



Max-Planck-Institut
für molekulare Physiologie



**Entwicklung von Inhibitoren für
Lipoproteintransporterproteine, Hh-Coaktivatoren
und einer γ -selektiven C-Ferrier-Umlagerung**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. Nat.)

Fakultät für Chemie und Chemische Biologie der Technischen Universität
Dortmund

von

Walter Hofer

aus

Balingen

1. Gutachter: **Prof. Dr. Dr. hc. Herbert Waldmann**
2. Gutachter: **Prof. Dr. Daniel Summerer**

Datum der Einreichung: 25.05.2018

Datum der mündlichen Prüfung: 08.06.2018

Die vorliegende Dissertation entstand im Zeitraum vom September 2014 bis Mai 2018 unter der Anleitung von Prof. Dr. Dr. h. c. Herbert Waldmann am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund und der Fakultät für Chemie und Chemische Biologie an der Technischen Universität Dortmund.

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen veröffentlicht:

Mejuch, T.; Garivet, G.; Hofer, W.; Kaiser, N.; Fansa, E. K.; Ehrt, C.; Koch, O.; Baumann, M.; Ziegler, S.; Wittinghofer, A.; Waldmann, H. Small-molecule inhibition of the UNC119-cargo interaction. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56* (22), 6181-6186

Inhaltsverzeichnis

1.	Allgemeine Einleitung	1
2.	Inhibition der UNC119-Src-Interaktion	3
2.1	Einleitung	3
2.1.1	Die Nicht-Rezeptor Tyrosinkinase c-Src.....	3
2.1.2	Die Modifikation von SFKs und deren Membranstabilisierung	5
2.1.3	UNC119a/b und ARL2/3.....	7
2.1.4	Transport von SFKs in Zellen	11
2.1.5	Die Rolle von KRAS in der Tumorentstehung.....	13
2.1.6	PDE δ und seine Interaktion mit lipidierten RAS-Proteinen.....	14
2.1.7	Direkte Src-Inhibitoren.....	17
2.1.8	Lipidomimetika	18
2.2	Zielsetzung	21
2.3	Resultate und Diskussion	23
2.3.1	Ergebnisse des Hochdurchsatzverfahrens	23
2.3.2	Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehung	24
2.3.3	Physikalisch-chemische und biophysikalische Experimente.....	33
2.3.4	Einfluss von Deltauncin auf die UNC119-Src-Interaktion bestimmt durch ein Proximity-Ligation Experiment	37
2.3.5	Einfluss von Deltauncin auf die UNC119-Src-Interaktion bestimmt durch FLIM-FRET Experimente	40
2.3.6	Einfluss von Deltauncin auf die Relokalisierung von Src	43
2.3.7	Einfluss von Deltauncin auf den Phosphorylierungsgrad von Src	44
2.3.8	Einfluss von Deltauncin auf die Zellmigration.....	45
2.3.9	Einfluss von Deltauncin auf die Koloniebildung und Zellproliferation	47
2.3.10	Einfluss von Deltauncin auf das Wachstum von Src-sensitiven Zelllinien.....	49
2.3.11	Einfluss von Deltauncin auf das Wachstum von RAS-sensitiven Zelllinien.....	53
2.3.12	Einfluss von Deltauncin auf Sphäroide	60
2.4	Zusammenfassung: Inhibition der UNC119-Src-Interaktion.....	63
3.	Modulation des Hedgehog Signalwegs zur Zellwachstumsregulierung	65
3.1	Einleitung	65
3.2	Zielsetzung	67
3.3	Resultate und Diskussion	69
3.3.1	Synthese und Testung der <i>cis</i> -Isomere	69
3.3.2	Synthese der <i>trans</i> -Isomere	75

3.4	Zusammenfassung: Modulation des Hedghog Signalwegs zur Zellwachstumsregulierung	79
4.	Neue Synthesemethoden von Glucalderivaten durch eine C-vinyloge, γ-selektive Ferrier-Umlagerung.....	81
4.1	Einleitung.....	81
4.2	Zielsetzung.....	83
4.3	Resultate und Diskussion.....	85
4.3.1	Initiale Syntheseoptimierung.....	85
4.3.2	Die Ferrier-Umlagerung von verschiedenen Glucalen mit 22b.....	89
4.3.3	Untersuchung verschiedener γ -Nukleophile.....	91
4.3.4	Optimierung der α/β -Selektivität - Enolate	93
4.3.5	Optimierung der α/β -Selektivität - Schutzgruppeneffekte	94
4.3.6	Optimierung der α/β -Selektivität - Katalysatoren	96
4.4	Zusammenfassung: Neue Synthesemethoden von Glucalderivaten durch eine C-vinyloge, γ -selektive Ferrier-Umlagerung	101
5.	Zusammenfassung.....	103
6.	Summary.....	107
7.	Experimenteller Teil	110
7.1	Chemischer Teil - Arbeitstechniken.....	110
7.1.1	Synthese der UNC119 Inhibitoren	113
	Synthese der acetylierten Indole 5a-n (allgemeine Vorschrift Ia).....	113
	Synthese der alkylierten Indole 5o-u (allgemeine Vorschrift Ib).....	121
	Synthese der Indolin-5-Sulfonylchloride 6a-v (allgemeine Vorschrift II)	125
	Synthese einfach <i>Boc</i> -geschützter Diamine 8a-f (allgemeine Vorschrift III)	137
	Synthese der acetylierten und geschützten Linker 10a-o (allgemeine Vorschrift IVa).....	141
	Synthese der alkylierten und geschützten Linker 10o-q (allgemeine Vorschrift IVb).....	149
	Synthese der acetylierten Linker 9a-n (allgemeine Vorschrift Va).....	153
	Synthese der alkylierten Linker 9o-q (allgemeine Vorschrift Vb).....	159
	Synthese der Inhibitoren 3a-j/a-u (allgemeine Vorschrift VIa).....	161
	Synthese der Inhibitoren 3j-m, o-q/e (allgemeine Vorschrift VIb)	161
7.1.2	Synthese der Hedgehog-Coaktivatoren	236
	Synthese der Pyrrolidin-2,4-dione 12a-f (allgemeine Vorschrift VIIa).....	236
	Synthese der Pyrrolidin-2,4-dion-enamine 13aa-fb (allgemeine Vorschrift VIII)	242
	Synthese der Coaktivatoren 14aa-fb (allgemeine Vorschrift IX).....	257
	Synthese der <i>trans</i> -Pyrrolidinon-Dipeptidbausteine 15-21	273
7.1.3	Neue Synthesemethoden zur Zuckerderivatisierung	282

Synthese der vinylogen Silylenolether-Vorstufen.....	282
Synthese der vinylogen Silylenolether 22a-i.....	289
Synthese der geschützten Zucker 30a-c.....	296
Synthese der H-Donor-Katalysatoren 31-35	299
7.2 Biologischer Teil - Arbeitstechniken und Materialien.....	304
7.2.1 <i>In vitro</i> Experimente.....	309
7.2.2 <i>In cellulo</i> Experimente	311
Abbildungsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	V
Liste der Abkürzungen	VI
Literaturverzeichnis.....	XI
Danksagung.....	XXVII

1. Allgemeine Einleitung

Bösartige Tumorerkrankungen sind global gesehen die zweithäufigste Erkrankung, die zum Tode führt. Allein 2015 starben 8,8 Millionen Menschen weltweit daran.¹

Eine Gemeinsamkeit aller Krebsarten ist das bestehende Ungleichgewicht innerhalb der entarteten Zellen.² Das Ungleichgewicht kann durch verschiedene, meist kombinierten Faktoren, entstehen, die in den sog. Krebsmerkmalen (engl. *hallmarks of cancer*) veranschaulicht sind.² Diese Faktoren führen zunächst zu Tumoren und über weitere Adaptionsmechanismen zu Metastasen.³ Dies bedeutet die Wanderung von adaptierten/undifferenzierten Krebszellen im Körper und führt zu einer Ausbreitung von Krebszellen an verschiedenen Orten und in verschiedenen Geweben. Im Moment gibt es bereits für einige Entitäten mehr oder weniger erfolgreiche Therapien, die vor allem chirurgische Eingriffe und konservative/medikamentöse Behandlung umfassen. Besonders die Gabe von herkömmlichen Zytostatika hat jedoch meist erhebliche Nebenwirkungen. Die meisten Nebenwirkungen können auf unspezifische Interaktionen mit gesunden Zellen zurückgeführt werden.³

Des Weiteren kann es zu Rezidiven kommen, wenn keine vollständige operative Entfernung möglich ist, sich Resistenzen bilden, der Krebs streut (Metastasierungen) oder eine bestimmte prädisponierende, genetische Veranlagung vorhanden ist. Der Schwerpunkt dieser Dissertation ist die Inhibition von UNC119 als indirekte Inhibition von Src, einem Protein, das meist überaktiv in vielen Tumoren vorliegt. Es werden auch folgende Ansätze besprochen:

- 1) Modulation des Hedghog (Hh) Signalwegs zur Zellwachstumsregulierung.
- 2) Neue Synthesemethoden von Glucalderivaten durch eine C-vinyloge, γ -selektive Ferrier-Umlagerung

2. Inhibition der UNC119-Src-Interaktion

2.1 Einleitung

2.1.1 Die Nicht-Rezeptor Tyrosinkinase c-Src

Src ist eines der Proteine, das am häufigsten mit Krebs in Verbindung gebracht wird. c-Src (auch Src) steht für zelluläres Sarcoma. Hierbei ist im Namen bereits sein onkogenes Potential zu erkennen: In ca. 50% der Dickdarm-, Lunge-, Brust-, Leber- und Bauchspeicheldrüsenkrebsfälle ist eine Erhöhung der Src-Aktivität zu beobachten.⁴ Src katalysiert die Übertragung einer Phosphorylgruppe auf einen Tyrosinrest eines anderen Proteins. Damit wird Src als Tyrosinkinase bezeichnet. Neben Src gibt es die strukturell und funktionell ähnlichen Kinasen Fyn, Yes, Blk, Hck, Lck und Lyn. Diese werden unter dem Begriff der Src-Familie-Kinasen (SFKs) zusammengefasst.⁵ Dabei werden Src, Fyn und Yes ubiquitär exprimiert.⁶ Humanes Src besteht aus 536 Aminosäuren.⁶ Das Protein ist *N*-terminal myristoyliert gefolgt von einem polybasischen Motiv, der Src homology (SH) 4 Domäne (engl. *SH4 domain*), einer besonderen Region (engl. *unique region*), einer SH3-Domäne, einer SH2-Domäne, einer katalytische Domäne (SH1) und einem kurzen, regulatorischen Schwanz (**Abb. 2.1**).⁷

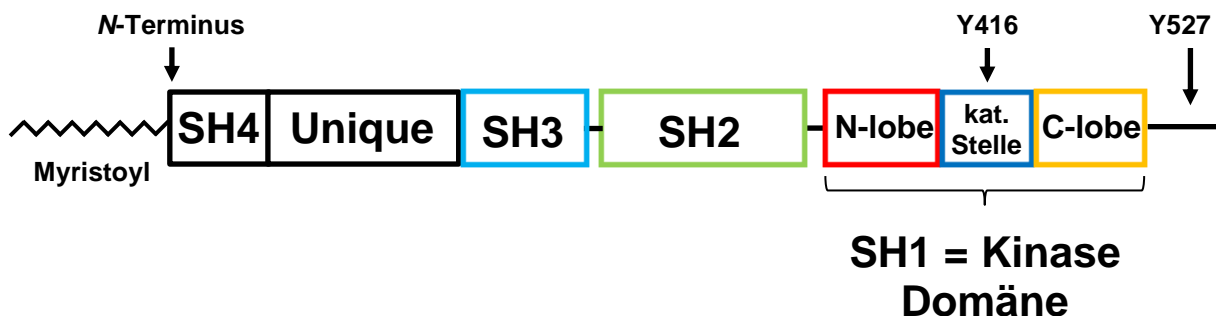


Abb. 2.1. Struktureller Aufbau von Src.

Src wird durch c-Src Kinase (CSK)⁸ und CSK homologe Kinase (CHK)⁹ an Tyrosin (Y) 527 phosphoryliert und dadurch deaktiviert. Im inaktiven Zustand, interagiert der phosphorylierte Y527-Rest mit der SH2 Domäne, welche durch weitere Interaktion mit anderen Aminosäuren die inaktive Konformation stabilisiert (**Abb. 2.23**).^{10, 11, 12, 13} Die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Y527 geschieht unablässig, wobei das Gleichgewicht auf der Seite der Phosphorylierung und damit auf dem inaktiven Zustand liegt.¹⁴ Einer der Wege, um die Kinasedomäne zu aktivieren, ist die Dephosphorylierung von pY527 durch Phosphatasen z. B. Shp1/2¹⁵, CD45¹⁵, PTP1B¹⁶, PTP $\alpha/\epsilon/\lambda$ ¹⁶, Phosphatase α ¹⁷ und γ ¹⁸. Die Affinität des Carboxyterminus zu SH2 wird hierdurch herabgesetzt, die SH3- und SH2-Domänen

bewegen sich und öffnen die katalytische Domäne von SH1. Dies führt anschließend zur Autophosphorylierung von Y416 in der Kinasedomäne. Src kann weiterhin durch Interaktion der Y527-Bindestelle mit anderen Proteinen, z. B. PDGF-R (*Platlet-Derived Growth Factor-Rezeptor*)^{19, 20} und die Fokale-Adhäsions-Kinase (FAK)²¹, aktiviert werden. Als Beispiel können hier die Protein-Tyrosinkinase-Rezeptoren herangezogen werden, die nach Bindung eines Liganden Src aktivieren können. Ein anderer krankheitsrelevanter Aktivierungsmechanismus kann eine Überexpression sein, die Src überaktiviert und damit zu Dickdarm-, Magen-, Hals und Bauchspeicheldrüsenkrebs führen kann.^{22,23} Die oben erwähnten Aktivatorproteine z. T. Rezeptoren, geben externe Signale an Src weiter und Src kann diese durch Phosphorylierung anderer Proteine amplifizieren. Damit ist Src ein wichtiger Verstärker für zelluläre Signale. Die Aktivatorproteine können außerdem in einem Feedback-Mechanismus von Src beeinflusst werden, um damit einen Signalweg intrinsisch hochzuregulieren bzw. abzuschalten. Somit funktioniert Src auch als Schalter.²⁴ Die Substrate von Src sind wichtig für das Zellüberleben, Differenzierung, Proliferation, Angiogenese und Migration (**Abb. 2.2**).^{25, 26} Erwähnenswert sind dabei der PI3K/Akt-Signalweg²⁷ und der RAS/Raf/ERK-Signalweg.²⁸ Wie oben bereits angeführt, ist Src in vielen Tumorarten stark aktiviert, überexprimiert oder konstitutionell aktiv, d. h. durch genetische Mutationen ständig in der aktiven Konformation.²⁹ Dies führt zur Aktivierung einiger Signalwege die für z. B. die replikative Unsterblichkeit, unbegrenzt Zellwachstum und Angiogenese zuständig sind. Daraus folgt die Bildung von Krebs bzw. Metastasen.³⁰

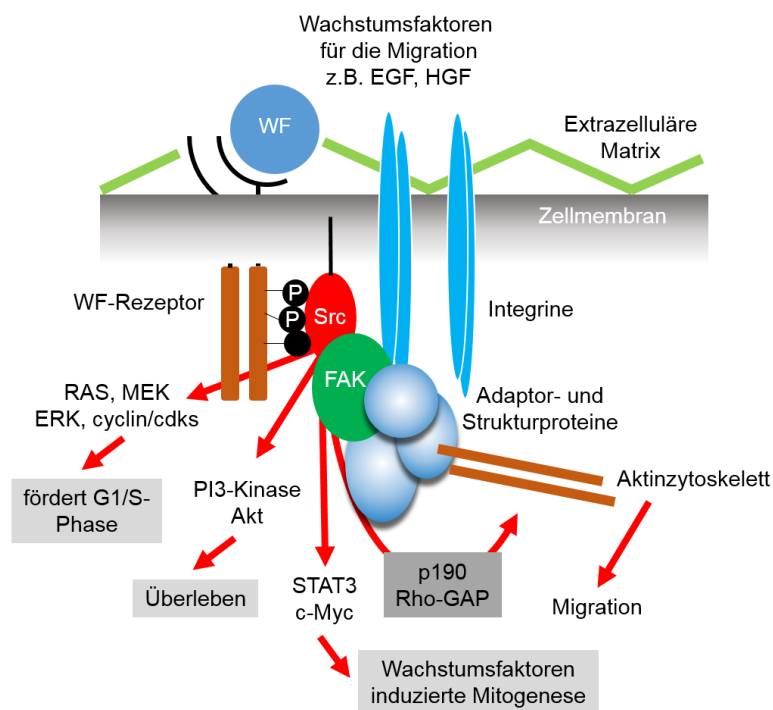


Abb. 2.2. Vereinfachtes Schema des Signalwegs von Src. Der Src-Signalweg führt zur Förderung der Zellteilung, Überleben und Migration.²⁶

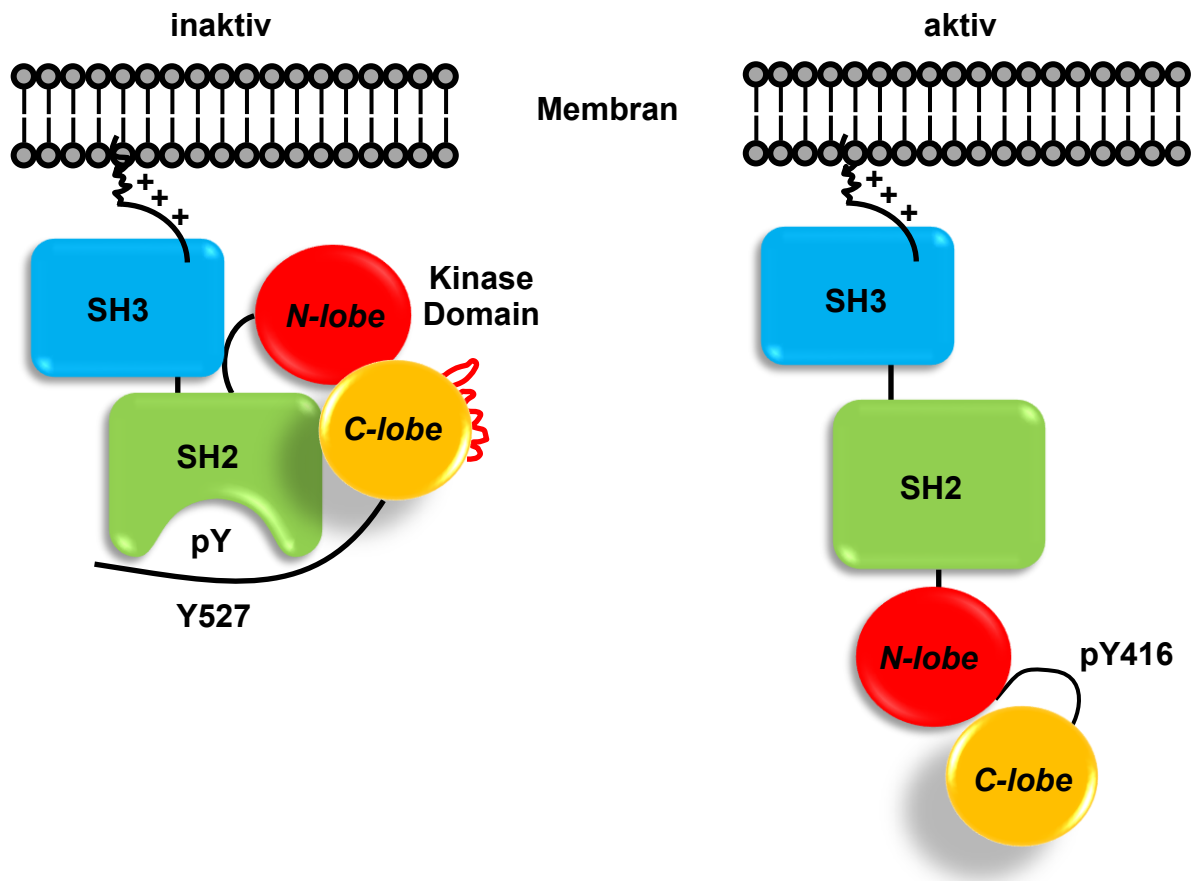


Abb. 2.3. Strukturelle Veränderung vor und nach der Aktivierung von Src. ²⁶

2.1.2 Die Modifikation von SFKs und deren Membranstabilisierung

Die Aufgabe von SFKs, speziell von Src ist stark abhängig von deren subzellulären Verteilung. ¹⁴ Dabei kann Src an der Plasmamembran, im Zytoplasma und im perinukleären Bereich sowie im Nukleus auftreten. An der Plasmamembran ³¹ ist Src an das Aktinzytoskelett, die fokale Adhäsionen und Adhäsionsverbindungen lokalisiert. ^{14, 32, 33, 34} Src besitzt hier die Funktionen eines Schalters und Verstärkers von wichtigen Zellsignalen (**Kapitel 2.1.1**). 30 – 40 % von Src ^{35, 36} befinden sich im Zytoplasma bzw. perinukleär, genauer in Endosomen, an Mikrotubuli, dem Golgi sowie in synaptischen Vesikeln. ^{14, 37, 36} Die angenommenen Funktionen hier sind Protein- und endosomaler Membrantransport sowie Regulierung des Zellzyklus. ¹⁴ Die Modulation der genannten Funktionen und die Lokalisation von Src geschehen nicht nur durch Phosphorylierung sondern ebenfalls durch Verankerung in der Membran. ^{14, 38} Die verankernde Einheit ist eine kotranslationale, kovalente *N*-terminale Myristoylierung von Src (Abb. 2.4 - Abb. 2.6). ^{39, 40} Die Lipidierung geschieht in mehreren Schritten. Zunächst wird das *N*-terminale Methionin kotranslational durch die Methioninpeptidase entfernt. ^{41, 42} Anschließend wird eine kovalente Peptidbindung von Acetyl-CoA-aktiviertem Myristat zum *N*-terminalen Glycin

geknüpft.⁴³ Dies geschieht durch das Enzym *N*-Myristoyltransferase. Diese Modifikation ist permanent und die Halbwertszeit des Myristoylrestes (Myr) entspricht der des Proteins.⁴³ Die Mutation des *N*-terminalen Glycins zeigt, dass ein Fehlen des Myristoylrestes die Src-Lokalisation verändert.³⁸ Dabei wird die Aktivität in Abwesenheit des Myristoylrestes *in cellulo* und *in vitro* gesenkt.³⁸ Neben der Lokalisation in der Membran, wo sich Src-regulierende Phosphatasen befinden, ist auch eine Autoregulation durch den Myr-Rest gezeigt.³⁸ Weiterhin wurde belegt, dass Src besonders während der Mitose in speziellen Bereichen von Membranen, den sog. *lipid-rafts*, durch den Myr-Rest lokalisiert ist, um aktiviert zu werden.⁴⁴ Diese lokalisationabhängige Aktivierung macht es attraktiv, Src aus Sicht der Myr-Seite zu studieren. Die Myristoylierung ist zwar notwendig aber nicht genug um SFKs in der Membran zu verankern.⁴⁵ Src hat zudem eine polybasische Aminosäureabfolge am *N*-Terminus, die aus jeweils drei Lysinen und Argininen besteht. Diese positiv geladenen Aminosäuren können mit Phosphatresten der Phospholipide, die anionischen Charakter haben, partiell ionische Bindungen eingehen und so das Protein an Membranen fixieren.⁴⁶

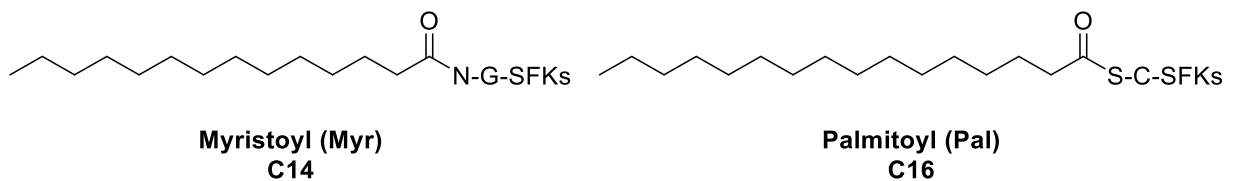


Abb. 2.4. Verschiedene Lipidierungen der SFKs. *N*-Myristoylierung (Myr) der SFKs und Src und *S*-Palmitoylierung (Pal) der SFKs.^{42, 38, 47} G: Glycin; C: Cystein.

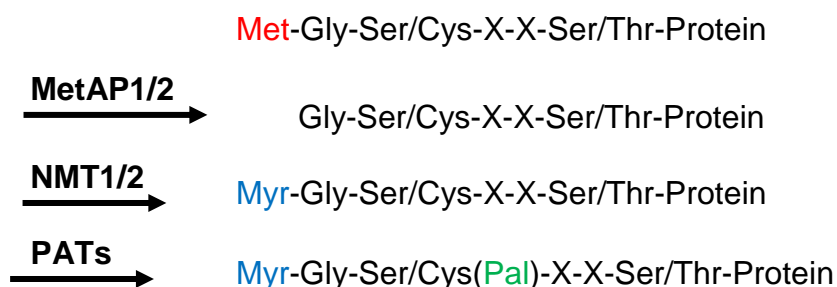


Abb. 2.5. Lipidierung von SFKs.^{42, 38, 47} Das *N*-terminale Methionin der SFKs und anderer Proteine mit einer Met-Gly-X-X-Ser/Thr-Box werden zunächst kotranslational durch die Methioninpeptidasen MetAP1/2 abgespalten. Anschließend wird kotranslational ein Myristoylrest kovalent über eine Peptidbindung durch eine *N*-Myristoyltransferase (NMT1/2) und Myr-CoA angebracht. Im Falle anderer SFKs wird anschließend posttranslational ein Palmitatrest durch Palmitoyltransferasen (PATs) an Cystein 3, 5 oder 6 angefügt.

Die restlichen SFKs haben statt einer polybasischen Aminosäureabfolge eine posttranslationale Modifikation, die die Proteine an der Plasmamembran halten. Hier wird durch einen Thioester an einem Cystein (Cys3, 5 oder 6) ein Palmitoylrest angebracht. ^{43, 48, 49, 50, 51, 52}

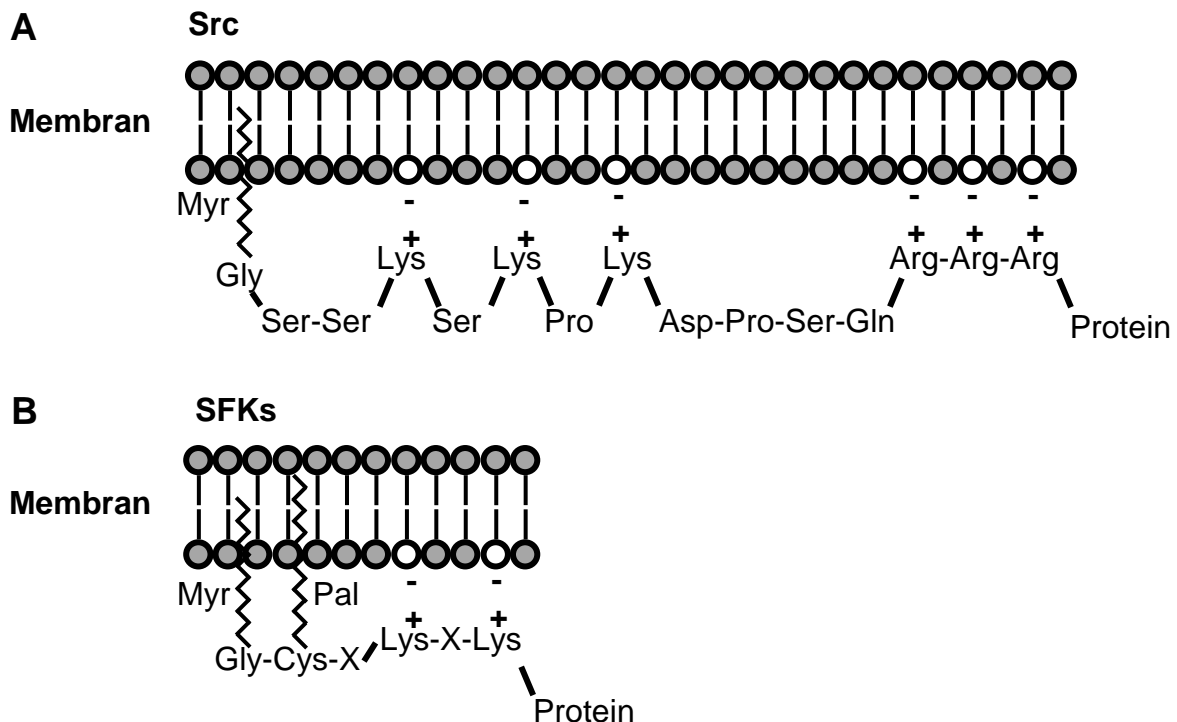


Abb. 2.6. Verankerung von SFKs in Membranen. ⁴³ **A:** Src ist durch einen Myristoylrest und polybasische Aminosäuren (drei Lysine und drei Arginine) in Membranen verankert. **B:** SFKs sind durch einen Myristoyl- sowie einem Palmitoylrest verankert.

2.1.3 UNC119a/b und ARL2/3

Es ist bekannt, dass das Protein UNC119 (engl. *uncoordinated protein 119*) an Myristoyl- aber auch an Laurylreste anderer Proteine binden kann und damit ein Chaperon darstellt. ⁵³ UNC119, ein 27-kDa großes Protein, das in den Isoformen a und b auftritt, wurde als wichtiger Bestandteil des Sehens und Riechens, genauer des Transports von α -Transducin in Zilien, in *C. elegans* entdeckt. Es ist strukturell konserviert in verschiedenen Spezies vorhanden. ^{54, 55, 56} Dabei sind seine beiden Isoformen zu etwa 60 % im Menschen identisch (Alignment: Blosum62, **Abb. 2.8**) ^{57, 58} Das humane UNC119a ist auch als *human retinal protein 4* (HRG4) bekannt. Die Struktur von UNC119 (**Abb. 2.7**) erinnert an ein Fass, dessen innere Oberfläche hydrophob ist und damit gut Fettsäuren binden kann.

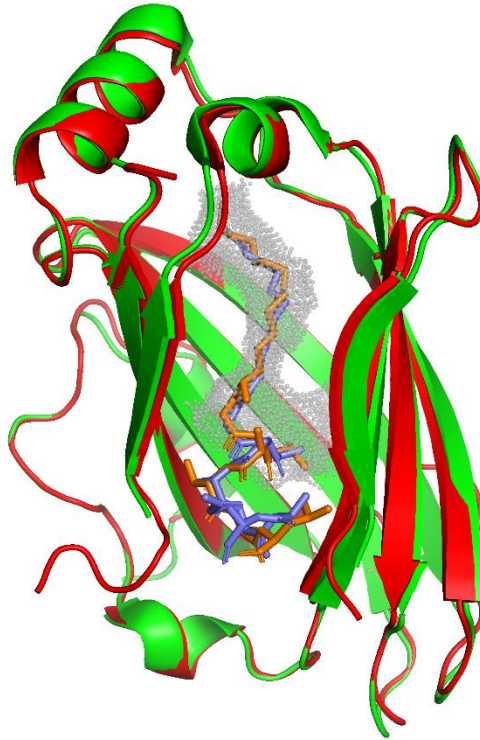


Abb. 2.7. Übereinanderlegen der Kristallstrukturen von UNC119a mit Lau- und Myr-Peptid.^{59, 60} UNC119a mit Lau-Transducin- α -Peptid (rot, PDB: 3RBQ), UNC119a mit Myr-NPHP3-Peptid (PDB: 5L7K, grün), hydrophobe Bindetasche (grau). Alignment durch PyMOL 2.0.

UNC119A	1	-----PC-PT--
UNC119B	1	MSGSNPKAAAAASAAGPGGLVAGKEEKKKAGGGVLNRLKARRQAPHHAADDGV-GAAVTE
UNC119A	5	QR--K-OPIGPEDVLGLORITGDYLCSPENIYKIDFVRFKIRDMSGTVLFEIKKPPVS
UNC119B	60	QELLALDTIRPEHVLRLSRVTENYLCKPEDNIYSIDFTRFKIRDLETGTVLFEIAKPCVS
UNC119A	62	--ERLPINRR--DIDENAGRFVRYQFTPAFLRLRQVGATVEFTVGDKPVNFRMIERHY
UNC119B	120	DQEE-D-EEEGGDVDISAGRFVRYQFTPAFLRLRTVGATVEFTVGDKPVSNFRMIERHY
UNC119A	117	FRNQLLKSFDHFHFGFCIPSSKNTCEHIYDFPPLSEELISEMIRHPYETQSDSFYFVDDRL
UNC119B	178	FREHLLKNFDFDFGFCIPSSRNTCEHIYDFPQLSEDVIRLMIENPYETRSDSFYFVDNRL
UNC119A	177	VMHNKADYSYS-GTP
UNC119B	238	IMHNKADYAYNGG--

Abb. 2.8. Sequenzalignment von UNC119a/b. Das Sequenzalignment wurde mit Hilfe von Blosum62 durchgeführt.⁵⁸ **Schwarz:** identische Aminosäurereste. **Grau:** konservierte Mutationen. **Weiß:** keine Übereinstimmung.

Neben der Bindung von myristoylierten und lauroylierten Proteinen wurden auch ARL2/3 als Interaktionspartner identifiziert. ⁶¹ ARL steht für *ARF-like proteins*. ARLs sind kleine GTPasen, die durch die Bindung von GTP ihre Konformation ändern können. Die Funktionsweise von ARL2/3 ist in **Abb. 2.9** beschreiben.

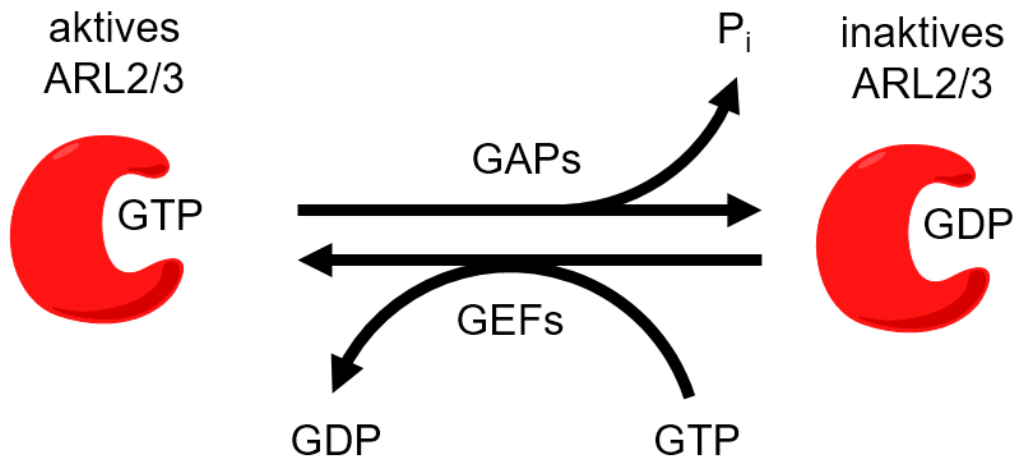


Abb. 2.9. Funktionsweise der kleinen GTPasen ARL2/3. Aktives, GTP-bindendes ARL2/3 hydrolysiert GTP mit Hilfe von GTPase-aktivierenden Proteinen (GAPs; für ARL2: ELMOD2 ⁶², für ARL3: RP2 ⁶³), wobei ein Pyrophosphat frei wird und ARL2/3 anschließend in der inaktiven, GDP-bindenden Form vorliegt. Um ARL2/3 zu aktivieren, muss GDP mit GTP durch Guanidin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEFs; für ARL2: unbekannt; ARL3: ARL13 ⁶⁴) ausgetauscht werden.

Wenn ARL2/3 im inaktiven Zustand durch ein β -Faltblatt an UNC119 bindet (**Abb. 2.10**), kann durch den Guaninnukleotid-Austausch von GDP zu GTP eine Konformationsänderung von ARL2/3 eintreten. Dabei wird eine Konformation von UNC119 durch ARL2/3 stabilisiert, bei der die Affinität von UNC119 für den Lipidrest, der in UNC119 sitzt, erniedrigt ist. ⁶⁵ Speziell dieser Prozess kann lokalisationsabhängig nur durch ARL3 durchgeführt werden. ⁶⁶ Da die Hydrolyse von GTP zu GDP bzw. der Austausch von GDP zu GTP in ARL2 energiegetrieben ist, kann UNC119 nicht nur an SFKs binden, sondern diese auch energetisch getrieben in verschiedenen Zellmembranen lokalisieren. ⁶⁷

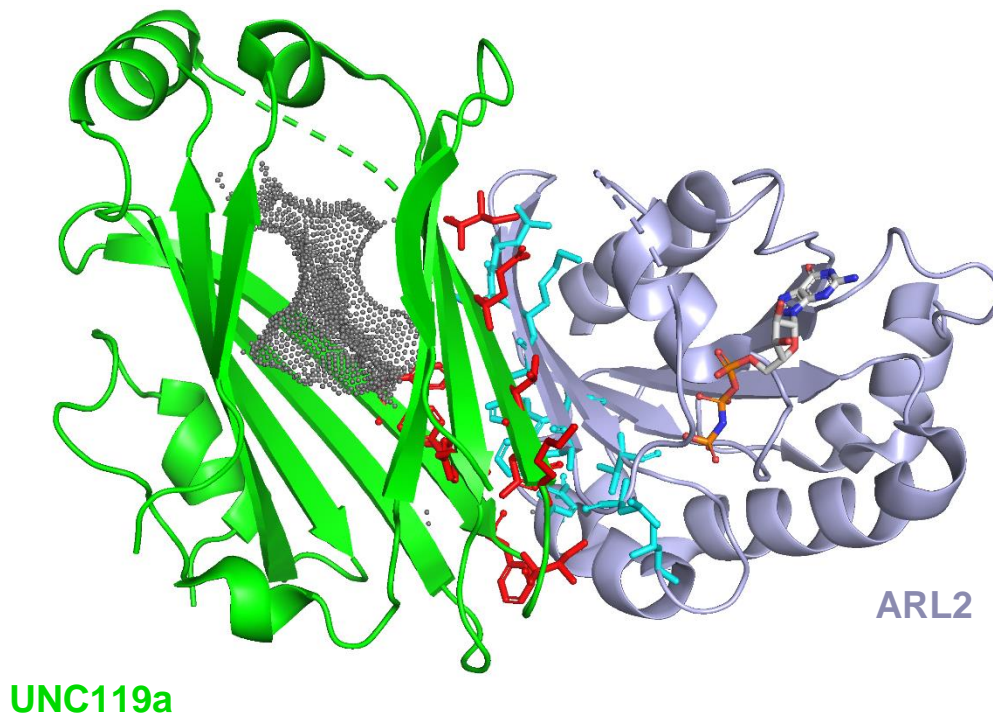
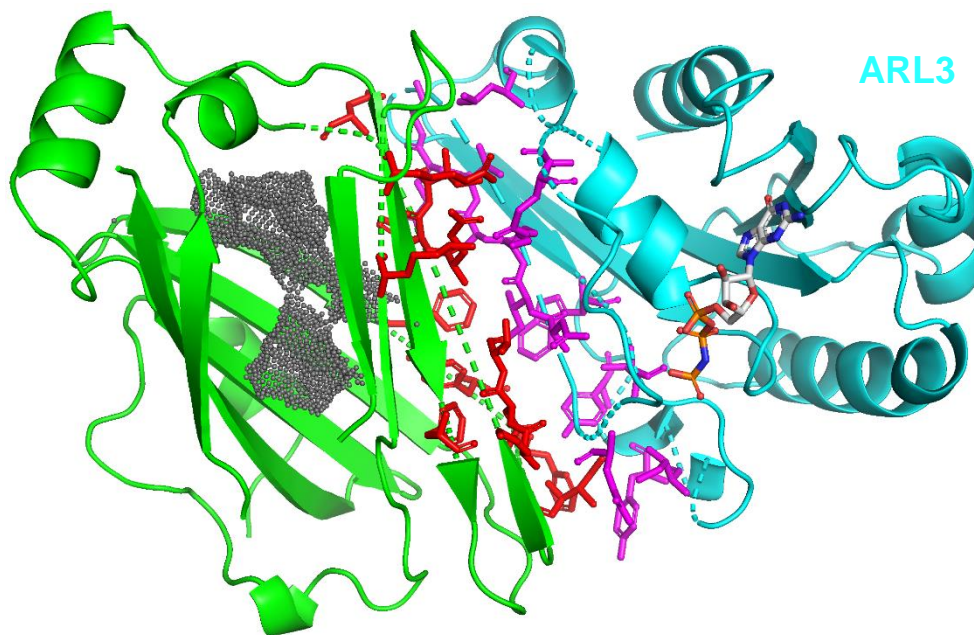
A**B**

Abb. 2.10. Strukturen von ARL2/3 in Komplex mit UNC119a.⁶⁵ **A:** UNC119 (grün)-ARL2 (lila)-Interaktion (PDB: 4GOK), **B:** UNC119 (grün)-ARL3 (cyan)-Interaktion (PDB: 4GOJ). Die an der Protein-Protein-Interaktion beteiligten Aminosäurereste sind in rot (UNC119), cyan (ARL2, **A**) bzw. magenta (ARL3, **B**) gefärbt.⁶⁵ In ARL2/3 ist Phosphoaminophosphatsäureguanylatester als nicht hydrolysierbares GTP-Analog als Cofaktor gebunden. In grau ist die hydrophobe Bindetasche von UNC119a zu sehen.

2.1.4 Transport von SFKs in Zellen⁶⁷

Der Transport von SFKs durch UNC119 ist in **Abb. 2.11** schematisch dargestellt. Nachdem SFKs in der Plasmamembran verankert wurden, können diese entropiegetrieben die Plasmamembran verlassen und durch Diffusion wieder an Endomembranen haften. Weiterhin muss zwischen Src und palmitoylierten SFKs unterschieden werden. Speziell Fyn als Vertreter der SFKs wurde für diesen Prozess untersucht. Src hat eine polybasische *N*-terminale Aminosäureabfolge, wodurch Myr-Src ohne zusätzliche posttranslationale Modifikationen in Membranen fester verankert werden kann. Dies erlaubt eine langsamere Dissoziation von Membranen für Src als für nicht-palmitoyliertes Fyn, dafür aber ein schnelleres Verteilen von Myr-Src als pal-Fyn. Dieser Prozess wird durch UNC119 beschleunigt, da die Dissoziation von Src von Membran zu Membran entfällt und direkte, vereinfachte Diffusion stattfinden kann. Wenn mit Src beladenes UNC119 auf ARL2/3 trifft, kann letzteres energiegetrieben Src aus UNC119 durch die Hydrolyse von GTP freisetzen. Dabei endet das *N*-terminal positiv geladene Src im negativ geladenen, recyclingenden Endosom. Die Endosomen werden dann durch exozytotische Prozesse zur Plasmamembran transportiert. Fyn hingegen wird nicht durch recyclingende Endosome zurück an die Plasmamembran transportiert, da es an Endosomen weniger gut verankert wird. Stattdessen diffundiert Fyn von der Plasmamembran zu Endomembranen, wo der Palmitoylrest durch Acyl-proteinhioesterasen (APT1/2) entfernt werden kann. Das erlaubt erleichterte Diffusion von Membran zu Membran bis zum Zellinneren, welches eine geringere Fyn-Konzentration aufweist als die Zellperipherie. Daneben kann UNC119 Fyn binden und dieses, wie Src, erleichtert diffundieren lassen. Die typische Lokalisation von Fyn am Golgi-Apparat kommt dadurch zustande, dass Fyn durch Palmitoyl-Acyl-Transferasen (PATs), die im Golgi-Apparat sitzen, palmitoyliert und somit dort lokal verankert wird. Durch exozytotische Prozesse kann Fyn dann wieder an die Plasmamembran gebracht werden.

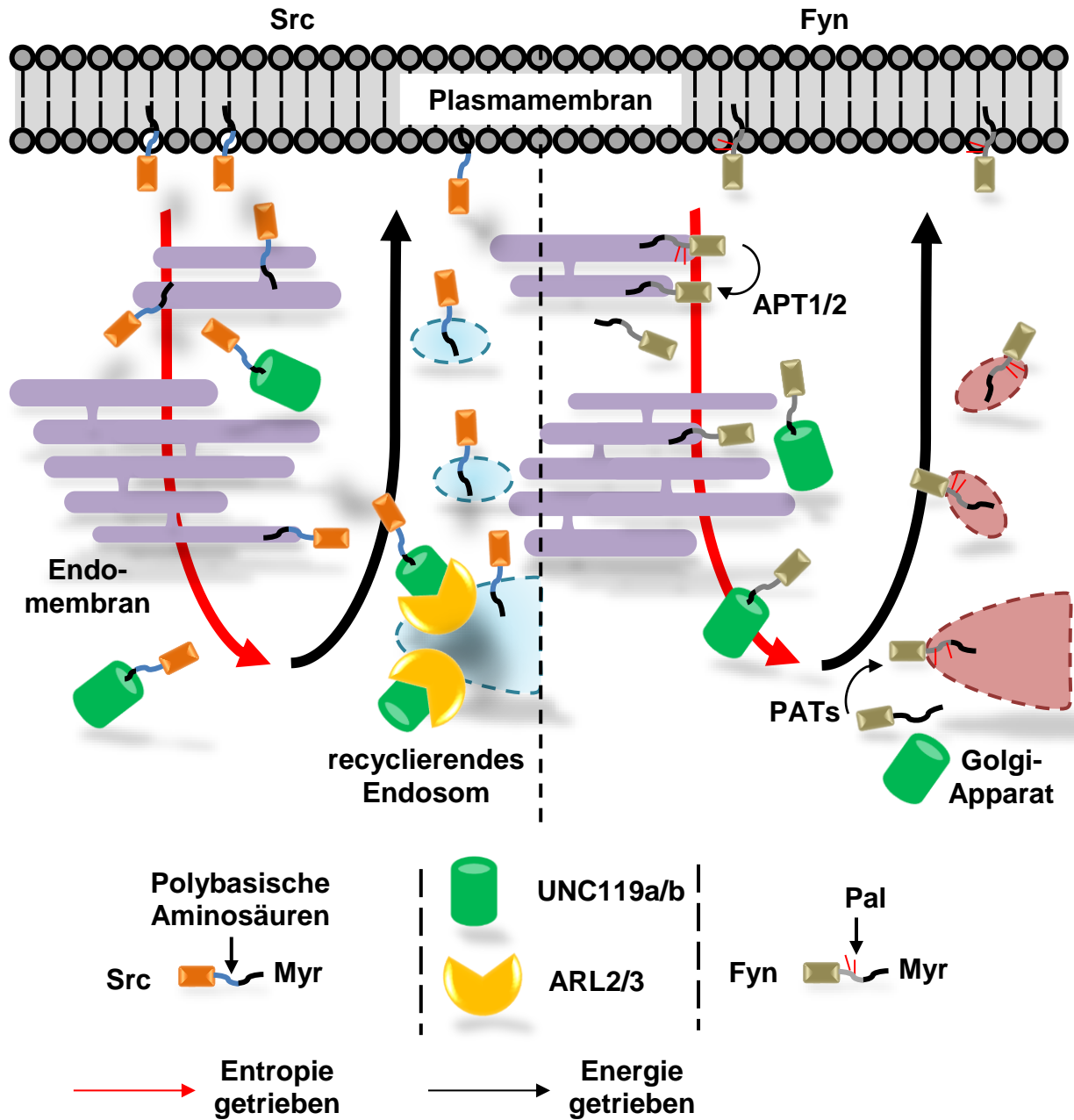


Abb. 2.11. Transport von Src und Fyn in der Zelle.⁶⁷

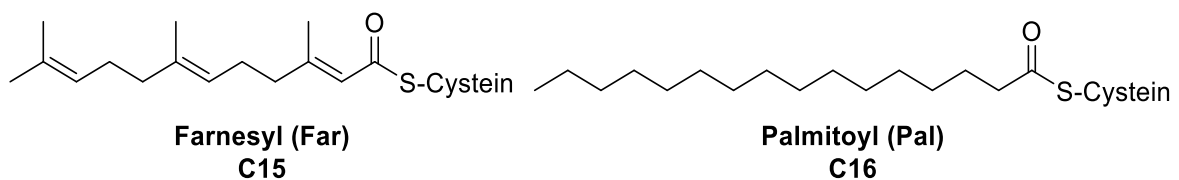


Abb. 2.12. Verschiedene Lipidierungen von RAS. S-Farnesylierung (Far) von allen HRAS, NRAS und KRAS4A/B und S-Palmitoylierung (Pal) von KRAS, NRAS und KRAS4A.

2.1.5 Die Rolle von KRAS in der Tumorentstehung

Neben den SFKs ist auch die RAS-Subfamilie in vielen Tumoren fehlreguliert. Dabei spielen mutierte Proteine der RAS-Subfamilie in ca. 20 % der Tumoren eine Rolle, wobei in manchen Tumorarten mutierte RAS-Proteine bis zu 90 % beteiligt sind.⁶⁸ Der Name RAS leitet sich vom Rattensarcom ab und zeigt durch diese Bezeichnung seine Rolle als mögliches Onkogen. Die Bezeichnung Protoonkogen beschreibt dabei meist Prot Die RAS-Subfamilie besteht aus N-, H- und KRAS, wobei KRAS in die Splicingformen KRAS4A und KRAS4B unterteilt wird. Diese Subfamilie gehört wie ARL2/3 zu den kleinen GTP-Pasen, die durch das Binden von GTP (aktive Konformation) und GDP (inaktive Konformation) sowie deren Austauschfaktoren reguliert werden.⁶⁹ In der aktiven Form dienen sie, ähnlich den SFKs, als Schalter bzw. Verstärker für wichtige zelluläre Prozesse wie Zellüberleben, Differenzierung, Zelladhäsion, Apoptose und Zellmigration. Diese Funktionen werden unter anderem durch den MAP-Kinasesignalweg und PI3K-AKT-Signalweg ausgeführt.⁷⁰ Dabei können Mutationen wie KRAS G12D bzw. Q61K konstitutiv aktive Formen hervorbringen.^{71, 72, 73} Diese wiederum haben eine ständige (Über-)Aktivierung der oben genannten Prozesse zur Folge, die schließlich zu Krebs führen können.^{74, 75} Mutation von KRAS in Bauchspeicheldrüsen-, Dickdarm-, Knochen- und Lungengewebe werden zusätzlich mit einem schlechten Verlauf und einer schlechten Prognose einer Krebserkrankung in Verbindung gebracht.^{76, 77, 78} Neben der Funktion als Schalter und Protoonkogen teilen die SFKs und die RAS-Familie auch ein ähnliches Lipidierungsmuster.⁷⁹ Im Gegensatz zu den SFKs sind alle RAS-Subfamilienmitglieder C-terminal farnesyliert (**Abb. 2.12**).⁴³ Da die Aktivität der RAS-Familie abhängig von deren Lokalisation an der Membran ist,⁸⁰ aber eine Lipidgruppe nicht für die Membranverankerung ausreicht,⁸¹ sind H-, NRAS und KRAS4B zusätzlich an einem Cystein palmitoyliert (**Abb. 2.12** und **Abb. 2.13**).⁸¹ KRAS4A hingegen hat, ähnlich zum N-Terminus von Src, statt einem zusätzlichen Palmitoylrest, positiv geladene Lysinreste am C-Terminus, die an teilweise negativ geladene Phospholipide binden können und so das Protein an der Membran verankern (**Abb. 2.13**). Alle diese Modifikationen werden im Gegensatz zu SFKs posttranslational hinzugefügt.⁸²

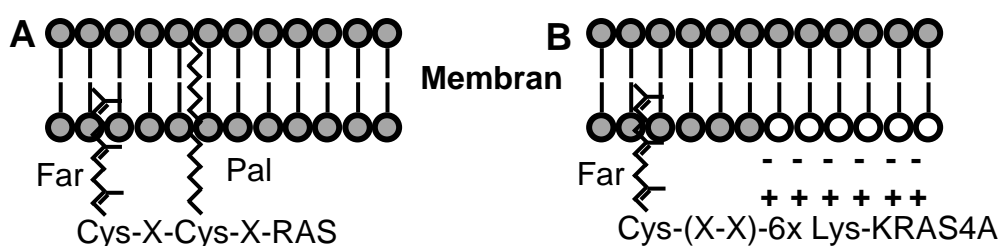


Abb. 2.13. Verankerung von RAS in Membranen.⁸³ **A:** Verankerung der RAS-Subfamilie mit Ausnahme von KRAS4A. **B:** Verankerung von KRAS4A.

2.1.6 PDE δ und seine Interaktion mit lipidierten RAS-Proteinen

PDE δ ist ein Chaperon für farnesylierte und geranylgeranierte Proteinen wie z. B. die im **Kapitel 2.1.5** beschriebenen RAS-Proteine.⁸⁴ Diese werden, ähnlich wie SFKs durch UNC119, durch PDE δ transportiert. Neben der Analogie in der Funktion von PDE δ und UNC119a/b ist auch eine Ähnlichkeit in der Struktur auffällig (**Abb. 2.14 A**). UNC119a und PDE δ weisen zudem eine Ähnlichkeit bzw. Homologie in der Proteinsequenz mit 30 % bzw. 20 % (Alignment: Blosum62, **Abb. 2.15**) auf.⁵⁸ In der Tertiärstruktur besitzen beide Proteine eine fassähnliche Struktur mit einem hydrophoben Inneren. Im Falle der RAS-Proteine binden hier die prenylierten Proteine.

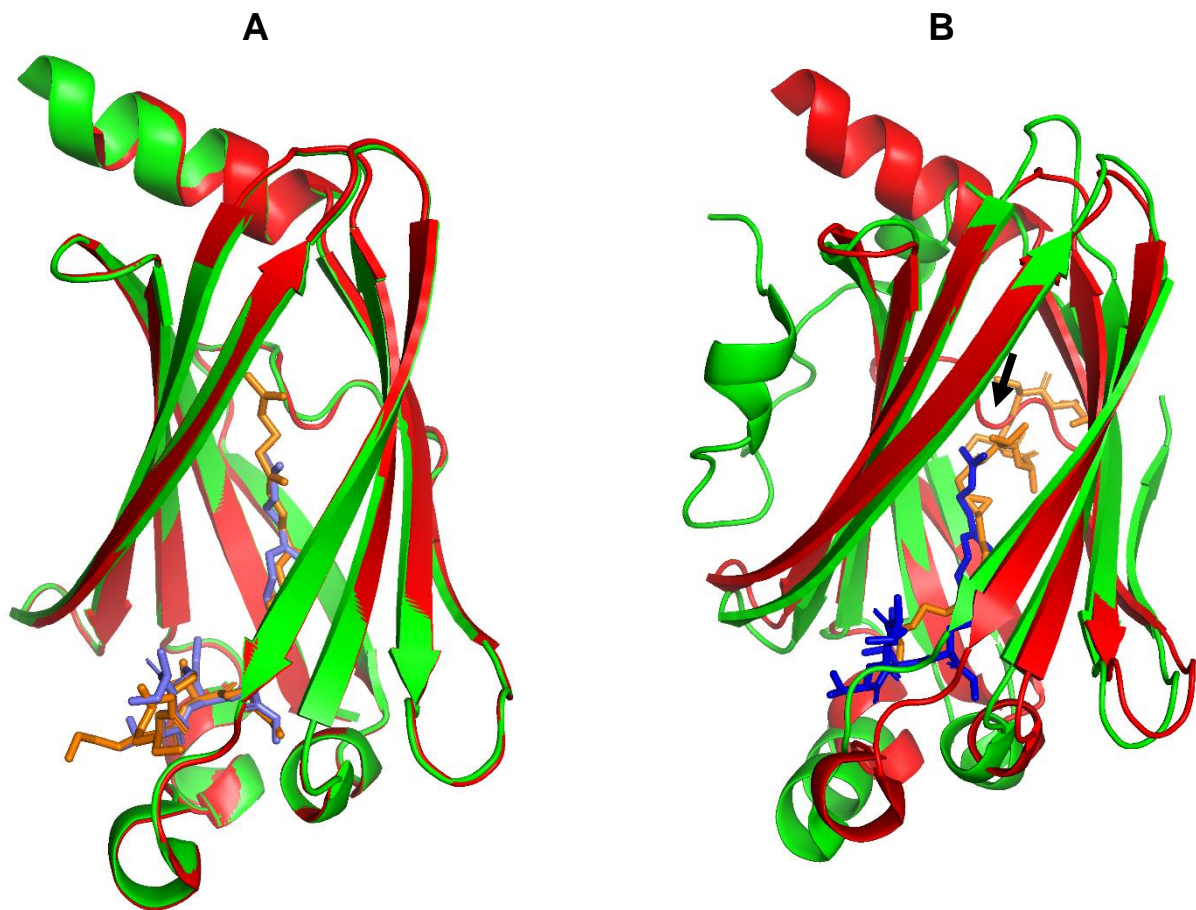


Abb. 2.14. Übereinanderlegen der PDE δ -Strukturen mit GerGer- und Far-Peptid (A).^{85, 86} PDE δ (rot) mit Far-INPP5E-Peptid (blau, PDB: 5F2U) und PDE δ (grün) mit Geranylgeranyl-PDE6C-Peptid (orange, PDB: 5E8F). Übereinanderlegen von PDE δ mit UNC119a (B).^{85, 60} PDE δ mit Far-INPP5E-Peptid (rot, PDB: 5F2U), UNC119a mit Myr-NPHP3-Peptid (grün, PDB: 5L7K), Far-INPP5E-Peptid (blau), Myr-NPHP3-Peptid (orange). Gleiche Ansicht von PDE δ in beiden Bildern, schwarzer Pfeil zeigt flexible Schleife (rot) an. Alignment durch PyMOL 2.0.

Bei dem Übereinanderlegen beider Strukturen (**Abb. 2.14 B**) ergeben sich Unterschiede im *N*-Terminus. UNC119 weist eine flexible Kette auf, wohingegen PDE δ eine α -Helix besitzt. Ein weiterer Unterschied ist eine Schleife (engl. *loop*; **Abb. 2.14 B**, schwarzer Pfeil), der sich im Falle von UNC119 als flexibler herausstellt und wegen seiner Flexibilität nicht korrekt kristallisiert werden kann. Zudem kann bei der Überlagerung der Proteine festgestellt werden, dass die Lipidreste zwar auf derselben Geraden liegen, die Peptide aber entgegengesetzt aus den Proteinen ragen. Dies wird auf die flexible Schleife von UNC119 zurückgeführt. Ebenso wie bei UNC119a kann ARL2/3 an PDE δ binden und durch eine energiegetriebene Konformationsänderung die Affinität des Binders der Bindetasche von PDE δ verringern (**Abb. 2.16**).⁸⁷ Damit ergibt sich, ähnlich wie bei UNC119a, eine energiegetriebene Lokalisation von RAS-Proteinen in der Zelle.⁸⁸

```

UNC119-PDEdelta
UNC119A      1  PGPLQQRKQPIGPEDVVLGLQRITGDYI C S P H E N I Y K I D F V R - F K - - - - - I R D M S G T V L H E
PDEdelta    1  - - - - - M S A K D E R A - R - E I I R G F K L N W M N I R D A E T G K I L W Q

UNC119A     55  I K K P P V S E R L P I N R R D L D - P N A G R F V R Y Q F - T P - A F L R L R Q V G A T V E E - - T V G L K P V N N F
PDEdelta    34  - G - - - - T E - - - - - D L S V P - - G - - V E H E A R V P K K I L K C K A V S R E L N F S S T - - E Q - M E K F

UNC119A     110 R M I E R H - Y F R N Q L L K S - F D F H F G F C I P S S K N T C E H I Y D F P P L S E E L I - S E M I R - H P - Y E T
PDEdelta    75  R L - E Q K V Y F K G Q C L E E W F - F E F G E V I E N S T N T W Q S I I E A A P E S Q - M M P A S V L T G N V I I E T

UNC119A     165  Q S D S F Y F V D D R L V M H N K A D - Y S Y - S G T P
PDEdelta    132  K - - - - F - F D D D L L V S T S R V R L E - Y V - - - -

```

Abb. 2.15. Strukturalignment von UNC119a und PDE δ .⁵⁸ Das Sequenzalignment wurde mit Hilfe von Blosom62 durchgeführt. **Schwarz:** identische Aminosäurereste. **Grau:** konservierte Mutationen. **Weiß:** keine Übereinstimmung.

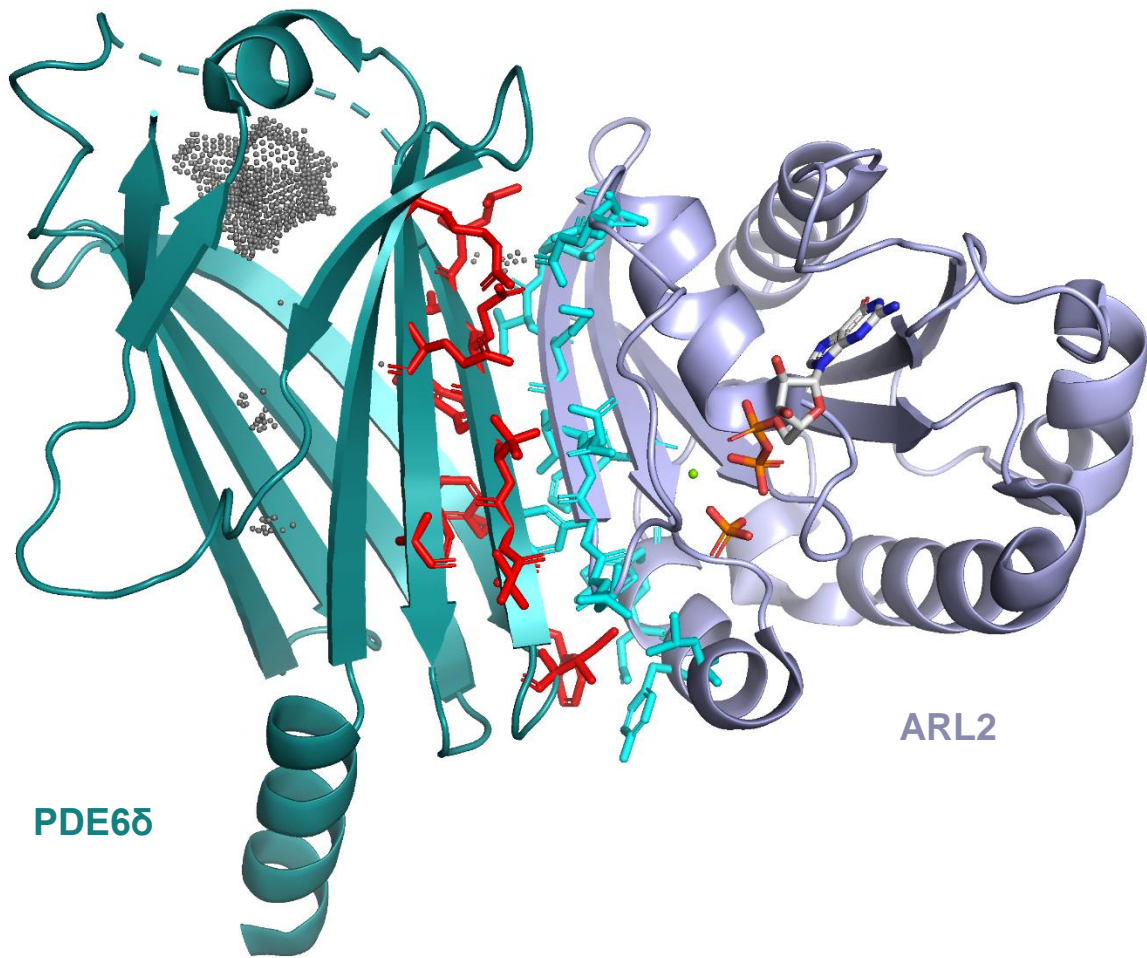


Abb. 2.16. Struktur von ARL2 im Komplex mit PDE δ (PDB: 1KSH).⁸⁹ PDE δ (grün), ARL2 (lila). Die an der Interaktion beteiligten Aminosäurereste sind in rot (PDE δ) bzw. cyan (ARL2) gefärbt. In ARL2 ist GDP, Pyrophosphat und Mg²⁺ als Cofaktor gebunden. In grau ist die hydrophobe Bindetasche von PDE δ zu sehen.

2.1.7 Direkte Src-Inhibitoren

Seit der Entdeckung der SFKs als Protoonkogene, also als Genprodukte, die durch Mutation ein onkogenes Potential haben, waren diese attraktiv für die Behandlung von Krebs bzw. für die Erforschung des Einflusses von SFKs auf eine Krebserkrankung. Zu den ersten vielversprechenden und oft eingesetzten Inhibitoren von SFKs gehören PP1 und PP2 (Abb. 2.17).⁹⁰ Wie viele Inhibitoren von Kinasen, bindet PP1 bzw. PP2 in der ATP-Bindestelle. Zwar inhibieren diese nicht effizient die EGFR Kinase, JAK2 oder ZAP-70, dennoch zeigen sie den Nachteil fehlender Selektivität für die jeweiligen SFKs.⁹⁰ Auch eine 2. Generation dieser Inhibitoren (KB SRC 4), die mehr als 20 Jahre später von Brandvold *et al.*⁹¹ entwickelt wurde, hat keinen bedeutenden Selektivitätsgewinn erfahren. Der Vorteil dieser Pan-SFK-Inhibitoren liegt darin, dass ein Src-Gen-*Knockout* zu keinem reduzierten Wachstum von Krebszellen führt. Außerdem ergeben sich durch fehlende Selektivität Nebeneffekte wie Toxizität bzw. entgegengesetzte Feedbackmechanismen der verschiedenen Proteine, die inhibiert werden.^{24,}

92

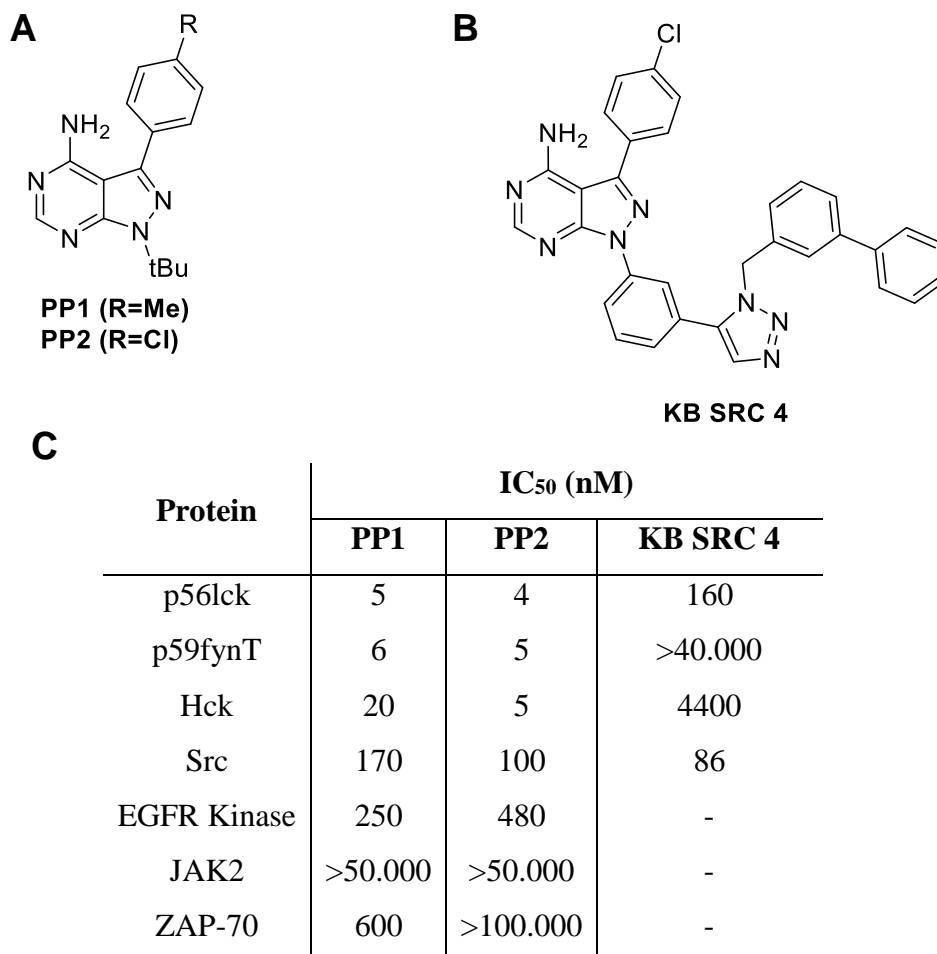


Abb. 2.17. Direkte Src-Inhibitoren sowie deren IC₅₀-Werte.^{90, 91} Die direkten Src-Inhibitoren PP1/PP2 (A) sowie die Weiterentwicklung dieser (B). IC₅₀-Werte für die Inhibitoren ausgewählter Kinasen (C).

