Aktivität (Faktor 4) im Vergleich zur Leitstruktur.

Die Steigerung der Elektronendichte am Aromaten durch Methoxylierung in *meta*- bzw. *para*-Stellung (**67u** und **67v**, $MHK_{90} = 0.19 \mu\text{M}$) führte zu einer geringfügigen Verringerung der *in vitro* Aktivität im Vergleich zu den fluorierten bzw. dem nicht-substituierten Anilid. Die Aktivität von **67u** und **67v** entspricht dennoch der von Rifampicin ($MHK_{90} = 0.19 \mu\text{M}$) und übersteigt die von KSK 106 (**1b**) um den Faktor 2. Sowohl die Verringerung als auch die Erhöhung der Elektronendichte am Aromaten zeigten einen kongruenten Trend: Substitutionen in *meta*- und *para*-Stellung waren einer Substitution in *ortho*-Stellung (**67q** und **67t**) gleichermaßen bevorzugt.

Tabelle 9: Minimale Hemmkonzentrationen (MHK₉₀) von KSK 106 (**1b**) und den Anilid-Analoga **67p-x** gegenüber *M. tuberculosis* H37Rv (erhoben von M. Sc. ANNA-LENE KIFFE-DELF).¹⁸⁵

Struktur					
	67s	67r	67q	67p	67v
MHK ₉₀ [μM]	0.048	0.048	0.097	0.097	0.19
Struktur					
	67u	1b	67w	67t	67x
MHK ₉₀ [μM]	0.19	0.39	0.78	3.125	> 100

Die Einführung von Pyridin (**67w**) wurde gut toleriert (MHK₉₀ = 0.78 μM) und könnte sich positiv auf die Wasserlöslichkeit des Inhibitors auswirken.

Einzig die *N*-Methylierung des Anilid-Stickstoffs (**67x**) führte zum Verlust der antimykobakteriellen *in vitro* Aktivität (MHK₉₀ > 100 μM). Möglicherweise wird die Anilid-Bindung durch die Kombination aus *N*-Methylierung und räumlicher Nähe zum Aromaten so stark abgeschirmt, dass keine enzymatische Hydrolyse stattfinden kann.

Möglicherweise sind KSK-Analoga mit Anilid- statt Benzoyloxyamid-Struktur in Region C bevorzugte Substrate für die bioaktivierende Amidohydrolase.

3.1.3.3 Einführung von Hydrazid-Strukturen

In ihrer Publikation aus dem Jahr 1971 beschrieben KISFALUDY *et al.* neben α -Aminooxyalkoxyamiden und -aniliden außerdem die exzellente antimykobakterielle *in vitro* sowie *in vivo* Aktivität von α -Aminooxyhydraziden (s. Kapitel 1.4.2, S. 29).¹⁷⁴ Zur Darstellung analoger Inhibitoren wurden Hydrazid-Strukturen in Region C der Leitstruktur KSK 106 (**1b**) eingeführt (Abbildung 25).

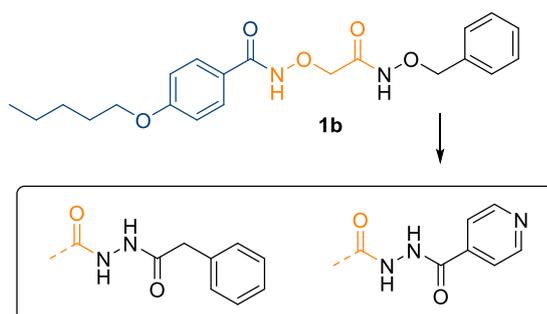
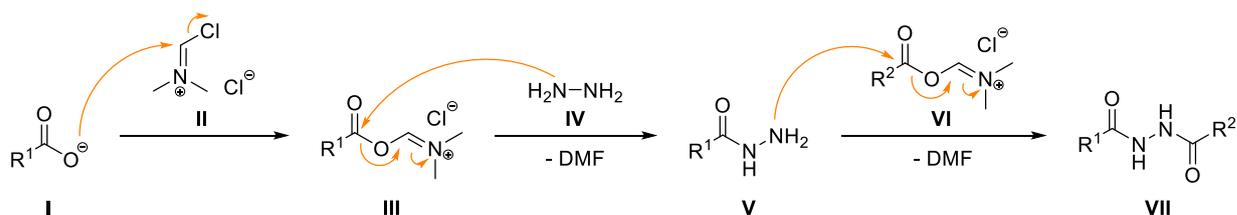


Abbildung 25: Einführung von Hydrazid-Strukturen in Region C von KSK 106 (**1b**).

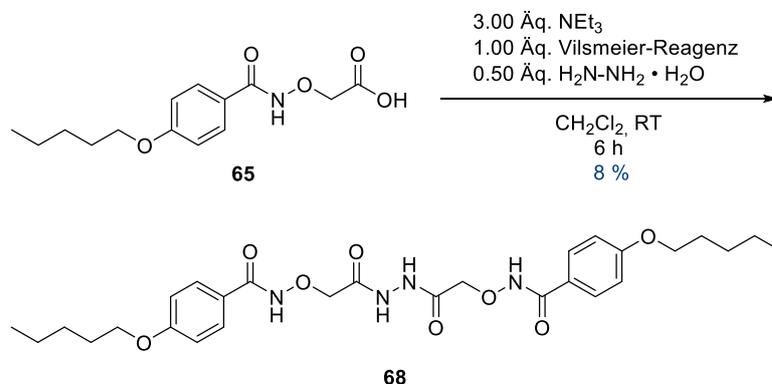
Nach Schema 28 (s. Kapitel 3.1.3, S. 60) erfolgte die Synthese der Hydrazid-Analoga **67y-z** durch eine HATU-Kupplung von Schlüsselintermediat **II** (**65**) und kommerziell erhältlichen Hydraziden: Phenyllessigsäurehydrazid (**66y**) und Isonicotinsäurehydrazid (INH, **66z**). In Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. KALSCHUEER konnten additive Effekte der KSK-Leitstrukturen mit Isoniazid (INH, **66z**) nachgewiesen werden (s. Kapitel 1.4.1, S. 27). Das INH-Analogon **67z** könnte also eine Art *Codrug* darstellen, welches nach enzymatischer Hydrolyse nicht nur eine potenziell aktive Wirkform (**65**, Schlüsselintermediat **II**), sondern auch INH freisetzen könnte.

Ein weiteres Hydrazid-Analogon wurde nach einer Vorschrift von ZAREI und NAKHLI dargestellt.²¹⁵ Sie beschrieben die Synthese symmetrischer ($R^1 = R^2$) und asymmetrischer ($R^1 \neq R^2$) Hydrazide **VII** durch Umsetzung von Carbonsäuren **I** mit Vilsmeier-Reagenz **II** und Hydrazin Monohydrat **IV** (Schema 29).



Schema 29: Mechanismus der Hydrazid-Synthese mithilfe des Vilsmeier-Reagenz (**II**) nach ZAREI und NAKHLI.²¹⁵

Nach diesem Vorbild wurde Schlüsselintermediat **II (65)** zusammen mit Triethylamin, Vilsmeier-Reagenz und Hydrazin Monohydrat bei Raumtemperatur gerührt, um das dimere Hydrazid-Analogon **68** zu erhalten (Schema 30).



Schema 30: Darstellung des dimeren Hydrazid-Analogons **68** mithilfe des Vilsmeier-Reagenzes.

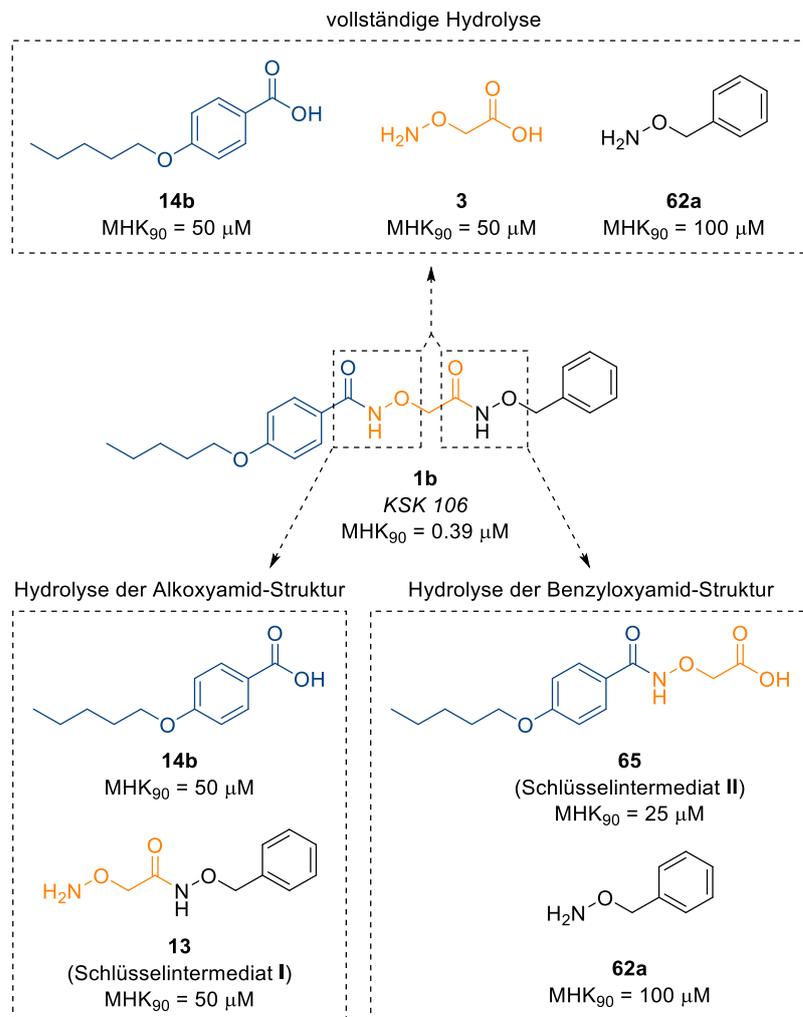
Keines der Hydrazid-Analoga zeigt nennenswerte antimykobakterielle *in vitro* Aktivität; mit minimalen Hemmkonzentrationen (MHK_{90}) von 50–100 μM sind sie als inaktiv anzusehen (Tabelle 10). KSK-Analoga mit Hydrazid-Struktur in Region C werden möglicherweise nicht als Substrate der bioaktivierenden Amidohydrolase toleriert.

Tabelle 10: Minimale Hemmkonzentrationen (MHK_{90}) von KSK 106 (**1b**) sowie den Hydrazid-Analoga **67y-z** und **68** gegenüber *M. tuberculosis* H37Rv (erhoben von M. Sc. ANNA-LENE KIFFE-DELFF).¹⁸⁵

Struktur	 1b	 67y	 67z
MHK_{90} [μM]	0.39	50	50
Struktur	 68		
MHK_{90} [μM]	> 100		

3.1.3.4 Maskierung der Hydrolysefragmente

Die Identifizierung von Einzelnukleotid-Polymorphismen, die zur Mutation einer Amidohydrolase führen und die daraus resultierende Ausbildung von *KSK 106*-Resistenz erlaubte es der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. KALSCHUEER, eine vorläufige Hypothese zum potenziellen Wirkmechanismus zu postulieren. Die Leitstruktur *KSK 106* (**1b**) könnte demnach ein *Prodrug* sein und die entsprechende Amidohydrolase wäre dabei verantwortlich für die intrazelluläre Biotransformation in eine aktive Wirkform (*Prodrug*-Theorie, s. Kapitel 1.4.1, S. 27). Diese Biotransformation durch enzymatische Hydrolyse kann dabei sowohl die Alkoxyamid- als auch die Benzyloxyamid-Struktur von *KSK 106* (**1b**) betreffen. Dabei ist die Entstehung von fünf verschiedenen Metaboliten möglich und der *Prodrug*-Theorie zufolge stellt mindestens einer davon die aktive Wirkform dar (Schema 31).



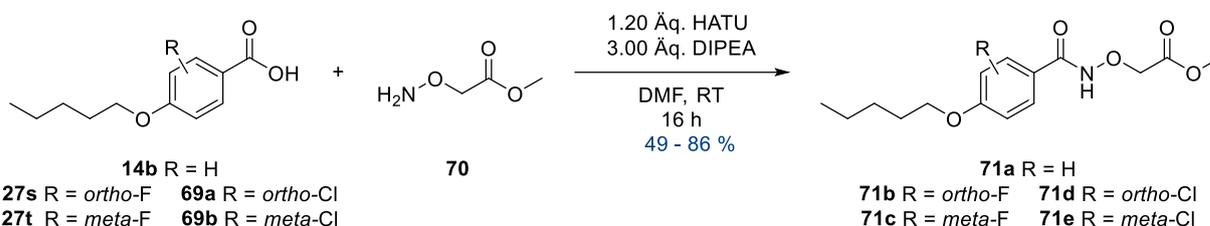
Schema 31: Fragmentierung der Leitstruktur *KSK 106* (**1b**) durch enzymatische Hydrolyse und zugehörige minimale Hemmkonzentrationen (MHK₉₀).

Mit minimalen Hemmkonzentrationen (MHK_{90}) von 25 – 100 μM sind die einzelnen Metabolite als schwach aktiv bis inaktiv anzusehen. Die Ursache liegt vermutlich in der Natur des Ganzzell-basierten Assays bzw. der inhärenten Relevanz von Permeabilität. Die getesteten Metabolite tragen Carboxyl- und Hydroxylaminygruppen, die unter physiologischen Bedingungen meist geladen vorliegen und angesichts der hohen Lipophilie der mykobakteriellen Zellwand vermutlich geringe Permeabilität zeigen.

Ziel war es daher, den ionischen Charakter der Metabolite (Carboxylat- und Hydroxylammonium-Ionen) zu maskieren und leicht hydrolysierbare Analoga mit gesteigerter Lipophilie zu entwickeln. Dabei wurde die Carbonsäure **65** mit intakter Alkoxyamid-Struktur (Schlüsselintermediat **II**) aufgrund ihrer vergleichsweise vielversprechenden Aktivität priorisiert ($MHK_{90} = 25 \mu\text{M}$).

Potenzielle Ester-Prodrugs

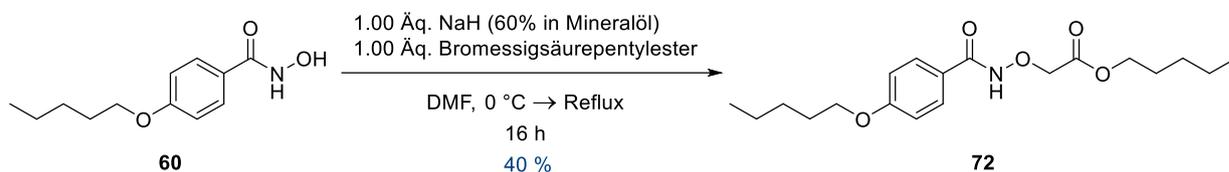
Eine effektive Methode zur Maskierung von Carboxylgruppen ist die Darstellung von Ester-*Prodrugs*. Dazu wurden zunächst die Methylester-Analoga **71a-e** durch Kupplungsreaktion der (halogenierten) Carbonsäuren **14b**, **27s-t** und **69a-b** mit α -Aminooxyessigsäuremethylester (**70**) unter Verwendung von HATU als Kupplungsreagenz dargestellt (Schema 32).



Schema 32: Darstellung der Methylester-Analoga **71a-e** durch HATU-medierte Kupplungsreaktion.

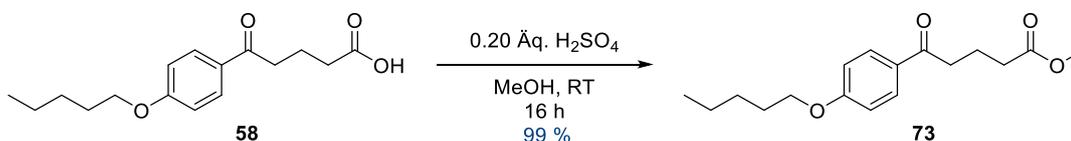
Die Biotransformation in die potenziell aktive Wirkform **65** (Schlüsselintermediat **II**) würde für die Methylester-Analoga **71a-e** durch Esterasen unter Freisetzung von Methanol erfolgen. Im Körper wird Methanol zunächst durch die Alkoholdehydrogenase (ADH) zu Formaldehyd und anschließend durch die Aldehyddehydrogenase (ALDH) weiter zu Ameisensäure metabolisiert. Letztere interferiert mit der mitochondrialen Atmungskette durch Inhibierung der Cytochrom-*c*-Oxidase (COX) und führt u. a. zu Hypoxie und Azidose.^{216,217} Die Methylester-Analoga **71a-e** wurden dennoch synthetisiert, da sie aufgrund guter Verfügbarkeit die initiale Überprüfung des Ester-*Prodrug*-Konzeptes ermöglichten.

Zur Vermeidung der inhärenten Toxizität von Methanol und zur Steigerung der Lipophilie des Inhibitors wurde zusätzlich das Pentylester-Analogon **72** durch *O*-Alkylierung der Hydroxamsäure **60** mit Bromessigsäurepentylester dargestellt (Schema 33).



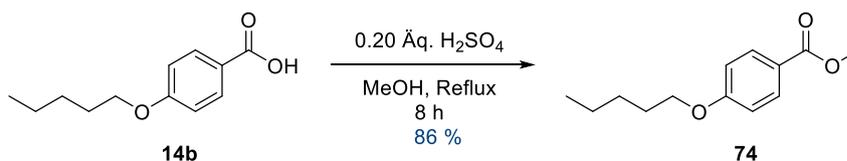
Schema 33: Darstellung des Pentylester-Analogons **72** durch *O*-Alkylierung der Hydroxamsäure **60**.

Nach dem Vorbild des Keton-Analogons **59** (s. Kapitel 3.1.2, S. 57) wurde das Methylester-Analogon **73** mit Keton-Struktur in Region B dargestellt (Schema 34). Dazu wurde die Carbonsäure **58** in Methanol gelöst und bei Raumtemperatur in Gegenwart katalytischer Mengen konzentrierter Schwefelsäure gerührt.



Schema 34: Darstellung des Methylester-Analogons **73** durch Veresterung der Carbonsäure **58**.

Um zusätzlich die Bedeutung der 4-(Pentyloxy)benzoesäure (**14b**) für die antimykobakterielle *in vitro* Aktivität zu identifizieren, wurde sie ebenfalls durch säurekatalysierte Veresterung in den entsprechenden Methylester **74** überführt (Schema 35).



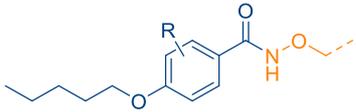
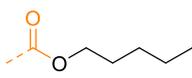
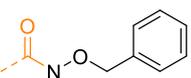
Schema 35: Darstellung des Methylesters **74** durch säurekatalysierte Veresterung von 4-Pentyloxybenzoesäure (**14b**).

Auch in Bezug auf die potenziellen Ester-*Prodrugs* ist eine Korrelation zwischen antimykobakterieller *in vitro* Aktivität und Lipophilie der Inhibitoren zu beobachten (Tabelle 11). Die Aktivität der Carbonsäure **65** mit intakter Alkoxyamid-Struktur (Schlüsselintermediat **II**, $\text{MHK}_{90} = 25 \mu\text{M}$, $\log P_{O/W} = 1.78$) konnte durch Veresterung mit Methanol (**71a**, $\text{MHK}_{90} = 0.78 \mu\text{M}$, $\log P_{O/W} = 2.39$) um den Faktor 32 gesteigert werden. Darüber hinaus ist deren Pentylester (**72**, $\text{MHK}_{90} = 0.048 \mu\text{M}$, $\log P_{O/W} = 3.84$) sogar um den Faktor 8 aktiver als die Leitstruktur *KSK 106* (**1b**, $\text{MHK}_{90} = 0.39 \mu\text{M}$).

Anhand des Methylesters **71a** wurde die Toleranz der Ester-Analoga gegenüber aromatischer Halogenierung getestet. Fluorierung in *ortho*-Stellung wurde unter Beibehalt der *in vitro* Aktivität toleriert (**71b**, $\text{MHK}_{90} = 0.78 \mu\text{M}$), während die Fluorierung in *meta*-Stellung zu einer Reduktion der Aktivität führte (**71c**, $\text{MHK}_{90} = 3.125 \mu\text{M}$). Chlorierung führte sowohl in *ortho*- als auch in *meta*-Stellung gleichermaßen zu einer geringfügigen Verringerung der *in vitro* Aktivität (**71d** und **71e**, $\text{MHK}_{90} = 1.56 \mu\text{M}$).

Die ausgeprägte *in vitro* Aktivität des Pentylesters **72** gegenüber *M. tuberculosis* H37Rv ($\text{MHK}_{90} = 0.048 \mu\text{M}$) unterstützt die *Prodrug*-Theorie und schafft Raum für neue Struktur motive zur Optimierung der Inhibitoren.

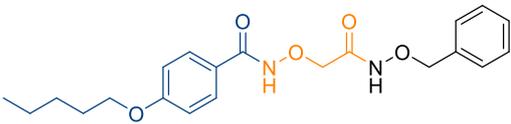
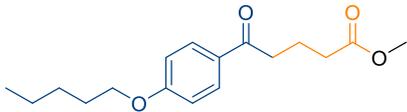
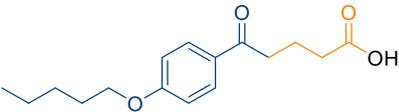
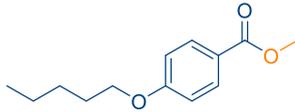
Tabelle 11: Minimale Hemmkonzentrationen (MHK_{90}) von *KSK 106* (**1b**), Schlüsselintermediat **II** (**65**) sowie den potenziellen Ester-*Prodrugs* **71a-e** und **72** gegenüber *M. tuberculosis* H37Rv (erhoben von M. Sc. ANNA-LENE KIFFE-DELFF).¹⁸⁵

				
Struktur	 72 R = H	 1b R = H	 71a R = H	 71b R = <i>ortho</i> -F
MHK_{90} [μM]	0.048	0.39	0.78	0.78
Struktur	 71d R = <i>ortho</i> -Cl	 71e R = <i>meta</i> -Cl	 71c R = <i>meta</i> -F	 65 R = H
MHK_{90} [μM]	1.56	1.56	3.125	25

Die sehr geringe *in vitro* Aktivität des Methylesters **73** mit Keton-Struktur in Region B ($\text{MHK}_{90} = 50 \mu\text{M}$) sowie die fehlende Aktivität der zugrundeliegenden Carbonsäure **58** ($\text{MHK}_{90} > 100 \mu\text{M}$) betonen erneut die Bedeutung der Alkoxyamid-Struktur für antimykobakterielle *in vitro* Aktivität (Tabelle 12).

Auch der Methylester **74** zeigte keine antimykobakterielle *in vitro* Aktivität ($\text{MHK}_{90} > 100 \mu\text{M}$), während die Veresterung der Carbonsäure **65** (s. Tabelle 11, S. 71) mit intakter Alkoxyamid-Struktur zu einer deutlichen Verbesserung der Aktivität führte (**71a**, $\text{MHK}_{90} = 0.78 \mu\text{M}$). Aufgrund dieser großen Diskrepanz ist davon auszugehen, dass es sich bei Carbonsäure **65** (Schlüsselintermediat II) tatsächlich um die aktive Wirkform handelt.

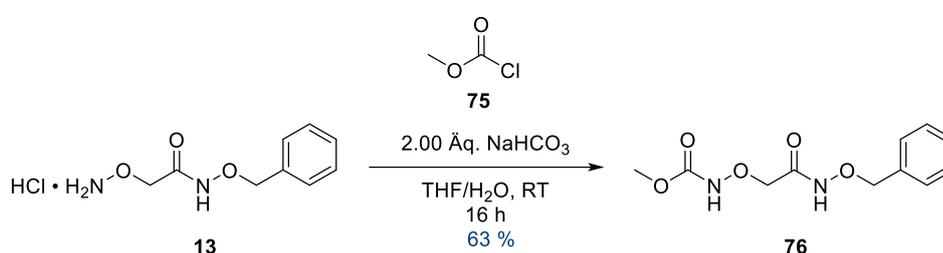
Tabelle 12: Minimale Hemmkonzentrationen (MHK_{90}) von KSK 106 (**1b**), δ -Ketocarbonsäure **58** sowie den potenziellen Ester-Prodrugs **73** und **74** gegenüber *M. tuberculosis* H37Rv (erhoben von M. Sc. ANNA-LENE KIFFE-DELFF).¹⁸⁵

Struktur	 1b	
$\text{MHK}_{90} [\mu\text{M}]$	0.39	
Struktur	 73	 58
$\text{MHK}_{90} [\mu\text{M}]$	50	> 100
Struktur	 74	
$\text{MHK}_{90} [\mu\text{M}]$	> 100	

Potenzielle Carbamat-Prodrugs

Carbamate eignen sich zur Erzeugung von *Prodrugs* aufgrund der Verbesserung der Permeabilität unter Beibehaltung der benötigten Labilität zur Freisetzung der zugrundeliegenden funktionellen Gruppe. In der Fachliteratur wird die Einführung von Carbamaten auch zur Steigerung der *first-pass* Stabilität diskutiert.²¹⁸

Um die Bedeutung des *O*-substituierten Hydroxylamins **13** (Schlüsselintermediat **I**) für die antimykobakterielle *in vitro* Aktivität zu identifizieren, wurde es durch Reaktion mit Methylchloroformiat (**75**) in das entsprechende Carbamat **76** überführt (Schema 36).



Schema 36: Darstellung des Carbamates **76** durch Acylierung von Schlüsselintermediat **I** (**13**).

Auch die kommerziell erhältliche Boc-Aminooxyessigsäure (**25**) wurde auf ihre *in vitro* Aktivität gegenüber *M. tuberculosis* H37Rv getestet (Tabelle 13). Weder **76** noch **25** als potenzielle Carbamat-*Prodrugs* von Schlüsselintermediat **I** (**13**) bzw. der freien α -Aminooxyessigsäure (**3**) zeigten antimykobakterielle *in vitro* Aktivität (MHK₉₀ > 100 μ M). Auch diese Beobachtung festigt die Vermutung, dass es sich bei Carbonsäure **65** (Schlüsselintermediat **II**) um die aktive Wirkform handelt.

Tabelle 13: Minimale Hemmkonzentrationen (MHK₉₀) von KSK 106 (**1b**) sowie den potenziellen Carbamat-*Prodrugs* **25** und **76** gegenüber *M. tuberculosis* H37Rv (erhoben von M. Sc. ANNA-LENE KIFFE-DELF).¹⁸⁵

Struktur		
	1b	
MHK ₉₀ [μ M]	0.39	
Struktur		
	25	76
MHK ₉₀ [μ M]	> 100	> 100

3.1.3.5 Bioisosterer Austausch

In den frühen 1950er Jahren definierte FRIEDMAN Bioisostere als Struktureinheiten, die im weitesten Sinne ein isosteres Verhältnis (gleiche Anzahl und Anordnung von Atomen) zueinander besitzen und dabei die gleiche Art biologischer Aktivität zeigen. THORNBURGH erweiterte diese Definition 1979, indem er den Begriff der Bioisosterie als das Phänomen zwischen verschiedenen chemischen Funktionalitäten mit ähnlichen physikochemischen Eigenschaften und vergleichbaren biologischen Effekten beschrieb. Durch diese Definition konnte zwischen zwei Gruppen differenziert werden: den klassischen und den nicht-klassischen Bioisosteren. Klassische Bioisostere zeichnen sich durch den Austausch Mono-, Di-, Tri- bzw. Tetra-Valenter Gruppen oder einen Ring-zu-Ring-Austausch aus. Der Austausch bei nicht-klassischen Bioisosteren kann deutlich komplexer sein und ganze funktionelle Gruppen oder sogar den Austausch eines offenkettigen Restes gegen ein Ringsystem (*vice versa*) umfassen.^{219,220}

THORNBURGH definierte außerdem acht Parameter, die zur Erzeugung eines bioisosteren Verhältnisses in Betracht gezogen werden können:

- 1 Größe (Molekulargewicht)
- 2 Form (Bindungswinkel und Hybridisierungen)
- 3 Elektronenverteilung (Polarisierbarkeit, induktive Effekte, Ladung, Dipole)
- 4 Lipophilie
- 5 Hydrophilie
- 6 pK_s-Wert
- 7 Chemische Reaktivität
- 8 Wasserstoffbrücken-Bindungen

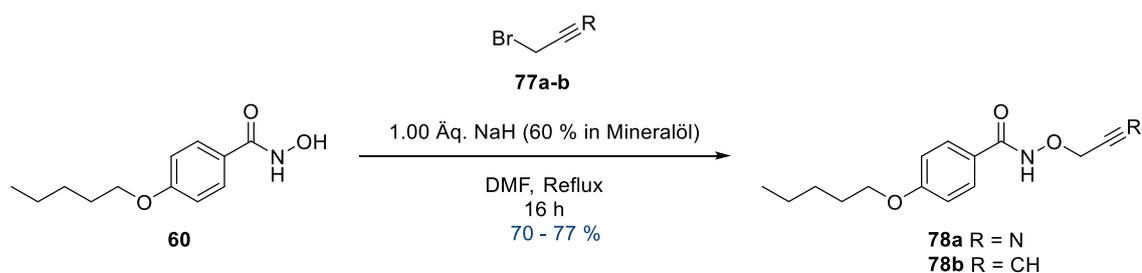
Durch Veränderung eines oder mehrerer Parameter können neben der Struktur (1 und 2) auch Interaktionen mit Biomolekülen (1, 2, 3, 6, 7 und 8), Pharmakokinetik (4, 5, 6 und 8) und Metabolisierung (4, 5 und 7) beeinflusst werden.²²⁰

Seit seiner Entdeckung bzw. Charakterisierung ist das Prinzip der Bioisosterie eine gängige und beliebte Strategie zur rationalen Entwicklung und Optimierung von Wirkstoffkandidaten in der medizinischen Chemie.

Carbonsäure-Bioisostere

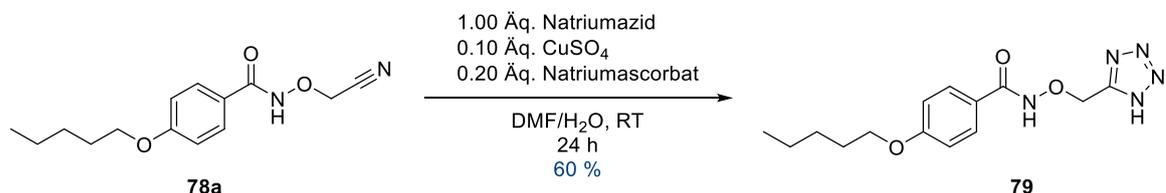
Zunächst wurde der bioisostere Austausch der Carboxylgruppe von Schlüsselintermediat **II** (**65**) vorgenommen. Aufgrund ihrer physikochemischen Ähnlichkeit sind Tetrazole die wohl verbreitetsten und meist genutzten Bioisostere von Carbonsäuren. Neben vergleichbarer Azidität ($pK_s = 4 - 5$) sind beide Struktur motive von planarer räumlicher Anordnung, wobei Tetrazole sterisch anspruchsvoller sind. Außerdem sind Tetrazolat-Anionen im Vergleich zu den entsprechenden Carboxylaten lipophiler und zeigen verändertes elektrostatisches Potential aufgrund der Delokalisierung der negativen Ladung im fünfgliedrigen Ringsystem.²²¹

Durch *O*-Alkylierung der Hydroxamsäure **60** mit Bromacetonitril (**77a**) konnte zunächst das Nitril **78a** erhalten werden (Schema 37). Der Einsatz von Propargylbromid (**77b**) unter gleichen Bedingungen lieferte das Alkin **78b**.



Schema 37: Darstellung von Nitril **78a** und Alkin **78b** durch *O*-Alkylierung der Hydroxamsäure **60**.

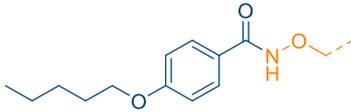
Die Kupfer-katalysierte *Click*-Reaktion (CuAAC, s. Kapitel 3.2, S. 85) zwischen Nitril **78a** und Natriumazid lieferte anschließend das Tetrazol-Analogon **79** (Schema 38).



Schema 38: Darstellung des Tetrazol-Analogons **79**.

Der bioisostere Austausch der Carboxylgruppe von Schlüsselintermediat **II** (**65**) gegen 1*H*-Tetrazol (**79**, $\text{MHK}_{90} > 100 \mu\text{M}$) führte zum Verlust der antimykobakteriellen *in vitro* Aktivität (Tabelle 14).

Tabelle 14: Minimale Hemmkonzentrationen (MHK_{90}) von KSK 106 (**1b**), Schlüsselintermediat **II** (**65**) und dem Tetrazol-Analogon **79** gegenüber *M. tuberculosis* H37Rv (erhoben von M. Sc. ANNA-LENE KIFFE-DELFF).¹⁸⁵

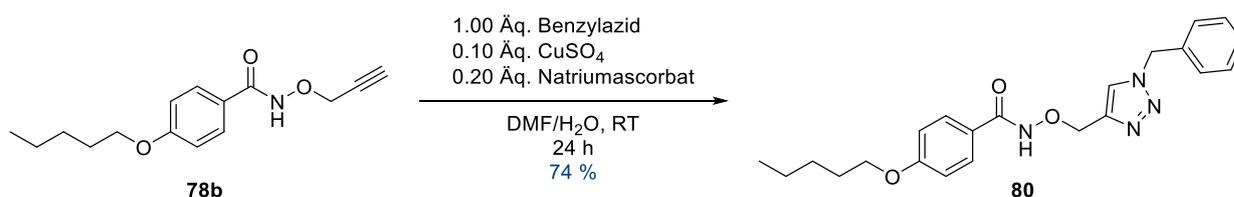
Struktur			
	1b	65	79
MHK_{90} [μM]	0.39	25	> 100

Diese Beobachtung steht im Einklang mit der postulierten Hypothese zum Wirkmechanismus (*Prodrug*-Theorie, s. Kapitel 1.4.1, S. 27): Demnach wäre das Tetrazol-Analogon **79** inaktiv, da eine hydrolytische Bioaktivierung, unter Freisetzung von Carbonsäure **65**, nicht möglich ist. Der Aktivitätsverlust könnte außerdem durch geringe Permeabilität oder reduzierte Bindungsaffinität zur potenziellen biomolekularen Zielstruktur erklärt werden.

Benzoyloxyamid-Bioisostere

Um die Argumentation hinsichtlich der *Prodrug*-Theorie weiter zu stärken, wurde zusätzlich die Benzoyloxyamid-Struktur der Leitstruktur KSK 106 (**1b**) gegen cyclische Bioisostere ausgetauscht. Die (hydrolytische) Freisetzung von Carbonsäure **65** (Schlüsselintermediat **II**) ist durch diesen Austausch ebenfalls unterbunden, weshalb keine *in vitro* Aktivität der resultierenden Analoga zu erwarten ist.

Zunächst wurde das Triazol-Analogon **80** durch die Kupfer-katalysierte *Click*-Reaktion (CuAAC, s. Kapitel 3.2, S. 85) von Alkin **78b** mit Benzylazid dargestellt (Schema 39).

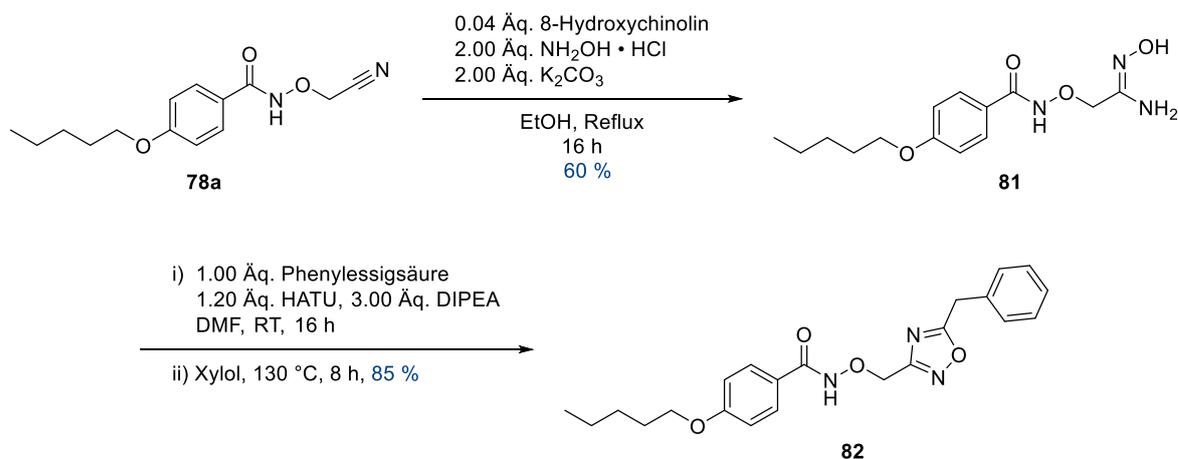


Schema 39: Darstellung des Triazol-Analogons **80**.

BURGESS und ANGELL beschrieben 2007 den Einsatz von 1,4-disubstituierten 1,2,3-Triazolen als bioisostere Amid-Funktionalität. Einerseits ähneln sich die molekularen Dimensionen dieser Funktionalitäten in Bezug auf Ausdehnung (4 - 5 Å) sowie Planarität und andererseits sind etwaige Triazole durch ihr starkes Dipolmoment auch vergleichbare Wasserstoffbrücken-Donoren (C5-H) und -Akzeptoren (N2).²²²

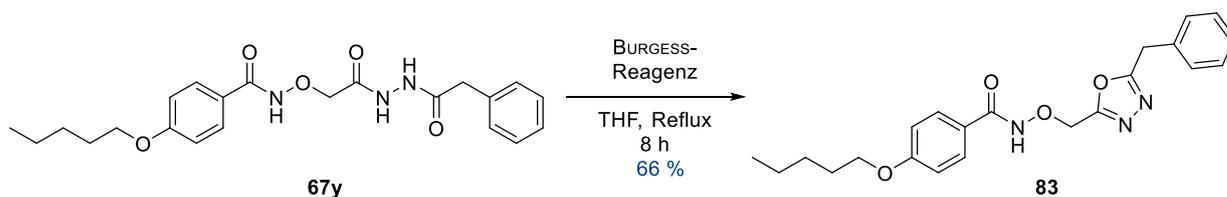
Neben 1,2,3-Triazolen werden in der Fachliteratur auch 1,2,4- und 1,3,4-Oxadiazole als geeignete heterocyclische Bioisostere für den Austausch der Benzyloxyamid-Struktur beschrieben.^{223–225}

Die Darstellung des bioisosteren 1,2,4-Oxadiazol-Analogons **82** erfolgte nach Vorschrift von LOBERA *et al.* ausgehend von Nitril **78a** (Schema 40).²²⁶ In Anwesenheit von Hydroxylamin-Hydrochlorid, Kaliumcarbonat und katalytischen Mengen 8-Hydroxychinolins konnte es zunächst in das entsprechende Z-konfigurierte Amidoxim **81** überführt werden. Anschließende HATU-Kupplung mit Phenylessigsäure und intramolekulare Cyclokondensation unter dehydratisierenden Bedingungen lieferten das gewünschte bioisostere KSK-Analogon **82**.



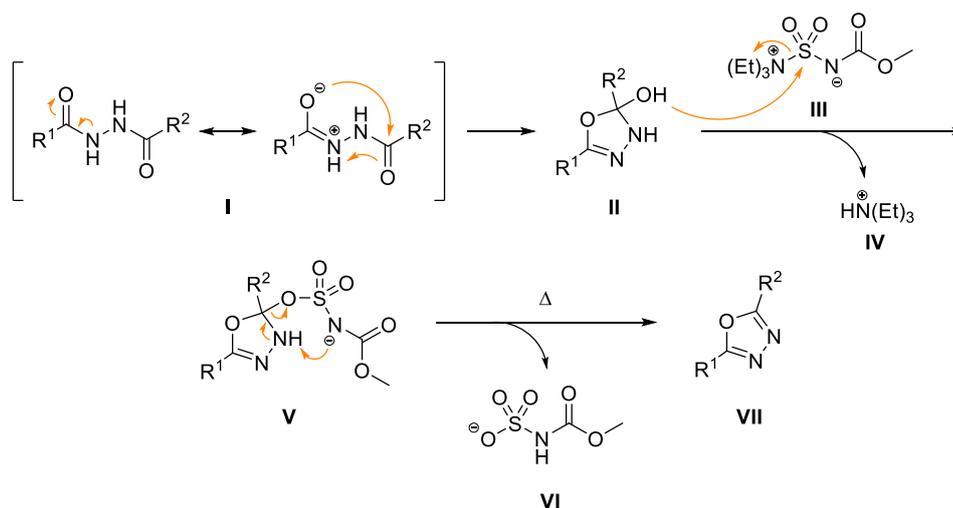
Schema 40: Darstellung des 1,2,4-Oxadiazol-Analogons **82**.²²⁶

Das entsprechende 1,3,4-Oxadiazol-Analogon **83** konnte durch intramolekulare Cyclokondensation des Hydrazid-Analogons **67y** erhalten werden (Schema 41).



Schema 41: Darstellung des 1,3,4-Oxadiazol-Analogons **83**.

Die dehydratisierenden Eigenschaften des BURGESS-Reagenzes **III** ermöglichen die intramolekulare Cyclokondensation geeigneter Hydrazide **I** (Schema 42). Nach intramolekularem Ringschluss durch Amidresonanz (**II**) erfolgt die Bildung des Sulfamates **V**. Dieser reagiert im Anschluss durch Erwärmung im Zuge einer stereoselektiven *syn*-Eliminierung unter Abspaltung von Sulfamat **VI** zum gewünschten 1,3,4-Oxadiazol **VII**.^{227,228}



Schema 42: Reaktionsmechanismus der BURGESS-Wasserabspaltung zur Synthese von 1,3,4-Oxadiazolen (**VII**).^{227,228}

Die Abwesenheit einer hydrolysierbaren Teilstruktur in Region C führte tatsächlich erneut zur Reduktion (**80**, MHK₉₀ = 12.5 μM) bzw. zum Verlust (**82** und **83**, MHK₉₀ > 100 μM) der antimykobakteriellen *in vitro* Aktivität (Tabelle 15). Die enzymatische Hydrolyse unter Freisetzung von Carbonsäure **65** (Schlüsselintermediat **II**) ist demnach als essenziell für die Inhibition mykobakteriellen Wachstums anzusehen und die *Prodrug*-Theorie scheint zunehmend plausibel.

Tabelle 15: Minimale Hemmkonzentrationen (MHK₉₀) von KSK 106 (**1b**) und den bioisosteren KSK-Analoga **80**, **82** und **83** gegenüber *M. tuberculosis* H37Rv (erhoben von M. Sc. ANNA-LENE KIFFE-DELFF).¹⁸⁵

Struktur	1b	80	82	83
MHK ₉₀ [μM]	0.39	12.5	> 100	> 100

3.1.4 Zusammenfassung der SAR

Die Auswertung der antimykobakteriellen *in vitro* Aktivität von über 100 Analoga der Leitstruktur KSK 106 (**1b**, Abbildung 26) ermöglichte das Verständnis der zugrundeliegenden SAR.

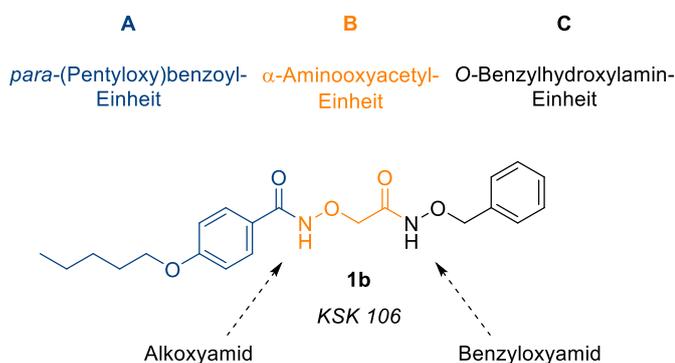


Abbildung 26: Einteilung der Leitstruktur KSK 106 (**1b**) in die Regionen A, B und C.

Aufgrund mangelnder Kenntnis über eine biomolekulare Zielstruktur bzw. einen präzisen Wirkmechanismus wurden die Inhibitoren Liganden-basiert, ergänzt durch die SAR zu KSK 104 (**1a**), entwickelt. Im Einklang mit der Vorarbeit von Dr. ALEXANDER BERGER konnte die bestehende SAR bestätigt und erweitert werden.

Region A

In Bezug auf die antimykobakterielle *in vitro* Aktivität haben sich eine *para*-(Pentylthio)benzoyl-Einheit (**28g**, $\text{MHK}_{90} = 0.19 \mu\text{M}$) sowie eine *para*-(Hexyl)benzoyl-Einheit (**28h**, $\text{MHK}_{90} = 0.19 \mu\text{M}$) als bevorzugte Strukturelemente für Region A herausgestellt (Abbildung 27). Die optimale Länge der Alkylkette ist für KSK 106 (**1b**) sowie das Thia-Analogon **28g** mit fünf Kohlenstoffatomen und für das Carba-Analogon **28h** mit sechs Kohlenstoffatomen erreicht.

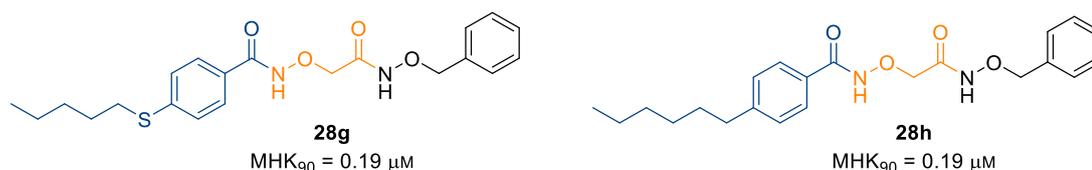


Abbildung 27: Thia- (**28g**) und Carba-Analogon (**28h**) von KSK 106 (**1b**).

Allgemein hat sich die Steigerung der Lipophilie (berechnet nach *SwissADME*) günstig auf die antimykobakterielle *in vitro* Aktivität ausgewirkt. Im Gegensatz dazu führte die Funktionalisierung der Alkylkette mit polaren Strukturelementen zu einer deutlichen Reduktion bzw. zum Verlust der antimykobakteriellen *in vitro* Aktivität: Ether (**28o**, $\text{MHK}_{90} = 12.5 \mu\text{M}$), Nitril (**28m**, $\text{MHK}_{90} = 12.5 \mu\text{M}$), Sulfon (**28q**, $\text{MHK}_{90} > 100 \mu\text{M}$), Sulfonamid (**28r**, $\text{MHK}_{90} > 100 \mu\text{M}$).

Der Austausch der *para*-(Pentyloxy)benzoyl-Einheit (Region A) gegen lineare gesättigte Alkylketten lieferte aktive Inhibitoren (Abbildung 28). Mit Kettenlängen von C_9 (**28y**, $\text{MHK}_{90} = 0.39 \mu\text{M}$, $\log P_{O/W} = 3.05$) und C_{10} (**28z**, $\text{MHK}_{90} = 0.39 \mu\text{M}$, $\log P_{O/W} = 3.36$) entsprechen Lipophilie sowie *in vitro* Aktivität in etwa der von *KSK 106* (**1b**, $\text{MHK}_{90} = 0.39 \mu\text{M}$, $\log P_{O/W} = 3.06$). Unter diesen Bedingungen ist die Benzoyl-Struktur in Region A nicht essenziell für gute antimykobakterielle *in vitro* Aktivität.

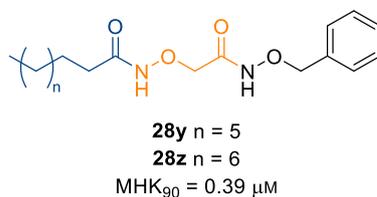


Abbildung 28: KSK-Analoga **28y** und **28z** mit linearen, gesättigten Kohlenstoffketten (C_9 und C_{10}) in Region A.

Verzweigte Alkylketten wurden wiederum nicht toleriert (**28x**, $\text{MHK}_{90} > 100 \mu\text{M}$) und KSK-Analoga mit Biaryl-Struktur in Region A zeigten ebenfalls nur geringe oder keine *in vitro* Aktivität (**28aa-ag**, $\text{MHK}_{90} = 3.125 - 100 \mu\text{M}$).

