

Entwicklung und Charakterisierung von neuen und selektiven Inhibitoren für die Ecto-5'-Nucleotidase

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Marianne Freundlieb

aus

Leverkusen

Bonn 2016

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Christa E. Müller
2. Gutachter: Prof. Dr. Michael Gütschow

Tag der Promotion: 10.05.2016

Erscheinungsjahr: 2016

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulserver der ULB Bonn (http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 2010 bis Dezember 2015 am Pharmazeutischen Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn Unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Christa E. Müller durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Christa E. Müller für die Überlassung des interessanten und vielseitigen Themas, die fachliche Unterstützung, die wertvollen Anregungen und Diskussionen, sowie die konstruktive Kritik, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Gütschow danke ich sehr herzlich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Enzyme als Arzneimitteltargets.....	1
1.2	Struktur und Katalyse von Enzymen	2
1.3	Enzymkinetik	3
1.4	Enzyminhibition	6
1.4.1	Kompetitiver Inhibitions-Mechanismus	7
1.4.2	Nicht-kompetitiver Inhibitions-Mechanismus	8
1.4.3	Unkompetitiver Inhibitions-Mechanismus	9
1.5	Ectonucleotidasen	11
1.5.1	Klassifizierung und Struktur der Ectonucleotidasen	11
1.5.2	Metabolismus extrazellulärer Nucleotide	13
1.6	Purinerge Rezeptoren.....	14
1.7	Ecto-5'-Nucleotidase.....	17
1.7.1	Struktur	18
1.7.2	Inhibitoren der Ecto-5'-Nucleotidase	23
1.7.2.1	Nucleotidische Inhibitoren	23
1.7.2.2	Anthrachinone	25
1.7.2.3	Polyoxometalate.....	25
1.7.2.4	Sulfonsäuren	26
1.7.2.5	3,4-Dihydropyrimidinone (DHPMs).....	27
1.7.2.6	Flavonoide	27
1.7.2.7	Alkaloide.....	28
1.7.2.8	Methylxanthine	28
1.7.2.9	Übersicht.....	29
1.8	Therapeutisches Potential.....	31
2	Ziele der Arbeit	36

3	Entwicklung enzymatischer Assays für die Charakterisierung von Inhibitoren der Ecto-5'-Nucleotidase	38
3.1	Einleitung	38
3.2	Malachitgrün-Assay	41
3.2.1	Kalibrierung des Testsystems	43
3.2.2	Bestimmung der optimalen Enzymkonzentration	44
3.2.3	Bestimmung des K_M -Wertes	45
3.2.4	Untersuchung des Einflusses verschiedener Pufferzusätze und von DMSO auf die Enzymreaktion	46
3.2.5	Anpassung der Inkubationszeit	49
3.2.6	Standardinhibitionskurven	50
3.2.7	Z'-Faktor	50
3.2.8	Zusammenfassung	51
3.3	Radiometrischer Assay	53
3.3.1	Kalibrierung des Testsystems	56
3.3.2	Bestimmung der optimalen Enzymkonzentration	57
3.3.3	Enzymkinetik	59
3.3.4	Michaelis-Menten-Plot	60
3.3.5	Z'-Faktor	61
3.3.6	Standard-Inhibitionskurven	62
3.3.7	Optimierung der Bedingungen zur Verwendung einer humanen Präparation der Ecto-5'-Nucleotidase	63
3.3.8	Zusammenfassung	64
4	Untersuchung einer Substanz-Bibliothek	66
4.1	Screening	66
4.2	Konzentrations-Inhibitions-Kurven	67
4.3	Struktur-Wirkungs-Beziehungen	70
4.3.1	N,N-Dimethylumazin-Derivate	70
4.3.2	Bizyklische Pyrimidin-2-amin-Derivate	72
4.4	Zusammenfassung	83
5	Untersuchung von α,β-Methylen-ADP-Derivaten als Inhibitoren der Ecto-5'-Nucleotidase	84

5.1 AOPCP-Derivate mit Substitution in Position 2	85
5.2 AOPCP-Derivate mit Substitution in Position 8	87
5.3 AOPCP-Derivate mit Substitution in Position N^6	88
5.4 AOPCP-Derivate mit Substitution in Position 6	93
5.5 AOPCP-Derivate mit Mehrfach-Substitution	95
5.6 AOPCP-Derivate mit Substitution an der Ribose-Partialstruktur	99
5.7 AOPCP-Derivate mit Substitution in der Phosphatkette	101
5.8 Zusammenfassung	103
6 Virtuelles Inhibitor-Screening an einem Homologiemodell der murinen Ecto-5'-Nucleotidase	104
6.1 Erstellung des Modells	104
6.2 Vergleich von Modell und Röntgenstruktur	105
6.3 Virtuelles Screening	106
7 Untersuchung ausgewählter Verbindungen aus dem virtuellen Screening	110
7.1 Screening	110
7.2 Konzentrations-Inhibitions-Kurven	111
7.3 Hemmmechanismus	115
7.4 Zusammenfassung	116
8 Synthesen	117
8.1 Darstellung von <i>N</i>-Sulfamoylphenylbenzamid-Derivaten	118
8.2 Synthese von 4-(2-Benzylidenhydrazinyl)benzensulfonamiden	124
8.3 Darstellung von 2-Oxo-<i>N</i>-(4-sulfamoylphenyl)-2<i>H</i>-chromen-3-carboxamiden	127

9	Untersuchung der Sulfonamid-Derivate als Inhibitoren der Ecto-5'-Nucleotidase.....	131
9.1	Screening	131
9.2	Konzentrations-Inhibitions-Kurven.....	132
9.3	Struktur-Wirkungs-Beziehungen.....	132
9.3.1	Sulfamoylbenzamide.....	132
9.3.2	Hydrazin-Derivate.....	133
9.3.3	Cumarin-Derivate	135
9.4	Zusammenfassung und Ausblick.....	138
10	Zusammenfassung.....	139
11	Experimenteller Teil	147
11.1	Allgemeine Angaben zur pharmakologischen Testung	147
11.1.1	Software	147
11.1.2	Chemikalien und Geräte	147
11.1.2.1	Geräte und Materialien.....	147
11.1.2.2	Chemikalien	149
11.1.2.3	Testverbindungen.....	150
11.1.2.4	Enzym	150
11.1.2.5	Radioliganden	150
11.1.2.6	Puffer und Lösungen	151
	Malachitgrün-Farbstofflösung.....	152
	Ammoniummolybdat-Lösung	152
11.2	Malachitgrün-Assay	153
11.2.1	Kalibrierung des Testsystems	153
11.2.2	Bestimmung der optimalen Enzymkonzentration	154
11.2.3	Michaelis-Menten-Plot	155
11.2.4	Enzymkinetik	157
11.2.5	Konzentrations-Inhibitions-Kurven	158
11.2.6	Screening	160
11.3	Radiometrischer Assay.....	161
11.3.1	Kalibrierung des Testsystems	161
11.3.2	Bestimmung der optimalen Enzymkonzentration	164

Inhaltsverzeichnis

11.3.3 Enzymkinetik	165
11.3.4 Michaelis Menten-Plot.....	166
11.3.5 Validierung	167
11.3.6 Konzentrations-Inhibitions-Kurven	168
11.3.7 Screening	170
11.4 Allgemeine Angaben zu Synthesen.....	171
11.4.1 Chemikalien und Geräte Chemikalien	171
11.5 <i>N</i>-(4-Sulfamoylphenyl)benzamide.....	173
11.6 4-(2-Benzylidenhydrazinyl)benzensulfonamide	200
11.7 2-Oxo-<i>N</i>-(4-sulfamoylphenyl)-2<i>H</i>-chromen-3-carboxamide.....	217
12 Abkürzungsverzeichnis	225
13 Literaturverzeichnis	228

1 Einleitung

1.1 Enzyme als Arzneimitteltargets

Enzyme fungieren als Katalysatoren für alle im Organismus stattfindenden biochemischen Reaktionen und sind damit essentiell für das Überleben des Organismus. Kommt es allerdings, beispielsweise durch Genmutation, zu einer Überexpression eines Enzyms oder zu einer Veränderung der Tertiärstruktur und einer dadurch ausgelösten erhöhten enzymatischen Aktivität, so können durch diese Fehlregulationen Erkrankungen ausgelöst werden.

Damit Arzneistoffe effektiv im lebenden Organismus wirken können, müssen sie zunächst resorbiert und verteilt werden. Sie müssen daher in der Lage sein, Zellmembranen zu überwinden, um ihre Zielstruktur zu erreichen, und darüber hinaus eine gewisse Zeit im Kreislauf verbleiben. Diese Voraussetzungen stellen besondere Ansprüche an die physikochemischen Eigenschaften der Arzneistoff-Moleküle und werden am besten von kleinen Molekülen (max. 500 Da), sogenannten „small molecule drugs“ erfüllt, die häufig einen hydrophoben Charakter aufweisen, und oft Heteroatome als Donatoren für nicht-kovalente Wechselwirkungen besitzen. Entsprechende Anforderungen stellen sich daher auch an die Zielstruktur, die komplementär zum Arzneistoffmolekül sein muss, um eine gute Interaktion mit dem Molekül gewährleisten zu können. Enzyme stellen auf Grund ihrer strukturellen Eigenschaften besonders geeignete Zielstrukturen für „small molecule drugs“ dar. Dies zeigt sich auch bei einer Betrachtung der auf dem Markt befindlichen Arzneistoffe und ihrer jeweiligen Zielstrukturen.¹

Abbildung 1 gibt die prozentuale Verteilung verschiedener Zielstrukturen für auf dem Markt befindliche Arzneimittel (Stand 2012) wieder und zeigt, dass die Klasse der Enzyme mit rund 28% das zweitwichtigste Arzneistoff-Target nach der Klasse der Rezeptoren darstellt.²

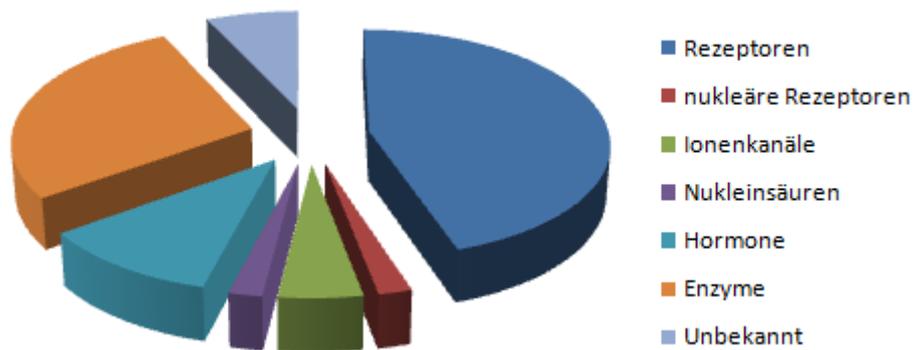


Abbildung 1.1: Targets der auf dem Markt befindlichen Arzneimittel (Stand 2012) modifiziert nach Adams et al.²

Bekannte Beispiele auf dem Markt befindlicher Enzyminhibitoren sind: Aciclovir als Inhibitor der viralen DNA-Polymerase, Acetylsalicylsäure als Inhibitor der Cyclooxygenase, Enalapril als Inhibitor des Angiotensin-konvertierenden Enzyms, Methotrexat als Inhibitor der Dihydrofolat-Reduktase und Sildenafil als Inhibitor der Phosphodiesterase.¹

1.2 Struktur und Katalyse von Enzymen

Enzyme sind aus Polypeptid-Ketten aufgebaut, die über ihre Sekundärstruktur gefaltet und über die Tertiärstruktur räumlich orientiert sind. Diese Struktur wird durch schwache intramolekulare Kräfte wie Wasserstoffbrücken und van-der-Waals-Kräfte stabilisiert, die reversibel und leicht aufzuheben sind, was die gesamte Struktur des Enzyms sehr dynamisch macht. Enzyme kommen daher nicht nur in einer festen Konformation vor, sondern vielmehr gehen verschiedene Subzustände ineinander über und bieten daher eine breitere Möglichkeit für Ligand-Interaktionen.¹

Durch die Bindung des Substrates kann eine relativ starke Konformationsänderung wie beispielsweise eine Domänen-Rotation ausgelöst werden, wie sie später noch für die Ecto-5'-Nucleotidase genauer beschrieben wird. Eine weitere Konformationsänderung sehen wir zum Beispiel bei der Aspartatprotease, die das Umklappen eines Loops zeigt. Durch diese relativ starke Konformationsänderung ist es möglich, ausgelöst durch die

Interaktion des Substrates mit der Bindungstasche des Enzyms, das katalytische Zentrum zu schließen, so dass die enzymatische Reaktion erfolgen kann. Anschließend geht das Enzym wieder an die offene dynamische Konformation über, aus der das Produkt dissoziieren kann.¹

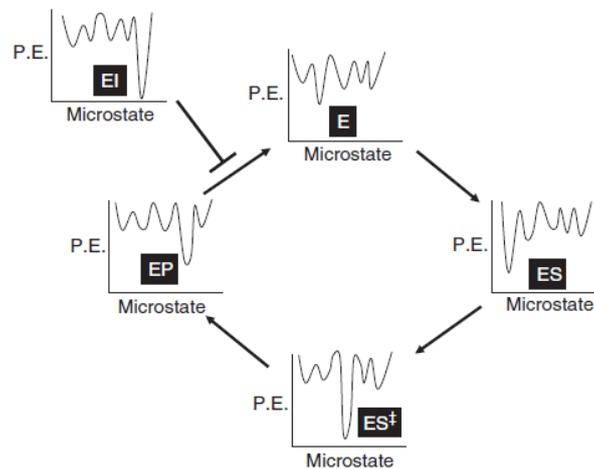


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Veränderungen der Protein-Konformation während der Assoziation, Katalyse und Dissoziation des Substrates. Für jeden Zustand ist ein Potential-Energie-Diagramm angegeben, das die jeweilige Konformation widerspiegelt.¹

In dem in Abbildung 1.2 dargestellten Diagramm bindet der Inhibitor nach der Produkt-Dissoziation. Ein Inhibitor kann aber grundsätzlich an jedem Zustand dieses katalytischen Zyklus binden und zwar an denjenigen, der die beste Komplementarität zu seiner Struktur aufweist.¹

1.3 Enzymkinetik

Bereits 1913 wurde von Leonor Michaelis und Maud Menten ein Modell entwickelt, das die hyperbole Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration erklären sollte.

Wie bereits vorher beschrieben, setzt sich eine enzymatische Reaktion aus mehreren reversiblen Reaktionen zusammen (Gleichung 1).^{1;3}

Gleichung 1:

Die Geschwindigkeit der Reaktion wird über die einzelnen kinetischen Konstanten beschrieben, wobei k_{+1} und k_{-2} jeweils die Geschwindigkeit der Dissoziationsreaktion wiedergeben und k_{-1} und k_{+2} die der Assoziationsreaktion. Die Dissoziationskonstante k_{-2} ist jedoch zu vernachlässigen, da aufgrund der Produktfreisetzung eine Rückreaktion so gut wie nicht stattfindet. Die Dissoziationskonstante k_{+2} wird auch als „turnover number“ bezeichnet und gibt die maximale Anzahl an Substratmolekülen an, die pro Enzymmolekül pro Sekunde umgesetzt werden können. Der Zusammenhang zwischen der Reaktionsgeschwindigkeit und den Konzentrationen der Reaktionsteilnehmer wird in der von Michaelis und Menten definierten Gleichung beschrieben.³

Gleichung 2

$$V = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

V = Umsatzgeschwindigkeit; V_{\max} = Maximalgeschwindigkeit; $[S]$ = Substratkonzentration;

$$K_M = \text{Michaelis-Konstante} = \frac{k_{+2} + k_{-1}}{k_{+1}}$$

Stellt man diesen Zusammenhang graphisch durch Auftragung der Umsatzgeschwindigkeit gegen die Substratkonzentration dar, erhält man eine Sättigungskurve (Abbildung 1.3).

Zunächst kommt es aufgrund des Konzentrationsverhältnisses $[S] \ll K_M$ zu einem raschen, fast linearen Anstieg der Umsatzgeschwindigkeit. Nimmt die Konzentration an Substrat zu (bis hin zu $K_M \ll [S]$), kommt es langsam zu einer Sättigung des Enzyms und die maximale Umsatzgeschwindigkeit (V_{\max}) wird erreicht, was sich in einer Abflachung der Kurve widerspiegelt. Die Michaelis-Konstante (K_M) gibt hierbei die Substratkonzentration an, bei der die halbmaximale Umsatzgeschwindigkeit erreicht wird und stellt somit ein Maß für die Substrataffinität des Enzyms dar. Der K_M -Wert ist eine sowohl substratspezifische als auch enzyspezifische Konstante.³

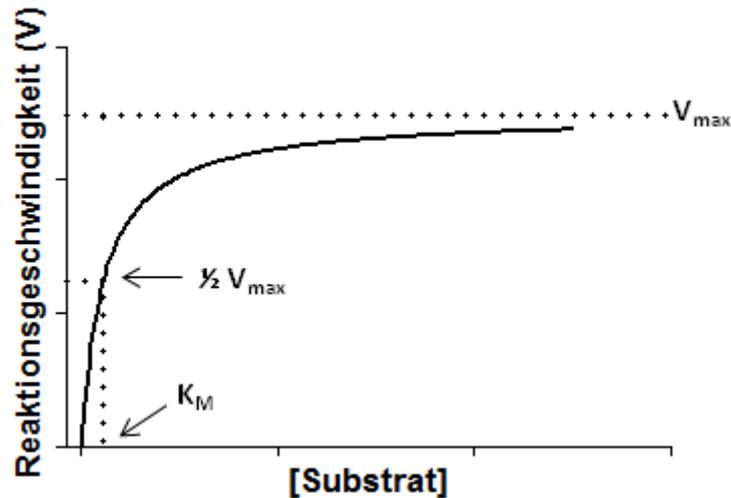


Abbildung 1.3: Michaelis-Menten-Kurve

Da eine Bestimmung der Parameter K_M und V_{\max} aus der graphischen Darstellung einer Sättigungskurve schwierig sein kann, wurden zu Zeiten, da es noch keine entsprechenden Programme zum so genannten „curve-fitting“ gab, Linearisierungsverfahren entwickelt, die eine Bestimmung dieser Werte vereinfachen. Das am häufigsten verwendete Verfahren ist die Linearisierung nach Lineweaver und Burk, bei der es sich um eine doppelt-reziproke-Auftragung handelt, die über die folgende Gleichung beschrieben werden kann:

Gleichung 3

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]}$$

Anhand der durch doppelt-reziproke-Auftragung erhaltenen Geraden lassen sich die Parameter $1/V_{\max}$ und $-1/K_M$, wie in Abbildung 1.4 dargestellt, über die Achsenabschnitte bestimmen.^{1; 3-4}

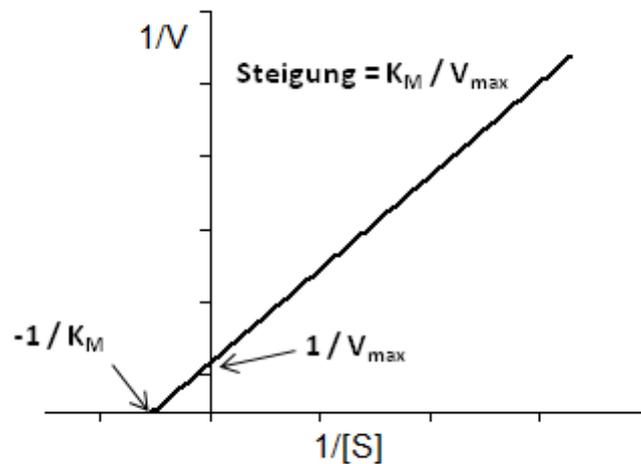


Abbildung 1.4: Lineweaver-Burk-Diagramm

Daneben gibt es noch zwei weitere Linearisierungsverfahren, den Eadie-Hofstee- und Hanes-Wolff-Plot, die jedoch weniger verbreitet sind.

Da bei diesen Linearisierungsverfahren jedoch die bei niedrigen Substratkonzentrationen gemessenen V -Werte, obwohl sie stärker fehlerbehaftet sind, stärker gewichtet werden als die V -Werte bei höheren Substratkonzentrationen, kann es zu einer Verzerrung der Messwerte kommen. Aufgrund neuerer, genauerer Verfahren für nicht-lineare Regressionsanalysen werden diese Linearisierungsverfahren daher heutzutage kaum noch genutzt.³

1.4 Enzyminhibition

Wie unter 1.2 bereits beschrieben bietet der Ablauf einer enzymatischen Reaktion verschiedene Angriffsstellen für Inhibitoren, wobei man grundsätzlich zunächst zwischen reversiblen und irreversiblen Inhibitoren unterscheidet. Die Hemmstoffe können an das freie Enzym, den Enzym-Substrat-Komplex oder an beides binden. Hieraus ergeben sich verschiedene Hemm-Mechanismen, die in den meisten Fällen auf reversiblen Interaktionen beruhen. Diese verschiedenen Hemm-Mechanismen werden im Folgenden noch einmal einzeln genauer vorgestellt.

1.4.1 Kompetitiver Inhibitions-Mechanismus

Kompetitive Inhibitoren binden im aktiven Zentrum des Enzyms und bilden hierbei einen Enzym-Inhibitor-Komplex aus. Häufig sind kompetitive Inhibitoren strukturell dem natürlichen Substrat sehr ähnlich, was es ihnen ermöglicht, die Substrat-Bindestelle zu besetzen. Es erfolgt also eine Konkurrenzreaktion zwischen der Bindung des Substrates und der des Inhibitors. Das Gleichgewicht, das sich zwischen der Ausbildung des Enzym-Substrat (ES)-Komplexes und des Enzym-Inhibitor (EI)-Komplexes einstellt, kann mithilfe der Dissoziationskonstante K_i wiedergegeben werden.¹

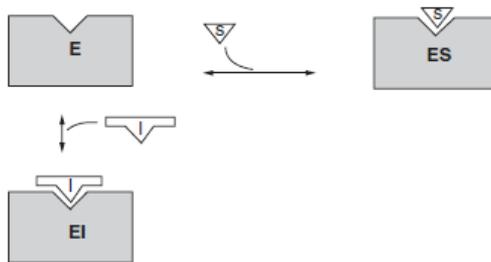


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung des kompetitiven Inhibitionsmechanismus.¹

Da Inhibitor und Substrat die gleiche Bindungsstelle besetzen, kommt es durch eine Erhöhung der Substratkonzentration zu einer Verdrängung des Inhibitors von der Bindungsstelle, und die Enzymhemmung kann auf diese Weise wieder aufgehoben werden. Daher wird die maximale Umsatzgeschwindigkeit (V_{\max}) durch den Inhibitor nicht beeinflusst, der apparente K_M -Wert hingegen wird erhöht.³ Dies lässt sich anhand der graphischen Darstellung im Michaelis-Menten-Diagramm und im Lineweaver-Burk-Diagramm erkennen (Abbildung 1.6).

Im Michaelis-Menten Diagramm zeigt sich dies zunächst noch nicht so deutlich, wählt man jedoch eine logarithmische Darstellung kann man sehr gut erkennen, dass die Maximalgeschwindigkeit unbeeinflusst bleibt. Die Erhöhung des K_M -Wertes zeigt sich in einer Rechts-Verschiebung der Kurven. Im Lineweaver-Burk Diagramm erkennt man den kompetitiven Hemmmechanismus daran, dass sich die erhaltenen Geraden auf der Ordinate schneiden.

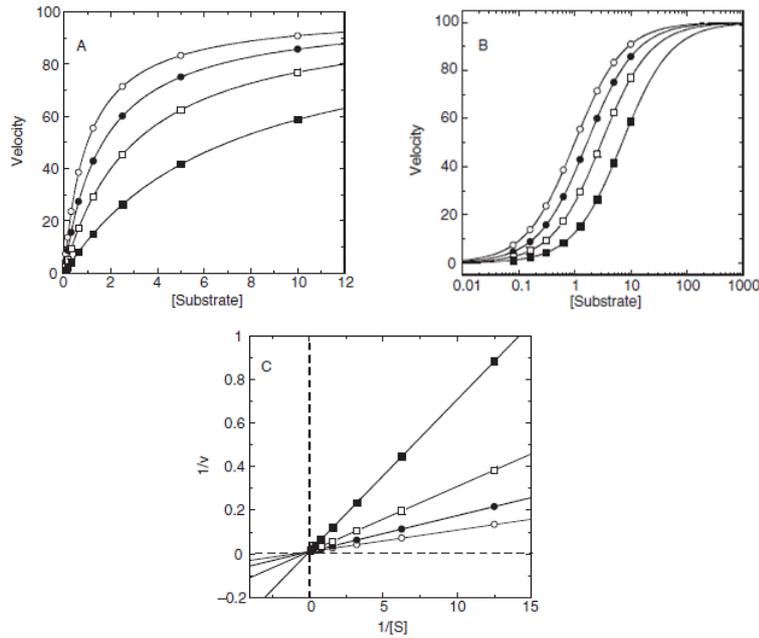


Abbildung 1.6: Graphische Darstellung der Bestimmung des kompetitiven Inhibitionsmechanismus durch Auftragung der Michaelis-Menten-Kurven unter Einfluss verschiedener Konzentrationen des Inhibitors in verschiedenen Darstellungen: \circ ohne Inhibitor $[I] = 0$; \bullet $[I] = K_i$; \square $[I] = 5 \cdot K_i$; \blacksquare $[I] = 10 \cdot K_i$. A: Michaelis-Menten Diagramm als Sättigungskurve. B: Michaelis-Menten Diagramm in logarithmischer Darstellung. C: Lineweaver-Burk Diagramm.¹

1.4.2 Nicht-kompetitiver Inhibitions-Mechanismus

Nicht-kompetitive Inhibitoren weisen eine andere Bindungsstelle als das Substrat auf und sind daher in der Lage, sowohl an das freie Enzym, als auch an den Enzym-Substrat-Komplex zu binden.

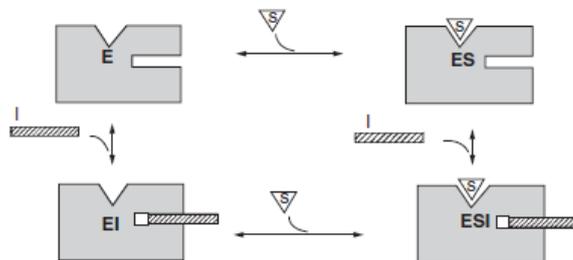


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung des nicht-kompetitiven Inhibitionsmechanismus.¹

Da keine Konkurrenz zwischen der Bindung des Substrates und der des Inhibitors besteht, ist es auch nicht möglich, den Inhibitor durch ein Erhöhen der Substratmenge wieder zu verdrängen. Daher wird die maximale Umsatzgeschwindigkeit (V_{\max}) durch den Inhibitor verringert, während der apparente K_M -Wert nahezu unverändert bleibt.³ Dies lässt sich anhand der graphischen Darstellung im Michaelis-Menten-Diagramm und im Lineweaver-Burk-Diagramm erkennen (Abbildung 1.8).

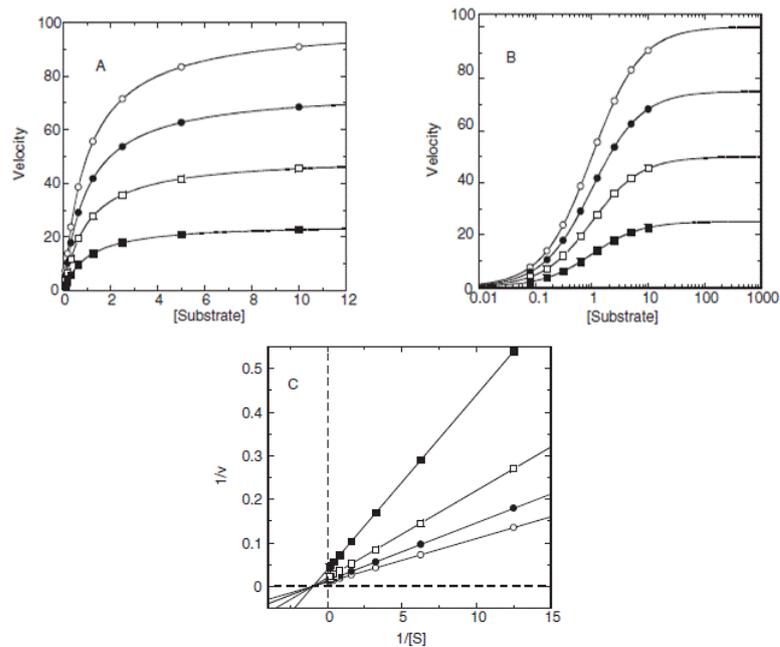


Abbildung 1.8: Graphische Darstellung der Bestimmung des nicht-kompetitiven Inhibitionsmechanismus durch Auftragung der Michaelis-Menten-Kurven unter Einfluss verschiedener Konzentrationen des Inhibitors in verschiedenen Darstellungen: ○ ohne Inhibitor [I] = 0; ● [I] = K_i ; ◻ [I] = $5 \cdot K_i$; ■ [I] = $10 \cdot K_i$. A: Michaelis-Menten Diagramm als Sättigungskurve. B: Michaelis-Menten Diagramm in logarithmischer Darstellung. C: Lineweaver-Burk Diagramm.¹

Die Abnahme der maximalen Umsatzgeschwindigkeit zeigt sich bereits im klassischen Michaelis-Menten-Diagramm sowie in dessen logarithmischer Darstellung. Im Lineweaver-Burk Plot erkennt man den nicht-kompetitiven Hemmmechanismus daran, dass sich die erhaltenen Geraden auf der Abszisse schneiden.

1.4.3 Unkompetitiver Inhibitions-Mechanismus

Inhibitoren, die lediglich an den Enzym-Substrat-Komplex, jedoch nicht an das freie Enzym binden können, nennt man unkompetitive Inhibitoren. Ein solcher Inhibitor

interagiert hierbei mit einer Bindungsstelle, die sich erst durch die über Substratbindung ausgelöste Konformationsänderung des Enzyms ausbildet (Abbildung 1.9).

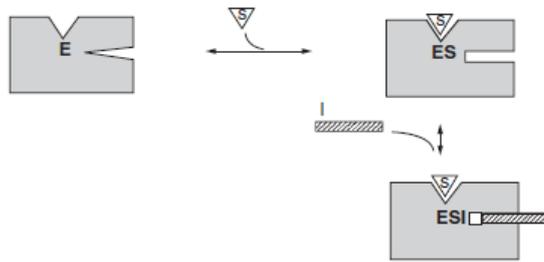


Abbildung 1.9: Schematische Darstellung des unkompetitiven Inhibitionsmechanismus.¹

Die unkompetitive Enzymhemmung ist daher Substrat-abhängig, wodurch eine Erhöhung der Substratkonzentration in diesem Fall zu einer Erhöhung der inhibitorischen Aktivität führen würde. Es zeigt sich für unkompetitive Inhibitoren daher sowohl eine Erniedrigung der maximalen Umsatzgeschwindigkeit (V_{max}), als auch des K_M -Wertes.^{1; 3}

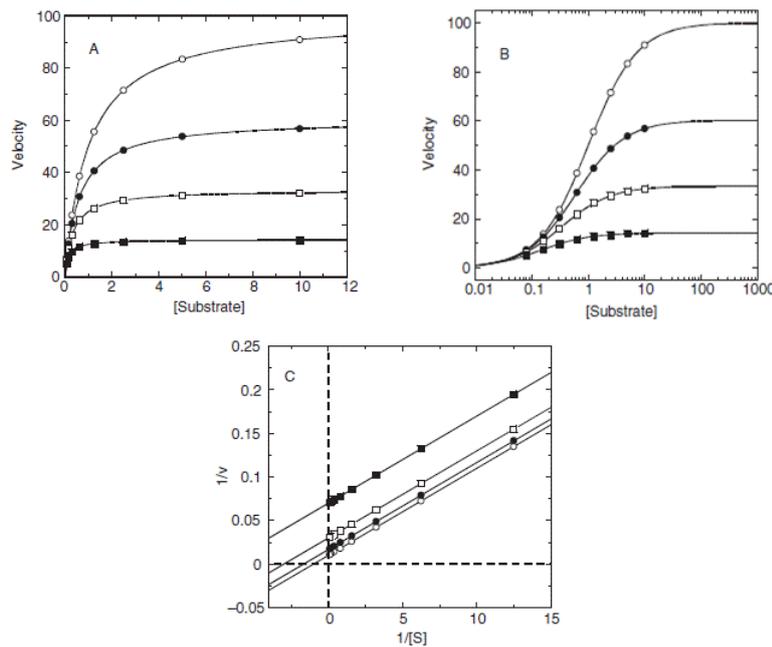


Abbildung 1.10: Graphische Darstellung der Bestimmung des unkompetitiven Inhibitionsmechanismus durch Auftragung der Michaelis-Menten-Kurven unter Einfluss verschiedener Konzentrationen des Inhibitors in verschiedenen Darstellungen: \circ ohne Inhibitor $[I] = 0$; \bullet $[I] = K_i$; \square $[I] = 5 \cdot K_i$; \blacksquare $[I] = 10 \cdot K_i$. A: Michaelis-Menten Diagramm als Sättigungskurve. B: Michaelis-Menten Diagramm in logarithmischer Darstellung. C: Lineweaver-Burk Diagramm¹

Im Michaelis-Menten Diagramm zeigt sich ein ähnliches Bild, wie bei nicht-kompetitiven Inhibitoren, da hier zunächst die Abnahme der maximalen Umsatzgeschwindigkeit ins Auge fällt. Im Gegensatz zu den nicht-kompetitiven Inhibitoren zeigt sich hier jedoch eine proportionale Erniedrigung des K_M -Wertes, was allerdings im Lineweaver-Burk-Diagramm deutlicher dargestellt werden kann. Hier erkennt man den unkompetitiven Hemmmechanismus daran, dass die erhaltenen Geraden parallel zueinander verlaufen.

1.5 Ectonucleotidasen

Der Begriff Ectonucleotidasen bezeichnet eine Gruppe von Enzymen, die extrazellulär Nucleotide dephosphorylieren. Sie spielen damit die Schlüsselrolle für deren Metabolismus und kontrollieren somit die Verfügbarkeit der einzelnen Nucleotide und Nucleoside. Ectonucleotidasen sind damit indirekt auch an der Signaltransduktion beteiligt, die durch die Bindung der Nucleotide und Nucleoside an die purinergen Rezeptoren gesteuert wird.⁵⁻¹⁰

Auf den genauen Ablauf der Metabolisierung sowie auf die Wirkungen der purinergen Rezeptoren wird im Folgenden genauer eingegangen.

1.5.1 Klassifizierung und Struktur der Ectonucleotidasen

Die Familie der Ectonucleotidasen setzt sich aus vier verschiedenen Enzymklassen zusammen, den Ecto-Nucleosidtriphosphatdiphosphohydrolasen (E-NTPDasen), den Ecto-Nucleotidpyrophosphatasen/phosphodiesterasen (E-NPPs), den Alkalischen Phosphatasen (APs) und der Ecto-5'-Nucleotidase (eN), die in Abbildung 1.11 aufgeführt sind.^{8; 10}

In der Klasse der NTPDasen wurden 8 Subtypen identifiziert, von denen jedoch nur vier (die NTPDase 1, NTPDase 2, NTPDase 3 und NTPDase 8) unter die Ectonucleotidasen fallen, die anderen vier Subtypen (NTPDase 4-7) sind intrazellulär in Membranen von Organellen lokalisiert.¹⁰⁻¹¹ Die Familie der NPPs setzt sich aus sieben Subtypen (NPP 1-7) zusammen, von denen jedoch nur NPP 1-3 bekanntermaßen Nucleotide hydrolysieren und somit zu den Ectonucleotidasen gehören.^{6; 8; 10} Von der humanen Alkalischen Phosphatase sind vier Isoenzyme bekannt, wobei drei gewebespezifisch sind und eine gewebeunspezifisch ist. Zu den gewebespezifischen zählen die intestinale Alkalische

Phosphatase (IAP), die Placenta-Alkalische Phosphatase (PLAP) und die keimzellspezifische Phosphatase (GCAP). Die Gewebeunspezifische Phosphatase (TNAP) wird vor allem in Knochen, Leber und Niere exprimiert, kommt in geringeren Konzentrationen aber auch in anderen Geweben vor.^{6; 8; 10}

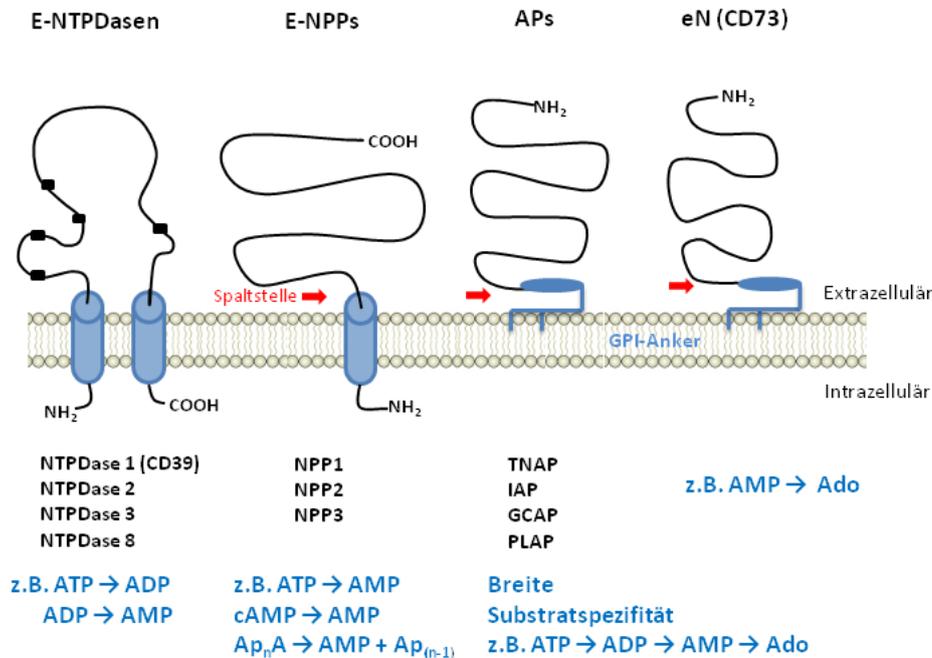


Abbildung 1.11: Klassifizierung der Ectonucleotidasen. (E-NTPDasen: Ecto-Nucleosidtriphosphatdiphosphohydrolasen, E-NPPs: Ecto-Nucleotidpyrophosphatasen/phosphodiesterasen, APs: Alkalische Phosphatasen, eN: Ecto-5'-Nucleotidase, GPI: Glycosylphosphatidylinositol, TNAP: gewebeunspezifische Phosphatase, IAP: intestinale Alkalische Phosphatase, GCAP: keimzellspezifische Phosphatase, PLAP: Placenta-Alkalische Phosphatase, cAMP: cyclisches AMP, Ap_nA: Dinucleosidpolyphosphat)

Die E-NTPDasen und die eN katalysieren konzertiert den Abbau von Nucleotiden zu Nucleosiden. Beide Enzymklassen sind Nucleotid-spezifisch, wobei die E-NTPDasen Nucleotidtriphosphate zu den entsprechenden Diphosphaten und weiter zum Monophosphat hydrolysieren und die eN das Nucleotidmonophosphat zum Nucleotid spaltet. Die beiden anderen Enzymklassen zeigen eine breitere Substratspezifität. Zu den Substraten der E-NPPs zählen Nucleosidtriphosphate und -diphosphate, NAD⁺, FAD, UDP-Zucker und Dinucleosidpolyphosphate, Phospholipide und Pyrophosphat. Kürzlich wurde zudem entdeckt, dass die E-NPP1 ebenfalls cyclische Dinucleotide, wie cGAMP effektiv hydrolysiert.¹² Neben diesen natürlich vorkommenden Verbindungen vermögen die NPPs aber auch künstliche Substrate, wie z.B. *p*-Nitrophenyl-TMP zu hydrolysieren.

Die Klasse der Alkalischen Phosphatasen zeigt ebenfalls nicht ausschließlich Ectonucleotidase-Aktivität, sondern katalysiert auch die Hydrolyse von verschiedenen Estern der Phosphorsäure mit organischen Verbindungen und vermag in Anwesenheit von hohen Phosphatkonzentrationen sogar Transphosphorylierungsreaktionen zu katalysieren. Aufgrund dieser geringen Spezifität ist es schwer zu sagen, welche Substrate physiologische Relevanz haben.¹⁰

1.5.2 Metabolismus extrazellulärer Nucleotide

Nucleotide kommen ubiquitär sowohl intra- als auch extrazellulär vor. Das am häufigsten vorkommende Nucleotid ATP dient intrazellulär hauptsächlich als Energielieferant für viele Prozesse wie dem aktiven Transport von Stoffen durch die Biomembran. Extrazellulär hingegen fungiert ATP als Signalmolekül an membranständigen nucleotidselektiven Rezeptoren (P2-Rezeptoren) die zu den oben erwähnten purinergen Rezeptoren gehören. Neben ATP sind aber auch andere Nucleotide dazu in der Lage, purinerge Rezeptoren zu aktivieren.⁶

Der Metabolismus ist hier am Beispiel des ATP dargestellt (Abbildung 1.12). ATP kann durch Zellyse, Ionenkanäle oder spezielle ATP-Transporter in den extrazellulären Raum gelangen. Dort kann es als Signalmolekül P2-Rezeptoren aktivieren oder es kann entweder von einer E-NTPDase zu ADP und weiter zu AMP oder von der E-NPP direkt in einem Schritt zu AMP dephosphoryliert werden. ADP ist ebenfalls in der Lage, P2-Rezeptoren zu aktivieren, wohingegen für AMP bisher keine Funktion als Signalmolekül nachgewiesen wurde. AMP wird weiter von der Ecto-5'-Nucleotidase zu Adenosin dephosphoryliert. Adenosin wiederum kann P1-Rezeptoren aktivieren und dient somit auch als Signalmolekül.

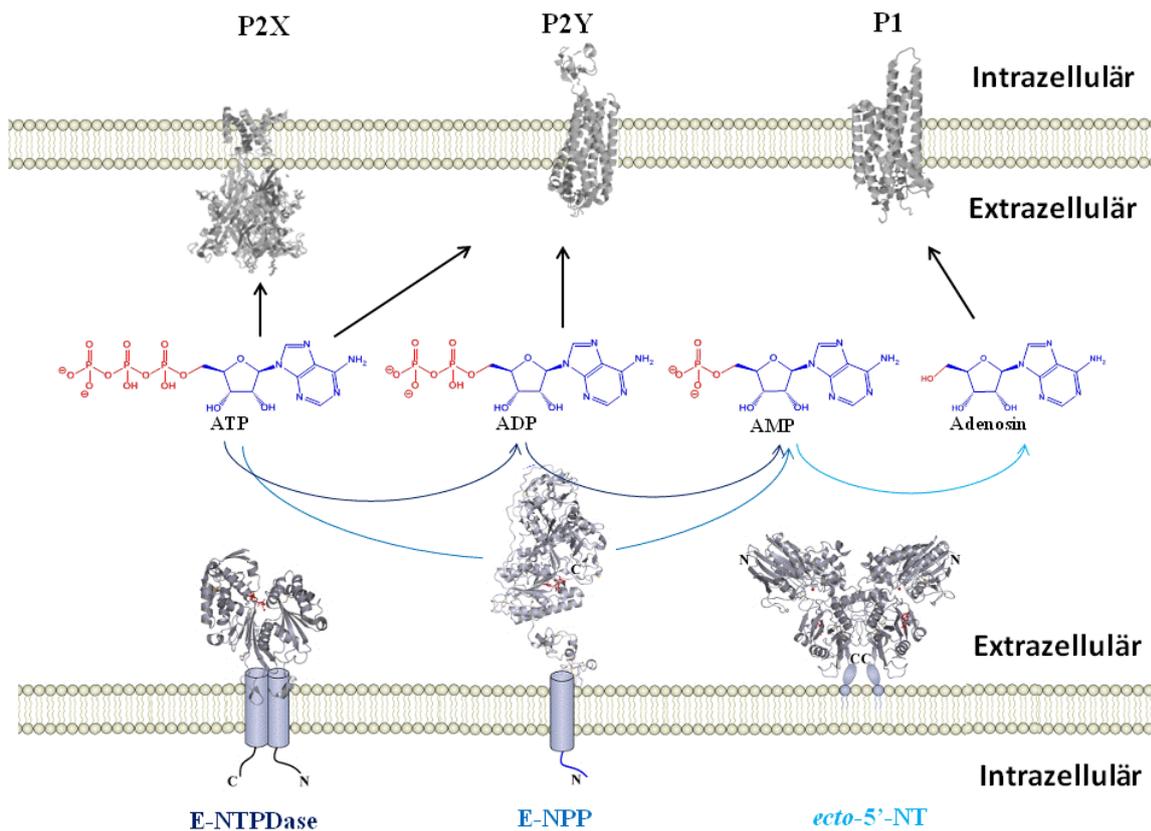


Abbildung 1.12: Extrazellulärer Metabolismus von ATP

Adenosin kann über spezielle Transportproteine wieder in die Zelle aufgenommen werden, wo es durch Kinasen wieder zu ADP und weiter zu ATP phosphoryliert wird. Dieser Vorgang wird auch Salvage-Pathway genannt. Darüber hinaus kann es aber auch extrazellulär weiter metabolisiert werden, indem es durch das Enzym Adenosindesaminase zu Inosin und weiter über die Purin-Nucleosid-Phosphorylase zu Hypoxanthin verstoffwechselt wird.⁶ In der Regel überwiegt jedoch die Metabolisierung über die Phosphorylierung durch die Adenosinkinase.¹³⁻¹⁴

1.6 Purinerge Rezeptoren

Die extrazellulär vorkommenden Nucleotide (ATP, ADP, UTP, und UDP) und das extrazellulär vorhandene Nucleosid Adenosin fungieren als Signalmoleküle und können, wie bereits erwähnt, von dort aus auf membranständige Rezeptoren einwirken, die Purinrezeptoren oder purinerge Rezeptoren genannt werden.

Der Begriff der Purinergen Rezeptoren wurde in den 70er Jahren von Burnstock geprägt und umfasst alle Klassen von Rezeptoren, die durch Purine aktiviert werden können.¹⁵ Einige Jahre später erfolgte eine Unterteilung dieser Klasse aufgrund der physiologischen Agonisten in die P1-Rezeptorfamilie (aktiviert durch Adenosin) und die P2-Rezeptorfamilie (aktiviert durch ATP und ADP).¹⁶ Erst deutlich später wurde eine weitere Klasse benannt, die P0-Rezeptorfamilie, die durch den Agonisten Adenin aktiviert wird.¹⁷ Die jeweiligen Rezeptorklassen zeigen verschiedene Subtypen, wie in Abbildung 1.13 dargestellt.

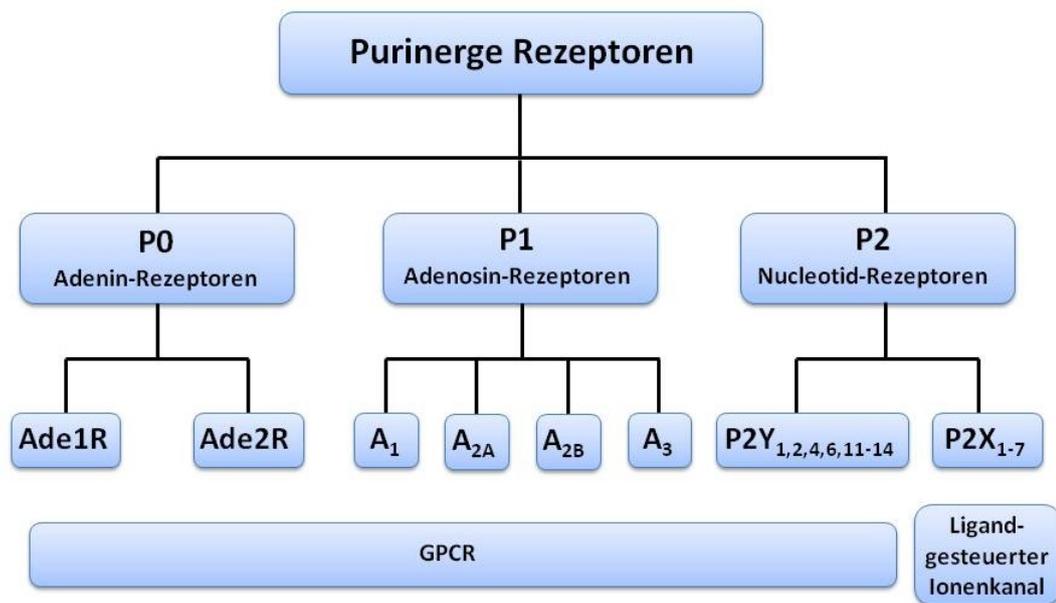


Abbildung 1.13: Klassifizierung der purinergen Rezeptoren

Die P2-Rezeptoren wurden aufgrund ihrer unterschiedlichen Pharmakologie in Ligand-gesteuerte Ionenkanäle (P2X) und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (P2Y) unterteilt.¹⁸⁻²⁰

Die P2X-Rezeptoren als Kation-selektive Kanäle können sich in Millisekunden nach Aktivierung durch ihren endogenen Liganden ATP öffnen.^{18; 21-22} Bisher sind sieben Subtypen bekannt.^{21; 23-24} Die Subtypen der P2Y-Rezeptoren können G_q-gekoppelt (P2Y_{1,2,4,6,11}), G_s-gekoppelt (P2Y₁₁) oder G_i-gekoppelt (P2Y₁₂₋₁₄) sein. Je nach Kopplung beeinflussen sie die Phospholipase C und weiterhin die Bildung von Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) oder beeinflussen die Adenylatcyclase und steuern darüber die cAMP-Konzentration.^{18; 24-25}

Da die Aktivierung der P2-Rezeptoren von der extrazellulären Konzentration der genannten Nucleotide abhängig ist, wird diese indirekt über die Ectonucleotidasen, E-NTPDasen und E-NPPs, gesteuert.

Die P1-Rezeptoren werden durch Adenosin aktiviert und sind somit abhängig von der extrazellulären Konzentration an Adenosin. Ihre Aktivierung wird somit über die Ecto-5'-Nucleotidase gesteuert. Sie stellen ebenfalls eine Gruppe von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren dar. Die Untergliederung dieser Klasse erfolgte in erster Linie aufgrund der unterschiedlichen Pharmakologie der Subtypen. Zunächst wurden die Subtypen A₁R und A₂R identifiziert, wobei A₁-Rezeptoren die Adenylatcyclase inhibieren und die A₂-Rezeptoren die Adenylatcyclase stimulieren.²⁶⁻²⁸ Die weiterführende Untergliederung innerhalb der A₂-Rezeptoren erfolgte unter anderem aufgrund unterschiedlicher Affinitäten gegenüber dem natürlichen Liganden Adenosin. Hiernach werden die hochaffinen als A_{2A}- und die niedrigaffinen als A_{2B}-Rezeptoren bezeichnet.²⁹⁻³² Die später identifizierte Klasse der A₃-Rezeptoren zeigt ebenso, wie die A₁-Rezeptoren eine Inhibition der Adenylatcyclase, ist hierbei jedoch, im Gegensatz zu den hochaffinen A₁-Rezeptoren, zu den niedriger affinen Adenosin-Rezeptor-Subtypen zu zählen.³³⁻³⁴

Tabelle 1.1: Adenosin-Rezeptoren und ihre Effektorsysteme ^{31; 35}

Rezeptor	A₁	A_{2A}	A_{2B}	A₃
G-Protein	G _{i/0}	G _s	G _s , G _{q/11}	G _i , G _{q/11}
Effektor	AC	AC	AC, PLC	AC, PLC
Second Messenger	cAMP↓	cAMP↑	cAMP↑ IP ₃ /DAG↑	cAMP↓ IP ₃ /DAG↑

Neben dem Effekt auf die Adenylatcyclase zeigen einige der Adenosin-Rezeptoren allerdings auch Effekte auf andere Signaltransduktionswege. So können A_{2B}- und A₃-Rezeptoren über G_{q/11}-Proteine die Phospholipase C stimulieren, was eine Erhöhung der Konzentrationen der „second messenger“ IP₃ und DAG zur Folge hat.³⁶⁻³⁹ Die einzelnen Rezeptorsubtypen und ihre Effektorsysteme sind in Tabelle 1.1 noch einmal zusammengefasst.

Adenosin-Rezeptoren kommen in verschiedenen Geweben im Körper vor, hierzu zählen in erster Linie das Gehirn (A_1 , A_{2A} , A_{2B} , A_3), das Herz (v.a. A_1), die Lunge (A_{2B} , A_{2A} , A_1), der Gastrointestinaltrakt sowie Mastzellen (A_{2B}), Thrombozyten und Leukozyten (A_{2A}).^{24; 31} Im Gehirn zeigen sie vor allem sedierende und anxiolytische Effekte^{40–42}, am Herzen negativ chronotrope, inotrope und dromotrope Wirkung.⁴³ Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Adenosin, A_{2B} -Rezeptor-vermittelt, an der Entstehung von entzündlichen Erkrankungen der Atemwege^{38; 44–46} und des Interstitiums^{47–48} beteiligt ist.

Die jüngste Klasse der purinergen Rezeptoren, die P0-Rezeptoren, werden wie schon erwähnt durch die Nucleobase Adenin aktiviert. Seit 2002 wurden Rezeptoren dieser Klasse in Geweben der Maus, der Ratte und des chinesischen Streifenhamsters identifiziert. Auch wenn es Hinweise auf die Existenz von Adeninrezeptoren in humanem Gewebe gibt, konnte bis dato noch keiner kloniert werden.^{17; 49–52}

1.7 Ecto-5'-Nucleotidase

Die Enzymfamilie der humanen 5'-Nucleotidasen weist sieben Isoformen auf, von denen fünf im Cytosol lokalisiert sind, eine in der Mitochondrienmatrix und nur eine extrazellulär.⁵³ Eine Sequenzanalyse dieser Isoformen zeigt jedoch deutlich, dass die Ecto-5'-Nucleotidase deutlich von den intrazellulären 5'-Nucleotidasen abzugrenzen ist, da sie phylogenetisch nicht verwandt sind.^{10; 54} Die Ecto-5'-Nucleotidase (auch Ecto-5'-NT, eN oder CD73 genannt) kommt in vielen Organismen vor und zeigt bei Vertebraten eine weite Gewebeverteilung, sowie eine Expression auf vielen Zelltypen des Immunsystems und verschiedenen Tumorzellen.⁵⁵

Die Hauptaufgabe des Enzyms ist die Katalyse der Hydrolyse von Nucleosid-5'-monophosphaten zu den entsprechenden Nucleosiden und Orthophosphat (P_i), wobei die vertebraten Formen als Hauptsubstrat Adenosin-5'-monophosphat (AMP) bevorzugen. Die katalytische Aktivität kann zwischen verschiedenen Geweben variieren⁵⁶ und wird mit einem K_M -Wert für AMP im unteren mikromolaren Bereich beschrieben.^{8–10; 53} Gegenüber Nucleosid-2'- und 3'- Monophosphaten zeigt sie keine Aktivität. ADP und ATP können ebenfalls an die Ecto-5'-Nucleotidase binden, vermögen jedoch keine Hydrolyse auszulösen und fungieren somit als kompetitive Inhibitoren mit Inhibitionskonstanten im mikromolaren Bereich, wodurch es zu einer feed-forward

Inhibition kommt, also der Beeinflussung eines Intermediats der Abbaukaskade auf ein anderes Intermediat.^{57–60} Hiermit stellt die eN den wichtigsten Kontrollpunkt für die Bereitstellung des extrazellulären Signalmoleküls Adenosin dar und zeigt eine funktionelle Bedeutung, die in direkter Beziehung zu der von extrazellulärem Adenosin steht. Diese Aussage konnte mithilfe von Experimenten mit Knock-out-Mäusen bestätigt werden.^{61–63}

Über die katalytische Aktivität hinaus zeigt sich die eN auch als Adhäsionsmolekül auf Immunzellen, wie Lymphozyten^{64–65} und fördert hierbei die Bindung derselben an das vaskuläre Endothel. In diesem Zusammenhang wird häufiger die Bezeichnung CD73 verwendet.

1.7.1 Struktur

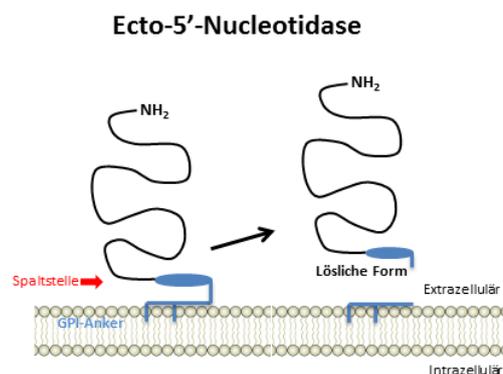


Abbildung 1.14: Schematische Darstellung der Ecto-5'-Nucleotidase

Bei der eN handelt es sich um ein Zn^{2+} -bindendes Enzym, das über einen Glycosylphosphatidylinositol (GPI)–Anker an die Membran gebunden ist und dessen katalytische Domäne in den extrazellulären Raum ragt. Neben dieser membrangebundenen Form kann es aber auch nach Abspaltung vom GPI-Anker in eine freie, gelöste Form überführt werden.^{10; 60} Das humane Enzym setzt sich aus 523 Aminosäureresten zusammen und weist vier Glykosylierungsstellen auf, wobei sich das Glykosylierungsmuster zwischen verschiedenen Geweben unterscheiden kann und offenbar die katalytische Aktivität nicht wesentlich beeinflusst.⁶⁶ Das humane Enzym tritt immer als Homodimer auf, wobei jedes Monomer der glykosylierten Form eine Masse von 62 – 74 kDa aufweist und das Dimer entsprechend von 160 kDa schwer ist.^{10; 67}

Inhibitors AOPCP in der geschlossenen Form dargestellt. Beide Kristallstrukturen zeigen eine relativ, starke sandwichartige, hydrophobe π -Wechselwirkung der Nucleobase mit zwei Phenylalanin-Resten (F417 und F500). Die Ribose wechselwirkt mit einem Aspartat (D506) und zwei Arginin-Molekülen (R354 und R395) über Wasserstoffbrückenbindungen und unterstützt damit die Positionierung des Nucleosids.⁷³

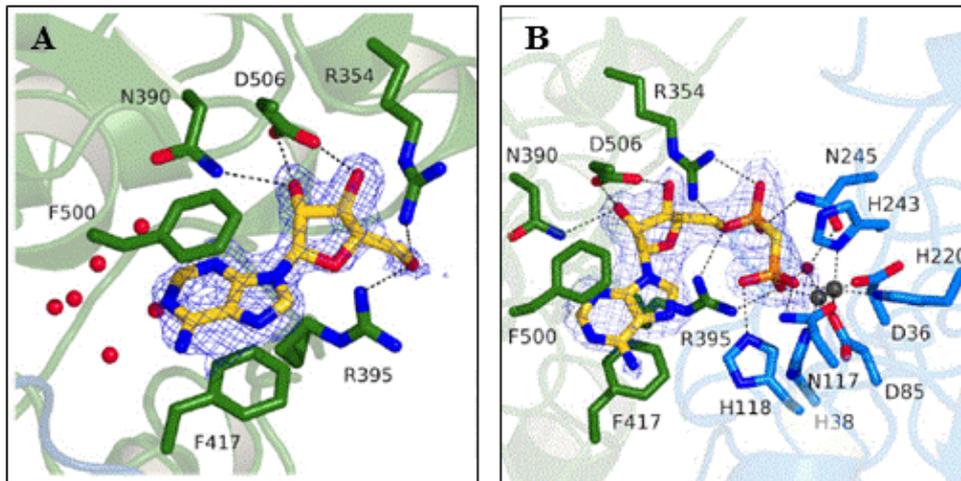


Abbildung 1.16: A: Bindungsmechanismus von Adenosin an das aktive Zentrum der humane Ecto-5'-Nucleotidase in ihrer offenen Form. B: Bindungsmechanismus von AOPCP an das aktive Zentrum der humanen Ecto-5'-Nucleotidase in ihrer geschlossenen Form.⁷³

Die geschlossene Kristallstruktur gibt darüber hinaus Auskunft über die Interaktion des Phosphatrestes mit dem aktiven Zentrum. Hierbei bilden sich Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der α -Phosphatgruppe des AOPCP und den Seitenketten der Aminosäuren N117, H118 und R395 aus. Bei der Aminosäure H118 handelt es sich um eine stark konservierte Aminosäure, die durch Bindung an einen Aspartat-Rest (hier D121) eine katalytische Asp-His-Dyade ausbildet und den Übergangszustand während der Hydrolyse stabilisiert, was typisch ist für Metallophosphatasen. Die β -Phosphatgruppe ist zu den beiden Metallionen koordiniert und geht hier eine Komplexbindung ein, die unter Einbeziehung des D85-Restes eine trigonal-bipyramidale Geometrie zeigt.⁷³

Zusätzlich zeigt die Kristallstruktur der geschlossenen Form die Ausbildung einer relativ großen Tasche auf Höhe des C2 des Adenin-Restes. Diese Tasche zeigt durch die Reste der Aminosäuren F421, P498, L389 und L415 größtenteils einen hydrophoben und basischen Charakter, mit den Aminosäuren N390 und N499 zeigen sich jedoch auch

polare und mit D524 sogar ionische Reste. Diese Tasche spielt zwar keine Rolle bei der Substratbindung, kann aber für die Entwicklung von Inhibitoren sehr interessant sein.⁷³

Der Vergleich eines Monomers der Kristallstruktur des humanen Enzyms mit der Kristallstruktur eines bakteriellen Enzyms zeigt, trotz großer Unterschiede in der Sequenz, kaum Unterschiede in der Struktur. Im Bereich des katalytischen Zentrums sind die Reste sehr stark konserviert und es zeigt sich lediglich ein Unterschied beim N245 des humanen Enzyms, das in den bakteriellen Formen gegen Histidin oder Glutamin ausgetauscht ist.

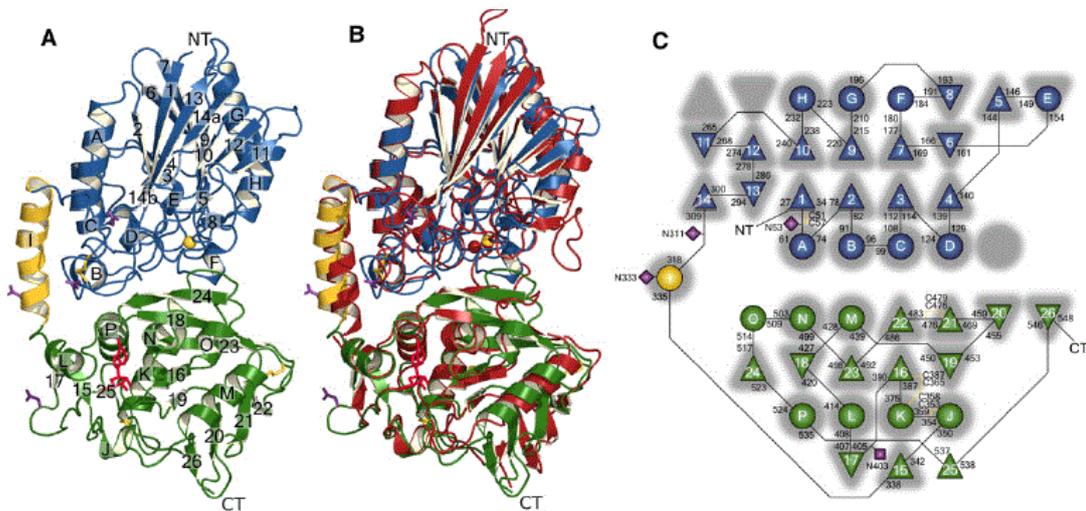


Abbildung 1.17: Vergleich der Kristallstrukturen der *E. coli*-5'-NT mit einem Monomer der humanen eN. **A:** Darstellung des Monomers der humanen eN in der offenen Form mit gebundenem Adenosin. **B:** Überlagerung der Kristallstrukturen der humanen eN (identisch zu A) und der *E.coli*-5'-NT (rot) **C:** Topologie-Modell, bei dem im Vordergrund die humane eN abgebildet ist und die *E. coli*-5'-NT in grau dahinter gelegt ist. Diese Abbildung stellt sehr gut den konservierten Bereich dar, sowie fehlende oder zusätzliche Strukturelemente.⁷³

Die Abbildung 1.17 zeigt die übereinandergelegten Strukturen des humanen Monomers und der *E. coli* 5'-Nucleotidase. Sie verdeutlicht, dass sich hauptsächlich geringe Unterschiede in oberflächlichen Schleifen zeigen, die für die katalytische Wirkung jedoch nicht relevant sind. Der Vergleich der geschlossenen Formen der Co-Kristallstrukturen mit AOPCP zeigt zwar eine fast identische Bindung der Nucleobase, jedoch ist die Interaktion des aktiven Zentrums mit dem terminalen Phosphatrest unterschiedlich. Dieser Unterschied lässt sich jedoch nicht über die Struktur sondern vielmehr über die stärkere Domänen-Rotation des humanen Enzyms erklären (26° Unterschied). Diese scheint ebenfalls der Grund für den Unterschied in der Substratspezifität zu sein und

erklärt, warum die E.coli-5'-Nucleotidase im Gegensatz zu dem humanen Enzym in der Lage ist ADP zu hydrolysieren.⁷³

Da bisher nur eine Kristallstruktur der humanen Ecto-5'-Nucleotidase in der geschlossenen Form erhalten werden konnte (die oben beschriebene Co-Kristallstruktur mit AOPCP) und es sich bei dieser um einen inhibitorischen Bindungsmechanismus handelt, konnte bisher kein genauer katalytischer Mechanismus für das humane Enzym beschrieben werden. Aufgrund der hohen strukturellen Ähnlichkeit mit dem bakteriellen Enzym kann jedoch angenommen werden, dass der katalytische Mechanismus ähnlich verläuft.

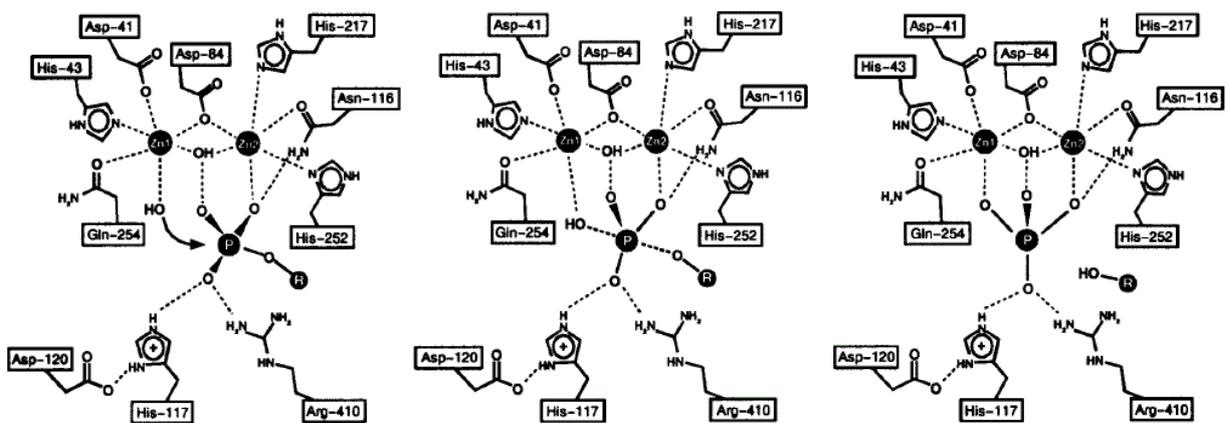


Abbildung 1.18: Angenommener katalytischer Mechanismus der E. coli-5'-NT für den Transfer der Phosphatgruppe vom Substrat auf das als Nucleophil fungierende Wassermolekül im aktiven Zentrum. Von links nach rechts dargestellt ist zunächst die Phase der Bindung, auch Michaelis-Komplex genannt, dann der Übergangszustand und zum Schluss der Produkt-Komplex.⁷⁴

Für die E.coli-5'-Nucleotidase konnte gezeigt werden, dass die Hydrolyse mittels einer Additions-Eliminierungs-Reaktion erfolgt, bei der die Phosphatgruppe an eines der Metallionen im Aktiven Zentrum bindet, wo sie durch die Aminosäuren Histidin und Arginin polarisiert wird und das zweite Metallion den rückseitigen nucleophilen Angriff durch ein Wassermolekül dirigiert (Abbildung 1.18).⁷⁴

Neben dem Bindungsmechanismus des Produktes Adenosin und des kompetitiven Standardinhibitors AOPCP wurde ebenfalls der Bindungsmechanismus von weiteren synthetischen Inhibitoren an der humanen eN untersucht, darunter als nicht-nucleotidischen Inhibitors Baicalin, einem Flavonoid. Die Kristallstruktur dieses Enzym-Inhibitor-Komplexes ist in Abbildung 1.19 dargestellt.⁷³

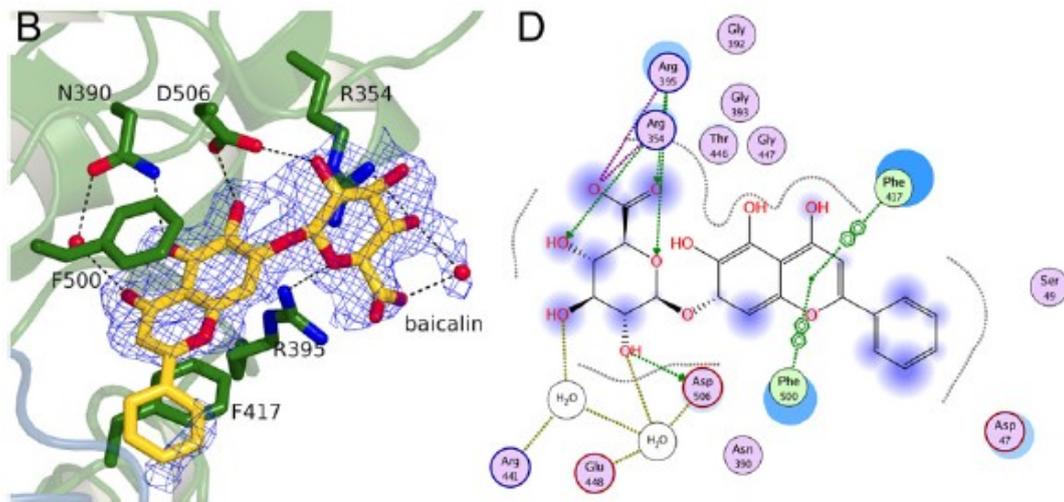


Abbildung 1.19: Bindungsmodus des Flavonoids Baicalin im aktiven Zentrum der humane Ecto-5'-Nucleotidase ⁷³

Der planare Chromen-Ring geht analog zu dem Adenin-Ring des natürlichen Substrates eine sandwischartige hydrophobe π -Wechselwirkung mit den Phenylalanin-Resten F417 und F500 ein. Der Glucuronsäure-Rest wechselwirkt mit den Seitenketten des Aspartats D506 und der Arginin-Moleküle R354 und R395, was der Wechselwirkung der Ribose im Substrat entspricht. Der Phenylring ragt hierbei in die oben beschriebene Tasche nahe der Adenosin-Bindungsstelle (am C2), geht hierbei jedoch nur relativ schwache Wechselwirkungen ein. ⁷³

1.7.2 Inhibitoren der Ecto-5'-Nucleotidase

Bisher sind nur wenige eN-Inhibitoren beschrieben, die als Leitstrukturen für die Arzneistoffentwicklung dienen könnten. Ein Grund hierfür könnte in den bisher fehlenden Assay-Methoden für Hochdurchsatz-Screenings liegen. Darüber hinaus ist ein Vergleich der Inhibitoren schwierig, da die beschriebenen Daten an sehr heterogenen Testsystemen, sprich Enzymmaterial verschiedener Spezies oder Organe, erhoben wurden.

1.7.2.1 Nucleotidische Inhibitoren

Die Inhibitoren der eN lassen sich in nucleotidische und nicht-nucleotidische Inhibitoren einteilen. Die nucleotidischen Inhibitoren sind in Abbildung 1.20 dargestellt.

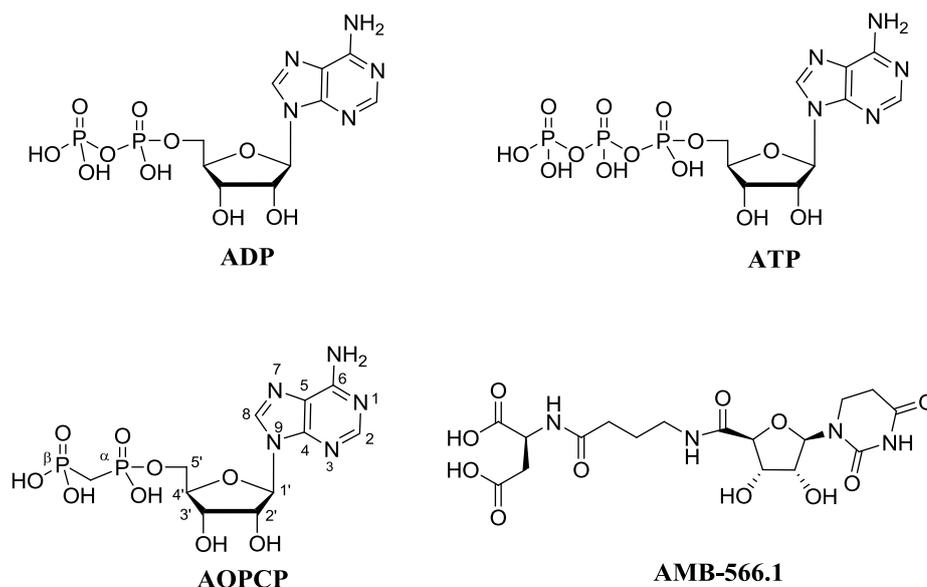


Abbildung 1.20:Strukturen der nucleotidischen Inhibitoren der Ecto-5'-Nucleotidase. ADP und ATP stellen endogene Inhibitoren dar, AOPCP und AMB-566.1 synthetische.

Zu der ersten Gruppe zählen zunächst die Nucleotide ATP und ADP selbst, die eine moderate inhibitorische Aktivität an der eN zeigen.^{60; 75-76} Diese sind für den Einsatz als Therapeutika oder pharmakologische Werkzeuge jedoch ungeeignet, da sie metabolisch zu instabil sind, denn sie werden schnell dephosphoryliert. Von ADP abgeleitete Derivate, in denen die P-O-P-Bindung durch P-CH₂-P ersetzt ist, sind metabolisch weitaus stabiler. Das α,β -Methylen-ADP, auch AOPCP genannt,^{57; 77-78} gilt als Standardinhibitor und wird als pharmakologische Tool-Verbindung verwendet. Von dieser Verbindung ausgehend wurden in unserem Arbeitskreis weitere Derivate synthetisiert, die im Rahmen dieser Arbeit charakterisiert wurden und auf die im Folgenden näher eingegangen wird. Eine weitere Klasse metabolisch stabiler nucleotidischer eN-Inhibitoren stellen Nucleotidmimetika dar. Hierbei handelt es sich um Adenosin-, Uracil- oder Dihydrouracil-Derivate mit 5'-terminalen Dicarbonsäure-, Phosphonsäure- oder Phosphonsäureester-Resten.⁷⁹ Die Verbindungen mit 5'-terminalem Dicarbonsäure-Rest zeigen die beste inhibitorische Aktivität gegenüber der eN, wohingegen die Verbindungen mit 5'-terminalem Phosphonsäure- oder Phosphonsäureester-Rest eine bessere inhibitorische Aktivität gegenüber den E-NTPDasen zeigt. Die K_i-Werte der potentesten Vertreter liegen im hohen nanomolaren bis mittleren mikromolaren Bereich. Ein Vertreter dieser Verbindungen ist das AMB-566.1, welches in Abbildung 1.20 dargestellt ist.⁷⁹⁻⁸¹

1.7.2.2 Anthrachinone

Nicht-nucleotidische Inhibitoren, die bisher beschrieben sind, zeigen nur moderate inhibitorische Aktivität, meist im mikromolaren Bereich. Eine Klasse nicht-nucleotidischer Inhibitoren stellen die Farbstoffe Reactive Blue (RB-2) und Acid Blue (AB-25), sowie von Acid Blue abgeleitete Anthrachinon-Derivate dar (Abbildung 1.21).