Darüber hinaus wurden andere Pan-Src-Inhibitoren wie SU6656, Saracatinib, Bosutinib und Dasatinib für den klinischen Einsatz entwickelt. Einige davon sind in der klinischen Phase 2 oder bereits zugelassen und zeigen durch die fehlende Selektivität starke Nebenwirkungen. Sie sind aber durch ihre Effektivität besonders in Kombination mit anderen Medikamenten sehr nützlich und effektiv in der Behandlung von soliden Tumoren oder kolorektalen Karzinomen.
93, 94, 95

2.1.8 Lipidomimetika

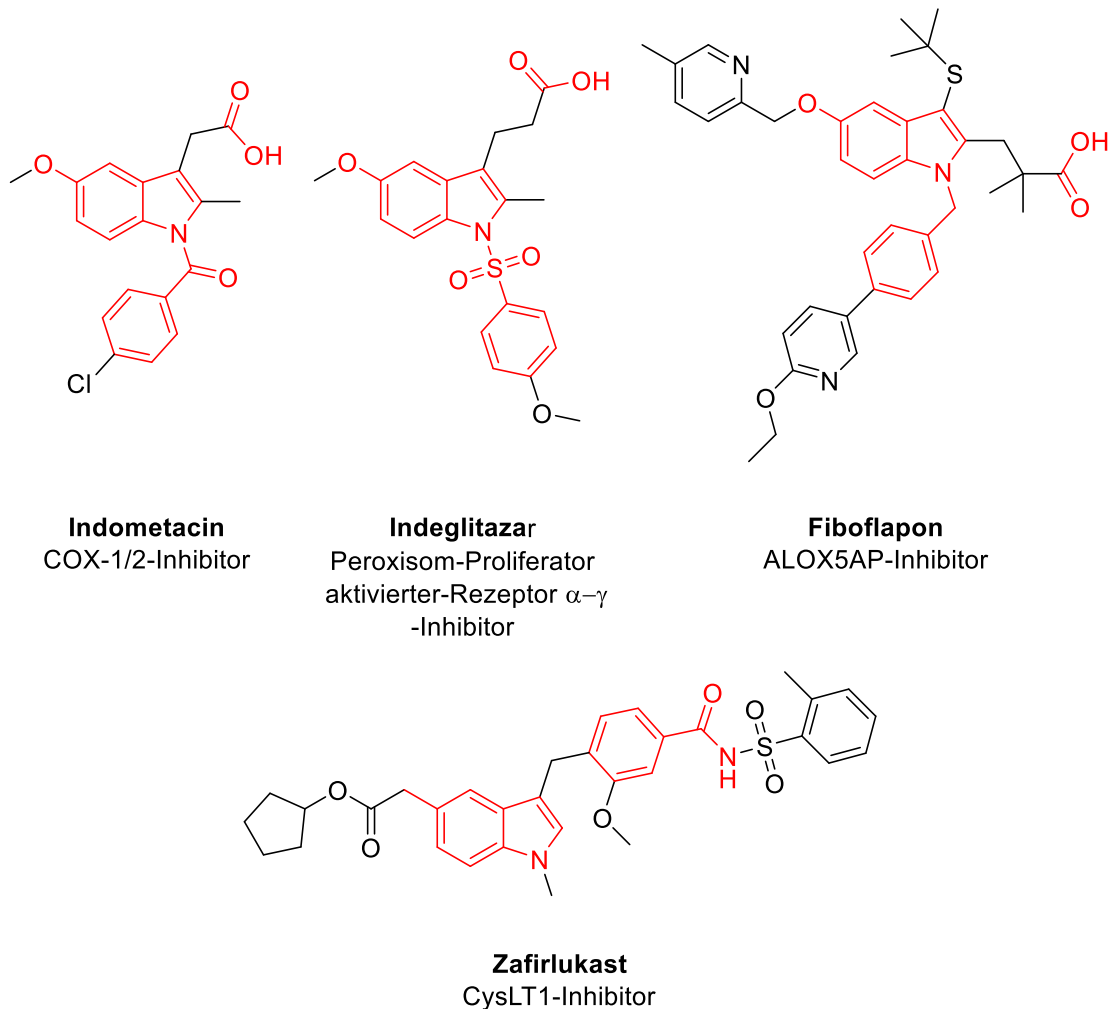


Abb. 2.18. Strukturen verschiedener Lipidomimetika und ihre Funktion. In rot sind privilegierte Strukturen der Lipidomimetika bzw. deren Derivate der Lipidomimetika nach Proschak *et al.* gezeigt.⁹⁶

Neben den direkten Src-Inhibitoren, können auch Stoffe, die die Lokalisation von SFKs in der Membran stören von Interesse sein. Ein Zielprotein wäre hierbei UNC119, das durch sog. Lipidomimetika inhibiert werden kann. Lipidomimetika sind Stoffe, die Lipide nachahmen sollen und diese z. B. in krankheitsrelevanten Proteinen meist als Liganden ersetzen. Eine bekannte Proteinklasse sind Kernrezeptoren, z. B. Peroxisom-Proliferator-aktivierte-

Rezeptoren. Diese Kernrezeptoren benötigen Fettsäuren als Aktivatoren für die Transkription von Proteinen für den Metabolismus von Fettsäuren und Zuckern. Damit sind diese Kernrezeptoren essentiell für wichtige Funktionen der Zelle wie Fettsäurestoffwechsel, Proliferation und Differenzierung.⁹⁶ Ein anderes Feld ist die Inhibition von Enzymen, die Fettsäuren metabolisieren. Bekannte Vertreter sind die Cyclooxygenasen 1/2 (COX-1/2) und Lipooxygenasen, die bei der Behandlung von Entzündungen und Schmerzen eine wichtige Rolle spielen.⁹⁶ Experimentelle und zugelassene Substanzen für die genannten Felder sind in **Abb. 2.18** zu sehen. Repräsentativ in rot ist zudem in **Abb. 2.18** zu erkennen, dass der Grundstruktur vieler Lipidomimetika eine Indolgruppe zugrunde liegt, die zudem oft linear angeordnet ist und entweder eine Carboxylgruppe oder ein Isooster davon besitzt. Dies kann auf den entsprechenden endogenen Liganden zurückzuführen sein, da Fettsäuren linear sind und eine Carboxylgruppe besitzen.⁹⁶ Zusätzlich wird hier deutlich, dass oft aromatische Substrukturen vorhanden sind, die entferntere, hydrophobe Stellen der Bindungstasche ausfüllen können.⁹⁶

Trotz der vielversprechenden Einsatzmöglichkeiten der Lipidomimetika ergeben sich einige Schwierigkeiten. Bei der Entwicklung neuer Lipidomimetika muss zunächst auf die Löslichkeit geachtet werden. Da die Mimetika in hydrophoben Taschen binden, müssen die Moleküle dementsprechend auch einen hydrophoben Teil besitzen. Das macht die Substanzen stark hydrophob und deshalb meist schwer löslich. Ein weiteres Problem liegt in der Selektivität: Freie Fettsäuren können an verschiedene Proteine binden. Bei der Entwicklung von Inhibitoren ist hier die Schwierigkeit, selektiv verschiedene andere Teile wie z. B. Aminosäuren am Eingang der Bindetasche so auszunutzen, dass gezielt nur an ein Protein gebunden werden kann. Umgekehrt ergibt sich in manchen Fällen der Vorteil, dass ein Pan-Inhibitor gleichzeitig verschiedene Proteine aus derselben Familie blockieren kann. Dies könnte einen größeren biologischen Effekt erzielen. Die gezielte Selektivität kann neben dem Adressieren der Bindetasche auch ein entropisch/thermodynamischer Effekt sein. Durch ein thermodynamisches Gleichgewicht von Inhibitor/Ligand/Protein kann dabei die kompetitive Dissoziation des endogenen Liganden für das Zielprotein besser sein als für unerwünschte Proteine. Somit kann eine Selektivität des Inhibitors in Bezug auf das Zielprotein erreicht werden. Eine Gruppe von Lipidomimetika ist vor kurzem für PDE δ beschrieben worden.^{84, 97, 98} Ähnlich wie die vorher beschriebenen Inhibitoren sind diese meist hydrophob und sitzen tief in der Bindetasche. Dies wird bildlich durch die Kristallstruktur von Deltasonamid 1 mit PDE δ verdeutlicht (**Abb. 2.19 A**). Durch Inhibition des Chaperons konnte ein Effekt auf die Lokalisation von KRAS gezeigt werden, der sich auch in Zellen durch selektive Toxizität in

RAS-abhängigen Krebszellen, meist aus Bauchspeicheldrüsentumoren auszeichnet. Da die UNC119-SFKs-Interaktion eine hohe Analogie zur PDE δ -RAS-Interaktion besitzt, könnte eine Entwicklung und Anwendung von Lipidomimetika für UNC119 in Bezug auf Myr-SFKs von großem Interesse sein.

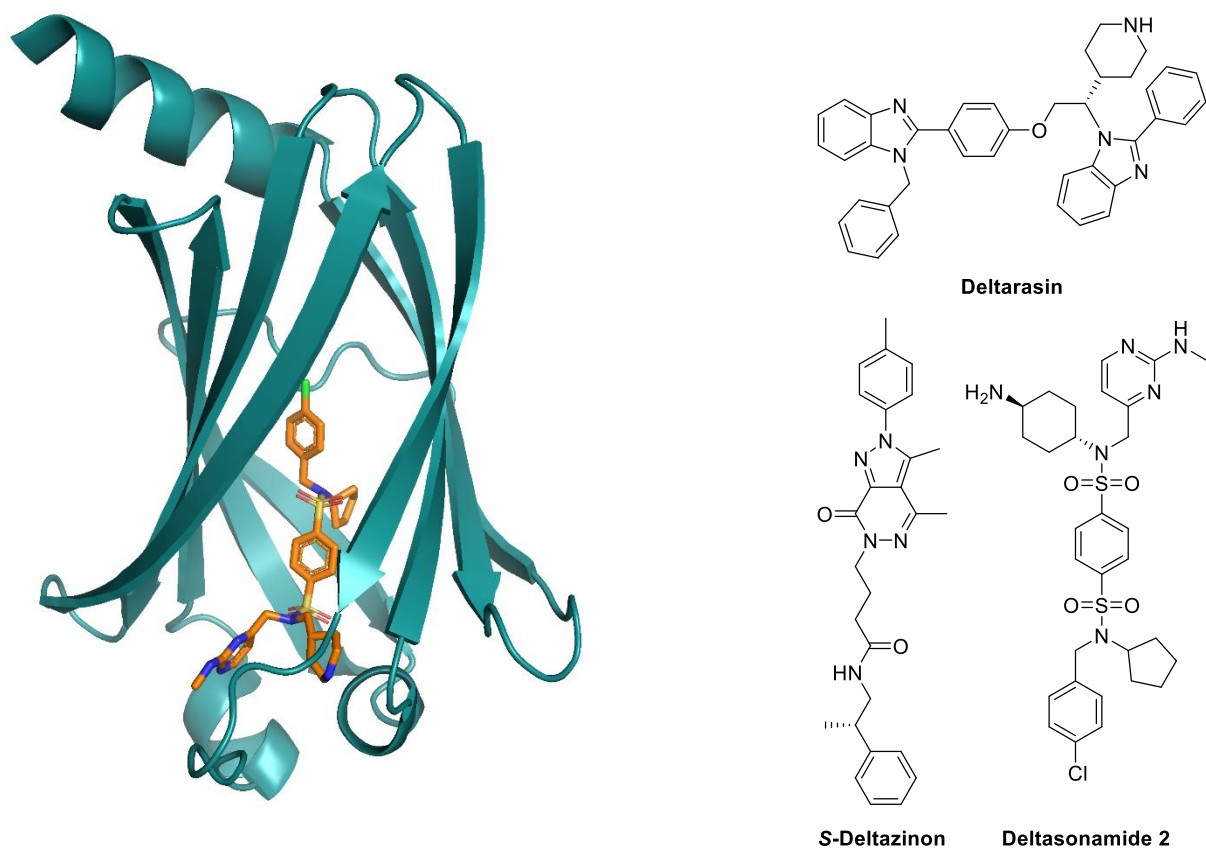


Abb. 2.19. A: Kristallstruktur von Deltazonamid 1 mit PDE δ (PDB: 5ML3). B: Struktur verschiedener PDE δ -Inhibitoren.^{84, 97, 98}

2.2 Zielsetzung

Src und SFKs spielen eine entscheidende Rolle für die Entstehung und den Verlauf vieler Krebserkrankung. Der Nachteil von Inhibitoren für Src und SFKs ist deren fehlende Selektivität und die resultierenden starken Nebenwirkungen. Es wurde gezeigt, dass die Lokalisation von Src und SFKs eine wichtige Rolle für deren Aktivität spielt. Ein gemeinsames Merkmal aller SFKs ist eine N-terminale, kovalente Myristoylierung, die an UNC119 binden kann. UNC119 ist als Chaperon der SFKs an deren Lokalisation beteiligt. Eine Inhibition von UNC119 ist attraktiv, um Veränderungen speziell von Src zu studieren und stellt den Schwerpunkt der Dissertation dar. Im Laufe der Arbeit sollten zunächst durch ein Hochdurchsatzverfahren (engl. *high-throughput screen*, HTS) mögliche Kandidaten für die Inhibition von UNC119 gefunden werden und auf Basis eines gemeinsamen molekularen Gerüsts eine Substanzbibliothek synthetisiert werden. Das molekulare Gerüst sollte dabei möglichst viele Moleküle mit ähnlich aufgebauten Strukturen beinhalten, die in niedriger Konzentration UNC119 inhibieren können. Während der Analyse der Struktur-Aktivitätsbeziehung sollten die Substanzen iterativ auf einen niedrigen IC₅₀-Wert getestet und auf den Ergebnissen aufbauend verbessert werden. Im Anschluss sollten physikalisch-chemische Eigenschaften wie Löslichkeit und Membranpermeabilität untersucht werden, um die Verbindung auszuwählen, die die höchste Löslichkeit und Membranpermeabilität aufweist. Diese Substanz sollte im weiteren Verlauf biologisch evaluiert werden. Zunächst sollte mit dem besten Kandidaten sowohl die Selektivität in Bezug auf andere lipidbindende Proteine analysiert als auch die Dissoziationskonstante für die Bindung an UNC119 bestimmt werden. Dies dient dem Ausschluss von Problemen bei weiteren Tests. Nach Abschluss der chemisch-physikalischen und biophysikalischen Experimente sollte die potenteste Substanz in biologisch relevanten und Src-typischen Assays getestet werden. Damit sollte zusammenfassend die physiologische Relevanz der Inhibition von UNC119, besonders mit Src im Fokus, untersucht werden.

2.3 Resultate und Diskussion

2.3.1 Ergebnisse des Hochdurchsatzverfahrens

Um mögliche Inhibitoren der UNC119-Src Interaktion zu finden, wurde im Vorfeld der Arbeit ein Hochdurchsatzverfahren (engl. *high-throughput screen*, HTS) im *Compound Managing and Screening Center* (COMAS, Dortmund) entwickelt (**Abb. 2.20**). In diesem Experiment sollten in möglichst kurzer Zeit Inhibitoren der Src-UNC119-Interaktion identifiziert werden. Dabei wurde auf ein *Homogeneous Time Resolved Fluorescence* (HTFR) Assay zurückgegriffen. Wenn UNC119 und das Myr-Src-Peptid binden, sollte ein Fluoreszenzsignal, das durch ein FRET-Paar⁹⁹ emittiert wird, zu detektieren sein. Bindet hingegen ein UNC119-Inhibitor, sollte das die Fluoreszenz verschwinden. Durch Titration des Inhibitors sollte ein IC₅₀-Wert ermittelt werden. Der genaue experimentelle Aufbau war folgendermaßen: Ein N-terminales, myristoyliertes Src Peptidfragment wurde mit einem Akzeptor (d2) über einen Avidin-Streptavidin-Komplex gekoppelt, GST-UNC119a hingegen mit einem anti-GST-Antikörper-Donor-Komplex (Europium-Kryptat-Komplex).^{99, 100} Wenn das Myr-Src-Peptid an UNC119 bindet und das System durch Laserlicht mit einer Wellenlänge von 337 nm aktiviert wird, wird Energie vom Donor (UNC119) zum Akzeptor (Myr-Src-Peptid) übertragen, wobei das emittierte Licht (620-665 nm) langwelliger wurde. Dieses Licht konnte anschließend gemessen werden. Wurde eine Substanz hinzugegeben, welche die Interaktion von UNC119-Myr-Src inhibiert, würde weniger Energie übertragen, was zu einer geringeren Signalintensität des Akzeptorfluorophors führte.

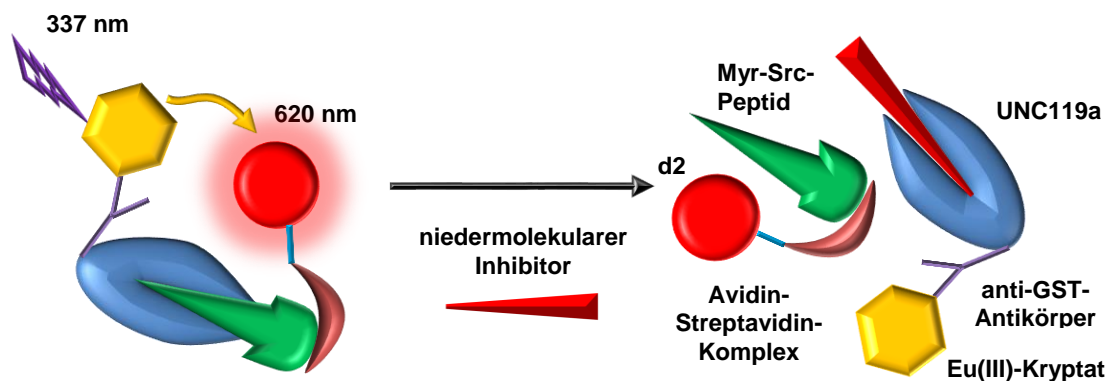


Abb. 2.20. Assay zur Untersuchung der Interaktion vom myr-Src-Peptid mit UNC119a. Das *Homogeneous Time Resolved Fluorescence* (HTFR) Assay dient zur Bestimmung der IC₅₀-Werte für die UNC119-Src-Inhibition.^{99, 100}

2.3.2 Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehung

Mithilfe des HTFR Assays wurden 280.000 Verbindungen getestet wovon ca. 50 Substanzen eine 50 %ige inhibitorische Konzentration (IC_{50}) von weniger als 200 nM aufwiesen. Nach eingehender Betrachtung der getesteten Moleküle wurde festgestellt, dass eine Reihe von strukturell ähnlichen Substanzen mit Thiazolon-Gerüst **2** einen niedrigen IC_{50} -Wert besitzt und somit geeignet für weitere Untersuchungen war (**Abb. 2.21**). Es wurde weiterhin beobachtet, dass eine Reihe von Substanzen statt des Thiazolongerüsts eine Indolingupe (**1**) aufwies. Es wurde entschieden, dass basierend auf der Struktur **1** als Subklasse von **2** eine Substanzbibliothek etabliert werden sollte (**Abb. 2.21**). Es wurde auf Grundlage von bekannten Lipidomimetika angenommen, dass die Vereinigung beider Moleküle einen Vorteil bringen würde.^{96,101} Die Überlegung wurde dadurch gestützt, dass das Indolin als Derivat des Indols ein "privilegiertes Grundgerüst" für Lipidomimetika ist, wie bereits in **Abb. 2.18** gezeigt wurde.⁹⁶ Für die Synthese wurde zunächst die gegebene Struktur-Aktivitätsbeziehung der getesteten Substanzen betrachtet. Im Falle von **1** wurde festgestellt, dass der Stickstoff des Indolins immer acetyliert war, sowie der Teil Linker des Diamins eine längere Kohlenwasserstoffkette ($CH_2 = 2$) besaß.

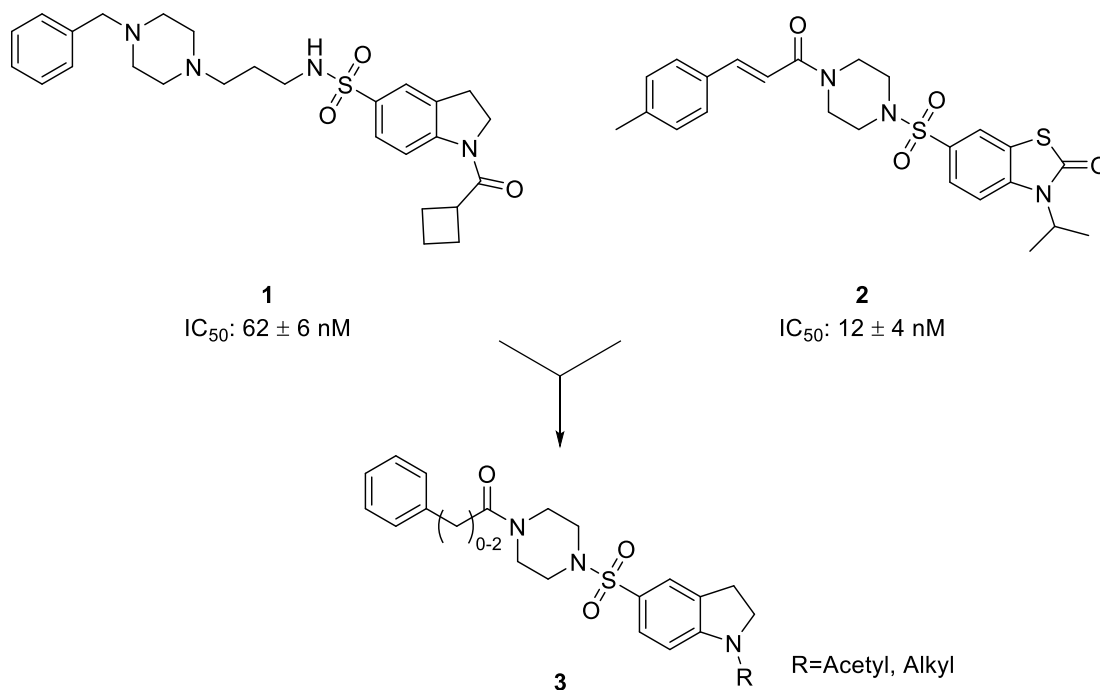


Abb. 2.21. Initiale Hits und kombinierte Zielstruktur. IC_{50} -Werte wurden im HTFR-Experiment bestimmt.

Bei **2** wurden nur alkyliertes Benzothiazolon als aktiv festgestellt. Der Linker ist weitestgehend variabel, wobei ein Michael-Akzeptor wie in **2** vermieden werden sollte, da evtl. kovalente

Bindungen mit Proteinen eingegangen werden konnte. Aus diesen Überlegungen resultierte die Zielstruktur **3** (Abb. 2.21).

Da die Synthese der Zielstruktur nicht vollständig bekannt war, wurde diese zunächst retrosynthetisch zerlegt (Abb. 2.22). Dabei wurde zuerst der Teil **6** vom Teil **9**, im Folgenden Linker, getrennt. Sulfonyliertes Indolin **6** wurde anschließend aus dem acetylierten oder dem alkylierten Baustein **5** erhalten. Dieser Baustein **5** konnte auf das Startmaterial Indolin **4** zurückgeführt werden. Für den Linker wurde eine Schutzgruppenstrategie vorgeschlagen, wobei das Diamin zunächst geschützt vorliegt (**8**). Das Startmaterial dieses Bausteins kann auf Piperazin zurückgeführt werden.

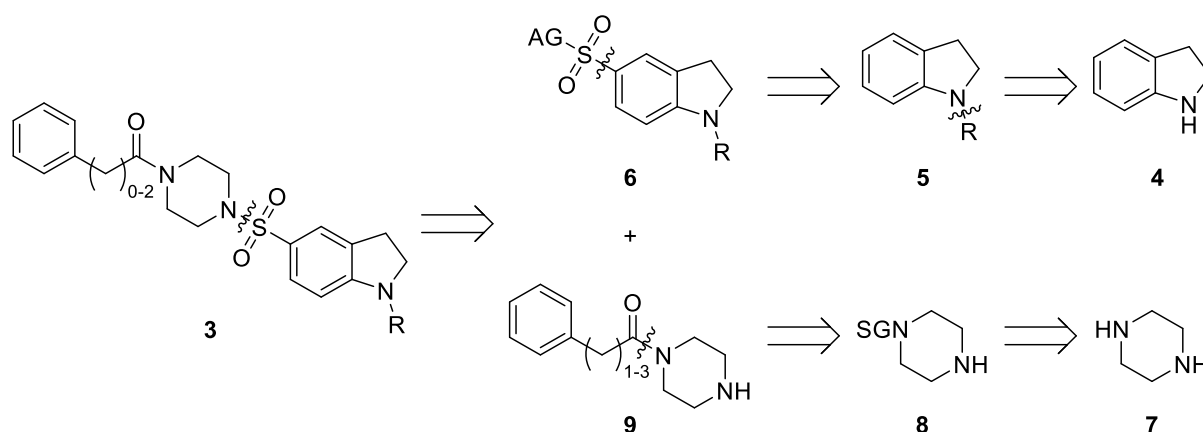


Abb. 2.22. Retrosynthese der Zielstruktur. SG = Schutzgruppe. AG = Abgangsgruppe.

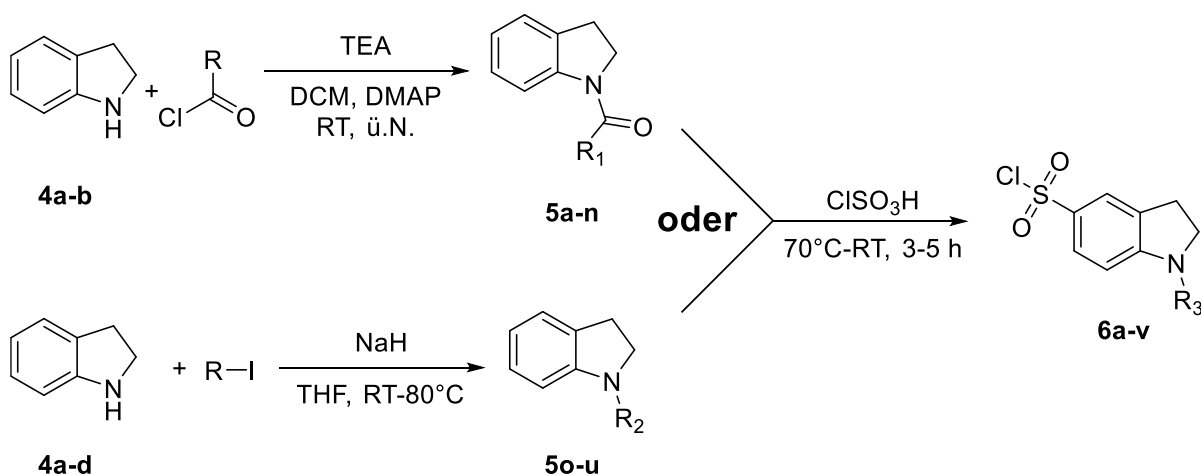


Abb. 2.23. Exemplarische Synthese der Sulfonylchloride **6a-v**.^{102, 103} R_1 = Acetyl, cyclische Alkyle, verschieden substituierte Aryle; R_2 = (verzweigte) Alkyle und Wasserstoff; R_3 = Carbonyl (R_1) und Alkyle R_2 . Neben Indolinen wurde auch verschiedene Indolinderivate (2-Methylindolin, Isatin, Benzimidazol) verwendet.

Um die Inhibitoren zu erhalten, wurden diese nach dem entwickelten Synthesepfad (Abb. 2.23-Abb. 2.25) hergestellt. Hierbei wurden zuerst verschiedene Indolinderivate (Indolin **4a**, 2-Methylindolin **4b**) in quantitativen Ausbeuten mit DMAP als Katalysator acetyliert (Abb. 2.23, **5a-n**).¹⁰² Für die Alkylierung wurden Carbonsäurechloride genutzt, wobei auch verschieden

substituierte Benzoylderivate verwendet wurden. Die Aufreinigung gestaltete sich als relativ simpel, da unerwünschte Substanzen durch eine Extraktion abgetrennt und dadurch das Produkt rein isoliert werden konnte. Parallel dazu wurden verschieden substituierte Indoline (Indolin **4a**, 2-Methylindolin **4b**, Isatin **4c**, Benzimidazol **4d**) mit Alkyljodiden bei 80 °C in moderaten Ausbeuten alkyliert (**Abb. 2.23, 5o-u**). Die *N*-substituierten Produkte **5a-u** sowie unsubstituiertes Indolin wurden anschließend bei erhöhter Temperatur in guten Ausbeuten chloresulfoniert.¹⁰³ Bei alkylierten und cyclischen Carbonylalkan *N*-substituierten Indolen musste eine kürzere Reaktionszeit gewählt werden, da ansonsten ein Zerfall der Substanz zu beobachten war. Es wurde versucht alkylierte Indol- bzw. Oxindolderivate herzustellen, wobei diese trotz verschiedener Ansätze nicht erhalten werden konnten. Die Produkte waren entweder nicht über eine Alkylierung zu erhalten oder zerfielen während der Chloresulfonierung. Auch eine Wolff-Kishner-Reduktion des Isatins bzw. eine Oxidation des Indolinrings nach der Chloresulfonierung, um Oxindole zu erhalten, war nicht möglich.

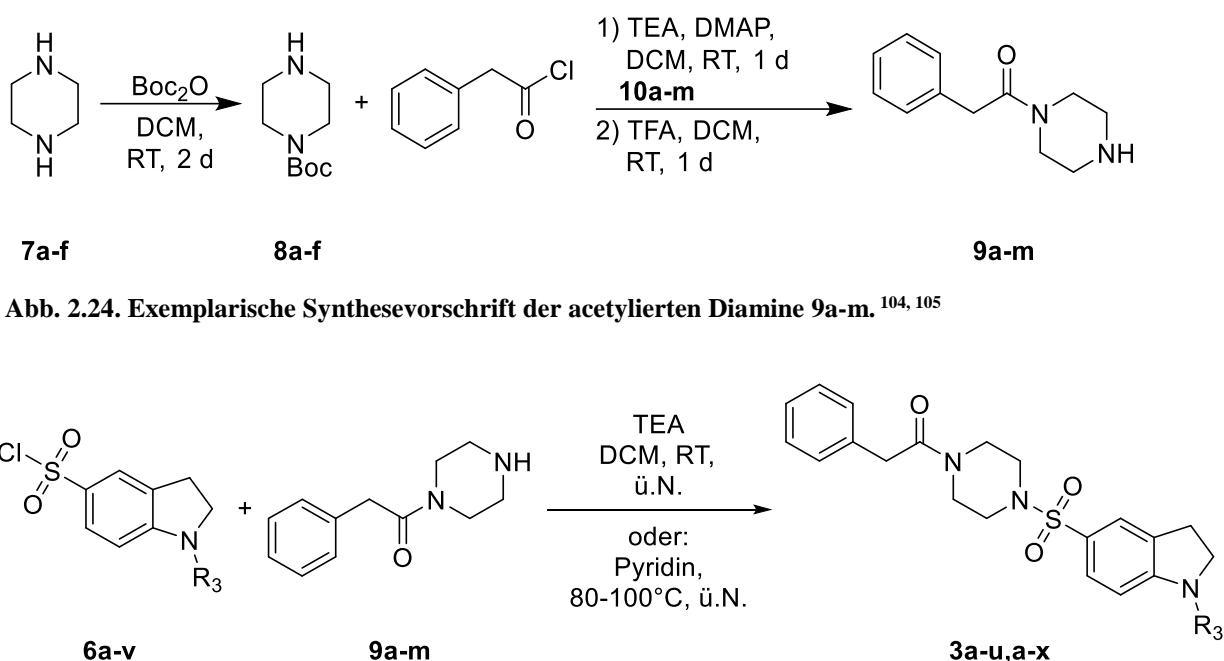


Abb. 2.24. Exemplarische Synthesevorschrift der acetylierten Diamine 9a-m.^{104, 105}

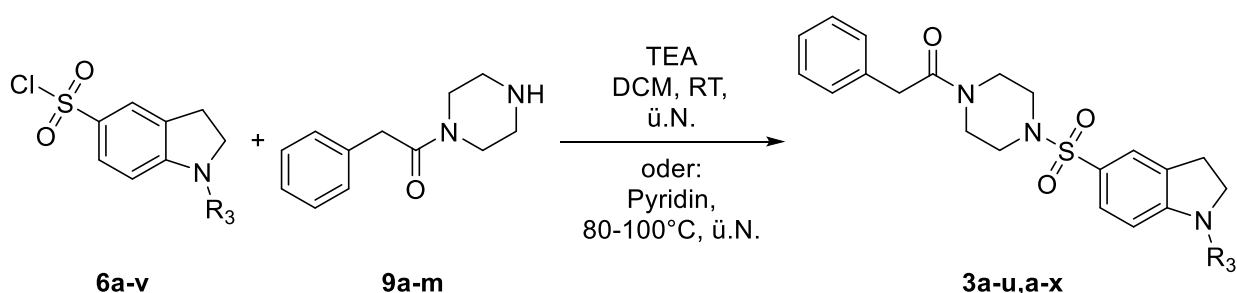


Abb. 2.25. Exemplarische Synthese der Inhibitoren 3a-u,a-x. R₃ = Alkyle, verschiedene Acetyle. Neben Indolinen wurde auch verschiedene Indolinderivate (2-Methylindoln, Isatin, Benzimidazol) verwendet.

Parallel dazu wurden Diamine (Piperazin **7a**, Methylpiperazin **7b**, Homopiperazin **7c**, Ethylen-**7d**, Propylen-**7e**, Butylendiamin **7f**) einfach *Boc* geschützt (**8a-f**) und im nächsten Schritt mit einer Benzoyl(derivat)- bzw. einem Benzylgruppe endständig substituiert (**10a-m** bzw. **10n-o**, **Abb. 2.24**).^{104, 105, 106} Die Ausbeuten waren auch hier meistens quantitativ und die Aufreinigung simpel. Anschließend wurde die *Boc*-Schutzgruppe durch TFA in DCM entfernt (**9a-o**). Die

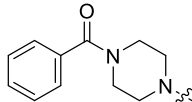
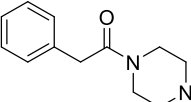
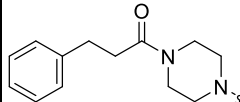
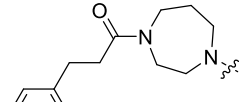







Schützen/Entschützen-Strategie musste angewandt werden, da ansonsten die Diamine doppelt acyliert wurden bzw. die Aufreinigung sich als schwierig erwies. Anschließend wurden beide Bausteine entweder, wie im Falle von cyclischen Diaminen bei Raumtemperatur und in DCM oder im Falle der primären Amine bei 80-100 °C in Pyridin umgesetzt (**Abb. 2.25**).¹⁰⁷ Alle Inhibitoren wurden über eine präp. HPLC gereinigt. Obwohl viele Substituenten abgedeckt wurden, konnten keine *N*-methylierten Inhibitoren realisiert werden. Auch die Synthese anderer *N*-alkylierter Inhibitoren war in manchen Fällen nicht möglich bzw. mit einer sehr geringen Ausbeute verbunden und sind deshalb hier nicht aufgeführt.

Zu Beginn der Substanzbibliothek-Synthese wurden zunächst acetylierte und alkylierte sulfonierte Indoline und deren Derivate mit Linker verschiedener Kohlenstoffkettenlänge ($n = 0-2$) und Diaminen (Piperazin **9a-c**, Homopiperazin **9d**) synthetisiert und sulfonamidiert. Im weiteren Verlauf wurden die Inhibitoren der Leitstruktur **3** aus Gründen der Klarheit wie folgt benannt: Erster Buchstabe entspricht der fortlaufenden Benennung des Indolinteils, der letzte Buchstabe entspricht dem Linker/Aminteil. In der Tabelle **Tab. 2.1** sind verschiedene Inhibitoren mit Alkylresten sowie kurzen, auch cyclischen Acetylresten zu sehen. Hierbei hatten alle alkylierten Derivate (**3o-u, a-c**) einen IC_{50} von mehr als 1 μM . Der IC_{50} -Wert wurde nicht eingehender untersucht, da die Initialsubstanzen potenter waren. Inhibitoren mit kurzen Acylresten wie Acetyl- (**3ka-d**) und Cyclopropanoylgruppen (**3la-d**) waren ebenfalls schwach aktiv. Inhibitoren mit Cyclohexoylsubstituent (**3ma-d**) als *N*-Substituent (Position **R₁**) war dagegen aktiv, wobei die Inhibition von UNC119a 10- bis 100-mal schwächer war als die initialen Hits **1** oder **2**. Um den Trend von großen cyclischen *N*-acetylierten Inhibitoren weiterzuverfolgen wurden dementsprechend Benzoylreste (**3a-j, a-d**) mit verschiedenen Substitutionsmustern verwendet (**R₂**, **Tab. 2.2**).

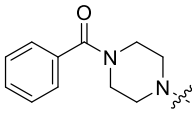
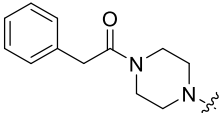
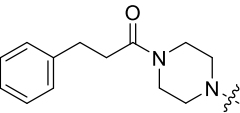
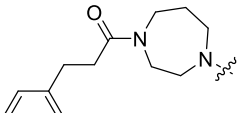
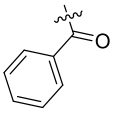
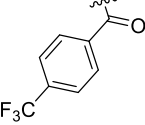
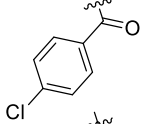
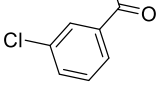
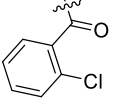
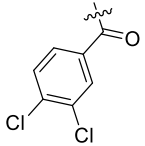
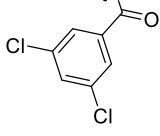
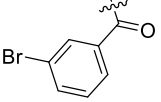
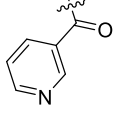
Bei der näheren Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehung (*structure activity relationship*, SAR) wurde festgestellt, dass die Aktivität der Inhibitoren von der Länge der Kohlenstoffketten abhing. Hierbei war kein Muster erkennbar, in welchen Fällen ein längerer und wann ein kürzerer Linker von Vorteil war. Die einzige Gemeinsamkeit bei allen *N*-benzoylierten Inhibitoren war, dass das Homopiperazin (**3ad**) statt dem Piperazin (**3aa-c**) aktiver und das 2-Methylindolin (**3ba-d**) inaktiv war. Werden die Benzoylsubstitutionsmuster der *N*-substituierten Indoline näher betrachtet, hatte eine *para*-Substitution einen negativen Effekt (**3c-d/a-d**), wobei mit steigender Größe der Gruppe (*p*-CF₃ gegen *p*-Cl) auch die Aktivität sank. *Ortho*-Substitutionen (**3ea-d**) wurden hingegen toleriert. *Meta*-Substituenten (**3da-d, 3id, 3jd**) zeigten die größte Aktivität, wobei ein Chlor-substituierter Inhibitor (**3da-d**) zu einem geringeren IC_{50} führte als ein Inhibitor mit größerem Bromsubstituent (**3id**).

Inhibitoren mit 2-Acetylpiperidin (**3jd**) und doppelsubstituierte Aromaten (**3ga-d**, **3hd**) zeigten hingegen eine schwächere Aktivität.

Tab. 2.1. IC₅₀-Werte der Substanzbibliothek mit N-Alkyl bzw. N-Acetylsubstituenten. In **fett** sind die Namen der Substanzen angegeben. **3lX**, **3rX**: 2-Methylindolin statt Indolin; **3sX**: Isatin statt Indolin; **3tX**, **3uX**: Benzimidazol statt Indolin.

R₁	R₂				
		IC₅₀ (nM)	IC₅₀ (nM)	IC₅₀ (nM)	IC₅₀ (nM)
		>1.000 (3ka) >1.000 (3la)	>1.000 (3kb) >1.000 (3lb)	>1.000 (3kc) >1.000 (3lc)	>1.000 (3kd) >1.000 (3ld)
		>1.000 (3ma)	>1.000 (3mb)	>1.000 (3mc)	>1.000 (3mc)
		764 ± 82 (3na)	>1.000 (3nb)	>1.000 (3nc)	559 ± 63 (3nc)
		>1.000 (3oa)	>1.000 (3ob)	-	-
		-	>1.000(3pb)	>1.000 (3pc)	-
		>1.000 (3qa)	>1.000 (3qb) >1.000 (3rb) >1.000 (3sb) >1.000 (3tb)	-	-
		-	>1.000 (3ub)	-	-

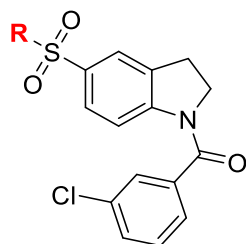
Tab. 2.2. IC₅₀-Werte für die Inhibitoren von UNC119 der Substanzbibliothek mit *N*-Benzoylsubstituenten. In **fett ist der Inhibitorname angegeben. **3bX**: 2-Methylindolin statt Indolin.**

R₁ \ R₂	 IC₅₀ (nM)	 IC₅₀ (nM)	 IC₅₀ (nM)	 IC₅₀ (nM)
	>1.000 (3aa) >1.000 (3ba)	>1.000 (3ab) >1.000 (3bb)	509 ± 32 (3ac) >1.000 (3bc)	234 ± 23 (3ad) 670 ± 69 (3bd)
	>1.000 (3ca)	>1.000 (3cb)	>1.000 (3cc)	>1.000 (3cd)
	>1.000 (3da)	>1.000 (3db)	>1.000 (3dc)	767 ± 144 (3dd)
	239 ± 45 (3ea)	236 ± 68 (3eb)	379 ± 33 (3ec)	111 ± 11 (3ed)
	>1.000 (3fa)	>1.000 (3fb)	409 ± 75 (3fc)	332 ± 36 (3fd)
	192 ± 6 (3ga)	879 ± 52 (3gb)	>1.000 (3gc)	>1.000 (3gd)
	-	-	-	251 ± 50 (3hd)
	-	-	-	159 ± 43 (3id)
	-	-	-	689 ± 28 (3jd)

Da sich ein *o*-Chlor-substituierter Benzoylring am Indolin als vorteilhaft erwies, wurden weitere Diaminreste (**9e-m**) synthetisiert und getestet (**Tab. 2.3**). Im Falle der Derivate mit Piperidin- statt Benzoylrest am Linker (**3ev-w**) muss angemerkt werden, dass diese nicht durch die oben gezeigte Syntheseroute hergestellt werden konnte. Der Grund lag in der guten Wasserlöslichkeit der Produkte und die Substanzen könnten damit im Extraktionsschritt verloren gehen. Stattdessen musste *Boc*-geschütztes Piperazin mit dem Sulfonylchlorid reagiert (**3et**), entschützt (**3u**) und anschließend mit einem Carbonylchlorid zum Amid (**3ev-w**) umgewandelt werden. Bei der Analyse der Struktur-Aktivitätsbeziehung wurde festgestellt, dass Inhibitoren mit längerem Linker am Piperazin von Vorteil sind (Vgl. **3ea** mit **3ec**), wobei bei Inhibitoren mit Homopiperazin der Effekt umgekehrt war (Vgl. **3ed** mit **3ef**). Methylpiperazin statt Piperazin (**3ee**) wurde toleriert. Chlor- und hydroxysubstituierte Benzoylreste (**3eh-j** und **23**) sowie Piperidine (**3ev-w**) am Linker wiesen einen ähnlichen IC₅₀ zwischen 190 und 300 nM auf. Wurde hingegen das Piperazin alkyliert (**3eg**) oder nicht substituiert (**3eu**), war die Aktivität beträchtlich niedriger. Eine *Boc*-Gruppe (**3et**) sowie direkte, aromatische Substitution (**3er-s**) des Diamins führte zur totalen Inaktivität. Derselbe Effekt wird bei linearen Diaminen mit verschiedenen Längen beobachtet (**3ek-m**). Interessanterweise hat auch ein symmetrischer Inhibitor (**3ex**) eine nanomolare Aktivität.

Da die Zielstrukturen **3** in **Abb. 2.22** nicht potenter als die Initialhits **1** und **2** waren, wurde beschlossen eine kleine Substanzbibliothek auf dem Initialhit **1** und dem obigen SAR-Resultaten aufzubauen. Hierbei sollte das Piperazin in **1** durch Homopiperazin und die Cyclobutancarboxylgruppe durch *m*-Chlorphenyl ersetzt werden. Hierbei wurde auf eine andere Syntheseroute zurückgegriffen (**Abb. 2.26**). Es wurde zuerst *Boc*-geschütztes (Homo-) Piperazin **8c** alkyliert (**10n**) und entschützt (**9n**), gefolgt von einer Substitution am Diaminring, um die alkylierten, Phthalimid-geschützten Diamine **10o-q** zu erhalten. Anschließend wurden diese durch Hydrazin entschützt (**9o-q**) und in Pyridin mit Sulfonylchlorid **6e** sulfonamidiert. Die erhaltene Substanzbibliothek ist in **Tab. 2.4** zusammengefasst. Es wurde damit durch eine andere Linkerstruktur ein deutlich niedriger IC₅₀ gefunden. Die direkt arylierten Diamine wiesen eine deutlich niedrigere inhibitorische Konzentration auf als in **Tab. 2.3**. Der beste Inhibitor **Deltauncin** (**3eq**) weist damit einen niedrigeren IC₅₀ als der initiale Hit **1** auf.

Tab. 2.3. IC₅₀-Werte der Substanzbibliothek mit *N*-Methachlorbenzoylsubstituenten. In **fett** sind die Inhibitorennamen angegeben.



Substituent R	IC ₅₀ (nM)	Substituent R	IC ₅₀ (nM)	Substituent R	IC ₅₀ (nM)
	239 ± 45 (3ea)		825 ± 21 (3eg)		356 ± 47 (3ev)
	236 ± 68 (3eb)		271 ± 23 (3eh)		211 ± 47 (3ew)
	379 ± 33 (3ec)		198 ± 45 (3ei)		>1.000 (3et)
	111 ± 11 (3ed)		183 ± 49 (3ej)		518 ± 30 (3eu)
	198 ± 52 (3ee)		>1.000 (3er)		330 ± 15 (3ex)
	548 ± 49 (3ef)		>1.000 (3es)		338 ± 99 (23)
	>1.000 (3ek)		>1.000 (3el)		>1.000 (3em)

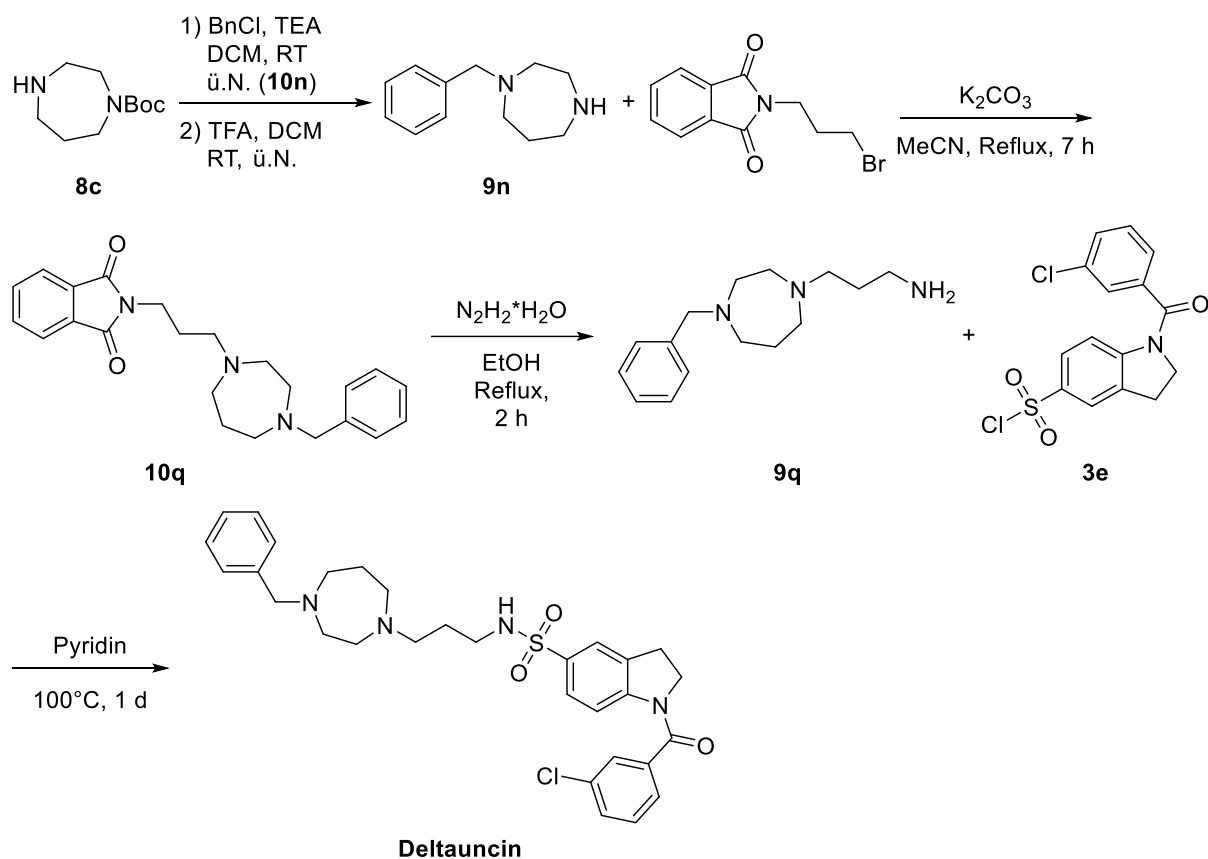
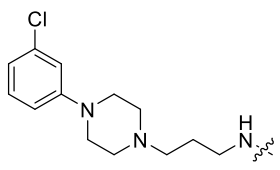
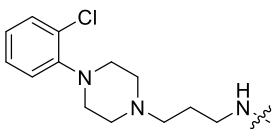
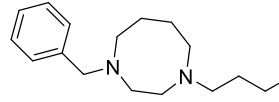
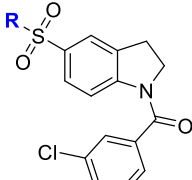


Abb. 2.26. Synthese der Substanzbibliothek basierend auf **1** am Beispiel von Deltauncin.

Tab. 2.4. IC_{50} -Werte der Substanzbibliothek basierend auf dem initialen Hit **1**. Namen der Inhibitoren sind in **fett** angegeben.

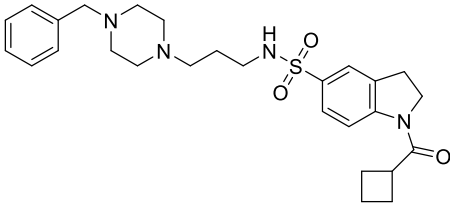
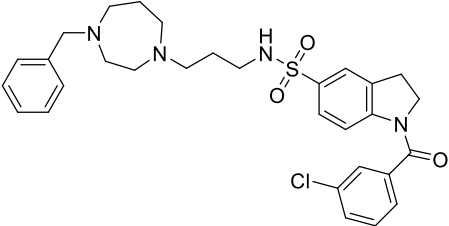
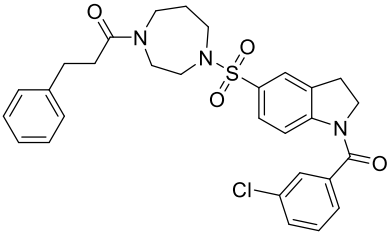
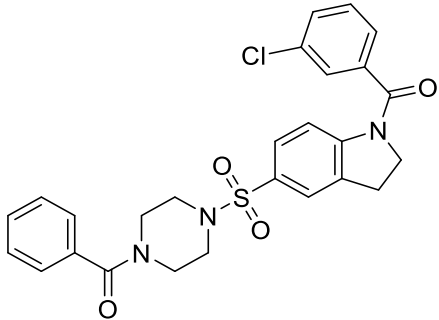
R	 IC₅₀ (nM)	 IC₅₀ (nM)	 IC₅₀ (nM)
	301 ± 85 (3eo)	152 ± 40 (3ep)	51 ± 6 (3eq, Deltauncin)

2.3.3 Physikalisch-chemische und biophysikalische Experimente

Im Anschluss an die Synthesen wurde die Löslichkeit und Membranpermeabilität der drei besten Indolininhibitoren und der Substanz **1** durchgeführt untersucht. ¹⁰⁰ Beide Experimente wurden durch Dr. Matthias Baumann am LDC, Dortmund durchgeführt. Dies war nötig um sicherzustellen, dass der Inhibitor bei zellulären Experimenten nicht im Zellmedium ausfällt und eine Zellgängigkeit gewährleistet ist. Der initiale Hit **1** hat die beste Löslichkeit (**Tab. 2.5**), gefolgt vom potentesten Inhibitor **Deltauncin**. **Deltauncin 2 (3ed)** und damit auf der Struktur **3** basierenden Substanzen wiesen eine niedrige Löslichkeit auf. Das PAMPA-Experiment wurde nur für den initialen Hit **1** durchgeführt, da das Experiment zu einem späteren Zeitpunkt nicht mehr durchgeführt werden konnte. Die Permeabilität von **1** lag im mittleren Bereich, d. h. bei 13,9 % Flux. Die Daten sollten aber auch auf das strukturell sehr ähnliche **Deltauncin** übertragbar sein. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die zwei Inhibitoren **Deltauncin** und **Deltauncin 2** auf ihre Selektivität bezüglich anderer Lipidbinder getestet. ¹⁰⁰

Dieses Experiment sollte die Selektivität zu UNC119 bzw. der Myristoylbindetasche zeigen und die Bindung zu anderen, wie z. B. farnesylbindende Proteine ausschließen. Damit können Effekte in Zellen, die durch eine direkte Bindung an die genannten Proteine stattfinden könnten, ausgeschlossen werden. Zusätzlich dient dieses orthogonale Experiment als Bestätigung der Bindung von **Deltauncin** mit UNC119 *in vitro*. Als Testsystem wurde ein Fluoreszenz-polarisationsexperiment durch Dr. Eyad Fansa, MPI Dortmund durchgeführt. In diesem Assay wurde ein Fluorophor-markiertes, lipidiertes Peptid, als verkürzte Form des endogenen Liganden, zusammen mit dem jeweiligen Chaperon inkubiert. Getestet wurde die Inhibition der Interaktion von UNC119a/Myr-Src sowie Far-RHEB (farnesyliertes *Ras homolog enriched in brain*) mit jeweils PDE δ ¹⁰⁸, *aryl hydrocarbon receptor interacting protein like 1* (AIPL1) ¹⁰⁹ und Calmodulin (CaM) ¹¹⁰ mit **Deltauncin** (**Abb. 2.27**) sowie **Deltauncin 2** (**Abb. 2.28**). UNC119a wurde in diesem Fall gewählt, da die Isoformen a und b relativ ähnlich sind und UNC119a in Zellen höher exprimiert wird. Während des Experiments wurde als Erstes eine stabile Gerade der Polarisation mit den lipidierten Peptiden ^{111, 112} gemessen. Im Anschluss wurde das Chaperon hinzugefügt. Durch die Bindung des Peptids an seinen Bindungspartner wurden die Freiheitsgrade des Fluorophors verringert und damit die Polarisation erhöht. Bei Zugabe eines Inhibitors sollte das fluoreszierende Peptid wieder frei in Lösung diffundieren und damit die Polarisation herabgesetzt sein. Entsprechend würde sich bei fehlender Bindung des Inhibitors die Polarisation nicht ändern. Um sicherzugehen, dass keine Bindung mit dem jeweiligen Chaperon eingegangen wurde, wurden neben einer 200 nM- und 400 nM-Lösung auch 4 μ M-Lösung des Inhibitors hinzugegeben.

Tab. 2.5. Löslichkeit, PAMPA (*parallel artificial permeability assay*) und IC₅₀-Übersicht der UNC119-Inhibitoren. Die Löslichkeit wurde über die Absorption verglichen mit reinem Lösemittel bestimmt. Bei dem PAMPA-Experiment wurden %Flux als Anteil der Substanz von Donor- verglichen zur Akzeptorwanne angegeben. Hierbei wurde die Menge über die Absorption beider Wannen bestimmt.

Inhibitor	Name	Löslichkeit (µM)	PAMPA (%Flux)	IC ₅₀ (nM)
	1	368,1	13,9	62 ± 6
	Deltauncin (3eq)	229,2	-	51 ± 6
	Deltauncin 2 (3ed)	11,4	-	111 ± 11
	Deltauncin 3 (3ea)	-	-	239 ± 45

Wie erwartet sinkt der Anteil an polarisiertem Licht im Falle von UNC119a bei Zugabe von **Deltauncin** bzw. **Deltauncin 2**. Qualitativ kann ein Unterschied bei der Polarisierung der jeweiligen Konzentration und damit Inhibition zwischen beiden Substanzen bemerkt werden. Im Falle von UNC119 fällt die Polarisierung auf das Anfangsniveau nach Zugabe von 400 nM des affineren **Deltauncin**, während für den gleichen Effekt 4 µM **Deltauncin 2** benötigt wird.

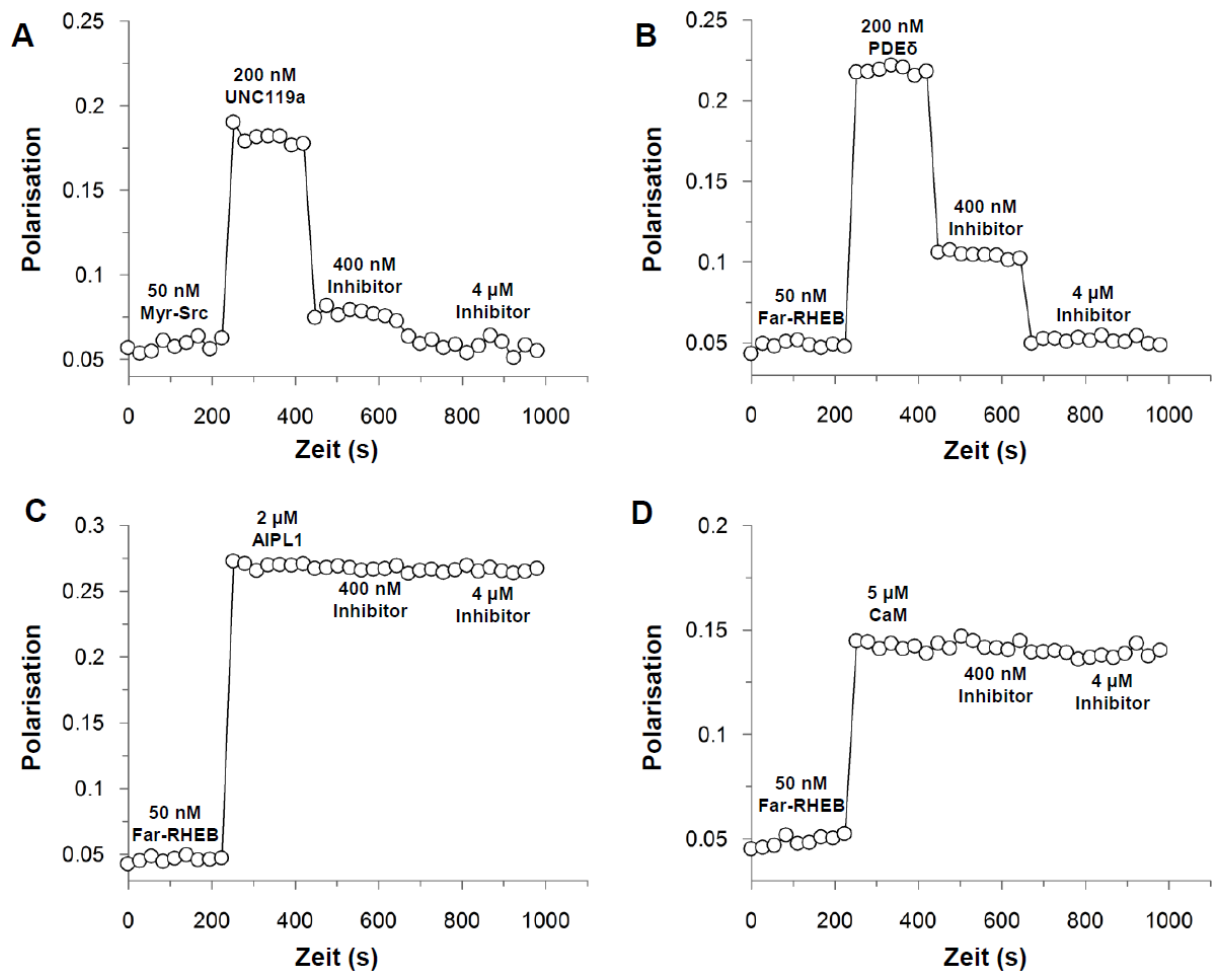


Abb. 2.27. Testung der Inhibition der Interaktion von verschiedenen Fluorophor-markierten, lipidierten Peptiden mit deren Chaperons durch Deltauncin mittels Fluoreszenzpolarisation. **A:** Myr-Src-Unc119a-Interaktion. **B:** Far-RHEB-PDE δ -Interaktion. **C:** Far-RHEB-AIPL1-Interaktion. **D:** Far-RHEB-CaM-Interaktion.

Die farnesylbindenden Proteine AIPL1 und Calmodulin sind keine Binder von **Deltauncin** bzw. **Deltauncin 2** (**Abb. 2.27** bzw. **Abb. 2.28** jeweils **C** und **D**). Überraschenderweise konnte eine Bindung beider Inhibitoren an PDE δ (**Abb. 2.27** bzw. **Abb. 2.28** jeweils **B**) gezeigt werden. Dieses Ergebnis kam überraschend, da keine Bindung von **Deltauncin** bzw. **Deltunincin 2** an andere Farnesyl- bzw. Fettsäure-bindenden Proteine zu sehen war und damit keine Spezifität zu erwarten wäre. Ein Grund für die Inhibition von PDE δ ist die Homologie der Struktur der Bindetasche zwischen PDE δ und UNC119. Diese doppelte Inhibition ermöglicht erstmals die gleichzeitige Inhibition der Chaperone zweier onkogener Proteine zu studieren.

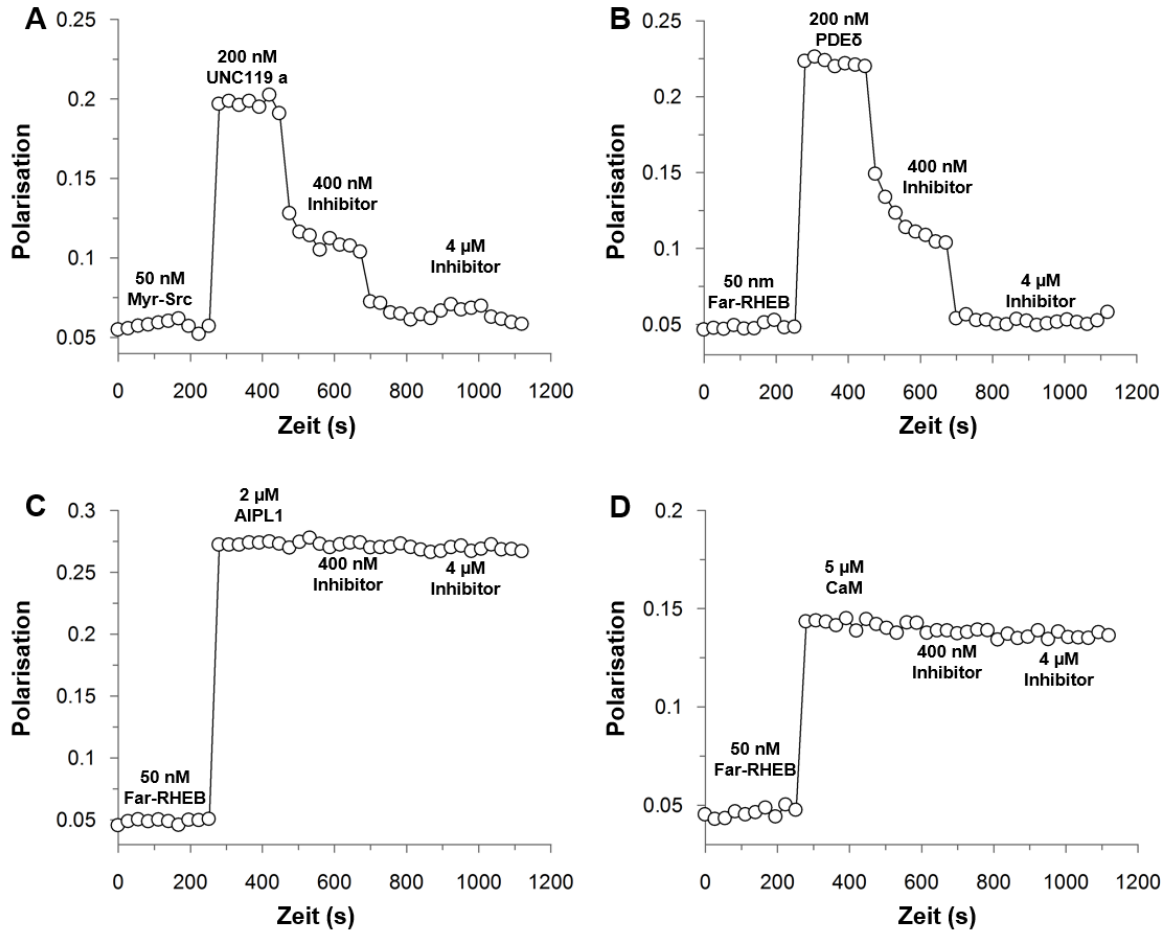


Abb. 2.28. Testung der Inhibition der Interaktion von verschiedenen Fluorophor-markierten, lipidierten Peptiden mit deren Chaperons durch Deltauncin 2 mittels Fluoreszenzpolarisation. **A:** Myr-Src-Unc119a-Interaktion. **B:** Far-RHEB-PDE δ -Interaktion. **C:** Far-RHEB-AIPL1-Interaktion. **D:** Far-RHEB-CaM-Interaktion.