Die Fluorierung der Alkylkette (terminal, **28p**) sowie des Benzenkerns (*ortho*-Stellung, **28s**) wurden unter geringfügiger Reduktion der Aktivität toleriert ($\text{MHK}_{90} = 0.78 \mu\text{M}$) und die Einführung eines terminalen Alkins (**28k**, $\text{MHK}_{90} = 0.19 \mu\text{M}$) führte sogar zur Verbesserung der antimykobakteriellen *in vitro* Aktivität (Abbildung 29). Diese Funktionalität ist von besonderer Bedeutung für die Synthese von Wirkstoffsonden, da sie bioorthogonale Reaktionsführung zur chemischen Markierung ermöglicht.

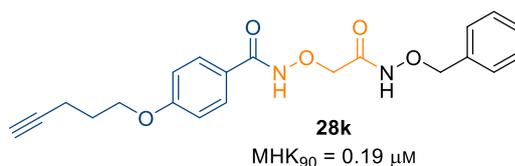


Abbildung 29: KSK-Analogon **28k** mit terminaler Alkin-Funktionalität in Region A zur Darstellung von Wirkstoffsonden.

Region B

Die Bedeutung der Alkoxyamid-Struktur von *KSK 106* (**1b**) als essenzielles Strukturmotiv für die antimykobakterielle *in vitro* Aktivität hat sich im Zuge der Region B Strukturmodifikationen gefestigt.

Ihr Austausch gegen eine Amid- (**55b**, $\text{MHK}_{90} > 100 \mu\text{M}$) bzw. eine Keton-Struktur (**59**, $\text{MHK}_{90} > 100 \mu\text{M}$) führte zum Verlust der antimykobakteriellen *in vitro* Aktivität (Abbildung 30).

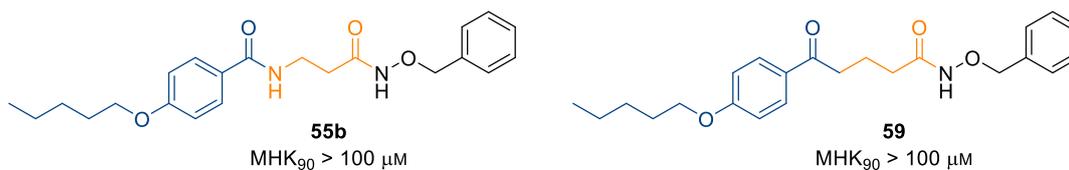


Abbildung 30: KSK-Analoga **55b** und **59** mit Amid- bzw. Keton-Struktur in Region B.

Auch eine Kettenverzweigung durch Methylierung in α -Stellung (Region B, **63a**, $\text{MHK}_{90} = 3.125 \mu\text{M}$) führte zur Reduktion der antimykobakteriellen *in vitro* Aktivität und die zusätzliche Methylierung in Benzyl-Stellung (Region C, **63b**, $\text{MHK}_{90} = 12.5 \mu\text{M}$) senkte die Aktivität weiter (Abbildung 31). Diese Beobachtung unterstützt die *Prodrug*-Theorie, da das Maß sterischer Hinderung stark mit der Eignung als Substrat für Hydrolasen korreliert.

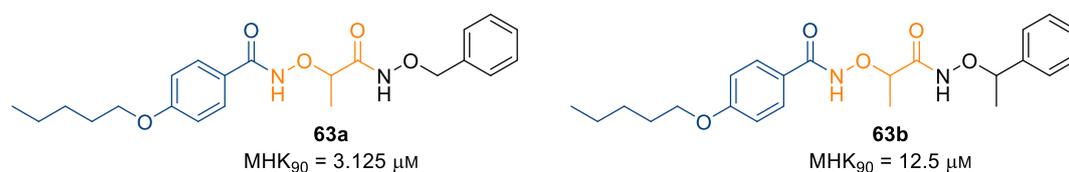


Abbildung 31: KSK-Analoga **63a** und **63b** mit Kettenverzweigung in den Regionen B und C.

Die geringe Toleranz für Strukturmodifikationen und deren starker Einfluss auf die *in vitro* Aktivität der resultierenden Inhibitoren machen die α -Aminoxyacetyl-Einheit (Region B) der KSK-Leistrukturen vergleichsweise unattraktiv für weitere Optimierungen.

Region C

Die *O*-Benzylhydroxylamin-Einheit in Region C der Leitstruktur *KSK 106* (**1b**) zeigte die größte Toleranz gegenüber vielfältigen Strukturmodifikationen. Der Austausch des Benzenkerns gegen Thiophen (**67c**) oder dessen Fluorierung in *para*-Stellung (**67a**) lieferten Inhibitoren mit guter *in vitro* Aktivität ($\text{MHK}_{90} = 0.78 \mu\text{M}$) und durch die Einführung cyclischer sowie linearer Alkoxyamid-Strukturen (**67f**, $\text{MHK}_{90} = 0.19 \mu\text{M}$ und **67h**, $\text{MHK}_{90} = 0.048 \mu\text{M}$) ließ sich die Aktivität sogar deutlich verbessern (Abbildung 32).

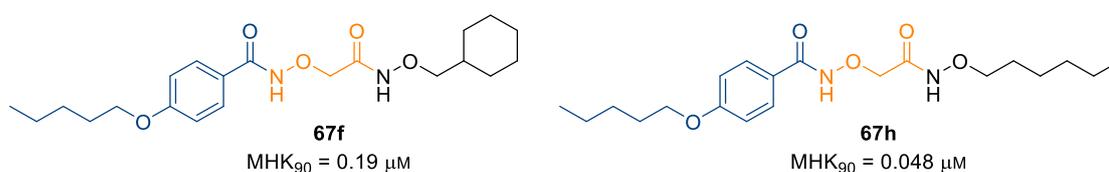


Abbildung 32: *KSK*-Analoga **67f** und **67h** mit aliphatischer Alkoxyamid-Struktur in Region C.

Während Hydrazid-Strukturen in Region C der Leitstruktur *KSK 106* (**1b**) zur starken Reduktion der antimykobakteriellen *in vitro* Aktivität führten (**67y-z**, $\text{MHK}_{90} = 50 \mu\text{M}$), wurden Anilid- sowie Ester-Strukturen sehr gut toleriert. Mit besonders ausgeprägter *in vitro* Aktivität ($\text{MHK}_{90} = 0.048 \mu\text{M}$) überzeugten dabei die Anilide **67r-s** und der Pentylester **72** (Abbildung 33). Die Benzylhydroxylamin-Struktur ist demnach nicht essenziell für gute antimykobakterielle *in vitro* Aktivität und *KSK*-Analoga mit Hexyloxyamid- oder Anilid-Strukturen sind möglicherweise sogar bessere Substrate für die bioaktivierende Amidohydrolase.

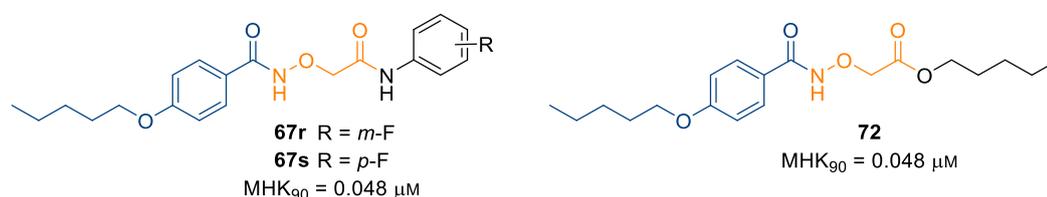


Abbildung 33: *KSK*-Analoga **67r-s** und **72** mit Anilid- bzw. Ester-Struktur in Region C.

Sowohl der Austausch der Benzylhydroxylamin-Struktur gegen heterocyclische Bioisostere (**80**, **82** und **83**) als auch der bioisostere Austausch der Carboxylgruppe von Schlüsselintermediat **II** (**65**) gegen *1H*-Tetrazol (**79**) führten zur deutlichen Reduktion bzw. zum Verlust der antimykobakteriellen *in vitro*

Aktivität ($MHK_{90} = 12.5 - 100 \mu\text{M}$). In Kombination mit der ausgeprägten Aktivität des Pentylesters **72** unterstützt auch diese Beobachtung einen Wirkmechanismus basierend auf hydrolytischer Freisetzung der Carbonsäure **65** mit intakter Alkoxyamid-Struktur (Schlüsselintermediat II, Abbildung 34) als aktive Wirkform (*Prodrug*-Theorie).

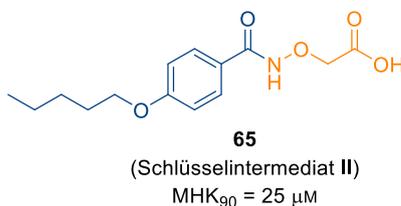


Abbildung 34: Carbonsäure **65** (Schlüsselintermediat II) als potenziell aktive Wirkform nach hydrolytischer Bioaktivierung.

Die Einführung einer Propargyl-Struktur (**67j**, $MHK_{90} = 0.78 \mu\text{M}$) wurde gut toleriert und ermöglicht die chemische Markierung der Leitstruktur in Region C (Abbildung 35). Im Hinblick auf den postulierten Wirkmechanismus (*Prodrug*-Theorie, s. Kapitel 1.4.1, S. 27) ist es von Vorteil, eine Markierung in mehreren Molekülregionen durchzuführen, da sich durch den Vergleich entstehender Hydrolysefragmente potenziell die aktive Wirkform identifizieren bzw. verifizieren lässt.



Abbildung 35: KSK-Analogon **67j** mit Propargyl-Struktur in Region C.

3.2 Identifizierung des Wirkstoffziels und der aktiven Wirkform

Zur Entdeckung und Entwicklung von Wirkstoffen existieren im Bereich der pharmazeutischen Forschung zwei methodisch konträre Herangehensweisen: Struktur- oder Liganden-basiert.

Die Struktur-basierte Wirkstoffentwicklung beginnt mit der Validierung einer pathologisch relevanten biomolekularen Zielstruktur, woraufhin *in vitro* Assays durchgeführt werden, um passende Leitstrukturen zu identifizieren.²²⁹ Im Kontrast dazu werden im Rahmen der Liganden-basierten Wirkstoffentwicklung potenzielle Kandidaten zunächst *in vitro* und später *in vivo* auf Eigenschaften untersucht, die eine wünschenswerte Veränderung des zellulären Phänotyps verursachen. Erst nachdem eine solche Leitstruktur entdeckt wurde, werden Anstrengungen unternommen, die biomolekularen Zielstrukturen zu bestimmen und den Mechanismus aufzuklären.²³⁰

Das Wissen über Ziel und Mechanismus ist von großer Bedeutung für die weitere präklinische Optimierung des Wirkstoffs. So kann beispielsweise die Affinität zu einer bekannten biomolekularen Zielstruktur durch strukturelle Veränderungen des Wirkstoffs gezielt verbessert werden. Auch unerwünschte Interaktionen mit anderen Biomolekülen können adressiert werden, um eine Steigerung der Selektivität zu bewirken. Letztlich kann dieses Wissen auch über den Erfolg von späten Entwicklungsstadien entscheiden, da Dosierung und Nebenwirkungen besser prognostiziert werden können.^{231,232}

Die Identifizierung einer Zielstruktur kann auf drei komplementären Wegen erfolgen:²³²

Genetische Interaktion – gezielte Modifikation bzw. Ausschalten bestimmter Gensequenzen, wodurch Rückschlüsse auf die Relevanz entsprechender Proteinstrukturen gezogen werden können (*knockout-strains*)^{233,234}

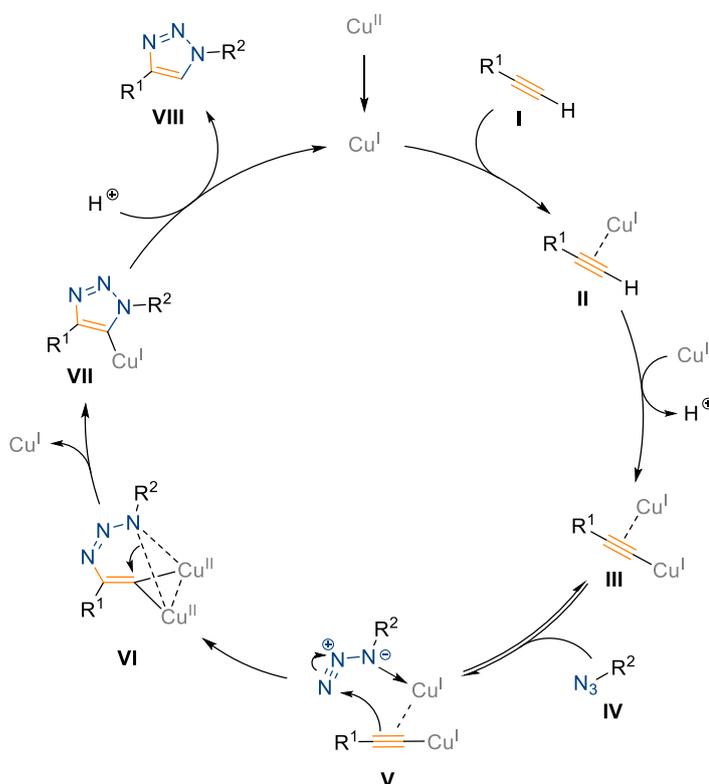
Rechnerische Interferenz – Simulation der Interaktion von Wirkstoffkandidaten mit Proteinen durch Erkennung von Mustern und iterative Näherung an die realen Bindungsverhältnisse (*in silico* Modell)²³⁵

Biochemische Methoden – chemische Markierung eines Kandidaten (Wirkstoffsonde) sowie dessen Einsatz in Bioassays zur Identifizierung von Protein-Wirkstoff-Komplexen.²³⁶

Im Rahmen dieses Projektes werden biochemische Methoden (*Pulldown*- und Fluoreszenz-Assay) zur Identifizierung des Wirkstoffziels und der aktiven Wirkform genutzt.

Die Darstellung der benötigten Wirkstoffsonden erfolgte nach dem Prinzip der bioorthogonalen Markierung. Dieses basiert auf der Verwendung physiologisch verträglicher, hoch selektiver, chemischer Reaktionen, die idealerweise nicht mit zellulären Prozessen interferieren und kaum Nebenreaktionen aufweisen.^{237,238} Die 1,3-dipolare Cycloaddition (*Click-Reaktion*) von Aziden und terminalen Alkinen – auch als HUISGEN-Reaktion bekannt – erfüllt diese Kriterien. Sie dient der Darstellung von 1,4-disubstituierten 1,2,3-Triazolen durch die konzertierte, pericyclische Verschiebung von π -Elektronen zwischen einem Dipol (Azid) und einem Dipolarophil (Alkin). Unter Normalbedingungen verläuft diese Reaktion langsam und selbst hohe Drücke und Temperaturen haben keinen nennenswerten Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit.²³⁹ Erst durch Anwesenheit von Kupfer(I)-Ionen kann die Reaktion schnell und regioselektiv erfolgen – Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin 1,3-dipolare Cycloaddition (CuAAC) – da die Dipolarophilie des Alkins massiv gesteigert wird.²⁴⁰

Der Mechanismus der CuAAC wurde 2012 von WORRELL *et al.* neu postuliert. Sie fanden einen Beweis für die Anwesenheit eines binuklearen σ,π -Kupferintermediates, wohingegen zuvor lediglich die Rolle eines σ -Intermediates beschrieben wurde (Schema 43).²⁴¹

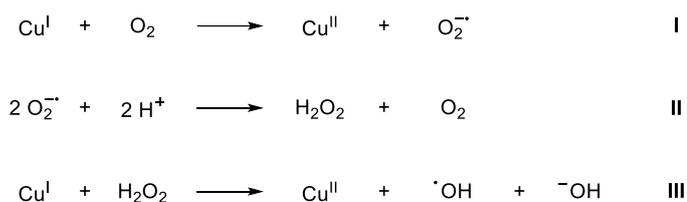


Schema 43: Postulierter Katalysezyklus der CuAAC über das binukleare Kupferintermediat III nach WORRELL *et al.*²⁴¹

Der Katalysezyklus beginnt mit der Bildung des π -Acetylids **II** durch Koordinierung des Kupfer(I)-Ions an das terminale Alkin **I**. Durch die gesteigerte Azidität des sp -hybridisierten Kohlenstoffs kann im Folgenden eine σ -Substitution mit einem weiteren Kupfer(I)-Ion stattfinden, wobei das binukleare σ,π -Kupferacetylid **III** entsteht. Durch Wechselwirkung mit einem organischen Azid **IV** wird ein tertiärer Azid-Alkin-Kupfer(I)-Komplex **V** gebildet. Die konzertierte, pericyclische Verschiebung von π -Elektronen liefert den Metallacyclus **VI** und durch nachfolgende reduktive Ringkontraktion entsteht das Kupfer(I)-triazolid **VII** unter Abspaltung eines Kupfer(I)-Ions. Abschließende Protonierung setzt das 1,4-disubstituierte 1,2,3-Triazol **VIII** unter Rückgewinnung des Kupfer(I)-Katalysators frei.²⁴²

Aufgrund der inhärenten Instabilität von Kupfer(I)-Spezies und deren Neigung zur Disproportionierung wird die Reaktion in der Regel mit Kupfer(II)-Salzen durchgeführt, welche *in situ* durch milde Reduktionsmittel wie Natriumascorbat in die katalytisch aktiven Kupfer(I)-Spezies überführt werden.²⁴⁰

Auch wenn *Click*-Reaktionen durch die Anwesenheit von Kupfer stark beschleunigt und ihre Selektivität gesteigert werden, ist ihr Einsatz im Bereich der bioorthogonalen Chemie nicht unbedenklich.²⁴² Kupfer(I)-Ionen sind für ihre ausgeprägte Toxizität gegenüber lebenden Zellen bekannt.^{238,240,242,243} In der Fachliteratur wird besonders die Kupfer-medierte Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) diskutiert (Schema 44), welche physiologischen Prozessen sowie empfindlichen biomolekularen Strukturen schadet.²⁴³ Dabei wird von beeinträchtigter Zellteilung, gestörtem zellulären Metabolismus und sogar vom Absterben der Zellen berichtet.²³⁸



Schema 44: Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) durch die Kupfer-medierte Fenton-Reaktion (III).²⁴³

Die Oxidation von Kupfer(I) durch Sauerstoff liefert zunächst ein Superoxid-Radikal (**I**), welches durch Protonierung weiter zu Wasserstoffperoxid reagiert (**II**). Die Fenton-Reaktion zwischen Kupfer(I) und Wasserstoffperoxid (**III**) resultiert zusätzlich in der Bildung eines Hydroxyl-Radikals.²⁴³

Durch geeignete Extraktionsverfahren lässt sich der inhärenten Toxizität von Kupfer(I)-Ionen allerdings entgegenwirken. So werden beispielsweise wässrige Lösungen organischer Komplexbildner wie Dinatriumethylendiamintetraacetat (Na_2EDTA)²⁴⁴ oder auch einfache anorganische Salze wie Ammoniumchlorid²⁴⁵ genutzt, um Kupfer(I)-Ionen auszuwaschen.

3.2.1 Affinitätsmarkierung

Heutzutage existiert eine Vielzahl an Methoden zur Identifizierung des Wirkstoffziels, wobei die Affinitätsmarkierung eine der geläufigsten ist.²⁴⁶ Dabei werden die nicht-essenziellen Regionen eines zuvor identifizierten Wirkstoffs genutzt, um eine Markierung (bspw. mit Biotin oder einer Festphasenmatrix) durchzuführen. Die resultierende Wirkstoffsonde wird mit einem Proteinlysate inkubiert, wobei sowohl unspezifische Wechselwirkungen zwischen Proteinen und der Sonde als auch stärkere, spezifische Wechselwirkungen (Protein-Wirkstoff-Komplex) auftreten.²⁴⁷ Im Falle einer Biotin-Markierung wird dem Proteinlysate zur Inkubation ebenfalls ein perlenförmiges Trägermaterial aus Agarose oder Kunstharz zugegeben, auf dem die Proteine Streptavidin oder Avidin immobilisiert wurden. Durch die außerordentlich große Affinität von Biotin gegenüber Avidin und Streptavidin können die markierten Wirkstoffsonden an diesem Trägermaterial nicht-kovalent angereichert werden.²⁴⁸ In einem ersten Reinigungsschritt werden die unspezifisch gebundenen Proteine ausgewaschen. Anschließend werden im zweiten Reinigungsschritt die spezifisch gebundenen Zielproteine entweder durch einen Überschuss an freiem Wirkstoff oder unter denaturierenden Bedingungen eluiert und gesammelt (*Pulldown-Assay*). Diese Proteinfraction kann durch analytische Verfahren wie LC-MS zunächst aufgetrennt und im Anschluss massenspektrometrisch untersucht werden (Abbildung 36).^{237,247}

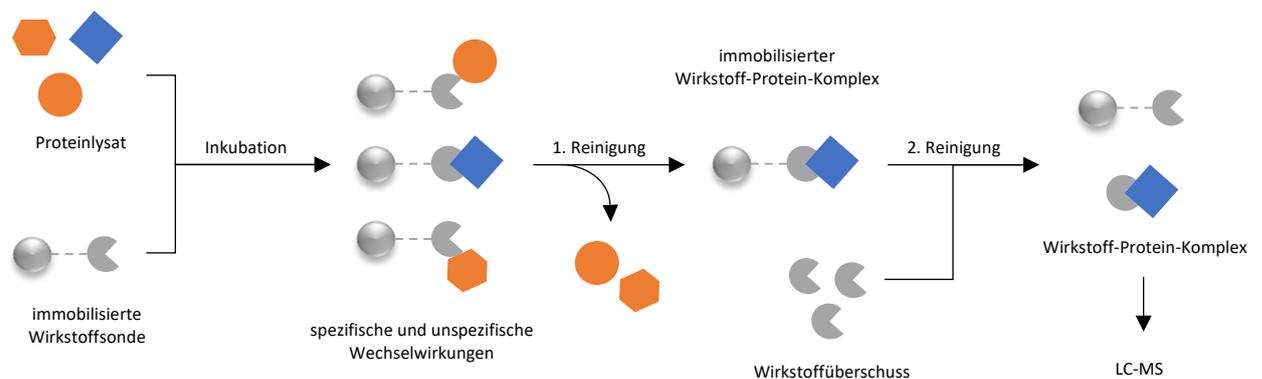


Abbildung 36: Schematische Darstellung eines Pulldown-Assays zur Identifizierung eines Zielproteins.

Zur Darstellung der Wirkstoffsonden wurde nach Absprache mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. KALSCHUEER ein Polyethylenglykol (PEG₃)-verbrücktes Biotin-Azid (**84**) genutzt (Abbildung 37). Dieses ist lang und flexibel genug, um sterische Hinderungen zu vermeiden und um der Zielstruktur diverse Orientierungsmöglichkeiten im dreidimensionalen Raum zu bieten.

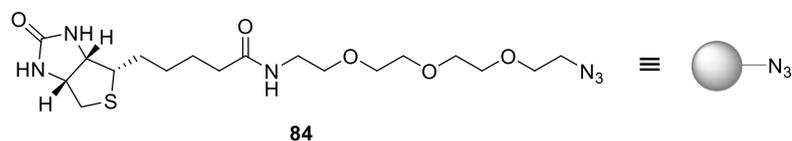
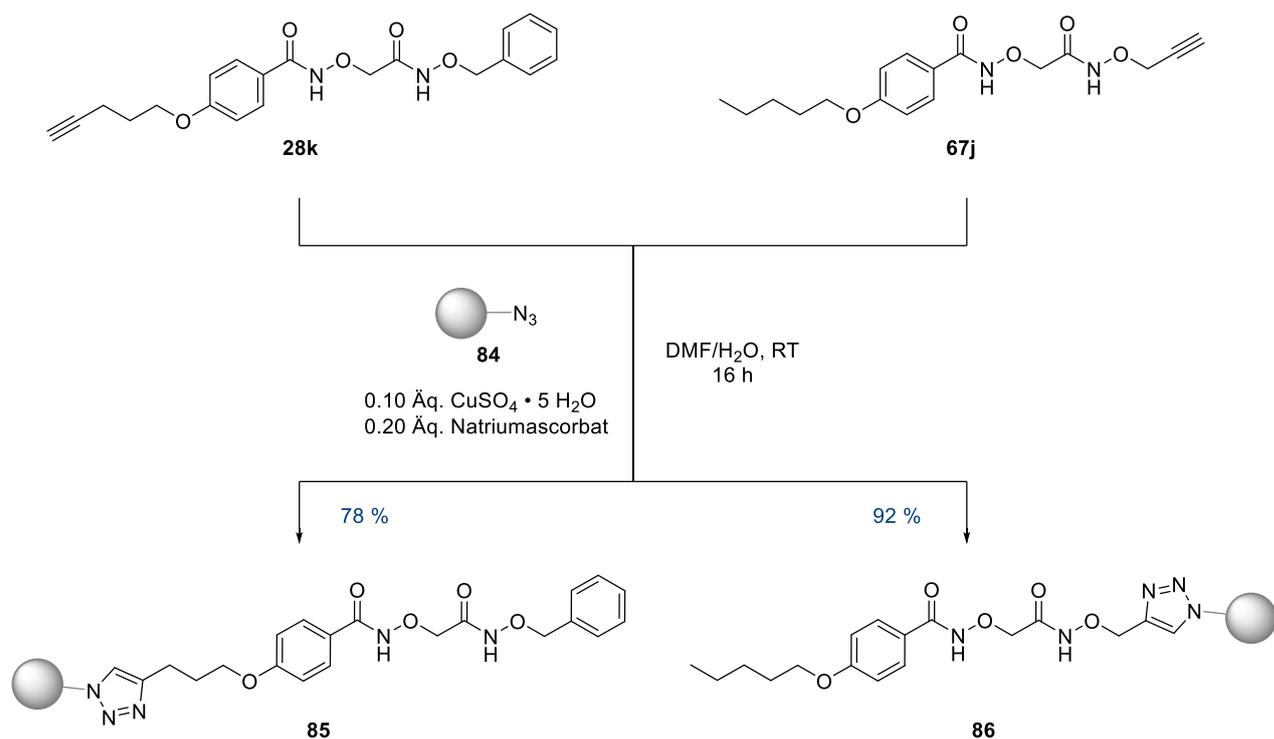


Abbildung 37: Struktur von Biotin-PEG₃-Azid (**84**) und dessen schematische Darstellung.

Nach der Vorschrift von HAMILL *et al.*²⁴⁴ wurden die KSK-Analoga **28k** und **67j** mit Biotin-PEG₃-Azid (**84**) in Anwesenheit von Kupfer(II)sulfat und Natriumascorbat in einem Gemisch aus Dimethylformamid und entmineralisiertem Wasser unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur gerührt (Schema 45).



Schema 45: Darstellung der Biotin-KSK-Konjugate **85** und **86** nach Vorschrift von Hamill *et al.*²⁴⁴

Nach Extraktion der Kupfer(I)-Ionen durch wässrige Na₂EDTA-Lösung (0.3 M, pH 8) und weiteren Reinigungsschritten (s. Kapitel 5.2.5, S. 113) wurden die Wirkstoffsonden **85** und **86** via ESI-HRMS über deren Masse-zu-Ladungs-Verhältnis charakterisiert. Mit einer Reinheit > 95 % (HPLC) können sie im Rahmen eines *Pulldown*-Assays zur Identifizierung des potenziellen Wirkstoffziels genutzt werden.

3.2.2 Fluoreszenzmarkierung

Die Fluoreszenzmarkierung ist eine Methode zur Detektion und zellulären Lokalisierung von Wirkstoffmolekülen, welche häufig auf der Einführung von Fluoreszenzfarbstoffen (Fluorochrome) durch chemische Modifikation beruht. Eine Markierung mit Fluorochromen wird in der Regel an nicht-essenziellen Regionen einer zuvor identifizierten Leitstruktur durchgeführt. Die erhaltenen Wirkstoffsonden können nach Inkubation mit fluoreszierenden Zellen und geeigneter Reinigung fluoreszenzmikroskopisch lokalisiert werden (Lokalisierungs-Assay). Dazu werden spezielle bakterielle Reporter-Stämme genutzt, die idealerweise eine orthogonal differenzierbare Fluoreszenz zu den entsprechenden Sonden aufweisen. So kann durch Änderung der Lichtwellenlänge λ im Fluoreszenzmikroskop über verschiedene Kanäle (von 380 nm bis 690 nm) zwischen Betrachtung der Sonden und der Zellen gewechselt werden. Hält man die jeweiligen Fluoreszenzmuster fotografisch fest, können durch Überlagerung der Bilder Lokalität und Dichte der nachzuweisenden Substanzen ermittelt werden. Die Markierung verschiedener Molekülregionen und der Vergleich der erhaltenen Fluoreszenzaufnahmen sowie der *in vitro* Aktivitäten kann zusätzlich Rückschlüsse über die Gestalt einer aktiven Wirkform ermöglichen.

Im Rahmen dieses Projektes führte die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. KALSCHUEER ein Ganzzell-basiertes *in vitro* Lokalisierungs-Assay durch, wobei sie standardmäßig den *M. tuberculosis mCherry* Reporter-Stamm zur Detektion der fluoreszierenden Wirkstoffsonden nutzen. Mit einem Anregungs- bzw. Absorptionsmaximum $\lambda_{\text{Abs.}}$ bei 587 nm und einem Emissionsmaximum $\lambda_{\text{Em.}}$ bei 610 nm zeigt dieser eine Fluoreszenz im roten Bereich des sichtbaren Lichtes.²⁴⁹ Zur optimalen Detektion von potenziell internalisierten Wirkstoffsonden sollten diese ein Emissionsmaximum $\lambda_{\text{Em.}}$ zwischen 500 und 540 nm aufweisen und somit eine Fluoreszenz im grünen Bereich des sichtbaren Lichtes zeigen. In Tabelle 16 ist eine Auswahl entsprechender Farbstoffe samt Absorptions- und Emissionsmaxima aufgelistet.²⁵⁰

Tabelle 16: Absorptions- und Emissionsmaxima von ausgewählten etablierten Fluoreszenzfarbstoffen.²⁵⁰

Fluorophor	$\lambda_{\text{Abs.}}$ [nm]	$\lambda_{\text{Em.}}$ [nm]
Cy2	489	506
BODIPY® FL	503	512
6-FAM	492	517
Alexa Fluor® 488	495	519

Zunächst wurden fluoreszierende Wirkstoffsonden durch Markierung der Leitstruktur mit 6-FAM-Azid (**87**) – einem Azid-Konjugat von 6-Carboxyfluorescein – dargestellt (Abbildung 38). 6-FAM-Azid ist ein Hybrid aus einem Triphenylmethan- und einem Xanthenfarbstoff, der durch Kondensation mit einem Azid-Linker für *Click*-Reaktionen zugänglich gemacht wurde.

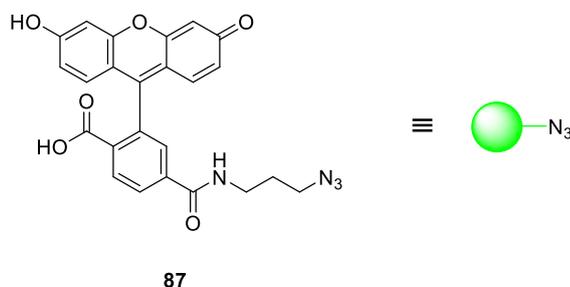
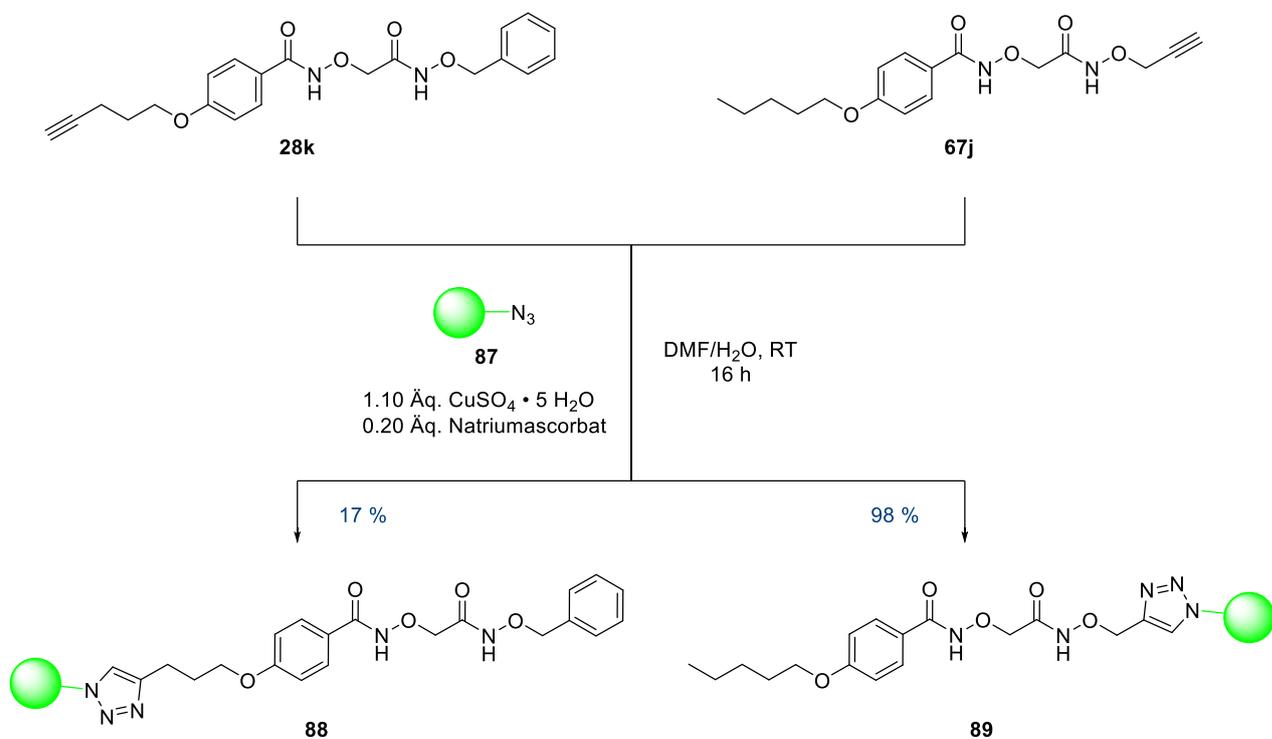


Abbildung 38: Struktur von 6-FAM-Azid (**87**) und dessen schematische Darstellung.

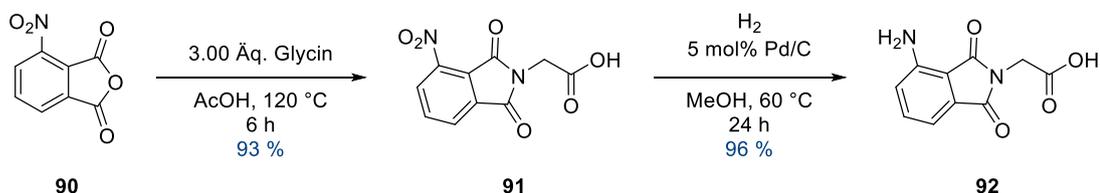
Die CuAAC der KSK-Analoga **28k** und **67j** mit 6-FAM-Azid (**87**) fand nach Vorschrift von HAMILL *et al.*²⁴⁴ in Anwesenheit von Kupfer(II)sulfat und Natriumascorbat in einem Gemisch aus Dimethylformamid und entmineralisiertem Wasser unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur statt (Schema 46).



Schema 46: Darstellung der (6-FAM)-KSK-Konjugate **88** und **89** nach Vorschrift von HAMILL *et al.*²⁴⁴

Aufgrund der freien Carbonsäure-Funktionalität von 6-FAM ist es nicht zielführend, die Extraktion der Kupfer(I)-Ionen mit basischer Na₂EDTA-Lösung durchzuführen, da ein Ausbeuteverlust zu erwarten ist. SEO *et al.*²⁴⁵ beschrieben hingegen das Extraktionsverfahren mit gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung als zuverlässige und leistungsfähige Methode zur Entfernung von Kupfer(I)-Ionen in Anwesenheit von sauren chemischen Funktionalitäten. Nach geeigneter Extraktion und weiteren Reinigungsschritten (s. Kapitel 5.2.5, S. 113) wurden die Reaktionsprodukte massenspektrometrisch über deren *Masse-zu-Ladungs-Verhältnis* charakterisiert.

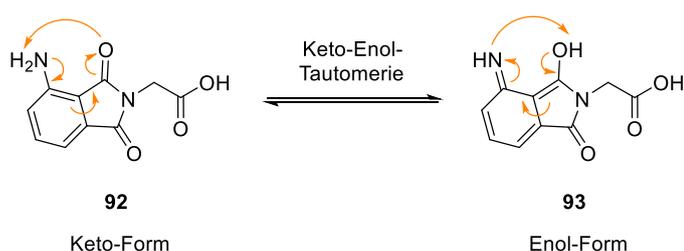
Neben den Fluorescein-basierten Wirkstoffsonden **88** und **89** wurde auch die Darstellung einer weiteren Sonde verfolgt. Im Jahr 2019 stellten FENG *et al.* die Synthese des grün fluoreszierenden Aminophthalimid-Farbstoffs **92** vor (Schema 47).²⁵¹



Schema 47: Darstellung des Phthalimid-basierten Farbstoffs **92** nach Feng *et al.*²⁵¹

Sie machten sich die Entstehung der Fluoreszenz durch Reduktion der Nitro-Gruppe von **91** zunutze, um Substanzen mit reduzierenden Eigenschaften detektieren zu können. Nach diesem Prinzip konnten sie Reduktionsmittel in wässriger Lösung, in Zellen und sogar in komplexeren lebenden Organismen nachweisen und quantifizieren.

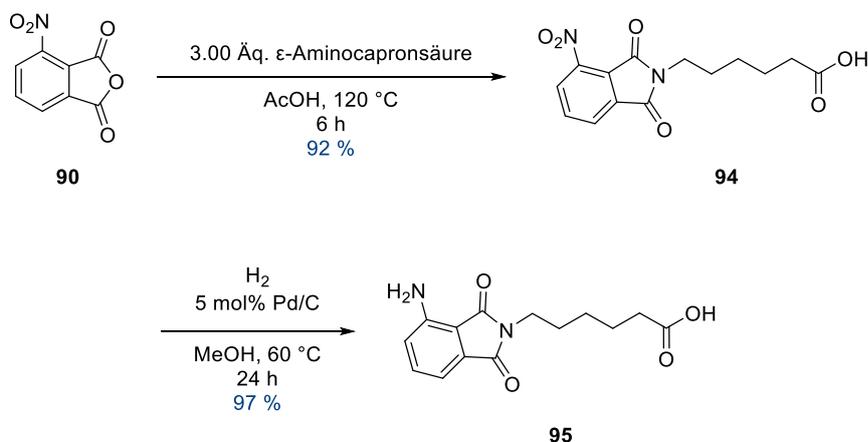
Die Fluoreszenz beruht bei Aminophthalimid **92** auf dem intramolekularen Protonentransfer im angeregten Zustand (*excited-state intramolecular proton transfer*, kurz ESIPT). In einem vierstufigen photochemischen Prozess erfolgt die Relaxation angeregter ESIPT-Fluorophore durch Keto-Enol-Tautomerisierung (Schema 48).



Schema 48: ESIPT-induzierte Keto-Enol-Tautomerisierung von Aminophthalimid **92**.

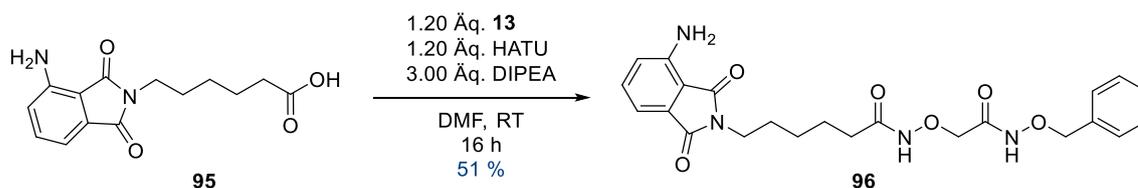
Bei Anregung der Keto-Form (**92**) ist die Neuverteilung von Ladungsverhältnissen möglich, die zur Tautomerisierung in die Enol-Form (**93**) führt. Die Relaxation des angeregten Zustandes der Enol-Form in den Grundzustand ist als Fluoreszenz zu erkennen (Enol-Emission). Der Grundzustand der Enol-Form wird durch umgekehrten Protonentransfer zurück in die Keto-Form überführt und der Prozess kann erneut beginnen. Auch die Relaxation der angeregten Keto-Form ist als Fluoreszenz wahrzunehmen (Keto-Emission), wobei sich die Wellenlängen beider Emissionen unterscheiden.²⁵² ESIPT-Fluorophore weisen aufgrund der erheblichen strukturellen Veränderung während des Protonentransfers eine ungewöhnlich hohe Stokes-Verschiebung von ca. 200 nm auf. Im Vergleich zu traditionellen Fluorophoren treten folglich seltener Selbstabsorption und innere Filtereffekte auf, weshalb sie im Bereich der Wirkstoffmarkierung an Beliebtheit zunehmen.^{252,253}

Die Carboxylgruppe des Farbstoffs **92** eignet sich zur Verknüpfung mit Wirkstoffen und somit zur Erzeugung von fluoreszierenden Wirkstoffsonden. Um sterische Hinderung und Interaktionen mit dem verknüpften Wirkstoff zu minimieren, wurde die Synthese mit ϵ -Aminocapronsäure anstatt Glycin durchgeführt. Nach abschließender Reduktion der Nitro-Gruppe konnte der kettenverlängerte Farbstoff **95** erhalten werden (Schema 49).²⁵¹



Schema 49: Synthese des kettenverlängerten Phthalimid-Farbstoffs **95** in Anlehnung an die Vorschrift von FENG et al.²⁵¹

Eine HATU-medierte Kupplungsreaktion zwischen dem kettenverlängerten Farbstoff **95** und Schlüsselintermediat **I (13)** lieferte die fluoreszierende ESIPT-Wirkstoffsonde **96** (Schema 50).



Schema 50: Kupplungsreaktion von Farbstoff **95** und Schlüsselintermediat **I (13)** zur Darstellung der ESIPT-Sonde **96**.

Die Überlagerung der Aufnahmen ermöglichte die Lokalisierung der Wirkstoffsonden (Abbildung 39). Aufgrund der kurzen Lebensdauer konnte die Fluoreszenz der ES IPT-Sonde **96** nicht festgehalten werden, weshalb lediglich Dimethylsulfoxid (DMSO) und 6-FAM-Azid (**87**) als Referenz dienen.

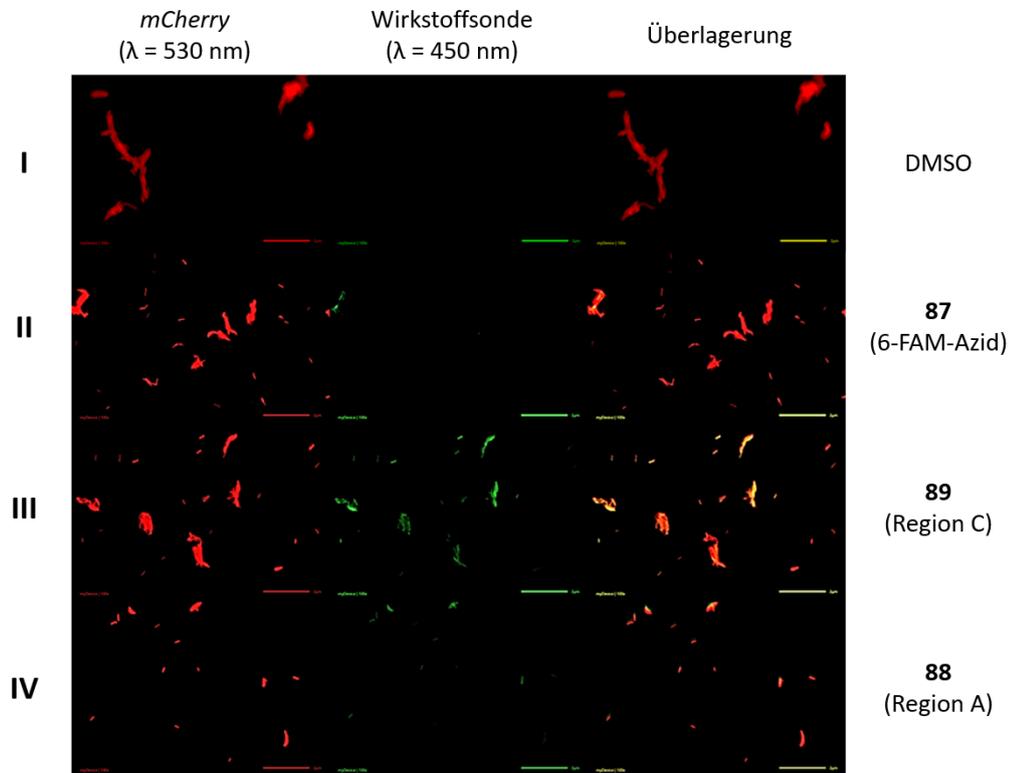


Abbildung 39: Gefilterte und überlagerte Aufnahmen des Lokalisierungs-Assays der Wirkstoffsonden **88** und **89** sowie DMSO und 6-FAM-Azid (**87**) als Referenz (erhoben von M. Sc. ANNA-LENE KIFFE-DELF).¹⁸⁵

Für DMSO ist erwartungsgemäß keine Fluoreszenz zu beobachten (I). Auch 6-FAM-Azid (**87**) zeigt nahezu keine Fluoreszenz bei Betrachtung mit Licht der Wellenlänge $\lambda = 450 \text{ nm}$ (II). Diese Beobachtung lässt sich durch mangelhafte Internalisierung des Fluorophors und damit einhergehende Auswaschung erklären. Gleiches gilt für die in Region A markierte Wirkstoffsonde **88**, deren Fluoreszenz nach Reinigung der Zellen kaum zu beobachten ist (IV). Signifikante Internalisierung ist nur für die in Region C markierte Wirkstoffsonde **89** zu beobachten, deren grüne Fluoreszenz deutlich und klar abgegrenzt zu erkennen ist (III). Auch die Überlagerung mit der entsprechenden Aufnahme der Zellen des *mCherry* Reporter-Stamms deutet auf erfolgreiche Internalisierung der Wirkstoffsonde hin.

Weder die *in vitro* Aktivitäten (Tabelle 17) noch die Fluoreszenzaufnahmen (Abbildung 39) der Wirkstoffsonden ermöglichten die eindeutige Identifizierung der aktiven Wirkform. Zur Steigerung der Aussagekraft des Lokalisierungs-Assays könnten sowohl die Sonden in Bezug auf Molekulargewicht und *in vitro* Aktivität als auch die Fluoreszenzaufnahmen in Bezug auf Auflösung, Belichtungszeit und Vergrößerung optimiert werden.

3.3 Untersuchung der Stabilität

Pharmazeutische Forschungseinrichtungen lassen der Stabilität eines potenziellen Wirkstoffkandidaten viel Aufmerksamkeit zukommen, da sie schon früh über den Verlauf und den Erfolg seiner Entwicklung entscheiden kann. Je früher Probleme erkannt und behoben werden, desto größer ist die Erfolgchance des Wirkstoffkandidaten in späteren Entwicklungsphasen.²⁵⁴ VAN DE WATERBEEMD beschreibt dieses Vorgehen als *property-based design*. Erhobene *structure-property relationships* (SPR) können die bestehenden SAR um wertvolle Erkenntnisse ergänzen.²⁵⁵

Stabilitätsprobleme erhöhen sowohl die Zeit als auch die Kosten, die zur Strukturoptimierung sowie zur Entwicklung einer Applikationsform des Wirkstoffs nötig sind. Durch Zersetzung eines Wirkstoffs in lebenden Organismen wird die Menge reduziert, die zum therapeutischen Ziel transportiert wird und Abbauprodukte können Nebenwirkungen oder sogar Toxizität hervorrufen.²⁵⁶

Neben dem Wissen über das Vorhandensein von Instabilität eines Wirkstoffkandidaten ist auch der Grund der Zersetzung von bedeutendem Interesse. So können beispielsweise pH-Wert,²⁵⁷ Licht,²⁵⁸ Temperatur und Feuchtigkeit²⁵⁹ einen maßgeblichen Einfluss auf die chemische Stabilität einer Substanz haben. Typische Zersetzungsreaktionen, die unter den genannten Bedingungen ablaufen, sind Hydrolysen, Oxidationen oder Umlagerungen.²⁵⁶ Für potenzielle Wirkstoffkandidaten, insbesondere für *Prodrugs*, wird zusätzlich die Plasmastabilität untersucht, da im Plasma enthaltene Enzyme verantwortlich für die Degradierung des Wirkstoffs sein können. Substanzen, die in Plasma nicht stabil sind, weisen häufig eine hohe *Clearance*, eine kurze Halbwertszeit und damit insgesamt eine geringe *in vivo* Aktivität auf.²⁶⁰

Letztendlich ist auch die Rate, mit der eine Zersetzung stattfindet, von Bedeutung. Im Bereich von Minuten bis Stunden hat sie beispielsweise einen Einfluss auf die *in vitro* als auch auf die *in vivo* Aktivität (*pharmacological timescale*). Im Vergleich dazu beeinflusst eine Zersetzung nach Monaten oder Jahren eher die Art der Formulierung oder die Lagerungsbedingungen (*pharmaceutical timescale*).²⁶¹

Sowohl die chemische Stabilität unter Nachahmung physiologischer Bedingungen als auch die Plasmastabilität von *KSK 104 (1a)* und *KSK 106 (1b)* wurden untersucht, um die Eignung beider Leitstrukturen für die weitere präklinische Entwicklung sowie für *in vivo* Studien beurteilen zu können.