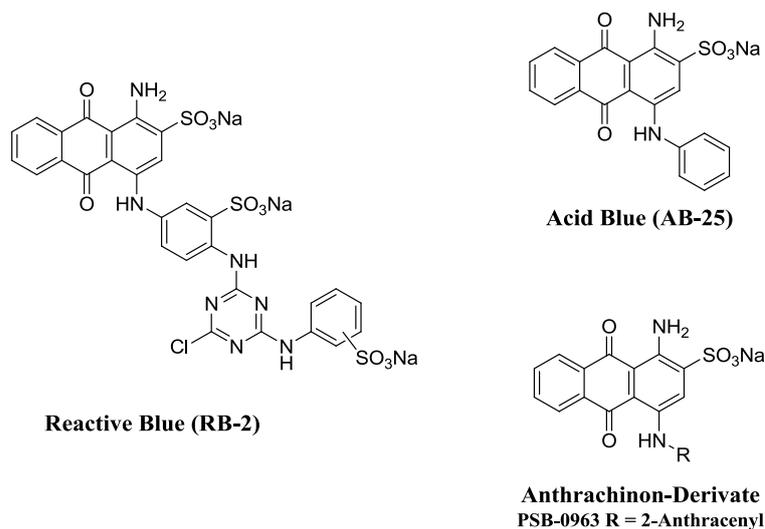


Abbildung 1.21: Strukturen der Anthrachinon-Derivate.

Die inhibitorischen Aktivitäten der Leitstrukturen RB-2 und AB-25 liegen im mikromolaren Bereich ($K_i = 3,07 \mu\text{M}$ bzw. $K_i = 15,2 \mu\text{M}$). Abgeleitet von AB-25 wurden in unserem Arbeitskreis einige Anthrachinon-Derivate synthetisiert, die durch Optimierung der Struktur-Wirkungs-Beziehungen eine verbesserte inhibitorische Aktivität mit K_i -Werten im hohen nanomolaren Bereich (PSB-0963: $K_i = 0,15 \mu\text{M}$) erreichen konnten.⁸²

1.7.2.3 Polyoxometalate

Eine weitere Klasse von nicht-nucleotidischen Inhibitoren stellen Polyoxometalate (POMs) und Rheniumcluster-Verbindungen dar, bei denen es sich um anorganische, negativ geladene Metallkomplexe handelt. Die Metallatome dieser Verbindungen sind über Sauerstoffatome verbrückt und liegen in ihrer höchsten Oxidationsstufe vor. Bei den POMs handelt es sich um Komplexe der Übergangsmetalle Vanadium, Wolfram, Niobium, Antimon oder Molybdän.

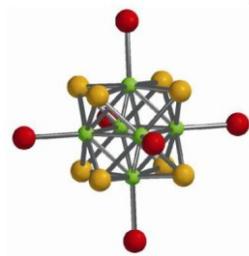


Abbildung 1.22: Schematische Darstellung der Struktur von Rheniumcluster-Verbindungen.

Die beste inhibitorische Aktivität gegenüber der eN zeigen hierbei die Rheniumcluster-Verbindungen (Abbildung 1.22), bei denen es sich um nicht-kompetitive Inhibitoren mit K_i -Werten im mikromolaren Bereich handelt.⁸¹ Jedoch zeigen diese Verbindungen keine gute Selektivität und es ist anzumerken, dass alle an der eN aktiven Verbindungen ebenfalls eine inhibitorische Aktivität gegenüber der Vertretern der E-NPPs oder der E-NTPDasen zeigt, die in den meisten Fällen zudem deutlich stärker ausgeprägt ist als die Aktivität gegenüber der eN.^{81; 83}

1.7.2.4 Sulfonsäuren

Da die als relativ potente nicht-nucleotidischen Inhibitoren beschriebenen Anthrachinone alle eine Sulfonat-Gruppe aufweisen, die laut entsprechenden Docking-Studien essentiell für die Bindung an das aktive Zentrum sind, wurde in letzter Zeit einige kleinere Sulfonsäure-Verbindungen untersucht.⁸⁴⁻⁸⁵ Die beiden besten Verbindungen aus diesen Studien sind in Abbildung 1.23 dargestellt.

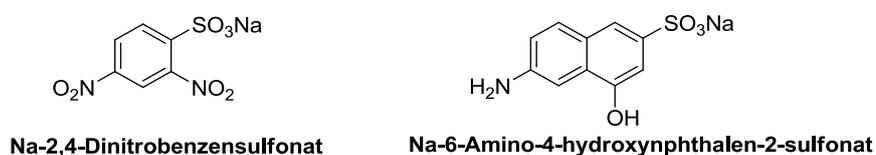
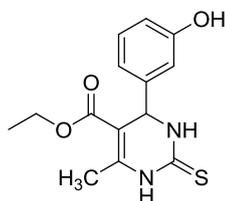


Abbildung 1.23: Strukturen der beiden gegenüber der eN potentesten Verbindungen aus der Klasse der Sulfonsäure-Derivate.

Für die Verbindung Natrium-2,4-Dinitrobenzensulfonat wird ein K_i -Wert von $0.61 \mu\text{M}$, gemessen an dem gelösten Enzym der Ratte,⁸⁵ und für Natrium-6-Amino-4-hydroxynaphthalen-2-sulfonat ein IC_{50} -Wert von $1.32 \mu\text{M}$ an der Ratte und $10.4 \mu\text{M}$ an dem humanen Enzym.⁸⁴

1.7.2.5 3,4-Dihydropyrimidinone (DHPMs)

Erst kürzlich wurde beschrieben, dass LaSOM-63 die Aktivität der eN zu inhibieren vermag. Dies wurde in C6-Gliomazellen gezeigt, wo eine Konzentration von 100 μM LaSOM eine Inhibition von 36% zeigte und eine Konzentration von 200 μM 48%.⁸⁶⁻⁸⁷



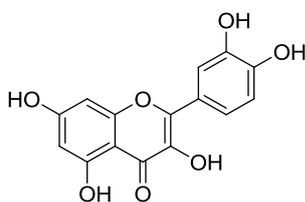
LaSOM-63

Abbildung 1.24: Struktur von LaSOM-63 einem 3,4-Dihydropyrimidinon mit inhibitorischer Aktivität gegenüber der eN.

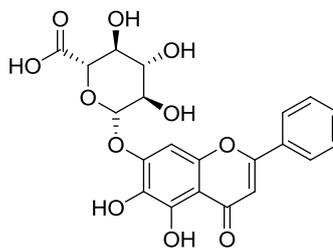
LaSOM-63 ist jedoch bisher die erste Verbindung aus der Klasse der DHPMs für die die antitumorale Aktivität der Inhibition der eN zugeschrieben werden konnte. Daher sind noch einige weitere Untersuchungen notwendig, um diese Verbindung als Leitstruktur einer neuen Inhibitoriklasse anzusehen.

1.7.2.6 Flavonoide

Neben den oben beschriebenen synthetischen Verbindungen konnten auch einige Naturstoffe mit einer inhibitorischen Aktivität identifiziert werden.



Quercetin



Baicalin

Abbildung 1.25: Strukturen der Polyphenole mit inhibitorischer Aktivität gegenüber der eN.

So sind die Polyphenole Quercetin (Abbildung 1.25) und das strukturell sehr ähnliche Myrectin als moderate Inhibitoren der eN mit K_i -Werte im mikromolaren Bereich beschrieben.⁸⁸⁻⁸⁹ Auch konnte mit Hilfe einer Kristallstruktur der humanen eN mit

Baicalin das Bindungsverhalten der Polyphenole mit dem aktiven Zentrum untersucht werden (siehe Abbildung 1.19), obwohl für Baicalin selbst nur eine relativ schwache Inhibition gezeigt werden konnte.⁷³

1.7.2.7 Alkaloide

Für die Alkaloide Candimin und Lycorin (Abbildung 1.27) konnte eine inhibitorische Aktivität gegenüber der eN von *Trichomonas vaginalis* nachgewiesen werden. Hierbei zeigte sich der gewünschte Effekt jedoch erst nach einer längeren Behandlungszeit von 24 Stunden.⁹⁰ Darüber hinaus wurde in dieser Studie sowohl eine inhibitorische Aktivität gegenüber der eN als auch der E-NTPDase von *Trichomonas vaginalis* nachgewiesen.^{86;}
90

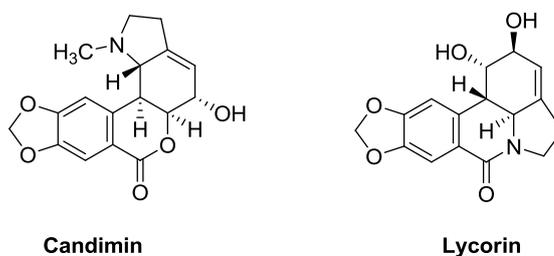


Abbildung 1.26: Strukturen der Alkaloide Candimin und Lycorin.

1.7.2.8 Methylxanthine

Auch für die natürlich vorkommenden Methylxanthine Coffein und Theophyllin (Abbildung 1.27) wurde eine inhibitorische Aktivität gegenüber der 5'-Nucleotidase beschrieben. Hierbei wurden diese als kompetitive Inhibitoren mit Inhibitionskonstanten im niedrigen millimolaren Bereich identifiziert, wobei Theophyllin die potentere beider Verbindungen ist.⁹¹⁻⁹²

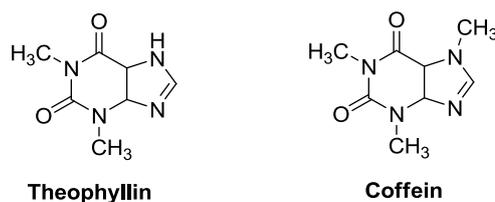


Abbildung 1.27: Strukturen der Methylxanthine Theophyllin und Coffein.

Der Nachteil dieser Verbindungen liegt allerdings in ihrer Unselektivität. So zeigen sie eine Aktivität gegenüber vielen verschiedenen Zielstrukturen, unter anderem gegenüber Adenosinrezeptoren.

1.7.2.9 Übersicht

Eine Übersicht über alle hier besprochenen Inhibitor-Klassen, mit jeweils einem potenten Vertreter ist in Tabelle 1.2 zusammengefasst.

Tabelle 1.2: Übersicht bisher beschriebener eN-Inhibitoren.

Inhibitor	Substanzklasse	Inhibition	Spezies/ Gewebe	Kommentar
ADP	Endogener Inhibitor	$K_i = 4.66 \mu\text{M}^a$	Ratte	metabolisch instabil
AOPCP	ADP-Analogon	$K_i = 0.197 \mu\text{M}^a$	Ratte	bei physiologischem pH-Wert geladen
AMB-566.1	Nucleotidmimetikum	$K_i = 0.18 \mu\text{M}^{80}$	Ratte	nicht selektiv gegenüber anderen Ectonucleotidasen
PSB-0963	Anthrachinon	$K_i = 0.15 \mu\text{M}^{82}$	Ratte	bei physiologischem pH-Wert geladen
$[(\text{Re}_6\text{S}_8)(\text{HCOO})_6]^{5-}$	POM	$K_i = 2.89 \mu\text{M}^{81}$	Ratte	nicht selektiv gegenüber anderen Ectonucleotidasen
$\text{C}_6\text{H}_3\text{N}_2\text{NaO}_7\text{S}$	Sulfonsäure-Derivat	$K_i = 0.61 \mu\text{M}^{85}$	Ratte	bei physiologischem pH-Wert geladen
LaSOM-63	DHMP	48% Inhibition bei $200 \mu\text{M}^{87}$	Gliomazellen	Nähere Charakterisierung, sowie Selektivitätsanalyse notwendig
Quercetin	Flavonoid	$\text{IC}_{50} = 45.3 \mu\text{M}^{88}$	Gliomazellen	nicht selektiv
Lycorin	Alkaloid	62 % Inhibition bei $250 \mu\text{M}$ (24h) ⁹⁰	Trichomonas vaginalis	nicht selektiv gegenüber anderen Ectonucleotidasen
Theophyllin	Methylxanthin	44% Inhibition bei $100 \mu\text{M}^{91}$	Kaninchen	nicht selektiv

^a Bestimmt mittels radiometrischem eN-Assay

1.8 Therapeutisches Potential

Sowohl die Ecto-5'-Nucleotidase, als auch die Adenosinrezeptoren sind ubiquitär exprimiert und spielen somit in vielen physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen eine Rolle.

Unter normalen Bedingungen liegt die extrazelluläre Adenosinkonzentration deutlich unter 1 μM und ist direkt mit der lokalen Energiebilanz der Zelle verknüpft. Das bei dem Verbrauch von ATP gebildete Adenosin wird über entsprechende bidirektionale Transporter (CNT: „concentrative nucleoside transporters“ oder ENT: „equilibrative nucleoside transporters“) aus der Zelle heraus geschleust.^{6; 93} Auch ATP wird kontinuierlich in einem geringen Maße in den extrazellulären Raum transportiert, welches wie oben beschrieben als Signalmolekül fungieren kann oder über die Kaskade der Ectonucleotidasen metabolisiert wird. Die Freisetzung von ATP oder Adenosin kann aber unter Bedingungen metabolischen Stresses, wie Entzündungen, Ischämien, Hypoxie, Gewebeverletzungen oder Zellyse drastisch ansteigen.⁹⁴⁻⁹⁹ Aus dieser erhöhten Adenosin-Konzentration resultieren viele pathophysiologische Vorgänge. Zu den wichtigsten zählen hier die Regulierung des Immunsystems, sowie der Einfluss auf Proliferation und Angiogenese. Hieraus ergibt sich ein therapeutisches Potential für Adenosin-Rezeptor-Antagonisten, sowie auch eN-Inhibitoren bei Schmerz¹⁰⁰⁻¹⁰³ Nieren- und Leberfibrose¹⁰⁴⁻¹⁰⁷, entzündlichen Erkrankungen, z.B. der Atemwege,¹⁰⁸⁻¹⁰⁹ Krebs oder neurologischen Erkrankungen. Das größte Interesse zeigt sich derzeit in den Bereichen der Behandlung Neurodegenerativer Erkrankungen, sowie der Behandlung von Krebserkrankungen, auf die ich im Folgenden näher eingehen möchte.

Im zentralen Nervensystem (ZNS) wirkt extrazelluläres Adenosin als Neuromodulator, inhibitorisch über A_1 -Rezeptoren und fazilitatorisch über A_{2A} -Rezeptoren.¹¹⁰ Während die Aktivierung der A_1 -Rezeptoren im ZNS in erster Linie über die Aktivität der Adenosinkinase kontrolliert wird, steuert die Aktivität der eN die Aktivierung der A_{2A} -Rezeptoren.¹¹¹⁻¹¹² Dieses Zusammenspiel zwischen eN und A_{2A} -Rezeptoren wird dadurch begünstigt, dass sie vor allem in Basalganglien Co-lokalisiert vorkommen. Damit bietet die eN eine neue Zielstruktur, um die Feinabstimmung der A_{2A} -Rezeptoraktivität zu modulieren.¹¹¹ Die Schlüsselrolle des A_{2A} -Rezeptors im ZNS ist die Modulation des

neuronalen Erregungskreises und somit verantwortlich für Lernen und Erinnerung.¹¹³⁻¹¹⁴ Entsprechend zeigt sich, dass A_{2A}-Rezeptoren bei neurodegenerativen Erkrankungen hochreguliert sind.¹¹⁵ Damit ergibt sich ein therapeutisches Potential in der Behandlung von Morbus Alzheimer.¹¹⁶ Darüber hinaus zeigen A_{2A}-Rezeptoren im Striatum eine Co-Expression mit Dopamin-D₂-Rezeptoren. Bei dieser Interaktion führt eine Aktivierung der A_{2A}-Rezeptoren zu einem Affinitätsverlust der D₂-Rezeptoren gegenüber Agonisten. Demzufolge zeigt sich ebenfalls ein therapeutisches Potential in der Behandlung von Morbus Parkinson.¹¹⁷ Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass über die eN generiertes extrazelluläres Adenosin A₁- und A_{2A}-Rezeptor vermittelt die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke erhöht.¹¹⁸⁻¹¹⁹ Durch den Einsatz von eN-Inhibitoren könnte daher genutzt werden, um z.B. das Eindringen von entzündlichen Immunzellen in das Gehirn zu vermindern.¹¹⁸

Ein weiterer therapeutischer Ansatz ist der Einsatz von A_{2A}-Antagonisten, die als Prodrugs eingesetzt werden und als Substrat der eN erst durch Dephosphorylierung in den aktiven Metaboliten überführt werden.¹²⁰⁻¹²¹ Dies bietet den Vorteil, dass die Antagonisten vor allem in Geweben mit erhöhter Expression der eN freigesetzt werden und entsprechend zielgerichteter wirken können.

Das große therapeutische Potential bei der Therapie von Krebserkrankungen zeigt sich in vielen Studien, die eine deutliche Überexpression der eN (CD73) in Tumoren nachweisen konnten. Zu diesen zählen u.a. Blasenkarzinome, Leukämie, Gliome, Melanome, Ovarialkarzinome, Kolonkarzinome und Brustkrebs.¹²² Diese Überexpression lässt sich letztlich als Konsequenz des in Tumorzellen herrschenden hypoxischen Milieus erklären, durch das HIF-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α) vermittelt die Transkription der eN ausgelöst wird. Die erhöhte Expression, die mit einer erhöhten Enzymaktivität einhergeht, führt automatisch zu einem verstärkten Abbau von AMP zu Adenosin und endet schließlich in einer Akkumulation von extrazellulärem Adenosin.^{55; 122-123}

Neben der vermehrten Expression der eN zeigen bestimmte Tumorzellen zusätzlich noch eine verminderte Expression der Adenosindesaminase (ADA). Die im Tumorgewebe erhöhte Adenosinkonzentration kann daher mit einem Zusammenspiel von erhöhter bzw. erniedrigter Expression der Enzyme E-NTPDase, eN und ADA, sowie einer erhöhten Enzymaktivität in Verbindung gebracht werden.¹³⁻¹⁴

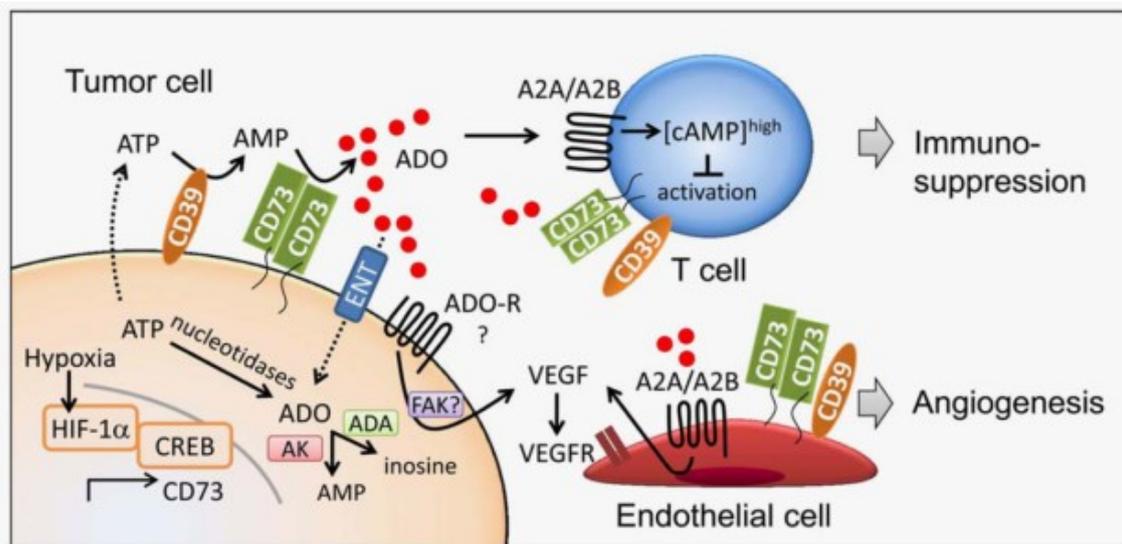


Abbildung 1.28: Schematische Darstellung der Wirkung von extrazellulärem Adenosin (ADO) in Bezug auf Tumorentstehung. Ausgelöst durch ein hypoxisches Milieu akkumuliert extrazelluläres Adenosin, welches Adenosin-Rezeptoren auf Tumorzellen und Endothelzellen aktiviert und hier zu einer verstärkten VEGF-Produktion führt und darüber Angiogenese auslöst. Auf T-Zellen resultiert die Aktivierung von Adenosinrezeptoren in einer verstärkten Ausschüttung von cAMP und trägt hierüber zu einer Immunsuppression bei.¹²²

Die Rolle der eN in der Entstehung von Krebs kann als multifunktional bezeichnet werden. Es zeigen sich zum einen Effekte aufgrund der katalytischen Wirkung, also der erhöhten Adenosinkonzentration, zum anderen aber auch aufgrund der nicht-katalytischen Wirkung als Adhäsionsmolekül.

Die durch die verstärkte katalytische Wirkung erhöhte Adenosinkonzentration fördert das Tumorstadium, die Angiogenese und Metastasierung und unterdrückt die gegen die Tumorzellen gerichtete Immunreaktion über verschiedene Mechanismen. Auf der Tumorzelle selbst vermitteln in erster Linie A_1 -Rezeptoren das Tumorstadium durch eine Inhibition von p27, einem Protein, das die Zellproliferation einschränkt.¹²⁴ Daneben kommt es durch Aktivierung von A_3 -Rezeptoren, die auf Tumorzellen überexprimiert sind, zu einer erhöhten Expression von HIF-1 α ,¹²⁵⁻¹²⁷ sowie einer verstärkten Produktion von VEGF (vascular endothelial growth factor) und Angiopoietin.¹²⁸ Durch diese Wachstumsfaktoren ausgelöst kommt es zu verstärkter Angiogenese. Auf Endothelzellen bewirkt eine Aktivierung von A_{2A} - und A_{2B} -Rezeptoren ebenfalls einen starken proangiogenetischen Effekt durch die Produktion von VEGF, Interleukin-8 und β FGF (basic fibroblast growth factor).¹²⁹⁻¹³¹ Auf Neutrophilen fördert eine Aktivierung der A_1 - und A_{2B} -Rezeptoren zum einen chronische Entzündungsreaktionen, die ebenfalls das

Tumorstadium fördert; sie regen zum anderen die Produktion von Metalloproteasen an, welche durch Matrixmodifikationen eine Metastasierung fördern.^{130; 132} Auf Makrophagen führt eine Aktivierung der A_{2A}-Rezeptoren zu einem Übergang der M1-Makrophagen in M2-Makrophagen, was eine verstärkte Produktion von VEGF und Interleukin-10 zufolge hat, welche das Tumorstadium unterstützen. Auf natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) kommt es A_{2A}-vermittelt zu einer verminderten Ausbildung von TNF- α (tumor necrosis factor- α) und IFN- γ (Interferon- γ)¹³³⁻¹³⁴ sowie zu einer verminderten lytischen Aktivität der NK-Zellen,¹³⁵ was sich in einem verstärkten Tumorstadium widerspiegelt und zu einer Immunsuppression beiträgt. Den stärksten Einfluss haben jedoch die T-Zellen. Auf diesen führt eine Aktivierung der A_{2A}-Rezeptoren (neben dem in Abbildung 1.28 gezeigten erhöhten cAMP-Level) zu einer Inhibition der Interleukin-6-Expression, während die Produktion von TGF- β (transforming growth factor β) verstärkt wird und es zu einer Differenzierung der naiven T-Zellen zu T_{reg}-Zellen (regulatorischen T-Zellen) kommt.¹³⁶ Dadurch kann sich die Tumorzelle vor der Immunantwort entziehen.

Zu den von der katalytischen Aktivität unabhängigen Funktionen der Ecto-5'-Nucleotidase spielen hier vor allem die Funktion als Adhäsionsmolekül eine Rolle. Damit fördert CD73 die Zell-Zell-Interaktion von Lymphozyten sowie Endothelzellen mit Komponenten der extrazellulären Matrix.^{55; 122} Zudem wurden mittlerweile sowohl proangiogenetische^{122; 137} als auch metastasierende Effekte¹³⁸ beschrieben, für die im Modell gezeigt werden konnte, dass sie unabhängig von der katalytischen Aktivität sind, deren genauer Mechanismus jedoch noch nicht aufgeklärt werden konnte.

Aufgrund dieser beschriebenen multifunktionalen Effekte der eN stellt diese eines der vielversprechendsten Targets in der Therapie von Tumorerkrankungen dar. Diesen Ansatz verfolgend wurden in der letzten Zeit eine Reihe von präklinische Studien veröffentlicht, in denen gezeigt werden konnte, dass eine Hemmung bzw. ein Ausschalten der eN durch knock-down^{123; 133} den Einsatz von spezifischen Antikörpern,^{122; 138-139} RNAi¹⁴⁰ oder auch bekannten Inhibitoren wie AOPCP^{139; 141} und Quercetin⁸⁸ sowohl Tumorstadium, Angiogenese, Metastasierungen als auch die Tumor-vermittelte Immunsuppression vermindert.

Vor allem die Immuntherapie, bekommt einen immer höheren Stellenwert in der Krebstherapie. Da hier auch die eN eine wichtige Rolle spielt, bieten sich hier einige

Möglichkeiten, vor allem auch in kombinatorischen Therapien. So würde sich zum Beispiel eine kombinatorische Therapie anbieten, wenn klassische Chemotherapeutika aufgrund der durch die Tumorzelle ausgelösten Immunsuppression nicht mehr wirken können. Hier könnte die deutliche Herabsetzung der Immunsuppression durch die Inhibition der eN und Senkung des extrazellulären Adenosin-Spiegels die therapeutische Wirksamkeit des Chemotherapeutikums wieder erhöhen und somit die Effizienz verbessern und die Toxizität durch Einsatz geringerer Mengen senken. Auch konnte gezeigt werden, dass es sinnvoll ist verschiedene Immuntherapeutika zu kombinieren, da die Tumorzellen verschiedene immunsuppressive Mechanismen nutzen. Besonders im Fokus stehen hier derzeit Anti-PD-1/PD-L1 monoklonale Antikörper (mAb), sowie Anti-CTLA-4 mAb. Für diese beiden Zielstrukturen befinden sich derzeit die neuen Therapeutika Ipilimumab (CTLA-4) und Nivolumab (PD-1/PD-L1) in der klinischen Phase.¹⁴²⁻¹⁴⁴ Weiterführende Studien konnten hier belegen, dass eine Kombination dieser beiden Arzneimittel synergistisch wirkt.¹⁴⁵ Da mittlerweile beschrieben wurde, dass eine verminderte Wirksamkeit von Anti-PD-1 mAb mit einer vermehrten Expression der eN auf der Tumorzelle in Zusammenhang steht, bietet sich auch hier eine hervorragende Möglichkeit der Kombinationstherapie von Anti-PD-1 mAb und einem Inhibitor der eN. Die synergistische Wirkung dieser beiden immuntherapeutischen Ansätze konnte bereits in präklinischen Studien belegt werden.¹⁴⁶

2 Ziele der Arbeit

Wie bereits erläutert, stellt die Ecto-5'-Nucleotidase ein interessantes Target für die Entwicklung von Arzneimitteln dar. Insbesondere die Therapie von neurodegenerativen Erkrankungen und von malignen Tumoren steht derzeit besonders im Fokus der Forschung. Die meisten Studien in diesem Feld nutzen derzeit Anti-CD73-Antikörper als Hemmstoffe der eN. Diese zeichnen sich zwar in der Regel durch eine hohe Spezifität aus, sind jedoch nur parenteral applizierbar und kaum hirngängig, sowie aufwendig und teuer in der Herstellung und Lagerung. Wie unter 1.7.2 beschrieben sind bisher jedoch nur wenige Inhibitoren der eN bekannt. Darüber hinaus zeigen viele dieser Verbindungen eine zu geringe Potenz und Selektivität, um sie als Hemmstoffe in vivo nutzen zu können. Die bisher beschriebenen Inhibitoren mit der höchsten Potenz und Selektivität, weisen alle eine ionische Partialstruktur auf, die eine perorale Bioverfügbarkeit unwahrscheinlich erscheinen lässt, da es ihnen wahrscheinlich nicht möglich ist Zellmembranen zu überwinden. Häufig sind bisher auch nur einzelne Verbindungen einer Klasse als Inhibitoren beschrieben, sodass deren Struktur-Wirkungsbeziehungen bisher unbekannt sind.

Unser Ziel war daher die Entwicklung neuer „small-molecule drugs“ als potente und selektive Inhibitoren der eN.

Da AOPCP als die bisher potenteste Verbindung mit einer hohen Selektivität beschrieben war, diente diese Verbindung als Leitstruktur für die Entwicklung neuer, verbesserter Inhibitoren. In Zusammenarbeit mit Sanjay Bhattarai (Arbeitsgruppe Frau Prof. Müller) sollten Derivate des AOPCP synthetisiert, pharmakologisch charakterisiert und nach Analyse der Struktur-Wirkungsbeziehungen weiter optimiert werden.

Zunächst zeigte sich jedoch die Notwendigkeit eines für unsere Bedürfnisse geeigneten Enzym-Assays. Es sollte daher ein Testsystem etabliert und validiert werden, das es uns ermöglichte, sowohl Verbindungen in einem höheren Durchsatz zu screenen, als auch potente Verbindungen näher zu charakterisieren. Im Rahmen dieser Assay-Etablierung sollte eine kleinere Substanzbibliothek untersucht werden.

In Zusammenarbeit mit Peter Ripphausen und Norbert Furtmann aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Jürgen Bajorath sollten ein virtuelles Screening sowie Dockingstudien durchgeführt werden, um neue Leitstrukturen, insbesondere nicht-ionische Verbindungen als Inhibitoren der eN zu entwickeln. Basierend auf identifizierten Leitstrukturen sollten Derivate synthetisiert werden, um Struktur-Wirkungsbeziehungen zu analysieren und die Inhibitoren zu optimieren.

3 Entwicklung enzymatischer Assays für die Charakterisierung von Inhibitoren der Ecto-5'-Nucleotidase

3.1 Einleitung

Das Ziel dieser Arbeit, die Identifizierung und Optimierung neuer Inhibitoren für die eN, setzte zunächst die Identifizierung einer bzw. mehrerer Leitstrukturen voraus. Hierfür war eine Methode erforderlich, die sich für ein Screening mit hohem Durchsatz eignete. Daher stellten sich an diese zu entwickelnde Methode folgende Anforderungen: schnelle und einfache Durchführung und robuste, gut reproduzierbare Ergebnisse.

Darüber hinaus sollte die Methode möglichst empfindlich sein, um auch weniger potente und schlecht wasserlösliche Verbindungen identifizieren zu können, Beispielsweise sollten auch Fragmente mit moderater inhibitorischer Potenz, die sich gut als Startpunkte eignen, identifiziert werden.¹⁴⁷

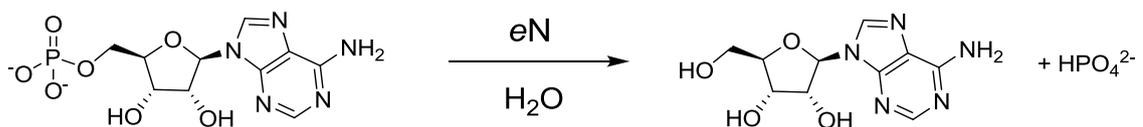


Abbildung 3.1: Hydrolyse von Adenosin-5'-monophosphat durch die Ecto-5'-Nucleotidase

Durch die Hydrolyse von AMP zu Adenosin und Phosphat ergeben sich die Möglichkeiten die Aktivität der eN über die Quantifizierung eines der Produkte, Adenosin oder Phosphat, zu bestimmen oder über die Abnahme der eingesetzten Substratmenge. Der optimale Fall wäre hierbei die Bestimmung des Adenosins. Die Recherche zu bekannten Assays ergab einen Überblick über verwendete Methoden, auf deren Vor- und Nachteile ich im Folgenden genauer eingehen möchte. Diese Methoden umfassen die UV/VIS-Spektroskopie, Lumineszenz, Chromatographie, Spektroskopie sowie Radioaktivitäts-Bestimmung.¹⁴⁸⁻¹⁶⁴

Einen relativ neuen Ansatz stellt eine Luciferase-basierte Assay-Methode dar.¹⁶⁰ Bei dieser wird ATP mit der Luciferase-Reaktion quantifiziert.

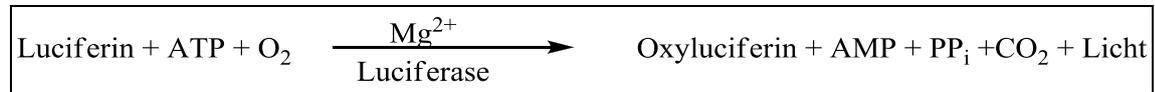


Abbildung 3.2: Darstellung der Luciferase-Reaktion

Die, bei dieser Methode angewendete, indirekte Bestimmung der eN-Aktivität beruht auf der Tatsache, dass AMP diese Reaktion zu hemmen vermag. Eine Abnahme der AMP-Konzentration, bedingt durch die enzymatische Umsetzung mittels eN, resultiert in einer verstärkten Luciferase-Reaktion und damit in einem erhöhten Lumineszenz-Signal.

Diese Methode zeigt jedoch einige Nachteile auf. So ist zum einen eine relativ hohe Substratkonzentration erforderlich, da niedrige Konzentrationen an AMP umgehend, durch das aus der Luciferase-Reaktion entstehende AMP, wieder ersetzen würden. Die Autoren geben eine Substratkonzentration von 300 μM an und arbeiten somit weit über dem K_m -Wert. Eine solch hohe Substratkonzentration ist jedoch für die Untersuchung kompetitiver Inhibitoren ungünstig, da der Inhibitor, wenn nicht überaus potent, ebenfalls in einer entsprechend hohen Konzentration eingesetzt werden müsste, was bei vielen kleinen Molekülen auf Grund nicht hinreichender Wasserlöslichkeit jedoch nicht möglich ist. Einen weiteren Nachteil dieser Methode sahen wir in der Anwesenheit recht hoher Konzentrationen von ATP, das ein recht potenter Inhibitor der eN mit einem K_i -Wert im niedrig mikromolaren Bereich ist.⁷⁵

Neben dieser neueren Methode ist noch eine ältere beschrieben, die sich ebenfalls eine gekoppelte Enzymreaktion zu Nutze macht, um anschließend das Produkt UV-spektroskopisch zu quantifizieren. Hierbei wird das bei der enzymatischen Katalyse von eN freigesetzte Adenosin von dem Hilfsenzym Adenosindeaminase (ADA) zu Inosin umgesetzt, wobei Ammoniak freigesetzt wird. Dieses wird mittels Berthelot-Reaktion (alkalische Hypochlorit-Phenol-Reaktion) zu blauem Indophenol umgesetzt, welches mittels UV-Absorptionsmessung quantifiziert werden kann.^{150; 158-159} Auch diese Methode erschien uns nicht optimal, da sie auf Grund ihrer vielen Schritte und

Reagenzien zum einen schwierig zu validieren und darüber hinaus auch störanfälliger ist. So kann es beispielsweise durch die Inhibition des Hilfsenzym zu einem falsch-positiven Ergebnis kommen¹⁶⁵ oder die Farbreaktion kann durch eine Reaktion mit der Testverbindung gestört werden.

Neben den oben aufgeführten indirekten Methoden sind aber auch direkte Methoden beschrieben. Hier finden sich in erster Linie instrumentelle Methoden der HPLC (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) oder CE (Kapillarelektrophorese).^{75; 148; 161} Diese Methoden zeigen einige Vorteile in der Charakterisierung der enzymatischen Reaktionen, da sie beispielsweise bei der Bildung von mehreren Produkten eine simultane Bestimmung derselben zulassen oder die Möglichkeit bieten, alternative Substrate zu untersuchen, jedoch sind sie für größere Screening-Kampagnen ungeeignet. Für ein solches Vorhaben sind sie in erster Linie zu zeitaufwendig. Daneben reicht auch hier die mit den bisher beschriebenen Methoden erreichte Sensitivität nicht aus, so dass Substratkonzentrationen deutlich über dem K_M -Wert erforderlich sind.

Abgesehen von den instrumentellen Methoden findet man zur direkten Bestimmung von Adenosin hauptsächlich radiometrische Methoden, bei denen radioaktiv markiertes Substrat eingesetzt wird. Für die Trennung des radioaktiven Substrats von dem radioaktiven Produkt werden verschiedene Methoden beschrieben. Zum einen kommen hier wieder chromatographische Systeme wie HPLC,¹⁵⁶ DC^{153–154; 158; 161; 164} oder Ionenaustauschchromatographie^{151; 156; 162} zum Einsatz, zum anderen werden Präzipitationsmethoden beschrieben, bei denen das nicht umgesetzte Substrat unter Verwendung von Zinksulfat und Bariumhydroxid¹⁵⁵ oder von Lanthan(III)chlorid¹⁶³ ausgefällt und über Zentrifugation abgetrennt wird.

Abgesehen von der direkten Bestimmung des Adenosins findet man sehr häufig auch die Quantifizierung von Phosphat für die Bestimmung der eN-Aktivität. Die am häufigsten verwendete Methode stellt der Malachitgrün-Assay dar.^{149; 152; 157} Bei diesem handelt es sich um eine kolorimetrische Methode, deren Vorteile vor allem darin bestehen, dass sie sehr kostengünstig durchzuführen ist und sehr schnell auch in größerem Maßstab durchgeführt werden kann. Hiermit stimmte diese Methode

zumindest schon mit einigen unserer Anforderungen überein. Deshalb sollte zunächst dieser Assay optimiert werden.

3.2 Malachitgrün-Assay

In dem hier vorgestellten Assay kann Phosphat, das bei der enzymatischen Hydrolyse von AMP freigesetzt wird, mit Hilfe eines Malachitgrün-Farbstoffkomplexes nachgewiesen werden.

Bei einem sauren pH-Wert kann Phosphat mit Molybdat-Ionen eine Komplexbildung eingehen, bei der sich die Molybdat-Ionen wie ein oktaedrischer Käfig um das Phosphat anordnen. Abbildung 3.3 zeigt beispielhaft die Komplexbildung eines Phosphates mit 12 Molybdat-Ionen.

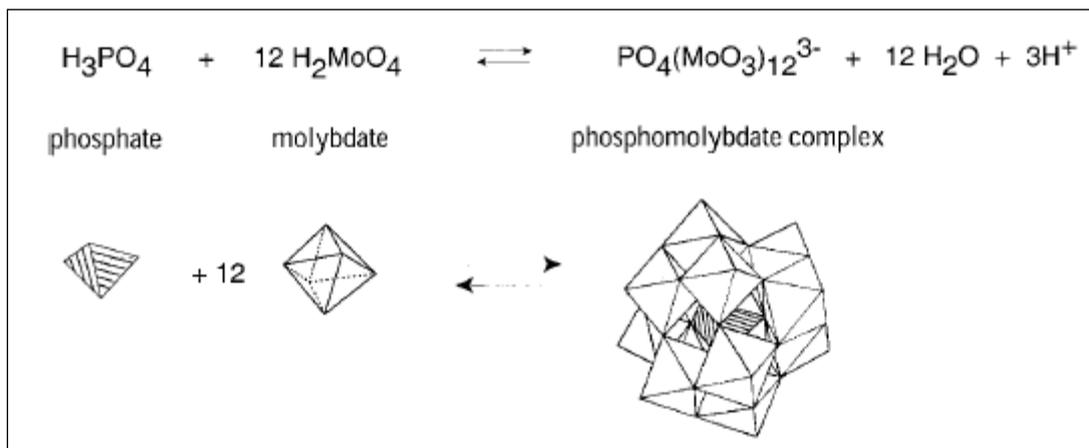


Abbildung 3.3: Beispielhafte Darstellung der Entstehung des Molybdatophosphat-Komplexes ¹⁵²

Bei Malachitgrün handelt es sich um einen kationischen Farbstoff, der bei einem sauren pH Wert < 2 in seiner protonierten, gelben Form vorliegt. In Anwesenheit von Phosphat und Molybdat-Ionen können sich jedoch die kationischen Farbstoffmoleküle durch elektrostatische Wechselwirkungen an die anionischen Phosphomolybdatokomplexe anlagern. Durch diese Reaktion kann Malachitgrün in Anwesenheit von Molybdat und Phosphat auch bei einem sauren pH-Wert in der nicht-ionischen, blau-grünen Form vorliegen.¹⁵²

Diese Reaktion vereint verschiedene Gleichgewichtsreaktionen, so dass neben den Konzentrationen der Molybdat- und Phosphat-Ionen auch die Konzentration an Protonen, also der pH-Wert eine sehr wichtige Rolle spielt.

Es ist für den Assay daher essentiell, die richtige Säurekonzentration zu wählen, um die Stabilität des Komplexes zu gewährleisten. Bei einer zu hohen Säurekonzentration kann sich der Komplex nicht bilden, bei einer zu niedrigen Säurekonzentration wird das Hintergrundsignal zu stark. Daneben muss die Konzentration an Molybdat-Ionen entsprechend hoch sein, so dass sich an jedes Phosphatmolekül 12 Molybdat-Ionen anlagern können.

Da die Reaktionen, wie oben beschrieben, verschiedenen Gleichgewichtsreaktionen unterliegt, ist die Menge an Malachitgrün, die in die blau-grüne Form übergehen kann, abhängig von den Konzentrationen an Molybdat und Phosphat, sowie dem pH-Wert. Wenn nun sichergestellt ist, dass die Konzentrationen an Molybdat, Malachitgrün und Protonen konstant sind, ist die Intensivität der Färbung nur noch abhängig von der Phosphatkonzentration. Die Bestimmung der optimalen Konzentrationen der verwendeten Reagenzien ist bei Cogan et al. beschrieben und die Ergebnisse wurden für den hier durchgeführten Assay übernommen.¹⁵²

Die Konzentration des entstandenen Farbstoffkomplexes wird durch eine Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 620 nm bestimmt. Durch Erstellung einer Kalibriergeraden mit Phosphat kann aus der gemessenen Absorption die in der Enzymreaktion entstandene Konzentration an Phosphat bzw. Adenosin berechnet werden.

Damit der Farbstoffkomplex nicht präzipitiert und lange genug stabil ist, so dass er quantitativ durch die Absorptionsmessung bestimmt werden kann, ist es wichtig, dem Malachitgrün-Reagenz ein Detergens zuzusetzen. In dem hier beschriebenen Assay wird als Detergens Tween 20 verwendet. Hierbei sollte jedoch eine Konzentration von 0,1 % nicht überschritten werden, da das Detergens sonst einen Einfluss auf die Reaktion oder die Absorption haben kann.

3.2.1 Kalibrierung des Testsystems

Die Kalibrierung dient der Bestimmung der Nachweisgrenze des Testsystems und gibt darüber hinaus auch Auskunft über die Gerätekapazität. Für eine geeignete Bestimmungsmethode ist es essentiell, dass die gemessenen Signale linear proportional zu den eingesetzten Konzentrationen sind. Dazu ist es wichtig, sicher zu stellen, dass das verwendete Gerät auch in dem Bereich der zu bestimmenden Produktkonzentrationen volle Kapazität zeigt, da andernfalls eine lineare Proportionalität nicht mehr gegeben ist und die Messung fehlerhaft wird. Diese grundlegenden Eigenschaften für eine Methode können überprüft werden, indem verschiedene Konzentrationen des Produktes eingesetzt werden und die daraus resultierenden Messsignale gegen die Produktkonzentration aufgetragen werden. In diesem Fall wurde für die Erstellung der Kalibriergerade Natriumhydrogenphosphat verwendet, welches das bei der Enzymreaktion freigesetzte Phosphat ersetzt. Die Ergebnisse wurden mittels einer linearen Regression ausgewertet und die Absorptionssignale in Abhängigkeit von der Phosphatkonzentration graphisch aufgetragen. Hieraus ergab sich die in Abbildung 3.4 dargestellte Kalibriergerade der Gleichung $y = 0,015x + 0,059$ mit einem Regressionskoeffizienten von $r^2 = 0,9882$.

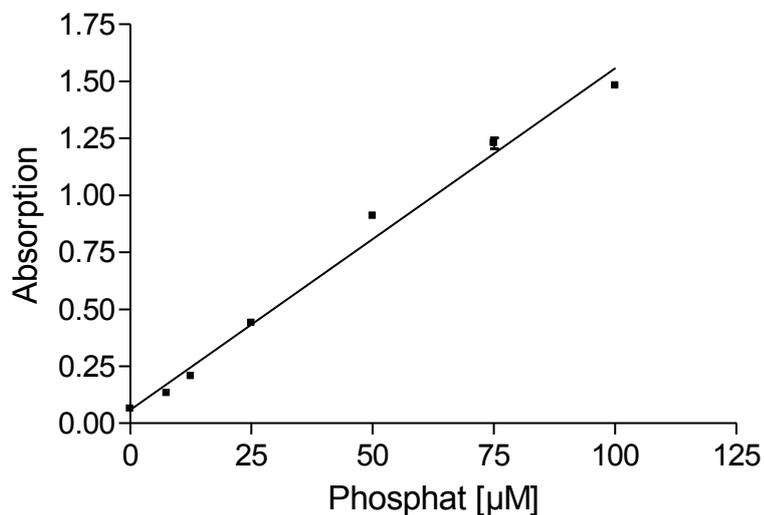


Abbildung 3.4: Kalibriergerade zur Untersuchung des Testsystems

Die Kalibriergeraden zeigt für den untersuchten Konzentrationsbereich eine gute Linearität. Um nun die Nachweisgrenze für dieses System zu bestimmen wird der sogenannte LOD-Wert (Limit of Detection) entsprechend Formel 3.1 berechnet.

Formel 3.1: Berechnung der Nachweisgrenze

$$LOD = \frac{3 \cdot \sigma}{slope}$$

Hierbei stellt σ die Standardabweichung des Hintergrundsignals und slope die Steigung der linearen Regression dar.

Für diesen Versuch konnte eine Nachweisgrenze von 0,191 μM Phosphat ermittelt werden, welche im Vergleich mit anderen in der Literatur beschriebenen Werten sehr gut ist, dort werden Nachweisgrenzen um 1 μM Phosphat angegeben.

Grundsätzlich sollte der Arbeitsbereich des Assays letztlich mindestens *20fach* oberhalb des LOD liegen, in diesem Fall bedeutet, dass eine Konzentration von mindestens 4 μM Phosphat. Ausgehend von einem K_M -Wert von 25 μM und einer maximalen Umsatzrate von 10 % liegt der optimale Arbeitsbereich leider auch knapp oberhalb der zu messenden Konzentration. Wir müssen also bei diesem Assay mit einer Umsatzrate von maximal 20% arbeiten, um in den gewünschten Arbeitsbereich zu kommen, wenn die Substratkonzentration nicht oberhalb des K_M -wertes liegen soll. Im weiteren Verlauf der Optimierung sollte dann kontrolliert werden, dass trotz der leicht erhöhten Umsatzrate in dem gewünschten linearen Bereich der Anfangsgeschwindigkeit (initial velocity) der Enzymreaktion gearbeitet werden kann.

3.2.2 Bestimmung der optimalen Enzymkonzentration

Um die optimale Enzymkonzentration für diesen Assay zu bestimmen, wurde eine Enzymtitration durchgeführt. Hierzu wurden verschiedene Enzymkonzentrationen mit einer fixen Substratkonzentration von 25 μM entsprechend dem Literatur K_M -Wert¹⁶⁶ inkubiert.

Die in diesem Versuch gemessenen Absorptionswerte wurden in einer linearen Regression gegen die Enzymkonzentration aufgetragen und ergaben eine Gerade der

Gleichung $y = 0,118x + 0,094$ mit einem Regressionskoeffizienten von $r^2 = 0,9604$ (Abbildung 3.5).

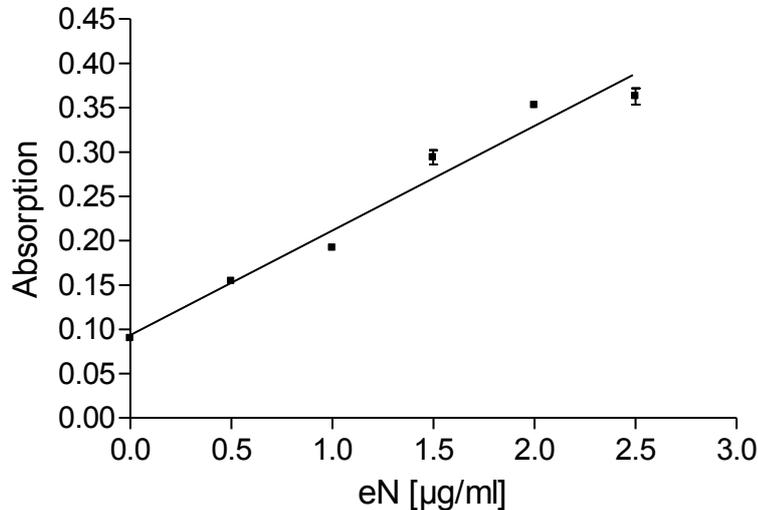


Abbildung 3.5: Lineare Regression zur Untersuchung der optimalen eN-Konzentration (Präparation der Ratten-eN¹⁶⁶)

Entsprechend der Kalibrierung des Systems wurde auch für die Bestimmung der optimalen Enzymkonzentration der LOD bestimmt. Dieser berechnet sich zu 0,025 µg/ml Proteingehalt und gibt somit einen optimalen Arbeitsbereich für eine Enzymkonzentration von 0,5 µg/ml an (20fach oberhalb des berechneten LOD).

3.2.3 Bestimmung des K_M -Wertes

Da der K_M -Wert und die Substratkonzentration bei der Durchführung von Enzymassays eine besonders wichtige Rolle spielen, der K_M -Wert in unterschiedlichen Testsystemen jedoch etwas variieren kann, wurde im Rahmen der Optimierung auch der K_M -Wert für die eN mit Hilfe des Malachitgrün-Assays bestimmt. Hierzu wurden verschiedene Substratkonzentrationen mit einer konstanten Enzymkonzentration von 0,5 µg/ml inkubiert.

Mit Hilfe einer simultan aufgenommenen Kalibriergerade konnten die erhaltenen Messwerte in die entstandene Adenosinkonzentration umgerechnet werden. Unter

Einbeziehung der Inkubationszeit und der Enzymkonzentration konnten die Werte für die Reaktionsgeschwindigkeit (velocity) bestimmt werden. Durch eine nichtlineare Regression der so erhaltenen Reaktionsgeschwindigkeit gegen die Substratkonzentration lassen sich die Daten graphisch als Sättigungskurve darstellen (Abbildung 3.6).

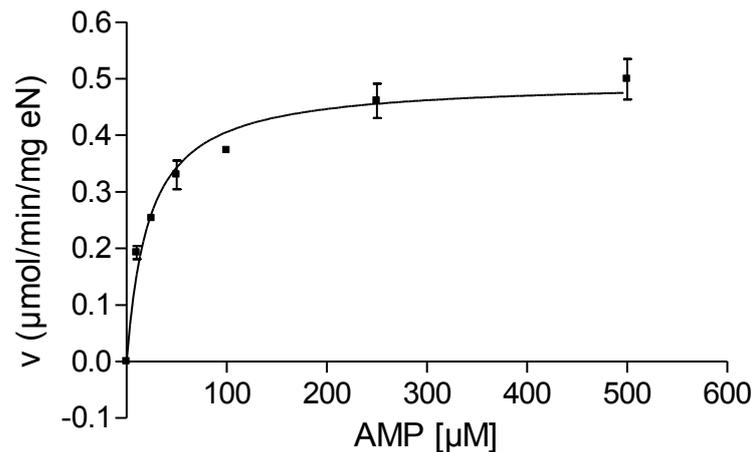


Abbildung 3.6: Michaelis-Menten-Plot zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante von Adenosin-5'-monophosphat an der Ratten-eN.

Für den K_m -Wert ergibt sich ein Wert von 22,4 μM . Dieser Wert stimmt gut mit den in der Literatur angegebenen Daten von etwa 25 μM überein.^{10; 75; 166} Da die Substratkonzentration bei der Untersuchung von kompetitiven Inhibitoren dem K_M -Wert entsprechen (oder darunter liegen) sollte, konnte ausgehend von diesem Versuch eine Substratkonzentration von 25 μM Adenosin-5'-monophosphat für weitere Versuche beibehalten werden.

3.2.4 Untersuchung des Einflusses verschiedener Pufferzusätze und von DMSO auf die Enzymreaktion

Da verschiedene Pufferzusätze und auch andere im Versuch eingesetzte Chemikalien einen Einfluss auf die Enzymreaktion ausüben können, wurden im Rahmen der Assayoptimierung auch einige dieser Einflüsse untersucht. Zunächst wurde die Zusammensetzung des Assaypuffers untersucht. Hier stand zunächst die Frage im

Raum, ob die eN ebenso wie andere Ectonucleotidasen auf die Anwesenheit divalenter Kationen wie Magnesium oder Calcium angewiesen ist. Eine weitere Komponente, die meist einen sehr großen Einfluss auf die Enzymaktivität haben kann, ist die Konzentration an Natriumchlorid. Somit wurde der Einfluss dieser Salze in zwei verschiedenen Puffersystemen (TRIS und HEPES) auf die Enzymaktivität bestimmt.

Aus den in diesem Versuch erhaltenen Messwerten wurden die Umsetzungsraten berechnet und diese, bezogen auf die Pufferzusätze, graphisch als Balkendiagramme dargestellt.

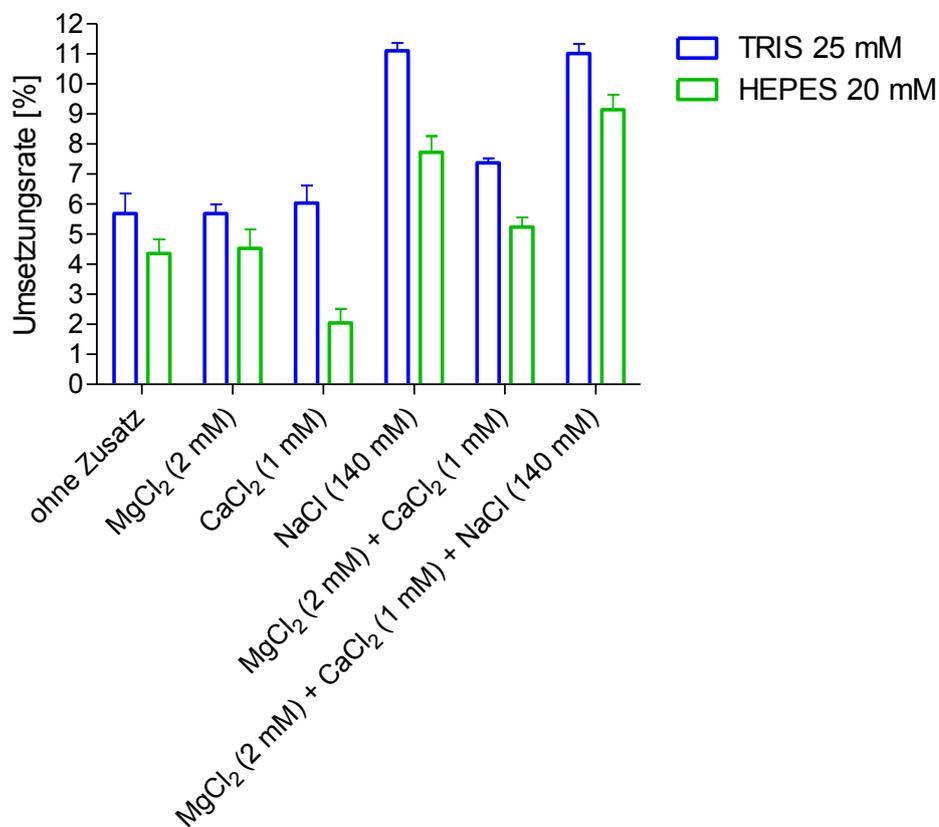


Abbildung 3.7: Darstellung des Einflusses verschiedener Pufferzusätze auf die Enzymreaktion

Die Abbildung 3.7 zeigt, dass sich TRIS im Vergleich zu HEPES besser als Puffer für diese Reaktion eignet. Ein Zusatz divalenter Kationen, wie Magnesium- oder Calciumchlorid, scheinen in der hier verwendeten Konzentration einzeln kaum einen

Effekt auf die Enzymreaktion auszuüben. Bei Kombination beider Salze sieht man jedoch eine leichte Steigerung der Umsatzrate. Natriumchlorid hingegen zeigt einen sehr starken positiven Effekt, in dem es die Umsatzrate fast verdoppelt. Der TRIS-Puffer mit Zusatz aller drei Salze zeigt den stärksten positiven Effekt auf die Enzymreaktion und wurde daher im weiteren Verlauf als Assaypuffer für den Malachitgrün-Assay verwendet.

Neben der Zusammensetzung des Assaypuffers zeigen aber auch noch andere Faktoren einen Einfluss auf die Enzymaktivität. Eine weitere wichtige Komponente, die untersucht werden sollte, ist der Einfluss der DMSO-Konzentration. Da viele Arzneistoffe, die in diesem Testsystem untersucht werden sollen, keine ausreichende Löslichkeit in Wasser zeigen, wird sehr häufig DMSO verwendet um die Löslichkeit zu verbessern. Die meisten Arzneistoffe werden zudem als DMSO-Stammlösung gelagert und aus dieser heraus verdünnt. Um nun zu überprüfen, ob geringe DMSO-Konzentrationen von dem Enzym toleriert werden, wurde die Enzymreaktion in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von DMSO bis 5 % durchgeführt. Aus den in diesem Versuch erhaltenen Messwerten wurden die jeweiligen Umsatzraten unter Einfluss der verschiedenen DMSO-Konzentrationen berechnet und in einem Balkendiagramm graphisch dargestellt.

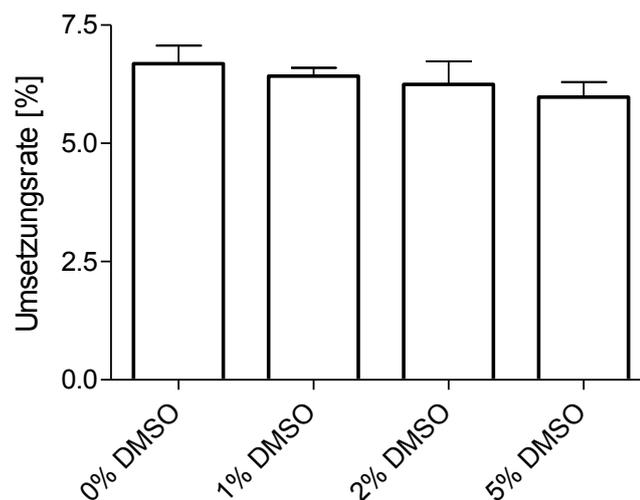


Abbildung 3.8: Darstellung des Einflusses von DMSO auf die Enzymreaktion

Die Abbildung 3.8 zeigt eine verringerte Umsetzungsrate unter steigender DMSO-Konzentration. Dies könnte darauf hinweisen, dass DMSO das Enzym schädigt. Da dieser Effekt bei den eingesetzten Konzentrationen nur schwach ausgeprägt ist, kann eine DMSO-Konzentration bis zu 2% im Assay bedenkenlos eingesetzt werden.

3.2.5 Anpassung der Inkubationszeit

Da, wie oben bereits erwähnt, sichergestellt werden muss, dass die Enzymreaktion in der linearen Anfangsgeschwindigkeit durchgeführt wird, wurde eine Enzymkinetik aufgenommen. Hierzu wurden die vorher bestimmten Substrat- und Enzymkonzentrationen eingesetzt und die Enzymreaktion nach unterschiedlichen Inkubationszeiten gestoppt. Mit Hilfe einer simultan aufgenommenen Kalibriergeraden wurde die Produktkonzentration errechnet und graphisch mittels linearer Regression gegen die Inkubationszeit aufgetragen.

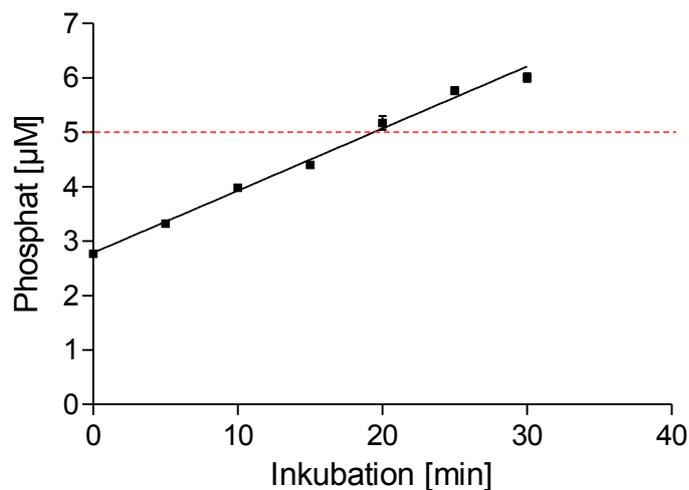


Abbildung 3.9: Enzymkinetik zur Anpassung der Inkubationszeit

Die Abbildung 3.9 zeigt, dass die maximale Umsetzung von 20% (rote gestrichelte Linie) bei einer Inkubation von 20 Minuten erreicht ist. Eine Inkubationszeit von 15 Minuten gewährleistet zum einen, dass die Umsetzungsrate 20% nicht überstiegen wird, zum anderen liegt bei dieser Inkubationszeit die Phosphatkonzentration knapp über dem geforderten Wert von 4 μM (20 x LOD). Eine Inkubationszeit von 15 Minuten erschien daher optimal und wurde für weitere Versuche verwendet.

3.2.6 Standardinhibitionskurven

Im Anschluss an die Optimierung der Assayparameter wurden Konzentrations-Inhibitionskurven von zwei bekannten Inhibitoren aufgenommen, dem AOPCP und ADP. Dieser Versuch sollte der Kontrolle dienen, ob der Assay mit den optimierten Bedingungen gute, valide und reproduzierbare Ergebnisse bei der Untersuchung von bekannten kompetitiven Inhibitoren liefern kann. Durch Normalisierung der Messwerte konnten diese als prozentuale Aktivität der eN gegen die Inhibitorkonzentration aufgetragen werden. Die graphische Darstellung erfolgte mittels nichtlinearer Regression.

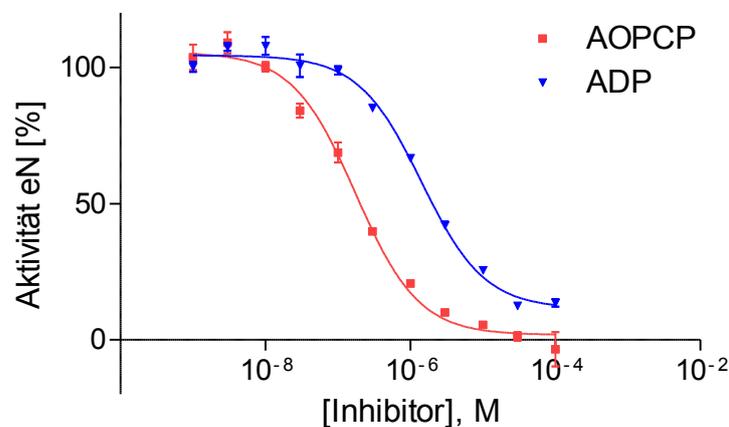


Abbildung 3.10: Inhibitionskurven von AOPCP und ADP

Aus den Inhibitionskurven ergeben sich IC_{50} -Werte von $0,188 \mu\text{M} \pm 0,015$ für AOPCP und $1,58 \mu\text{M} \pm 0,11$ für ADP und daraus errechnete K_i -Werte von $0,0628 \mu\text{M} \pm 0,0050$ (AOPCP) und $0,497 \mu\text{M} \pm 0,034$ (ADP). Die ermittelten Werte stimmen mit den Literaturwerten gut überein.^{53; 75; 155}

Anhand der Kurven zeigt sich, dass die Methode sehr gute reproduzierbare Werte ergibt und somit gut geeignet ist für die Untersuchung kompetitiver Inhibitoren.

3.2.7 Z'-Faktor

Der Z'-Faktor ist ein statistischer Parameter der häufig verwendet wird, um die Robustheit und die Qualität eines Assay zu bestimmen. Er wird vor allem gerne herangezogen, um einen Assay auf seine Eignung im Hinblick auf ein High-

Throughput-Screening zu bewerten. Die Berechnung erfolgt entsprechend Formel 3.2 wobei σ_+ die Standardabweichung der Positivkontrolle, σ_- die Standardabweichung der Negativkontrolle, μ_+ den Mittelwert der Positivkontrolle und μ_- den Mittelwert der Negativkontrolle beschreibt.

Formel 3.2: Berechnung des Z' -Faktors

$$Z' = 1 - \left| \frac{3 \cdot \sigma_+ + 3 \cdot \sigma_-}{\mu_+ + \mu_-} \right|$$

Als Positivkontrolle dienen hier die Werte, die für die höchste Inhibitorkonzentration erhalten wurden. Im Falle des Standardinhibitors AOPCP konnte die Enzymaktivität bei einer Konzentration von 100 μM auf >1% gesenkt werden, so dass diese den Hintergrund-Werten entsprechen. Als Negativkontrolle dienen die Werte der ungehemmten Enzymreaktion. Der so berechneten Z' -Faktor ergibt gemittelt einen Wert von 0,8 und weist damit auf eine gute Qualität und Robustheit des Assays hin.

3.2.8 Zusammenfassung

Die durchgeführten Experimente zur Optimierung des Versuchsaufbaus des Malachitgrün-Assays für das Screening und die Charakterisierung von kompetitiven eN-Inhibitoren führte zu folgenden Parametern:

- Assaypuffer: Tris 25 mM / NaCl 140 mM / MgCl₂ 2 mM / CaCl₂ 1 mM, pH 7,4
- Substratkonzentration: 25 μM
- Enzymkonzentration: 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (rekombinante Ratten-eN Präparation¹⁶⁶)
- Inkubationstempertaur: 37°C
- Inkubationszeit: 15 Minuten
- Malachitgrün: 120 μM (unter Zusatz von Tween 20 in einer Endkonzentration von 0,0775%)
- Ammoniummolybdat: 6 mM (unter Zusatz von H₂SO₄ in einer Endkonzentration von 0,45 M)

Auf diese Weise konnten wir den Assay soweit optimieren, dass wir die Nachweisgrenze auf 0,2 μM Phosphat senken konnten, wodurch wir in der Lage waren, die eingesetzte Substratkonzentration deutlich zu verringern auf eine Konzentration entsprechend dem K_M -Wert des Substrats.

Trotz der reduzierten Substratkonzentration konnten wir ein gutes Messfenster erreichen, da auf Grund der angepassten Konzentrationen an Malachitgrün und Ammoniummolybdat mit den entsprechenden Zusätzen das Background-Signal ebenfalls deutlich gesenkt werden konnte. Die Messungen zeigen einen sehr robusten Assay, der geringe Schwankungen aufweist und sehr gut reproduzierbare Werte liefert. Dies spiegelt sich auch in dem sehr guten Z' -Faktor wieder, den wir über die Versuche bestimmen konnten und der im Schnitt bei 0,8 lag.

Die optimierte Methode stellt nun ein gutes Instrument für größere Screening-Kampagnen an der eN dar. Es ist eine kostengünstige, schnelle Methode, die sehr gut im Mikrotiter-Plattenformat durchgeführt werden kann und somit auch die Möglichkeit bietet, sie auf einen Pipettierroboter zu übertragen.

Jedoch zeigt auch die optimierte Methode noch einige Nachteile, die mit diesem Assay nicht umgangen werden können. Ein großer Nachteil ist, dass keine farbigen Verbindungen untersucht werden können, da diese die Absorption des Farbstoffsignals stören. Auch Proteine oder andere ungelöste Partikel im Reaktionsansatz würden das Absorptionssignal stören, wodurch der Assay nur mit dem gelösten und gereinigten Enzym durchgeführt werden kann und nicht mit Membranpräparationen.

Darüber hinaus ist es nicht möglich, die Substratkonzentration noch weiter zu senken und somit unterhalb des K_M -Wertes zu arbeiten. Da einige der Testverbindungen, die an der eN untersucht werden sollten, jedoch eine nicht hinreichende Löslichkeit im wässrigen Milieu zeigen und schon in Konzentrationen von 100 μM präzipitieren, war die Suche nach einer weiteren Methode erforderlich, die eine höhere Empfindlichkeit aufweist und so auch geringere Substratkonzentrationen zulässt. Diese Methode fanden wir in einer radiometrischen Methode deren Entwicklung und Optimierung im nächsten Abschnitt beschrieben ist.

3.3 Radiometrischer Assay

Da wie bereits erwähnt der Malachitgrün Assay trotz der Optimierung einige Nachteile zeigt, wurde nach einer alternativen Methode gesucht, mit der ebenfalls kompetitive Inhibitoren an der eN untersucht werden können. Hierbei wurden viele bekannte Methoden evaluiert. Schließlich entschieden wir uns für einen radiometrischen Assay, da dieser eine besonders hohe Sensitivität verspricht. Wie bereits erwähnt sind Methoden beschrieben, die radioaktiv markiertes Substrat einsetzen, jedoch erfolgte die Trennung von radioaktivem Substrat und Produkt über chromatographische Methoden,^{151; 153–154; 156; 158; 161-162;164} was uns für unser Vorhaben jedoch zu zeit- und arbeitsintensiv erschien. Daher suchten wir nach einer alternativen Methode, um Produkt und Substrat zu trennen. Ein beschriebener Thymidinkinase-Assay beruht auf der Ausfällung des Produktes Thymidin-5'-monophosphat, das anschließend durch Filtration vom Substrat Thymidin abgetrennt werden kann.¹⁶⁷ Diese Methode übertrugen wir auf das Adenosin-5'-monophosphat und passten die dort beschriebene Methode der Fällung des Substrates und die Separation des Produktes an unser System und unsere technischen Möglichkeiten im Labor an. Eingesetzt wird bei der von uns entwickelten Methode radioaktiv markiertes [³H]Adenosin-5'-monophosphat. Durch die Enzymreaktion bildet sich hieraus [³H]Adenosin. Das Fällungsreagenz Lanthan(III)chlorid bildet mit Phosphat ein schwerlösliches Salz und vermag auch mit Adenosin-5'-monophosphat einen schwerlöslichen Komplex zu bilden, mit Adenosin hingegen kann es nicht reagieren, so dass dieses in Lösung verbleibt.

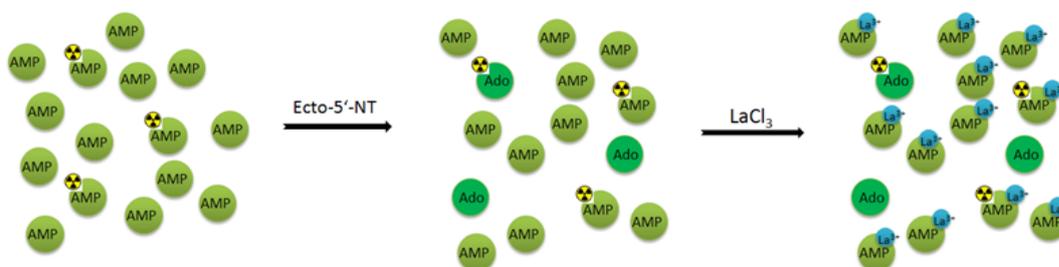


Abbildung 3.11: Schematische Darstellung der Fällungsreaktion mit Lanthan(III)chlorid

Vorversuche zeigten jedoch, dass lediglich die Zugabe einer Lanthan(II)chlorid-Lösung ohne weitere Zusätze keine ausreichende Fällung des AMP-Lanthan-Komplexes erreichen konnte. Um die Bildung des Lanthan-AMP-Komplexes zu verbessern, wurde daraufhin die in der Literatur beschriebene Co-Präzipitationsmethode angewendet.¹⁶⁷ Hierbei wird neben dem zu fällenden AMP noch Phosphat eingesetzt, das mit dem Lanthanchlorid sehr schnell ein Präzipitat in einem Verhältnis von 1:1 zu bilden vermag. Durch die gleichzeitige Fällung von AMP und Phosphat mit Lanthanchlorid wird die Fällung von AMP deutlich verbessert. Vorversuche zeigten, dass Phosphat hierbei in einer mindestens 1000fach höheren Konzentration als das Substrat AMP eingesetzt werden sollte.

Neben dem Zusatz von Phosphat für die Co-Präzipitation spielt auch der pH-Wert eine wichtige Rolle für eine optimale Fällung. Daher wurden verschiedene Fällungspuffer untersucht, zum einen der Zusatz von Acetat für einen leicht sauren pH-Wert, ein Fällungspuffer ohne weitere Zusätze und ein Zusatz von Triethanolamin zur Einstellung eines leicht alkalischen pH-Werts.

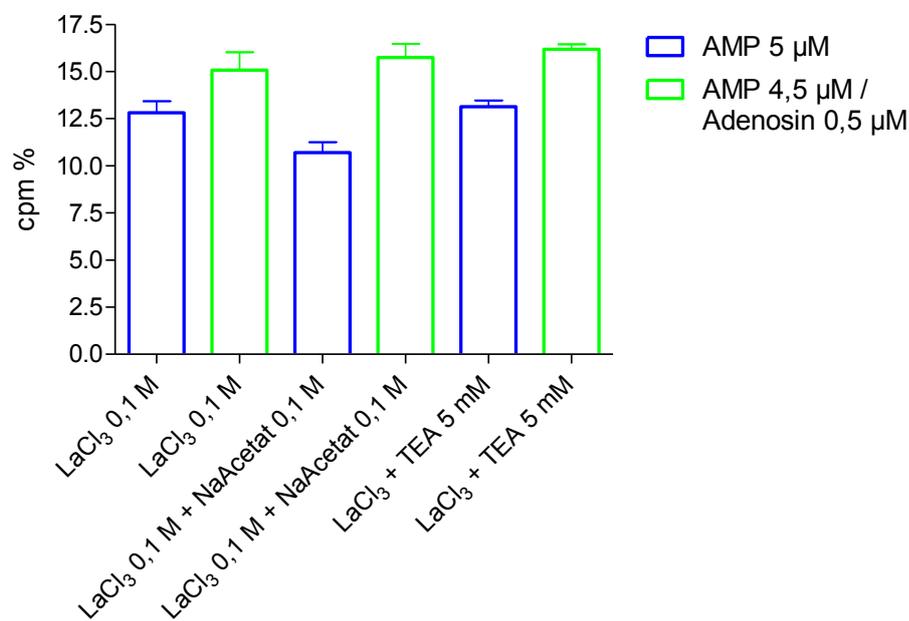


Abbildung 3.12: Vergleich verschiedener Fällungspuffer

Abbildung 3.12 zeigt bei einem leicht alkalischen pH-Wert von 8 die schlechteste Fällungsreaktion, bei einem schwach sauren pH-Wert von 4 hingegen erreicht man die beste Fällung.

Das so ausgefällte [^3H]AMP kann dann von dem im Filtrat gelösten [^3H]Adenosin durch Filtration getrennt werden. Hierzu verwenden wir in unserem Labor einen Zellharvester, der mit einer speziellen Collection-Box ausgestattet ist, die es uns ermöglicht die Filtrate einzeln aufzufangen (Abbildung 3.13).