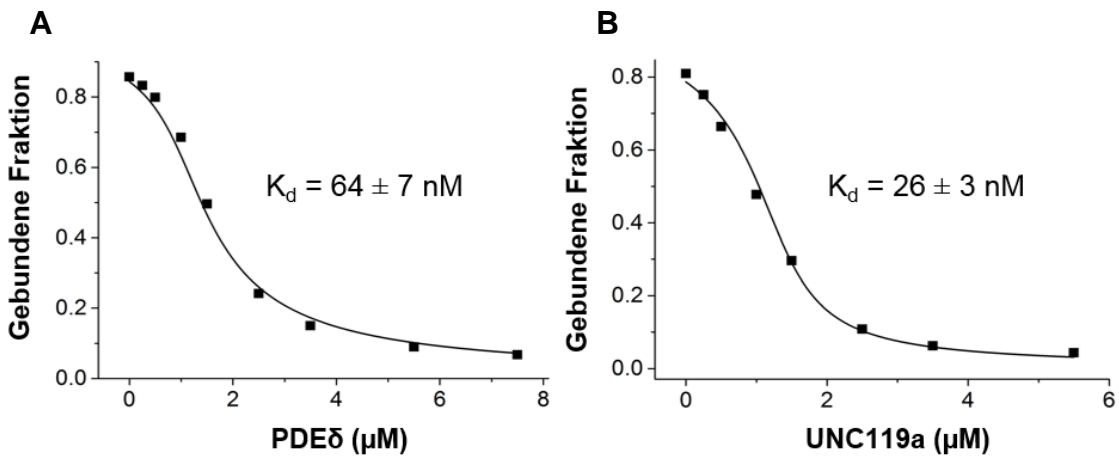


Abb. 2.29. K_d -Bestimmung durch ein Verdrängungsexperiment von Deltauncin mit PDE δ (A) und UNC119a (B). Titration von Deltauncin zu vorher entstandenen Komplex von 0,5 μ M Far-RHEB Peptid bzw. Myr-Src Peptid mit 1,5 μ M PDE δ bzw. UNC119a.

Da die in **Kapitel 2.3.1** IC_{50} -Werte abhängig von der Proteinkonzentration sind, wurden konzentrations-unabhängige K_d -Werte für die Bindung von **Deltauncin** an UNC119a und PDE δ ermittelt (**Abb. 2.29**). Für UNC119a ergab sich eine Bindungskonstante von 23 ± 3 nM und für PDE δ von 64 ± 7 nM. Dass **Deltauncin** knapp 2,5-mal schwächer an PDE δ bindet als an UNC119a, ist auch qualitativ durch das Plateau bei PDE δ im Selektivitätsprofil zu entnehmen (Vgl. **Abb. 2.27 A** und **B**).

2.3.4 Einfluss von Deltauncin auf die UNC119-Src-Interaktion bestimmt durch ein Proximity-Ligation Experiment

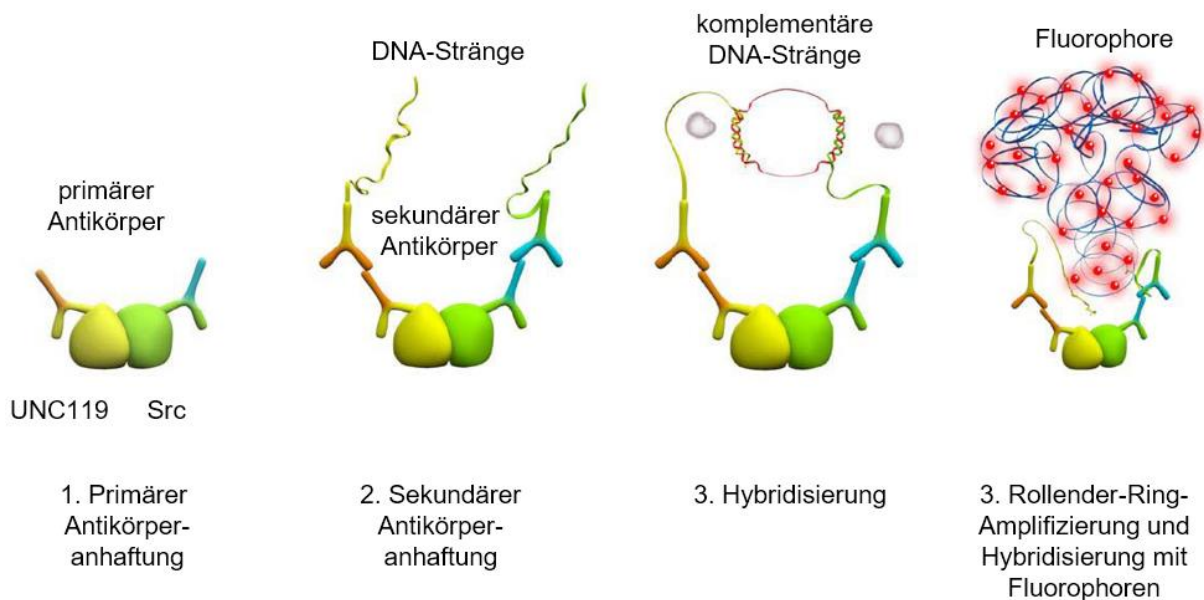


Abb. 2.30. Funktionsweise des PLA. ¹¹³

Ein direkter Nachweis der Inhibition der UNC119-Src-Interaktion kann durch das sog. *proximity-ligation assay* (PLA, **Abb. 2.30**) erfolgen. Hierbei wurden Antikörper gegen UNC119 und Src verschiedener Herkunft mit vorher permeabilisierten Zellen inkubiert. Einen sekundären, mit jeweils einem einzigartigen DNA-Strang versehenen Antikörper, gegen jeweils den primären Antikörper von UNC119 bzw. Src wurden daraufhin hinzugefügt. Befanden sich beide Proteine in Nachbarschaft (maximal 40 nm Abstand voneinander) ¹¹³, können die DNA-Stränge beider Antikörper zusammen mit komplementären, kurzen Oligonukleotiden hybridisieren, um einen Ring zu bilden. Die Stränge werden anschließend ligiert, vervielfältigt und durch komplementäre Oligonukleotide, die an fluoreszente Sonden gekoppelt sind, sichtbar gemacht. Das Binden der Proteine würde dabei in der Immunofluoreszenzmikroskopie als Punkte sichtbar. Zunächst wurden die optimalen Antikörperkonzentrationen für beide Proteine

in verschiedenen Zelllinien (HeLa, MDA-MB-231, MCF-7, U2OS) durch Immunofluoreszenzmikroskopie ermittelt (**Abb. 2.32**). Aufgrund der Verteilung der Fluoreszenz, also Src erhöht plasmamembrangebunden und UNC119 im Zytosol verteilt, konnte die Selektivität des UNC119- und Src-Antikörper angenommen werden. Daran anschließend wurde das PLA getestet. Hierbei wurde neben DAPI, das den Zellkern anfärbte, und den primären und sekundären Antikörpern auch WGA-488 verwendet, ein Marker für Zellmembranen. Als Negativkontrollen wurde jeweils einer der primären Antikörper (anti-UNC119 oder anti-Src) weggelassen. Es konnten keine PLA-Signale für die Positiv- und Negativkontrolle (**Abb. 2.31**) detektiert werden und damit keine Bindung von Src an UNC119. Um einen Fehler der PLA-Reagenzien auszuschließen wurden zwei primäre Antikörper desselben Proteins mit verschiedenen Epitopen gegen dasselbe Protein und aus verschiedenen Spezies gewählt (**Abb. 2.33**). Sowohl für Src als auch β -Catenin (**Abb. 2.33**) konnten viele PLA-Signale registriert und damit die Funktionalität der Reagenzien gezeigt werden. Durch dieses Ergebnis ließ sich darauf schließen, dass unter diesen Bedingungen das PLA keine Bindung von Src und UNC119 zeigen konnte.

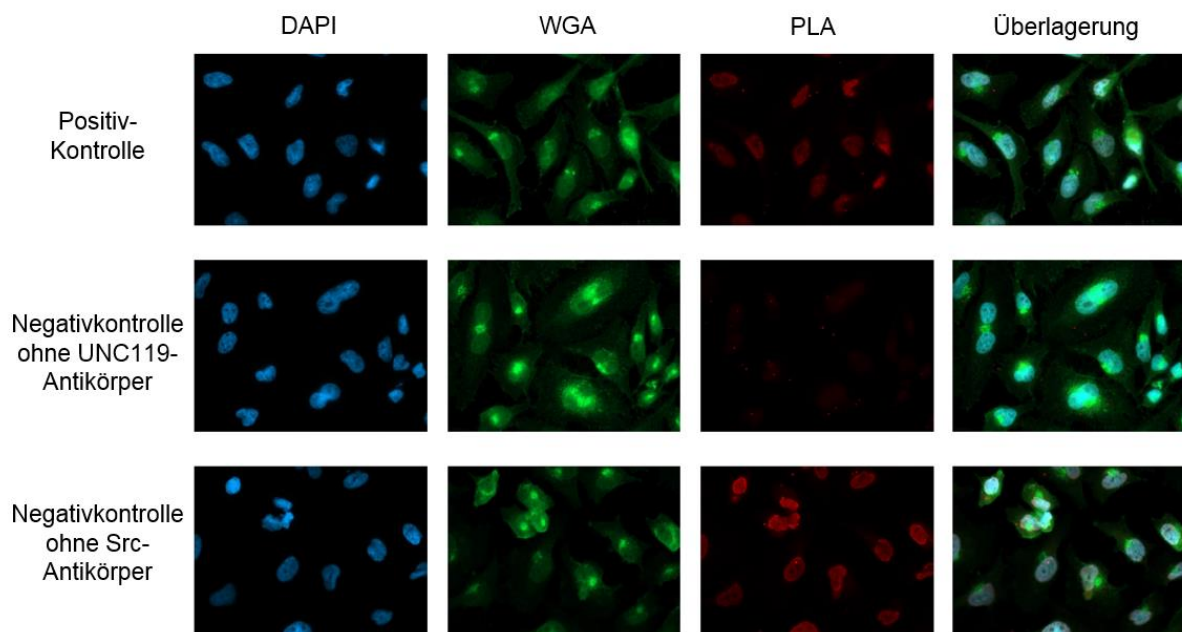


Abb. 2.31 PLA für die Detektion der UNC119-Src-Interaktion in HeLa-Zellen. Repräsentative Aufnahmen von HeLa Zellen gefärbt für DAPI, WGA und PLA sowie Überlagerung der Kanäle für die Positivkontrolle, die Negativkontrolle ohne Src-Antikörper und die Negativkontrolle ohne UNC119-Antikörper.

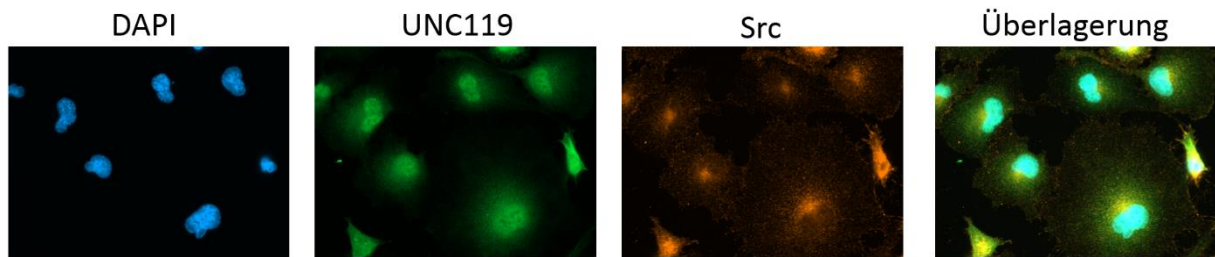


Abb. 2.32. Untersuchung der Immunfluoreszenz der Lokalisation von UNC119 und Src. Repräsentative Aufnahmen von HeLa-Zellen gefärbt mit DAPI und anti-UNC119, anti-Src Antikörper sowie die Überlagerung der Kanäle.

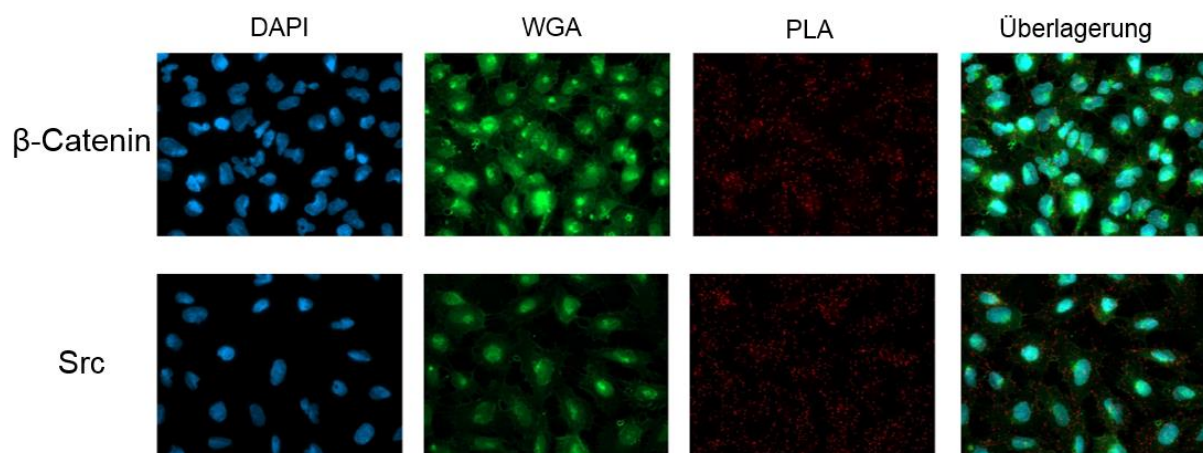


Abb. 2.33. Untersuchung der Funktionstüchtigkeit des PLA-Kits. Repräsentative Aufnahmen von U2OS-Zellen gefärbt mit DAPI, WGA, PLA von anti- β -Catenin (Maus und Kaninchen) bzw. anti-Src (Maus und Kaninchen) sowie Überlagerung der Kanäle.

2.3.5 Einfluss von Deltauncin auf die UNC119-Src-Interaktion bestimmt durch FLIM-FRET Experimente

Da im PLA-Experiment keine Bindung von UNC119 und Src gezeigt werden konnte, wurde ein Ansatz der Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie, die den Förster-Resonanzenergietransfer nutzt, (engl. *fluorescence lifetime imaging microscopy* (FLIM) und *fluorescence resonance energy transfer* (FRET), kurz FLIM-FRET) in Betracht gezogen (durchgeführt durch Dr. Antonios Konitiotis am MPI Dortmund). Da **Deltauncin** eine doppelte Selektivität hat, wurde sowohl die Src-UNC119a- bzw. -UNC119b-Interaktion als auch die PDE δ -RHEB-Bindung beobachtet. Das Prinzip des FLIM-FRET (Abb. 2.34) beruht auf der Fluoreszenz-Lebensdauer des FRET-Donors. In diesem Fall wurden HeLa-Zellen transient mit einem UNC119a- oder UNC119b- bzw. PDE δ -mCherry-Konstrukt und einem Src-6Q- bzw. RHEB-mCitrin-Konstrukt transfiziert.⁶⁷ Src-6Q ist eine Src-Mutante, die in Position 6 der Aminosäuresequenz mutiert wurde. Diese Mutation wurde gewählt, da das polybasische Motiv, das mit erhöhter Ladung und damit guter Membranverankerung einhergeht, durch Glutamin unterbrochen wird und somit die Verankerung in einzelnen Membranen schlechter ist. Dies führt wiederum zur besseren Verteilung von Src in allen Membranen und damit ein besseres Signal für das FLIM-FRET Experiment. Wenn das Chaperon an das myristoylierte bzw. prenylierte Protein binden würde, kämen die Fluorophore mCherry und mCitrin in geeignete Nähe (max. 10 nm). Hierdurch kann der Energietransfer erfolgen, d. h. FRET kann stattfinden. Dabei kann die Fluoreszenzlebensdauer α des Donors gemessen werden. Wurde in dem Experiment **Deltauncin** zu dem FLIM-FRET System hinzugegeben, verringerte sich die Fluoreszenzlebensdauer, was durch das Absinken des α -Wertes detektiert wurde (Abb. 2.35 A-C). Die zwei lipidierten Proteine waren vor Behandlung in der Zelle diffus verteilt, bei der Zugabe von **Deltauncin** hingegen lokalisierten diese mehr in den Endomembranen. Dies liegt an der Freisetzung der lipidierten Proteine nach der Inhibition von UNC119 durch **Deltauncin** und der anschließenden Lokalisation der lipidierten Proteine von UNC119 an Endomembranen. Dies ist ebenfalls am Anstieg der lokalen Fluoreszenz sichtbar (Abb. 2.35 A-C). Diese Beobachtung bestätigt, dass **Deltauncin** die Interaktion von UNC119a/b und PDE δ mit Src bzw. RHEB inhibiert. Zusätzlich zeigte dieses Experiment, dass der Inhibitor zellgänig ist und seine Aufgabe in Zellen erfüllt, was für weitere zelluläre Experimente eine wichtige Grundlage war.

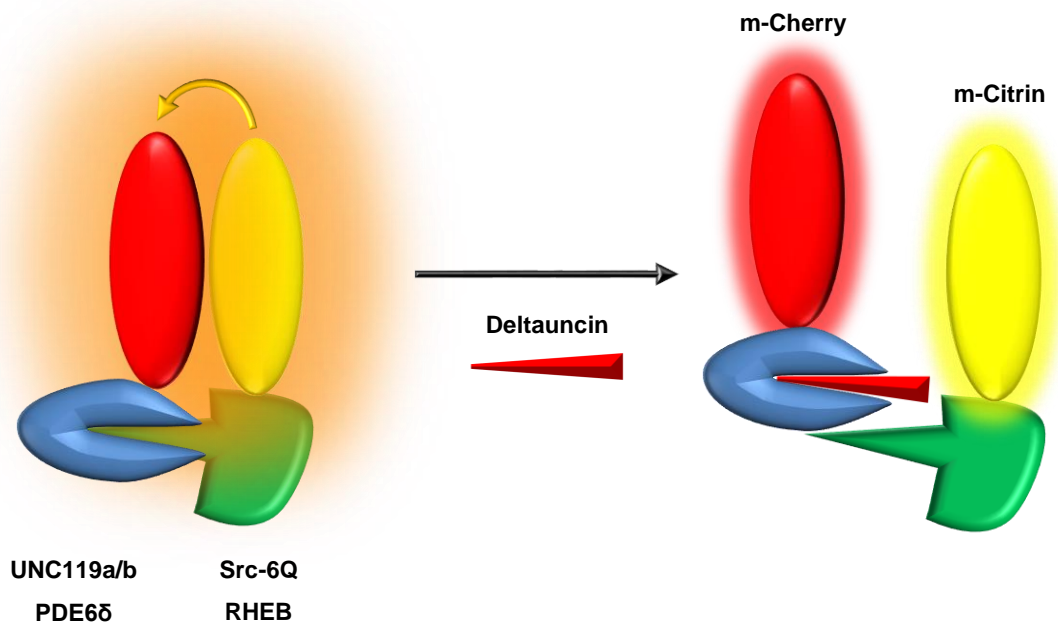


Abb. 2.34. Prinzip des FLIM-FRET Experiments.

Weiterhin können über eine **Deltauncin**-Titration und die ermittelten α -Werte ein „In-Zellen“- K_d von UNC119a/b und PDE δ bestimmt werden (**Abb. 2.35 E**). Auffällig war, dass der zelluläre K_d von **Deltauncin** an UNC119a ($938,2 \pm 35,9$ nM) höher als für UNC119b ($144,1 \pm 9,45$ nM) war. Beobachtet wurde zudem, dass im intrazellulären Kontext die Bindung von PDE δ ($708,2 \pm 105,9$ nM) besser war als bei UNC119a, was widersprüchlich zu den gemessenen K_d -Werten des jeweiligen Proteins aus **Kapitel 2.3.3** ist. Dies kann durch strukturelle Veränderung durch das Anhängen der Fluorophore oder anderer zellulärer Faktoren erklärt werden. ¹¹⁴

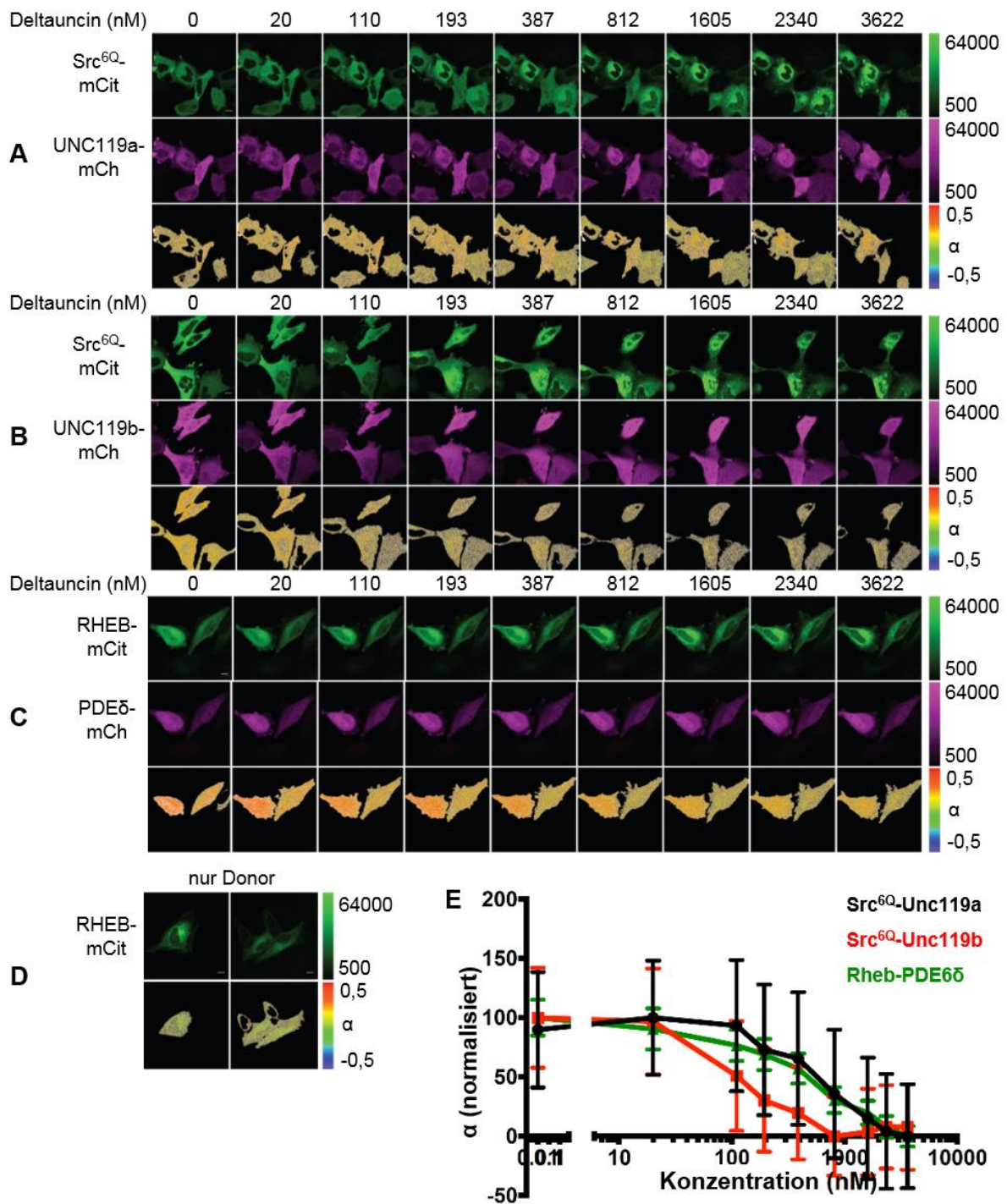


Abb. 2.35. FRET-FLIM Experiment von mCitrine-Src-6Q mit mCherry-UNC119a/b bzw. mCitrine-RHEB mit PDE δ nach Behandlung mit Deltauncin. Behandlung von mCitrine-Src-6Q und mCherry-UNC119a (A) bzw. mCherry-UNC119b (B) oder mCitrine-RHEB-PDE δ (C) mit **Deltauncin** in Konzentrationen, die über den Aufnahmen zu sehen sind. Es sind der mCitrine- (jeweils erste Reihe), der mCherry- (jeweils zweite Reihe) sowie der FRET-Kanal (jeweils dritte Reihe) angegeben. FLIM-Werte sind durch α -Werte repräsentiert. Die Donor-Kontrolle ist in D zu sehen. Für die Berechnung der In-Zellen-K_d-Werte wurden die α -Werte normalisiert und gegen die Konzentration aufgetragen (E; K_d für **Deltauncin-Src-6Q-UNC119**: 938,2 ± 35,9 nM (n=21), **Deltauncin-Src-6Q-UNC119b**: 144,1 ± 9,45 nM (n=26) und **Deltauncin-RHEB-PDE δ** : 708,2 ± 105,9 nM (n=20)).

2.3.6 Einfluss von Deltauncin auf die Relokalisierung von Src

Nach erfolgreichem Beweis der Inhibition von UNC119 durch **Deltauncin**, sollte anschließend die Relokalisierung von Src aus Membranen nach Behandlung mit **Deltauncin** studiert werden. Der Hintergrund war, dass nach Inhibition von UNC119 Src an der Plasmamembran weniger an der Endomembran vorhanden sein sollte. Dies sollte zusätzlich das FLIM-FRET Experiment stützen. Src-abhängige HT29-Zellen¹¹⁵ wurden mit verschiedenen Konzentrationen von **Deltauncin** behandelt, fixiert und Src immunfluoreszent angefärbt (**Abb. 2.36 A**, durchgeführt durch Dr. Antonios Konitiotis am MPI Dortmund). Die Analyse der Verteilung von Src ist in **Abb. 2.36 B** gezeigt. Wie zu erwarten war eine dosisabhängige, Endomembran-gebundene Fraktion von Src zu detektieren. Eine der Schwierigkeiten dieses Experiments bestand darin, relativ viel Inhibitor zu nutzen, obwohl UNC119 bereits bei niedrigeren Konzentrationen als 12,5 μM gesättigt sein sollte, da der K_d -Wert im niedrigen nanomolaren Bereich ist. Ein deutlicher Effekt trat aber erst mit hoher Konzentration (50 μM) von **Deltauncin** ein. Dies kann an verschiedenen Zelltypen der Experimente und transfizierte verglichen zu nicht-transfizierte Zellen liegen (HT29 vs. HeLa).

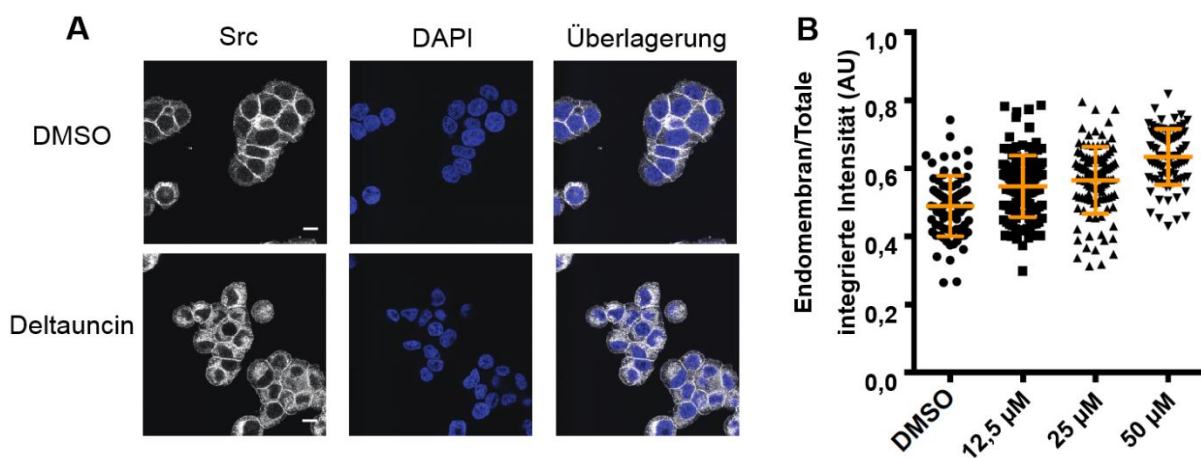


Abb. 2.36. Intrazelluläre Verteilung von Src. A: Aufnahme von mit Src-Immunfluoreszenz gefärbten HT29-Zellen, die mit DMSO oder 50 μM **Deltauncin** behandelt wurden. HT29-Zellen wurden entweder mit DMSO oder 50 μM **Deltauncin** behandelt. **B:** Verteilung von Src an Endomembranen in HT29-Zellen. Analyse von immunfluoreszent markiertem Src und dessen Verteilung in der Zelle nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von **Deltauncin**.

2.3.7 Einfluss von Deltauncin auf den Phosphorylierungsgrad von Src

In **Kapitel 2.3.5** und **2.3.6** konnte gezeigt werden, dass **Deltauncin** UNC119a/b blockiert und damit auch die subzelluläre Lokalisation von Src verändert. In der Literatur³⁸ ist bekannt, dass nicht-myristoyliertes bzw. nicht-membrangebundenes Src weniger autophosphoryliert vorliegt. Dies ist ein Indikator für eine verringerte Kinaseaktivität. Um zu überprüfen, ob dies auch der Fall nach **Deltauncin**-Behandlung war, wurde ein „*in-cell*“ Western verwendet. Hierbei wurde in MDA-MB-231-Zellen, in den Src überaktiv ist, das Verhältnis von phospho-Y416 Src (pY416-Src) zu totalem Src (tSrc) betrachtet. Hierzu wurden pSrc und tSrc durch verschiedene Antikörper markiert und anschließend durch fluoreszierende, sekundäre Antikörper in einem Plattenleser detektiert. Y416 von Src wird autokatalytisch phosphoryliert, wobei weniger Aktivität ein Rückgang der Y416-Phosphorylierung bedeuten würde. Dies würde sich in einer niedrigen pSrc/tSrc-Verhältnis widerspiegeln.

Das Ergebnis der Titration von **Deltauncin** ist eine dosisabhängige Verringerung der Y416-Phosphorylierung (**Abb. 2.37**, durchgeführt durch Guillaume Garivet am MPI Dortmund). Bemerkenswert ist, dass **Deltauncin** bei der gleichen Konzentration wie Dasatinib (78 nM), ein direkter, potenter SFK-Kinaseinhibitor, eine vergleichbare Reduktion der Phosphorylierung von Src zeigte (Vgl. $48 \pm 15\%$ Dasatinib zu $49 \pm 5\%$ **Deltauncin**).

Trotz hoher Konzentrationen an **Deltauncin** konnte dennoch kein komplettes Herabsetzen des pSrc/tSrc-Verhältnisses herbeigeführt werden, was auf evtl. unbekannte Feedback-Mechanismen zurückzuführen war. Auch kann ein Erhöhen der Src-Expression in diesem Fall ausgeschlossen werden, da die Inkubationszeit mit unter 30 Min. deutlich unter einem Rückkopplungsprozess für die Transkription liegt.¹¹⁶

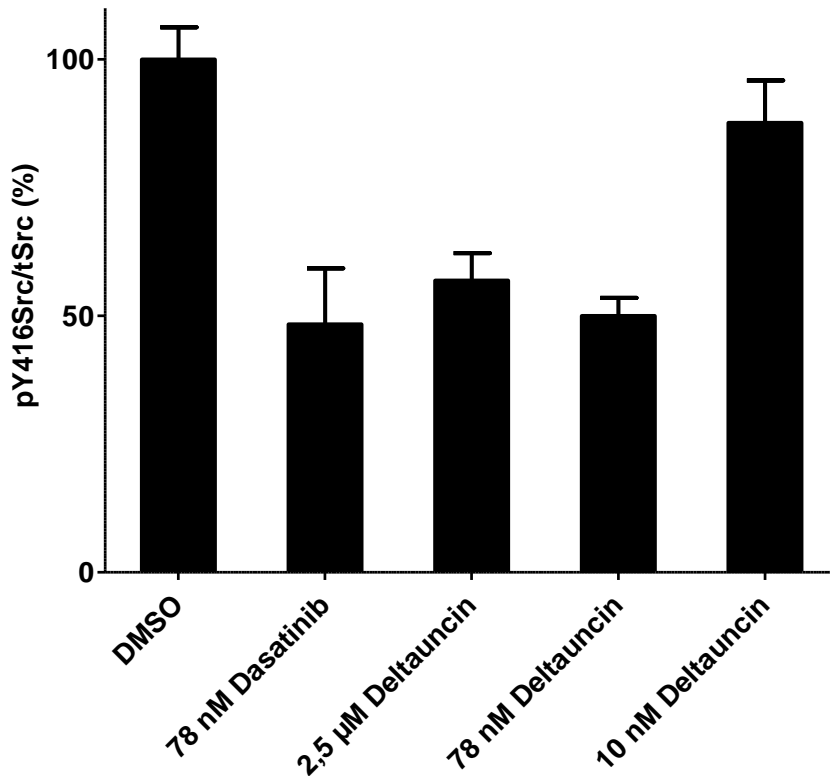


Abb. 2.37. Einfluss von Deltauncin auf die Y416-Phosphorylierung von Src in MDA-MB-231-Zellen. MDA-MB-231-Zellen wurden 30 Min. mit angegebener Inhibitoren-Konzentration behandelt und anschließend immunofluoreszent auf Src und pY416Src gefärbt. Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

2.3.8 Einfluss von Deltauncin auf die Zellmigration

Da eine verringerte Autophosphorylierung von Src gezeigt werden konnte, wurde von einer gesenkten Aktivität von Src ausgegangen. Ein Phänotyp der Verringerten Aktivität von Src ist eine Verhinderung der Migration der Zellen.¹¹⁷ Dies kann in einem Migrationsexperiment, auch Wundheilungsassay nachgewiesen werden. Dabei wurde ein konfluenter Zellrasen mit Src-sensitiven MDA-MB-231-Zellen mittels eines spitzen Gegenstandes definierter Breite verletzt und die Konfluenz der Wunde mit einem automatisierten Mikroskop jede Stunde verfolgt (**Abb. 2.38**). Bei der Negativkontrolle (DMSO) war die Verletzung nach etwa 15 h geheilt. Dabei wurde davon ausgegangen, dass nicht die Proliferation, sondern die Migration eine größere Rolle spielte. Als Positivkontrolle wurde Dasatinib verwendet. Hier war nach über 20 h kaum Wundschließung zu beobachten. Bei **Deltauncin** hingegen deckte sich der Effekt mit der DMSO-Kontrolle. Der fehlende Einfluss auf die Migration kann auf drei Faktoren zurückzuführen sein: entweder eine Resistenz gegen die Substanz durch z. B. Efluxpumpen¹¹⁸,¹¹⁹, ein unbekannte Feedbackmechanismen, die Src/SFKs oder Signalwege der Migration

weiterhin funktionstüchtig halten oder der Einfluss von **Deltauncin** ist nicht groß genug, um eine Migration zu verhindern.

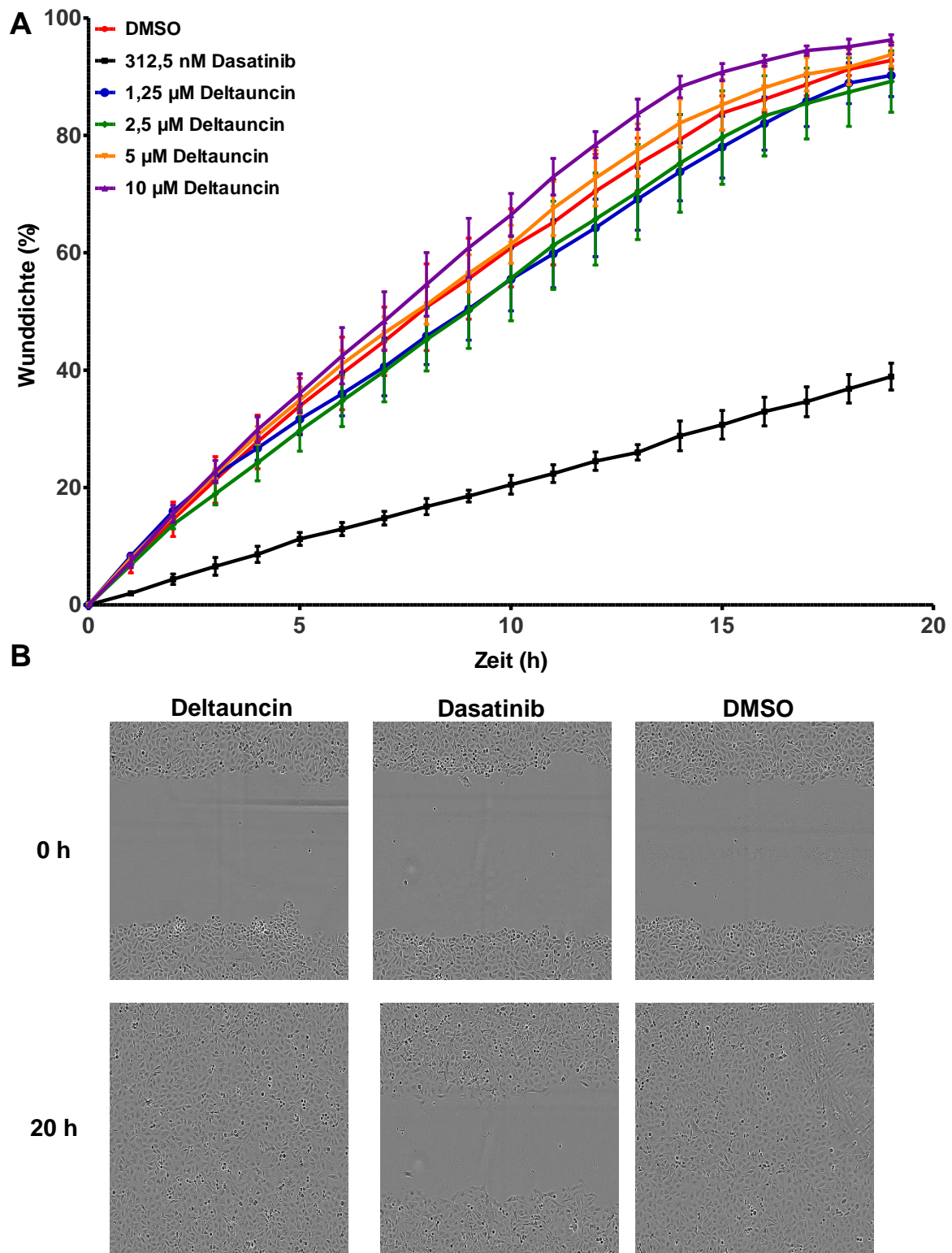


Abb. 2.38. Einfluss von Deltauncin auf die Migration von MDA-MB-231 nach 20 h Behandlung mit Deltauncin. A: Bilder der Zellen wurden jede Stunde mit dem IncuCyte Zoom-System aufgenommen und die Konfluenz der Wunde ermittelt. **B:** Bilder von Zellen, die mit **Deltauncin** (10 µM), Dasatinib (312,5 nM) und DMSO (0,1 %) behandelt wurden nach 0 und 20 h. Als Kontrolle für die Migration diente Dasatinib.

2.3.9 Einfluss von Deltauncin auf die Koloniebildung und Zellproliferation

Da keiner der bekannten Phänotypen nach Inhibition von Src eingetreten war, wurde die Proliferation von Src-sensitiven und damit **Deltauncin**-sensitiven Krebszellen in Betracht gezogen. Dabei wurde zunächst die Koloniebildung studiert. Hierbei kann neben der Proliferation (Hofgröße) auch ein Rückschluss auf das Überleben einzelner Klone rückgeschlossen werden.¹²⁰ Es wurden Src-sensitive MDA-MB-231-Brustkrebszellen und HT29-Kolonkarzinomzellen verwendet, da in den meisten Dickdarmkarzinomen Src überaktiv ist.¹²¹ Die Zellen wurden zehn Tage lang mit **Deltauncin** und einem selektiven UNC119-Inhibitor **11** behandelt. Der potente, selektive Inhibitor **11** ist strukturell nahe an **Deltauncin** angelehnt, ist aber kein PDE δ -Inhibitor, sondern ausschließlich ein selektiver UNC119-Inhibitor. Die Ergebnisse sind in **Abb. 2.40** zusammengefasst.

Es konnte eine Reduktion der Kolonienanzahl nach Behandlung mit **Deltauncin** beobachtet werden, wobei ein stärkerer Effekt für HT29- im Vergleich zu MDA-MB-231-Zellen zu erkennen war. Dies konnte auf mögliche Resistenzen z. B. in den MDA-MB-231-Zellen zurückgeführt werden.^{118, 119} In der Brustkrebszelllinie wurden die Kolonienreduktion auch im Fall von **11** nachgewiesen, wohingegen kein Effekt in HT29-Zellen nach Behandlung mit **11** zu sehen war. Im Falle beider Inhibitoren konnte eine qualitative Reduktion der Höfe der MDA-MB-231-Zellen dosisabhängig erkannt werden, was auf ein verringertes Zellwachstum schließen lässt. Da die Kolonien der HT29-Zellen zu klein waren, konnte dies nicht für diese Zelllinie bestätigt werden. Eine Gegenüberstellung von **Deltauncin** mit dem selektiven Inhibitor zeigt einen stärkeren Effekt im Falle des dualen Inhibitors. Da **Deltauncin** auch PDE δ zusätzlich blockiert, kann die Inhibition eines weiteren Chaperons zur höheren Effektivität in Zellen führen. Speziell im Falle der HT29-Zellen, die von Src aber nicht von KRAS^{121, 122} abhängig sind, muss scheinbar eine duale Inhibition erfolgen, um sogar überhaupt einen Effekt zu sehen. Diese Hypothese sollte in weiteren Proliferationsexperimenten besonders im Bezug zu KRAS abhängige Zellen untersucht werden.

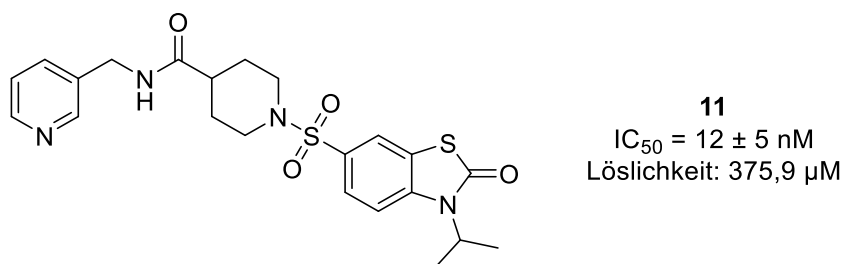


Abb. 2.39. Struktur, IC₅₀ im *homogeneous time-resolved fluorescence* Experiment und Löslichkeit des selektiven UNC119-Inhibitors **11**.

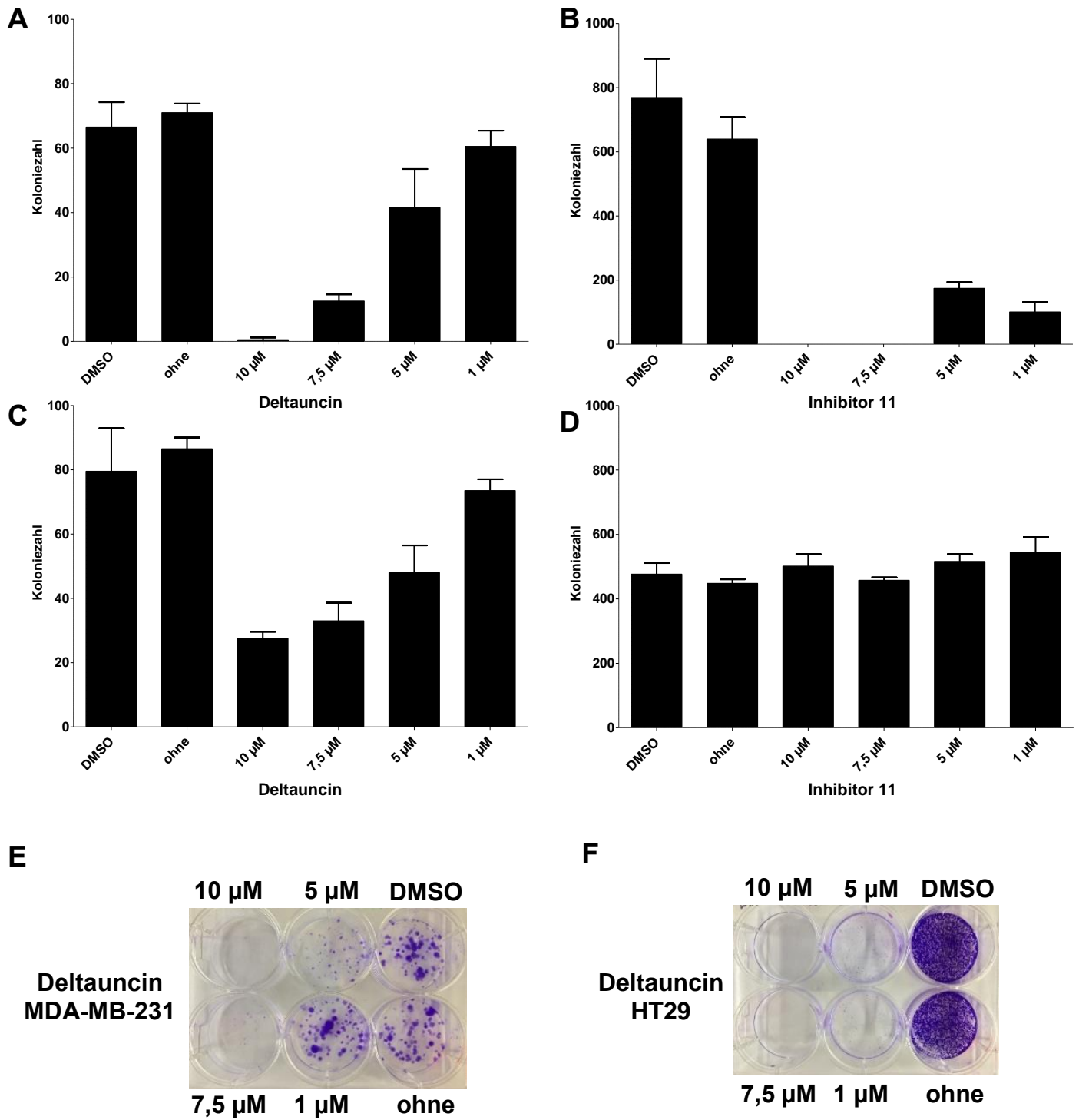


Abb. 2.40. Einfluss von Deltaauncin und 11 auf die Bildung von Kolonien. MDA-MB-231-Zellen (A, C) oder HT29-Zellen (B, D) wurden mit **Deltaauncin** (A, B) bzw. mit **11** (C, D) zehn Tage behandelt und die Kolonien gezählt. E und F sind Bilder nach Behandlung mit **Deltaauncin** entsprechender Konzentrationen nach 10 Tagen.

2.3.10 Einfluss von Deltauncin auf das Wachstum von Src-sensitiven Zelllinien

Um die Ergebnisse des Koloniebildungsexperiments zu untermauern, wurden MDA-MB-231- und HT29-Zellen drei Tage mit **Deltauncin** oder **11** behandelt (Abb. 2.41), um deren Wachstum mithilfe des Lebendzellanalyse-System IncuCyte ZOOM zu studieren. Wie die Koloniegröße in **Kapitel 2.3.9** sollte das Wachstum der Zellen entweder mit höherer Inhibitorkonzentration abnehmen bzw. mit der Anfangskonfluenz gleich sein. Stattdessen wurde das Wachstum nach Behandlung mit UNC119-spezifischem Inhibitor **11** gar nicht beeinträchtigt. Im Falle von **Deltauncin** konnte nur in hohen Dosen (10 μM bei MDA-MB-231 bzw. 12 μM bei HT29) eine Wirkung beobachtet werden. Diese Ergebnisse decken sich mit denen des Migrationsversuchs (**Kapitel 2.3.8**).

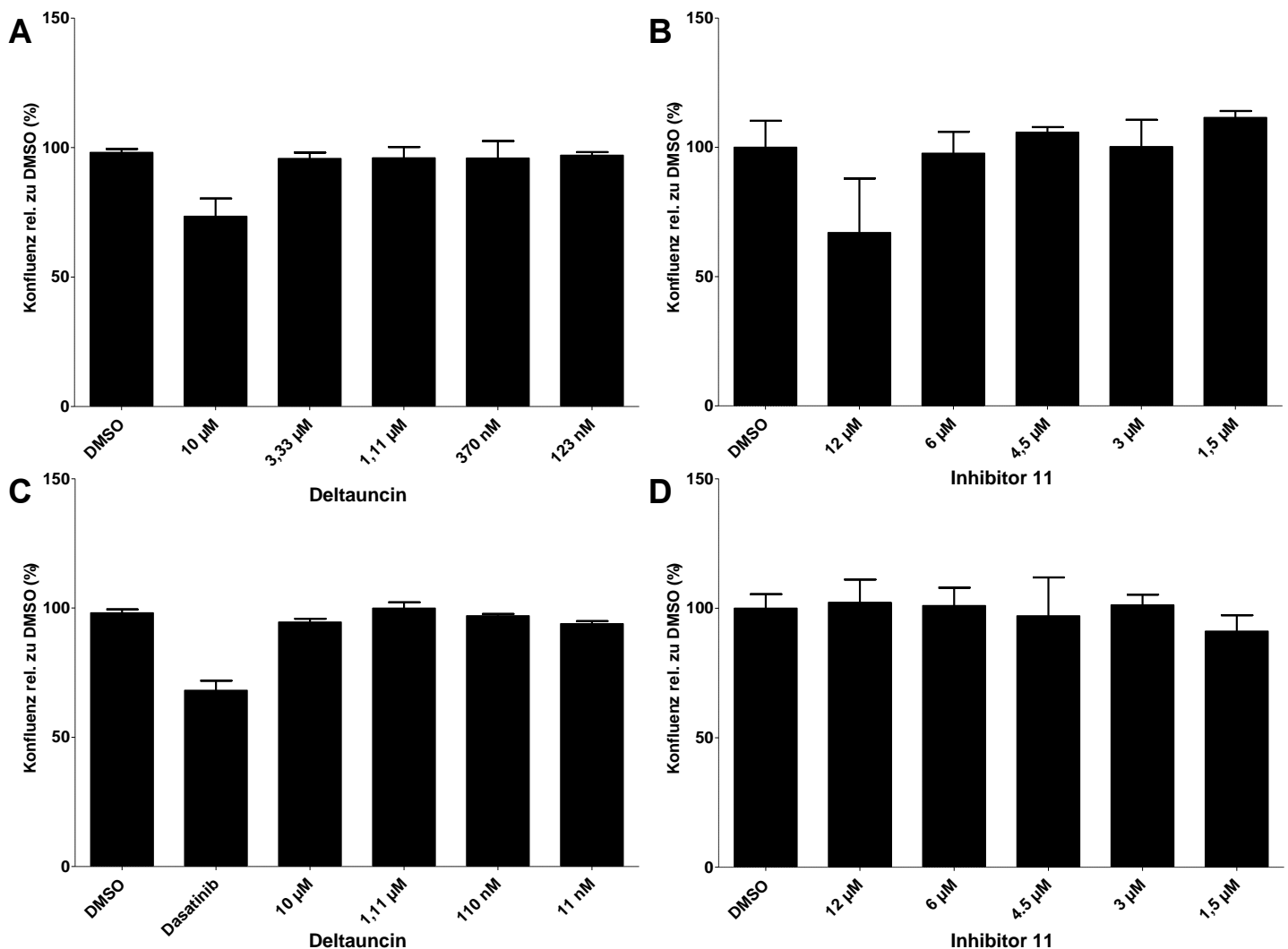


Abb. 2.41. Einfluss von Deltauncin und 11 auf das Wachstum von MDA-MB-231- und HT29-Zellen mit Konfluenz als Detektionsmethode nach 48 h. MDA-MB-231- (A, C) und HT29-Zellen (B, D) wurden drei Tage mit **Deltauncin** (A, B) oder **11** (C, D) behandelt. Die Zellen wurden drei Tage im IncuCyte beobachtet, wobei die Konfluenz für die DMSO-Kontrolle auf 100 % Konfluenz am Endpunkt gesetzt wurde. Für das Konfluenzplateau (nach 48 h) wurde die Konfluenz relativ zu DMSO angegeben. 1 μM Dasatinib diente als Positivkontrolle. Repräsentative Kurven können **Abb. 2.42** und **Abb. 2.43** entnommen werden.

Der auftretende Unterschied zwischen dem Wachstumsexperiment und dem Koloniebildungsexperiment kann an der verschiedenen Methodik liegen. Im Falle des Koloniebildungsexperiments wurden Zellen sehr dünn ausgesät, was diese evtl. anfälliger für **Deltauncin** macht. Dies kann auf fehlende Zell-Zell-Kontakte zurückgeführt werden.¹²³ Ein anderer Faktor ist, dass die Zellen im Kolonieformationsversuch zehn statt drei Tage mit Substanzen behandelt wurden, was wiederum Langzeiteffekte hervorrufen könnte.

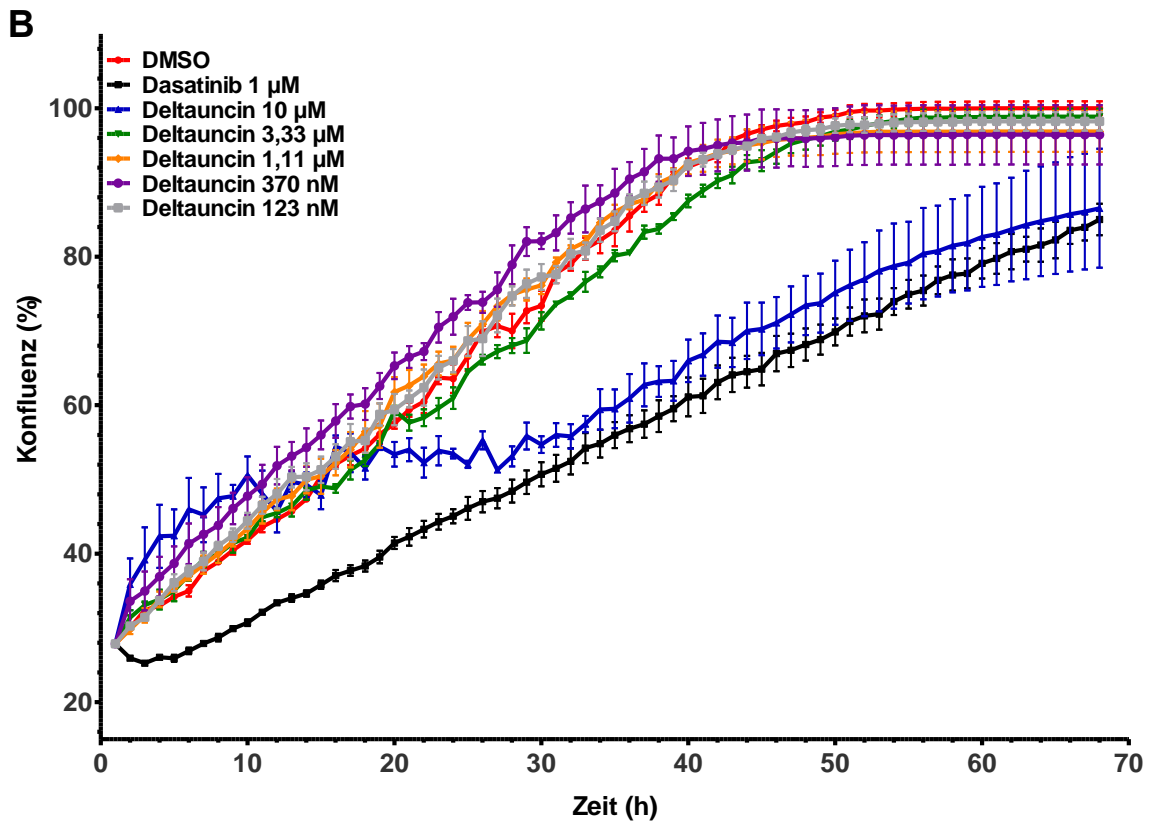
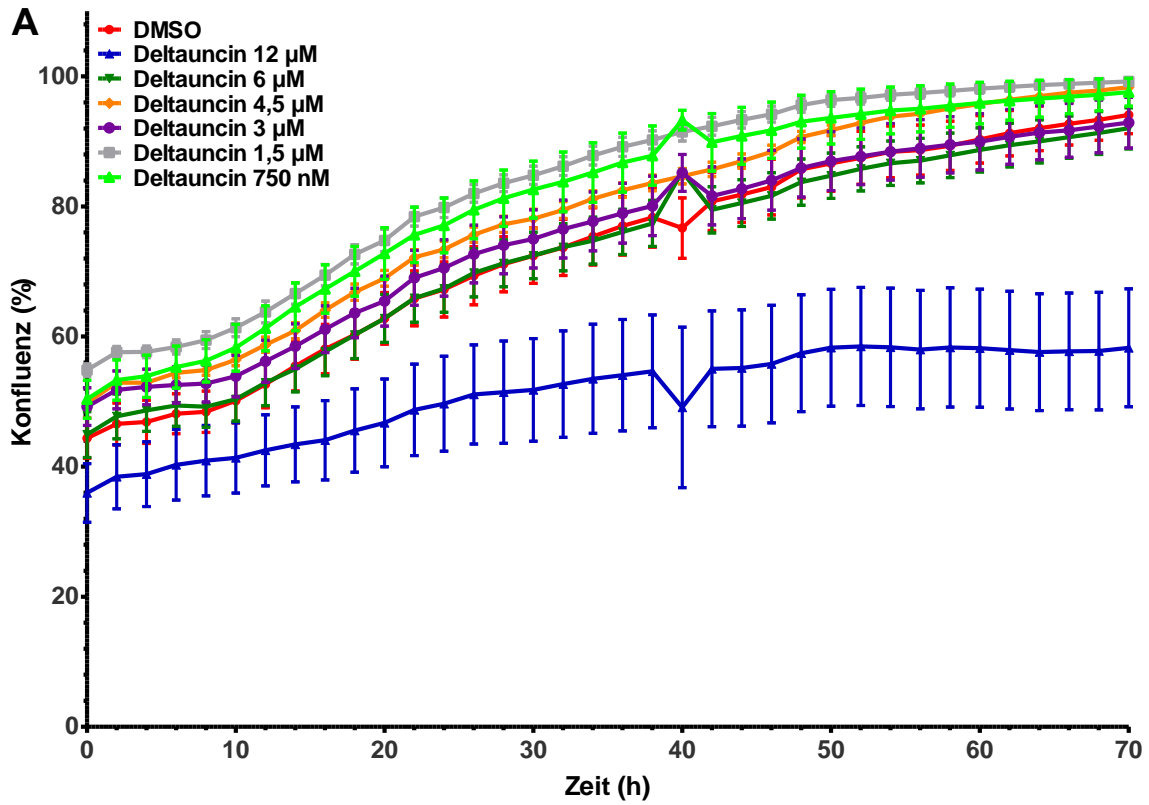


Abb. 2.42. Einfluss von Deltauncin auf die Konfluenz von HT29- (A) und MDA-MB-231-Zellen (B) nach 70 h Behandlung mit Deltauncin. Bilder der Zellen wurden alle 2 h (HT29) bzw. jede Stunde (MDA-MB-231) mit dem IncuCyte Zoom-System aufgenommen und die Konfluenz ermittelt. Die Konfluenzwerte nach 48 h können Abb. 2.41 entnommen werden. Als Kontrolle diente Dasatinib.

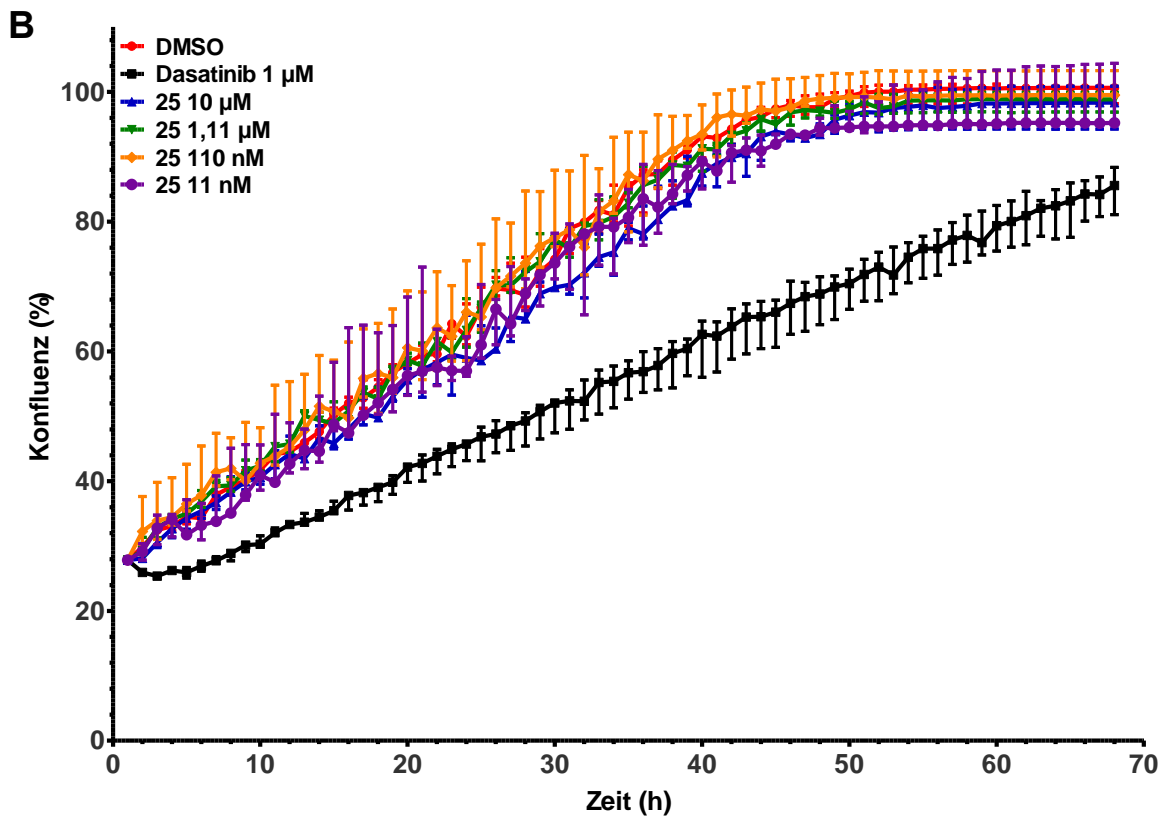
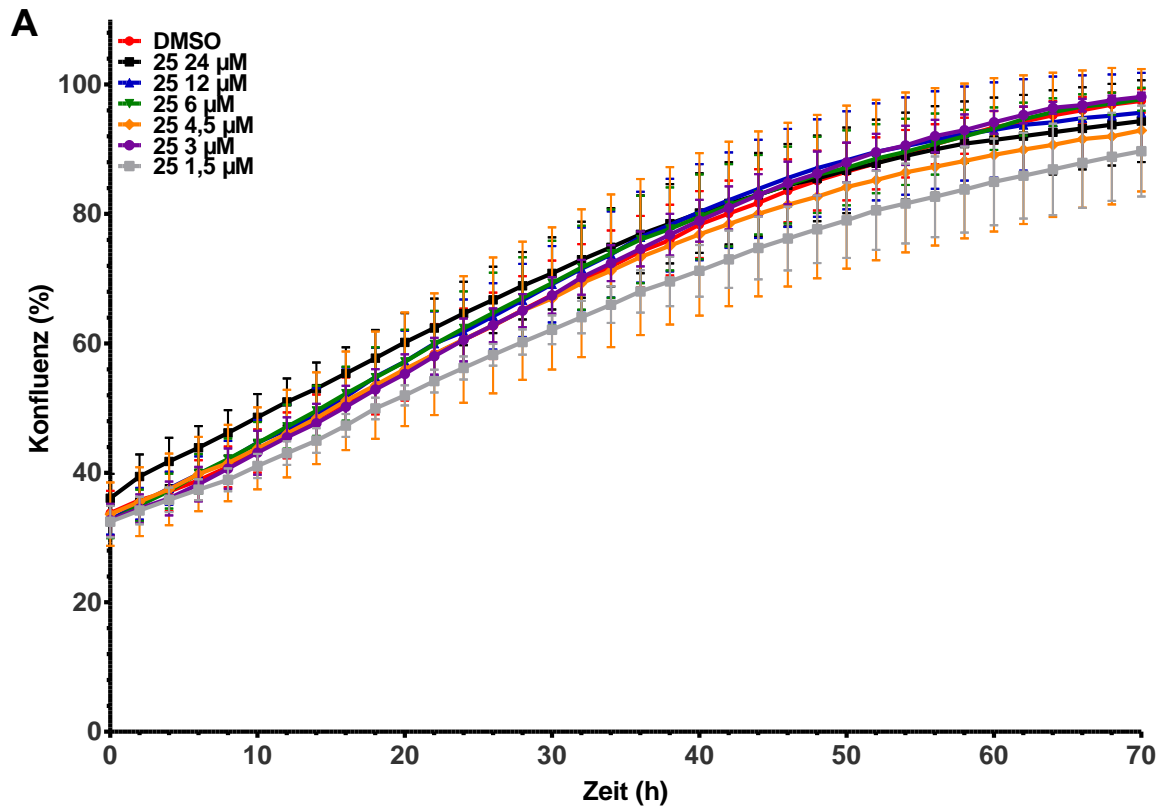


Abb. 2.43. Einfluss von 11 auf die Konfluenz von HT29- (A) und MDA-MB-231-Zellen (B) nach 70 h Behandlung mit Deltauncin. Bilder der Zellen wurden alle 2 h (HT29) bzw. jede Stunde (MDA-MB-231) mit dem IncuCyte Zoom-System aufgenommen und die Konfluenz ermittelt. Die Konfluenzwerte nach 48 h können Abb. 2.41 entnommen werden. Als Kontrolle diente Dasatinib.