3.3.1 Chemische Stabilität

Zur Bestimmung der chemischen Stabilität nach LEVEN *et al.* wurden die Leitstrukturen **KSK 104 (1a)** und **KSK 106 (1b)** zunächst in einem Vehikel aus 7 % Tween®80, 3 % Ethanol und 90 % Phosphatpuffer (v/v) formuliert (0.5 mg/mL) und kontinuierlich bei 37 °C inkubiert.²⁶² Die verwendeten Phosphatpuffer wurden nach der Vorschrift des *Europäischen Arzneibuchs* (EAB) mit pH 2 bzw. pH 7.4 hergestellt, um die physiologischen pH-Werte des Magens und des Blutkreislaufes zu simulieren. Zu den Zeitpunkten $t = 0, 1, 3, 6, 24, 48$ [h] wurden Proben entnommen und HPLC-analytisch untersucht ($n = 2$). Durch Vergleich der Peakfläche (*Area under curve*, kurz: AUC) zum Zeitpunkt t mit der initialen Peakfläche ($t = 0$) konnte die prozentuale Zersetzung der Leitstrukturen erschlossen werden.

Für beide Leitstrukturen erfolgte im Verlauf von 48 Stunden bei pH 2 eine Zersetzung von etwa 3 % und im gleichen Zeitraum bei pH 7.4 konnte sogar nur eine Zersetzung von etwa 1.5 % beobachtet werden (Abbildung 40).

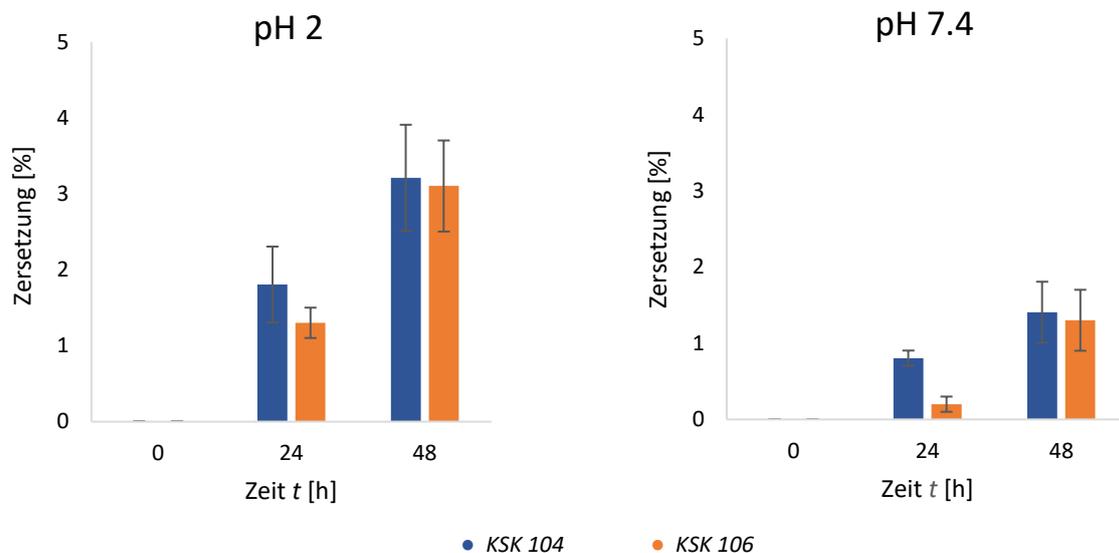


Abbildung 40: Prozentuale Zersetzung der Leitstrukturen KSK 104 (blau) und KSK 106 (orange) in Phosphatpuffer mit pH 2 bzw. pH 7.4 im Verlauf von 48 Stunden bei 37 °C. Angegeben sind Mittelwerte ($n = 2$) samt Standardabweichungen.

Das geringe Ausmaß der Zersetzung im Verlauf von 48 Stunden betont die chemische Stabilität beider Leitstrukturen in wässriger Lösung unter Nachahmung relevanter physiologischer Bedingungen und damit deren Eignung für die weitere präklinische Entwicklung. Außerdem sind diese Daten von akuter Relevanz für geplante *in vivo* Studien am Forschungsinstitut Borstel Leibniz Lungenzentrum.

3.3.2 Plasmastabilität

Die Plasmastabilität der Leitstrukturen wurde im Institut für Klinische Pharmazie und Pharmakotherapie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf von Dr. BJÖRN BURCKHARDT und ALENA MORITZ bestimmt.²⁶³ Dazu wurden Lösungen von *KSK 104* (**1a**) und *KSK 106* (**1b**) in humanem EDTA-Plasma mit einer Konzentration von 50 ng/mL angesetzt und bei 37 °C inkubiert. Zu den Zeitpunkten $t = 0, 2, 4, 24$ [h] erfolgten Probenentnahmen ($n = 3$) und die Quantifizierung erfolgte via LC-MS/MS durch den Vergleich der initialen Signalintensität ($t = 0$) mit der Intensität zum Zeitpunkt t (Abbildung 41).

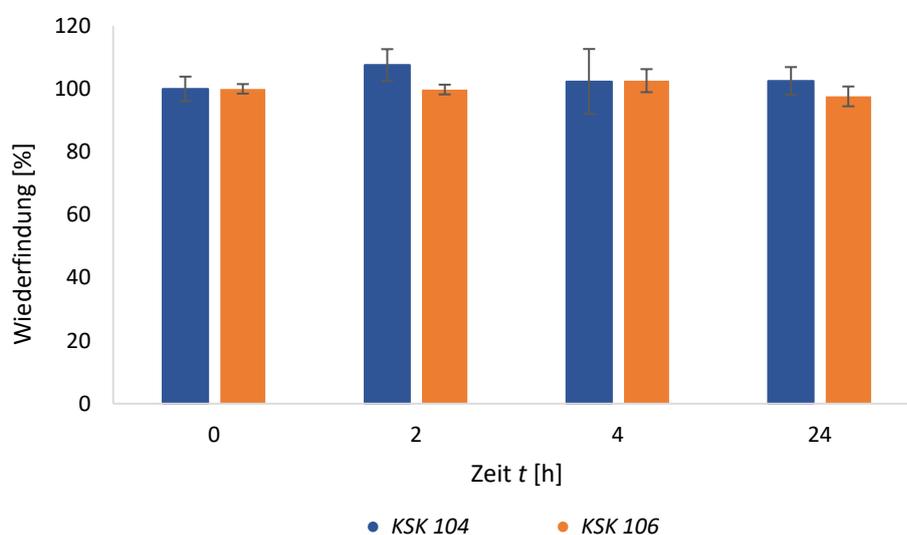


Abbildung 41: Prozentuale Wiederfindung der Leitstrukturen *KSK 104* (blau) und *KSK 106* (orange) in humanem EDTA-Plasma im Verlauf von 24 Stunden bei 37 °C. Angegeben sind Mittelwerte ($n = 3$) samt Standardabweichungen (erhoben und bereitgestellt von Dr. BJÖRN BURCKHARDT und ALENA MORITZ).²⁶³

Beide Leitstrukturen sind unter den gegebenen Bedingungen über mindestens 24 Stunden massenspektrometrisch in voller Intensität zu detektieren und können daher als stabil in humanem EDTA-Plasma angesehen werden. Ergänzend zur ausgeprägten chemischen Stabilität ist die hohe Plasmastabilität der Leitstrukturen *KSK 104* (**1a**) und *KSK 106* (**1b**) ein bedeutender Faktor für *in vivo* Studien im Hinblick auf die Anwendung verschiedener Applikationsformen.

3.4 Wasserlöslichkeit und präklinische Formulierung

Auf die Identifizierung eines Wirkstoffkandidaten folgt dessen präklinische Entwicklung. Dabei werden Strukturmodifikationen sowie *in vitro* Studien und später auch *in vivo* Studien in Tiermodellen durchgeführt, um den Kandidaten zu optimieren und Erkenntnisse über Toxizität, Pharmakokinetik und Pharmakodynamik zu erhalten. Speziell für *in vivo* Studien muss in Abhängigkeit vom Applikationsweg eine effektive präklinische Formulierung gefunden werden, die erfolgreich die Wasserlöslichkeit des Wirkstoffkandidaten vermittelt.²⁶⁴

Bei der Löslichkeitsvermittlung werden schnell die charakterisierten physiologischen Grenzen organischer Lösungsmittel oder Hilfsstoffe überschritten, weshalb der Einsatz des Kandidaten in Tierversuchen oder gar klinischen Studien scheitert.²⁶⁵ Daher werden bereits im Rahmen der synthetischen Strukturoptimierung eines Wirkstoffkandidaten Anstrengungen unternommen, dessen Wasserlöslichkeit zu verbessern, um den Erfolg einer Formulierung und der weiteren Entwicklung zu gewährleisten.²⁶⁶

Das Ziel einer Formulierung für *in vivo* Studien im Tiermodell ist die Maximierung der Wirkstoffexposition sowie deren Vereinheitlichung unter verschiedenen Spezies. Die diverse Physiologie der Tiere sowie unterschiedliche Applikationswege stellen dabei besondere Herausforderungen dar. Daraus ergeben sich Anforderungen wie z. B. eine geeignete Konzentration der finalen Formulierung, der Einsatz geeigneter Hilfsstoffe im Hinblick auf tierspezifische Toxizität und auch die Berücksichtigung des applizierbaren Volumens für verschiedene Spezies.^{265,267}

Die perorale Applikation zählt zu den gängigsten Applikationswegen im Bereich der pharmazeutischen Wirkstoffentwicklung sowie für zugelassene Arzneistoffe und bietet ein breites Spektrum an möglichen Vehikeln für verschiedene Darreichungsformen.²⁶⁴ Allerdings kann mangelnde orale Bioverfügbarkeit durch schlechte Absorption, *first-pass* Metabolisierung oder Abbau im Verdauungstrakt dazu führen, dass ein anderer Applikationsweg gewählt werden muss.²⁶⁸

Durch parenterale Applikation können genannte Barrieren umgangen werden. Beispielsweise wird der Wirkstoff im Falle einer intravenösen Applikation direkt in den Blutkreislauf injiziert und ist somit keiner Absorptionsproblematik oder *first-pass* Metabolisierung ausgesetzt.²⁶⁹ Hier müssen allerdings Faktoren wie Volumen der Dosis, Stabilität der Formulierung, pH-Wert, Viskosität und Osmolalität berücksichtigt werden, um eine Wirkung und physiologische Verträglichkeit zu gewährleisten.^{265,270}

In Vorbereitung auf geplante *in vivo* Studien im Tiermodell musste sowohl die Wasserlöslichkeit der Leitstrukturen **KSK 104 (1a)** und **KSK 106 (1b)** ermittelt als auch nötigenfalls eine präklinische Formulierung zur Löslichkeitsvermittlung etabliert werden.

Die Ermittlung der thermodynamischen Wasserlöslichkeit beider Leitstrukturen erfolgte in Anlehnung an die Literaturvorschrift von ALSENZ und KANSY (*thermodynamic equilibrium solubility assay*, kurz: THESA).²⁷¹ Dabei wurde die absolute Peakfläche des HPLC-Chromatogramms einer Prüflösung durch Vergleich mit einer Kalibriergeraden in Relation zur Löslichkeit im gegebenen Medium gesetzt.

Zunächst wurden Kalibrierlösungen von **KSK 104 (1a)** und **KSK 106 (1b)** in Acetonitril mit bekannten, äquidistanten Konzentrationen vermessen. Die erhaltenen Peakflächen [AU·s] wurden gegen die verwendeten Konzentrationen [$\mu\text{g/mL}$] aufgetragen und durch lineare Regression konnten Kalibriergeraden erhalten werden (Abbildung 42 und Abbildung 43).

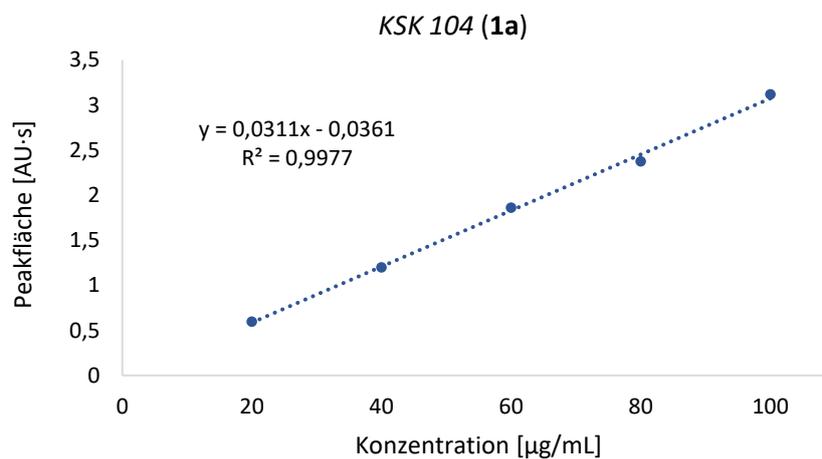


Abbildung 42: Kalibriergerade zur Ermittlung der Wasserlöslichkeit von **KSK 104 (1a)**.

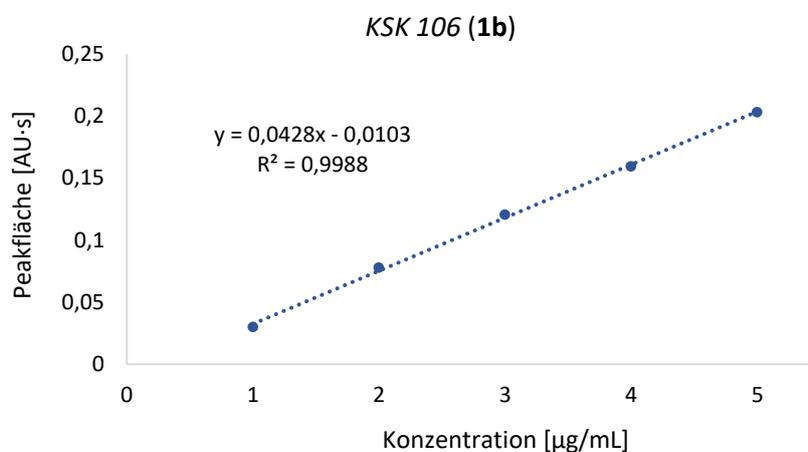


Abbildung 43: Kalibriergerade zur Ermittlung der Wasserlöslichkeit von **KSK 106 (1b)**.

Die Prüflösungen wurden mit einer theoretischen Konzentration von 1 mg/mL in PBS-Puffer (pH 7.4) angesetzt und bei Raumtemperatur für 10 Minuten im Ultraschallbad und anschließend für 24 Stunden in einem automatischen Schüttler geschwenkt ($n = 2$). Nach Zentrifugation und Filtration der vorliegenden Suspensionen wurden die Prüflösungen an der HPLC vermessen. Die erhaltenen Peakflächen [AU·s] konnten mithilfe der Regressionsgeradengleichungen (Gl. I und II) in die Löslichkeit [$\mu\text{g}/\text{mL}$] im wässrigen Medium umgerechnet werden (Tabelle 18).

KSK 104 (1a)	KSK 106 (1b)
$y = 0,0311x - 0,0361 \quad \text{(I)}$	$y = 0,0428x - 0,0103 \quad \text{(II)}$
$\Leftrightarrow x = \frac{y + 0,0361}{0,0311}$	$\Leftrightarrow x = \frac{y + 0,0103}{0,0428}$

Tabelle 18: Peakflächen (HPLC-Chromatogramme) von KSK 104 (1a) und KSK 106 (1b) und resultierende Wasserlöslichkeiten ($\mu\text{g}/\text{mL}$ und μM) bei pH 7.4 ($n = 2$). Angegeben sind Mittelwerte (M) samt Standardabweichung (SD).²⁷¹

pH 7.4						
	Peakfläche [AU·s]		Löslichkeit [$\mu\text{g}/\text{mL}$]		Löslichkeit [μM]	
	M	SD	M	SD	M	SD
KSK 104 (1a)	0.05	0.001	2.80	0.040	7.45	0.106
KSK 106 (1b)	0.02	0.002	0.68	0.041	1.77	0.107

Die Wasserlöslichkeit der Leitstrukturen unter Nachahmung physiologischer Bedingungen ist mit 2.80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ für KSK 104 (1a) bzw. mit 0.68 $\mu\text{g}/\text{mL}$ für KSK 106 (1b) als sehr gering einzuschätzen. Für die geplanten *in vivo* Experimente ist sowohl die perorale als auch die intravenöse Applikation mit einer Konzentration von 1 mg/mL beabsichtigt, weshalb präklinische Formulierungen zur Löslichkeitsvermittlung beider Substanzen etabliert werden mussten. Zwecks toxikologischer Unbedenklichkeit gegenüber den Labormäusen (BALB/c) wurden vorzüglich erprobte Vehikel, die bereits in der Fachliteratur publiziert wurden, getestet (Tabelle 19).²⁷²

Tabelle 19: Übersicht der getesteten Vehikel zur Lösungsvermittlung (1 mg/mL) von KSK 104 (1a) und KSK 106 (1b).

Eintrag	Vehikel	KSK 104	KSK 106
1	Tween®80 – EtOH – PBS (7%-3%-90%, v/v)	✗	✗
2	Tween®80 – EtOH – Saline (7%-3%-90%, v/v)	✗	✗
3	Miglyol®812	✗	✗
4	Miglyol®812 – Transcutol HP (80%-20%, v/v)	✓	✓
5	DMSO – PEG 400 – Saline (10%-20%-70%, v/v)	✗	✗
6	DMSO – PEG 400 – Tween®80 – Saline (10%-18%-4%-68%, v/v)	✗	✗
7	DMSO – Tween®80 – PG – Saline (5%-5%-20%-70%, v/v)	✓	✓
8	PG – H ₂ O (80%-20%, v/v)	✓	✓

Die Vehikel auf Basis von Tween®80 (Einträge 1 und 2) und DMSO/PEG 400 (Einträge 5 und 6) konnten kurzfristig eine Lösungsvermittlung bewirken, wobei bereits nach 5 Minuten eine Trübung der Lösung als Folge von Präzipitation beobachtet werden konnte. Das Vehikel auf Basis von Miglyol®812 (Eintrag 3) konnte beide Substanzen erst durch Zusatz von Transcutol HP (Eintrag 4) erfolgreich in Lösung bringen. Allerdings ist dieses Vehikel nicht zur intravenösen Applikation geeignet und es mangelt an publizierter Fachliteratur, weshalb von seinem Einsatz abgesehen wurde.

Letztlich konnten zwei Vehikel auf Basis von Propylenglykol (PG) überzeugen (Einträge 7 und 8). Sie vermitteln die Löslichkeit beider Leitstrukturen für mindestens 24 Stunden und sind zudem ausreichend in der Fachliteratur dokumentiert.^{273–275} Die intravenöse Applikation ist mit dem Vehikel aus Eintrag 7 und die perorale Applikation mit dem Vehikel aus Eintrag 8 geplant (Tabelle 19).

Die *in vivo* Studien im Tiermodell werden in Absprache mit Dr. CHRISTOPH HÖLSCHER, dem Leiter des Programmbereichs Infektion, im Forschungszentrum Borstel Leibniz Lungenzentrum durchgeführt. Zunächst sollen *in vivo* Toxizität sowie Pharmakokinetik beider Leitstrukturen und weiterer potenter Analoga evaluiert werden, worauf anschließend ein Infektionsmodell zur Bestimmung der antimykobakteriellen *in vivo* Aktivität aufbaut.

4 Zusammenfassung

Die globale Ausbreitung arzneimittelresistenter Tuberkulose (MDR-/XDR-TB) stellt eine zunehmende Bedrohung für Gesundheitssysteme und das öffentliche Leben weltweit dar. Im Jahr 2020 waren 20 % aller TB-Infektionen auf resistente Stämme des *M. tuberculosis* zurückzuführen – Tendenz steigend. Verglichen mit der Behandlung einer sensitiven TB ist die Behandlung einer MDR-/XDR-TB nicht nur deutlich zeit- und kostenintensiver, sondern weist auch mehr Nebenwirkungen und verringerte Heilungsraten auf. Die WHO appelliert an die Einhaltung der vereinbarten Richtlinien (*End TB Strategy*) und beschreibt die Intensivierung der Wirkstoffentwicklung als einzigen Weg, die Ausbreitung der MDR-/XDR-TB einzudämmen.^{8,10,14,22,129}

Die α -Aminoxyessigsäure-basierte Leitstruktur KSK 106

Dieses Projekt befasste sich mit der Synthese und präklinischen Strukturoptimierung der α -Aminoxyessigsäure-basierten Leitstruktur KSK 106 (**1b**) mit ausgeprägter antimykobakterieller *in vitro* Aktivität selbst gegenüber resistenten Stämmen des *M. tuberculosis* (Abbildung 44).

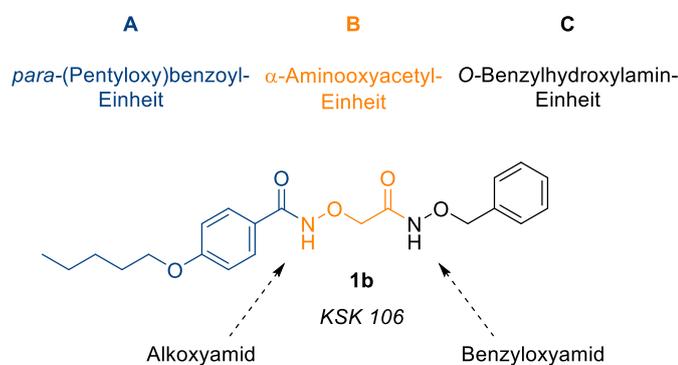


Abbildung 44: Leitstruktur KSK 106 (**1b**) und Einteilung in die Molekülregionen A, B und C.

Durch Gesamtgenomsequenzierung von spontan KSK 106-resistenten Mutanten konnte die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. KALSCHUEER Einzelnukleotid-Polymorphismen im Gen *AmiC* nachweisen. Dieses Gen codiert für eine hypothetische Amidohydrolase, die mit der Biotransformation von KSK 106 (**1b**) assoziiert wird. Basierend auf dieser Entdeckung formulierten sie eine vorläufige Hypothese zum Wirkmechanismus: Bei KSK 106 (**1b**) könnte es sich um ein *Prodrug* handeln, welches durch intrazelluläre, enzymatische Hydrolyse in die aktive Wirkform überführt wird (*Prodrug*-Theorie, s. Kapitel 1.4.1, S. 27).¹⁶⁹

Strukturmodifikationen und SAR

Zur Generierung umfangreicher Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (SAR) wurde eine Substanzbibliothek von über 100 Analoga der Leitstruktur *KSK 106* (**1b**) synthetisiert. Im Rahmen der Strukturmodifikationen in den Regionen A, B und C wurden neben antimykobakterieller *in vitro* Aktivität auch metabolische Stabilität und Wasserlöslichkeit adressiert.

Alle dargestellten KSK-Analoga wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. KALSCHUEER im Rahmen eines phänotypischen Ganzzell-Assays auf ihre antimykobakterielle *in vitro* Aktivität gegenüber *M. tuberculosis* H37Rv untersucht. Die Auswertung der biologischen Aktivität (MHK₉₀) ist die Grundlage für die abgeleiteten Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (SAR). Durch gezielte Modifikationen in den einzelnen Regionen konnte die Bedeutung der einzelnen Struktur motive in Bezug auf die antimykobakterielle *in vitro* Aktivität bewertet werden (Abbildung 45). Die beobachteten Trends sowie die SAR zu *KSK 106* (**1b**) befinden sich im Einklang mit der Vorarbeit von Dr. ALEXANDER BERGER.¹⁷⁷

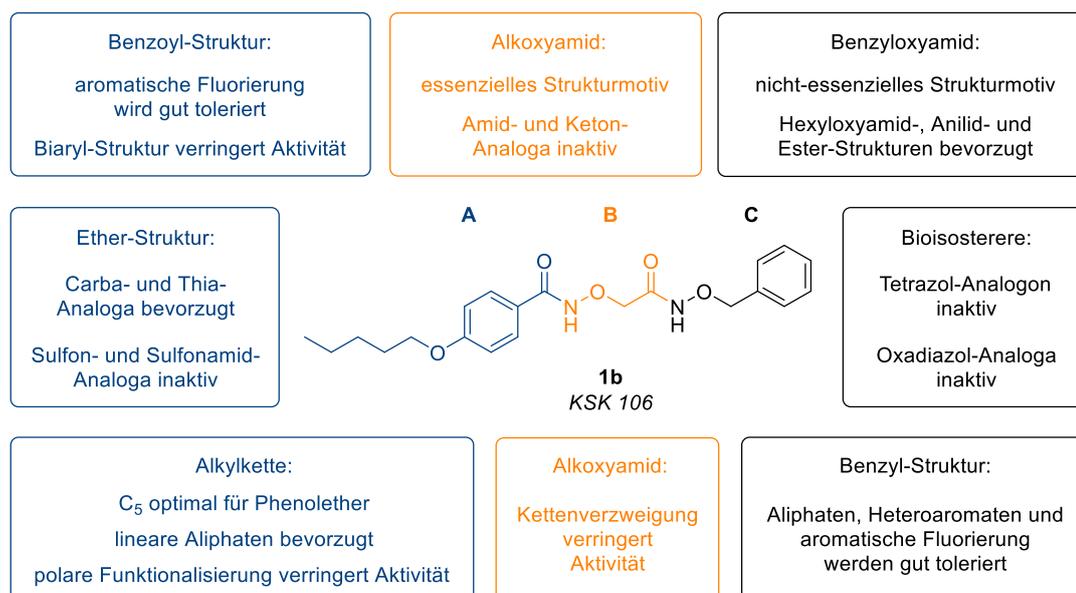


Abbildung 45: Zusammenfassung der wichtigsten SAR zu Leitstruktur *KSK 106* (**1b**).

Im Zuge der Strukturoptimierung von *KSK 106* (**1b**) wurden insgesamt zwölf Inhibitoren dargestellt, deren antimykobakterielle *in vitro* Aktivität im Vergleich zur Leitstruktur verbessert ist (MHK₉₀ < 0.39 µM, s. Kapitel 3.1.4, S. 79). Darunter befinden sich ausschließlich KSK-Analoga der Regionen A und C, weshalb die Alkoxyamid-Struktur der α-Aminoxyacetyl-Einheit (Region B) als essenzielles Strukturmotiv für die antimykobakterielle *in vitro* Aktivität zu bewerten ist.

Mit besonders ausgeprägter *in vitro* Aktivität im nanomolaren Bereich ($\text{MHK}_{90} = 0.048 \mu\text{M}$) konnten die KSK-Analoga **67h**, **67r-s** und **72** mit modifizierter Benzyloxyamid-Struktur überzeugen (Abbildung 46).

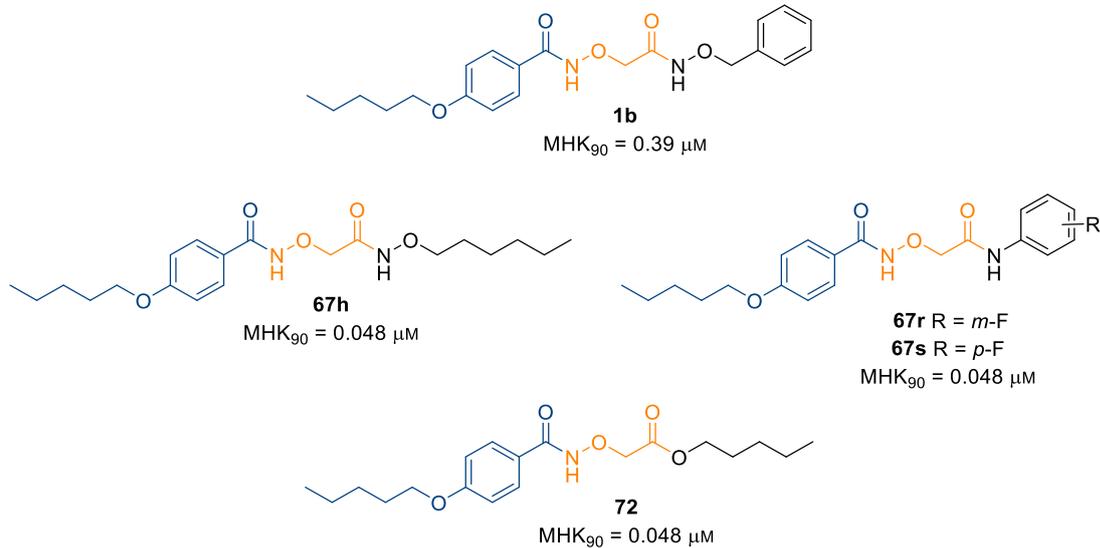


Abbildung 46: Leitstruktur KSK 106 (**1b**) und die aktivsten KSK-Analoga **67h**, **67r-s** und **72** ($\text{MHK}_{90} = 0.048 \mu\text{M}$).

Die SAR der aktivsten KSK-Analoga verdeutlicht, dass es sich bei der Benzyloxyamid-Struktur in Region C um ein nicht-essenzielles Strukturmotiv handelt. Sowohl der Austausch gegen eine Hexyloxyamid-Struktur (**67h**) als auch der Austausch gegen Anilid- bzw. Ester-Strukturen (**67r-s** bzw. **72**) führten zu einer deutlichen Verbesserung (Faktor 8) der antimykobakteriellen *in vitro* Aktivität.

Zusätzlich wird der postulierte Wirkmechanismus über hydrolytische Bioaktivierung (*Prodrug*-Theorie) durch die ausgeprägte *in vitro* Aktivität des Pentylesters **72** unterstützt. Ergänzt durch die Inaktivität der Carbamate (**25** und **76**, s. Kapitel 3.1.3.4, S. 73) und der heterocyclischen Bioisostere (**80**, **82** und **83**, s. Kapitel 3.1.3.5, S. 78) lässt sich die Carbonsäure **65** mit intakter Alkoxyamid-Struktur (Schlüsselintermediat II) vorläufig als aktive Wirkform definieren (Abbildung 47).

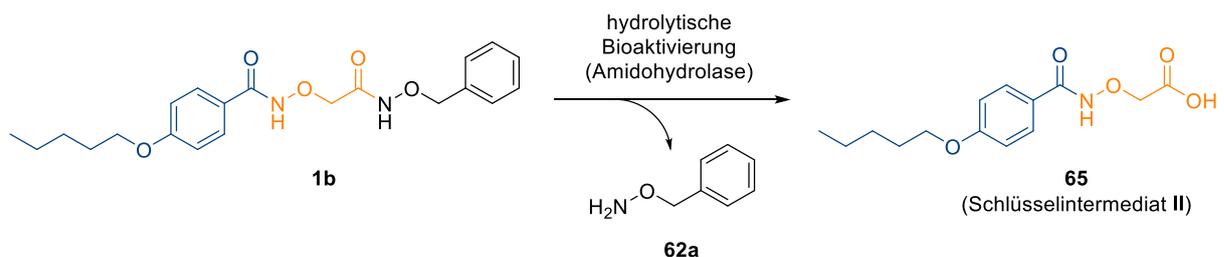


Abbildung 47: Bioaktivierung der Leitstruktur KSK 106 (**1b**) unter Freisetzung der potenziell aktiven Wirkform **65** (Schlüsselintermediat II).

Identifizierung des Wirkstoffziels und der aktiven Wirkform

Zur Identifizierung des Wirkstoffziels soll in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. KALSCHUEER ein *Pulldown*-Assay durchgeführt werden. Zu diesem Zweck wurde die Leitstruktur *KSK 106 (1b)* sowohl in Region A als auch in Region C mit einem Biotin-Linker markiert.

Zusätzlich wurde die Leitstruktur *KSK 106 (1b)* in den Regionen A und C fluoreszierend markiert, um im Rahmen eines Lokalisierungs-Assays die Identifizierung der aktiven Wirkform zu ermöglichen. Aufgrund mangelnder *in vitro* Aktivität sowie kurzer Fluoreszenzlebensdauer ist die Aussagekraft des Lokalisierungs-Assays begrenzt.

Untersuchung der Stabilität

Die Leitstrukturen *KSK 104 (1a)* und *KSK 106 (1b)* sind unter Nachahmung relevanter physiologischer Bedingungen sowohl im wässrigen Medium (pH 2 und 7.4) als auch in humanem EDTA-Plasma über mindestens 24 Stunden stabil.

Wasserlöslichkeit und präklinische Formulierung

Die Wasserlöslichkeit der Leitstrukturen *KSK 104 (1a)* und *KSK 106 (1b)* ist sehr gering, weshalb im Hinblick auf *in vivo* Studien im Tiermodell präklinische Formulierungen auf Basis von Propylenglykol (PG) etabliert wurden.

5 Experimenteller Teil

5.1 Material und Methoden

Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht eigens synthetisiert, käuflich erworben (*Sigma Aldrich, Acros Organics, BLDpharm, Carl Roth, TCI, Fluorochem, abcr, Alfa Aesar, Carbolution Chemicals, Lumiprobe, Thermo Fischer Scientific*) und ohne weitere Aufreinigung eingesetzt.

Lösungsmittel

Alle absoluten Lösungsmittel wurden von den Firmen *Sigma Aldrich* und *Acros Organics* erworben. Die eigenständige Trocknung von Lösungsmitteln erfolgte destillativ und die erhaltenen Destillate wurden bis zur Verwendung lichtgeschützt über aktiviertem 4 Å Molsieb gelagert. Für Extraktionen, Säulenchromatographien und Umkristallisationen wurden Lösungsmittel technischer Qualität benutzt.

Das Entfernen von Lösungsmitteln erfolgte destillativ bei 50 °C Wassertemperatur durch Rotationsverdampfer der Firma *Büchi* mit angeschlossenen Vakuumpumpen der Firma *Vacuubrand*.

Dünnschichtchromatographie (DC)

Reaktionen und Aufreinigungen wurden dünnschichtchromatographisch verfolgt, wobei Fertigfolien der Firma *Macherey-Nagel* (ALUGRAM® Xtra SIL G/UV₂₅₄) mit Fluoreszenzindikator verwendet wurden. Die Auswertung erfolgte einerseits durch UV-Detektion (254 nm und 366 nm) sowie durch Anfärbung mit verschiedenen Tauchlösungen und anschließender Entwicklung mithilfe eines Heißluftföns.

Kaliumpermanganat-Lösung: 3.00 g Kaliumpermanganat, 20.0 g Kaliumcarbonat und 5.00 mL Natriumhydroxid-Lösung (5 %) in 300 mL entmineralisiertem Wasser.

Molybdätosphorsäure-Lösung: 10.0 g Molybdätosphorsäure in 100 mL abs. Ethanol.

Vanillin-Lösung: 15.0 g Vanillin und 2.50 mL Schwefelsäure (konz.) in 250 mL abs. Ethanol.

Bromkresolgrün-Lösung: 0.04 g Bromkresolgrün in 100 mL abs. Ethanol und tropfenweise Zugabe von 0.1 M wässriger Natriumhydroxid-Lösung (bis Blaufärbung eintritt).

Säulenchromatographie

Präparative Säulenchromatographien wurden mit Kieselgel 60 M der Firma *Macherey-Nagel* (0.040 - 0.063 mm) durchgeführt. Als Eluentengemische dienten *n*-Hexan mit Essigsäureethylester oder Dichlormethan mit Methanol in graduell veränderter Zusammensetzung – stets von geringerer zu höherer Polarität.

Flash-Chromatographien wurden mit dem Gerät CombiFlash® Rf 200 mit RediSep™ Rf-Kartuschen der Firma *Teledyne Isco* durchgeführt.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

HPLC-Messungen wurden mithilfe einer Gerätekombination der Firma *Knauer* durchgeführt (Pumpe: Azura P6.1L, Autosampler: Optimas 800, UV-Detektor: K-2600), wobei bei 220 nm und 254 nm detektiert wurde. Als stationäre Phase wurde eine Umkehrphasen-Trennsäule (SN: FK36) der Firma *Knauer* genutzt. Als mobile Phase diente ein Gemisch aus Wasser und Acetonitril (*gradient grade*), welches mit 0.1 % Trifluoressigsäure (TFA) versetzt wurde (Tabelle 20).

Tabelle 20. Laufmittelgradient für HPLC-Messungen.

Zeit [min]	Wasser (+ 0.1 % TFA) [%]	Acetonitril (+ 0.1 % TFA) [%]
0	90	10
0.5	90	10
20	0	100
30	0	100
31	90	10
40	90	10

Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

Sämtliche NMR-Spektren wurden im „Center for Molecular and Structural Analytics an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (CeMSA@HHU)“ von Herrn Aian und Frau Muth an Geräten der Firma *Bruker* aufgenommen:

Bruker Avance III – 300 (¹H: 300 MHz, ¹³C: 75 MHz, ¹⁹F: 282 MHz)

Bruker Avance III – 600 (^1H : 600 MHz, ^{13}C : 151 MHz, ^{19}F : 565 MHz)

Bruker Avance DRX – 500 (^1H : 500 MHz, ^{13}C : 126 MHz, ^{19}F : 471 MHz)

Die Proben wurden in kommerziell erhältlichen, deuterierten Lösungsmitteln (Chloroform- d , DMSO- d_6 , Methanol- d_4) der Firma *Sigma-Aldrich* gelöst und die Prozessierung der Spektren erfolgte mit einer Software der Firma *Mestrelab Research* (Mnova). Die chemischen Verschiebungen δ sind in *parts per million* (ppm) angegeben und stehen in Relation zur Verschiebung des nicht vollständig deuterierten Lösungsmittelsignals (^1H -NMR: Chloroform- d 7.26, DMSO- d_6 2.50, Methanol- d_4 3.31; ^{13}C -NMR: Chloroform- d 77.16, DMSO- d_6 39.52, Methanol- d_4 49.00). Für die Bezeichnung von Multiplizitäten wurden gängige Abkürzungen verwendet: s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quartett), quin. (Quintett), hept. (Heptett), m (Multipllett) und br s (breites Singulett).

Schmelzpunkte

Zur Bestimmung der Schmelzpunkte wurde ein Gerät der Firma *Büchi* benutzt (Schmelzpunkt M-565). Die gemessenen Schmelzpunkte sind nicht korrigiert und wurden bei Normaldruck bestimmt.

Massenspektrometrie (MS)

Sämtliche Massenspektren wurden im „Center for Molecular and Structural Analytics an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (CeMSA@HHU)“ von Herrn Tommes und Herrn Bürgel an einem Gerät der Firma *Bruker* (UHR-QTOF maXis 4G) aufgenommen.

Mikrowellenreaktionen

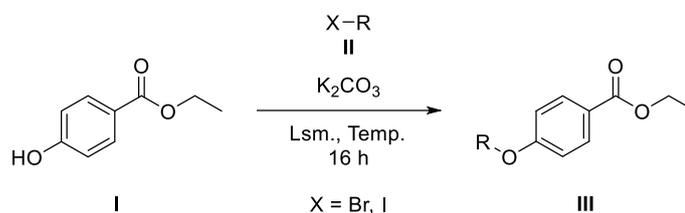
Ein Mikrowellenreaktor der Firma *CEM GmbH* wurde für die Durchführung von Mikrowellenreaktionen genutzt. Ein dickwandiges Mikrowellenrohr mit Schnappdeckelverschluss wurde dazu als Reaktionsgefäß verwendet.

Elementaranalyse

Elementaranalysen wurden im Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf von Frau Zerta an einem Gerät der Firma *PerkinElmer* (Perkin Elmer II Analyzer 2400) durchgeführt.

5.2 Allgemeine Synthesevorschriften (ASV)

5.2.1 ASV1 – Alkylierung von Ethyl-4-hydroxybenzoat (WILLIAMSON-Synthese)



Methode A

Die Alkylierung von Ethyl-4-hydroxybenzoat (I) nach Methode A (WILLIAMSON-Synthese) erfolgte in Anlehnung an die Vorschrift von KIPPELEN & MARDER *et al.*²⁷⁶

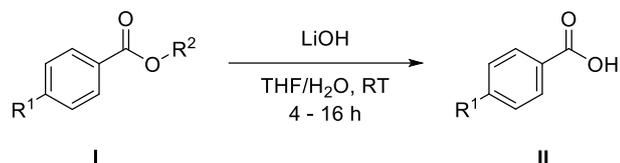
1.00 Äq. Ethyl-4-hydroxybenzoat (I) und 3.00 Äq. Kaliumcarbonat wurden bei Raumtemperatur in *N,N*-Dimethylformamid suspendiert. Nach Zugabe von 1.30 Äq. des Alkylhalogenids II wurde auf 80 °C erhitzt und für 16 h gerührt. Nach vollständigem Umsatz (DC) wurde die Suspension mit entmineralisiertem Wasser verdünnt und dreimal mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit dem Eluentengemisch *n*-Hexan/Essigsäureethylester gereinigt.

Methode B

Die Alkylierung von Ethyl-4-hydroxybenzoat (I) nach Methode B (WILLIAMSON-Synthese unter FINKELSTEIN-Bedingungen) erfolgte in Anlehnung an die Vorschrift von RAMPA *et al.*²⁷⁷

1.00 Äq. Ethyl-4-hydroxybenzoat (I), 0.100 Äq. Kaliumiodid und 3.00 Äq. Kaliumcarbonat wurden bei Raumtemperatur in Aceton suspendiert. Nach Zugabe von 1.30 Äq. des Alkylhalogenids II wurde zum Reflux erhitzt und für 8 h gerührt. Nach vollständigem Umsatz (DC) wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in entmineralisiertem Wasser aufgenommen und dreimal mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde erneut unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit dem Eluentengemisch *n*-Hexan/Essigsäureethylester gereinigt.

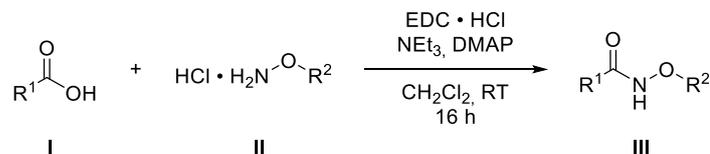
5.2.2 ASV2 – Alkalische Hydrolyse von Carbonsäureestern



Die alkalische Hydrolyse von Carbonsäureestern erfolgte in Anlehnung an die Vorschrift von KLEIN *et al.*²⁷⁸

1.00 Äq. des Carbonsäureesters I wurden bei Raumtemperatur in Tetrahydrofuran/Wasser (2:1) gelöst. Nach Zugabe von 5.00 Äq. Lithiumhydroxid wurde für 4 – 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem Umsatz (DC) wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck größtenteils entfernt. Das Rohprodukt wurde in entmineralisiertem Wasser aufgenommen, mit 1 M Salzsäure (pH 1) gefällt und anschließend abfiltriert. Der entstandene Feststoff wurde mehrmals mit entmineralisiertem Wasser gewaschen und unter Hochvakuum getrocknet. Abschließend wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit dem Eluentengemisch *n*-Hexan/Essigsäureethylester gereinigt und aus diesem Gemisch umkristallisiert.

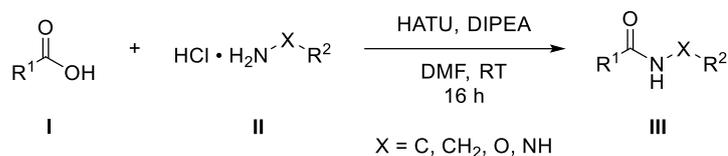
5.2.3 ASV3 – Kupplungsreaktion mit EDC



Kupplungsreaktionen unter Verwendung von EDC als Kupplungsreagenz erfolgten in Anlehnung an die Vorschrift von WEISENBURGER *et al.*²⁷⁹

1.20 Äq. des *N*-Nucleophils II wurden bei Raumtemperatur zusammen mit 1.20 Äq. Triethylamin und 0.100 Äq. *N,N*-Dimethylpyridin-4-amin in abs. Dichlormethan gelöst (0.200 M). Nach 10 min Rühren wurden 1.00 Äq. der Carbonsäure I und 1.20 Äq. 3-(Ethyliminomethylidenamino)-*N,N*-dimethylpropan-1-amin-Hydrochlorid (EDC · HCl) zugegeben und weitere 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem Umsatz (DC) wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in Essigsäureethylester aufgenommen. Der gelöste Rückstand wurde dreimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung, einmal mit Zitronensäure-Lösung (10 %) und einmal mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit dem Eluentengemisch *n*-Hexan/Essigsäureethylester gereinigt und anschließend aus diesem Gemisch umkristallisiert.

5.2.4 ASV4 – Kupplungsreaktion mit HATU



Kupplungsreaktionen unter Verwendung von HATU als Kupplungsreagenz erfolgten in Anlehnung an die Vorschrift von WEISENBURGER *et al.*²⁷⁹

1.00 Äq. der Carbonsäure I wurden bei Raumtemperatur zusammen mit 1.20 Äq. *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HATU) und 3.00 Äq. *N,N*-Diisopropylethylamin in abs. *N,N*-Dimethylformamid (0.200 M) gelöst. Nach 10 min Rühren wurden 1.20 Äq. des *N*-Nucleophils II zugegeben und für weitere 16 h bei Raumtemperatur gerührt.

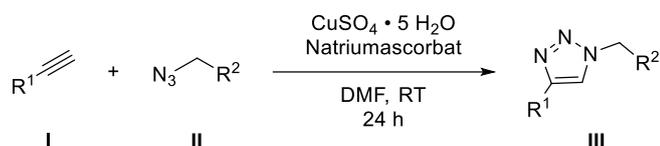
Aufarbeitung A

Der Reaktionsansatz wurde nach vollständigem Umsatz (DC) in das 4-fache Volumen 1 M Salzsäure überführt. Die entstandene Suspension wurde nach fünfminütigem Aufenthalt im Ultraschallbad filtriert und mit entmineralisiertem Wasser sowie *n*-Hexan gewaschen. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit dem Eluentengemisch *n*-Hexan/Essigsäureethylester gereinigt und anschließend aus diesem Gemisch umkristallisiert.

Aufarbeitung B

Das Lösungsmittel wurde nach vollständigem Umsatz (DC) unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in entmineralisiertem Wasser aufgenommen und dreimal mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit dem Eluentengemisch *n*-Hexan/Essigsäureethylester gereinigt und anschließend aus diesem Gemisch umkristallisiert.

5.2.5 ASV5 – Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin 1,3-dipolare Cycloaddition (CuAAC)



Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin 1,3-dipolare Cycloadditionen (CuAAC) erfolgten in Anlehnung an die Vorschriften von HAMILL *et al.*²⁴⁴ bzw. SEO *et al.*²⁴⁵

Method A

In einem Mikroreaktionsgefäß wurden 1.00 Äq. des Alkins I und 1.00 Äq. des Azids II bei Raumtemperatur in abs. *N,N*-Dimethylformamid gelöst. Nach Zugabe von 0.100 Äq. einer Kupfer(II)sulfat-Lösung (0.200 M) sowie 0.200 Äq. einer Natriumascorbat-Lösung (0.200 M) wurde der Reaktionsansatz bei Raumtemperatur für 24 h unter Schutzgasatmosphäre und Lichtausschluss gerührt.

Der Reaktionsansatz wurde nach vollständigem Umsatz (DC) mit dem dreifachen Volumen Dichlormethan verdünnt und anschließend dreimal mit Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz-Lösung (0.300 M, pH 8) gewaschen. Die organische Phase wurde abschließend mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das Rohprodukt III ohne weitere Reinigungsschritte verwendet.