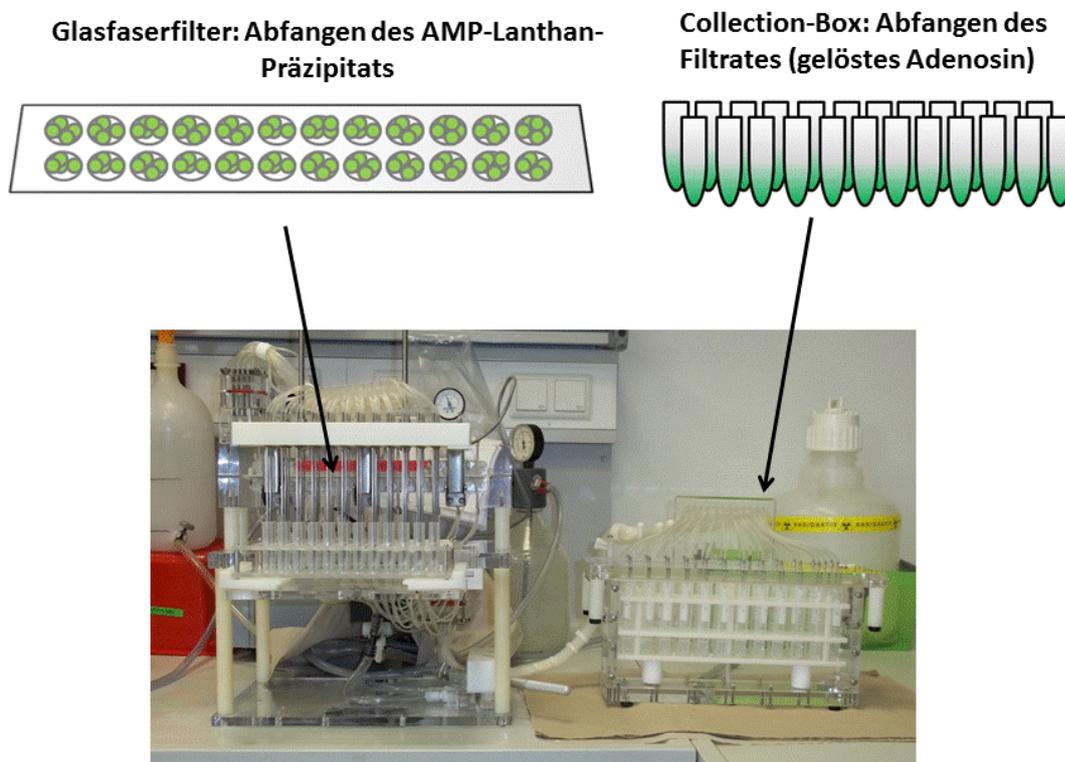


Abbildung 3.13: Foto der Collection-Box, sowie schematische Darstellung der Trennung von Substrat und Produkt durch Filtration.

Dies wurde zunächst im 24er Format durchgeführt und konnte später auch auf das 48er Format übertragen werden.

Nach Optimierung der Fällungsreaktion durch Anpassen der Konzentrationen des Fällungsreagenzien, sowie des pH-Wertes wurde der Assay in Hinblick auf spezifische

Aktivität, Enzym- und Substratkonzentration und Inkubationszeit untersucht und optimiert.

3.3.1 Kalibrierung des Testsystems

Obwohl wir durch die Optimierung der Fällungsreaktion einen signifikanten Unterschied zwischen reinem AMP und der Mischung AMP/Adenosin messen konnten haben wir dennoch deutlich gesehen, dass eine vollständige Ausfällung von AMP nicht möglich war und wir daher ein gewisses Background-Signal in Kauf genommen werden musste. Da sich dies auch auf die Empfindlichkeit des Testsystems auswirkt, war es notwendig die Kalibrierung des Testsystems mit [^3H]Adenosin in der Gegenwart von [^3H]AMP durchzuführen. Hierzu wurde eine fixe Konzentration von 5 μM [^3H]AMP eingesetzt, da dies der Substratkonzentration entsprach, die wir im weiteren Verlauf für den Assay einsetzen wollten. Für die Kalibrierung selbst wurden dann verschiedene Konzentrationen [^3H]Adenosin zwischen 3 μM und 0,01 μM eingesetzt und der Versuch wurde mit drei Verschiedenen spezifischen Aktivitäten der Radioligand-Lösungen durchgeführt.

Die Ergebnisse wurden mittels linearer Regression ausgewertet und die erhaltenen cpm-Werte wurden graphisch gegen die Adenosin-Konzentration aufgetragen.

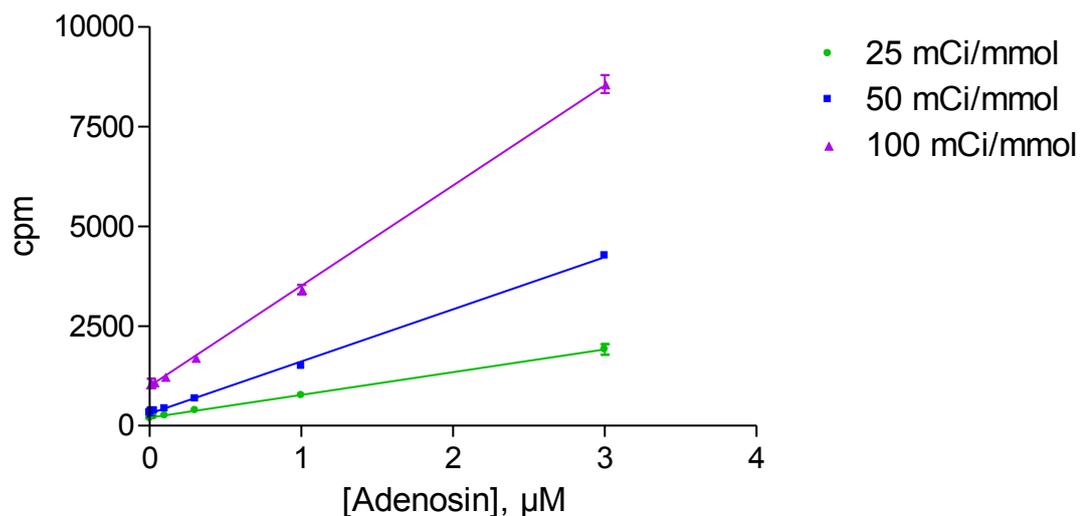


Abbildung 3.14: Vergleich der Kalibriergeraden unter Verwendung von Radioligand-Verdünnungen unterschiedlicher spezifischer Aktivitäten.

Der Vergleich der Kalibriergeraden zeigt, dass eine Erhöhung der spezifischen Aktivität eine deutliche Erhöhung der Steigung der Kalibriergerade zur Folge hat, daneben aber auch eine unerwünschte Zunahme der Backgroundsignale. Wie man anhand der LOD-Werte in Tabelle 3.1 erkennt, hat die Erhöhung der spez. Aktivität insgesamt einen positiven Effekt auf die Nachweisgrenze des Testsystems.

Tabelle 3.1: Nachweisgrenze für die jeweiligen spezifischen Aktivitäten

Spezifische Aktivität	Nachweisgrenze (LOD) [μM Adenosin]
25 mCi/mmol	0,07
50 mCi/mmol	0,03
100 mCi/mmol	0,03

Die Verwendung von Radioligand-Lösungen mit spezifischen Aktivitäten von 50 mCi/mmol bzw. 100 mCi/mmol zeigen dieselbe Nachweisgrenze. Zunächst wurde für den weiteren Verlauf eine spezifische Aktivität von 100 mCi/mmol gewählt, da diese ein besseres Messfenster verspricht.

3.3.2 Bestimmung der optimalen Enzymkonzentration

Die Bestimmung der optimalen Enzymkonzentration erfolgte analog der Optimierung des Malachitgrün-Assays. Da die cpm-Werte aus den drei verschiedenen Versuchen relativ stark schwanken, da sich bereits kleinste Unterschiede in der Verdünnung relativ stark in den Messwerten bemerkbar machen, wurden die Messwerte bezogen auf die eingesetzte Radioligand-Lösung normalisiert. Die so erhaltenen Werte wurden in einer linearen Regression gegen die Enzymkonzentration aufgetragen und ergaben eine Gerade der Gleichung $y = 9,75x + 0,0464$ mit einem Regressionskoeffizienten von $r^2 = 0,9978$.

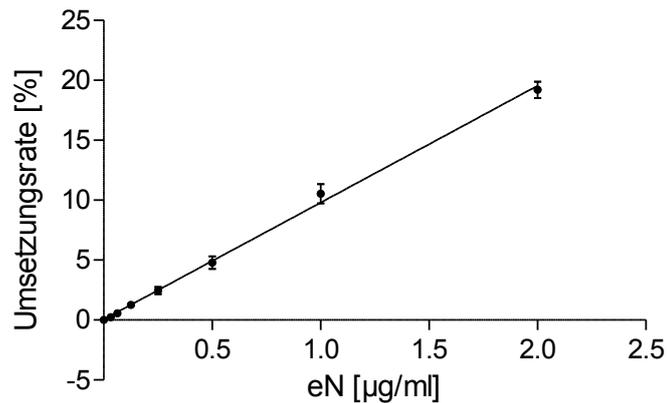


Abbildung 3.15: Lineare Regression zur Bestimmung der optimalen Enzymkonzentration

Auch für diesen Versuch wurde der LOD bestimmt, der sich zu 0,013 µg/ml Proteingehalt berechnet. Da die optimale Enzymkonzentration mindestens 20fach über dem berechneten LOD liegen sollte, wurde im weiteren Verlauf eine Enzymkonzentration von 0,3 µg/ml gewählt.

Ein weiterer wichtiger Parameter in Hinblick auf die optimale Enzymkonzentration ist der Z' -Faktor. Dieser wird für jede eingesetzte Enzymkonzentration berechnet und dient der Kontrolle für den optimalen Arbeitsbereich, der durch den LOD bestimmt wurde. Der Z' -Faktor sollte für die ausgewählte Konzentration in einem Bereich von 0,75 – 1 liegen, um ein gutes, robustes Messfenster sicher zu stellen. Die berechneten Werte sind in Abbildung 3.16 in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration graphisch dargestellt.

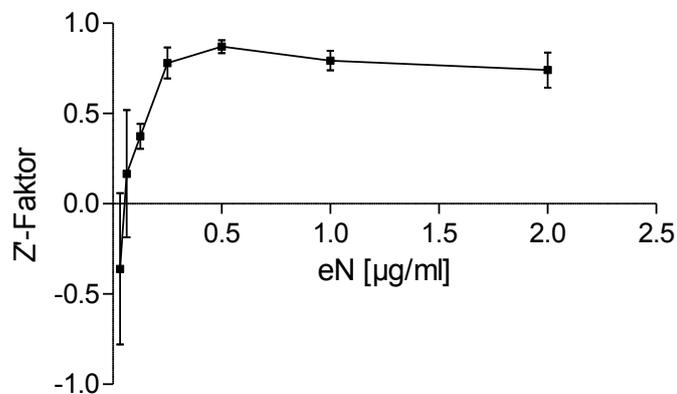


Abbildung 3.16: Graphische Darstellung des Z' -Faktors in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration

Diese Darstellung zeigt, dass der Z'-Faktor für Enzymkonzentrationen oberhalb von 0,25 µg/ml und damit auch die ausgewählte Enzymkonzentration von 0,3 µg/ml in einem geeigneten Bereich zwischen 0,75 und 0,9 liegt.

3.3.3 Enzymkinetik

Die Enzymkinetik wird aufgenommen, um auch für diese Methode sicher zu stellen, dass im linearen Bereich der Anfangsgeschwindigkeit gearbeitet wird. Für diesen Versuch wurde die vorher bestimmte Enzymkonzentration von 0,3 µg/ml und eine Substratkonzentration von 5 µM eingesetzt und die Umsatzrate bei verschiedenen Inkubationszeiten bis 60 Minuten bestimmt. Die gemessenen Counts wurden in Abhängigkeit der Inkubationszeit aufgetragen und mittels linearer Regression ausgewertet.

Da wir bei einer Umsatzrate zwischen 10 und 20% davon ausgehen können, dass wir in dem gewünschten linearen Bereich arbeiten, wurden simultan Adenosinkonzentrationen von 0,5 µM und 1,0 µM bestimmt und die gemessenen Counts in der Abbildung als rote Grenzlinien dargestellt.

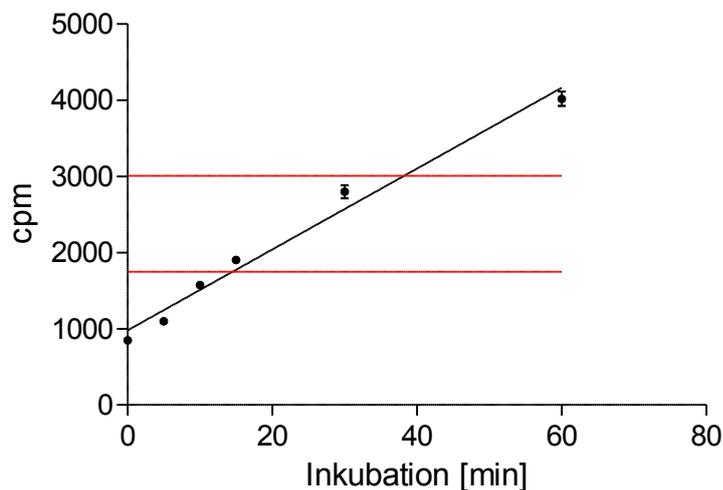


Abbildung 3.17: Enzymkinetik zur Anpassung der Inkubationszeit

Die Abbildung 3.17 zeigt die gewünschte Linearität der Enzymreaktion über den gesamten gemessenen Bereich. Die maximale Umsetzung von 20% wird bei einer Inkubation von etwa 35 Minuten erreicht, die Umsetzung von 10% bei etwa 15 Minuten. Für diesen Assay wurde daher eine optimale Inkubationszeit von 25 Minuten für alle weiteren Versuche übernommen.

3.3.4 Michaelis-Menten-Plot

Da der K_M -Wert, wie bereits erwähnt, in verschiedenen Testsystemen variieren kann, wurde auch mit dem radiometrischen Assay ein Michaelis-Menten-Plot zur Bestimmung dieses Wertes aufgenommen.

Durch die Umrechnung der Zerfälle pro Minute in die Aktivität der Probe lässt sich über die spezifische Aktivität der eingesetzten Radioligand-Lösung die erhaltene Adenosinkonzentration berechnen. Unter Einbeziehung der Enzymkonzentration und der Inkubationszeit kann hieraus die enzymatische Umsatzgeschwindigkeit (v) berechnet werden. Durch eine nichtlineare Regression der so erhaltenen Umsatzgeschwindigkeit gegen die Substratkonzentration lassen sich die Daten graphisch wie in Abbildung 3.18 als Sättigungskurve oder logarithmisch wie in Abbildung 3.19 als sigmoidale Kurve darstellen.

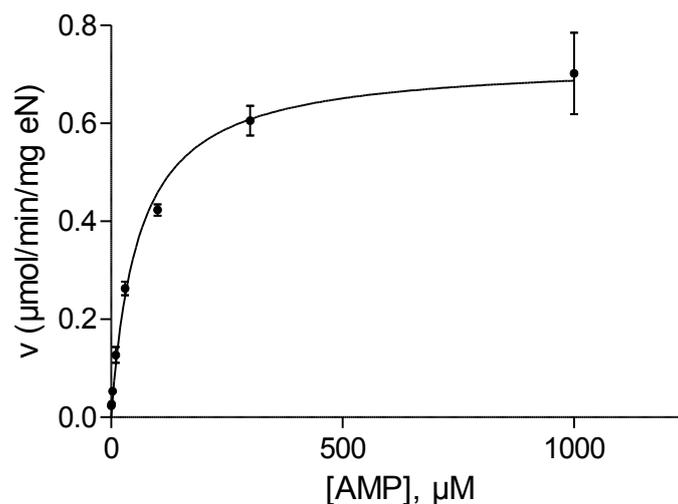


Abbildung 3.18: Michaelis-Menten-Plot zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante von Adenosin-5'-monophosphat

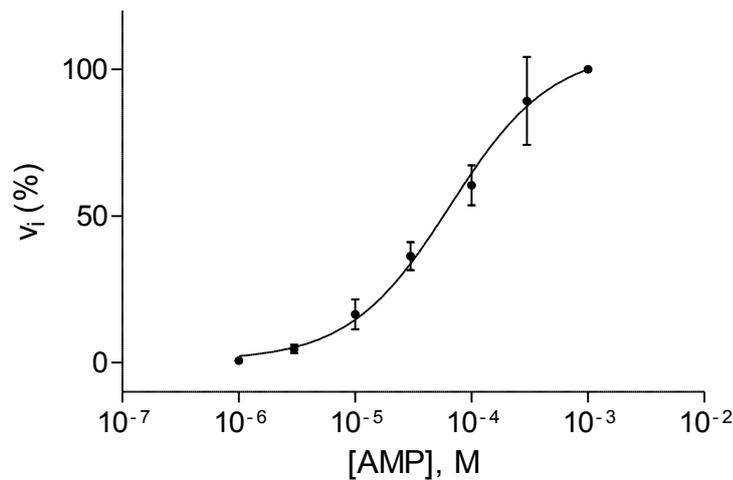


Abbildung 3.19: Logarithmische Darstellung des Michaelis-Menten-Plot zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante von Adenosin-5'-monophosphat

Für die Michaelis-Menten-Konstante ergibt sich ein Wert von $59 \pm 10 \mu\text{M}$. Dieser Wert ist im Vergleich zu dem K_M -Wert des Malachitgrün-Assays etwas höher, was sich mit der leicht veränderten Zusammensetzung des Assay-Puffers erklären lassen könnte. Vor allem der Zusatz von Phosphat könnte hier eine Rolle spielen, da es das Enzym im Rahmen einer Produkthemmung in höheren Konzentrationen in geringem Maße zu inhibieren vermag. Für diesen Assay ist das Phosphat jedoch für die Co-Präzipitation erforderlich. Da das Phosphat bei der Testung an der Präparation des Rattenenzym keinen großen Einfluss zeigte wurde das Phosphat hier weiterhin direkt dem Assaypuffer zugegeben. Bei empfindlicheren Präparationen (wie dem von uns ebenfalls verwendeten humanen Enzym) kann das Phosphat auch nach der Enzymreaktion, unmittelbar vor der Zugabe des Fällungspuffers zugegeben werden.

Unter der Voraussetzung, dass die optimale Substratkonzentration in einem Bereich von $0,1 \times K_M - 10 \times K_M$ liegen soll, wurde in weiteren Assay eine niedrige Substratkonzentration von $5 \mu\text{M}$ gewählt.

3.3.5 Z'-Faktor

Für die Validierung des Assays wurden dreimal je 24 Positiv- und Negativkontrollen aufgenommen. Die Positiv-Kontrollen sollen die vollständig gehemmte Reaktion

darstellen, daher wurde hier der Ansatz ohne Zugabe von Enzym gemessen und gibt somit das Background-Signal wieder, dass durch den nicht umgesetzten Radioliganden hervorgerufen wird. Dies war uns möglich, da wir bereits aus den Daten des Malachitgrün-Assay wussten, dass der Standardinhibitor AOPCP das Signal auf <1% Enzymaktivität und somit auf das Background-Signal senkt. Die Negativ-Kontrollen stellen die ungehemmte Enzymreaktion dar.

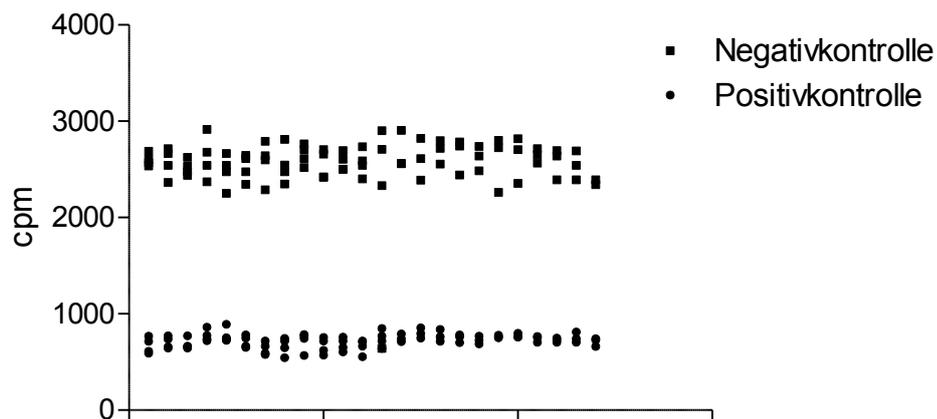


Abbildung 3.20: Graphische Darstellung der Verteilung von Negativ- und Positivkontrollen zur Validierung der Versuchsbedingungen

Die graphische Darstellung in Abbildung 3.20 zeigt ein gutes Messfenster unter den von uns verwendeten optimierten Bedingungen.

Der aus diesem Versuch berechnete Z' -Faktor ergibt einen Wert von 0,73 und weist damit ebenfalls auf eine gute Qualität und Robustheit des Assays hin.

3.3.6 Standard-Inhibitionskurven

Nach Abschluss der Assay-Optimierung und Validierung werden auch für diesen Assay Konzentrations-Inhibitionskurven der Standardinhibitoren AOPCP und ADP aufgenommen. Hierfür werden der Enzymreaktion verschiedene Konzentrationen an Inhibitor zwischen 100 μM und 0,001 μM zugesetzt und die resultierende Enzymaktivität bestimmt. Durch Normalisierung der Messwerte können diese als

prozentuale Aktivität der eN gegen die InhibitorKonzentration aufgetragen werden. Die graphische Darstellung erfolgt mittels nichtlinearer Regression.

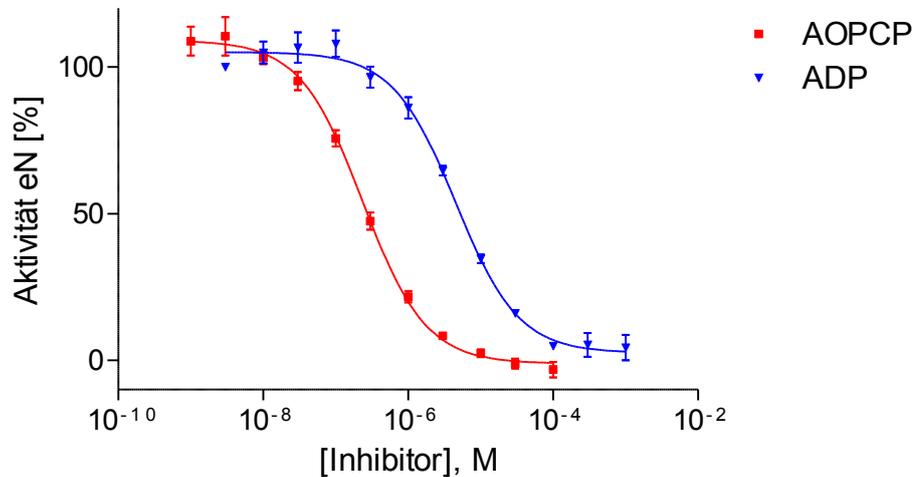


Abbildung 3.21: Konzentrations- Inhibitionskurve der Standardinhibitoren AOPCP und ADP

Aus den Inhibitionskurven ergeben sich IC_{50} -Werte von $0.236 \pm 0.006 \mu\text{M}$ für AOPCP und $4.66 \pm 0.13 \mu\text{M}$ für ADP. Daraus berechnen sich die K_i -Werte von $0.197 \pm 0.005 \mu\text{M}$ für AOPCP und $3.88 \pm 0.11 \mu\text{M}$ für ADP. Diese liegen in den in der Literatur beschriebenen Bereichen.^{53; 75; 155}

3.3.7 Optimierung der Bedingungen zur Verwendung einer humanen Präparation der Ecto-5'-Nucleotidase

Die Optimierung der Bedingungen in Bezug auf die Enzykonzentration und Substratkonzentration wurde analog zu der oben beschriebenen Vorgehensweise durchgeführt. Hierfür wurde eine Präparation der humanen Ecto-5'-Nucleotidase der Firma R&D-Systems verwendet. Bereits die ersten Versuche zeigten, dass diese Präparation deutlich empfindlicher und instabiler ist, wie die bisher verwendete Präparation des Rattenenzym. Auch zeigte sich hier eine höhere Empfindlichkeit gegen Phosphat als Inhibitor der Enzymaktivität, so dass bei den Versuchen mit dem humanen Enzym ein Assaypuffer ohne Phosphat verwendet wurde und dieses dann beim Beenden der Enzymreaktion unmittelbar vor der Zugabe des Assaypuffers hinzugefügt wurde.

Die Bestimmung der optimalen Enzymkonzentration ergab, nach der Bestimmung eines LOD von 0,001 $\mu\text{g/ml}$, eine Arbeitskonzentration von 0,025 $\mu\text{g/ml}$. Der mit dieser Enzymkonzentration durchgeführte Michaelis-Menten-Plot lieferte einen K_M -Wert von $50.2 \pm 8.3 \mu\text{M}$.

Die Empfindlichkeit dieser Enzympräparation macht es jedoch trotz Optimierung schwierig, gut reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Es scheint daher sinnvoll für weitere Testungen, zunächst eine andere, stabilere humane Präparation zu testen und zu optimieren.

3.3.8 Zusammenfassung

Die durchgeführten Experimente zur Optimierung des Versuchsaufbaus des radiometrischen eN-Assays für das Screening und die Charakterisierung von kompetitiven eN-Inhibitoren führte zu folgenden Parametern:

- Assaypuffer: Tris 25 mM / NaCl 140 mM, pH 7,4 (human);
Tris 25 mM / NaCl 140 mM / Phosphat 50 mM, pH 7,4 (Ratte)
- Substratkonzentration: 5 μM
- Enzymkonzentration: 0,3 $\mu\text{g/ml}$ (Ratte); 0,025 $\mu\text{g/ml}$ (human)
- Inkubationstemperatur: 37°C
- Inkubationszeit: 25 Minuten
- Fällungspuffer: Lanthan(III)chlorid 100 mM / Na Acetat 100 mM, pH 4,0

Auf diese Weise konnten wir einen sehr empfindlichen Assay mit einer Nachweisgrenze von 0,03 μM Adenosin etablieren. Mit dieser Nachweisgrenze ist der Assay etwa *30fach* empfindlicher als alle bisher beschriebenen Methoden, die maximal eine Nachweisgrenze von etwa 1 μM erreichen konnten. Hierdurch war es uns möglich, die eingesetzte Substratkonzentration deutlich zu reduzieren und so unterhalb des K_M -Wertes des Substrats zu arbeiten.

Durch die Optimierung der Fällungsreaktion konnten wir ein gutes Messfenster erreichen und das Background-Signal auf ein tolerierbares Level senken. Die Messungen zeigen, dass wir einen sehr robusten Assay erhalten konnten, der wenig

Schwankungen zeigt und sehr gut reproduzierbare Werte liefert. Dies spiegelt sich auch in einem guten Z' -Faktor wieder den wir über die Versuche bestimmen konnten und der im Schnitt bei 0,7 lag.

Die optimierte Methode stellt auf Grund der Robustheit und Einfachheit der Trennung von Substrat und Produkt ein gutes Verfahren für größere Screening-Kampagnen an der eN dar. Eine Limitierung dessen stellt bisher lediglich die Verfügbarkeit der Auffangeinheit für das Filtrat dar, die an den Zellharvester angeschlossen werden muss. Bisher war es leider nur möglich eine solche maximal im 48er Format zu erhalten. Sollte in der Zukunft eine entsprechende Auffangeinheit auch für 96er-Harvester zur Verfügung stehen, könnte der Assay im Mikrotiter-Plattenformat durchgeführt werden und somit noch besser in größeren Screening-Vorhaben eingesetzt werden. Ebenfalls würde sich dann die Möglichkeit bieten, die Methode auf einen Pipettierroboter zu übertragen.

Ein weiterer Vorteil gegenüber vielen bekannten Methoden zeigt sich darin, dass problemlos farbige Verbindungen untersucht werden können, da sie das Detektions-Prinzip nicht stören. Ebenfalls sollte die Verwendung von Membranpräparationen oder Zellen anstelle von gelöstem Enzym kein Problem für die Versuchsdurchführung darstellen.

4 Untersuchung einer Substanz-Bibliothek

4.1 Screening

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mithilfe des neu etablierten Radio-Assays, in einer kleineren Screening-Kampagne, eine Subbibliothek der institutseigenen Substanzbibliothek getestet. Hierbei handelte es sich um eine Bibliothek, die sich aus verschiedenartigen, meist mehrgliedrigen heteroaromatischen Verbindungen zusammensetzt, die im Arbeitskreis von Professor Herdewijn synthetisiert wurden und 321 Verbindungen umfasst.

Alle Verbindungen wurden im Radio-Assay bei einer Konzentration von 10 μM untersucht. Das Ergebnis dieses Screenings ist in Abbildung 4.1 graphisch dargestellt.

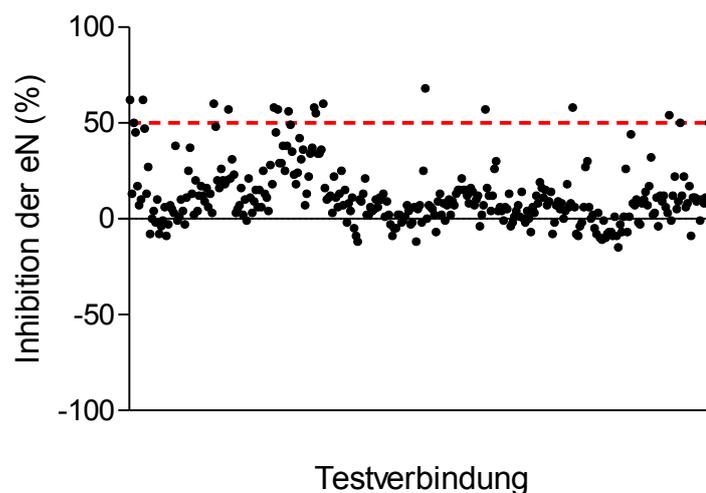


Abbildung 4.1: Ergebnis des Screenings einer Substanz Bibliothek an der eN. Die Enzyminhibition (%) wurde berechnet und graphisch dargestellt. Die gestrichelte Linie gibt die Treffergrenze für potente Verbindungen bei >50% Inhibition an.

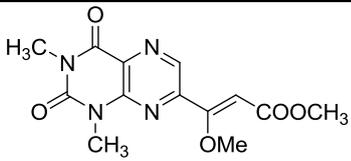
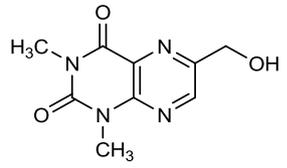
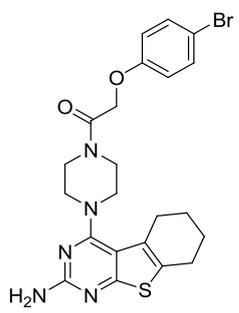
Der Grenzwert von 50 % Inhibition, oberhalb dessen eine Verbindung als Treffer definiert wurde, ist in Abbildung 4.1 als gestrichelte Linie dargestellt. Mithilfe dieses Screenings konnten von den 321 getesteten Verbindungen 14 als Treffer identifiziert werden. Dies bedeutet eine Treffer-Rate von 4,4 %. Das hier durchgeführte Einpunktscreening wurde noch zweimal wiederholt, um ein möglichst valides und

reproduzierbares Ergebnis zu gewährleisten. Bei den in diesem Screening identifizierten Treffern handelt es sich um die Verbindungen **1-13** mit Inhibitionswerten zwischen 54% und 68% bei einer hier eingesetzten Endkonzentration von 10 μM . Die Treffer wurden im Folgenden näher charakterisiert.

4.2 Konzentrations-Inhibitions-Kurven

Für die potentesten Testverbindungen wurden Konzentrations-Inhibitionskurven aufgenommen. Die aus den Kurven ermittelten IC_{50} -Werte sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

Tabelle 4.1: Inhibitorische Aktivitäten der potentesten Testverbindungen der Substanz-Bibliothek

Testverbindung		$\text{IC}_{50} \pm \text{SEM}$ [μM]
1 PZB08511001A		5.77 \pm 1.01
2 PZB08511008A		9.04 \pm 1.32
3 PZB08511049A		10.7 \pm 2.0

4	PZB08511057A		13.0 ± 4.3
5	PZB08511082A		11.7 ± 2.7
6	PZB08511084A		11.3 ± 1.7
7	PZB08511090A		12.1 ± 3.4
8	PZB08511104A		10.7 ± 1.0
9	PZB08511105A		15.1 ± 4.4

10	PZB08511109A		12.8 ± 2.0
11	PZB08511180A		4.90 ± 0.88
12	PZB08511225A		22.6 ± 1.5
13	PZB08511279A		7.63 ± 0.66

Die hier näher untersuchten Verbindungen zeigen alle eine relativ gute inhibitorische Aktivität zwischen 4.90 μM und 22.6 μM . Sie zeigen damit eine vergleichbare Potenz wie bisher beschriebene, nicht-nucleotidische Inhibitoren. Aufgrund der schlechten Löslichkeit dieser Verbindungen war es jedoch notwendig die Kurven teilweise zu extrapolieren, da einige der Verbindungen bereits bei einer Endkonzentration von 100 μM ausfallen und daher in höheren Konzentrationen nicht eingesetzt werden konnten.

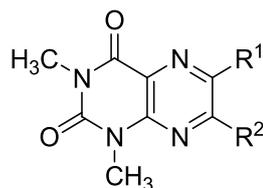
4.3 Struktur-Wirkungs-Beziehungen

Bei Betrachtung der Ergebnisse des Screenings, sowie der IC_{50} -Werte zeigen vor allem zwei Verbindungsklassen mehrere aktive Verbindungen. Hierbei handelt es sich zum einen um N,N-Dimethylumazin-Derivate und zum anderen um bityklische Heterozyklen, die sich von Pyrimidin-2-amin ableiten. Für diese beiden Verbindungsklassen lassen sich erste, vorsichtige Struktur-Wirkungs-Beziehungen ableiten.

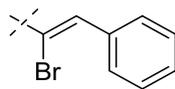
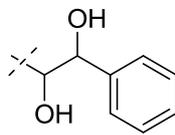
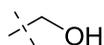
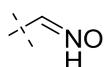
4.3.1 N,N-Dimethylumazin-Derivate

Die prozentualen Inhibitionswerte sowie IC_{50} -Werte, der für die Diskussion relevanten Verbindungen sind in Tabelle 4.2 aufgeführt.

Tabelle 4.2: Inhibitorische Aktivität der potenten N,N-Dimethyl-2,4(1*H*, 3*H*)-pteridindion-Derivate



	R^1	R^2	% Inhibition \pm SEM bei 10 μ M ($IC_{50} \pm$ SEM)
1 PZB08511001A	H		62 \pm 9 (5.77 \pm 1.01 μM)
14 PZB08511002A		H	13 \pm 12
15 PZB08511003A		H	50 \pm 3

16 PZB08511004A	H		45 ± 5
17 PZB08511005A	H		17 ± 1
2 PZB08511008A		H	62 ± 4 (9.04 ± 1.32 μM)
18 PZB08511009A		H	47 ± 7

Die hier untersuchten Verbindungen lassen darauf schließen, dass aliphatische, polare Reste sowohl in Position 6, als auch in Position 7 gegenüber aromatischen Resten bevorzugt sind. Aufgrund der hier vorliegenden Ergebnisse kann keine bevorzugte Position für die Substitution benannt werden, es scheinen Substitutionen in Position 6 wie 7 gleichermaßen toleriert zu werden. Darüber hinaus kann vermutet werden, dass eine Einführung konjugierter Doppelbindungen in die aliphatische Kette die Potenz zu verbessern vermag (Verbindung **1** erwies sich mit einem IC₅₀-Wert von 5.77 μM als bestes Derivat mit aliphatischem Rest und **16** mit einem Inhibitionswert von 45% als das beste Derivat mit aromatischem Rest).

Die hier beschriebenen Vermutungen zur Struktur-Wirkungs-Beziehung sind in Abbildung 4.2 zusammengefasst.

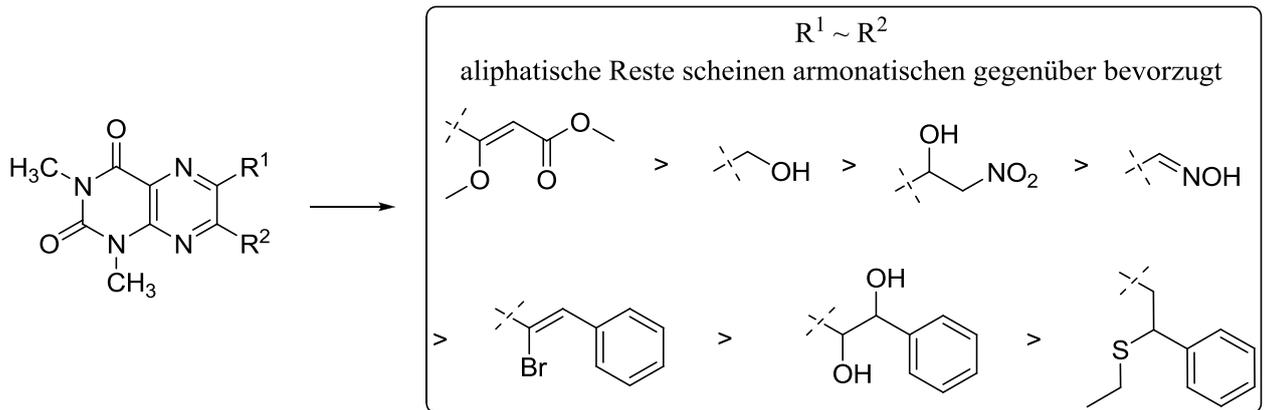


Abbildung 4.2: Erste Struktur-Wirkungs-Beziehungen der N,N-Dimethyluracil-Derivate an der eN

Aufgrund der geringen Anzahl der untersuchten Verbindungen sind jedoch nur die sehr eingeschränkten aufgeführten Struktur-Wirkungs-Beziehungen möglich. Um diese Vermutungen zu bestätigen und weiter auszubauen, bedarf es jedoch der Untersuchung weiterer strukturell verwandter Derivate.

Da die hier aktiven Verbindungen strukturell an Xanthine erinnern, könnte der nächste Schritt, neben der Untersuchung weiterer N,N-Dimethyluracil-Derivate, auch eine Untersuchung der im Haus zur Verfügung stehenden Xanthin-Bibliothek sein, die sich aus rund 500 Verbindungen zusammensetzt.

4.3.2 Bicyklische Pyrimidin-2-amin-Derivate

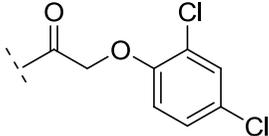
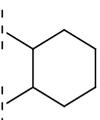
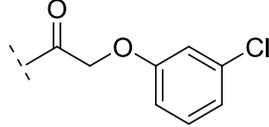
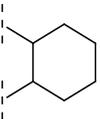
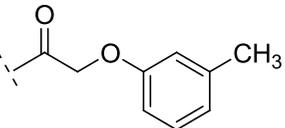
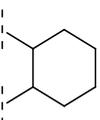
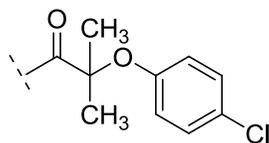
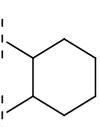
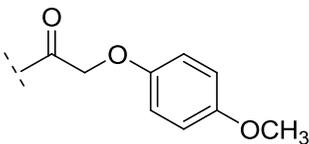
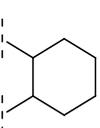
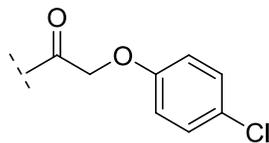
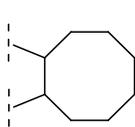
Da acht der vierzehn in diesem Projekt identifizierten Treffer in die Strukturklasse der bicyklischen Pyrimidin-2-amin Derivate einzuordnen sind, wurden alle in diesem Projekt untersuchten Derivate dieser Klasse genauer betrachtet. Die prozentualen Inhibitionswerte sowie IC₅₀-Werte der für die Diskussion relevanten Verbindungen sind in Tabelle 4.3 zusammengefasst.

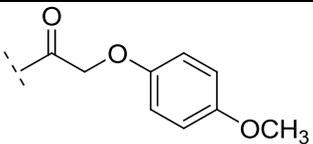
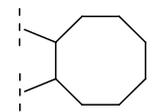
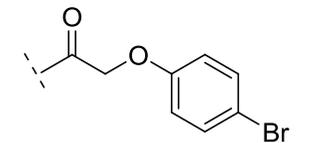
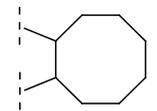
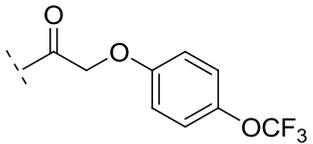
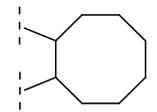
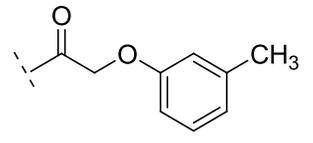
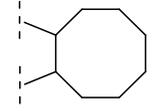
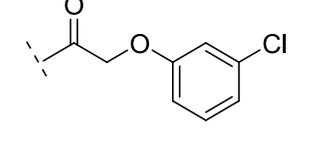
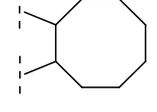
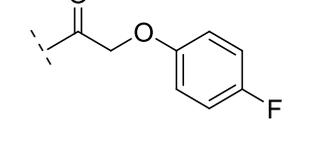
Aufgrund der schlechten Löslichkeit dieser Verbindungen in Wasser war es notwendig, die zu untersuchenden Verbindungen direkt aus DMSO zu pipettieren, ohne zunächst eine 10% ige Verdünnung herzustellen. Das daraus resultierende geringe Pipettiervolumen von 1 µl und die teils schlechte Löslichkeit führten zu relativ starke

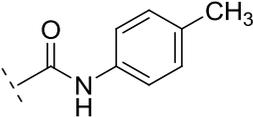
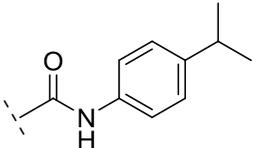
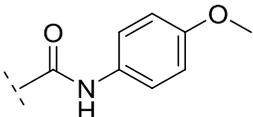
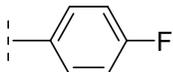
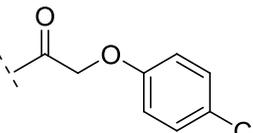
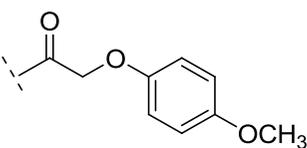
Schwankungen zwischen den Einzelwerten einiger Verbindungen, die sich in den in Tabelle 4.3 angegebenen Standardabweichungen widerspiegeln. Obwohl im Rahmen dieses Projektes 38 Verbindungen dieser Strukturklasse untersucht wurden, sind (auch aufgrund der beschriebenen Schwankungen) Struktur-Wirkungs-Beziehungen nur sehr eingeschränkt möglich. Um die im Folgenden dargelegten Vermutungen zu bestätigen und weiter auszubauen bedarf es daher der Untersuchung weiterer Derivate dieser Strukturklasse. Für deutliche Struktur-Wirkungs-Beziehungen wären darüber hinaus Verbindungen wichtig, die sich durch eine signifikant verbesserte inhibitorische Aktivität von den hier untersuchten Verbindungen abheben.

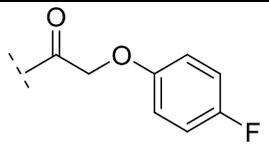
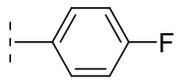
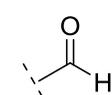
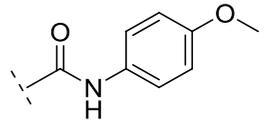
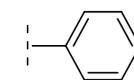
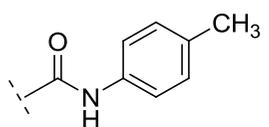
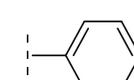
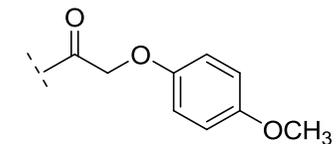
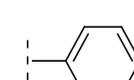
Tabelle 4.3: Inhibitorische Aktivität der potenten bicyklischen Pyrimidin-2-amin-Derivate

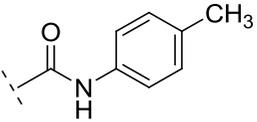
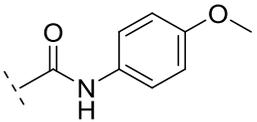
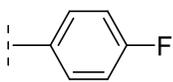
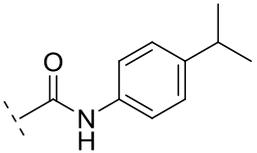
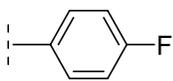
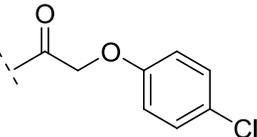
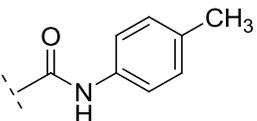
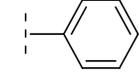
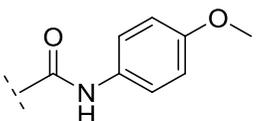
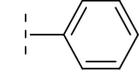
						%Inhibition ± SEM bei 10 μM (IC ₅₀ ±SEM)
	R ¹	R ²	R ³	X		
19 PZB08511010A				S	13 ± 2	
20 PZB08511011A				S	27 ± 18	
3 PZB08511049A				S	60 ± 6 (10.7 ± 2.0 μM)	

21 PZB08511050A			S	48 ± 7
22 PZB08511052A			S	16 ± 12
23 PZB08511053A			S	26 ± 22
24 PZB08511055A			S	18 ± 10
25 PZB08511056A			S	20 ± 17
4 PZB08511057A			S	57 ± 11 $(13.0 \pm 4.3 \mu\text{M})$

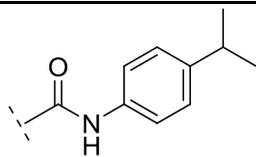
26 PZB08511058A			S	21 ± 10
27 PZB08511059A			S	31 ± 22
28 PZB08511060A			S	23 ± 12
29 PZB08511061A			S	3 ± 5
30 PZB08511062A			S	5 ± 4
31 PZB08511054A		H 	O	20 ± 21

32	H	H		N	25 ± 6
PZB08511088A					
33		H		N	38 ± 19
PZB08511089A					
7		H		N	56 ± 5
PZB08511090A					(12.1 ± 3.4 μM)
34		H		N	49 ± 20
PZB08511091A					
35		H		N	35 ± 10
PZB08511092A					
36		H		N	23 ± 25
PZB08511093A					

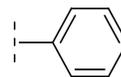
37 PZB08511094A		H		N	18 ± 4
38 PZB08511095A		H		N	24 ± 8
39 PZB08511096A		H		N	42 ± 16
40 PZB08511097A		H		N	31 ± 8
41 PZB08511098A		H		N	36 ± 7
42 PZB08511102A	H	H		O	34 ± 19

43 PZB08511103A		H		O	37 ± 16
8 PZB08511104A		H		O	58 ± 0 (10.7 ± 1.0 μM)
9 PZB08511105A		H		O	55 ± 11 (15.1 ± 4.4 μM)
44 PZB08511106A		H		O	34 ± 14
45 PZB08511107A		H		O	34 ± 15
46 PZB08511108A		H		O	36 ± 17

10
PZB08511109A



H

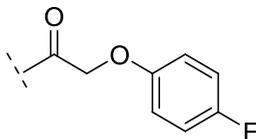


O

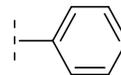
60 ± 5

(12.8 ± 2.0 μM)

47
PZB08511110A



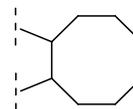
H



O

16 ± 12

48
PZB08511147A

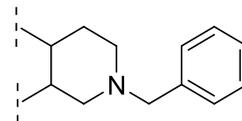


S

2 ± 7

11
PZB08511180A

H



S

68 ± 3

(4.90 ± 0.88 μM)

Die Betrachtung der in Tabelle 4.3 aufgeführten Verbindungen zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Heteroatomen des annelierten Fünfrings. Lediglich bei den Verbindungen **42** und **8** mit Inhibitionswerten von 34% und 58% (bzw. einem IC₅₀-Wert von 10.7 µM) zeigte Sauerstoff eine leichte Verbesserung gegenüber den äquivalenten Verbindungen **32** und **33** mit Stickstoff, die eine Inhibition von 25% respektive 49% zeigten. Ein direkter Vergleich mit Schwefel als Heteroatom ist hier leider nicht möglich, da keine der Verbindungen mit Sauerstoff oder Stickstoff die gleichen Reste an R²/R³ aufweisen.

Auch die Betrachtung der Reste R²/R³ zeigt keine deutliche Präferenz. Ein Vergleich von Cyclohexan und Cycloheptan lässt vermuten, dass Cyclohexan minimal besser toleriert wird. Dies zeigt sich in dem Vergleich der Verbindungen **3** (Inhibition von 60% bzw. einem IC₅₀-Wert von 10.7) und **27** (Inhibition von 31%), **22** (16% Inhibition) und **30** (5% Inhibition) sowie **22** (26% Inhibition) und **29** (3% Inhibition). Bei den Verbindungen **25** und **26** lässt sich kein Unterschied feststellen (20% ~ 21%) und bei den Verbindungen **20** und **4** sieht man den umgekehrten Fall, bei dem Cycloheptan mit 57 % Inhibition bzw. einem IC₅₀-Wert von 13.0 µM eine bessere inhibitorische Aktivität zeigt als Cyclohexan mit einer Inhibition von lediglich 27%. Auch der Vergleich von 4-Fluorphenyl und Phenyl in Position R³ zeigt leider keine durchgängige Verstärkung der Aktivität durch die Einführung des Fluorsubstituenten. Diese ist lediglich bei Verbindung **8** mit einem IC₅₀-Wert von 10.7 µM (58% Inhibition) gegenüber Verbindung **46** mit einer Inhibition von 36% zu erkennen. Im Gegensatz dazu führte die Einführung des Fluorsubstituenten in Verbindung **9** mit einem IC₅₀-Wert von 15.1 µM eine leichte Verschlechterung der inhibitorischen Aktivität gegenüber **10** mit einem IC₅₀-Wert von 12.8 µM. Eine relativ deutliche Verbesserung der inhibitorischen Aktivität erkennt man jedoch bei Verbindung **11** durch Einführung eines annelierten N-Benzylpiperidin-Rings in Position R²/R³, die mit einem IC₅₀-Wert von 4.90 µM als die beste Verbindung dieser Bibliothek identifiziert werden konnte. Die Verbindungen **32** und **42** zeigen im Vergleich dazu nur eine Inhibition von 25% bzw. 34%. Da jedoch nur diese eine Verbindung mit diesem Rest untersucht wurde, wäre die Untersuchung weiterer entsprechender Derivate notwendig, um diese Beobachtung zu bestätigen. Da Verbindung **11** an Position R¹ unsubstituiert ist, wären vor allem Derivate interessant, die in dieser Position einen aromatischen Rest aufweisen.

Bei den bisher untersuchten Verbindungen konnte eine Substitution der Position R¹ bei den Verbindungen **7**, **34**, **8** und **9** die Aktivität gegenüber der unsubstituierten Verbindung **32** deutlich verbessern. Besonders gut toleriert werden in dieser Position offenbar der 4-Isopropylphenyl-1-carboxamid-Rest (**7** mit IC₅₀ = 12.1 μM und **9** mit IC₅₀ = 15.1 μM) sowie der 4-Methoxyphenyl-1-carboxamid-Rest (**34** mit 49% Inhibition und **8** mit IC₅₀ = 10.7 μM). Andere Reste zeigten in dieser Position keinen Effekt oder wie im Falle des 2-(4-Fluorphenoxy)acetyl-Restes (**37**, **47**) eine leichte Verschlechterung gegenüber den nicht substituierten Verbindungen (**32**, **42**) mit einer Abnahme von 25% Inhibition auf 18% und von 34% auf 16%. Da bei den Verbindungen mit Cyclohexan oder Cycloheptan-Ring kein Derivat mit unsubstituierter Position R¹ untersucht wurde, konnten hier nur die entsprechenden Reste untereinander verglichen werden, wobei 4-Halogen-Phenylsubstituenten offenbar besonders gut toleriert werden. Dies zeigt sich vor allem in den Verbindungen **3** mit einem IC₅₀-Wert von 10.7 μM und **4** mit einem IC₅₀-Wert von 13.0 μM. Diese beiden Verbindungen repräsentieren damit die besten Verbindungen der Cyclohexan/Cycloheptan-substituierten Derivate.

Eine grobe Zusammenfassung dieser ersten Struktur-Wirkungsbeziehungen ist in Abbildung 4.3 dargestellt.

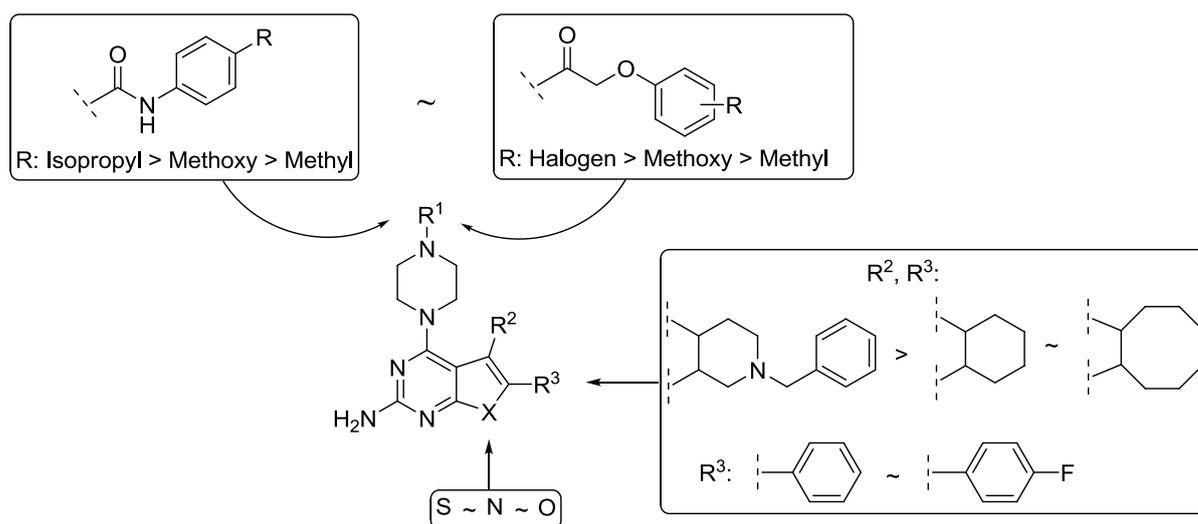


Abbildung 4.3: Zusammenfassung der Struktur-Wirkungs-Beziehungen der bicyklischen Pyrimidin-2-amin-Derivate an der eN

4.4 Zusammenfassung

Im Rahmen des in diesem Kapitel beschriebenen Projektes konnte mit dem im Vorfeld etablierten und optimierten Radio-Assay eine kleinere Screening-Kampagne durchgeführt werden, bei der 14 Treffer identifiziert werden konnten, die eine Inhibition von mehr wie 50% bei einer Endkonzentration von 10 μ M zeigten. Diese 14 Treffer konnten weiterhin anhand von Konzentrations-Inhibition-Kurven näher charakterisiert werden.

Die ermittelten Inhibitions- und IC_{50} -Werte deuteten nach näherer Betrachtung vor allem auf zwei Strukturklassen hin, die jeweils mehrere aktive Verbindungen aufzeigten und somit erste, vorsichtige Aussagen über Struktur-Wirkungs-Beziehungen zuließen. Bei diesen beiden Klassen handelt es sich um N,N-Dimethylumazin-Derivate und zum anderen um bizyklische Pyrimidin-2-amin-Derivate.

Die weiteren identifizierten Treffer ließen bisher keine weiteren Aussagen über Struktur-Wirkungs-Beziehungen zu, da zu wenige strukturell verwandte Verbindungen getestet wurden und diese lediglich geringe oder keine inhibitorische Aktivität zeigten.

Um eine gute Leitstruktur für die Optimierung von eN-Inhibitoren zu finden bedarf es jedoch noch weiterer Untersuchungen, sowie einer Vertiefung der Struktur-Wirkungs-Beziehungen.

Ein weiterer Schritt könnte die Untersuchung der im Arbeitskreis vorhandenen Xanthin-Bibliothek darstellen, da diese den hier identifizierten N,N-Dimethylumazin-Derivaten strukturell ähneln.

5 Untersuchung von α,β -Methylen-ADP-Derivaten als Inhibitoren der Ecto-5'-Nucleotidase

Im Rahmen dieser Arbeit wurden von Sanjay Bhattarai synthetisierte Verbindungen untersucht, die sich von Adenosin-5'-[α,β -metylen]-diphosphat (AOPCP), dem bisher potentesten, bekannten Inhibitor der eN, ableiten. Die Struktur des AOPCP ist in Abbildung 5.1 dargestellt: Die Verbindung ist ein Analoges des Adenosin-5'-diphosphats (ADP), in dem das verbrückende Sauerstoffatom des Diphosphat-Restes gegen eine Methylengruppe ausgetauscht wurde.

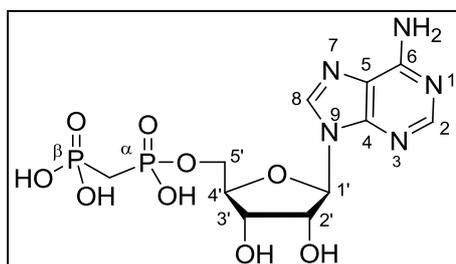


Abbildung 5.1: AOPCP als Leitstruktur für die Entwicklung neuer, potenter und selektiver eN-Inhibitoren

ADP selbst zeigt, wie bereits erwähnt, in vitro eine inhibitorische Aktivität im mikromolaren Konzentrationsbereich ($K_i = 3.88 \mu\text{M}$). Der Einsatz als Inhibitor gestaltet sich in vivo jedoch als schwierig, da es im Körper schnell enzymatisch abgebaut wird. Die Einführung der Methylengruppe im AOPCP konnte die inhibitorische Aktivität gegenüber der eN im Vergleich zu ADP um den Faktor 20 steigern, darüber hinaus wurde vor allem auch eine deutlich verbesserte metabolische Stabilität der Verbindung erreicht werden. Da das Grundgerüst des AOPCP noch viele Veränderungen zulässt, stellt die Verbindung eine hervorragende Leitstruktur dar. Die hier untersuchten Derivate zeigen Substitutionen an den Positionen 2, 6, 8 und N^6 sowie Substitutionen an der Ribose- und dem Phosphat-Rest.

Die Aktivität der Verbindungen wurde mit Hilfe des beschriebenen radiometrischen eN-Assays bestimmt.

5.1 AOPCP-Derivate mit Substitution in Position 2

Eine Substitution in Position 2 wird, mit Ausnahme der Verbindungen SB-627a und SB-690, grundsätzlich gut toleriert. Die Einführung der Halogensubstituenten Iod bzw. Chlor führten zu einer deutlichen Steigerung der inhibitorischen Aktivität. Mit den K_i -Werten von 15.1 nM bzw. 18.6 nM wurde eine *10fache* höhere Aktivität im Vergleich zu AOPCP erreicht. Auch schwefelhaltige Substituenten werden in dieser Position gut toleriert; so zeigte die Einführung des 2-Cyclohexylethylthio-Restes (SB-470a) mit einem K_i -Wert von 42.8 nM eine *5fache* Steigerung der Aktivität, die Einführung des 2-Allylthio-Restes (SB-417a) mit einem K_i -Wert von 65.7 nM eine *3fache* Steigerung. Die Einführung kleiner, stickstoffhaltiger Substituenten konnte die inhibitorische Aktivität verdoppeln, wobei die Aminogruppe (SB-676a, $K_i = 90.6$ nM) dem Hydrazin-Rest (SB-646a $K_i = 116$ nM) leicht überlegen war. Die Einbindung der Aminogruppen in ein Ringsystem hingegen bewirkte eine *10fache* Verringerung der Aktivität, dies zeigte sich bei der Einführung des Piperazin-Rings (SB-627a) mit einem K_i -Wert von 2290 nM. Die Einführung einer Oxo-Gruppe (SB-690) führte ebenfalls zu einer Verringerung der Aktivität. Mit einem K_i -Wert von 326 nM ist dieser Effekt jedoch recht schwach ausgeprägt und die Aktivität im Vergleich zu AOPCP noch nicht einmal um den Faktor 2 verringert. Für einige der hier beschriebenen Verbindungen sind zur Veranschaulichung in Abbildung 5.2 Konzentrations-Inhibitionskurven dargestellt.

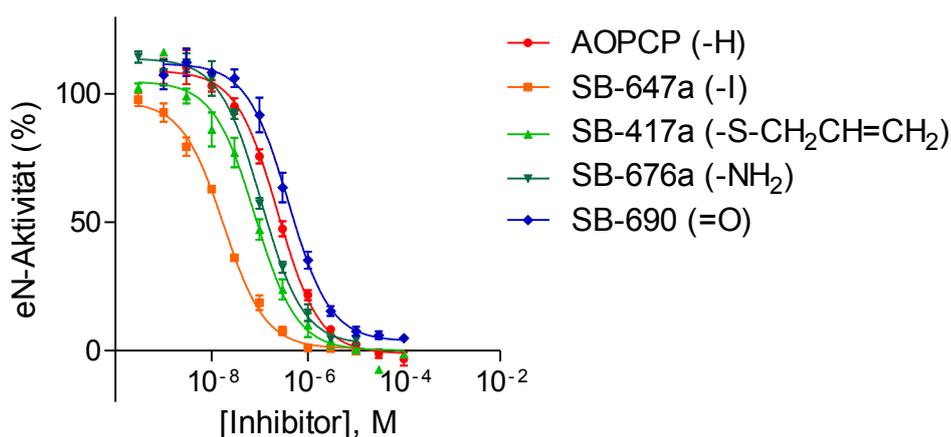
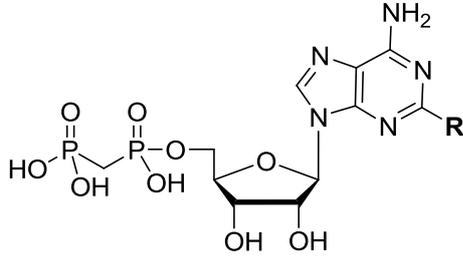
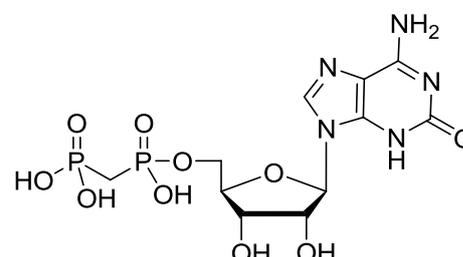
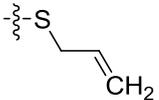
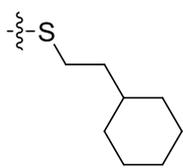
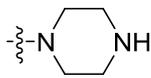
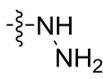


Abbildung 5.2: Ausgewählte Verbindungen der an Position 2 substituierten α,β -Methylen-ADP-Derivate. Der Einfluss der Substituenten auf die inhibitorische Aktivität gegenüber der eN kann mit der folgenden Reihenfolge angegeben werden: Iod (SB-647a, $K_i = 15.1 \pm 1.2$ nM) > 2-Allylthio (SB-417a, $K_i = 65.7 \pm 5.6$ nM) > Amino (SB-676a, $K_i = 90.6 \pm 7.3$ nM) > H (AOPCP) ($K_i = 197 \pm 5$ nM) > Oxo (SB-690, $K_i = 326 \pm 42$ nM).

Insgesamt wurden acht an Position 2 substituierte Derivate untersucht. Die ermittelten Aktivitäten sind zusammenfassend noch einmal in Tabelle 5.1 aufgelistet.

Tabelle 5.1: Aktivitäten der an Position 2 substituierten α,β -Methylen-ADP-Derivate

Verbindung	R	$K_i \pm \text{SEM}$ [nM]
	 SB-407b - SB676a	
	 SB-690	
AOPCP	$\text{-}\xi\text{-H}$	197 \pm 5
49 (SB-407b)	$\text{-}\xi\text{-Cl}$	18.6 \pm 3.8
50 (SB-417a)		65.7 \pm 5.6
51 (SB-470a)		42.8 \pm 6.5
52 (SB-627a)		2290 \pm 237
53 (SB-646a)		116 \pm 18
54 (SB-647a)	$\text{-}\xi\text{-I}$	15.1 \pm 1.2
55 (SB-676a)	$\text{-}\xi\text{-NH}_2$	90.6 \pm 7.3
56 (SB-690)	siehe Strukturformel	326 \pm 42

5.2 AOPCP-Derivate mit Substitution in Position 8

Eine Substitution in Position 8 zeigt keinen deutlichen Vorteil, lediglich die Einführung eines Chlorsubstituenten (SB 386b) konnte mit einem K_i -Wert von 93,5 nM die Aktivität im Vergleich zu AOPCP verdoppeln. Alle anderen Derivate, die in dieser Position substituiert wurden, zeigten eine verschlechterte inhibitorische Aktivität. Hierbei wird noch am besten ein Bromsubstituent (SB 386c) toleriert, der die Aktivität mit einem K_i -Wert 491 nM lediglich um den Faktor 2 verringert. Durch die Einführung eines Aminomethyl-Restes zeigt die Verbindung SB 411b mit einem K_i -Wert von 1719 nM eine fast 10fach verringerte Aktivität und Verbindung 459b durch Einführung des Thioethyl-Rest mit einem K_i -Wert von 3612 nM sogar einen fast 20fachen Aktivitätsverlust. Diese Beobachtungen spiegeln sich in den Konzentrations-Inhibitionskurven wider, die in Abbildung 5.3 dargestellt sind.

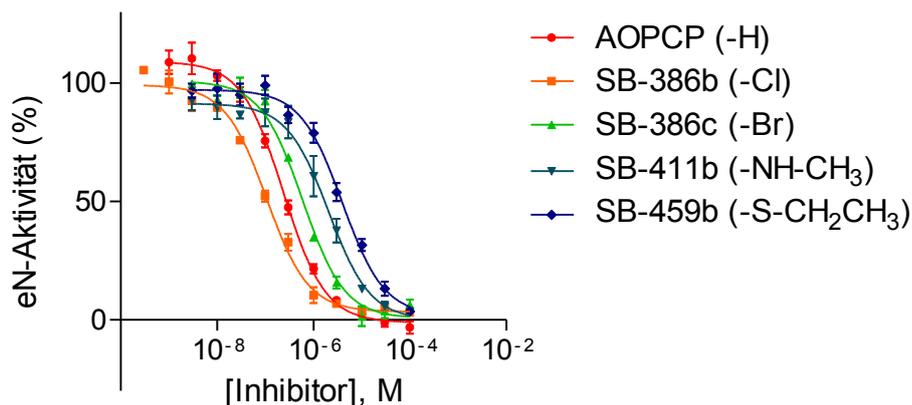


Abbildung 5.3: Konzentrations-Inhibitions-Kurven der in Position 8 substituierten α,β -Methylen-ADP-Derivate. Abgesehen von Verbindung SB-386b führt eine Substitution in dieser Position zu einer Aktivitätsminderung. Es ergibt sich hierfür folgende Reihenfolge: Chlor (SB-386b, $K_i = 93.5 \pm 4.5$ nM) > H (AOPCP) ($K_i = 197 \pm 5$ nM) > Brom (SB-386c, $K_i = 491 \pm 50$ nM) > Aminomethyl (SB-411b, $K_i = 1720 \pm 384$ nM) > Thioethyl (SB-459b, $K_i = 3610 \pm 576$ nM).

Insgesamt wurden vier an Position 8 substituierte Derivate untersucht. Die ermittelten Aktivitäten sind in Tabelle 5.2 noch einmal zusammengefasst.

Tabelle 5.2: Aktivitäten der an Position 8 substituierten α,β -Methylen-ADP-Derivate

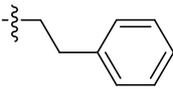
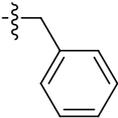
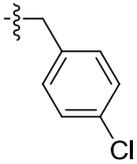
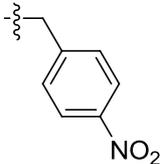
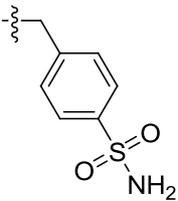
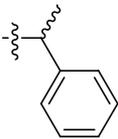
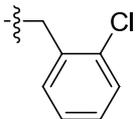
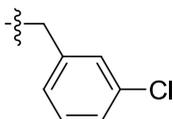
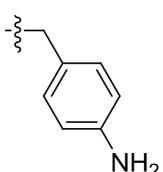
Verbindung	R	$K_i \pm \text{SEM}$ [nM]
AOPCP	-H	197 ± 5
57 (SB-386b)	-Cl	93.5 ± 4.5
58 (SB-386c)	-Br	491 ± 50
59 (SB-411b)	-NH	1720 ± 384
60 (SB-459b)	-S	3610 ± 576

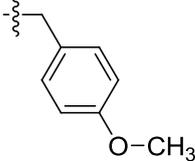
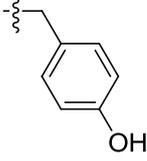
5.3 AOPCP-Derivate mit Substitution in Position N^6

Der N^6 -Stickstoff bietet eine sehr gute Möglichkeit für verschiedene Substitutionen. So wurden in dieser Position sowohl mono- als auch di-substituierte Derivate synthetisiert. Hierbei wurden zum einen kleinere Alkyl-Reste und zum anderen aromatische Reste eingeführt. Insgesamt wurden 20 an Position N^6 substituierte Derivate untersucht. Die ermittelten Aktivitäten sind in Tabelle 5.3 aufgelistet.

Tabelle 5.3: Aktivitäten der an Position N^6 substituierten α,β -Methylen-ADP-Derivate

Verbindung	R ¹	R ²	K _i ± SEM [nM]
AOPCP			197 ± 5
61 (SB-248b)			86.0 ± 19.1
62 (SB-282)			68.0 ± 5.1
63 (SB-305)			43.8 ± 0.3
64 (SB-318b)			104 ± 13
65 (SB-377a)			92.5 ± 8.5
66 (SB-379c)			9.03 ± 1.24
67 (SB-380b)			76.4 ± 5.0
68 (SB-415b)			36.8 ± 4.7
69 (SB-421)			23.6 ± 4.9

70 (SB-425a)	---H		8.04 \pm 2.24
71 (SB-437b)	---CH_3		4.64 \pm 0.23
72 (SB-441a)	---H		7.23 \pm 0.78
73 (SB-443a)	---H		17.6 \pm 1.5
74 (SB-450d)	---H		14.2 \pm 1.7
75 (SB-497b)	---H		3.39 \pm 0.59
76 (SB-555a)	---H		3.56 \pm 0.83
77 (SB-575a)	---H		8.18 \pm 3.85
78 (SB-597c)	---H		29.0 \pm 1.7

79 (SB-640d)			4.84 \pm 0.30
80 (SB-660b)			9.06 \pm 1.45

Eine Substitution der N^6 -Position führte in allen hier untersuchten Fällen zu einer Steigerung der inhibitorischen Aktivität gegenüber der Leitstruktur AOPCP. Monosubstitutionen in dieser Position zeigten, dass die Aktivität vor allem durch größere, hydrophobe Reste gesteigert werden kann.

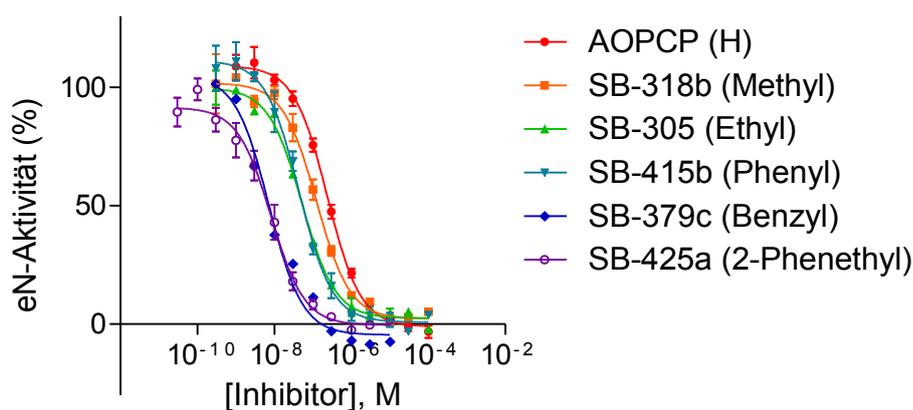


Abbildung 5.4: Konzentrations-Inhibitions-Kurven ausgewählter N^6 -Monosubstituierter α,β -Methylen-ADP-Derivate. Der Einfluss der Substituenten auf die inhibitorische Aktivität gegenüber der eN kann mit der folgenden Reihenfolge angegeben werden: 2-Phenethyl (SB-425a, $K_i = 8.04 \pm 2.24$ nM) > Benzyl (SB-379c, $K_i = 9.03 \pm 1.24$ nM) > Phenyl (SB-415b, $K_i = 36.8 \pm 4.7$ nM) > Ethyl (SB-305, $K_i = 43.8 \pm 0.3$ nM) > Methyl (SB-318b, $K_i = 104 \pm 13$ nM) > H (AOPCP) ($K_i = 197 \pm 5$ nM).

Die Einführung einer Methylgruppe (SB-318b) mit einem K_i -Wert von 104 nM verdoppelte die Aktivität gegenüber AOPCP, eine Ethylgruppe (SB-305) mit einem K_i -Wert von 43.8 nM verbesserte die Aktivität bereits um einen Faktor von etwa 4,5. Die Einführung aromatischer Reste konnte die Aktivität weiterhin steigern, wobei eine Verlängerung der Kette zum aromatischen Rest mit einer Aktivitätszunahme einherging.

So vermag ein Phenyl-Rest (SB-415b) mit einem K_i -Wert von 36.8 nM die Aktivität um den Faktor 5,5 zu steigern, ein Benzyl-Rest (SB-379c) mit einem K_i -Wert von 9.03 nM um den Faktor 20 und ein 2-Phenethyl-Rest (SB-425a) mit einem K_i -Wert von 8.04 nM sogar um den Faktor 25. Zur Veranschaulichung wurden in Abbildung 5.4 Konzentrations-Inhibitions-Kurven einiger ausgewählter Mono-substituierter N^6 -Derivate dargestellt.

Eine Substitution des eingeführten Benzylrestes zeigt wenig Einfluss auf die Aktivität. Lediglich die Einführung einer *p*-Methoxygruppe in (SB-640d) mit einem K_i -Wert von 4.84 nM oder die Einführung eines Chlorsubstituenten in *ortho*-Position (SB-555a) mit einem K_i -Wert von 3.56 nM, in *meta*-Position (SB-575a) mit einem K_i -Wert von 8.18 nM oder in *para*-Position (SB-441a) mit einem K_i -Wert von 7.23 nM zeigten eine geringe Verbesserung der inhibitorischen Aktivität gegenüber dem unsubstituierten Benzylrest. Die Einführung einer Hydroxygruppe in *para*-Position (SB-660b) zeigt mit einem K_i -Wert von 9.06 nM keine Veränderung der Aktivität. Die Einführung einer Sulfonamid-Gruppe (SB-450d) verringert mit einem K_i -Wert von 14.2 nM die Aktivität leicht, ebenso wie die Einführung einer Nitro-Gruppe (SB-443a) mit einem K_i -Wert von 17.6 nM oder einer Aminogruppe (SB-597c) mit einem K_i -Wert von 29.0 nM.

Neben den monosubstituierten Verbindungen wurden auch disubstituierte Verbindungen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass lediglich die Einführung einer Methylgruppe als zweiter Substituent zu einer Verbesserung der Aktivität führt. Dies steigerte im Falle der bereits methylsubstituierten Verbindung SB-248b mit einem K_i -Wert von 86.0 nM die Aktivität gegenüber SB 318b um den Faktor 1,5. Bei der ethylsubstituierten Verbindung (SB-421) mit einem K_i -Wert von 23.6 nM, sowie bei der benzylsubstituierten Verbindung (SB-437b) mit einem K_i -Wert von 4.64 nM konnte die Einführung einer Methylgruppe als Zweitsubstituent die Aktivität verdoppeln. Größere Reste hingegen verschlechterten die Aktivität. Bereits die Einführung eines Ethylrestes als Zweitsubstituent erniedrigte die Aktivität. Im Fall der bereits einfach ethylsubstituierten Verbindung (SB-399c) mit einem K_i -Wert von 68.0 nM verringerte sich die Aktivität um den Faktor 1,5. Im Fall der benzylsubstituierten Verbindung (SB-380b) mit einem K_i -Wert von 76.4 nM sogar um den Faktor 8,5. Die Einführung eines zweiten Benzylrestes in die bereits einfach benzylsubstituierte Verbindung (SB-377a) führte mit einem K_i -Wert von 92.5 nM sogar zur Verschlechterung der Aktivität um den Faktor 10. Der Einfluss eines

Zweitsubstituenten in N^6 -Position auf das Benzyl-Derivat (SB-379c) ist in Abbildung 5.5 anhand der Konzentrations-Inhibitions-Kurven dargestellt.