2.3.11 Einfluss von Deltauncin auf das Wachstum von RAS-sensitive Zelllinien

Da **Deltauncin** neben der indirekten Inhibition von Src auch das Protoonkogen KRAS indirekt inhibieren sollte, wurden KRAS-abhängige und unabhängige Krebszelllinien verwendet. Wenn PDE δ inhibiert wird, kann (K)RAS nicht mehr an der Zellmembran angereichert werden und somit (K)RAS weniger stark aktiv werden. Ist eine Zelllinie (K)RAS-abhängig und PDE δ ist inhibiert, sollte keine Proliferation mehr erfolgen. In diesem Experiment wurden die Zelllinien Panc-I (RAS-unabhängig/RAS-mutiert), BxPC3 (RAS-unabhängig/wildtyp), Panc-Tu-I (RAS-abhängig/RAS-mutiert), MiaPaCa 2 (RAS-abhängig) bzw. HCT116 (RAS-abhängig) verwendet.^{97, 124} Die ersten vier genannten Zelllinien sind aus Bauchspeicheldrüsenkrebs, HCT116-Zellen wurden aus einem Kolonkarzinom isoliert und sollten als Src-unabhängige Negativkontrolle für Inhibitor **11** dienen.

Wie zu erwarten, war **Deltauncin** dosisabhängig toxisch für KRAS-abhängige Zelllinien. Als Positivkontrolle wurde *S*-Deltazinon 1 eingesetzt, das selektiv PDE δ inhibiert und in KRAS-abhängigen Zellen einen toxischen Effekt zeigt.⁹⁷ Dies liegt an der Inhibierung des RAS-*Shuttlings* und damit der Signalwege, in denen RAS involviert ist.⁹⁷ **11** zeigte wie vermutet keine toxische Wirkung in allen Zellen (**Abb. 2.45**, repräsentativ in **A**). Interessanterweise wurde ein reduziertes Wachstum nach **Deltauncin**-Behandlungen in KRAS-unabhängigen Zellen bemerkt. Eine Literaturrecherche ergab, dass die KRAS-unabhängigen Zelllinien Src-abhängig sind.¹²⁵ In Anbetracht der Ergebnisse aus **Abb. 2.40** und **Abb. 2.41**, müssen auch bei den Src-abhängigen Zelllinien Panc-I und BxPC3 zwei Chaperone blockiert werden, damit eine Inhibition des Wachstums stattfindet.

Dies sollte in weiteren Experimenten, in denen **11** und *S*-Deltazinon 1 im Verhältnis 1:1 gemischt wurden, bewiesen werden (**Abb. 2.45**). In KRAS-abhängigen Panc-Tu-I konnte eine erhöhte Toxizität mit gleichzeitiger Behandlung mit beiden Inhibitoren verglichen mit den Einzelsubstanzen **11** oder *S*-Deltazinon 1 festgestellt werden. Die Wachstumsreduktion von 12 μ M der kombinierten Anwendung war ähnlich zu der, die durch 12 μ M **Deltauncin** verursacht wurde. Hingegen konnte in Panc-I-Zellen eine leichte Toxizität bei kombinierter Anwendung und kein Effekt auf BxPC3 Zellen beobachtet werden. Damit kann abschließend durch die nicht eindeutigen Ergebnisse zusammengefasst werden, dass der Grund für die hohe Toxizität von **Deltauncin** nicht ersichtlich ist.

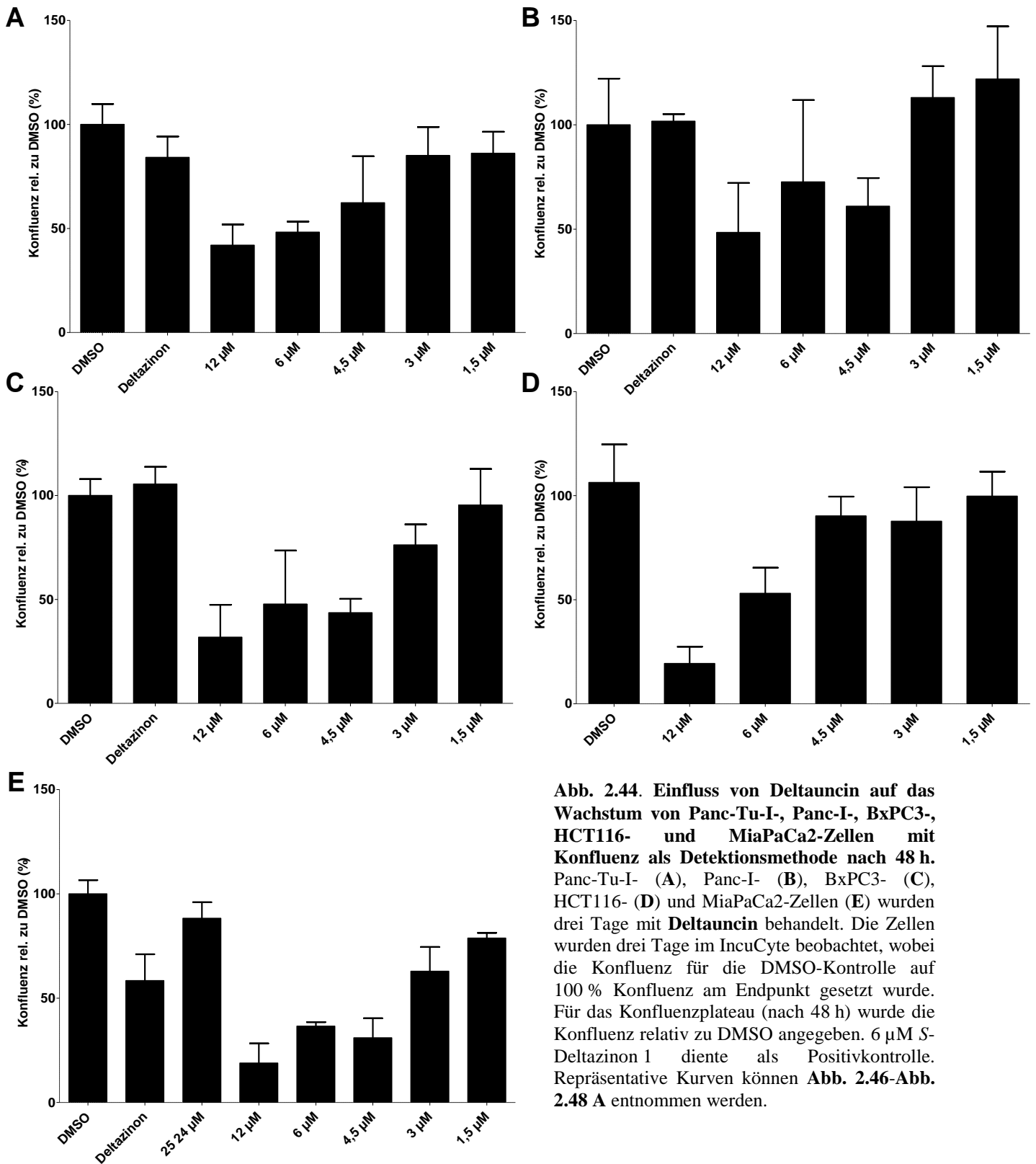


Abb. 2.44. Einfluss von Deltauncin auf das Wachstum von Panc-Tu-I-, Panc-I-, BxPC3-, HCT116- und MiaPaCa2-Zellen mit Konfluenz als Detektionsmethode nach 48 h. Panc-Tu-I- (A), Panc-I- (B), BxPC3- (C), HCT116- (D) und MiaPaCa2-Zellen (E) wurden drei Tage mit **Deltauncin** behandelt. Die Zellen wurden drei Tage im IncuCyte beobachtet, wobei die Konfluenz für die DMSO-Kontrolle auf 100 % Konfluenz am Endpunkt gesetzt wurde. Für das Konfluenzplateau (nach 48 h) wurde die Konfluenz relativ zu DMSO angegeben. 6 µM *S*-Deltazinon 1 diente als Positivkontrolle. Repräsentative Kurven können **Abb. 2.46-Abb. 2.48 A** entnommen werden.

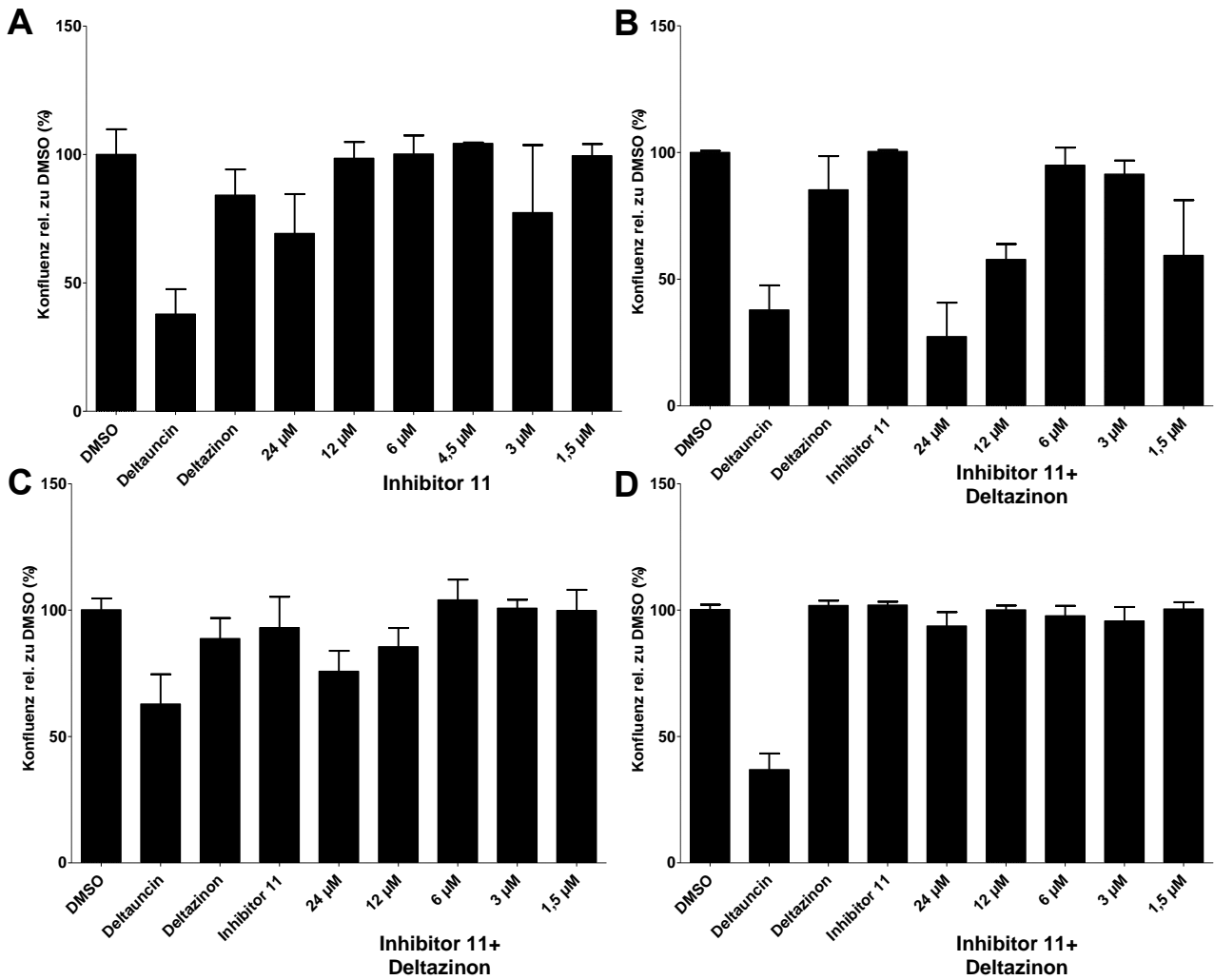


Abb. 2.45. Einfluss von **11** sowie eine 1:1 Behandlung von **11** und *S*-Deltazinon **1** auf das Wachstum von MDA-MB-231- und HT29-Zellen mit Konfluenz als Detektionsmethode nach 48 h. Panc-Tu-I-Zellen (A, repräsentativ für Panc-I und BxPC3) wurde drei Tage mit **11** behandelt. Panc-Tu-I- (B), Panc-I- (C) und BxPC3-Zellen (D) wurden drei Tage mit einer 1:1 Mischung aus *S*-Deltazinon **1** und **11** behandelt. Die Zellen wurden drei Tage im IncuCyte beobachtet, wobei die Konfluenz für die DMSO-Kontrolle auf 100 % Konfluenz am Endpunkt gesetzt wurde. Für das Konfluenzplateau (nach 48 h) wurde die Konfluenz relativ zu DMSO angegeben. 12 µM Deltauncin bzw. 6 µM *S*-Deltazinon **1** und 24 µM **11** diente als Kontrollen. Repräsentative Kurven können **Abb. 2.48 B**-**Abb. 2.50** entnommen werden.

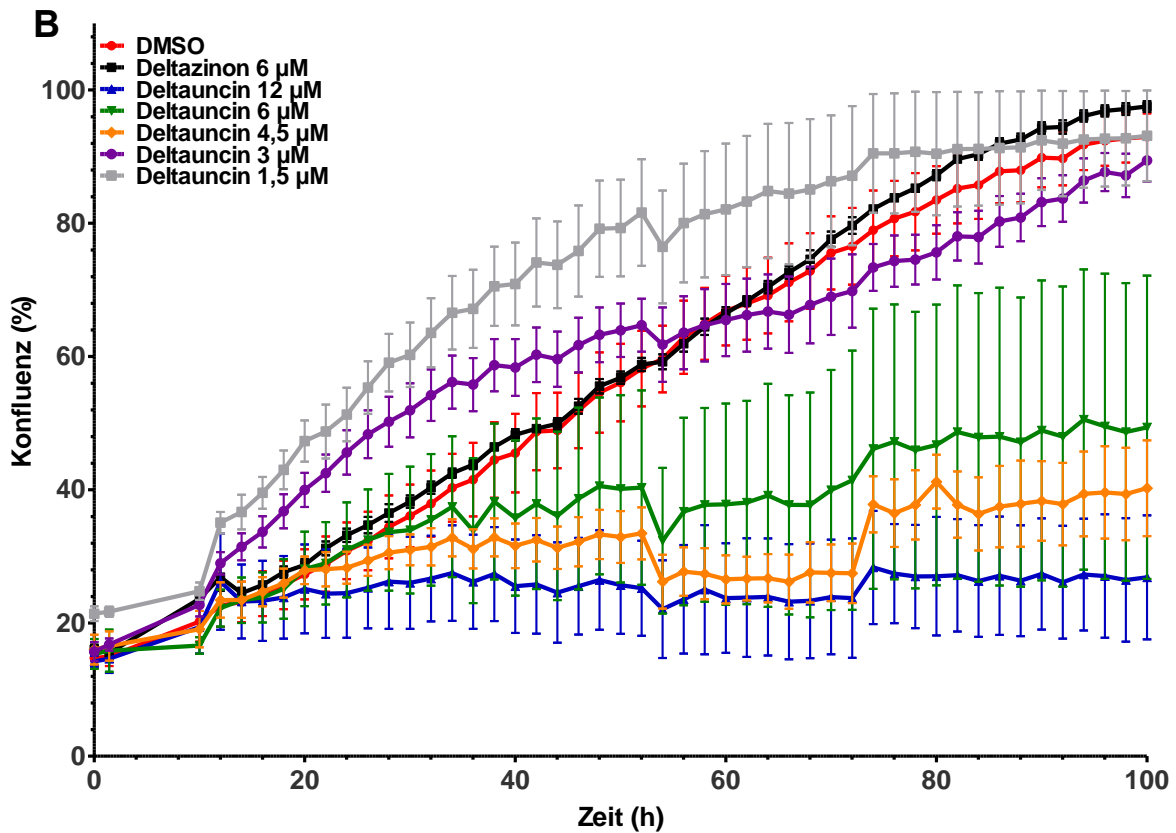
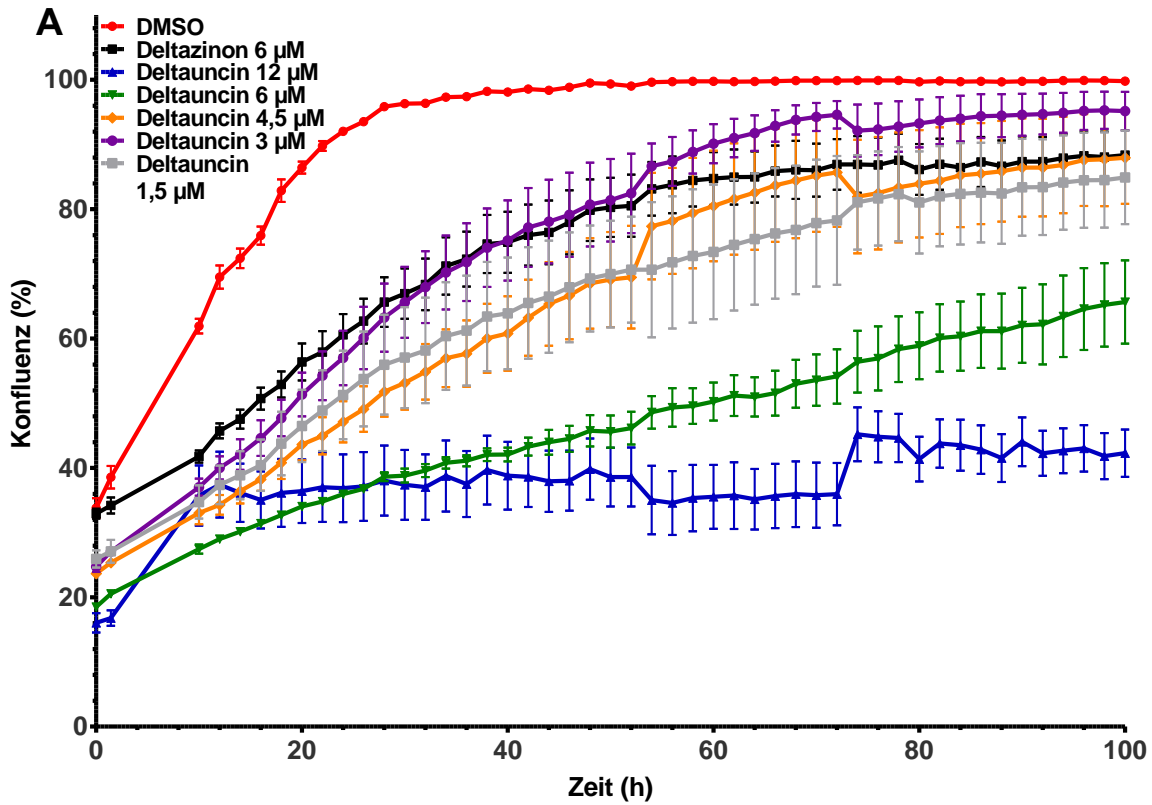


Abb. 2.46. Einfluss von Deltauncin auf die Konfluenz von Panc-Tu-I- (A) und Panc-I-Zellen (B) nach 100 h Behandlung mit Deltauncin. Bilder der Zellen wurden alle 2 h mit dem IncuCyte Zoom-System aufgenommen und die Konfluenz ermittelt. Die Konfluenzwerte nach 48 h können **Abb. 2.44** entnommen werden. Als Wachstumskontrolle für RAS-abhängige Zellen diente S-Deltazinon 1.

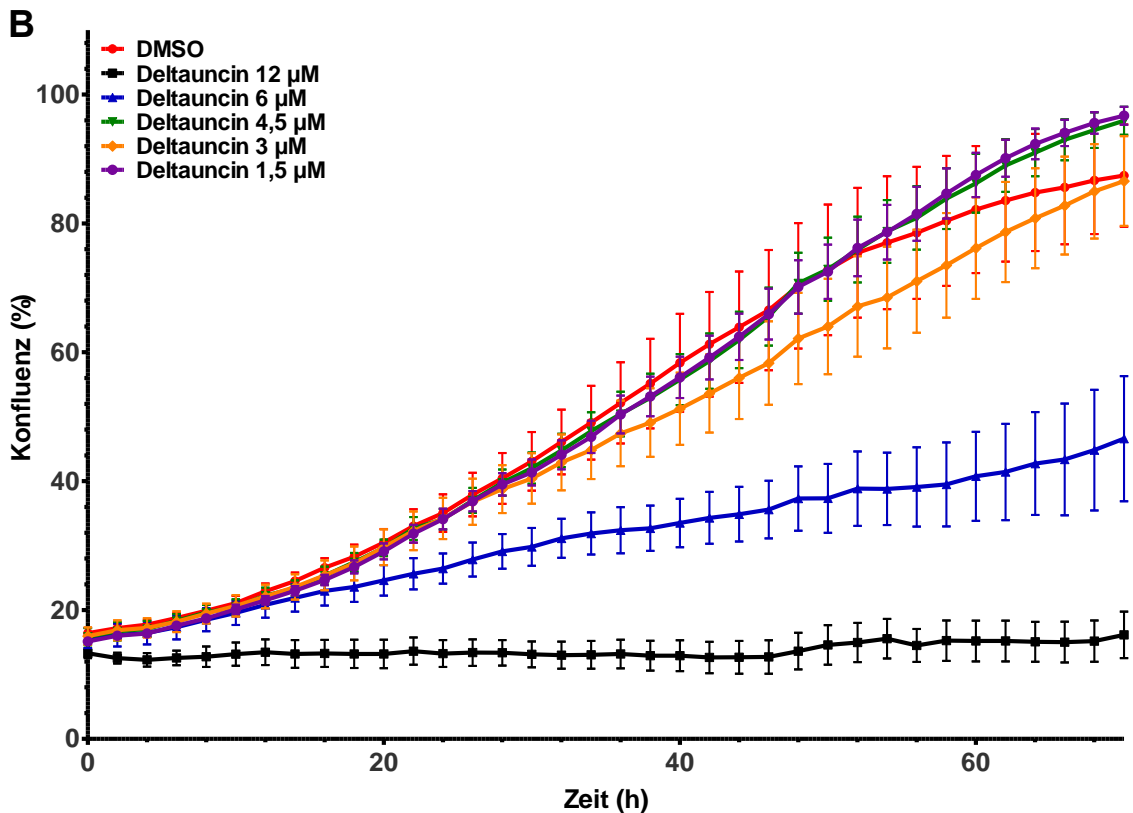
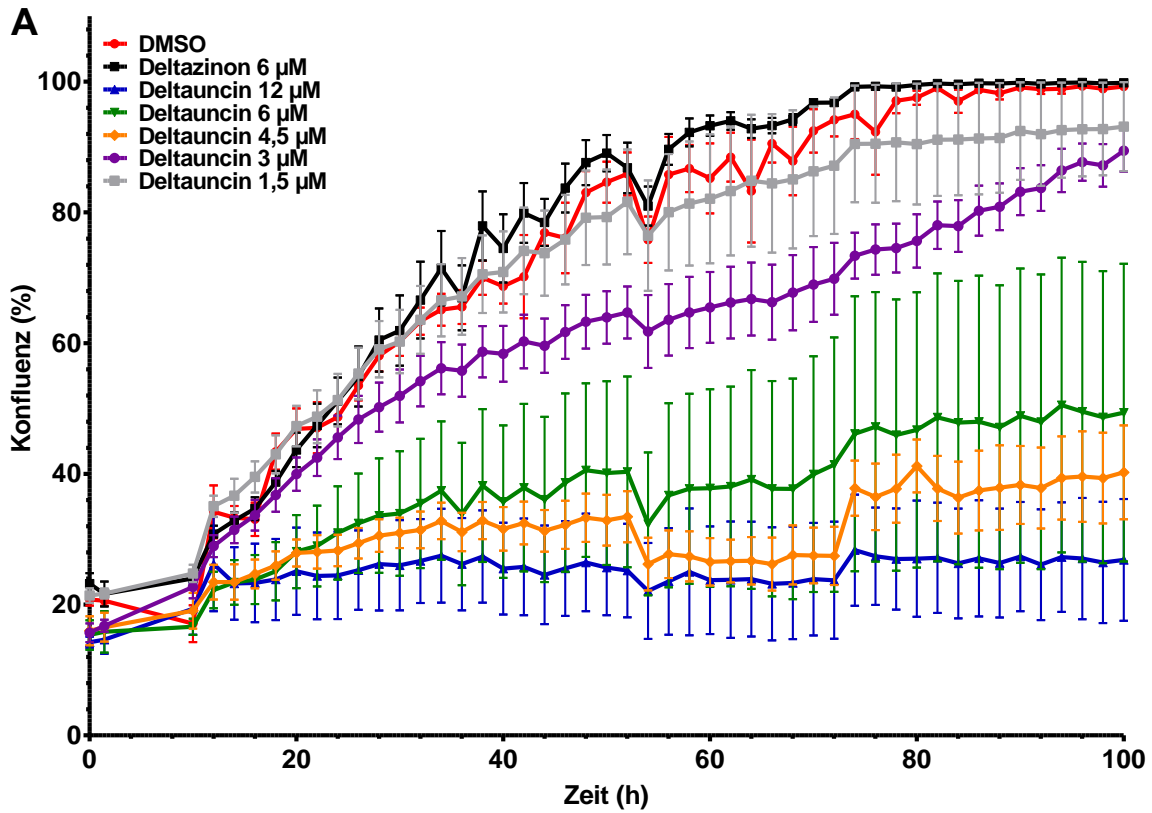


Abb. 2.47. Einfluss von Deltaucin auf die Konfluenz von BxPC3- (A) und HCT116-Zellen (B) nach 70 h Behandlung mit Deltaucin. Bilder der Zellen wurden alle 2 h mit dem IncuCyte Zoom-System aufgenommen und die Konfluenz ermittelt. Die Konfluenzwerte nach 48 h können Abb. 2.44 entnommen werden. Als Wachstumskontrolle für RAS-abhängige Zellen diente S-Deltazinon 1.

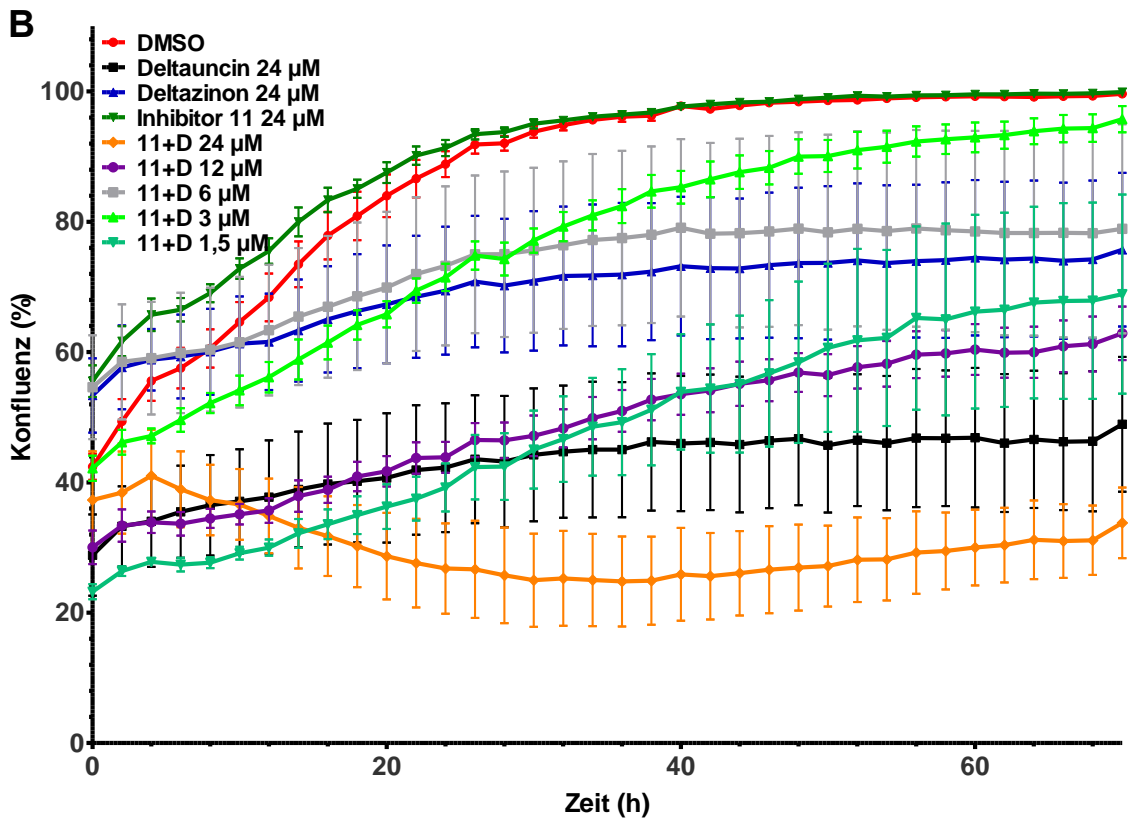
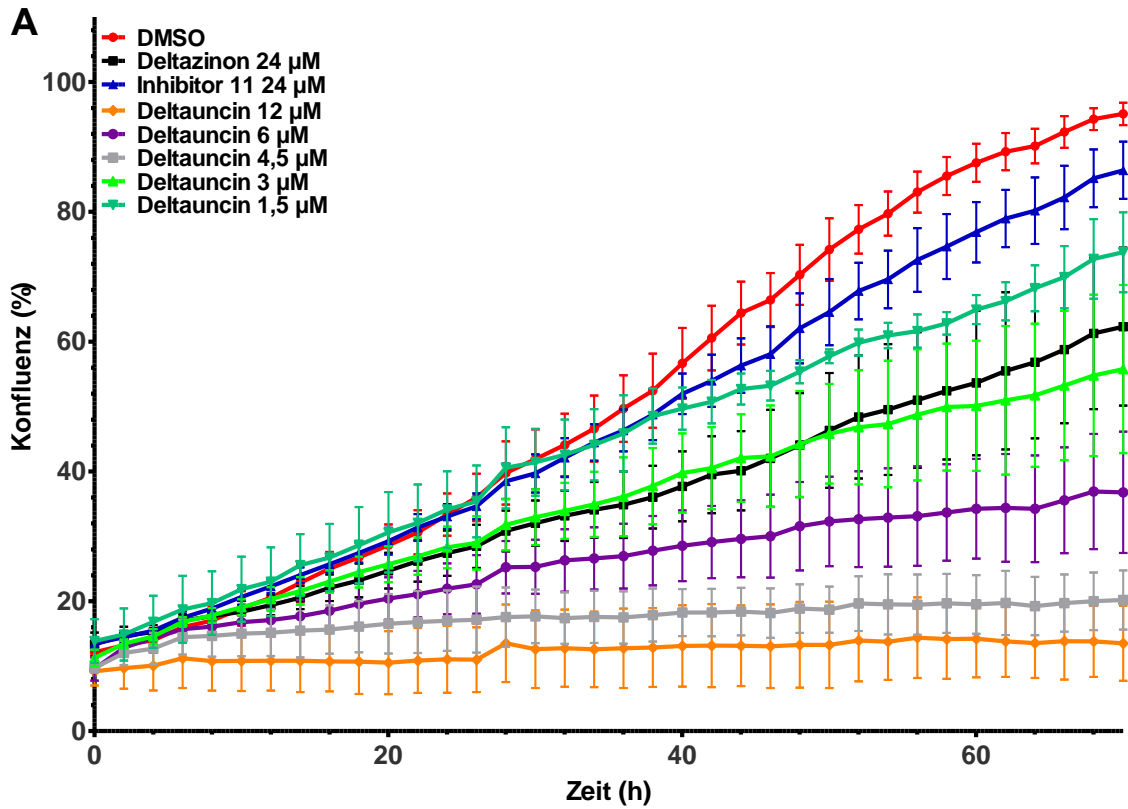


Abb. 2.48. Einfluss von Deltauncin auf die Konfluenz von MiaPaCa2- (A) und Panc-Tu-I-Zellen (B) nach 70 h Behandlung mit Deltauncin bzw. einer 1:1 Mischung von 11 und S-Deltazinon 1 (D+11). Bilder der Zellen wurden alle 2 h mit dem IncuCyte Zoom-System aufgenommen und die Konfluenz ermittelt. Die Konfluenzwerte nach 48 h können [Abb. 2.44](#) bzw. [Abb. 2.45](#) entnommen werden. Als Wachstumskontrolle Zellen dienten **Deltauncin**, **S-Deltazinon 1** und **11**.

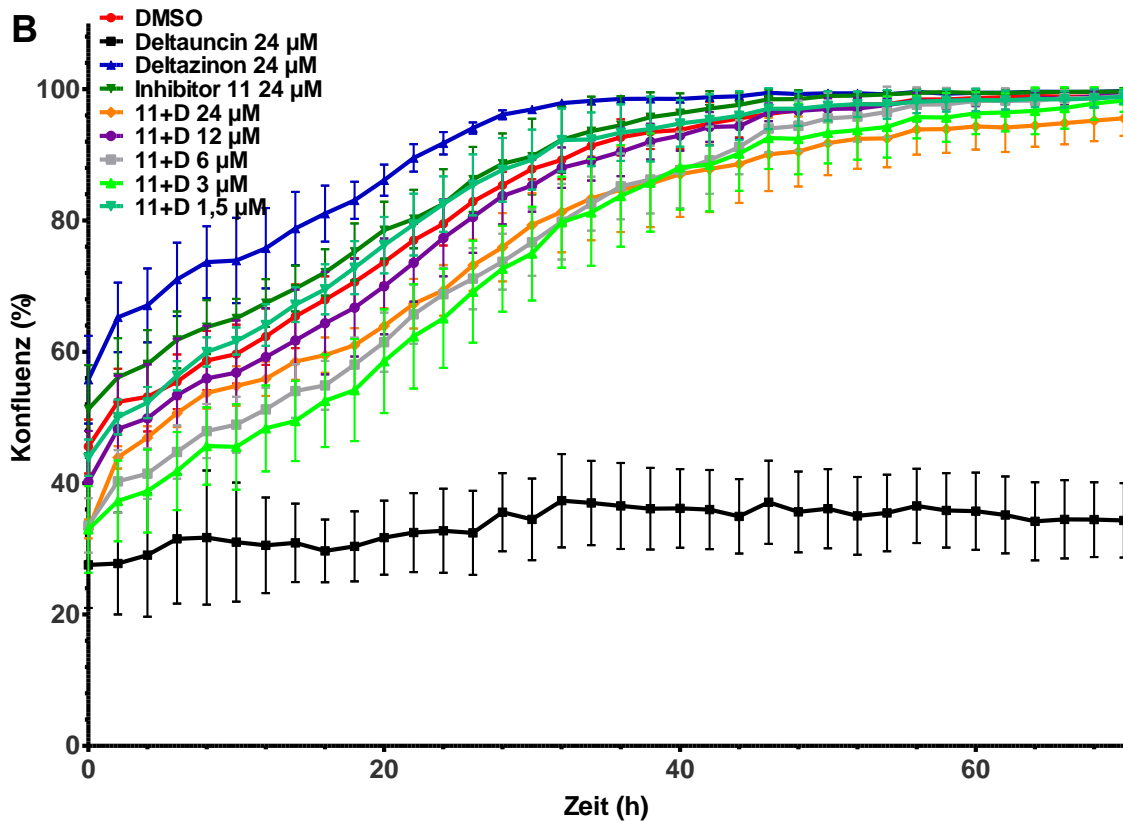
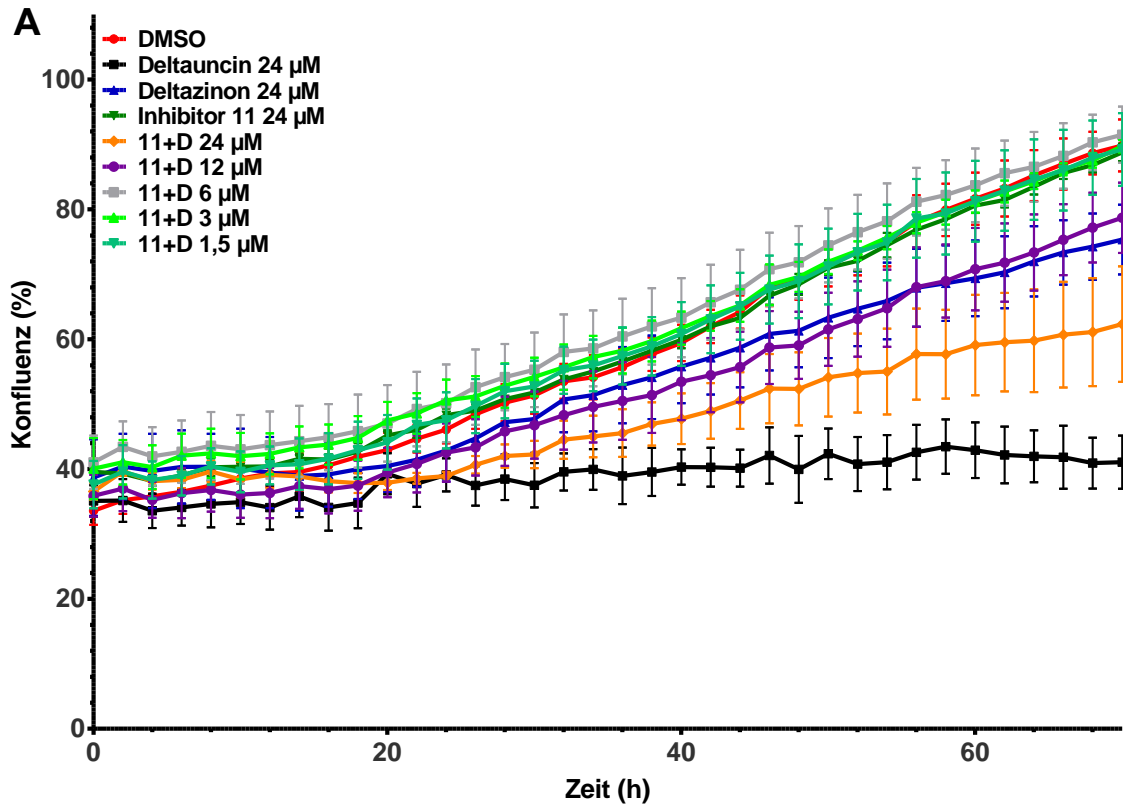


Abb. 2.49. Einfluss von Deltauncin auf die Konfluenz von Panc-I- (A) und BxPC3-Zellen (B) nach 70 h Behandlung mit einer 1:1 Mischung 11 und S-Deltazinon 1 (D+11). Bilder der Zellen wurden alle 2 h mit dem IncuCyte Zoom-System aufgenommen und die Konfluenz ermittelt. Die Konfluenzwerte nach 48 h können Abb. 2.45 entnommen werden. Als Wachstumskontrolle dienen Deltauncin, S-Deltazinon 1 und 11.

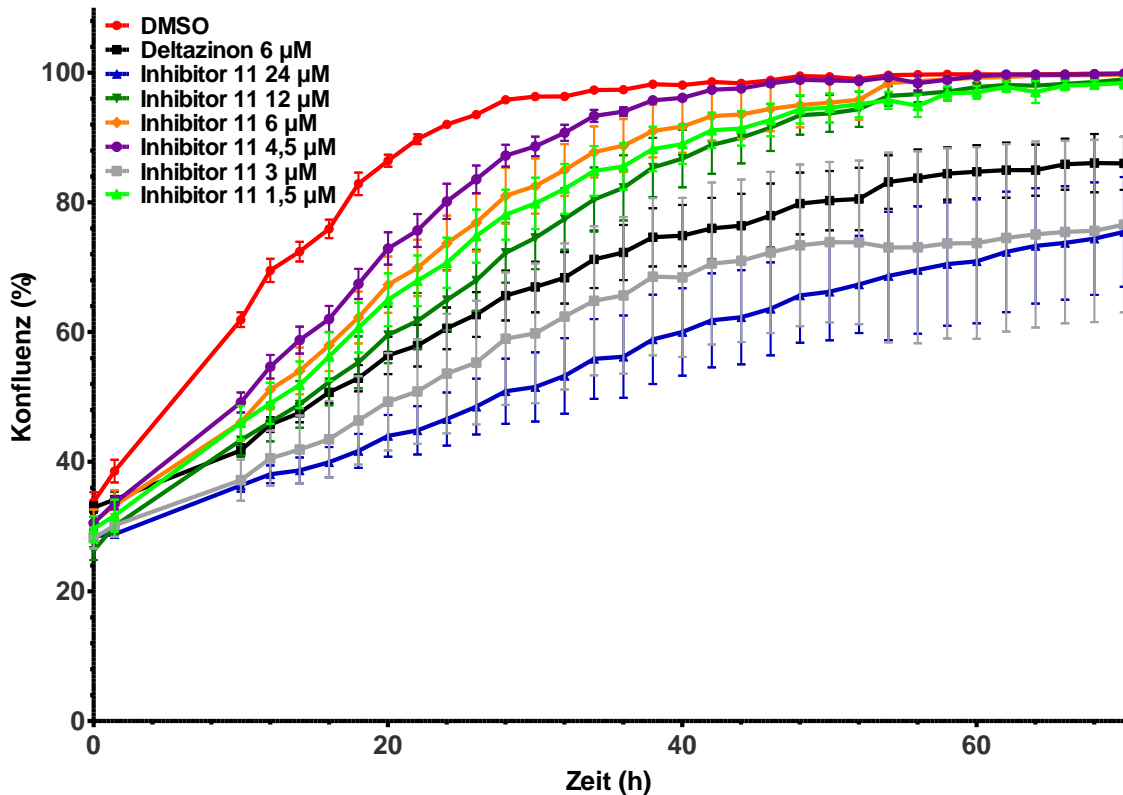


Abb. 2.50. Einfluss von 25 auf die Konfluenz von Panc-Tu-I-Zellen (B) nach 70 h Behandlung mit 11. Bilder der Zellen wurden alle 2 h mit dem IncuCyte Zoom-System aufgenommen und die Konfluenz ermittelt. Die Konfluenzwerte nach 48 h können Abb. 2.45 entnommen werden. Als Wachstumskontrolle für RAS-abhängige Zellen diente S-Deltazinon 1. Der Graph ist repräsentativ für die Behandlung von Panc-I-, BxPC3- und HCT116-Zellen mit 11.

2.3.12 Einfluss von Deltauncin auf Sphäroide

Um weitere Effekte auf Zellen zu erforschen, wurde **Deltauncin** neben 2D-Zellkulturexperimenten (Koloniebildungstest und Konfluenzmessungen), in HT29-Sphäroiden getestet. Sphäroide sind in der 3D-Zellkultur Modelle, um solide Tumore zu simulieren. Hierbei ist das Zentrum meist schwierig für Zytostatika erreichbar.¹²⁶ Für den Versuch wuchsen Sphäroide über 72 h und wurden mit **Deltauncin** in verschiedenen Konzentrationen sowie mit Dasatinib und Staurosporin als Kontrollen behandelt (durchgeführt durch Elisabeth Hennes am MPI Dortmund). Zusätzlich im Medium befand sich Propidiumiodid (PI). Dieses kann nur in tote Zellen, also solche mit zerstörter Membran, in die DNA interkalieren und ist daher ein Marker für tote Zellen. Die Kontrollen des Experiments verhielten sich wie angenommen: Im Falle von DMSO bildete sich nach einiger Zeit ein toter Kern, der auf das verminderte Aussetzen an die Nährstoffe des Mediums zurückzuführen sein kann.¹²⁶ Dasatinib tötete Zellen bzw. blockierte das Zellwachstum, ohne die Sphäroide zu zerstören. Im Falle von

Staurosporin konnte ein langsamer Zerfall des Sphäroids mit anschließendem unspezifischem, toxischem Effekt beobachtet werden. ^{127, 128}

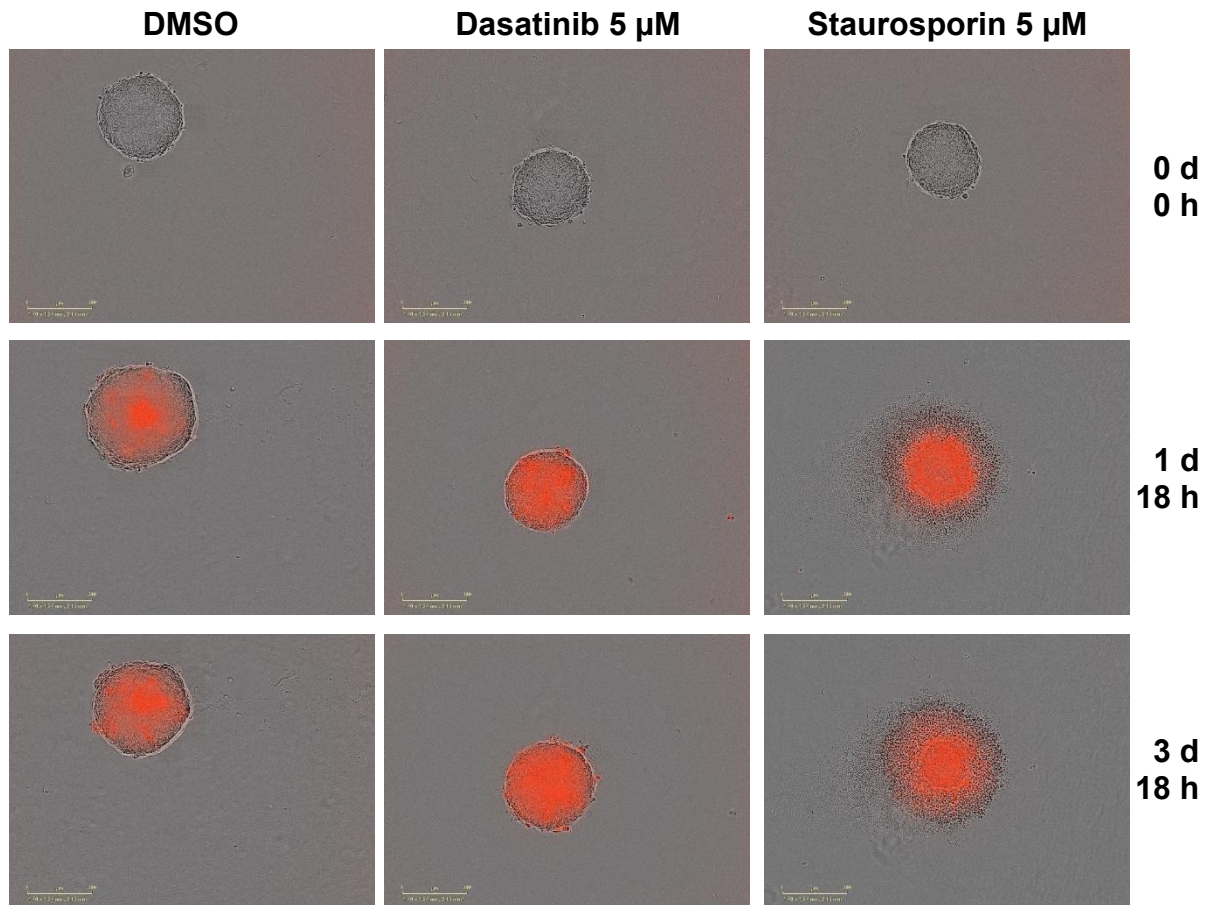


Abb. 2.51. Kontrollen des Sphäroidexperiments. Sphäroide wurden mit DMSO, Dasatinib und Staurosporin für 90 h behandelt. Tote Zellen werden durch PI (rot) angefärbt.

Interessanterweise verhielt sich der Sphäroid nach **Deltauncin**-Behandlung ähnlich wie nach Staurosporin-Zugabe. Das Aggregat zerfiel langsam und gleichmäßig von allen Seiten, wobei die Zeit kürzer und der Effekt stärker bei größeren Konzentrationen war. Da es nach einem kontrollierten, nicht sofort einsetzenden Zerfall aussah, kann gemutmaßt werden, dass evtl. Zell-Zell-Kontakte durch die Inhibition von Src gebrochen werden und somit das ganze Gebilde nach und nach auseinanderfiel. ³⁴ Das Ergebnis zeigt deutlich, dass **Deltauncin** ein potenter Inhibitor darstellt, der selbst unter herausfordernden Bedingungen, wie in einem 3D-Zellkulturmodell, Aktivität besitzt.

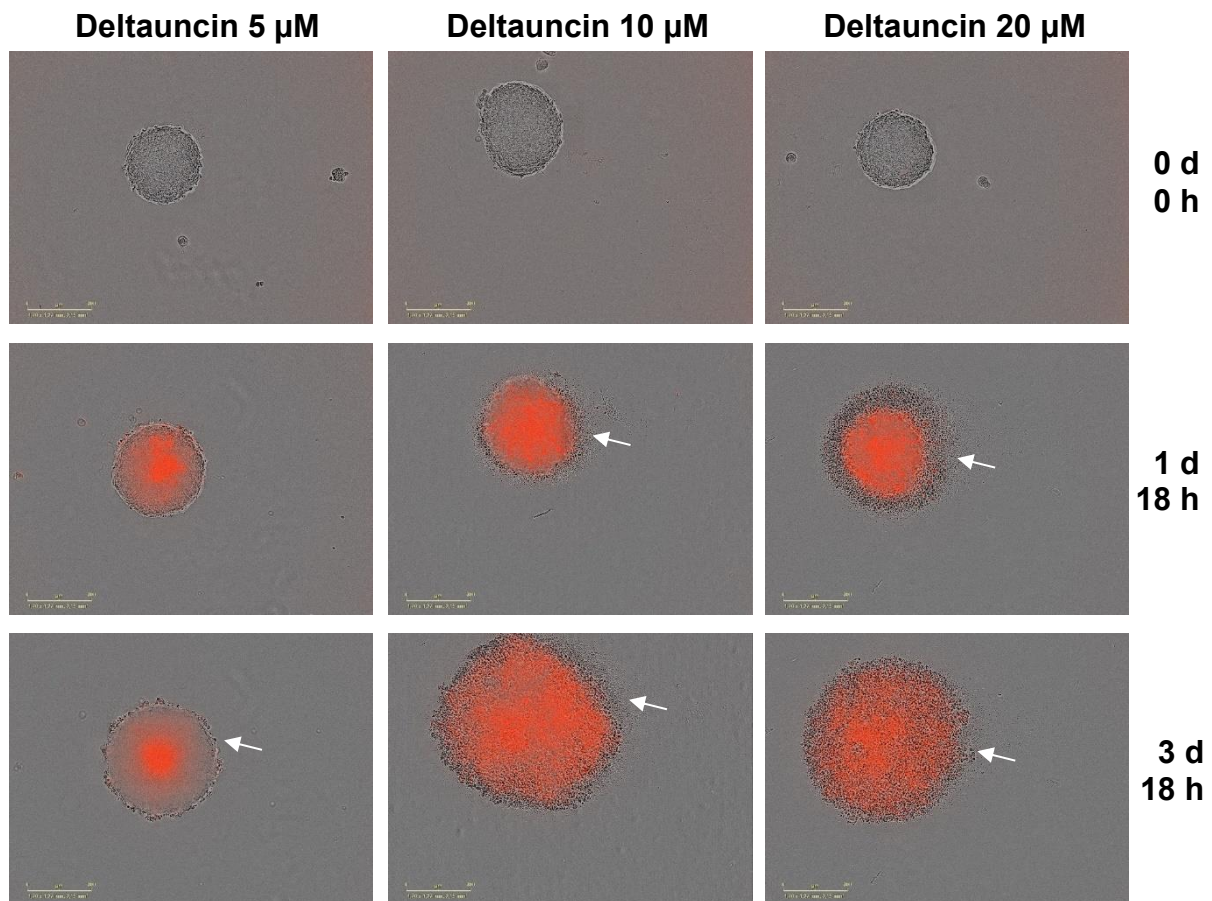


Abb. 2.52. Auswirkung von Deltauncin auf HT29-Sphäroide. Sphäroide wurden mit **Deltauncin** unterschiedlicher Konzentration für 90 h behandelt. Apoptotische Zellen werden durch PI angefärbt. Pfeile zeigen Zonen des Zerfalls an.

2.4 Zusammenfassung: Inhibition der UNC119-Src-Interaktion

Mit Hilfe eines *Homogeneous Time-Resolved Fluorescent High-Throughput Screenings* für Inhibitoren der UNC119-Src-Interaktion, wurde eine Indolin-basierte Substanz als potente Ausgangstruktur für die Inhibition des SFK-Chaperons UNC119 identifiziert. Nach iterativem Verbessern dieser Verbindung stellte sich **Deltauncin** nicht nur als potentester Inhibitor von UNC119 heraus, sondern zeigte auch eine gute Löslichkeit. Überraschenderweise erwies sich **Deltauncin** als dualer Inhibitor mit hoher Affinität für UNC119a und PDE δ . **Deltauncin** wurde diversen biologischen Testungen unterzogen. **Deltauncin** bindet in Zellen an UNC119a/b und PDE δ , was durch ein FRET-FLIM Experiment bewiesen werden konnte. Es konnte weiterhin eine Inhibition der Y416-Phosphorylierung von Src sowie eine veränderte Lokalisation von Src an Endomembranen beobachtet werden. Damit konnte gezeigt werden, dass das Blockieren von UNC119 zu einer Reduktion der Aktivität von Src führt. Obwohl die Aktivität von Src eingeschränkt war, zeigte die Substanz in Src-abhängigen Prozessen wie die Zellmigration und Src-abhängigem Wachstum von HT29- und MDA-MB-231-Zellen keine Wirkung. Hingegen konnte eine dosisabhängige, starke Reduktion von Kolonien im Koloniebildungsexperiment gezeigt werden. Weiterhin wurde **Deltauncin** im fordernden Sphäroid-Tumormodell getestet. Es stellte sich heraus, dass **Deltauncin**, ähnlich wie Staurosporin, Sphäroide aufbrechen kann. In weiteren Experimenten wurde bestätigt, dass **Deltauncin** das Wachstum von KRAS-abhängigen Zellen reduziert. Im Vergleich zum UNC119-spezifischen Inhibitor **11** war **Deltauncin** toxisch für verwandte KRAS-unabhängigen Zelllinien. Hiermit konnte erstmals verdeutlicht werden, dass eine doppelte Inhibition von PDE δ und UNC119 mit einem Molekül von Vorteil ist.

3. Modulation des Hedgehog Signalwegs zur Zellwachstumsregulierung

3.1 Einleitung

Neben den Signalwegen, in denen Src und KRAS involviert ist, ist der Hedgehog- (Hh-) Signalweg ein weiterer onkogener Signalweg. Die Krebstypen, die mit dereguliertem Hh-Signalübertragung zusammenhängen, sind meist Gehirn- (Medulloblastom), Muskel- (Rhabdomyosarkom), Haut- (Basaliome), Bauchspeicheldrüsen- und kleinzelliger Lungenkrebs.¹²⁹ Namensgebend für den Signalweg ist der an einen Igel erinnernden Phänotyp der Fruchtfliegenlarven nach Mutation des hh-Gens.¹³⁰ Am Anfang der Signalkaskade, die sich im Zillium abspielt, binden die Hh-Liganden Sonic (Shh), Desert (Dhh) oder Indian (Ihh) an das Transmembranprotein PTCH1. Daraufhin wird die Inhibition von dem 7-Transmembranprotein Smoothened (SMO) durch PTCH1 durch einen unbekanntes Mechanismus aufgehoben (Abb. 3.1). SMO selbst inhibiert GLI1, ein Transkriptionsfaktor, nicht mehr, der dann in den Kern diffundieren kann und die Zielgene transkribiert. Die Zielgene des Hh-Signalwegs sind verantwortlich für die richtige embryonale Entwicklung, Differenzierung, Regenerierung von Geweben, Zellproliferation und Osteogenese (Knochenwachstum).¹²⁹ Damit ergeben sich bei einer gestörten Signaltransduktion verschiedene Krankheiten. Überschießende Aktivität wird mit Krebs in Verbindung gebracht. Auf der anderen Seite kann eine Inhibition des Signalwegs, beispielweise durch genetische Mutation oder durch Gabe von Inhibitoren, zu veränderter embryonaler Entwicklung führen.¹³¹ Hierbei ist eine Inhibition des Signalwegs mit Zyklopie oder Schwangerschaftsabbrüchen verbunden.¹³²

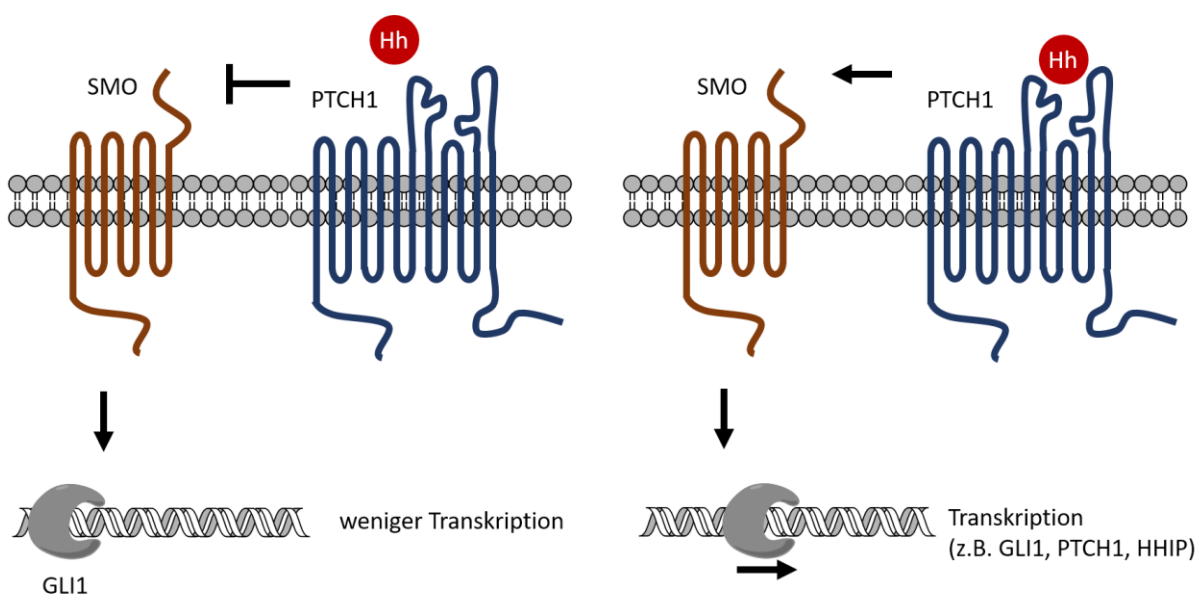
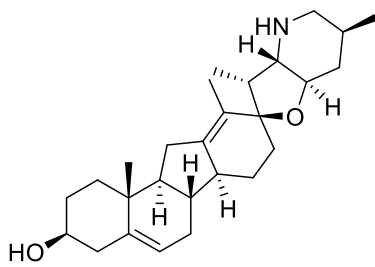
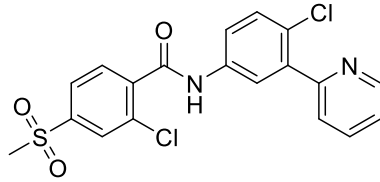


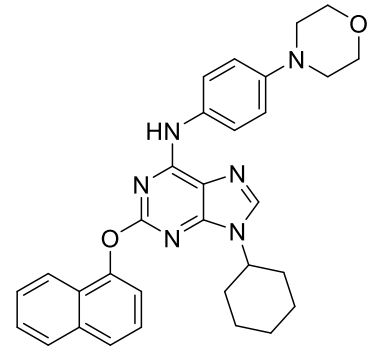
Abb. 3.1. Die vereinfachte Hh-Signalkaskade.



Cyclopamin



Vismodegib



Purmorphamin

Abb. 3.2. SMO-Inhibitoren und -Agonisten. Cyclopamin ist ein natürlich vorkommender SMO-Inhibitor. Vismodegib ist ein klinisch zugelassener SMO-Inhibitor. Purmorphamin ist ein SMO-Agonist.

Die Deaktivierung des Signalwegs wird in der klinischen Behandlung von Krebs eingesetzt. Ein natürlich vorkommender Vertreter von Hh-Inhibitoren ist Cyclopamin, das aus *V. californicum* isoliert wurde. Die Substanz wurde entdeckt, nachdem Schafe *V. californicum* zu sich genommen hatten und deren Nachwuchs Zyklopie aufwies. Dieser Fund war auch namensgebend für die Substanz.¹³³ Cyclopamin ist ein SMO-Inhibitor und blockiert damit GLI als Transkriptionsfaktor.¹³⁴ Der erste klinisch zugelassene Hh-Inhibitor war Vismodegib, der für die Behandlung von Basalzellkarzinoma entwickelt wurde und inhibiert ebenfalls SMO.¹³⁵ Auf der anderen Seite würde eine Aktivierung des Hh-Signalwegs auch vorteilhaft sein. Hierbei würde es zu verbessertem Zellwachstum und damit Geweberegeneration führen. Ein solcher Stoff stellt beispielsweise Purmorphamin dar, welches agonistisch auf den Hh-Signalweg durch direktes Aktivieren von SMO wirkt.¹³⁶

3.2 Zielsetzung

Der zweite Teil der Dissertation widmet sich Hedgehog (Hh)-Coaktivatoren. Der Hh-Signalweg spielt eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung, Differenzierung und Proliferation. Im Gegensatz zu SMO-Inhibitoren, die Krebs stoppen sollen, sind Hh-(Co-)Agonisten attraktiv für die regenerative Medizin. Basierend auf einer Treffersubstanz in einem Hh-relevanten *Screen*, sollte eine Dipeptid abgeleitete Substanzbibliothek mit verschieden orientierten Stereozentren aufgebaut und biologisch evaluiert werden.

3.3 Resultate und Diskussion

3.3.1 Synthese und Testung der *cis*-Isomere

Neben der Behandlung von Krebs durch Hh-Inhibitoren kann der Hh-Signalweg auch für Differenzierung und Ausbildung von neuem Gewebe wie z. B. Herzgewebe benutzt werden. Basierend auf dieser Idee wurden Hits aus einem *Screen* für Hh-Signalweg-Modulatoren aus der COMAS Substanz-Bibliothek untersucht, die im Assay eine zusätzliche Hh-Signalweg-Aktivierung aufwiesen. Bei dem zugrundeliegenden Experiment handelt es sich um ein Osteogeneseassay, bei dem der Hh-Signalweg von C3H10T1/2-Zellen durch Purmorphamin stimuliert wurden (durchgeführt durch COMAS, Dortmund). Es wurde über die alkalische Phosphatase, die als Marker für Osteogenese dient, die Hh-Signalaktivität bestimmt. Substanzen mit der höchsten positiven Modulation des Hh-Signalwegs im Vergleich zur Behandlung mit Purmorphamin alleine wurden im Anschluss erneut manuell getestet und bestätigt. Um mögliche, unerwünschte Interaktionen der Moleküle mit dem Assay zu vermeiden, wurde ein GLI-abhängiger Reporter-gen-Assay mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt (Experimente durchgeführt durch Sumersing Patil am MPI Dortmund). Im nächsten Schritt wurde bestimmt, dass alle gefunden Substanzen Coaktivatoren sind, d. h. die Substanzen weisen nur in Kombination mit Purmorphamin eine Steigerung der Hh-Signalweg-Aktivität auf. Um den genauen Wirkmechanismus zu untersuchen, wurde der potenteste Coaktivator **107862 (14aa)** ausgewählt (**Abb. 3.3**).

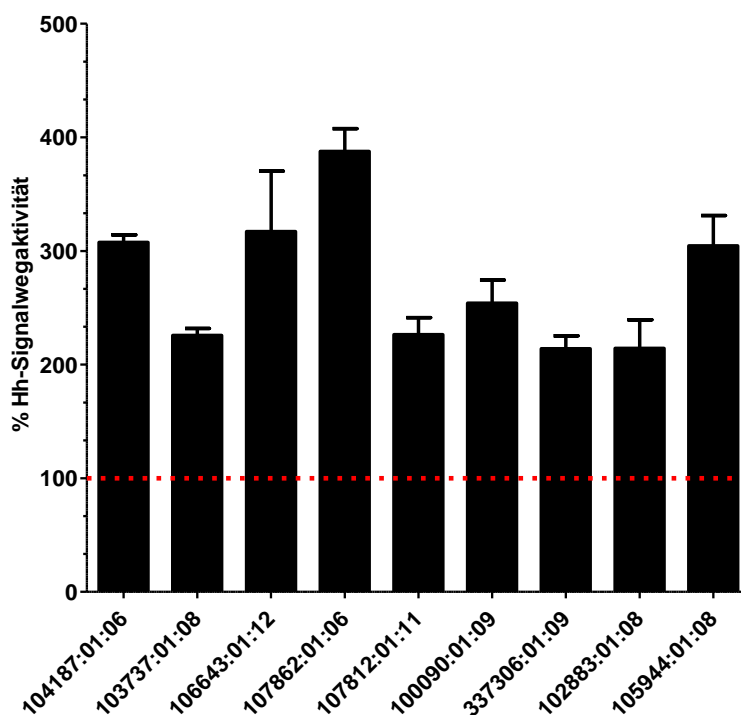


Abb. 3.3. Bestätigung der Coaktivatoren-Aktivität aus dem COMAS Osteogenese Experiment durch ein GLI-Reporter-gen-Assay. Shh-LIGHT2-Zellen wurden 48 h mit 10 μ M der Substanz inkubiert und die Gen-Expression über den Luciferase-Reporter ausgelesen.