Method B

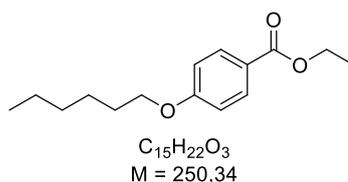
In einem Mikroreaktionsgefäß wurden 1.00 Äq. des Alkins I und 1.00 Äq. des Azids II bei Raumtemperatur in abs. *N,N*-Dimethylformamid gelöst. Nach Zugabe von 1.10 Äq. einer Kupfer(II)sulfat-Lösung (0.200 M) sowie 0.200 Äq. einer Natriumascorbat-Lösung (0.200 M) wurde der Reaktionsansatz bei Raumtemperatur für 24 h unter Schutzgasatmosphäre und Lichtausschluss inkubiert.

Der Reaktionsansatz wurde nach vollständigem Umsatz (DC) mit dem dreifachen Volumen Dichlormethan verdünnt und anschließend dreimal mit einer gesättigten Ammoniumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde abschließend mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das Rohprodukt III ohne weitere Reinigungsschritte verwendet.

5.3 Synthesevorschriften

5.3.1 Carbonsäureester

Ethyl-4-(hexyloxy)benzoat (**31b**)

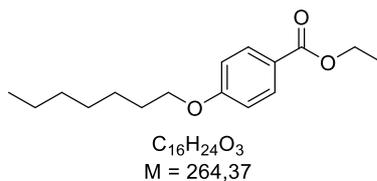


Die Synthese erfolgte gemäß **ASV1-B** und das Produkt **31b** konnte als farbloses Öl (2.46 g, 9.82 mmol, 66 %) erhalten werden. Die spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen überein.¹⁸⁰

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.92 – 7.85 (m, 2H), 7.05 – 6.98 (m, 2H), 4.26 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.03 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 1.72 (dq, *J* = 6.6, 8.1 Hz, 2H), 1.39 (q, *J* = 6.2, 7.0 Hz, 2H), 1.30 (ddt, *J* = 2.1, 5.8, 7.2 Hz, 7H), 0.92 – 0.81 (m, 3H)

HPLC t_R = 19.11 min, Area (AUC) = 99.6 %

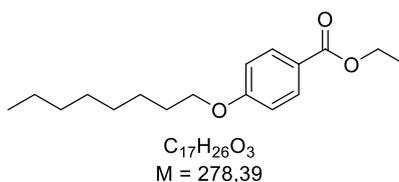
Ethyl-4-(heptyloxy)benzoat (**31c**)



Die Synthese erfolgte gemäß **ASV1-B** und das Produkt **31c** konnte als farbloses Öl (2.57 g, 9.73 mmol, 65 %) erhalten werden. Die spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen überein.¹⁸⁰

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.89 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.02 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 4.27 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.03 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 1.78 – 1.66 (m, 2H), 1.46 – 1.22 (m, 11H), 0.90 – 0.82 (m, 3H)

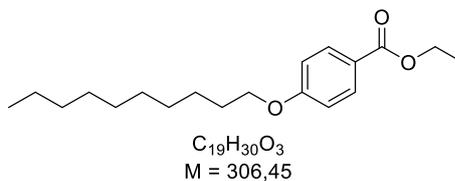
HPLC t_R = 20.15 min, Area (AUC) = 99.0 %

Ethyl-4-(octyloxy)benzoat (31d)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV1-B** und das Produkt **31d** konnte als farbloses Öl (4.09 g, 14.7 mmol, 98 %) erhalten werden. Die spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen überein.¹⁸⁰

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.89 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.01 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 4.26 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.02 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 1.79 – 1.63 (m, 2H), 1.39 (q, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.34 – 1.21 (m, 11H), 0.89 – 0.81 (m, 3H)

HPLC t_R = 21.07 min, Area (AUC) = 99.5 %

Ethyl-4-(decyloxy)benzoat (31e)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV1-B** und das Produkt **31e** konnte als farbloses Öl (4.32 g, 14.1 mmol, 94 %) erhalten werden. Die spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen überein.¹⁸¹

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.95 – 7.82 (m, 2H), 7.01 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 4.26 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.03 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 1.71 (p, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.28 (dd, *J* = 8.1, 15.3 Hz, 17H), 0.90 – 0.79 (m, 3H)

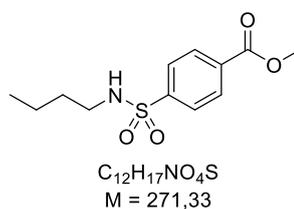
HPLC t_R = 22.46 min, Area (AUC) ≥ 99.9 %

Ethyl-4-(pentylamino)benzoat (**97**)

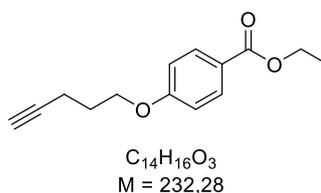
Die Synthese erfolgte nach Vorschrift von CHEN *et al.*²⁸⁰ und das Produkt **97** konnte als weißer Feststoff (0.781 g, 3.32 mmol, 66 %) erhalten werden. Die spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen überein.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 7.67 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.56 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.47 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H), 4.19 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.04 (td, $J = 7.0, 5.4$ Hz, 2H), 1.61 – 1.47 (m, 2H), 1.32 (td, $J = 4.0, 2.2$ Hz, 4H), 1.26 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 0.93 – 0.83 (m, 3H)

HPLC $t_R = 6.08$ min, Area (AUC) = 99.4 %

Methyl-4-(*N*-butylsulfamoyl)benzoat (**35**)

Die Synthese erfolgte in Anlehnung an die Vorschrift von XU *et al.*¹⁸⁹ und das Rohprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt gemäß **ASV2** eingesetzt.

Ethyl-4-(pent-4-yn-1-yloxy)benzoat (**37k**)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV1-A** und das Rohprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt gemäß **ASV2** eingesetzt.

Ethyl-4-(hex-5-yn-1-yloxy)benzoat (37l)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV1-A** und das Produkt **37l** konnte als farbloses Öl (1.10 g, 4.47 mmol, 89 %) erhalten werden. Die spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen überein.¹⁹⁰

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 7.94 – 7.85 (m, 2H), 7.09 – 6.94 (m, 2H), 4.26 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 4.06 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.78 (t, $J = 2.6$ Hz, 1H), 2.23 (td, $J = 7.0, 2.7$ Hz, 2H), 1.82 (dq, $J = 8.6, 6.5$ Hz, 2H), 1.68 – 1.52 (m, 2H), 1.30 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H)

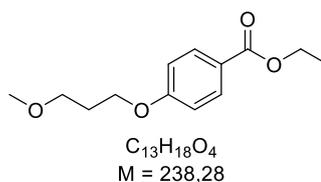
HPLC $t_R = 15.57$ min, Area (AUC) ≥ 99.9 %

Ethyl-4-(4-cyanobutoxy)benzoat (37m)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV1-A** und das Produkt **37m** konnte als gelber Feststoff (1.01 g, 4.09 mmol, 82 %) erhalten werden. Die spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen überein.²⁸¹

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 7.94 – 7.86 (m, 2H), 7.08 – 7.00 (m, 2H), 4.27 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 4.09 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H), 2.58 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 1.88 – 1.68 (m, 4H), 1.30 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H)

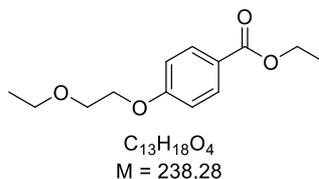
HPLC $t_R = 13.08$ min, Area (AUC) ≥ 99.9 %

Ethyl-4-(3-methoxypropoxy)benzoat (37n)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV1-B** und das Produkt **37n** konnte als farbloses Öl (1.59 g, 6.66 mmol, 95 %) erhalten werden. Die spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen überein.²⁸²

¹H-NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.98 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.91 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 4.34 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.11 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 3.56 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 3.36 (s, 3H), 2.06 (p, *J* = 6.2 Hz, 2H), 1.38 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H)

HPLC t_R = 14.51 min, Area (AUC) = 99 %

Ethyl-4-(2-ethoxyethoxy)benzoat (37o)

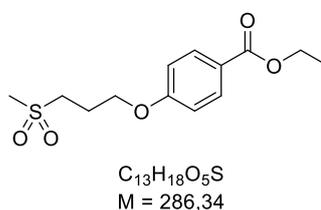
Die Synthese erfolgte gemäß **ASV1-B** und das Produkt **37o** konnte als farbloses Öl (1.32 g, 5.54 mmol, 79 %) erhalten werden. Die spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen überein.²⁸³

¹H-NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.09 – 7.82 (m, 2H), 7.05 – 6.77 (m, 2H), 4.34 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.22 – 4.15 (m, 2H), 3.84 – 3.76 (m, 2H), 3.61 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.38 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.25 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H)

HPLC t_R = 14.17 min, Area (AUC) = 99 %

Ethyl-4-[(5,5,5-trifluoropentyl)oxy]benzoat (37p)

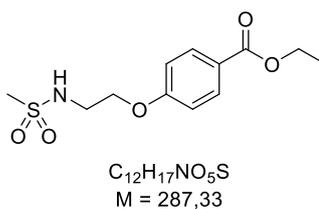
Die Synthese erfolgte gemäß **ASV1-A** und das Rohprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt gemäß **ASV2** eingesetzt.

Ethyl-4-[3-(methylsulfonyl)propoxy]benzoat (37q)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV1-B** und das Produkt **37q** konnte als farbloses Öl (0.150 g, 0.524 mmol, 39 %) erhalten werden. Die spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen überein.²⁸²

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.98 – 7.86 (m, 2H), 7.10 – 7.00 (m, 2H), 4.27 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 4.17 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 3.31 – 3.23 (m, 2H), 3.02 (s, 3H), 2.24 – 2.09 (m, 2H), 1.30 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H)

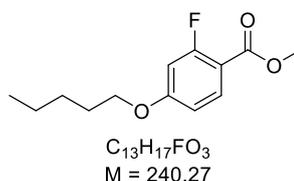
HPLC $t_R = 11.09$ min, Area (AUC) ≥ 99.9 %

Ethyl-4-[2-(methylsulfonamido)ethoxy]benzoat (37r)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV1-A** und das Produkt **37r** konnte als farbloses Öl (0.342 g, 1.19 mmol, 62 %) erhalten werden. Die spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen überein.²⁸⁴

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.96 – 7.88 (m, 2H), 7.31 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 7.14 – 6.99 (m, 2H), 4.27 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.11 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H), 3.36 (q, *J* = 5.6 Hz, 2H), 2.95 (s, 3H), 1.30 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H)

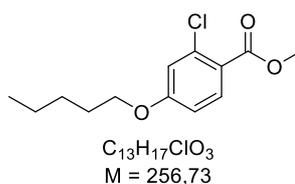
HPLC t_R = 10.53 min, Area (AUC) \geq 99.9 %

Methyl-2-fluoro-4-(pentyloxy)benzoat (43a)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV1-A** und das Rohprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt gemäß **ASV2** eingesetzt.

Methyl-3-fluoro-4-(pentyloxy)benzoat (44a)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV1-A** und das Rohprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt gemäß **ASV2** eingesetzt.

Methyl-2-chloro-4-(pentyloxy)benzoat (43b)

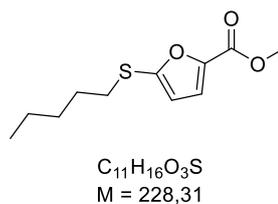
Die Synthese erfolgte gemäß **ASV1-A** und das Rohprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt gemäß **ASV2** eingesetzt.

Methyl-3-chloro-4-(pentyloxy)benzoat (44b)

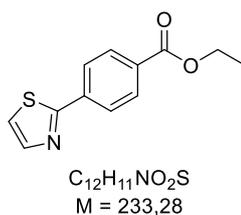
Die Synthese erfolgte gemäß **ASV1-A** und das Rohprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt gemäß **ASV2** eingesetzt.

Methyl-2-[4-(pentyloxy)phenyl]acetat (98)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV1-B** und das Rohprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt gemäß **ASV2** eingesetzt.

Methyl-5-(pentylthio)furan-2-carboxylat (99)

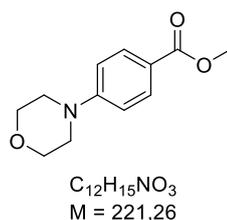
Die Synthese erfolgte in Anlehnung an die Vorschrift von ZENG *et al.*²⁰⁴ und das Rohprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt gemäß **ASV2** eingesetzt.

Ethyl-4-(thiazol-2-yl)benzoat (100)

Die Synthese erfolgte in Anlehnung an die Vorschrift von LU *et al.*²⁸⁵ und das Produkt **100** konnte als gelber Feststoff (0.192 g, 0.877 mmol, 71 %) erhalten werden. Die spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen überein.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.14 – 8.03 (m, 4H), 8.01 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 7.91 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 4.34 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.34 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H)

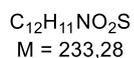
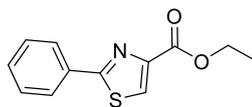
HPLC t_R = 14.50 min, Area (AUC) = 93.2 %

Methyl-4-(morpholino)benzoat (101)

Die Synthese erfolgte nach Vorschrift von QIAO *et al.*²⁰⁸ und das Produkt **101** konnte als weißer Feststoff (0.789 g, 3.57 mmol, 12 %) erhalten werden. Die spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen überein.

¹H-NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) 7.95 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.90 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 3.91 – 3.84 (m, 7H), 3.32 – 3.27 (m, 4H)

HPLC t_R = 10.43 min, Area (AUC) = 96 %

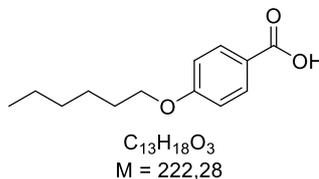
Ethyl-2-(phenylthiazol)-4-carboxylat (102)

Die Synthese erfolgte nach Vorschrift von YANG *et al.*²⁸⁶ und das Produkt **102** konnte als farbloses Öl (0.576 g, 2.47 mmol, 49 %) erhalten werden. Die spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen überein.

¹H-NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) 8.16 (s, 1H), 8.05 – 7.97 (m, 2H), 7.49 – 7.42 (m, 3H), 4.45 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 1.43 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H)

HPLC $t_R = 13.13$ min, Area (AUC) = 99.8 %

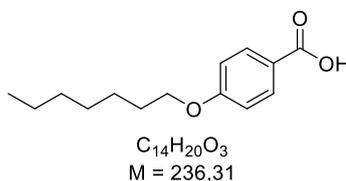
5.3.2 Carbonsäuren

4-(Hexyloxy)benzoesäure (**27b**)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV2** und das Produkt **27b** konnte als weißer Feststoff (0.565 g, 2.54 mmol, 32 %) erhalten werden. Die spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen überein.¹⁸⁰

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.59 (s, 1H), 7.96 – 7.76 (m, 2H), 7.08 – 6.90 (m, 2H), 4.03 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 1.71 (dt, *J* = 6.5, 8.1 Hz, 2H), 1.47 – 1.22 (m, 6H), 0.94 – 0.78 (m, 3H)

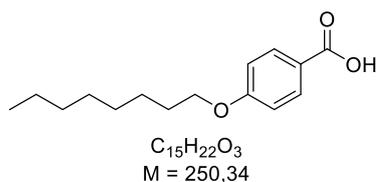
HPLC t_R = 15.49 min, Area (AUC) \geq 99.9 %

4-(Heptyloxy)benzoesäure (**27c**)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV2** und das Produkt **27c** konnte als weißer Feststoff (1.7 g, 7.19 mmol, 95 %) erhalten werden. Die spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen überein.¹⁸⁰

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.93 – 7.80 (m, 2H), 7.05 – 6.93 (m, 2H), 4.02 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 1.79 – 1.64 (m, 2H), 1.48 – 1.19 (m, 8H), 0.94 – 0.79 (m, 3H)

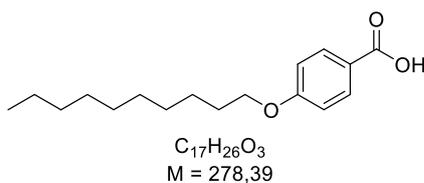
HPLC t_R = 16.32 min, Area (AUC) \geq 99.9 %

4-(Octyloxy)benzoesäure (27d)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV2** und das Produkt **27d** konnte als weißer Feststoff (0.485 g, 1.94 mmol, 27 %) erhalten werden. Die spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen überein.¹⁸⁰

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.58 (s, 1H), 7.89 – 7.85 (m, 2H), 7.02 – 6.97 (m, 2H), 4.03 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 1.75 – 1.68 (m, 2H), 1.44 – 1.37 (m, 2H), 1.34 – 1.22 (m, 8H), 0.88 – 0.83 (m, 3H)

HPLC t_R = 17.52 min, Area (AUC) = 98.4 %

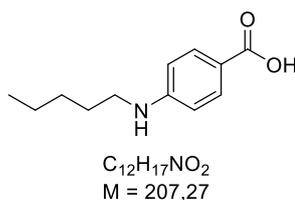
4-(Decyloxy)benzoesäure (27e)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV2** und das Produkt **27e** konnte als weißer Feststoff (3.33 g, 12 mmol, 91 %) erhalten werden. Die spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen überein.¹⁸¹

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.59 (s, 1H), 7.90 – 7.84 (m, 2H), 7.03 – 6.96 (m, 2H), 4.02 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 1.71 (p, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.45 – 1.20 (m, 14H), 0.91 – 0.79 (m, 3H)

HPLC t_R = 19.57 min, Area (AUC) ≥ 99.9 %

4-(Pentylamino)benzoesäure (27f)



Die Synthese erfolgte gemäß **ASV2** und das Produkt **27f** konnte als weißer Feststoff (0.079 g, 0.381 mmol, 76 %) erhalten werden. Die spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen überein.¹⁸⁶

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.94 (s, 1H), 7.65 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.54 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 6.39 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 3.04 (td, *J* = 7.0, 5.4 Hz, 2H), 1.61 – 1.47 (m, 2H), 1.39 – 1.26 (m, 4H), 0.96 – 0.80 (m, 3H)

HPLC t_R = 11.56 min, Area (AUC) = 99.2 %

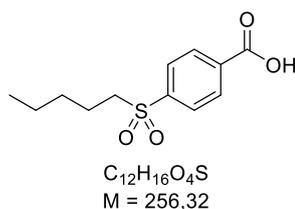
4-(Pentylthio)benzoesäure (27g)



Die Synthese erfolgte nach Vorschrift von ARAKAWA *et al.*¹⁸⁷ und das Produkt **27g** konnte als weißer Feststoff (1.85 g, 8.23 mmol, 82 %) erhalten werden. Die spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen überein.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.83 (s, 1H), 7.88 – 7.79 (m, 2H), 7.41 – 7.31 (m, 2H), 3.08 – 2.97 (m, 2H), 1.70 – 1.53 (m, 2H), 1.46 – 1.21 (m, 4H), 0.86 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H)

HPLC t_R = 14.65 min, Area (AUC) = 98.7 %

4-(Pentylsulfonyl)benzoesäure (**27i**)

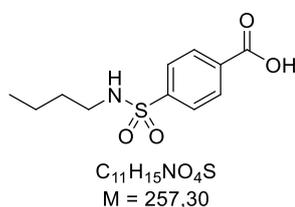
Die Synthese erfolgte in Anlehnung an die Vorschrift von Li *et al.*¹⁸⁸ und das Produkt **27i** konnte als weißer Feststoff (0.562 g, 2.19 mmol, 55 %) erhalten werden.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.56 (s, 1H), 8.22 – 8.12 (m, 2H), 8.01 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 3.39 – 3.34 (m, 2H), 1.60 – 1.46 (m, 2H), 1.36 – 1.14 (m, 4H), 0.85 – 0.74 (m, 3H)

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.14, 142.67, 135.34, 130.19, 128.04, 54.28, 29.52, 21.85, 21.50, 13.59

HPLC $t_R = 11.17$ min, Area (AUC) ≥ 99.9 %

Schmelzpunkt $T_M = 178.2$ °C

4-(*N*-Butylsulfamoyl)benzoesäure (**27j**)

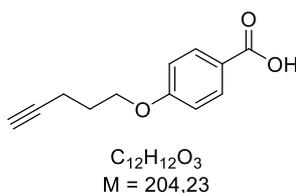
Die Synthese erfolgte gemäß **ASV2** und das Produkt **27j** konnte als weißer Feststoff (0.155 g, 0.602 mmol, 91 %) erhalten werden.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.42 (s, 1H), 8.17 – 8.07 (m, 2H), 7.94 – 7.84 (m, 2H), 7.74 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H), 2.82 – 2.69 (m, 2H), 1.41 – 1.13 (m, 4H), 0.78 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H)

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.26, 144.34, 134.04, 130.10, 126.72, 42.19, 31.06, 19.15, 13.42

HPLC $t_R = 10.16$ min, Area (AUC) ≥ 99.9 %

Schmelzpunkt $T_M = 217.2$ °C

4-(Pent-4-yn-1-yloxy)benzoesäure (**27k**)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV2** und das Produkt **27k** konnte als weißer Feststoff (0.895 g, 4.38 mmol, 97 %) erhalten werden.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.61 (s, 1H), 8.05 – 7.66 (m, 2H), 7.24 – 6.76 (m, 2H), 4.11 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.82 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H), 2.34 (td, *J* = 7.1, 2.7 Hz, 2H), 1.92 (q, *J* = 6.6 Hz, 2H)

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.98, 162.09, 131.37, 123.01, 114.23, 83.54, 71.72, 66.26, 27.57, 14.44

HPLC *t_R* = 11.13 min, Area (AUC) ≥ 99.9 %

Schmelzpunkt *T_M* = 143.0 °C

4-(Hex-5-yn-1-yloxy)benzoesäure (**27l**)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV2** und das Produkt **27l** konnte als weißer Feststoff (0.414 g, 1.9 mmol, 95 %) erhalten werden. Die spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen überein.¹⁹⁰

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.59 (s, 1H), 7.87 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.03 – 6.97 (m, 2H), 4.06 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.78 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H), 2.24 (td, *J* = 2.7, 7.1 Hz, 2H), 1.81 (dq, *J* = 6.5, 8.7 Hz, 2H), 1.64 – 1.56 (m, 2H)

HPLC *t_R* = 11.69 min, Area (AUC) = 99.0 %

4-(4-Cyanobutoxy)benzoesäure (**27m**)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV2** und das Produkt **27m** konnte als weißer Feststoff (0.168 g, 0.768 mmol, 77 %) erhalten werden. Die spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen überein.¹⁹¹

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.60 (s, 1H), 7.91 – 7.84 (m, 2H), 7.04 – 6.97 (m, 2H), 4.08 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 2.58 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 1.82 (dq, $J = 6.4, 8.6$ Hz, 2H), 1.72 (dq, $J = 7.1, 9.6$ Hz, 2H)

HPLC $t_R = 9.14$ min, Area (AUC) = 96.1 %

4-(3-Methoxypropoxy)benzoesäure (**27n**)

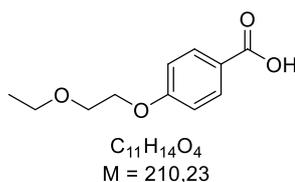
Die Synthese erfolgte gemäß **ASV2** und das Produkt **27n** konnte als weißer Feststoff (1.3 g, 6.18 mmol, 98 %) erhalten werden.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.60 (s, 1H), 7.87 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 7.00 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 4.08 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.47 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 3.24 (s, 3H), 1.96 (p, $J = 6.4$ Hz, 2H)

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.99, 162.18, 131.36, 122.90, 114.21, 68.36, 64.92, 57.96, 28.81

HPLC $t_R = 9.45$ min, Area (AUC) = 99.0 %

Schmelzpunkt $T_M = 114.8$ °C

4-(2-Ethoxyethoxy)benzoesäure (**27o**)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV2** und das Produkt **27o** konnte als weißer Feststoff (1.06 g, 5.06 mmol, 93 %) erhalten werden.

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.61 (s, 1H), 7.94 – 7.79 (m, 2H), 7.08 – 6.95 (m, 2H), 4.21 – 4.10 (m, 2H), 3.75 – 3.65 (m, 2H), 3.50 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H), 1.12 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H)

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 166.98, 162.11, 131.33, 122.99, 114.26, 68.16, 67.47, 65.71, 15.08

HPLC $t_R = 9.27$ min, Area (AUC) = 99.0 %

Schmelzpunkt $T_M = 130.7$ °C

4-[(5,5,5-Trifluoropentyl)oxy]benzoesäure (**27p**)

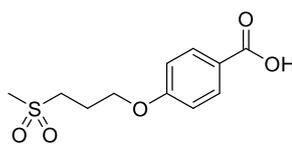
Die Synthese erfolgte gemäß **ASV2** und das Produkt **27p** konnte als weißer Feststoff (0.306 g, 1.17 mmol, 84 %) erhalten werden.

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.61 (s, 1H), 7.98 – 7.77 (m, 2H), 7.11 – 6.88 (m, 2H), 4.07 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 2.44 – 2.20 (m, 2H), 1.90 – 1.73 (m, 2H), 1.72 – 1.56 (m, 2H)

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 166.99, 162.15, 131.34, 127.70 (d, $J = 276.5$ Hz), 122.93, 114.23, 67.16, 32.11 (d, $J = 27.3$ Hz), 27.41, 18.25

HPLC $t_R = 12.93$ min, Area (AUC) = 95.2 %

Schmelzpunkt $T_M = 127.5$ °C

4-[3-(Methylsulfonyl)propoxy]benzoesäure (**27q**)

$C_{11}H_{14}O_5S$
 $M = 258,29$

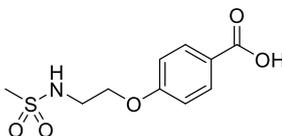
Die Synthese erfolgte gemäß **ASV2** und das Produkt **27q** konnte als weißer Feststoff (0.126 g, 0.486 mmol, 93 %) erhalten werden.

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.64 (s, 1H), 7.93 – 7.85 (m, 2H), 7.08 – 6.97 (m, 2H), 4.16 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 3.29 (dd, $J = 6.2, 4.0$ Hz, 2H), 3.02 (s, 3H), 2.24 – 2.09 (m, 2H)

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 168.98, 163.79, 132.86, 124.53, 115.40, 67.22, 52.05, 40.94, 23.53

HPLC $t_R = 6.89$ min, Area (AUC) ≥ 99.9 %

Schmelzpunkt $T_M = 223.5$ °C

4-[2-(Methylsulfonamido)ethoxy]benzoesäure (**27r**)

$C_{10}H_{13}NO_5S$
 $M = 259,28$

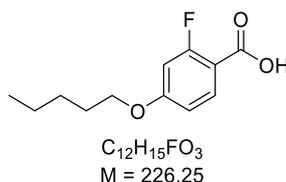
Die Synthese erfolgte gemäß **ASV2** und das Produkt **27r** konnte als weißer Feststoff (0.250 g, 0.966 mmol, 81 %) erhalten werden.

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.63 (s, 1H), 7.95 – 7.84 (m, 2H), 7.31 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H), 7.08 – 6.98 (m, 2H), 4.10 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H), 3.35 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H), 2.95 (s, 3H)

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 166.95, 161.83, 131.38, 123.20, 114.30, 67.20, 41.74, 39.94

HPLC $t_R = 6.45$ min, Area (AUC) ≥ 99.9 %

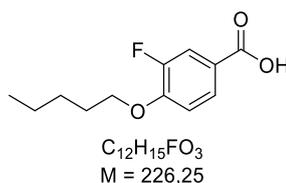
Schmelzpunkt $T_M = 194.4$ °C

2-Fluoro-4-(pentyloxy)benzoesäure (27s)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV2** und das Produkt **27s** konnte als weißer Feststoff (0.966 g, 4.27 mmol, 93 %) erhalten werden. Die spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen überein.¹⁹³

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.84 (s, 1H), 7.80 (t, $J = 9.0$ Hz, 1H), 6.96 – 6.75 (m, 2H), 4.04 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 1.71 (td, $J = 9.2, 8.1, 5.6$ Hz, 2H), 1.48 – 1.24 (m, 4H), 0.96 – 0.83 (m, 3H)

HPLC $t_R = 14.22$ min, Area (AUC) ≥ 99.9 %

3-Fluoro-4-(pentyloxy)benzoesäure (27t)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV2** und das Produkt **27t** konnte als weißer Feststoff (0.813 g, 3.59 mmol, 80 %) erhalten werden. Die spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen überein.¹⁹⁴

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.91 (s, 1H), 7.74 (ddd, $J = 8.5, 2.1, 1.1$ Hz, 1H), 7.65 (dd, $J = 11.9, 2.1$ Hz, 1H), 7.25 (t, $J = 8.6$ Hz, 1H), 4.11 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 1.85 – 1.66 (m, 2H), 1.50 – 1.24 (m, 4H), 0.97 – 0.81 (m, 3H)

HPLC $t_R = 14.19$ min, Area (AUC) = 98.2 %

2-[4-(Pentyloxy)phenyl]essigsäure (**27u**)

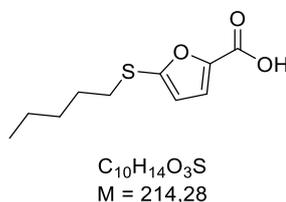
Die Synthese erfolgte gemäß **ASV2** und das Produkt **27u** konnte als weißer Feststoff (1.48 g, 6.67 mmol, 91 %) erhalten werden.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.21 (s, 1H), 7.20 – 7.09 (m, 2H), 6.90 – 6.79 (m, 2H), 3.92 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 3.47 (s, 2H), 1.69 (dq, $J = 8.5, 6.7$ Hz, 2H), 1.47 – 1.24 (m, 4H), 0.96 – 0.84 (m, 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, DMSO- d_6) δ 172.99, 157.44, 130.33, 126.78, 114.17, 67.33, 40.36, 28.39, 27.73, 21.89, 13.92

HPLC $t_R = 14.02$ min, Area (AUC) ≥ 99.9 %

Schmelzpunkt $T_M = 85.1$ °C

5-(Pentylthio)furan-2-carbonsäure (**27v**)

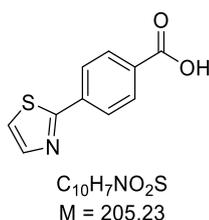
Die Synthese erfolgte gemäß **ASV2** und das Produkt **27v** konnte als gelber Feststoff (0.135 g, 0.629 mmol, 72 %) erhalten werden.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 13.06 (s, 1H), 7.21 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 6.69 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 2.92 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.57 (p, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.38 – 1.22 (m, 4H), 0.85 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6) δ 158.98, 151.57, 146.68, 119.62, 115.78, 34.36, 30.22, 29.16, 21.87, 14.08

HPLC $t_R = 13.75$ min, Area (AUC) ≥ 99.9 %

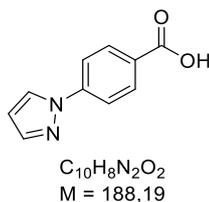
Schmelzpunkt $T_M = 83.7$ °C

4-(Thiazol-2-yl)benzoesäure (**27aa**)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV2** und das Produkt **27aa** konnte als weißer Feststoff (0.146 g, 0.71 mmol, 86 %) erhalten werden. Die spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen überein.²⁰⁹

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.15 (s, 1H), 8.12 – 8.02 (m, 4H), 8.01 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 7.90 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H)

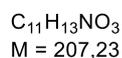
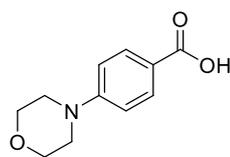
HPLC t_R = 9.05 min, Area (AUC) ≥ 99.9 %

4-(1H-Pyrazol-1-yl)benzoesäure (**27ab**)

Die Synthese erfolgte nach Vorschrift von IOANNIDIS *et al.*²¹⁰ und das Produkt **27ab** konnte über zwei Stufen als weißer Feststoff (1 g, 5.31 mmol, 66 %) erhalten werden. Die spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen überein.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.01 (s, 1H), 8.62 (dd, *J* = 2.6, 0.6 Hz, 1H), 8.08 – 8.02 (m, 2H), 8.01 – 7.95 (m, 2H), 7.81 (dd, *J* = 1.7, 0.5 Hz, 1H), 6.60 (dd, *J* = 2.6, 1.7 Hz, 1H)

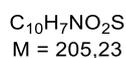
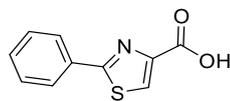
HPLC t_R = 8.04 min, Area (AUC) ≥ 99.9 %

4-(Morpholino)benzoesäure (**27ad**)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV2** und das Produkt **27ad** konnte als weißer Feststoff (0.556 g, 2.68 mmol, 79 %) erhalten werden. Die spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen überein.²⁰⁸

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.48 (s, 1H), 7.78 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.96 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 3.73 (t, *J* = 4.8 Hz, 4H), 3.24 (t, *J* = 4.9 Hz, 4H)

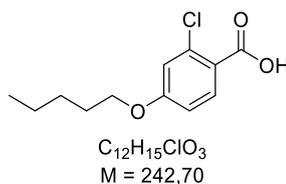
HPLC $t_R = 7.23$ min, Area (AUC) ≥ 99.9 %

2-Phenylthiazol-4-carbonsäure (**27ag**)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV2** und das Produkt **27ag** konnte als weißer Feststoff (0.454 g, 2.21 mmol, 90 %) erhalten werden. Die spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen überein.²¹¹

¹H-NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.29 (s, 1H), 8.04 – 7.94 (m, 2H), 7.53 – 7.44 (m, 3H)

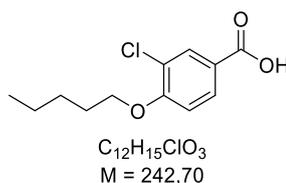
HPLC $t_R = 9.20$ min, Area (AUC) ≥ 99.9 %

2-Chloro-4-(pentyloxy)benzoesäure (69a)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV2** und das Produkt **69a** konnte als weißer Feststoff (0.894 g, 3.68 mmol, 78 %) erhalten werden. Die spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen überein.²⁸⁷

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.97 (s, 1H), 7.82 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.07 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 6.97 (dd, $J = 8.8, 2.5$ Hz, 1H), 4.04 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 1.83 – 1.59 (m, 2H), 1.47 – 1.24 (m, 4H), 0.97 – 0.81 (m, 3H)

HPLC $t_R = 15.11$ min, Area (AUC) = 97.9 %

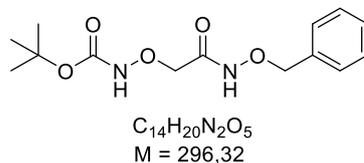
3-Chloro-4-(pentyloxy)benzoesäure (69b)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV2** und das Produkt **69b** konnte als weißer Feststoff (0.869 g, 3.58 mmol, 74 %) erhalten werden. Die spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen überein.²⁸⁸

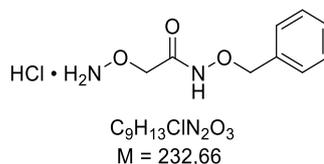
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.93 (s, 1H), 8.04 – 7.69 (m, 2H), 7.23 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 4.13 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 1.86 – 1.66 (m, 2H), 1.51 – 1.25 (m, 4H), 0.89 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H)

HPLC $t_R = 15.29$ min, Area (AUC) ≥ 99.9 %

5.3.3 KSK-Analoga: Region A

tert-Butyl-[2-((benzyloxy)amino)-2-oxoethoxy]carbammat (**26**)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV3** mit *O*-Benzylhydroxylamin (**62a**) als *N*-Nucleophil und das Rohprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt eingesetzt.

2-(Aminooxy)-*N*-(benzyloxy)acetamid-Hydrochlorid (**13**) – Schlüsselintermediat I

1.00 Äq. des geschützten Hydroxylamins **26** wurden in Dioxan gelöst (0.2 M). Zu dieser Lösung wurden 4.00 Äq. einer Lösung von Chlorwasserstoff in Dioxan (4 M) zugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert, mehrmals mit Diethylether gewaschen und unter Hochvakuum getrocknet. Das Produkt **13** konnte als weißer Feststoff (4.58 g, 19.9 mmol, 85 %) erhalten werden.

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.05 – 10.15 (m, 4H), 7.55 – 7.22 (m, 5H), 4.84 (s, 2H), 4.47 (s, 2H)

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 163.91, 133.71, 129.23, 128.79, 128.36, 77.16, 75.67

HPLC $t_R = 5.06$ min, Area (AUC) ≥ 99.9 %

Schmelzpunkt $T_M = 183.8$ °C

5.3.3.1 Variation der Kettenlänge

N-[2-((Benzyloxy)amino)-2-oxoethoxy]-4-butoxybenzamid (**28a**)

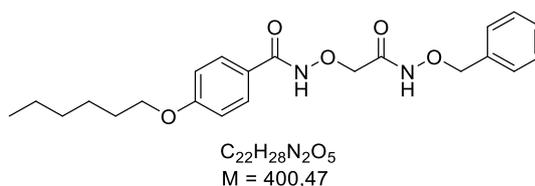
Die Synthese erfolgte gemäß **ASV3** mit Schlüsselintermediat **I (13)** als *N*-Nucleophil und das Produkt **28a** konnte als weißer Feststoff (0.228 g, 0.612 mmol, 61 %) erhalten werden.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.93 (s, 1H), 11.51 (s, 1H), 7.78 – 7.65 (m, 2H), 7.49 – 7.25 (m, 5H), 7.08 – 6.89 (m, 2H), 4.84 (s, 2H), 4.35 (s, 2H), 4.02 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 1.70 (dq, *J* = 8.3, 6.6 Hz, 2H), 1.52 – 1.34 (m, 2H), 0.93 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H)

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.11, 164.84, 161.53, 135.72, 129.12, 128.83, 128.30, 114.19, 77.02, 73.32, 67.43, 30.58, 18.66, 13.66

HPLC $t_R = 13.45$ min, Area (AUC) = 98.8 %

Schmelzpunkt $T_M = 138.5$ °C

N-[2-((Benzyloxy)amino)-2-oxoethoxy]-4-(hexyloxy)benzamid (**28b**)

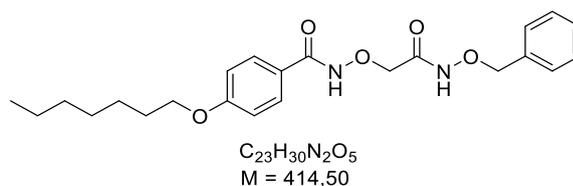
Die Synthese erfolgte gemäß **ASV3** mit Schlüsselintermediat **I (13)** als *N*-Nucleophil und das Produkt **28b** konnte als weißer Feststoff (0.092 g, 0.228 mmol, 46 %) erhalten werden.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.93 (s, 1H), 11.51 (s, 1H), 7.72 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.46 – 7.28 (m, 5H), 6.99 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 4.84 (s, 2H), 4.35 (s, 2H), 4.02 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 1.71 (p, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.48 – 1.19 (m, 6H), 0.95 – 0.78 (m, 3H)

¹³C-NMR (75 MHz, Chloroform-*d*) δ 168.24, 166.32, 163.06, 135.15, 129.42, 129.21, 128.74, 128.57, 121.95, 114.65, 78.38, 75.65, 68.44, 31.66, 29.17, 25.77, 22.70, 14.14

HPLC $t_R = 15.46$ min, Area (AUC) = 96.1 %

Schmelzpunkt $T_M = 129.1$ °C

N-[2-((Benzyloxy)amino)-2-oxoethoxy]-4-(heptyloxy)benzamid (**28c**)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV3** mit Schlüsselintermediat **I (13)** als *N*-Nucleophil und das Produkt **28c** konnte als weißer Feststoff (0.101 g, 0.244 mmol, 49 %) erhalten werden.

¹H-NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 11.42 (s, 1H), 9.43 (s, 1H), 7.70 – 7.62 (m, 2H), 7.35 (ddd, $J = 2.0, 5.9, 33.2$ Hz, 5H), 6.93 – 6.86 (m, 2H), 4.95 (s, 2H), 4.48 (s, 2H), 3.98 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 1.78 (dt, $J = 6.5, 8.0$ Hz, 2H), 1.51 – 1.24 (m, 8H), 0.95 – 0.84 (m, 3H)

¹³C-NMR (75 MHz, Chloroform-*d*) δ 168.23, 166.34, 163.06, 135.12, 129.43, 129.21, 128.75, 128.57, 121.90, 114.64, 78.38, 75.62, 68.43, 31.88, 29.20, 29.15, 26.05, 22.72, 14.21

HPLC $t_R = 17.29$ min, Area (AUC) = 97.9 %

Schmelzpunkt $T_M = 134.3$ °C

N-[2-((Benzyloxy)amino)-2-oxoethoxy]-4-(octyloxy)benzamid (**28d**)

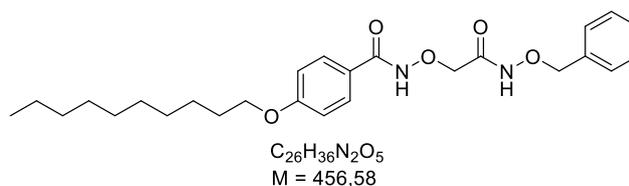
Die Synthese erfolgte gemäß **ASV3** mit Schlüsselintermediat **I (13)** als *N*-Nucleophil und das Produkt **28d** konnte als weißer Feststoff (0.040 g, 0.093 mmol, 19 %) erhalten werden.

¹H-NMR (600 MHz, Chloroform-*d*) δ 11.53 (s, 1H), 9.91 (s, 1H), 7.70 – 7.64 (m, 2H), 7.42 – 7.37 (m, 2H), 7.33 – 7.23 (m, 3H), 6.90 – 6.84 (m, 2H), 4.93 (s, 2H), 4.46 (s, 2H), 3.96 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 1.81 – 1.74 (m, 2H), 1.48 – 1.41 (m, 2H), 1.37 – 1.24 (m, 8H), 0.89 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H)

¹³C-NMR (75 MHz, Chloroform-*d*) δ 170.94, 165.87, 163.19, 129.38, 129.24, 128.74, 128.60, 121.84, 114.76, 78.40, 75.22, 68.33, 31.93, 29.45, 29.35, 29.21, 26.11, 22.79, 14.22

HPLC $t_R = 18.42$ min, Area (AUC) = 97.6 %

Schmelzpunkt $T_M = 132.4$ °C

N-[2-((Benzyloxy)amino)-2-oxoethoxy]-4-(decyloxy)benzamid (**28e**)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV3** mit Schlüsselintermediat **I (13)** als *N*-Nucleophil und das Produkt **28e** konnte als weißer Feststoff (0.120 g, 0.263 mmol, 53 %) erhalten werden.

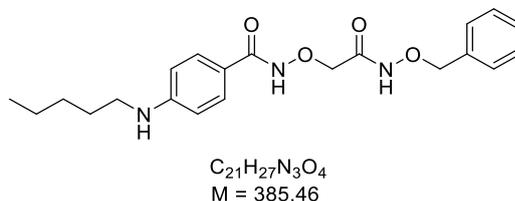
1H -NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 11.34 (s, 1H), 8.85 (s, 1H), 7.64 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.38 (dd, *J* = 36.4, 7.0 Hz, 5H), 6.92 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 4.98 (s, 2H), 4.52 (s, 2H), 4.00 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 1.80 (p, *J* = 6.6 Hz, 2H), 1.27 (s, 14H), 0.96 – 0.82 (m, 3H)

^{13}C -NMR (75 MHz, Chloroform-*d*) δ 168.31, 166.30, 163.09, 135.14, 129.43, 129.22, 128.75, 128.58, 121.86, 114.66, 78.39, 75.53, 68.46, 32.02, 29.68, 29.50, 29.45, 29.21, 26.10, 22.81, 14.25

HPLC t_R = 20.56 min, Area (AUC) = 96.2 %

Schmelzpunkt T_M = 122.4 °C

5.3.3.2 Austausch der Ether-Struktur

N-[2-((Benzyloxy)amino)-2-oxoethoxy]-4-(pentylamino)benzamid (**28f**)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV3** mit Schlüsselintermediat **I (13)** als *N*-Nucleophil und das Produkt **28f** konnte als farbloses Öl (0.056 g, 0.145 mmol, 39 %) erhalten werden.

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11.65 (s, 2H), 7.58 – 7.48 (m, 2H), 7.45 – 7.27 (m, 5H), 6.59 – 6.49 (m, 2H), 6.31 (s, 1H), 4.84 (s, 2H), 4.34 (s, 2H), 3.03 (td, $J = 7.0, 5.5$ Hz, 2H), 1.52 (q, $J = 6.9$ Hz, 2H), 1.40 – 1.21 (m, 4H), 0.96 – 0.79 (m, 3H)

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 166.36, 165.18, 152.39, 135.76, 128.84, 128.30, 116.62, 110.69, 77.02, 42.27, 28.80, 28.18, 21.95, 13.95

HPLC $t_R = 13.26$ min, Area (AUC) = 97.6 %

N-[2-((Benzyloxy)amino)-2-oxoethoxy]-4-(pentylthio)benzamid (**28g**)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV3** mit Schlüsselintermediat **I (13)** als *N*-Nucleophil und das Produkt **28g** konnte als weißer Feststoff (0.078 g, 0.195 mmol, 39 %) erhalten werden.

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.03 (s, 1H), 11.47 (s, 1H), 7.73 – 7.63 (m, 2H), 7.46 – 7.26 (m, 7H), 4.84 (s, 2H), 4.36 (s, 2H), 3.03 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.68 – 1.52 (m, 2H), 1.46 – 1.20 (m, 4H), 0.86 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H)

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 164.69, 135.78, 135.47, 128.81, 128.27, 127.67, 126.26, 76.97, 73.05, 30.82, 30.30, 27.94, 21.62, 13.81

HPLC $t_R = 15.76$ min, Area (AUC) = 97.1 %

Schmelzpunkt $T_M = 111.8$ °C

N-[2-((Benzyloxy)amino)-2-oxoethoxy]-4-hexylbenzamid (**28h**)

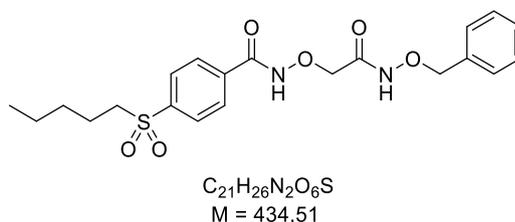
Die Synthese erfolgte gemäß **ASV3** mit Schlüsselintermediat **I (13)** als *N*-Nucleophil und das Produkt **28h** konnte als weißer Feststoff (0.121 g, 0.315 mmol, 63 %) erhalten werden.

1H -NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.99 (s, 1H), 11.48 (s, 1H), 7.74 – 7.60 (m, 2H), 7.45 – 7.22 (m, 7H), 4.84 (s, 2H), 4.36 (s, 2H), 2.62 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 1.56 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.33 – 1.21 (m, 6H), 0.93 – 0.74 (m, 3H)

^{13}C -NMR (75 MHz, Chloroform-*d*) δ 169.64, 166.18, 148.79, 135.00, 129.21, 128.99, 128.76, 128.59, 127.46, 78.40, 75.74, 36.06, 31.76, 31.19, 29.02, 22.70, 14.19

HPLC $t_R = 16.57$ min, Area (AUC) = 97.9 %

Schmelzpunkt $T_M = 91.7$ °C

N-[2-((Benzyloxy)amino)-2-oxoethoxy]-4-(pentylsulfonyl)benzamid (**28i**)

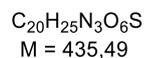
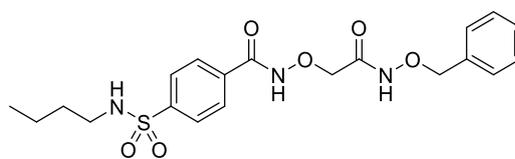
Die Synthese erfolgte gemäß **ASV3** mit Schlüsselintermediat **I (13)** als *N*-Nucleophil und das Produkt **28i** konnte als weißer Feststoff (0.155 g, 0.357 mmol, 36 %) erhalten werden.