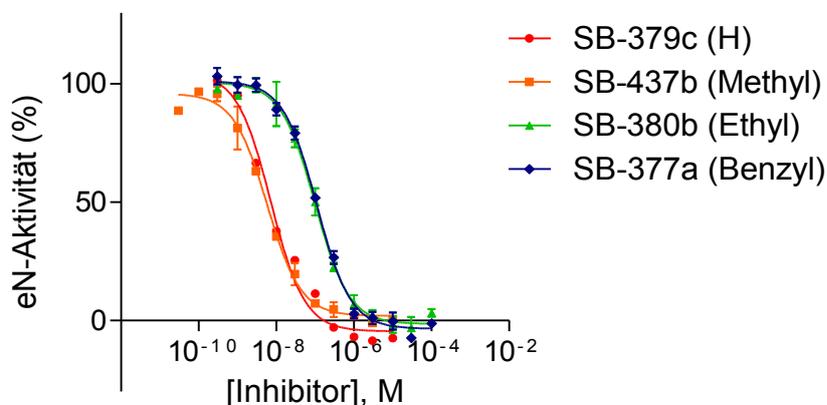


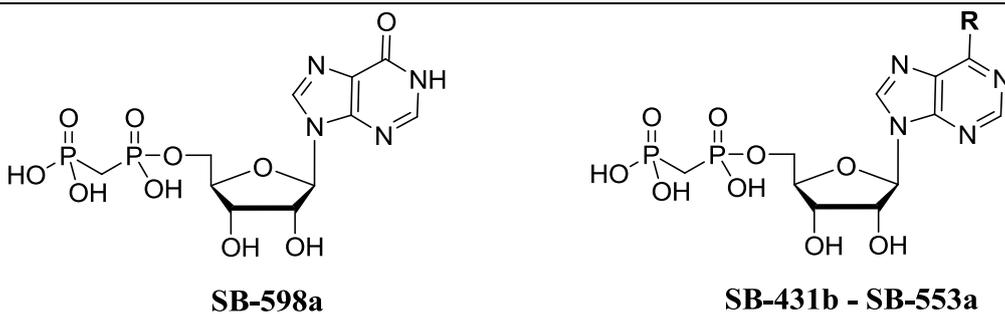
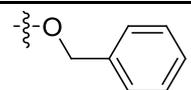
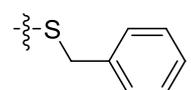
Abbildung 5.5: Konzentrations-Inhibitions-Kurven von N^6 -Benzyl-Derivaten mit unterschiedlichen Zweitsubstituenten. Die Einführung einer Methylgruppe (SB-437b, $K_i = 4.64 \pm 0.23$ nM) zeigt eine leichte Verbesserung gegenüber dem mono-substituierten Derivat (SB-379c, $K_i = 9.03 \pm 1.24$ nM), größere Zweitsubstituenten wie Ethyl (SB-380b, $K_i = 76.4 \pm 5.0$ nM) oder Benzyl (SB-377a, $K_i = 92.5 \pm 8.5$ nM) verringern die inhibitorische Aktivität deutlich.

5.4 AOPCP-Derivate mit Substitution in Position 6

Insgesamt wurden fünf an Position C6 substituierte Derivate, die keinen Amino-Rest tragen, untersucht. Die ermittelten Aktivitäten sind in Tabelle 5.4 aufgelistet.

Ein Austausch der Amino-Gruppe an C6 zeigte für das 6-Chlorpurin-Nucleotid (SB-449d) mit einem K_i -Wert von 157 nM keine signifikant veränderte inhibitorische Aktivität im Vergleich zu AOPCP, wohingegen das Inosin-Nucleotid (SB-598a) mit einem K_i -Wert von 2830 nM eine deutlich verringerte Aktivität aufwies. Dies könnte sich mit dem Verlust des aromatischen Zustandes erklären, der bei dem Übergang in das entsprechende Tautomer stattfindet. Eine weitere Variation in dieser Position war der Austausch des Stickstoff-Atoms gegen ein Sauerstoff- oder Schwefelatom.

Tabelle 5.4: Aktivitäten der an Position 6 substituierten α,β -Methylen-ADP-Derivate

		
Verbindung	R	$K_i \pm \text{SEM}$ [nM]
81 (SB-431b)		9.20 \pm 0.52
82 (SB-448b)		32.0 \pm 4.1
83 (SB-449d)		157 \pm 9
84 (SB-553a)		9.50 \pm 1.79
85 (SB-598a)	siehe Strukturformel	2830 \pm 421

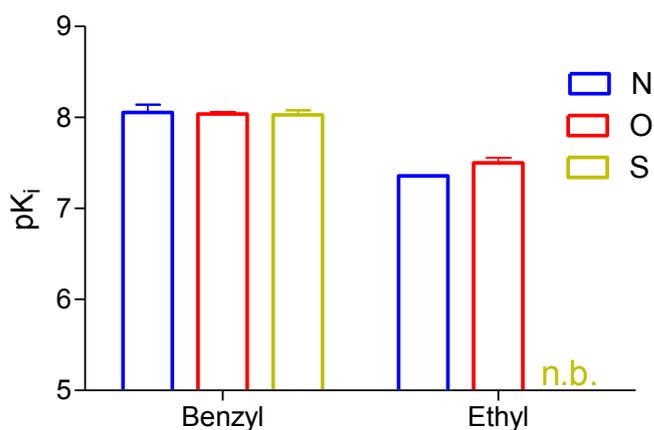

Abbildung 5.6: Graphische Darstellung der pK_i -Werte ausgewählter, an Position 6 substituiertes α,β -Methylen-ADP-Derivate. Eine Substitution des Stickstoffes gegen Sauerstoff oder Schwefel hat keinen Einfluss auf die inhibitorische Aktivität.

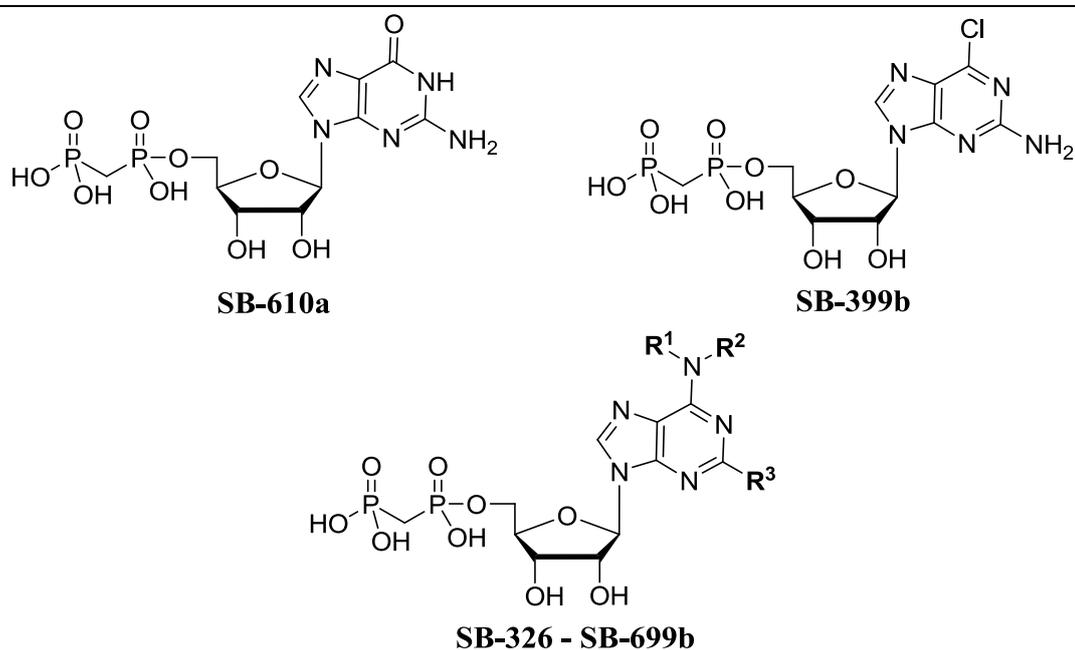
Abbildung 5.6 stellt die entsprechenden Aktivitäten graphisch als pK_i -Werte dar und veranschaulicht sehr gut, dass in allen hier untersuchten Fällen die Substitution des N^6 -Stickstoffes, gegen Sauerstoff oder Schwefel, keinen signifikanten Unterschied in der inhibitorischen Aktivität bewirkt.

5.5 AOPCP-Derivate mit Mehrfach-Substitution

Die bisher gewonnenen Erkenntnisse über die Struktur-Wirkungsbeziehungen der α,β -Methylen-ADP-Derivate an der eN, durch die Untersuchung der Substitution an einzelnen Positionen, wurde nachfolgend genutzt, um durch Kombination verschiedener Substitutionen die inhibitorische Aktivität weiterhin zu steigern.

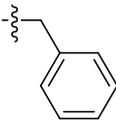
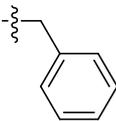
Insgesamt wurden 14 α,β -Methylen-Derivate untersucht, bei denen bisher gewonnene Struktur-Wirkungsbeziehungen kombiniert wurden. Die ermittelten Aktivitäten sind in Tabelle 5.5 aufgelistet.

Tabelle 5.5: Aktivitäten der an Position N^6 substituierten α,β -Methylen-ADP-Derivate



Verbindung	R^1	R^2	R^3	$K_i \pm SEM$ [nM]
------------	-------	-------	-------	-----------------------

86 (SB-326)				41.0 \pm 1.5
87 (SB-399b)	siehe Strukturformel			268 \pm 21
88 (SB-399c)				29.8 \pm 1.7
89 (SB-424d)				5.25 \pm 1.10
90 (SB-466a)				7.52 \pm 0.80
91 (SB-489d)				0.764 \pm 0.246
92 (SB-610a)	siehe Strukturformel			1110 \pm 349
93 (SB-629d)				1.12 \pm 0.28
94 (SB-639b)				0.919 \pm 0.128
95 (SB-650b)				1.20 \pm 0.04
96 (SB-651a)				1.23 \pm 0.04
97 (SB-685a)				0.341 \pm 0.060

98 (SB-696a)	ξ -H		ξ -I	1.53 \pm 0.24
99 (SB-699b)	ξ -CH ₃		ξ -I	2.22 \pm 0.11

Die Kombination aus geeigneten Substituenten in Position 2 mit solchen in Position 6 bzw. N^6 führte in den meisten Fällen zu der gewünschten Aktivitätssteigerung. Davon ausgenommen sind die Verbindungen SB-399b und SB-466a, die durch Einführung einer Amino-Gruppe in Position 2 eine verminderte Aktivität gegenüber den in dieser Position unsubstituierten Derivaten zeigt. Im Falle der Verbindung SB-399b mit einem K_i -Wert von 268 nM verringerte sich die Aktivität im Vergleich zu Verbindung SB-449d um den Faktor 1,7. Im Falle der Verbindung SB-466a mit einem K_i -Wert von 7.52 nM im Vergleich zu Verbindung SB-437b um den Faktor 1,6. Bei allen anderen untersuchten Verbindungen hingegen konnte die inhibitorischen Aktivität durch Einführung der Aminogruppe in Position 2 im Schnitt verdoppelt werden.

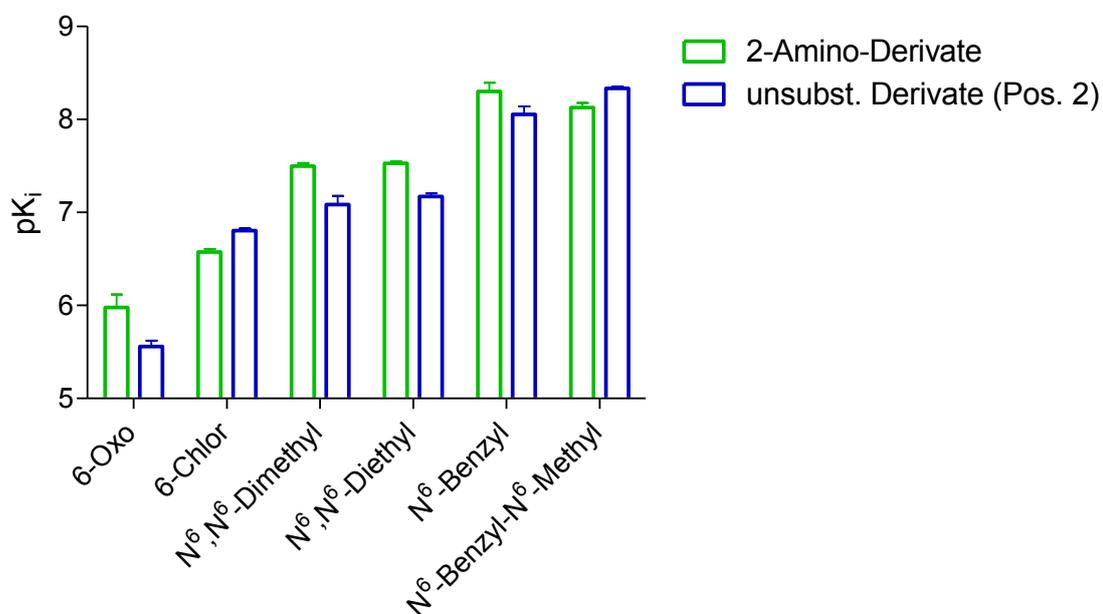


Abbildung 5.7: Graphische Darstellung des Einflusses einer Amino-Gruppe in Position 2 auf bereits in Position 6 bzw. N^6 substituierte Derivate. Dargestellt sind die inhibitorischen Aktivitäten als pK_i -Werte.

Die Einführung eines Halogensubstituenten in Position 2 zeigte in allen Fällen einen positiven Effekt auf die inhibitorische Aktivität und war, wie erwartet, in allen hier untersuchten Fällen der Aminogruppe in dieser Position überlegen. So zeigt die Einführung eines Chlor-Substituenten in Verbindung SB-489d mit einem K_i -Wert von 0.764 nM eine Verbesserung der Aktivität um den Faktor sechs gegenüber der analogen Verbindung mit freier Position 2 (SB-437b), wohingegen die Einführung der Aminogruppe (SB-466a), wie bereits erwähnt, in diesem Fall die Aktivität sogar verringerte. Die Chlor-Substitution in Position 2 des 1-Methyl-benzyl-Derivats wurde sowohl an den einzelnen Isomeren als auch am Racemat untersucht und führte in allen drei Fällen zu einem K_i -Wert von etwa 1 nM und zeigte somit eine um den Faktor drei verbesserte Aktivität gegenüber Verbindung SB-497b (dem analogen Racemat mit freier Position 2). Darüber hinaus zeigten die Ergebnisse dieser drei Verbindungen, dass die stereochemische Orientierung des Restes in dieser Position keine Rolle spielt. Einen noch etwas stärkeren Einfluss hatte die Einführung des Chlorsubstituenten auf das Benzyl- und das 2-Chlorbenzyl-Derivat. Mit einem K_i -Wert von 1.23 nM zeigte die Verbindung SB-651a eine *7fache* Aktivitätssteigerung gegenüber der Verbindung SB-379c und Verbindung SB-685a mit einem K_i -Wert von 0.341 nM zeigte sogar eine *10fache* Aktivitätssteigerung gegenüber SB-555a. Verbindung SB-685a konnten wir so als den potentesten, bisher bekannten eN-Inhibitor identifizieren. Die Konzentrations-Inhibitionskurve dieser Verbindung ist in Abbildung 5.8 dargestellt.

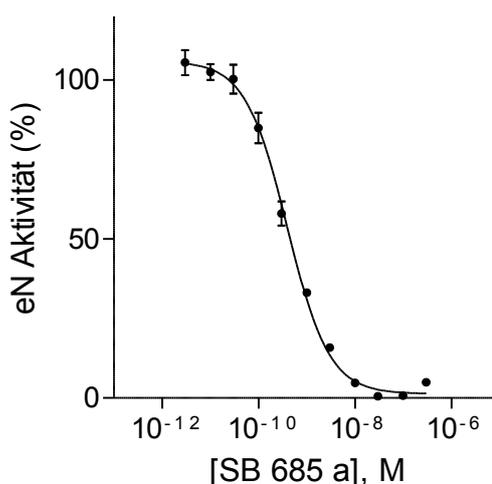


Abbildung 5.8: Konzentrations-Inhibitions-Kurve des bisher besten identifizierten eN-Inhibitors SB-685a mit einem K_i -Wert von 0.341 ± 0.060 nM.

Die Einführung eines Iod-Substituenten zeigte hingegen einen etwas schwächer positiven Effekt auf die Aktivität, als die des Chlorsubstituenten. So ergibt sich für SB-696a mit einem K_i -Wert von 1.53 nM eine *6fache* Verbesserung gegenüber dem unsubstituierten Derivat (SB-379c), jedoch auch eine minimale Verschlechterung gegenüber dem Chlor-substituierten Derivat (SB-651a). Im Fall der Verbindung SB-699b konnte durch die Iod-Substitution nur eine Verdoppelung der Aktivität erreicht werden und wiederum zeigt sich eine Verschlechterung gegenüber dem Chlor-substituierten Derivat (SB-489d), diesmal sogar um den Faktor 3. Der Einfluss der Halogensubstituenten in Position zwei ist zusammenfassend noch einmal graphisch in Abbildung 5.9 dargestellt.

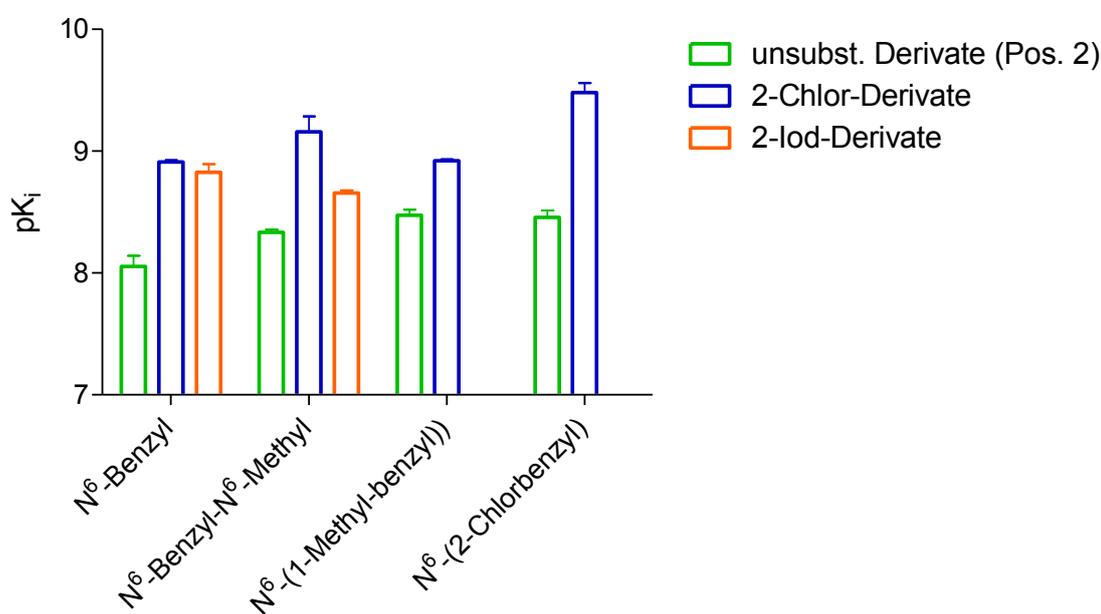


Abbildung 5.9: Graphische Darstellung des Einflusses eines Halogensubstituenten in Position 2 auf bereits in Position 6 bzw. N^6 substituierte Derivate. Dargestellt sind die inhibitorischen Aktivitäten als pK_i -Werte.

5.6 AOPCP-Derivate mit Substitution an der Ribose-Partialstruktur

Insgesamt wurden fünf Derivate untersucht, die an der Ribos substituiert sind. Abgesehen von Verbindung SB-428b, handelt es sich bei diesen Verbindungen um Zwischenstufen der Synthese. Die Untersuchung dieser Zwischenstufen sollte Auskunft darüber geben, welche Rolle die Ribose-Gruppe bei der Enzym-Ligand-Bindung spielt und ob eine unsubstituierte Ribose-Einheit essentiell ist. Neben diesen Zwischenprodukten wurde als

weitere Variation die Verbindung SB-428b untersucht, in deren Ribose-Einheit ein weiterer Phosphat-Rest eingeführt wurde. Die ermittelten Aktivitäten dieser fünf Derivate sind in Tabelle 5.6 aufgelistet.

Tabelle 5.6: Aktivitäten der an der Ribose-Einheit substituierten α,β -Methylen-ADP-Derivate

Verbindung	R ¹	R ²	K _i ± SEM [nM]
100 (SB-281)			679 ± 49
101 (SB-288a)			365 ± 31
102 (SB-307c)			415 ± 60
103 (SB-313e)			3870 ± 920
104 (SB-428b)	siehe Strukturformel		3480 ± 522

Die Isopropyliden-Derivate, die als Zwischenstufen während der Synthese anfielen, zeigten eine deutlich verschlechterte Aktivität gegenüber den entsprechenden Synthese-Endstufen mit 2',3'-unsubstituierter Ribose.

SB-281 zeigte im Vergleich zu SB-421 eine 10fach verminderte Aktivität, SB-288a war im Vergleich zu SB-305 8fach, SB-307c im Vergleich zu SB-248 5fach und SB-313e im Vergleich zu SB-318 sogar 37fach schwächer wirksam.

Die Einführung eines zweiten Diphosphat-Restes führte ebenfalls zu einer deutlichen Verringerung der Aktivität und zeigte mit einem K_i -Wert von 3480 nM nur noch eine inhibitorische Aktivität im mikromolaren Bereich. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass in dieser Position nicht nur die polaren Wechselwirkungen der Ribose eine Rolle spielen, darüber hinaus lässt sich vermuten, dass die Bindungstasche in dieser Region nicht ausreichend Platz für größere Substituenten bietet.

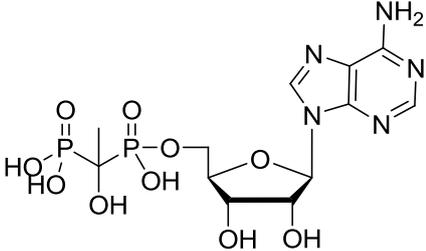
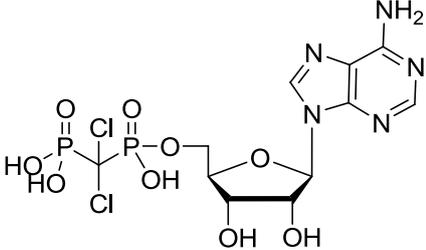
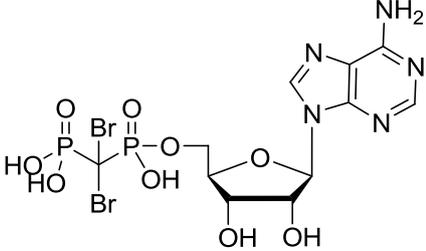
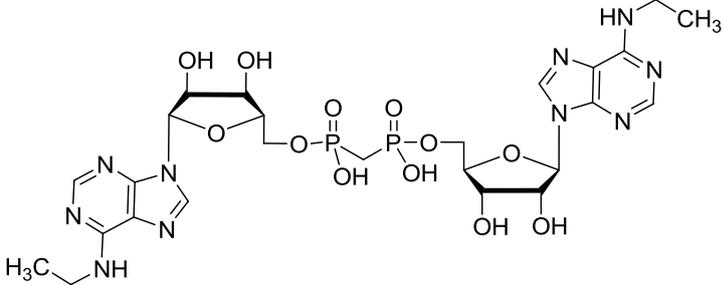
5.7 AOPCP-Derivate mit Substitution in der Phosphatkette

Da vor allem die Seitenkette wichtig für Enzym-Ligand-Interaktion ist, diese aber auch den stärksten Einfluss auf die metabolische Stabilität hat, sollten weitere Variationen des Phosphat-Restes untersucht werden. Die Ergebnisse der hier untersuchten vier Derivate zeigten in allen Fällen, dass eine Variation der Phosphatkette zu einem Aktivitätsverlust führt.

Eine Substitution der Methylengruppe mit zwei Chloratomen (SB-706b) wird mit einem K_i -Wert von 292 noch relativ gut toleriert und zeigt nur eine Verminderung der Aktivität um den Faktor 1,5, wohingegen bereits eine Substitution mit den leicht größeren Brom-Substituenten, sowie die Einführung einer Hydroxy- und einer Methylgruppe (SB-320) kaum noch toleriert werden und zu einem starken Aktivitätsverlust führen. Mit einem K_i -Wert von 3930 nM (SB-780) bzw. 4050 nM (SB-320) zeigen diese beiden Verbindungen nur noch eine moderate Aktivität, die im Vergleich zu AOPCP *20fach* verringert ist. Ebenso führte die Kopplung eines weiteren Adenosin-Derivat-Restes an den Phosphat-Rest zu einer deutlichen Verschlechterung. Mit einem K_i -Wert von 4870 nM zeigt die Verbindung SB-286 eine um den Faktor 25 verminderte Aktivität. Dies kann, neben der Veränderung des Phosphat-Restes, allerdings auch an der Größe des Moleküls liegen. Die Kristallstruktur des gebundenen AOPCP zeigt, dass die Phosphonatgruppe an das Metallzentrum des Enzyms bindet. Hierzu ist der freie Phosphonat-Rest notwendig, um eine Interaktion mit dem Metallzentrum ausüben zu können, darüber hinaus scheint dieser Bereich des aktiven Zentrums zu klein zu sein, um einen entsprechend großen Rest tolerieren zu können. Dies lässt die Vermutung zu, dass die oben aufgeführte Verbindung eventuell ein allosterischer Modulator ist, oder es durch eine Instabilität der Verbindung zu einer teilweisen Zersetzung in einen aktiven Metaboliten kommt.

Die ermittelten Aktivitäten der hier beschriebenen vier Derivate sind in Tabelle 5.7 noch einmal zusammengefasst.

Tabelle 5.7: Aktivitäten der am Phosphat-Rest substituierten α,β -Methylen-ADP-Derivate

Verbindung	Struktur	$K_i \pm SEM$ [nM]
AOPCP	s.o.	197 \pm 5
105 (SB-320)		4050 \pm 394
106 (SB-706b)		292 \pm 23
107 (SB-780)		3930 \pm 532
108 (SB-286)		4870 \pm 1799

5.8 Zusammenfassung

Insgesamt wurden im Rahmen dieser Arbeit 60 α,β -Methylen-ADP-Derivate an der eN auf ihre inhibitorische Aktivität hin untersucht, deren Ergebnisse weitgehende Aussagen über die Struktur-Wirkungsbeziehungen zulassen. So konnten diese Studien zeigen, dass Variationen an der Ribose-Einheit, sowie dem Phosphat-Rest nicht toleriert werden, eine Substitution in 8-Position kaum einen Einfluss hat und sich Substitutionen in den Positionen 2, 6 und N^6 positiv auf die inhibitorische Aktivität auswirken.

Die hier beschriebenen Struktur-Wirkungsbeziehungen sind noch einmal in Abbildung 5.10 zusammengefasst.

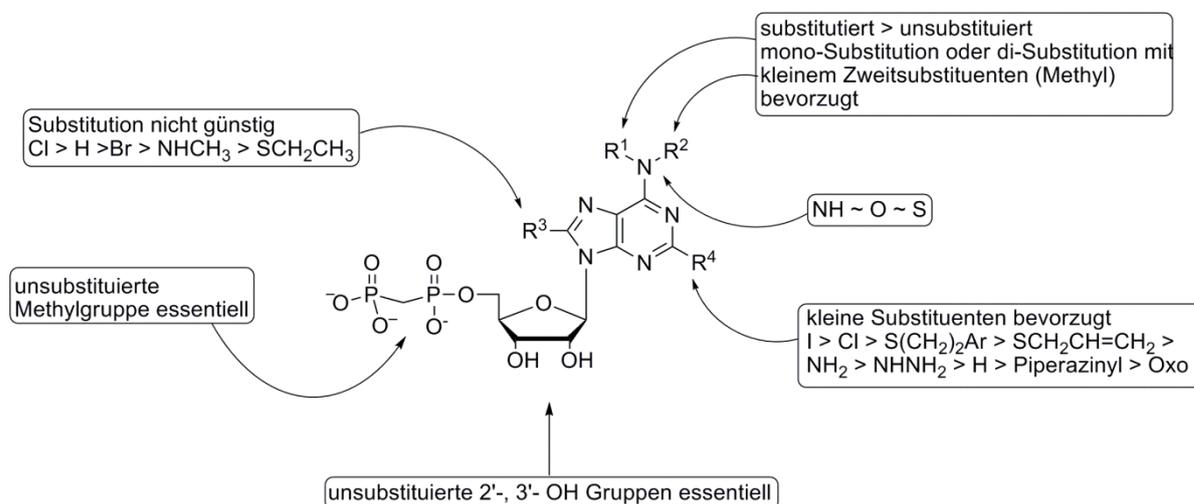


Abbildung 5.10: Struktur-Wirkungs-Beziehungen der α,β -Methylen-ADP-Derivate an der eN

6 Virtuelles Inhibitor-Screening an einem Homologiemodell der murinen Ecto-5'-Nucleotidase

Aufgrund des großen therapeutischen Potentials, aber der recht geringen Anzahl an bekannten potenten Inhibitoren der Ecto-5'-Nucleotidase wurde im Vorfeld meiner Forschungen in Kooperation mit dem Arbeitskreis von Prof. Bajorath ein Projekt durchgeführt, bei dem zunächst ein Homologiemodell für die murine Ecto-5'-Nucleotidase der Ratte erstellt und an diesem im Folgenden ein virtuelles Screening durchgeführt wurde.¹⁶⁸

6.1 Erstellung des Modells

Da zu dem Zeitpunkt dieses Projektes die Kristallstruktur der humanen Ecto-5'-Nucleotidase noch nicht veröffentlicht war, wurde für das virtuelle Screening ein Homologiemodell erstellt.¹⁶⁸ Da in unserem Arbeitskreis die Ecto-5'-Nucleotidase der Ratte für In-vitro-Versuche zur Verfügung stand, wurde entsprechend beschlossen das Homologiemodell der Ratten-Spezies zu erstellen. Zunächst wurde eine Sequenzsuche durchgeführt, um verwandte Enzyme zu identifizieren, für die eine Röntgenstruktur verfügbar war. Die Suche, durchgeführt mittels des Programms PDB-BLAST, identifizierte zwei verwandte Enzyme: zum einen der Ecto-5'-Nucleotidase-Vorläufer aus dem Bakterium *Thermus thermophilus* HB8 mit 34,8% Sequenzhomologie und zum anderen die 5'-Nucleotidase aus dem Bakterium *Escherichia coli* mit etwa 25% Sequenzhomologie. Aufgrund der höheren Homologie wurde *Thermus thermophilus* für die Erstellung des Modells ausgewählt. Da eine Sequenzhomologie unter 40% für ein statistisches Sequenz-Alignment nicht ausreichend verlässlich ist, wurde ein Struktur-basiertes Alignment durchgeführt, dem neben den Informationen über *Thermus thermophilus* noch eine Vielzahl weiterer Informationen zu anderen Nucleotidasen hinzu gefügt wurden (man spricht hier auch von einem „multiple-structure-based sequence alignment“). Die über das Alignment identifizierten konservierten Regionen wurden in das Modell kopiert und die Seitenketten und nicht-konservierten Regionen wurden dann mit Hilfe des Programms „Molecular Operating Environment“ (MOE 2007.9) modelliert.¹⁶⁸

Anschließend erfolgte eine Evaluierung des Modells mittels eines Ramachandran-Plots, sowie einer Sequenz-Struktur-Kompatibilitäts Analyse durch ProSA II (einem Programm für Protein Struktur-Analyse). Beide Analysen zeigten, dass das Modell keine deutlichen Abweichungen von natürlich vorkommenden Proteinen aufweist.¹⁶⁸

6.2 Vergleich von Modell und Röntgenstruktur

Nach der Veröffentlichung der Röntgenstruktur der humanen Ecto-5'-Nucleotidase⁷³ konnte das erstellte Modell des Ratten-Enzyms unter neuen Gesichtspunkten evaluiert werden. Diese Studie wurde ebenfalls im Arbeitskreis von Prof. Bajorath durchgeführt.¹⁶⁹

Hierbei wurden zunächst das Homologie-Modell und die Kristallstruktur einander gegenüber gestellt und miteinander verglichen. Beide Strukturen sind in Abbildung 6.1 dargestellt.

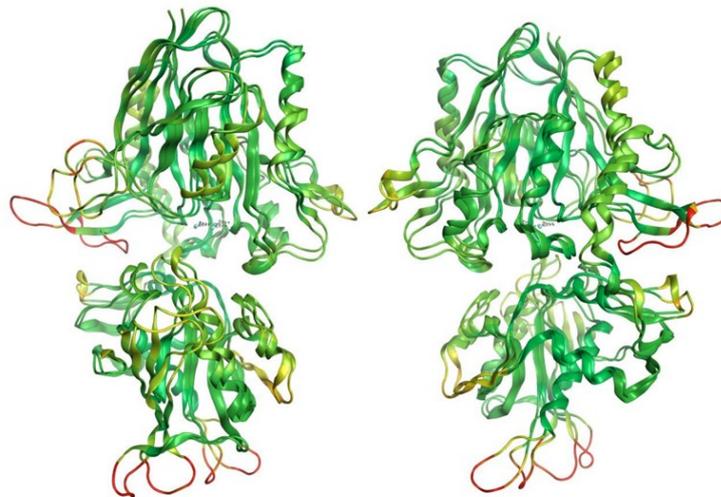


Abbildung 6.1: Darstellung der Überlagerung von Modell und Kristallstruktur in zwei Ansichten (um 180° zueinander gedreht). Grün gibt die Bereiche an, die geringe Unterschiede von rmsd < 3 Å zeigen, gelb gibt einen mittleren Bereich wider mit rmsd > 3 Å und < 8 Å und rote Bereiche zeigen stärkere Abweichungen von rmsd > 8 Å an.¹⁶⁹

Bereits an dieser Darstellung lässt sich gut erkennen, dass Modell und Kristallstruktur sehr gut übereinstimmen und hauptsächlich Unterschiede in oberflächlichen Schleifen zu beobachten sind. Auch die weiteren Untersuchungen wie die Berechnungen der mittleren quadratischen Abweichungen (rmsd) zwischen dem Modell und den zur Verfügung stehenden Kristallstrukturen beweisen dies. Die Berechnungen zeigen, dass das Modell

mit einem rmsd-Wert von 3,2 Å am nächsten an die geschlossene Form der humanen Kristallstruktur herankommt. Die Werte für die Kristallstrukturen der offenen Formen sind deutlich höher >10 Å. Darüber hinaus wurde erneut ein „Alignment“ der Aminosäuresequenzen des Modells gegen die der Kristallstruktur durchgeführt. Auch das „Alignment“ konnte erneut zeigen, dass beide sehr gut übereinstimmen. Es sind lediglich drei Sequenzbereiche vorhanden, die starke Abweichungen zeigen, die jedoch den bereits erwähnten oberflächlichen Schleifen zugeordnet werden können. Vor allem für das aktive Zentrum zeigten sich aber kaum Unterschiede. Lediglich sechs Aminosäurereste zeigten im Vergleich einen Wert von mehr als 1 Å Abweichung. Auch der Vergleich der Interaktionsanalyse zwischen Modell und dem Inhibitor AOPCP zeigte den gleichen Bindungsmodus wie die entsprechende Kristallstruktur.

Zusammenfassend kann diese Studie also bestätigen, dass das für das virtuelle Screening verwendete Homologiemodell der tatsächlichen Kristallstruktur sehr nahe kommt und die Ergebnisse als sehr zuverlässig angesehen werden können.¹⁶⁹

6.3 Virtuelles Screening

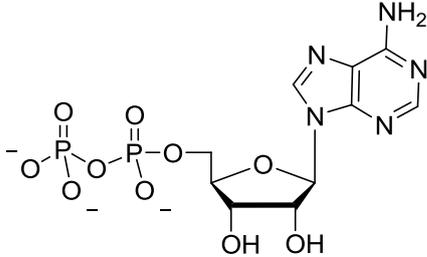
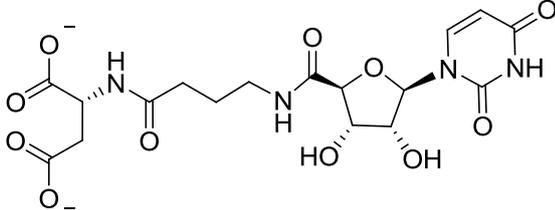
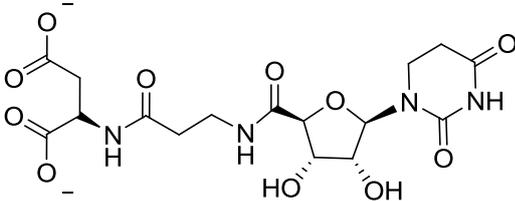
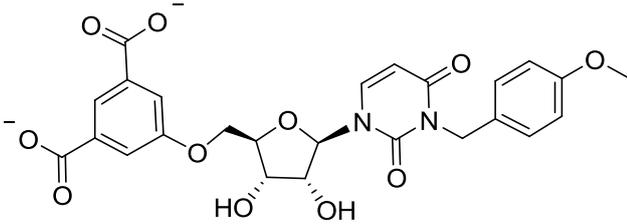
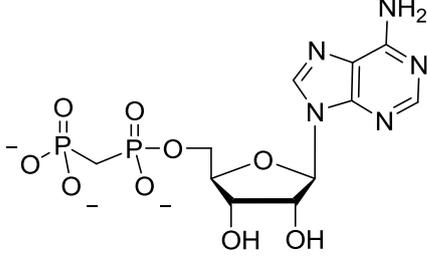
Für das virtuelle Screening wurde die ZINC-8-supplier Datenbank verwendet, die über 2,7 Millionen kommerziell verfügbare Verbindungen in einem, zum Docking bereiten 3D Format enthält.¹⁷⁰ Diese Datenbank wird bereitgestellt vom Institut für Pharmazeutische Chemie der University of California, San Francisco (UCSF).

Da es aber zu zeitaufwendig wäre, die komplette Datenbank zu screenen wurde eine Auswahl von 70000 Verbindungen getroffen. Für diese Auswahl wurden zunächst einige bekannte Inhibitoren zusammengetragen, die in Tabelle 6.1 aufgeführt sind.

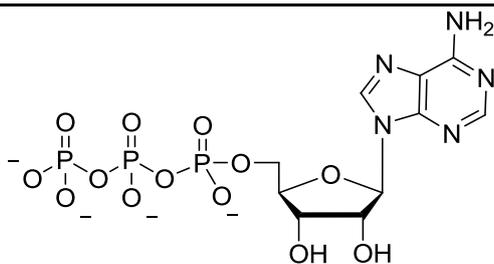
Ausgehend von diesen Verbindungen wurde eine Ähnlichkeitssuche durchgeführt, indem für die Verbindungen mit Hilfe des Programms MOE 2007.9 sogenannte MACCS-keys errechnet wurden, die einen „strukturellen Fingerprint“ der Verbindung darstellen. Hierzu werden verschiedene Fragen, wie z.B. die Anwesenheit von Halogenatomen oder Disulfid-Bindungen, die Anzahl bestimmter Atome oder Ringgrößen mit „richtig“ oder „falsch“ bewertet. Insgesamt werden zur Erstellung dieses MACCS-keys 166 dieser Fragen bewertet. Diese strukturellen Fingerprints wurden dann ebenfalls für alle Verbindungen der ZINC-Datenbank bestimmt und auf dieser Grundlage konnte die

Ähnlichkeitssuche durchgeführt werden, die für jede Verbindung einen sogenannten Tanimoto-Koeffizient angibt.

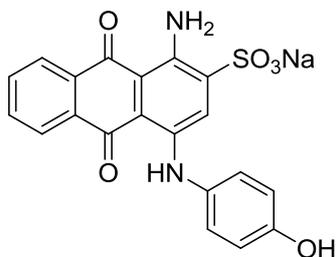
Tabelle 6.1: Bekannte potente und strukturell verschiedene Inhibitoren der eN, die für die Erstellung der Matrix für die Ähnlichkeitssuche verwendet wurden.

Bezeichnung	Struktur
ADP	
109 (AMB193)	
110 (AMB196)	
111 (AMB47)6	
AOPCP	

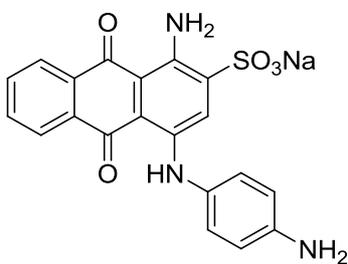
ATP



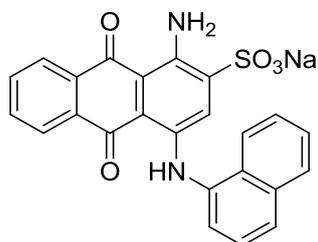
112
(YB011)



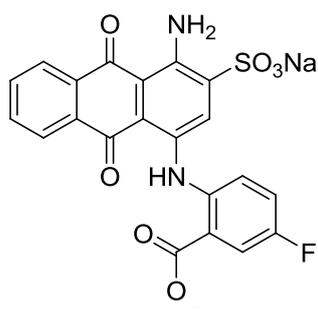
113
(YB019)



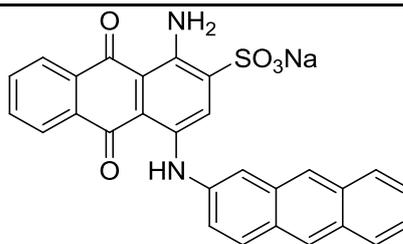
114
(YB040)



115
(YB051)



116
(YB063)



Ausgehend von dieser Ähnlichkeitssuche wurden alle Verbindungen für das virtuelle Screening ausgewählt, die einen Tanimoto Koeffizienten zwischen 0,63 und 0,8 aufwiesen. Die so ausgewählten 70000 Verbindungen wurden dann in dem Programm FlexX gedockt, welches eine Ranking-Liste erstellt. Die besten 2700 Verbindungen dieser Liste mit Scores von -58 bis -41 wurden anschließend manuell im Programm MOE geprüft und an Hand dieser Prüfung wurden 372 Verbindungen ausgewählt, die in unmittelbarer Nähe zum aktiven Zentrum binden. Diese Verbindungen wurden dann unter weiteren Gesichtspunkten betrachtet und bewertet, vor allem wurde überprüft, dass keine Kollision zwischen dem gedockten Molekül und den Aminosäureresten des aktiven Zentrums oder der hydrophoben Bindungstasche stattfindet. Daneben wurden hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem Molekül und den Aminosäuren Phe 419 und Tyr 512 der Bindungstasche betrachtet, sowie die Interaktion funktioneller Gruppen der Verbindung mit der Zink-Domäne des aktiven Zentrums. Diese Bewertung führte schließlich zu 128 Verbindungen, die den Anforderungen besonders gut entsprachen und als Hits für die In-vitro-Testung ausgewählt wurden.

7 Untersuchung ausgewählter Verbindungen aus dem virtuellen Screening

7.1 Screening

Mithilfe der neu etablierten Assay-Methoden sollten zunächst einige der im virtuellen Screening identifizierten Treffer in vitro untersucht werden. Aus diesen 128 Verbindungen wurden 48 ausgewählt, die kommerziell verfügbar waren. Erste Ergebnisse wurden mithilfe des Malachitgrün-Assays erhalten und diese nachfolgend mit dem empfindlicheren Radio-Assay überprüft. Hierbei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den Testergebnissen beider Methoden. Die Untersuchung dieser ersten Verbindungen zeigte als gemeinsames Strukturelement der meisten Treffer eine Sulfonamid-Gruppe. Um dies zu bestätigen wurden noch weitere 40 Verbindungen aus den Treffern des virtuellen Screenings ausgewählt, die den bisher bestätigten Treffern strukturell ähnlich waren; diese wurden ebenfalls im Radio-Assay untersucht.

Alle Verbindungen wurden im Radio-Assay zunächst bei einer Konzentration von 100 μM untersucht und zur weiteren Eingrenzung der Ergebnisse erneut bei einer Konzentration von 10 μM . Die Ergebnisse beider Screenings sind in Abbildung 4.1 graphisch dargestellt.

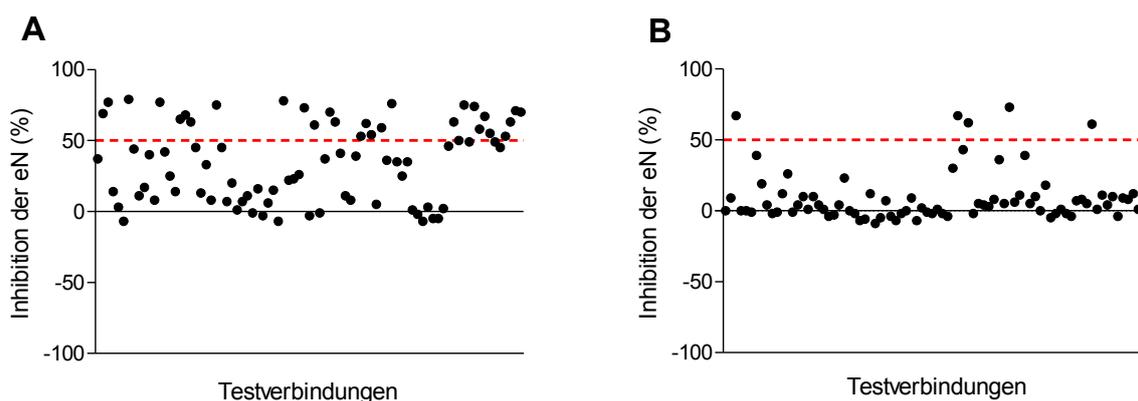


Abbildung 7.1: Screening-Ergebnisse der PR-Verbindungen an der eN. Die Enzyminhibition (%) wurde berechnet und graphisch dargestellt. Die gestrichelte Linie gibt die Treffergrenze für potente Verbindungen bei 50% Inhibition an. (A) Screening der Testverbindungen bei einer Endkonzentration von 100 μM (B) Screening der Testverbindungen bei einer Endkonzentration von 10 μM

Der Grenzwert von 50 % Inhibition, oberhalb dessen eine Verbindung als Treffer definiert wurde, ist in Abbildung 4.1 als gestrichelte Linie dargestellt. Mithilfe des ersten Screenings bei einer Konzentration von 100 μM konnten von den 88 getesteten Verbindungen 32 als Primärtreffer identifiziert werden. Das zweite Screening, bei einer Konzentration von 10 μM , konnte jedoch lediglich noch 5 Verbindungen als höher potente Treffer bestätigen.

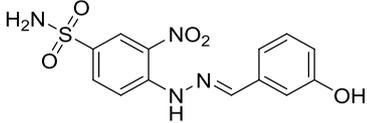
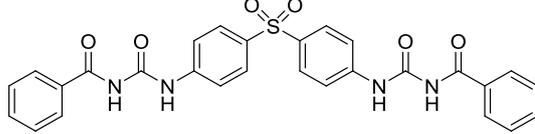
Schließlich wurden, um Verwechslungen, sowie eine Zersetzung der Testverbindungen während der Lagerung auszuschließen, massenspektrometrische Analysen durchgeführt. Hierbei zeigte sich für Verbindung PR3 eine Zersetzung der Verbindung mit einer Reinheit von lediglich noch 56,8%.

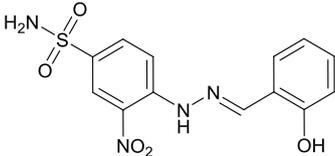
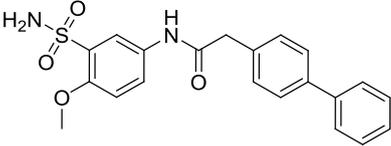
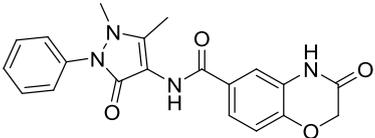
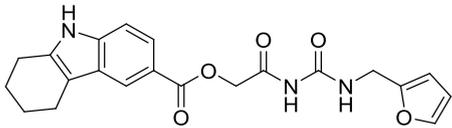
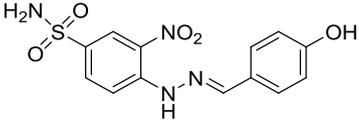
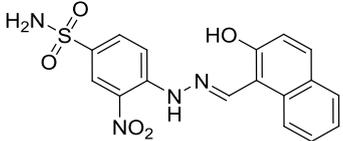
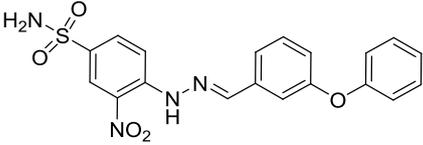
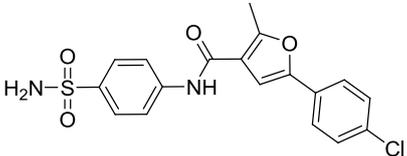
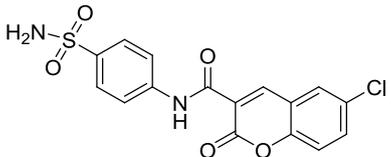
Neben den fünf Treffern des zweiten Screenings wurden für weitere Untersuchungen noch zehn Verbindungen der Primärtreffer ausgewählt, die im zweiten Screening zumindest eine signifikante Inhibition zeigten, so dass schließlich 15 Verbindungen näher charakterisiert werden sollten.

7.2 Konzentrations-Inhibitions-Kurven

Für die potentesten Testverbindungen wurden Konzentrations-Inhibitionskurven aufgenommen. Die aus den Kurven ermittelten IC_{50} -Werte sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

Tabelle 7.1: Inhibitorische Aktivitäten der potentesten Testverbindungen

	Testverbindung	$\text{IC}_{50} \pm \text{SEM}$ [μM]
117 (PR-2)		18.4 ± 1.7
118 (PR-3)		7.10 ± 1.04

119 (PR-8)		9.46 ± 2.00
120 (PR-15)		32.8 ± 1.8
121 (PR-21)		50.9 ± 12.8
122 (PR-27)		32.5 ± 17.5
123 (PR-51)		8.03 ± 0.61
124 (PR-52)		6.54 ± 0.26
125 (PR-53)		3.99 ± 1.46
126 (PR-59)		45.1 ± 6.2
127 (PR-61)		1.90 ± 0.21

128 (PR-63)		15.5 ± 3.7
129 (PR-77)		16.6 ± 2.6
130 (PR-79)		74.8 ± 8.3
131 (PR-88)		46.5 ± 2.7

Die hier näher untersuchten Verbindungen zeigten alle zumindest eine moderate inhibitorische Aktivität im mikromolaren Bereich, sechs der Verbindungen sogar eine recht gute im niedrigen mikromolaren Bereich.

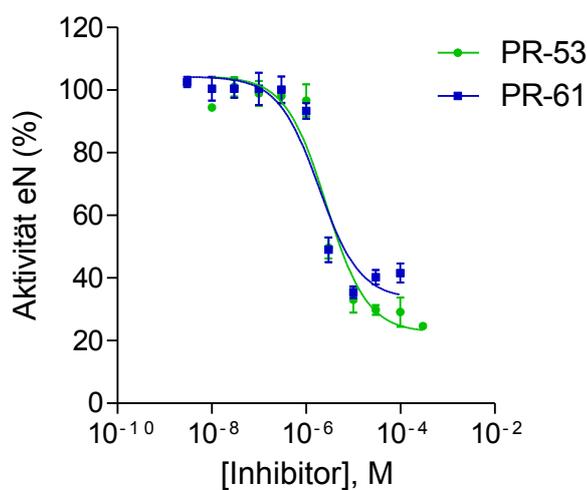


Abbildung 7.2: Konzentrations-Inhibitionskurven, der beiden besten Verbindungen PR-53 und PR-61 an der eN. PR-53: $IC_{50} = 3.99 \pm 1.46 \mu\text{M}$ ($n = 3$); PR-61: $IC_{50} = 1.90 \pm 0.21 \mu\text{M}$ ($n = 3$).

Für die beiden besten Verbindungen PR-53 und PR-61 sind in Abbildung 7.2 Konzentrations-Inhibitionskurven dargestellt. Mit IC_{50} - Werten von $3.99 \mu\text{M}$ bzw. $1.90 \mu\text{M}$ zeigen die Verbindungen PR-53 und PR-61 eine inhibitorische Aktivität, die in ihrem Potenzlevel mit bisher beschriebenen nicht-nucleotidischen Inhibitoren vergleichbar sind. Die Kurven zeigten jedoch keine vollständige Hemmung des Enzyms, was sich wahrscheinlich mit der schlechten Wasserlöslichkeit der Verbindungen begründen lässt, auf Grund derer die Verbindungen in höheren Konzentrationen im Assay ausfielen.

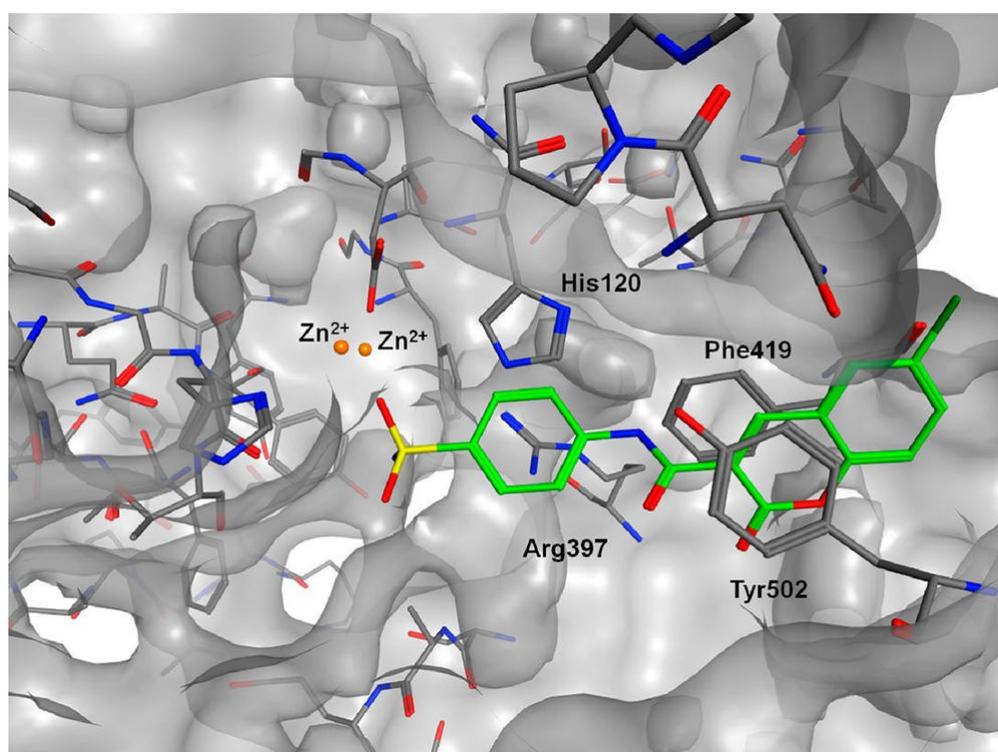


Abbildung 7.3: Hypothetischer Bindungsmodus für Verbindung PR-61 im aktiven Zentrum der eN, einschließlich ausgewählter Reste, die für die Enzym-Inhibitor-Interaktion wichtig sind. Die Sulfonamidgruppe interagiert hierbei mit den Zink-Ionen des aktiven Zentrums und der Cumarin-Rest geht hydrophobe Wechselwirkungen mit den planaren aromatischen Resten der Aminosäuren Phe 419 und Tyr 502 der Bindungstasche ein.¹⁶⁸

Abgesehen von den Verbindungen PR-21 und PR-27 zeigen alle hier identifizierten Inhibitoren einen sehr ähnlichen strukturellen Aufbau. Sie verfügen alle über einen Nucleosid-imitierenden Rest, einen Heterozyklus oder einen substituierten Aromaten, sowie über einen (aromatisch substituierten) Sulfonamid-Rest, der in der Lage ist, mit den Zink-Ionen des Aktiven Zentrums zu interagieren. Beide Reste sind über einen Amid-,

Hydrazin- oder Harnstoff-Linker miteinander verbunden. Der hier postulierte Bindungsmechanismus ist in Abbildung 7.3 exemplarisch für die Verbindung PR-61 dargestellt.

7.3 Hemmmechanismus

Für die potenteste der in diesem Projekt getesteten Verbindungen sollte stellvertretend für diese Substanzklasse der Hemmmechanismus bestimmt werden. In Abbildung 7.4 sind das Michaelis-Menten- und das Lineweaver-Burk-Diagramm dargestellt, die für die Bestimmung des Hemmmechanismus verwendet wurden.

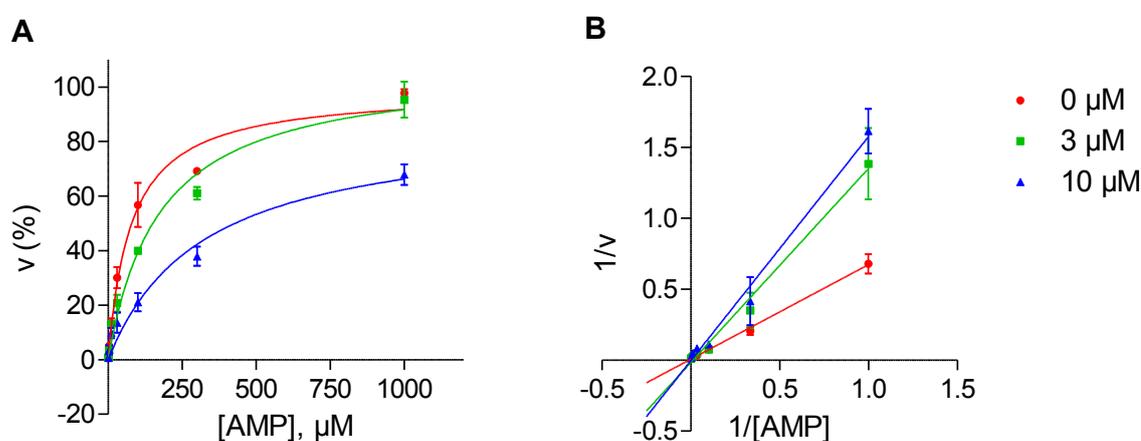


Abbildung 7.4: Michaelis-Menten-Diagramm (A) und Lineweaver-Burk-Diagramm (B) zur Bestimmung des Hemmmechanismus von PR-61 in Anwesenheit von 0 μM , 3 μM und 10 μM Inhibitor ($n = 3$)

Das Michaelis-Menten-Diagramm zeigt, dass sich der K_m -Wert mit steigender Inhibitorkonzentration erhöht. Vor allem die Kurve der niedrigeren Inhibitor-Konzentration zeigt sehr gut, dass die maximale Umsatzgeschwindigkeit jedoch unverändert bleibt, bei der höheren Inhibitor-Konzentration ist dies im Diagramm leider nicht zu sehen, da hier vermutlich das Plateau und damit die maximale Umsatzgeschwindigkeit noch nicht erreicht ist. Die Geraden im Lineweaver-Burk-Diagramm schneiden sich auf der Y-Achse, sodass ein kompetitiver Hemmmechanismus angenommen werden kann.

7.4 Zusammenfassung

Die im Rahmen dieses Projektes durchgeführten Untersuchungen konnten zeigen, dass einige der im virtuellen Screening identifizierte potentiellen Inhibitoren tatsächlich In-vitro inhibitorische Aktivität zeigen. Aus 88 der hier ausgewählten Verbindungen zeigten 32 eine Inhibition von mehr als 50% bei 100 μM . Für die 15 vielversprechendsten Verbindungen wurden Konzentrations-Inhibitionskurven aufgenommen. Diese Verbindungen zeigten moderate bis gute inhibitorische Aktivitäten mit IC_{50} -Werten von 1.90 μM bis 74.8 μM .

Unter den besten Verbindungen waren vor allem zwei Grundstrukturen zu erkennen, die mehrere aktive Derivate zeigten. Anhand dieser Grundstrukturen konnten zwei Leitstrukturen bestimmt werden, die eine Basis für die Entwicklung neuartiger eN-Inhibitoren bieten könnten. Diese beiden potentiellen Leitstrukturen sind in Abbildung 7.5 aufgeführt.

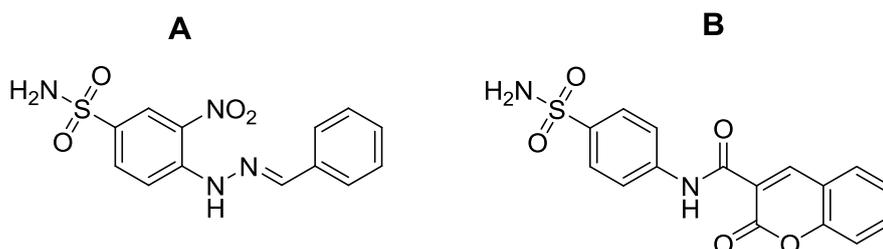


Abbildung 7.5: Potentielle Leitstrukturen für die Entwicklung neuer eN-Inhibitoren, abgeleitet aus den Ergebnissen des virtuellen Screenings und nachfolgender In-vitro-Tests. (A) 4-(2-Benzylidenhydrazinyl)-3-nitrobenzenesulfonamid; (B) 2-Oxo-N-(4-sulfamoylphenyl)-2H-chromen-3-carboxamid.

Beide Verbindungen sind mithilfe bekannter Methoden gut zu synthetisieren und besitzen ein geringes Molekulargewicht, so dass sie eine gute Basis für weitere Derivatisierungen darstellen.

Darüber hinaus konnte für die Verbindung PR-61 der im Modelling postulierte kompetitive Bindungsmechanismus bestätigt werden.

8 Synthesen

Wie bereits in der Einleitung erläutert wurde, können Ectonucleotidasen sehr interessante Zielstrukturen für die Entwicklung neuartiger Arzneistoffe sein. Da bisher nur sehr wenige Inhibitoren für diese Enzymklasse bekannt sind, hat diese Arbeit zum Ziel, neuartige Inhibitoren zu identifizieren, ihre Struktur-Wirkungsbeziehungen zu untersuchen und die Strukturen zu optimieren. Der Fokus der vorliegenden Arbeit liegt auf der Ecto-5'-Nucleotidase.

Da aus den Ergebnissen des virtuellen Screenings hervor ging, dass vor allem Sulfanilamid-Derivate mit freier, endständiger Sulfonamid-Gruppe, die über einen kurzen, polaren linker mit einem aromatischen Rest verbunden sind, gute Kandidaten darstellen, wurde zunächst eine möglichst einfache Leitstruktur (**132**) gewählt, die viele weitere Modifikationen zulässt, diese ist in Abbildung 8.1 dargestellt.

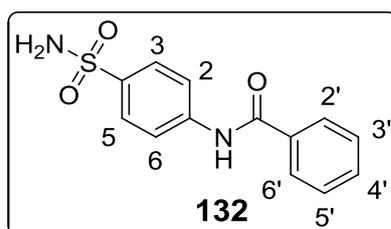


Abbildung 8.1: Leitstruktur für die Entwicklung neuer eN-Inhibitoren

Die Betrachtung der Leitstruktur zeigt, dass prinzipiell eine Substitution des aromatischen Restes sowie der Austausch desselben gegen einen heteroaromatischen Rest möglich ist. Darüber hinaus sind Substitutionen des Aminobenzensulfonamid-Restes möglich. Zunächst wurde eine kleine Bibliothek von Verbindungen synthetisiert, die einen substituierten aromatischen Rest tragen, sowie ein paar der entsprechenden Konstitutions-Isomere, die sich von Metanilamid ableiten. Des Weiteren wurden Metanilamid-Derivate dargestellt, die kleine Substituenten in Position 2 des Aminobenzensulfonamid-Rings tragen.

8.1 Darstellung von *N*-Sulfamoylphenylbenzamid-Derivaten

Für die Darstellung der Leitstruktur wurden zunächst zwei der bei *Vullo et. al.*¹⁷¹ beschriebenen Methoden durchgeführt und in Hinsicht auf Ausbeute und Geschwindigkeit der Reaktion bewertet.

Die als Methode A beschriebene Schotten-Baumann-Synthese, bei der Sulfanilamid (**132**) in einer Natriumhydroxid-Lösung gelöst und mit Benzoylchlorid (**143**) umgesetzt wird, führte jedoch nicht zum gewünschten Produkt, da das Carbonsäurechlorid in Gegenwart von Natriumhydroxid zu schnell hydrolysierte.

Als zweite wurde die als Methode C beschriebene Variante durchgeführt, bei der das Sulfanilamid (**133**) zunächst in einer 1:1-Mischung aus Aceton und Wasser gelöst und dann mit einer Base versetzt wird. Als Basen wurden Kaliumcarbonat (**A**), Natriumhydrogencarbonat (**B**) und Triethylamin (**C**) getestet. Durch Zugabe des Benzoylchlorid (**134**) wird das gewünschte Produkt (**132**) erhalten (Abbildung 8.2)

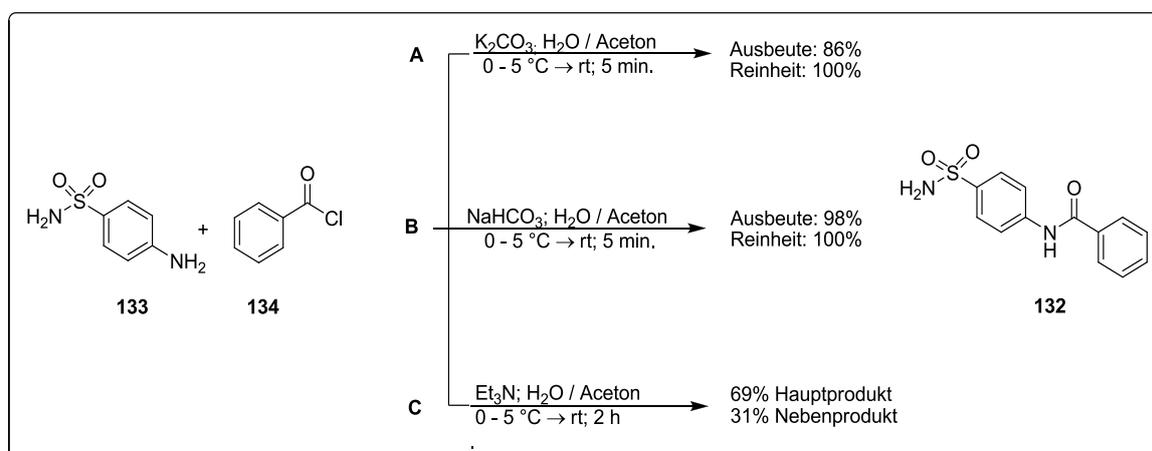


Abbildung 8.2: Ermittlung des geeigneten Lösungsmittel, sowie der geeigneten Base für die Amidkopplung zur Darstellung von *N*-(4-Sulfamoylphenyl)benzamid

Der Einsatz von Kaliumcarbonat führte zu einer Ausbeute von 86 % bei einer Reaktionsdauer von etwa 5 Minuten. Eine noch etwas bessere Ausbeute von 98% konnte durch den Einsatz von Natriumhydrogencarbonat erreicht werden, wobei auch diese Reaktion sehr schnell abläuft und bereits nach fünf Minuten eine vollständige Umsetzung zeigt. Mit beiden Varianten konnten die Produkte allein durch Abfiltrieren und

gründliches Waschen des Filtrates in einer 100%igen Reinheit erhalten werden. Beim Einsatz von Triethylamin zeigte sich zunächst, dass die Reaktion langsamer abläuft, darüber hinaus konnte hier das gewünschte Produkt nicht in entsprechend guter Reinheit erhalten werden. Bei dieser Reaktion entstand ein Nebenprodukt mit deutlich höherer Masse, welches mit einer weiteren Kopplung des Säurechlorids an die Sulfonamid-Gruppe zu erklären war. Hauptprodukt und Nebenprodukt wurden in dem hier durchgeführten Versuch in einem Verhältnis von 69% zu 31% erhalten.

Aufgrund der hier beschriebenen Ergebnisse wurde zunächst die Variante B für die Synthese weiterer Derivate ausgewählt (Abbildung 8.3).

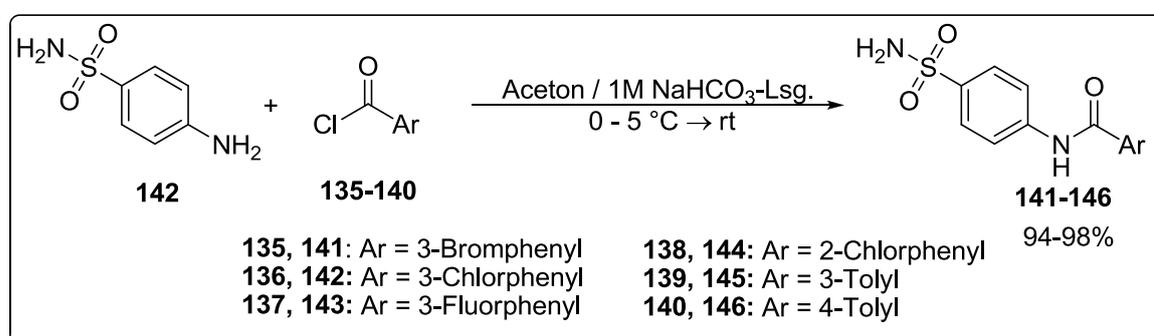


Abbildung 8.3: Darstellung der Verbindungen **141-146** via Variante B

Die mithilfe dieser Methode dargestellten Derivate konnten in einer sehr guten Ausbeute von 94-98% erhalten werden.

Bei der Umsetzung weiterer Derivate zeigte sich jedoch, dass einige der eingesetzten Säurechloride deutlich hydrolyseempfindlicher waren als die Testverbindung und eine Umsetzung nur unvollständig, mit teils sehr niedrigen Ausbeuten erfolgt. Daher wurde in weiteren Versuchen zunächst anstelle der Aceton-Wasser-Mischung reines Aceton als Lösungsmittel verwendet. Auf Grund des nun wasserfreien Milieus wurde zunächst Triethylamin als Base eingesetzt, da wir hier von einer guten Mischbarkeit in dem gewählten Lösungsmittel ausgehen konnten. Jedoch zeigte sich auch im wasserfreien Milieu erneut, dass der Einsatz von Triethylamin bei einigen der eingesetzten Säurechloride eine weitere Substitution des Säurechlorids an die Sulfonamidgruppe begünstigte. Daher wurde in einem weiteren Versuch Natriumhydrogencarbonat eingesetzt, dass sich in Aceton zwar nur wenig löst, aber dennoch in dieser Variante zu

sehr guten Ergebnissen führte. Dies deutet darauf hin, dass ein ausreichendes Abfangen der während der Reaktion entstehenden Protonen durch Natriumhydrogencarbonat auch in dieser Zusammensetzung gewährleistet zu sein scheint.

Die optimierte Reaktion ist in Abbildung 8.4 dargestellt.

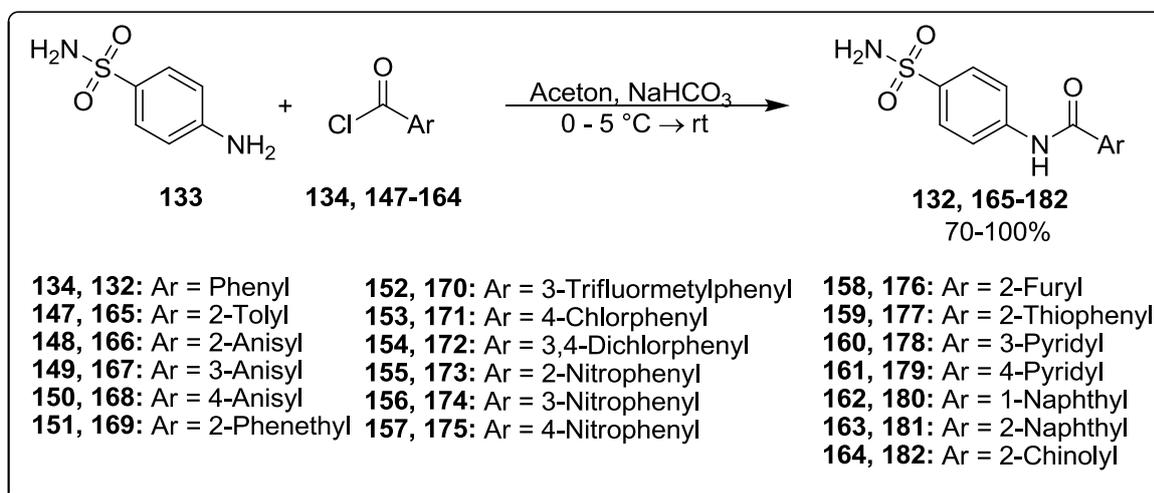


Abbildung 8.4: Allgemeines Schema der optimierten Synthese der Sulfanilamid-Derivate **132** und **165-182**

Mithilfe der optimierten Methode konnte eine ganze Reihe von Verbindungen in guten bis sehr guten Ausbeuten von 70% bis 100% dargestellt werden. Alle Verbindungen zeigten zudem nach Abfiltrieren und Waschen des Rückstandes mit Wasser und Diethylether eine sehr gute Reinheit, so dass eine weitere Aufreinigung nicht notwendig war.

Da die Ergebnisse der Docking-Studien eine hydrophobe Wechselwirkung des aromatischen Restes analog zu der hydrophoben Wechselwirkung des Adenins mit der Bindungstasche zeigten, schien es sinnvoll, neben den in Abbildung 8.3 und Abbildung 8.4 aufgeführten aromatischen Resten einen Adenin-Rest an das Aminobenzensulfonamid zu koppeln.

Für die Darstellung dieser Verbindung wurde im ersten Schritt zunächst ein Brom-Rest über eine Amidkupplung eingeführt. Diese wurde entsprechend der oben beschriebenen optimierten Methode durch Reaktion von Bromacetylchlorid (**183**) mit Sulfanilamid (**133**) in Aceton unter Zusatz von Natriumhydrogencarbonat durchgeführt. Das

Zwischenprodukt **184** konnte hierbei in einer ausgezeichneten Ausbeute von fast 100% erhalten werden. Im zweiten Schritt erfolgt dann die Alkylierung von Adenin. Wie frühere Untersuchungen zeigten, kann eine regioselektive Alkylierung von Adenin über den pH-Wert gesteuert werden. Unter neutralen Bedingungen wird Adenin zunächst an Position 3 alkyliert und bei weiterem Überschuss des Alkylierungsmittels wird Position 7 angegriffen. Durch Zusatz einer Base erfolgt jedoch die Alkylierung selektiv an Position 9 und bei weiterem Zusatz wird ein zweiter Alkylsubstituent in Position 1 dirigiert.^{173; 172; 174} Entsprechend dieser Untersuchungen wurde in der vorliegenden Arbeit das gewünschte in Position 9 alkylierte Produkt **186** durch eine Reaktion von Adenin (**185**) mit dem im ersten Schritt dargestellten Bromid **184** in Gegenwart der Base Natriumhydrid erhalten (Abbildung 8.5).