Für Testzwecke sollte mehr Substanz hergestellt werden sowie im Anschluss eine Struktur-Aktivitätsbeziehung aufgestellt werden. Dabei wurde auf eine Syntheseroute aus der Literatur nach Tønder *et al.*^{137,138} zurückgegriffen (**Abb. 3.4**). Dazu wurde *Boc* geschütztes L-Valin mit Meldrumsäure kondensiert, um anschließend unter Hitze zu decarboxylieren und zu cyclisieren. Die *Boc*-Gruppe wurde säurekatalytisch abgespalten, um Pyrrolidindion **12a** zu erhalten. Das Produkt konnte ohne weitere Aufreinigung, nach intensivem Waschen im Zwischenschritt der Synthese erhalten werden. Anschließend wurde eine Iminbildung unter wasserbindenden Bedingungen (3 Å MS) und leichtem Erhitzen von Pyrrolidinon **12a** mit L-Phenylalaninamid durchgeführt. Es konnte das isomerisierte, stabilere **13aa** durch Säulenchromatographie isoliert werden. Durch das leichte Erwärmen während der Reaktion wurde etwa 20 % unerwünschtes Diastereomer erhalten, das abgetrennt werden konnte. Dieses entstand wahrscheinlich durch Säure-katalysierte Isomerisierung eines der Stereozentren. Im letzten Schritt der Synthese wurde eine Reduktion mit NaBH₃CN unter aktivierenden, sauren Bedingungen durchgeführt. Hierbei musste zwei Tage bei Raumtemperatur gerührt werden, um eine komplette Umsetzung zu beobachten und **14aa** in guter Ausbeute zu erhalten. Die Reduktion verlief relativ zum Isopropylrest *cis*-selektiv. Diese Selektivität der Reaktion wurde bereits in der Literatur beschrieben und durch die räumliche Nähe und der sterischen Hinderung der Isopropylgruppe erklärt.¹³⁹

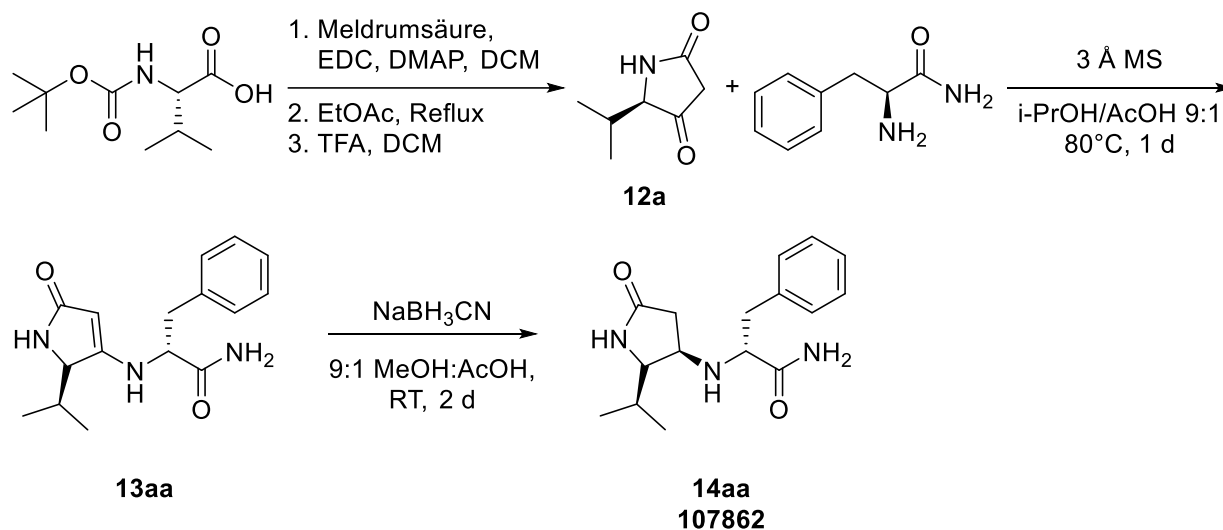


Abb. 3.4. Syntheseroute des Coactivator **14aa** nach Tønder *et al.*^{137,138}

Anschließend wurde **14aa** im gleichen GLI-Reportgen-Assay erneut getestet (**Abb. 3.5**, durchgeführt durch Sumersing Patil am MPI Dortmund), wobei dieses Isomer nicht mehr aktiv war. Es könnte zwei Gründe für dieses Ergebnis geben: entweder wurde das falsche Isomer in

der Substanzbibliothek angegeben oder die Substanz war über die Zeit in DMSO isomerisiert. Die mögliche Änderung des chiralen Zentrums wurde auch dadurch gestützt, dass während der Enamin-Synthese bereits unter milden, sauren Bedingungen eine Racemisierung zu beobachten war. Um herauszufinden welches Diastereomer aktiv war, wurde mit der Synthese einer Bibliothek der chiralen Zentren begonnen. Dabei wurden *cis*-Isomere hergestellt (**Abb. 3.6**). Da bei der Iminbildung ungewollte diastereomere Nebenprodukte durch Erhitzen beobachtet wurden, musste diese Reaktion optimiert werden. Durch ein Lewis-Säure-Screening konnte die Enaminbildung bereits bei Raumtemperatur erfolgen (**Tab. 3.1**). Hierbei stellte sich CuCl als geeigneter Katalysator heraus (**Tab. 3.1, Eintrag 1**). Daraufhin wurden alle *cis*-Isomere (**Abb. 3.6**) nach dieser modifizierten Syntheseroute hergestellt und getestet (**Abb. 3.5**). Dabei war **14ab** die potenteste Substanz.

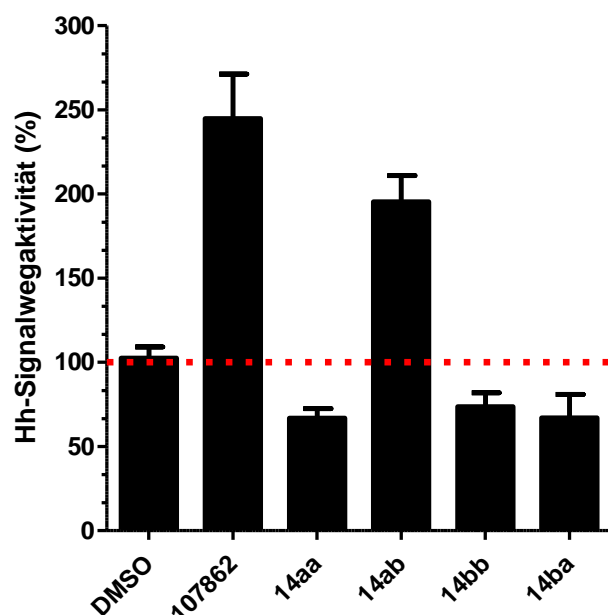


Abb. 3.5. GLI-Reportergen-Assay für die Substanzen **14aa**, **14ab**, **14bb** und **14ba** sowie die Kontrollen DMSO und Ausgangsprobe **107862**. Shh-LIGHT2-Zellen wurden 48 h mit 10 μ M der Substanzen inkubiert und die Gen-Expression über den Luciferase-Reporter ausgelesen.

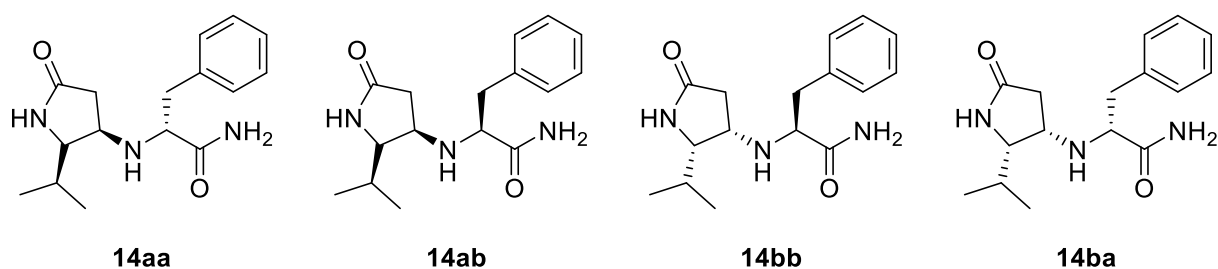
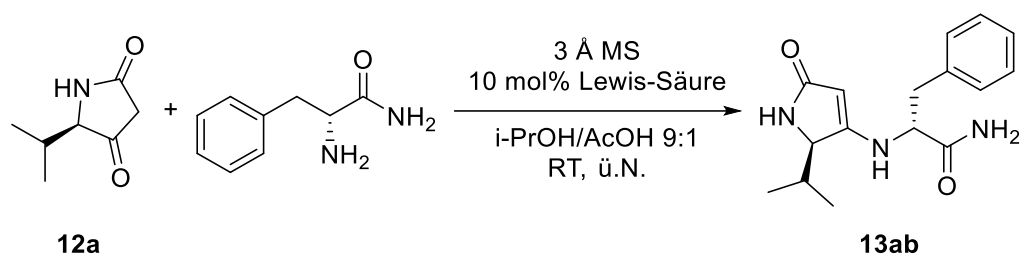


Abb. 3.6. Synthetisierte *cis*-Coaktivatoren basierend auf Coaktivator **14aa**.

Tab. 3.1. Lewis-Säure-Screening für die Enamin-Bildung.^[a]

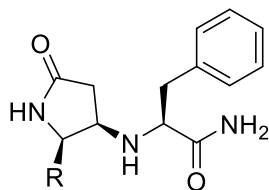


Eintrag	Lewis-Säure	Isolierte Ausbeute (%)
1	CuCl	98
2	Yb(OTf) ₃	44
3	FeCl ₂ * 4 H ₂ O	98 ^[b]
4	FeCl ₃	51

[a] Reaktionsbedingungen: **12a** (70,84 μmol), L-Phenylalaninamid (67,00 μmol) und 10 mol% Lewis-Säure in 1,5 ml trockenem MeOH : AcOH 9 : 1. [b] Unbekannte Nebenprodukte.

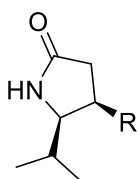
Da der genaue Wirkmechanismus des Coaktivators untersucht werden sollte, wurde eine Substanzbibliothek basierend auf Coaktivator **14ab** erstellt. Dabei wurde entweder der L-Phenylalaninamid- (**Tab. 3.2**) oder Pyrrolidinonteil (**Tab. 3.3**) von **14ab** beibehalten und der entsprechend andere Teil geändert. Über das ganze Molekül wurde die Anordnung der Stereozentren beibehalten. Die Ergebnisse des GLI-Reportergergen-Experiments der Substanzbibliothek sind als Graph in **Abb. 3.7** zusammengefasst (durchgeführt durch Sumersing Patil am MPI Dortmund). Unerwartet wurde dabei keine Korrelation zwischen der Dosis (10 μM bzw. 20 μM) der Coaktivatoren festgestellt. Weiterhin konnten auch keine Reproduzierbarkeit festgestellt werden, was sich neben den hohen Fehlerbalken auch bei einer nachsynthetisierten Charge von Coaktivator **14ab** (Vgl. **14ab** und **14ab neu**) zeigte.

Tab. 3.2. Synthetisierte Substanzbibliothek basierend auf 14ab, verschiedene Substituenten in Position 5.



Substituent R	Bezeichnung	Hh-Aktivität 10 μ M (%)	Hh-Aktivität 20 μ M (%)
	14cb	115 \pm 28,1	90 \pm 29,1
	14db	98 \pm 7,5	134 \pm 41,0
	14eb	98 \pm 17,1	102 \pm 32,7
H	14fb	115 \pm 45,8	72 \pm 31,0

Tab. 3.3. Synthetisierte Substanzbibliothek basierend auf 14ab, verschiedene Substituenten in Position 4.



Substituent R	Bezeichnung	Hh Aktivität 10 μ M (%)	Hh Aktivität 20 μ M (%)
	14ac	88 \pm 23,3	86 \pm 64,7
	14ad	160 \pm 89,4	84 \pm 21,0
	14ae	108 \pm 16,2	89 \pm 46,5
	14af	136 \pm 66,8	130 \pm 29,2
	14ag	126 \pm 63,9	155 \pm 46,2
	14ah	99 \pm 5,2	107 \pm 36,8
	14ai	138 \pm 35,8	94 \pm 3,6

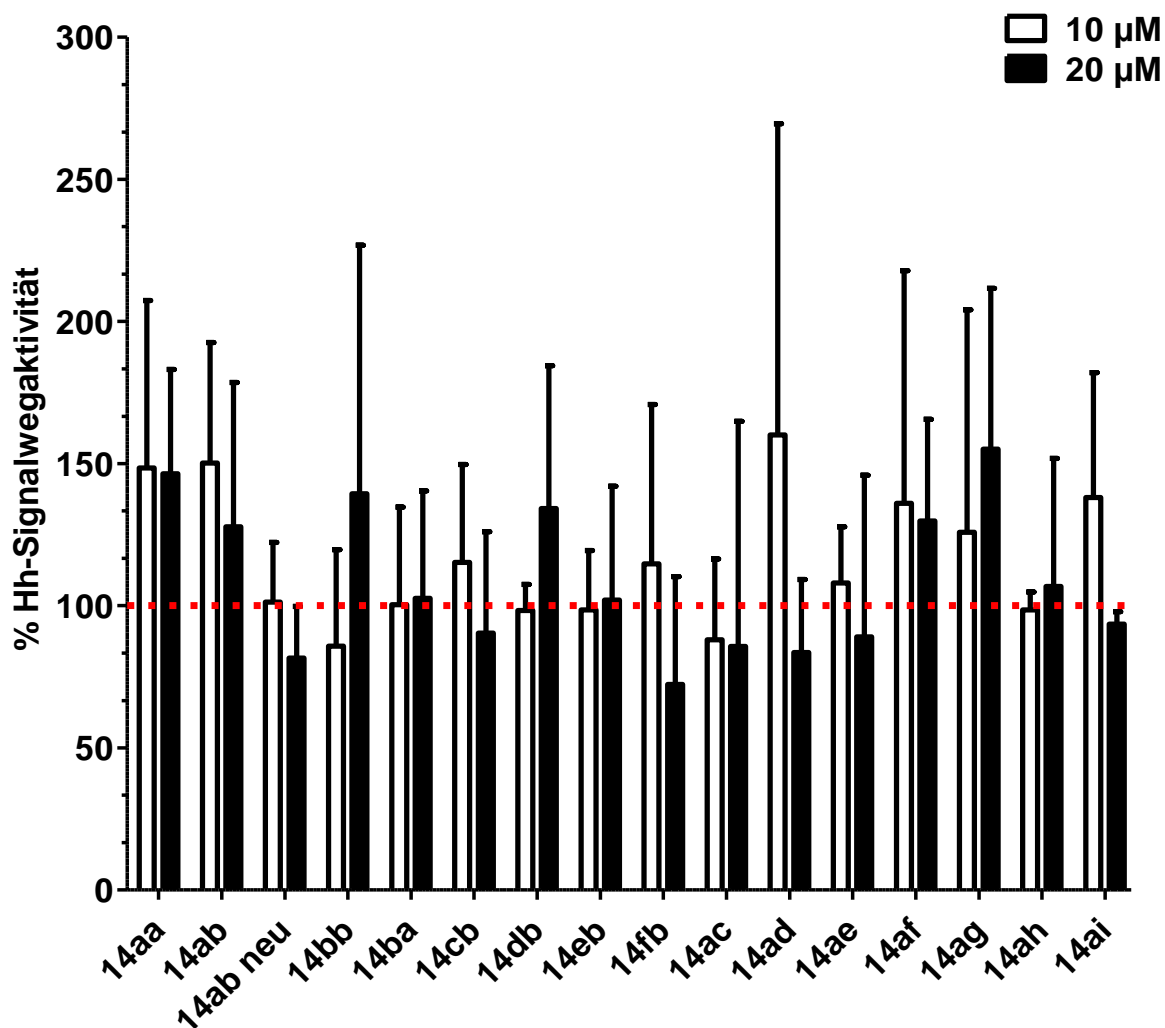


Abb. 3.7. GLI-Reporter-Gen-Assay für die Substanzbibliothek basierend auf 14ab. Shh-LIGHT2-Zellen wurden 48 h mit 10 μ M der Substanzen inkubiert und die Gen-Expression über den Luciferase-Reporter ausgelesen.

3.3.2 Synthese der *trans*-Isomere

Die *cis*-Isomere wurden erfolgreich in **Kapitel 3.3.1** synthetisiert. Da diese aber keine reproduzierbaren Ergebnisse lieferten, sollten die *trans*-Isomere synthetisiert und analysiert werden. Da diese Synthese nicht in der Literatur beschrieben wurde, wurde zunächst eine asymmetrische Hydrogenierung des **13ab** angestrebt. Dabei wurden verschiedene Katalysatoren (PtO_2 ¹⁴⁰, (1*R*,1'*R*,2*S*,2'*S*)- und (1*S*,1'*S*,2*R*,2'*R*)-DuanPhos¹⁴¹, TangPhos¹⁴²) und verschiedene H_2 -Drücke sowie erhöhte Temperatur getestet. Es konnte aber keine Umsetzung beobachtet werden. Gründe könnten darin liegen, dass entweder der Druck zu gering oder die Katalysatoren nicht für ein solches System, beispielsweise wegen der sterischen Hinderungen, geeignet waren. Da die direkte Umsetzung nicht möglich war, wurde eine andere

Synthesestrategie verfolgt. Dabei wurde der Pyrrolidinon-Ring entweder als Nukleophil oder Elektrophil verwendet (**Abb. 3.8**).

Tab. 3.4. Asymmetrische Hydrogenierung von Enamin 13aa. ^{140, 141, 142 [a]}

13aa **trans-Coaktivator**

Katalysatoren

(1R,1'R,2S,2'S)-DuanPhos

(1S,1'S,2R,2'R)-DuanPhos

TangPhos

Katalysator	H ₂ -Druck (bar)	Lösungsmittel	Temperatur
PtO ₂ ^[b]	10	MeOH	RT
PtO ₂ ^[b]	10	MeOH	50 °C
(1R,1'R,2S,2'S)-DuanPhos	2	MeOH	RT
(1S,1'S,2R,2'R)-DuanPhos	2	MeOH	RT
TangPhos ^[c]	2	Trifluoroethanol	RT

[a] Reaktionsbedingungen: **13aa** (135,72 μmol) und 1 mol% Katalysator in 2-3 ml Lösungsmittel. [b] 20 mol% Katalysator. [c] 2 mol% Katalysator.

Zunächst wurde der Pyrrolidinonring als Elektrophil verwendet (**Abb. 3.9**). Hierbei wurde zunächst die Ketogruppe in Position 4 des Pyrrolidindions zum entsprechenden *Boc*-geschützten *cis*-Alkohol **15g** in hoher Ausbeute reduziert. Die Eigenschaft der selektiven Hydrogenierung wurde bei dieser Route genutzt. Durch geeignete Reaktionsbedingungen sollte bei einer S_N2-Reaktion das chirale Zentrum invertiert werden. Der Alkohol wurde DMAP-katalytisch durch Tosylchlorid zu einer guten Abgangsgruppe umgewandelt. **16** wurde unter verschiedenen Reaktionsbedingungen (verschiedene Lösemittel, Raumtemperatur, Reflux) mit

Phenylalaninamid ohne Erfolg umgesetzt. Weiterhin wurde **15** mit Oxalylchlorid/DMF¹⁴³ statt Tosylchlorid *in situ* aktiviert und ebenfalls erfolglos mit der geschützten Aminosäure substituiert.

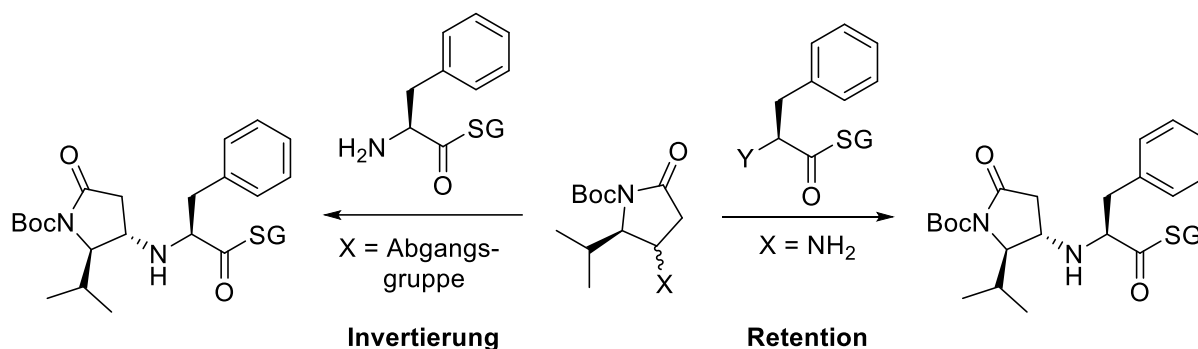


Abb. 3.8. Strategie zur Synthese der *trans*-Isomere.

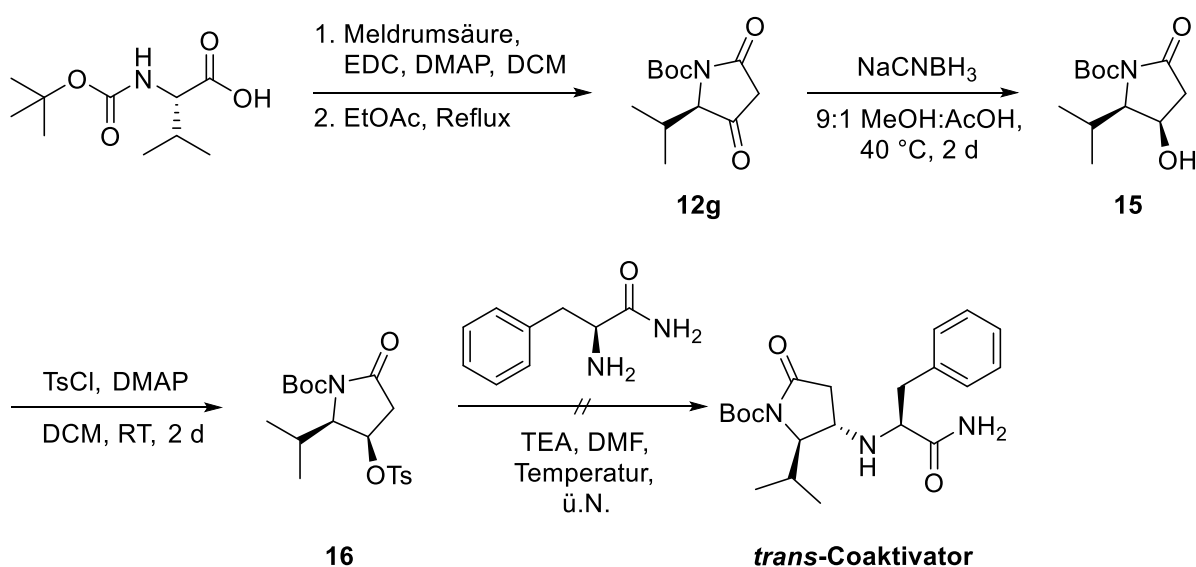


Abb. 3.9. Syntheseroute der *trans*-Isomere mit Pyrrolidinonring als Elektrophil.

Die zweite verfolgte Synthesestrategie war die Nutzung des Pyrrolidinonrings als Nukleophil. Dabei wurde zunächst der Nitroester **17** aus 3-Nitropropansäure unter Aktivierung von Oxalylchlorid hergestellt (Abb. 3.10).¹⁴⁴ Darauf folgend wurde der Nitroester in einer Nitro-Mannich-Reaktion unter BzOH-Katalyse zusammen mit Isobutylaldehyd und Benzylamin in hoher Ausbeute zum racemischen Nitropyrrolidinon umgesetzt (*rac*-**18**).¹⁴⁵ Wie beschrieben wurde ein Enantiomerenmisch im Verhältnis 1 : 1 erhalten, deren Isobutylgruppe relativ zur Nitrogruppe in *trans*-Stellung war. Das Enantiomerenmisch sollte darauf folgend in das Amin reduziert werden und eine Substitutionsreaktion durchlaufen. Hierbei sollten sich die diastereomeren *trans*-Coaktivatoren bilden, die einzeln abgetrennt werden könnten. Um das

Amin **rac-19** zu erhalten, wurde die Nitrogruppe von **rac-18** unter sauren Bedingungen in abs. EtOH bei Rückfluss mit Zinnchlorid quantitativ reduziert. Parallel dazu wurde **21** synthetisiert (Abb. 3.11). Dazu wurde die Aminogruppe von L-Phenylalanin in eine Diazogruppe durch NaNO_2 in konz. HCl gewandelt und anschließend durch Chloridionen der Salzsäure ersetzt (**20**). Die Säurefunktionalität wurde durch Ethylchlorformiat aktiviert, um anschließend durch wässrige Ammoniaklösung amidiert zu werden. Im Anschluss wurde **rac-19** mit **21** in DMF bei Raumtemperatur über Nacht mit verschiedenen Basen (NaH, TEA, DBU, Pyridin) reagiert (Abb. 3.12). Die zwei Bausteine reagierten entweder nicht oder **21** wurde zum Phenylacrylamid eliminiert. Da die *trans*-Isomere nicht herstellbar und die *cis*-Isomere nicht reproduzierbar bioaktiv waren, wurden weitere Untersuchungen eingestellt.

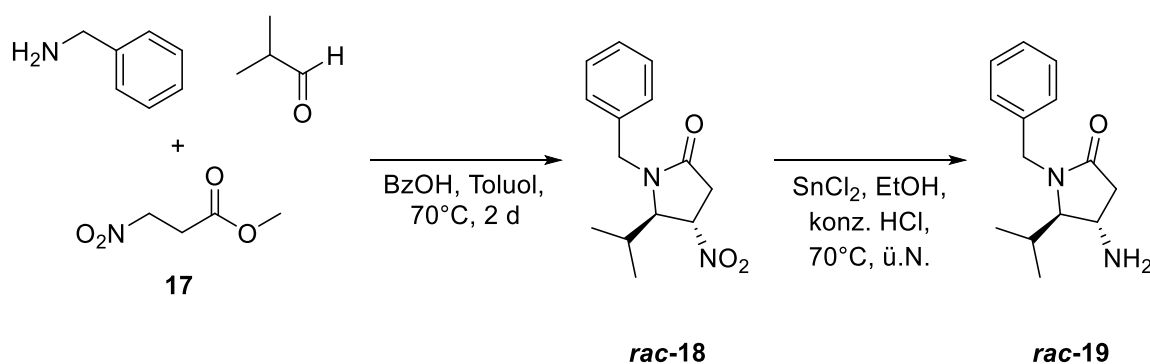


Abb. 3.10. Synthese des racemischen Aminopyrrolidinons **rac-19** für die Syntheseroute der *trans*-Isomere mit Pyrrolidinonring als Nukleophil.

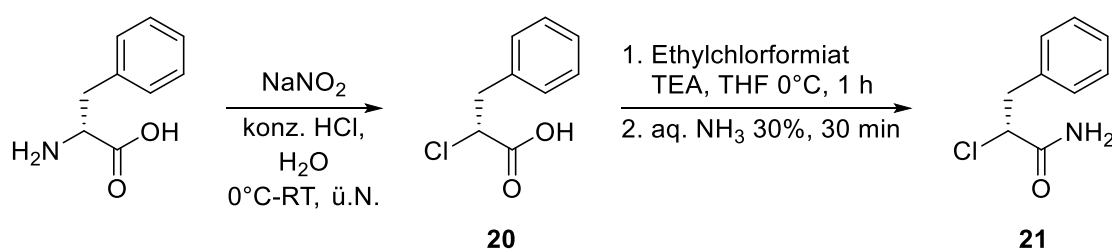


Abb. 3.11. Synthese des elektrophilen Aminosäurebausteins **21**.

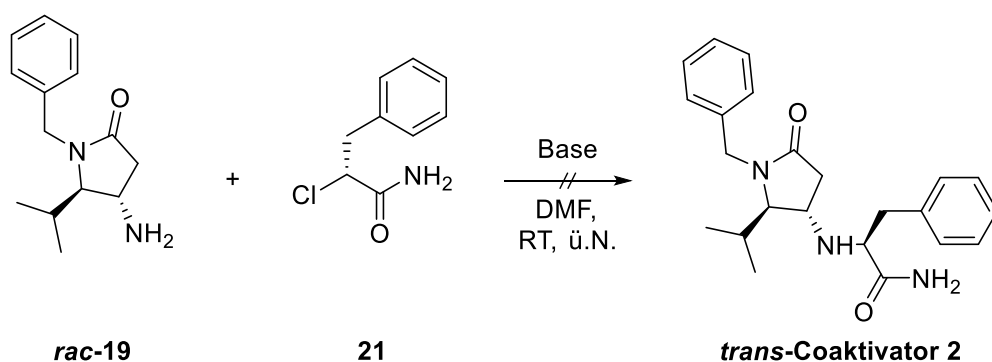


Abb. 3.12. Syntheseroute der *trans*-Isomere mit Pyrrolidinonring als Nukleophil.

3.4 Zusammenfassung: Modulation des Hedghog Signalwegs zur Zellwachstumsregulierung

In diesem Abschnitt wurden Coaktivatoren für den Hh-Signalweg untersucht, die nützlich für die Erforschung der Rolle des Hh-Signalweges für Geweberegeneration, Differenzierung und Embryonalentwicklung sein könnten. Nach einem Hit eines *High-Throughput Screens* im COMAS und Validierung wurde ein Pyrrolidinondi-peptid als möglicher Kandidat für eine weitere Untersuchung in Betracht gezogen. Nach erfolgreicher Synthese stellte sich die Substanz als inaktiv heraus. Darauffolgend wurden verschiedene Diastereomere des *Hits* nach Literatursynthese hergestellt werden. Da nur die Hälfte, die *cis*-Isomere, auf diesem Wege synthetisierbar war, sollten parallel dazu die *trans*-Isomere synthetisiert werden. Die Synthese stellte sich hierbei als schwierig heraus. Eine asymmetrische Hydrogenierung sowie zahlreiche Versuche über Substitutionsreaktionen des Pyrrolidindionrings scheiterten. Nach Testung der *cis*-Isomere, war das Isomer **14ab** als Coaktivator zusammen mit Purmorphamin im GLI-Reporterassay aktiv. Basierend auf diesem Molekül wurde eine kleine Substanzbibliothek von elf Molekülen synthetisiert. Nach eingehender biologischer Untersuchung dieser Substanzen in einem GLI-Reporterexperiment konnte dabei keine reproduzierbare Aktivität festgestellt werden. Der Grund lag womöglich in der Isomerisierung der Substanz *in cellulo*. Damit wird abschließend zusammengefasst, dass sich diese Substanzklasse aufgrund ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften nicht zum biologischen Testen zumindest für den Hh-Signalweg anbietet.

4. Neue Synthesemethoden von Glucalderivaten durch eine C-vinyloge, γ -selektive Ferrier-Umlagerung

4.1 Einleitung

Zucker sind wichtige Energieträger der Zelle und haben entscheidende Funktionen als Modifikation von biologisch relevanten Molekülen. Da Krebszellen einen hohen Energieverbrauch besitzen, sind diese stark von Glucose abhängig.¹⁴⁶ Durch unvollständige Oxidation von Zucker wird nicht das gesamte energetische Potential von Glucose ausgeschöpft, was unter dem Begriff Warburg-Effekt zusammengefasst ist.¹⁴⁶ Durch den hohen Energiebedarf greift die Krebszelle auf eigene Ressourcen zurück, die nicht benötigt werden. Dabei werden z. B. nicht benötigte Proteine selbstverdaut.^{147, 148, 149}

Eine bekannte, lang untersuchte und verwendete Reaktion für die Synthese von Zuckerderivaten ist die Ferrier-Umlagerung (**Abb. 4.1**).¹⁵⁰ Hierbei werden Glucal, meist *O*-acetyliert, mit einem Katalysator umgesetzt. Dabei bildet sich ein Carbokation aus, wobei das C3-Acetat eliminiert wird. Anschließend kann ein Nukleophil am partiell positiven C1 angreifen. Als Folge bildet sich eine Doppelbindung im Produkt zwischen C2 und C3. Dieses Produkt ist kinetisch bevorzugt. Die Ferrier-Umlagerung kann zudem als Glykosylierungsreaktion aufgefasst werden, die für die Herstellung neuer zuckerbasierter Stoffe sehr nützlich sein kann. Verschiedene Katalysatoren für diese Reaktion wurden in der Vergangenheit verwendet, die zumeist Lewis-Säuren darstellen: $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$; Übergangsmetallchloride; Triflate der Lanthanoide und übergangsmetallkatalysierte Reaktion.¹⁵¹ Als Nukleophil wurden meistens Alkohole verwendet, z. T. Zucker um Disaccharide zu erhalten.¹⁵¹ Der herausfordernde Teil der Ferrier Umlagerung liegt bei der Kontrolle der α/β -Selektivität. Meist werden α -Produkte erhalten, die durch den anomeren Effekt, also der Hyperkonjugation von Alkohol und C1-Kohlenstoff entstehen. Neben den meistverwendeten *O*- oder *S*-Nukleophilen, gibt es ebenfalls die herausforderndere *C*-Glycosylierung. In der Literatur werden dafür meist TMS-geschützte Alkene verwendet, um eine C1-C-Knüpfung zu erhalten.¹⁵² Damit ergibt sich eine große Lücke in der Literatur für andere *C*-glykosidische Strukturen, die durch die Ferrier-Umlagerung erhalten werden könnten. Eine Gruppe möglicher Nukleophile stellen vinyloge Substrate dar. Hierbei würde eine vinyloge Ferrier-Umlagerung geschehen, die *C*-glykosidische Produkte ergibt. Mögliche vinyloge Substrate wären vinyloge Enolether wie z. B. **22**. Diese würden eine Etherschutzgruppe an einem Enolat, das durch Keto-Enol-Tautomerie entsteht, besitzen und als eine Art aufgezoogene Feder bei der Reaktion genutzt werden. Durch geeignete Bedingungen kann die Schutzgruppe (SG) abgelöst werden, sich das

Keton bilden und durch mesomere Delokalisation der Elektronen eine Bindung zum Carbokation des C1-Kohlenstoffs entstehen (**Abb. 4.2**).

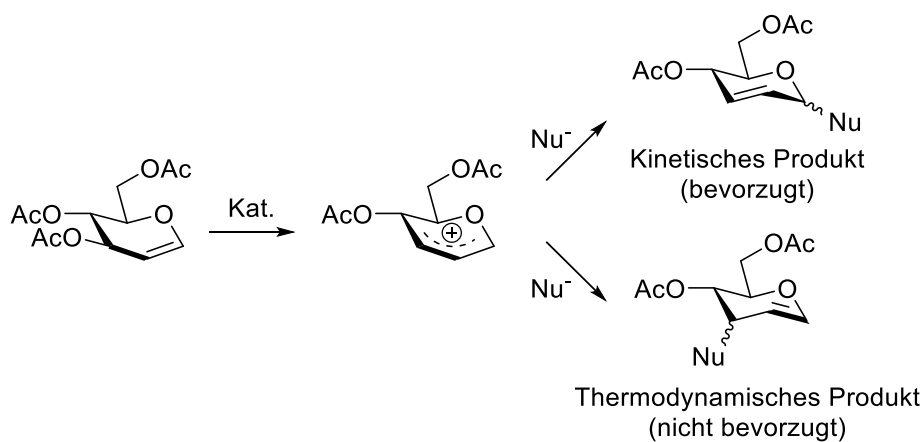


Abb. 4.1. Mechanismus der Ferrier Umlagerung.¹⁵¹

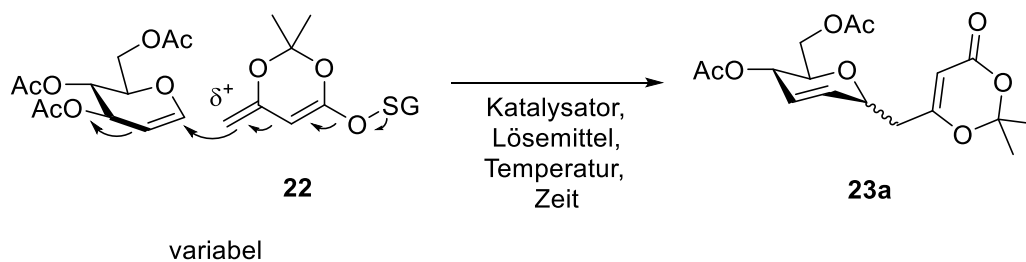


Abb. 4.2. Vorgeschlagene Reaktionsfolge für die vinyloge C-Glycosylierung durch die Ferrier-Umlagerung.
SG = Schutzgruppe.

4.2 Zielsetzung

Im dritten Teil der Dissertation sollte eine neue Methode zur *C*-Glykosylierung durch eine Ferrier-Umlagerung entwickelt werden. Der Hintergrund liegt darin, dass bisher für die Ferrier-Umlagerung meist S- oder O-Nukleophile verwendet worden sind. Außerdem sollte hier erstmals eine γ -selektive, vinyloge Ferrier-Umlagerung optimiert und demonstriert werden.

4.3 Resultate und Diskussion

4.3.1 Initiale Syntheseoptimierung

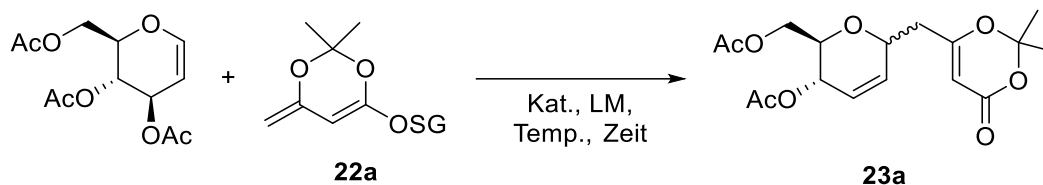


Abb. 4.3. Reaktionsschema der Ferrier-Umlagerung.

Ausgehend von Substanz **22a** (Abb. 4.3), wurde die γ -vinyloge Ferrier-Umlagerung optimiert. In der Literatur wurde meist 3,4,6-Triacetlyglucal für die Ferrier-Umlagerung genutzt. Dieses war kommerziell erhältlich und konnte direkt für die Reaktion eingesetzt werden. Das Enolat **22a** wurde gewählt, da das Dienolat relativ stabil ist und wahrscheinlich durch seine Sterik eine hohe γ -Selektivität bei der Umlagerung zeigen sollte. Als erstes wurde der vinyloge, TMS-geschützte Baustein **22a** synthetisiert, welcher hochreaktiv, wasser- und lichtempfindlich war. Die Synthese des Dienolates stellte sich als relativ kompliziert heraus, da unter komplett wasserfreien Reaktionsbedingungen gearbeitet werden musste. Hierzu musste das DIPA frisch destilliert sein. Das Dioxinon musste ebenfalls vor dem Experiment frisch destilliert werden, da ansonsten zerfallenes Dioxinon die Reaktion stören würde. Weiterhin musste sowohl das Dioxinon für die Deprotonierung als auch das TMSCl langsam hinzugegeben werden, da sich ansonsten die Lösung zu stark erwärmen würde und die Ausbeute durch Zerfall des Produkts gemindert sein würde.

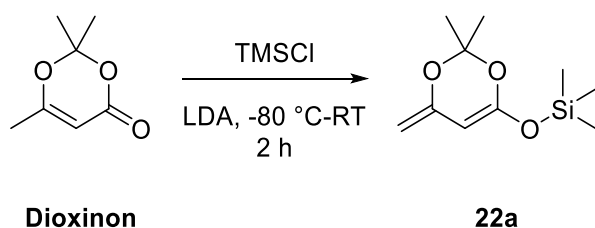
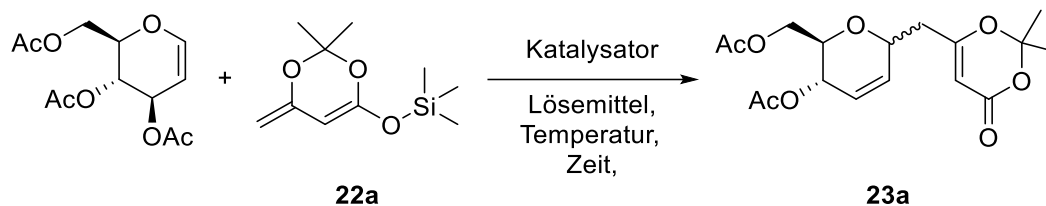


Abb. 4.4. Synthese des Enolat **22a**.

Tab. 4.1. Optimierung der vinylogenen Ferrier-Umlagerung ausgehend von 3,4,6-Triacetylglucal und **22a** nach Katalysator, Zeit und Temperatur.^[a]



Eintrag	Katalysator (Beladung)	Zeit (h)	Temp. (°C)	Ausbeute (%) ^[b]	α : β -Verhältnis ^[c]
1	Zn(OTf) ₂ (20 mol%)	0.5	50	46	1:1,2
2	Zn(OTf) ₂ (10 mol%)	0.5	50	60	1:1,1
3	Zn(OTf) ₂ (30 mol%)	0.5	50	59	1:1,2
4	Zn(OTf) ₂ (20 mol%)	1	50	44	1:1,30
5	Zn(OTf) (20 mol%)	2	50	63	1:1,16
6	Zn(OTf) ₂ (20 mol%)	5	50	50	1:1,25
7 ^[d]	Zn(OTf) ₂ (20 mol%)	0.5	50	57	1:1
8	Sc(OTf) ₃ (5 mol%)	19	RT	40	1:1,89
9	Yb(OTf) ₃ (10 mol%)	19	RT	11	1:1,50
10	Zn(NTf ₂) ₂ (5 mol%)	19	RT	37	1:0,91

[a] Reaktionsbedingungen: Triacetyl-(D)-Glucal (0,2 mmol) und **22a** (0,3 mmol) in 0,5 ml trockenem Lösungsmittel. [b] NMR Ausbeuten bestimmt durch ¹H-NMR mit 1,3,5-Trimethoxybenzol als internen Standard.

[c] α : β -Verhältnis durch ¹H-NMR der unaufgereinigten Reaktion, anomeres Zentrum durch ¹J_{C-H} Kupplungskonstanten bestimmt. [d] 3 eq. **22a**. [e] DCM statt DCE.

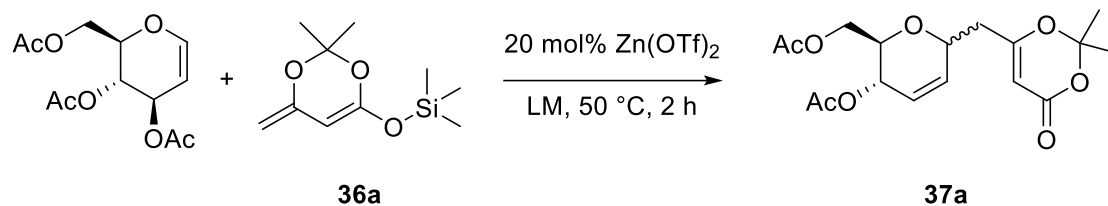
Nach der Synthese von **22a** wurde zunächst das TMS-geschützte Dioxinon mit 3,4,6-Triacetylglucal in DCE mit 20 mol% Zn(OTf)₂ als Katalysator bei erhöhter Temperatur umgesetzt. Wie vermutet wurde eine γ -selektive Umsetzung beobachtet, sowie eine Ausbeute von 46 % und einem α/β -Verhältnis von 1:1,25 nach 30 Minuten erhalten. Basierend auf diesem ersten Ergebnis, wurden Katalysatorbeladungen (**Tab. 4.1, Eintrag 1-3**), Reaktionszeiten (**Tab. 4.1, Eintrag 4-6**) sowie Dienolatmenge (**Tab. 4.1, Eintrag 7**) getestet (in Kooperation mit Dr. Chuanjie Loh am MPI Dortmund). Anschließend wurden andere Metalltriflate bzw. Zn(N(Tf)₂)₂ bei Raumtemperatur und DCM getestet, wobei die besten Reaktionsbedingungen für 20 mol% Zn(OTf)₂, zwei Stunden und 50 °C ermittelt wurden.

Basierend auf diesem Ergebnis wurde im Anschluss mit verschiedenen Lösungsmitteln experimentiert (**Tab. 4.2**). Es wurden zunächst polare Lösemittel verwendet (**Tab. 4.2, Eintrag 1 und 2**), wobei in beiden Fällen eine Zersetzung stattfand. Weiterhin wurde festgestellt, dass die Konzentration erhöht werden musste (**Tab. 4.2, Eintrag 3 und 4**). 1,4-Dioxan bewährte sich als bestes Lösungsmittel (**Tab. 4.2, Eintrag 11**). Es zeigte sich, dass eine kleinere Ausbeute bei frisch hergestelltem **22a** im Gegensatz zu älterem **22a** zu beobachten war (**Tab. 4.2, Eintrag 11 und 12**). Dies kann an einem langsamen Zerfall des Enolats über Zeit wegen der hohen Reaktivität trotz der Lagerung bei -35 °C unter Schutzatmosphäre liegen. Hierbei könnte freies (OTf)⁻ als Katalysator dienen.

Um nicht-reproduzierbare Ergebnisse zu umgehen, wurde die reaktive, für Wasser leicht zugängliche und damit leicht abspaltbare TMS-Schutzgruppe durch eine TBS-Gruppe ersetzt (**22b**). Die TBS-Schutzgruppe stellte sich als relativ stabil heraus, da nach der Reaktion die Substanz in Eiswasser ausgeschüttelt werden konnte, ohne einen Zerfall zu beobachten. Dadurch wurden ebenfalls die Reinheit und die Ausbeute erhöht. Auch beim Umgang mit der Substanz während der Reaktion wurde kein Zerfall beobachtet, welche sich durch Gelbfärbung des Stoffes auszeichnete. Nach erfolgreicher Synthese wurde die Ferrier-Umlagerung mit dem TBS-geschützten Dioxinonenolether **22b** erneut optimiert (**Tab. 4.3**).

Als finale Reaktionsbedingungen für die Ferrier-Umlagerung mit TBS-geschütztem Enolat **22b** wurden die Reaktionsbedingungen, die in **Tab. 4.3, Eintrag 3** angegeben sind, gewählt. Die Reaktion wurde darauffolgend hochskaliert (12 mmol Edukt), wobei nur 10 mol% Zn(OTf)₂ und 1,5 eq. **22b** verwendet wurden und die isolierte Ausbeute bei 86 % lag. Hiermit konnte gezeigt werden, dass die Reaktion robust ist, da ein Hochskalieren ähnliche Ausbeuten lieferte, wie eine Reaktion in kleinem Maßstab.

Tab. 4.2. Optimierung der vinylogenen Ferrier-Umlagerung ausgehend von 3,4,6-Triacetylglucal und Enolether **22a** nach Lösungsmittel.^[a]

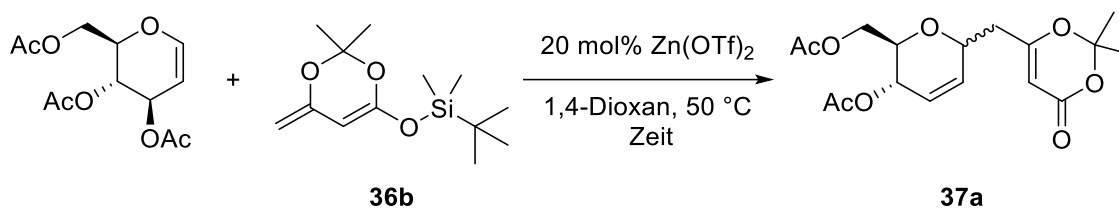


Eintrag	Katalysator (Beladung)	Lösungsmittel	Ausbeute (%) ^[b]	α : β -Verhältnis ^[c]
1	Zn(OTf) ₂ (20 mol%)	Aceton	-	-
2	Zn(OTf) ₂ (20 mol%)	HFIP	-	-
3 ^[d]	Zn(OTf) ₂ (20 mol%)	DCE	69	1:1,1
4	Zn(OTf) ₂ (20 mol%)	DCE	62	1:1,0
5	Zn(OTf) ₂ (20 mol%)	CHCl ₃	60	1:1,2
6	Zn(OTf) ₂ (20 mol%)	MeCN	67	1:0,8
7	Zn(OTf) ₂ (20 mol%)	Toluol	35	1:1,0
8	Zn(OTf) ₂ (20 mol%)	THF	58	1:0,9
9	Zn(OTf) ₂ (20 mol%)	Chlorbenzol	63	1:1,0
10	Zn(OTf) ₂ (20 mol%)	Fluorbenzol	70	1:1,1
11 ^[e]	Zn(OTf) ₂ (20 mol%)	1,4-Dioxan	77	1:1,1
12 ^[f]	Zn(OTf) ₂ (20 mol%)	1,4-Dioxan	60	1:1,1

[a] Reaktionsbedingungen: Triacetyl-(D)-Glucal (1 mmol) und **22a** (2 mmol) in 0,5 ml trockenem Lösungsmittel.

[b] NMR Ausbeuten bestimmt durch ¹H-NMR mit 1,3,5-Trimethoxybenzol als internen Standard. [c] α : β -Verhältnis durch ¹H-NMR der unaufgereinigten Reaktion, anomeres Zentrum durch ¹J_{C-H} Kupplungskonstanten bestimmt. [d] 1,0 ml Lösungsmittel. [e] altes **22a**. [f] frisch destilliertes **22a**.

Tab. 4.3. Optimierung der vinylogenen Ferrier-Umlagerung ausgehend von 3,4,6-Triacetylglucal und Enolether **22b.^[a]**



Eintrag	Katalysator (Beladung)	Zeit (h)	Isolierte Ausbeute (%)	α : β -Verhältnis ^[b]
1	Zn(OTf) ₂ (20 mol%)	2	56	1:1,1
2	Zn(OTf) ₂ (20 mol%)	15	81	1:1,1
3 ^[c]	Zn(OTf) ₂ (20 mol%)	15	61	1:1,2
4 ^[d]	Zn(OTf) ₂ (10 mol%)	15	86	1:1,1

[a] Reaktionsbedingungen: Triacetyl-(D)-Glucal (1 mmol) und **22b** (2 mmol) in 0,5 ml trockenem Lösungsmittel.

[b] α : β -Verhältnis durch ¹H NMR der unaufgereinigten Reaktion, anomeres Zentrum durch ¹J_{C-H} Kupplungskonstanten bestimmt. [c] 1,1 eq. **22b**. [d] 1,5 eq. **22b**. [d] Reaktionsbedingungen: Triacetyl-(D)-Glucal (12 mmol), **22b** (18 mmol) und 10 mol% Zn(OTf)₂ in 3 ml trockenem Lösungsmittel.

4.3.2 Die Ferrier-Umlagerung von verschiedenen Glucalen mit **22b**

Mit der optimierten Reaktionsbedingung (**Tab. 4.3**) wurde daraufhin die Anwendbarkeit der γ -selektiven, vinylogenen Ferrier-Umlagerung mit **22b** auf verschiedene acetylierte Zucker getestet (**Tab. 4.4**, in Kooperation mit Dr. Chuanjie Loh am MPI Dortmund). Die vinyloge Substitution ließ sich dabei auf Monosaccharide, Disaccharide sowie sechs- und fünfgliedrige Glucale anwenden. Die Ausbeute schwankte dabei zwischen 54 und 86 %, wobei Triacetyl-D-Glucal die höchste Ausbeute lieferten. Das höchste α / β -Verhältnis wurde für Acetylalactal (**Tab. 4.4, Eintrag 2**) erhalten, wobei hier von dirigierenden Acetylgruppen ausgegangen wurde, da diese im Gegensatz zu Acetylglucal (**Tab. 4.4, Eintrag 1**) alle in derselben Ebene liegen und damit ein Angriff von der gegenüberliegenden β -Seite bevorzugt war. Im Falle von Acetylramnal (**Tab. 4.4, Eintrag 5**) war das kinetische α -Produkt vermehrt gebildet worden. Bei den restlichen Glucalen war keine α / β -Selektivität zu beobachten.

Tab. 4.4. Untersuchung der Anwendung der γ -selektiven Ferrier-Umlagerung auf verschiedene, acetylierte Zucker.^[a]

acetylierte Glucale + **22b** $\xrightarrow[1,4\text{-Dioxan, } 50\text{ }^\circ\text{C, 15 h}]{20\text{ mol\% Zn(OTf)}_2}$ **23a-g**

Eintrag	Zucker (R)	Isolierte Ausbeute (%)	α : β -Verhältnis ^[b]
1		86	1:1,1
2		54	1:3,7
3 ^[c]		83	1,2:1
4a ^[c]		81	1:1,6
4b ^[c]		77	1:1,5
5		80	1,9:1
6		62	1,1:1
7 ^[c]		70	1,4:1

[a] Reaktionsbedingungen: Triacetyl-(D)-Glucal (1 mmol) und **22b** (2 mmol) in 1 ml trockenem 1,4 Dioxan bei 50 °C für 15 h. [b] α : β -Verhältnis durch ¹H-NMR der unaufgereinigten Reaktion, anomeres Zentrum durch ¹J_{C-H} Kupplungskonstanten bestimmt [c] Anomere trennbar. 4a: D-Xylal. 4b: D-Arabinol.

4.3.3 Untersuchung verschiedener γ -Nukleophile

Da die Reaktion erfolgreich auf verschiedene Glucal angewendet werden konnte, wurden im Anschluss verschiedene vinyloge γ -Nukleophile unter den Reaktionsbedingungen, wie sie in **Tab. 4.4** beschrieben sind, mit Triacetyl-D-Glucal reagiert. Dafür wurden zunächst lineare, TBS-geschützte, verzweigte und nicht verzweigte Crotonyl-Nukleophile hergestellt (**Tab. 4.5, Einträge 1-4**). Durch $^1\text{H-NMR}$ wurde nach der Reaktion festgestellt, dass weder eine γ -noch α/β -selektive Substitution stattgefunden hatte. Dies lag wahrscheinlich an der ungeschützten α -Position des vinylogen Systems, die neben der γ -Position reaktiv ist. Im Falle des Sorbinsäurenucleophils (**Tab. 4.5, Eintrag 4**) war dies besonders deutlich, wobei neben fehlender γ -, auch keine ε -Selektivität erreicht wurde und das Verhältnis von $\alpha:\beta:\varepsilon$ -Angriff stöchiometrisch vorlag. Im Falle des α -blockierten 2-Methylcrotonylesters (**Tab. 4.5, Eintrag 3**) konnte ein leicht verbessertes $\gamma:\alpha$ -Verhältnis erreicht werden. Für die leichte γ -gegenüber α -Selektivität des 2-Methylcrotonsäurenucleophils (**Tab. 4.5, Eintrag 3**) wurde davon ausgegangen, dass die α -Position zu einem Teil durch die α -Methylgruppe abgeschirmt wurde.

Die γ -Selektivität von Enolat **22a** und **22b** im Gegensatz zu den linearen Nucleophilen könnte daraus resultieren, dass die sterische Hinderung des Dioxinonrings die α -Position zu einem gewissen Grad abgeschirmt hat. Da keine Selektivität erreicht werden konnte, wurde die Methylestergruppe des Crotonylenoethers durch ein Dimethylpyrrol ersetzt. Diese Struktur wurde gewählt, da das Beispiel bereits in der vinylogen Mukaiyama-Aldolreaktion eingesetzt wurde. Bei der Mukaiyama-Aldolreaktion wurden ebenfalls γ -Selektivitätsprobleme von linearen Nucleophilen beobachtet.¹⁵³

In der Literatur¹⁵³ wurde deshalb die Dimethylpyrrolgruppe eingesetzt um die benachbarte α -Position zu blockieren. Um die Enoether **22g-i** zu erhalten, wurde zunächst Crotonylchlorid mit wässriger Ammoniaklösung (**24**) umgesetzt, um anschließend die Pyrrolbildung (**25**) bei 120 °C durchzuführen (Abb. 4.5). Im Anschluss wurden mit NaHMDS als Base das Crotonylderivat mit verschiedenen Silyl-Schutzgruppen substituiert, um **22g-i** zu erhalten.

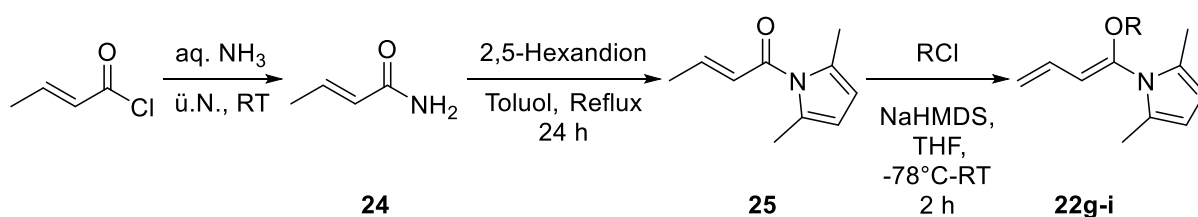
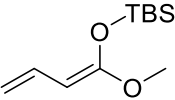
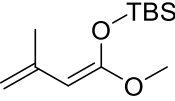
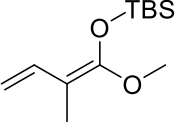
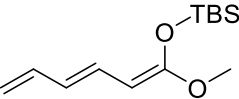
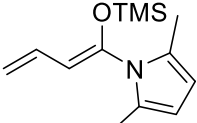
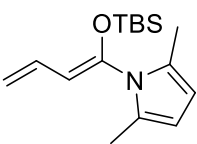
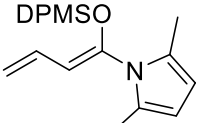
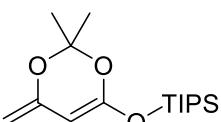


Abb. 4.5. Synthese der Pyrrol-abgeleiteten Enoether **22g-i**.¹⁵³

Überraschenderweise wurde keine Umlagerung von Triacetylglucal mit TBS-geschütztem Pyrrol **22h** (Tab. 4.5, Eintrag 6) beobachtet. Der als sehr reaktiv angenommene TMS-Enolether **22g** (Tab. 4.5, Eintrag 5) ging ebenfalls keine Substitutionsreaktion ein. Auch **22i**, das für eine Mukaiyama-Reaktion verwendet wurde, zeigte keine Produktbildung.

Tab. 4.5. Optimierung der vinylogen Ferrier-Umlagerung mit verschiedenen Enolaten.^[a]

Eintrag	Name des Nucleophils	Nucleophil	$\alpha:\beta$ -Verhältnis ^[b]	$\gamma:\alpha$ -Verhältnis ^[b]
1	22c		ca. 1:1	ca. 1:1
2	22d		ca. 1:1	ca. 1:1
3	22e		ca. 1:1	ca. 2.2:1
4	22f		ca. 1:1	ca. 1:1:1
5	22g		-	-
6	22h		-	-
7	22i		-	-
8	22j		-	-

[a] Reaktionsbedingungen: 0,2 mmol Triacetylglucal; 0,4 mmol Dienolat **22c-j** und 20 mol% Zn(OTf)₂ in 0,2 ml trockenem 1,4-Dioxan bei 50 °C für 15 h. [b] $\alpha:\beta$ - und $\alpha:\gamma$ -Verhältnisse wurde durch ¹H-NMR bestimmt, aufgrund fehlender Reaktivität/Selektivität wurde keine Ausbeute bestimmt.

4.3.4 Optimierung der α/β -Selektivität - Enolate

Die gezeigten Enolate konnten keine γ -Selektivität aufweisen. Daher wurde im Folgenden der Fokus auf die α/β -Selektivität gelegt. Hierbei wurde die Reaktivität der Silyl-Abgangsgruppe verändert. Dazu wurde TBS durch TIPS ersetzt (**22j**, **Tab. 4.5, Eintrag 8**). Der Hintergrund war, dass durch eine langsamere Reaktionsgeschwindigkeit das thermodynamisch stabilere Produkt gebildet werden sollte. Gekoppelt an den anomeren Effekt sollte sich bevorzugt das α -Produkt bilden.¹⁵¹ Es konnte keine Reaktion beobachtet werden, was in der TIPS-Gruppe als schlechte Abgangsgruppe begründet liegt. Als nächstes sollten Dioxinon-Enolate **22i-k** (**Abb. 2.6** und **Abb. 2.7**) synthetisiert werden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit γ -C-Glycosidierungen eingehen und durch verschiedene Eigenschaften das α/β -Verhältnis positiv beeinflussen sollten.

Daraufhin sollte **22k** synthetisiert werden, das ein Derivat der Enolate **22a** und **22b** darstellt. Es wurde spekuliert, dass die 2-Methylgruppe die Reaktivität des vinylogenen Systems und damit das α/β -Verhältnis beeinflussen sollte. Es wurde beginnend von *tert*-Butylacetoacetat eine Methylierung an der C-H aciden α -Position durchgeführt (**Abb. 4.6**). Anschließend wurde das Lakton durch eine Acetal- und Esterbildung erhalten, das dann unter den Standardbedingungen zum Enolether **22k** überführt werden sollte. Trotz mehrere Anläufe konnte **22k** nicht erhalten werden, welches als TMS-Derivat in der Literatur¹⁵⁴ beschrieben ist. Stattdessen zerfiel das Produkt und konnte nur teilweise geschützt isoliert werden.

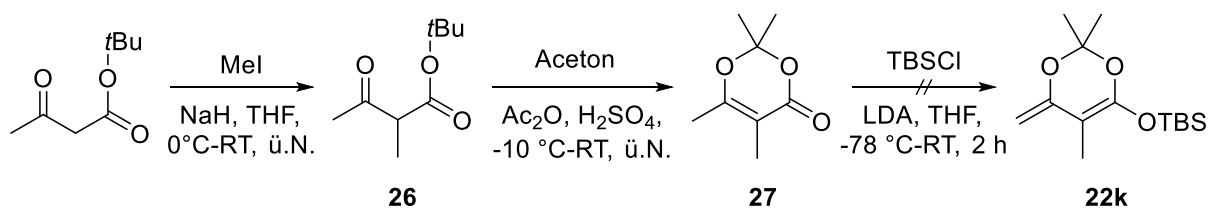


Abb. 4.6. Synthese des Enolethers **22k**.¹⁵⁴

Als nächstes wurde der difluorierte Enolether **22l** synthetisiert (**Abb. 4.7**).¹⁵⁵ Die Fluorgruppe sollte dabei durch den negativen induktiven Effekt einen Einfluss auf die vinyloge Reaktivität nehmen und damit die α/β -Selektivität beeinflussen.¹⁵⁶ Bei der Synthese wurde Dioxinon in zwei Schritten unter geringer Ausbeute mit NFSI umgesetzt, um das difluorierte Dioxinon **29** zu erhalten. Anschließend wurde **29** mit einer TBS-Gruppe geschützt (**22l**).¹⁵⁵ Leider konnte auch hier nur Zerfall des Edukts aber keine Produktbildung beobachtet werden.

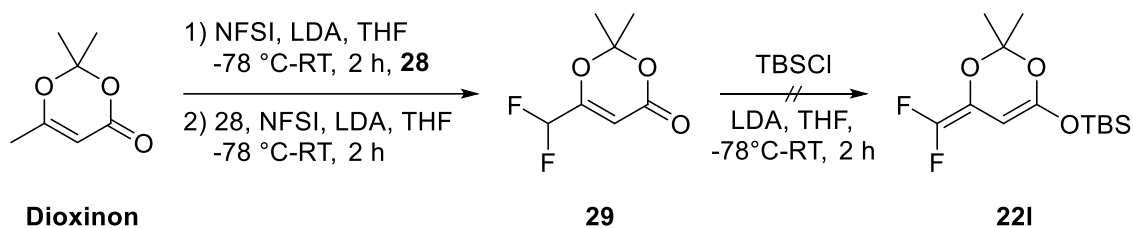


Abb. 4.7. Synthese des Enolethers 221.¹⁵⁵

4.3.5 Optimierung der α/β -Selektivität - Schutzgruppeneffekte

Da keines der Enolatderivate erfolgreich zu einer besseren α/γ -Selektivität führte, wurde die α/β -Selektivität genauer untersucht. Hierbei wurde zunächst der Einfluss von verschiedenen Schutzgruppen der Zucker betrachtet. Dazu sollten die Acetylgruppen durch andere Estergruppen (Mesyl-, Tosyl-, Trifluoracetyl-, Pivalat-, Benzoylgruppen) und Ethergruppen (Benzyl-, TBS-Gruppen) ersetzt werden. Die verschiedenen Schutzgruppen sollten neben der erhöhten Reaktivität als Abgangsgruppe (Mesyl, Tosyl, Trifluoracetyl) auch durch sterische Effekte als Substituent (Pivalat, Benzoyl, Benzyl, TBS) die Selektivität steuern. Außer dem kommerziell erhältlichen benzylierten Glucal mussten weitere Glucalderivate synthetisiert werden (**Abb. 4.8**).

Bei den Estern konnte das Glucal nur durch die Pivaloyl- und Benzylgruppen geschützt werden. Die Mesyl- und Tosylgruppen waren für eine Aufreinigung zu reaktiv. Bei der Reaktion mit Trifluoracetylchlorid wurde eine heftige Reaktion beobachtet, die zur Zersetzung des Startmaterials führte. Nach der Synthese des Ausgangsmaterials wurde die Umlagerung unter den optimierten Bedingungen der einzelnen Zuckerderivate getestet (**Tab. 4.6**). Es konnte in allen Fällen bis auf die Benzyl-geschützten Glucalderivate (**Tab. 4.6, Eintrag 4**) keine Reaktion registriert werden. Aus unbekanntem Gründen konnte in nur eine vollständige Zersetzung des Benzyl-geschützten Startmaterials beobachtet werden (**Tab. 4.6, Eintrag 4**).

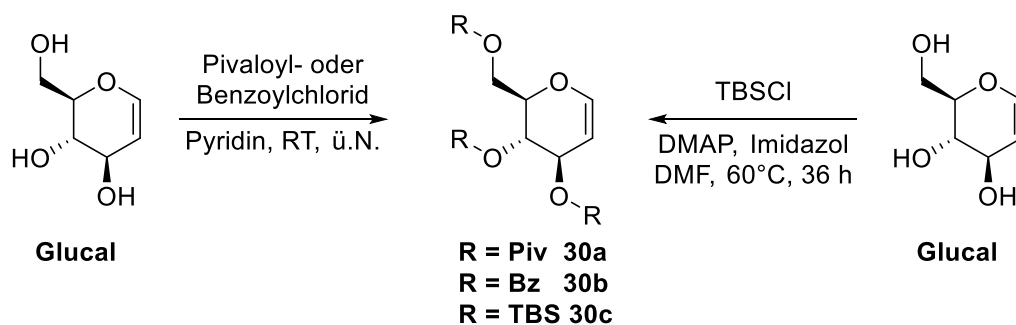
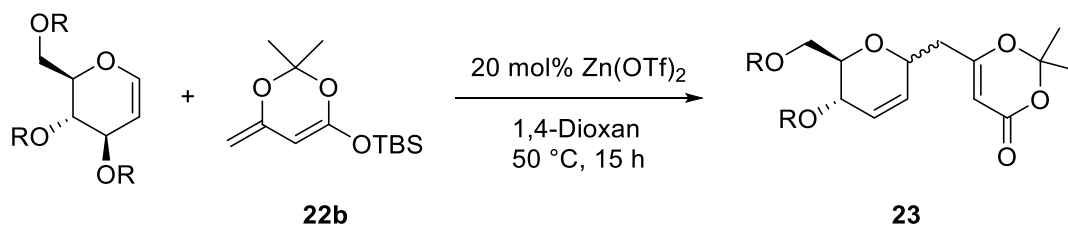


Abb. 4.8. Synthese verschieden geschützter Zuckerbausteine.