1H -NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.31 (s, 1H), 11.41 (s, 1H), 7.99 (d, $J = 1.1$ Hz, 4H), 7.45 – 7.25 (m, 5H), 4.85 (s, 2H), 4.39 (s, 2H), 3.35 (dd, $J = 6.8, 4.5$ Hz, 2H), 1.51 (p, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.35 – 1.13 (m, 4H), 0.85 – 0.74 (m, 3H)

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164.47, 152.70, 141.62, 136.12, 135.75, 128.82, 128.29, 128.12, 127.90, 77.00, 72.75, 54.27, 29.50, 21.90, 21.49, 13.57

HPLC $t_R = 12.22$ min, Area (AUC) ≥ 99.9 %

Schmelzpunkt $T_M = 109.3$ °C

N-[2-((Benzyloxy)amino)-2-oxoethoxy]-4-(*N*-butylsulfamoyl)benzamid (**28j**)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV4-B** mit Schlüsselintermediat **I (13)** als *N*-Nucleophil und das Produkt **28j** konnte als weißer Feststoff (0.076 g, 0.173 mmol, 17 %) erhalten werden.

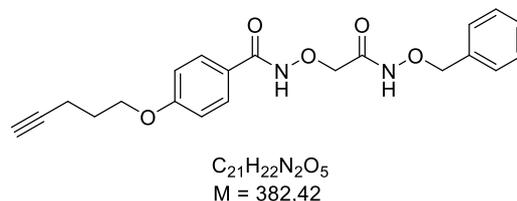
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.27 (s, 1H), 11.41 (s, 1H), 7.90 (q, *J* = 8.5 Hz, 4H), 7.71 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 7.50 – 7.18 (m, 5H), 4.85 (s, 2H), 4.38 (s, 2H), 2.84 – 2.64 (m, 2H), 1.44 – 1.11 (m, 4H), 0.78 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H)

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 191.81, 164.51, 143.43, 135.74, 128.85, 128.30, 126.61, 77.01, 73.02, 42.20, 31.06, 19.17, 13.43

HPLC *t*_R = 11.37 min, Area (AUC) = 98.2 %

Schmelzpunkt *T*_M = 123.2 °C

5.3.3.3 Funktionalisierung der Alkylkette

N-[2-((Benzyloxy)amino)-2-oxoethoxy]-4-(pent-4-yn-1-yloxy)benzamid (**28k**)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV4-B** mit Schlüsselintermediat **I (13)** als *N*-Nucleophil und das Produkt **28k** konnte als weißer Feststoff (0.394 g, 1.03 mmol, 52 %) erhalten werden.

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11.93 (s, 1H), 11.52 (s, 1H), 7.81 – 7.66 (m, 2H), 7.47 – 7.27 (m, 5H), 7.02 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 4.84 (s, 2H), 4.36 (s, 2H), 4.09 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 2.82 (t, $J = 2.6$ Hz, 1H), 2.33 (td, $J = 7.1, 2.7$ Hz, 2H), 1.90 (p, $J = 6.6$ Hz, 2H)

^{13}C -NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 165.23, 161.76, 136.15, 129.47, 129.15, 128.65, 123.93, 114.64, 83.92, 77.43, 73.78, 71.92, 66.69, 27.99, 14.81

HPLC $t_R = 12.24$ min, Area (AUC) ≥ 99.9 %

Schmelzpunkt $T_M = 143.8$ °C

N-[2-((Benzyloxy)amino)-2-oxoethoxy]-4-(hex-5-yn-1-yloxy)benzamid (**28l**)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV3** mit Schlüsselintermediat **I (13)** als *N*-Nucleophil und das Produkt **28l** konnte als weißer Feststoff (0.049 g, 0.124 mmol, 25 %) erhalten werden.

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11.94 (s, 1H), 11.51 (s, 1H), 7.79 – 7.65 (m, 2H), 7.47 – 7.26 (m, 5H), 7.09 – 6.92 (m, 2H), 4.84 (s, 2H), 4.35 (s, 2H), 4.05 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.78 (t, $J = 2.6$ Hz, 1H), 2.23 (td, $J = 2.7, 7.0$ Hz, 2H), 1.81 (dq, $J = 6.5, 8.7$ Hz, 2H), 1.68 – 1.51 (m, 2H)

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 165.08, 164.81, 161.52, 135.71, 129.12, 128.82, 128.29, 123.26, 114.20, 84.24, 77.04, 73.32, 71.44, 67.21, 27.63, 24.54, 17.41

HPLC $t_R = 13.09$ min, Area (AUC) = 95.5 %

Schmelzpunkt $T_M = 133.7$ °C

N-[2-((Benzyloxy)amino)-2-oxoethoxy]-4-(4-cyanobutoxy)benzamid (**28m**)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV3** mit Schlüsselintermediat **I (13)** als *N*-Nucleophil und das Produkt **28m** konnte als weißer Feststoff (0.080 g, 0.201 mmol, 40 %) erhalten werden.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.94 (s, 1H), 11.51 (s, 1H), 7.73 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.45 – 7.28 (m, 5H), 7.06 – 6.94 (m, 2H), 4.84 (s, 2H), 4.35 (s, 2H), 4.07 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.58 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.88 – 1.62 (m, 4H)

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.05, 164.81, 161.40, 135.71, 129.12, 128.82, 128.30, 123.31, 120.58, 114.22, 76.92, 74.16, 66.84, 27.57, 21.65, 15.93

HPLC *t*_R = 10.96 min, Area (AUC) = 95.9 %

Schmelzpunkt T_M = 127.8 °C

N-[2-((Benzyloxy)amino)-2-oxoethoxy]-4-(3-methoxypropoxy)benzamid (**28n**)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV3** mit Schlüsselintermediat **I (13)** als *N*-Nucleophil und das Produkt **28n** konnte als weißer Feststoff (0.061 g, 0.156 mmol, 31 %) erhalten werden.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.94 (s, 1H), 11.51 (s, 1H), 7.77 – 7.67 (m, 2H), 7.45 – 7.29 (m, 5H), 7.05 – 6.96 (m, 2H), 4.84 (s, 2H), 4.36 (s, 2H), 4.07 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.46 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 3.24 (s, 3H), 1.95 (p, *J* = 6.4 Hz, 2H)

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.08, 164.82, 161.49, 135.73, 129.15, 128.84, 128.31, 123.35, 114.20, 77.02, 73.37, 68.35, 64.89, 57.96, 28.81

HPLC *t*_R = 10.97 min, Area (AUC) = 98 %

Schmelzpunkt T_M = 112.2 °C

N-[2-((Benzyloxy)amino)-2-oxoethoxy]-4-(2-ethoxyethoxy)benzamid (**28o**)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV3** mit Schlüsselintermediat **I (13)** als *N*-Nucleophil und das Produkt **28o** konnte als weißer Feststoff (0.149 g, 0.383 mmol, 38 %) erhalten werden.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.94 (s, 1H), 11.51 (s, 1H), 7.79 – 7.65 (m, 2H), 7.46 – 7.28 (m, 5H), 7.07 – 6.96 (m, 2H), 4.84 (s, 2H), 4.36 (s, 2H), 4.20 – 4.08 (m, 2H), 3.76 – 3.63 (m, 2H), 3.50 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.12 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H)

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164.99, 164.81, 161.41, 135.66, 129.10, 128.83, 128.30, 123.39, 114.23, 77.01, 73.33, 68.17, 67.42, 65.69, 15.08

HPLC $t_R = 10.89$ min, Area (AUC) = 99 %

Schmelzpunkt $T_M = 126.3$ °C

N-[2-((Benzyloxy)amino)-2-oxoethoxy]-4-[(5,5,5-trifluoropentyl)oxy]benzamid (**28p**)

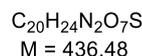
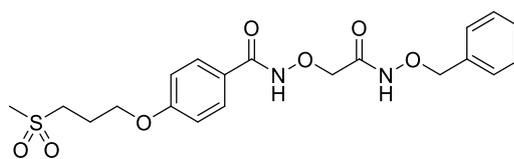
Die Synthese erfolgte gemäß **ASV3** mit Schlüsselintermediat **I (13)** als *N*-Nucleophil und das Produkt **28p** konnte als weißer Feststoff (0.052 g, 0.118 mmol, 16 %) erhalten werden.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.94 (s, 1H), 11.51 (s, 1H), 7.78 – 7.66 (m, 2H), 7.45 – 7.28 (m, 5H), 7.08 – 6.94 (m, 2H), 4.84 (s, 2H), 4.36 (s, 2H), 4.06 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.42 – 2.23 (m, 2H), 1.81 (p, *J* = 6.5 Hz, 2H), 1.64 (tt, *J* = 9.8, 6.0 Hz, 2H)

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.05, 164.84, 161.44, 135.72, 129.52, 129.13, 128.84, 128.30, 125.85, 123.28, 114.22, 77.02, 73.31, 67.12, 32.09 (d, *J* = 27.3 Hz), 27.39, 18.24

HPLC $t_R = 13.91$ min, Area (AUC) = 99 %

Schmelzpunkt $T_M = 140.3$ °C

N-[2-((Benzyloxy)amino)-2-oxoethoxy]-4-[3-(methylsulfonyl)propoxy]benzamid (**28q**)

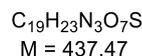
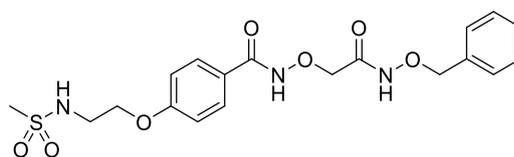
Die Synthese erfolgte gemäß **ASV3** mit Schlüsselintermediat **I (13)** als *N*-Nucleophil und das Produkt **28q** konnte als weißer Feststoff (0.115 g, 0.263 mmol, 66 %) erhalten werden.

¹H-NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.69 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.37 (dd, *J* = 32.7, 6.8 Hz, 5H), 6.91 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 4.96 (d, *J* = 5.2 Hz, 2H), 4.52 (s, 2H), 4.17 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.33 – 3.19 (m, 2H), 2.97 (s, 3H), 2.45 – 2.28 (m, 2H)

¹³C-NMR (75 MHz, Chloroform-*d*) δ 171.88, 168.19, 160.22, 129.63, 129.44, 129.24, 128.63, 114.99, 114.81, 77.16, 65.96, 51.68, 41.20, 29.85, 22.55

HPLC t_R = 9.13 min, Area (AUC) \geq 99.9 %

Schmelzpunkt T_M = 113.9 °C

N-[2-((Benzyloxy)amino)-2-oxoethoxy]-4-[2-(methylsulfonamido)ethoxy]benzamid (**28r**)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV4-B** mit Schlüsselintermediat **I (13)** als *N*-Nucleophil und das Produkt **28r** konnte als weißer Feststoff (0.176 g, 0.403 mmol, 45 %) erhalten werden.

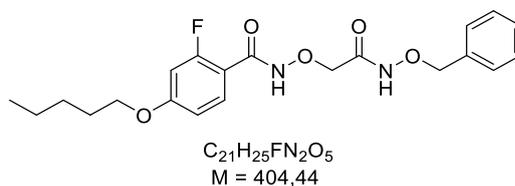
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.92 (s, 1H), 11.48 (s, 1H), 7.77 – 7.71 (m, 2H), 7.42 – 7.32 (m, 5H), 7.27 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 7.06 – 7.00 (m, 2H), 4.85 (s, 2H), 4.36 (s, 2H), 4.10 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H), 3.35 (q, *J* = 5.6 Hz, 2H), 2.95 (s, 3H)

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 169.55, 164.72, 161.02, 135.63, 129.02, 128.65, 128.16, 123.68, 114.21, 76.95, 73.30, 67.10, 41.64, 40.11

HPLC t_R = 8.79 min, Area (AUC) \geq 99.9 %

Schmelzpunkt T_M = 129.9 °C

5.3.3.4 Modifikation der Benzoyl-Struktur

N-[2-((Benzyloxy)amino)-2-oxoethoxy]-2-fluoro-4-(pentyloxy)benzamid (**28s**)

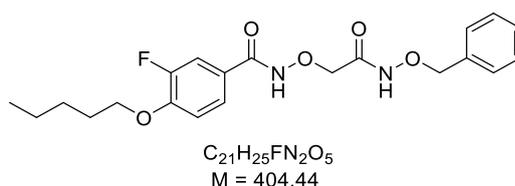
Die Synthese erfolgte gemäß **ASV4-A** mit Schlüsselintermediat **I (13)** als *N*-Nucleophil und das Produkt **28s** konnte als weißer Feststoff (0.193 g, 0.478 mmol, 48 %) erhalten werden.

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11.61 (s, 1H), 11.45 (s, 1H), 7.57 (t, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.49 – 7.26 (m, 5H), 7.00 – 6.74 (m, 2H), 4.84 (s, 2H), 4.36 (s, 2H), 4.03 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 1.71 (p, $J = 7.0$ Hz, 2H), 1.37 (tq, $J = 7.2, 4.4, 3.7$ Hz, 4H), 0.97 – 0.79 (m, 3H)

^{13}C -NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 164.65, 162.34 (d, $J = 41.3$ Hz), 161.41, 159.75, 135.71, 131.29 (d, $J = 4.7$ Hz), 128.83, 128.32, 112.15, 111.14, 102.23 (d, $J = 25.9$ Hz), 77.09, 73.16, 68.35, 28.07, 27.55, 21.82, 13.88

HPLC $t_R = 15.11$ min, Area (AUC) ≥ 99.9 %

Schmelzpunkt $T_M = 70.3$ °C

N-[2-((Benzyloxy)amino)-2-oxoethoxy]-3-fluoro-4-(pentyloxy)benzamid (**28t**)

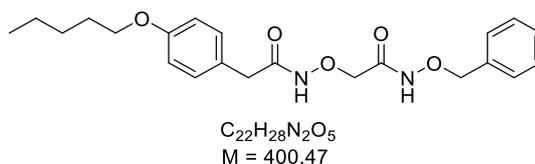
Die Synthese erfolgte gemäß **ASV4-A** mit Schlüsselintermediat **I (13)** als *N*-Nucleophil und das Produkt **28t** konnte als weißer Feststoff (0.154 g, 0.381 mmol, 38 %) erhalten werden.

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.03 (s, 1H), 11.45 (s, 1H), 7.69 – 7.50 (m, 2H), 7.45 – 7.30 (m, 5H), 7.26 (t, $J = 8.5$ Hz, 1H), 4.84 (s, 2H), 4.35 (s, 2H), 4.11 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 1.74 (p, $J = 6.6$ Hz, 2H), 1.49 – 1.26 (m, 4H), 0.98 – 0.79 (m, 3H)

^{13}C -NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 164.67, 151.94, 150.12, 135.73, 128.84, 128.30, 124.46, 123.62, 114.87, 114.28, 77.00, 73.12, 68.80, 28.10, 27.51, 21.80, 13.88

HPLC $t_R = 14.68$ min, Area (AUC) ≥ 99.9 %

Schmelzpunkt $T_M = 135.8$ °C

N-(Benzyloxy)-2-[(2-(4-(pentyloxy)phenyl)acetamido)oxy]acetamid (**28u**)

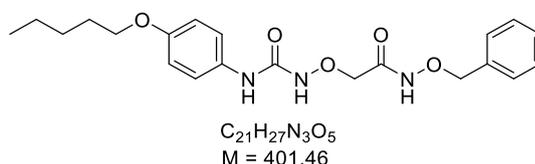
Die Synthese erfolgte gemäß **ASV3** mit Schlüsselintermediat **I (13)** als *N*-Nucleophil und das Produkt **28u** konnte als weißer Feststoff (0.137 g, 0.342 mmol, 34 %) erhalten werden.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.46 (s, 2H), 7.42 – 7.32 (m, 5H), 7.19 – 7.08 (m, 2H), 6.89 – 6.78 (m, 2H), 4.76 (s, 2H), 4.22 (s, 2H), 3.89 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.24 (s, 2H), 1.75 – 1.60 (m, 2H), 1.35 (ddt, *J* = 7.7, 6.0, 4.0 Hz, 4H), 0.94 – 0.83 (m, 3H)

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 168.36, 164.85, 157.50, 135.69, 129.99, 128.76, 128.33, 126.88, 114.23, 77.20, 72.76, 67.32, 38.04, 28.37, 27.70, 21.88, 13.91

HPLC $t_R = 12.22$ min, Area (AUC) ≥ 99.9 %

Schmelzpunkt $T_M = 110.8$ °C

N-(Benzyloxy)-2-[(3-(4-(pentyloxy)phenyl)ureido)oxy]acetamid (**46**)

Die Synthese erfolgte in Anlehnung an die Vorschrift von Sit *et al.*²⁰⁰

Bei Raumtemperatur wurden 1.00 Äq. 4-(Pentyloxy)benzoesäure und 2.00 Äq. *N,N*-Diisopropylethylamin in Toluol vorgelegt. Nach Zugabe von 1.40 Äq. Diphenylphosphorylazid wurde für 10 min bei Raumtemperatur und anschließend für 1 h bei 105 °C gerührt. Im Anschluss wurde die Reaktion auf Raumtemperatur gekühlt und 2.00 Äq. des Schlüsselintermediates **I (13)** zugegeben. Nach 10 min Rühren bei Raumtemperatur wurde für eine weitere Stunde bei 80 °C gerührt. Nach vollständigem Umsatz wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit dem Eluentengemisch *n*-Hexan/Essigsäureethylester gereinigt. Das Produkt **46** konnte als weißer Feststoff (0.162 g, 0.402 mmol, 40 %) erhalten werden.

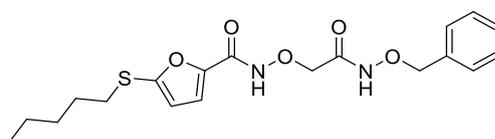
¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.47 (s, 1H), 9.53 (s, 1H), 9.26 (s, 1H), 7.43 – 7.34 (m, 7H), 6.93 – 6.81 (m, 2H), 4.84 (s, 2H), 4.25 (s, 2H), 3.91 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 1.68 (q, *J* = 6.8 Hz, 2H), 1.44 – 1.27 (m, 4H), 0.95 – 0.84 (m, 3H)

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.07, 157.54, 154.43, 135.65, 131.65, 128.87, 128.37, 120.66, 114.50, 77.13, 73.13, 67.54, 28.43, 27.73, 21.90, 13.92

HPLC *t_R* = 14.55 min, Area (AUC) = 99.4 %

Schmelzpunkt *T_M* = 139.7 °C

N-[2-((Benzyloxy)amino)-2-oxoethoxy]-5-(pentylthio)furan-2-carboxamid (**28v**)



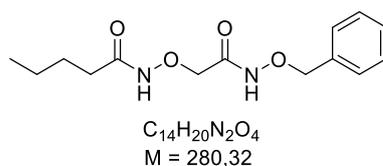
C₁₉H₂₄N₂O₅S
M = 392,47

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV3** mit Schlüsselintermediat **I (13)** als *N*-Nucleophil und das Produkt **28v** konnte als gelbes Öl (0.124 g, 0.316 mmol, 63 %) erhalten werden.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.00 (s, 1H), 11.38 (s, 1H), 7.47 – 7.27 (m, 5H), 7.18 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 6.71 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 4.83 (s, 2H), 4.32 (s, 2H), 2.93 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.54 (p, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.38 – 1.18 (m, 4H), 0.91 – 0.74 (m, 3H)

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164.94, 156.85, 150.31, 146.93, 136.18, 129.39, 128.79, 117.04, 116.12, 77.47, 73.68, 34.50, 30.35, 29.23, 22.03, 14.27

HPLC *t_R* = 14.69 min, Area (AUC) = 98.1 %

N-[2-((Benzyloxy)amino)-2-oxoethoxy]pentanamid (**28w**)

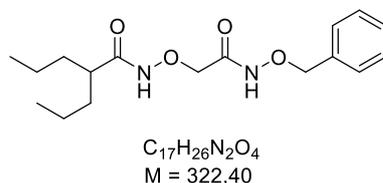
Die Synthese erfolgte gemäß **ASV4-B** mit Schlüsselintermediat **I (13)** als *N*-Nucleophil und das Produkt **28w** konnte als weißer Feststoff (0.149 g, 0.532 mmol, 53 %) erhalten werden.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.38 (s, 2H), 7.38 (tdd, *J* = 4.1, 3.1, 1.5 Hz, 5H), 4.82 (s, 2H), 4.22 (s, 2H), 2.04 – 1.90 (m, 2H), 1.54 – 1.37 (m, 2H), 1.32 – 1.16 (m, 2H), 0.85 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H)

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 170.61, 164.87, 135.74, 128.76, 128.33, 77.03, 73.27, 31.62, 26.89, 21.59, 13.63

HPLC $t_R = 9.46$ min, Area (AUC) = 97.4 %

Schmelzpunkt $T_M = 60.2$ °C

N-[2-((Benzyloxy)amino)-2-oxoethoxy]-2-propylpentanamid (**28x**)

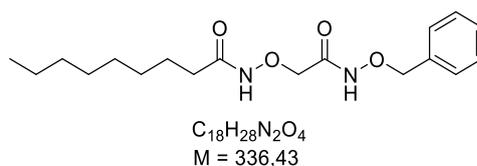
Die Synthese erfolgte gemäß **ASV3** mit Schlüsselintermediat **I (13)** als *N*-Nucleophil und das Produkt **28x** konnte als weißer Feststoff (0.182 g, 0.565 mmol, 57 %) erhalten werden.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.49 (s, 1H), 11.41 (s, 1H), 7.48 – 7.30 (m, 5H), 4.81 (s, 2H), 4.25 (s, 2H), 2.07 – 1.93 (m, 1H), 1.52 – 1.32 (m, 2H), 1.21 (ddd, *J* = 22.2, 13.6, 6.1 Hz, 6H), 0.82 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H)

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.89, 164.87, 135.69, 128.70, 128.35, 77.16, 72.93, 41.74, 34.38, 19.97, 13.87

HPLC $t_R = 12.71$ min, Area (AUC) ≥ 99.9 %

Schmelzpunkt $T_M = 84.7$ °C

N-[2-((Benzyloxy)amino)-2-oxoethoxy]nonanamid (**28y**)

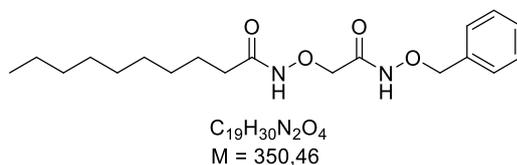
Die Synthese erfolgte gemäß **ASV3** mit Schlüsselintermediat **I (13)** als *N*-Nucleophil und das Produkt **28y** konnte als weißer Feststoff (0.065 g, 0.193 mmol, 39 %) erhalten werden.

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11.38 (s, 2H), 7.38 (dq, $J = 4.3, 3.1, 1.7$ Hz, 5H), 4.82 (s, 2H), 4.22 (s, 2H), 1.96 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.46 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.22 (s, 10H), 0.92 – 0.77 (m, 3H)

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 170.44, 165.18, 135.56, 128.74, 128.31, 77.04, 73.01, 31.90, 31.23, 28.65, 28.55, 28.43, 24.76, 22.06, 13.94

HPLC $t_R = 14.58$ min, Area (AUC) = 99 %

Schmelzpunkt $T_M = 63.4$ °C

N-[2-((Benzyloxy)amino)-2-oxoethoxy]decanamid (**28z**)

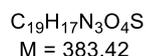
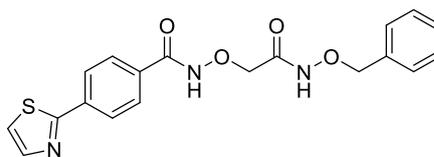
Die Synthese erfolgte gemäß **ASV3** mit Schlüsselintermediat **I (13)** als *N*-Nucleophil und das Produkt **28z** konnte als weißer Feststoff (0.075 g, 0.214 mmol, 43 %) erhalten werden.

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11.38 (d, $J = 40.7$ Hz, 2H), 7.38 (dt, $J = 4.3, 2.9, 1.6$ Hz, 5H), 4.82 (s, 2H), 4.22 (s, 2H), 1.96 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.57 – 1.37 (m, 2H), 1.22 (s, 12H), 0.93 – 0.75 (m, 3H)

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 171.25, 164.71, 135.52, 128.75, 128.31, 76.73, 72.93, 31.91, 31.26, 28.85, 28.70, 28.66, 28.42, 24.76, 22.08, 13.95

HPLC $t_R = 15.76$ min, Area (AUC) = 99 %

Schmelzpunkt $T_M = 63.5$ °C

N-[2-((Benzyloxy)amino)-2-oxoethoxy]-4-(thiazol-2-yl)benzamid (**28aa**)

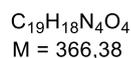
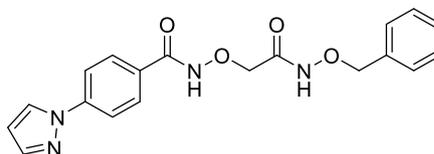
Die Synthese erfolgte gemäß **ASV3** mit Schlüsselintermediat **I (13)** als *N*-Nucleophil und das Produkt **28aa** konnte als weißer Feststoff (0.044 g, 0.113 mmol, 18 %) erhalten werden.

¹H-NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 11.26 (s, 1H), 10.16 (s, 1H), 8.05 – 7.96 (m, 2H), 7.92 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.86 – 7.73 (m, 2H), 7.44 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.43 – 7.27 (m, 5H), 4.96 (s, 2H), 4.52 (s, 2H)

¹³C-NMR (75 MHz, Chloroform-*d*) δ 167.10, 166.02, 157.60, 143.49, 136.52, 135.14, 131.72, 129.24, 128.83, 128.64, 128.29, 127.06, 120.54, 78.45, 77.36

HPLC $t_R = 10.50$ min, Area (AUC) ≥ 99.9 %

Schmelzpunkt $T_M = 138.1$ °C

N-[2-((Benzyloxy)amino)-2-oxoethoxy]-4-(1H-pyrazol-1-yl)benzamid (**28ab**)

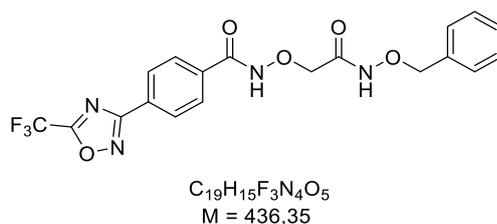
Die Synthese erfolgte gemäß **ASV3** mit Schlüsselintermediat **I (13)** als *N*-Nucleophil und das Produkt **28ab** konnte als weißer Feststoff (0.053 g, 0.144 mmol, 19 %) erhalten werden.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.15 (s, 1H), 11.48 (s, 1H), 8.62 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.97 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.93 – 7.85 (m, 2H), 7.81 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.45 – 7.30 (m, 5H), 6.60 (dd, *J* = 2.6, 1.7 Hz, 1H), 4.86 (s, 2H), 4.39 (s, 2H)

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164.61, 149.98, 141.71, 135.85, 128.81, 128.27, 128.10, 117.78, 108.49, 76.99, 73.11

HPLC $t_R = 10.13$ min, Area (AUC) ≥ 99.9 %

Schmelzpunkt $T_M = 164.6$ °C

N-[2-((Benzyloxy)amino)-2-oxoethoxy]-4-[5-(trifluoromethyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl]benzamid (**28ac**)

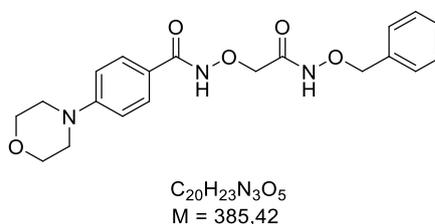
Die Synthese erfolgte gemäß **ASV4-B** mit Schlüsselintermediat **I (13)** als *N*-Nucleophil und das Produkt **28ac** konnte als weißer Feststoff (0.154 g, 0.354 mmol, 35 %) erhalten werden.

1H -NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.99 (dt, $J = 8.8, 1.9$ Hz, 2H), 7.85 – 7.72 (m, 2H), 7.26 – 7.10 (m, 5H), 4.79 (s, 2H), 4.45 – 4.30 (m, 2H)

^{13}C -NMR (75 MHz, Chloroform-*d*) δ 169.48, 167.82, 164.88, 134.93, 134.41, 133.92, 128.49, 127.92, 127.82, 127.56, 127.08, 77.47, 77.27

HPLC $t_R = 13.51$ min, Area (AUC) = 98.6 %

Schmelzpunkt $T_M = 162.1$ °C

N-[2-((Benzyloxy)amino)-2-oxoethoxy]-4-morpholinobenzamid (**28ad**)

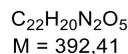
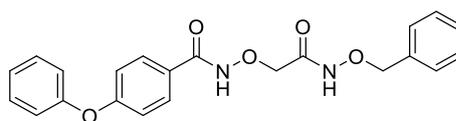
Die Synthese erfolgte gemäß **ASV3** mit Schlüsselintermediat **I (13)** als *N*-Nucleophil und das Produkt **28ad** konnte als weißer Feststoff (0.086 g, 0.223 mmol, 45 %) erhalten werden.

1H -NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.83 (s, 1H), 11.58 (s, 1H), 7.74 – 7.58 (m, 2H), 7.49 – 7.26 (m, 5H), 6.97 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 4.84 (s, 2H), 4.35 (s, 2H), 3.73 (t, $J = 4.8$ Hz, 4H), 3.23 (t, $J = 4.9$ Hz, 4H)

^{13}C -NMR (75 MHz, Methanol-*d*₄) δ 168.67, 167.41, 155.52, 136.91, 130.37, 130.00, 129.75, 129.60, 121.51, 114.88, 79.00, 75.50, 67.59, 48.79

HPLC $t_R = 10.33$ min, Area (AUC) = 99 %

Schmelzpunkt $T_M = 156.9$ °C

N-[2-((Benzyloxy)amino)-2-oxoethoxy]-4-phenoxybenzamid (**28ae**)

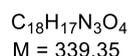
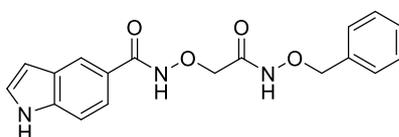
Die Synthese erfolgte gemäß **ASV3** mit Schlüsselintermediat **I (13)** als *N*-Nucleophil und das Produkt **28ae** konnte als weißer Feststoff (0.222 g, 0.566 mmol, 57 %) erhalten werden.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.74 (d, *J* = 131.3 Hz, 2H), 7.83 – 7.74 (m, 2H), 7.51 – 7.28 (m, 7H), 7.28 – 7.16 (m, 1H), 7.16 – 6.96 (m, 4H), 4.84 (s, 2H), 4.36 (s, 2H)

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 160.88, 159.81, 155.35, 135.92, 130.27, 129.41, 128.79, 128.28, 125.87, 124.44, 119.61, 117.44, 76.92, 73.08

HPLC *t_R* = 13.34 min, Area (AUC) ≥ 99.9 %

Schmelzpunkt *T_M* = 102.4 °C

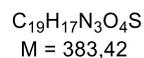
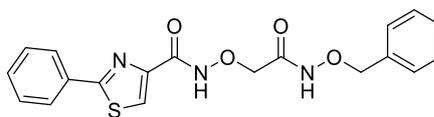
N-[2-((Benzyloxy)amino)-2-oxoethoxy]-1*H*-indole-5-carboxamid (**28af**)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV3** mit Schlüsselintermediat **I (13)** als *N*-Nucleophil und das Produkt **28af** konnte als farbloses Öl (0.090 g, 0.265 mmol, 53 %) erhalten werden.

¹H-NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 11.56 (s, 1H), 9.27 (s, 1H), 8.59 (s, 1H), 8.04 (dt, *J* = 1.6, 0.7 Hz, 1H), 7.51 (dd, *J* = 8.6, 1.7 Hz, 1H), 7.45 – 7.39 (m, 3H), 7.34 – 7.26 (m, 4H), 6.62 (ddd, *J* = 3.1, 2.0, 0.9 Hz, 1H), 4.97 (s, 2H), 4.51 (s, 2H)

¹³C-NMR (75 MHz, Chloroform-*d*) δ 187.50, 166.08, 155.68, 138.38, 135.30, 129.22, 128.69, 128.58, 127.73, 126.27, 121.19, 120.97, 111.60, 103.99, 78.39, 76.13

HPLC *t_R* = 9.60 min, Area (AUC) = 97.5 %

N-[2-((Benzyloxy)amino)-2-oxoethoxy]-2-phenylthiazole-4-carboxamid (**28ag**)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV3** mit Schlüsselintermediat **I (13)** als *N*-Nucleophil und das Produkt **28ag** konnte als weißer Feststoff (0.049 g, 0.128 mmol, 26 %) erhalten werden.

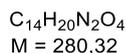
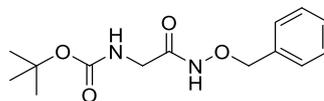
¹H-NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.12 (s, 1H), 7.90 (dd, *J* = 6.7, 2.9 Hz, 2H), 7.49 – 7.39 (m, 5H), 7.30 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 4.98 (s, 2H), 4.56 (s, 2H)

¹³C-NMR (75 MHz, Methanol-*d*₄) δ 170.46, 167.50, 162.00, 148.72, 136.66, 134.02, 132.01, 130.40, 130.25, 129.69, 129.45, 127.80, 126.37, 79.20, 75.44

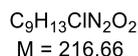
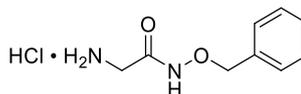
HPLC *t_R* = 12.11 min, Area (AUC) = 98.7 %

Schmelzpunkt *T_M* = 121.8 °C

5.3.4 KSK-Analoga: Region B

tert-Butyl-[2-((benzyloxy)amino)-2-oxoethyl]carbammat (**103**)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV4-B** mit *O*-Benzylhydroxylamin (**62a**) als *N*-Nucleophil und das Rohprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt eingesetzt.

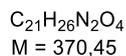
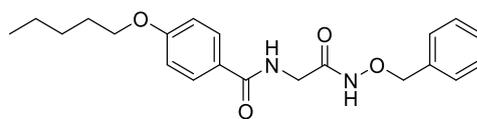
2-Amino-*N*-(benzyloxy)acetamid-Hydrochlorid (**54a**)

1.00 Äq. des geschützten Amins **103** wurden in Dioxan gelöst (0.2 M). Zu dieser Lösung wurden 4.00 Äq. einer Lösung von Chlorwasserstoff in Dioxan (4 M) zugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Kühlung auf 0 °C wurde der entstandene Niederschlag abfiltriert, mehrmals mit Diethylether gewaschen und unter Hochvakuum getrocknet. Das Produkt **54a** konnte als braunes Öl (0.345 g, 1.60 mmol, 40 %) erhalten werden.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11.68 (s, 1H), 8.19 (s, 3H), 7.56 – 7.19 (m, 5H), 4.83 (s, 2H), 3.39 (s, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, DMSO- d_6) δ 168.86, 135.64, 128.82, 128.54, 128.40, 77.24, 75.89

HPLC $t_R = 4.55$ min, Area (AUC) ≥ 99.9 %

N-[2-((Benzyloxy)amino)-2-oxoethyl]-4-(pentyloxy)benzamid (**55a**)

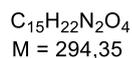
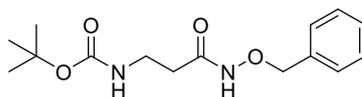
Die Synthese erfolgte gemäß **ASV4-A** mit Amin **54a** als *N*-Nucleophil und das Produkt **55a** konnte als weißer Feststoff (0.076 g, 0.206 mmol, 21 %) erhalten werden.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.21 (s, 1H), 8.60 (s, 1H), 7.91 – 7.76 (m, 2H), 7.50 – 7.25 (m, 5H), 7.06 – 6.92 (m, 2H), 4.80 (s, 2H), 4.02 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.77 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H), 1.82 – 1.64 (m, 2H), 1.48 – 1.26 (m, 4H), 0.97 – 0.82 (m, 3H)

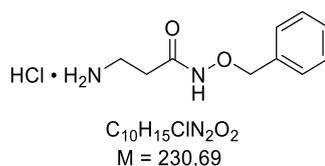
¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.36, 166.01, 161.12, 135.99, 129.20, 128.81, 128.32, 125.98, 113.88, 76.95, 67.64, 38.69, 28.28, 27.66, 21.88, 13.92

HPLC *t_R* = 13.74 min, Area (AUC) = 98.2 %

Schmelzpunkt *T_M* = 183.3 °C

tert-Butyl-[3-((benzyloxy)amino)-3-oxopropyl]carbammat (**104**)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV4-B** mit *O*-Benzylhydroxylamin (**62a**) als *N*-Nucleophil und das Rohprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt eingesetzt.

3-Amino-N-(benzyloxy)propanamid-Hydrochlorid (54b)

1.00 Äq. des geschützten Amins **104** wurden in Dioxan gelöst (0.2 M). Zu dieser Lösung wurden 4.00 Äq. einer Lösung von Chlorwasserstoff in Dioxan (4 M) zugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert, mehrmals mit Diethylether gewaschen und unter Hochvakuum getrocknet. Das Produkt **54b** konnte als weißer Feststoff (0.687 g, 3.01 mmol, 75 %) erhalten werden.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.35 (s, 1H), 8.00 (s, 3H), 7.51 – 7.25 (m, 5H), 4.81 (s, 2H), 2.98 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.38 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H)

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.54, 135.92, 128.72, 128.29, 128.24, 76.95, 34.91, 29.55

HPLC $t_R = 4.75$ min, Area (AUC) ≥ 99.9 %

Schmelzpunkt $T_M = 154.9$ °C

N-[3-((Benzyloxy)amino)-3-oxopropyl]-4-(pentyloxy)benzamid (55b)

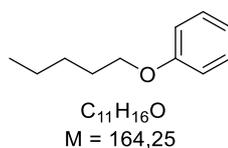
Die Synthese erfolgte gemäß **ASV4-A** mit Amin **54b** als *N*-Nucleophil und das Produkt **55b** konnte als weißer Feststoff (0.290 g, 0.754 mmol, 75 %) erhalten werden.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.04 (s, 1H), 8.41 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 7.87 – 7.72 (m, 2H), 7.34 (td, *J* = 6.7, 4.1 Hz, 5H), 7.05 – 6.89 (m, 2H), 4.78 (s, 2H), 4.00 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.44 (q, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.24 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.72 (p, *J* = 6.6 Hz, 2H), 1.47 – 1.26 (m, 4H), 0.97 – 0.81 (m, 3H)

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167.68, 165.71, 160.94, 136.06, 128.96, 128.83, 128.26, 128.20, 126.46, 113.85, 76.80, 67.61, 35.82, 32.65, 28.28, 27.66, 21.88, 13.92

HPLC $t_R = 13.61$ min, Area (AUC) = 96.9 %

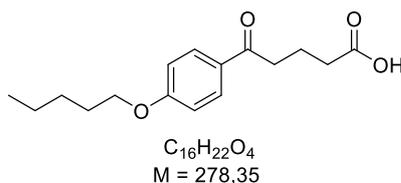
Schmelzpunkt $T_M = 153.7$ °C

n-(Pentyloxy)benzol (**57**)

Die Synthese erfolgte nach Vorschrift von DIEDERICH *et al.*²¹² und das Produkt **57** konnte als farbloses Öl (2.18 g, 13.3 mmol, 53 %) erhalten werden. Die spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen überein.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.32 – 7.21 (m, 2H), 6.96 – 6.85 (m, 3H), 3.94 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 1.70 (dq, *J* = 8.7, 6.6 Hz, 2H), 1.47 – 1.27 (m, 4H), 0.95 – 0.84 (m, 3H)

HPLC *t_R* = 17.97 min, Area (AUC) ≥ 99.9 %

5-Oxo-5-[4-(pentyloxy)phenyl]pentansäure (**58**)

Bei Raumtemperatur wurden 1.00 Äq. *n*-(Pentyloxy)benzol (**57**) und 1.50 Äq. Glutarsäureanhydrid in Dichlormethan gelöst. Bei 0 °C wurden 1.50 Äq. wasserfreies Aluminiumchlorid zugegeben und gerührt, bis die Lösung Raumtemperatur erreicht hat. Nach 1 h Reflux wurde die Reaktion erneut auf 0 °C gekühlt und mit Eiswasser abgebrochen. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Nach Trocknung über wasserfreiem Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt durch Umkristallisation aus *n*-Hexan und Essigsäureethylester gereinigt. Das Produkt **58** konnte als beiger Feststoff (0.235 g, 0.843 mmol, 35 %) erhalten werden.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.05 (s, 1H), 8.05 – 7.73 (m, 2H), 7.14 – 6.86 (m, 2H), 4.04 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.98 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.29 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.77 (dp, *J* = 23.1, 7.0 Hz, 4H), 1.54 – 1.18 (m, 4H), 1.00 – 0.66 (m, 3H)

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 197.92, 174.26, 162.52, 130.15, 129.39, 114.26, 67.82, 36.72, 32.88, 28.21, 27.63, 21.86, 19.43, 13.91

HPLC *t_R* = 14.21 min, Area (AUC) = 95.7 %

Schmelzpunkt *T_M* = 97.7 °C

N-(Benzyloxy)-5-oxo-5-[4-(pentyloxy)phenyl]pentanamid (59)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV4-A** mit *O*-Benzylhydroxylamin (**62a**) als *N*-Nucleophil und das Produkt **59** konnte als weißer Feststoff (0.079 g, 0.206 mmol, 56 %) erhalten werden.

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 10.96 (s, 1H), 7.99 – 7.79 (m, 2H), 7.48 – 7.22 (m, 5H), 7.08 – 6.95 (m, 2H), 4.78 (s, 2H), 4.05 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 2.92 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.03 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.83 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 1.72 (q, $J = 6.8$ Hz, 2H), 1.38 (tdd, $J = 9.4, 6.0, 4.3$ Hz, 4H), 0.96 – 0.81 (m, 3H)

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 170.44, 169.03, 162.46, 136.09, 133.90, 130.14, 129.39, 128.74, 128.26, 114.26, 67.73, 63.96, 36.55, 31.46, 28.20, 27.62, 21.85, 19.66, 13.90

HPLC $t_R = 15.81$ min, Area (AUC) = 97.6 %

Schmelzpunkt $T_M = 111.1$ °C

N-Hydroxy-4-(pentyloxy)benzamid (60)

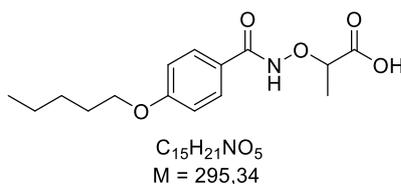
Die Synthese erfolgte gemäß **ASV4-A** mit Hydroxylamin-Hydrochlorid als *N*-Nucleophil und das Produkt **60** konnte als weißer Feststoff (1.85 g, 8.28 mmol, 55 %) erhalten werden.

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11.04 (s, 1H), 8.88 (s, 1H), 7.88 – 7.57 (m, 2H), 7.09 – 6.81 (m, 2H), 4.00 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 1.83 – 1.62 (m, 2H), 1.49 – 1.23 (m, 4H), 0.99 – 0.79 (m, 3H)

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 164.02, 160.92, 128.61, 124.74, 114.02, 67.61, 28.26, 27.66, 21.87, 13.91

HPLC $t_R = 10.81$ min, Area (AUC) = 98.8 %

Schmelzpunkt $T_M = 150$ °C

2-[(4-(Pentyloxy)benzamido)oxy]propansäure (**61**)

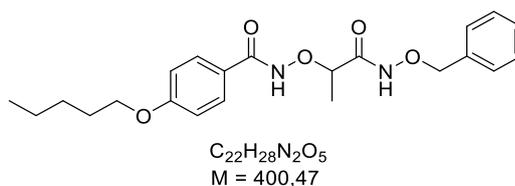
Bei Raumtemperatur wurden 1.00 Äq. der Hydroxamsäure **60** in Tetrahydrofuran gelöst und anschließend auf -10 °C gekühlt. Zu dieser Lösung wurden im Verlauf von 10 min 1.00 Äq. Natriumhydrid zugegeben und für 10 min gerührt. Abschließend wurden tropfenweise 1.00 Äq. 2-Bromopropansäure zugegeben und für weitere 8 h refluxiert. Nach vollständigem Umsatz wurde die Reaktion durch Zugabe von wässriger Natronlauge (1 M) abgebrochen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in entmineralisiertem Wasser aufgenommen. Nach Zugabe von 1 M Salzsäure (pH 1) wurde die wässrige Phase dreimal mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit dem Eluentengemisch *n*-Hexan/Essigsäureethylester gereinigt. Das Produkt **61** konnte als brauner Feststoff (0.206 g, 0.697 mmol, 17 %) erhalten werden.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11.56 (s, 1H), 7.79 – 7.65 (m, 2H), 7.04 – 6.90 (m, 2H), 4.49 (q, $J = 6.9$ Hz, 1H), 4.01 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 1.72 – 1.61 (m, 2H), 1.40 – 1.32 (m, 7H), 0.90 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, DMSO- d_6) δ 172.78, 165.06, 161.46, 129.11, 123.61, 114.08, 78.82, 67.68, 28.21, 27.61, 21.83, 16.41, 13.85

HPLC $t_R = 12.76$ min, Area (AUC) = 96.8 %

Schmelzpunkt $T_M = 116.4\text{ °C}$

N-[(1-((Benzyloxy)amino)-1-oxopropan-2-yl)oxy]-4-(pentyloxy)benzamid (**63a**)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV4-B** mit *O*-Benzylhydroxylamin (**62a**) als *N*-Nucleophil und das Produkt **63a** konnte als violettes Öl (0.126 g, 0.314 mmol, 45 %) erhalten werden.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.78 (s, 1H), 11.44 (s, 1H), 7.72 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.49 – 7.17 (m, 5H), 6.99 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 4.82 (s, 2H), 4.34 (q, *J* = 6.6 Hz, 1H), 4.02 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 1.72 (p, *J* = 6.6 Hz, 2H), 1.48 – 1.24 (m, 7H), 0.89 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H)

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167.72, 165.08, 161.52, 135.73, 129.13, 128.91, 128.26, 123.46, 114.14, 78.88, 76.85, 67.69, 28.21, 27.62, 21.84, 16.70, 13.89

HPLC $t_R = 15.01$ min, Area (AUC) = 95.1 %

N-[(1-Oxo-1-((1-phenylethoxy)amino)propan-2-yl)oxy]-4-(pentyloxy)benzamid (**63b**)

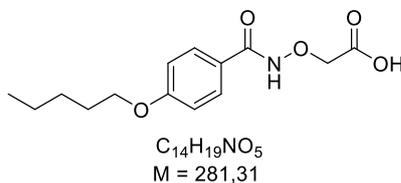
Die Synthese erfolgte gemäß **ASV4-B** mit *O*-(1-Phenylethyl)hydroxylamin (**62b**) als *N*-Nucleophil und das Produkt **63b** konnte als violettes Öl (0.190 g, 0.458 mmol, 46 %) erhalten werden.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.74 (s, 1H), 11.19 (s, 1H), 7.80 – 7.59 (m, 2H), 7.51 – 7.14 (m, 5H), 7.09 – 6.86 (m, 2H), 4.96 (dq, *J* = 9.3, 6.5 Hz, 1H), 4.41 – 4.19 (m, 1H), 4.02 (td, *J* = 6.5, 4.9 Hz, 2H), 1.71 (ddt, *J* = 9.5, 6.8, 2.9 Hz, 2H), 1.49 – 1.20 (m, 10H), 0.97 – 0.79 (m, 3H)

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167.77, 165.14, 161.52, 141.25, 129.13, 128.18, 127.91, 126.76, 123.43, 114.11, 81.93, 78.68, 67.70, 28.23, 27.64, 21.86, 20.69, 16.73, 13.90

HPLC $t_R = 15.52$ min, Area (AUC) = 99.6 %

5.3.5 KSK-Analoga: Region C

2-[(4-(Pentyloxy)benzamido)oxy]essigsäure (**65**) – Schlüsselintermediat II

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV4-A** mit α -Aminooxyessigsäure-Hemihydrochlorid (**64**) als *N*-Nucleophil und das Produkt **65** konnte als weißer Feststoff (7.54 g, 26.8 mmol, 89 %) erhalten werden.