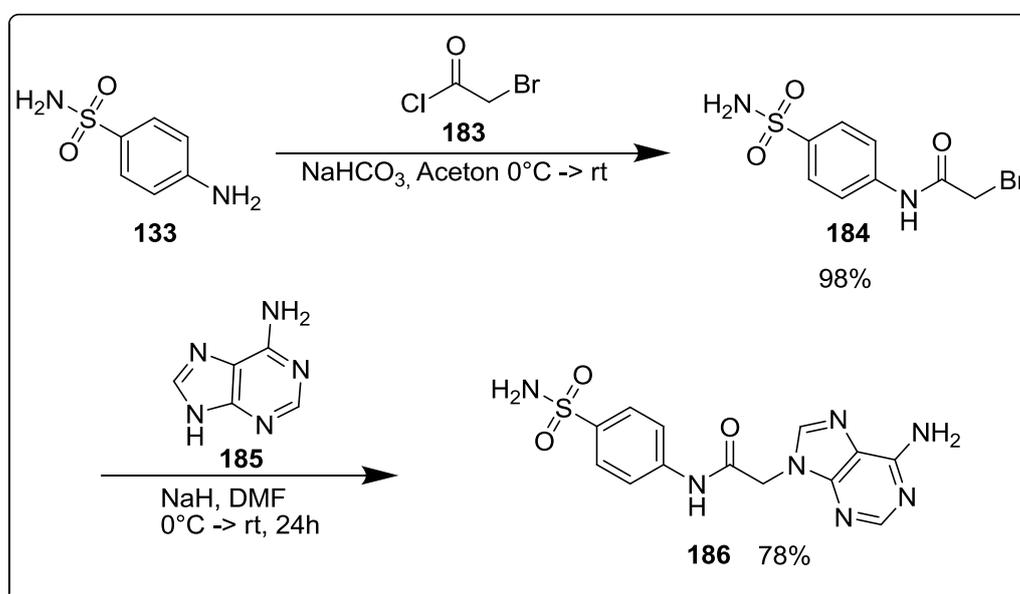


Abbildung 8.5: Darstellung von 2-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-N-(4-sulfamoylphenyl)acetamid

Auf diese Weise konnte das gewünschte Produkt **186** in einer guten Ausbeute von 78% erhalten werden.

Analog zur Darstellung der Sulfanilamid-Derivate erfolgte die Darstellung der konstitutionsisomeren Metanil-Derivate. Das Syntheschema ist in Abbildung 8.6 dargestellt. Auch die Metanilamid-Derivate **196-204** konnten in sehr guten Ausbeuten von 98% bis 100% erhalten werden.

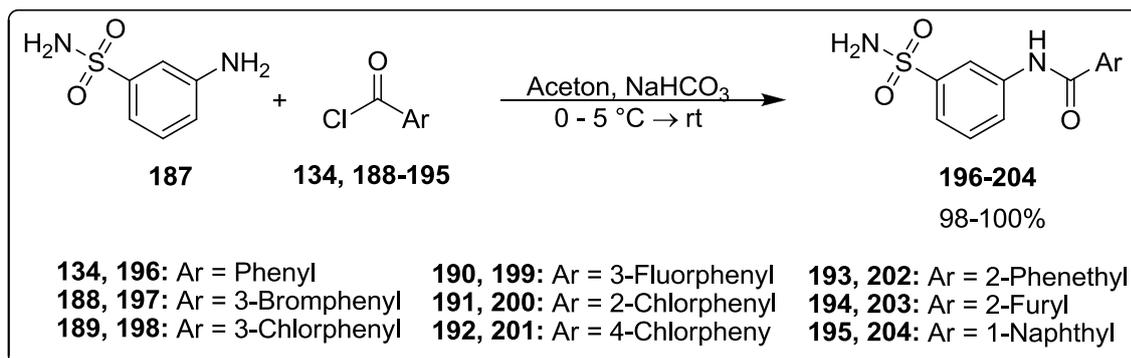


Abbildung 8.6: Darstellung der Metanilamid-Derivate

Neben den in Abbildung 8.6 aufgeführten Verbindungen sollten weiterhin Metanilamid-Derivate dargestellt werden, die in Position 2 substituiert sind. Zunächst wurde das Hydroxy-substituierte Derivat ausgehend von 2-Aminophenol-4-sulfonamid (**205**) synthetisiert. Die Umsetzung erfolgte analog zu dem oben aufgeführten Syntheschema, wobei durch sehr langsames Zutropfen des Säurechlorids die Amidkopplung möglichst selektiv durchgeführt werden konnte, jedoch wurde zu einem geringeren Anteil durch zusätzliche Veresterung der phenolischen Gruppe durch das Säurechlorid etwa 10% des Produktes zu Nebenprodukt **207** umgesetzt.

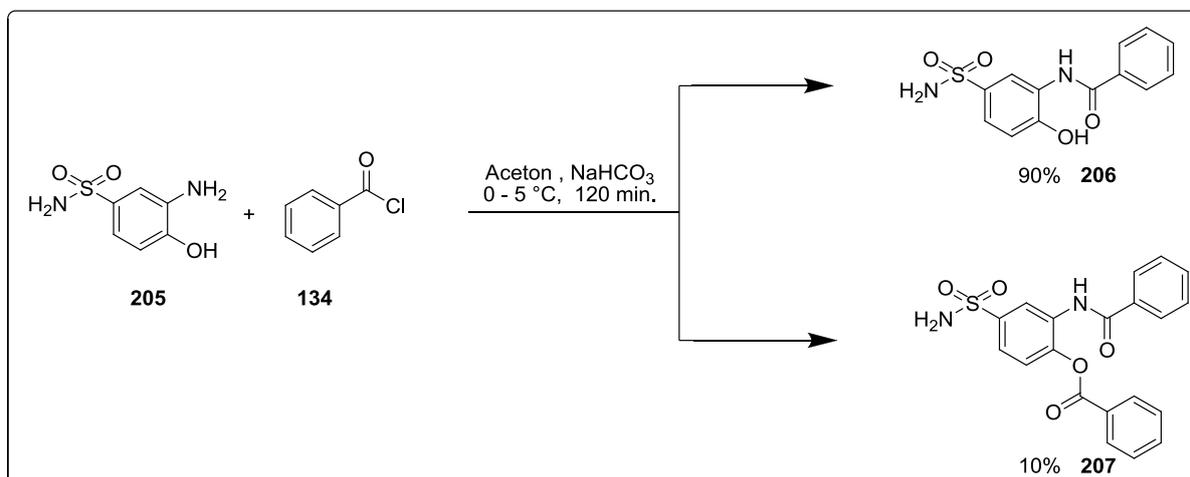


Abbildung 8.7: Darstellung des *N*-(2-Hydroxy-5-sulfamoylphenyl)benzamids

Da eine selektive Spaltung der entstandenen Esterfunktion nicht erreicht werden konnte wurde der Ansatz säulechromatographisch aufgereinigt und eine mäßige Ausbeute von 20% in Kauf genommen.

Neben der Hydroxygruppe sollten als weitere Substituenten noch Chlor bzw. Methyl in die 2-Position des Metanilamids eingeführt werden. Da die entsprechenden Ausgangsverbindungen jedoch nicht kommerziell verfügbar waren, mussten diese zunächst dargestellt werden.

Dazu wurde im ersten Schritt, entsprechend einer von *Bhattacharya et al.*¹⁷⁵ beschriebenen Methode, das entsprechende Nitrobenzen (**208-209**) mit Chlorsulfonsäure versetzt, um das entsprechende Nitrobenzen-Sulfonylchlorid (**210-211**) zu erhalten. Anschließend wurde dieses durch Versetzen mit methanolischer Ammoniak-Lösung in das entsprechende Sulfonamid (**212-213**) überführt. In einem weiteren Schritt wurde dann die Nitrogruppe zum Amin reduziert, sodass das als Ausgangsprodukt benötigte 3-Amino-4-chlorbenzensulfonamid (**214**) bzw. 3-Amino-4-methylbenzensulfonamid (**215**) erhalten wurde.

Im Anschluss erfolgt die Kopplung mit Benzoylchlorid (**134**) entsprechend der zuvor optimierten Methode.

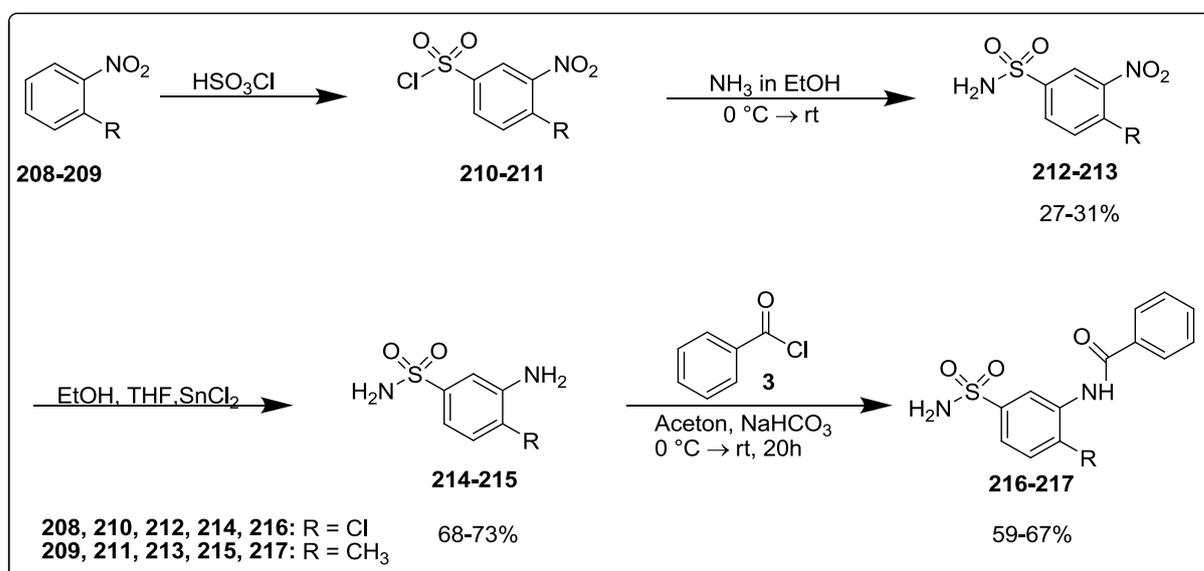


Abbildung 8.8: Darstellung der in Position 2 substituierten Metanilamid-Derivate **216** und **217**

8.2 Darstellung von 4-(2-Benzylidenhydrazinyl)- benzensulfonamiden

Da sich in dem virtuellen Screening vor allem zwei Strukturklassen als besonders potent herausgestellt haben, sollten auch einige weitere Verbindungen dieser beiden Strukturklassen dargestellt werden, um Struktur-Wirkungsbeziehungen analysieren zu können, die helfen sollen die Inhibitoren zu optimieren. Zunächst wird im Folgenden die Klasse der 4-(2-Benzylidenhydrazinyl)benzensulfonamide beschrieben, die weiterhin als Hydrazin-Derivate bezeichnet werden. Obwohl die aktiven Verbindungen dieser Strukturklasse aus dem virtuellen Screening eine Nitrogruppe in Position 3 der Sulfanilamid-Einheit aufweisen, wurde in dieser Arbeit zunächst eine Reihe von Hydrazin-Derivaten ohne diese Nitrogruppe dargestellt. Diese sind wesentlich einfacher zugänglich und ermöglichen darüber hinaus auch eine Verifizierung der Rolle dieser Nitrogruppe für die Potenz der Verbindungen.

Für die Darstellung der 4-(2-Benzylidenhydrazinyl)benzensulfonamide (**241-262**) wurde eine in der Literatur beschriebene Methode angewendet.¹⁷⁶

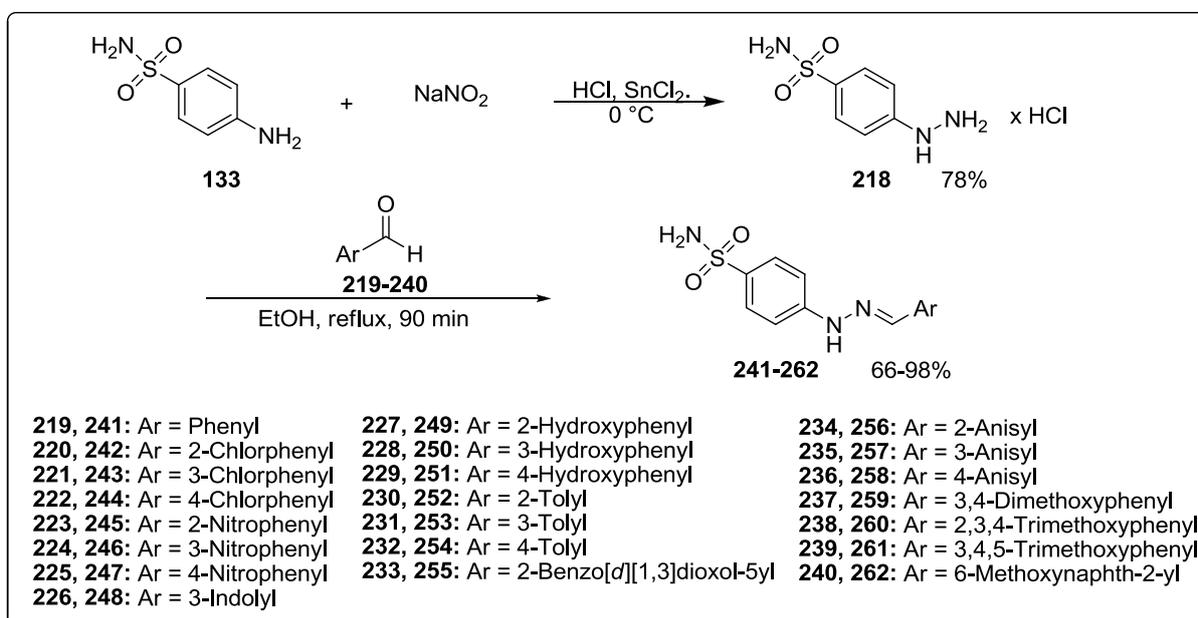


Abbildung 8.9: Darstellung der Hydrazin-Derivate **241-262**

Bei der vorgestellten Methode wird zunächst Sulfanilamid (**133**) im salzsauren Medium mit Natriumnitrit und anschließend mit Zinn(II)chlorid versetzt, um 4-Sulfamoylphenylhydrazinhydrochlorid (**218**) zu erhalten. Im nächsten Schritt wird dann das erhaltene 4-Sulfamoylphenylhydrazinhydrochlorid (**218**) unter Erhitzen mit dem entsprechenden aromatischen Aldehyd (**219-240**) zum gewünschten Produkt (**241-262**) umgesetzt.

Die auf diese Weise dargestellten Hydrazin-Derivate konnten in mittleren bis guten Ausbeuten von 66% bis 98% erhalten werden. Auch die Hydrazin-Derivate konnten mit dieser Methode in einer sehr guten Reinheit ausgefällt werden, so dass eine weitere aufwendige Aufarbeitung nicht notwendig war.

Neben den in Abbildung 8.9 dargestellten aromatischen Resten sollte weiterhin ein Xanthin-Rest an das Aminobenzensulfonamid gekoppelt werden. Methylxanthine sind in der Literatur ebenfalls als schwache Inhibitoren der eN beschrieben und zeigen auf Grund ihrer Größe und strukturellen Eigenschaften gute Voraussetzungen für Wechselwirkungen mit der hydrophoben Bindungstasche der eN. Die Darstellung erfolgte entsprechend dem in Abbildung 8.10 dargestellten Syntheschema.

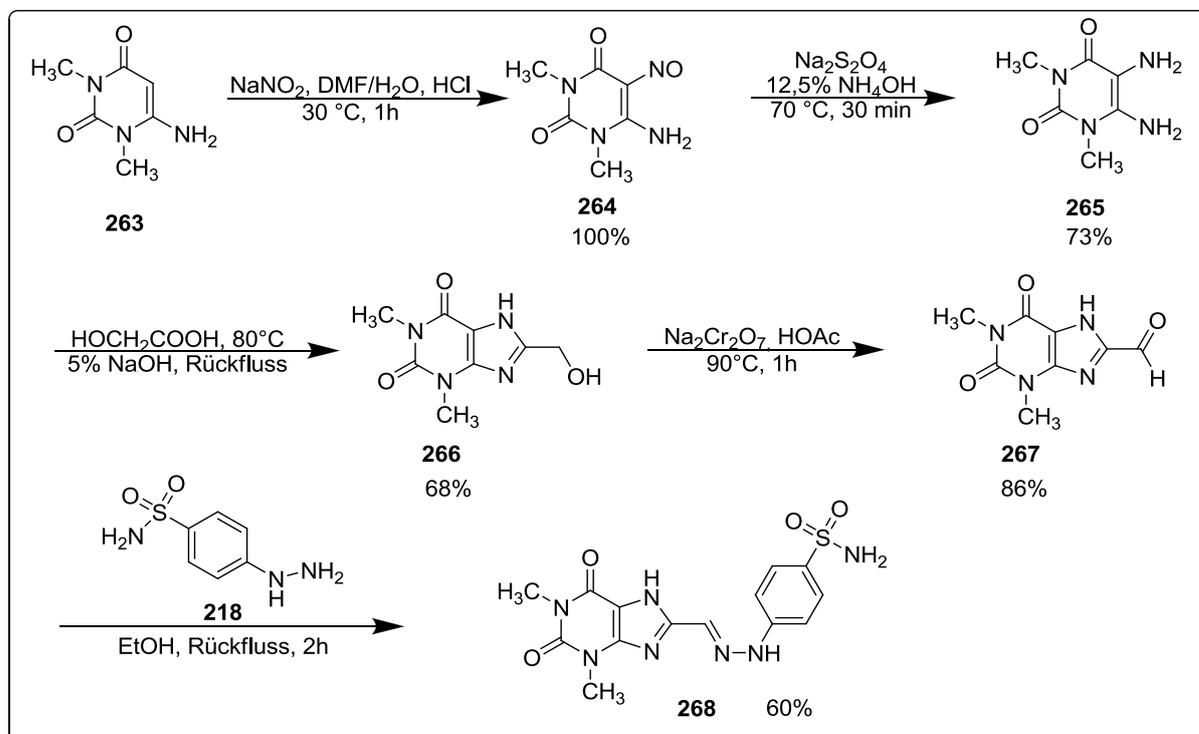


Abbildung 8.10: Syntheschema für die Darstellung von 4-(2-((1,3-Dimethyl-2,6-dioxo-2,3,6,7-tetrahydro-1H-purin-8-yl)methylen)hydrazinyl)benzenesulfonamid

Zunächst erfolgte der Aufbau des Xanthinringes. Hierzu wurde 1,3-Dimethyl-6-aminouracil (**263**) durch Nitrosierung mit Natriumnitrit in Essigsäure und anschließender Reduktion mit Natriumdithionit in Ammoniak zu 1,3-Dimethyl-5,6-diaminouracil (**265**) umgesetzt.¹⁷⁷ Der Ringschluss konnte durch Kondensation mit α -Hydroxymethylelessigsäure erreicht werden und führte zu 8-Hydroxymethyltheophyllin (**266**).¹⁷⁸ Unter Verwendung von Natriumdichromat in Essigsäure konnte das Zwischenprodukt **266** selektiv zum entsprechenden Aldehyd **267** oxidiert werden.¹⁷⁸

Die Kopplung des so hergestellten Theophyllin-8-carbaldehyds (**267**) an das Sulfonamid erfolgt entsprechend der oben beschriebenen Methode unter Verwendung des im Vorfeld hergestellten 4-Sulfamoylphenylhydrazinhydrochlorids (**218**).

Das Produkt **268** konnte so in einer mittleren Ausbeute von 60% erhalten werden.

Neben den oben beschriebenen 4-(2-Benzylidenhydrazinyl)benzensulfonamid-Derivaten sollte jedoch auch eine Methode entwickelt werden, um die entsprechenden in 3-Position nitrierten Derivate zu erhalten. Zur Einführung der Nitrogruppe in diese Position wurde zunächst die unter 8.1 bereits beschriebene Methode angewendet, um 4-Chlor-3-nitrobenzen-1-Sulfonamid (**212**) zu erhalten. Die oben beschriebene Methode zur Generierung des Hydrazins war in diesem Fall jedoch nicht möglich, da hierbei die Nitrogruppe reduziert würde. Daher wurde für die hier dargestellte Verbindung in einem weiteren Ansatz durch Erhitzen einer Mischung aus Benzaldehyd (**219**) und Hydrazinhydrat in einer Mikrowellenreaktion Benzylidenhydrazin (**269**) generiert, welches im folgenden Schritt in einer weiteren Mikrowellenreaktion, durch eine Substitutionsreaktion mit 4-Chlor-3-nitrobenzen-1-sulfonamid (**212**) das Endprodukt 4-(2-Benzylidenhydrazinyl)-3-nitrobenzensulfonamid (**270**) bildet. Auf diese Weise konnte das gewünschte Produkt **270** in einer sehr guten Ausbeute von 92% erhalten werden.

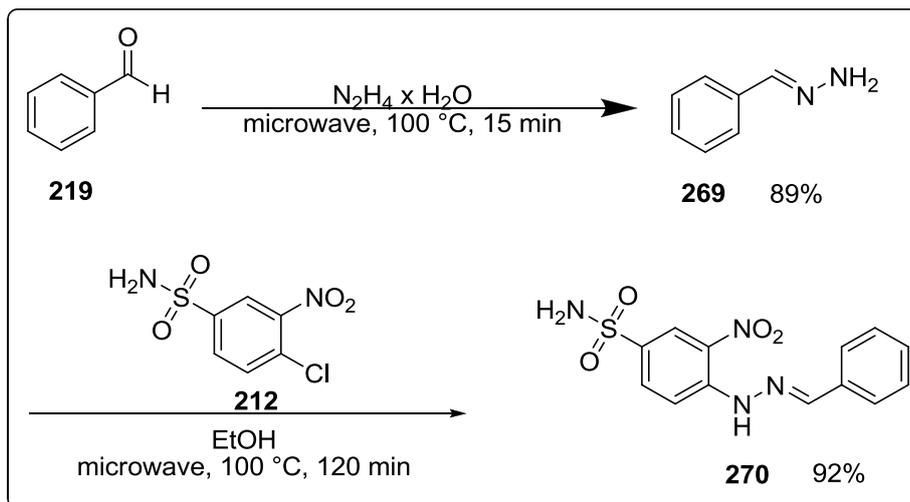


Abbildung 8.11: Darstellung von 4-(2-Benzylidenhydrazinyl)-3-nitrobenzensulfonamid

8.3 Darstellung von 2-Oxo-N-(4-sulfamoylphenyl)-2H-chromen-3-carboxamiden

Eine weitere Strukturklasse, die sich nach dem virtuellen Screening als wirksam erwiesen hatte und aus der auch die beste Verbindung stammt, ist die Klasse der 2-Oxo-N-(4-sulfamoylphenyl)-2H-chromen-3-carboxamide, die im Weiteren auch als Cumarin-Derivate bezeichnet werden.

Für die Herstellung dieser Derivate wurde zunächst Sulfanilamid (**133**) in der oben beschriebenen, optimierten Schotten-Baumann ähnlichen Reaktion mit Ethylmalonylchlorid (**271**) umgesetzt. Das bei dieser Reaktion entstandene Zwischenprodukt (**272**) wurde im zweiten Schritt in einer Knoevenagel-Reaktion mit dem entsprechenden Salicylaldehyd (**273-281**) zu dem jeweils gewünschten Produkt (**282-290**) umgesetzt.

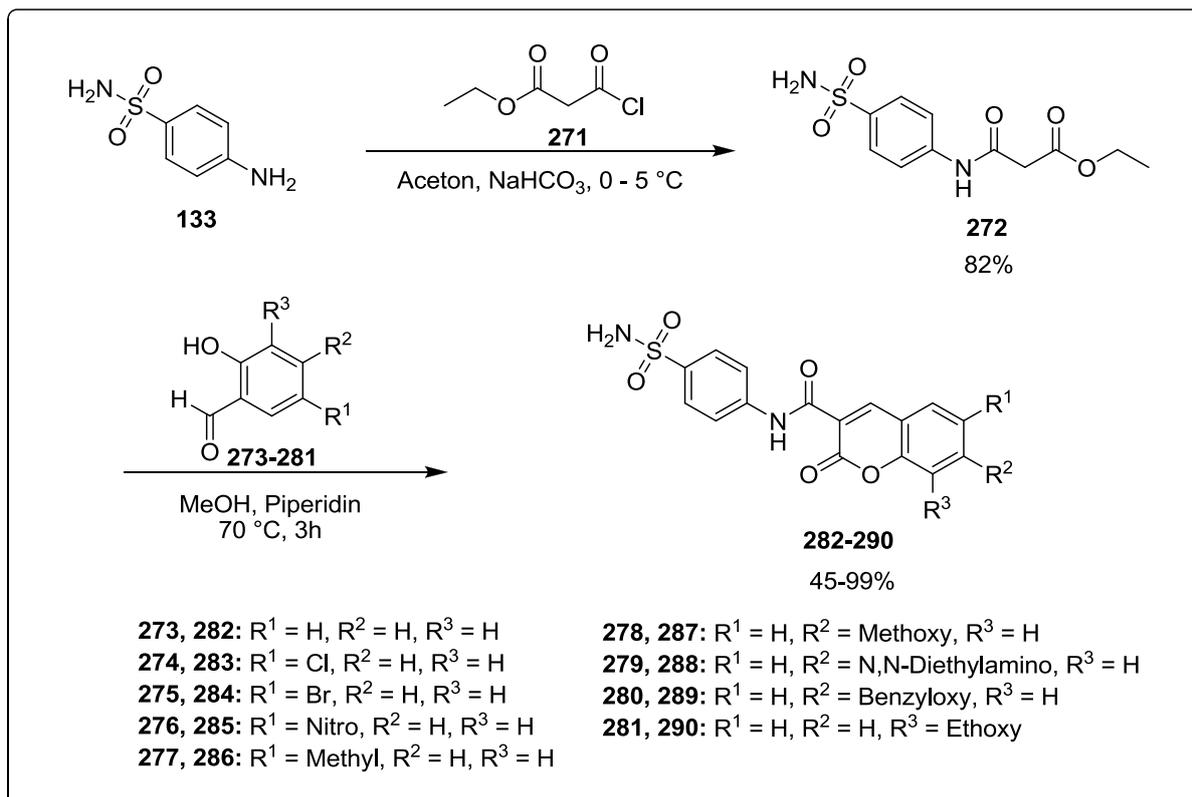


Abbildung 8.12: Darstellung der 2-Oxo-N-(4-sulfamoylphenyl)-2H-chromen-3-carboxamide **282-290**

Die mithilfe der in Abbildung 8.12 dargestellten Methode konnten die gewünschten Cumarin-Derivate **282-290** in sehr guten Ausbeuten von 95% bis 99% dargestellt werden, lediglich Verbindung **288** konnte nur in einer mittleren Ausbeute von 45% erhalten werden.

Neben den in Abbildung 8.12 aufgeführten Resten sollte ebenfalls ein Benzyloxy-Rest in Position R³ eingeführt werden.

Da der entsprechende Salicylaldehyd jedoch nicht kommerziell erhältlich war, wurde dieser zunächst in einer Alkylierungsreaktion generiert. Hierzu wurde 2,3-Dihydroxybenzaldehyd (**291**) unter Zugabe von Natriumhydrid mit Benzylbromid (**292**) versetzt. Das Produkt wurde dann entsprechend der oben aufgeführten Methode mit dem vorher dargestellten Zwischenprodukt **293** weiter umgesetzt zu dem gewünschten Produkt **294**, welches ebenfalls in einer sehr guten Ausbeute von 94% erhalten werden konnte.

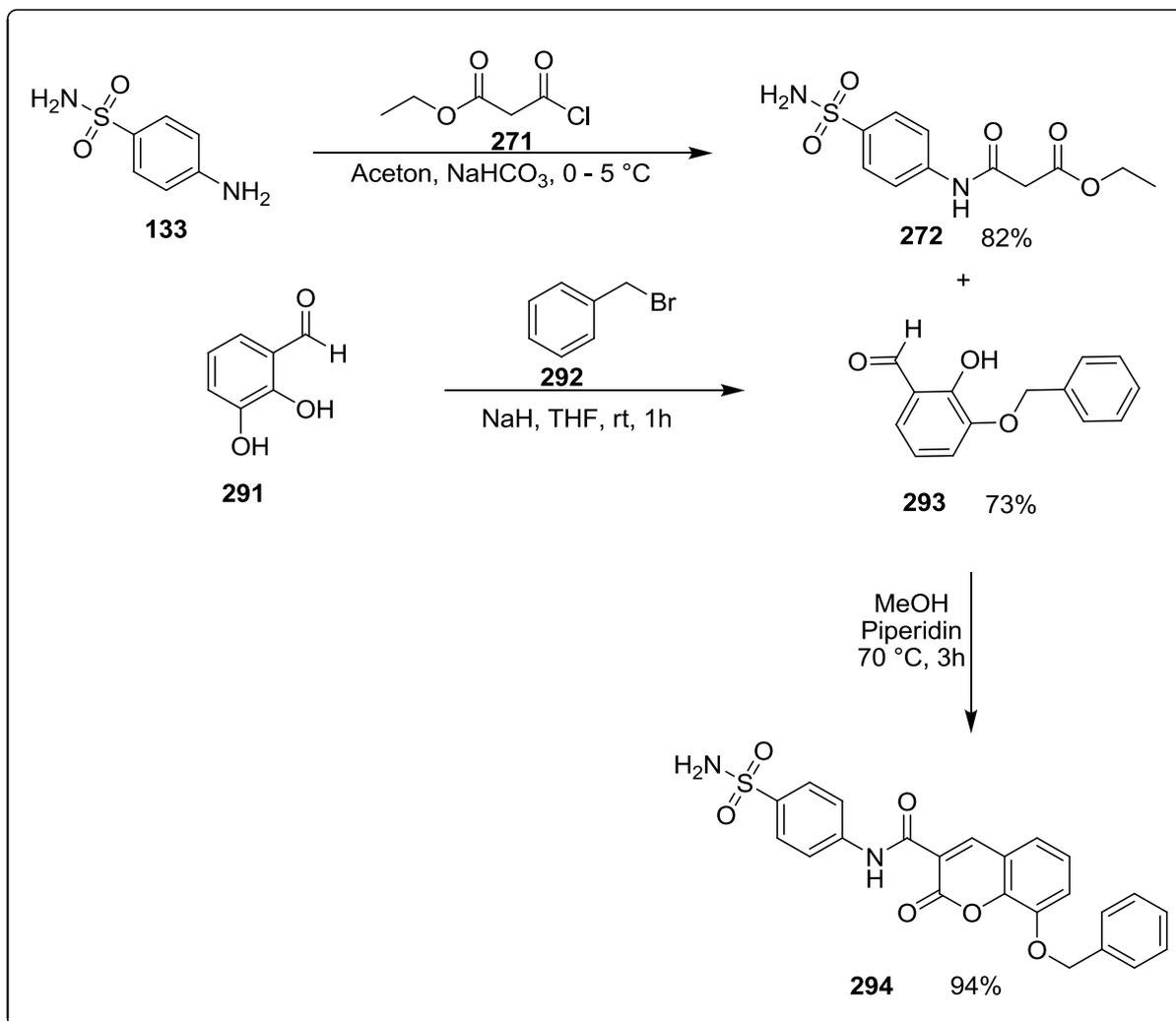


Abbildung 8.13: Darstellung von 8-(Benzyloxy)-2-oxo-*N*-(4-sulfamoylphenyl)-2*H*-chromen-3-carboxamid

Des Weiteren wurde auch bei den Cumarin-Derivaten das konstitutionsisomere, von Metanilamid abgeleitete Derivat dargestellt, um zu untersuchen, ob eine para-Stellung der Sulfonamidgruppe zu dem Amid-Linker notwendig oder bevorzugt für eine inhibitorische Aktivität ist. Die Darstellung wurde entsprechend der oben beschriebenen Methode durchgeführt, wobei als Ausgangsstoff jedoch Metanilamid (**287**) anstelle von Sulfanilamid (**133**) eingesetzt wurde. Nach der Umsetzung mit Ethylmalonylchlorid (**271**) zu dem Zwischenprodukt Ethyl-3-oxo-3-(3-sulfamoylphenylamino)propanoat (**295**) wurde dieses mit Salicylaldehyd (**273**) zu dem gewünschten Produkt 2-Oxo-*N*-(3-sulfamoylphenyl)-2*H*-chromen-3-carboxamid (**296**) umgesetzt.

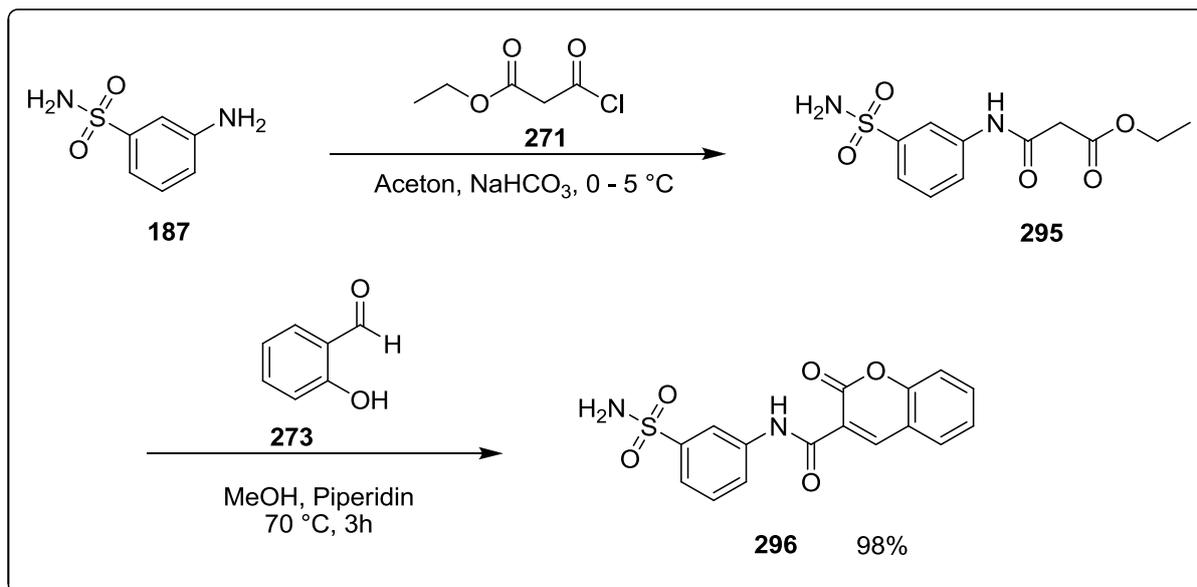


Abbildung 8.14: Darstellung von 2-Oxo-*N*-(3-sulfamoylphenyl)-2*H*-chromen-3-carboxamide

Auch Verbindung **296** konnte, wie die anderen Cumarin-Derivate, in einer sehr guten Ausbeute von 98% erhalten werden.

9 Untersuchung der Sulfonamid-Derivate als Inhibitoren der Ecto-5'-Nucleotidase

Die in dieser Arbeit synthetisierten Sulfonamid-Derivate wurden mithilfe des in 3.3 beschriebenen Radio-Assays an der eN (Ratte) auf ihre inhibitorische Aktivität hin untersucht. Hierzu wurden die Verbindungen zunächst bei einer Konzentration von 100 μM gescreent und für die vielversprechendsten Verbindungen wurden nachfolgend Konzentrations-Inhibitions-Kurven aufgenommen.

9.1 Screening

Alle Verbindungen wurden im Radio-Assay zunächst bei einer hohen Konzentration von 100 μM untersucht und zur weiteren Abschätzung der Potenz erneut bei einer Konzentration von 10 μM . Die Ergebnisse beider Screenings sind in Abbildung 4.1 graphisch dargestellt.

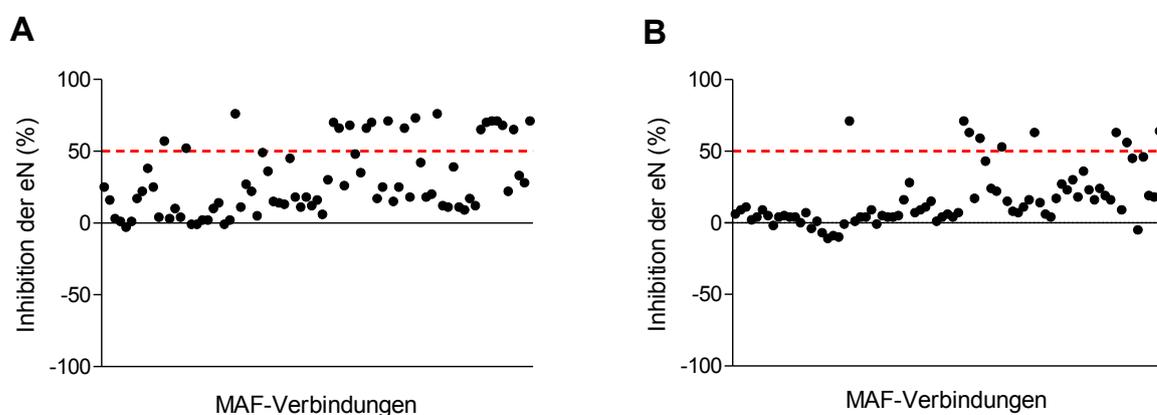


Abbildung 9.1: Screening-Ergebnisse der MAF-Verbindungen an der eN. Die Enzyminhibition (%) wurde berechnet und graphisch dargestellt. Die gestrichelte Linie gibt die Treffergrenze für potente Verbindungen bei 50% Inhibition an. (A) Screening der Testverbindungen bei einer Endkonzentration von 100 μM . (B) Screening der Testverbindungen bei 10 μM .

Der Grenzwert von 50% Inhibition, oberhalb dessen eine Verbindung als Treffer definiert wurde, ist in Abbildung 4.1 als gestrichelte Linie dargestellt. Mithilfe des ersten

Screenings bei einer Konzentration von 100 μM konnten von den 80 getesteten Verbindungen nur 20 als Primärtreffer identifiziert werden. Das zweite Screening, bei einer Konzentration von 10 μM , konnte lediglich acht Verbindungen als stärker potente Treffer bestätigen.

Neben den acht Treffern des zweiten Screenings wurden noch zwei weitere Verbindungen der Primärtreffer ausgewählt die im zweiten Screening ebenfalls eine signifikante Inhibition zeigten, sodass schließlich zehn Verbindungen näher charakterisiert wurden.

9.2 Konzentrations-Inhibitions-Kurven

Für die potentesten Testverbindungen wurden Konzentrations-Inhibitionskurven aufgenommen und daraus die IC_{50} -Werte ermittelt. Die hier näher untersuchten Verbindungen zeigen alle eine moderate bis gute inhibitorische Aktivität in einem Bereich von 1.66 μM – 43.4 μM .

Die beiden besten Verbindungen sind zum einen die Verbindung MAF44, die bereits als bester Hit aus dem virtuellen Screening hervorging, und zum anderen die Verbindung MAF77, die im gleichen Aktivitätsbereich mit einem leicht verbesserten Wert charakterisiert werden konnte. Bei der Verbindung MAF77 handelt es sich um eines der Hydrazin-Derivate.

9.3 Struktur-Wirkungs-Beziehungen

9.3.1 Sulfamoylbenzamide

Aus der Gruppe der Sulfamoylbenzamide (MAF 1-42) zeigen nur sehr wenige Verbindungen eine inhibitorische Aktivität. Die beste Verbindung ist hierbei MAF 25 mit einer Inhibition von $> 70\%$ bei 100 μM . Die Aufnahme einer Konzentrations-Inhibitionskurve war jedoch nicht möglich, da die Verbindung bei höheren Konzentrationen, die hierfür eingesetzt werden mussten, leider ausfiel. Auch für Verbindung MAF 22 konnte eine gute Inhibition von mehr als 70% bei 10 μM beobachtet werden, jedoch zeigte diese Verbindung keine inhibitorische Aktivität bei höheren

Konzentrationen mehr, so dass auch hier keine nähere Charakterisierung stattfinden konnte. Beide Verbindungen zeigen mit einem Naphthyl- (MAF22) bzw. einem Chinolin-Rest (MAF25) einen ähnlichen aromatischen Rest. Bei beiden handelt es sich um anellierte aromatische Ringsysteme, im Gegensatz zu den meisten phenylischen oder kleinen heteroaromatischen Resten der anderen Verbindungen dieser Klasse. Dies lässt den Schluss zu, dass ein relativ großer planarer Rest aus mindestens zwei aromatischen Ringen essentiell für eine ausreichende Wechselwirkung mit der hydrophoben Bindungstasche des Enzyms ist. Da die Verbindungen MAF21 und MAF34, obwohl sie ebenfalls einen Naphthyl-Rest tragen, keine signifikante inhibitorische Aktivität aufweisen, zeigt sich, dass auch die Winkelung bzw. die Anordnung des Restes eine Rolle spielt.

9.3.2 Hydrazin-Derivate

Die im Rahmen dieser Arbeit zunächst synthetisierten Hydrazin-Derivate ohne Nitro-Gruppe in Position 3 des Benzensulfonamid-Ringes, zeigten leider keine besonders gute inhibitorische Aktivität. Bei einer Screening-Konzentration von 100 μM konnten von den 22 Verbindungen noch fünf als Hits identifiziert werden, von denen jedoch nur eine Verbindung (MAF77) eine signifikante Inhibition von 56% bei einer Screening-Konzentration von 10 μM zeigte.

Wie oben bereits beschrieben, wurde diese Verbindung näher charakterisiert und es konnte ein IC_{50} -Wert von 1,66 μM ermittelt werden. Hiermit stellt diese Verbindung eine der potentesten nicht-nucleotidischen Verbindungen dar, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden. Darüber hinaus weisen die hier erhobenen Daten darauf hin, dass ein größerer planarer Rest (anelliertes aromatisches System) eine stärkere inhibitorische Aktivität bewirkt, was bereits die Untersuchung der Sulfamoylbenzamide vermuten ließ.

Weiterhin zeigt ein Vergleich der Verbindungen MAF42, MAF53, MAF54 und MAF55, mit den Verbindungen MAF74, PR8, PR2 und PR51, also ein Vergleich der entsprechenden Verbindungen mit und ohne Nitro-Substitution in Position 3 des Benzensulfonamid-Restes, dass die Einführung der Nitrogruppe in dieser Position eine deutliche Steigerung der inhibitorischen Aktivität bewirkt (Abbildung 9.2).

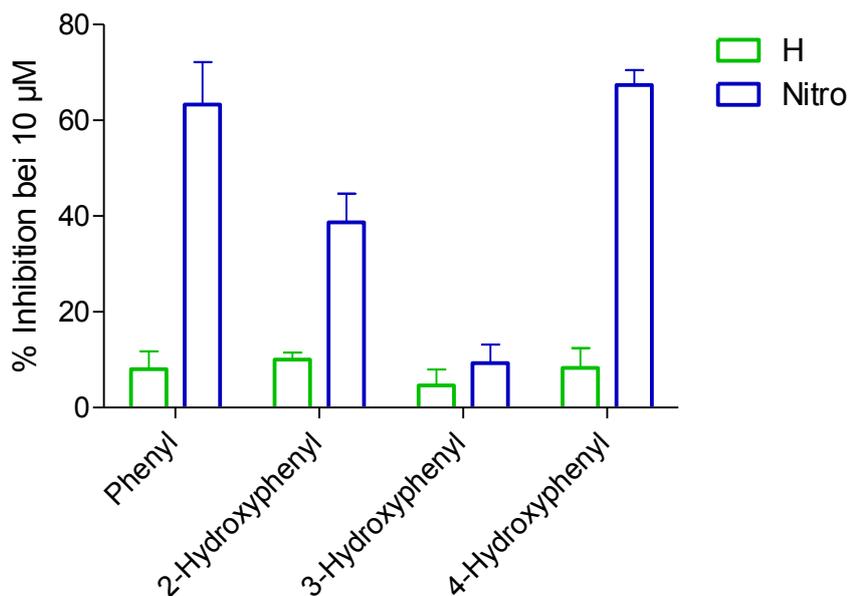


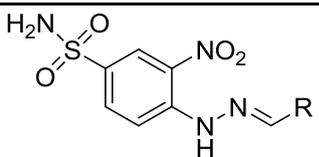
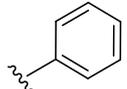
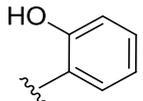
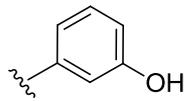
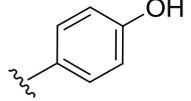
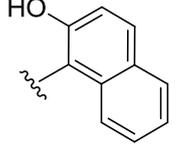
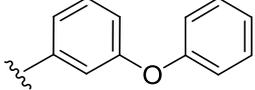
Abbildung 9.2: Vergleich der Hydrazin-Derivate mit (blau) und ohne (grün) Nitro-Substituenten in Position 3 des Benzensulfonamid-Ringes. Die Darstellung zeigt deutlich, dass die Nitro-substituierten Derivate deutlich überlegen sind.

Bereits die Einführung der Nitrogruppe in die Leitstruktur (Phenyl-Rest) konnte die Aktivität von einer kaum signifikanten Inhibition bei 100 μM auf 70% Inhibition steigern. Selbst bei 10 μM zeigte diese Verbindung noch eine gute Inhibition von 63%, woraufhin diese Verbindung näher charakterisiert wurde. Der hierbei ermittelte IC_{50} -Wert, sowie die Werte der entsprechenden Nitro-substituierten Derivate aus dem Virtuellen Screening, sind in Tabelle 9.1 zusammengefasst.

Der für die Nitro-substituierte Leitstruktur ermittelte IC_{50} -Wert von 5,79 μM weist auf eine relativ gute inhibitorische Aktivität hin und zeigt weiterhin, in einem Vergleich mit den Verbindungen PR2, PR8 und PR51 aus dem virtuellen Screening, dass die Einführung einer Hydroxygruppe die inhibitorische Aktivität leicht verschlechtert (IC_{50} -Werte zwischen 8,03 μM und 18,4 μM). Man kann anhand dieser Daten, zusammen mit den Daten des Screenings, vermuten, dass eine Substitution am Benzyliden-Rest bevorzugt in *para*- oder *ortho*- Position erfolgen sollte, da die *meta*-substituierten Verbindungen im Vergleich jeweils das schlechteste Ergebnis aufweisen. Auch die Einführung eines 2-Hydroxynaphthyl-Restes führt mit einem IC_{50} -Wert von 6,54 μM zu einer minimalen Verschlechterung der inhibitorischen Aktivität gegenüber der entsprechenden Leitstruktur. Da vorherige Daten jedoch zeigten, dass größere planare

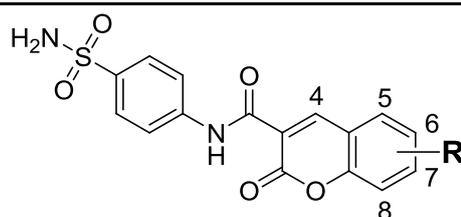
Reste die Aktivität verbessern, deutet dies, wie auch die verringerte Aktivität durch die Einführung der Hydroxygruppe, darauf hin, dass eine polare Gruppe an diesem Rest nicht gut toleriert wird. Lediglich der 3-Phenoxybenzyliden-Rest in Verbindung PR53 konnte die inhibitorische Aktivität mit einem IC_{50} -Wert von 3,99 μ M gegenüber der Leitstruktur leicht verbessern.

Tabelle 9.1: Aktivitäten der Nitro-substituierten Hydrazin-Derivate

		
	R	$IC_{50} \pm SEM$ [μM]
MAF74		5.79 \pm 1.77
PR8		9.46 \pm 2.00
PR2		18.4 \pm 1.7
PR51		8.03 \pm 0.61
PR52		6.54 \pm 0.26
PR53		3.99 \pm 1.46

9.3.3 Cumarin-Derivate

Für alle 11 im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Cumarin-Derivate konnte im Screening eine signifikante Inhibition bestimmt werden. Sieben dieser Derivate zeigten sowohl bei einer Konzentration von 100 μ M als auch bei 10 μ M eine gute inhibitorische Aktivität von $>50\%$ und wurden daher mittels Aufnahme von Konzentrations-Inhibitionskurven näher charakterisiert. Die hieraus ermittelten IC_{50} -Werte sind in Tabelle 9.2 zusammengefasst.

Tabelle 9.2: Aktivitäten der Cumarin-Derivate


	R	IC₅₀ ± SEM [μM] (% Inhibition ± SEM bei 10 μM)
MAF43	-	2.21 ± 0.26
MAF44	6-Chlor	1.90 ± 0.21
MAF46	6-Brom	2.85 ± 0.80
MAF56	6-Methyl	9.41 ± 1.83
MAF84	6-Hydroxy	8.54 ± 1.43
MAF47	6-Nitro	8.60 ± 0.61
MAF48	7-Methoxy	(27 ± 2)
MAF50	7-N,N-Diethyl	13.8 ± 7.5
MAF78	7-O-Benzyl	(45 ± 10)
PR77	8-Methoxy	16.6 ± 2.6
MAF49	8-Ethoxy	(35 ± 4)
MAF81	8-O-Benzyl	(17 ± 5)
PR79	6,8-Dichlor	(11 ± 4)

Die Ergebnisse der Konzentrations-Inhibitionskurven zeigen, dass das unsubstituierte Cumarin-Derivat (MAF 43) zu den potentesten Verbindungen gehört mit einem IC₅₀-Wert von 2,21 μM. Lediglich die in Position 6 Halogen-substituierten Derivate zeigen eine ähnlich hohe Aktivität, wobei das Chlor-substituierte Derivat (MAF44) mit einem

IC₅₀-Wert von 1,90 µM minimal besser und das Brom-substituierte Derivat (MAF46) mit 2,85 µM minimal schlechter ist.

Alle weiteren Substitutionen, die bisher durchgeführt wurden, verringerten die Aktivität bezogen auf das unsubstituierte Derivat.

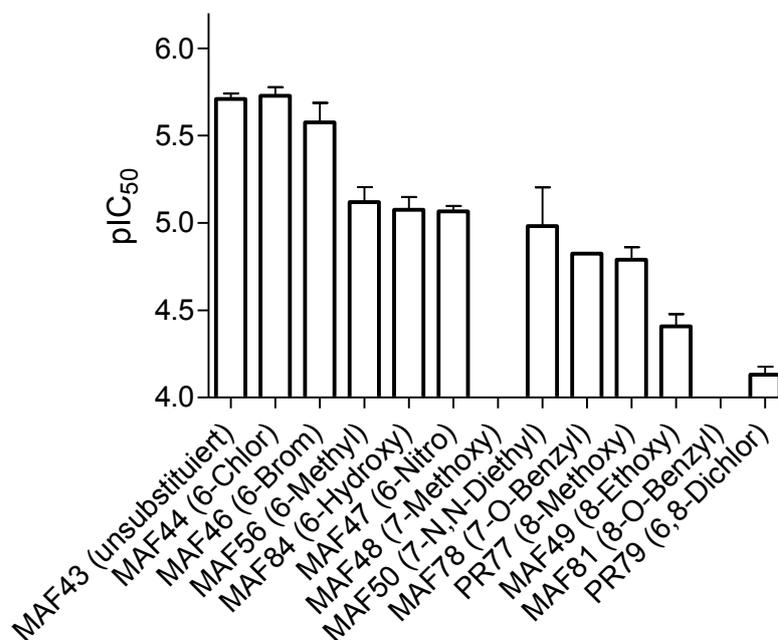


Abbildung 9.3: Vergleich der pIC₅₀-Werte der Coumarin-Derivate

Hierbei lässt sich jedoch sagen, dass eine Substitution in Position 6 generell noch am besten toleriert wird. Diese sind zum einen das Methylsubstituierte Derivat (MAF56) mit einem IC₅₀-Wert von 9,41 µM, das Hydroxy-substituierte Derivat (MAF84) mit 8,54 µM und das Nitro-substituierte Derivat (MAF47) mit 8,60 µM. In Position 7 wird ein Diethylamino-Rest (MAF50) mit einem IC₅₀-Wert von 13,8 µM noch ganz gut toleriert. Ein O-Benzyl-Rest in dieser Position zeigt eine leicht schlechtere Inhibition von 45% bei 10 µM und ein Methoxy-Rest in dieser Position bewirkt eine deutlich verringerte Aktivität mit nur noch 27% Inhibition bei 10 µM. In Position 8 wird ein Methoxy-Rest (PR77) mit einem IC₅₀-Wert von 16,6 µM noch am besten toleriert. Bereits die Einführung eines Ethoxy-Restes verringert die inhibitorische Aktivität auf 35 % Hemmung bei 10 µM, und die Einführung eines O-Benzyl-Restes führt zu einer weiteren Verringerung auf 17%. Ebenfalls führte die Einführung eines zweiten Chlorsubstituenten

in die bisher beste Verbindung MAF44 zu einem beinahe vollständigen Verlust der Aktivität. So konnten bei Verbindung PR79 nur noch 11% Inhibition bei 10 μM festgestellt werden.

9.4 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieses Projektes wurde die zuvor synthetisierte Sulfonamid-Bibliothek mit Hilfe des Radio-Assays der eN untersucht. Durch das zunächst durchgeführte Screening wurden aus den 80 getesteten Verbindungen 10 ausgewählt die mit Hilfe von Konzentrations-Inhibitions-Kurven näher untersucht wurden. Diese Studie lieferte detaillierte Struktur-Wirkungsbeziehung für die neue Klasse der Sulfonamid-Derivate als eN-Inhibitoren.

Die ermittelten Inhibitions- und IC_{50} -Werte zeigten, dass es uns leider nicht gelungen ist, die inhibitorische Aktivität durch die hier durchgeführten Variationen deutlich zu verbessern.

Daher wurden einige weitere Ideen für strukturelle Veränderungen, in Zusammenarbeit mit Norbert Furtmann aus dem Arbeitskreis von Herrn Prof. Bajorath, in dem Modell der Ecto-5'-Nucleotidase gedockt. Diese Dockingstudie konnte unsere Beobachtungen, dass die Nitrogruppe einen positiven Effekt ausübt, sowie den Vorteil von bicyclischen aromatischen Substituenten bestätigen. Weiterhin könnte zum Beispiel die Einführung eines Sulfonsäure-Restes, anstelle des Sulfonamids die Interaktion mit dem aktiven Zentrum verbessern. Auch die Einführung eines basischen Substituenten an den aromatischen Rest könnte sich als hilfreich erweisen, da dieser eventuell eine Salzbrücke zu Asp524 ausbilden könnte.

10 Zusammenfassung

Die Ecto-5'-Nucleotidase (CD73, eN), ein Enzym der Familie der Ectonucleotidasen, wird ubiquitär im Körper exprimiert. Das Enzym wird bei verschiedenen pathophysiologischen Prozessen, vor allem bei Hypoxie, Entzündungsreaktionen und Krebs, stark hochreguliert. Damit stellt die eN eine vielversprechende Zielstruktur für die Entwicklung neuer Arzneistoffe, insbesondere für die Immunchemotherapie von Krebs, dar. Inhibitoren können zum einen direkt auf das Tumorstadium, die Angiogenese und die Metastasierung einwirken und diese Prozesse hemmen, darüber hinaus können sie aber auch als Immuntherapeutika eingesetzt werden und somit die Effektivität anderer cytostatischer Behandlungsmethoden signifikant verbessern. Neben der Rolle der eN bei Krebserkrankungen rückt auch das therapeutische Potential bei Erkrankungen des zentralen Nervensystems immer mehr in den Fokus der Forschung. Durch die Co-Lokalisation von eN und A_{2A} -Rezeptoren zeigen eN-Inhibitoren ein Potential für die Behandlung von Morbus Alzheimer und neurodegenerativen Erkrankungen. Darüber hinaus kann durch den Einfluss der eN auf die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke das Eindringen z.B. von entzündlichen Immunzellen gesteuert werden.

Besonders gut als Arzneistoffe geeignet sind kleine Moleküle, die dazu in der Lage sind, Zellmembranen zu überwinden und die somit gut an ihre Zielorte transportiert werden können. Bisher sind nur wenige Inhibitoren der eN beschrieben, welche zudem wenig potent und kaum selektiv sind. Die Erforschung und Identifizierung neuer Inhibitoren, sowie deren strukturelle Optimierung erfordert zunächst geeignete Methoden zur Aktivitätsbestimmung des Enzyms. Die Etablierung eines eN-Assays wird erschwert durch den niedrigen K_M -Wert des Enzyms für das Hauptsubstrat AMP (deutlich unter 50 μ M). Dies erfordert eine hohe Assay-Sensitivität mit niedriger Nachweisgrenze.

10.1 Malachitgrün-Assay

Der Malachitgrün-Assay, eine kolorimetrische Methode, erlaubt die Detektion des bei der enzymatischen Hydrolyse entstehenden Phosphats. Durch Optimierung bisher beschriebener Methoden gelang es im Rahmen der vorliegenden Arbeit, die Empfindlichkeit der Methode deutlich zu verbessern. Dies ermöglicht nun den Einsatz einer relativ geringen Substratkonzentration, was vor allem für die Untersuchung kompetitiver Inhibitoren von Vorteil ist. Der entwickelte Assay zeigt ein großes Messfenster und ist mit einem Z' -Faktor von 0,8 robust, reproduzierbar und für die Durchführung von Hochdurchsatzverfahren geeignet.

10.2 Radiometrischer Assay

Über die Optimierung des Malachitgrün-Assays hinaus konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein ganz neuer, radiometrischer eN-Assay entwickelt, optimiert und validiert werden. Das Prinzip dieses Assays beruht auf der selektiven Präzipitation des radioaktiv markierten Substrats AMP (Tritiierung im Adenin-Ring) und dessen Abtrennung vom ungeladenen Produkt Adenosin mit Hilfe eines Zellharvesters mit spezieller Auffangeinheit für das Filtrat. Das separierte Produkt kann anschließend mittels Flüssigszintillation quantifiziert werden. Dieser Assay ermöglicht es, aufgrund der hohen Empfindlichkeit sogar mit Substratkonzentrationen deutlich unterhalb des K_M -Wertes zu arbeiten. Dies ermöglicht auch die Identifizierung schwach wirksamer oder schlecht wasserlöslicher Substrate. Mit einem Z' -Faktor von 0,7 zeigt auch diese Methode eine hohe Robustheit und kann für die Durchführung von Hochdurchsatzverfahren genutzt werden.

Ein weiterer Vorteil dieses neuen eN-Assays liegt darin, dass die Quantifizierung durch farbige Komponenten (beispielsweise durch die eingesetzten Inhibitoren) oder Proteinfragmente (beispielsweise bei der Verwendung von Membranpräparationen anstelle des gelösten Enzyms) nicht gestört wird, wie dies bei spektroskopischen Methoden, wie dem Malachitgrün-Assay, der Fall ist.

10.3 Vergleich verschiedener Testsysteme

Die Vor- und Nachteile der im Rahmen der vorliegenden Arbeit optimierten Assay-Verfahren gegenüber bisher beschriebenen Methoden sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Tabelle 10.1: Vor- und Nachteile der vorgestellten und in der Literatur beschriebenen eN-Assays

Testsystem	Sensitivität	HTS geeignet	Im Plattenformat durchführbar	Natürliches Substrat ^a	Direkter Produkt nachweis
Malachitgrün-Assay	-	+	+	+	-
Radiometrischer Assay	+	+	(+) ^b	+	+
CE-Methode ^{75;81}	-	-	-	+	+
HPLC-Meth. ^{148; 161}					
Luciferase-Assay ^c	-	+	+	+	-
Enzymgekoppelter Barthelot-Assay ^d	-	?	+	+	-

^a Die Verwendung des natürlichen Hauptsubstrats AMP ist von Vorteil, da manche Inhibitoren eine Substrat-abhängige Potenz zeigen.

^b Bisher nicht etabliert, wäre aber prinzipiell möglich nach Entwicklung einer Platte zum Auffangen des Filtrats

^c Bestimmung der Abnahme der AMP-Konzentration, welche die Luciferase-Reaktion verstärkt und damit das Lumineszenzsignal erhöht. ¹⁶⁰

^d Bei der Barthelot-Methode wird das entstandene Adenosin mit dem Hilfsenzym Adenosindeaminase zu Inosin weiter umgesetzt. Bei dieser Reaktion frei gesetztes Ammoniak wird mittels alkalischer Hypochlorit-Phenol-Reaktion zu einem farbigen Produkt umgesetzt, welches kolorimetrisch bestimmt wird. ¹⁵⁸⁻¹⁵⁹

10.4 Untersuchung einer Substanzbibliothek

Im Rahmen einer Screening-Kampagne wurde eine Subbibliothek der institutseigenen Substanzbibliothek untersucht. Nach einem Screening von 321 Verbindungen bei einer Konzentration von 10 μM wurden 14 Treffer identifiziert und näher charakterisiert. Diese zeigten alle eine inhibitorische Aktivität im niedrigen mikromolaren Bereich. Die meisten der untersuchten Hit-Substanzen ließen sich dabei zwei Strukturklassen zuordnen: den N,N-Dimethylumazin-Derivaten und den bityklischen Pyrimidin-2-amin-Derivaten.

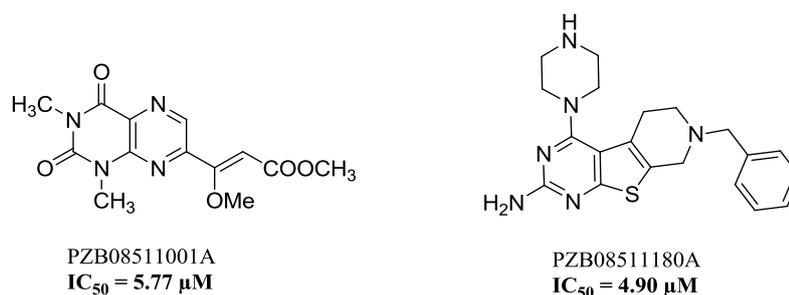


Abbildung 10.1: Die jeweils besten Verbindungen der Strukturklassen der N,N-Dimethylumazin-Derivate (PZB08511001A) und der bityklischen Pyrimidin-2-amin-Derivate (PZB08511180A).

Basierend auf den in dieser Arbeit beschriebenen ersten Struktur-Wirkungsbeziehungen sollen zukünftig weitere Derivate dieser Verbindungsklassen hergestellt und untersucht werden. Des Weiteren würde es sich anbieten, strukturell ähnliche Xanthin- und Alloxanthin-Derivate in die Untersuchungen mit einzubeziehen.

10.5 α,β -Methylen-ADP-Derivate

Ausgehend von dem bisher potentesten beschriebenen eN-Inhibitor Adenosin- $[\alpha,\beta$ -methylene]diphosphat (AOPCP) wurden von Sanjay Bhattarai (AK Prof. Müller) Derivate synthetisiert, die Modifikationen in den Purin-Positionen 2, 6, 8 und N^6 der Ribose-Partialstruktur und der Phosphatkette aufweisen. Diese Derivate wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf ihre inhibitorische Wirkung gegenüber der eN charakterisiert. Basierend auf diesen Ergebnissen war es uns möglich, detaillierte Struktur-Wirkungsbeziehungen aufzustellen und die Verbindungen entscheidend zu optimieren.

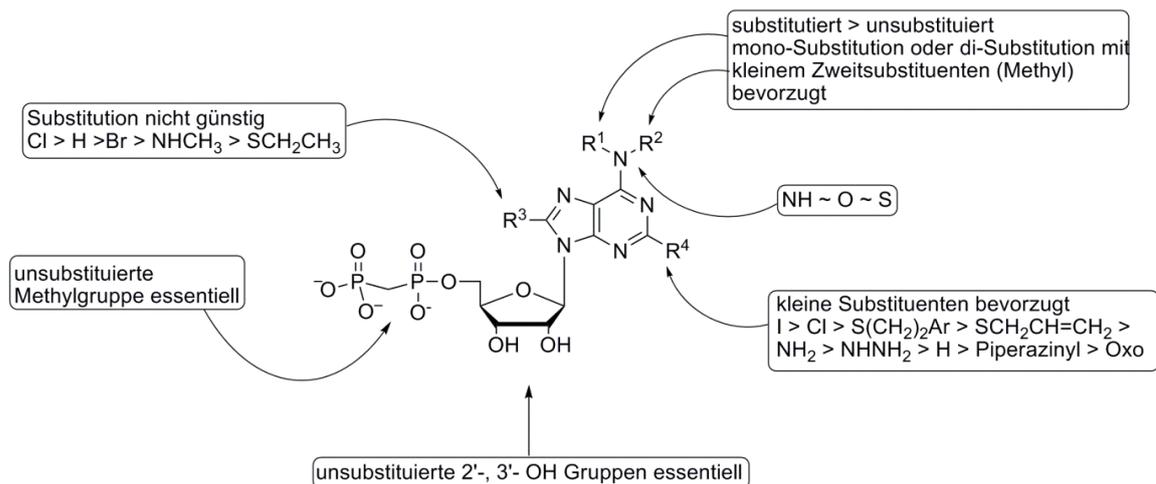


Abbildung 10.2: Struktur-Wirkungsbeziehungen der AOPCP-Derivate

Substituenten am N^6 zeigten den stärksten Einfluss auf die inhibitorische Aktivität. Durch die Einführung aromatischer Reste (Benzyl, Phenethyl) in dieser Position, konnten wir K_i -Werte im einstellig nanomolaren Bereich erhalten. Durch Kombination von N^6 - und 2-Substitutionen (mit kleinen polaren Resten) konnte eine weitere Steigerung der inhibitorischen Potenz erzielt werden. Auf diese Weise erhielten wir Verbindungen mit Inhibitionskonstanten im subnanomolaren Bereich.

Als potenteste Verbindung der AOPCP-Derivate wurde Verbindung **97** mit einem K_i -Wert von 0.341 nM identifiziert. Die Verbindung zeigt damit eine um den Faktor 600 verbesserte inhibitorische Potenz gegenüber der Leitstruktur AOPCP ($K_i = 197$ nM).

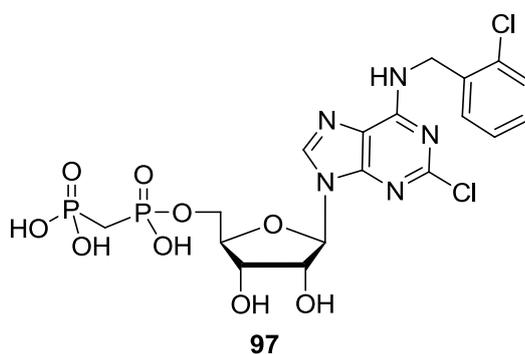


Abbildung 10.3: Das potenteste AOPCP-Derivat an der Rattenpräparation der Ecto-5'-Nucleotidase mit einem K_i -Wert von 0.341 nM (Vergleich Leitstruktur AOPCP: $K_i = 197$ nM)

10.6 Sulfonamid-Derivate

Obwohl die von uns optimierten AOPCP-Derivate eine sehr starke inhibitorische Potenz und darüber hinaus eine sehr gute Selektivität gegenüber anderen Nucleotidasen aufweisen, sind sie für den Einsatz als perorale Arzneimittel problematisch, da sie aufgrund des Phosphat-Restes bei physiologischen pH-Werten negativ geladen sind. In dieser Form sind sie nicht in der Lage, Zellmembranen zu überwinden und sind somit nicht peroral bioverfügbar. Daher wurde neben der Optimierung der AOPCP-Derivate an der Optimierung einer weiteren Strukturklasse von eN-Inhibitoren gearbeitet. Mithilfe eines virtuellen Screenings unter Verwendung eines Homologie-Modells der eN und anschließender In-vitro-Untersuchung der identifizierten Hits konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit Sulfonamide als neue eN-Inhibitor-Klasse beschrieben werden. Es wurden die folgenden neuen Leitstrukturen identifiziert.

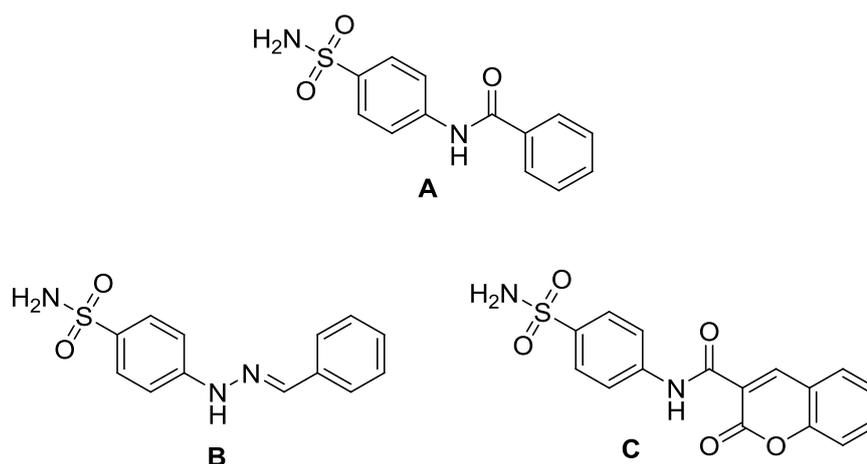


Abbildung 10.4: Leitstrukturen für die Optimierung von Sulfonamid-Derivaten als Inhibitoren der Ecto-5'-Nucleotidase. **A:** *N*-Sulfamoylphenylbenzamid; **B:** 4-(2-Benzylidenhydrazinyl)benzenesulfonamid; **C:** 2-Oxo-*N*-(4-sulfamoylphenyl)-2*H*-chromen-3-carboxamid

Ausgehend von diesen Leitstrukturen wurde eine Bibliothek von 80 Sulfonamid-Derivaten synthetisiert. Durch Optimierung bekannter Synthesestrategien, konnten die in Rahmen dieser Arbeit dargestellten Verbindungen überwiegend in sehr guten Ausbeuten erhalten werden.

Die pharmakologische Charakterisierung dieser Sulfonamid-Bibliothek erlaubte die Aufstellung erster Struktur-Wirkungsbeziehungen (SAR). Die Kernaussagen dieser SAR-Analyse sind in der folgenden Abbildung zusammengefasst.

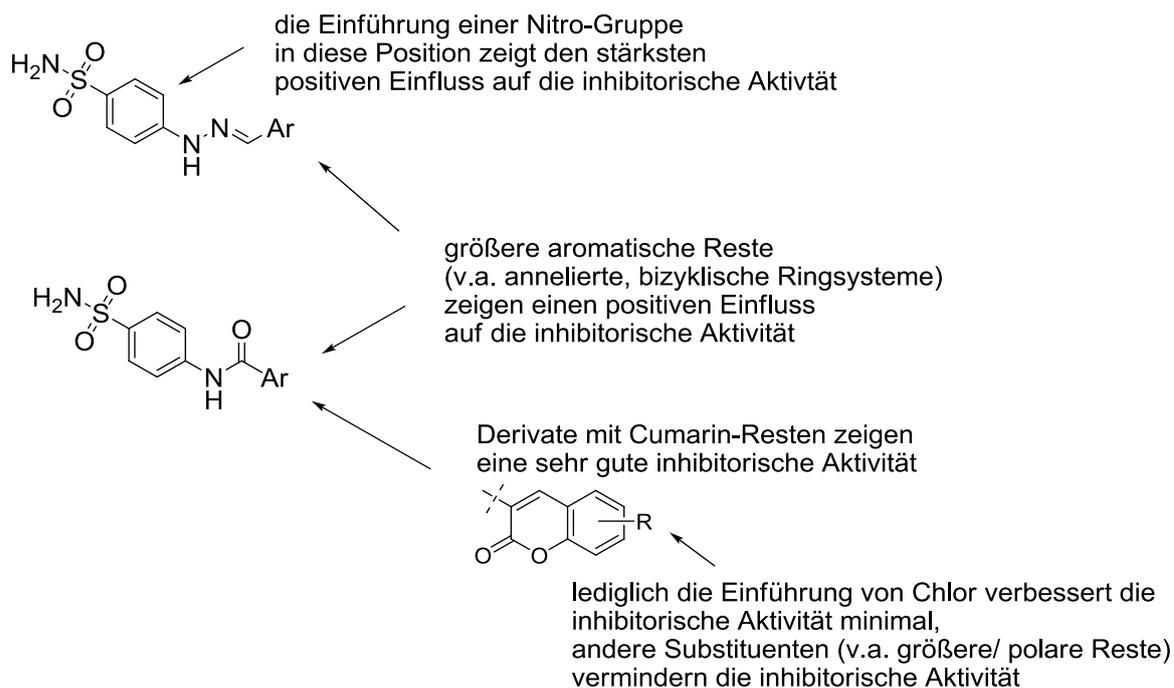


Abbildung 10.5: Zusammenfassung der Struktur-Wirkungsbeziehungen der Sulfonamid-Derivate als eN-Inhibitoren

Die jeweils potentesten Verbindungen der Hydrazin- und Cumarin-Serie zeigten inhibitorische Aktivitäten im niedrigen mikromolaren Bereich.

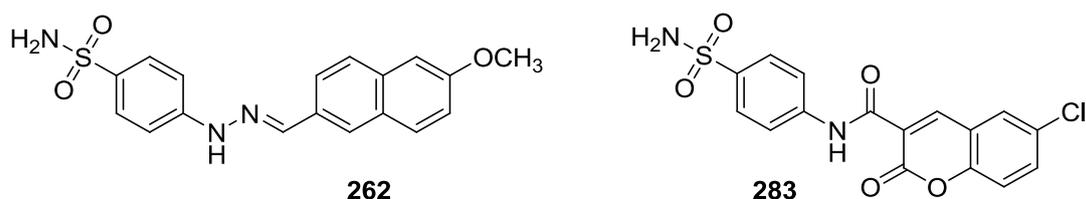


Abbildung 10.6: Potenteste Verbindungen in der Gruppe der Sulfonamid-Derivate; **262** (MAF77): $IC_{50} = 1,66 \mu M$; **283** (MAF44): $IC_{50} = 1,90 \mu M$

Darüber hinaus konnte der durch die Docking-Studie postulierte kompetitive Hemmmechanismus für Verbindung **262** auch in vitro bestätigt werden.

Zukünftig sollte die Rolle der Nitro-Gruppe in Position 3 des Benzensulfonamid-Ringes genauer untersucht werden. Diese könnte in die Leitstruktur der Cumarine eingeführt werden, um zu untersuchen, ob für diese Verbindungsklasse derselbe Effekt einer Wirkungssteigerung beobachtet werden kann. Um zu überprüfen, ob der

aktivitätssteigernde Effekt durch die Erhöhung des Säurecharakters des Sulfonamids zustande kommt, könnten auch entsprechende Sulfonsäure-Derivate dargestellt und untersucht werden.

Mit der vorliegenden Arbeit konnten wir die Entwicklung und Charakterisierung von Ecto-5'-Nucleotidase-Inhibitoren wesentlich voran bringen. Zunächst gelang es uns, Testsysteme zu etablieren und zu optimieren, die für Hochdurchsatz-Screeningverfahren geeignet sind und darüber hinaus eine deutlich verbesserte Empfindlichkeit gegenüber bisher beschriebenen Methoden zeigen. Weiterhin konnten wir durch systematische Optimierung von AOPCP-Derivaten die ersten hoch potenten, selektiven Inhibitoren erhalten. Mit Hilfe eines virtuellen Screeningansatzes konnten wir neue, nicht geladene Leitstrukturen identifizieren und durch Synthese einer Substanzbibliothek deren Struktur-Wirkungsbeziehungen analysieren. Damit stehen pharmakologische Tool-Verbindungen zur Verfügung, mit denen das therapeutische Potential der eN-Hemmung ausgelotet werden kann.