Tab. 4.6. Optimierung der vinylogen Ferrier-Umlagerung im Hinblick auf verschiedene Schutzgruppen des Glucals.



Eintrag ^[a]	Glucal	$\alpha:\beta$ -Verhältnis ^[b]	Bemerkung
1		ca. 1:1	-
2		-	Edukt
3		-	Edukt
4		-	Zersetzung
5		-	Edukt

[a] Reaktionsbedingungen: 0,2 mmol geschütztes D-Glucal; 0,4 mmol **22b** und 20 mol% Zn(OTf)₂ in 0,2 ml trockenem 1,4-Dioxan bei 50 °C für 15 h. [b] $\alpha:\beta$ -Verhältnis wurde durch ¹H-NMR bestimmt.

4.3.6 Optimierung der α/β -Selektivität - Katalysatoren

Verschiedene Enolate, Zuckerderivate und Schutzgruppen (**Kapitel 4.3.3-4.3.5**) konnten keine größere Verschiebung zu Gunsten des α - oder β -Anomers erbringen. Daher wurde die letzte Möglichkeit, den Katalysator zu ändern, intensiv ausgeschöpft (**Tab. 4.7**). Zunächst wurden Metall-basierte Lewis-Säuren (**Tab. 4.7, Einträge 1-19**) getestet. Als erstes wurde $\text{Zn}(\text{OTf})_2$ aus der Modellreaktion durch ZnCl_2 ersetzt (**Tab. 4.7, Eintrag 1**), wobei sich das Startmaterial zersetzte. Bei Reaktionen mit Metallhalogeniden der Oxidationsstufe II (**Einträge 1, 5 und 7**), mit Ausnahme von InCl_2 (**Tab. 4.7, Eintrag 15**), zersetzte sich das Startmaterial. Alle anderen Metallhalogenid-Katalysatoren mit anderen Oxidationsstufen waren inaktiv und führten zu keiner Reaktion (**Tab. 4.7, Einträge 3, 4, 8, 10, 11, 13-18**). Aufgrund dieser Beobachtungen, war das Gegenion wichtiger als die Oxidationstufe. Es modulierte die Reaktivität des Systems, wenn z. B. $\text{Zn}(\text{OTf})_2$ mit ZnCl_2 verglichen wurde.

Es stellte sich heraus, dass ebenfalls Cu- und Ag-Triflat- bzw. -Triflylamid-Komplexe unabhängig von der Oxidationsstufe die Reaktion katalysiert haben (**Tab. 4.7, Einträge 6, 9, 12**), wenngleich mit weniger Ausbeute als im optimierten System und ohne Selektivität. Im Falle der literaturbekannten Ferrier-Umlagerung¹⁵⁷ mit TiCl_4 (**Tab. 4.7, Eintrag 15**) konnte eine Reaktion beobachtet werden. Bei der Durchführung musste darauf geachtet werden, die Reaktion anfangs zu kühlen, da der Katalysator hochreaktiv war. Zusätzlich wurden 40 mol% TiCl_4 verwendet, weniger als die in der Literatur genannten stöchiometrischen Mengen. Es konnte eine geringe Ausbeute ohne Selektivität beobachtet werden.

Als Nächstes wurden Zn-katalysierte Reaktionen mit verschiedenen chiralen, Chinin-basierten Liganden, die hergestellt werden mussten, getestet. Dabei wurde zunächst die methylierte Quadratsäure **31** in einer Amidierungsreaktion zu **32** umgesetzt (**Abb. 4.9**). Parallel dazu, wurde **33** aus Chinin durch eine Mitsunobu-Reaktion erhalten. Substanz **32** und **33** wurden daraufhin in Methanol zum Katalysator **34** reagiert.^{158, 159} Ähnlich dazu wurde das Thioharnstoff-Derivat **35** erhalten, wobei ein Isothiocyanat mit **33** umgesetzt wurde (**Abb. 4.10**).¹⁵⁹ Die Ferrier-Reaktion wurde mit 20 mol% **34** bzw. **35** und jeweils 40 mol% $\text{Zn}(\text{OTf})_2$ durchgeführt. Es wurde $\text{Zn}(\text{OTf})_2$ gewählt, da das Gegenion $(\text{OTf})^-$ bei dieser Ferrier-Umlagerung bisher entscheidend zur Katalyse beitrug. Die Reaktion wurde mit 40 mol% des Metalls durchgeführt, da der Chinidin-Teil des Katalysators koordinierende Stickstoffe besitzt. Um nicht nur die Koordination an die Stickstoffe zu erreichen, sondern auch eine Koordination an den Wasserstoffbrückendonorteil zu erhalten, wurde ein erhöhtes Verhältnis von Metall zu chiralen Molekül eingesetzt. Dieses Katalysatorsystem stellte sich als zu reaktiv heraus, was sich in einer Zersetzung des Edukts zeigte.

Da die Katalysatoren **34** und **35** Wasserstoffbrückenkatalysatoren waren, wurde eine H-Brücken-Katalyse in Betracht gezogen (**Tab. 4.7, Einträge 21 und 22**). Neben den erwähnten Katalysatoren **34** und **35** wurde auch ein BARF-Derivat (**36**) und als Kontrolle das BARF Gegenion **37** verwendet (**Abb. 4.12 und Tab. 4.7, Einträge 23 und 24**). Es konnte nur im Fall von **36** eine Reaktion beobachtet werden, wobei keine α/β -Selektivität vorlag. Als nächstes Katalysatoren-System wurde BF_3 -Etherat bzw. **BPF** untersucht (**Tab. 4.7, Einträge 25 und 26**). Auch hier konnte eine Reaktion mit geringer bis mittlerer Ausbeute beobachtet werden ohne das α - oder β -Produkt bevorzugt zu erhalten. Es wurde ebenfalls Iod als Katalysator getestet.¹⁶⁰ Hierbei wurde eine Umsetzung beobachtet ohne die gewünschte Selektivität zu erhalten. Da sich keine der Anomere bevorzugt bildete und evtl. Optimierungen des Liganden ausstanden, konnten im Rahmen dieser Arbeit die Selektivität nicht zufriedenstellend optimiert werden.

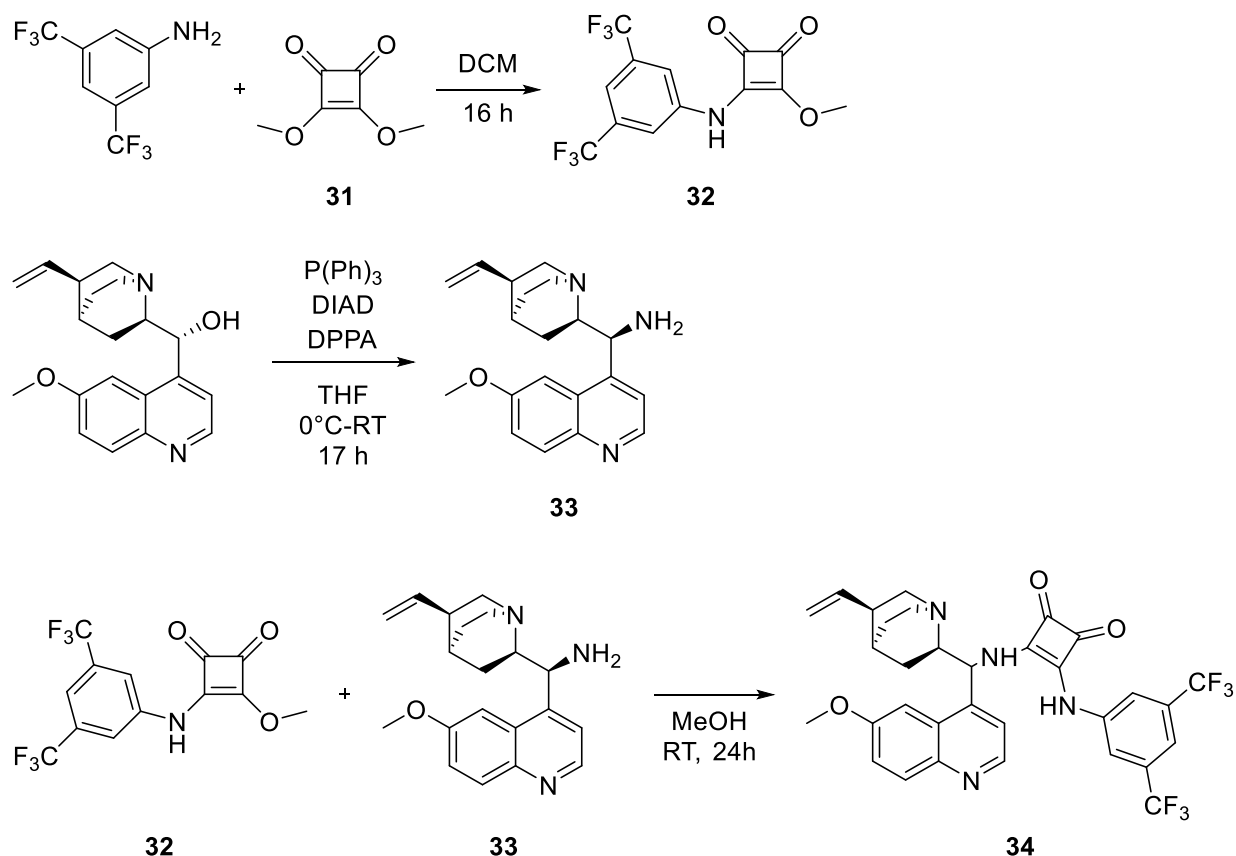


Abb. 4.9. Synthese des Katalysators **34**.^{157, 159}

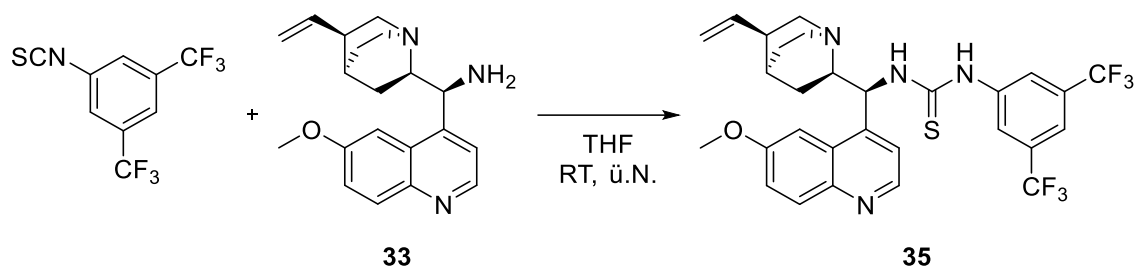


Abb. 4.10. Synthese des Katalysators 35.¹⁵⁹

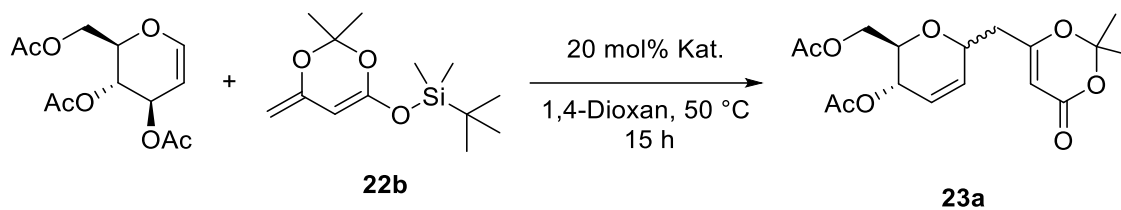


Abb. 4.11. Reaktionsschema zur Optimierung der vinylogenen Ferrier-Umlagerung im Hinblick auf Katalysatoren (Tab. 4.7).

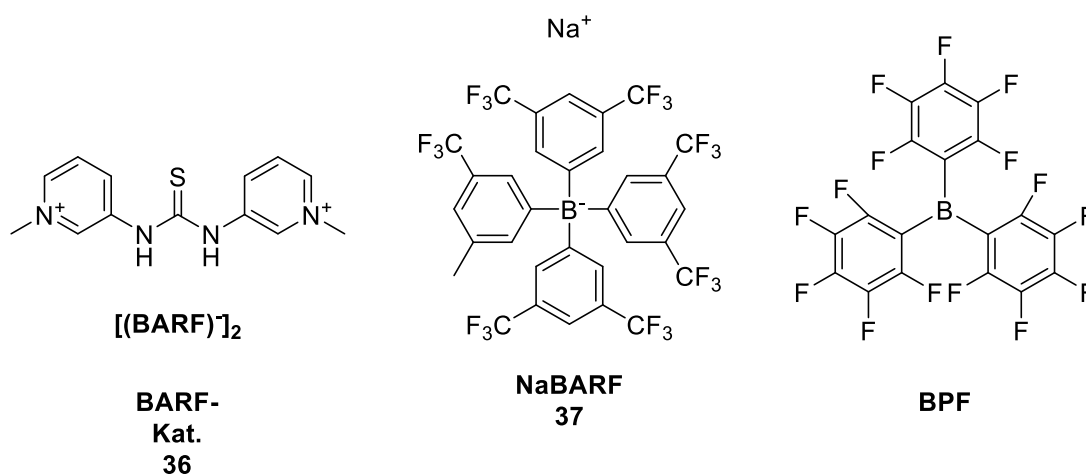


Abb. 4.12. Verwendete Katalysatoren bei der Ferrier-Umlagerung aus Tab. 4.7.

Tab. 4.7. Optimierung der vinylogenen Ferrier-Umlagerung im Hinblick auf Katalysatoren.^[a]

Eintrag	Kat.	Ausbeute [%]	α : β -Verhältnis ^[b]	Bemerkung
1	ZnCl ₂	-	-	Zersetzung
2 ^{[c], [d]}	TiCl ₄	57	1:1	-
3	CuCl	-	-	Edukt
4	CuI	-	-	Edukt
5	CuBr ₂	-	-	Zersetzung
6	Cu(OTf) ₂	47	1:1,26	-
7	FeCl ₂	-	-	Zersetzung
8	FeCl ₃	-	-	Produktspuren
9	Ag(NTf ₂)	42	1:0,82	-
10	AgNO ₃	-	-	Edukt
11	AgClO ₄	-	-	Zersetzung
12	Ag(OTf)	54	1:1,04	-
13	SnCl ₂	-	-	Edukt
14	AlCl ₃	-	-	Edukt
15	InCl ₃	-	-	Edukt
16	AuCl	-	-	Edukt
17	AuCl ₃	-	-	Edukt
18	CeCl ₃ *7H ₂ O	-	-	Edukt
19	34 Zn(OTf) ₂	-	-	Zersetzung
20	35 Zn(OTf) ₂	-	-	Zersetzung
21	34	-	-	Edukt
22	35	-	-	Edukt
23	36	34	1:0,82	-
24	37	-	-	Edukt
25 ^{[c], [d]}	BF ₃ *Et ₂ O	56	1:1	-
26	BPF	32	1:0,89	-
27	I ₂	36	1:0,97	-

[a] Reaktionsbedingungen: 0,2 mmol geschütztes Triacetylglucal; 0,4 mmol **22b** und 20 mol% Zn(OTf)₂ in 0,2 ml trockenem 1,4-Dioxan bei 50 °C für 15 h. [b] α : β -Verhältnisse wurde durch ¹H-NMR bestimmt. [c] Temperatur: -75 °C bis RT. [d] 40 mol% Katalysator.

4.4 Zusammenfassung: Neue Synthesemethoden von Glucalderivaten durch eine C-vinyloge, γ -selektive Ferrier-Umlagerung

In diesem Teilprojekt der Dissertation sollten durch die Ferrier-Umlagerung eine neue Methode für die vinyloge C-Glycosylierung gefunden werden. Hierbei wurde zunächst ein Silylgeschütztes Dioxinonenolat als mögliches Nukleophil und Actelyglucal als Substrat eingesetzt werden. Anschließend sollte die Modellreaktion optimiert werden. Hierbei stellte sich TBS als geeignete Schutzgruppe des Dioxinonnukleophils heraus. Nach der Syntheseoptimierung wurde zunächst die Reaktion auf verschiedene andere Zucker erweitert. Dabei stellte sich heraus, dass keine α/β -Selektivität erreicht werden konnte. Es wurden deshalb systematisch verschiedene Reaktionsparameter untersucht. Hierbei wurde festgestellt, dass Acetate als einzige Schutzgruppe der Glucal zulässig waren. Im Falle der linearen Enolether konnte keine Selektivität für einen α/β - bzw. α -, γ -, ϵ -Angriff beobachtet werden. Nach intensivem Testen verschiedenster literaturbekannter Katalysatoren der Ferrier-Umlagerung, konnte ebenfalls keine Selektivität gezeigt werden. Obwohl unter diesen Bedingungen kein Anomer deutlich bevorzugt gebildet wurde, konnte hier die erste γ -vinyloge C-Glycosylierung durch eine Ferrier-Umlagerung berichtet werden. Es konnten sieben Glucal als Beispiele sowie die Skalierbarkeit der Reaktion gezeigt werden.

5. Zusammenfassung

Krebs zeichnet sich durch eine Fehlregulierung mehrerer Prozesse der Zelle aus. Die Src Tyrosin Kinasen (SFKs), mit ihrem prominentesten Vertreter Src, sind ein Signalverstärker für Onkogene und liegen in ca. 50% der Dickdarm-, Lunge-, Brust-, Leber- und Bauchspeicheldrüsenkrebsfälle meist überaktiv und/oder überexprimiert vor. ⁴ Der Schwerpunkt dieser Arbeit bestand darin, die Aktivität von Src durch dessen Delokalisation zu unterbinden, indem die Bindung von Src und SFKs an dessen Transportpartner UNC119 durch kleine Moleküle-Inhibitoren inhibiert werden sollte. Zunächst wurde ein *Screening* für UNC119-Inhibitoren durchgeführt. Eine Indolin-basierte Substanz konnte als potente Ausgangstruktur für die Inhibition des SFK-Chaperon identifiziert werden.

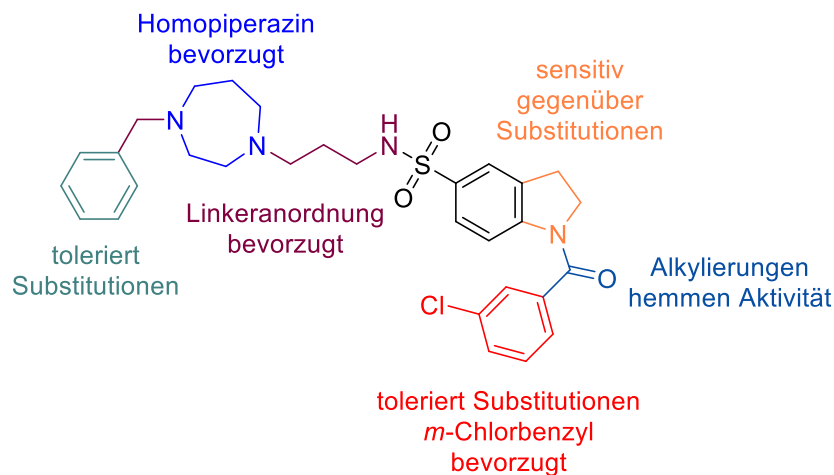


Abb. 5.1. Struktur-Wirkungsbeziehung des potentesten UNC119-Inhibitors Deltauncin.

Nach Synthese von ca. 80 Substanzen und iterativem Verbessern des initialen Hits stellte sich ein substituiertes Indolin, das **Deltauncin** (Abb. 5.2), als potentester Inhibitor von UNC119 heraus. Struktur-Aktivitätsbeziehungsanalysen zeigten, dass ein Inhibitor mit *N*-benzoyliertes, *m*-Chlor-substituiertes Indolinteil die höchste Aktivität zeigte. Das Substitutionsmuster am aromatischen Ring der Kohlenwasserstoffkette war variabel (Abb. 5.1). Die Kohlenstoffkette des Inhibitors am Sulfonamid musste hingegen lang und ein Piperazin, am besten Homopiperazin, aufweisen. **Deltauncin** zeigte nicht nur einen niedrigen IC₅₀-Wert, sondern auch eine gute Löslichkeit (229,2 µM). Überraschenderweise erwies sich **Deltauncin** als doppelter Inhibitor für UNC119a (K_d = 23 ± 3 nM) und PDEδ (K_d = 64 ± 7 nM), ein Chaperon der protoonkogenen RAS-Subfamilie. Die Bindung der Substanz an UNC119a/b und PDEδ in Zellen wurde durch ein FRET-FLIM-Experiment bestätigt, wobei ähnliche Bindungskonstanten (zellulärer K_d; UNC119a: 938,2 ± 35,9 nM; UNC119b: 144,1 ± 9,45 nM; PDEδ: 708,2 ± 105,9 nM) wie *in vitro* ermittelt wurden. Weiterhin konnte eine Delokalisation von Src von der Plasmamembran in Endomembranen durch Fluoreszenzmikroskopie nach

Behandlung von Zellen bestätigt werden. Wie erwartet zeigte eine Inhibition von UNC119 durch **Deltauncin** einen Effekt auf die Autohosphorylierung von Src und damit die Aktivität von Src. Darauf aufbauend wurde die Hypothese aufgestellt, dass Src überaktive und damit Src-abhängige Zellen durch das Blockieren von UNC119 ein reduziertes Wachstum aufweisen sollten. Es konnte eine dosisabhängige, starke Reduktion von Kolonien im Koloniebildungsassay gezeigt werden, wobei die Src-abhängigen Zelllinie MDA-MB-231 und HT29 verwendet wurden. Neben der Koloniezahl wurden Sphäroide der HT29-Zellen als Modell für solide Tumoren untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass **Deltauncin** Sphäroide aufbrechen kann.

Da **Deltauncin** zwei Chaperone inhibiert, wurde der Einfluss von **Deltauncin** auf das Wachstum von KRAS-abhängigen Panc-Tu-I-, HCT116- und MiaPaCa2-Zellen studiert und eine Wachstumsreduktion beobachtet. Überraschenderweise wurde auch ein Effekt *in cellulo* auf die KRAS-unabhängigen Kontrollzelllinien BxPC3 und Panc-I bemerkt. Dies steht im Gegensatz zu einem UNC119-spezifischen Inhibitor, der keinen Effekt in keiner der Zelllinien aufweist, bzw. PDE δ spezifischen Inhibitor, der das Wachstum nur in KRAS-abhängigen Zellen unterdrückt. Um aber eine Verringerung des Wachstums zu erzielen, reichte eine Inhibition von UNC119 allein nicht aus. Eine gemeinsame Gabe von UNC119- und PDE δ -Inhibitor zeigte hingegen nur schwache Effekte. Damit muss der genaue Wirkmechanismus von **Deltauncin** eingehender überprüft werden. In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal ein dualer Inhibitor von UNC119 und PDE δ beschrieben, der das Wachstum von KRAS- und Src-abhängigen Krebszelllinien reduziert.

Im zweiten Teilprojekt dieser Dissertation sollte eine Dipeptid-Substanzklasse (**Abb. 5.2**) synthetisiert werden. Diese sollte als Verstärker der Proliferation und Differenzierung durch den Hedgehog-Signalweg fungieren. Das Ziel war zunächst die erneute Synthese der Substanz aus dem vorangegangenen Screening. Der Coaktivator von Purmorphamin stellte sich als inaktiv im Hh-Signalweg heraus. Es wurde vermutet, dass das saure α -Proton racemisiert und ein anderes Stereoisomer bioaktiv ist. Die Struktur wies drei Stereozentren auf, wobei zwei davon durch den chiralen Pool von Aminosäuren eingebaut werden konnten und ein chirales Zentrum durch eine selektive Reduktion erhalten werden konnte. Basierend darauf wurden zunächst die fehlenden drei *cis*-Isomere synthetisiert. Daneben wurden diverse Versuche angestrebt, die fehlenden *trans*-Isomere zu erhalten, die aber durch asymmetrische Hydrierung oder Substitutionen nicht realisiert werden konnten. Aufbauend auf einem anderen aktiven *cis*-Isomer wurden anschließend elf Verbindungen für weitere Untersuchungen hergestellt. Die

biologische Aktivität konnte nicht reproduziert werden, da wahrscheinlich die Stereozentren im Zellkontext leicht isomerisieren können. Somit eignet sich diese Substanzklasse für diesen Signalweg nicht und wurde deshalb nicht weiter verfolgt.

Im letzten Teil dieser Arbeit wurde eine neuartige Glycosylierungsreaktion durch die Ferrier-Umlagerung entwickelt (**Abb. 5.2**). Dabei wurden triacetylierte Glucale mit Silyl-geschützten Enolethern umgesetzt, um durch eine wenig beschriebene γ -vinyloge Ferrier-Umlagerung untypische C-glycosylierte Produkte zu erhalten. Nach Optimierung der $\text{Zn}(\text{OTf})_2$ -katalysierten Umsetzung, konnten sieben verschiedene Glucale mit einem vinylogen TBS-geschützten Enoldioxinon umgesetzt werden. Auch ein Hochskalieren der Reaktion mit ähnlichen Ausbeuten war erfolgreich. Trotz intensivem Testen und Ausschöpfen verschiedener Vorgehensweisen konnte keine α/β -Selektivität beobachtet werden. Zusammenfassend wurde hier erstmals eine robuste γ -selektive, vinyloge C-Glykosylierung durch eine Ferrier-Umlagerung beschrieben.

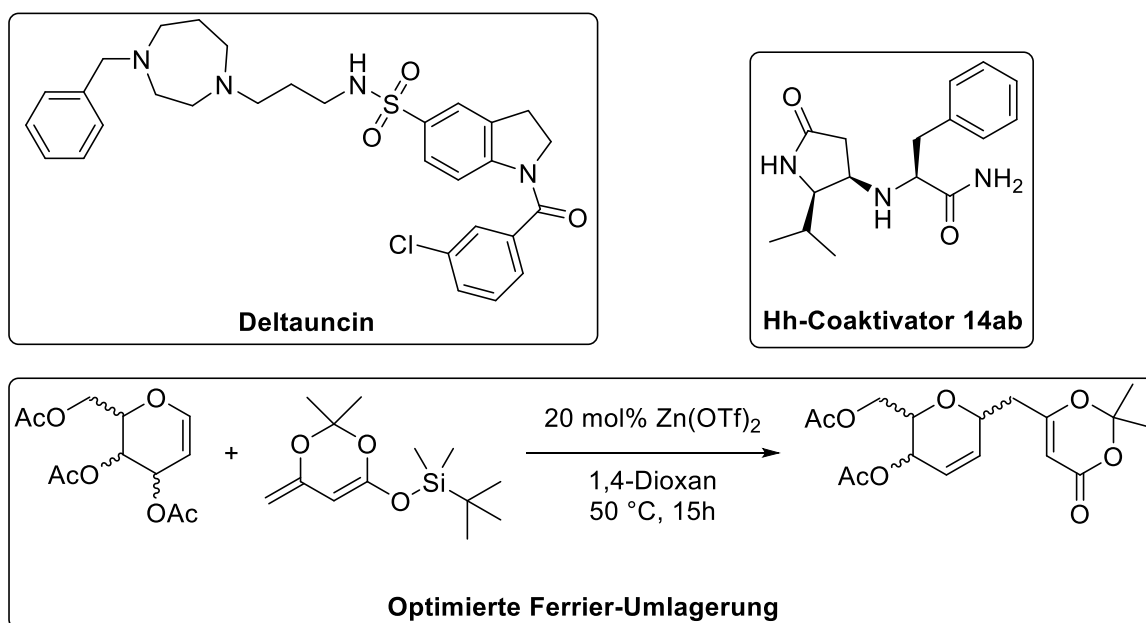


Abb. 5.2. Schematische Zusammenfassung der Dissertation.

6. Summary

Cancer displays a misregulation of many processes in cells. The Src tyrosine kinase protein family (SFKs), with Src as its most prominent representative, are amplifiers of oncogenes and are overactive and/or overexpressed in around 50% of colon, lung, breast, liver and pancreas tumors. The emphasis of this thesis is the disruption of plasma membrane localization of Src and therefore its activity by inhibition of the binding of Src to its shuttle protein UNC119 by small molecule inhibitors. At first, a high-throughput screening for UNC119-inhibitors was conducted in-house. An indoline-based scaffold was identified as a potent starting structure for the inhibition of the SFK-chaperon. After synthesis of ca. 80 structurally related compounds and the iterative improvement of the best structure, **Deltauncin** (Abb. 6.2) turned out to be the most potent inhibitor of UNC119. Structure-activity relationship analysis showed that an *N*-3-chlorobenzoyl substituted indoline part of the inhibitor was essential (Abb. 6.1). The substitution pattern of the aromatic ring at the sulphonamide was variable.

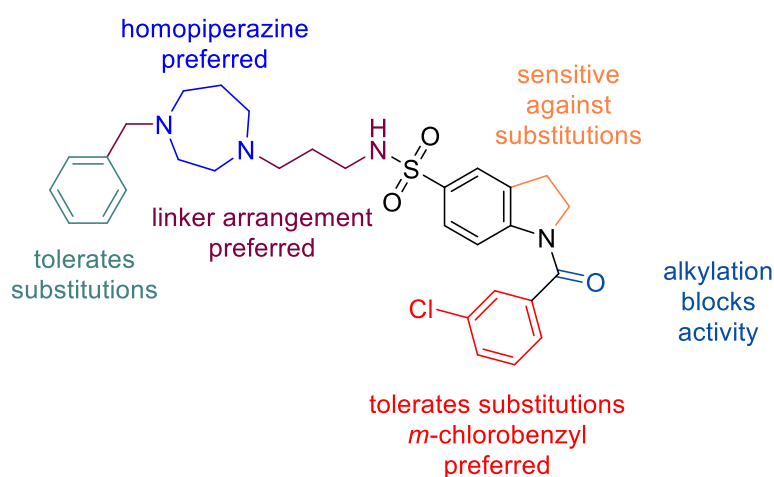


Abb. 6.1. Structure activity relationship of the most potent UNC119-inhibitor **Deltauncin**.

The hydrocarbon chain next to the sulphonamide should be long enough and must exhibit a piperazine, at best a homopiperazine. Furthermore, **Deltauncin** showed excellent solubility (229.2 μ M) and was therefore suitable for further biological validation. Surprisingly, **Deltauncin** exhibited a dual inhibition with high affinity of UNC119a ($K_d = 23 \pm 3$ nM) and PDE δ ($K_d = 64 \pm 7$ nM). PDE δ is the chaperon of the protooncogenic RAS-subfamily. The cellular binding of the substance to UNC119a/b and PDE δ was confirmed by a FRET-FLIM experiment in cells and it was found similar binding constants (in-cell K_d ; UNC119a: 938.2 ± 35.9 nM; UNC119b: 144.1 ± 9.45 nM; PDE δ : 708.2 ± 105.9 nM) like *in vitro*. Consequently, the delocalisation of Src from the plasma membrane to endomembranes was confirmed by fluorescence microscopy after the treatment of cells with **Deltauncin**. As

expected, an inhibition of UNC119 by **Deltauncin** suppressed the autophosphorylation of Src and thus its activity. Therefore, it was hypothesized that Src-dependent and therefore sensitive cells should show a growth reduction upon blocking UNC119. A dose-dependent, strong reduction of colonies was detected in a clonogenic assay utilizing the Src-dependent breast cancer cell line MDA-MB-231 and the colon cancer cell line HT29. Besides the colony formation, spheroids of HT29 cells as solid tumour model were studied. It was proven, that **Deltauncin** can break up spheroids.

Deltauncin inhibits two chaperons, UNC119 and PDE δ . As expected, a growth reduction was observed on KRAS-dependent Panc-Tu-I, HCT116 and MiaPaCa2 cells after treatment with **Deltauncin**. Surprisingly, an additional reduction in growth was seen in the KRAS-independent cell lines BxPC3 and Panc-I. This observation is contrary to the lack of influence of the UNC119 specific inhibitor in KRAS-independent but Src-dependent cell lines and to the PDE δ -specific inhibitor which suppresses the growth of KRAS-dependent cells only. In order to achieve a reduction in growth, a single inhibition of UNC119 was not sufficient. Therefore, combined treatment of cells with selective UNC119- and PDE δ -inhibitors was performed. However, an effect in the magnitude of **Deltauncin** cannot be observed. Concluding from that, the exact mechanism of action of **Deltauncin** in cells has to be determined. Herein, an inhibitor for both UNC119 and PDE δ was described the first time that has suppressed growth in various cancer cell lines.

In the second part of this dissertation, another glance should be taken on a dipeptide substance class (**Abb. 6.2**) acting as an amplifier of proliferation and differentiation through the Hedgehog signalling pathway. The goal was to resynthesize the substance of the preceding screen. However, it proved to be inactive in the Hh signalling pathway most likely due to the acid α -proton of the dipeptide, which might undergo racemization and one of the stereoisomer might be the bioactive molecule in the Hh pathway. The compound displayed three stereogenic centres, of which two were introduced by a chiral pool of amino acids and the other by selective reduction. Based upon that, the missing three *cis* isomers were synthesized. After diverse attempts, none of the four *trans* isomers could be obtained by either asymmetric hydrogenation or substitution reaction. Based on another active *cis* isomer, eleven compounds were synthesized for further studies. The biological activity proved to be not reproducible, most probably because of isomerisation *in cellulo*. Therefore this compound class was not applicable for this setup and was not followed up.

The main focus of the third part was the development of novel glycosylation reactions by Ferrier rearrangement (**Abb. 6.2**). Thereby, triacetylated glucals were treated with silyl protected enol ethers in order to access atypical C-glycosylated products by rarely described γ -vinylogous Ferrier rearrangement. After optimization of the $\text{Zn}(\text{OTf})_2$ -catalyzed synthesis, seven different glucals were reacted with a TBS protected enol dioxinone. An upscaling of the reaction was also successful. Despite extensive tests and exhaustive pursue of different approaches, no α/β -selectivity could be achieved. In summary, the first robust and upscalable γ -selective, vinylogous C-glycosylation by a Ferrier rearrangement was described.

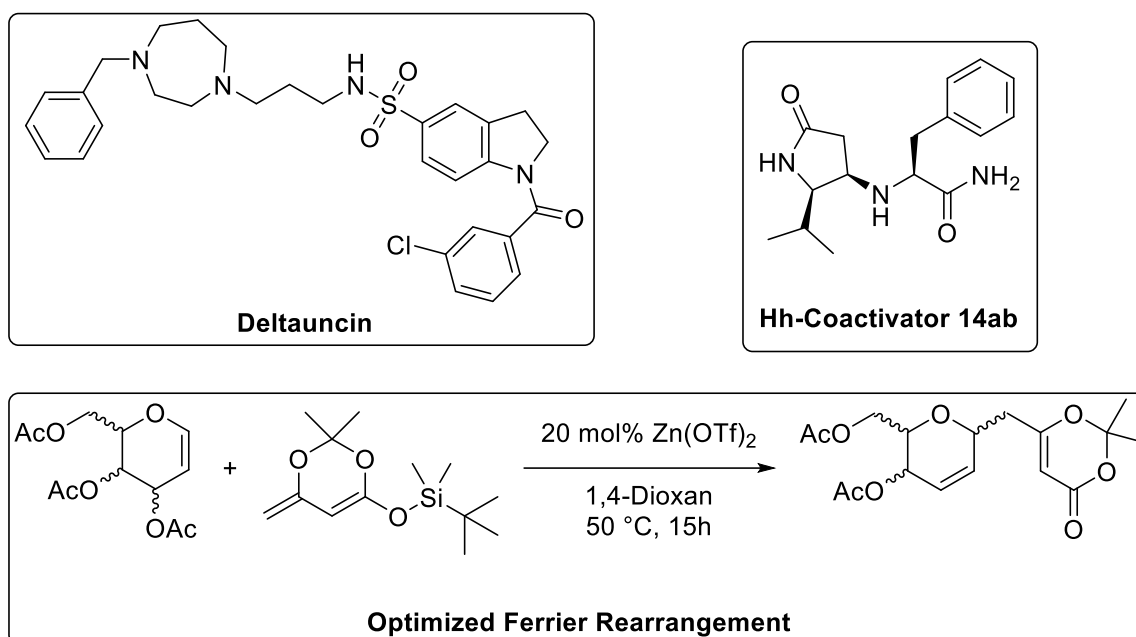


Abb. 6.2. Schematic summary of the dissertation.

7. Experimenteller Teil

7.1 Chemischer Teil - Arbeitstechniken

Chemikalien und Lösemittel

Die Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich (Taufkirchen), AlfaAesar (Karlsruhe), VWR, Acros (Darmstadt), Thermo Fisher Scientific (Nidderau), Merck (Darmstadt) und Bachem (Bubendorf, Schweiz) und ohne weitere Aufreinigung, soweit nicht anders angegeben, bezogen. Destilliertes Wasser wurde entweder aus dem hausinternen Verteilungssystem oder aus einer Milli-Q Pod-Anlage (Millipore, Merck (Darmstadt)) entnommen. Inhibitoren für das *COMAS-Screening* wurden von ChemDiv (San Diego, USA) bezogen. Lösemittel wurden von Thermo Fisher Scientific (Nidderau) erhalten. Trockene Lösemittel wurden von Acros (Nidderau) erstanden. NMR-Lösemittel wurden von Deutero (Kastellaun) und Euroisotop (Saarbrücken) erhalten.

Synthetisierte Substanzen

Reaktionen wurden unter einer trockenen Argonatmosphäre in Glaskolben durch dreimaliges Begasen/Evakuieren durchgeführt. Entgast/gelöst wurde in einem Bandelin Sonorex RK102H Ultraschallbad. Die Produkte wurden im Hochvakuum ($3 \cdot 10^{-1}$ mbar) für mindestens 16 h getrocknet. In den Fällen von Harzen/niedrigsiedenden Ölen wurde die Substanz gefriergetrocknet: in flüssigen Stickstoff getaucht und evakuiert bis zur Blasenbildung. Dieser Prozess wurde dreimal wiederholt. Alle Substanzen wurden bei -30 °C gelagert. Alle Inhibitoren wurde mit $^1\text{H-NMR}$, HPLC/MS und HRMS und falls es die Menge zuließ, mit $^{13}\text{C-NMR}$ charakterisiert. Literaturbekannte Substanzen und Stoffe, die von anderen synthetisierten Substanz abstammen wurden zumindest mit $^1\text{H-NMR}$ charakterisiert bzw. direkt im nächsten Schritt verwendet. Der UNC-spezifische Inhibitor **11** wurde von ChemDiv (San Diego, USA) erhalten. Die Optimierung der Ferrier-Umlagerung aus **Kapitel 4.3.1**. (**Tab. 4.1-Tab. 4.3**) und die Synthesen der Produkte (**Tab. 4.4**) wurden in Kooperation mit Dr. Chuanjie Loh am MPI Dortmund durchgeführt und charakterisiert. TIPS-geschütztes Dienolat **36j** (**Tab. 4.5, Eintrag 8**) wurde von Huei-Ru Wu am MPI Dortmund und BAREF-Katalysator **50** und NaBAREF **51** (**Tab. 4.7, Abb. 4.12**), von Dr. Chunfa Xu am MPI Dortmund synthetisiert und dankend erhalten.

Dünnschichtchromatographie und Färbung

Dünnschichtchromatographie (DC) Platten, Polygram Sil G/UV 254 wurden von MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG (Dürren) erhalten und wurden für die Detektion des Reaktions-/Aufreinigungsprozesses verwendet. Im Falle der Glucalderivate wurde mit einer KMnO_4 -Lösung angefärbt (Zusammensetzung: 9 g KMnO_4 , 60 g K_2CO_3 , 15 ml 5 %ige wässrige NaOH, 900 ml dest. H_2O).

Aufreinigung

Die Substanzen wurden über trockengepackte Silica-Säulen aufgereinigt. Das Silica Gel 60 (0,04-0,063 mm) wurde von Sigma-Aldrich bezogen. Das (un-)verdünnte Produkt wurde entweder direkt oder auf Silica aufgezogen aufgetragen. Die Endprodukte (Inhibitoren und Coaktivatoren) wurden über eine C18 oder C4 Umkehrphasensäule (klein: 125x10 mm; groß: 125x21 mm) in einer Agilent HPLC (1100 Serie) oder einer Waters HPLC aufgereinigt (Flussrate: 1,0 ml/min bzw. 2,0 ml/min bei kleiner bzw. großer Säule, Zeit: 35 min, 0,1 % TFA in H_2O und 0,1 % TFA in Acetonitril). Zuvor wurden diese über einen Chromafil PET-45/15 MS HPLC-Filter (0,45 μM , MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG (Dürren)) filtriert.

NMR

Kernspinresonanzmessungen wurde in folgenden Maschinen gemessen:

400 MHz: Bruker AV 400 Avance III HD NanoBay

500 MHz: Bruker AV 500 Avance III HD (Prodigy), Agilent Technologies DD2

600 MHz: Bruker AV 600 Avance III HD (CryoProbe)

700 MHz: Bruker AV 700 Avance III HD (CryoProbe)

Spektren wurden bei Raumtemperatur aufgenommen. Kalibriert wurde über interne, deuterierte Lösemittel.

Analytische HPLC/MS

Analytische HPLC-MS Chromatogramme wurden von einer Agilent HPLC (1100 Serie) mit einer Umkehrphasen-Säule (C4 oder C18 - 5 μm , 250x4,6 mm) ausgestattet mit einem Finigan LCQ ESI Spektrometer und einem UV/VIS Detektor (Flussrate: 1,0 ml/min, Zeit: 15 min, 0,1 % HCOOH in H_2O und 0,1 % HCOOH in MeCN).

HRMS

HRMS-Spektren wurden an einer Thermo Orbitrap, welche ESI verwendete, gemessen, die an ein Thermo Accela HPLC System (Säule: Hypersyl GOLD, 50 mm x 1 mm, Partikelgröße: 1,9 μm) gekoppelt war.

Polarimeter

In einem Schmidt+Hansch Polaritronic HH8 Polarimeter wurde in 1 ml in angegebener Konzentration und Lösemittel bei 589 nm polarisiertem Licht die Polarisation dreimal gemessen und der Mittelwert zu Bestimmung der Polarisation verwendet. Küvettenlänge: 10 cm, Konzentration c in g/100 ml.

7.1.1 Synthese der UNC119 Inhibitoren

Synthese der acetylierten Indole 5a-n (allgemeine Vorschrift Ia)¹⁰²

Das Indolin-Derivat **4a, b** wurde zusammen mit 3 eq. TEA und einer Spatelspitze DMAP in DCM (15 ml) gelöst. 1,2 eq. Carbonylchlorid wurde langsam unter Rühren hinzugegeben und über Nacht gerührt. Die Reaktion wurde in 50 ml 10 %iger wässriger NaOH gegeben und die wässrige Phase dreimal mit 50 ml DCM extrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO₄ bzw. Na₂SO₄ getrocknet. Es wurde anschließend im angegebenen Lösemittel über eine Silicasäule getrennt oder das Rohprodukt im nächsten Schritt verwendet.

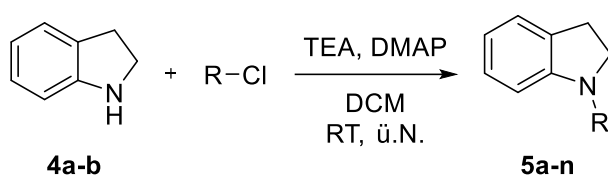
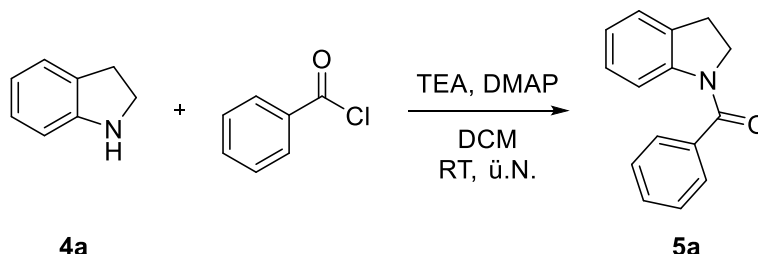


Abb. 7.1. Generelles Reaktionsschema der allgemeinen Vorschrift Ia für die Synthese der acetylierten Indole.¹⁰² R = Benzoyl (**5a**), Benzoyl (2-Methylindolin, **5b**), 4-(Trifluormethyl)benzoyl (**5c**), 4-Chlorbenzoyl (**5d**), 3-Chlorbenzoyl (**5e**), 4-Chlorbenzoyl (**5f**), 3,4-Dichlorbenzoyl (**5g**), 3,5-Dichlorbenzoyl (**5h**), 3-Brombenzoyl (**5i**), Nicotinoyl (**5j**), Acetyl (**5k**), Acetyl (2-Methylindolin, **5l**), Cyclopropanoyl (**5m**), Cyclohexanoyl (**5n**).

N-Benzoylindolin (5a)



Allgemeine Vorschrift Ia wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

Indolin **4a** (0,60 g; 5,04 mmol), Benzoylchlorid (1,06 g; 0,88 ml; 7,55 mmol) und TEA (1,06 g; 0,88 ml; 7,55 mmol). Es wurde über Silica (PE : E 2 : 1) getrennt.

Aussehen: gelber Feststoff

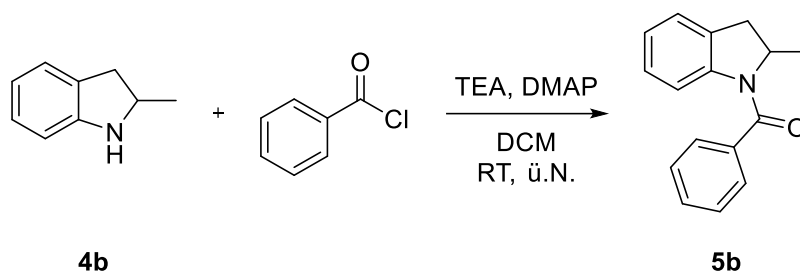
Ausbeute: 1,12 g (5,04 mmol) → quant.

R_f-Wert: 0,09 (Silica, PE : E 3 : 1)

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 7,60 – 7,39 (m, 5H); 7,21 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H); 7,01 (bs, 1H); 4,07 (bs, 2H); 3,11 (t, *J* = 8,3 Hz, 2H).

N-Benzoyl-2-methylindolin (**5b**)



Allgemeine Vorschrift Ia wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

2-Methylindolin **4b** (0,50 g; 0,49 ml; 3,75 mmol), Benzoylchlorid (0,65 g; 0,53 ml; 4,60 mmol) und TEA (1,14 g; 1,56 ml; 16,78 mmol). Das Rohprodukt wurde nicht gereinigt.

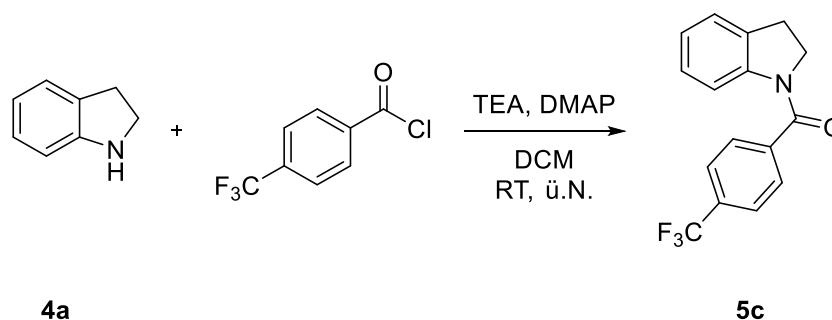
Aussehen: braunes Öl

Ausbeute: 0,89 g (3,75 mmol) → quant.

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 8,18 – 8,06 (m, 1H); 7,43 (d, *J* = 7,2 Hz, 5H); 7,20 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H); 7,05 – 6,93 (m, 2H); 4,74 (s, 1H); 3,44 – 3,36 (m, 1H); 2,63 (d, *J* = 15,7 Hz, 1H); 1,23 (d, *J* = 7,1 Hz, 3H).

N-(4-(Trifluoromethyl)benzoyl)indolin (**5c**)



Allgemeine Vorschrift Ia wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

Indolin **4a** (1,00 g; 0,94 ml; 8,39 mmol), 4-(Trifluormethyl)benzoylchlorid (2,63 g; 1,88 ml; 12,59 mmol) und TEA (4,25 g; 5,90 ml; 41,96 mmol). Es wurde über Silica (PE : E 2 : 1) getrennt.

Aussehen: gelber Feststoff

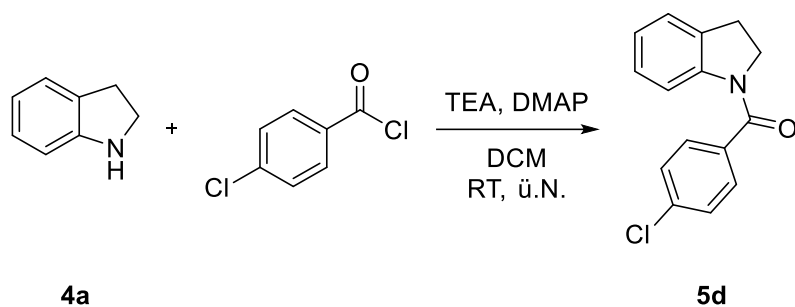
Ausbeute: 2,32 g (7,98 mmol) → 95 %.

R_f-Wert: 0,23 (Silica, PE : E 7 : 1)

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 8,21 (bs, 1H); 7,69 (dd, *J* = 18,9; 8,3 Hz, 4H); 7,23 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H); 7,05 (bs, 1H); 4,02 (bs, 2H); 3,14 (t, *J* = 8,1 Hz, 2H).

N-(4-Chlorbenzoyl)indolin (**5d**)



Allgemeine Vorschrift Ia wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

Indolin **4a** (1,00 g; 0,94 ml; 8,39 mmol), 4-Chlorbenzoylchlorid (2,20 g; 1,61 ml; 12,59 mmol) und TEA (4,25 g; 5,90 ml; 25,18 mmol). Es wurde über Silica (PE : E 7 : 1) getrennt.

Aussehen: gelber Feststoff

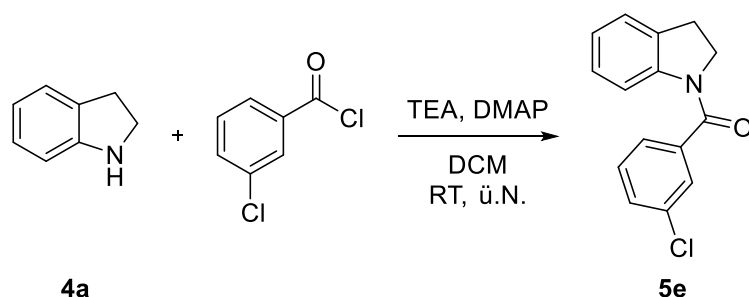
Ausbeute: 2,16 g (8,39 mmol) → quant.

R_f-Wert: 0,18 (Silica, PE : E 7 : 1)

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 8,09 – 8,04 (m, 1H); 7,55 – 7,38 (m, 4H); 7,21 (d, *J* = 7,6 Hz, 6H); 7,02 (bs, 1H); 4,06 (s, 2H); 3,12 (t, *J* = 8,2 Hz, 2H).

N-(3-Chlorbenzoyl)indolin (**5e**)



Allgemeine Vorschrift Ia wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

Indolin **4a** (1,00 g; 0,94 ml; 8,39 mmol), 3-Chlorbenzoylchlorid (1,71 g; 1,25 ml; 9,78 mmol) und TEA (2,70 g; 3,75 ml; 25,18 mmol). Das Rohprodukt wurde nicht gereinigt.

Aussehen: braun-weißer Feststoff

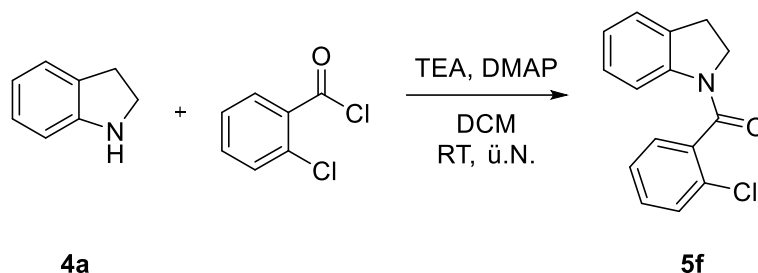
Ausbeute: 2,29 g (8,90 mmol) → quant.

R_f-Wert: 0,38 (Silica, PE : E 6 : 1)

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 8,22 (bs, 1H); 7,57 (s, 1H); 7,50 – 7,39 (m, 3H); 7,25 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H); 7,08 (s, 1H); 4,09 (s, 2H); 3,16 (t, *J* = 8,3 Hz, 9H).

N-(2-Chlorbenzoyl)indolin (**5f**)



Allgemeine Vorschrift Ia wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

Indolin **4a** (1,00 g; 0,94 ml; 8,39 mmol), 2-Chlorbenzoylchlorid (1,71 g; 1,24 ml; 9,78 mmol) und TEA (2,70 g; 3,75 ml; 25,18 mmol). Das Rohprodukt wurde nicht gereinigt.

Aussehen: braun-weißer Feststoff

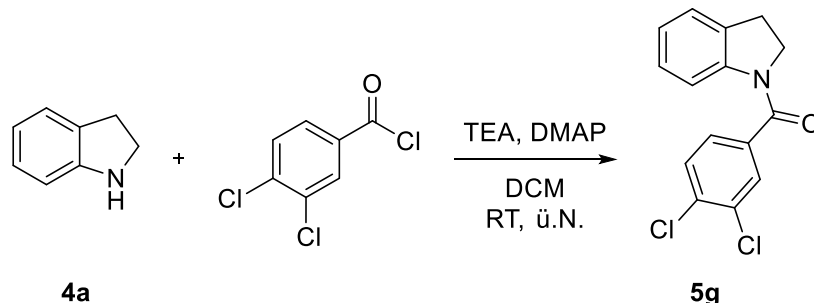
Ausbeute: 2,29 g (8,90 mmol) → quant.

R_f-Wert: 0,29 (Silica, PE : E 6 : 1)

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 8,35 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H); 7,49 – 7,33 (m, 4H); 7,21 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H); 7,13 – 7,03 (m, 1H); 6,94 – 6,78 (m, 1H); 3,80 (bs, 2H); 3,13 (t, *J* = 8,4 Hz, 2H).

N-(3,4-Dichlorbenzoyl)indolin (**5g**)



Allgemeine Vorschrift Ia wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

Indolin **4a** (1,00 g; 0,94 ml; 8,39 mmol), 3,4-Chlorbenzoylchlorid (2,64 g; 12,59 mmol) und TEA (4,25 g; 5,90 ml; 25,18 mmol). Es wurde über Silica (PE : E 7 : 1) getrennt.

Aussehen: kanariengelber Feststoff

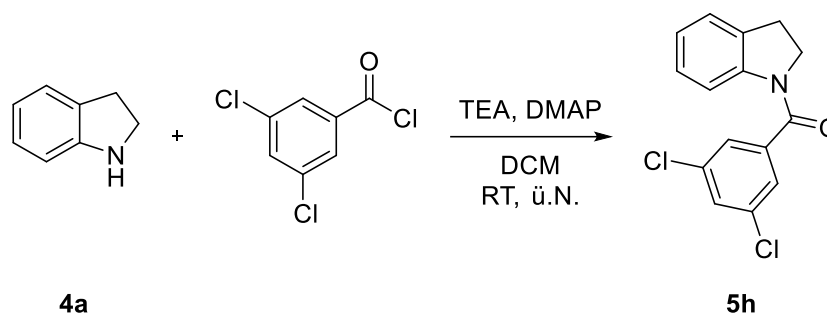
Ausbeute: 2,23 g (7,65 mmol) → 91 %

R_f-Wert: 0,21 (Silica, PE : E 7 : 1)

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 8,08 (bs, 1H); 7,59 (d, *J* = 1,9 Hz, 1H); 7,46 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H); 7,33 (dd, *J* = 8,2; 1,9 Hz, 1H); 7,16 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H); 7,08 (s, 1H); 6,98 (s, 1H); 4,00 (bs, 2H); 3,07 (t, *J* = 8,2 Hz, 2H).

N-(3,5-Dichlorbenzoyl)indolin (**5h**)



Allgemeine Vorschrift Ia wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

Indolin **4a** (1,06 g; 1,00 ml; 8,92 mmol), 3,5-Dichlorbenzoylchlorid (2,06 g; 1,45 ml; 9,81 mmol) und TEA (2,71 g; 3,76 ml; 26,76 mmol). Das Rohprodukt wurde nicht gereinigt.

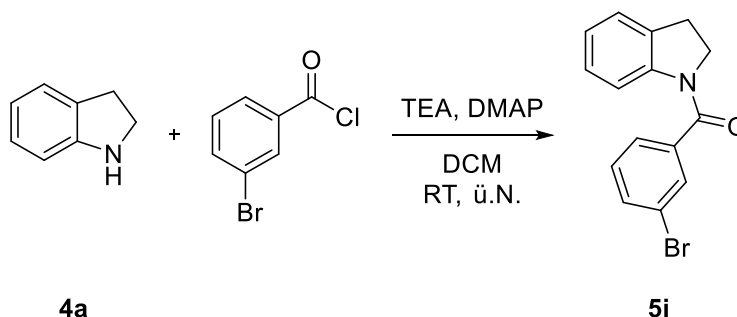
Aussehen: gelb-weißer Feststoff

Ausbeute: 2,60 g (8,90 mmol) → quant.

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 8,16 (bs, 1H); 7,50 (s, 1H); 7,45 (d, *J* = 1,8 Hz, 2H); 7,26 (bs, 1H); 7,26 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H); 7,10 (bs, 1H); 4,07 (s, 2H); 3,18 (t, *J* = 8,2 Hz, 2H).

N-(3-Bromobenzoyl)indolin (**5i**)



Allgemeine Vorschrift Ia wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

Indolin **4a** (1,06 g; 1,00 ml; 8,92 mmol), 3-Bromobenzoylchlorid (2,35 g; 1,41 ml; 10,70 mmol) und TEA (2,71 g; 3,76 ml; 26,76 mmol). Das Rohprodukt wurde nicht gereinigt.

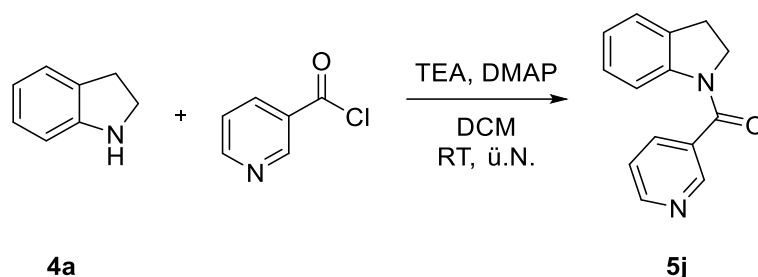
Aussehen: oranger Feststoff

Ausbeute: 2,70 g (8,92 mmol) → quant.

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 8,20 (s, 1H); 7,73 – 7,71 (m, 1H); 7,64 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H); 7,50 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H); 7,36 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H); 7,25 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H); 7,22 (bs, 1H); 7,07 (s, 1H); 4,08 (s, 2H); 3,16 (t, *J* = 8,2 Hz, 2H).

N-Nicotinoylindolin (**5j**)



Allgemeine Vorschrift Ia wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

Indolin **4a** (1,06 g; 1,00 ml; 8,92 mmol), Nicotinoylchlorid Hydrochlorid (1,91 g; 10,70 mmol) und TEA (2,71 g; 3,76 ml; 26,76 mmol). Das Rohprodukt wurde nicht gereinigt.

Aussehen: brauner Feststoff

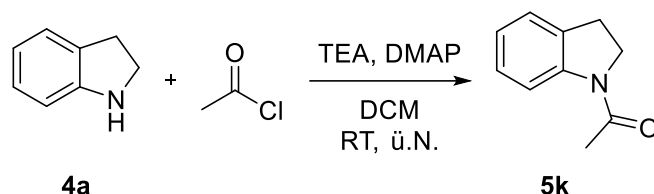
Ausbeute: 2,00 g (8,92 mmol) → quant.

R_f-Wert: 0,35 (Silica, PE : E 5 : 1)

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 8,85 (s, 1H); 8,75 (d, *J* = 3,6 Hz, 1H); 8,24 (bs, 1H); 7,92 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H); 7,43 (ddd, *J* = 7,8, 4,9, 0,8 Hz, 1H); 7,38 – 7,29 (bs, 1H); 7,26 (d, *J* = 7,5 Hz, 2H); 7,09 (bs, 1H); 4,12 (s, 2H); 3,18 (t, *J* = 8,2 Hz, 2H).

N-Acetylintolin (**5k**)



Allgemeine Vorschrift Ia wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

Indolin **4a** (1,00 g; 0,94 ml; 8,39 mmol), Acetylchlorid (0,79 g; 0,59 ml; 9,23 mmol) und TEA (1,70 g; 2,33 ml; 16,78 mmol). Es wurde über Silica (PE : E 5 : 2) getrennt.

Aussehen: braun-weiße Kristalle

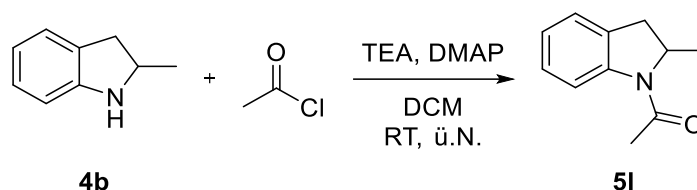
Ausbeute: 1,35 g (8,39 mmol) → quant.

R_f-Wert: 0,39 (Silica, PE : E 3 : 1)

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 8,20 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H); 7,17 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H); 7,00 (s, 1H); 4,05 (t, *J* = 8,5 Hz, 2H); 3,19 (t, *J* = 8,5 Hz, 2H).

N-Acetyl-2-methylindolin (5l)



Allgemeine Vorschrift Ia wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

2-Methylindolin **4b** (0,50 g; 0,49 ml; 3,75 mmol), Acetylchlorid (0,33 g; 0,30 ml; 4,14 mmol) und TEA (1,14 g; 1,56 ml; 16,78 mmol). Das Rohprodukt wurde nicht gereinigt.

Aussehen: braunes Öl

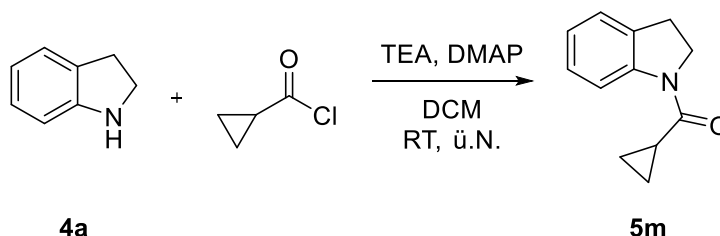
Ausbeute: 0,59 g (3,38 mmol) → 90 %.

R_f-Wert: 0,33 (Silica, PE : E 3 : 1)

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 8,15 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H); 7,20 (t, *J* = 7,8 Hz, 2H); 7,01 (dd, *J* = 11,5; 4,1 Hz, 1H); 4,52 – 4,39 (m, 1H); 3,41 (dd, *J* = 16,4; 8,8 Hz, 1H); 2,65 (d, *J* = 15,5 Hz, 1H); 2,28 (s, 3H); 1,28 (t, *J* = 9,8 Hz, 3H).

N-(Cyclopropancarbonyl)indolin (5m)



Allgemeine Vorschrift Ia wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

Indolin **4a** (1,07 g; 1,00 ml; 8,97 mmol), Cyclopropancarbonylchlorid (1,03 g; 0,90 ml; 9,87 mmol) und TEA (2,72 g; 3,73 ml; 26,91 mmol). Das Rohprodukt wurde nicht gereinigt.

Aussehen: brauner Feststoff

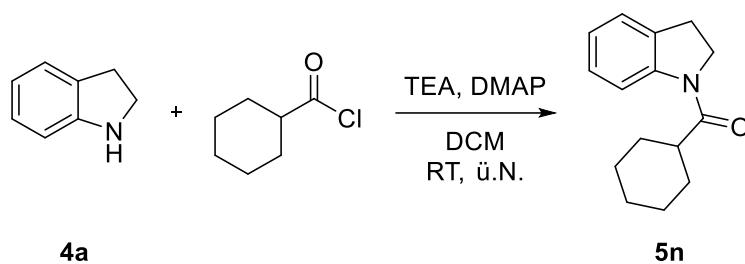
Ausbeute: 1,68 g (8,97 mmol) → quant.

R_f-Wert: 0,27 (Silica, PE : E 6 : 1)

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 8,20 (s, 1H); 7,20 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H); 7,02 (t, *J* = 7,4 Hz, 1H); 4,30 (bs, 2H); 3,25 (bs, 2H); 1,78 (s, 1H); 1,16 (s, 2H); 0,91 (d, *J* = 4,7 Hz, 2H).

N-(Cyclohexancarboxyl)indolin (**5n**)



Allgemeine Vorschrift Ia wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

Indolin **4a** (1,07 g; 1,00 ml; 8,97 mmol), Cyclohexylcarbonylchlorid (1,45 g; 1,32 ml; 9,87 mmol) und TEA (2,72 g; 3,73 ml; 26,91 mmol). Das Rohprodukt wurde nicht gereinigt.

Aussehen: hell braun-weißer Feststoff

Ausbeute: 1,64 g (7,13 mmol) → 79 %

R_f-Wert: 0,52 (Silica, PE : E 6 : 1)

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 8,29 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H); 7,21 (t, *J* = 7,9 Hz, 2H); 7,02 (t, *J* = 7,2 Hz, 1H); 4,18 – 4,13 (t, 2H); 3,22 (t, *J* = 8,1 Hz, 2H); 2,49 (t, *J* = 11,2 Hz, 1H); 1,88 (d, *J* = 8,7 Hz, 3H); 1,75 (d, *J* = 4,1 Hz, 1H); 1,67 – 1,58 (m, 4H); 1,34 (s, 3H).

Synthese der alkylierten Indole 5o-u (allgemeine Vorschrift Ib)

Das Indolin-Derivat **4a-d** wurde zusammen mit 3 eq. NaH (60 %ige Dispersion in Mineralöl) in 15 ml trockenem DMF bei Argonatmosphäre gelöst und mit 1,5 eq. Alkylhalogenid versetzt. Die Lösung wurde für 8 h bei 100 °C gerührt. Die Reaktion wurde anschließend auf Raumtemperatur gebracht. Die Mischung wurde in 50 ml 10 %iger wässriger NaOH gegeben und die wässrige Phase dreimal mit 50 ml DCM extrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO₄ bzw. Na₂SO₄ getrocknet. Es wurde anschließend im angegebenen Lösemittel über eine Silicasäule getrennt.