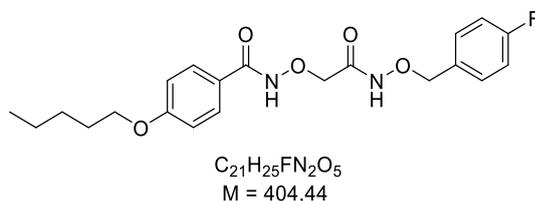
1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.00 (s, 1H), 11.84 (s, 1H), 7.85 – 7.62 (m, 2H), 7.06 – 6.86 (m, 2H), 4.48 (s, 2H), 4.01 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 1.81 – 1.62 (m, 2H), 1.36 (tdt, J = 8.0, 3.6, 2.2 Hz, 4H), 0.97 – 0.81 (m, 3H)

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 170.12, 164.85, 161.49, 129.12, 123.53, 114.12, 71.97, 67.68, 28.23, 27.63, 21.86, 13.90

HPLC t_R = 11.91 min, Area (AUC) = 99.3 %

Schmelzpunkt T_M = 162.6 °C

5.3.5.1 Modifikation der Benzyl-Struktur

N-[2-(((4-Fluorobenzyl)oxy)amino)-2-oxoethoxy]-4-(pentyloxy)benzamid (**67a**)

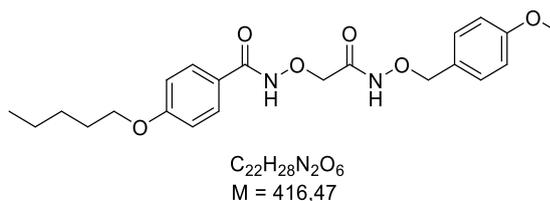
Die Synthese erfolgte gemäß **ASV4-A** mit Schlüsselintermediat **II (65)** als Carbonsäure und das Produkt **67a** konnte als beigefarbener Feststoff (0.186 g, 0.461 mmol, 46 %) erhalten werden.

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11.94 (s, 1H), 11.50 (s, 1H), 7.80 – 7.62 (m, 2H), 7.52 – 7.38 (m, 2H), 7.15 (dd, $J = 10.1, 7.6$ Hz, 2H), 7.07 – 6.93 (m, 2H), 4.82 (s, 2H), 4.35 (s, 2H), 4.02 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 1.72 (p, $J = 6.7$ Hz, 2H), 1.37 (tdd, $J = 10.8, 6.5, 2.3$ Hz, 4H), 0.97 – 0.80 (m, 3H)

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 165.11, 164.86, 163.60, 161.63, 160.48, 132.05, 131.16 (d, $J = 8.3$ Hz), 129.13, 123.21, 115.11 (d, $J = 21.3$ Hz), 114.20, 76.12, 73.33, 67.72, 28.22, 27.64, 21.87, 13.91

HPLC $t_R = 14.77$ min, Area (AUC) ≥ 99.9 %

Schmelzpunkt $T_M = 133$ °C

N-[2-(((4-Methoxybenzyl)oxy)amino)-2-oxoethoxy]-4-(pentyloxy)benzamid (**67b**)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV4-A** mit Schlüsselintermediat **II (65)** als Carbonsäure und das Produkt **67b** konnte als weißer Feststoff (0.213 g, 0.511 mmol, 51 %) erhalten werden.

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11.95 (s, 1H), 11.42 (s, 1H), 7.82 – 7.61 (m, 2H), 7.41 – 7.20 (m, 2H), 7.07 – 6.90 (m, 2H), 6.86 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 4.76 (s, 2H), 4.35 (s, 2H), 4.01 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 3.72 (s, 3H), 1.70 (q, $J = 6.8$ Hz, 2H), 1.37 (dtd, $J = 9.1, 6.4, 4.0$ Hz, 4H), 0.94 – 0.83 (m, 3H)

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 165.07, 164.74, 161.62, 159.35, 130.71, 129.14, 127.64, 123.24, 114.19, 113.64, 76.58, 73.32, 67.72, 55.04, 28.23, 27.64, 21.86, 13.91

HPLC $t_R = 14.47$ min, Area (AUC) = 99.4 %

Schmelzpunkt $T_M = 125.4\text{ °C}$

N-[2-Oxo-2-((thiophen-2-ylmethoxy)amino)ethoxy]-4-(pentyloxy)benzamid (**67c**)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV4-A** mit Schlüsselintermediat **II (65)** als Carbonsäure und das Produkt **67c** konnte als gelber Feststoff (0.247 g, 0.628 mmol, 63 %) erhalten werden.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.93 (s, 1H), 11.52 (s, 1H), 7.81 – 7.65 (m, 2H), 7.57 (dd, *J* = 5.1, 1.2 Hz, 1H), 7.14 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 7.07 – 6.88 (m, 3H), 5.00 (s, 2H), 4.36 (s, 2H), 4.02 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 1.72 (p, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.50 – 1.25 (m, 4H), 0.98 – 0.81 (m, 3H)

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.10, 164.96, 161.62, 137.44, 129.14, 128.86, 127.70, 126.86, 123.25, 114.19, 73.30, 70.81, 67.71, 28.21, 27.63, 21.85, 13.90

HPLC *t_R* = 14.28 min, Area (AUC) = 98.1 %

Schmelzpunkt *T_M* = 112.2 °C

N-[2-Oxo-2-((pyridin-4-ylmethoxy)amino)ethoxy]-4-(pentyloxy)benzamid (**67d**)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV3** mit Schlüsselintermediat **II (65)** als Carbonsäure und das Produkt **67d** konnte als gelber Feststoff (0.163 g, 0.419 mmol, 10 %) erhalten werden.

¹H-NMR (300 MHz, Methanol-*d*₄) δ 8.59 – 8.40 (m, 2H), 7.76 – 7.61 (m, 2H), 7.56 – 7.42 (m, 2H), 7.06 – 6.89 (m, 2H), 5.00 (s, 2H), 4.46 (s, 2H), 4.03 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 1.78 (dt, *J* = 7.8, 6.4 Hz, 2H), 1.57 – 1.27 (m, 4H), 0.95 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H)

¹³C-NMR (75 MHz, Methanol-*d*₄) δ 168.79, 167.87, 164.15, 150.19, 147.44, 130.29, 124.57, 123.86, 115.48, 77.05, 75.45, 69.31, 29.95, 29.32, 23.50, 14.36

HPLC *t_R* = 9.63 min, Area (AUC) = 97.2 %

Schmelzpunkt *T_M* = 124.8 °C

N-[2-Oxo-2-((pyridin-2-ylmethoxy)amino)ethoxy]-4-(pentyloxy)benzamid (**67e**)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV4-B** mit Schlüsselintermediat **II (65)** als Carbonsäure und das Produkt **67e** konnte als gelbes Öl (1.41 g, 3.63 mmol, 73 %) erhalten werden.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.93 (s, 1H), 11.62 (s, 1H), 8.58 – 8.47 (m, 1H), 7.80 (td, *J* = 7.7, 1.8 Hz, 1H), 7.76 – 7.63 (m, 2H), 7.53 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.33 (ddd, *J* = 7.6, 4.8, 1.2 Hz, 1H), 7.08 – 6.89 (m, 2H), 4.94 (s, 2H), 4.36 (s, 2H), 4.03 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.72 (p, *J* = 6.8 Hz, 2H), 1.37 (tdd, *J* = 9.0, 5.7, 4.3 Hz, 4H), 0.98 – 0.80 (m, 3H)

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.16, 164.99, 161.63, 155.64, 149.04, 136.76, 129.13, 123.22, 122.55, 114.18, 77.89, 73.38, 67.72, 28.23, 27.63, 21.86, 13.89

HPLC $t_R = 9.99$ min, Area (AUC) = 95.3 %

N-[2-((Cyclohexylmethoxy)amino)-2-oxoethoxy]-4-(pentyloxy)benzamid (**67f**)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV4-A** mit Schlüsselintermediat **II (65)** als Carbonsäure und das Produkt **67f** konnte als beigefarbener Feststoff (0.130 g, 0.331 mmol, 33 %) erhalten werden.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.94 (s, 1H), 11.39 (s, 1H), 7.83 – 7.57 (m, 2H), 6.99 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 4.34 (s, 2H), 4.01 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.60 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H), 1.66 (dddd, *J* = 23.6, 14.3, 9.5, 5.4 Hz, 8H), 1.37 (dddd, *J* = 11.8, 9.1, 6.3, 3.9 Hz, 4H), 1.16 (t, *J* = 10.5 Hz, 3H), 0.98 – 0.80 (m, 5H)

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.17, 164.43, 161.65, 129.12, 123.21, 114.20, 80.65, 73.44, 67.71, 35.90, 29.12, 28.22, 27.64, 26.01, 25.17, 21.87, 13.90

HPLC $t_R = 16.73$ min, Area (AUC) = 95.3 %

Schmelzpunkt $T_M = 98.6$ °C

N-[2-(Methoxyamino)-2-oxoethoxy]-4-(pentyloxy)benzamid (**67g**)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV4-A** mit Schlüsselintermediat **II (65)** als Carbonsäure und das Produkt **67g** konnte als gelber Feststoff (0.223 g, 0.720 mmol, 72 %) erhalten werden.

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11.95 (s, 1H), 11.52 (s, 1H), 7.82 – 7.63 (m, 2H), 7.08 – 6.89 (m, 2H), 4.35 (s, 2H), 4.01 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 3.62 (s, 3H), 1.78 – 1.63 (m, 2H), 1.45 – 1.27 (m, 4H), 0.93 – 0.81 (m, 3H)

^{13}C -NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 165.09, 164.42, 161.54, 128.98, 123.22, 114.14, 73.47, 67.66, 63.23, 28.09, 27.49, 21.68, 13.71

HPLC $t_R = 11.73$ min, Area (AUC) = 98.8 %

Schmelzpunkt $T_M = 111.1$ °C

N-[2-((Hexyloxy)amino)-2-oxoethoxy]-4-(pentyloxy)benzamid (**67h**)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV4-A** mit Schlüsselintermediat **II (65)** als Carbonsäure und das Produkt **67h** konnte als weißer Feststoff (0.162 g, 0.426 mmol, 43 %) erhalten werden.

1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 11.95 (s, 1H), 11.39 (s, 1H), 7.84 – 7.62 (m, 2H), 7.08 – 6.90 (m, 2H), 4.35 (s, 2H), 4.01 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 3.78 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 1.79 – 1.65 (m, 2H), 1.52 (p, $J = 6.8$ Hz, 2H), 1.44 – 1.15 (m, 10H), 0.87 (dt, $J = 23.8, 7.2$ Hz, 6H)

^{13}C -NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 165.19, 164.49, 161.64, 129.10, 123.18, 114.19, 75.27, 73.47, 67.71, 30.99, 28.21, 27.62, 27.46, 24.96, 22.01, 21.85, 13.88

HPLC $t_R = 16.75$ min, Area (AUC) = 99.5 %

Schmelzpunkt $T_M = 110.9$ °C

N-[2-(*tert*-Butoxyamino)-2-oxoethoxy]-4-(*pentyl*oxy)benzamid (**67i**)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV4-B** mit Schlüsselintermediat **II (65)** als Carbonsäure und das Produkt **67i** konnte als gelbes Öl (0.194 g, 0.550 mmol, 55 %) erhalten werden.

1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 11.98 (s, 1H), 10.91 (s, 1H), 7.77 – 7.69 (m, 2H), 7.03 – 6.97 (m, 2H), 4.39 (s, 2H), 4.02 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 1.76 – 1.68 (m, 2H), 1.43 – 1.30 (m, 4H), 1.17 (s, 9H), 0.89 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H)

^{13}C -NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 165.60, 165.45, 161.57, 128.99, 123.11, 114.15, 80.76, 73.72, 67.66, 28.09, 27.50, 26.14, 21.69, 13.71

HPLC $t_R = 13.95$ min, Area (AUC) ≥ 99.9 %

N-[2-Oxo-2-((*prop*-2-yn-1-yloxy)amino)ethoxy]-4-(*pentyl*oxy)benzamid (**67j**)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV3** mit Schlüsselintermediat **II (65)** als Carbonsäure und das Produkt **67j** konnte als weißer Feststoff (0.176 g, 0.526 mmol, 74 %) erhalten werden.

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11.94 (s, 1H), 11.69 (s, 1H), 7.82 – 7.59 (m, 2H), 7.10 – 6.90 (m, 2H), 4.50 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H), 4.38 (s, 2H), 4.01 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 3.58 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H), 1.83 – 1.55 (m, 2H), 1.37 (tdt, $J = 8.0, 3.4, 2.2$ Hz, 4H), 0.95 – 0.80 (m, 3H)

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 165.10, 161.61, 129.14, 123.22, 114.20, 78.81, 78.55, 73.29, 67.71, 62.71, 28.22, 27.63, 21.86, 13.90

HPLC $t_R = 12.96$ min, Area (AUC) = 96.9 %

Schmelzpunkt $T_M = 113$ °C

N-[2-Oxo-2-((1-phenylethoxy)amino)ethoxy]-4-(pentyloxy)benzamid (**67k**)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV3** mit Schlüsselintermediat **II (65)** als Carbonsäure und das Produkt **67k** konnte als weißer Feststoff (0.144 g, 0.360 mmol, 51 %) erhalten werden.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.71 (s, 2H), 7.81 – 7.59 (m, 2H), 7.52 – 7.14 (m, 5H), 7.09 – 6.84 (m, 2H), 4.96 (q, *J* = 6.4 Hz, 1H), 4.28 (s, 2H), 4.01 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 1.71 (q, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.55 – 1.20 (m, 7H), 0.98 – 0.79 (m, 3H)

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164.72 (br s), 161.44, 141.15, 128.93, 128.09, 127.73, 126.48, 123.26, 114.08, 81.78, 73.22, 67.65, 28.10, 27.50, 21.69, 20.59, 13.71

HPLC *t_R* = 15.64 min, Area (AUC) = 98.8 %

Schmelzpunkt *T_M* = 72.9 °C

N-[2-Oxo-2-(phenoxyamino)ethoxy]-4-(pentyloxy)benzamid (**67l**)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV4-A** mit Schlüsselintermediat **II (65)** als Carbonsäure und das Produkt **67l** konnte als beigefarbener Feststoff (0.212 g, 0.568 mmol, 57 %) erhalten werden.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.27 (s, 1H), 12.05 (s, 1H), 7.77 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.38 – 7.22 (m, 2H), 7.13 – 6.93 (m, 5H), 4.56 (s, 2H), 4.03 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 1.72 (p, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.37 (tdt, *J* = 8.3, 3.7, 2.2 Hz, 4H), 0.94 – 0.85 (m, 3H)

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.44, 165.22, 161.58, 159.16, 129.30, 129.03, 123.21, 122.41, 114.16, 112.86, 73.19, 67.67, 28.09, 27.50, 21.69, 13.71

HPLC *t_R* = 14.91 min, Area (AUC) ≥ 99.9 %

Schmelzpunkt *T_M* = 73.9 °C

N-[2-Oxo-2-(phenethylamino)ethoxy]-4-(pentyloxy)benzamid (**67m**)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV4-B** mit Schlüsselintermediat **II (65)** als Carbonsäure und das Produkt **67m** konnte als gelber Feststoff (0.178 g, 0.463 mmol, 46 %) erhalten werden.

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11.83 (s, 1H), 8.58 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 7.78 – 7.68 (m, 2H), 7.28 – 7.13 (m, 5H), 7.05 – 6.95 (m, 2H), 4.32 (s, 2H), 4.02 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 3.37 (dt, $J = 7.8, 6.3$ Hz, 2H), 2.75 (t, $J = 8.1, 6.6$ Hz, 2H), 1.78 – 1.65 (m, 2H), 1.46 – 1.26 (m, 4H), 0.94 – 0.84 (m, 3H)

^{13}C -NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 168.27, 161.93, 139.60, 129.38, 128.93, 128.63, 126.43, 123.90, 114.62, 75.20, 68.15, 40.52, 35.41, 28.59, 27.99, 22.19, 14.21

HPLC $t_R = 15.18$ min, Area (AUC) = 99.4 %

Schmelzpunkt $T_M = 128$ °C

N-[2-(Benzylamino)-2-oxoethoxy]-4-(pentyloxy)benzamid (**67n**)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV4-B** mit Schlüsselintermediat **II (65)** als Carbonsäure und das Produkt **67n** konnte als orangefarbener Feststoff (0.269 g, 0.726 mmol, 73 %) erhalten werden.

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11.85 (s, 1H), 8.92 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 7.82 – 7.60 (m, 2H), 7.39 – 7.16 (m, 5H), 7.10 – 6.91 (m, 2H), 4.43 (s, 2H), 4.37 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H), 4.02 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 1.81 – 1.61 (m, 2H), 1.37 (dddd, $J = 9.1, 6.5, 5.1, 2.7$ Hz, 4H), 0.97 – 0.80 (m, 3H)

^{13}C -NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 167.78, 161.50, 138.86, 128.88, 128.11, 127.06, 126.67, 123.16, 114.15, 74.74, 67.66, 41.70, 28.09, 27.49, 21.69, 13.71

HPLC $t_R = 14.68$ min, Area (AUC) = 98.2 %

Schmelzpunkt $T_M = 74.1$ °C

N-[2-((Benzyloxy)(methyl)amino)-2-oxoethoxy]-4-(pentyloxy)benzamid (**67o**)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV4-B** mit Schlüsselintermediat **II (65)** als Carbonsäure und das Produkt **67o** konnte als gelber Feststoff (0.119 g, 0.298 mmol, 30 %) erhalten werden.

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11.68 (s, 1H), 7.82 – 7.61 (m, 2H), 7.55 – 7.31 (m, 5H), 7.03 – 6.88 (m, 2H), 5.75 (s, 1H), 4.90 (s, 2H), 4.65 (s, 2H), 4.00 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 3.19 (s, 3H), 1.79 – 1.61 (m, 2H), 1.47 – 1.27 (m, 4H), 0.95 – 0.80 (m, 3H)

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 169.17, 164.46, 161.38, 134.50, 129.55, 129.11, 128.82, 128.51, 123.83, 114.04, 75.42, 71.76, 67.66, 40.35, 28.24, 27.64, 21.87, 13.91

HPLC t_R = 15.18 min, Area (AUC) = 99.5 %

Schmelzpunkt T_M = 77.9 °C

5.3.5.2 Einführung von Anilid-Strukturen

N-[2-Oxo-2-(phenylamino)ethoxy]-4-(pentyloxy)benzamid (**67p**)

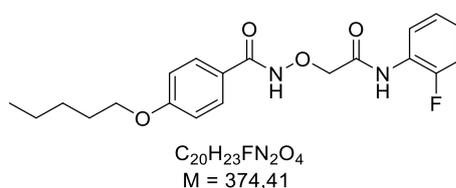
Die Synthese erfolgte gemäß **ASV3** mit Schlüsselintermediat **II (65)** als Carbonsäure und das Produkt **67p** konnte als weißer Feststoff (0.173 g, 0.485 mmol, 68 %) erhalten werden.

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.20 (s, 1H), 10.67 (s, 1H), 7.83 – 7.73 (m, 2H), 7.73 – 7.58 (m, 2H), 7.41 – 7.27 (m, 2H), 7.15 – 7.04 (m, 1H), 7.04 – 6.90 (m, 2H), 4.56 (s, 2H), 4.02 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 1.72 (p, $J = 6.7$ Hz, 2H), 1.36 (tdd, $J = 9.1, 5.8, 4.3$ Hz, 4H), 0.93 – 0.84 (m, 3H)

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 166.86, 165.84, 161.78, 138.24, 129.22, 128.89, 123.73, 122.85, 119.19, 114.30, 75.53, 67.74, 28.20, 27.61, 21.85, 13.89

HPLC $t_R = 16.52$ min, Area (AUC) = 95.9 %

Schmelzpunkt $T_M = 81$ °C

N-[2-((2-Fluorophenyl)amino)-2-oxoethoxy]-4-(pentyloxy)benzamid (**67q**)

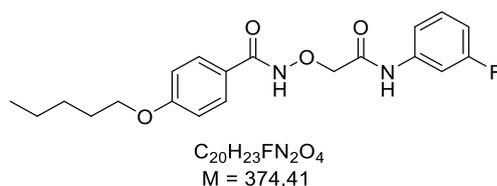
Die Synthese erfolgte gemäß **ASV4-B** mit Schlüsselintermediat **II (65)** als Carbonsäure und das Produkt **67q** konnte als gelber Feststoff (0.155 g, 0.413 mmol, 83 %) erhalten werden.

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.15 (s, 1H), 10.42 (s, 1H), 8.05 – 7.86 (m, 1H), 7.80 – 7.70 (m, 2H), 7.36 – 7.24 (m, 1H), 7.24 – 7.11 (m, 2H), 7.07 – 6.94 (m, 2H), 4.62 (s, 2H), 4.02 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 1.72 (s, 2H), 1.37 (tdd, $J = 9.0, 5.6, 4.2$ Hz, 4H), 0.96 – 0.79 (m, 3H)

^{13}C -NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 167.32, 165.64, 161.73, 158.85 (d, $J = 252.1$ Hz), 129.19, 125.72, 125.36, 124.44, 123.79, 122.97, 115.60 (d, $J = 19.1$ Hz), 114.27, 75.50, 67.73, 28.21, 27.62, 21.85, 13.90

HPLC $t_R = 15.74$ min, Area (AUC) ≥ 99.9 %

Schmelzpunkt $T_M = 90.8$ °C

N-[2-((3-Fluorophenyl)amino)-2-oxoethoxy]-4-(pentyloxy)benzamid (**67r**)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV4-B** mit Schlüsselintermediat **II (65)** als Carbonsäure und das Produkt **67r** konnte als weißer Feststoff (0.467 g, 1.25 mmol, 83 %) erhalten werden.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.20 (s, 1H), 10.87 (s, 1H), 7.82 – 7.71 (m, 2H), 7.70 – 7.59 (m, 1H), 7.47 – 7.32 (m, 2H), 7.07 – 6.97 (m, 2H), 6.97 – 6.88 (m, 1H), 4.58 (s, 2H), 4.02 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 1.72 (p, *J* = 6.6 Hz, 2H), 1.37 (tdd, *J* = 9.1, 5.7, 4.3 Hz, 4H), 0.95 – 0.82 (m, 3H)

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167.32, 165.59, 162.94, 161.56, 139.93, 130.60, 129.22, 122.84, 115.04, 114.30, 110.25 (d, *J* = 20.9 Hz), 106.05 (d, *J* = 26.3 Hz), 75.45, 67.74, 28.20, 27.61, 21.84, 13.89

HPLC *t_R* = 16.85 min, Area (AUC) ≥ 99.9 %

Schmelzpunkt *T_M* = 108.4 °C

N-[2-((4-Fluorophenyl)amino)-2-oxoethoxy]-4-(pentyloxy)benzamid (**67s**)

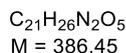
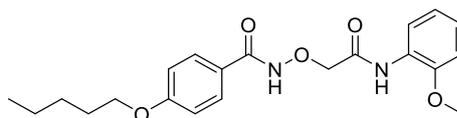
Die Synthese erfolgte gemäß **ASV4-B** mit Schlüsselintermediat **II (65)** als Carbonsäure und das Produkt **67s** konnte als rot-brauner Feststoff (0.174 g, 0.465 mmol, 93 %) erhalten werden.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.19 (s, 1H), 10.72 (s, 1H), 7.77 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.72 – 7.64 (m, 2H), 7.19 (t, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.01 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 4.56 (s, 2H), 4.02 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 1.72 (p, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.36 (tdd, *J* = 4.4, 5.8, 9.2 Hz, 4H), 0.95 – 0.80 (m, 3H)

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.79, 165.86, 161.80, 158.26 (d, *J* = 240.0 Hz), 134.67, 129.23, 122.85, 120.99 (d, *J* = 7.9 Hz), 115.48 (d, *J* = 22.3 Hz), 114.29, 75.48, 67.74, 28.21, 27.62, 21.86, 13.88

HPLC *t_R* = 16.67 min, Area (AUC) ≥ 99.9 %

Schmelzpunkt *T_M* = 111.7 °C

N-[2-((2-Methoxyphenyl)amino)-2-oxoethoxy]-4-(pentyloxy)benzamid (**67t**)

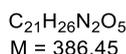
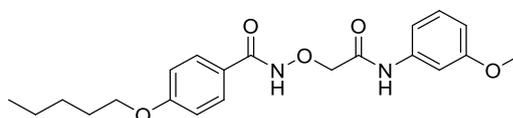
Die Synthese erfolgte gemäß **ASV3** mit Schlüsselintermediat **II (65)** als Carbonsäure und das Produkt **67t** konnte als weißer Feststoff (0.108 g, 0.280 mmol, 56 %) erhalten werden.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.05 (s, 1H), 9.77 (s, 1H), 8.03 (dd, *J* = 8.0, 1.4 Hz, 1H), 7.80 – 7.67 (m, 2H), 7.14 – 6.89 (m, 5H), 4.56 (s, 2H), 4.02 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.84 (s, 3H), 1.72 (p, *J* = 6.6 Hz, 2H), 1.44 – 1.29 (m, 4H), 0.94 – 0.84 (m, 3H)

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.43, 165.12, 161.55, 149.39, 129.00, 126.56, 124.57, 123.20, 121.09, 120.20, 114.16, 111.29, 75.39, 67.66, 55.78, 28.09, 27.49, 21.69, 13.71

HPLC *t_R* = 15.80 min, Area (AUC) = 96.2 %

Schmelzpunkt *T_M* = 98.5 °C

N-[2-((3-Methoxyphenyl)amino)-2-oxoethoxy]-4-(pentyloxy)benzamid (**67u**)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV3** mit Schlüsselintermediat **II (65)** als Carbonsäure und das Produkt **67u** konnte als weißer Feststoff (0.033 g, 0.086 mmol, 17 %) erhalten werden.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.19 (s, 1H), 10.64 (s, 1H), 7.87 – 7.66 (m, 2H), 7.37 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.25 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.19 (dt, *J* = 8.2, 1.5 Hz, 1H), 7.09 – 6.92 (m, 2H), 6.68 (ddd, *J* = 8.0, 2.5, 1.3 Hz, 1H), 4.55 (s, 2H), 4.02 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.74 (s, 3H), 1.72 (p, *J* = 6.6 Hz, 2H), 1.37 (tdd, *J* = 9.1, 5.8, 4.3 Hz, 4H), 0.94 – 0.83 (m, 3H)

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.74, 165.74, 161.70, 159.51, 139.27, 129.54, 129.09, 122.84, 114.23, 111.50, 109.00, 105.19, 75.47, 67.69, 54.93, 28.08, 27.49, 21.68, 13.71

HPLC *t_R* = 16.49 min, Area (AUC) = 98.6 %

Schmelzpunkt *T_M* = 62.7 °C

N-[2-((4-Methoxyphenyl)amino)-2-oxoethoxy]-4-(pentyloxy)benzamid (**67v**)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV3** mit Schlüsselintermediat **II (65)** als Carbonsäure und das Produkt **67v** konnte als beigefarbener Feststoff (0.240 g, 0.622 mmol, 89 %) erhalten werden.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.16 (s, 1H), 10.51 (s, 1H), 7.81 – 7.72 (m, 2H), 7.63 – 7.52 (m, 2H), 7.07 – 6.97 (m, 2H), 6.96 – 6.87 (m, 2H), 4.53 (s, 2H), 4.02 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.73 (s, 3H), 1.77 – 1.64 (m, 2H), 1.47 – 1.25 (m, 4H), 0.94 – 0.83 (m, 3H)

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.30, 165.83, 161.80, 155.54, 131.42, 129.21, 122.88, 120.70, 114.29, 113.99, 75.52, 67.74, 55.16, 28.22, 27.63, 21.86, 13.88

HPLC *t*_R = 15.73 min, Area (AUC) ≥ 99.9 %

Schmelzpunkt T_M = 106 °C

N-[2-Oxo-2-(pyridin-4-ylamino)ethoxy]-4-(pentyloxy)benzamid (**67w**)

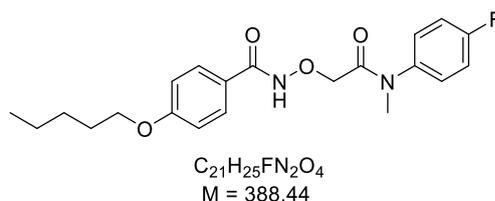
Die Synthese erfolgte gemäß **ASV4-B** mit Schlüsselintermediat **II (65)** als Carbonsäure und das Produkt **67w** konnte als weißer Feststoff (0.146 g, 0.408 mmol, 82 %) erhalten werden.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.21 (s, 1H), 10.99 (s, 1H), 8.55 – 8.36 (m, 2H), 7.84 – 7.71 (m, 2H), 7.70 – 7.56 (m, 2H), 7.13 – 6.91 (m, 2H), 4.61 (s, 2H), 4.02 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 1.72 (p, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.36 (tdd, *J* = 4.2, 5.7, 9.0 Hz, 4H), 0.95 – 0.81 (m, 3H)

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 168.26, 165.83, 161.78, 150.55, 144.81, 129.22, 122.81, 114.28, 113.32, 75.40, 67.74, 28.20, 27.62, 21.85, 13.89

HPLC *t*_R = 10.44 min, Area (AUC) = 99 %

Schmelzpunkt T_M = 186 °C

N-[2-((4-Fluorophenyl)(methyl)amino)-2-oxoethoxy]-4-(pentyloxy)benzamid (**67x**)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV4-B** mit Schlüsselintermediat **II (65)** als Carbonsäure und das Produkt **67x** konnte als grauer Feststoff (0.075 g, 0.193 mmol, 39 %) erhalten werden.

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11.65 (s, 1H), 7.68 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.42 (d, J = 6.5 Hz, 2H), 7.26 (t, J = 8.5 Hz, 2H), 6.96 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 4.26 (s, 2H), 4.00 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 3.17 (s, 3H), 1.70 (q, J = 6.8 Hz, 2H), 1.37 (ddt, J = 12.0, 8.8, 4.4 Hz, 4H), 0.89 (t, J = 6.9 Hz, 3H)

^{13}C -NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 166.66, 164.29, 161.31, 138.91, 129.35, 128.95, 123.74, 116.48, 114.00, 72.12, 67.62, 36.78, 28.13, 27.53, 21.73, 13.76

HPLC t_R = 14.91 min, Area (AUC) = 98.4 %

Schmelzpunkt T_M = 79 °C

5.3.5.3 Einführung von Hydrazid-Strukturen

N-[2-Oxo-2-(2-(2-phenylacetyl)hydrazinyl)ethoxy]-4-(pentyloxy)benzamid (**67y**)

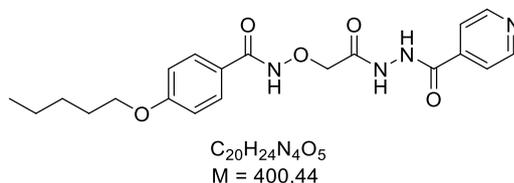
Die Synthese erfolgte gemäß **ASV4-A** mit Schlüsselintermediat **II (65)** als Carbonsäure und das Produkt **67y** konnte als weißer Feststoff (0.805 g, 1.95 mmol, 65 %) erhalten werden.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.92 (s, 1H), 10.24 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 10.17 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 7.81 – 7.65 (m, 2H), 7.38 – 7.16 (m, 5H), 7.06 – 6.91 (m, 2H), 4.48 (s, 2H), 4.01 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.49 (s, 2H), 1.72 (p, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.37 (tdd, *J* = 8.8, 5.6, 4.2 Hz, 4H), 0.94 – 0.83 (m, 3H)

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 168.64, 166.42, 165.15, 161.54, 135.49, 128.98, 128.89, 128.06, 126.34, 123.23, 114.13, 73.64, 67.66, 39.52 (dp, *J* = 42.0, 21.0 Hz), 28.09, 27.50, 21.69, 13.71

HPLC *t*_R = 13.19 min, Area (AUC) = 99.5 %

Schmelzpunkt *T*_M = 160.5 °C

N-[2-(2-Isonicotinoylhydrazinyl)-2-oxoethoxy]-4-(pentyloxy)benzamid (**67z**)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV4-B** mit Schlüsselintermediat **II (65)** als Carbonsäure und das Produkt **67z** konnte als weißer Feststoff (0.278 g, 0.694 mmol, 69 %) erhalten werden.

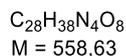
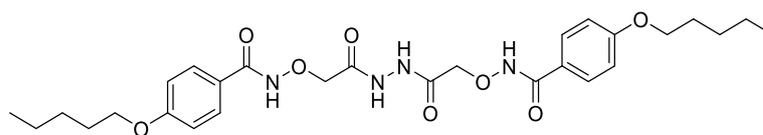
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.21 (s, 1H), 8.76 – 8.58 (m, 2H), 7.86 – 7.62 (m, 4H), 6.95 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 4.44 (d, *J* = 2.8 Hz, 2H), 4.00 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 1.72 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.36 (tq, *J* = 13.3, 7.4, 6.6 Hz, 4H), 0.89 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H)

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164.71, 162.08, 160.49, 149.45, 148.88, 128.62, 121.25, 120.94, 113.73, 73.59, 67.54, 28.18, 27.55, 21.73, 13.74

MS (ESI) (*m/z*) berechnet für C₂₀H₂₄N₄O₅ [M+H]⁺: 401.44; gefunden: 401.18

HPLC *t*_R = 9.71 min, Area (AUC) ≥ 99.9 %

Schmelzpunkt *T*_M = 189.1 °C

N,N'-[[(Hydrazine-1,2-diylbis(2-oxoethane-2,1-diyl))bis(oxy)]bis[4-(pentyloxy)benzamid] (**68**)

Die Darstellung des Hydrazids **68** erfolgte in Anlehnung an die Vorschrift von ZAREI und NAKHLI.²¹⁵

1.00 Äq. des Schlüsselintermediates **II** (**65**) sowie 1.00 Äq. (Chloromethylen)dimethyliminium Chlorid (Vilsmeier-Reagenz) wurden zusammen mit 3.00 Äq. Triethylamin in trockenem Acetonitril (0.1 M) gelöst. Nach Zugabe von 0.50 Äq. Hydrazin Monohydrat wurde für 6 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung abgebrochen und die wässrige Phase dreimal mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt aus *n*-Hexan/Essigsäureethylester umkristallisiert. Das Produkt **68** konnte als weißer Feststoff (0.047 g, 0.084 mmol, 8 %) erhalten werden.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.96 (s, 2H), 10.34 (s, 2H), 7.73 (d, *J* = 8.7 Hz, 4H), 7.09 – 6.91 (m, 4H), 4.51 (s, 4H), 4.02 (t, *J* = 6.5 Hz, 4H), 1.72 (p, *J* = 6.6 Hz, 4H), 1.52 – 1.22 (m, 8H), 0.89 (t, *J* = 6.9 Hz, 6H)

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.58, 165.30, 161.64, 129.13, 123.23, 114.21, 73.69, 67.72, 28.21, 27.62, 21.85, 13.88

HPLC $t_R = 15.64$ min, Area (AUC) = 97.7 %

Schmelzpunkt $T_M = 162.5$ °C

5.3.5.4 Maskierung der Hydrolysefragmente

Methyl-2-[(4-(pentyloxy)benzamido)oxy]acetat (71a)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV4-B** mit α -Aminooxyessigsäuremethylester (**70**) als *N*-Nucleophil und das Produkt **71a** konnte als weißer Feststoff (0.358 g, 1.21 mmol, 81 %) erhalten werden.

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11.81 (s, 1H), 7.71 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.03 – 6.92 (m, 2H), 4.56 (s, 2H), 4.01 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 3.70 (s, 3H), 1.71 (p, $J = 6.5$ Hz, 2H), 1.37 (tdd, $J = 8.9, 5.6, 4.2$ Hz, 4H), 0.94 – 0.84 (m, 3H)

^{13}C -NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 169.35, 165.18, 161.87, 129.48, 124.15, 114.53, 72.22, 68.12, 51.98, 28.59, 28.00, 22.18, 14.21

HPLC $t_R = 13.16$ min, Area (AUC) ≥ 99.9 %

Schmelzpunkt $T_M = 93.5$ °C

Methyl-2-[(2-fluoro-4-(pentyloxy)benzamido)oxy]acetat (71b)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV4-B** mit α -Aminooxyessigsäuremethylester (**70**) als *N*-Nucleophil und das Produkt **71b** konnte als weißer Feststoff (0.536 g, 1.71 mmol, 86 %) erhalten werden.

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11.52 (s, 1H), 7.54 (t, $J = 8.5$ Hz, 1H), 6.97 – 6.75 (m, 2H), 4.56 (s, 2H), 4.02 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 3.70 (s, 3H), 1.71 (p, $J = 6.8$ Hz, 2H), 1.37 (tq, $J = 7.6, 4.6, 3.8$ Hz, 4H), 0.96 – 0.82 (m, 3H)

^{13}C -NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 168.92, 162.30 (d, $J = 11.2$ Hz), 161.91, 160.52 (d, $J = 250.2$ Hz), 131.17 (d, $J = 4.4$ Hz), 112.72 (d, $J = 14.4$ Hz), 110.98, 102.20 (d, $J = 25.9$ Hz), 71.82, 68.31, 51.69, 28.07, 27.56, 21.82, 13.88

HPLC $t_R = 14.17$ min, Area (AUC) = 96.2 %

Schmelzpunkt $T_M = 71.9$ °C

Methyl-2-[(3-fluoro-4-(pentyloxy)benzamido)oxy]acetat (**71c**)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV4-B** mit α -Aminooxyessigsäuremethylester (**70**) als *N*-Nucleophil und das Produkt **71c** konnte als gelbes Öl (0.473 g, 1.51 mmol, 76 %) erhalten werden.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.93 (s, 1H), 7.69 – 7.51 (m, 2H), 7.24 (t, *J* = 8.5 Hz, 1H), 4.57 (s, 2H), 4.09 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.70 (s, 3H), 1.81 – 1.67 (m, 2H), 1.36 (dddd, *J* = 14.5, 10.2, 6.5, 2.2 Hz, 4H), 0.97 – 0.79 (m, 3H)

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 169.02, 163.56, 150.90 (d, *J* = 244.7 Hz), 149.51 (d, *J* = 10.4 Hz), 124.47 (d, *J* = 3.3 Hz), 123.92, 114.81 (d, *J* = 19.9 Hz), 114.19, 71.77, 68.78, 51.68, 28.11, 27.52, 21.81, 13.87

HPLC t_R = 13.49 min, Area (AUC) = 95.3 %

Methyl-2-[(2-chloro-4-(pentyloxy)benzamido)oxy]acetat (**71d**)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV4-B** mit α -Aminooxyessigsäuremethylester (**70**) als *N*-Nucleophil und das Produkt **71d** konnte als gelber Feststoff (0.342 g, 1.04 mmol, 52 %) erhalten werden.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.75 (s, 1H), 7.34 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.06 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.94 (dd, *J* = 8.6, 2.5 Hz, 1H), 4.58 (s, 2H), 4.01 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.70 (s, 3H), 1.70 (p, *J* = 6.8 Hz, 2H), 1.45 – 1.24 (m, 4H), 0.96 – 0.80 (m, 3H)

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 168.86, 163.46, 160.37, 131.78, 130.53, 125.34, 115.46, 113.29, 71.69, 68.14, 51.71, 28.10, 27.55, 21.82, 13.89

HPLC t_R = 14.00 min, Area (AUC) \geq 99.9 %

Schmelzpunkt T_M = 68.8 °C

Methyl-2-[(3-chloro-4-(pentyloxy)benzamido)oxy]acetat (71e)

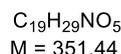
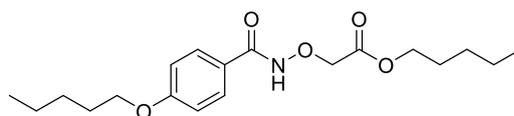
Die Synthese erfolgte gemäß **ASV4-B** mit α -Aminooxyessigsäuremethylester (**70**) als *N*-Nucleophil und das Produkt **71e** konnte als weißer Feststoff (0.320 g, 0.971 mmol, 49 %) erhalten werden.

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11.96 (s, 1H), 7.82 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 7.73 (dd, J = 8.6, 2.2 Hz, 1H), 7.22 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 4.57 (s, 2H), 4.11 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 3.70 (s, 3H), 1.75 (p, J = 6.6 Hz, 2H), 1.38 (dddd, J = 14.1, 12.6, 6.9, 4.2 Hz, 4H), 0.89 (t, J = 7.0 Hz, 3H)

^{13}C -NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 169.02, 163.45, 156.61, 128.81, 127.90, 124.43, 121.14, 113.21, 71.77, 68.86, 51.68, 28.06, 27.56, 21.78, 13.90

HPLC t_R = 14.48 min, Area (AUC) = 98.9 %

Schmelzpunkt T_M = 72.3 °C

Pentyl-2-[(4-(pentyloxy)benzamido)oxy]acetat (72)

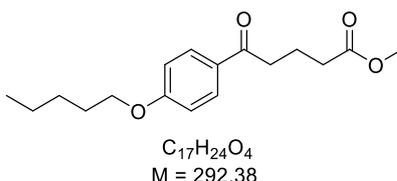
1.00 Äq. der Hydroxamsäure **60** wurden in trockenem *N,N*-Dimethylformamid (0.2 M) gelöst. Bei 0 °C wurden 1.00 Äq. Natriumhydrid zugegeben und für 10 min gerührt. Nach tropfenweiser Zugabe von 1.00 Äq. Bromessigsäurepentylester wurde für 6 h refluxiert und für weitere 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung aufgenommen und dreimal mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit dem Eluentengemisch *n*-Hexan/Essigsäureethylester gereinigt und aus dem gleichen Gemisch umkristallisiert. Das Produkt **72** konnte als weißer Feststoff (0.138 g, 0.393 mmol, 39 %) erhalten werden.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.78 (s, 1H), 7.79 – 7.63 (m, 2H), 7.04 – 6.90 (m, 2H), 4.55 (s, 2H), 4.11 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 4.00 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 1.79 – 1.65 (m, 2H), 1.59 (dq, *J* = 11.6, 6.6 Hz, 2H), 1.43 – 1.22 (m, 8H), 0.87 (dt, *J* = 26.5, 6.9 Hz, 6H)

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 168.66, 164.78, 161.48, 129.11, 123.67, 114.11, 71.77, 67.70, 64.42, 28.23, 27.77, 27.64, 27.46, 21.87, 21.75, 13.91, 13.81

HPLC *t_R* = 17.17 min, Area (AUC) = 96.1 %

Schmelzpunkt *T_M* = 71.8 °C

Methyl-5-oxo-5-[4-(pentyloxy)phenyl]pentanoat (73)

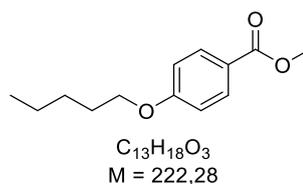
1.00 Äq. der δ -Ketocarbonsäure **58** wurden in Methanol gelöst und mit 0.200 Äq. konzentrierter Schwefelsäure versetzt. Das Gemisch wurde für 16 h bei Raumtemperatur gerührt, bevor das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt wurde. Der Rückstand wurde in Essigsäureethylester aufgenommen und erschöpfend mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und abschließend mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde aus *n*-Hexan/Essigsäureethylester umkristallisiert und das Produkt **73** konnte als orangefarbener Feststoff (0.538 g, 0.184 mmol, 99 %) erhalten werden.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 7.97 – 7.86 (m, 2H), 7.08 – 6.97 (m, 2H), 4.05 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 3.59 (s, 3H), 2.99 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.38 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.84 (p, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.73 (p, $J = 6.7$ Hz, 2H), 1.47 – 1.27 (m, 4H), 0.97 – 0.81 (m, 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, DMSO- d_6) δ 197.78, 173.15, 162.53, 130.14, 129.35, 114.25, 67.82, 51.24, 36.58, 32.55, 28.20, 27.61, 21.85, 19.34, 13.89

HPLC $t_R = 17.35$ min, Area (AUC) = 97.0 %

Schmelzpunkt $T_M = 42.9$ °C

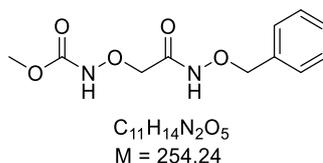
Methyl-4-(pentyloxy)benzoat (**74**)

Die Synthese erfolgte in Anlehnung an die Vorschrift von DE SOUSA *et al.*²⁸⁹ und das Produkt **74** konnte als farbloses Öl (0.574 g, 2.58 mmol, 86 %) erhalten werden.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.05 – 7.70 (m, 2H), 7.18 – 6.81 (m, 2H), 4.02 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.80 (s, 3H), 1.83 – 1.61 (m, 2H), 1.36 (tdd, *J* = 9.1, 5.8, 4.3 Hz, 4H), 0.99 – 0.74 (m, 3H)

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.87, 162.57, 131.18, 121.63, 114.36, 67.80, 51.73, 28.19, 27.60, 21.84, 13.85

HPLC $t_R = 17.91$ min, Area (AUC) = 98.8 %

Methyl-[2-((benzyloxy)amino)-2-oxoethoxy]carbamate (**76**)

1.00 Äq. des Schlüsselintermediates **I (13)** wurden in Tetrahydrofuran/Wasser im Verhältnis 5:1 (0.2 M) gelöst. Nach Zugabe von 1.30 Äq. Methylchloroformiat und 2.00 Äq. Natriumhydrogencarbonat wurde für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Verdünnung mit entmineralisiertem Wasser beendet und die wässrige Phase wurde dreimal mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit dem Eluentengemisch *n*-Hexan/Essigsäureethylester gereinigt und aus diesem Gemisch umkristallisiert. Das Produkt **76** konnte als weißer Feststoff (0.160 g, 0.629 mmol, 63 %) erhalten werden.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.90 (d, *J* = 144.8 Hz, 2H), 7.52 – 7.19 (m, 5H), 4.82 (s, 2H), 4.16 (s, 2H), 3.61 (s, 3H)

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164.93, 158.09, 136.14, 129.17, 128.68, 77.92, 73.31, 52.46

HPLC $t_R = 7.47$ min, Area (AUC) ≥ 99.9 %

Schmelzpunkt $T_M = 88.2$ °C

5.3.5.5 Bioisosterer Austausch

N-(Cyanomethoxy)-4-(pentyloxy)benzamid (**78a**)

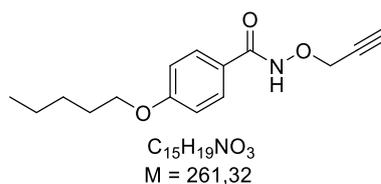
1.00 Äq. der Hydroxamsäure **60** wurden in trockenem *N,N*-Dimethylformamid (0.2 M) gelöst. Bei 0 °C wurden 1.00 Äq. Natriumhydrid zugegeben und für 10 min gerührt. Nach tropfenweiser Zugabe von 1.00 Äq. Bromacetonitril wurde für 6 h refluxiert und für weitere 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung aufgenommen und dreimal mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit dem Eluentengemisch *n*-Hexan/Essigsäureethylester gereinigt und aus dem gleichen Gemisch umkristallisiert. Das Produkt **78a** konnte als weißer Feststoff (1.83 g, 6.98 mmol, 70 %) erhalten werden.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.10 (s, 1H), 7.92 – 7.56 (m, 2H), 7.26 – 6.79 (m, 2H), 4.90 (s, 2H), 4.02 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 1.72 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 1.37 (dtt, $J = 9.3, 6.7, 5.3, 2.4$ Hz, 4H), 0.98 – 0.74 (m, 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, DMSO- d_6) δ 165.00, 161.72, 129.13, 123.15, 116.78, 114.27, 67.73, 60.86, 28.21, 27.63, 21.85, 13.90

HPLC $t_R = 13.52$ min, Area (AUC) = 95.8 %

Schmelzpunkt $T_M = 136.3$ °C

4-(Pentyloxy)-N-(prop-2-yn-1-yloxy)benzamid (**78b**)

1.00 Äq. der Hydroxamsäure **60** wurden in trockenem *N,N*-Dimethylformamid (0.2 M) gelöst. Bei 0 °C wurden 1.00 Äq. Natriumhydrid zugegeben und für 10 min gerührt. Nach tropfenweiser Zugabe von 1.00 Äq. Propargylbromid (80 % in Toluol) wurde für 6 h refluxiert und für weitere 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung aufgenommen und dreimal mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit dem Eluentengemisch *n*-Hexan/Essigsäureethylester gereinigt und aus dem gleichen Gemisch umkristallisiert. Das Produkt **78b** konnte als beigefarbener Feststoff (0.400 g, 1.53 mmol, 77 %) erhalten werden.