11 Experimenteller Teil

11.1 Allgemeine Angaben zur pharmakologischen Testung

11.1.1 Software

Microsoft Office 2007 (Excel, Word, Power Point)

ChemBioDraw Ultra 11.0.1. Cambridge Software

Win-NMR 6.2.0.0. Bruker Daltonik GmbH

GraphPad Prism 5.01. GraphPad Software, San Diego, Californien, USA

11.1.2 Chemikalien und Geräte

11.1.2.1 Geräte und Materialien

Analysenwaage	Sartorius CP225D
Autoklav	Varioklav® Dampfsterilisator, H + P Systec 3850 ELV
Gefrierschränk -80 °C	U570, New Brunswick Scientific
Gefrierschränk -20 °C	Bosch
Glasfaserfilter	GF/B, Brandell
Harvester	Brandell M-24 Brandell M-48
Individual Collection Box	Brandell

Liquid Scintillation Counter	TRICARB 2900 TR, Canberra Packard/Perkin-Elmer
Maxi-Vials	Roth-Messflaschen Typ Vial 20 ml, Roth
Mehrkanalpipette	Mettler Toledo Multi Mate 5-50 μ l
Midi-Vials, 8mL	Perkin Elmer
Mikrotiterplatten (96 MicroWell Plates, clear, flat bottom)	Sarstedt
Mithras LB 940	Berthold
Multipette	Eppendorf Multipette® Plus Brand Handy Step
PE-vials 3,5 mL und 13 mL	Sarstedt
pH-Meter	Metrohm, 691 pH Meter
Pipetten	Eppendorf Research 1-10 μ l Eppendorf Research 10-100 μ l Eppendorf Research 100-1000 μ l
Pipettenspitzen	Sarstedt
Rührer mit Heizplatte	IKA Labortechnik RCT basic
Safe-Lock-Reaktionsgefäße	Eppendorf
Schüttelwasserbad	GFL 1083
Thermomixer	HLC
Ultraschallbad	Bandelin SONOREX RK 52H
Vortex	Unimag ZX3, UniEquip Laborgerätebau- und Vertriebs GmbH, Planegg

11.1.2.2 Chemikalien

Adenosin			Sigma-Aldrich A 9251
Adenosin-5'-monophosphat Hexahydrat	Dinatriumsalz	(AMP-Na ₂)	Sigma A1752
Adenosin-5'-O-(α , β -methylen)diphosphat 10 mM wässrige Stammlösung	Natriumsalz		Biolog Life Science Institute
Adenosin-5'-diphosphat Monohydrat	Dintariumsalz	(ADP-Na ₂)	Sigma A2754
Calciumchlorid-Dihydrat			Fluka 21097
Dimethylsulfoxid			Roth 4720.3
Ethanol p.a.			Merck 1.00983.1000
N-(Hydroxyethyl)piperazin-N'-(ethansulfonsäure) (HEPES)			Roth 3105.4
Lanthan-(III)-chlorid			Roth 3979.1
Magnesiumchlorid-Hexahydrat			Fluka 63068
Malachitgrünoxalat			Sigma Aldrich
Natriumacetat			Fluka 71183
Natriumchlorid			Roth 9265.1
di-Natriumhydrogenphosphat			AppliChem A 1046.O500
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)			Roth 5429.3
Tween 20			AppliChem A 1389
Ultima Gold XR Szintillationscocktail			Perkin Elmer

11.1.2.3 Testverbindungen

MAF -Verbindungen	Selbst synthetisierte Verbindungen
SB -Verbindungen	Verbindungen hergestellt von Sanjay Bhattarai, Arbeitskreis Frau. Prof. Dr. Christa E. Müller, Bonn
PR -Verbindungen	Verbindungen die im Rahmen des Virtual Screening Projektes kommerziell erworben wurden
HER -Verbindungen	Verbindungen hergestellt im Arbeitskreis Herr Prof. Dr. Piet Herdewijn, Leuven, Belgien

11.1.2.4 Enzym

Ratten-Ecto-5'-Nucleotidase	Prof. Dr. Herbert Zimmermann, AK Neurochemie, Biozentrum der J.W. Goethe-Universität, Frankfurt
GSH-Aga-Eluat dial. 2 mM Hepes pH 7,4	
0,26 mg/ml	

11.1.2.5 Radioliganden

- [2,8-³H] Adenosin 5'-monophosphat (Lösung in Ethanol : Wasser 1:1) spezifische Aktivität 22,9 Ci/mmol, Konzentration 1,0 mCi/ml, MT-618, Hartmann Analytic GmbH
- [2-³H] Adenosin (wässrige Lösung mit 0,1 % Ethanol) spezifische Aktivität 23 Ci/mmol, Konzentration 1,0, TRK 423, Amersham Biosciences mCi/ml

11.1.2.6 Puffer und Lösungen

Enzympuffer zur Aufbewahrung von Enzymverdünnungen

HEPES	$M_r = 238,30 \text{ g/mol}$	40 mM	953 mg
Iodacetamid	$M_r = 184,96 \text{ g/mol}$	4 mM	74 mg
Wasser (millipore)			100 ml

Der pH-Wert wird auf 7,4 eingestellt und der Puffer unmittelbar vor der Verwendung im Verhältnis 1:1 mit Glycerol gemischt. Die Lagerung erfolgt bei 4°C.

Assaypuffer für Malachitgrün-Assay

TRIS	$M_r = 121,14 \text{ g/mol}$	25 mM	303 mg
$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$	$M_r = 203,30 \text{ g/mol}$	2 mM	41 mg
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	$M_r = 147,01 \text{ g/mol}$	1 mM	15 mg
NaCl	$M_r = 58,44 \text{ g/mol}$	140 mM	818 mg
Wasser (millipore)			100 ml

Der Puffer wird auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt und bei 4 °C gelagert.

Assaypuffer für den Radioaktiv-Assay

TRIS	$M_r = 121,14 \text{ g/mol}$	25 mM	303 mg
NaCl	$M_r = 58,44 \text{ g/mol}$	140 mM	818 mg
Na_2HPO_4	$M_r = 141,96 \text{ g/mol}$	50 mM	710 mg
Wasser (millipore)			100 ml

Der Puffer wird auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt und bei 4 °C gelagert.

Fällungspuffer

LaCl ₃	M _r = 371,37 g/mol	100 mM	18,6 g
NaOAc	M _r = 82,02 g/mol	100 mM	4,1 g
Wasser (Millipore)			500 ml

Der Puffer wird auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt und bei 4 °C gelagert.

Malachitgrün-Farbstofflösung

Um eine Endkonzentration von Malachitgrün im Assay von 120 µM zu erreichen, wird zunächst eine 0,6 mM Farbstofflösung hergestellt. Hierzu werden 5,6 mg Malachitgrünoxalat in einer Lösung von 0,313 ml 20%iger Tween Lösung in 19,687 ml Millipore Wasser gelöst. Das Detergenz Tween 20, in einer Endkonzentration von 0,0775% verhindert eine Präzipitation des gebildeten Farbstoffkomplexes im Assay. Durch den Verdünnungsschritt beim Pipettieren in die 96-Well-Platte können die geforderten Endkonzentrationen erreicht werden.

Ammoniummolybdat-Lösung

Um eine Endkonzentration von 6 mM Ammoniummolybdat und 0,45 M Schwefelsäure im Assay zu erreichen, wird zunächst eine 20 mM Ammoniummolybdat-Lösung in 1,5 M Schwefelsäure hergestellt. Hierzu werden 494 mg Ammoniummolybdat in 20 ml einer 1,5 M Schwefelsäure gelöst. Durch den Verdünnungsschritt beim Pipettieren in die 96-Well-Platte kann die geforderte Endkonzentration erreicht werden.

11.2 Malachitgrün-Assay

11.2.1 Kalibrierung des Testsystems

Die Kalibrierung des Testsystems wird durchgeführt, um die Nachweisgrenze und Empfindlichkeit des Systems zu bestimmen. Für die Erstellung einer Kalibriergerade wird eine Natriumhydrogenphosphat-Stammlösung von 10 mM hergestellt und aus dieser nach folgendem Schema verdünnt.

Endkonzentration	Volumen	Volumen
Na₂HPO₄	Phosphatlösung	Assaypuffer / DMSO 10%
100 µM	20 µl Stammlösung	180 µl
75 µM	100 µl 100 µM	33 µl
50 µM	100 µl 75 µM	50 µl
25 µM	100 µl 50 µM	100 µl
12,5 µM	100 µl 25 µM	100 µl
7,5 µM	100 µl 12,5 µM	66 µl

Anschließend wird nach folgendem Schema in die 96-Well-Platte pipettiert:

Assaypuffer	90 µl
Na ₂ HPO ₄ -Verdünnung	10 µl
Ammoniummolybdat-Lösung	60 µl
Malachitgrün-Lösung	40 µl

Nach Zugabe der Farbstofflösung wird für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, damit sich der Farbstoff-Phosphat-Komplex vollständig ausbilden kann. Hierbei ist wichtig, dass die Inkubationszeit immer gleich gewählt wird, da sich die Intensität des Farbkomplexes im Verlauf der Zeit ändert. Zunächst ist die Farbintensität relativ schwach, wird mit vollständiger Ausbildung des Komplexes intensiver, nach gewisser Zeit jedoch nimmt sie wieder ab, da es zu einer Alterung des Komplexes und dadurch zu einer Präzipitation kommt. Im Anschluss an die Inkubation des Farbkomplexes wird die Absorption bei einer Wellenlänge von 620 nm gemessen. Für jede Konzentration wird eine Dreifachbestimmung durchgeführt und der Versuch in zwei unabhängigen Versuchen für die Bestätigung der Daten wiederholt.

Das Experiment wird mit dem Programm PRISM® ausgewertet. Aus der resultierenden Geraden lässt sich der LOD-Wert bestimmen.

11.2.2 Bestimmung der optimalen Enzymkonzentration

Für die Bestimmung der optimalen Enzymkonzentration wird eine Enzymtitration durchgeführt. Hierzu wird aus der Enzym-Stammlösung von 100 µg/ml wie folgt verdünnt.

Endkonzentration	Volumen	Volumen
eN	Stammlösung	Assaypuffer
0,5 µg/ml	10 µl	190 µl
1 µg/ml	40 µl	360 µl
1,5 µg/ml	15 µl	85 µl
2,0 µg	20 µl	80 µl
2,5 µg/ml	25µl	75 µl

Das Substrat wird in einer Konzentration von 25 μM (entsprechend dem in der Literatur angegebenen K_M -Wert) eingesetzt.

Anschließend wird nach dem folgenden Schema in die 96-Well-Platte pipettiert, wobei die Platte zunächst nach Zugabe von Assaypuffer und Substrat für etwa 10 Minuten bei 37 °C vorinkubiert wird und dann die Enzymreaktion durch Zugabe des Enzyms gestartet wird.

Assaypuffer	80 μl
AMP	10 μl
eN	10 μl
Ammoniummolybdat-Lösung	60 μl
Malachitgrün-Lösung	40 μl

Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 37 °C wird die Enzymreaktion durch Zugabe der sauren Ammoniummolybdat-Lösung gestoppt. Durch die anschließende Zugabe der Malachitgrün-Lösung bildet sich der Farbstoff-Phosphat-Komplex, dessen Absorption nach weiteren 15 Minuten Inkubation bei einer Wellenlänge von 620 nm gemessen wird. Für jede Konzentration wird eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

Das Experiment wird mit dem Programm PRISM® ausgewertet. Aus der resultierenden Geraden lässt sich der LOD-Wert bestimmen.

11.2.3 Michaelis-Menten-Plot

Die Aufnahme eines Michaelis-Menten-Plots dient der Bestimmung von K_M - und V_{max} -Werten. Diese Werte geben die Aktivität und somit die Umsatzrate des Enzyms wieder und werden daher auch für die Bestimmung der optimalen Substratkonzentration bei der Untersuchung kompetitiver Inhibitoren eingesetzt. Für die Aufnahme des Michaelis-Menten-Plots wird ausgehend von einer 100 mM AMP-Stammlösung entsprechend dem folgenden Schema verdünnt:

Endkonzentration	Volumen	Volumen
AMP	AMP-Lösung	Assaypuffer / DMSO 10%
1000 μM	40 μl Stammlösung	360 μl
750 μM	200 μl 1000 μM	66 μl
500 μM	200 μl 1000 μM	100 μl
250 μM	200 μl 500 μM	200 μl
100 μM	200 μl 250 μM	300 μl
50 μM	200 μl 100 μM	200 μl
25 μM	200 μl 50 μM	200 μl
10 μM	200 μl 25 μM	300 μl

Anschließend wird nach dem folgenden Schema in die 96-Well-Platte pipettiert, wobei die Platte zunächst nach Zugabe von Assaypuffer und Substrat für etwa 10 Minuten bei 37 °C vorinkubiert und dann die Enzymreaktion durch Zugabe des Enzyms gestartet wird.

Assaypuffer	80 μl
AMP	10 μl
eN	10 μl
Ammoniummolybdat-Lösung	60 μl
Malachitgrün-Lösung	40 μl

Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 37 °C wird die Enzymreaktion durch Zugabe der sauren Ammoniummolybdat-Lösung gestoppt. Durch Zugabe der Malachitgrün-Lösung bildet sich der Farbstoff-Phosphat-Komplex, dessen Absorption nach weiteren

15 Minuten Inkubation bei einer Wellenlänge von 620 nm gemessen wird. Für jede Konzentration wird eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

Das Experiment wird mit dem Programm PRISM® ausgewertet. Aus der resultierenden Sättigungskurve lassen sich der K_M - und der V_{max} -Wert bestimmen.

11.2.4 Enzymkinetik

Die Aufnahme einer Enzymkinetik dient der Optimierung der Inkubationszeit und stellt hiermit sicher, dass die Enzymreaktion im linearen Bereich durchgeführt wird, die Menge an umgesetztem Substrat einen Wert von 20% jedoch nicht überschreitet. Für die Bestimmung der Enzymkinetik wird die Enzymreaktion nach unterschiedlichen Inkubationszeiten zwischen 5 und 30 Minuten gestoppt. Das Substrat wird hierbei in einer Konzentration von 25 μM eingesetzt und das Enzym in einer Konzentration von 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Für die Durchführung dieses Experiments wurde entsprechend dem folgenden Schema in die 96-Well-Platte pipettiert, wobei die Platte zunächst nach Zugabe von Assaypuffer und Substrat für etwa 10 Minuten bei 37 °C vorinkubiert wird und dann die Enzymreaktion durch Zugabe des Enzyms gestartet wird.

Assaypuffer	80 μl
AMP	10 μl
eN	10 μl
Ammoniummolybdat- Lösung	60 μl
Malachitgrün-Lösung	40 μl

Die Enzymreaktion wurde nach 5, 10, 15, 20, 25 und 30 Minuten jeweils durch Zugabe der sauren Ammoniummolybdatlösung gestoppt. Anschließend wurde 15 Minuten nach Zugabe der Malachitgrün-Farbstofflösung die Absorption bei 620 nm gemessen.

Für jede Inkubationszeit wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

Für die Auswertung des Experiments werden zunächst die erhaltenen Absorptionswerte durch Verrechnung mit einer simultan aufgenommenen Kalibriergerade in die

entsprechende Produktkonzentration umgerechnet. Die so berechneten Werte werden mit dem Programm PRISM® in einer linearen Regression ausgewertet. Durch die Umrechnung in die Produktmenge kann nun anhand der erhaltenen Geraden abgelesen werden, welcher Inkubationszeitraum eine Umsetzungsrate zwischen 10% und 20% gewährleistet.

11.2.5 Konzentrations-Inhibitions-Kurven

Um die Konzentrationsabhängigkeit der Inhibition einer Testverbindung zu bestimmen werden Konzentrations-Inhibitionskurven aufgenommen und aus diesen IC_{50} - bzw. K_i -Werte bestimmt.

Hierzu werden von den Testverbindungen zunächst Stammlösungen mit Konzentrationen von 10 mM, 1 mM und ggf. 0,1 mM meist in DMSO hergestellt. Nur einige wenige Verbindungen können direkt in einer wässrigen Lösung hergestellt und verdünnt werden. Hierzu zählen in erster Linie die Standardinhibitoren AOPCP und ADP.

Für die Aufnahme einer Kurve werden dann 10 verschiedene Konzentrationen in einer Lösung mit maximal 10% DMSO hergestellt. Die Verdünnung erfolgt nach dem in der folgenden Tabelle angegebenen Beispiel.

Endkonzentration	Volumen	Volumen
Inhibitor	Inhibitor-Lösung	Assaypuffer
100 μM	20 μ l Stammlösung	180 μ l
30 μM	75 μ l 100 μ M	175 μ l
10 μM	75 μ l 30 μ M	150 μ l
3 μM	75 μ l 10 μ M	175 μ l
1 μM	75 μ l 3 μ M	150 μ l

0,3 μM	75 μl 1 μM	175 μl
0,1 μM	75 μl 0,3 μM	150 μl
0,03 μM	75 μl 0,1 μM	175 μl
0,01 μM	75 μl 0,03 μM	150 μl
0,003 μM	75 μl 0,01 μM	175 μl
0,001 μM	75 μl 0,003 μM	150 μl

Anschließend wird nach dem folgenden Schema in die 96-Well-Platte pipettiert, wobei die Platte zunächst nach Zugabe von Assaypuffer und Substrat für etwa 10 Minuten bei 37 °C vorinkubiert wird und dann die Enzymreaktion durch Zugabe des Enzyms gestartet wird.

Assaypuffer	70 μl
Inhibitor	10 μl
AMP	10 μl
eN	10 μl
Ammoniummolybdat- Lösung	60 μl
Malachitgrün-Lösung	40 μl

Nach einer Inkubation von 15 Minuten bei 37 °C wird die Enzymreaktion durch Zugabe der sauren Ammoniummolybdat-Lösung gestoppt. Die Zugabe der Malachitgrün-Lösung führt zur Ausbildung des Farbstoff-Phosphat-Komplex, dessen Absorption nach weiteren 15 Minuten Inkubation bei einer Wellenlänge von 620 nm gemessen wird.

Für jede Konzentration wird eine Dreifachbestimmung durchgeführt und der Versuch in zwei unabhängigen Versuchen für die Bestätigung der Daten wiederholt.

Das Experiment wird mit dem Programm PRISM® ausgewertet. Aus der resultierenden sigmoidalen Kurve lässt sich der IC₅₀-Wert bestimmen und aus diesem der K_i-Wert berechnen.

11.2.6 Screening

Um zunächst einen Eindruck zu bekommen, ob Testverbindungen einen gewünschten inhibitorischen Effekt zeigen, werden sie zuerst in einem Screening untersucht.

Hierbei wird die zu untersuchende Verbindung in einer vorher definierten Konzentration eingesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Verbindungen bei einer Endkonzentration von 30 µM untersucht.

Für die Durchführung des Screenings wird nach dem folgenden Schema in die 96-Well-Platte pipettiert, wobei die Platte zunächst nach Zugabe von Assaypuffer und Substrat für etwa 10 Minuten bei 37 °C vorinkubiert wird und dann die Enzymreaktion durch Zugabe des Enzyms gestartet wird.

	Test- Verbindung	Negativkontrolle	Positivkontrolle
Assaypuffer	-	40 µl	80 µl
Assaypuffer/DMSO 10%	-	20 µl	20 µl
Test-Verbindung 30µM	60 µl	-	-
AMP	20 µl	20 µl	-
eN	20 µl	20 µl	-
Ammoniummolybdate- Lösung	60 µl	60 µl	60 µl
Malachitgrün-Lösung	40 µl	40 µl	40 µl

Nach einer Inkubation von 15 Minuten bei 37 °C wird die Enzymreaktion durch Zugabe der sauren Ammoniummolybdat-Lösung gestoppt. Die Zugabe der Malachitgrün-Lösung führt zur Ausbildung des Farbstoff-Phosphat-Komplex, dessen Absorption nach weiteren 15 Minuten Inkubation bei einer Wellenlänge von 620 nm gemessen wird.

Für jede Testverbindungen wird eine Dreifachbestimmung durchgeführt und der Assay insgesamt dreimal durchgeführt.

Die Berechnung der prozentualen Inhibition erfolgt mit Hilfe des Programms Excel.

11.3 Radiometrischer Assay

11.3.1 Kalibrierung des Testsystems

Die Kalibrierung des Testsystems wird durchgeführt, um die Nachweisgrenze und Empfindlichkeit des Systems zu bestimmen. Hierzu werden zunächst Kalibriergeraden von [³H]Adenosin mit verschiedenen spezifischen Aktivitäten aufgenommen. Da Vorversuche jedoch zeigten, dass die Fällung von AMP nicht vollständig erfolgt und damit ein erhöhtes Backgroundsignal gemessen wird, wird der Kalibrierung [³H]AMP zugefügt.

Da für eine Enzymreaktion eine relativ hohe Konzentration an Substrat (im mikromolaren Bereich) eingesetzt werden muss, sollte die spezifische Aktivität des vorliegenden Radioliganden erniedrigt werden, da andernfalls die gemessenen Counts außerhalb des Bereiches liegen, für den eine Linearität des Testsystems gewährleistet werden kann. Um eine Erniedrigung der spezifischen Aktivität zu erreichen wird der Radioligand mit dem sogenannten Kaltliganden gemischt. Hierbei handelt es sich um dieselbe, aber nicht radioaktiv markierte Verbindung.

Das Mischungsverhältnis von Radioligand, Kaltligand und Assaypuffer kann über die folgenden Gleichungen berechnet werden.

Gleichung 4: Berechnung des Radioliganden

$$\mu Ci = \frac{\text{spez. Aktivität}_{(soll)} [Ci / mmol] \cdot cRL_{(soll)} [nM] \cdot VF \cdot vRL_{(gesamt)} [ml]}{1000}$$

$cRL_{(soll)}$: Konzentration des Radioliganden im Assay

$vRL_{(gesamt)}$: Benötigtes Volumen des Radioliganden für alle Proben

VF: Verdünnungsfaktor im Assay

Gleichung 5: Berechnung des Kaltliganden

$$W = M \cdot a [1/A_{(soll)} - 1/A_{(ist)}]$$

W = mg Kaltligand; **M** = Molekulargewicht Substrat (mg/mmol); **a** errechnete Menge Radioligand [mCi]; **A_(ist)** gegebene spezifische Aktivität [mCi/mmol]; **A_(soll)** gewünschte spezifische Aktivität_(soll) [mCi/ mmol]

Aus dieser Berechnung ergeben sich für die 30 µM Adenosin- und 50 µM AMP-Stammlösungen die in der folgenden Tabelle angegebenen Mischungsverhältnisse.

Spezifische Aktivität	Radioligand (1:100 Verdünnung)	Kaltligand (0,1 mg/ml)	Assaypuffer
30 µM Adenosin			
25 mCi/mmol	9 µl	9,6 µl	101 µl
50 mCi/mmol	18 µl	9,6 µl	92,4 µl
100 mCi/mmol	36 µl	9,6 µl	74,4 µl
50 µM AMP			
25 mCi/mmol	35 µl	70 µl	175 µl
50 mCi/mmol	70 µl	70 µl	140 µl
100 mCi/mmol	140 µl	70 µl	70 µl

Ausgehend von diesen Stammlösungen wird anschließend wie folgt verdünnt:

Endkonzentration	Volumen	Volumen
Adenosin	Adenosinlösung	Assaypuffer
5 µM	Stammlösung	-
2,5 µM	50 µl von 5 µM	50 µl
1 µM	50 µl von 2,5 µM	75 µl
0,5 µM	50 µl von 1 µM	50 µl
0,1 µM	50 µl von 0,5 µM	200 µl
0,05 µM	50 µl von 0,1 µM	50 µl
0,01 µM	50 µl von 0,05 µM	200 µl

Anschließend werden die Ansätze entsprechend dem folgenden Schema in die Test-Röhrchen pipettiert:

Assaypuffer	60 µl
Assapuffer/DMSO 10%	20 µl
Adenosin	10 µl
AMP	10 µl
Fällungspuffer	500 µl

Nach Zugabe des Fällungspuffers werden die Ansätze für etwa 2-3 Stunden auf Eis inkubiert. Anschließend werden sie am 24er Harvester über einen GF/B-Filter abgesaugt und mit 3 x 1 ml Fällungspuffer gewaschen.

Die Filtrate werden in Maxivials überführt, mit 6 ml Ultima-Gold XR Szintillationscocktail versetzt und im LS-Counter vermessen.

Für jede Konzentration wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt und der Versuch noch zweimal wiederholt.

Das Experiment wird mit dem Programm PRISM® ausgewertet. Aus der resultierenden Geraden lässt sich der LOD-Wert bestimmen.

11.3.2 Bestimmung der optimalen Enzymkonzentration

Für die Bestimmung der optimalen Enzymkonzentration wird eine Enzymtitration durchgeführt. Hierzu werden ausgehend von einer 100 µg/ml Stammlösung sieben verschiedene Enzymkonzentrationen entsprechend dem folgenden Schema verdünnt. Das Substrat wird in einer Konzentration von 5 µM mit einer spezifischen Aktivität von 100 mCi/mmol eingesetzt.

Endkonzentration	Volumen	Volumen
eN	Stammlösung	Assaypuffer
2 µg/ml	20 µl	80µl
1 µg/ml	50 µl von 2 µg/ml	50 µl
0,5 µg/ml	50 µl von 1 µg/ml	50 µl
0,25 µg/ml	50 µl von 0,5 µg/ml	50 µl
0,125 µg/ml	50 µl von 0,25 mg/ml	50 µl
0,063 µg/ml	50 µl von 0,125 µg/ml	50 µl
0,032 µg/ml	50 µl von 0,063 µg/ml	50 µl

Anschließend wird nach dem folgenden Schema in die Test-Röhrchen pipettiert, wobei zunächst der Assaypuffer vorgelegt und das Substrat hinzugegeben wird. Die Ansätze werden dann etwa 5 Minuten bei 37 °C vorinkubiert. Die Enzymreaktion wird durch die Zugabe des Enzyms gestartet und für 15 Minuten bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Durch Zugabe des kalten Fällungspuffers wird die Reaktion beendet.

Assaypuffer	80 µl
AMP	10 µl
eN	10 µl
Fällungspuffer	500 µl

Die Ansätze werden dann für etwa 2-3 Stunden auf Eis inkubiert und anschließend am 24er Harvester über einen GF/B-Filter abgesaugt. Nach dreimaligem Waschen mit 1 ml

kaltem Fällungspuffer werden die Filtrate in Maxi-Vials überführt, mit 6 ml Szintillationscocktail versetzt und im LS-Counter die Zerfälle gemessen. Für jede Konzentration wird eine Dreifachbestimmung durchgeführt und der Versuch noch zweimal wiederholt.

Das Experiment wird mit dem Programm PRISM® ausgewertet. Aus der resultierenden Geraden lässt sich der LOD-Wert bestimmen.

11.3.3 Enzymkinetik

Die Aufnahme einer Enzymkinetik dient der Optimierung der Inkubationszeit und stellt hiermit sicher, dass die durchgeführte Enzymreaktion im linearen Bereich durchgeführt wird, die Menge an umgesetztem Substrat einen Wert von 20% jedoch nicht überschreitet. Für die Bestimmung der Enzymkinetik wird die Enzymreaktion nach unterschiedlichen Inkubationszeiten zwischen 5 und 60 Minuten gestoppt. Das Substrat wird hierbei in einer Konzentration von 5 μM eingesetzt und das Enzym in einer Konzentration von 0,3 $\mu\text{g/ml}$.

Um die Grenze zwischen 10% und 20% Umsetzung festzulegen werden die Signale von [^3H]Adenosin bei Konzentrationen von 1 μM und 0,5 μM mit einer spezifischen Aktivität von 100 mCi/mmol gemessen.

Für die Durchführung des Versuches wird nach dem folgenden Schema in die Test-Röhrchen pipettiert. Die Reaktion wird wie oben beschrieben durch Zugabe der Enzymlösung gestartet und nach 5, 10, 15, 30 und 60 Minuten Inkubation bei 37 °C jeweils durch Zugabe des kalten Fällungspuffers gestoppt.

Assaypuffer	80 μl
AMP	10 μl
eN	10 μl
Fällungspuffer	500 μl

Nach Zugabe des Fällungspuffers werden die Ansätze für etwa 2-3 Stunden auf Eis inkubiert und anschließend am 24er Harvester über einen GF/B-Filter abgesaugt und

mit 3 x 1ml Fällungspuffer gewaschen. Die Filtrate werden in Maxi-Vials überführt, mit 6 ml Szintillationscocktail versetzt und im LS-Counter vermessen. Für jede Inkubationszeit wird eine Dreifachbestimmung durchgeführt und der Versuch noch zweimal wiederholt.

Die erhaltenen Werte werden mit dem Programm PRISM® in einer linearen Regression ausgewertet. Durch die Bestimmung der beiden Adenosinkonzentrationen für 10% und 20% kann nun anhand der erhaltenen Geraden abgelesen werden, welcher Inkubationszeitraum eine Umsetzungsrate zwischen 10% und 20% gewährleistet.

11.3.4 Michaelis Menten-Plot

Die Aufnahme eines Michaelis-Menten-Plots dient der Bestimmung von K_M - und V_{max} -Werten. Diese Werte geben die Aktivität des Enzyms und damit seine Umsatzrate wieder und dienen damit auch der Bestimmung der optimalen Substratkonzentration für die Untersuchung kompetitiver Inhibitoren. Für die Aufnahme des Michaelis-Menten-Plots wird ausgehend von einer 10 mM AMP-Stammlösung mit einer spezifischen Aktivität von 1 mCi/mmol entsprechend dem folgenden Schema verdünnt.

Endkonzentration	Volumen	Volumen
AMP	AMP-Lösung	Assaypuffer
1000 μM	Stammlösung	-
300 μM	100 μl von 1000 μM	234 μl
100 μM	100 μl von 300 μM	200 μl
30 μM	100 μl von 100 μM	234 μl
10 μM	100 μl von 30 μM	200 μl
3 μM	100 μl von 10 μM	234 μl
1 μM	100 μl von 3 μM	200 μl

Anschließend wird nach dem folgenden Schema in die Test-Röhrchen pipettiert, wobei zunächst der Assaypuffer vorgelegt und das Substrat hinzugegeben wird. Die Ansätze

werden dann etwa 5 Minuten bei 37 °C vorinkubiert. Die Enzymreaktion wird durch die Zugabe des Enzyms gestartet und für 25 Minuten bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Durch Zugabe des kalten Fällungspuffers wird die Reaktion beendet.

Assaypuffer	80 µl
AMP	10 µl
eN	10 µl
Fällungspuffer	500 µl

Nach Zugabe des Fällungspuffers werden die Ansätze für etwa 2-3 Stunden auf Eis inkubiert und anschließend am 24er Harvester über einen GF/B-Filter abgesaugt und mit 3 x 1ml Fällungspuffer gewaschen. Die Filtrate werden in Maxi-Vials überführt, mit 6 ml Szintillationscocktail versetzt und im LS-Counter vermessen. Für jede Konzentration wird eine Dreifachbestimmung durchgeführt und der Versuch noch zweimal wiederholt.

Das Experiment wird mit dem Programm PRISM® ausgewertet. Aus der resultierenden Sättigungskurve lassen sich der K_M - und der V_{max} -Wert bestimmen.

11.3.5 Validierung

Zum Abschluss der Assay-Optimierung wird eine Validierung durchgeführt. Hierzu werden unter den vorher bestimmten Bedingungen dreimal jeweils 24 Positiv- und Negativkontrollen bestimmt. Das Substrat wird in einer Konzentration von 5 µM mit einer spezifischen Aktivität von 100mCi/mmol und das Enzym in einer Konzentration von 0,3 µg/ml eingesetzt.

	Positivkontrolle	Negativkontrolle
Assaypuffer	90 µl	80 µl
AMP	10 µl	10 µl
eN	-	10 µl
Fällungspuffer	500 µl	500 µl

Die Reaktion wird wie oben beschrieben durch Zugabe der Enzymlösung gestartet und nach 25 Minuten Inkubation bei 37 °C jeweils durch Zugabe des kalten Fällungspuffers gestoppt.

Nach Zugabe des Fällungspuffers werden die Ansätze für etwa 2-3 Stunden auf Eis inkubiert und anschließend am 24er Harvester über einen GF/B-Filter abgesaugt und mit 3 x 1ml Fällungspuffer gewaschen. Die Filtrate werden in Maxi-Vials überführt, mit 6 ml Szintillationscocktail versetzt und im LS-Counter vermessen. Der Versuch wird noch zweimal wiederholt und alle Ergebnisse zusammengefasst für die Berechnung des Z'-Faktors

11.3.6 Konzentrations-Inhibitions-Kurven

Um die Konzentrationsabhängigkeit der Inhibition einer Testverbindung zu bestimmen werden Konzentrations-Inhibitionskurven aufgenommen und aus diesen IC₅₀- bzw. K_i-Werte bestimmt.

Hierzu werden von den Testverbindungen zunächst Stammlösungen mit Konzentrationen von 10 mM, 1 mM und ggf. 0,1 mM meist in DMSO hergestellt. Nur einige wenige Verbindungen können direkt in einer wässrigen Lösung hergestellt und verdünnt werden. Hierzu zählen in erster Linie die Standardinhibitoren AOPCP und ADP.

Für die Aufnahme einer Kurve werden dann 10 verschiedene Konzentrationen in Lösungen mit maximal 10% DMSO hergestellt. Die Verdünnung erfolgt nach dem in der folgenden Tabelle angegebenen Beispiel. Das Substrat wird in einer Konzentration von 5 µM mit einer spezifischen Aktivität von 100 mCi/mmol und das Enzym in einer Konzentration von 0,3 µg/ml eingesetzt.

Endkonzentration	Volumen	Volumen
Inhibitor	Inhibitor-Lösung	Assaypuffer
100 µM	20 µl Stammlösung	180 µl
30 µM	75 µl 100 µM	175 µl
10 µM	75 µl 30 µM	150 µl

3 μM	75 μl 10 μM	175 μl
1 μM	75 μl 3 μM	150 μl
0,3 μM	75 μl 1 μM	175 μl
0,1 μM	75 μl 0,3 μM	150 μl
0,03 μM	75 μl 0,1 μM	175 μl
0,01 μM	75 μl 0,03 μM	150 μl
0,003 μM	75 μl 0,01 μM	175 μl
0,001 μM	75 μl 0,003 μM	150 μl

Anschließend wird nach dem folgenden Schema in die Test-Röhrchen pipettiert. Wobei die Reaktion durch Zugabe der Enzymlösung gestartet und nach 25 Minuten Inkubation bei 37 °C durch Zugabe des kalten Fällungspuffers beendet wird.

Assaypuffer	70 μl
Inhibitor	10 μl
AMP	10 μl
eN	10 μl
Fällungspuffer	500 μl

Nach Zugabe des Fällungspuffers werden die Ansätze für etwa 2-3 Stunden auf Eis inkubiert und anschließend am 24er bzw. 48er Harvester über einen GF/B-Filter abgesaugt und mit 3 x 1 ml bzw. 3 x 0,5 ml Fällungspuffer gewaschen. Die Filtrate werden in Maxi-Vials bzw. Midi-Vials überführt, mit 6 ml bzw. 4 ml Szintillationscocktail versetzt und im LS-Counter vermessen. Für jede Konzentration wird eine Doppelbestimmung durchgeführt und der Versuch noch zweimal wiederholt.

Das Experiment wird mit dem Programm PRISM® ausgewertet. Aus der resultierenden sigmoidalen Kurve lässt sich der IC_{50} -Wert bestimmen und aus diesem der K_i -Wert berechnen.

11.3.7 Screening

Um zunächst einen Eindruck zu bekommen, ob Testverbindungen einen gewünschten inhibitorischen Effekt zeigen werden sie zuerst in einem Screening untersucht.

Hierbei wird die zu untersuchende Verbindung in einer vorher definierten Konzentration von 10 μM bzw. bei schwächer potenten Verbindungen von 100 μM untersucht.

Für das Screening mit 100 μM Inhibitorkonzentration wird eine 10 mM Stammlösung in DMSO verwendet, für das Screening bei 10 μM eine 1 mM Stammlösung in DMSO.

Das Substrat wird in einer Konzentration von 5 μM mit einer spezifischen Aktivität von 100 mCi/mmol und das Enzym in einer Konzentration von 0,3 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt.

Für die Durchführung des Screenings wird entsprechend dem folgenden Schema in die Test-Röhrchen pipettiert. wobei die Reaktion durch Zugabe der Enzymlösung gestartet und nach 25 min. Inkubation bei 37 °C durch Zugabe des kalten Fällungspuffers gestoppt wird.

Assaypuffer	70 μl
Inhibitor	10 μl
AMP	10 μl
eN	10 μl
Fällungspuffer	500 μl

Nach Zugabe des Fällungspuffers werden die Ansätze für etwa 2-3 Stunden auf Eis inkubiert und anschließend am 24er bzw. 48er Harvester über einen GF/B-Filter abgesaugt und mit 3 x 1 ml bzw. 3 x 0,5 ml Fällungspuffer gewaschen. Die Filtrate werden in Maxi-Vials bzw. Midi-Vials überführt, mit 6 ml bzw. 4 ml Szintillationscocktail versetzt und im LS-Counter vermessen.

Für jede Konzentration wird eine Dreifachbestimmung durchgeführt und der Versuch noch zweimal wiederholt.

Die Berechnung der prozentualen Inhibition erfolgt mit Hilfe des Programms Excel.

11.4 Allgemeine Angaben zu Synthesen

11.4.1 Chemikalien und Geräte Chemikalien

Die für die Synthese verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Acros Organics (über VWR, Siegburg), Fluka (Buchs, Schweiz), Sigma-Aldrich (Steinheim), TCI (Eschborn) und Merck (Filsum) bezogen und ohne weitere Aufreinigung verwendet.

Lösungsmittel

Dichlormethan wurde für die Synthese und Aufreinigung über Calciumhydrid destilliert. Alle weiteren Lösungsmittel wurden in der vom Hersteller gelieferten Qualität verwendet. Trockene Lösungsmittel wurden in Gebinden mit Septum wie bezogen eingesetzt.

Dünnschichtchromatographie

Die Reaktionskontrollen wurden mit Hilfe von Kieselgel-beschichteter Aluminiumplatten 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt) durchgeführt. Die Detektion erfolgte unter UV-Licht der Wellenlänge 254 nm und 366 nm.

Säulenchromatographie

Die säulenchromatographische Aufreinigung wurde als Flash-Chromatographie mit einem System von Büchi (Essen), bestehend aus Pumpe C-601, Pumpensteuergerät C-610 und Fraktionssammelgerät C-660 auf Kieselgel 60 mit einer Korngröße von 0,040 mm bis 0,063 mm (Merck, Darmstadt) durchgeführt.

Mikrowelle

Mikrowellenreaktionen wurden in der Mikrowelle Discover der Firma CEM GmbH (Kamp-Lintfort) mit der fokussiertenTM Mikrowellen-Synthese durchgeführt.

Schmelzpunktbestimmung

Schmelzpunkte wurden mit Hilfe des Büchi-B-545 Schmelzpunktgerätes aufgenommen.

NMR-Spektroskopie

NMR-Spektren wurden mit einem Bruker Avance 500 Spektrometer (^1H : 500 MHz, ^{13}C : 125 MHz) aufgenommen. Das verwendete Lösungsmittel DMSO- d_6 diente als interner Standard: ^1H : δ [ppm] DMSO- d_6 : 2.49 ^{13}C : δ [ppm] DMSO- d_6 : 37.7. Die chemischen Verschiebungen (δ) sind in ppm und die Kopplungskonstanten J werden in Hz angegeben. Die Multiplizitäten der ^1H -Signale werden folgendermaßen abgekürzt: s = Singulett, d = Dublett, dd = doppeldublett, ddd = Dublett von Doppeldubletts, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett, br = breites Singulett. Die NMR-Spektren wurden bei Raumtemperatur aufgenommen.

HPLC-MS

Die Reinheit und Identität aller Endprodukte und einer Zwischenprodukte sowie Stabilitätsuntersuchungen wurden mittels eines an ein API 2000 Massenspektrometer (Elektronensprayionisation, Applied Biosystems, Darmstadt) gekoppelten HPLC-Systems (Agilent 1100) bestimmt. Es wurden 0,5 mg der zu prüfenden Substanz in 1,0 ml Methanol gelöst. Von dieser Lösung wurden 10 μl in das HPLC-System mit einer Phenomenex Luna C-18 Säule (Korngröße 3 μm , Abmessungen 50 x 2.00 mm innerer Durchmesser) injiziert. Der Analyt wurde mit einem Gradienten aus wässriger 2 mM Ammoniumacetat-Lösung und Methanol von 9:1 (v/v) und nach 0:10 (v/v) über 15 min bei einer Flussrate von 250 $\mu\text{l}/\text{min}$ eluiert. Die Detektion erfolgte durch die Messung der UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 254 nm.

11.5 *N*-(4-Sulfamoylphenyl)benzamide

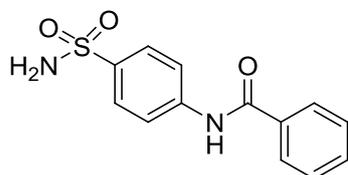
Vorschrift A

5 mmol Sulfanilamid werden in 20 ml einer 1:1 Mischung aus Aceton und einer 1M Natriumhydrogencarbonat-Lösung gelöst (entspricht 10 mmol NaHCO₃). Unter Eiskühlung werden langsam 5,5 mmol des entsprechenden Carbonsäurechlorids zu getropft, wobei sich langsam im Verlauf der Reaktion ein Niederschlag bildet. Nach Beenden der Reaktion (DC-Kontrolle) wird das Produkt abfiltriert, dreimal mit Wasser und Diethylether gewaschen und anschließend getrocknet.

Vorschrift B

3 mmol eines Aminobenzensulfonamids (Sulfanilamid, Metanilamid) werden in 30 ml Aceton gelöst und mit 6 mmol Natriumhydrogencarbonat versetzt. Unter Eiskühlung wird langsam ein Äquivalent des entsprechenden Carbonsäurechlorids hinzu gegeben, wobei sich langsam im Verlauf der Reaktion ein Niederschlag bildete. Nach Beenden der Reaktion (DC-Kontrolle) wird das Aceton über einen Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in Eiswasser suspendiert. Das Produkt wird abfiltriert, dreimal mit Wasser und Diethylether gewaschen und anschließend getrocknet.

N-(4-Sulfamoylphenyl)benzamid (132, MAF1)



Summenformel: C₁₃H₁₂N₂O₃S

Molare Masse: 276.32 g/mol

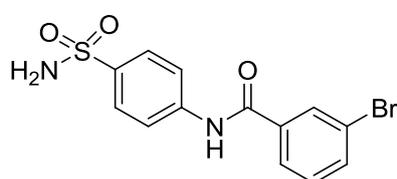
Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift B dargestellt.

Ausbeute: 831 mg (100%)

Aussehen: weißes Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, wenig löslich in Aceton, Ethylacetat, Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser, Dichlormethan, Diethylether

und Petrolether; **R_f-Wert:** 0.68 (Aceton:Toluol, 3:2); **Schmelzpunkt:** 291-294 °C (Lit.: 285-291 °C)¹⁷⁹⁻¹⁸⁰; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] 7.25 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.54 (dd, 2H, ³J = 7.6 Hz, ³J = 7.3 Hz, 3'-H, 5'-H); 7.61 (ddt, 1H, ³J = 7.6 Hz, ³J = 7.3 Hz, ⁴J = 2.2 Hz, ⁴J = 1.3 Hz, 4'-H); 7.80 (d, 2H, ³J = 8.9 Hz, 3-H, 5-H); 7.92 – 8,00 (m, 4H, 2-H, 6-H, 2'-H, 6'-H); 10.52 (s, 1H, NH-C=O); **LC-MS (m/z):** 275.2 [M]⁻, 294.3 [M+NH₄]⁺, 553.4 [2M]⁺, 570.5 [2M+NH₄]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 100%; **Elementaranalyse:** C: 56.27% (theor. 56.51%), N: 9.93% (10.14%), H: 4.42% (4.38%)

Brom-*N*-(4-sulfamoylphenyl)benzamid (141, MAF2)



Summenformel: C₁₃H₁₁BrN₂O₃S

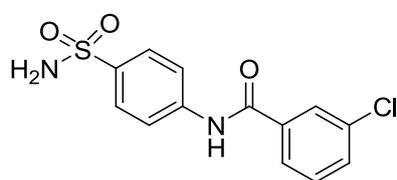
Molare Masse: 355.21 g/mol

Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift A dargestellt.

Ausbeute: 1,70g (96%)

Aussehen: weißes Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, wenig löslich in Aceton, Ethylacetat, Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser, Dichlormethan, Diethylether und Petrolether; **R_f-Wert:** 0.73 (Aceton:Toluol, 3:2); **Schmelzpunkt:** 233-235 °C; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ 7.26 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.51 (t, 1H, ³J = 7.9 Hz, 5'-H); 7.81 (m, 3H, 3-H, 5-H, 4'-H); 7.93 (d, 3H, ³J = 8.8 Hz, 2-H, 6-H); 7.95 – 7.97 (m, 1H, 6'-H); 8.15 (dd, 1H, ⁴J = 1.6 Hz, ⁴J = 1.9 Hz, 2'-H); 10.61 (s, 1H, NH-C=O); **LC-MS (m/z):** 353.1 [M(⁷⁹Br)]⁻, 355.1 [M(⁸¹Br)]⁻, 355.3 [M(⁷⁹Br)]⁺, 357.3 [M(⁸¹Br)]⁺, 372.2 [M(⁷⁹Br)+NH₄]⁺, 374.2 [M(⁸¹Br)+NH₄]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 98%; **Elementaranalyse:** C: 44.08% (theor. 43.96%), N: 7.85% (7.89%), H: 3.23% (3.12%)

3-Chlor-*N*-(4-sulfamoylphenyl)benzamid (142, MAF3)



Summenformel: C₁₃H₁₁ClN₂O₃S

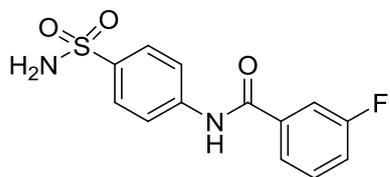
Molare Masse: 310.76 g/mol

Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift A dargestellt.

Ausbeute: 1,46 g (94%)

Aussehen: weißes Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, wenig löslich in Aceton, Ethylacetat, Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser, Dichlormethan, Diethylether und Petrolether; **R_f-Wert:** 0.72 (Aceton:Toluol 3:2); **Schmelzpunkt:** 250-254 °C; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ 7.26 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.58 (t, 1H, ³J = 7.9 Hz, 5'-H); 7.67-7.69 (m, 1H, 4'-H); 7.81 (d, 2H, ³J = 8.8 Hz; 3-H, 5-H); 7.9133 (m, 3H, 2-H, 6-H, 6'-H); 8.02 (t, 1H, ⁴J = 1.9, 2'-H); 10.61 (s, 1H, NH-C=O); **LC-MS (m/z):** 230.1 [M-SO₂NH₂]⁻, 309.1 [M]⁻, 311.2 [M]⁺, 328.2 [m+NH₄]⁺, 638.2 [2M+NH₄]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 99%; **Elementaranalyse:** C: 49.95% (theor. 50.24%), N: 9.09% (9.01%), H: 3.67% (3.57%)

3-Fluor-N-(sulfamoylphenyl)benzamid (143, MAF5)



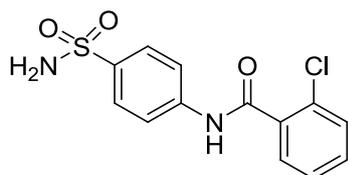
Summenformel: C₁₃H₁₁FN₂O₃S

Molare Masse: 294.30 g/mol

Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift A dargestellt.

Ausbeute: 1,43 g (98%)

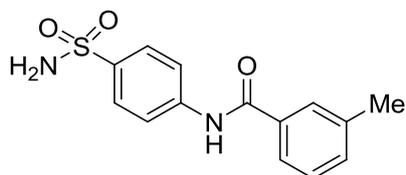
Aussehen: weißes Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, wenig löslich in Aceton, Ethylacetat, Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser, Dichlormethan, Diethylether und Petrolether; **R_f-Wert:** 0.70 (Aceton:Toluol 3:2); **Schmelzpunkt:** 269-271 °C; **¹H-NMR:** 500 MHz, DMSO-*d*₆), δ 7.26 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.46 (m, 1H, 5'-H); 7.60 (m, 1H, 6'-H); 7.81 (m, 4H, 3-H, 5-H, 2'-H, 4'-H); 7.93 (d, 2H, ³J = 8.9 Hz, 2-H, 6-H); 10.57 (s, 1H, NH-C=O); **LC-MS (m/z):** 293.2 [M]⁻, 295.2 [M]⁺, 312.2 [M+NH₄]⁺, 606-3 [2M+NH₄]⁺, 611.4 [2M+Na]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 98%; **Elementaranalyse:** C: 53.04% (theor. 53.05%), N: 9.22% (9.52%), H: 3.89% (3.77%)

2-Chlor-N-(4-sulfamoylphenyl)benzamid (144, MAF4)**Summenformel:** C₁₃H₁₁ClN₂O₃S**Molare Masse:** 310.76 g/mol

Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift A dargestellt.

Ausbeute: 1,46 g (94%)

Aussehen: weißes Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, wenig löslich in Aceton, Ethylacetat, Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser, Dichlormethan, Diethylether und Petrolether; **R_f-Wert:** 0.69 (Aceton:Toluol 3:2); **Schmelzpunkt:** 271-272 °C; **¹H-NMR:** 500 MHz, DMSO-*d*₆, δ 7.26 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.58 (t, 1H, ³J = 7.9 Hz, 5'-H); 7.67-7.69 (m, 1H, 4'-H); 7.81 (d, 2H, ³J = 8.8 Hz; 3-H, 5-H); 7.91 (m, 3H, 2-H, 6-H, 6'-H); 8.02 (t, 1H, ⁴J = 1.9 Hz, 2'-H); 10.61 (s, 1H, NH-C=O); **LC-MS (m/z):** 309.2 [M]⁻, 311.2 [M]⁺, 328.2 [M+NH₄]⁺, 621.3 [2M]⁺, 638.2 [2M+NH₄]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 99%; **Elementaranalyse:** C: 49.99% (theor. 50.24%), N: 8.82% (9.01%), H: 3.69% (3.57%)

3-Methyl-N-(4-sulfamoylphenyl)benzamid (145, MAF7)**Summenformel:** C₁₄H₁₄N₂O₃S**Molare Masse:** 290.07 g/mol

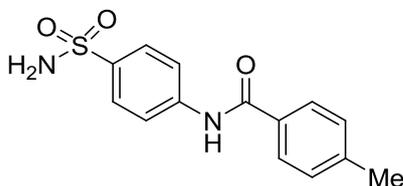
Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift A dargestellt.

Ausbeute: 1,40 g (96%)

Aussehen: weißes Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, wenig löslich in Aceton, Ethylacetat, Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser, Dichlormethan, Diethylether und Petrolether; **R_f-Wert:** 0.69 (Aceton:Toluol 3:2); **Schmelzpunkt:** 248-252 °C; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ 3.09 (s, 3H, Ph-CH₃); 7.24 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.42 (m, 2H, 4'-H, 5'-H); 7.75-7.81 (m, 4H, 3-H, 5-H, 2'-H, 6'-H); 7.94 (d, 2H, ³J = 8.5 Hz, 2-H, 6-H); 10.48 (s, 1H, NH-C=O); **LC-MS (m/z):** 289.1 [M]⁻, 291.3 [M]⁺, 308.3 [M+NH₄]⁺, 581.4 [2M]⁺, 598.4 [2M+NH₄]⁺, 603.6 [2M+Na]⁺, **Reinheit mit HPLC-**

UV(220 – 400nm)-ESI-MS: 98%; **Elementaranalyse:** C: 57.74% (theor. 57.92%), N: 9.36% (9.65%), H: 4.93% (4.86%)

4-Methyl-N-(4-sulfamoylphenyl)benzamid (146, MAF8)



Summenformel: C₁₄H₁₄N₂O₃S

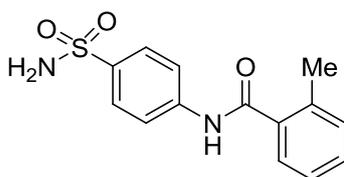
Molare Masse: 290.07 g/mol

Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift A dargestellt.

Ausbeute: 1,39 g (96%)

Aussehen: weißes Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, wenig löslich in Aceton, Ethylacetat, Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser, Dichlormethan, Diethylether und Petrolether; **R_f-Wert:** 0.66 (Aceton:Toluol 3:2); **Schmelzpunkt:** 296-298 °C; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ 2.38 (s, 3H, Ph-CH₃); 7.24 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.34 (d, 2H, ³J = 7.9 Hz, 3'-H, 5'-H); 7.80 (d, 2H, ³J = 8.9 Hz, 3-H, 5-H); 7.89 (d, 2H, ³J = 8.2 Hz, 2'-H, 6'-H); 7.95 (d, 2H, ³J = 8.9 Hz, 2-H, 6-H); 10.43 (s, 1H, NH-C=O); **LC-MS (m/z):** 289.1 [M]⁻, 291.3 [M]⁺, 308.3 [M+NH₄]⁺, 581.4 [2M]⁺, 598.4 [2M+NH₄]⁺, 603.6 [2M+Na]⁺; **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 98%; **Elementaranalyse:** C: 57.78% (theor. 57.92%), N: 9.37% (9.65%), H: 4.97% (4.86%)

2-Methyl-N-(4-sulfamoylphenyl)benzamid (165, MAF6)



Summenformel: C₁₄H₁₄N₂O₃S

Molare Masse: 290.07 g/mol

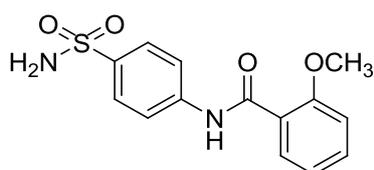
Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift B dargestellt.

Ausbeute: 869 mg (100%)

Aussehen: weißes Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, wenig löslich in Aceton, Ethylacetat, Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser, Dichlormethan, Diethylether und Petrolether; **R_f-Wert:** 0.72 (Aceton:Toluol 3:2); **Schmelzpunkt:** 247-249 °C; **¹H-**

NMR: (500 MHz, DMSO- d_6), δ 7.24 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.30 (dt, 2H, ³J = 8.2 Hz, ³J = 7.9 Hz, 3'-H, 5'-H); 7.40 (t, 1H, ³J = 7.6 Hz, 4'-H); 7.47 (d, 1H, ³J = 7.9 Hz, 6'-H); 7.78 (d, 2H, ³J = 8.9 Hz, 3-H, 5-H); 7.88 (d, 2H, ³J = 8.9 Hz, 2-H, 6-H); 10.59 (s, 1H, NH-C=O); **LC-MS (m/z):** 289.1 [M]⁻, 291.5 [M]⁺, 581.4 [2M]⁺, 598.4 [2M+NH₄]⁺, 603.4 [2M+Na]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 99%; **Elementaranalyse:** C: 57.90% (theor. 57.92%), N: 9.56% (9.65%), H: 5.07% (4.86%)

2-Methoxy-*N*-(4-sulfamoylphenyl)benzamid (166, MAF17)



Summenformel: C₁₄H₁₄N₂O₄S

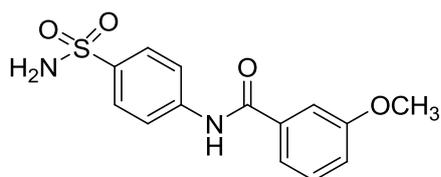
Molare Masse: 306.07 g/mol

Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift B dargestellt.

Ausbeute: 924 mg (100%)

Aussehen: weißes Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, wenig löslich in Aceton, Ethylacetat, Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser, Dichlormethan, Diethylether und Petrolether; **R_f-Wert:** 0.66 (Aceton : Toluol, 3:2); **Schmelzpunkt:** 250-253 °C; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO- d_6), δ 3.89 (s, 3H, -OCH₃); 7.07 (ddd, 1H, ³J = 7.6 Hz, ³J = 7.3 Hz, ⁴J = 1.0 Hz, 5'-H); 7.18 (d, 1H, ³J = 7.9 Hz, 3'-H); 7.24 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.49-7.53 (m, 1H, 4'-H); 7.63 (dd, 1H, ³J = 7.6 Hz, ⁴J = 1.9 Hz, 6'-H); 7.78 (d, 2H, ³J = 8.8 Hz, 3-H, 5-H); 7.89 (d, 2H, ³J = 8.5 Hz, 2-H, 6-H); 10.39 (s, 1H, -NH-C=O); **LC-MS (m/z):** 305.2 [M]⁻, 307.3 [M]⁺, 613.4 [2M]⁺, 630.4 [2M+NH₄]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 98%; **Elementaranalyse:** C: 54.59% (theor. 54.89%), N: 8.90% (9.14%), H: 4.63% (4.61%)

3-Methoxy-*N*-(4-sulfamoylphenyl)benzamid (167, MAF11)



Summenformel: C₁₄H₁₄N₂O₄S

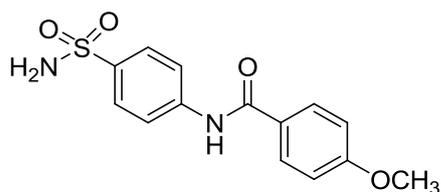
Molare Masse: 306.07 g/mol

Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift B dargestellt.

Ausbeute: 888 mg (97%)

Aussehen: weißes Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, wenig löslich in Aceton, Ethylacetat, Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser, Dichlormethan, Diethylether und Petrolether; **R_f-Wert:** 0.76 (Aceton:Toluol 3:2); **Schmelzpunkt:** 212-214 °C; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ 7.17 (ddd, 1H, ³J = 8.2 Hz, ⁴J = 1.9 Hz, ⁴J = 1.0 Hz, 4'-H); 7.25 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.46 (dd, 1H, ³J = 8.2 Hz, ³J = 7.6 Hz, 5'-H); 7.50 (dd, 1H, ⁴J = 1.9 Hz, ⁴J = 1.6 Hz, 2'-H); 7.55 (ddd, 1H, ³J = 7.9 Hz, ⁴J = 1.0 Hz, ⁴J = 0.6 Hz); 7.80 (d, 2H, ³J = 9.2 Hz, 3-H, 5-H); 7.94 (d, 2H, ³J = 8.9 Hz, 2-H, 6-H); 10.48 (s, 1H, NH-C=O); **LC-MS (m/z):** 305.2 [M]⁻, 307.3 [M]⁺, 324.3 [M+NH₄]⁺, 613.4 [2M]⁺, 630.4 [2M+NH₄]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 100%; **Elementaranalyse:** C: 54.84% (theor. 54.89%), N: 8.93% (9.14%), H: 4.61% (4.61%)

4-Methoxy-*N*-(4-sulfamoylphenyl)benzamid (168, MAF12)



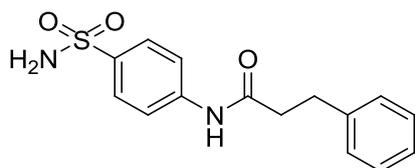
Summenformel: C₁₄H₁₄N₂O₄S

Molare Masse: 306.07 g/mol

Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift B dargestellt.

Ausbeute: 901 mg (97%)

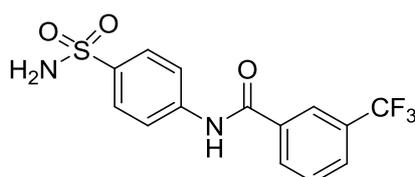
Aussehen: weißes Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, wenig löslich in Aceton, Ethylacetat, Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser, Dichlormethan, Diethylether und Petrolether; **R_f-Wert:** 0.67 (Aceton:Toluol 3:2); **Schmelzpunkt:** 286 °C; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ 3.84 (s, 3H, -OCH₃); 7.07 (d, 2H, ³J = 8.9 Hz, 3'-H, 5'-H); 7.23 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.78 (d, 2H, ³J = 8.8 Hz, 3-H, 5-H); 7.93 (d, 2H, ³J = 8.8 Hz, 2-H, 6-H); 7.97 (d, 2H, ³J = 8.9 Hz, 2'-H, 6'-H); 10.35 (s, 1H, -NH-C=O); **LC-MS (m/z):** 289.1 [M-NH₂]⁻, 305.2 [M]⁻, 307.4 [M]⁺, 324.3 [M+NH₄]⁺, 613.4 [2M]⁺, 630.5 [2M+NH₄]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 100%; **Elementaranalyse:** C: 54.87% (theor. 54.89%), N: 8.94% (9.14%), H: 4.60% (4.61%)

3-Phenyl-*N*-(4-sulfamoylphenyl)propanamid (169, MAF18)**Summenformel:** C₁₅H₁₆N₂O₃S**Molare Masse:** 304.36 g/mol

Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift B dargestellt.

Ausbeute: 908 mg (100%)

Aussehen: weißes Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, wenig löslich in Aceton, Ethylacetat, Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser, Dichlormethan, Diethylether und Petrolether; **R_f-Wert:** 0.67 (Aceton:Toluol 3:2); **Schmelzpunkt:** 204-206 °C; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ 2.66 (dd, 2H, J = 8.2 Hz, J = 7.3 Hz, CH₂-Ph); 2.91 (dd, 2H, J = 7.9 Hz, J = 7.6 Hz, CH₂-C=O); 7.17 (tt, 1H, ³J = 7.2 Hz, ⁴J = 1.9 Hz, 4'-H); 7.20 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.23-7.29 (m, 4H, 2'-H, 3'-H, 5'-H, 6'-H); 7.73 (s, 4H, 2-H, 3-H, 5-H, 6-H); 10.25 (s, 1H, NH-C=O); **LC-MS (m/z):** 303.1 [M]⁻, 305.2 [M]⁺, 322.4 [M+NH₄]⁺, 609.3 [2M]⁺, 626.4 [2M+NH₄]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 100%; **Elementaranalyse:** (C₁₅H₁₆N₂O₃S x ¼ H₂O): C: 58.21% (theor. 58.33%), N: 8.73% (9.07%), H: 5.05% (5.38%)

N-(4-Sulfamoylphenyl)-3-(trifluormethyl)benzamid (170, MAF10)**Summenformel:** C₁₄H₁₁F₃N₂O₃S**Molare Masse:** 344.04 g/mol

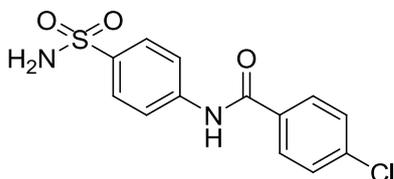
Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift B dargestellt.

Ausbeute: 962 mg (93%)

Aussehen: weißes Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, wenig löslich in Aceton, Ethylacetat, Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser, Dichlormethan, Diethylether und Petrolether; **R_f-Wert:** 0.75 (Aceton:Toluol 3:2); **Schmelzpunkt:** 225-226 °C; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ 7.27 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.78-7.84 (m, 3H, 3-H, 5-H, 5'-H); 7.94 (d, 2H, ³J = 8.9 Hz, 2-H, 6-H); 7.98 (d, 1H, ³J = 7.9 Hz, 4'-H); 8.27 (d, 1H, ³J =

7.9 Hz, 6'-H); 8.30 (s, 1H, 2'-H); 10.73 (s, 1H, NH-C=O); **LC-MS (m/z):** 343.3 [M]⁻, 345.3 [M]⁺, 362.4 [M+NH₄]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 100%; **Elementaranalyse:** C: 48.96% (theor. 48.84%), N: 8.19% (8.14%), H: 3.29% (3.22%)

4-Chlor-N-(4-sulfamoylphenyl)benzamid (171, MAF16)



Summenformel: C₁₃H₁₁ClN₂O₃S

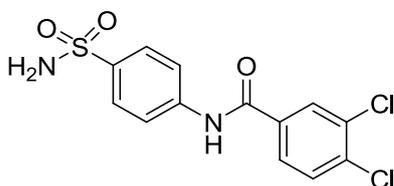
Molare Masse: 310.76 g/mol

Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift B dargestellt.

Ausbeute: 923 mg (100%)

Aussehen: weißes Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, wenig löslich in Aceton, Ethylacetat, Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser, Dichlormethan, Diethylether und Petrolether; **R_f-Wert:** 0.70 (Aceton:Toluol 3:2); **Schmelzpunkt:** 281-284 °C; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ 7.25 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.62 (d, 2H, ³J = 8.8 Hz, 3'-H, 5'-H); 7.81 (d, 2H, ³J = 8.8 Hz, 3-H, 5-H); 7.93 (d, 2H, ³J = 8.9 Hz, 2-H, 6-H); 8.00 (d, 2H, ³J = 8.5 Hz, 2'-H, 6'-H); 10.58 (s, 1H, -NH-C=O); **LC-MS (m/z):** 309.2 [M]⁻, 311.2 [M]⁺, 328.2 [M+NH₄]⁺, 638.2 [2M+NH₄]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 100%; **Elementaranalyse:** C: 50.16% (theor. 50.24%), N: 9.01% (9.01%), H: 3.69% (3.57%)

3,4-Dichlor-N-(4-sulfamoylphenyl)benzamid (172, MAF9)



Summenformel: C₁₃H₁₀Cl₂N₂O₃S

Molare Masse: 343.98 g/mol

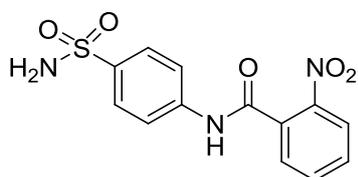
Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift B dargestellt.

Ausbeute: 1,01 g (97%)

Aussehen: weißes Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, wenig löslich in Aceton, Ethylacetat, Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser, Dichlormethan, Diethylether

und Petrolether; **R_f-Wert:** 0.72 (Aceton:Toluol 3:2); **Schmelzpunkt:** 260-269 °C; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ 7.26 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.82 (dd, 3H, ³J = 8.9 Hz, ³J = 8.5 Hz, 3-H, 5-H, 5'-H); 7.92 (d, 2H, ³J = 8.8 Hz, 2-H, 6-H); 7.95 (dd, 1H, ³J = 8.6 Hz, ⁴J = 2.2 Hz, 6'-H); 8.23 (d, 1H, ⁴J = 1.9 Hz, 2'-H); 10.65 (s, 1H, NH-C=O); **LC-MS (m/z):** 343.3 [M]⁻, 345.3 [M]⁺, 362.3 [M+NH₄]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 100%; **Elementaranalyse:** C: 45.24% (theor. 45.23%), N: 8.09% (8.12%), H: 3.08% (2.92%)

2-Nitro-*N*-(4-sulfamoylphenyl)benzamid (173, MAF15)



Summenformel: C₁₃H₁₁N₃O₅S

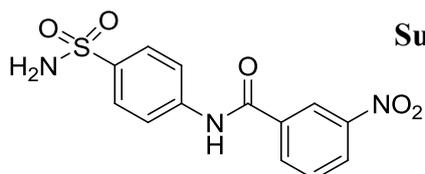
Molare Masse: 321.04 g/mol

Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift B dargestellt.

Ausbeute: 976 mg (100%)

Aussehen: weißes Pulver, **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, wenig löslich in Aceton, Ethylacetat, Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser, Dichlormethan, Diethylether und Petrolether; **R_f-Wert:** 0.61 (Aceton:Toluol 3:2); **Schmelzpunkt:** 274-275 °C; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ 7.27 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.76-7.90 (m, 7H, 2-H, 3-H, 5-H, 6-H, 4'-H 5'-H, 6'-H); 8.17 (dd, 1H, ³J = 8.2 Hz, ⁴J = 1.0 Hz, 3'-H); 10.96 (s, 1H, -NH-C=O); **LC-MS (m/z):** 320.0 [M]⁻, 322.3 [M]⁺, 339.3 [M+NH₄]⁺, 660.5 [2M+NH₄]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 100%; **Elementaranalyse:** (C₁₃H₁₁N₃O₅S x 1/8 H₂O): 48.67% (theor. 48.26%), N: 12.61% (12.99%), H: 3.46% (3.50%)

3-Nitro-*N*-(4-sulfamoylphenyl)benzamid (174, MAF13)



Summenformel: C₁₃H₁₁N₃O₅S

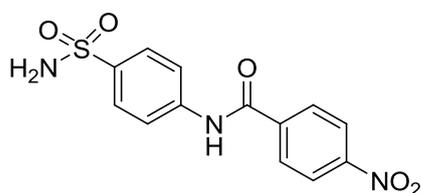
Molare Masse: 321.04 g/mol

Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift B dargestellt.

Ausbeute: 856 mg (90%)

Aussehen: weißes Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, wenig löslich in Aceton, Ethylacetat, Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser, Dichlormethan, Diethylether und Petrolether; **R_f-Wert:** 0.67 (Aceton:Toluol 3:2); **Schmelzpunkt:** 236 °C; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ 7.27 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.82-7.87 (m, 3H, 3-H, 5-H, 5'-H); 7.95 (d, 2H, ³J = 8.9 Hz, 2-H, 6-H); 8.41 (ddd, 1H, ³J = 7.6 Hz, ⁴J = 1.3 Hz, ⁴J = 1.0 Hz, 4'-H); 8.45 (ddd, 1H, ³J = 8.2 Hz, ⁴J = 1.3 Hz, ⁴J = 1.0 Hz, 6'-H); 8.80 (t, 1H, ⁴J = 1.9 Hz, 2'-H); 10.84 (s, 1H, -NH-C=O); **LC-MS (m/z):** 289.1 [M-NH₂]⁻, 305.2 [M]⁻, 307.4 [M]⁺, 324.3 [M+NH₄]⁺, 613.4 [2M]⁺, 630.5 [2M+NH₄]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 97%; **Elementaranalyse:** (C₁₃H₁₁N₃O₅S x 1/12 H₂O): 48.76% (theor. 48.37%), N: 12.58% (13.02%), H: 3.46% (3.49%)

4-Nitro-*N*-(4-sulfamoylphenyl)benzamid (175, MAF14)



Summenformel: C₁₃H₁₁N₃O₅S

Molare Masse: 321.04 g/mol

Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift B dargestellt.

Ausbeute: 893 mg (93%)

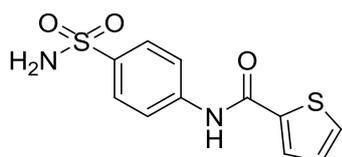
Aussehen: weißes Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, wenig löslich in Aceton, Ethylacetat, Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser, Dichlormethan, Diethylether und Petrolether; **R_f-Wert:** 0.68 (Aceton:Toluol 3:2); **Schmelzpunkt:** 266-269 °C (Lit.: 260-263 °C) ¹⁸¹⁻¹⁸²; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ 7.27 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.82 (d, 2H, ³J = 8.9 Hz, 3-H, 5-H); 7.94 (d, 2H, ³J = 8.9 Hz, 2-H, 6-H); 8.20 (d, 2H, ³J = 8.9 Hz, 2'-H, 6'-H); 8.38 (d, 2H, ³J = 9.1 Hz, 3'-H, 5'-H); 10.83 (s, 1H, -NH-C=O); **LC-MS (m/z):** 320.1 [M]⁻, 322.7 [M]⁺, 339.3 [M+NH₄]⁺, 660.5 [2M+NH₄]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 95%; **Elementaranalyse:** C: 48.49% (theor. 48.59%), N: 12.70% (13.08%), H: 3.53% (3.45%)

N-(4-Sulfamoylphenyl)furan-2-carboxamid (176, MAF19)**Summenformel:** C₁₁H₁₀N₂O₄S**Molare Masse:** 266.27 g/mol

Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift B dargestellt.

Ausbeute: 796 mg (100%)

Aussehen: weißes Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, wenig löslich in Aceton, Ethylacetat, Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser, Dichlormethan, Diethylether und Petrolether; **R_f-Wert:** 0.63 (Aceton:Toluol 3:2); **Schmelzpunkt:** 278-282 °C (Lit.: 283-284 °C)¹⁸³; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ 6.71 (dd, 1H, ³J = 1.9 Hz, ³J = 1.6 Hz, 4'-H); 7.24 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.38 (d, 1H, ³J = 3.8 Hz, 5'-H); 7.78 (d, 2H, ³J = 8.8 Hz, 3-H, 5-H); 7.91 (d, 2H, ³J = 8.8 Hz, 2-H, 6-H); 7.95 (m, 1H, 3'-H); 10.45 (s, 1H, NH-C=O); **LC-MS (m/z):** 265.1 [M]⁻, 267.2 [M]⁺, 284.1 [M+NH₄]⁺, 550.3 [2M+NH₄]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 100%; **Elementaranalyse:** C: 49.25% (theor. 49.62%), N: 10.37% (10.52%), H: 3.83% (3.79%)

N-(4-Sulfamoylphenyl)thiophen-2-carboxamid (177, MAF20)**Summenformel:** C₁₁H₁₀N₂O₃S₂**Molare Masse:** 282.34 g/mol

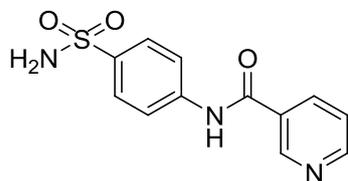
Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift B dargestellt.

Ausbeute: 846 mg (100%)

Aussehen: weißes Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, wenig löslich in Aceton, Ethylacetat, Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser, Dichlormethan, Diethylether und Petrolether; **R_f-Wert:** 0.67 (Aceton:Toluol 3:2); **Schmelzpunkt:** 285-289 °C (Lit.: 284-286 °C)¹⁸³; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ 7.24 (m, 3H, SO₂NH₂, 4'-H); 7.79 (d, 2H, ³J = 8.9 Hz, 3-H, 5-H); 7.89 (m, 3H, 2-H, 6-H, 3'-H); 8.05 (dd, 1H, ³J = 3.8 Hz, ⁴J = 1.3 Hz, 5'-H); 10.48 (s, 1H, NH-C=O); **LC-MS (m/z):** 281.2 [M]⁻, 283.1 [M]⁺, 300.1

$[M+NH_4]^+$, 582.3 $[2M+NH_4]^+$, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 100%;
Elementaranalyse: C: 46.73% (theor. 49.79%), N: 9.73% (9.92%), H: 3.65% (3.57%)

N-(4-Sulfamoylphenyl)nicotinamid (178, MAF23)



Summenformel: C₁₂H₁₁N₃O₃S

Molare Masse: 277.30 g/mol

Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift B dargestellt.

Ausbeute: 767 mg (93%)

Aussehen: weißes Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, wenig löslich in Aceton, Ethylacetat, Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser, Dichlormethan, Diethylether und Petrolether; **R_f-Wert:** 0.27 (Aceton:Toluol 3:2); **Schmelzpunkt:** 244-248 °C (Lit.: 250 °C)¹⁸⁴; **¹H-NMR:** 500 MHz, DMSO-*d*₆, δ 7.27 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.63 (dd, 1H, ³J = 7.9 Hz, ³J = 5.1, 3'-H); 7.82 (d, 2H, ³J = 8.8 Hz, 3-H, 5-H); 7.94 (d, 2H, ³J = 9.1 Hz; 2-H, 6-H); 8.39 (m, 1H, 2'-H); 8.80 (dd, 1H, ³J = 4.8 Hz, ⁴J = 1.6 Hz, 4'-H); 9.15 (dd, 1H, ⁴J = 1.6 Hz, ⁴J = 0.6 Hz, 6'-H); 10.78 (s, 1H, NH-C=O); **LC-MS (m/z):** 276.2 [M]⁻, 278.2 [M]⁺, 555.6 [2M]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 100%;
Elementaranalyse: (C₁₂H₁₁N₃O₃S x ¼ H₂O): C: 51.28% (theor. 51.15%), N: 14.85% (14.91%), H: 3.90% (4.11%)

N-(4-Sulfamoylphenyl)isonicotinamid (179, MAF24)



Summenformel: C₁₂H₁₁N₃O₃S

Molare Masse: 277.30 g/mol

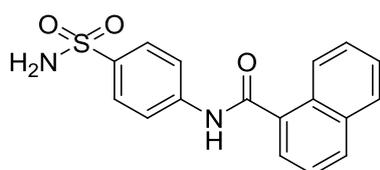
Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift B dargestellt.

Ausbeute: 571 mg (70%)

Aussehen: weißes Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, wenig löslich in Aceton, Ethylacetat, Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser, Dichlormethan, Diethylether

und Petrolether; **R_f-Wert:** 0.26 (Aceton:Toluol 3:2); **Schmelzpunkt:** 272-276 °C; **¹H-NMR:** 500 MHz, DMSO-*d*₆), δ 7.27 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.82 (d, 2H, ³J = 8.8 Hz, 3-H, 5-H); 7.87 (d, 2H, ³J = 6.0 Hz, 3'-H, 5'-H); 7.93 (d, 2H, ³J = 8.8 Hz; 2-H, 6-H); 8.80 (d, 2H, ³J = 6.0 Hz, 2'-H, 6'-H); 10.76 (s, 1H, NH-C=O); **LC-MS (m/z):** 276.2 [M]⁻, 278.2 [M]⁺, 555.6 [2M]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 100%; **Elementaranalyse:** C: 51.63% (theor. 51.98%), N: 15.09% (15.15%), H: 3.94% (4.00%)

N-(4-Sulfamoylphenyl)-1-naphtamid (180, MAF21)



Summenformel: C₁₇H₁₄N₂O₃S

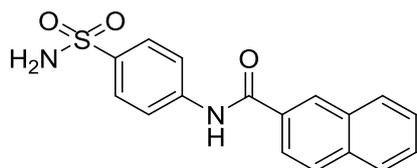
Molare Masse: 326.37 g/mol

Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift B dargestellt.