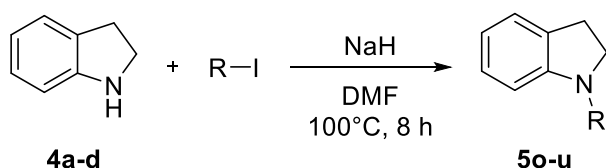
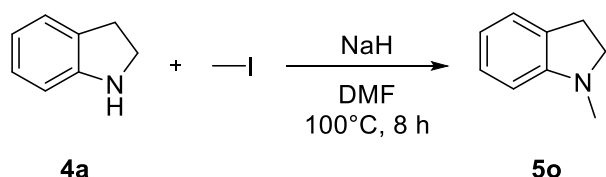


Abb. 7.2. Generelles Reaktionsschema der allgemeinen Vorschrift Ib für die Synthese der alkylierten Indole. R = Methyl (**5o**), Ethyl (**5p**), Isopropyl (**5q**), Isopropyl (2-Methylindolin, **5r**), Isopropyl (Isatin, **5s**), Isopropyl (Benzimidazol, **5t**), 1-Propyl (Benzimidazol, **5u**).

N-Methylindolin (5o)



Allgemeine Vorschrift Ib wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

Indolin **4a** (1,07 g; 1,00 ml; 8,97 mmol), Methyljodid (1,66 g; 0,73 ml; 11,66 mmol) und NaH, 60 %ige Dispersion in Mineralöl (301,39 mg; 12,56 mmol). Es wurde über Silica (PE : E 100 : 1 - PE : E 8 : 1) getrennt.

Aussehen: grün-braunes Öl

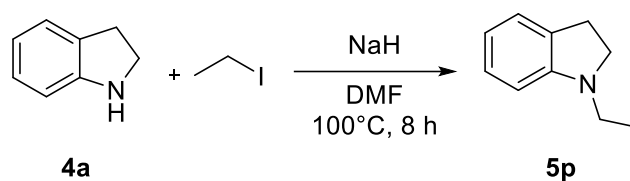
Ausbeute: 904,00 mg (6,79 mmol) → 76 %

Rf-Wert: 0,74 (Silica, PE : E 8 : 1)

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 7,15 – 7,10 (m, 2H); 6,72 (t, *J* = 7,4 Hz, 1H); 6,55 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H); 3,34 (t, *J* = 8,1 Hz, 2H); 2,99 (t, *J* = 8,1 Hz, 2H); 2,80 (s, 3H).

N-Ethylindolin (**5p**)



Allgemeine Vorschrift Ib wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

Indolin **4a** (1,07 g; 1,00 ml; 8,97 mmol), Ethyliodid (1,82 g; 0,94 ml; 11,66 mmol) und NaH, 60 %ige Dispersion in Mineralöl (301,39 mg; 12,56 mmol). Es wurde über Silica (PE : E 100 : 1 – 8 : 1) getrennt.

Aussehen: grün-braunes Öl

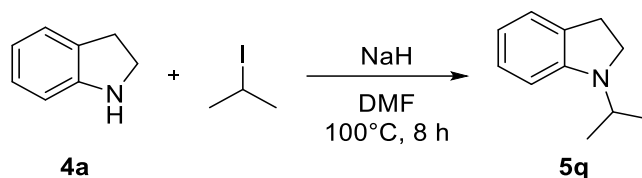
Ausbeute: 484,00 mg (3,29 mmol) → 37 %

R_f-Wert: 0,70 (Silica, PE : E 8 : 1)

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 7,10 (t, *J* = 8,2 Hz, 2H); 6,69 (t, *J* = 7,3 Hz, 1H); 6,53 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H); 3,37 (t, *J* = 8,2 Hz, 2H); 3,18 (qui, *J* = 7,2 Hz, 2H); 2,99 (t, *J* = 8,2 Hz, 2H); 1,23 (t, *J* = 7,2 Hz, 3H).

N-(2-Propyl)indolin (**5q**)



Allgemeine Vorschrift Ib wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

Indolin **4a** (1,07 g; 1,00 ml; 8,97 mmol), 2-Propyliodid (2,38 g; 1,40 ml; 13,99 mmol) und NaH, 60 %ige Dispersion in Mineralöl (0,65 g; 26,91 mmol). Es wurde über Silica (PE : E 100 : 1) getrennt.

Aussehen: bräunliches Öl

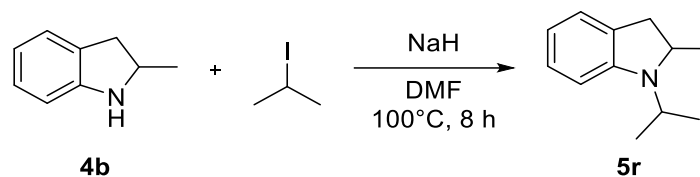
Ausbeute: 666,00 mg (4,13 mmol) → 46 %

R_f-Wert: 0,32 (Silica, PE : E 100 : 1)

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 7,09 (d, *J* = 4,7 Hz, 2H); 6,65 (s, 1H); 6,48 (s, 1H); 3,86 (hept, *J* = 6,6 Hz, 1H); 3,38 (t, *J* = 8,1 Hz, 2H); 2,97 (t, *J* = 8,3 Hz, 2H); 1,19 (d, *J* = 6,6 Hz, 6H).

N-(2-Propyl)-2-methylindolin (**5r**)



Allgemeine Vorschrift Ib wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

2-Methylindolin **4b** (1,02 g; 1,00 ml; 7,68 mmol), 2-Propyliodid (1,70 g; 1,00 ml; 10,02 mmol) und NaH, 60 %ige Dispersion in Mineralöl (553,74 mg; 23,07 mmol). Es wurde über Silica (PE : E 5 : 1) getrennt.

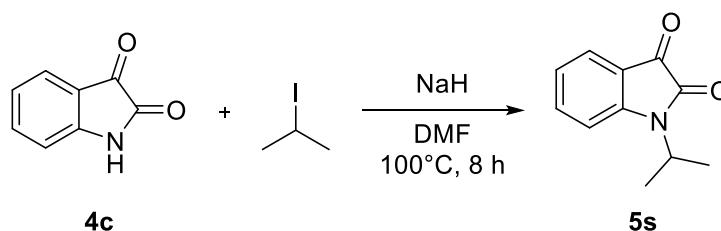
Aussehen: braunes Öl

Ausbeute: 861,00 mg (2,81 mmol) → 64 %

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 7,04 (s, 2H); 6,60 (bs, 1H); 6,50 (bs, 1H); 3,86 (d, *J* = 5,3 Hz, 1H); 3,70 (dt, *J* = 13,0, 6,5 Hz, 1H); 3,28 – 3,15 (m, 1H); 2,64 – 2,54 (m, 1H); 1,28 (dd, *J* = 14,5, 6,9 Hz, 9H).

N-(2-Propyl)isatin (**5s**)



Allgemeine Vorschrift Ib wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

Isatin **4c** (2,00 g; 13,59 mmol), 2-Propyliodid (3,41 g; 2,00 ml; 20,04 mmol) und NaH, 60 %ige Dispersion in Mineralöl (980,00 mg; 40,84 mmol). Es wurde über Silica (PE : E 5 : 1) getrennt.

Aussehen: orange-brauner Feststoff

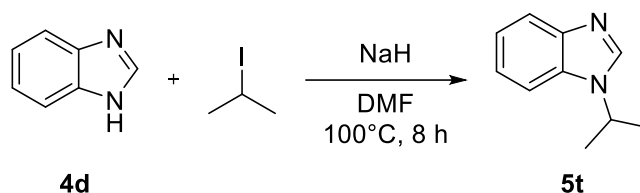
Ausbeute: 532,00 mg (2,81 mmol) → 21 %

R_f-Wert: 0,18 (Silica, PE : E 5 : 1)

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 7,64 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H); 7,59 (dd, *J* = 11,4; 4,3 Hz, 1H); 7,12 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H); 7,05 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H); 4,56 (hept, *J* = 7,0 Hz, 1H); 1,55 (d, *J* = 7,0 Hz, 6H).

N-(2-Propyl)benzimidazol (**5t**)



Allgemeine Vorschrift Ib wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

Benzimidazol **4d** (1,00 g; 8,46 mmol), 2- Propyliodid (2,16 g; 1,27 ml; 12,70 mmol) und NaH, 60 %ige Dispersion in Mineralöl (609,41 mg; 25,39 mmol). Es wurde über Silica (DCM - E) getrennt.

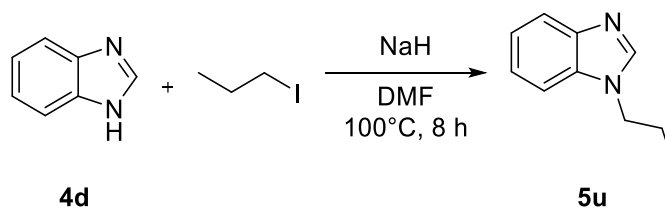
Aussehen: oranges Öl

Ausbeute: 1,27 g (7,94 mmol) → 94 %

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 8,04 (s, 1H); 7,87 – 7,82 (m, 1H); 7,46 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H); 7,32 (dt, *J* = 6,3; 4,3 Hz, 2H); 4,72 – 4,62 (m, 1H); 1,66 (d, *J* = 6,8 Hz, 6H).

N-(1-Propyl)benzimidazol (**5u**)



Allgemeine Vorschrift Ib wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

Benzimidazol **4d** (1,00 g; 8,46 mmol), Butyliodid (2,21 g; 1,27 ml; 13,00 mmol) und NaH, 60 %ige Dispersion in Mineralöl (609,41 mg; 25,39 mmol). Es wurde über Silica (E mit 0,1 % TEA) getrennt.

Aussehen: braunes Öl

Ausbeute: 1,07 g (6,66 mmol) → 79 %

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 7,94 (s, 1H); 7,71 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H); 7,39 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H); 7,31 – 7,24 (m, 3H), 4,13 (t, *J* = 7,1 Hz, 2H); 3,38 (s, 2H); 1,93 – 1,85 (m, 2H); 0,92 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H).

Synthese der Indolin-5-Sulfonylchloride 6a-v (allgemeine Vorschrift II)¹⁰³

Das *N*-derivatisierte Indolin **5a-u** wurde bei 0 °C langsam mit 10 ml Chlorsulfonsäure versetzt. Die Reaktion wurde bei 70 °C für die angegebene Zeit gerührt. Die Lösung wurde langsam in 200 ml Eiswasser pipettiert und 100 ml DCM hinzugegeben. Nach Abtrennen der organischen Phase wurde die wässrige Phase zweimal mit jeweils 100 ml DCM extrahiert. Es wurde über MgSO₄ bzw. Na₂SO₄ getrocknet. Das reine Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung verwendet.

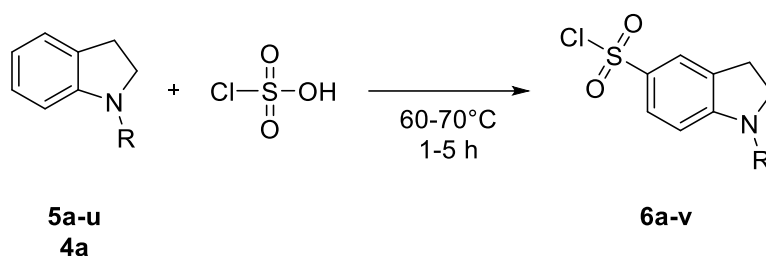
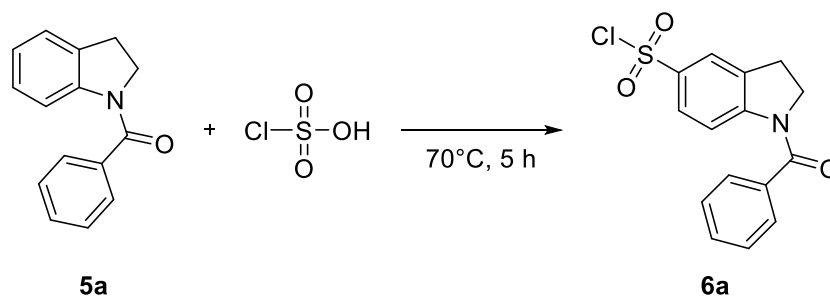


Abb. 7.3. Generelles Reaktionsschema der allgemeinen Vorschrift II für die Synthese der Indolin-5-Sulfonylchloride.¹⁰³ **R** = Benzoyl (**6a**), Benzoyl (2-Methylindolin, **6b**), 4-(Trifluormethyl)benzoyl (**6c**), 4-Chlorbenzoyl (**6d**), 3-Chlorbenzoyl (**6e**), 4-Chlorbenzoyl (**6f**), 3,4-Dichlorbenzoyl (**6g**), 3,5-Dichlorbenzoyl (**6h**), 3-Brombenzoyl (**6i**), Nicotinoyl (**6j**), Acetyl (**6k**), Acetyl (2-Methylindolin, **6l**), Cyclopropanoyl (**6m**), Cyclohexanoyl (**6n**), H (**6o**), Ethyl (**6p**), Isopropyl (**6q**), Isopropyl (2-Methylindolin, **6r**), Isopropyl (Isatin, **6s**), Isopropyl (Benzimidazol, **6t**), 1-Propyl (Benzimidazol, **6u**), Methyl (**6v**).

N-Benzoylindolin-5-sulfonylchlorid (**6a**)



Allgemeine Vorschrift II wurde mit 1-Benzoylindolin **5a** (1,12 g; 5,03 mmol) durchgeführt sowie 5 h bei 70°C gerührt.

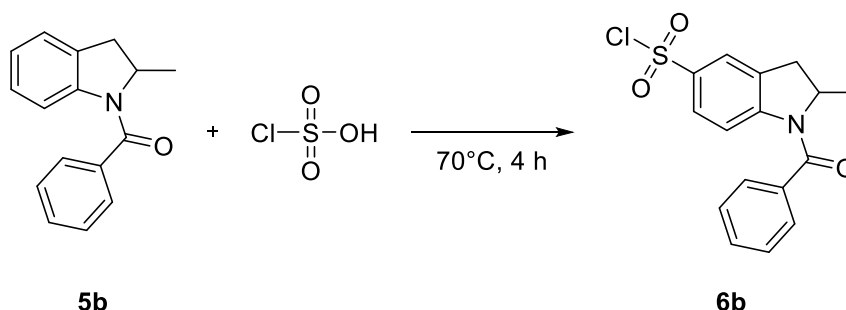
Aussehen: schwarzer Feststoff

Ausbeute: 1,62 g (5,03 mmol) \rightarrow quant.

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 8,80 (s, 1H); 8,51 – 8,48 (m, 1H); 8,31 (ddd, $J = 8,0; 1,9; 1,1$ Hz, 1H); 8,15 (dd, $J = 8,3; 1,2$ Hz, 1H); 7,88 (s, 1H); 7,81 (t, $J = 7,9$ Hz, 1H); 7,59 (d, $J = 1,6$ Hz, 1H); 7,52 (s, 1H); 4,23 (t, $J = 8,5$ Hz, 2H); 3,27 (t, $J = 8,5$ Hz, 2H).

N-Benzoyl-2-methylindolin-5-sulfonylchlorid (**6b**)



Allgemeine Vorschrift II wurde mit 1-Benzoyl-2-methylindolin **5b** (1,03 g; 4,35 mmol) durchgeführt sowie 4 h bei 70°C gerührt.

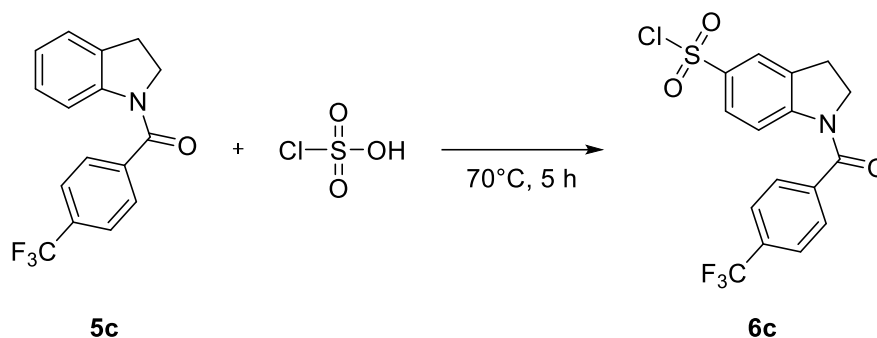
Aussehen: zähviskoses, braunes Öl

Ausbeute: 1,06 g (3,15 mmol) \rightarrow 73 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 8,79 (t, $J = 1,6$ Hz, 1H); 8,52 – 8,47 (m, 1H); 8,31 (ddd, $J = 8,0; 1,9; 1,1$ Hz, 1H); 8,17 – 8,12 (m, 1H); 7,88 (s, 1H); 7,81 (t, $J = 7,9$ Hz, 2H); 7,68 – 7,63 (m, 1H); 4,91 – 4,82 (m, 1H); 3,53 (dd, $J = 16,2; 9,0$ Hz, 1H); 2,82 (dd, $J = 16,2; 1,6$ Hz, 1H); 1,29 (d, $J = 6,4$ Hz, 3H).

N-(4-(Trifluoromethyl)benzoyl)indolin-5-sulfonylchlorid (**6c**)



Allgemeine Vorschrift II wurde mit 1-(4-(Trifluoromethyl)benzoyl)indolin **5c** (1,47 g; 5,03 mmol) durchgeführt sowie 5 h bei 70°C gerührt.

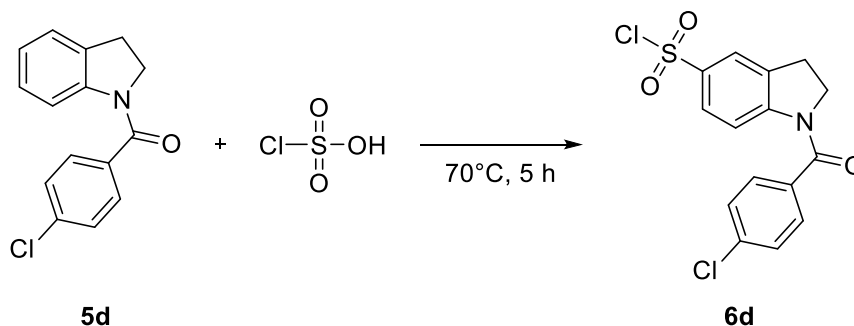
Aussehen: braun-weißer Feststoff

Ausbeute: 1,96 g (5,03 mmol) \rightarrow quant.

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 7,89 (d, $J = 13,5$ Hz, 1H); 7,81 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,79 – 7,71 (m, 2H); 7,68 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H); 7,42 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H); 4,15 (t, $J = 8,5$ Hz, 2H); 3,26 (t, $J = 8,5$ Hz, 2H).

N-(4-Chlorbenzoyl)indolin-5-sulfonylchlorid (**6d**)



Allgemeine Vorschrift II wurde mit 1-(4-Chlorbenzoyl)indolin **5d** (2,17 g; 8,40 mmol) durchgeführt sowie 5 h bei 70°C gerührt.

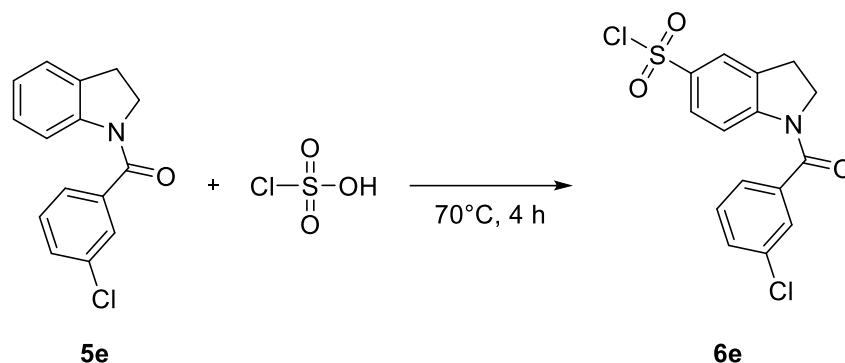
Aussehen: braun-weißer Feststoff

Ausbeute: 2,71 g (5,03 mmol) \rightarrow 91 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 8,02 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H); 7,86 (t, $J = 4,5$ Hz, 2H); 7,55 – 7,41 (m, 4H); 4,18 (t, $J = 8,5$ Hz, 2H); 3,24 (t, $J = 8,5$ Hz, 2H).

N-(3-Chlorbenzoyl)indolin-5-sulfonylchlorid (**6e**)



Allgemeine Vorschrift II wurde mit 1-(3-Chlorbenzoyl)indolin **5e** (2,46 g; 9,55 mmol) durchgeführt sowie 4 h bei 70 °C gerührt.

Aussehen: weiß-brauner Feststoff

Ausbeute: 3,10 g (8,71 mmol) → 91 %

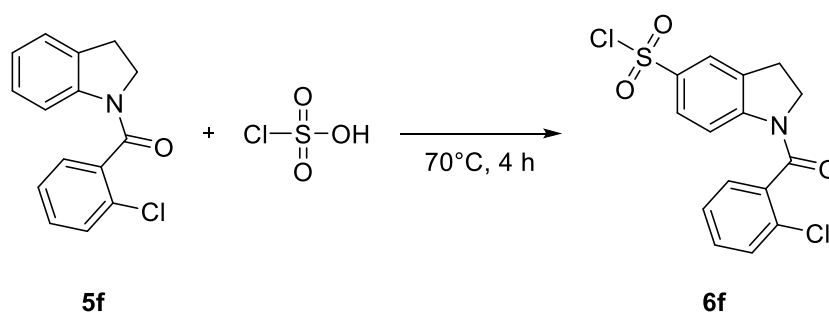
¹H-NMR: (500 MHz, CD₂Cl₂):

δ [ppm] = 8,21 – 7,76 (m, 3H); 7,63 – 7,55 (m, 2H); 7,50 (d, *J* = 5,1 Hz, 2H); 4,18 (t, *J* = 8,5 Hz, 2H); 3,28 (t, *J* = 8,5 Hz, 2H).

¹³C-NMR: (125 MHz, CD₂Cl₂):

δ [ppm] = 168,49; 149,19; 139,10; 137,99; 135,15; 134,85; 131,40; 130,66; 128,24; 127,58; 125,57; 124,23; 117,20; 51,67; 28,05.

N-(2-Chlorbenzoyl)indolin-5-sulfonylchlorid (**6f**)



Allgemeine Vorschrift II wurde mit 1-(2-Chlorbenzoyl)indolin **5f** (2,35 g; 9,13 mmol) durchgeführt sowie 4 h bei 70 °C gerührt.

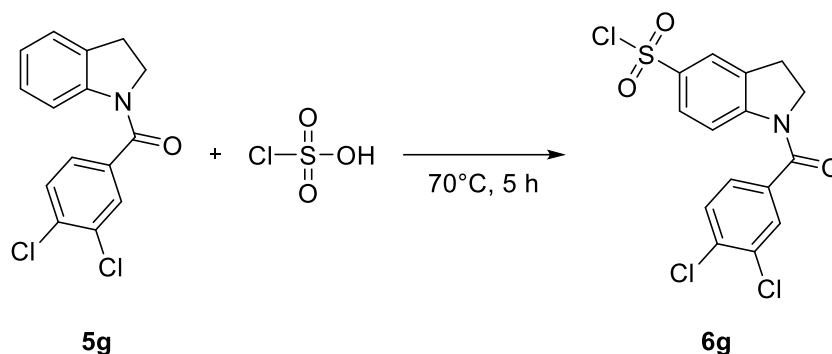
Aussehen: weiß-brauner Feststoff

Ausbeute: 2,94 g (8,25 mmol) → 90 %

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 8,52 (d, *J* = 6,9 Hz, 1H); 7,97 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H); 7,85 (s, 1H); 7,43 (d, *J* = 19,7 Hz, 4H); 3,94 (bs, 2H); 3,25 (t, *J* = 8,8 Hz, 2H).

N-(3,4-Dichlorbenzoyl)indolin-5-sulfonylchlorid (**6g**)



Allgemeine Vorschrift II wurde mit 1-(3,4-Dichlorbenzoyl)indolin **5g** (2,24 g; 7,65 mmol) durchgeführt sowie 5 h bei 70°C gerührt.

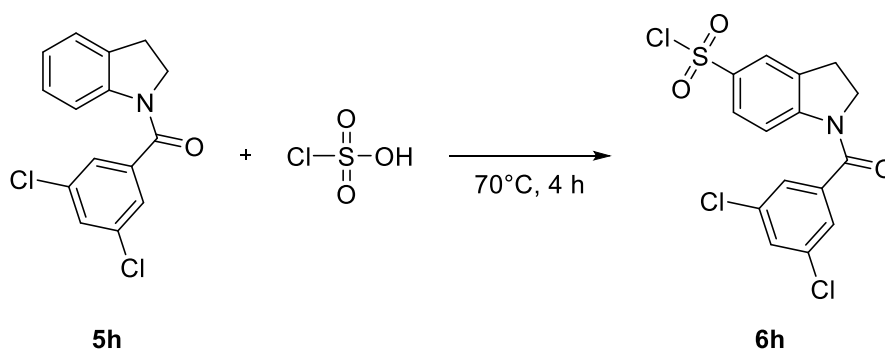
Aussehen: brauner Feststoff

Ausbeute: 2,82 g (7,21 mmol) \rightarrow 94 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 7,91 – 7,85 (m, 2H); 7,67 (t, $J = 2,0$ Hz, 1H); 7,57 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H); 7,41 (dd, $J = 8,2; 2,0$ Hz, 1H); 4,17 (t, $J = 8,5$ Hz, 2H); 3,26 (t, $J = 8,1$ Hz, 2H).

1-(3,5-Dichlorbenzoyl)indolin, 5-sulfonylchlorid (**6h**)



Allgemeine Vorschrift II wurde mit 1-(3,5-Dichlorbenzoyl)indolin **5h** (2,60 g; 8,90 mmol) durchgeführt sowie 4 h bei 70°C gerührt.

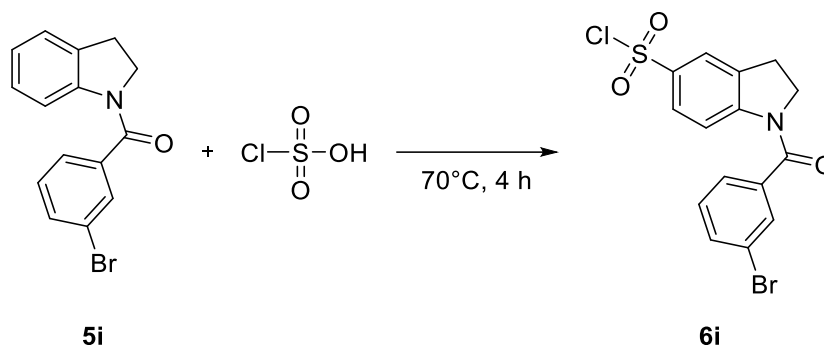
Aussehen: oranger Feststoff

Ausbeute: 3,26 g (8,33 mmol) \rightarrow 94 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 8,31 – 7,89 (m, 3H); 7,56 (t, $J = 1,9$ Hz, 1H); 7,47 (d, $J = 1,9$ Hz, 2H); 4,19 (t, $J = 8,5$ Hz, 2H); 3,30 (t, $J = 8,4$ Hz, 2H).

1-(3-Bromobenzoyl)indolin, 5-sulfonylchlorid (6i)



Allgemeine Vorschrift II wurde mit 1-(3-Bromobenzoyl)indolin **5i** (2,85 g; 9,43 mmol) durchgeführt sowie 4 h bei 70 °C gerührt.

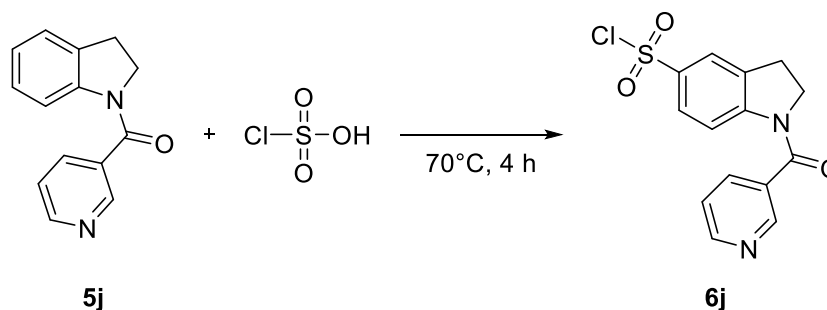
Aussehen: weiß-brauner Feststoff

Ausbeute: 3,50 g (8,73 mmol) → 93 %

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 8,28 – 7,87 (m, 3H); 7,75 – 7,73 (m, 1H); 7,70 (ddd, *J* = 8,0; 1,8; 1,0 Hz, 1H); 7,54 – 7,50 (m, 1H); 7,40 (t, *J* = 7,9 Hz, 1H); 4,20 (t, *J* = 8,5 Hz, 2H); 3,28 (t, *J* = 8,5 Hz, 2H).

N-Nicotinoylindolin-5-sulfonylchlorid (6j)



Allgemeine Vorschrift II wurde mit 1-Nicotinoylindolin **5j** (2,33 g; 10,38 mmol) durchgeführt sowie 4 h bei 70 °C gerührt.

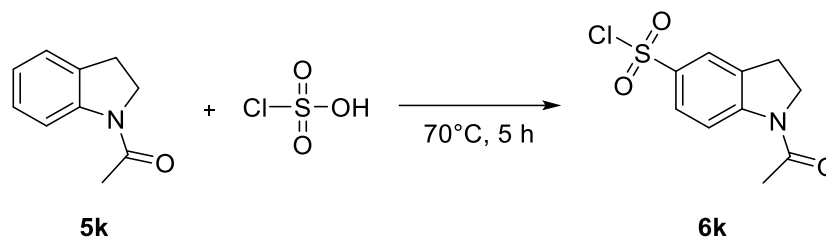
Aussehen: blass gelber Feststoff

Ausbeute: 2,53 g (7,85 mmol) → 76 %

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 8,68 (s, 1H); 8,52 (d, *J* = 4,4 Hz, 1H); 8,42 (d, *J* = 7,0 Hz, 2H); 7,85 – 7,65 (m, 3H); 3,70 (s, 2H); 2,79 (s, 2H).

N-Acetylmethylindolin-5-sulfonylchlorid (**6k**)



Allgemeine Vorschrift II wurde mit 1-Acetylmethylindolin **5k** (1,40 g; 8,68 mmol) durchgeführt sowie 5 h bei 70°C gerührt.

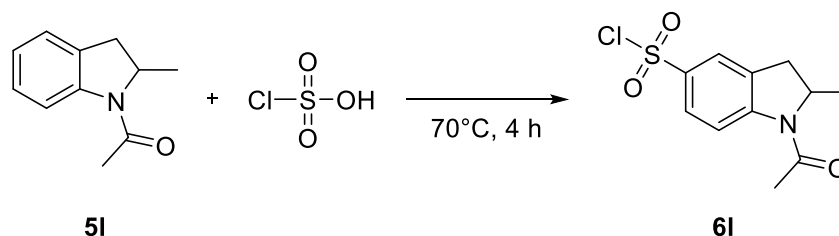
Aussehen: brauner Feststoff

Ausbeute: 2,25 g (8,68 mmol) \rightarrow quant.

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 8,37 (d, $J = 9,4$ Hz, 1H); 7,88 (dd, $J = 8,7; 2,1$ Hz, 1H); 7,80 (s, 1H); 4,19 (t, $J = 8,8$ Hz, 2H); 3,30 (t, $J = 8,8$ Hz, 2H).

N-Acetyl-2-methylindolin-5-sulfonylchlorid (**6l**)



Allgemeine Vorschrift II wurde mit 1-Acetyl-2-methylindolin **5l** (0,59 g; 3,37 mmol) durchgeführt sowie 4 h bei 70°C gerührt.

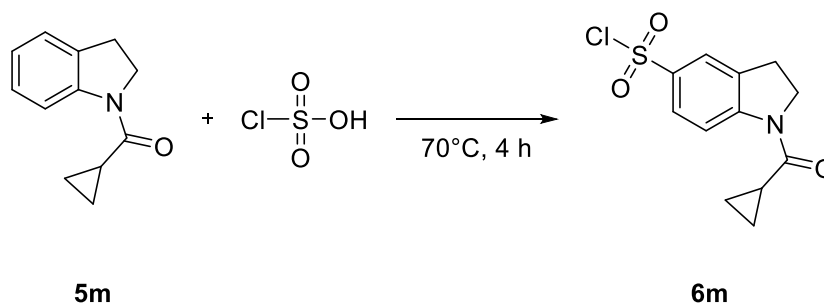
Aussehen: zähviskoses, braunes Öl

Ausbeute: 0,32 g (1,18 mmol) \rightarrow 35 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 7,96 – 7,92 (m, 1H); 7,86 (s, 1H); 7,76 – 7,39 (m, 1H); 4,65 (s, 1H); 3,52 (dd, $J = 16,1; 9,2$ Hz, 1H); 2,82 (d, $J = 16,1$ Hz, 1H); 2,37 (d, $J = 11,4$ Hz, 3H); 1,40 (d, $J = 6,4$ Hz, 3H).

N-(Cyclopropancarbonyl)indolin-5-sulfonylchlorid (6m)



Allgemeine Vorschrift II wurde mit 1-(Cyclopropancarbonyl)indolin **5m** (1,74 g; 9,27 mmol) durchgeführt sowie 4 h bei 70°C gerührt. Das Produkt enthält Verunreinigungen die nicht abgetrennt werden konnten.

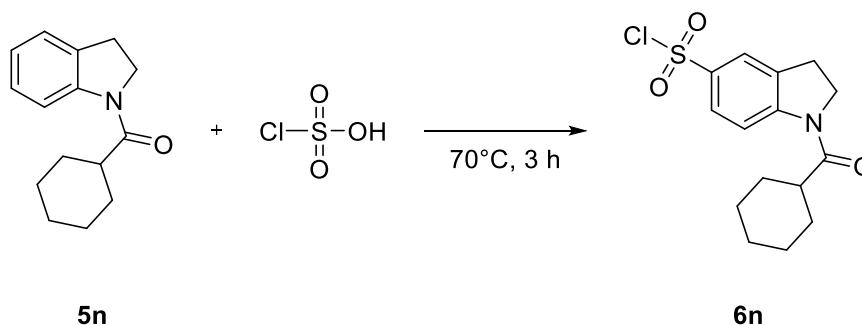
Aussehen: braunes Öl

Ausbeute: 839,00 mg (2,94 mmol) \rightarrow 32 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 8,47 – 7,32 (m, 3H); 4,43 – 4,36 (t, $J = 8,5$ Hz, 2H); 3,32 (t, $J = 8,5$ Hz, 2H); 1,78 (tt, $J = 8,1; 4,7$ Hz, 1H); 1,20 – 0,83 (m, 6H).

N-(Cyclohexancarboxyl)indolin-5-sulfonylchlorid (6n)



Allgemeine Vorschrift II wurde mit 1-(Cyclohexancarboxyl)indolin **5n** (1,64 g; 7,15 mmol) durchgeführt sowie 3 h bei 70°C gerührt.

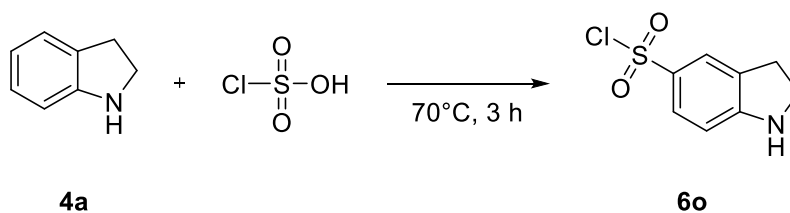
Aussehen: schwarzes Öl

Ausbeute: 1,57 g (4,79 mmol) \rightarrow 67 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 7,91 (t, $J = 9,2$ Hz, 1H); 7,77 (qui, $J = 7,4$ Hz, 2H); 4,29 (t, $J = 8,6$ Hz, 2H); 3,32 (t, $J = 8,5$ Hz, 2H); 2,52 (t, $J = 11,2$ Hz, 1H); 1,89 (d, $J = 11,2$ Hz, 4H); 1,77 (d, $J = 4,5$ Hz, 1H); 1,63 (d, $J = 10,8$ Hz, 1H); 1,35 (t, $J = 8,4$ Hz, 4H).

Indolin-5-sulfonylchlorid (6o)



Allgemeine Vorschrift II wurde mit Indolin **4a** (1,00 ml; 1,07 g; 8,97 mmol) durchgeführt sowie 3 h bei 70 °C gerührt.

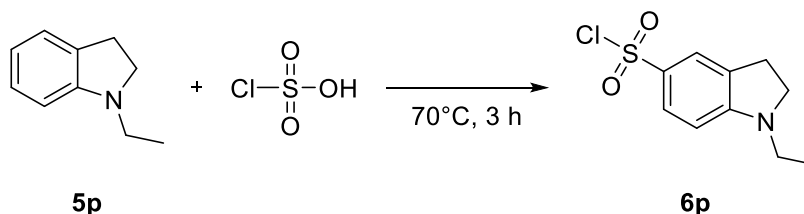
Aussehen: oranger Feststoff

Ausbeute: 1,74 g (7,99 mmol) → 89 %

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 8,41 – 7,30 (m, 3H); 4,16 – 4,02 (m, 2H); 3,55 – 3,01 (m, 2H).

N-Ethylindolin-5-sulfonylchlorid (6p)



Allgemeine Vorschrift II wurde mit 1-Ethylindolin **5p** (484,00 mg; 3,29 mmol) durchgeführt sowie 3 h bei 70 °C gerührt.

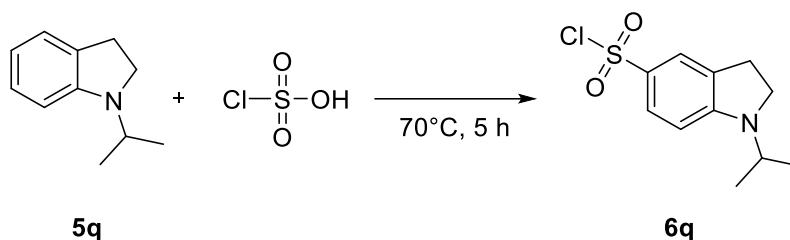
Aussehen: dunkelgrünes Wachs

Ausbeute: 807,00 mg (3,29 mmol) → quant.

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 7,32 (dd, *J* = 7,7; 1,7 Hz, 1H); 7,20 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H); 6,95 (d, *J* = 1,6 Hz, 1H); 3,57 (t, *J* = 8,5 Hz, 2H); 3,27 (qui, *J* = 7,2 Hz, 2H); 3,10 (t, *J* = 8,4 Hz, 2H); 1,25 (t, *J* = 7,2 Hz, 3H).

N-(2-Propyl)indolin-5-sulfonylchlorid (6q)



Allgemeine Vorschrift II wurde mit 1-(2-Propyl)indolin **5q** (247,00 mg; 1,53 mmol) durchgeführt sowie 5 h bei 70 °C gerührt.

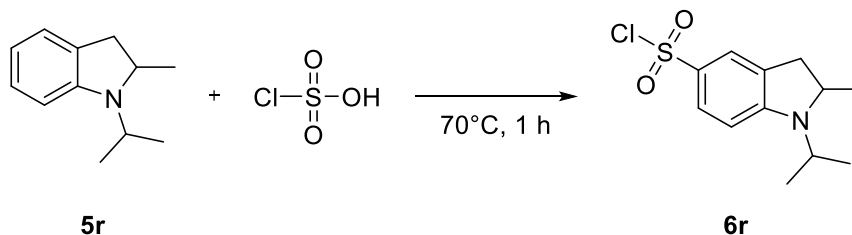
Aussehen: dunkelgrünes Öl

Ausbeute: 376,00 mg (1,45 mmol) → 95 %

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 7,39 (dd, *J* = 7,7; 1,3 Hz, 1H); 7,24 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H); 7,06 (d, *J* = 1,0 Hz, 1H); 3,94 (dt, *J* = 13,1; 6,6 Hz, 1H); 3,61 (t, *J* = 8,3 Hz, 2H); 3,13 (t, *J* = 8,2 Hz, 2H); 1,26 (d, *J* = 6,6 Hz, 6H).

N-(2-Propyl), 2-methylindolin-5-sulfonylchlorid (6r)



Allgemeine Vorschrift II wurde mit 1-(2-Propyl), 2-methylindolin **5r** (861,00 mg; 4,91 mmol) durchgeführt sowie 1 h bei 70 °C gerührt.

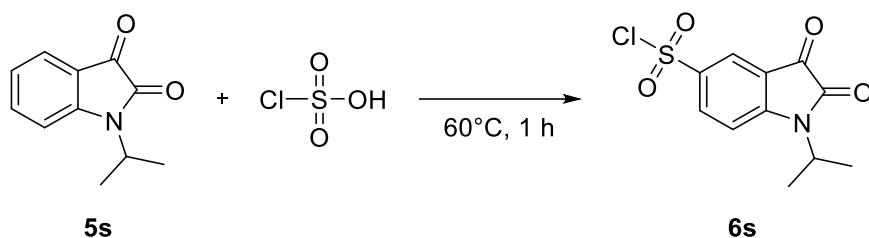
Aussehen: grünes Harz

Ausbeute: 990,00 mg (1,48 mmol) → 74 %

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 7,24 (dd, *J* = 7,6; 1,6 Hz, 1H); 7,13 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H); 6,90 (d, *J* = 1,5 Hz, 1H); 4,07 (dt, *J* = 9,6; 6,2 Hz, 1H); 3,76 (dt, *J* = 13,7; 6,8 Hz, 1H); 3,31 (dd, *J* = 17,0; 9,5 Hz, 1H); 2,67 (dd, *J* = 17,0; 6,2 Hz, 1H); 1,37 – 1,31 (m, 9H).

N-(2-Propyl)isatin-5-sulfonylchlorid (**6s**)



Allgemeine Vorschrift II wurde mit 1-(2-Propyl)isatin **5s** (282,00 mg; 1,49 mmol) durchgeführt sowie 1 h bei 60°C gerührt.

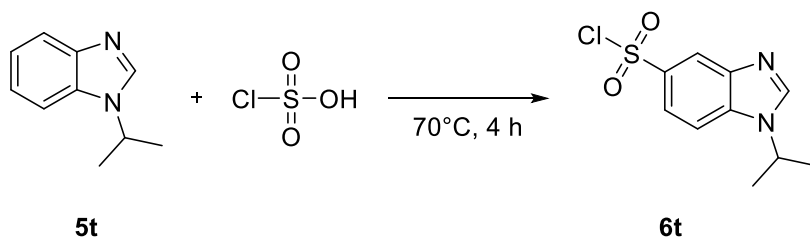
Aussehen: braunes Harz

Ausbeute: 426,00 mg (1,48 mmol) \rightarrow quant.

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 8,32 – 8,10 (m, 2H); 7,28 – 7,17 (m, 1H); 4,65 – 4,56 (m, 1H); 1,59 (dd, $J = 6,8$; 5,5 Hz, 6H).

N-(2-Propyl)benzimidazol-5-sulfonylchlorid (**6t**)



Allgemeine Vorschrift II wurde mit 1-(2-Propyl)benzimidazol **5t** (1,27 g; 7,94 mmol) durchgeführt sowie 4 h bei 70°C gerührt.

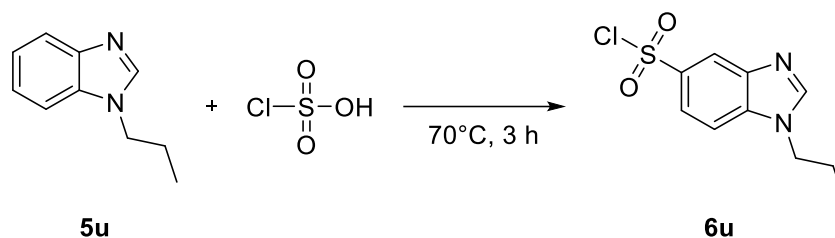
Aussehen: braunes Harz

Ausbeute: 0,88 g (3,40 mmol) \rightarrow 43 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 8,66 – 8,20 (m, 2H); 8,10 – 7,61 (m, 2H); 4,32 (dt, $J = 26,4$; 7,2 Hz, 2H); 2,03 (ddt, $J = 14,5$; 10,2; 7,3 Hz, 2H); 1,09 – 1,00 (m, 3H).

N-(1-Propyl)benzimidazol-5-sulfonylchlorid (**6u**)



Allgemeine Vorschrift II wurde mit 1-(1-Propyl)benzimidazol **5u** (1,07 g; 6,66 mmol) durchgeführt sowie 3 h bei 70°C gerührt.

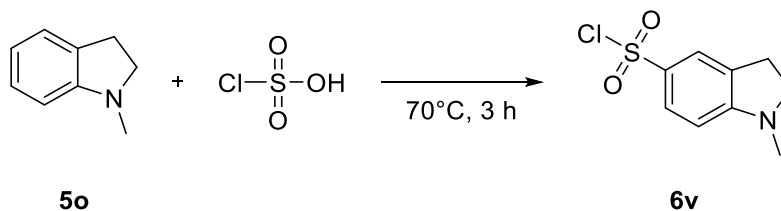
Aussehen: braunes Harz

Ausbeute: 812,00 mg (3,15 mmol) \rightarrow 47 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 8,60 – 8,51 (m, 1H); 8,37 – 8,23 (m, 1H); 8,08 – 7,63 (m, 2H); 4,80 (dh; $J = 20,4$; 6,8 Hz, 1H); 1,74 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H); 1,72 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H).

N-Methylindolin-5-sulfonylchlorid (**6v**)



Allgemeine Vorschrift II wurde mit 1-Methylindolin **5o** (904,00 mg; 6,79 mmol) durchgeführt sowie 3 h bei 70°C gerührt.

Aussehen: dunkelgrünes Wachs

Ausbeute: 457,00 mg (1,97 mmol) \rightarrow 29 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 7,34 (dd, $J = 7,7$; 1,7 Hz, 1H); 7,21 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H); 6,94 (d, $J = 1,6$ Hz, 1H); 3,53 (t, $J = 8,4$ Hz, 2H); 3,09 (t, $J = 8,3$ Hz, 2H); 2,88 (s, 3H).

Synthese einfach Boc-geschützter Diamine 8a-f (allgemeine Vorschrift III) ^{104, 105, 106}

Diamin **7a-f** (2 eq.) wurde in DCM (50 ml) gelöst. Anschließend wurde 1 eq. Di-*tert*-butyldicarbonat in 25 ml DCM langsam bei 0 °C hinzugegeben. Die Lösung wurde für zwei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wurde abgezogen und das entstandene Gel mit 100 ml Wasser versetzt. Die Lösung wurde filtriert. Das Filtrat wurde dreimal mit 50 ml DCM extrahiert. Die organische Phase sowie der Filterkuchen wurden zusammengegeben und über MgSO₄ getrocknet. Das Produkt wurde *in vacuo* getrocknet.

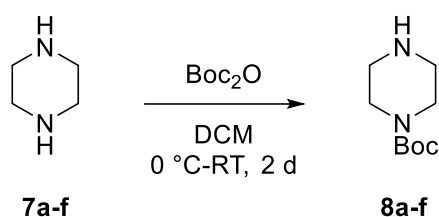
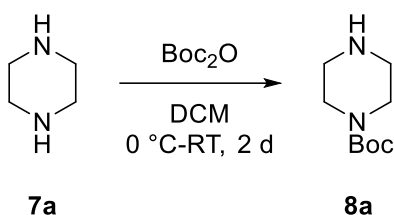


Abb. 7.4. Generelles Reaktionsschema der allgemeinen Vorschrift III für die Synthese der einfach Boc-geschützten Diamine. ^{104, 105, 106} Diamine: Piperazin (**8a**), Homopiperazin (**8b**), Methylpiperazin (**8c**), Propyldiamin (**8d**), Butyldiamin (**8e**), Ethyldiamin (**8f**).

tert-Butyl-piperazin-1-carboxylat (**8a**)



Allgemeine Vorschrift III wurde mit Piperazin **7a** (8,05 g; 93,47 mmol) und Boc₂O (10,20 g; 10,00 ml; 46,74 mmol) durchgeführt.

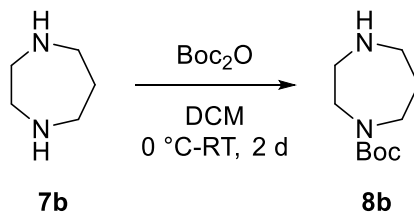
Aussehen: weißer Feststoff

Ausbeute: 8,21 g (44,05 mmol) → 94 %

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 3,40 (t, *J* = 4,9 Hz, 4H); 2,88 (s, 1H); 2,82 (t, *J* = 4,9 Hz, 2H); 1,86 (s, 1H); 1,48 (d, *J* = 1,5 Hz, 9H).

tert-Butyl-homopiperazin-1-carboxylat (**8b**)



Allgemeine Vorschrift III wurde mit Homopiperazin **7b** (4,68 g; 46,74 mmol) und Boc₂O (5,10 g; 5,00 ml; 23,37 mmol) durchgeführt.

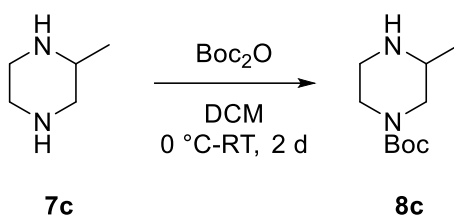
Aussehen: weißes Öl

Ausbeute: 4,00 g (19,95 mmol) → 85 %

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 3,55 – 3,42 (m, 4H); 2,97 – 2,88 (m, 3H); 2,19 (d, *J* = 6,4 Hz, 1H); 1,89 – 1,78 (m, 2H); 1,48 (d, *J* = 3,2 Hz, 9H).

tert-Butyl-3-methylpiperazin-1-carboxylat (8c)



Allgemeine Vorschrift III wurde mit 2-Methylpiperazin **7c** (4,68 g; 46,74 mmol) und Boc_2O (5,10 g; 5,00 ml; 23,37 mmol) durchgeführt.

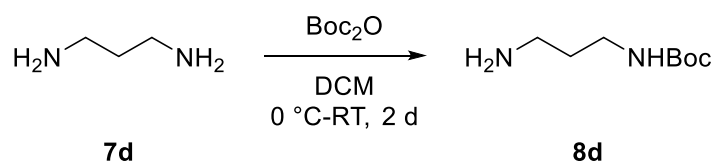
Aussehen: gelbe Flüssigkeit

Ausbeute: 4,68 g (23,37 mmol) \rightarrow quant.

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 3,95 (s, 2H); 2,97 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H); 2,78 (d, $J = 9,7$ Hz, 3H); 2,42 (s, 1H); 1,48 (s, 9H); 1,07 (d, $J = 6,3$ Hz, 3H).

tert-Butyl-(3-aminopropyl)carbammat (8d)



Allgemeine Vorschrift III wurde mit 1,3-Diaminopropan **7d** (8,66 g; 9,75 ml; 116,84 mmol) und Boc_2O (5,10 g; 5,00 ml; 23,37 mmol) durchgeführt.

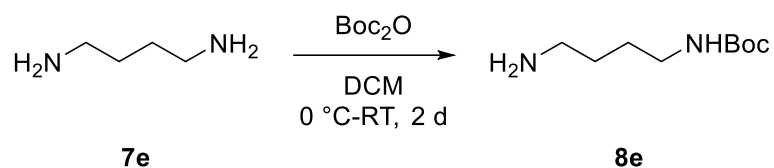
Aussehen: gelbes Öl

Ausbeute: 4,07 g (23,37 mmol) \rightarrow quant.

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 4,91 (s, 1H); 3,30 – 3,16 (m, 2H); 2,81 (d, $J = 6,6$ Hz, 1H); 1,87 (s, 2H); 1,69 – 1,64 (m, 1H); 1,47 (s, 9H).

***tert*-Butyl-(4-aminobutyl)carbamate (8e)**



Allgemeine Vorschrift III wurde mit 1,4-Diaminobutan **7e** (0,82 g; 0,94 ml; 9,36 mmol) und Boc_2O (1,02 g; 1,00 ml; 4,67 mmol) durchgeführt.

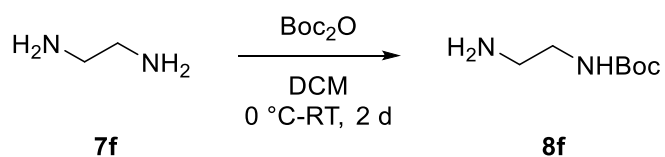
Aussehen: weißes Wachs

Ausbeute: 620,00 mg (3,29 mmol) \rightarrow 70 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 4,71 (s, 1H); 4,58 (s, 1H); 3,15 (s, 2H); 2,78 (s, 1H); 2,19 – 2,04 (m, 2H); 1,54 (d, $J = 12,9$ Hz, 3H); 1,46 (s, 9H).

***tert*-Butyl-(2-aminoethyl)carbamate (8f)**



Allgemeine Vorschrift III wurde mit 1,2-Diaminoethan **7f** (2,47 g; 2,22 ml; 33,28 mmol) und Boc_2O (1,21 g; 1,19 ml; 5,54 mmol) durchgeführt.

Aussehen: oranges Harz

Ausbeute: 872,30 mg (5,44 mmol) \rightarrow 98 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 4,86 (s, 1H); 3,25 (s, 1H); 2,19 (d, $J = 1,5$ Hz, 2H); 1,46 (s, 9H).

Synthese der acetylierten und geschützten Linker 10a-o (allgemeine Vorschrift IVa) ¹⁰⁴,

105

Einfach geschütztes Diamin, 3 eq. TEA und eine Spatelspitze DMAP wurden in 15 ml DCM gelöst. Anschließend wurden 1,2 eq. Carbonylchlorid langsam hinzugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde in 50 ml 10 %ige wässrige NaOH Lösung gegeben und dreimal mit 50 ml DCM extrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO₄ bzw. Na₂SO₄ getrocknet. Das Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung verwendet.

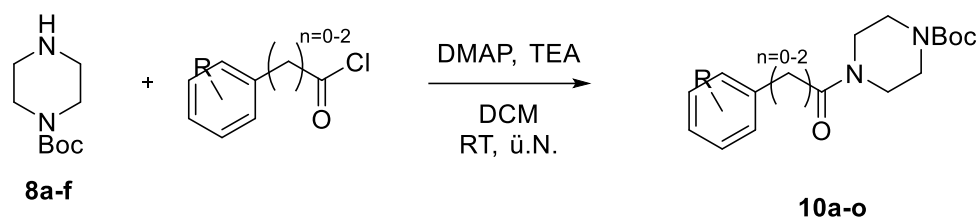
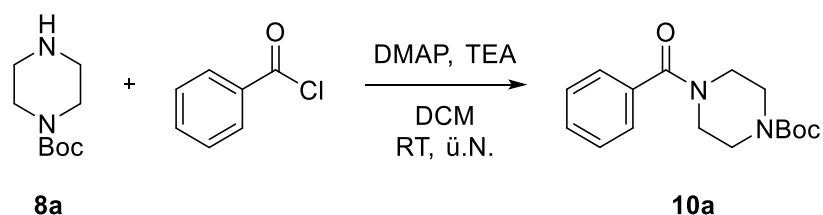


Abb. 7.5. Generelles Reaktionsschema der allgemeinen Vorschrift IVa für die Synthese der acetylierten Boc-geschützten Diamine. ^{104, 105} R = H, n = 0 (**10a**), R = H, n = 1 (**10b**), R = H, n = 2 (**10c**), R = H, n = 2 (Homopiperazin, **10d**), R = H, n = 0 (2-Methylpiperazin, **10e**), R = H, n = 0 (Homopiperazin, **10f**), R = H, n = 0 (Benzyl, **10g**), R = 4, n = 0 (**10h**), R = 3-Chlor, n = 0 (**10i**), R = 2-Chlor, n = 0 (**10j**), R = H, n = 0 (1,3-Diaminopropan, **10k**), R = H, n = 0 (1,4-Diaminobutan, **10l**), R = H, n = 0 (1,2-Diaminoethan, **10m**), R = H, n = 0 (Homopiperazin u. Benzyl, **10n**).

tert-Butyl-4-benzoylpiperazin-1-carboxylat (10a)



Allgemeine Vorschrift IVa wurde mit **8a** (0,50 g; 2,68 mmol), Benzoylchlorid (0,45 g; 0,37 ml; 3,22 mmol) und TEA (0,81 g; 1,12 ml; 8,05 mmol) durchgeführt.

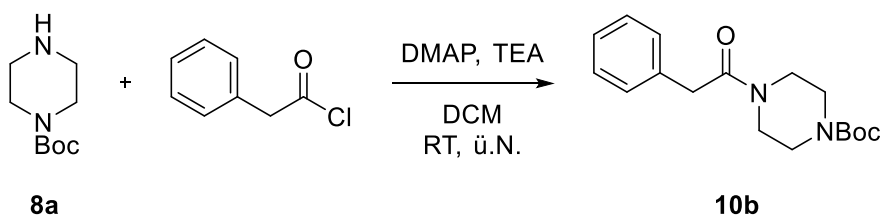
Aussehen: gelb-brauner Feststoff

Ausbeute: 0,78 g (2,68 mmol) \rightarrow quant.

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 7,56 – 7,36 (m, 5H); 3,73 (bs, 2H); 3,46 – 3,37 (m, 2H); 1,46 (s, 9H).

tert-Butyl-4-(2-phenylacetyl) piperazin-1-carboxylat (10b)



Allgemeine Vorschrift IVa wurde mit **8a** (0,30 g; 1,61 mmol), Phenylacetylchlorid (0,28 g; 0,24 ml; 1,82 mmol) und TEA (0,49 g; 0,67 ml; 4,83 mmol) durchgeführt.

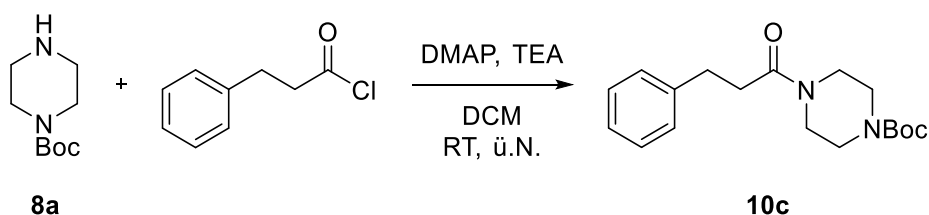
Aussehen: gelber Feststoff

Ausbeute: 0,49 g (1,61 mmol) \rightarrow quant.

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 7,49 – 7,28 (m, 3H); 7,22 – 7,12 (m, 1H); 3,76 – 3,70 (m, 1H); 3,63 – 3,54 (m, 1H); 3,37 (s, 3H); 3,20 (dd, $J = 8,2; 3,2$ Hz, 1H); 3,07 (dd, $J = 14,8; 7,4$ Hz, 1H); 1,65 (s, 2H); 1,46 – 1,35 (m, 9H).

tert-Butyl-4-(3-phenylpropanoyl)-piperazin-1-carboxylat (10c)



Allgemeine Vorschrift IVa wurde mit **8a** (0,30 g; 1,61 mmol), 3-Phenylpropanoylchlorid (0,30 g; 0,26 ml; 1,77 mmol) und TEA (0,49 g; 0,67 ml; 4,83 mmol) durchgeführt.

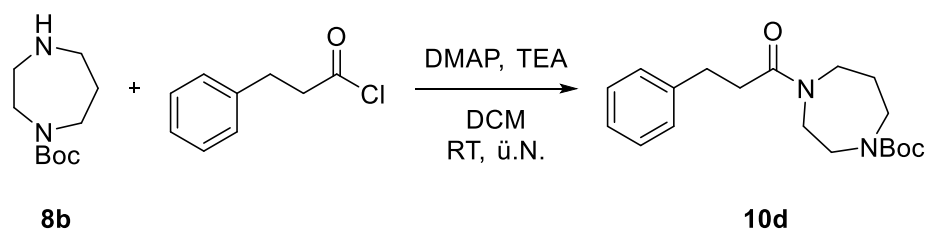
Aussehen: orange-gelber Feststoff

Ausbeute: 0,51 g (1,61 mmol) → quant.

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 7,28 (d, *J* = 0,9 Hz, 1H); 7,22 – 7,18 (m, 4H); 3,61 – 3,54 (m, 2H); 3,37 (s, 4H); 3,30 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H); 3,15 (s, 1H); 3,00 – 2,94 (m, 2H); 2,65 – 2,59 (m, 2H); 1,45 (s, 9H).

tert-Butyl-4-(3-phenylpropanoyl)-homopiperazin-1-carboxylat (10d)



Allgemeine Vorschrift IVa wurde mit **8b** (500,00 mg; 2,50 mmol), 3-Phenylpropanoylchlorid (0,45 g; 0,40 ml; 2,69 mmol) und TEA (0,76 g; 1,04 ml; 7,49 mmol) durchgeführt.

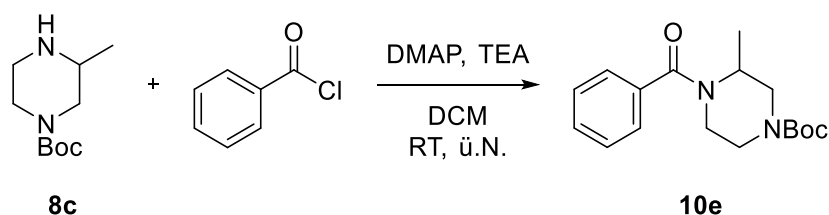
Aussehen: braunes Öl

Ausbeute: 0,80 g (2,41 mmol) → 96 %

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 7,33 – 7,29 (m, 2H); 7,23 (dd, *J* = 11,4; 6,2 Hz, 3H); 3,65 (s, 1H); 3,55 (s, 1H); 3,47 (d, *J* = 5,4 Hz, 2H); 3,42 (d, *J* = 6,3 Hz, 2H); 3,36 (d, *J* = 5,7 Hz, 2H); 3,05 – 2,95 (m, 2H); 2,64 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H); 1,89 – 1,83 (m, 2H), 1,48 (s, 9H).

tert-Butyl-4-benzoyl-3-methylpiperazin-1-carboxylat (10e)



Allgemeine Vorschrift IVa wurde mit **8c** (0,50 g; 2,50 mmol), Benzoylchlorid (0,39 g; 0,32 ml; 2,75 mmol) und TEA (0,76 g; 1,04 ml; 7,49 mmol) durchgeführt.

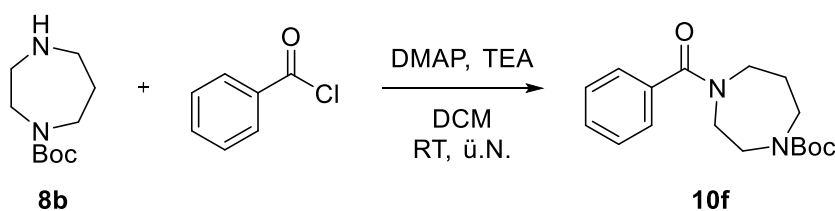
Aussehen: weißer Feststoff

Ausbeute: 683,00 mg (2,24 mmol) → 90 %

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 7,46 – 7,37 (m, 5H); 4,17 – 4,12 (m, 1H); 3,91 (s, 9H); 3,32 – 2,75 (m, 3H); 1,49 (s, 9H); 1,28 (d, *J* = 7,2 Hz, 3H).

tert-Butyl-4-benzoyl-homopiperazin-1-carboxylat (10f)



Allgemeine Vorschrift IVa wurde mit **8b** (279,70 mg; 1,40 mmol), Benzoylchlorid (0,22 g; 0,18 ml; 1,54 mmol) und TEA (0,42 g; 0,58 ml; 4,19 mmol) durchgeführt.

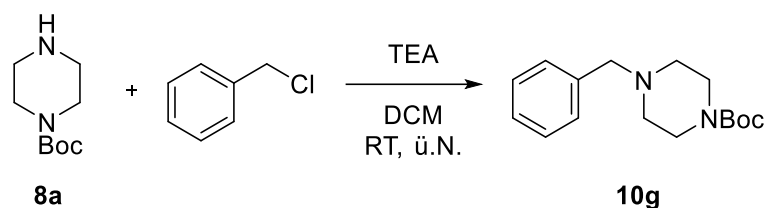
Aussehen: hellbraunes Harz

Ausbeute: 377,00 mg (1,24 mmol) → 89 %

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 7,44 – 7,37 (m, 5H); 3,83 (bs, 1H); 3,73 (bs, 1H); 3,73 (bs, 1H); 3,57 – 3,36 (m, 5H); 2,02 (s, 1H); 1,73 (s, 1H); 1,46 (s, 9H).

tert-Butyl-4-benzylpiperazin-1-carboxylat (**10g**)



Allgemeine Vorschrift IVa wurde mit **8a** (1,50 g; 8,05 mmol), Benzylchlorid (1,32 g; 1,20 ml; 10,41 mmol) und TEA (0,90 g; 1,23 ml; 8,86 mmol), aber ohne DMAP durchgeführt.

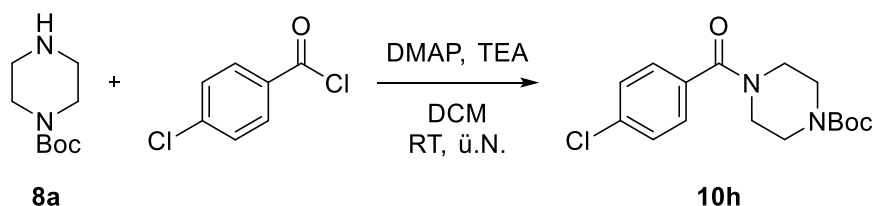
Aussehen: weißes Wachs

Ausbeute: 1,22 g (4,41 mmol) → 55 %

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 7,33 (d, J = 4,0 Hz, 4H); 7,28 – 7,25 (m, 1H); 3,55 (d, J = 13,2 Hz, 3H); 3,44 (dd, J = 14,4; 9,7 Hz, 3H); 2,54 (bs, 2H); 2,44 – 2,38 (m, 2H); 1,48 (s, 9H).

tert-Butyl-4-benzoylpiperazin-1-carboxylat (**10h**)



Allgemeine Vorschrift IVa wurde mit **8a** (0,20 g; 1,07 mmol), 4-Chlorbenzoylchlorid (0,27 g; 0,20 ml; 1,56 mmol) und TEA (0,33 g; 0,45 ml; 3,22 mmol) durchgeführt.

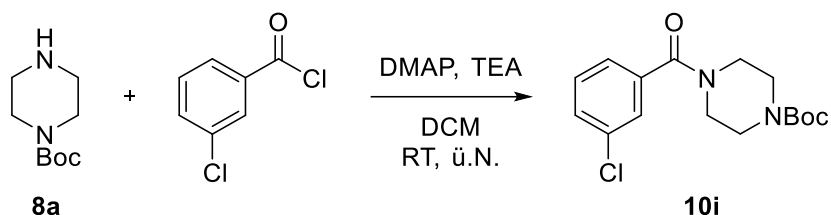
Aussehen: gelb-brauner Feststoff

Ausbeute: 348,00 mg (1,07 mmol) → quant.