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11.73 (s, 1H), 7.78 – 7.65 (m, 2H), 7.04 – 6.93 (m, 2H), 4.56 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H), 4.05 – 3.99 (m, 2H), 3.59 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H), 1.72 (p, $J = 6.6$ Hz, 2H), 1.37 (dddd, $J = 11.8, 9.0, 6.2, 3.9$ Hz, 4H), 0.89 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H)

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 164.25, 161.42, 128.98, 123.80, 114.14, 78.91, 78.60, 67.68, 62.47, 28.23, 27.64, 21.86, 13.90

HPLC $t_R = 13.81$ min, Area (AUC) = 97.8 %

Schmelzpunkt $T_M = 71.3$ °C

N-[(1*H*-Tetrazol-5-yl)methoxy]-4-(pentylloxy)benzamid (**79**)

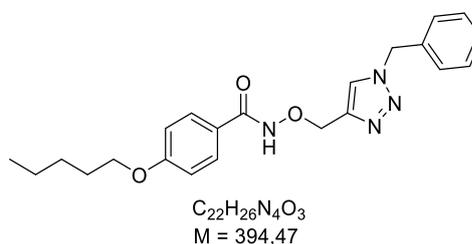
Die Synthese erfolgte gemäß **ASV5-A** und das Produkt **79** konnte als weißer Feststoff (0.184 g, 0.603 mmol, 60 %) erhalten werden.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.73 (s, 1H), 7.67 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.98 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 5.23 (s, 2H), 4.01 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 1.71 (p, *J* = 6.6 Hz, 2H), 1.46 – 1.28 (m, 4H), 0.89 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H)

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164.57, 161.49, 131.33, 129.06, 123.66, 114.13, 67.69, 65.02, 28.22, 27.63, 21.86, 13.90

HPLC *t_R* = 11.69 min, Area (AUC) = 95.3 %

Schmelzpunkt *T_M* = 150.4 °C

N-[(1-Benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy]-4-(pentylloxy)benzamid (**80**)

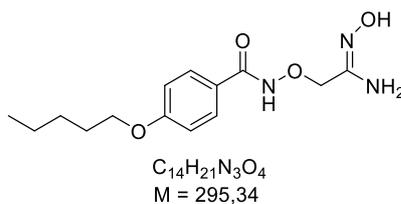
Die Synthese erfolgte gemäß **ASV5-A** und das Produkt **80** konnte als weißer Feststoff (0.439 g, 1.11 mmol, 74 %) erhalten werden.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.57 (s, 1H), 8.28 (s, 1H), 7.72 – 7.65 (m, 2H), 7.42 – 7.26 (m, 5H), 7.03 – 6.89 (m, 2H), 5.61 (s, 2H), 4.96 (s, 2H), 4.01 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 1.77 – 1.65 (m, 2H), 1.45 – 1.26 (m, 4H), 0.89 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H)

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164.11, 161.29, 142.07, 136.07, 128.93, 128.72, 128.07, 127.84, 125.40, 124.14, 114.08, 67.77, 67.66, 52.73, 28.23, 27.64, 21.86, 13.90

HPLC *t_R* = 14.07 min, Area (AUC) ≥ 99.9 %

Schmelzpunkt *T_M* = 125.5 °C

(E)-N-[2-Amino-2-(hydroxyimino)ethoxy]-4-(pentyloxy)benzamid (**81**)

Die Synthese des Amidoxims **81** erfolgte in Anlehnung an die Vorschrift von LOBERA *et al.*²²⁶

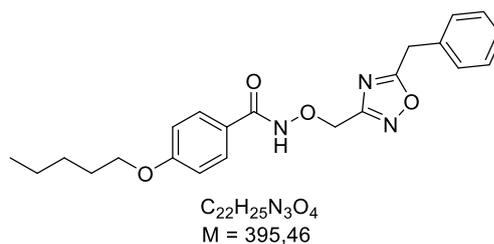
1.00 Äq. des Nitrils **78a** und 0.04 Äq. 8-Hydroxychinolin wurden in Ethanol gelöst (0.1 M). Nach Zugabe von 2.00 Äq. Hydroxylamin-Hydrochlorid (1 M in entmineralisiertem Wasser) und 2.00 Äq. Kaliumcarbonat (0.5 M in entmineralisiertem Wasser) wurde für 6 h refluxiert und für weitere 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in Essigsäureethylester aufgenommen und mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit dem Eluentengemisch Dichlormethan/Methanol gereinigt. Nach Umkristallisation aus *n*-Hexan/Essigsäureethylester konnte das Produkt **81** als beigefarbener Feststoff (0.178 g, 0.603 mmol, 60 %) erhalten werden.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.71 (s, 1H), 9.28 (s, 1H), 7.83 – 7.59 (m, 2H), 7.06 – 6.91 (m, 2H), 5.58 (s, 2H), 4.27 (s, 2H), 4.01 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 1.71 (dt, *J* = 8.1, 6.5 Hz, 2H), 1.49 – 1.26 (m, 4H), 0.89 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H)

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164.57, 161.40, 149.24, 128.98, 123.78, 114.13, 73.95, 67.68, 28.23, 27.63, 21.86, 13.90

HPLC *t*_R = 9.56 min, Area (AUC) = 97 %

Schmelzpunkt *T*_M = 132.7 °C

N-[(5-Benzyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)methoxy]-4-(pentyloxy)benzamid (**82**)

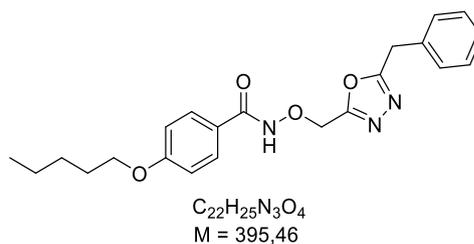
Gemäß **ASV4-B** wurden zunächst 1.20 Äq. des Amidoxims **81** mit 1.00 Äq. Phenyllessigsäure umgesetzt. Ohne weitere Aufreinigung wurde das Gemisch anschließend in Xylol gelöst und für 8 h bei 130 °C gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit dem Eluentengemisch *n*-Hexan/Essigsäureethylester gereinigt. Das Produkt **82** konnte als orangefarbener Feststoff (0.134 g, 0.339 mmol, 85 %) erhalten werden.

1H -NMR (300 MHz, Methanol- d_4) δ 7.73 – 7.55 (m, 2H), 7.39 – 7.26 (m, 6H), 7.02 – 6.85 (m, 2H), 5.03 (s, 2H), 4.32 (s, 2H), 4.02 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 1.79 (p, J = 6.5 Hz, 2H), 1.44 (dddd, J = 14.0, 12.0, 6.8, 2.4 Hz, 4H), 0.95 (t, J = 7.0 Hz, 3H)

^{13}C -NMR (151 MHz, Methanol- d_4) δ 180.71, 168.35, 167.51, 163.89, 135.15, 130.24, 130.10, 129.91, 129.45, 128.59, 115.37, 69.26, 68.78, 33.42, 29.97, 29.33, 23.50, 14.35

HPLC t_R = 15.74 min, Area (AUC) = 98.6 %

Schmelzpunkt T_M = 86.6 °C

N-[(5-Benzyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)methoxy]-4-(pentyloxy)benzamid (**83**)

1.00 Äq. des Hydrazids **67y** sowie 2.00 Äq. Methyl-*N*-(triethylammoniumsulfonyl)carbammat (BURGESS-Reagenz) wurden in Tetrahydrofuran suspendiert und für 8 h refluxiert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in entmineralisiertem Wasser aufgenommen und dreimal mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit dem Eluentengemisch *n*-Hexan/Essigsäureethylester gereinigt und aus diesem Gemisch umkristallisiert. Das Produkt **83** konnte als gelber Feststoff (0.261 g, 0.661 mmol, 66 %) erhalten werden.

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11.76 (s, 1H), 7.72 – 7.54 (m, 2H), 7.42 – 7.22 (m, 5H), 7.08 – 6.88 (m, 2H), 5.07 (s, 2H), 4.31 (s, 2H), 4.01 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 1.80 – 1.63 (m, 2H), 1.37 (tdt, J = 8.1, 3.8, 2.3 Hz, 4H), 0.97 – 0.82 (m, 3H)

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 166.42, 164.51, 162.49, 161.49, 134.32, 128.98, 128.86, 128.70, 127.20, 123.60, 114.17, 67.69, 65.70, 30.67, 28.21, 27.63, 21.86, 13.90

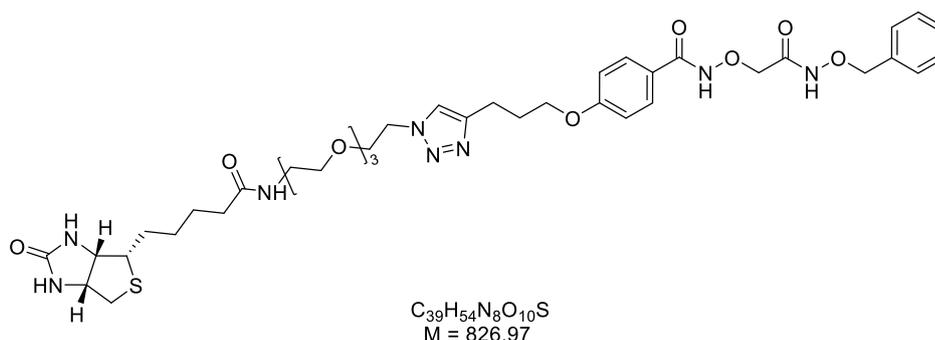
HPLC t_R = 15.01 min, Area (AUC) = 99.2 %

Schmelzpunkt T_M = 98.2 °C

5.3.6 Wirkstoffsonden

5.3.6.1 Affinitätsmarkierung

N-[2-((Benzyloxy)amino)-2-oxoethoxy]-4-[3-(1-(13-oxo-17-((3*a*S,4*S*,6*a*R)-2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)-3,6,9-trioxa-12-azaheptadecyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)propoxy]benzamid (**85**)

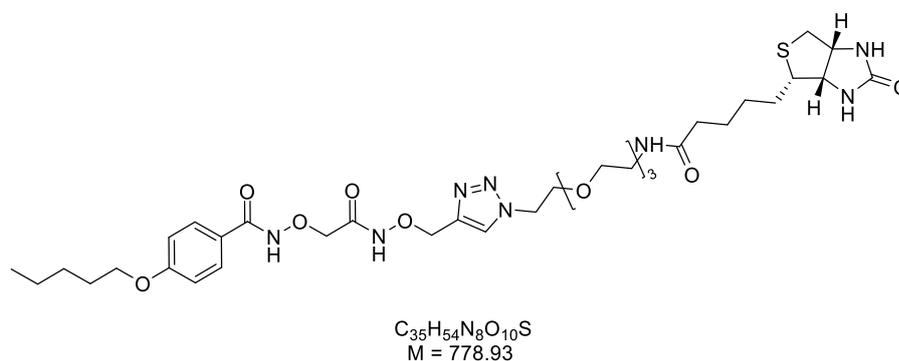


Die Synthese erfolgte gemäß **ASV5-A** und das Produkt **85** konnte als farbloses Öl (0.0036 g, 0.0044 mmol, 78 %) erhalten werden.

HRMS (ESI) (*m/z*) berechnet für $C_{39}H_{54}N_8O_{10}S$ [M+H]⁺: 827.3756; gefunden: 827.3754

HPLC t_R = 8.65 min, Area (AUC) = 95.1 %

N-[2-Oxo-2-(((1-(13-oxo-17-((3*a*S,4*S*,6*a*R)-2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)-3,6,9-trioxa-12-azaheptadecyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)amino)ethoxy]-4-(pentyloxy)benzamid (**86**)



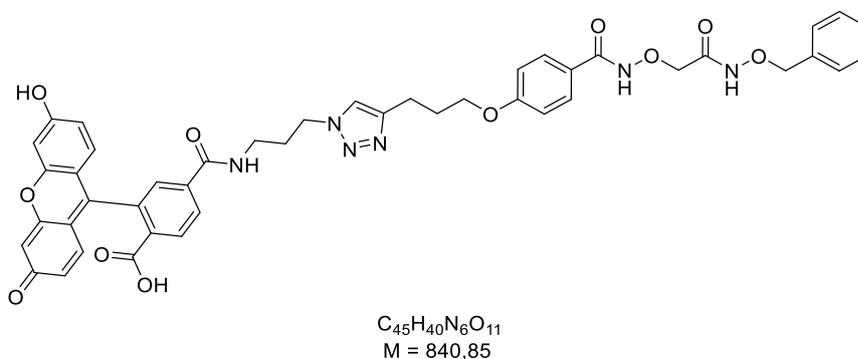
Die Synthese erfolgte gemäß **ASV5-A** und das Produkt **86** konnte als farbloses Öl (0.0071 g, 0.0091 mmol, 92 %) erhalten werden.

HRMS (ESI) (*m/z*) berechnet für $C_{35}H_{54}N_8O_{10}S$ [M+H]⁺: 779.3756; gefunden: 779.3762

HPLC t_R = 10.09 min, Area (AUC) = 96.6 %

5.3.6.2 Fluoreszenzmarkierung

4-[(3-(4-(3-(4-((2-((Benzyloxy)amino)-2-oxoethoxy)carbamoyl)phenoxy)propyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propyl)carbamoyl]-2-(6-hydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoesäure (**88**)

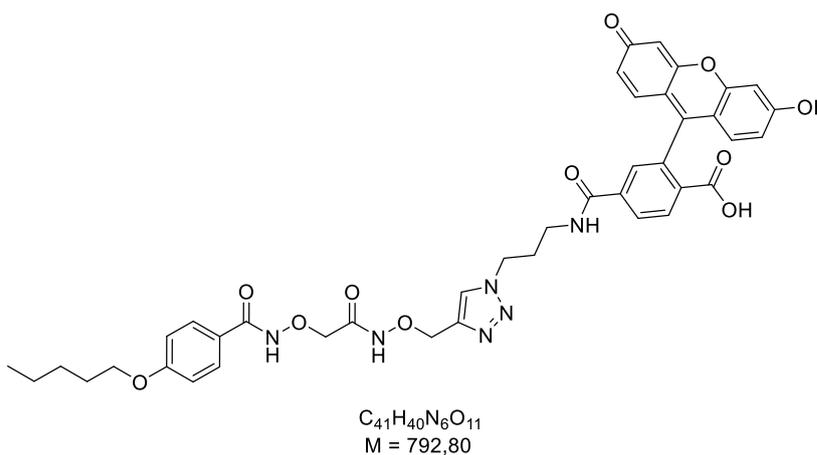


Die Synthese erfolgte gemäß **ASV5-B** und das Produkt **88** konnte als gelbes Öl (0.0015 g, 0.0018 mmol, 17 %) erhalten werden.

MS (ESI) (m/z) berechnet für $C_{45}H_{40}N_6O_{11}$ $[M+H]^+$: 841.85; gefunden: 841.28

HPLC $t_R = 10.49$ min, Area (AUC) = 96.2 %

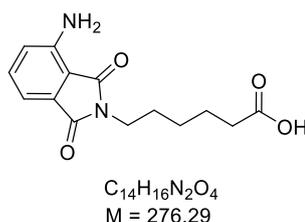
4-[(3-(4-(1,5-dioxo-1-(4-(pentylloxy)phenyl)-3,7-dioxo-2,6-diazaoctan-8-yl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propyl)carbamoyl]-2-(6-hydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoesäure (**89**)



Die Synthese erfolgte gemäß **ASV5-B** und das Produkt **89** konnte als gelbes Öl (0.0051 g, 0.0064 mmol, 98 %) erhalten werden.

MS (ESI) (m/z) berechnet für $C_{41}H_{40}N_6O_{11}$ $[M+H]^+$: 793.80; gefunden: 793.28

HPLC $t_R = 11.74$ min, Area (AUC) = 85.7 %

6-(4-Amino-1,3-dioxisoindolin-2-yl)hexansäure (**95**)

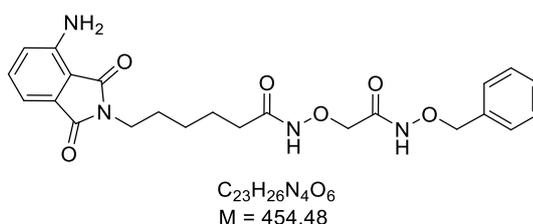
Die Synthese erfolgte in Anlehnung an die Vorschrift von FENG *et al.*²⁵¹ und das Produkt **95** konnte als gelber Feststoff (0.803 g, 2.90 mmol, 97 %) erhalten werden.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.87 (s, 1H), 7.41 (dd, $J = 8.5, 7.0$ Hz, 1H), 6.95 (dd, $J = 7.7, 6.0$ Hz, 2H), 6.42 (s, 2H), 3.48 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 2.18 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.69 – 1.39 (m, 4H), 1.25 (qd, $J = 9.6, 9.0, 5.9$ Hz, 2H)

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 174.36, 169.46, 168.04, 146.36, 135.00, 132.31, 121.31, 110.61, 108.96, 36.67, 33.48, 27.77, 25.77, 24.05

HPLC $t_R = 9.24$ min, Area (AUC) = 97.8 %

Schmelzpunkt $T_M = 142.7$ °C

6-(4-Amino-1,3-dioxisoindolin-2-yl)-*N*-[2-((benzyloxy)amino)-2-oxoethoxy]hexanamid (**96**)

Die Synthese erfolgte gemäß **ASV4-B** mit Schlüsselintermediat **I (13)** als *N*-Nucleophil und das Produkt **96** konnte als gelbes Öl (0.462 g, 1.02 mmol, 51 %) erhalten werden.

¹H-NMR (300 MHz, Methanol-*d*₄) δ 7.47 – 7.30 (m, 6H), 7.00 (dd, $J = 7.1, 0.7$ Hz, 1H), 6.94 (dd, $J = 8.4, 0.7$ Hz, 1H), 4.88 (s, 2H), 4.32 (s, 2H), 3.59 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 2.08 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.64 (qq, $J = 7.2, 3.6$ Hz, 4H), 1.41 – 1.26 (m, 2H)

¹³C-NMR (75 MHz, Methanol-*d*₄) δ 174.92, 173.95, 171.51, 170.46, 147.99, 136.74, 136.18, 133.96, 130.28, 129.69, 129.49, 122.45, 112.35, 111.06, 79.19, 75.17, 38.04, 33.27, 29.28, 27.27, 25.85

HPLC $t_R = 10.62$ min, Area (AUC) ≥ 99.9 %

6 Literaturverzeichnis

- (1) Hershkovitz, I.; Donoghue, H. D.; Minnikin, D. E.; May, H.; Lee, O. Y.-C.; Feldman, M.; Galili, E.; Spigelman, M.; Rothschild, B. M.; Bar-Gal, G. K. Tuberculosis Origin: The Neolithic Scenario. *Tuberculosis* **2015**, *95*, S122–S126. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.02.021>.
- (2) Comas, I.; Coscolla, M.; Luo, T.; Borrell, S.; Holt, K. E.; Kato-Maeda, M.; Parkhill, J.; Malla, B.; Berg, S.; Thwaites, G.; et al. Out-of-Africa Migration and Neolithic Coexpansion of Mycobacterium Tuberculosis with Modern Humans. *Nat. Genet.* **2013**, *45* (10), 1176–1182. <https://doi.org/10.1038/ng.2744>.
- (3) Bates, J. H.; Stead, W. W. The History of Tuberculosis as a Global Epidemic. *Med. Clin. North Am.* **1993**, *77* (6), 1205–1217. [https://doi.org/10.1016/s0025-7125\(16\)30188-2](https://doi.org/10.1016/s0025-7125(16)30188-2).
- (4) Barberis, I.; Bragazzi, N. L.; Galluzzo, L.; Martini, M. The History of Tuberculosis: From the First Historical Records to the Isolation of Koch’s Bacillus. *J. Prev. Med. Hyg.* **2017**, *58* (1), E9–E12.
- (5) Daniel, T. M. The History of Tuberculosis. *Respir. Med.* **2006**, *100* (11), 1862–1870. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2006.08.006>.
- (6) Koch, R. Die Ätiologie Der Tuberkulose. *Berliner Klin. Wochenschrift* **1882**, *15*, 428–445.
- (7) Cambau, E.; Drancourt, M. Steps towards the Discovery of Mycobacterium Tuberculosis by Robert Koch, 1882. *Clin. Microbiol. Infect.* **2014**, *20* (3), 196–201. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12555>.
- (8) World Health Organization. Global Tuberculosis Report. **2021**.
- (9) Furin, J.; Cox, H.; Pai, M. Tuberculosis. *The Lancet.* **2019**, *393* (10181), 1642–1656. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30308-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30308-3).
- (10) World Health Organization. Global Tuberculosis Report. **2018**.
- (11) Pai, M.; Behr, M. A.; Dowdy, D.; Dheda, K.; Divangahi, M.; Boehme, C. C.; Ginsberg, A.; Swaminathan, S.; Spigelman, M.; Getahun, H.; et al. Primer on Tuberculosis. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2016**, *2*. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.76>.
- (12) World Health Organization. Global Tuberculosis Report. **2015**.
- (13) World Health Organization. Global Tuberculosis Report. **2014**.
- (14) Pai, M.; Behr, M. A.; Dowdy, D.; Dheda, K.; Divangahi, M.; Boehme, C. C.; Ginsberg, A.;

- Swaminathan, S.; Spigelman, M.; Getahun, H.; et al. Tuberculosis. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2016**, *2* (1), 16076. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.76>.
- (15) Orme, I. M.; Robinson, R. T.; Cooper, A. M. The Balance between Protective and Pathogenic Immune Responses in the TB-Infected Lung. *Nat. Immunol.* **2015**, *16* (1), 57–63. <https://doi.org/10.1038/ni.3048>.
- (16) van der Wel, N.; Hava, D.; Houben, D.; Fluitsma, D.; van Zon, M.; Pierson, J.; Brenner, M.; Peters, P. J. M. Tuberculosis and *M. Leprae* Translocate from the Phagolysosome to the Cytosol in Myeloid Cells. *Cell* **2007**, *129* (7), 1287–1298. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.059>.
- (17) Wolf, A. J.; Desvignes, L.; Linas, B.; Banaiee, N.; Tamura, T.; Takatsu, K.; Ernst, J. D. Initiation of the Adaptive Immune Response to Mycobacterium Tuberculosis Depends on Antigen Production in the Local Lymph Node, Not the Lungs. *J. Exp. Med.* **2007**, *205* (1), 105–115. <https://doi.org/10.1084/jem.20071367>.
- (18) Samstein, M.; Schreiber, H. A.; Leiner, I. M.; Sušac, B.; Glickman, M. S.; Pamer, E. G. Essential yet Limited Role for CCR2+ Inflammatory Monocytes during Mycobacterium Tuberculosis-Specific T Cell Priming. *Elife* **2013**, *2*, e01086. <https://doi.org/10.7554/eLife.01086>.
- (19) Lin, P. L.; Ford, C. B.; Coleman, M. T.; Myers, A. J.; Gawande, R.; Ioerger, T.; Sacchettini, J.; Fortune, S. M.; Flynn, J. L. Sterilization of Granulomas Is Common in Active and Latent Tuberculosis despite Within-Host Variability in Bacterial Killing. *Nat. Med.* **2014**, *20* (1), 75–79. <https://doi.org/10.1038/nm.3412>.
- (20) Marakalala, M. J.; Raju, R. M.; Sharma, K.; Zhang, Y. J.; Eugenin, E. A.; Prideaux, B.; Daudelin, I. B.; Chen, P.-Y.; Booty, M. G.; Kim, J. H.; et al. Inflammatory Signaling in Human Tuberculosis Granulomas Is Spatially Organized. *Nat. Med.* **2016**, *22* (5), 531–538. <https://doi.org/10.1038/nm.4073>.
- (21) Tiemersma, E. W.; van der Werf, M. J.; Borgdorff, M. W.; Williams, B. G.; Nagelkerke, N. J. D. Natural History of Tuberculosis: Duration and Fatality of Untreated Pulmonary Tuberculosis in HIV Negative Patients: A Systematic Review. *PLoS One* **2011**, *6* (4), e17601.
- (22) World Health Organization. Global Tuberculosis Report. **2020**.
- (23) Gradmann, C. Robert Koch and the White Death: From Tuberculosis to Tuberculin. *Microbes Infect.* **2006**, *8* (1), 294–301. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.06.004>.
- (24) Schmiedebach, H.-P. Spiegelung von Seuchen in Öffentlichkeit Und Kultur. In *Infektionen und*

- Gesellschaft*; Springer, Berlin, Heidelberg, 2021; pp 36–43.
- (25) World Health Organization. BCG Vaccines: WHO Position Paper. *Wkly. Epidemiol. Rec.* **2018**, 93 (08), 73–96.
- (26) Roy, A.; Eisenhut, M.; Harris, R. J.; Rodrigues, L. C.; Sridhar, S.; Habermann, S.; Snell, L.; Mangtani, P.; Adetifa, I.; Lalvani, A.; et al. Effect of BCG Vaccination against Mycobacterium Tuberculosis Infection in Children: Systematic Review and Meta-Analysis. *BMJ Br. Med. J.* **2014**, 349, g4643. <https://doi.org/10.1136/bmj.g4643>.
- (27) Hart, P. D.; Sutherland, I. BCG and Vole Bacillus Vaccines in the Prevention of Tuberculosis in Adolescence and Early Adult Life. *Br. Med. J.* **1977**, 2 (6082), 293 LP – 295. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.6082.293>.
- (28) Palmer, C. E.; Long, M. W. Effects of Infection with Atypical Mycobacteria on BCG Vaccination and Tuberculosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* **1966**, 94 (4), 553–568. <https://doi.org/10.1164/arrd.1966.94.4.553>.
- (29) Brewer, T. F.; Colditz, G. A. Relationship Between Bacille Calmette-Guerin (BCG) Strains and the Efficacy of BCG Vaccine in the Prevention of Tuberculosis. *Clin. Infect. Dis.* **1995**, 20 (1), 126–135. <https://doi.org/10.1093/clinids/20.1.126>.
- (30) Hengster, P.; Schnapka, J.; Fille, M.; Menardi, G. Occurrence of Suppurative Lymphadenitis after a Change of BCG Vaccine. *Arch. Dis. Child.* **1992**, 67 (7), 952 LP – 955. <https://doi.org/10.1136/adc.67.7.952>.
- (31) Fine, P. E. M.; Carneiro, I. A. M.; Milstien, J. B.; Clements, C. J.; Organization, W. H. Issues Relating to the Use of BCG in Immunization Programmes: A Discussion Document. *Dep. Vaccines Biol.* **1999**.
- (32) Madhukar, P.; Denkinger, C. M.; Kik, S. V.; Rangaka, M. X.; Zwerling, A.; Oxlade, O.; Metcalfe, J. Z.; Cattamanchi, A.; Dowdy, D. W.; Dheda, K.; et al. Gamma Interferon Release Assays for Detection of Mycobacterium Tuberculosis Infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **2014**, 27 (1), 3–20. <https://doi.org/10.1128/CMR.00034-13>.
- (33) Pai, M.; Sotgiu, G. Diagnostics for Latent TB Infection: Incremental, Not Transformative Progress. *Eur. Respir. J.* **2016**, 47 (3), 704 LP – 706. <https://doi.org/10.1183/13993003.01910-2015>.
- (34) Lalvani, A.; Pareek, M. Interferon Gamma Release Assays: Principles and Practice. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **2010**, 28 (4), 245–252.

- <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.eimc.2009.05.012>.
- (35) Farhat, M.; Greenaway, C.; Pai, M.; Menzies, D. False-Positive Tuberculin Skin Tests: What Is the Absolute Effect of BCG and Non-Tuberculous Mycobacteria? [Review Article]. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **10** (11), 1192–1204. <https://doi.org/10.1186/1471-2466-9-41>.
- (36) Pai, M.; Riley, L. W.; Colford Jr, J. M. Interferon-Gamma Assays in the Immunodiagnosis of Tuberculosis: A Systematic Review. *Lancet Infect. Dis.* **2004**, *4* (12), 761–776. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(04\)01206-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(04)01206-X).
- (37) Rangaka, M. X.; Wilkinson, K. A.; Glynn, J. R. Predictive Value of Interferon- γ Release Assays for Incident Active Tuberculosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Lancet Infect. Dis.* **2012**, *12* (1), 45–55. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70210-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70210-9).
- (38) World Health Organization. Guidelines on the Management of Latent Tuberculosis Infection. **2015**.
- (39) Desikan, P. Sputum Smear Microscopy in Tuberculosis: Is It Still Relevant? *Indian J. Med. Res.* **2013**, *137* (3), 442–444.
- (40) Shin, S. S.; J Seung, K. Tuberculosis. *Hunter's Trop. Med. Emerg. Infect. Dis.* **2013**, *9*, 416–432. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-4390-4.00039-4>.
- (41) Cruciani, M.; Scarparo, C.; Malena, M.; Bosco, O.; Serpelloni, G.; Mengoli, C. Meta-Analysis of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460 TB, with or without Solid Media, for Detection of Mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* **2004**, *42* (5), 2321–2325. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.5.2321-2325.2004>.
- (42) Steingart, K. R.; Schiller, I.; Horne, D. J.; Pai, M.; Boehme, C. C.; Dendukuri, N. Xpert® MTB/RIF Assay for Pulmonary Tuberculosis and Rifampicin Resistance in Adults. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2014**, No. 1. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD009593.pub3>.
- (43) Ling, D. I.; Zwerling, A. A.; Pai, M. GenoType MTBDR Assays for the Diagnosis of Multidrug-Resistant Tuberculosis: A Meta-Analysis. *Eur. Respir. J.* **2008**, *32* (5), 1165 LP – 1174. <https://doi.org/10.1183/09031936.00061808>.
- (44) World Health Organization. Systematic Screening for Active Tuberculosis: Principles and Recommendations. **2013**.
- (45) Getahun, H.; Matteelli, A.; Abubakar, I.; Aziz, M. A.; Baddeley, A.; Barreira, D.; Den Boon, S.; Borroto Gutierrez, S. M.; Bruchfeld, J.; Burhan, E.; et al. Management of Latent Mycobacterium Tuberculosis Infection: WHO Guidelines for Low Tuberculosis Burden

- Countries. *Eur. Respir. J.* **2015**, *46* (6), 1563 LP – 1576.
<https://doi.org/10.1183/13993003.01245-2015>.
- (46) Landry, J.; Menzies, D. Preventive Chemotherapy. Where Has It Got Us? Where to Go Next? *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **2008**, *12* (13), 1352–1364.
- (47) World Health Organization. Treatment of Tuberculosis: Guidelines (4th Edition). **2010**.
- (48) Nahid, P.; Dorman, S. E.; Alipanah, N.; Barry, P. M.; Brozek, J. L.; Cattamanchi, A.; Chaisson, L. H.; Chaisson, R. E.; Daley, C. L.; Grzemska, M.; et al. Official American Thoracic Society/Centers for Disease Control and Prevention/Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guidelines: Treatment of Drug-Susceptible Tuberculosis. *Clin. Infect. Dis.* **2016**, *63* (7), e147–e195. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw376>.
- (49) Saukkonen, J. J.; Cohn, D. L.; Jasmer, R. M.; Schenker, S.; Jereb, J. A.; Nolan, C. M.; Peloquin, C. A.; Gordin, F. M.; Nunes, D.; Strader, D. B.; et al. An Official ATS Statement: Hepatotoxicity of Antituberculosis Therapy. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2006**, *174* (8), 935–952.
<https://doi.org/10.1164/rccm.200510-1666ST>.
- (50) Girling, D. J. Adverse Effects of Antituberculosis Drugs. *Drugs* **1982**, *23* (1), 56–74.
<https://doi.org/10.2165/00003495-198223010-00003>.
- (51) O'Donnell, M. R.; Daftary, A.; Frick, M.; Hirsch-Moverman, Y.; Amico, K. R.; Senthilingam, M.; Wolf, A.; Metcalfe, J. Z.; Isaakidis, P.; Davis, J. L.; et al. Re-Inventing Adherence: Toward a Patient-Centered Model of Care for Drug-Resistant Tuberculosis and HIV. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **2016**, *20* (4), 430–434. <https://doi.org/10.5588/ijtld.15.0360>.
- (52) Kaufmann, S. H. E.; Hahn, H.; Ulrichs, T.; Bange, F.-C. Mykobakterien. *Medizinische Mikrobiol. und Infekt.* **2009**, 354–369. https://doi.org/10.1007/978-3-540-46362-7_42.
- (53) Fu, L. M.; Fu-Liu, C. S. Is Mycobacterium Tuberculosis a Closer Relative to Gram-Positive or Gram-Negative Bacterial Pathogens? *Tuberculosis* **2002**, *82* (2), 85–90.
<https://doi.org/10.1054/tube.2002.0328>.
- (54) Delogu, G.; Sali, M.; Fadda, G. The Biology of Mycobacterium Tuberculosis Infection. *Cit. Mediterr J Hematol Infect Dis* **2013**, *5* (1), 2013070. <https://doi.org/10.4084/MJHID.2013.070>.
- (55) Forbes, B. A.; Hall, G. S.; Miller, M. B.; Novak, S. M.; Rowlinson, M.-C.; Salfinger, M.; Somoskövi, A.; Warshauer, D. M.; Wilson, M. L. Practical Guidance for Clinical Microbiology Laboratories: Mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **2018**, *31* (2), e00038-17.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00038-17>.

-
- (56) Brennan, P. J.; Nikaido, H. THE ENVELOPE OF MYCOBACTERIA. *Annu. Rev. Biochem.* **1995**, *64* (1), 29–63. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.64.070195.000333>.
- (57) Hingley-Wilson, S. M.; Sambandamurthy, V. K.; Jacobs, W. R. Survival Perspectives from the World's Most Successful Pathogen, Mycobacterium Tuberculosis. *Nat. Immunol.* **2003**, *4* (10), 949–955. <https://doi.org/10.1038/ni981>.
- (58) Cook, G. M.; Berney, M.; Gebhard, S.; Heinemann, M.; Cox, R. A.; Danilchanka, O.; Niederweis, M. Physiology of Mycobacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **2009**, *55*, 81–319. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(09\)05502-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(09)05502-7).
- (59) Kalscheuer, R.; Palacios, A.; Anso, I.; Cifuentes, J.; Anguita, J.; Jacobs Jr, W. R.; Guerin, M. E.; Prados-Rosales, R. The Mycobacterium Tuberculosis Capsule: A Cell Structure with Key Implications in Pathogenesis. *Biochem. J.* **2019**, *476* (14), 1995–2016. <https://doi.org/10.1042/BCJ20190324>.
- (60) Kaur, D.; Guerin, M. E.; Škovierová, H.; Brennan, P. J.; Jackson, M. B. T.-A. in A. M. Biogenesis of the Cell Wall and Other Glycoconjugates of Mycobacterium Tuberculosis. *Adv. Appl. Microbiol.* **2009**, *69*, 23–78. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(09\)69002-X](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(09)69002-X).
- (61) Jackson, M. The Mycobacterial Cell Envelope-Lipids. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2014**, *4* (10). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021105>.
- (62) Briken, V.; Porcelli, S. A.; Besra, G. S.; Kremer, L. Mycobacterial Lipoarabinomannan and Related Lipoglycans: From Biogenesis to Modulation of the Immune Response. *Mol. Microbiol.* **2004**, *53* (2), 391–403. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04183.x>.
- (63) Cambier, C. J.; Takaki, K. K.; Larson, R. P.; Hernandez, R. E.; Tobin, D. M.; Urdahl, K. B.; Cosma, C. L.; Ramakrishnan, L. Mycobacteria Manipulate Macrophage Recruitment through Coordinated Use of Membrane Lipids. *Nature* **2014**, *505* (7482), 218–222. <https://doi.org/10.1038/nature12799>.
- (64) Hestvik, A. L. K.; Hmama, Z.; Av-Gay, Y. Mycobacterial Manipulation of the Host Cell. *FEMS Microbiol. Rev.* **2005**, *29* (5), 1041–1050. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2005.04.013>.
- (65) Barry, C. E.; Lee, R. E.; Mdluli, K.; Sampson, A. E.; Schroeder, B. G.; Slayden, R. A.; Yuan, Y. Mycolic Acids: Structure, Biosynthesis and Physiological Functions. *Prog. Lipid Res.* **1998**, *37* (2), 143–179. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(98\)00008-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0163-7827(98)00008-3).
- (66) Kuni, T.; Cindy, W.; S., B. G. Pathway to Synthesis and Processing of Mycolic Acids in Mycobacterium Tuberculosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **2005**, *18* (1), 81–101.
-

- <https://doi.org/10.1128/CMR.18.1.81-101.2005>.
- (67) North, E.; Jackson, M.; Lee, R. New Approaches to Target the Mycolic Acid Biosynthesis Pathway for the Development of Tuberculosis Therapeutics. *Curr. Pharm. Des.* **2014**, *20* (27), 4357–4378. <https://doi.org/10.2174/1381612819666131118203641>.
- (68) Belete, T. M. Novel Targets to Develop New Antibacterial Agents and Novel Alternatives to Antibacterial Agents. *Hum. Microbiome J.* **2019**, *11*, 100052. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.humic.2019.01.001>.
- (69) Patrick, G. L. An Introduction to Medicinal Chemistry. *Oxford Univ. Press* **2013**, *5*.
- (70) McGaw, L. J.; Elgorashi, E. E.; Eloff, J. N. Cytotoxicity of African Medicinal Plants Against Normal Animal and Human Cells; Kuete, V. B. T.-T. S. of A. M. P., Ed.; Elsevier, 2014; pp 181–233. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800018-2.00008-X>.
- (71) Bakheet, T. M.; Doig, A. J. Properties and Identification of Antibiotic Drug Targets. *BMC Bioinformatics* **2010**, *11* (1), 195. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-195>.
- (72) Silver, L. L. Appropriate Targets for Antibacterial Drugs. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2016**, *6* (12). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a030239>.
- (73) Vollmer, W.; Bertsche, U. Murein (Peptidoglycan) Structure, Architecture and Biosynthesis in Escherichia Coli. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2008**, *1778* (9), 1714–1734. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.06.007>.
- (74) de Ávila, M. B.; Bitencourt-Ferreira, G.; de Azevedo, W. F. Structural Basis for Inhibition of Enoyl-[Acyl Carrier Protein] Reductase (InhA) from Mycobacterium Tuberculosis. *Curr. Med. Chem.* **2018**, *27* (5), 745–759. <https://doi.org/10.2174/0929867326666181203125229>.
- (75) Goude, R.; Amin, A. G.; Chatterjee, D.; Parish, T. The Arabinosyltransferase EmbC Is Inhibited by Ethambutol in Mycobacterium Tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53* (10), 4138–4146. <https://doi.org/10.1128/AAC.00162-09>.
- (76) Silhavy, T. J.; Kahne, D.; Walker, S. The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2010**, *2* (5). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414>.
- (77) Duax, W. L.; Langs, D. A.; Smith, G. D.; Grochulski, P.; Pletnev, V.; Ivanov, V. Molecular Structure and Mechanisms of Action of Cyclic and Linear Ion Transport Antibiotics. *Bioorg. Khim.* **1992**, *18* (10–11), 1341–1360.
- (78) Palomino, J. C.; Martin, A. Drug Resistance Mechanisms in Mycobacterium Tuberculosis. *Antibiotics* **2014**, *3* (3), 317–340. <https://doi.org/10.3390/antibiotics3030317>.

- (79) Stehr, M.; Elamin, A. A.; Singh, M. Pyrazinamide: The Importance of Uncovering the Mechanisms of Action in Mycobacteria. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **2015**, *13* (5), 593–603. <https://doi.org/10.1586/14787210.2015.1021784>.
- (80) Zhang, Y.; Wade, M. M.; Scorpio, A.; Zhang, H.; Sun, Z. Mode of Action of Pyrazinamide: Disruption of Mycobacterium Tuberculosis Membrane Transport and Energetics by Pyrazinoic Acid. *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, *52* (5), 790–795. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg446>.
- (81) Lucas-Lenard, J.; Lipmann, F. Protein Biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* **1971**, *40* (1), 409–448. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.40.070171.002205>.
- (82) Lengyel, P.; Söll, D. Mechanism of Protein Biosynthesis. *Bacteriol. Rev.* **1969**, *33* (2), 264–301. <https://doi.org/10.1128/br.33.2.264-301.1969>.
- (83) Wilson, D. N. Ribosome-Targeting Antibiotics and Mechanisms of Bacterial Resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **2014**, *12* (1), 35–48. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3155>.
- (84) Nyborg, J.; Kjeldgaard, M. Elongation in Bacterial Protein Biosynthesis. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1996**, *7* (4), 369–375. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(96\)80110-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0958-1669(96)80110-8).
- (85) Poehlsgaard, J.; Douthwaite, S. The Bacterial Ribosome as a Target for Antibiotics. *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3* (11), 870–881. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1265>.
- (86) Forge, A.; Schacht, J. Aminoglycoside Antibiotics. *Audiol. Neurotol.* **2000**, *5* (1), 3–22. <https://doi.org/10.1159/000013861>.
- (87) Becker, B.; Cooper, M. A. Aminoglycoside Antibiotics in the 21st Century. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8* (1), 105–115. <https://doi.org/10.1021/cb3005116>.
- (88) Chopra, I.; Roberts, M. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2001**, *65* (2), 232–260. <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001>.
- (89) Grossman, T. H. Tetracycline Antibiotics and Resistance. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2016**, *6* (4), a025387.
- (90) Zhang, Y. The Magic Bullets and Tuberculosis Drug Targets. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2004**, *45* (1), 529–564. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.100120>.
- (91) Vázquez-Laslop, N.; Mankin, A. S. How Macrolide Antibiotics Work. *Trends Biochem. Sci.* **2018**, *43* (9), 668–684. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.06.011>.
- (92) Kanfer, I.; Skinner, M. F.; Walker, R. B. Analysis of Macrolide Antibiotics. *J. Chromatogr. A*

- 1998**, 812 (1), 255–286. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00276-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00276-3).
- (93) Diekema, D. J.; Jones, R. N. Oxazolidinone Antibiotics. *Lancet* **2001**, 358 (9297), 1975–1982. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)06964-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)06964-1).
- (94) Hashemian, S. M. R.; Farhadi, T.; Ganjparvar, M. Linezolid: A Review of Its Properties, Function, and Use in Critical Care. *Drug Des. Devel. Ther.* **2018**, 12, 1759–1767. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S164515>.
- (95) Stevens, D. L.; Dotter, B.; Madaras-Kelly, K. A Review of Linezolid: The First Oxazolidinone Antibiotic. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **2004**, 2 (1), 51–59. <https://doi.org/10.1586/14787210.2.1.51>.
- (96) Stokes, J. M.; Lopatkin, A. J.; Lobritz, M. A.; Collins, J. J. Bacterial Metabolism and Antibiotic Efficacy. *Cell Metab.* **2019**, 30 (2), 251–259. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.06.009>.
- (97) Millikan, L. E.; Harrell, E. R. Drug Reactions to the Sulfones. *Arch. Dermatol.* **1970**, 102 (2), 220–224. <https://doi.org/10.1001/archderm.1970.04000080092020>.
- (98) Otten, H. Domagk and the Development of the Sulphonamides. *J. Antimicrob. Chemother.* **1986**, 17 (6), 689–690. <https://doi.org/10.1093/jac/17.6.689>.
- (99) Henry, R. J. The Mode of Action of Sulfonamides. *Bacteriol. Rev.* **1943**, 7 (4), 175–262. <https://doi.org/10.1128/br.7.4.175-262.1943>.
- (100) Scholar, E. Sulfones. *xPharm Compr. Pharmacol. Ref.* **2007**, 1–3. <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.61014-1>.
- (101) Shiota, T.; Baugh, C. M.; Jackson, R.; Dillard, R. The Enzymatic Synthesis of Hydroxymethyl-dihydropteridine Pyrophosphate and Dihydrofolate. *Biochemistry* **1969**, 8 (12), 5022–5028. <https://doi.org/10.1021/bi00840a052>.
- (102) Cong, M.; Xiao, Y.; J., L. P. Bacterial Transcription as a Target for Antibacterial Drug Development. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2016**, 80 (1), 139–160. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00055-15>.
- (103) Villain-Guillot, P.; Bastide, L.; Gualtieri, M.; Leonetti, J.-P. Progress in Targeting Bacterial Transcription. *Drug Discov. Today* **2007**, 12 (5), 200–208. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.drudis.2007.01.005>.
- (104) McClure, W. R.; Cech, C. L. On the Mechanism of Rifampicin Inhibition of RNA Synthesis. *J. Biol. Chem.* **1978**, 253 (24), 8949–8956. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021->

- 9258(17)34269-2.
- (105) Marians, K. J. Prokaryotic DNA Replication. *Annu. Rev. Biochem.* **1992**, *61* (1), 673–715. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.61.070192.003325>.
- (106) Mott, M. L.; Berger, J. M. DNA Replication Initiation: Mechanisms and Regulation in Bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **2007**, *5* (5), 343–354. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1640>.
- (107) Dewar, J. M.; Walter, J. C. Mechanisms of DNA Replication Termination. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, *18* (8), 507–516. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.42>.
- (108) Drlica, K.; Franco, R. J. Inhibitors of DNA Topoisomerases. *Biochemistry* **1988**, *27* (7), 2253–2259.
- (109) Karl, D.; Muhammad, M.; J., K. R.; Xilin, Z. Quinolone-Mediated Bacterial Death. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, *52* (2), 385–392. <https://doi.org/10.1128/AAC.01617-06>.
- (110) Nellums, L. B.; Rustage, K.; Hargreaves, S.; Friedland, J. S. Multidrug-Resistant Tuberculosis Treatment Adherence in Migrants: A Systematic Review and Meta-Analysis. *BMC Med.* **2018**, *16* (1), 27. <https://doi.org/10.1186/s12916-017-1001-7>.
- (111) Wahl, L. M.; Nowak, M. A. Adherence and Drug Resistance: Predictions for Therapy Outcome. *Proc. R. Soc. London. Ser. B Biol. Sci.* **2000**, *267* (1445), 835–843. <https://doi.org/10.1098/rspb.2000.1079>.
- (112) Waglechner, N.; Wright, G. D. Antibiotic Resistance: It's Bad, but Why Isn't It Worse? *BMC Biol.* **2017**, *15* (1), 84. <https://doi.org/10.1186/s12915-017-0423-1>.
- (113) Tacconelli, E.; Carrara, E.; Savoldi, A.; Harbarth, S.; Mendelson, M.; Monnet, D. L.; Pulcini, C.; Kahlmeter, G.; Kluytmans, J.; Carmeli, Y.; et al. Discovery, Research, and Development of New Antibiotics: The WHO Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria and Tuberculosis. *Lancet Infect. Dis.* **2018**, *18* (3), 318–327. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3).
- (114) Silver, L. L.; Bostian, K. A. Discovery and Development of New Antibiotics: The Problem of Antibiotic Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, *37* (3), 377–383.
- (115) Olaru, I. D.; von Groote-Bidlingmaier, F.; Heyckendorf, J.; Yew, W. W.; Lange, C.; Chang, K. C. Novel Drugs against Tuberculosis: A Clinicians Perspective. *Eur. Respir. J.* **2015**, *45* (4), 1119 LP – 1131. <https://doi.org/10.1183/09031936.00162314>.
- (116) Alrajhi, A. A.; Abdulwahab, S.; Almodovar, E.; Al-Abdely, H. M. Risk Factors for Drug-Resistant Mycobacterium Tuberculosis in Saudi Arabia. *Neurosci. J.* **2002**, *7* (2), 99 LP – 104.

- (117) Cox, G.; Wright, G. D. Intrinsic Antibiotic Resistance: Mechanisms, Origins, Challenges and Solutions. *Int. J. Med. Microbiol.* **2013**, *303* (6), 287–292.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.009>.
- (118) Reygaert, W. C. An Overview of the Antimicrobial Resistance Mechanisms of Bacteria. *AIMS Microbiol.* **2018**, *4* (3), 482–501. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>.
- (119) Wright, G. D. Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (14), 4055–4061. <https://doi.org/10.1039/C0CC05111J>.
- (120) Blair, J. M. A.; Webber, M. A.; Baylay, A. J.; Ogbolu, D. O.; Piddock, L. J. V. Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **2015**, *13* (1), 42–51.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>.
- (121) Sreevatsan, S.; Stockbauer, K. E.; Pan, X.; Kreiswirth, B. N.; Moghazeh, S. L.; Jacobs, W. R.; Telenti, A.; Musser, J. M. Ethambutol Resistance in Mycobacterium Tuberculosis: Critical Role of EmbB Mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41* (8), 1677–1681.
<https://doi.org/10.1128/AAC.41.8.1677>.
- (122) Starks, A. M.; Gumusboga, A.; Plikaytis, B. P.; Shinnick, T. M.; Posey, J. E. Mutations at EmbB Codon 306 Are an Important Molecular Indicator of Ethambutol Resistance in Mycobacterium Tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53* (3), 1061–1066.
<https://doi.org/10.1128/AAC.01357-08>.
- (123) Egorov, A. M.; Ulyashova, M. M.; Rubtsova, M. Y. Bacterial Enzymes and Antibiotic Resistance. *Acta Naturae* **2018**, *10* (4), 33–48.
- (124) Livermore, D. M. Beta-Lactamase-Mediated Resistance and Opportunities for Its Control. *J. Antimicrob. Chemother.* **1998**, *41* (suppl_4), 25–41.
https://doi.org/10.1093/jac/41.suppl_4.25.
- (125) Knowles, J. R. Penicillin Resistance: The Chemistry of Beta-Lactamase Inhibition. *Acc. Chem. Res.* **1985**, *18* (4), 97–104.
- (126) Njire, M.; Tan, Y.; Mugweru, J.; Wang, C.; Guo, J.; Yew, W.; Tan, S.; Zhang, T. Pyrazinamide Resistance in Mycobacterium Tuberculosis: Review and Update. *Adv. Med. Sci.* **2016**, *61* (1), 63–71. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.advms.2015.09.007>.
- (127) Zhang, Y.; Heym, B.; Allen, B.; Young, D.; Cole, S. The Catalase—Peroxidase Gene and Isoniazid Resistance of Mycobacterium Tuberculosis. *Nature* **1992**, *358* (6387), 591–593.
<https://doi.org/10.1038/358591a0>.