Ausbeute: 922 mg (93%)

Aussehen: weißes Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, wenig löslich in Aceton, Ethylacetat, Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser, Dichlormethan, Diethylether und Petrolether; **R_f-Wert:** 0.73 (Aceton : Toluol, 3:2); **Schmelzpunkt:** 256-260 °C; **¹H-NMR:** 500 MHz, DMSO-*d*₆), δ 7.27 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.61 (m, 3H, 4'-H, 5'-H, 6'-H); 7.78 (dd, 1H, ³J = 7.3 Hz, ⁴J = 1.0 Hz, 8'-H); 7.83 (d, 2H, ³J = 8.8 Hz; 3-H, 5-H); 7.96 (d, 2H, ³J = 8.9 Hz, 2-H, 6-H); 8.03 (m, 1H, 3'-H); 8.10 (d, 1H, ³J = 8.2 Hz, 9'-H); 8.18 (m, 1H, 10'-H); 10.61 (s, 1H, NH-C=O); **LC-MS (m/z):** 325.3 [M]⁻, 327.3 [M]⁺, 344.3 [M+NH₄]⁺, 653.3 [2M]⁺, 675.4 [2M+Na]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 99%; **Elementaranalyse:** C: 62.49% (theor. 62.56%), N: 8.44% (8.58%), H: 4.38% (4.32%)

N-(4-Sulfamoylphenyl)-2-naphtamid (181, MAF22)



Summenformel: C₁₇H₁₄N₂O₃S

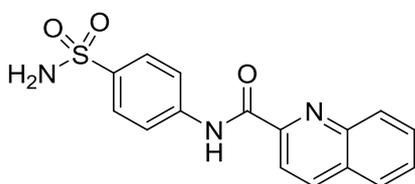
Molare Masse: 326.37 g/mol

Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift B dargestellt.

Ausbeute: 971 mg (100%)

Aussehen: weißes Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, wenig löslich in Aceton, Ethylacetat, Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser, Dichlormethan, Diethylether und Petrolether; **R_f-Wert:** 0.68 (Aceton:Toluol 3:2); **Schmelzpunkt:** 305-308 °C; **¹H-NMR:** 500 MHz, DMSO-*d*₆), δ 7.26 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.64 (m, 2H, 5'-H, 6'-H); 7.83 (d, 2H, ³J = 8.9 Hz, 3-H, 5-H); 8.05 (m, 6H, 2-H, 6-H, 4'-H, 7'-H, 9'-H, 10'-H); 8.61 (s, 1H, 2'-H); 10.71 (s, 1H, NH-C=O); **LC-MS (m/z):** 325.3 [M]⁻, 327.2 [M]⁺, 344.3 [M+NH₄]⁺, 653.3 [2M]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 100%; **Elementaranalyse:** C: 62.38% (theor. 62.56%), N: 8.50% (8.58%), H: 4.45% (4.32%)

N-(4-Sulfamoylphenyl)chinolin-2-carboxamid (182, MAF25)



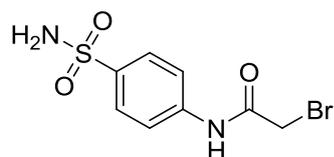
Summenformel: C₁₆H₁₃N₃O₃S

Molare Masse: 327.36 g/mol

Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift B in einem 1,5 mmol Ansatz dargestellt.

Ausbeute: 371 mg (73%)

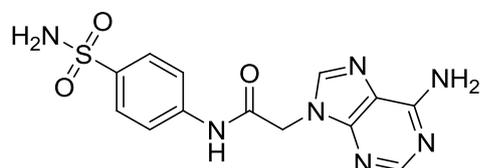
Aussehen: bräunlich violetter Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, wenig löslich in Aceton, Ethylacetat, Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser, Dichlormethan, Diethylether und Petrolether; **R_f-Wert:** 0.74 (Aceton:Toluol 3:2); **Schmelzpunkt:** 262-265 °C; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ 7.28 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.76 (td, 1H, ³J = 7.9 Hz, ⁴J = 1.3 Hz, 6'-H); 7.85 (d, 2H, ³J = 8.8 Hz, 3-H, 5-H); 7.93 (td, 1H, ³J = 8.5 Hz, ⁴J = 1.3 Hz, 5'-H); 8.13 (m, 3H, 2-H, 6-H, 7'-H); 8.26 (dd, 2H, ³J = 9.2 Hz, ³J = 8.5 Hz, 4'-H, 9'-H); 8.64 (d, 1H, ³J = 8.6 Hz, 10'-H); 11.02 (s, 1H, NH-C=O); **LC-MS (m/z):** 326.2 [M]⁻, 328.2 [M]⁺, 655.3 [2M]⁺, 677.4 [2M+Na]⁺; **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 99%; **Elementaranalyse (C₁₆H₁₃N₃O₃S x ¼ H₂O):** C: 58.05% (theor. 57.91%), N: 12.32% (12.66%), H: 3.98% (4.10%)

2-Brom-N-(4-sulfamoylphenyl)acetamid (184, MAF83.1)**Summenformel:** C₈H₉BrN₂O₃S**Molare Masse:** 293.14 g/mol

0,86 g (5 mmol) Sulfanilamid werden in 50 ml Aceton gelöst und mit 0,8 g (10 mmol) Natriumhydrogencarbonat versetzt. Unter Eiskühlung werden 0,4 ml (5 mmol) Bromacetylchlorid zugetropft. Der Ansatz wird etwa 2 Stunden gerührt und dabei langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Nach Beenden der Reaktion wird das Lösungsmittel abrotiert, der Rückstand in Wasser suspendiert, abfiltriert und getrocknet.

Ausbeute: 1,44 g (98%)

LC-MS (m/z): 293.3 [M(⁸¹Br)]⁻, 295.0 [M(⁷⁹Br)]⁺, 297.0 [M(⁸¹Br)]⁺, 312.1 [M(⁷⁹Br)+NH₄]⁺, 314.1 [M(⁸¹Br)+NH₄]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 99%;

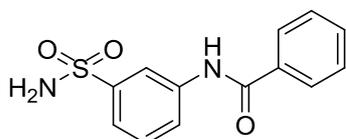
2-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-N-(4-sulfamoylphenyl)acetamid (186, MAF83)**Summenformel:** C₁₃H₁₃N₇O₃S**Molare Masse:** 347.35 g/mol

0,62 g (3 mmol) Adenin werden in 10 ml trockenem DMF gelöst. Unter Eiskühlung werden 0,12 g (6 mmol) einer Natriumhydrid-Dispersion zugegeben. Die Mischung wird unter Beibehaltung der Eiskühlung für etwa 1 Stunde gerührt. Anschließend werden langsam 0,88 g (3mmol) 2-Brom-N-(4-sulfamoylphenyl)acetamid, gelöst in 2 ml trockenem DMF, zugegeben, die Mischung langsam auf Raumtemperatur erwärmt und für 24 Stunden gerührt. Nach Beenden der Reaktion wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mit Petrolether zum Entfernen des Mineralöls und anschließend mit Wasser gewaschen, filtriert und getrocknet.

Ausbeute: 813 mg (78%)

Aussehen: weißes Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, wenig löslich in Aceton, Ethylacetat, Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser, Dichlormethan, Diethylether und Petrolether; **Schmelzpunkt:** 319-321 °C unter Zersetzung; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ 5.10 (s, 2H, CH₂); 7.20 (s, 2H, NH₂ Adenin); 7.24 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.72 (d, 2H, ³J = 8.5 Hz, 3-H, 5-H); 7.77 (d, 2H, ³J = 8.5 Hz, 2-H, 6-H); 8.11 (s, 1H, 8-Pos. Adenin); 8.12 (s, 1H, 2-Pos. Adenin); 10.77 (s, 1H, NH-C=O); **LC-MS (m/z):** 348.1 [M]⁻, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 99 %

N-(3-Sulfamoylphenyl)benzamid (196, MAF26)



Summenformel: C₁₃H₁₂N₂O₃S

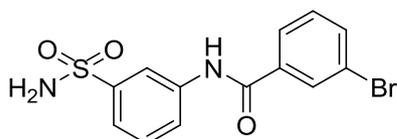
Molare Masse: 276.32 g/mol

Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift B in einem 1,5 mmol Ansatz dargestellt.

Ausbeute: 406 mg (98%)

Aussehen: weißes Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, wenig löslich in Aceton, Ethylacetat, Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser, Dichlormethan, Diethylether und Petrolether; **R_f-Wert:** 0.70 (Aceton:Toluol 3:2); **Schmelzpunkt:** 232-235 °C; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ 7.35 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.57 (m, 5H, 5-H, 6-H, 3'-H, 4'-H, 5'-H); 7.97 (m, 3H, 4-H, 2'-H, 6'-H); 8.37 (s, 1H, 2-H); 10.51 (s, 1H, NH-C=O); **LC-MS (m/z):** 275.2 [M]⁻, 294.2 [M+NH₄]⁺, 570.6 [2M+NH₄]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 100%; **Elementaranalyse:** C: 56.50% (theor. 56.51%), N: 10.03% (10.14%), H: 4.27% (4.38%)

3-Brom-*N*-(3-sulfamoylphenyl)benzamid (197, MAF27)



Summenformel: C₁₃H₁₁BrN₂O₃S

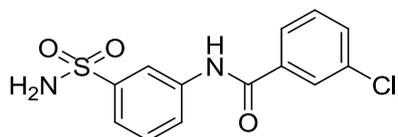
Molare Masse: 355.21 g/mol

Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift B dargestellt.

Ausbeute: 1,06 g (99%)

Aussehen: weißes Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, wenig löslich in Aceton, Ethylacetat, Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser, Dichlormethan, Diethylether und Petrolether; **R_f-Wert:** 0.74 (Aceton:Toluol 3:2); **Schmelzpunkt:** 234-236 °C; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ 7.36 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.54 (m, 3H, 5-H, 4'-H, 5'-H); 7.81 (m, 1H, 6-H); 7.96 (m, 2H, 4-H, 6'-H); 8.17 (dd, 1H, ⁴J = 1.9 Hz, ⁴J = 1.6 Hz, 2'-H); 8.33 (dd, 1H, ⁴J = 1.9 Hz, ⁴J = 1.6 Hz, 2-H); 10.59 (s, 1H, NH-C=O); **LC-MS (m/z):** 353.3 [M(⁷⁹Br)]⁻, 355.3 [M(⁸¹Br)]⁻, 355.2 [M(⁷⁹Br)]⁺, 357.2 [M(⁸¹Br)]⁺, 372.2 [M(⁷⁹Br)+NH₄]⁺, 374.2 [M(⁸¹Br)+NH₄]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 100%; **Elementaranalyse:** C: 43.92% (theor. 43.96%), N: 7.83% (7.89%), H: 3.14% (3.12%)

3-Chlor-N-(3-sulfamoylphenyl)benzamid (198, MAF30)



Summenformel: C₁₃H₁₁ClN₂O₃S

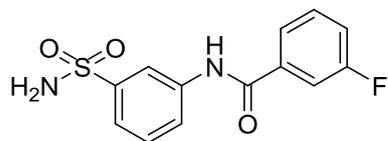
Molare Masse: 310.76 g/mol

Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift B dargestellt.

Ausbeute: 924 mg (99%)

Aussehen: weißes Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, wenig löslich in Aceton, Ethylacetat, Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser, Dichlormethan, Diethylether und Petrolether; **R_f-Wert:** 0.75 (Aceton:Toluol 3:2); **Schmelzpunkt:** 223-227 °C; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ 7.36 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.52-7.58 (m, 2H, 4-H, 5-H); 7.62 (d, 2H, ³J = 8.9 Hz, 3'-H, 5'-H); 7.95 (td, 1H, ³J = 7.3 Hz, ⁴J = 1.9 Hz, 6-H); 8.01 (d, 2H, ³J = 8.8 Hz, 2'-H, 6'-H); 8.34 (t, 1H, ⁴J = 1.6 Hz, 2-H); 10.56 (s, 1H, NH-C=O); **LC-MS (m/z):** 309.2 [M]⁻, 328.2 [M+NH₄]⁺, 638.3 [2M+NH₄]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 100%; **Elementaranalyse:** C: 50.15% (theor. 50.24%), N: 9.04% (9.01%), H: 3.66% (3.57%)

3-Fluor-N-(3-sulfamoylphenyl)benzamid (199, MAF28)



Summenformel: C₁₃H₁₁FN₂O₃S

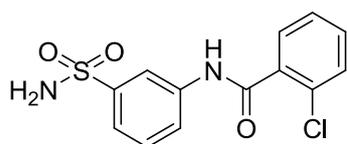
Molare Masse: 294.30 g/mol

Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift B dargestellt.

Ausbeute: 879 mg (100%)

Aussehen: weißes Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, wenig löslich in Aceton, Ethylacetat, Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser, Dichlormethan, Diethylether und Petrolether; **R_f-Wert:** 0.71 (Aceton:Toluol 3:2); **Schmelzpunkt:** 250-254 °C; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ 7.36 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.46 (m, 1H, 4'-H); 7.59 (m, 3H, 5-H, 2'-H, 5'-H); 7.79 (m, 1H, 6-H); 7.84 (m, 1H, 6'-H); 7.96 (dt, 1H, ³J = 7.3 Hz, ⁴J = 1.9 Hz, 4-H); 8.34 (dd, 1H, ⁴J = 1.9 Hz, ⁴J = 1.6 Hz, 2-H); 10.56 (s, 1H, NH-C=O); **LC-MS (m/z):** 293.2 [M]⁻, 312.2 [M+NH₄]⁺, 606.3 [2M+NH₄]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 100%; **Elementaranalyse:** C: 53.05% (theor. 53.05%), N: 9.40% (9.52%), H: 3.75% (3.77%)

2-Chlor-N-(3-sulfamoylphenyl)benzamid (200, MAF29)



Summenformel: C₁₃H₁₁ClN₂O₃S

Molare Masse: 310.76 g/mol

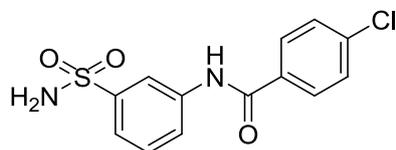
Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift B dargestellt.

Ausbeute: 908 mg (97%)

Aussehen: weißes Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, wenig löslich in Aceton, Ethylacetat, Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser, Dichlormethan, Diethylether und Petrolether; **R_f-Wert:** 0.73 (Aceton:Toluol 3:2); **Schmelzpunkt:** 214-216 °C; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ 7.37 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.54 (m, 6H, 4-H, 5-H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 6'-H); 7.80 (m, 1H, 6-H); 8.35 (dd, 1H, ⁴J = 1.9 Hz, ⁴J = 1.6 Hz, 2-H); 10.78 (s, 1H, NH-C=O); **LC-MS (m/z):** 309.2 [M]⁻, 328.2 [M+NH₄]⁺, 638.3 [2M+NH₄]⁺, **Reinheit**

mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS: 99%; **Elementaranalyse:** (C₁₃H₁₁ClN₂O₃S x ¼ H₂O): C: 49.79% (theor. 49.53%), N: 8.85% (8.89%), H: 3.64% (3.68%)

4-Chlor-N-(3-sulfamoylphenyl)benzamid (201, MAF31)



Summenformel: C₁₃H₁₁ClN₂O₃S

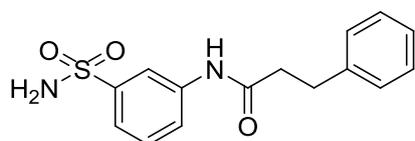
Molare Masse: 310.76 g/mol

Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift B dargestellt.

Ausbeute: 920 mg (99%)

Aussehen: weißes Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, wenig löslich in Aceton, Ethylacetat, Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser, Dichlormethan, Diethylether und Petrolether; **R_f-Wert:** 0.75 (Aceton:Toluol 3:2); **Schmelzpunkt:** 265-269 °C; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ 7.36 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.56 (m, 2H, 5-H, 6-H); 7.62 (d, 2H, ³J = 8.9 Hz, 3'-H, 5'-H); 7.95 (dt, 1H, ³J = 7.3 Hz, ⁴J = 1.9 Hz, 4-H); 8.01 (d, 2H, ³J = 8.8 Hz, 2'-H, 6'-H); 8.34 (dd, 1H, ⁴J = 1.6 Hz, 2-H); 10.56 (s, 1H, NH-C=O); **LC-MS (m/z):** 309.2 [M]⁻, 328.2 [M+NH₄]⁺, 638.3 [2M+NH₄]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 100%; **Elementaranalyse:** C: 50.21% (theor. 50.24%), N: 8.99% (9.0%), H: 3.65% (3.57%)

3-Phenyl-N-(3-sulfamoylphenyl)propanamid (202, MAF32)



Summenformel: C₁₅H₁₆N₂O₃S

Molare Masse: 304.36 g/mol

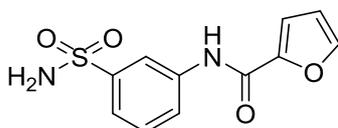
Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift B dargestellt.

Ausbeute: 882 mg (97%)

Aussehen: weißes Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, wenig löslich in Aceton, Ethylacetat, Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser, Dichlormethan, Diethylether und Petrolether; **R_f-Wert:** 0.72 (Aceton:Toluol 3:2); **Schmelzpunkt:** 193-196 °C; **¹H-**

NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ 2.65 (dd, 2H, $J = 7.9$ Hz, $J = 7.6$ Hz, CH₂-Ar); 2.92 (dd, 2H, $J = 7.9$ Hz, $J = 7.6$ Hz, CH₂-CO); 7.17 (tt, 1H, $^3J = 6.9$ Hz, $^4J = 1.6$ Hz, 4'-H); 7.26 (m, 4H, 2'-H, 3'-H, 5'-H, 6'-H); 7.32 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.47 (m, 2H, 5-H, 6-H); 7.72 (m, 1H, 4-H); 8.14 (s, 1H, 2-H); 10.18 (s, 1H, NH-C=O); **LC-MS (m/z):** 303.1 [M]⁻, 305.3 [M]⁺, 322.4 [M+NH₄]⁺, 607.3 [2M]⁻, 609.3 [2M]⁺, 626.5 [2M+NH₄]⁺, 631.4 [2M+Na]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 100%; **Elementaranalyse:** C: 59.19% (theor. 59.19%), N: 9.12% (9.20%), H: 5.25% (5.30%)

N-(3-Sulfamoylphenyl)furan-2-carboxamid (203, MAF33)



Summenformel: C₁₁H₁₀N₂O₄S

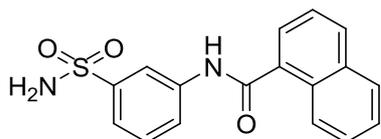
Molare Masse: 266.27 g/mol

Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift B dargestellt.

Ausbeute: 770 mg (97%)

Aussehen: weißes Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, wenig löslich in Aceton, Ethylacetat, Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser, Dichlormethan, Diethylether und Petrolether; **R_f-Wert:** 0.55 (Aceton:Toluol 3:2); **Schmelzpunkt:** 192-195 °C; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ 6.71 (dd, 1H, $^3J = 3.5$ Hz, $^4J = 1.6$ Hz, 4'-H); 7.35 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.38 (dd, 1H, $^3J = 3.5$ Hz, $^4J = 1.6$ Hz, 5'-H); 7.53 (m, 2H, 5-H, 6-H); 7.93 (dt, 1H, $^3J = 7.3$ Hz, $^4J = 1.9$ Hz, 4-H); 7.95 (dd, 1H, $^3J = 1.9$ Hz, $^4J = 0.6$ Hz, 3'-H); 8.31 (dd, 1H, $^4J = 1.6$ Hz, 2-H); 10.45 (s, 1H, NH-C=O); **LC-MS (m/z):** 265.2 [M]⁻, 284.2 [M+NH₄]⁺, 550.5 [2M+NH₄]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 98%; **Elementaranalyse:** C: 49.51% (theor. 49.62%), N: 10.30% (10.52%), H: 3.75% (3.79%)

N-(3-Sulfamoylphenyl)-1-naphthamid (204, MAF34)



Summenformel: C₁₇H₁₄N₂O₃S

Molare Masse: 326.37 g/mol

Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift B dargestellt.

Ausbeute: 966 mg (99%)

Aussehen: bräunlich weißes Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, wenig löslich in Aceton, Ethylacetat, Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser, Dichlormethan, Diethylether und Petrolether; **R_f-Wert:** 0.73 (Aceton:Toluol 3:2); **Schmelzpunkt:** 227-230 °C; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ 7.38 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.59 (m, 5H, 3'-H, 6'-H, 7'-H, 8'-H, 9'-H); 7.78 (dd, 1H, ³J = 6.9 Hz, ⁴J = 1.3 Hz, 4'-H); 7.90 (dt, 1H, ³J = 7.6 Hz, ⁴J = 1.9 Hz, 5-H); 8.02 (m, 1H, 6-H); 8.09 (d, 1H, 3J = 8.4 Hz, 4-H); 8.19 (m, 1H, 2'-H); 8.46 (s, 1H, 2-H); 10.84 (s, 1H, NH-C=O); **LC-MS (m/z):** 325.3 [M]⁻, 327.3 [M]⁺, 344.3 [M+NH₄]⁺, 653.4 [2M]⁺, 670.4 [2M+NH₄]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 99%; **Elementaranalyse** (C₁₇H₁₄N₂O₃S x ¼ H₂O): C: 62.02% (theor. 61.71%), N: 8.38% (8.47%), H: 4.35% (4.42%)

N-(2-Hydroxy-5-sulfamoylphenyl)benzamid (206, MAF35)



Summenformel: C₁₃H₁₂N₂O₄S

Molare Masse: 292.31 g/mol

566 mg (3 mmol) 2-Aminophenol-4-sulfonamid werden in 15 ml Aceton gelöst und mit 0,5 g (6 mmol) Natriumhydrogencarbonat versetzt. Unter Eiskühlung wird eine Lösung von 0,34 ml Benzoylchlorid in 15 ml Aceton sehr langsam über einen Zeitraum von etwa einer Stunde zugetropft. Der Ansatz wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und nach Beenden der Reaktion das Aceton über einen Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in Eiswasser suspendiert. Das Produkt wird abfiltriert und mit Wasser und Diethylether gewaschen.

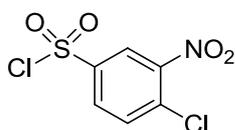
Aufgrund der Konkurrenzreaktion unter Bildung des Nebenproduktes 2-Amino-5-sulfamoylphenylbenzoat ist es bei dieser Verbindung notwendig das Produkt säulenchromatographisch aufzureinigen. Da die Verbindung jedoch in den meisten Lösungsmitteln nicht ausreichend gut löslich ist wird das Rohprodukt hier in einer größeren Menge eines Dichlormethan-Methanol-Gemisches (etwa 100 ml) gelöst. Kleine schwer lösliche Rückstände werden abfiltriert und anschließend die Lösung mit 1,8 g Kieselgel versetzt und zur Trockne eingedampft. Dieses Gemisch des Rohproduktes mit Kieselgel wird dann trocken auf die Säule gegeben und mit einem Gradienten von 0% zu

20% Methanol in Dichlormethan als Fließmittel chromatographiert. Die entsprechenden Fraktionen werden vereinigt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

Ausbeute: 20%

Aussehen: braun-violettes Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, wenig löslich in Aceton, Ethylacetat, Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser, Dichlormethan, Diethylether und Petrolether; **R_F-Wert:** 0.55 (Aceton:Toluol 3:2); **Schmelzpunkt:** 274-276 °C; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ 7.01 (d, 1H, ³J = 8.6 Hz, 5-H); 7.15 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.49 (dd, 1H, ³J = 8.5 Hz, ⁴J = 1.9 Hz, 6-H); 7.54 (d, 2H, ³J = 7.9 Hz, 3'-H, 5'-H); 7.60 (dd, 1H, ³J = 7.3 Hz, ³J = 7.0 Hz, 4'-H); 7.96 (d, 2H, ³J = 7.9 Hz, 2'-H, 6'-H); 8.25 (d, 1H, ⁴J = 2.2 Hz, 2-H); 9.56 (s, 1H, NH-C=O); **LC-MS (m/z):** 291.2 [M]⁻, 293.2 [M]⁺, 310.2 [M+NH₄]⁺, 585.4 [2M]⁺, 602.5 [2M+NH₄]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 100%; **Elementaranalyse** (C₁₃H₁₂N₂O₄S x ¼ H₂O): C: 52.92% (theor. 52.60%), N: 9.33% (9.44%), H: 4.14% (4.24%)

4-Chlor-3-nitrobenzen-1-sulfonylchlorid (210, MAF36.1)



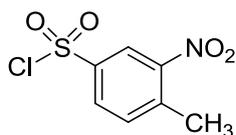
Summenformel: C₆H₃Cl₂NO₄S

Molare Masse: 256.06 g/mol

4,7 g (30 mmol) 2-Nitrochlorbenzen werden unter Eiskühlung mit 6 ml Chlorsulfonsäure (90 mmol) versetzt und anschließend für 20 Stunden bei 95-105°C erhitzt. Nach Abkühlen der Lösung auf Raumtemperatur wird diese vorsichtig unter Rühren auf Eis gegeben. Dabei entsteht ein braun-weißer Niederschlag.

Die so erhaltene wässrige Suspension wird viermal mit je 50 ml Ethylacetat extrahiert, die organische Phase zweimal mit 50 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und einmal mit 50 ml Wasser gewaschen und anschließend über Natriumsulfat getrocknet.

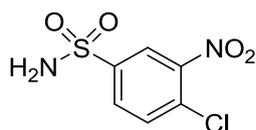
Nach Abfiltrieren des Natriumsulfats wird der Ansatz auf etwa 30 ml eingengt und direkt in der zweiten Stufe weiter umgesetzt.

4-Methyl-3-nitrobenzen-1-sulfonylchlorid (211, MAF37.1)**Summenformel:** C₇H₆ClNO₄S**Molare Masse:** 235.64 g/mol

3,5 ml (30 mmol) 2-Nitrotoluol werden in 15 ml Dichlormethan gelöst und unter Eiskühlung mit 5 ml (75 mmol) Chlorsulfonsäure versetzt, wobei eine rot-braune Lösung entsteht. Der Reaktionsansatz wird anschließend für 36 Stunden bei 50°C erhitzt, wobei sich die Lösung dunkel braun färbt. Nach Abkühlen der Lösung auf Raumtemperatur wird diese vorsichtig unter Rühren auf Eis gegeben. Dabei entsteht ein braun-weißer Niederschlag.

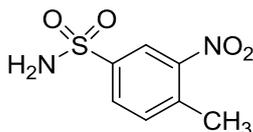
Die so erhaltene wässrige Suspension wird viermal mit je 25 ml Ethylacetat extrahiert, die organische Phase zweimal mit 25 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und einmal mit 25 ml Wasser gewaschen und anschließend über Natriumsulfat getrocknet.

Nach Abfiltrieren des Natriumsulfats wird der Ansatz auf etwa 30 ml eingeeengt und direkt in der zweiten Stufe weiter umgesetzt.

4-Chlor-3-nitrobenzensulfonamid (212, MAF36.2)**Summenformel:** C₆H₅ClN₂O₄S**Molare Masse:** 236.63 g/mol

Der im vorherigen Schritt erhaltene Ansatz wird unter Eiskühlung mit 8.6 ml 7N methanolischer Ammoniaklösung (60 mmol) versetzt, wobei ein gelblich-weißer Niederschlag entsteht. Nach ca. 15 Minuten ist die Reaktion beendet (DC-Kontrolle). Die organische Phase wird mit Wasser gewaschen und anschließend am Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft.

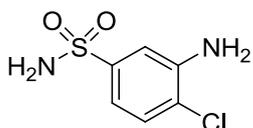
Ausbeute: 1,92 g (27%) berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen**LC-MS (m/z):** 235.1 [M]⁻, 254.1 [M]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 97%

4-Methyl-3-nitrobenzensulfonamid (213, MAF37.2)**Summenformel:** C₇H₈N₂O₄S**Molare Masse:** 216.21 g/mol

Der im vorherigen Schritt erhaltene Ansatz wird unter Eiskühlung mit 8,6 ml 7N methanolischer Ammoniaklösung (60 mmol) versetzt, wobei ein gelblich-weißer Niederschlag entsteht. Nach ca. 15 Minuten ist die Reaktion beendet (DC-Kontrolle). Die organische Phase wird mit Wasser gewaschen und anschließend am Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft.

Ausbeute: 1,99 g (31%) berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

LC-MS (m/z): 215.1 [M]⁻, 450.4 [2M+NH₄]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 95 %

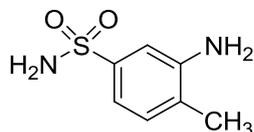
3-Amino-4-chlorbenzensulfonamid (214, MAF36.3)**Summenformel:** C₆H₇ClN₂O₂S**Molare Masse:** 206.65 g/mol

0,71 g (3 mmol) 4-Chlor-3-nitrobenzensulfonamid wird in einer Mischung aus 10 ml Ethanol und 10 ml Tetrahydrofuran gelöst und unter Rühren langsam mit 3,37 g (15 mmol) Zinn(II)chlorid versetzt. Nach etwa einer Stunde bei Raumtemperatur ist die Reaktion beendet (DC-Kontrolle) und das Lösungsmittel wird über einen Rotationsverdampfer entfernt, wobei ein öliger Rückstand im Kolben entsteht, der bei Zugabe von Wasser zu einem schmutzig weißen Niederschlag auskristallisiert. Der Ansatz wird mit Natronlauge (50%ig) auf einen pH-Wert von etwa 7-8 eingestellt, wobei sich der Niederschlag verdichtet und wird anschließend mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und schließlich am Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft.

Ausbeute: 445 mg (73%)

LC-MS (m/z): 205.0 [M]⁻, 207.0 [M]⁺, 224.0 [M+NH₄]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 96 %

3-Amino-4-methylbenzulfonamid (215, MAF37.3)



Summenformel: C₇H₁₀N₂O₂S

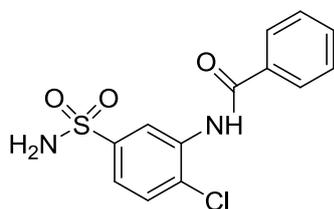
Molare Masse: 186.23 g/mol

865 mg (4 mmol) 4-Methyl-3-nitrobenzulfonamid werde in einer Mischung aus 10 ml Ethanol und 10 ml Tetrahydrofuran gelöst und unter Rühren langsam mit 3,37 g (15 mmol) Zinn(II)chlorid versetzt. Nach etwa einer Stunde erwärmen auf 50°C ist die Reaktion beendet (DC-Kontrolle) und das Lösungsmittel wird über einen Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wird in 10 ml Wasser aufgenommen und der Ansatz mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung auf einen pH-Wert von etwa 7-8 eingestellt, wobei sich der weiße Niederschlag verdichtete. Anschließend wird das Produkt durch fünfmaliges ausschütteln mit je 50 ml Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wird mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und schließlich am Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft.

Ausbeute: 505 mg (68%)

LC-MS (m/z): 185.3 [M]⁻, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 99 %

N-(2-chlor-5-sulfamoylphenyl)benzamid (216, MAF36.4)



Summenformel: C₁₃H₁₁ClN₂O₃S

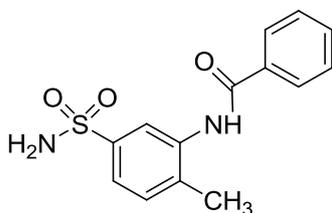
Molare Masse: 310.76 g/mol

Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift B in einem 2,2 mmol Ansatz dargestellt.

Ausbeute: 413 mg (59%)

Aussehen: weißes Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, wenig löslich in Aceton, Ethylacetat, Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser, Dichlormethan, Diethylether und Petrolether; **R_f-Wert:** 0.76 (Aceton:Toluol 3:2); **Schmelzpunkt:** 192-194 °C; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ 7.50 (brs, 2H, SO₂NH₂); 7.55 (dd, 2H, ³J = 7.9 Hz, ³J = 7.3 Hz, 3'-H, 5'-H); 7.63 (tt, 1H, ³J = 7.3 Hz, ⁴J = 1.3 Hz, 4'-H); 7.70 (dd, 1H, ³J = 8.5 Hz, ⁴J = 2.2 Hz, 6-H); 7.77 (d, 1H, ³J = 8.6 Hz, 5-H); 8.00 (d, 2H, ³J = 7.0 Hz, 2'-H, 6'-H); 8.09 (d, 1H, ⁴J = 2.2 Hz, 2-H); 10.22 (brs, 1H, NH-C=O); **LC-MS (m/z):** 309.2 [M]⁻, 311.2 [M]⁺, 328.3 [M+NH₄]⁺, 638.6 [2M+NH₄]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 98%; **Elementaranalyse:** C: 50.29% (theor. 50.24%), N: 8.77% (9.01%), H: 3.53% (3.57%)

N-(2-Methyl-5-sulfamoylphenyl)benzamid (217, MAF37.4)



Summenformel: C₁₄H₁₄N₂O₃S

Molare Masse: 290.34 g/mol

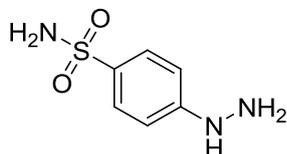
Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift B in einem 2,7 mmol Ansatz dargestellt.

Ausbeute: 536 mg (67%)

Aussehen: weißes Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, wenig löslich in Aceton, Ethylacetat, Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser, Dichlormethan, Diethylether und Petrolether; **R_f-Wert:** 0.71 (Aceton:Toluol 3:2); **Schmelzpunkt:** 174-178 °C; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ 2.31 (s, 3H, Ar-CH₃); 7.32 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.46 (d, 1H, ³J = 8.2 Hz, 5-H); 7.54 (dd, 2H, ³J = 7.9 Hz, ³J = 7.3 Hz, 3'-H, 5'-H); 7.61 (m, 2H, 4'-H, 6-H); 7.86 (d, 1H, ⁴J = 2.3 Hz, 2-H); 7.98 (d, 2H, ³J = 6.0 Hz, 2'-H, 6'-H); 10.05 (s, 1H, NH-C=O); **LC-MS (m/z):** 289.2 [M]⁻, 291.4 [M]⁺, 308.4 [M+NH₄]⁺, 581.6 [2M]⁺, 598.5 [2M+NH₄]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 97%; **Elementaranalyse:** C: 57.87% (theor. 57.92%), N: 9.50% (9.65%), H: 4.94% (4.86%)

11.6 4-(2-Benzylidenhydrazinyl)benzensulfonamide

4-Hydrazinylbenzensulfonamid (**218**, MAF42.1)



Summenformel: C₆H₉N₃O₂S

Molare Masse: 187,22 g/mol (HCl: 223,68 g/mol)

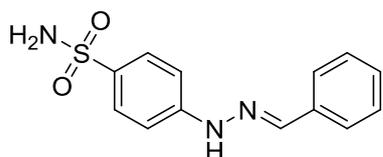
1,72 g (10 mmol) Sulfanilamid werden mit 5 ml konzentrierter Salzsäure und 10 g Eis versetzt. Unter Eiskühlung wird langsam eine Lösung von 690 mg (10 mmol) Natriumnitrit in 1,25 ml Wasser zugetropft. Nach 30 Minuten wird die entstandene Lösung unter Eiskühlung und starkem Rühren auf eine kalte Lösung von 5 g (etwa 20 mmol) Zinn(II)chlorid in 7,5 ml konzentrierter Salzsäure gegeben. Das entstandene Reaktionsgemisch wurde über Nacht im Kühlschrank verwahrt und am folgenden Tag der entstandene Niederschlag abfiltriert.

Ausbeute: 1,74 g (78%)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] 7.04 (d, 2H, ³J = 8.5 Hz, 3-H, 5-H); 7.16 (d, 2H, SO₂NH₂); 7.69 (d, 2H, ³J = 8.5 Hz, 2-H, 6-H); 8.84 (s, 1H, -NH); 10.43 (s, 3H, -NH₃⁺); **LC-MS (m/z):** 186.4 [M]⁻, 188.1 [M]⁺; 205.2 [M+NH₄]⁺, 375.4 [2M]⁺, 562.4 [3M]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 98 %

Vorschrift C

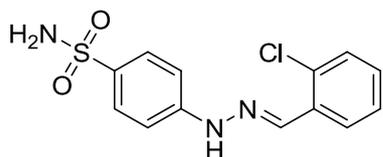
0,67 g (3 mmol) 4-Hydrazinylbenzensulfonamid-Hydrochlorid werden in 30 ml Ethanol gelöst und mit 3 mmol des entsprechenden Aldehyds versetzt. Der Reaktionsansatz wird für etwa 90 Minuten, bis zum Beenden der Reaktion (DC-Kontrolle) zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird der Ansatz auf Eiswasser gegeben und das dabei präzipitierte Produkt abfiltriert, mit Wasser und Diethylether gewaschen und getrocknet.

4-(2-Benzylidenhydrazinyl)benzensulfonamid (241, MAF42)**Summenformel:** C₁₃H₁₃N₃O₂S**Molare Masse:** 275,33 g/mol

Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift C dargestellt.

Ausbeute: 670 mg (81%)

Aussehen: weißes Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, Aceton, und Dichlormethan, wenig löslich in Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser; **Schmelzpunkt:** 199-202 °C (Lit.: 196-198 °C)¹⁸⁵; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] 7.04 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.14 (d, 2H, ³J = 8.5Hz, 3-H, 5-H); 7.32 (t, 1H, ³J = 7.5 Hz, 4'-H); 7.40 (t, 2H, ³J = 7.5 Hz, 3'-H, 5'-H); 7.67 (2 x d, 4H, ³J = 9.0 Hz, 2'-H, 6'-H, 2-H, 6-H); 7.94 (s, 1H, -N=CH-Ar); 10.75 (s, 1H, Ar-NH-N=R); **LC-MS (m/z):** 274.35 [M]⁻, 276.33 [M]⁺; 293.34 [M+NH₄]⁺, 551.41 [2M]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 98 %

4-(2-(2-chlorbenzyliden)hydrazinyl)benzensulfonamid (242, MAF45)**Summenformel:** C₁₃H₁₂ClN₃O₂S**Molare Masse:** 309,77 g/mol

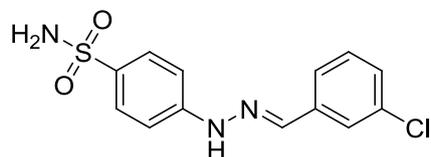
Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift C dargestellt.

Ausbeute: 705 mg (76%)

Aussehen: gelblich-weißes Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, Aceton, und Dichlormethan, wenig löslich in Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser; **Schmelzpunkt:** 220-221 °C; **¹H-NMR:** 500 MHz, DMSO-*d*₆, δ 7.07 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.16 (d, 2H, ³J = 9.0Hz, 3-H, 5-H); 7.33 (td, 1H, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 2.0 Hz, 4'-H); 7.38 (td, 1H, ³J = 7.5 Hz, ⁴J = 1.0 Hz, 5'-H); 7.47 (dd, 1H, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 1.5 Hz, 6'-H); 7.68 (d, 2H, ³J = 9.0 Hz, 2-H, 6-H); 8.04 (dd, 1H, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 2 Hz, 3'-H); 8.29 (s, 1H, -N=CH-Ar); 11.07 (s, 1H, Ar-NH-N=R); **LC-MS (m/z):** 308.30 [M]⁻, 310.24 [M]⁺;

327.29 $[M+NH_4]^+$, 612.32 $[2M]^+$; 636.44 $[2M+NH_4]^+$, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS: 98 %**

4-(2-(3-Chlorbenzyliden)hydrazinyl)benzensulfonamid (243, MAF51)



Summenformel: $C_{13}H_{12}ClN_3O_2S$

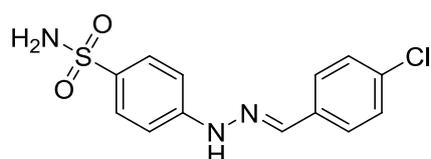
Molare Masse: 309,77 g/mol

Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift C dargestellt.

Ausbeute: 894 mg (96%)

Aussehen: gelblich weißes Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, Aceton, und Dichlormethan, wenig löslich in Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser; **Schmelzpunkt:** 190-191 °C; **1H -NMR:** (500 MHz, DMSO- d_6), δ 7.06 (s, 2H, SO_2NH_2); 7.17 (d, 2H, $^3J = 8.8$ Hz, 3-H, 5-H); 7.42 (t, 1H, $^3J = 7.9$ Hz, 5'-H); 7.50 (ddd, 1H, $^3J = 8.2$ Hz, $^4J = 1.25$ Hz, 4'-H); 7.63 (dt, 1H, $^3J = 7.6$ Hz, $^4J = 1.3$ Hz, 6'-H); 7.67 (d, 2H, $^3J = 8.8$ Hz, 2-H, 6-H); 7.74 (t, 1H, $^4J = 1.9$ Hz, 2'-H); 7.91 (s, 1H, -N=CH-Ar); 10.89 (s, 1H, Ar-NH-N=R); **LC-MS (m/z):** 308.3 $[M]^-$, 310.2 $[M]^+$, 327.3 $[M+NH_4]^+$, 617.3 $[2M]^-$, 619.5 $[2M]^+$, 636.4 $[2M+NH_4]^+$, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS: 97%**

4-(2-(4-Chlorbenzyliden)hydrazinyl)benzensulfonamid (244, MAF52)



Summenformel: $C_{13}H_{12}ClN_3O_4S$

Molare Masse: 309,77 g/mol

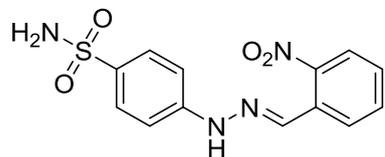
Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift C dargestellt.

Ausbeute: 886 mg (95%)

Aussehen: weißes Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, Aceton, und Dichlormethan, wenig löslich in Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser; **Schmelzpunkt:** 182-184 °C; **1H -NMR:** (500 MHz, DMSO- d_6), δ 7.05 (s, 2H, SO_2NH_2); 7.15 (d, 2H, $^3J = 8.8$ Hz, 3-H, 5-H); 7.45 (d, 2H, $^3J = 8.5$ Hz, 3'-H, 5'-H); 7.66 (d, 2H, $^3J = 8.8$ Hz, 2-H, 6-H); 7.70 (d, 2H, $^3J = 8.5$ Hz, 2'-H, 6'-H); 7.92 (s, 1H, -N=CH-Ar); 10.83

(s, 1H, Ar-NH-N=R); **LC-MS (m/z):** 308.3 [M]⁻, 310.2 [M]⁺, 327.3 [M+NH₄]⁺, 617.3 [2M]⁻, 619.5 [2M]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 97%

4-(2-(2-Nitrobenzyliden)hydrazinyl)benzensulfonamid (245, MAF62)



Summenformel: C₁₃H₁₃N₄O₄S

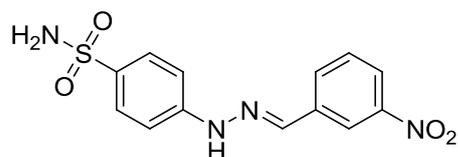
Molare Masse: 320,32 g/mol

Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift C in einem 2 mmol-Ansatz dargestellt.

Ausbeute: 588 mg (92%)

Aussehen: orange rotes Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, Aceton, und Dichlormethan, wenig löslich in Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser; **Schmelzpunkt:** 276-279 °C; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ 7.09 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.18 (d, 2H, ³J = 8.8 Hz, 3-H, 5-H); 7.54 (td, 1H, ³J = 7.3 Hz, ⁴J = 1.6 Hz, 4'-H); 7.69 (d, 2H, ³J = 9.2 Hz, 2-H, 6-H); 7.73 (td, 1H, ³J = 7.3 Hz, ⁴J = 0.9 Hz, 5'-H); 7.99 (dd, 1H, ³J = 8.2 Hz, ⁴J = 1.0 Hz, 3'-H); 8.18 (dd, 1H, ³J = 8.2 Hz, ⁴J = 1.6 Hz, 6'-H); 8.33 (s, 1H, -N=CH-Ar); 11.22 (s, 1H, Ar-NH-N=R); **LC-MS (m/z):** 319.2 [M]⁻, 338.4 [M+NH₄]⁺, 353.3[M+MeOH]⁺, 641.2 [2M]⁺, 658.3 [2M+NH₄]⁺, 663.3 [2M+Na]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 99%

4-(2-(3-Nitrobenzyliden)hydrazinyl)benzensulfonamid (246, MAF61)



Summenformel: C₁₃H₁₃N₄O₄S

Molare Masse: 320,32 g/mol

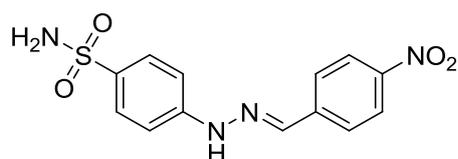
Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift C in einem 2 mmol-Ansatz dargestellt.

Ausbeute: 615 mg (96%)

Aussehen: oranges Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, Aceton, und Dichlormethan, wenig löslich in Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser; **Schmelzpunkt:** 232-233 °C; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ 7.03 (s, 2H, SO₂NH₂);

7.20 (d, 2H, $^3J = 8.8$ Hz, 3-H, 5-H); 7.68 (d/t, 3H, $^3J = 7.7$ Hz, $^3J = 8.9$ Hz, 2-H, 6-H, 5'-H); 7.11 (s, d, 3H, $^3J = 8.8$ Hz, 2'-H, 3-H, 5-H); 8.05 (s, 1H, -N=CH-Ar); 8.14 (dd, 2H, $^3J = 7.9$ Hz, $^4J = 1.9$ Hz, 4'-H, 6'-H); 8.46 (t, 1H, $^4J = 1.9$ Hz, 2'-H); 11.04 (s, 1H, Ar-NH-N=R); **LC-MS (m/z):** 319.2 [M]⁻, 321.2 [M]⁺, 338.4 [M+NH₄]⁺, 343.3 [M+Na]⁺, 353.3[M+MeOH]⁺, 658.3 [2M+NH₄]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS: 99%**

4-(2-(4-Nitrobenzyliden)hydrazinyl)benzensulfonamid (247, MAF60)



Summenformel: C₁₃H₁₃N₄O₄S

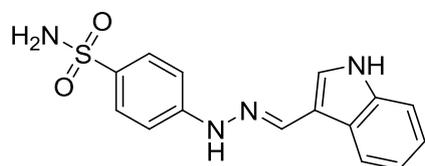
Molare Masse: 320,32 g/mol

Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift C in einem 2 mmol-Ansatz dargestellt.

Ausbeute: 616 mg (96%)

Aussehen: oranges Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, Aceton, und Dichlormethan, wenig löslich in Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser; **Schmelzpunkt:** 261-263 °C; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ 7.10 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.23 (d, 2H, $^3J = 8.8$ Hz, 3-H, 5-H); 7.70 (d, 2H, $^3J = 8.8$ Hz, 2-H, 6-H); 7.93 (d, 2H, $^3J = 8.8$ Hz, 3'-H, 5'-H); 8.02 (s, 1H, -N=CH-Ar); 8.23 (d, 2H, $^3J = 8.9$ Hz, 2'-H, 6'-H); 11.20 (s, 1H, Ar-NH-N=R); **LC-MS (m/z):** 319.2 [M]⁻, 321.1 [M]⁺, 338.4 [M+NH₄]⁺, 343.3 [M+Na]⁺, 658.2 [2M+NH₄]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS: 99%**

4-(2-((1*H*-Indol-3-yl)methylen)hydrazinyl)benzensulfonamid (248, MAF73)



Summenformel: C₁₅H₁₄N₄O₂S

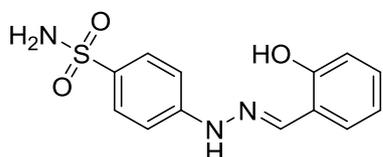
Molare Masse: 314,36 g/mol

Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift C in einem 2 mmol-Ansatz dargestellt.

Ausbeute: 482 mg (77%)

Aussehen: Pulver ockerfarben; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, Aceton, und Dichlormethan, wenig löslich in Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser; **Schmelzpunkt:** 242-248 °C; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ 6.99 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.09 (d, 2H, ³J = 8.5 Hz, 3-H, 5-H); 7.15-7.21 (m, 2H, 6'-H, 7'-H); 7.42 (dd, 1H, ³J = 7.0 Hz, ⁴J = 2.2 Hz, 8'-H); 7.66 (d, 2H, ³J = 9.2 Hz, 2-H, 6-H); 7.69 (d, 1H, ⁴J = 2.9 Hz, 2'-H); 8.19 (s, 1H, -N=CH-Ar); 8.23 (dd, 1H, ³J = 6.6 Hz, ⁴J = 1.9 Hz, 5'-H); 10.34 (s, 1H, -NH Indol); 10.40 (s, 1H, Ar-NH-N=R); **LC-MS (m/z):** 313.24 [M]⁻, 315.22 [M]⁺, 627.33 [2M]⁻, 629.30 [2M]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 97%

4-(2-(2-Hydroxybenzyliden)hydrazinyl)benzensulfonamid (249, MAF53)



Summenformel: C₁₃H₁₃N₃O₃S

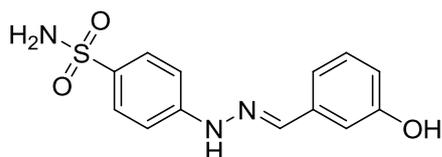
Molare Masse: 291,33 g/mol

Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift C dargestellt.

Ausbeute: 846 mg (97%)

Aussehen: weißes Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, Aceton, und Dichlormethan, wenig löslich in Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser; **Schmelzpunkt:** 275-278°C; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ 6.84-6.89 (m, 2H, 3'-H, 5'-H); 7.04 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.06 (d, 2H, ³J = 8.8 Hz, 3-H, 5-H); 7.18 (td, 1H, ³J = 7.5 Hz, ⁴J = 1.9 Hz, 4'-H); 7.64 (dd, 1H, ³J = 7.9 Hz, ⁴J = 1.9 Hz, 6'-H); 7.67 (d, 2H, ³J = 8.9 Hz, 2-H, 6-H); 8.23 (s, 1H, -N=CH-Ar); 10.21 (s, 1H, -OH); 10.76 (s, 1H, Ar-NH-N=R); **LC-MS (m/z):** 290.3 [M]⁻, 292.3 [M]⁺, 581,3 [2M]⁻, 583.3 [2M]⁺, 605.3 [2M+Na]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 99%

4-(2-(3-Hydroxybenzyliden)hydrazinyl)benzensulfonamid (250, MAF54)



Summenformel: C₁₃H₁₃N₃O₃S

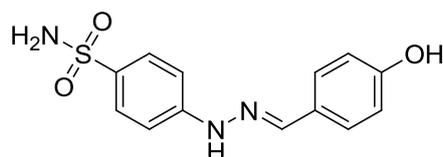
Molare Masse: 291,33 g/mol

Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift C dargestellt.

Ausbeute: 647 mg (74%)

Aussehen: gelbliches Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, Aceton, und Dichlormethan, wenig löslich in Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser; **Schmelzpunkt:** 249-251 °C; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ 6.73 (ddd, 1H, ³J = 7.9 Hz, ⁴J = 2.6 Hz, ⁴J = 1.0 Hz, 4'-H); 7.03 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.06 (dt, 1H, ³J = 7.6 Hz, ⁴J = 1.3 Hz, 6'-H); 7.11 (s, d, 3H, ³J = 8.8 Hz, 2'-H, 3-H, 5-H); 7.19 (t, 1H, ³J = 7.9 Hz, 5'-H); 7.65 (d, 2H, ³J = 9.2 Hz, 2-H, 6-H); 7.85 (s, 1H, -N=CH-Ar); 9.45 (s, 1H, -OH); 10.69 (s, 1H, Ar-NH-N=R); **LC-MS (m/z):** 290.3 [M]⁻, 292.2 [M]⁺, 309.4 [M+NH₄]⁺, 581.4 [2M]⁻, 583.3 [2M]⁺, 600.4 [2M+NH₄]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 99%

4-(2-(4-Hydroxybenzyliden)hydrazinyl)benzensulfonamid (251, MAF55)



Summenformel: C₁₃H₁₃N₃O₃S

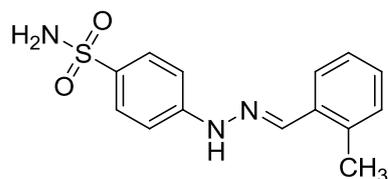
Molare Masse: 291,33 g/mol

Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift C dargestellt.

Ausbeute: 799 mg (91%)

Aussehen: bräunlich weißes Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, Aceton, und Dichlormethan, wenig löslich in Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser; **Schmelzpunkt:** 246-247 °C; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ 6.79 (d, 2H, ³J = 8.9 Hz, 3'-H, 5'-H); 7.00 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.08 (d, 2H, ³J = 8.9 Hz, 3-H, 5-H); 7.50 (d, 2H, ³J = 8.5 Hz, 2'-H, 6'-H); 7.63 (d, 2H, ³J = 8.8 Hz, 2-H, 6-H); 7.85 (s, 1H, -N=CH-Ar); 9.67 (s, 1H, -OH); 10.49 (s, 1H, Ar-NH-N=R); **LC-MS (m/z):** 290.3 [M]⁻, 292.3 [M]⁺, 583.3 [2M]⁺, 605.3 [2M+Na]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 98,%

4-(2-(2-Methylbenzyliden)hydrazinyl)benzensulfonamid (252, MAF57)



Summenformel: C₁₄H₁₅N₃O₂S

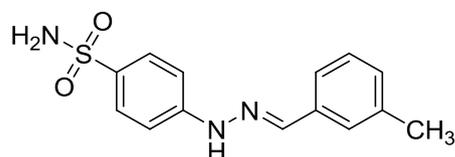
Molare Masse: 289,35 g/mol

Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift C dargestellt.

Ausbeute: 852 mg (98%)

Aussehen: gelbes Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, Aceton, und Dichlormethan, wenig löslich in Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser; **Schmelzpunkt:** 204-205 °C; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ 2.44 (s, 3H, Ar-CH₃); 7.03 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.12 (d, 2H, ³J = 8.9 Hz, 3-H, 5-H); 7.21-7.23 (m, 3H, 3'-H, 4'-H, 5'-H); 7.66 (d, 2H, ³J = 8.9 Hz, 2-H, 6-H); 7.80 (m, 1H, 6'-H); 8.18 (s, 1H, -N=CH-Ar); 10.76 (s, 1H, Ar-NH-N=R); **LC-MS (m/z):** 288.2 [M]⁻, 290.4 [M]⁺, 307.4 [M+NH₄]⁺, 579.6 [2M]⁺, 601.4 [2M+Na]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 97%

4-(2-(3-Methylbenzyliden)hydrazinyl)benzensulfonamid (253, MAF63)



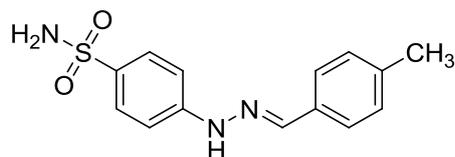
Summenformel: C₁₄H₁₅N₃O₂S

Molare Masse: 289,35 g/mol

Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift C in einem 2 mmol-Ansatz dargestellt.

Ausbeute: 483 mg (83%)

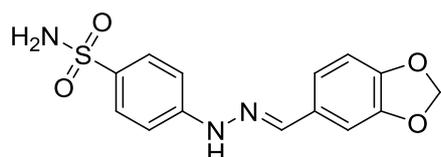
Aussehen: weißes Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, Aceton, und Dichlormethan, wenig löslich in Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser; **Schmelzpunkt:** 200-203 °C; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] 3.16 (s, 3H, CH₃); 7.03 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.13 (d, 2H, ³J = 8.8 Hz, 3-H, 5-H); 7.13 (dd, 1H, ³J = 6.7 Hz, ⁴J = 1.9 Hz, 4'-H); 7.28 (t, 1H, ³J = 7.6 Hz, 5'-H); 7.46 (d, 1H, ³J = 7.9 Hz, 6'-H); 7.50 (s, 1H, 2'-H); 7.65 (d, 2H, ³J = 8.8 Hz, 2-H, 6-H); 7.90 (s, 1H, -N=CH-Ar); 10.72 (s, 1H, Ar-NH-N=R); **LC-MS (m/z):** 288.14 [M]⁻, 290.34 [M]⁺; 307.38 [M+NH₄]⁺, 579.53 [2M]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 97 %

4-(2-(4-Methylbenzyliden)hydrazinyl)benzensulfonamid (254, MAF58)**Summenformel:** C₁₄H₁₅N₃O₂S**Molare Masse:** 289,35 g/mol

Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift C dargestellt.

Ausbeute: 808 mg (93%)

Aussehen: weißes Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, Aceton, und Dichlormethan, wenig löslich in Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser; **Schmelzpunkt:** 220-222 °C; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ 2.32 (s, 3H, Ar-CH₃); 7.03 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.12 (d, 2H, ³J = 8.8 Hz, 3-H, 5-H); 7.21 (d, 2H, ³J = 7.9 Hz, 3'-H, 5'-H); 7.57 (d, 2H, ³J = 8.2 Hz, 2'-H, 6'-H); 7.65 (d, 2H, ³J = 8.8 Hz, 2-H, 6-H); 7.91 (s, 1H, -N=CH-Ar); 10.66 (s, 1H, Ar-NH-N=R); **LC-MS (m/z):** 288.2 [M], 290.4 [M]⁺, 307.4 [M+NH₄]⁺, 579.6 [2M]⁺, 601.4 [2M+Na]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 98%

4-(2-((Benzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)methylen)hydrazinyl)benzensulfonamid (255, MAF79)**Summenformel:** C₁₄H₁₃N₃O₄S**Molare Masse:** 319,34 g/mol

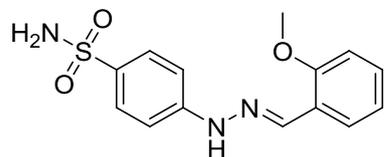
Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift C in einem 1 mmol-Ansatz dargestellt.

Ausbeute: 211 mg (66%)

Aussehen: gelbes Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, Aceton, und Dichlormethan, wenig löslich in Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser; **Schmelzpunkt:** 219-221 °C; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ 6.05 (s, 2H, CH₂); 6.93 (d, 1H, ³J = 7.9 Hz, 5'-H); 7.02 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.08 (dd, 1H, ³J = 8.2 Hz, ⁴J = 1.6 Hz, 6'-H); 7.11 (d, 2H, ³J = 8.6 Hz, 3-H, 5-H); 7.32 (d, 1H, ⁴J = 1.6 Hz); 7.63 (d, 2H, ³J = 8.8 Hz, 2-H, 6-H); 7.86 (s, 1H, -N=CH-Ar); 10.61 (s, 1H, Ar-NH-N=R); **LC-MS (m/z):**

317.98 [M]⁻, 320.05 [M]⁺, 342.12 [M+Na]⁺, 639.01 [2M]⁺; **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS: 98%**

4-(2-(2-Methoxybenzyliden)hydrazinyl)benzensulfonamid (256, MAF65)



Summenformel: C₁₄H₁₅N₃O₃S

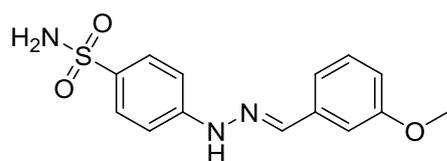
Molare Masse: 305,35 g/mol

Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift C in einem 2 mmol-Ansatz dargestellt.

Ausbeute: 561 mg (92%)

Aussehen: gelbliches Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, Aceton, und Dichlormethan, wenig löslich in Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser; **Schmelzpunkt:** 202-204 °C; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ [ppm] 3.84 (s, 3H, OCH₃); 6.98 (t, 1H, ³J = 7.6 Hz, 5'-H); 7.02 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.05 (d, 1H, ³J = 8.2 Hz, 3'-H); 7.10 (d, 2H, ³J = 8.8 Hz, 3-H, 5-H); 7.31 (td, 1H, ³J = 7.6 Hz, ⁴J = 1.9 Hz, 4'-H); 7.64 (d, 2H, ³J = 8.8 Hz, 2-H, 6-H); 7.87 (dd, 1H, ³J = 7.9 Hz, ⁴J = 1.9 Hz, 6'-H); 8.28 (s, 1H, -N=CH-Ar); 10.76 (s, 1H, Ar-NH-N=R); **LC-MS (m/z):** 304.19 [M]⁻, 306.39 [M]⁺; 611.44 [2M]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:94%**

4-(2-(3-Methoxybenzyliden)hydrazinyl)benzensulfonamid (257, MAF66)



Summenformel: C₁₄H₁₅N₃O₃S

Molare Masse: 305,35 g/mol

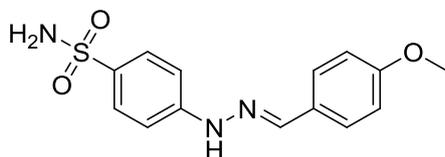
Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift C in einem 2 mmol-Ansatz dargestellt.

Ausbeute: 489 mg (83%)

Aussehen: weißes Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, Aceton, und Dichlormethan, wenig löslich in Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser; **Schmelzpunkt:** 211-213 °C; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ [ppm] 3.80 (s, 3H, OCH₃); 6.90 (ddd, 1H, ³J = 8.2 Hz, ⁴J = 1.0 Hz, 4'-H); 7.04 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.13 (d, 2H, ³J = 8.9 Hz, 3-H, 5-H); 7.24 (2 x d, 2H, ³J = 7.6 Hz, ⁴J = 2.2 Hz, 2'-H, 6'-H); 7.31 (t, 1H,

$^3J = 7.9$ Hz, 5'-H); 7.66 (d, 2H, $^3J = 8.9$ Hz, 2-H, 6-H); 7.90 (s, 1H, -N=CH-Ar); 10.75 (s, 1H, Ar-NH-N=R); **LC-MS (m/z):** 304.16 [M]⁻, 306.38 [M]⁺, 323.40 [M+NH₄]⁺, 611.45 [2M]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 95%

4-(2-(4-Methoxybenzyliden)hydrazinyl)benzensulfonamid (258, MAF59)



Summenformel: C₁₄H₁₅N₃O₃S

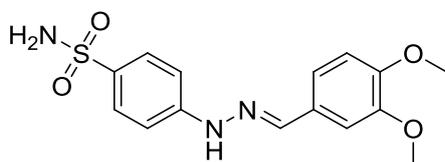
Molare Masse: 305,35 g/mol

Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift C dargestellt.

Ausbeute: 868 mg (74%)

Aussehen: weißes Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, Aceton, und Dichlormethan, wenig löslich in Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser; **Schmelzpunkt:** 234-236 °C; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ 3.78 (s, 3H, Ar-OCH₃); 6.97 (d, 2H, $^3J = 8.9$ Hz, 3'-H, 5'-H); 7.01 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.10 (d, 2H, $^3J = 8.8$ Hz, 3-H, 5-H); 7.63 (2xd(Überlagerung), 4H, $^3J = 9.2$ Hz, 2-H, 6-H, 2'-H, 6'-H); 7.89 (s, 1H, -N=CH-Ar); 10.58 (s, 1H, Ar-NH-N=R); **LC-MS (m/z):** 289,2 [M - CH₃]⁻, 304.2 [M]⁻, 306.4 [M]⁺, 611.5 [2M]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 98%

4-(2-(3,4-Dimethoxybenzyliden)hydrazinyl)benzensulfonamid (259, MAF67)



Summenformel: C₁₅H₁₇N₃O₄S

Molare Masse: 335,38 g/mol

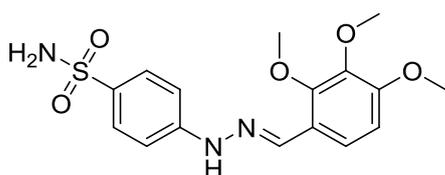
Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift C in einem 2 mmol-Ansatz dargestellt.

Ausbeute: 558 mg (83%)

Aussehen: Pulver ockerfarben; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, Aceton, und Dichlormethan, wenig löslich in Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser; **Schmelzpunkt:** 227-230 °C; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ [ppm] 3.78 (s, 3H,

OCH₃); 3.82 (s, 3H, OCH₃); 6.97 (d, 1H, ³J = 8.5 Hz, 5'-H); 7.02 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.12 (d, 2H, ³J = 8.8 Hz, 3-H, 5-H); 7.15 (dd, 1H, ³J = 8.5 Hz, ⁴J = 1.9 Hz, 6'-H); 7.32 (d, 1H, ⁴J = 1.9 Hz, 2'-H); 7.64 (d, 2H, ³J = 9.2 Hz, 2-H, 6-H); 7.87 (s, 1H, -N=CH-Ar); 10.59 (s, 1H, Ar-NH-N=R); **LC-MS (m/z):** 334.09 [M]⁻, 336.15 [M]⁺, 671.22 [2M]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS: 98%**

4-(2-(2,3,4-Trimethoxybenzyliden)hydrazinyl)benzensulfonamid (260, MAF68)



Summenformel: C₁₆H₁₉N₃O₅S

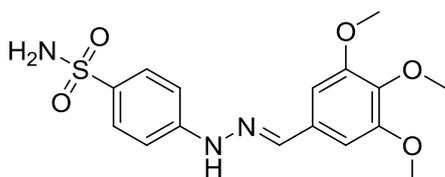
Molare Masse: 365,40 g/mol

Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift C in einem 2 mmol-Ansatz dargestellt.

Ausbeute: 650 mg (89%)

Aussehen: gelbes Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, Aceton, und Dichlormethan, wenig löslich in Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser; **Schmelzpunkt:** 209-212°C; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ [ppm] 3.77 (s, 3H, OCH₃ Pos. 3'); 3.82 (s, 6H, OCH₃ Pos. 2', 4'); 6.88 (d, 1H, ³J = 8.8 Hz, 5'-H); 7.01 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.08 (d, 2H, ³J = 8.8 Hz, 3-H, 5-H); 7.60 (d, 1H, ³J = 8.8 Hz, 6'-H); 7.64 (d, 2H, ³J = 8.8 Hz, 2-H, 6-H); 8.11 (s, 1H, -N=CH-Ar); 10.69 (s, 1H, Ar-NH-N=R); **LC-MS (m/z):** 364.10 [M]⁻, 365.89 [M]⁺, 731,40 [2M]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS: 98%**

4-(2-(3,4,5-Trimethoxybenzyliden)hydrazinyl)benzensulfonamid (261, MAF69)



Summenformel: C₁₆H₁₉N₃O₅S

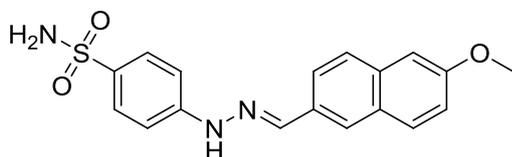
Molare Masse: 365,40 g/mol

Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift C in einem 2 mmol-Ansatz dargestellt.

Ausbeute: 582 mg (80%)

Aussehen: gelbes Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, Aceton, und Dichlormethan, wenig löslich in Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser; **Schmelzpunkt:** 225-227 °C; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ [ppm] 3.68 (s, 3H, OCH₃ Pos. 4'); 3.84 (s, 6H, OCH₃ Pos. 3', 5'); 6.99 (s, 2H, 2'-H, 6'-H); 7.04 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.14 (d, 2H, ³J = 8.8 Hz, 3-H, 5-H); 7.65 (d, 2H, ³J = 8.9 Hz, 2-H, 6-H); 7.86 (s, 1H, -N=CH-Ar); 10.70 (s, 1H, Ar-NH-N=R); **LC-MS (m/z):** 364.23 [M]⁻, 366.13 [M]⁺, 731,62 [2M]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 98%

4-(2-((6-Methoxynaphthalen-2-yl)methylen)hydrazinyl)benzensulfonamid
(262, MAF77)



Summenformel: C₁₈H₁₇N₃O₃S

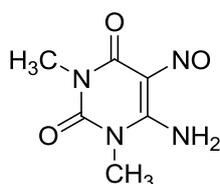
Molare Masse: 355,41 g/mol

Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift C in einem 1 mmol-Ansatz dargestellt.

Ausbeute: 312 mg (88%)

Aussehen: bräunlich-weißes Pulver; **Löslichkeit:** löslich in DMSO, schlecht löslich in Dichlormethan, Diethylether, Ethanol, und Wasser; **Schmelzpunkt:** 283-286 °C; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ 3.88 (s, 3H, Ar-OCH₃); 7.05 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.17 (dd, 1H, ³J = 8.8 Hz, ⁴J = 2.5 Hz, 7'-H); 7.18 (d, 2H, ³J = 8.8 Hz, 3-H, 5-H); 7.33 (d, 1H, ⁴J = 2.6 Hz, 5'-H); 7.67 (d, 2H, ³J = 8.9 Hz, 2-H, 6-H); 7.82 (d, 1H, ³J = 9.2 Hz, 3'-H); 7.85 (d, 1H, ³J = 8.8 Hz, 8'-H); 7.94-7.97 (m, 2H, 2'-H, 10'-H); 8.06 (s, 1H, -N=CH-Ar); 10.77 (s, 1H, Ar-NH-N=R); **LC-MS (m/z):** 354.19 [M]⁻, 356.23 [M]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 99%

6-Amino-1,3-dimethyl-5-nitrosopyrimidin-2,4(1*H*,3*H*)-dion (264, MAF82.1)



Summenformel: C₆H₈N₄O₃

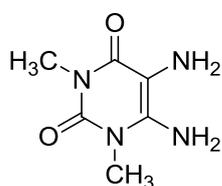
Molare Masse: 184,15 g/mol

3,1 g (20 mmol) 6-Amino-1,3-dimethyluracil werden in 30 ml eines Lösungsmittelgemisches von drei Teilen DMF und einem Teil Wasser unter Erhitzen auf 90 °C gelöst. Nach Abkühlen der Lösung auf 30 °C wird eine Lösung von 2,8 g (40 mmol) Natriumnitrit zugegeben. Der Reaktionsansatz wird mit einigen Tropfen konzentrierter Salzsäure versetzt, bis keine weitere Farbvertiefung zu beobachten ist. Der Ansatz wird für eine weitere Stunde gerührt und anschließend der entstandene Niederschlag abfiltriert und mit Wasser gewaschen.

Ausbeute: 3,7 g (100%)

Aussehen: Magenta farbiges Pulver; **Schmelzpunkt:** 254 °C; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ [ppm] 3.24 (s, 3H, N₁-CH₃); 3.26 (s, 3H, N₃-CH₃); **¹³C-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ [ppm] 27.97 (N₁-CH₃); 28.81 (N₃-CH₃); 139.30 (C₅); 146.24 (C₆); 149.54 (C₂); 160.36 (C₄); **LC-MS (m/z):** 183.30 [M]⁻, 185.31 [M]⁺, 202.32 [M+NH₄]⁺, 367.09 [2M]⁻, 369.21 [2M]⁺; **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 100%

5,6-Diamino-1,3-dimethylpyrimidin-2,4(1*H*,3*H*)-dion (265, MAF82.2)



Summenformel: C₆H₁₀N₄O₂

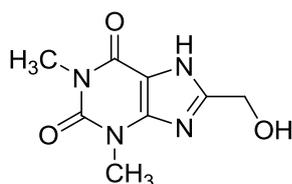
Molare Masse: 170,17 g/mol

2,7 g (15 mmol) 6-Amino-1,3-dimethyl-5-nitrosopyrimidin-2,4(1*H*,3*H*)-dion (MAF82.1) werden in 75 ml 12,5 %iger wässriger Ammoniaklösung gelöst und auf 70 °C erhitzt. Unter Rühren werden langsam, portionsweise über einen Zeitraum von etwa 20 Minuten 5,25 g (45 mmol) Natriumdithionit zugegeben, wodurch sich die Lösung entfärbt. Der Reaktionsansatz wird am Rotationsverdampfer eingedampft bis sich ein Niederschlag bildet, wird über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt und anschließend der Niederschlag abfiltriert. Nach Waschen mit einer kleinen Menge kaltem Wasser und vorsichtigem Trocknen unter Lichtausschluss wird das Produkt schnellstmöglich weiter umgesetzt.

Ausbeute: 1,93 g (73%)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ [ppm] 3.12 (s, 3H, N₁-CH₃); 3.28 (s, 3H, N₃-CH₃); 6.11 (s, 2H, NH₂); **¹³C-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ [ppm] 27.72 (N₃-CH₃); 29.87 (N₁-CH₃); 96.18 (C₅); 144.86 (C₂); 149.91 (C₆); 159.14 (C₄); **LC-MS (m/z):** 171.20 [M]⁺, 193.19 [M+Na]⁺, 341.40 [2M]⁺, 363.34 [2M+Na]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 99%

8-(Hydroxymethyl)-1,3-dimethyl-1H-purin-2,6(3H,7H)-dion (266, MAF82.3)



Summenformel: C₈H₁₀N₄O₃

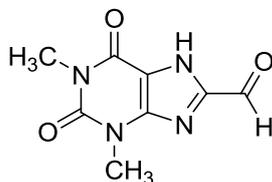
Molare Masse: 210,19 g/mol

1,93 g (11 mmol) 5,6-Diamino-1,3-dimethylpyrimidin-2,4(1*H*,3*H*)-dion (MAF82.2) werden mit 1,7 g (22 mmol) α-Hydroxyessigsäure verrieben, bei 80 °C in einer Porzellanschale aufgeschmolzen und für eine Stunde weiter erhitzt. Die erstarrte Schmelze wird dann in 5%iger Natronlauge aufgenommen und unter Rückfluss erhitzt. Das Produkt wird durch Zugabe von konzentrierter Schwefelsäure bei pH 4 ausgefällt, anschließend abfiltriert und mit viel Wasser und wenig Ethanol gewaschen.

Ausbeute: 1,58 g (68%)

Aussehen: blass rosa Pulver; **Schmelzpunkt:** 246-248 °C; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ [ppm] 3.22 (s, 3H, N₁-CH₃); 3.41 (s, 3H, N₃-CH₃); 4.49 (s, 2H, CH₂-OH); **¹³C-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ [ppm] 27.82 (N₁-CH₃); 29.82 (N₃-CH₃); 56.96 (CH₂-OH); 106.47 (C₅); 148.06 (C₈); 151.35 (C₄); 153.74 (C₂); 154.29 (C₆); **LC-MS (m/z):** 209.11 [M]⁻, 211.35 [M]⁺, 228.34 [M+NH₄]⁺, 419.27 [2M]⁻, 421,33 [2M]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 99%

1,3-Dimethyl-2,6-dioxo-2,3,6,7-tetrahydro-1*H*-purin-8-carbaldehyd (267, MAF82.4)



Summenformel: C₈H₈N₄O₃

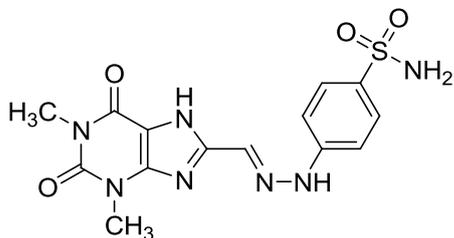
Molare Masse: 208,17 g/mol

1,5 g (7 mmol) 8-Hydroxymethyltheophyllins (MAF82.3) werden bei 90 °C in 15 ml Eisessig gelöst und portionsweise mit 0,75 g Natriumdichromat versetzt und für etwa eine Stunde bei 90 °C gerührt. Der Niederschlag wird durch Abkühlung auf 4 °C vollständig ausgefällt, anschließend abfiltriert und mit viel Wasser und wenig Ethanol gewaschen.

Ausbeute: 1,28 g (86%)

Aussehen: bräunlich-weißes Pulver; **Schmelzpunkt:** 310 °C unter Zersetzung; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ [ppm] 3.24 (s, 3H, N₁-CH₃); 3.45 (s, 3H, N₃-CH₃); 9.72 (s, 1H, CHO); **¹³C-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ [ppm] 28.14 (N₁-CH₃); 30.32 (N₃-CH₃); 112.52 (C₅); 145.20 (C₈); 146.82 (C₄); 151.16 (C₂); 155.51 (C₆); 181.91 (CHO); **LC-MS (m/z):** 209.20 [M]⁺, 226.31 [M+NH₄]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 98%

4-(2-((1,3-Dimethyl-2,6-dioxo-2,3,6,7-tetrahydro-1*H*-purin-8-yl)methylen)hydrazinyl)benzenesulfonamid (268, MAF82.5)



Summenformel: C₁₄H₁₅N₇O₄S

Molare Masse: 377,38 g/mol

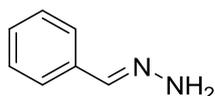
1,1 g (5mmol) 4-Hydrazinylbenzenesulfonamid-Hydrochlorid (MAF42.1) werden in 50 ml Ethanol gelöst, mit 1,0 g (5 mmol) des Theophyllin-8-carbaldehyds (MAF82.4) versetzt

und für etwa zwei Stunden zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen wird der entstandene Niederschlag abfiltriert und mit Wasser und wenig Ethanol gewaschen.