- (128) Slayden, R. A.; Barry, C. E. The Genetics and Biochemistry of Isoniazid Resistance in Mycobacterium Tuberculosis. *Microbes Infect.* **2000**, *2* (6), 659–669. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)00359-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)00359-2).
- (129) Seung, K. J.; Keshavjee, S.; Rich, M. L. Multidrug-Resistant Tuberculosis and Extensively Drug-Resistant Tuberculosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2015**, *5* (9), a017863–a017863. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a017863>.
- (130) Caminero, J. A.; Sotgiu, G.; Zumla, A.; Migliori, G. B. Best Drug Treatment for Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant Tuberculosis. *Lancet Infect. Dis.* **2010**, *10* (9), 621–629. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70139-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70139-0).
- (131) Benoit, L.; T., C. S. Mode of Action of Clofazimine and Combination Therapy with Benzothiazinones against Mycobacterium Tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59* (8), 4457–4463. <https://doi.org/10.1128/AAC.00395-15>.
- (132) Ma, Z.; Lienhardt, C.; McIlleron, H.; Nunn, A. J.; Wang, X. Global Tuberculosis Drug Development Pipeline: The Need and the Reality. *Lancet* **2010**, *375* (9731), 2100–2109. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60359-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60359-9).
- (133) Singh, V.; Chibale, K. Strategies to Combat Multi-Drug Resistance in Tuberculosis. *Acc. Chem. Res.* **2021**, *54* (10), 2361–2376. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.0c00878>.
- (134) Osborne, R. First Novel Anti-Tuberculosis Drug in 40 Years. *Nat. Biotechnol.* **2013**, *31* (2), 89–90. <https://doi.org/10.1038/nbt0213-89>.
- (135) Perveen, S.; Kumari, D.; Singh, K.; Sharma, R. Tuberculosis Drug Discovery: Progression and Future Interventions in the Wake of Emerging Resistance. *Eur. J. Med. Chem.* **2022**, *229*, 114066. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.114066>.
- (136) Mdluli, K.; Kaneko, T.; Upton, A. The Tuberculosis Drug Discovery and Development Pipeline and Emerging Drug Targets. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2015**, *5* (6), a021154.
- (137) Hards, K.; Robson, J. R.; Berney, M.; Shaw, L.; Bald, D.; Koul, A.; Andries, K.; Cook, G. M. Bactericidal Mode of Action of Bedaquiline. *J. Antimicrob. Chemother.* **2015**, *70* (7), 2028–2037. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv054>.
- (138) Andries, K.; Verhasselt, P.; Guillemont, J.; Göhlmann, H. W. H.; Neefs, J.-M.; Winkler, H.; Van Gestel, J.; Timmerman, P.; Zhu, M.; Lee, E.; et al. A Diarylquinoline Drug Active on the ATP Synthase of Mycobacterium Tuberculosis. *Science (80-.).* **2005**, *307* (5707), 223–227. <https://doi.org/10.1126/science.1106753>.

- (139) Nguyen, T. V. A.; Anthony, R. M.; Bañuls, A.-L.; Nguyen, T. V. A.; Vu, D. H.; Alffenaar, J.-W. C. Bedaquiline Resistance: Its Emergence, Mechanism, and Prevention. *Clin. Infect. Dis.* **2018**, *66* (10), 1625–1630. <https://doi.org/10.1093/cid/cix992>.
- (140) Nguyen, T. V. A.; Anthony, R. M.; Cao, T. T. H.; Bañuls, A.-L.; Nguyen, V. A. T.; Vu, D. H.; Nguyen, N. V.; Alffenaar, J.-W. C. Delamanid Resistance: Update and Clinical Management. *Clin. Infect. Dis.* **2020**, *71* (12), 3252–3259. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa755>.
- (141) Yuan, T.; Werman, J. M.; Sampson, N. S. The Pursuit of Mechanism of Action: Uncovering Drug Complexity in TB Drug Discovery. *RSC Chem. Biol.* **2021**, *2* (2), 423–440. <https://doi.org/10.1039/D0CB00226G>.
- (142) Mudde, S. E.; Upton, A. M.; Lenaerts, A.; Bax, H. I.; De Steenwinkel, J. E. M. Delamanid or Pretomanid? A Solomonic Judgement! *J. Antimicrob. Chemother.* **2022**, *77* (4), 880–902. <https://doi.org/10.1093/jac/dkab505>.
- (143) J Libardo, M. D.; Boshoff, H. I. M.; Barry, C. E. The Present State of the Tuberculosis Drug Development Pipeline. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2018**, *42*, 81–94. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.coph.2018.08.001>.
- (144) Kumar, A.; Karkara, B. B.; Panda, G. Novel Candidates in the Clinical Development Pipeline for TB Drug Development and Their Synthetic Approaches. *Chem. Biol. Drug Des.* **2021**, *98* (5), 787–827. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/cbdd.13934>.
- (145) Pethe, K.; Bifani, P.; Jang, J.; Kang, S.; Park, S.; Ahn, S.; Jiricek, J.; Jung, J.; Jeon, H. K.; Cechetto, J.; et al. Discovery of Q203, a Potent Clinical Candidate for the Treatment of Tuberculosis. *Nat. Med.* **2013**, *19* (9), 1157–1160. <https://doi.org/10.1038/nm.3262>.
- (146) Zumla, A.; Nahid, P.; Cole, S. T. Advances in the Development of New Tuberculosis Drugs and Treatment Regimens. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12* (5), 388–404. <https://doi.org/10.1038/nrd4001>.
- (147) Brindha, S.; Sundaramurthi, J. C.; Vincent, S.; Velmurugan, D.; Gnanadoss, J. J. In Silico and in Vitro Screening of FDA-Approved Drugs for Potential Repurposing against Tuberculosis. *bioRxiv* **2017**, 228171. <https://doi.org/10.1101/228171>.
- (148) Brindha, S.; Sundaramurthi, J. C.; Velmurugan, D.; Vincent, S.; Gnanadoss, J. J. Docking-Based Virtual Screening of Known Drugs against MurE of Mycobacterium Tuberculosis towards Repurposing for TB. *Bioinformatics* **2016**, *12* (8), 359–367. <https://doi.org/10.6026/97320630012368>.

- (149) Battah, B.; Chemi, G.; Butini, S.; Campiani, G.; Brogi, S.; Delogu, G.; Gemma, S. A Repurposing Approach for Uncovering the Anti-Tubercular Activity of FDA-Approved Drugs with Potential Multi-Targeting Profiles. *Molecules* **2019**, *24* (23), 4373. <https://doi.org/10.3390/molecules24234373>.
- (150) Ly, L. H.; McMurray, D. N. Tuberculosis: Vaccines in the Pipeline. *Expert Rev. Vaccines* **2008**, *7* (5), 635–650. <https://doi.org/10.1586/14760584.7.5.635>.
- (151) Tang, J.; Yam, W.-C.; Chen, Z. Mycobacterium Tuberculosis Infection and Vaccine Development. *Tuberculosis* **2016**, *98*, 30–41. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tube.2016.02.005>.
- (152) Brosch, R.; Vincent, V. Cutting-Edge Science and the Future of Tuberculosis Control. *Bull. World Health Organ.* **2007**, *85* (5), 410–412. <https://doi.org/10.2471/06.035386>.
- (153) Torfs, E.; Piller, T.; Cos, P.; Cappoen, D. Opportunities for Overcoming Mycobacterium Tuberculosis Drug Resistance: Emerging Mycobacterial Targets and Host-Directed Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20* (12), 2868. <https://doi.org/10.3390/ijms20122868>.
- (154) Young, C.; Walzl, G.; Du Plessis, N. Therapeutic Host-Directed Strategies to Improve Outcome in Tuberculosis. *Mucosal Immunol.* **2020**, *13* (2), 190–204. <https://doi.org/10.1038/s41385-019-0226-5>.
- (155) Wallis, R. S.; Hafner, R. Advancing Host-Directed Therapy for Tuberculosis. *Nat. Rev. Immunol.* **2015**, *15* (4), 255–263. <https://doi.org/10.1038/nri3813>.
- (156) Ndlovu, H.; Marakalala, M. J. Granulomas and Inflammation: Host-Directed Therapies for Tuberculosis. *Front. Immunol.* **2016**, *7*, 434. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00434>.
- (157) Kolloli, A.; Subbian, S. Host-Directed Therapeutic Strategies for Tuberculosis. *Frontiers in Medicine*. 2017.
- (158) Paik, S.; Kim, J. K.; Chung, C.; Jo, E.-K. Autophagy: A New Strategy for Host-Directed Therapy of Tuberculosis. *Virulence* **2019**, *10* (1), 448–459. <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1536598>.
- (159) Gries, R.; Sala, C.; Rybniker, J. Host-Directed Therapies and Anti-Virulence Compounds to Address Anti-Microbial Resistant Tuberculosis Infection. *Applied Sciences*. 2020. <https://doi.org/10.3390/app10082688>.
- (160) Stanley, S. A.; Barczak, A. K.; Silvis, M. R.; Luo, S. S.; Sogi, K.; Vokes, M.; Bray, M.-A.; Carpenter, A. E.; Moore, C. B.; Siddiqi, N.; et al. Identification of Host-Targeted Small Molecules That

- Restrict Intracellular Mycobacterium Tuberculosis Growth. *PLoS Pathog.* **2014**, *10* (2), e1003946–e1003946. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003946>.
- (161) Patra, J. K.; Das, G.; Fraceto, L. F.; Campos, E. V. R.; Rodriguez-Torres, M. del P.; Acosta-Torres, L. S.; Diaz-Torres, L. A.; Grillo, R.; Swamy, M. K.; Sharma, S.; et al. Nano Based Drug Delivery Systems: Recent Developments and Future Prospects. *J. Nanobiotechnology* **2018**, *16* (1), 71. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0392-8>.
- (162) Nasiruddin, M.; Neyaz, M. K.; Das, S. Nanotechnology-Based Approach in Tuberculosis Treatment. *Tuberc. Res. Treat.* **2017**, *2017*, 4920209. <https://doi.org/10.1155/2017/4920209>.
- (163) Mitchell, M. J.; Billingsley, M. M.; Haley, R. M.; Wechsler, M. E.; Peppas, N. A.; Langer, R. Engineering Precision Nanoparticles for Drug Delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2021**, *20* (2), 101–124. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0090-8>.
- (164) Behzadi, S.; Serpooshan, V.; Tao, W.; Hamaly, M. A.; Alkawareek, M. Y.; Dreaden, E. C.; Brown, D.; Alkilany, A. M.; Farokhzad, O. C.; Mahmoudi, M. Cellular Uptake of Nanoparticles: Journey inside the Cell. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46* (14), 4218–4244. <https://doi.org/10.1039/c6cs00636a>.
- (165) Singh, J.; Garg, T.; Rath, G.; Goyal, A. K. Advances in Nanotechnology-Based Carrier Systems for Targeted Delivery of Bioactive Drug Molecules with Special Emphasis on Immunotherapy in Drug Resistant Tuberculosis – a Critical Review. *Drug Deliv.* **2016**, *23* (5), 1676–1698. <https://doi.org/10.3109/10717544.2015.1074765>.
- (166) Soria-Carrera, H.; Lucía, A.; De Matteis, L.; Aínsa, J. A.; de la Fuente, J. M.; Martín-Rapún, R. Polypeptidic Micelles Stabilized with Sodium Alginate Enhance the Activity of Encapsulated Bedaquiline. *Macromol. Biosci.* **2019**, *19* (4), 1800397. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/mabi.201800397>.
- (167) Costa, A.; Sarmiento, B.; Seabra, V. Mannose-Functionalized Solid Lipid Nanoparticles Are Effective in Targeting Alveolar Macrophages. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2018**, *114*, 103–113. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.12.006>.
- (168) Stenzel, K. Unveröffentlichte Forschungsergebnisse, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Kurz. *Inst. für Pharm. und Med. Chem. der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*, **2016**.
- (169) van Geelen, L. Unveröffentlichte Forschungsergebnisse, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Kalscheuer. *Inst. für Pharm. Bio. und Biotech. der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*, **2020**.
- (170) Seibert, C. M.; Raushel, F. M. Structural and Catalytic Diversity within the Amidohydrolase

- Superfamily. *Biochemistry* **2005**, *44* (17), 6383–6391. <https://doi.org/10.1021/bi047326v>.
- (171) Favour, C. B. Bacteriological Study of Carboxymethoxylamine Hemihydrochloride. *J. Bacteriol.* **1948**, *55* (1), 1–9. <https://doi.org/10.1128/jb.55.1.1-9.1948>.
- (172) McHale, D.; Green, J.; Mamalis, P. Amino-Oxy-Derivatives. Part I. Some α -Amino-Oxy-Acids and α -Amino-Oxy-Hydrazides. *J. Chem. Soc.* **1960**, No. 0, 225–229. <https://doi.org/10.1039/JR9600000225>.
- (173) Testa, E.; Nicolaus, B. J. R.; Mariani, L.; Pagani, G. O, N-Substituierte Hydroxylamine / Über Synthese Und Eigenschaften Der α -Aminoxy-Carbonsäuren, Analoga Natürlicher α -Aminocarbonsäuren. *Helv. Chim. Acta* **1963**, *46* (3), 766–780. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/hlca.19630460309>.
- (174) Kisfaludy, L.; Dancsi, L.; Patthy, Á.; Fekete, G.; Szabó, I. α -Aminoxy-Acid Derivatives with Potent Antituberculosic Effect. *Experientia* **1971**, *27* (9), 1055–1056. <https://doi.org/10.1007/BF02138876>.
- (175) Kisfaludy, L.; Patthy, A.; Dancsi, L.; Fekete, G.; Szabo, I. Neue Tuberkulostatisch Wirkende Alpha-Aminoxy-Hydroxamsäurederivate Und Verfahren Zur Herstellung Derselben. **1971**, DE 2063996 A1.
- (176) Kisfaludy, L.; Dancsi, L.; Patthy, A.; Fekete, G.; Szabo, I. Verfahren Zur Herstellung von Neuen Substituierten Alfa-Aminoxy-carbonsäureamidderivaten. **1974**, AT 338777 B.
- (177) Berger, A. Unveröffentlichte Forschungsergebnisse, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Kurz. *Inst. für Pharm. und Med. Chem. der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*, **2021**.
- (178) Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. *CLSI Doc. M07-A9*. **2012**, *32*, 1–88.
- (179) Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V. SwissADME: A Free Web Tool to Evaluate Pharmacokinetics, Drug-Likeness and Medicinal Chemistry Friendliness of Small Molecules. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 42717. <https://doi.org/10.1038/srep42717>.
- (180) Cheng, X.; Bai, X.; Jing, S.; Ebert, H.; Prehm, M.; Tschierske, C. Self-Assembly of Imidazolium-Based Rodlike Ionic Liquid Crystals: Transition from Lamellar to Micellar Organization. *Chem. – A Eur. J.* **2010**, *16* (15), 4588–4601. <https://doi.org/10.1002/chem.200903210>.
- (181) Hu, X. Y.; Jia, K.; Cao, Y.; Li, Y.; Qin, S.; Zhou, F.; Lin, C.; Zhang, D.; Wang, L. Dual Photo- and PH-Responsive Supramolecular Nanocarriers Based on Water-Soluble Pillar[6]Arene and Different Azobenzene Derivatives for Intracellular Anticancer Drug Delivery. *Chem. – A Eur. J.* **2015**, *21*

- (3), 1208–1220. <https://doi.org/10.1002/chem.201405095>.
- (182) Finkelstein, H. Darstellung Organischer Jodide Aus Den Entsprechenden Bromiden Und Chloriden. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1910**, *43* (2), 1528–1532.
<https://doi.org/10.1002/cber.19100430257>.
- (183) Takahashi, Y.; Seki, M. Finkelstein Reaction in Non-Polar Organic Solvents: A Streamlined Synthesis of Organic Iodides. *Org. Process Res. Dev.* **2021**, *25* (8), 1974–1978.
<https://doi.org/10.1021/acs.oprd.1c00226>.
- (184) Ervithayasuporn, V.; Pornsamutsin, N.; Prangyoo, P.; Sammawutthichai, K.; Jaroentomeechai, T.; Phurat, C.; Teerawatananond, T. One-Pot Synthesis of Halogen Exchanged Silsesquioxanes: Octakis(3-Bromopropyl)Octasilsesquioxane and Octakis(3-Iodopropyl) Octasilsesquioxane. *Dalt. Trans.* **2013**, *42* (37), 13747–13753. <https://doi.org/10.1039/c3dt51373d>.
- (185) Kiffe-Delf, A.-L. Unveröffentlichte Forschungsergebnisse, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Kalscheuer. *Inst. für Pharm. Bio. und Biotech. der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*, **2022**.
- (186) Sabatelli, A. D.; Spirnak, J. A. Novel Sunscreen Agents, Sunscreen Compositions and Methods for Preventing Sunburn. **1991**, US 4999186 A.
- (187) Arakawa, Y.; Sasaki, Y.; Igawa, K.; Tsuji, H. Hydrogen Bonding Liquid Crystalline Benzoic Acids with Alkylthio Groups: Phase Transition Behavior and Insights into the Cybotactic Nematic Phase. *New J. Chem.* **2017**, *41* (14), 6514–6522. <https://doi.org/10.1039/C7NJ00282C>.
- (188) Li, J.; Chen, L.; Goyal, B.; Laidig, G.; Stanton, T. F.; Sjogren, E. B. Heterocyclic Inhibitors of Glutaminase. **2013**, WO 2013/078123 A1.
- (189) Yang, Z.; Xu, W.; Wu, Q.; Xu, J. Aminoxidation of Arenethiols to N-Chloro-N-Sulfonyl Sulfinamides. *J. Org. Chem.* **2016**, *81* (7), 3051–3057.
<https://doi.org/10.1021/acs.joc.6b00261>.
- (190) Cheng, L. J.; Islam, S. M.; Mankad, N. P. Synthesis of Allylic Alcohols via Cu-Catalyzed Hydrocarbonylative Coupling of Alkynes with Alkyl Halides. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140* (3), 1159–1164. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b12582>.
- (191) Chappellet, S.; Eckert, J.-F.; Ibn-Elhj, M.; Lincker, F.; Palika, S.; Seiberle, H.; Tang, Q.; Veenstra, E. Photoaligning Materials. **2013**, WO 2013/050121 A1.
- (192) Lee, J.; Zhong, Y. L.; Reamer, R. A.; Askin, D. Practical Synthesis of Sultams via Sulfonamide Dianion Alkylation: Application to the Synthesis of Chiral Sultams. *Org. Lett.* **2003**, *5* (22), 4175–4177. <https://doi.org/10.1021/ol0356183>.

- (193) Wei, Q.; Yuan, X.; Zhang, L.; Wang, L.; Yang, H.; Wang, Y. Synthesis and Mesomorphic Properties of Two Series of Laterally Fluorinated Symmetric Ester Liquid Crystals. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **2008**, *487* (1), 52–60. <https://doi.org/10.1080/15421400802198359>.
- (194) Hirai, T.; Yoshizawa, A.; Nishiyama, I.; Fukumasa, M.; Shiratori, N.; Yokoyama, A. Novel Halogen-Containing Ester Compounds, and Their Intermediates, and Method of Producing the Same as Well as Liquid Crystal Compositions Containing the Same and Light Switching Elements. **1992**, US 5098602 A.
- (195) Luo, Y.-R. Comprehensive Handbook of Chemical Bond Energies. *CRC Press* **2007**, *1*. <https://doi.org/10.1201/9781420007282>.
- (196) Barnes-Seeman, D.; Beck, J.; Springer, C. Fluorinated Compounds in Medicinal Chemistry: Recent Applications, Synthetic Advances and Matched-Pair Analyses. *Curr. Top. Med. Chem.* **2014**, *14* (7), 855–864. <https://doi.org/10.2174/1568026614666140202204242>.
- (197) Purser, S.; Moore, P. R.; Swallow, S.; Gouverneur, V. Fluorine in Medicinal Chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37* (2), 320–330. <https://doi.org/10.1039/b610213c>.
- (198) Swallow, S. Fluorine in Medicinal Chemistry. *Prog. Med. Chem.* **2015**, *54*, 65–133. <https://doi.org/10.1016/bs.pmch.2014.11.001>.
- (199) Kirk, K. Fluorination in Medicinal Chemistry: Methods, Strategies, and Recent Development. *Org. Process Res. Dev.* **2008**, *12* (2), 305–321. <https://doi.org/10.1021/op700134j>.
- (200) Sit, S. Y.; Conway, C. M.; Xie, K.; Bertekap, R.; Bourin, C.; Burris, K. D. Oxime Carbamate-Discovery of a Series of Novel FAAH Inhibitors. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2010**, *20* (3), 1272–1277. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.11.080>.
- (201) Shioiri, T.; Ninomiya, K.; Yamada, S. Diphenylphosphoryl Azide. New Convenient Reagent for a Modified Curtius Reaction and for Peptide Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94* (17), 6203–6205. <https://doi.org/10.1021/ja00772a052>.
- (202) Smith, P. A. S. The Curtius Reaction. *Org. React.* **2011**, 337–449. <https://doi.org/10.1002/0471264180.or003.09>.
- (203) Subbaiah, M. A. M.; Meanwell, N. A. Bioisosteres of the Phenyl Ring: Recent Strategic Applications in Lead Optimization and Drug Design. *J. Med. Chem.* **2021**, *64* (19), 14046–14128. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c01215>.
- (204) Zong, C.; Liu, J.; Chen, S.; Zeng, R.; Zou, J. Efficient C-S Cross-Coupling of Thiols with Aryl Iodides Catalyzed by Cu(OAc)₂·H₂O and 2,2'-Biimidazole. *Chinese J. Chem.* **2014**, *32* (3), 212–

218. <https://doi.org/10.1002/cjoc.201300830>.
- (205) Zhang, H.; Cai, Q.; Ma, D. Amino Acid Promoted CuI-Catalyzed C-N Bond Formation between Aryl Halides and Amines or N-Containing Heterocycles. *J. Org. Chem.* **2005**, *70* (13), 5164–5173. <https://doi.org/10.1021/jo0504464>.
- (206) McGaughey, G. B.; Gagné, M.; Rappé, A. K. π -Stacking Interactions: Alive and Well in Proteins. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (25), 15458–15463. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.25.15458>.
- (207) Pimviriyakul, P.; Jaruwat, A.; Chitnumsub, P.; Chaiyen, P. Structural Insights into a Flavin-Dependent Dehalogenase HadA Explain Catalysis and Substrate Inhibition via Quadruple π -Stacking. *J. Biol. Chem.* **2021**, *297* (2), 100952. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100952>.
- (208) Qiao, J. X.; Chang, C. H.; Cheney, D. L.; Morin, P. E.; Wang, G. Z.; King, S. R.; Wang, T. C.; Rendina, A. R.; Luettgen, J. M.; Knabb, R. M.; et al. SAR and X-Ray Structures of Enantiopure 1,2-Cis-(1R,2S)-Cyclopentylidiamine and Cyclohexylidiamine Derivatives as Inhibitors of Coagulation Factor Xa. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2007**, *17* (16), 4419–4427. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.06.029>.
- (209) Tani, S.; Uehara, T. N.; Yamaguchi, J.; Itami, K. Programmed Synthesis of Arylthiazoles through Sequential C-H Couplings. *Chem. Sci.* **2014**, *5* (1), 123–135. <https://doi.org/10.1039/c3sc52199k>.
- (210) Ioannidis, S.; Talbot, A. C.; Follows, B.; Buckmelter, A. J.; Wang, M.; Campbell, A.-M. Pyrrolotriazinones and Imidazotriazinones as Ubiquitin-Specific Protease 7 Inhibitors. **2016**, US 2016/0185786 A1.
- (211) Zhao, S.; Zhang, X.; Wei, P.; Su, X.; Zhao, L.; Wu, M.; Hao, C.; Liu, C.; Zhao, D.; Cheng, M. Design, Synthesis and Evaluation of Aromatic Heterocyclic Derivatives as Potent Antifungal Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *137*, 96–107. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.05.043>.
- (212) Zürcher, M.; Hof, F.; Barandun, L.; Schütz, A.; Schweizer, W. B.; Meyer, S.; Bur, D.; Diederich, F. Synthesis of Exo-3-Amino-7-Azabicyclo[2.2.1]heptanes as a Class of Malarial Aspartic Protease Inhibitors: Exploration of Two Binding Pockets. *European J. Org. Chem.* **2009**, No. 11, 1707–1719. <https://doi.org/10.1002/ejoc.200801184>.
- (213) Goutopoulos, A.; Fan, P.; Khanolkar, A. D.; Xie, X. Q.; Lin, S.; Makriyannis, A. Stereochemical Selectivity of Methanandamides for the CB1 and CB2 Cannabinoid Receptors and Their Metabolic Stability. *Bioorganic Med. Chem.* **2001**, *9* (7), 1673–1684. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(01\)00088-8](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(01)00088-8).

- (214) Macuamule, C. J.; Tjhin, E. T.; Jana, C. E.; Barnard, L.; Koekemoer, L.; De Villiers, M.; Saliba, K. J.; Strauss, E. A Pantetheinase-Resistant Pantothenamide with Potent, on-Target, and Selective Antiplasmodial Activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59* (6), 3666–3668. <https://doi.org/10.1128/AAC.04970-14>.
- (215) Zarei, M.; Nakhli, M. E. Synthesis of Acylhydrazines and, Symmetrical and Asymmetrical Diacylhydrazines from Carboxylic Acid via the Vilsmeier Reagent Mediated Process. *Res. Chem. Intermed.* **2017**, *43* (3), 1909–1918. <https://doi.org/10.1007/s11164-016-2738-x>.
- (216) Liesivuori, J.; Savolainen, A. H. Methanol and Formic Acid Toxicity: Biochemical Mechanisms. *Pharmacol. Toxicol.* **1991**, *69* (3), 157–163. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1991.tb01290.x>.
- (217) Maag, H. Prodrugs of Carboxylic Acids. *Biotechnol. Pharm. Asp.* **2007**, *5*, 703–729. https://doi.org/10.1007/978-0-387-49785-3_20.
- (218) Ghosh, A. K.; Brindisi, M. Organic Carbamates in Drug Design and Medicinal Chemistry. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (7), 2895–2940. <https://doi.org/10.1021/jm501371s>.
- (219) Lima, M. L.; Barreiro, J. E. Bioisosterism: A Useful Strategy for Molecular Modification and Drug Design. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12* (1), 23–49. <https://doi.org/10.2174/0929867053363540>.
- (220) Brown, N. Bioisosterism in Medicinal Chemistry. *Bioisosteres Med. Chem.* **2012**, *54*, 1–14. <https://doi.org/10.1002/9783527654307.ch1>.
- (221) Ballatore, C.; Hury, D. M.; Smith III, A. B. Carboxylic Acid (Bio)Isosteres in Drug Design. *ChemMedChem* **2013**, *8* (3), 385–395. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201200585>.
- (222) Angell, Y. L.; Burgess, K. Peptidomimetics via Copper-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloadditions. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36* (10), 1674–1689. <https://doi.org/10.1039/B701444A>.
- (223) Swain, C. J.; Baker, R.; Kneen, C.; Moseley, J.; Saunders, J.; Seward, E. M.; Stevenson, G.; Beer, M.; Stanton, J.; Watling, K. Novel 5-HT₃ Antagonists. Indole Oxadiazoles. *J. Med. Chem.* **1991**, *34* (1), 140–151. <https://doi.org/10.1021/jm00105a021>.
- (224) Reed, C. W.; Washecheck, J. P.; Quitlag, M. C.; Jenkins, M. T.; Rodriguez, A. L.; Engers, D. W.; Blobaum, A. L.; Conn, P. J.; Niswender, C. M.; Lindsley, C. W. Surveying Heterocycles as Amide Bioisosteres within a Series of MGLu7 NAMs: Discovery of VU6019278. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2019**, *29* (10), 1211–1214. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.03.016>.
- (225) Aprile, S.; Riva, B.; Bhela, I. P.; Cordero-Sanchez, C.; Avino, G.; Genazzani, A. A.; Serafini, M.;

- Pirali, T. 1,2,4-Oxadiazole-Bearing Pyrazoles as Metabolically Stable Modulators of Store-Operated Calcium Entry. *ACS Med. Chem. Lett.* **2021**, *12* (4), 640–646.
<https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.1c00034>.
- (226) Lobera, M.; Madauss, K. P.; Pohlhaus, D. T.; Wright, Q. G.; Trocha, M.; Schmidt, D. R.; Baloglu, E.; Trump, R. P.; Head, M. S.; Hofmann, G. A.; et al. Selective Class IIa Histone Deacetylase Inhibition via a Nonchelating Zinc-Binding Group. *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9* (5), 319–325.
<https://doi.org/10.1038/nchembio.1223>.
- (227) Burgess, E. M.; Penton, H. R.; Taylor, E. A. Synthetic Applications of N-Carboalkoxysulfamate Esters. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92* (17), 5224–5226. <https://doi.org/10.1021/ja00720a041>.
- (228) Fuchino, K.; Masui, M.; Yoshida, S.; Kusakabe, K. Facile Construction of an Amino-1,3-Oxazine Scaffold Using Burgess Reagent Under Mild Conditions. *Tetrahedron Lett.* **2021**, *64*, 152684.
<https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2020.152684>.
- (229) Sams-Dodd, F. Target-Based Drug Discovery: Is Something Wrong? *Drug Discov. Today* **2005**, *10* (2), 139–147. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(04\)03316-1](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(04)03316-1).
- (230) Wohlleben, W.; Mast, Y.; Stegmann, E.; Ziemert, N. Antibiotic Drug Discovery. *Microb. Biotechnol.* **2016**, *9* (5), 541–548. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12388>.
- (231) Mechanism Matters. *Nat. Med.* **2010**, *16* (4), 347. <https://doi.org/10.1038/nm0410-347>.
- (232) Schenone, M.; Dančík, V.; Wagner, B. K.; Clemons, P. A. Target Identification and Mechanism of Action in Chemical Biology and Drug Discovery. *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9* (4), 232–240.
<https://doi.org/10.1038/nchembio.1199>.
- (233) Perlstein, E. O.; Ruderfer, D. M.; Roberts, D. C.; Schreiber, S. L.; Kruglyak, L. Genetic Basis of Individual Differences in the Response to Small-Molecule Drugs in Yeast. *Nat. Genet.* **2007**, *39* (4), 496–502. <https://doi.org/10.1038/ng1991>.
- (234) Zheng, X. S.; Chan, T. F.; Zhou, H. H. Genetic and Genomic Approaches to Identify and Study the Targets of Bioactive Small Molecules. *Chem. Biol.* **2004**, *11* (5), 609–618.
<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2003.08.011>.
- (235) Koutsoukas, A.; Simms, B.; Kirchmair, J.; Bond, P. J.; Whitmore, A. V.; Zimmer, S.; Young, M. P.; Jenkins, J. L.; Glick, M.; Glen, R. C.; et al. From in Silico Target Prediction to Multi-Target Drug Design: Current Databases, Methods and Applications. *J. Proteomics* **2011**, *74* (12), 2554–2574. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.05.011>.
- (236) Burdine, L.; Kodadek, T. Target Identification in Chemical Genetics: The (Often) Missing Link.

- Chem. Biol.* **2004**, *11* (5), 593–597. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2004.05.001>.
- (237) Chen, X.; Wang, Y.; Ma, N.; Tian, J.; Shao, Y.; Zhu, B.; Wong, Y. K.; Liang, Z.; Zou, C.; Wang, J. Target Identification of Natural Medicine with Chemical Proteomics Approach: Probe Synthesis, Target Fishing and Protein Identification. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2020**, *5* (1). <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0186-y>.
- (238) Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. Bioorthogonal Chemistry: Fishing for Selectivity in a Sea of Functionality. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2009**, *48* (38), 6974–6998. <https://doi.org/10.1002/anie.200900942>.
- (239) Breugst, M.; Reissig, H. U. The Huisgen Reaction: Milestones of the 1,3-Dipolar Cycloaddition. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2020**, *59* (30), 12293–12307. <https://doi.org/10.1002/anie.202003115>.
- (240) Ramapanicker, R.; Chauhan, P. Click Chemistry: Mechanistic and Synthetic Perspectives. *Click React. Org. Synth.* **2016**, 1–24. <https://doi.org/10.1002/9783527694174.ch1>.
- (241) Kaplan, W. D.; Worrell, B. T.; Malik, J. A.; Fokin, V. V. Direct Evidence of a Dinuclear Copper Intermediate in Cu(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloadditions. *Science (80-.)*. **2012**, *340* (6131), 457–460. <https://doi.org/10.1126/science.1232139>.
- (242) Zhu, L.; Brassard, C. J.; Zhang, X.; Guha, P. M.; Clark, R. J. On the Mechanism of Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition. *Chem. Rec.* **2016**, 1501–1517. <https://doi.org/10.1002/tcr.201600002>.
- (243) Kennedy, D. C.; McKay, C. S.; Legault, M. C. B.; Danielson, D. C.; Blake, J. A.; Pegoraro, A. F.; Stollow, A.; Mester, Z.; Pezacki, J. P. Cellular Consequences of Copper Complexes Used to Catalyze Bioorthogonal Click Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (44), 17993–18001. <https://doi.org/10.1021/ja2083027>.
- (244) Hamill, K.; Esko, J. D.; McCoy, L.; Tor, Y. Novel Polymyxin Derived Cell Penetrating Scaffolds. **2018**, US 2018 / 0099022 A1.
- (245) Lee, B.; Sun, W.; Lee, H.; Basavarajappa, H.; Sulaiman, R. S.; Sishtla, K.; Fei, X.; Corson, T. W.; Seo, S. Y. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Photoaffinity Probes of Antiangiogenic Homoisoflavonoids. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2016**, *26* (17), 4277–4281. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.07.043>.
- (246) Hage, D. S. Affinity Chromatography: A Review of Clinical Applications. *Clin. Chem.* **1999**, *45* (5), 593–615. <https://doi.org/10.1093/clinchem/45.5.593>.

- (247) Lomenick, B.; Olsen, R. W.; Huang, J. Identification of Direct Protein Targets of Small Molecules. *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6* (1), 34–46. <https://doi.org/10.1021/cb100294v>.
- (248) Guesdon, J. L.; Ternynck, T.; Avrameas, S. The Use of Avidin-Biotin Interaction in Immunoenzymatic Techniques. *J. Histochem. Cytochem.* **1979**, *27* (8), 1131–1139. <https://doi.org/10.1177/27.8.90074>.
- (249) MacGilvary, N. J.; Tan, S. Fluorescent Mycobacterium Tuberculosis Reporters: Illuminating Host-Pathogen Interactions. *Pathog. Dis.* **2018**, *76* (3). <https://doi.org/10.1093/femspd/fty017>.
- (250) Fluorophore Reference Guide: Excitation and Emission Data. *Bio-Rad Lab. Inc.* **2000**.
- (251) Feng, W.; Feng, S.; Feng, G. A Fluorescent ES IPT Probe for Imaging Co-Releasing Molecule-3 in Living Systems. *Anal. Chem.* **2019**, *91* (13), 8602–8606. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b01908>.
- (252) Sedgwick, A. C.; Wu, L.; Han, H. H.; Bull, S. D.; He, X. P.; James, T. D.; Sessler, J. L.; Tang, B. Z.; Tian, H.; Yoon, J. Excited-State Intramolecular Proton-Transfer (ESIPT) Based Fluorescence Sensors and Imaging Agents. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47* (23), 8842–8880. <https://doi.org/10.1039/c8cs00185e>.
- (253) Suzuki, N.; Kubota, T.; Ando, N.; Yamaguchi, S. Photobase-Driven Excited-State Intramolecular Proton Transfer (ESIPT) in a Strapped π -Electron System. *Chem. - A Eur. J.* **2022**, *28* (4), 202103584–202103585. <https://doi.org/10.1002/chem.202103584>.
- (254) Van de Waterbeemd, H.; Smith, D. A.; Beaumont, K.; Walker, D. K. Property-Based Design: Optimization of Drug Absorption and Pharmacokinetics. *J. Med. Chem.* **2001**, *44* (9), 1313–1333. <https://doi.org/10.1021/jm000407e>.
- (255) Kerns, E. H.; Di, L. Pharmaceutical Profiling in Drug Discovery. *Drug Discov. Today* **2003**, *8* (7), 316–323. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(03\)02649-7](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(03)02649-7).
- (256) Kerns, E. H.; Di, L. Chapter 5 - Chemical Stability. In *Comprehensive Medicinal Chemistry II*; Elsevier: Oxford, 2007; pp 489–507. <https://doi.org/10.1016/B0-08-045044-X/00138-3>.
- (257) Kibbey, C. E.; Poole, S. K.; Robinson, B.; Jackson, J. D.; Durham, D. An Integrated Process for Measuring the Physicochemical Properties of Drug Candidates in a Preclinical Discovery Environment. *J. Pharm. Sci.* **2001**, *90* (8), 1164–1175. <https://doi.org/10.1002/JPS.1070>.
- (258) Won, C. M.; Tang, S. Y.; Strohbeck, C. L. Photolytic and Oxidative Degradation of an Antiemetic Agent, RG 12915. *Int. J. Pharm.* **1995**, *121* (1), 95–105. <https://doi.org/10.1016/0378->

- 5173(95)00014-A.
- (259) Shah, K. P.; Zhou, J.; Lee, R.; Schowen, R. L.; Elsbernd, R.; Ault, J. M.; Stobaugh, J. F.; Slavik, M.; Riley, C. M. Automated Analytical Systems for Drug Development Studies. I — A System for the Determination of Drug Stability. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1994**, *12* (8), 993–1001. [https://doi.org/10.1016/0731-7085\(94\)E0011-O](https://doi.org/10.1016/0731-7085(94)E0011-O).
- (260) Di, L.; Kerns, E. H.; Hong, Y.; Chen, H. Development and Application of High Throughput Plasma Stability Assay for Drug Discovery. *Int. J. Pharm.* **2005**, *297* (1–2), 110–119. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.03.022>.
- (261) Testa, B.; Carrupt, P. -A; Gal, J. The So-called “Interconversion” of Stereoisomeric Drugs: An Attempt at Clarification. *Chirality* **1993**, *5* (3), 105–111. <https://doi.org/10.1002/chir.530050302>.
- (262) Leven, M.; Knaab, T. C.; Held, J.; Duffy, S.; Meister, S.; Fischli, C.; Meitzner, D.; Lehmann, U.; Lungerich, B.; Kuna, K.; et al. 3-Hydroxy-N'-Arylidenepropanehydrazonamides with Halo-Substituted Phenanthrene Scaffolds Cure P. Berghei Infected Mice When Administered Perorally. *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (14), 6036–6044. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00140>.
- (263) Moritz, A. Unveröffentlichte Forschungsergebnisse, Arbeitsgruppe Dr. Burckhardt. *Inst. für Klin. Pharm. und Pharmakother. der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*, **2022**.
- (264) Shah, S. M.; Jain, A. S.; Kaushik, R.; Nagarsenker, M. S.; Nerurkar, M. J. Preclinical Formulations: Insight, Strategies, and Practical Considerations. *AAPS PharmSciTech* **2014**, *15* (5), 1307–1323. <https://doi.org/10.1208/s12249-014-0156-1>.
- (265) Neervannan, S. Preclinical Formulations for Discovery and Toxicology: Physicochemical Challenges. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2006**, *2* (5), 715–731. <https://doi.org/10.1517/17425255.2.5.715>.
- (266) Venkatesh, S.; Lipper, R. A. Role of the Development Scientist in Compound Lead Selection and Optimization. *J. Pharm. Sci.* **2000**, *89* (2), 145–154. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6017\(200002\)89:2<145::AID-JPS2>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6017(200002)89:2<145::AID-JPS2>3.0.CO;2-6).
- (267) Lipinski, C. A. Drug-like Properties and the Causes of Poor Solubility and Poor Permeability. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2000**, *44* (1), 235–249. [https://doi.org/10.1016/S1056-8719\(00\)00107-6](https://doi.org/10.1016/S1056-8719(00)00107-6).
- (268) Martinez, M. N.; Amidon, G. L. A Mechanistic Approach to Understanding the Factors

- Affecting Drug Absorption: A Review of Fundamentals. *J. Clin. Pharmacol.* **2002**, *42* (6), 620–643. <https://doi.org/10.1177/00970002042006005>.
- (269) Shi, Y.; Porter, W.; Merdan, T.; Li, L. C. Recent Advances in Intravenous Delivery of Poorly Water-Soluble Compounds. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2009**, *6* (12), 1261–1282. <https://doi.org/10.1517/17425240903307423>.
- (270) Lee, Y. C.; Zocharski, P. D.; Samas, B. An Intravenous Formulation Decision Tree for Discovery Compound Formulation Development. *Int. J. Pharm.* **2003**, *253* (1–2), 111–119. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00704-4](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00704-4).
- (271) Alsenz, J.; Kansy, M. High Throughput Solubility Measurement in Drug Discovery and Development. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, *59* (7), 546–567. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.05.007>.
- (272) Gad, S. C.; Spainhour, C. B.; Shoemake, C.; Pallman, D. R. S.; Stricker-Krongrad, A.; Downing, P. A.; Seals, R. E.; Eagle, L. A.; Polhamus, K.; Daly, J. Tolerable Levels of Nonclinical Vehicles and Formulations Used in Studies by Multiple Routes in Multiple Species with Notes on Methods to Improve Utility. *Int. J. Toxicol.* **2016**, *35* (2), 95–178. <https://doi.org/10.1177/1091581815622442>.
- (273) Thackaberry, E. A.; Wang, X.; Schweiger, M.; Messick, K.; Valle, N.; Dean, B.; Sambrone, A.; Bowman, T.; Xie, M. Solvent-Based Formulations for Intravenous Mouse Pharmacokinetic Studies: Tolerability and Recommended Solvent Dose Limits. *Xenobiotica* **2014**, *44* (3), 235–241. <https://doi.org/10.3109/00498254.2013.845706>.
- (274) Gao, Y.; Shen, J. K.; Choy, E.; Zhang, Z.; Mankin, H. J.; Hornicek, F. J.; Duan, Z. Pharmacokinetics and Tolerability of NSC23925b, a Novel P-Glycoprotein Inhibitor: Preclinical Study in Mice and Rats. *Sci. Rep.* **2016**, *6*. <https://doi.org/10.1038/srep25659>.
- (275) Cheng, Y.; Moraski, G. C.; Cramer, J.; Miller, M. J.; Schorey, J. S. Bactericidal Activity of an Imidazo[1, 2- A]Pyridine Using a Mouse M. Tuberculosis Infection Model. *PLoS One* **2014**, *9* (1), 87483. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087483>.
- (276) Zhang, Y. D.; Jespersen, K. G.; Kempe, M.; Kornfield, J. A.; Barlow, S.; Kippelen, B.; Marder, S. R. Columnar Discotic Liquid-Crystalline Oxadiazoles as Electron-Transport Materials. *Langmuir* **2003**, *19* (16), 6534–6536. <https://doi.org/10.1021/la0341456>.
- (277) Montanari, S.; Mahmoud, A. M.; Pruccoli, L.; Rabbito, A.; Naldi, M.; Petralla, S.; Moraleda, I.; Bartolini, M.; Monti, B.; Iriepa, I.; et al. Discovery of Novel Benzofuran-Based Compounds with Neuroprotective and Immunomodulatory Properties for Alzheimer's Disease Treatment. *Eur.*

- J. Med. Chem.* **2019**, *178*, 243–258. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.05.080>.
- (278) Kühn, N.; Leuthold, M. M.; Behnam, M. A. M.; Klein, C. D. Beyond Basicity: Discovery of Nonbasic DENV-2 Protease Inhibitors with Potent Activity in Cell Culture. *J. Med. Chem.* **2021**, *64* (8), 4567–4587. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c02042>.
- (279) Dunetz, J. R.; Magano, J.; Weisenburger, G. A. Large-Scale Applications of Amide Coupling Reagents for the Synthesis of Pharmaceuticals. *Org. Process Res. Dev.* **2016**, *20* (2), 140–177. <https://doi.org/10.1021/op500305s>.
- (280) Sheng, X. H.; Cui, C. C.; Shan, C.; Li, Y. Z.; Sheng, D. H.; Sun, B.; Chen, D. Z. O - Phenylenediamine: A Privileged Pharmacophore of Ferrostatins for Radical-Trapping Reactivity in Blocking Ferroptosis. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16* (21), 3952–3960. <https://doi.org/10.1039/c8ob00546j>.
- (281) Han, G.; Liu, N.; Li, C.; Tu, J.; Li, Z.; Sheng, C. Discovery of Novel Fungal Lanosterol 14 α -Demethylase (CYP51)/Histone Deacetylase Dual Inhibitors to Treat Azole-Resistant Candidiasis. *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (10), 5341–5359. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00102>.
- (282) Beavers, L. S.; Finley, D. R.; Gadski, R. A.; Hipskind, P. A.; Jesudason, C. D.; Pickard, R. T.; Stevens, F. C.; Takakuwa, T. Pyrrolidine Derivatives as Histamine H3-Receptor Antagonists. **2006**, WO 2006/101808 A1.
- (283) Yang, L.; Lu, H. H.; Lai, C. H.; Li, G.; Zhang, W.; Cao, R.; Liu, F.; Wang, C.; Xiao, J.; Xue, D. Light-Promoted Nickel Catalysis: Etherification of Aryl Electrophiles with Alcohols Catalyzed by a NiII-Aryl Complex. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2020**, *59* (31), 12714–12719. <https://doi.org/10.1002/anie.202003359>.
- (284) Cameron, K. O.; Ke, H. Z.; Lefker, B. A.; Rosati, R. A.; Thompson, D. D. Prevention of Loss and Restoration of Bone Mass by Certain Prostaglandin Agonists. **2001**, US/6288120 B1.
- (285) Lu, R. J.; Pickens, J. C.; Tucker, J. A.; Zinevitch, T.; Sviridov, S.; Konoplev, V. Piperazine and Piperidine Biaryl Derivatives. **2007**, WO 2007/103456 A2.
- (286) Liang, J.; Soucy, V. D.; Tusi, V.; Liu, Y.; Zhang, B.; Lai, Y.; Magnuson, S.; Zhu, B.; Wang, F.; Gu, J.; et al. Steric and Electronic Factors Influence Regio-Isomeric Thiazole Formations between Substituted Benzothioamides and Ethyl Bromopyruvate. *J. Heterocycl. Chem.* **2014**, *51* (4), 1137–1146. <https://doi.org/10.1002/jhet.1644>.
- (287) Chen, Y.; Smith, P. A.; Roberts, T. C.; Higuchi, R. I.; Paraselli, P.; Koehler, M. F. T.; Schwarz, J. B.;

- Crawford, J. J.; Ly, C. Q.; Hanan, E. J.; et al. Macrocyclic Broad Spectrum Antibiotics. **2017**, WO 2017/084630 A1.
- (288) Gill, G. S.; Grobelny, D. W. S1P Receptors Modulators. **2010**, WO 2010/042998 A1.
- (289) Lima, T. C.; Ferreira, A. R.; Silva, D. F.; Lima, E. O.; de Sousa, D. P. Antifungal Activity of Cinnamic Acid and Benzoic Acid Esters against *Candida Albicans* Strains. *Nat. Prod. Res.* **2018**, 32 (5), 572–575. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1317776>.