Ausbeute: 1,13g (60%)

Aussehen: gelbes Pulver; **Löslichkeit:** löslich in DMSO, schlecht löslich in Wasser, Ethanol, Dichlormethan, und Diethylether; **Schmelzpunkt:** 358-359 °C unter Zersetzung; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ 3.28 (s, 3H, N₁-CH₃); 3.57 (s, 3H, N₃-CH₃); 7.09 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.33 (d, 2H, ³J = 8.6 Hz, 3-H, 5-H); 7.69 (d, 2H, ³J = 8.6 Hz, 2-H, 6-H); 7.78 (s, 1H, -N=CH-Xanthin); 11.26 (s, 1H, Ar-NH-N=R); 13.72 (s, 1H, NH Xanthin); **LC-MS (m/z):** 378.40 [M]⁺, 755.50 [2M]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 100%

Benzylidenhydrazin (269, MAF 74.1)



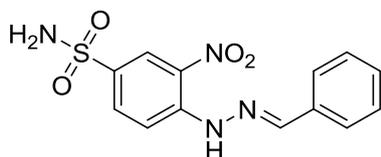
Summenformel: C₇H₈N₂

Molare Masse: 120,15 g/mol

0,2 ml (2 mmol) Benzaldehyd werden mit 0,4 ml Hydrazinhydrat versetzt und in der Mikrowelle 15 Minuten auf 100 °C erhitzt. Nach Abkühlen des Reaktionsansatzes wird das Produkt durch dreimaliges ausschütteln mit je 5 ml Dichlormethan extrahiert und über Natriumsulfat getrocknet. Nach entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer erhält man das Produkt als farbloses Öl. Aufgrund der Empfindlichkeit dieses Zwischenproduktes wird es umgehend weiter umgesetzt.

Ausbeute: 214 mg (89%)

4-(2-Benzyliden)hydrazinyl)-3-nitrobenzensulfonamid (270, MAF74)



Summenformel: C₁₃H₁₂N₄O₄S

Molare Masse: 320,32 g/mol

237 mg 4-Chlor-3-nitrobenzensulfonamid (MAF36.2) werden in einem ml Ethanol gelöst und mit 120 mg Benzylidenhydrazin (MAF74.1) versetzt. Der Reaktionsansatz wird dann in der Mikrowelle für 120 Minuten auf 100 °C erhitzt. Nach Abkühlen des

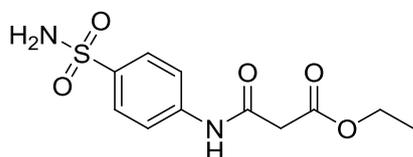
Reaktionsansatzes wird der entstandene orange Niederschlag abfiltriert und mit Wasser und wenig Ethanol gewaschen.

Ausbeute: 348 mg (92%)

Aussehen: oranges Pulver; **Löslichkeit:** gut löslich in DMSO, Aceton, und Dichlormethan, wenig löslich in Methanol, Ethanol, schlecht löslich in Wasser; **Schmelzpunkt:** 272-274 °C; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ 7.42 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.43-7.49 (m, 3H, 3'-H, 4'-H, 5'-H); 7.78 (dd, 2H, ³J = 7.9 Hz, ⁴J = 1.6 Hz, 2'-H, 6'-H); 7.97 (dd, 1H, ³J = 9.2 Hz, ⁴J = 2.2 Hz, 6-H); 8.12 (d, 1H, ³J = 9.2 Hz, 5-H); 8.51 (d, 1H, ⁴J = 2.2 Hz, 2-H); 8.61 (s, 1H, -N=CH-Ar); 11.42 (s, 1H, Ar-NH-N=R); **LC-MS (m/z):** 319.07 [M]⁻, 321.12 [M]⁺, 338.25 [M+NH₄]⁺, 641.00 [2M]⁺, 658.08 [2M+NH₄]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 98%

11.7 2-Oxo-N-(4-sulfamoylphenyl)-2H-chromen-3-carboxamide

Ethyl-3-oxo-3-(4-sulfamoylphenylamino)propanoat (272, MAF43.1)



Summenformel: C₁₁H₁₄N₂O₅S

Molare Masse: 286,30 g/mol

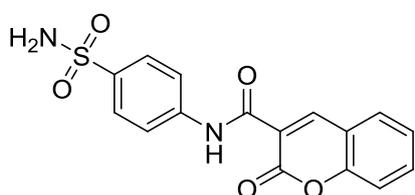
1,7 g (10 mmol) Sulfanilamid werden in 100 ml Aceton gelöst und mit 1,7 g (20 mmol) Natriumhydrogencarbonat versetzt. Unter Eiskühlung werden 1,26 ml (10 mmol) Ethylmalonylchlorid zugetropft, wobei ein gelblicher Niederschlag entsteht. Nach einer Stunde Rühren ist die Reaktion beendet (DC-Kontrolle) und das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wird in Eiswasser aufgenommen, abfiltriert und mit Wasser und Diethylether gewaschen.

Ausbeute: 2,35 g (82%)

LC-MS (m/z): 285.1 [M]⁻, 287.1 [M]⁺, 304.2 [M+NH₄]⁺, 573.3 [2M]⁺, 590.2 [2M+NH₄]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 98%

Vorschrift D

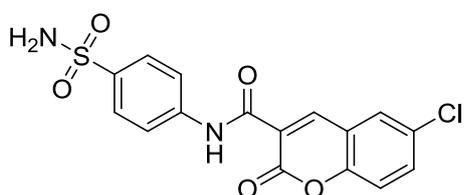
0,86 g (3 mmol) Ethyl-3-oxo-3-(4-sulfamoylphenylamino)propanoat (MAF43.1) werden in 30 ml Ethanol gelöst, mit 3 mmol des entsprechenden Salicylaldehyds und etwa 10 mg Piperazin versetzt. Der Ansatz wird für etwa zwei Stunden bis zum Beenden der Reaktion (DC-Kontrolle) zum Sieden erhitzt, wobei das Produkt ausfällt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird das entstandene Produkt abfiltriert und mit Wasser und Diethylether gewaschen.

2-Oxo-N-(4-sulfamoylphenyl)-2H-chromen-3-carboxamid (282, MAF43)**Summenformel:** C₁₆H₁₂N₂O₅S**Molare Masse:** 344,34 g/mol

Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift D dargestellt.

Ausbeute: 1,02 g (99,0%)

Aussehen: gelblich-weißes Pulver; **Löslichkeit:** löslich in DMSO, schlecht löslich in Wasser, Ethanol, Dichlormethan, und Diethylether; **Schmelzpunkt:** 347-349 °C (Lit.: >300 °C)¹⁸⁶; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ [ppm] 7.29 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.47 (td, 1H, ³J = 8.0Hz, ⁴J = 1.0 Hz 7'-H); 7.54 (d, 1H, ³J = 8.0 Hz, 8'-H); 7.78 (td, 1H, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 1.5 Hz, 6'-H); 7.83 (d, 2H, ³J = 9.0 Hz, 3-H, 5-H); 7.89 (d, 2H, ³J = 9.0 Hz, 2-H, 6-H); 8.01 (dd, 1H, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 1.5 Hz, 5'-H); 8.92 (s, 1H, 3'-H); 10.88 (s, 1H, Ar-NH-CO-R); **LC-MS (m/z):** 343.29 [M]⁻, 345.40 [M]⁺; 362.48 [M+NH₄]⁺, 706.29 [2M+NH₄]⁺; **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:**100 %

6-Chlor-2-oxo-N-(4-sulfamoylphenyl)-2H-chromen-3-carboxamid (283, MAF44)**Summenformel:** C₁₆H₁₁ClN₂O₅S**Molare Masse:** 378,79 g/mol

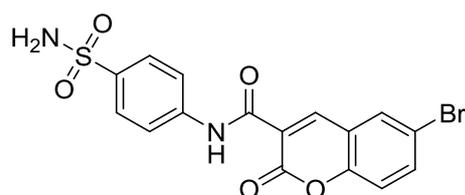
Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift D in einem 4 mmol-Ansatz dargestellt.

Ausbeute: 1,48 g (98%)

Aussehen: gelbes Pulver; **Löslichkeit:** löslich in DMSO, schlecht löslich in Wasser, Ethanol, Dichlormethan, und Diethylether; **Schmelzpunkt:** 344-346 °C; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ 7.29 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.59 (d, 1H, ³J = 9.0 Hz, 8'-H); 7.80 (dd, 1H, ³J = 9.0 Hz, ⁴J = 2.5 Hz, 7'-H); 7.83 (d, 2H, ³J = 9.0 Hz, 3-H, 5-H); 7.88 (d, 2H, ³J = 9.0 Hz, 2-H, 6-H); 8.14 (d, 1H, ⁴J = 2.5 Hz, 5'-H); 8.85 (s, 1H, 3'-H); 10.83 (s, 1H, Ar-NH-CO-R); **LC-MS (m/z):** 377.27 [M]⁻, 379.34 [M]⁺; 396.19 [M+NH₄]⁺, 774.43 [2M+NH₄]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 100%

6-Brom-2-oxo-*N*-(4-sulfamoylphenyl)-2*H*-chromen-3-carboxamid (284,

MAF46)



Summenformel: C₁₆H₁₁BrN₂O₅S

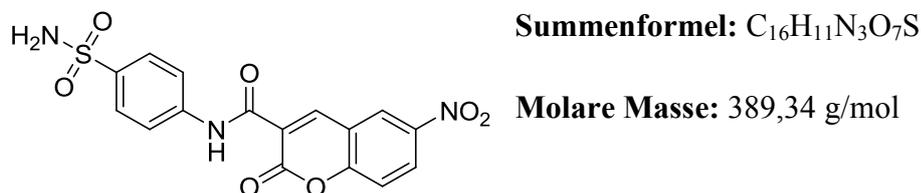
Molare Masse: 423,24 g/mol

Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift D dargestellt.

Ausbeute: 1,21 g (95%)

Aussehen: gelblich weißes Pulver; **Löslichkeit:** löslich in DMSO, schlecht löslich in Wasser, Ethanol, Dichlormethan, und Diethylether; **Schmelzpunkt:** 327-330 °C; **¹H-NMR:** 500 MHz, DMSO-*d*₆), δ 7.29 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.52 (d, 1H, ³J = 8.9 Hz, 8'-H); 7.83 (d, 2H, ³J = 8.9 Hz, 3-H, 5-H); 7.88 (d, 2H, ³J = 8.9 Hz, 2-H, 6-H); 7.92 (dd, 1H, ³J = 8.9 Hz, ⁴J = 2.6 Hz, 7'-H); 8.27 (d, 1H, ⁴J = 2.2 Hz, 5'-H); 8.85 (s, 1H, 3'-H); 10.83 (s, 1H, Ar-NH-CO-R); **LC-MS (m/z):** 421.1 [M(⁷⁹Br)]⁻, 423.1 [M(⁸¹Br)]⁻, 423.2 [M(⁷⁹Br)]⁺, 425.2 [M(⁸¹Br)]⁺, 440,3 [M(⁷⁹Br)+NH₄]⁺, 442.3 [M(⁸¹Br)+NH₄]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 100%

6-Nitro-2-oxo-N-(4-sulfamoylphenyl)-2H-chromen-3-carboxamid (285, MAF47)

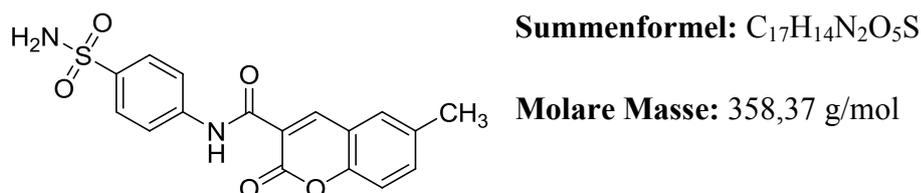


Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift D dargestellt.

Ausbeute: 1,10 g (95%)

Aussehen: gelbes Pulver; **Löslichkeit:** löslich in DMSO, schlecht löslich in Wasser, Ethanol, Dichlormethan, und Diethylether; **Schmelzpunkt:** 307-310 °C; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ 7.30 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.76 (d, 1H, ³J = 9.1 Hz, 8'-H); 7.83 (d, 2H, ³J = 8.8 Hz, 3-H, 5-H); 7.89 (d, 2H, ³J = 8.9 Hz, 2-H, 6-H); 8.53 (dd, 1H, ³J = 9.2 Hz, ⁴J = 2.9 Hz, 7'-H); 8.99 (d, 1H, ⁴J = 2.5 Hz, 5'-H); 9.02 (s, 1H, 3'-H); 10.77 (s, 1H, Ar-NH-CO-R); **LC-MS (m/z):** 388.2 [M]⁻, 390.2 [M]⁺, 407.2 [M+NH₄]⁺, 796.5 [2M+NH₄]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 99%

6-Methyl-2-oxo-N-(4-sulfamoylphenyl)-2H-chromen-3-carboxamid (286, MAF56)



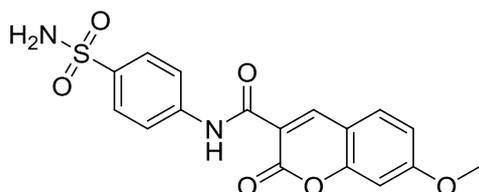
Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift D dargestellt.

Ausbeute: 758 mg (96%)

Aussehen: weißes Pulver; **Löslichkeit:** löslich in DMSO, schlecht löslich in Wasser, Ethanol, Dichlormethan, und Diethylether; **Schmelzpunkt:** 319-321 °C; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ 2.40 (s, 3H, Ar-CH₃); 7.29 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.44 (d, 1H, ³J = 8.5 Hz, 8'-H); 7.60 (dd, 1H, ³J = 8.5 Hz, ⁴J = 2.2 Hz, 7'-H); 7.78 (s, 1H, 5'-H); 7.82 (d, 2H, ³J = 8.9 Hz, 3-H, 5-H); 7.89 (d, 2H, ³J = 8.9 Hz, 2-H, 6-H); 8.84 (s, 1H, 3'-H); 10.89 (s, 1H,

Ar-NH-CO-R); **LC-MS (m/z):** 357.3 [M]⁻, 359.3 [M]⁺, 376.4 [M+NH₄]⁺, 717.3 [2M]⁺, 734.3 [2M+NH₄]⁺, 749.3 [2M+MeOH]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 96%

7-Methoxy-2-oxo-N-(4-sulfamoylphenyl)-2H-chromen-3-carboxamid (287, MAF48)



Summenformel: C₁₇H₁₄N₂O₆S

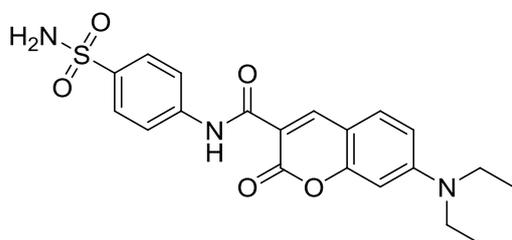
Molare Masse: 374,37 g/mol

Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift D dargestellt.

Ausbeute: 1,08 g (96%)

Aussehen: weißes Pulver; **Löslichkeit:** löslich in DMSO, schlecht löslich in Wasser, Ethanol, Dichlormethan, und Diethylether; **Schmelzpunkt:** 310-312 °C; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ 3.91 (s, 3H, OCH₃); 7.07 (dd, 1H, ³J = 8.5 Hz, ⁴J = 2.2 Hz, 6'-H); 7.16 (d, 1H, ⁴J = 2.5Hz, 8'-H); 7.28 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.82 (d, 2H, ³J = 8.9 Hz, 3-H, 5-H); 7.89 (d, 2H, ³J = 8.9 Hz, 2-H, 6-H); 7.94 (d, 1H, ³J = 8.5 Hz, 5'-H); 8.91 (s, 1H, 3'-H); 10.86 (s, 1H, Ar-NH-CO-R); **LC-MS (m/z):** 373.3 [M]⁻, 375.3 [M]⁺, 392.4 [M+NH₄]⁺, 749.3 [2M]⁺, 766.4 [2M+NH₄]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 100%

6-(Diethylamino)-2-oxo-N-(4-sulfamoylphenyl)-2H-chromen-3-carboxamid (288, MAF50)



Summenformel: C₂₀H₂₁N₃O₅S

Molare Masse: 415,46 g/mol

Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift D dargestellt.

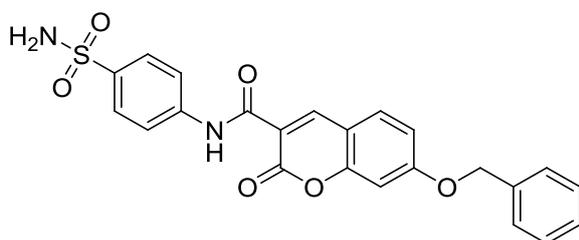
Ausbeute: 557 mg (45%)

Aussehen: gelbes Pulver; **Löslichkeit:** löslich in DMSO, schlecht löslich in Wasser, Ethanol, Dichlormethan, und Diethylether; **Schmelzpunkt:** 284-287 °C; **¹H-NMR:** (500

MHz, DMSO- d_6), δ 1.15 (t, 6H, $J = 7.0$ Hz, N-(CH₂CH₃)₂); 3.50 (q, 4H, $J = 7.0$ Hz, N-(CH₂-CH₃)₂); 6.67 (d, 1H, $^4J = 2.5$ Hz, 5'-H); 6.84 (dd, 1H, $^3J = 9.2$ Hz, $^4J = 2.5$ Hz, 7'-H); 7.25 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.73 (d, 1H, $^3J = 8.9$ Hz, 8'-H); 7.79 (d, 2H, $^3J = 8.6$ Hz, 3-H, 5-H); 7.87 (d, 2H, $^3J = 8.9$ Hz, 2-H, 6-H); 8.76 (s, 1H, 3'-H); 10.96 (s, 1H, Ar-NH-CO-R); **LC-MS (m/z):** 414.2 [M]⁻, 416.2 [M]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS: 97%**

7-(Benzyloxy)-2-oxo-N-(4-sulfamoylphenyl)-2H-chromen-3-carboxamid

(289, MAF78)



Summenformel: C₂₃H₁₈N₂O₆S

Molare Masse: 450,46 g/mol

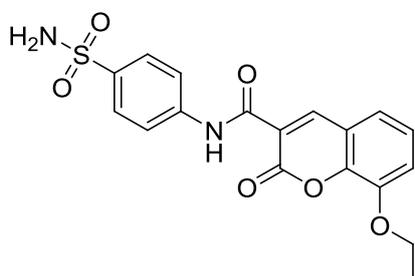
Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift D dargestellt.

Ausbeute: 1,29 g (96%)

Aussehen: gelblich-weißes Pulver; **Löslichkeit:** löslich in DMSO, schlecht löslich in Dichlormethan, Diethylether, Ethanol, und Wasser; **Schmelzpunkt:** 299-301 °C; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO- d_6), δ 5.28 (s, 2H, -OCH₂-Ar); 7.15 (dd, 1H, $^3J = 8.6$ Hz, 3'-H, 5'-H); 7.25 (d, 1H, $^4J = 2.5$ Hz, 7'-H); 7.28 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.36 (tt, 1H, $^3J = 7.3$ Hz, $^4J = 1.3$ Hz, 4''-H); 7.41 (td, 2H, $^3J = 7.3$ Hz, $^4J = 1.3$ Hz, 3''-H, 5''-H); 7.49 (d, 2H, $^3J = 6.9$ Hz, 2''-H, 6''-H); 7.82 (d, 2H, $^3J = 8.9$ Hz, 3-H, 5-H); 7.89 (d, 2H, $^3J = 8.9$ Hz, 2-H, 6-H); 7.95 (d, 1H, $^3J = 8.9$ Hz, 4'-H); 8.90 (s, 1H, 2'-H); 10.86 (s, 1H, Ar-NH-CO-R); **LC-MS (m/z):** 449,03 [M]⁻, 451.24 [M]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS: 100%**

8-Ethoxy-2-oxo-N-(4-sulfamoylphenyl)-2H-chromen-3-carboxamid **(290,**

MAF49)



Summenformel: C₁₈H₁₆N₂O₆S

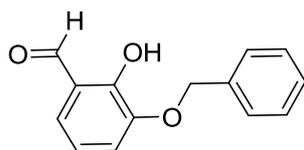
Molare Masse: 388,39 g/mol

Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift D dargestellt.

Ausbeute: 1,13 g (97%)

Aussehen: gelbes Pulver; **Löslichkeit:** löslich in DMSO, schlecht löslich in Wasser, Ethanol, Dichlormethan, und Diethylether; **Schmelzpunkt:** 289-291 °C; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ 1.42 (t, 3H, J = 6.9 Hz, O-CH₂CH₃); 4.22 (q, 2H, J = 6.9 Hz, O-CH₂-CH₃); 7.29 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.37 (t, 1H, ³J = 7.9 Hz, 6'-H); 7.45 (dd, 1H, ³J = 8.2 Hz, ⁴J = 1.3Hz, 7'-H); 7.53 (dd, 1H, ³J = 7.9 Hz, ⁴J = 1.6 Hz, 5'-H); 7.83(d, 2H, ³J = 8.9 Hz, 3-H, 5-H); 7.89 (d, 2H, ³J = 9.2 Hz, 2-H, 6-H); 8.88 (s, 1H, 3'-H); 10.88 (s, 1H, Ar-NH-CO-R); **LC-MS (m/z):** 387.4 [M]⁻, 389.4 [M]⁺, 406.3 [M+NH₄]⁺, 777.5 [2M]⁺, 794.5 [2M+NH₄]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 100%

3-(Benzyloxy)-2-hydroxybenzaldehyd (293, MAF81.1)



Summenformel: C₁₄H₁₂O₃

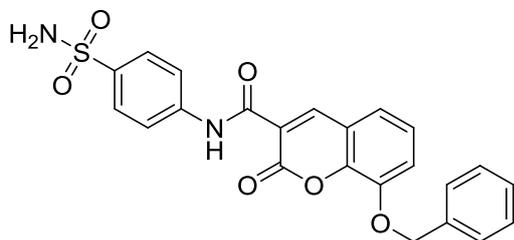
Molare Masse: 228,24 g/mol

Zu einer Suspension von 0,7 g Natriumhydrid-Dispersion (18 mmol) in 15 ml trockenem THF wird 1 g 2,3-dihydroxybenzaldehyd (7,2 mmol) gegeben und die Mischung für etwa 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Unter Rühren werden langsam 0,861 ml Benzylbromid (7,2 mmol) zugetropft und weitere 24 Stunden gerührt. Nach Beenden der Reaktion wird der Ansatz auf 150 ml Wasser gegeben. Die wässrige Phase wird mit 100 ml Chloroform extrahiert, mit 1 M HCl auf pH 2 angesäuert und erneut mit 100 ml Chloroform extrahiert. Die vereinigten Chloroform-Phasen werden mit 1 M HCl gewaschen, mit NaSO₄ getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer das Lösungsmittel entfernt.

Ausbeute: 1,20 g (73%)

LC-MS (m/z): 277.21 [M]⁻, 229.23 [M]⁺, 246.23 [M+NH₄]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 88%

8-(Benzyloxy)-2-oxo-N-(4-sulfamoylphenyl)-2H-chromene-3-carboxamid
(294, MAF81.2)



Summenformel: C₂₃H₁₈N₂O₆S

Molare Masse: 450,46 g/mol

Die Verbindung wurde entsprechend Vorschrift D dargestellt.

Ausbeute: 1,27 g (94%)

Aussehen: weißes Pulver; **Löslichkeit:** löslich in DMSO, schlecht löslich in Dichlormethan, Diethylether, Ethanol, und Wasser; **Schmelzpunkt:** 242-245 °C; **¹H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ [ppm] 5.30 (s, 2H, OCH₂); 7.29 (s, 2H, SO₂NH₂); 7.35-7.39 (m, 2H, 6'-H, 7'-H); 7.42 (t, 2H, ³J = 8 Hz, 3''-H, 5''-H); 7.50-7.56 (m, 4H, 5'-H, 2''-H, 4''-H, 6''-H); 7.83 (d, 2H, ³J = 10 Hz, 3-H, 5-H); 7.89 (d, 2H, ³J = 10 Hz, 2-H, 6-H) 8.88 (s, 1H, 4'-H); 10.87 (s, 1H, NH-CO); **LC-MS (m/z):** 451.22 [M]⁺, 468.38 [M+NH₄]⁺, **Reinheit mit HPLC-UV(220 – 400nm)-ESI-MS:** 97%

12 Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylatcyclase
AcOH	Essigsäure
ADA	Adenosindesaminase
Ade1R	Adenin-Rezeptor Subtyp 1
Ade2R	Adenin-Rezeptor Subtyp 2
Ado	Adenosin
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Adenosinkinase
AMP	Adenosinmonophosphat
AOPCP	Adenosin-5'-[α,β -methylen]-diphosphat
AP	Alkalische Phosphatase
Ap _n A	Dinucleosidpolyphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CE	Kapillarelektrophorese
CD39	Ectonucleosidtriphosphatdiphosphohydrolase
CD73	Ecto-5'-Nucleotidase
cGAMP	cyclisches Dinucleotid
CNT	„concentrative nucleoside transporters“
cpm	Counts per Minute
CTLA-4	cytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein 4
d	Dublett
δ	chemische Verschiebung
DAG	Diacylglycerol
DC	Dünnschichtchromatographie
dd	Dublett vom Dublett
DHPM	3,4-Dihydropyrimidinon
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO-d ₆	deuteriertes Dimethylsulfoxid

E. coli-5'-NT	5'-Nucleotidase des E. coli
Ecto-5'-NT	Ecto-5'-Nucleotidase
EI-Komplex	Enzym-Inhibitor-Komplex
eN	Ecto-5'-Nucleotidase
ENT	„equilibrative nucleoside transporters“
E-NPP	Ectonucleotidpyrophosphatase/phosphodiesterase
E-NTPDase	Ectonucleosidtriphosphatdiphosphohydrolase
ES-Komplex	Enzym-Substrat-Komplex
ESI	Elektronensprayionisation
EtOH	Ethanol
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
GCAP	Germ Cell Alkaline Phosphatase
GF/B Filter	Glasfaserfilter Grad B
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIF-1 α	Hypoxie-induzierter Faktor 1 α
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IAP	Intestinale Alkalische Phosphatase
IC ₅₀	Halbmaximale Inhibitionskonzentration
IFN- γ	Interferon γ
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
<i>J</i>	Kopplungskonstante
K _i	Gleichgewichtsinhibitionskonstante
K _M	Michaelis-Konstante
LC-MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
LOD	Nachweisgrenze (limit of detection)
LS-Counter	Liquid Scintillation Counter
Lsg.	Lösung
m	Multipllett
mAb	Monoklonaler Antikörper
MeOH	Methanol
m/z	Verhältnis Masse/Ladung

v	Umsatzgeschwindigkeit
NAD ⁺	oxidierte Form des Nicotinamidadenindinucleotid
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NMR	Kernspinresonanz (nuclear magnetic resonance)
NTPDase	Nucleosidtriphosphatdiphosphohydrolase
PD-1/PD-L1	programmierter Zelltod (Ligand) 1
P _i	Phosphat
PLAP	Placental Alkaline Phosphatase
PLC	Phospholipase C
POM	Polyoxometalat
r ²	Regressionskoeffizient
RB-2	Reactive blue 2
R _f	Retentionsfaktor
RL	Radioligand
rmsd	mittlere quadratische Abweichung
rt	Raumtemperatur
s	Singulett
SEM	Standardfehler
t	Triplet
TEA	Triethylamin
TGF-β	transformierender Wachstumsfaktor Typ β
THF	Tetrahydrofuran
TMP	Thymidin-5'-monophosphat
TNAP	Tissue-nonspecific alkaline phosphatase
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UDP	Uridindiphosphat
UTP	Uridintriphosphat
V _{max}	Maximalgeschwindigkeit
VEGF	vascular endothelial growth factor
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser

13 Literaturverzeichnis

1. Copeland, R. A. *Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery*; Wiley, 2013.
2. Adams, R.; Worth, C. L.; Guenther, S.; Dunkel, M.; Lehmann, R.; Preissner, R. Binding sites in membrane proteins – Diversity, druggability and prospects. *Eur. J. Cell Biol.* **2012**, *91*, 326–339.
3. Löffler, G. *Biochemie und Pathobiochemie*; Springer, 2007.
4. Leskovac, V. *Comprehensive enzyme kinetics*; Kluwer Academic/Plenum Pub, 2003.
5. Kukulski, F.; Levesque, S. A.; Sevigny, J. Impact of ectoenzymes on P2 and P1 receptor signaling. *Adv. Pharmacol.* **2011**, *61*, 263–299.
6. Yegutkin, G. G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1783*, 673–694.
7. Ziganshin, A. U.; Hoyle, C. H. V.; Burnstock, G. Ecto-enzymes and metabolism of extracellular ATP. *Drug Dev. Res.* **1994**, *32*, 134–146.
8. Zimmermann, H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **2000**, *362*, 299–309.
9. Zimmermann, H. Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Dev. Res.* **2001**, *52*, 44–56.
10. Zimmermann, H.; Zebisch, M.; Sträter, N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signal.* **2012**, *8*, 437–502.
11. Robson, S. C.; Sévigny, J.; Zimmermann, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal.* **2006**, *2*, 409–430.

12. Li, L.; Yin, Q.; Kuss, P.; Maliga, Z.; Millán, J. L.; Wu, H.; Mitchison, T. J. Hydrolysis of 2'3'-cGAMP by ENPP1 and design of nonhydrolyzable analogs. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 1043–1048.
13. Spychala, J. Tumor-promoting functions of adenosine. *Pharmacol. Ther.* **2000**, *87*, 161–173.
14. Zhang, B. CD73: a novel target for cancer immunotherapy. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 6407–6411.
15. Burnstock, G. Do some nerve cells release more than one transmitter? *Neuroscience* **1976**, *1*, 239–248.
16. Burnstock, G. A basis for distinguishing two types of purinergic receptor, in cell membrane receptors for drugs and hormones: A multidisciplinary approach (Bolis, L.; Straub, R. W. (eds.)). Raven Press, New York, **1985**, 107-118.
17. Bender, E.; Buist, A.; Jurzak, M.; Langlois, X.; Baggerman, G.; Verhasselt, P.; Ercken, M.; Guo, H. Q.; Wintmolders, C.; Van den Wyngaert, I.; van Oers, I.; Schoofs, L.; Luyten, W. Characterization of an orphan G protein-coupled receptor localized in the dorsal root ganglia reveals adenine as a signaling molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 8573–8578.
18. Abbracchio, M. P.; Burnstock, G. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol. Ther.* **1994**, *64*, 445–475.
19. Burnstock, G.; Kennedy, C. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen. Pharmacol.* **1985**, *16*, 433–440.
20. Fredholm, B. B.; Abbracchio, M. P.; Burnstock, G.; Daly, J. W.; Harden, T. K.; Jacobson, K. A.; Leff, P.; Williams, M. Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol. Rev.* **1994**, *46*, 143–156.
21. Khakh, B. S.; Burnstock, G.; Kennedy, C.; King, B. F.; North, R. A.; Seguela, P.; Voigt, M.; Humphrey, P. P. International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacol. Rev.* **2001**, *53*, 107–118.

22. Valera, S.; Hussy, N.; Evans, R. J.; Adami, N.; North, R. A.; Surprenant, A.; Buell, G. A new class of ligand-gated ion channel defined by P2X receptor for extracellular ATP. *Nature* **1994**, *371*, 516–519.
23. Burnstock, G. Introduction: P2 receptors. *Curr. Top. Med. Chem.* **2004**, *4*, 793–803.
24. Ralevic, V.; Burnstock, G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* **1998**, *50*, 413–492.
25. Abbracchio, M. P.; Burnstock, G.; Boeynaems, J. M.; Barnard, E. A.; Boyer, J. L.; Kennedy, C.; Knight, G. E.; Fumagalli, M.; Gachet, C.; Jacobson, K. A.; Weisman, G. A. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol. Rev.* **2006**, *58*, 281–341.
26. Londos, C.; Cooper, D. M.; Wolff, J. Subclasses of external adenosine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1980**, *77*, 2551–2554.
27. Maenhaut, C.; van Sande, J.; Libert, F.; Abramowicz, M.; Parmentier, M.; Vanderhaegen, J. J.; Dumont, J. E.; Vassart, G.; Schiffmann, S. RDC8 codes for an adenosine A₂ receptor with physiological constitutive activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, *173*, 1169–1178.
28. van Calker, D.; Muller, M.; Hamprecht, B. Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *J. Neurochem.* **1979**, *33*, 999–1005.
29. Bruns, R. F.; Lu, G. H.; Pugsley, T. A. Characterization of the A₂ adenosine receptor labeled by [³H]NECA in rat striatal membranes. *Mol. Pharmacol.* **1986**, *29*, 331–346.
30. Daly, J. W.; Butts-Lamb, P.; Padgett, W. Subclasses of adenosine receptors in the central nervous system: interaction with caffeine and related methylxanthines. *Cell, Mol. Neurobiol.* **1983**, *3*, 69–80.

31. Fredholm, B. B.; IJzerman, A. P.; Jacobson, K. A.; Klotz, K. N.; Linden, J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev.* **2001**, *53*, 527–552.
32. Fredholm, B. B.; IJzerman, A. P.; Jacobson, K. A.; Linden, J.; Müller, C. E. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors-an update. *Pharmacol. Rev.* **2011**, *63*, 1–34.
33. Ribeiro, J. A.; Sebastiao, A. M. Adenosine receptors and calcium: basis for proposing a third (A₃) adenosine receptor. *Prog. Neurobiol.* **1986**, *26*, 179–209.
34. Zhou, Q. Y.; Li, C.; Olah, M. E.; Johnson, R. A.; Stiles, G. L.; Civelli, O. Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: the A₃ adenosine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1992**, *89*, 7432–7436.
35. Müller, C. E. P2-pyrimidinergic receptors and their ligands. *Curr. Pharm. Des.* **2002**, *8*, 2353–2369.
36. Auchampach, J. A.; Jin, X.; Wan, T. C.; Caughey, G. H.; Linden, J. Canine mast cell adenosine receptors: cloning and expression of the A₃ receptor and evidence that degranulation is mediated by the A_{2B} receptor. *Mol. Pharmacol.* **1997**, *52*, 846–860.
37. Gao, Z.; Chen, T.; Weber, M. J.; Linden, J. A_{2B} adenosine and P2Y₂ receptors stimulate mitogen-activated protein kinase in human embryonic kidney-293 cells. cross-talk between cyclic AMP and protein kinase c pathways. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 5972–5980.
38. Linden, J.; Thai, T.; Figler, H.; Jin, X.; Robeva, A. S. Characterization of human A_{2B} adenosine receptors: radioligand binding, western blotting, and coupling to G_q in human embryonic kidney 293 cells and HMC-1 mast cells. *Mol. Pharmacol.* **1999**, *56*, 705–713.
39. Palmer, T. M.; Gettys, T. W.; Stiles, G. L. Differential interaction with and regulation of multiple G-proteins by the rat A₃ adenosine receptor. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 16895–16902.

40. Jain, N.; Kemp, N.; Adeyemo, O.; Buchanan, P.; Stone, T. W. Anxiolytic activity of adenosine receptor activation in mice. *Br. J. Pharmacol.* **1995**, *116*, 2127–2133.
41. Malhotra, J.; Gupta, Y. K. Effect of adenosine receptor modulation on pentylenetetrazole-induced seizures in rats. *Br. J. Pharmacol.* **1997**, *120*, 282–288.
42. Nikodijevic, O.; Sarges, R.; Daly, J. W.; Jacobson, K. A. Behavioral effects of A₁- and A₂-selective adenosine agonists and antagonists: evidence for synergism and antagonism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1991**, *259*, 286–294.
43. Olsson, R. A.; Pearson, J. D. Cardiovascular purinoceptors. *Physiol. Rev.* **1990**, *70*, 761–845.
44. Holgate, S. T.; Church, M. K.; Polosa, R. Adenosine: a positive modulator of airway inflammation in asthma. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1991**, *629*, 227–236.
45. Sun, C. X.; Zhong, H.; Mohsenin, A.; Morschl, E.; Chunn, J. L.; Molina, J. G.; Belardinelli, L.; Zeng, D.; Blackburn, M. R. Role of A_{2B} adenosine receptor signaling in adenosine-dependent pulmonary inflammation and injury. *J. Clin. Invest.* **2006**, *116*, 2173–2182.
46. Zhong, H.; Wu, Y.; Belardinelli, L.; Zeng, D. A_{2B} adenosine receptors induce IL-19 from bronchial epithelial cells, resulting in TNF-alpha increase. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2006**, *35*, 587–592.
47. Kolachala, V.; Ruble, B.; Vijay-Kumar, M.; Wang, L.; Mwangi, S.; Figler, H.; Figler, R.; Srinivasan, S.; Gewirtz, A.; Linden, J.; Merlin, D.; Sitaraman, S. Blockade of adenosine A_{2B} receptors ameliorates murine colitis. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *155*, 127–137.
48. Sitaraman, S. V.; Merlin, D.; Wang, L.; Wong, M.; Gewirtz, A. T.; Si-Tahar, M.; Madara, J. L. Neutrophil-epithelial crosstalk at the intestinal luminal surface mediated by reciprocal secretion of adenosine and IL-6. *J. Clin. Invest.* **2001**, *107*, 861–869.
49. Gorzalka, S.; Vittori, S.; Volpini, R.; Cristalli, G.; von Kügelgen, I.; Müller, C. E. Evidence for the functional expression and pharmacological characterization of adenine receptors in native cells and tissues. *Mol. Pharmacol.* **2005**, *67*, 955–964.

50. von Kügelgen, I.; Schiedel, A. C.; Hoffmann, K.; Alsdorf, B. B.; Abdelrahman, A.; Müller, C. E. Cloning and functional expression of a novel G_i protein-coupled receptor for adenine from mouse brain. *Mol. Pharmacol.* **2008**, *73*, 469–477.
51. Schiedel, A. C.; Meyer, H.; Alsdorf, B. B.; Gorzalka, S.; Brussel, H.; Müller, C. E. [³H]Adenine is a suitable radioligand for the labeling of G protein-coupled adenine receptors but shows high affinity to bacterial contaminations in buffer solutions. *Purinergic Signal.* **2007**, *3*, 347–358.
52. Thimm, D.; Knospe, M.; Abdelrahman, A.; Moutinho, M.; Alsdorf, B. B.; von Kügelgen, I.; Schiedel, A. C.; Müller, C. E. Characterization of new G protein-coupled adenine receptors in mouse and hamster. *Purinergic Signal.* **2013**, *9*, 415–426.
53. Hunsucker, S. A.; Mitchell, B. S.; Sychala, J. The 5'-nucleotidases as regulators of nucleotide and drug metabolism. *Pharmacol. Ther.* **2005**, *107*, 1–30.
54. Wallden, K.; Stenmark, P.; Nyman, T.; Flodin, S.; Graslund, S.; Loppnau, P.; Bianchi, V.; Nordlund, P. Crystal structure of human cytosolic 5'-nucleotidase II: insights into allosteric regulation and substrate recognition. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 17828–17836.
55. Jin, D.; Fan, J.; Wang, L.; Thompson, L. F.; Liu, A.; Daniel, B. J.; Shin, T.; Curiel, T. J.; Zhang, B. CD73 on Tumor Cells Impairs Antitumor T-Cell Responses: A Novel Mechanism of Tumor-Induced Immune Suppression. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 2245–2255.
56. Resta, R.; Hooker, S. W.; Hansen, K. R.; Laurent, A. B.; Park, J. L.; Blackburn, M. R.; Knudsen, T. B.; Thompson, L. F. Murine ecto-5'-nucleotidase (CD73): cDNA cloning and tissue distribution. *Gene* **1993**, *133*, 171–177.
57. Grondal, E. J.; Zimmermann, H. Purification, characterization and cellular localization of 5'-nucleotidase from Torpedo electric organ. *Biochem. J.* **1987**, *245*, 805–810.
58. James, S.; Richardson, P. J. Production of adenosine from extracellular ATP at the striatal cholinergic synapse. *J. Neurochem.* **1993**, *60*, 219–227.

59. Naito, Y.; Lowenstein, J. M. 5'-Nucleotidase from rat heart. *Biochemistry* **1981**, *20*, 5188–5194.
60. Sträter, N. Ecto-5'-nucleotidase: Structure function relationships. *Purinergic Signal*. **2006**, *2*, 343–350.
61. Castrop, H.; Huang, Y.; Hashimoto, S.; Mizel, D.; Hansen, P.; Theilig, F.; Bachmann, S.; Deng, C.; Briggs, J.; Schnermann, J. Impairment of tubuloglomerular feedback regulation of GFR in ecto-5'-nucleotidase/CD73-deficient mice. *J. Clin. Invest.* **2004**, *114*, 634–642.
62. Koszalka, P.; Ozuyaman, B.; Huo, Y.; Zerneck, A.; Fogel, U.; Braun, N.; Buchheiser, A.; Decking, Ulrich K. M.; Smith, M. L.; Sevigny, J.; Gear, A.; Weber, A. A.; Molojavyi, A.; Ding, Z.; Weber, C.; Ley, K.; Zimmermann, H.; Godecke, A.; Schrader, J. Targeted disruption of cd73/ecto-5'-nucleotidase alters thromboregulation and augments vascular inflammatory response. *Circ. Res.* **2004**, *95*, 814–821.
63. Thompson, L. F.; Eltzschig, H. K.; Ibla, J. C.; Van De Wiele, C. J.; Resta, R.; Morote-Garcia, J. C.; Colgan, S. P. Crucial role for ecto-5'-nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia. *J. Exp. Med.* **2004**, *200*, 1395–1405.
64. Airas, L.; Hellman, J.; Salmi, M.; Bono, P.; Puurunen, T.; Smith, D. J.; Jalkanen, S. CD73 is involved in lymphocyte binding to the endothelium: characterization of lymphocyte-vascular adhesion protein 2 identifies it as CD73. *J. Exp. Med.* **1995**, *182*, 1603–1608.
65. Airas, L.; Niemela, J.; Jalkanen, S. CD73 engagement promotes lymphocyte binding to endothelial cells via a lymphocyte function-associated antigen-1-dependent mechanism. *J. Immunol.* **2000**, *165*, 5411–5417.
66. Morote-Garcia, J. C.; Garcia-Ayllon, M. S.; Campoy, F. J.; Vidal, C. J.; Munoz-Delgado, E. Active and inactive ecto-5'-nucleotidase variants in liver of control and dystrophic Lama2dy mice. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2004**, *36*, 422–433.
67. Martinez-Martinez, A.; Munoz-Delgado, E.; Campoy, F. J.; Flores-Flores, C.; Rodriguez-Lopez, J. N.; Fini, C.; Vidal, C. J. The ecto-5'-nucleotidase subunits in

- dimers are not linked by disulfide bridges but by non-covalent bonds. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1478*, 300–308.
68. Knöfel, T.; Sträter, N. X-ray structure of the Escherichia coli periplasmic 5'-nucleotidase containing a dimetal catalytic site. *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6*, 448–453.
69. Knöfel, T.; Sträter, N. E. coli 5'-nucleotidase undergoes a hinge-bending domain rotation resembling a ball-and-socket motion. *J. Mol. Biol.* **2001**, *309*, 255–266.
70. Schultz-Heienbrok, R.; Maier, T.; Sträter, N. A large hinge bending domain rotation is necessary for the catalytic function of Escherichia coli 5'-nucleotidase. *Biochemistry* **2005**, *44*, 2244–2252.
71. Heuts, D. P.; Weissenborn, M. J.; Olkhov, R. V.; Shaw, A. M.; Gummadova, J.; Levy, C.; Scrutton, N. S. Crystal structure of a soluble form of human CD73 with ecto-5'-nucleotidase activity. *ChemBioChem* **2012**, *13*, 2384–2391.
72. Knapp, K. M.; Zebisch, M.; Sträter, N. Crystallization and preliminary X-ray analysis of the open form of human ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Acta Crystallogr. Sect. F, Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2012**, *68*, 1545–1549.
73. Knapp, K.; Zebisch, M.; Pippel, J.; El-Tayeb, A.; Müller, C. E.; Sträter, N. Crystal Structure of the Human Ecto-5'-Nucleotidase (CD73): Insights into the Regulation of Purinergic Signaling. *Structure* **2012**, *20*, 2161–2173.
74. Knöfel, T.; Sträter, N. Mechanism of hydrolysis of phosphate esters by the dimetal center of 5'-nucleotidase based on crystal structures. *J. Mol. Biol.* **2001**, *309*, 239–254.
75. Iqbal, J.; Jirovsky, D.; Lee, S. Y.; Zimmermann, H.; Müller, C. E. Capillary electrophoresis-based nanoscale assays for monitoring ecto-5'-nucleotidase activity and inhibition in preparations of recombinant enzyme and melanoma cell membranes. *Anal. Biochem.* **2008**, *373*, 129–140.
76. Kawashima, Y.; Nagasawa, T.; Ninomiya, H. Contribution of ecto-5'-nucleotidase to the inhibition of platelet aggregation by human endothelial cells. *Blood* **2000**, *96*, 2157–2162.

77. Colgan, S. P.; Eltzschig, H. K.; Eckle, T.; Thompson, L. F. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signal*. **2006**, *2*, 351–360.
78. Mihaylova-Todorova, S. T.; Todorov, L. D.; Westfall, D. P. Enzyme kinetics and pharmacological characterization of nucleotidases released from the guinea pig isolated vas deferens during nerve stimulation: evidence for a soluble ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-like ATPase and a soluble ecto-5'-nucleotidase-like AMPase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, *302*, 992–1001.
79. Brunschweiler, A. *Darstellung und Charakterisierung von Uracil- und Adeninnucleotid-Mimetika als selektive Ectonucleotidase-Inhibitoren*; Dissertationsschrift, Universität Bonn, 2007.
80. Lee, S.-Y. *Identifizierung und Charakterisierung neuartiger Ectonucleotidase-Inhibitoren mittels Kapillarelektrophorese*; Diplomarbeit, Universität Bonn, 2007.
81. Li, W. *Therapeutically important enzymes with polar substrates or products: characterization by capillary electrophoresis and identification of inhibitors*; Dissertationsschrift, Universität Bonn, 2014.
82. Baqi, Y.; Lee, S. Y.; Iqbal, J.; Ripphausen, P.; Lehr, A.; Scheiff, A. B.; Zimmermann, H.; Bajorath, J.; Müller, C. E. Development of potent and selective inhibitors of ecto-5'-nucleotidase based on an anthraquinone scaffold. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 2076–2086.
83. Lee, S. Y.; Fiene, A.; Li, W.; Hanck, T.; Brylev, K. A.; Fedorov, V. E.; Lecka, J.; Haider, A.; Pietzsch, H. J.; Zimmermann, H.; Sévigny, J.; Kortz, U.; Stephan, H.; Müller, C. E. Polyoxometalates--potent and selective ecto-nucleotidase inhibitors. *Biochem. Pharmacol.* **2015**, *93*, 171–181.
84. Iqbal, J.; Saeed, A.; Raza, R.; Matin, A.; Hameed, A.; Furtmann, N.; Lecka, J.; Sévigny, J.; Bajorath, J. Identification of sulfonic acids as efficient ecto-5'-nucleotidase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *70*, 685–691.
85. Raza, R.; Saeed, A.; Lecka, J.; Sévigny, J.; Iqbal, J. Identification of small molecule sulfonic acids as ecto-5'-Nucleotidase inhibitors. *Med. Chem* **2012**, *8*, 1133–1139.

86. Corbelini, P. F.; Figueiro, F.; das Neves, G. M.; Andrade, S.; Kawano, D. F.; Battastini, A. M.; Eifler-Lima, V. L. Insights into ecto-5'-nucleotidase as a new target for cancer therapy: A medicinal chemistry study. *Curr. Med. Chem.* **2015**, *22*, 1776-1792.
87. Figueiro, F.; Mendes, F. B.; Corbelini, P. F.; Janarelli, F.; Jandrey, E. H.; Russowsky, D.; Eifler-Lima, V. L.; Battastini, A. M. A monastrol-derived compound, LaSOM 63, inhibits ecto-5'nucleotidase/CD73 activity and induces apoptotic cell death of glioma cell lines. *Anticancer Res.* **2014**, *34*, 1837–1842.
88. Braganhol, E.; Tamajusuku, A. S.; Bernardi, A.; Wink, M. R.; Battastini, A. M. Ecto-5'-nucleotidase/CD73 inhibition by quercetin in the human U138MG glioma cell line. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1770*, 1352–1359.
89. Kavutcu, M.; Melzig, M. F. In vitro effects of selected flavonoids on the 5'-nucleotidase activity. *Pharmazie* **1999**, *54*, 457–459.
90. Giordani, R. B.; Weizenmann, M.; Rosemberg, D. B.; De Carli, G. A.; Bogo, M. R.; Zuanazzi, J. A.; Tasca, T. Trichomonas vaginalis nucleoside triphosphate diphosphohydrolase and ecto-5'-nucleotidase activities are inhibited by lycorine and candimine. *Parasitol. Int.* **2010**, *59*, 226–231.
91. Fredholm, B. B.; Hedqvist, P.; Vernet, L. Effect of theophylline and other drugs on rabbit renal cyclic nucleotide phosphodiesterase, 5'-nucleotidase and adenosine deaminase. *Biochem. Pharmacol.* **1978**, *27*, 2845–2850.
92. Heyliger, C. E.; Panagia, V.; Dhalla, N. S. Effect of cyclic AMP phosphodiesterase inhibitors on cardiac sarcolemmal 5'-nucleotidase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1981**, *217*, 489–493.
93. Morote-Garcia, J. C.; Rosenberger, P.; Nivillac, N. M.; Coe, I. R.; Eltzschig, H. K. Hypoxia-inducible factor-dependent repression of equilibrative nucleoside transporter 2 attenuates mucosal inflammation during intestinal hypoxia. *Gastroenterology* **2009**, *136*, 607–618.
94. Bodin, P.; Burnstock, G. Increased release of ATP from endothelial cells during acute inflammation. *Inflammation Res.* **1998**, *47*, 351–354.

95. Bodin, P.; Burnstock, G. Purinergic signalling: ATP release. *Neurochem. Res.* **2001**, *26*, 959–969.
96. Kumar, V.; Sharma, A. Adenosine: An endogenous modulator of innate immune system with therapeutic potential. *Eur. J. Pharmacol.* **2009**, *616*, 7–15.
97. Latini, S.; Pedata, F. Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *J. Neurochem.* **2001**, *79*, 463–484.
98. Lazarowski, E. R.; Boucher, R. C.; Harden, T. K. Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *64*, 785–795.
99. Salmi, M.; Jalkanen, S. Cell-surface enzymes in control of leukocyte trafficking. *Nat. Rev. Immunol.* **2005**, *5*, 760–771.
100. Sowa, N. A.; Taylor-Blake, B.; Zylka, M. J. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) inhibits nociception by hydrolyzing AMP to adenosine in nociceptive circuits. *J. Neurosci.* **2010**, *30*, 2235–2244.
101. Sowa, N. A.; Voss, M. K.; Zylka, M. J. Recombinant ecto-5'-nucleotidase (CD73) has long lasting antinociceptive effects that are dependent on adenosine A₁ receptor activation. *Mol. Pain* **2010**, *6*, 1-8.
102. Street, S. E.; Walsh, P. L.; Sowa, N. A.; Taylor-Blake, B.; Guillot, T. S.; Vihko, P.; Wightman, R. M.; Zylka, M. J. PAP and NT5E inhibit nociceptive neurotransmission by rapidly hydrolyzing nucleotides to adenosine. *Mol. Pain* **2011**, *7*, 1-15.
103. Zylka, M. J. Pain-relieving prospects for adenosine receptors and ectonucleotidases. *Trends Mol. Med.* **2011**, *17*, 188–196.
104. Kriz, W. Adenosine and ATP: traffic regulators in the kidney. *J. Clin. Invest.* **2004**, *114*, 611–613.
105. Peng, Z.; Fernandez, P.; Wilder, T.; Yee, H.; Chiriboga, L.; Chan, Edwin S. L.; Cronstein, B. N. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) -mediated extracellular adenosine production plays a critical role in hepatic fibrosis. *FASEB J.* **2008**, *22*, 2263–2272.

106. Rajakumar, S. V.; Lu, B.; Crikis, S.; Robson, S. C.; d'Apice, A. J.; Cowan, P. J.; Dwyer, K. M. Deficiency or inhibition of CD73 protects in mild kidney ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* **2010**, *90*, 1260–1264.
107. Robson, S. C.; Schuppan, D. Adenosine: tipping the balance towards hepatic steatosis and fibrosis. *J. Hepatol.* **2010**, *52*, 941–943.
108. Cicala, C.; Ialenti, A. Adenosine signaling in airways: Toward a promising antiasthmatic approach. *Eur. J. Pharmacol.* **2013**, *714*, 522–525.
109. Della Latta, V.; Cabiati, M.; Rocchiccioli, S.; Del Ry, S.; Morales, M. A. The role of the adenosinergic system in lung fibrosis. *Pharmacol. Res.* **2013**, *76*, 182–189.
110. Fredholm, B. B.; Chen, J. F.; Cunha, R. A.; Svenningsson, P.; Vaugeois, J. M. Adenosine and Brain Function. *Int. Rev. Neurobiol.* **2005**, *63*, 191–270.
111. Augusto, E.; Matos, M.; Sévigny, J.; El-Tayeb, A.; Bynoe, M. S.; Müller, C. E.; Cunha, R. A.; Chen, J. F. Ecto-5'-nucleotidase (CD73)-mediated formation of adenosine is critical for the striatal adenosine A_{2A} receptor functions. *J. Neurosci.* **2013**, *33*, 11390–11399.
112. Boison, D. Modulators of Nucleoside Metabolism in the Therapy of Brain Diseases. *Curr. Top. Med. Chem.* **2011**, *11*, 1068–1086.
113. Wei, C. J.; Singer, P.; Coelho, J.; Boison, D.; Feldon, J.; Yee, B. K.; Chen, J. F. Selective inactivation of adenosine A_{2A} receptors in striatal neurons enhances working memory and reversal learning. *Learn. Mem.* **2011**, *18*, 459–474.
114. Zhou, S.J.; Zhu, M. E.; Shu, D.; Du, X. P.; Song, X. H.; Wang, X. T.; Zheng, R. Y.; Cai, X. H.; Chen, J. F.; He, J. C. Preferential enhancement of working memory in mice lacking adenosine A_{2A} receptors. *Brain Res.* **2009**, *1303*, 74–83.
115. Cunha, R. A. Neuroprotection by adenosine in the brain: From A₁ receptor activation to A_{2A} receptor blockade. *Purinergic Signal.* **2005**, *1*, 111–134.
116. Canas, P. M.; Porciuncula, L. O.; Cunha, G. M.; Silva, C. G.; Machado, N. J.; Oliveira, J. M.; Oliveira, C. R.; Cunha, R. A. Adenosine A_{2A} receptor blockade prevents synaptotoxicity and memory dysfunction caused by beta-amyloid

- peptides via p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Neurosci.* **2009**, *29*, 14741–14751.
117. Chen, J. F.; Xu, K.; Petzer, J. P.; Staal, R.; Xu, Y. H.; Beilstein, M.; Sonsalla, P. K.; Castagnoli, K.; Castagnoli, N. Jr.; Schwarzschild, M. A. Neuroprotection by caffeine and A_{2A} adenosine receptor inactivation in a model of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* **2001**, *21*, RC143.
118. Bynoe, M. S.; Viret, C.; Yan, A.; Kim, D. G. Adenosine receptor signaling: a key to opening the blood–brain door. *Fluids Barriers CNS* **2015**, *12*, 1-12.
119. Gao, X.; Qian, J.; Zheng, S.; Changyi, Y.; Zhang, J.; Ju, S.; Zhu, J.; Li, C. Overcoming the blood-brain barrier for delivering drugs into the brain by using adenosine receptor nanoagonist. *ACS Nano* **2014**, *8*, 3678–3689.
120. El-Tayeb, A.; Iqbal, J.; Behrenswerth, A.; Romio, M.; Schneider, M.; Zimmermann, H.; Schrader, J.; Müller, C. E. Nucleoside-5'-monophosphates as prodrugs of adenosine A_{2A} receptor agonists activated by ecto-5'-nucleotidase. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 7669–7677.
121. Flögel, U.; Burghoff, S.; van Lent, P. L.; Temme, S.; Galbarz, L.; Ding, Z.; El-Tayeb, A.; Huels, S.; Bonner, F.; Borg, N.; Jacoby, C.; Müller, C. E.; van den Berg, W. B.; Schrader, J. Selective activation of adenosine A_{2A} receptors on immune cells by a CD73-dependent prodrug suppresses joint inflammation in experimental rheumatoid arthritis. *Sci. Trans. Med.* **2012**, *4*, 146ra108.
122. Allard, B.; Turcotte, M.; Spring, K.; Pommey, S.; Royal, I.; Stagg, J. Anti-CD73 therapy impairs tumor angiogenesis. *International journal of cancer. Int. J. Cancer* **2014**, *134*, 1466–1473.
123. Stagg, J.; Divisekera, U.; Duret, H.; Sparwasser, T.; Teng, M. W.; Darcy, P. K.; Smyth, M. J. CD73-Deficient Mice Have Increased Antitumor Immunity and Are Resistant to Experimental Metastasis. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 2892–2900.
124. Mirza, A.; Basso, A.; Black, S.; Malkowski, M.; Kwee, L.; Pachter, J. A.; Lachowicz, J. E.; Wang, Y.; Liu, S. RNA interference targeting of A₁ receptor-

- overexpressing breast carcinoma cells leads to diminished rates of cell proliferation and induction of apoptosis. *Cancer Boil. Ther.* **2005**, *4*, 1355–1360.
125. Merighi, S.; Benini, A.; Mirandola, P.; Gessi, S.; Varani, K.; Leung, E.; Maclennan, S.; Baraldi, P. G.; Borea, P. A. A₃ adenosine receptors modulate hypoxia-inducible factor-1 α expression in human A375 melanoma cells. *Neoplasia* **2005**, *7*, 894–903.
126. Merighi, S.; Benini, A.; Mirandola, P.; Gessi, S.; Varani, K.; Leung, E.; Maclennan, S.; Baraldi, P. G.; Borea, P. A. Hypoxia inhibits paclitaxel-induced apoptosis through adenosine-mediated phosphorylation of bad in glioblastoma cells. *Mol. Pharmacol.* **2007**, *72*, 162–172.
127. Merighi, S.; Benini, A.; Mirandola, P.; Gessi, S.; Varani, K.; Leung, E.; Maclennan, S.; Borea, P. A. Adenosine modulates vascular endothelial growth factor expression via hypoxia-inducible factor-1 in human glioblastoma cells. *Biochem. Pharmacol.* **2006**, *72*, 19–31.
128. Feoktistov, I.; Ryzhov, S.; Goldstein, A. E.; Biaggioni, I. Mast cell-mediated stimulation of angiogenesis: cooperative interaction between A_{2B} and A₃ adenosine receptors. *Circ. Res.* **2003**, *5*, 485–492.
129. Gessi, S.; Fogli, E.; Sacchetto, V.; Merighi, S.; Varani, K.; Preti, D.; Leung, E.; Maclennan, S.; Borea, P. A. Adenosine modulates HIF-1 α , VEGF, IL-8, and foam cell formation in a human model of hypoxic foam cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2010**, *30*, 90–97.
130. Iino, M.; Ehama, R.; Nakazawa, Y.; Iwabuchi, T.; Ogo, M.; Tajima, M.; Arase, S. Adenosine stimulates fibroblast growth factor-7 gene expression via adenosine A_{2B} receptor signaling in dermal papilla cells. *J. Invest. Dermatol.* **2007**, *127*, 1318–1325.
131. Stagg, J.; Smyth, M. J. Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. *Oncogene* **2010**, *29*, 5346–5358.
132. Haskó, G. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol.* **2004**, *25*, 33–39.

133. Beavis, P. A.; Milenkovski, N.; Stagg, J.; Smyth, M. J.; Darcy, P. K. A blockade enhances anti-metastatic immune responses. *Oncoimmunology* **2013**, *2*, e26705.
134. Miller, J. S.; Cervenka, T.; Lund, J.; Okazaki, I. J.; Moss, J. Purine metabolites suppress proliferation of human NK cells through a lineage-specific purine receptor. *J. Immunol.* **1999**, *162*, 7376–7382.
135. Raskovalova, T.; Huang, X.; Sitkovsky, M.; Zacharia, L. C.; Jackson, E. K.; Gorelik, E. G_s protein-coupled adenosine receptor signaling and lytic function of activated NK cells. *J. Immunol.* **2005**, *175*, 4383–4391.
136. Zarek, P. E.; Huang, C. T.; Lutz, E. R.; Kowalski, J.; Horton, M. R.; Linden, J.; Drake, C. G.; Powell, J. D. A_{2A} receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood* **2008**, *111*, 251–259.
137. Sadej, R.; Skladanowski, A. C. Dual, enzymatic and non-enzymatic, function of ecto-5'-nucleotidase (eN, CD73) in migration and invasion of A375 melanoma cells. *Acta Biochim. Pol.* **2012**, *59*, 647–652.
138. Terp, M. G.; Olesen, K. A.; Arnspang, E. C.; Lund, R. R.; Lagerholm, B. C.; Ditzel, H. J.; Leth-Larsen, R. Anti-human CD73 monoclonal antibody inhibits metastasis formation in human breast cancer by inducing clustering and internalization of CD73 expressed on the surface of cancer cells. *J. Immunol.* **2013**, *191*, 4165–4173.
139. Stagg, J.; Divisekera, U.; McLaughlin, N.; Sharkey, J.; Pommey, S.; Denoyer, D.; Dwyer, K. M.; Smyth, M. J. Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107*, 1547–1552.
140. Zhi, X.; Wang, Y.; Zhou, X.; Yu, J.; Jian, R.; Tang, S.; Yin, L.; Zhou, P. RNAi-mediated CD73 suppression induces apoptosis and cell-cycle arrest in human breast cancer cells. *Cancer Sci.* **2010**, *101*, 2561–2569.
141. Yegutkin, G. G.; Marttila-Ichihara, F.; Karikoski, M.; Niemelä, J.; Laurila, J. P.; Elima, K.; Jalkanen, S.; Salmi, M. Altered purinergic signaling in CD73-deficient mice inhibits tumor progression. *Eur. J. Immunol.* **2011**, *41*, 1231–1241.

142. Gettinger, S. N.; Horn, L.; Gandhi, L.; Spigel, D. R.; Antonia, S. J.; Rizvi, N. A.; Powderly, J. D.; Heist, R. S.; Carvajal, R. D.; Jackman, D. M.; Sequist, L. V.; Smith, D. C.; Leming, P.; Carbone, D. P.; Pinder-Schenck, M. C.; Topalian, S. L.; Hodi, F. S.; Sosman, J. A.; Sznol, M.; McDermott, D. F.; Pardoll, D. M.; Sankar, V.; Ahlers, C. M.; Salvati, M.; Wigginton, J. M.; Hellmann, M. D.; Kollia, G. D.; Gupta, A. K.; Brahmer, J. R. Overall Survival and Long-Term Safety of Nivolumab (Anti-Programmed Death 1 Antibody, BMS-936558, ONO-4538) in Patients With Previously Treated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2015**, *33*, 2004–2012.
143. Hodi, F. S.; O’Day, S. J.; McDermott, D. F.; Weber, R. W.; Sosman, J. A.; Haanen, J. B.; Gonzalez, R.; Robert, C.; Schadendorf, D.; Hassel, J. C.; Akerley, W.; van den Eertwegh, A. J.; Lutzky, J.; Lorigan, P.; Vaubel, J. M.; Linette, G. P.; Hogg, D.; Ottensmeier, C. H.; Lebbé, C.; Peschel, C.; Quirt, I.; Clark, J. I.; Wolchok, J. D.; Weber, J. S.; Tian, J.; Yellin, M. J.; Nichol, G. M.; Hoos, A.; Urba, W. J. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **2010**, *363*, 711–723.
144. Robert, C.; Mateus, C. Drug therapy of melanoma: anti-CTLA-4 and anti-PD-1 antibodies. *Bull. Acad. Natl. Med.* **2014**, *198*, 297–308.
145. Curran, M. A.; Montalvo, W.; Yagita, H.; Allison, J. P. PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 4275–4280.
146. Allard, B.; Pommey, S.; Smyth, M. J.; Stagg, J. Targeting CD73 enhances the antitumor activity of anti-PD-1 and anti-CTLA-4 mAbs. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 5626–5635.
147. Hajduk, P. J.; Greer, J. A decade of fragment-based drug design: strategic advances and lessons learned. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 211–219.
148. Amici, A.; Emanuelli, M.; Raffaelli, N.; Ruggieri, S.; Magni, G. One-Minute High-Performance Liquid Chromatography Assay for 5'-Nucleotidase Using a 20-mm Reverse-Phase Column. *Anal. Biochem.* **1994**, *216*, 171–175.

149. Baykov, A. A.; Evtushenko, O. A.; Avaeva, S. M. A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay. *Anal. Biochem.* **1988**, *171*, 266–270.
150. Bethune, V. G.; Fleisher, M.; Schwartz, M. K. Automated method for determination of serum 5'-nucleotidase activity. *Clin. Chem.* **1972**, *18*, 1524–1528.
151. Chatterjee, S. K.; Bhattacharya, M.; Barlow, J. J. A simple, specific radiometric assay for 5'-nucleotidase. *Anal. Biochem.* **1979**, *95*, 497–506.
152. Cogan, E. B.; Birrell, G.; Griffith, O. A Robotics-Based Automated Assay for Inorganic and Organic Phosphates. *Anal. Biochem.* **1999**, *271*, 29–35.
153. Ellims, P. H.; Bailey, L.; Van Der Weyden, M. B. An improved method for the determination of human erythrocyte pyrimidine 5'-nucleotidase activity. *Clin. Chim. Acta* **1978**, *88*, 99–103.
154. Garvey, E. P.; Lowen, G. T.; Almond, M. R. Nucleotide and nucleoside analogues as inhibitors of cytosolic 5'-nucleotidase I from heart. *Biochem.* **1998**, *37*, 9043–9051.
155. Gentry, M. K.; Olsson, R. A. A simple, specific, radioisotopic assay for 5'-nucleotidase. *Anal. Biochem.* **1975**, *64*, 624–627.
156. Janero, D. R.; Yarwood, C.; Thakkar, J. K. Application of solid-phase extraction on anion-exchange cartridges to quantify 5'-nucleotidase activity. *J. Chromatogr.* **1992**, *573*, 207–218.
157. Lanzetta, P. A.; Alvarez, L. J.; Reinach, P. S.; Candia, O. A. An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal. Biochem.* **1979**, *100*, 95–97.
158. Perez, S.; Curtis, N.; Kokkinopoulos, D.; Papamichail, M.; Tsiapalis, C. M.; Trangas, T. A colorimetric assay for the determination of 5'-nucleotidase activity. *J. Immunol. Methods* **1987**, *101*, 73–78.
159. Price, C. P.; Hill, P. G.; Sammons, H. G. A comparison of two colorimetric procedures for the assay of 5'-nucleotidase. *Clin. Chim. Acta* **1971**, *33*, 260–263.

160. Sachsenmeier, K. F.; Hay, C.; Brand, E.; Clarke, L.; Rosenthal, K.; Guillard, S.; Rust, S.; Minter, R.; Hollingsworth, R. Development of a novel ectonucleotidase assay suitable for high-throughput screening. *J. Biomol. Screen.* **2012**, *17*, 993–998.
161. Stolk, J. N.; De Abreu, R. A.; Boerbooms, A. M.; de Koning, D. G. M.; de Graaf, R.; Kerstens, P. J.; van de Putte, L. B. Purine enzyme activities in peripheral blood mononuclear cells: comparison of a new non-radiochemical high-performance liquid chromatography procedure and a radiochemical thin-layer chromatography procedure. *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.* **1995**, *666*, 33–43.
162. Suran, A. A. A simple microradioisotopic assay for 5'-nucleotidase activity: Application to central nervous tissues. *Anal. Biochem.* **1973**, *55*, 593–600.
163. Tucker-Pian, C.; Bakay, B.; Nyhan, W. L. 5'-Nucleotidase: solubilization, radiochemical analysis, and electrophoresis. *Biochem. Gen.* **1979**, *17*, 995–1005.
164. Yegutkin, G. G. Extracellular ATP formation on vascular endothelial cells is mediated by ecto-nucleotide kinase activities via phosphotransfer reactions. *FASEB J.* **2001**, *15*, 251–260.
165. Kruger, N. J. Errors and artifacts in coupled spectrophotometric assays of enzyme activity. *Phytochemistry* **1995**, *38*, 1065–1071.
166. Servos, J.; Reiländer, H.; Zimmermann, H. Catalytically active soluble ecto-5'-nucleotidase purified after heterologous expression as a tool for drug screening. *Drug Dev. Res.* **1998**, *45*, 269–276.
167. Gammon, S. T.; Bernstein, M.; Schuster, D. P.; Piwnica-Worms, D. A method for quantification of nucleotides and nucleotide analogues in thymidine kinase assays using lanthanum phosphate coprecipitation. *Anal. Biochem.* **2007**, *369*, 80–86.
168. Ripphausen, P.; Freundlieb, M.; Brunschweiler, A.; Zimmermann, H.; Müller, C. E.; Bajorath, J. Virtual screening identifies novel sulfonamide inhibitors of ecto-5'-nucleotidase. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 6576–6581.

169. Furtmann, N.; Bajorath, J. Evaluation of molecular model-based discovery of ecto-5'-nucleotidase inhibitors on the basis of X-ray structures. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 6616–6622.
170. Irwin, J. J.; Shoichet, B. K. ZINC – A Free Database of Commercially Available Compounds for Virtual Screening. *J. Chem. Inf. Model.* **2005**, *45*, 177–182.
171. Vullo, D.; Franchi, M.; Gallori, E.; Antel, J.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of mitochondrial isozyme V with aromatic and heterocyclic sulfonamides. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1272–1279.
172. Broom, A. D.; Townsend, L. B.; Jones, J. W.; Robins, R. K. Purine nucleosides. VI. further methylation studies of naturally occurring purine nucleosides. *Biochemistry.* **1964**, *3*, 494–500.
173. Lister, J. H. *Chemistry of Heterocyclic Compounds* John Wiley & Sons, Inc. 1971.
174. Montgomery, J. A.; Thomas, H. J. On the alkylation of adenine. *J. Heterocycl. Chem.* **1964**, *1*, 115–120.
175. Bhattacharya, G.; Herman, J.; Delfin, D.; Salem, M. M.; Barszcz, T.; Mollet, M.; Riccio, G.; Brun, R.; Werbovetz, K. A. Synthesis and antitubulin activity of N¹- and N⁴-substituted 3,5-dinitro sulfanilamides against African trypanosomes and Leishmania. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1823–1832.
176. Premkumar, R. E.; Ramana, R. M. V. Substituted hydrazones as inhibitors of Cyclooxygenase-2. WO Patent 2003049698, **2003**.
177. Müller, C. E. General Synthesis and Properties of 1-Monosubstituted Xanthines. *Synthesis* **1993**, *1*, 125–128.
178. Bredereck, H.; Siegel, E.; Föhlisch, B. Synthesen in der Purinreihe, XIII. Über die Darstellung einiger Xanthin-aldehyde-(8). *Chem. Ber.* **1962**, *95*, 403–413.
179. Barghon, A.; Perrot, R. N⁴-Acylated derivatives of sulfaguanidine and of its N¹-acylated derivatives. *Ann. Sci. Univ. Besançon. Chim.* **1955**, *1*, 16pp.

180. Roth, H. J.; Allmer, I. Photoreaktionen von Sulfonamid-Mannichbasen. 4. Mitt.: Photochemische Reaktionen von Anilino-benzyl-ketonen. *Arch. Pharm.* **1970**, *303*, 741–753.
181. Chu, E. J. H. Derivatives of sulfanilamide; N⁴-(*p*-Aminobenzoyl)-sulfanilamide and related compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **1945**, *67*, 2243–2244.
182. Siebenmann, C.; Schnitzer, R. J. Chemotherapeutic study of *p*-nitrobenzoyl- and related compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **1943**, *65*, 2126–2128.
183. Ilies, M.; Supuran, C. T.; Scozzafava, A.; Casini, A.; Mincione, F.; Menabuoni, L.; Caproiu, M. T.; Maganu, M.; Banciu, M. D. Carbonic anhydrase inhibitors: sulfonamides incorporating furan-, thiophene- and pyrrole-carboxamido groups possess strong topical intraocular pressure lowering properties as aqueous suspensions. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 2145–2155.
184. Kolloff, H. G.; Hunter, J. H. Sulfanilamide Compounds. III. N⁴-Heteroöyl Derivatives of N¹-Substituted Sulfanilamides. *J. Am. Chem. Soc.* **1940**, *62*, 1646–1647.
185. Lespagnol, A.; Bar, D.; Erb-Debruyne, M.; Delhomenie-Sauvage, M. Potential carbonic anhydrase inhibitors. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1960**, 490–494.
186. Darwish, E. S.; Fattah, A. M.; Ataby, F. A.; Al-Shayea, O. N. Synthesis and Antimicrobial Evaluation of Some Novel Thiazole, Pyridone, Pyrazole, Chromene, Hydrazone Derivatives Bearing a Biologically Active Sulfonamide Moiety. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 1237–1254.

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und sowohl in Höhen als auch in Tiefen immer zu mir gestanden haben.

Zunächst gilt mein besonderer Dank meiner wissenschaftlichen Betreuerin Frau Prof. Dr. Christa Müller, die es mir möglich gemacht hat diese Arbeit in ihrem Arbeitskreis anzufertigen. Durch das sehr interessante und vielseitige Thema, sowie die Offenheit und das Interesse gegenüber neuen Ideen konnte ich sehr viele neue Methoden und eine eigenständige Arbeitsweise erlernen. Ich danke allen, die mir mit Ihrer Hilfe, Geduld und Diskussionsbereitschaft bei der Erlernung neuer Methoden beseite gesatnden haben.

Zum Gelingen der Synthesen möchte ich mich vor allem bei Dr. Younis Baqi, Dr. Thomas Brunschweiler, Dr. Mario Funke und Dr. Sabrina Gollos für die Unterstützung und hilfreichen Diskussionen und guten Tipps danken. Marion Schneider, Sabine Terhart-Krabbe und Annette Reiner danke ich für die Durchführung der LC-MS und NMR-Analytik.

Nicole Florin danke ich für die tolle Einarbeitung in das Isotopenlabor und die Unterstützung bei der Erstellung der neuen Assaymethode. Ebenso bedanke ich mich bei meinen „Enzym-Kollegen“ Amelie, Heidi, Sangyong und Wenjin für die interessanten und hilfreichen Diskussionsrunden.

Ein weiterer Dank gilt Ralf Mayer und dem gesamten Team des 7. Semesters für die tolle Zusammenarbeit. Es war mir eine Freude dieses Semester mit Euch betreuen zu dürfen.

Bei dem ganzen Arbeitskreis und insbesondere meinen Bürokollegen und der Mittags-Runde Benni, Victor, Clara, Claudia, Katharina, Christian, Amelie, Mario, Sabrina, Anne, Dominik, Thomas und Simone bedanke ich mich für die tolle Atmosphäre und die netten und lustigen gemeinsamen Stunden. Danke auch für die lustigen Abende und Unternehmungen, wie die Besuche im Fußballstadion und der Paddelausflug. Danke an Marion für die schönen gemeinsamen Ausritte im Königsforst.

Der größte Dank gebührt sicherlich meiner Familie und meinen Freunden, die mich immer Unterstützt undmit beigestanden haben, immer ein offenes Ohr für mich hatten und mich wieder aufgebaut haben, wenn es mal nicht so rund lief. Danke für alles!