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 8,09 (m, 1H); 7,46 – 7,35 (m, 3H); 3,89 – 3,34 (m, 7H); 3,15 (s, 1H); 1,49 (s, 9H).

tert-Butyl-3-benzoylpiperazin-1-carboxylat (10i)



Allgemeine Vorschrift IVa wurde mit **8a** (0,20 g; 1,07 mmol), 3-Chlorbenzoylchlorid (0,27 g; 0,20 ml; 1,56 mmol) und TEA (0,33 g; 0,45 ml; 3,22 mmol) durchgeführt.

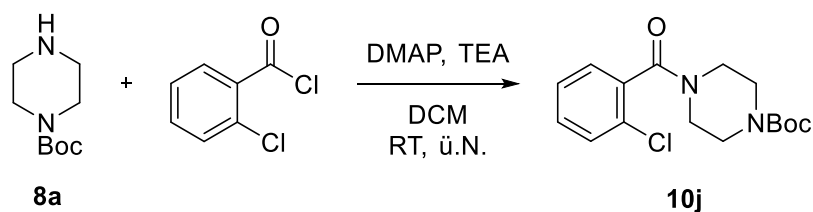
Aussehen: gelb-brauner Feststoff

Ausbeute: 348,00 mg (1,07 mmol) → quant.

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 8,36 – 6,61 (m, 1H); 7,45 – 7,29 (m, 3H); 3,77 – 3,39 (m, 6H); 3,12 (s, 2H); 1,49 (s, 9H).

tert-Butyl-2-benzoylpiperazin-1-carboxylat (10j)



Allgemeine Vorschrift IVa wurde mit **8a** (0,20 g; 1,07 mmol), 2-Chlorbenzoylchlorid (0,27 g; 0,20 ml; 1,56 mmol) und TEA (0,33 g; 0,45 ml; 3,22 mmol) durchgeführt.

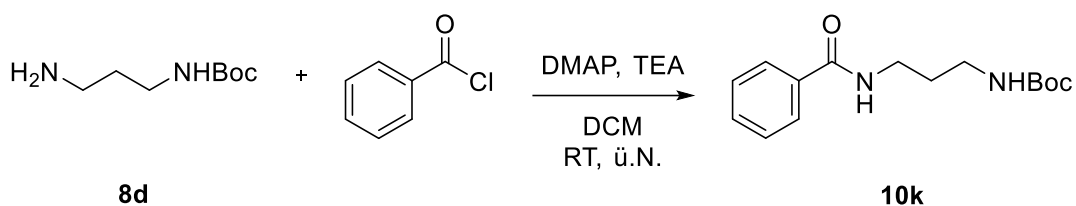
Aussehen: gelb-brauner Feststoff

Ausbeute: 348,00 mg (1,07 mmol) → quant.

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 8,26 – 6,53 (m, 1H); 7,46 – 7,29 (m, 3H); 6,54 (d, *J* = 6,6 Hz, 1H); 3,41 (s, 8H); 1,49 (d, *J* = 3,1 Hz, 9H).

tert-Butyl-(3-benzamidopropyl)carbamat (**10k**)



Allgemeine Vorschrift IVa wurde mit **8d** (500,00 mg; 2,87 mmol), Benzoylchlorid (0,44 g; 0,36 ml; 3,16 mmol) und TEA (0,87 g; 1,19 ml; 8,61 mmol) durchgeführt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch in Silica im Gradienten PE : E 5 : 1 – 3 : 1 getrennt.

Aussehen: orang-gelber Feststoff

Ausbeute: 455,00 mg (1,63 mmol) → 57 %

R_f-Wert: 0,05 (Silica, PE : E 5 : 1)

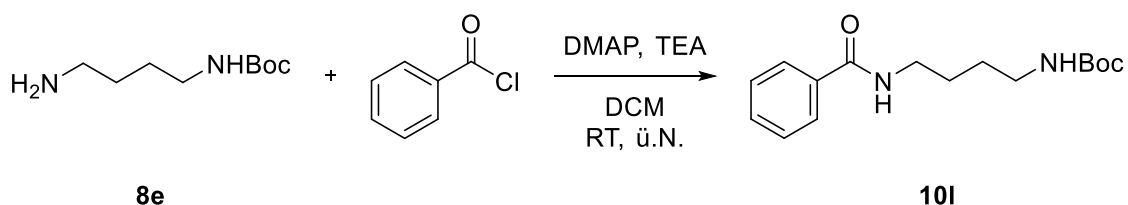
¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 7,89 (dd, *J* = 14,6; 8,0 Hz, 2H); 7,49 (m, 3H); 7,25 (s, 1H); 3,53 (d, *J* = 12,3 Hz, 2H); 3,27 (dd, *J* = 11,8; 6,0 Hz, 2H); 1,77 – 1,70 (m, 2H); 1,48 (s, 9H).

¹³C-NMR: (125 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 134,96; 131,70; 128,90; 127,37; 109,98; 79,94; 37,47; 36,50; 30,68; 28,79.

tert-Butyl-(3-benzamidobutyl)carbamat (**10l**)



Allgemeine Vorschrift IVa wurde mit **8e** (500,00 mg; 2,66 mmol), Benzoylchlorid (0,70 g; 0,60 ml; 4,54 mmol) und TEA (0,81 g; 1,10 ml; 7,79 mmol) durchgeführt.

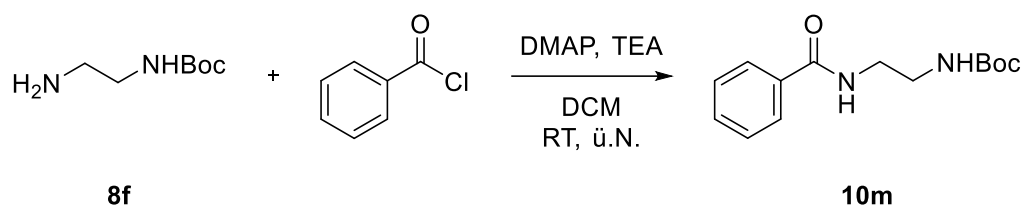
Aussehen: gelber Feststoff

Ausbeute: 355,00 mg (1,21 mmol) → 46 %

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 7,79 (d, *J* = 7,3 Hz, 2H); 7,46 (m, 4H); 6,46 (s, 1H); 4,63 (s, 1H); 3,50 (qui, *J* = 6,5 Hz, 2H); 3,17 (d, *J* = 5,7 Hz, 2H); 1,69 – 1,57 (m, 4H); 1,44 (s, 9H).

tert-Butyl-(2-benzamidoethyl)carbamate (10m)

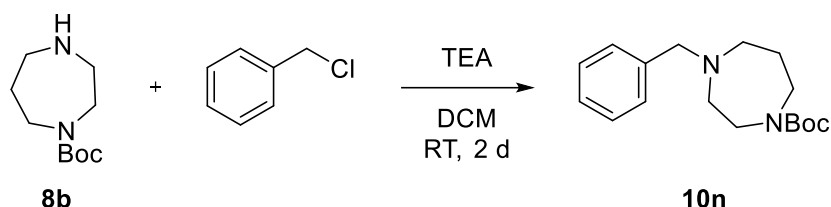


Allgemeine Vorschrift IVa wurde mit **8f** (235,00 mg; 1,47 mmol), Benzoylchlorid (0,23 g; 0,19 ml; 1,61 mmol) und TEA (0,45 g; 0,61 ml; 4,40 mmol) durchgeführt.

Aussehen: braunes Harz

Ausbeute: 0,78 g (2,68 mmol) → quant.

tert-Butyl-4-benzylhomopiperazin-1-carboxylat (10n)



Allgemeine Vorschrift IVa wurde mit **8b** (1,50 g; 7,49 mmol), Benzylchlorid (1,32 g; 1,20 ml; 10,41 mmol) und TEA (2,19 g; 3,00 ml; 21,64 mmol), aber ohne DMAP und mit zwei Tage Rühren durchgeführt. Das Produkt wurde in PE : E 5 : 1 gesäult.

Aussehen: durchsichtiges Öl

Ausbeute: 946,00 mg (3,26 mmol) → 43 %

R_f-Wert: 0,09 (Silica, PE : E 5 : 1)

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 7,38 – 7,23 (m, 5H); 3,57 – 3,30 (m, 4H); 2,66 (dd, *J* = 19,1; 14,1 Hz, 4H); 1,84 (d, *J* = 16,6 Hz, 2H); 1,49 (d, *J* = 3,2 Hz, 9H).

Synthese der alkylierten und geschützten Linker 10o-q (allgemeine Vorschrift IVb)

N-(3-Bromopropyl)phthalimid (1 eq.), 1 eq. substituiertes Diamin **9n, r-s** und 2 eq. K_2CO_3 wurden bei Argonatmosphäre mit 20 ml trockenem Acetonitril übergossen. Es wurde für 7 h unter Rückfluss gerührt. Die warme Suspension wurde abfiltriert und das Filtrat vom Lösemittel befreit. Entweder wurde säulenchromatographisch getrennt oder das Produkt wurde direkt im nächsten Schritt verwendet.

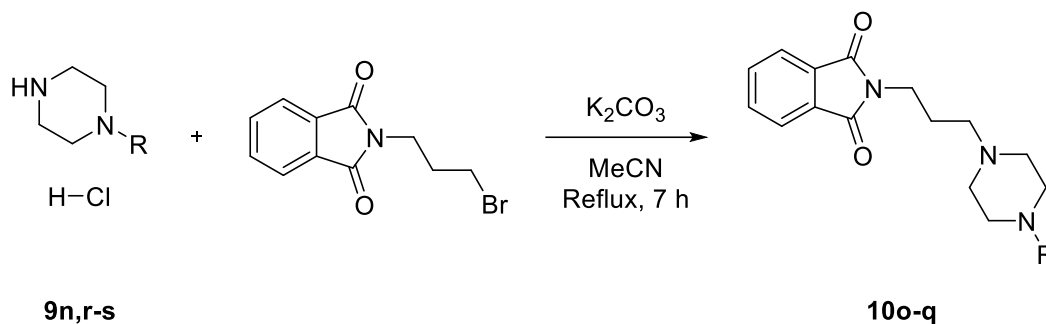
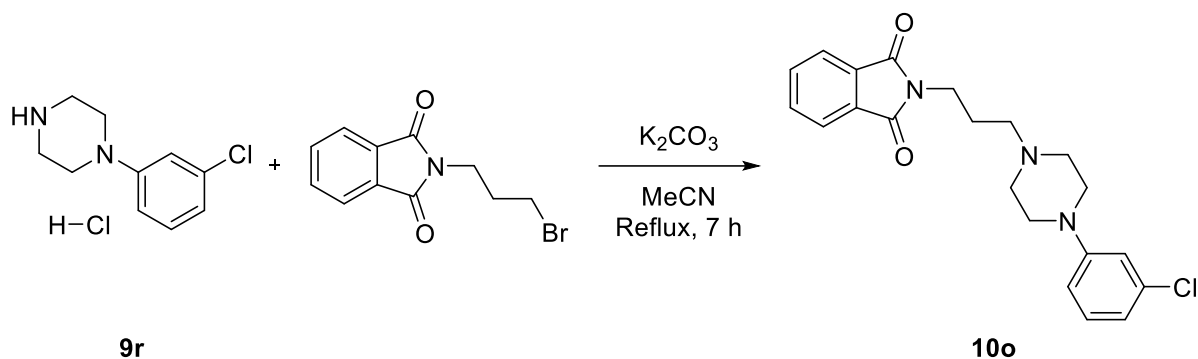


Abb. 7.6. Generelles Reaktionsschema der allgemeinen Vorschrift IVb für die Synthese der alkylierten Phthalimid geschützten Diamine. Diamine: 1-(3-Chlophenyl)piperazin (**10o**), 1-(2-Chlophenyl)piperazin (**10p**), *N*-Benzylhomopiperazin (**10q**).

1-(3-(4-(3-Chlorphenyl)piperazin-1-yl)propyl)phthalimid (10o)



Allgemeine Vorschrift IVb wurde mit 1-(3-Chlorphenyl)piperazin Hydrochlorid **9r** (2,00 g; 8,58 mmol), *N*-(3-Bromopropyl)phthalimid (2,30 g; 8,58 mmol) und K₂CO₃ (2,37 g; 17,16 mmol) durchgeführt. Es wurde säulenchromatographisch auf Silica in PE : E 5 : 1 – 3 : 1 getrennt.

Aussehen: oranges Öl

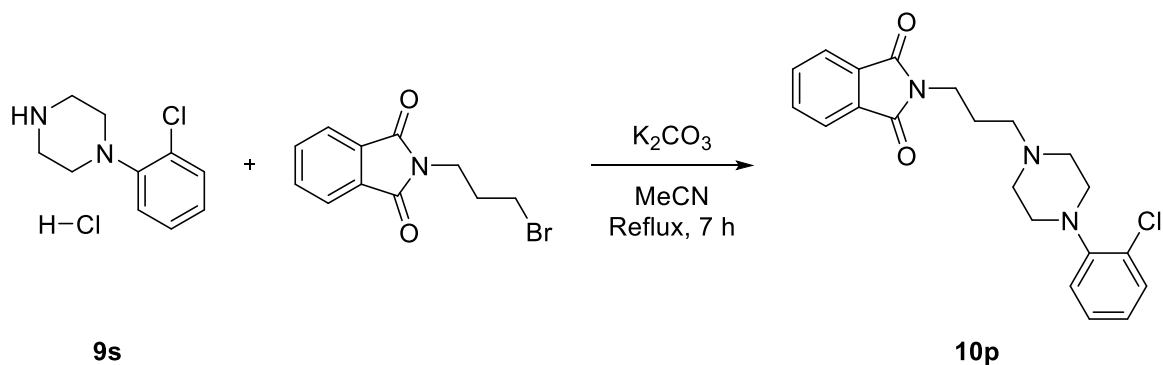
Ausbeute: 2,87 g (7,48 mmol) → 87 %

R_f-Wert: 0,05 (Silica, PE : E 5 : 1)

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 7,87 – 7,81 (m, 4H); 7,18 (s, 1H); 6,86 (s, 2H); 6,76 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H); 3,79 (t, *J* = 6,8 Hz, 2H); 3,07 – 2,98 (m, 4H); 2,55 – 2,43 (m, 6H); 1,90 (p, *J* = 6,7 Hz, 2H).

1-(3-(4-(2-Chlorphenyl)piperazin-1-yl)propyl)phthalimid (10p)



Allgemeine Vorschrift IVb wurde mit 1-(2-Chlorphenyl)piperazin Hydrochlorid **9s** (2,00 g; 8,58 mmol), *N*-(3-Bromopropyl)phthalimid (2,30 g; 8,58 mmol) und K₂CO₃ (2,37 g; 17,16 mmol) durchgeführt. Es wurde säulenchromatographisch auf Silica in PE : E 5 : 1 – 3 : 1 getrennt.

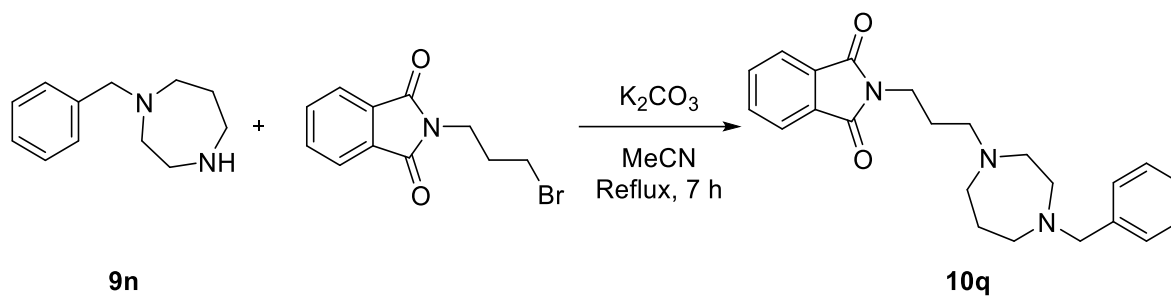
Aussehen: oranges Öl

Ausbeute: 1,77 g (4,61 mmol) → 54 %

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 7,90 – 7,84 (m, 4H); 7,36 (dd, *J* = 7,9; 1,4 Hz, 1H); 7,26 (td, *J* = 8,0; 1,5 Hz, 1H); 7,04 – 6,95 (m, 2H); 3,80 (t, *J* = 6,8 Hz, 2H); 2,82 (s, 5H); 2,50 (t, *J* = 6,4 Hz, 5H); 1,90 (p, *J* = 6,6 Hz, 2H).

1-(3-(4-Benzylhomopiperazin-1-yl)propyl)phthalimid (10q)



Allgemeine Vorschrift IVb wurde mit **9n** (619,00 mg; 3,25 mmol), *N*-(3-Bromopropyl)phthalimid (872,16 mg; 3,25 mmol) und K₂CO₃ (5,84 g; 42,29 mmol) durchgeführt.

Aussehen: oranges Öl

Ausbeute: 1,23 g (3,25 mmol) → quant.

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 7,78 – 7,63 (m, 4H); 7,25 – 7,19 (m, 4H); 7,18 – 7,11 (m, 1H); 3,68 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H); 3,51 (s, 2H); 2,65 – 2,44 (m, 10H); 1,76 (p, *J* = 6,9 Hz, 2H), 1,69 – 1,61 (m, 2H).

Synthese der acetylierten Linker 9a-n (allgemeine Vorschrift Va)

1 eq. geschützter Linker wurde in 15 ml DCM gelöst und mit 10 eq. TFA versetzt. Es wurde über Nacht gerührt. Die Lösung wurde in 25 ml gesättigte wässrige NaHCO₃ gegeben und dreimal mit 50 ml DCM extrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO₄ bzw. Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösemittel wurde *in vacuo* entfernt und das Produkt direkt im nächsten Schritt verwendet.

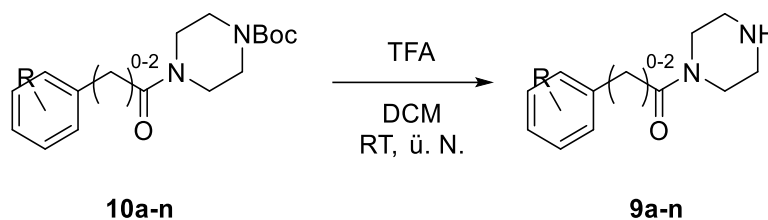
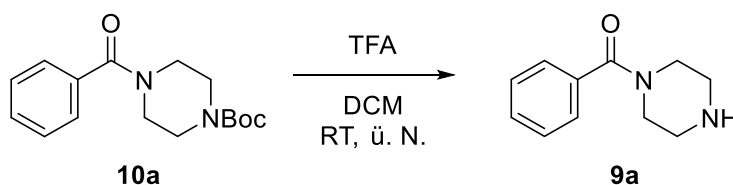


Abb. 7.7. Generelles Reaktionsschema der allgemeinen Vorschrift Va für die Synthese der acetylierten Diamine. R = H, n = 0 (**9a**), R = H, n = 1 (**9b**), R = H, n = 2 (**9c**), R = H, n = 2 (Homopiperazin, **9d**), R = H, n = 0 (2-Methylpiperazin, **9e**), R = H, n = 0 (Homopiperazin, **9f**), R = H, n = 0 (Benzyl, **9g**), R = 4, n = 0 (**9h**), R = 3-Chlor, n = 0 (**9i**), R = 2-Chlor, n = 0 (**9j**), n = 0 (1,3-Diaminopropan, **9k**), R = H, R = H, n = 0 (1,4-Diaminobutan, **9l**), n = 0 (1,2-Diaminoethan, **9m**), R = H, R = H, n = 0 (Homopiperazin u. Benzyl, **9n**).

N-Benzoylpiperazin (9a)



Allgemeine Vorschrift Va wurde mit **10a** (0,95 g; 3,27 mmol) und TFA (3,73 g; 2,52 ml; 32,68 mmol) durchgeführt und direkt im nächsten Schritt verwendet.

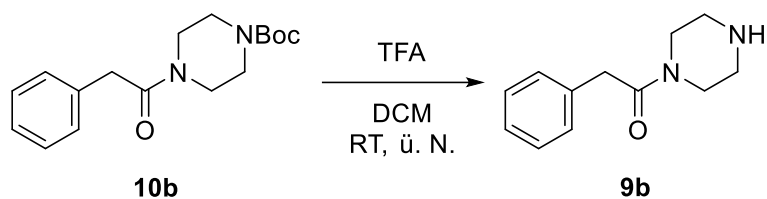
Aussehen: gelb-braunes Wachs

Ausbeute: 292,00 mg (1,53 mmol) → 47 %

¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 7,45 – 7,34 (m, 5H); 3,78 (bs, 2H); 3,45 (bs, 2H); 2,86 (s, 4H).

N-(2-Phenyl-1-ethanoyl)piperazin (**9b**)



Allgemeine Vorschrift Va wurde mit **10b** (0,52 g; 1,71 mmol) und TFA (1,94 g; 1,31 ml; 17,05 mmol) durchgeführt und direkt im nächsten Schritt verwendet.

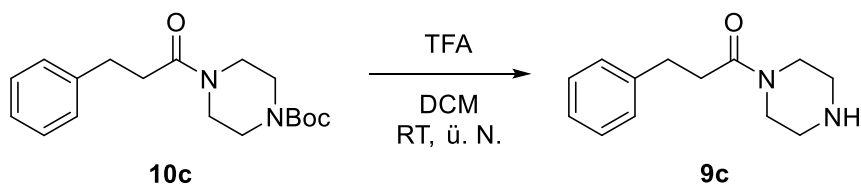
Aussehen: braunes Öl

Ausbeute: 348,00 mg (1,71 mmol) → quant.

¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 7,54 – 7,02 (m, 5H); 3,76 – 2,10 (m, 10H).

N-(3-Phenyl-1-propanoyl)piperazin (**9c**)



Allgemeine Vorschrift Va wurde mit **10c** (0,54 g; 1,71 mmol) und TFA (1,94 g; 1,31 ml; 17,05 mmol) durchgeführt und direkt im nächsten Schritt verwendet.

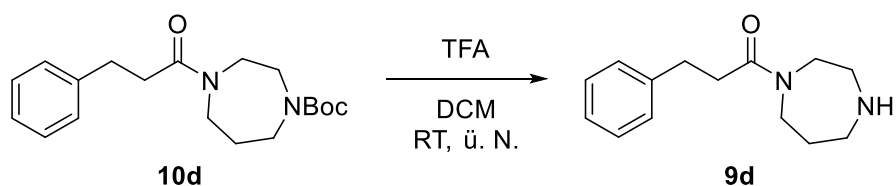
Aussehen: braunes Öl

Ausbeute: 309,00 mg (1,42 mmol) → 83 %

¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 7,33 (m, 1H); 7,22 (m, 4H); 3,22 – 2,75 (m, 12H).

***N*-(3-Phenyl-1-propanoyl)homopiperazin (9d)**

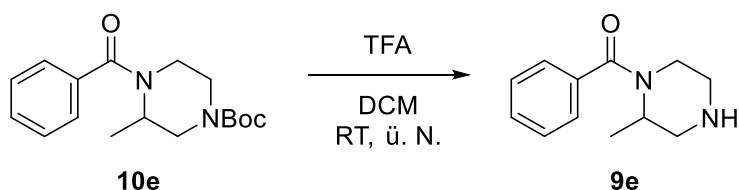


Allgemeine Vorschrift Va wurde mit **10d** (584,00 mg; 1,76 mmol) und TFA (2,00 g; 1,35 ml; 17,57 mmol) durchgeführt und direkt im nächsten Schritt verwendet.

Aussehen: braunes Öl

Ausbeute: 328,00 mg (1,41 mmol) → 80 %

***N*-Benzoyl-2-methylpiperazin (9e)**

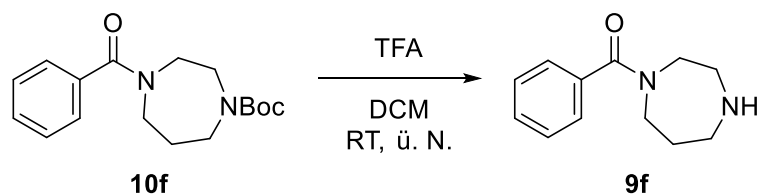


Allgemeine Vorschrift Va wurde mit **10e** (427,00 mg; 1,40 mmol) und TFA (1,60 g; 1,08 ml; 14,03 mmol) durchgeführt und direkt im nächsten Schritt verwendet.

Aussehen: gelbes Harz

Ausbeute: 250,00 mg (1,22 mmol) → 87 %

***N*-Benzoylhomopiperazin (9f)**

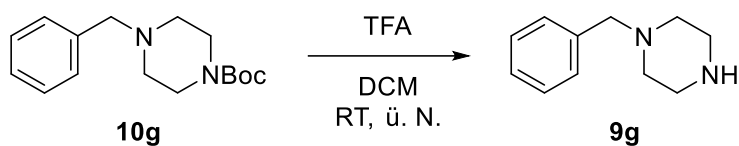


Allgemeine Vorschrift Va wurde mit **10f** (377,00 mg; 1,24 mmol) und TFA (1,41 g; 0,95 ml; 12,39 mmol) durchgeführt und direkt im nächsten Schritt verwendet.

Aussehen: gelb-braunes Wachs

Ausbeute: 78,00 mg (0,38 mmol) → 31 %

N-Benzylpiperazin (**9g**)

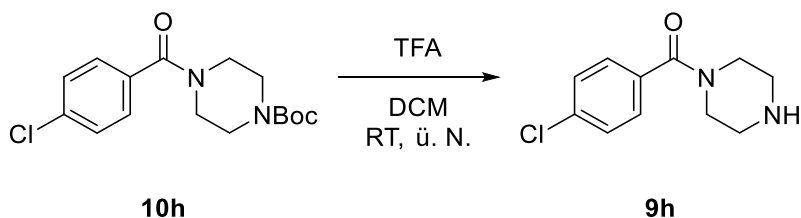


Allgemeine Vorschrift Va wurde mit **10g** (1,54 g; 5,58 mmol) und TFA (6,36 g; 4,30 ml; 55,79 mmol) durchgeführt und direkt im nächsten Schritt verwendet.

Aussehen: weißes Pulver

Ausbeute: 509,00 mg (2,89 mmol) \rightarrow 52 %

N-(4-Chlor)benzoyl-2-methylpiperazin (**9h**)

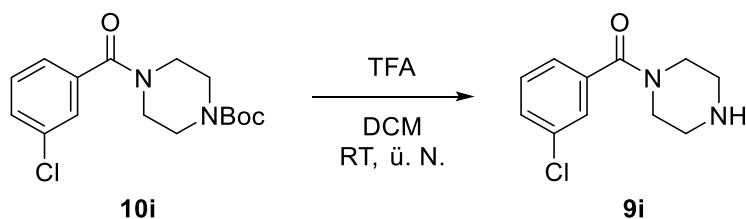


Allgemeine Vorschrift Va wurde mit **10h** (347,00 mg; 1,07 mmol) und TFA (1,22 g; 0,82 ml; 10,68 mmol) durchgeführt und direkt im nächsten Schritt verwendet.

Aussehen: gelbes Öl

Ausbeute: 196,00 mg (1,22 mmol) \rightarrow 82 %

N-(3-Chlor)-benzoyl-2-methylpiperazin (**9i**)

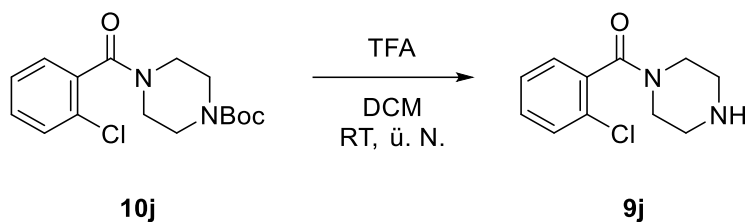


Allgemeine Vorschrift Va wurde mit **10i** (348,00 mg; 1,07 mmol) und TFA (1,22 g; 0,83 ml; 10,71 mmol) durchgeführt und direkt im nächsten Schritt verwendet.

Aussehen: gelbes Öl

Ausbeute: 154,00 mg (0,69 mmol) \rightarrow 64 %

N-(2-Chlor)benzoyl-2-methylpiperazin (**9j**)

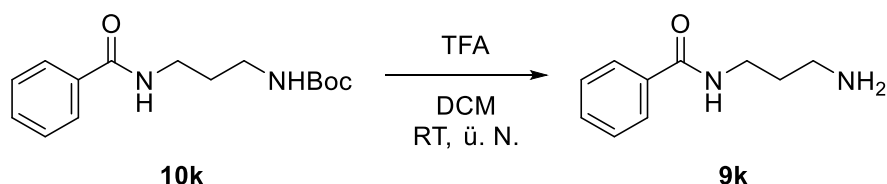


Allgemeine Vorschrift Va wurde mit **10j** (370,00 mg; 1,14 mmol) und TFA (1,30 g; 0,88 ml; 11,39 mmol) durchgeführt und direkt im nächsten Schritt verwendet.

Aussehen: oranges Öl

Ausbeute: 167,00 mg (0,74 mmol) → 65 %

N-(2-Aminopropyl)benzamide (**9k**)

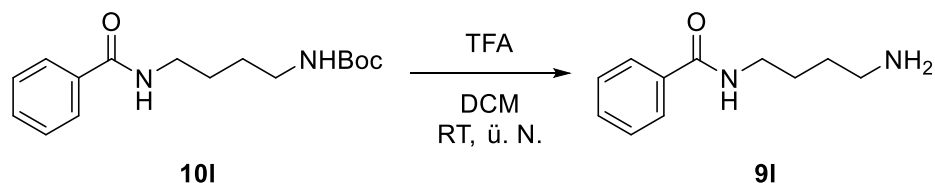


Allgemeine Vorschrift Va wurde mit **10k** (577,00 mg; 2,07 mmol) und TFA (2,36 g; 1,60 ml; 20,73 mmol) durchgeführt und direkt im nächsten Schritt verwendet.

Aussehen: oranger Feststoff

Ausbeute: 188,00 mg (1,05 mmol) → 51 %

N-(2-Aminobutyl)benzamide (**9l**)

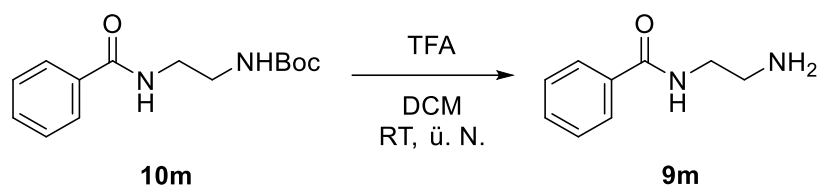


Allgemeine Vorschrift Va wurde mit **10l** (355,00 mg; 1,21 mmol) und TFA (1,38 g; 0,96 ml; 12,14 mmol) durchgeführt und direkt im nächsten Schritt verwendet.

Aussehen: gelber Feststoff

Ausbeute: 23,00 mg (1,05 mmol) → 10 %

N-(2-Aminoethyl)benzamide (**9m**)

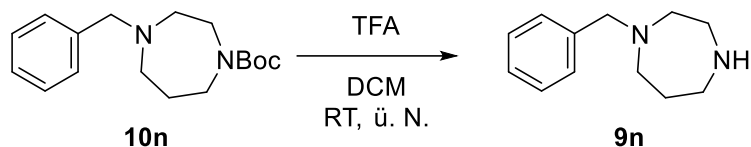


Allgemeine Vorschrift Va wurde mit **10m** (496,00 mg; 1,88 mmol) und TFA (2,14 g; 1,45 ml; 18,77 mmol) durchgeführt und direkt im nächsten Schritt verwendet.

Aussehen: braunes Harz

Ausbeute: 289,00 mg (1,76 mmol) → 93 %

N-Benzylhomopiperazin (**9n**)



Allgemeine Vorschrift Va wurde mit **10n** (946,00 mg; 3,26 mmol) und TFA (3,71 g; 2,51 ml; 32,58 mmol) durchgeführt. Der Extraktionsschritt entfiel; stattdessen wurde das Lösemittel abgezogen sowie mit 20 ml Toluol coevaporiert.

Aussehen: gelb-braunes Wachs

Ausbeute: 619,00 mg (3,25 mmol) → quant.

Synthese der alkylierten Linker 9o-q (allgemeine Vorschrift Vb)

1 eq. geschützter Linker **10o-q** wurde in 20 ml absolutem Ethanol gelöst und mit 2 eq. Hydrazin Monohydrat (64 %) versetzt. Die Lösung wurde für 2 h unter Rückfluss gerührt. Die Mischung wurde auf Raumtemperatur gebracht, mit DCM verdünnt und filtriert. Das Filtrat wurde mit 50 ml Wasser, anschließend mit 50 ml konz. NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösemittel wurde *in vacuo* entfernt.

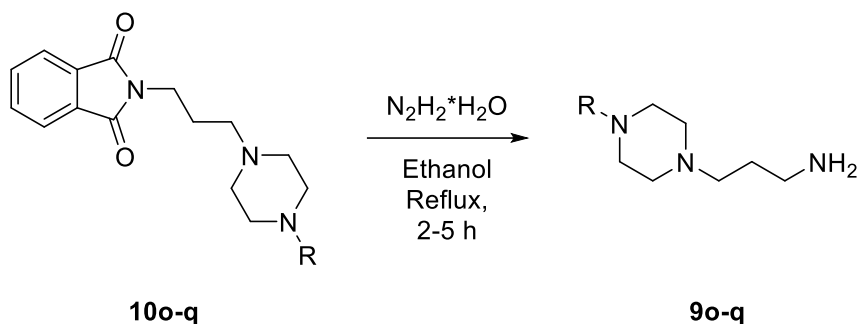
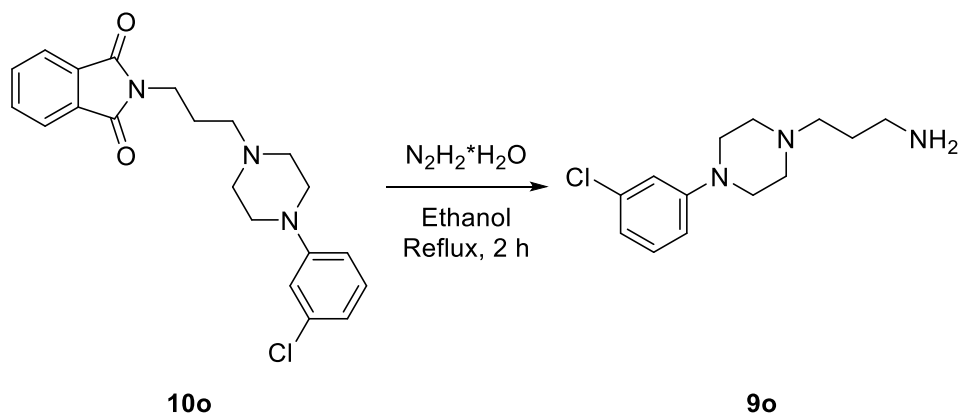


Abb. 7.8. Generelles Reaktionsschema der allgemeinen Vorschrift Vb für die Synthese der alkylierten Diamine. Diamine: 1-(3-Chlorphenyl)piperazin (**9o**), 1-(2-Chlorphenyl)piperazin (**9p**), Benzylhomopiperazin (**9q**).

3-(4-(3-Chlorphenyl)piperazin-1-yl)propan-1-amin (9o**)**



Allgemeine Vorschrift Vb wurde mit **10o** (2,87 g; 7,48 mmol) und 64 % Hydrazin Monohydrat (1,17 g; 1,13 ml; 14,95 mmol) durchgeführt.

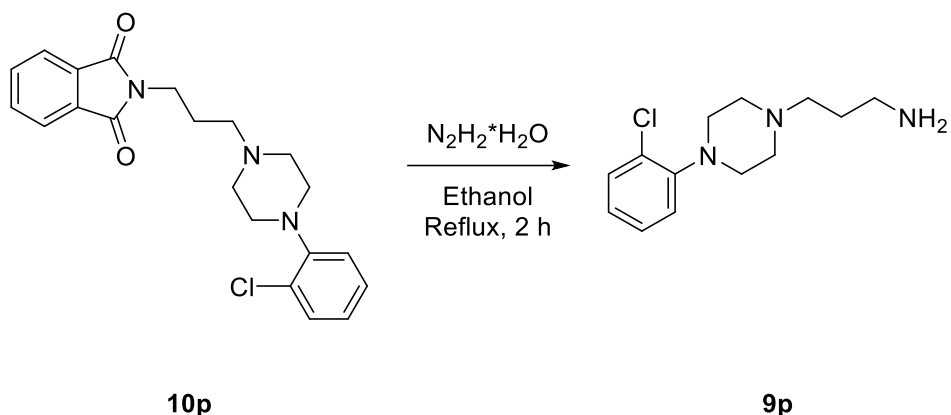
Aussehen: oranges Öl

Ausbeute: 1,58 g (6,24 mmol) → 83 %

¹H-NMR: (600 MHz, Aceton-d⁶):

δ [ppm] = 7,21 (t, *J* = 8,1 Hz, 1H); 6,93 (t, *J* = 2,1 Hz, 1H); 6,91 (dd, *J* = 8,4; 2,0 Hz, 1H); 6,78 (ddd, *J* = 7,8; 1,8; 1,6 Hz, 1H); 3,27 – 3,19 (m, 6H); 2,59 – 2,53 (m, 4H); 2,45 – 2,39 (m, 2H); 1,80 – 1,76 (m, 2H).

3-(4-(2-Chlorphenyl)piperazin-1-yl)propan-1-amin (9p)



Allgemeine Vorschrift Vb wurde mit **10p** (1,77 g; 4,61 mmol) und 64 % Hydrazin Monohydrat (0,72 g; 0,70 ml; 9,21 mmol) durchgeführt.

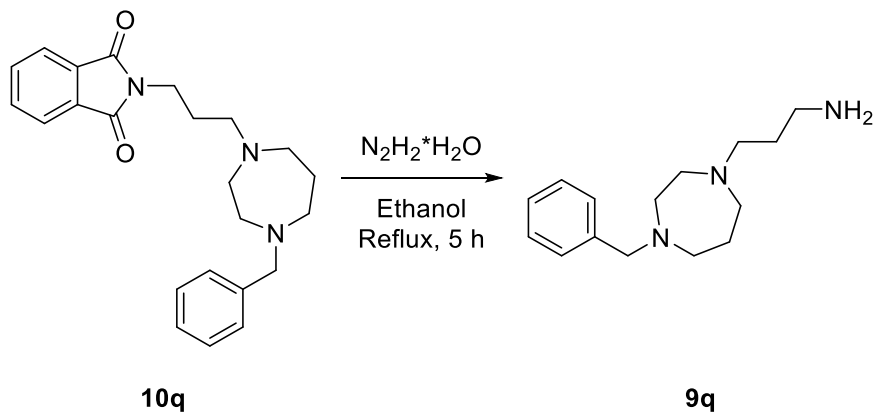
Aussehen: gelbes Öl

Ausbeute: 1,17 g (4,60 mmol) → quant.

¹H-NMR: (600 MHz, Aceton-d₆):

δ [ppm] = 7,39 (dd, $J = 7,9$; 1,4 Hz, 1H); 7,29 (td, $J = 8,0$; 1,4 Hz, 1H); 7,16 (dd, $J = 8,0$; 1,3 Hz, 1H); 7,03 (td, $J = 7,7$; 1,4 Hz, 1H); 3,58 (q, $J = 7,0$ Hz, 2H); 3,26 (t, $J = 6,9$ Hz, 2H); 3,05 (s, 2H); 2,61 (s, 2H); 1,81 – 1,75 (m, 2H); 1,14 (t, $J = 7,0$ Hz, 2H).

3-(4-Benzyl-homopiperazin-1-yl)propan-1-amin (9q)



Allgemeine Vorschrift Vb wurde mit **9q** (1,23 g; 3,25 mmol) und 64 % Hydrazin Monohydrat (0,51 g; 0,49 ml; 6,50 mmol) bei 5 h unter Rückfluss durchgeführt.

Aussehen: oranges Öl

Ausbeute: 622,00 mg (2,51 mmol) → 77 %

¹H-NMR: (500 MHz, Aceton-d₆):

δ [ppm] = 7,37 (d, $J = 7,5$ Hz, 2H); 7,31 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H); 7,23 (t, $J = 7,2$ Hz, 1H); 3,63 (s, 2H); 2,75 – 2,52 (m, 10H); 2,09 (dd, $J = 6,3$; 4,2 Hz, 2H); 1,83 – 1,68 (m, 4H).

Synthese der Inhibitoren 3a-j/a-u (allgemeine Vorschrift VIa)

Sulfonylchlorid **6a-u** und 1,5 eq. Amin **9a-j** wurden vorgelegt und mit 2,5 ml DCM sowie 3 eq. TEA versetzt. Es wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Das Lösemittel wurde abgezogen und das Rohprodukt über eine präparative HPLC (C18-Säule; Acetonitril:Wasser 5:95-100:0 in 35 Minuten) getrennt. Die Inhibitoren werden durch ihre Ausgangsmaterialien benannt. Dabei steht **3** für Inhibitor, der erste Buchstabe **a-j** für das Sulfonamid und der letzte Buchstabe für das Amin **a-u**.

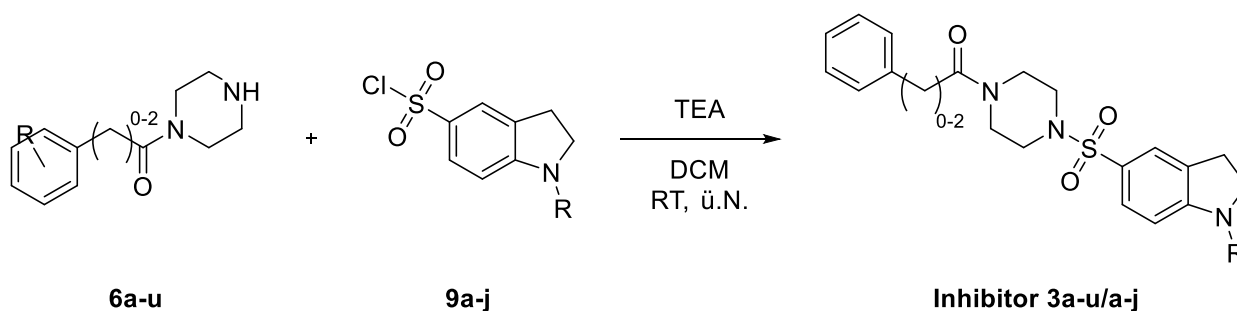


Abb. 7.9. Generelles Reaktionsschema der allgemeinen Vorschrift VIa für die Synthese der Inhibitoren.

Synthese der Inhibitoren 3j-m, o-q/e (allgemeine Vorschrift VIb)¹⁰⁷

Sulfonylchlorid **6e** und 1,5 eq. primäres Amin **9j-m, o-q** wurden vorgelegt und mit 2,5 ml Pyridin versetzt. Es wurde über Nacht entweder bei Raumtemperatur gerührt oder unter Rückfluss gerührt. Das Lösemittel wurde abgezogen und das Rohprodukt über eine präparative HPLC (C18-Säule; Acetonitril:Wasser 5:95-100:0 in 35 Minuten) getrennt. Die Inhibitoren werden durch ihre Ausgangsmaterialien benannt. Dabei steht **3** für Inhibitor, der erste Buchstabe **e** für das Sulfonamid und der letzte Buchstabe **m, o-q** für das Amin.

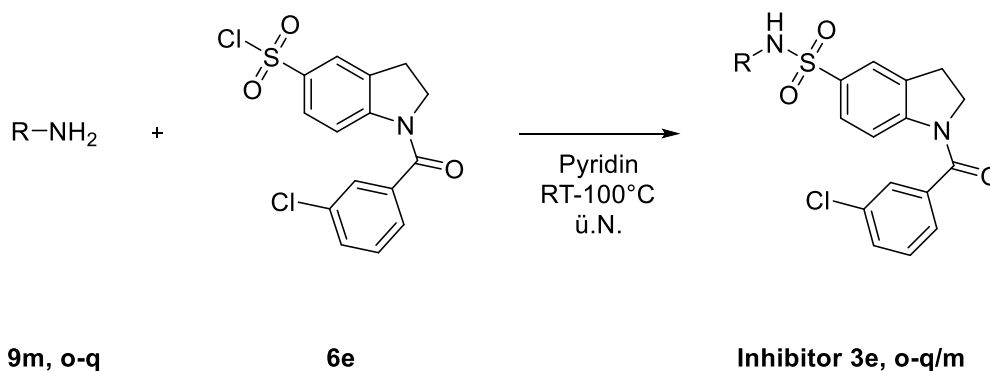
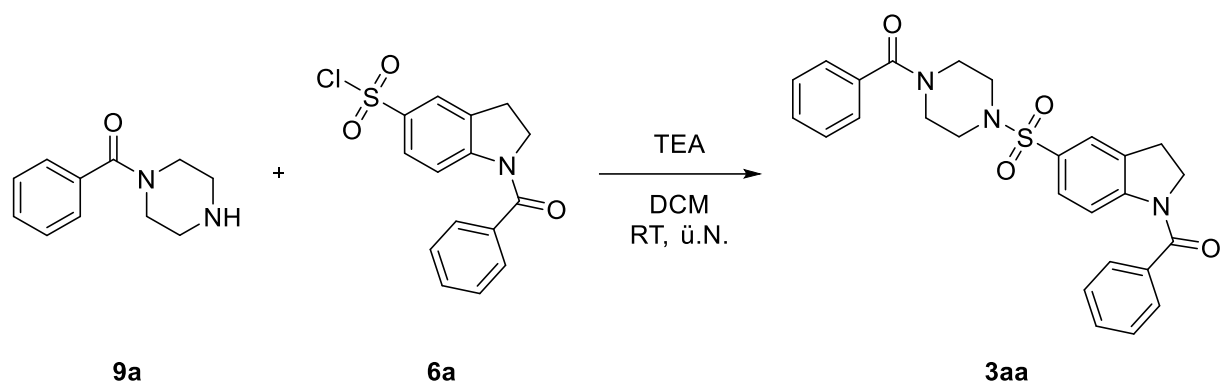


Abb. 7.10. Generelles Reaktionsschema der allgemeinen Vorschrift VIb für die Synthese der Inhibitoren.

Inhibitor 3aa



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **9a** (20,00 mg; 62,15 μmol), **9a** (19,00 mg; 99,87 μmol) und TEA (14,60 mg; 20,00 μl ; 144,28 μmol) durchgeführt.

Ausbeute: 1,80 mg (3,79 μmmol) \rightarrow 6 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 7,61 – 7,34 (m, 13H); 4,20 (t, $J = 8,3$ Hz, 2H); 3,90 (bs, 2H); 3,58 (bs, 2H); 3,24 (t, $J = 8,1$ Hz, 2H); 3,09 (s, 4H).

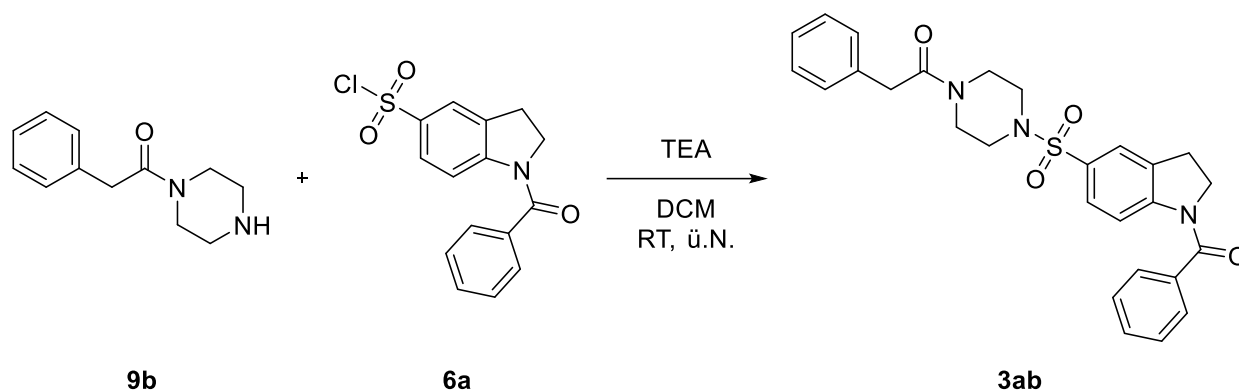
LC/MS (ESI +): $m/z = 476,3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 476,16385$

gefunden: $m/z = 476,16395$

Inhibitor 3ab



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6a** (25,00 mg; 77,69 μmol), **9b** (20,00 mg; 97,91 μmol) und TEA (14,60 mg; 20,00 μl ; 144,28 μmol) durchgeführt.

Ausbeute: 2,00 mg (4,09 μmmol) \rightarrow 5 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 7,63 – 7,47 (m, 8H); 7,33 – 7,30 (m, 2H); 7,27 (m, 1H); 7,18 (m, 2H); 4,20 (t, $J = 8,3$ Hz, 2H); 3,75 (t, $J = 8,0$ Hz, 2H); 3,72 (s, 2H); 3,55 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H); 3,22 (t, $J = 8,4$ Hz, 2H); 2,98 (t, $J = 7,6$ Hz 2H); 2,81 (t, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (151 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 169,49; 134,41; 128,86; 128,53; 124,38; 45,90; 45,76; 45,49; 41,12; 40,96; 30,15; 29,71; 29,25; 14,14.

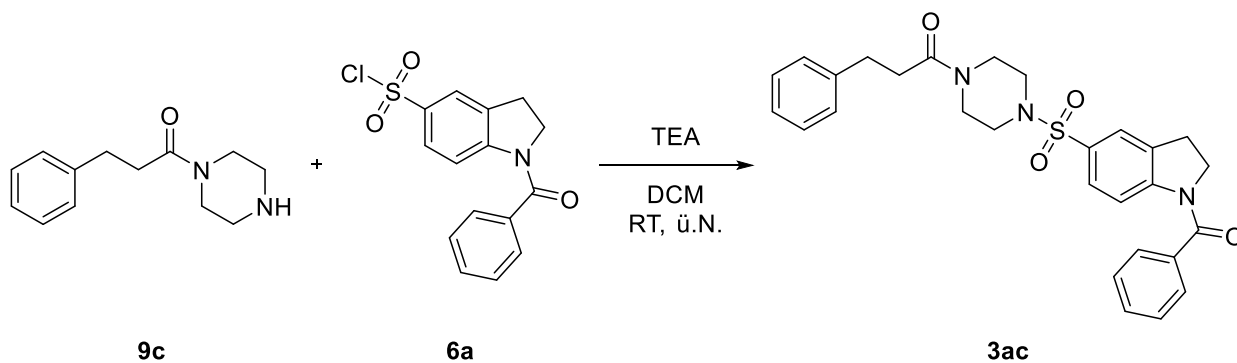
LC/MS (ESI +): $m/z = 490,3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{27}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 490,17950$

gefunden: $m/z = 490,17944$

Inhibitor 3ac



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6a** (25,00 mg; 77,69 μmol), **9c** (20,00 mg; 91,62 μmol) und TEA (14,60 mg; 20,00 μl ; 144,28 μmol) durchgeführt.

Ausbeute: 5,00 mg (9,93 μmmol) \rightarrow 13 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 7,62 – 7,49 (m, 7H); 7,27 – 7,13 (m, 6H); 4,21 (t, $J = 8,3$ Hz, 2H); 3,74 (m, 2H); 3,43 (m, 2H); 3,25 (t, $J = 8,1$ Hz, 2H); 2,99 – 2,92 (m, 4H); 2,77 (m, 2H); 2,66 (d, $J = 15,4$ Hz, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (151 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 170,63; 170,60; 169,64; 147,11; 140,83; 136,04; 130,99; 128,82; 128,53; 128,43; 128,13; 127,09; 127,05; 126,30; 124,41; 46,00; 45,89; 45,63; 44,93; 40,98; 34,87; 31,40; 31,39; 27,85.

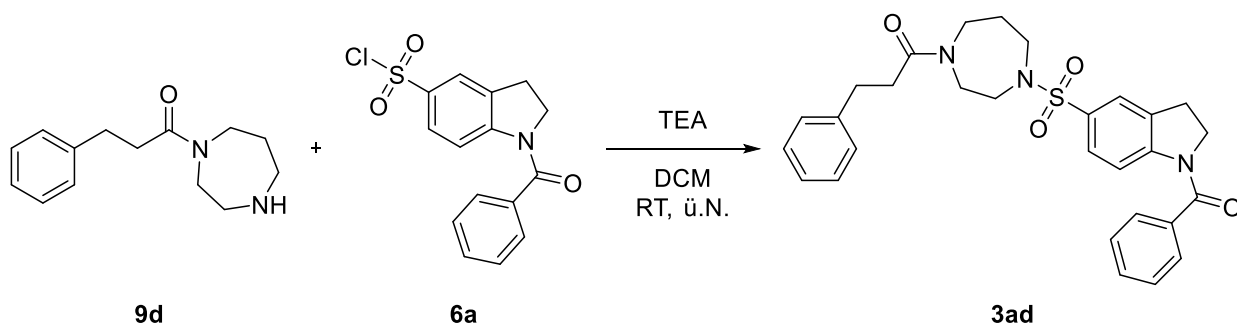
LC/MS (ESI +): $m/z = 504,4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{27}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 504,19515$

gefunden: $m/z = 504,19514$

Inhibitor 3ad



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6a** (20,00 mg; 62,15 μmol), **9d** (18,00 mg; 77,48 μmol) und TEA (25,55 mg; 35,00 μl ; 252,50 μmol) durchgeführt.

Ausbeute: 6,80 mg (13,14 μmmol) \rightarrow 21 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 7,82 – 7,32 (m, 8H); 7,28 – 7,15 (m, 5H); 4,18 (t, $J = 8,3$ Hz, 2H); 3,71 (bs, 2H); 3,55 (dd, $J = 13,1$; 6,6 Hz, 2H); 3,31 – 3,10 (m, 6H); 2,99 (dd, $J = 13,9$; 6,7 Hz, 2H); 2,62 – 2,60 (m, 2H); 1,95 – 1,90 (m, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (151 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 172,04; 169,70; 131,05; 128,93; 128,66; 128,63; 127,24; 126,40; 126,35; 50,51; 50,00; 49,89; 48,13; 47,26; 46,80; 44,85; 35,30; 34,90; 31,54; 31,49; 28,95; 27,64.

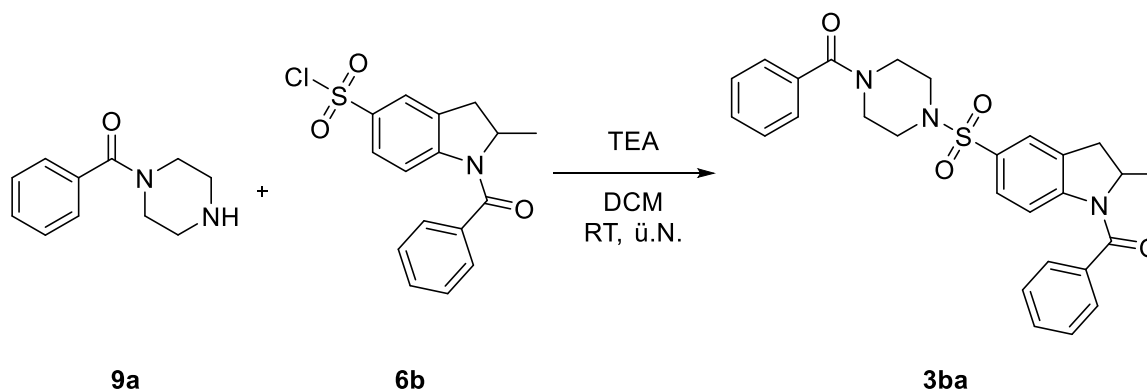
LC/MS (ESI +): $m/z = 518,3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{29}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 518,21080$

gefunden: $m/z = 518,21096$

Inhibitor 3ba



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6b** (20,00 mg; 59,56 μmol), **9a** (19,00 mg; 99,87 μmol) und TEA (14,60 mg; 20,00 μl ; 144,28 μmol) durchgeführt.

Ausbeute: 6,40 mg (13,07 μmmol) \rightarrow 22 %

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 7,51 – 7,26 (m, 13H); 4,73 (m, 1H); 3,77 (s, 2H); 3,50 (s, 2H); 2,95 (s, 4H); 2,68 (d, $J = 16,2$ Hz, 2H); 1,18 (d, $J = 6,4$ Hz, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (126 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 134,56; 132,60; 130,87; 130,35; 128,89; 128,68; 128,05; 127,14; 127,09; 124,95; 116,80; 57,89; 35,62; 21,21.

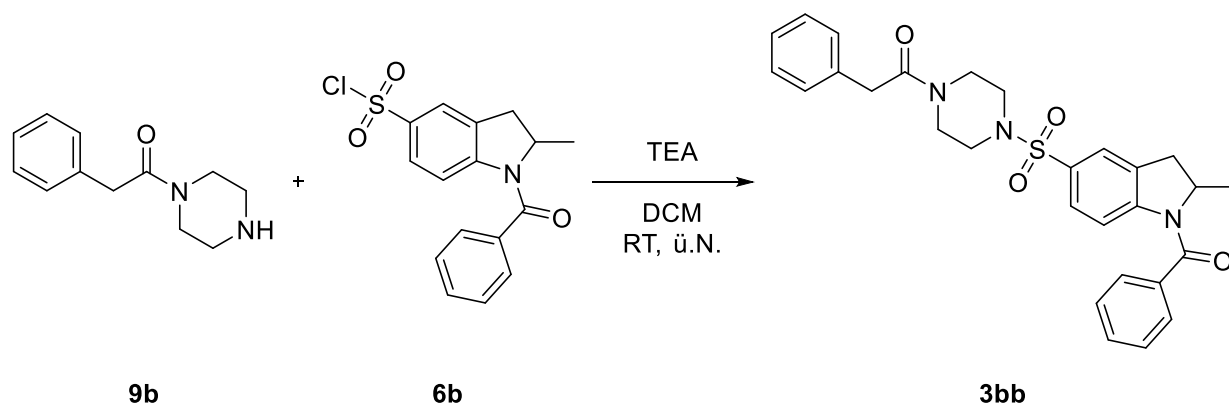
LC/MS (ESI +): $m/z = 490,4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{27}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 490,17950$

gefunden: $m/z = 490,17950$

Inhibitor 3bb



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6b** (20,00 mg; 59,56 μmol), **9b** (15,00 mg; 73,43 μmol) und TEA (14,60 mg; 20,00 μl ; 144,28 μmol) durchgeführt.

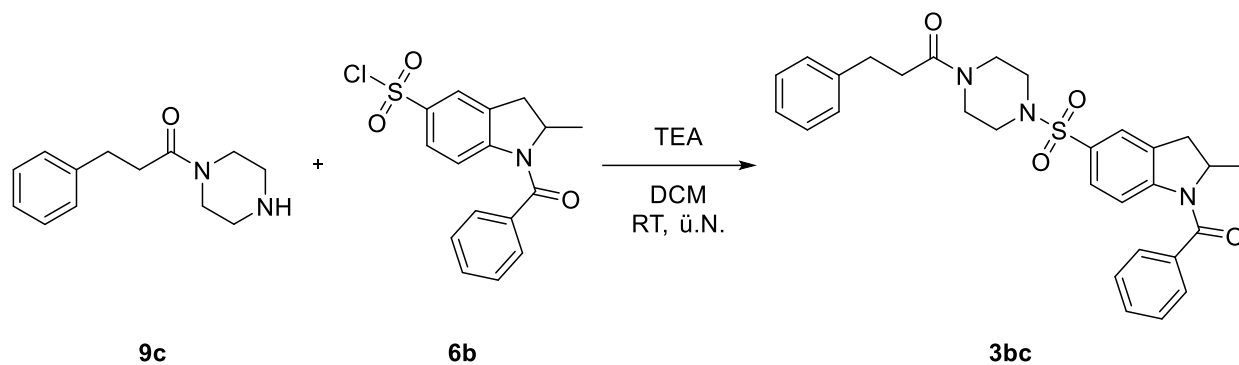
Ausbeute: 1,60 mg (3,18 μmmol) \rightarrow 5 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 7,55 – 7,35 (m, 9H); 7,19 – 7,09 (m, 3H); 4,82 – 4,78 (m, 1H); 3,72 (d, $J = 16,2$ Hz, 4H); 3,55 – 3,49 (m, 2H); 2,97 (bs, 2H); 2,76 (dd, $J = 34,0; 9,2$ Hz, 4H); 1,25 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H).

LC/MS (ESI +): $m/z = 504,3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

Inhibitor 3bc



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6b** (20,00 mg; 56,59 μmol), **9c** (15,00 mg; 68,71 μmol) und TEA (14,60 mg; 20,00 μl ; 144,28 μmol) durchgef\u00fchrt.

Ausbeute: 3,10 mg (5,99 μmmol) \rightarrow 10 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 7,56 - 7,53 (m, 4H); 7,52 - 7,46 (m, 3H); 7,41 (dd, $J = 17,2; 8,0$ Hz, 1H); 7,24 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H); 7,19 - 7,14 (m, 3H); 4,85 - 4,80 (m, 1H); 3,73 (s, 2H); 3,56 - 3,47 (m, 2H); 3,45 (s, 2H); 2,95 (dd, $J = 14,5; 6,8$ Hz, 4H); 2,80 (s, 2H); 2,62 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H); 1,27 (d, $J = 6,2$ Hz, 3H).

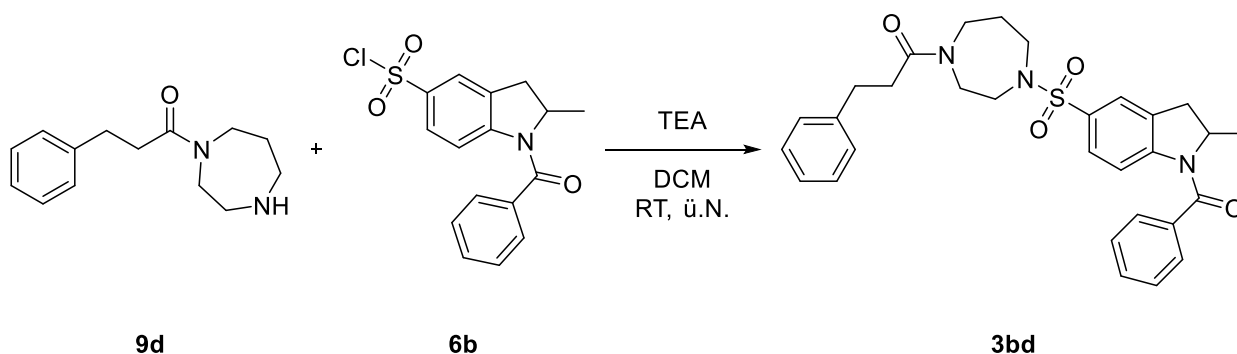
LC/MS (ESI +): $m/z = 518,3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{29}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 518,21080$

gefunden: $m/z = 518,21130$

Inhibitor 3bd



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6b** (20,00 mg; 59,56 μmol), **9d** (18,00 mg; 77,48 μmol) und TEA (25,55 mg; 35,00 μl ; 252,50 μmol) durchgeföhrt.

Ausbeute: 2,80 mg (5,27 μmmol) \rightarrow 9 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 7,62 (s, 1H); 7,53 – 7,50 (m, 6H); 7,30 – 7,25 (t, 2H); 7,25 – 7,20 (m, 3H); 4,82 (s, 1H); 3,75 (dd, $J = 5,6; 3,4$ Hz, 1H); 3,68 (dd, $J = 7,2; 4,9$ Hz, 1H); 3,57 – 3,46 (m, 3H); 3,29 (t, $J = 5,1$ Hz, 1H); 3,25 – 3,20 (m, 1H); 3,18 – 3,14 (m, 1H); 3,11 (t, $J = 6,0$ Hz, 1H); 3,00 – 2,96 (m, 2H); 2,75 (d, $J = 16,2$ Hz, 1H); 2,64 (td, $J = 7,8; 3,6$ Hz, 2H); 1,99 – 1,86 (m, 2H); 1,27 (d, $J = 5,6$ Hz, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (126 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 130,93; 128,99; 128,65; 128,64; 127,24; 126,40; 124,35; 57,94; 49,94; 48,27; 47,28; 46,78; 44,86; 35,70; 35,33; 34,89; 31,54; 31,49; 29,85; 28,93; 27,61.

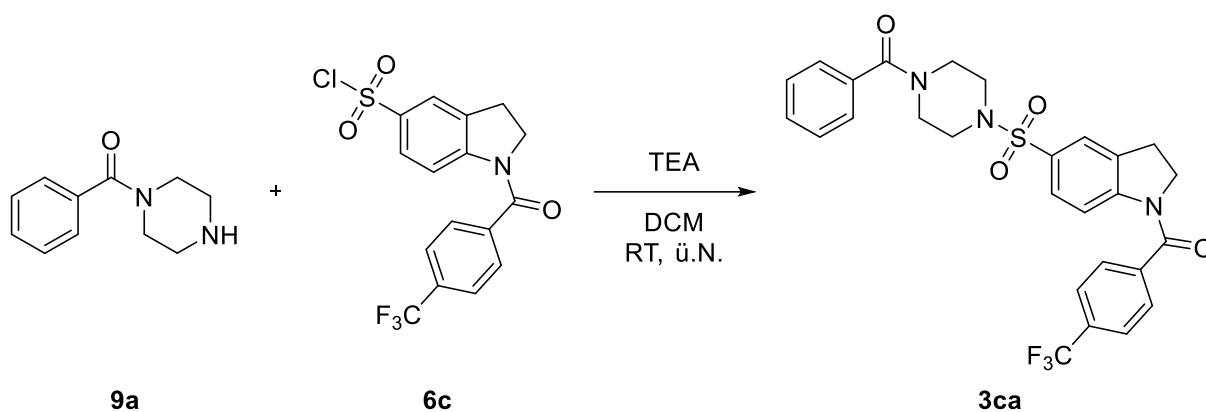
LC/MS (ESI +): $m/z = 532,4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{30}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 532,22645$

gefunden: $m/z = 532,22677$

Inhibitor 3ca



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6c** (20,00 mg; 51,31 μmol), **9a** (19,00 mg; 99,87 μmol) und TEA (14,60 mg; 20,00 μl ; 144,28 μmol) durchgeführt.

Ausbeute: 10,60 mg (19,50 μmmol) \rightarrow 38 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 7,74 (dd, $J = 37,3; 8,0$ Hz, 4H); 7,60 (s, 2H); 7,45 - 7,42 (m, 3H); 7,34 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H); 4,15 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H); 3,72 (d, $J = 142,7$ Hz, 4H); 3,24 (t, $J = 8,3$ Hz, 2H); 3,04 (s, 4H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (151 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 170,60; 168,25; 134,87; 130,40; 128,79; 128,38; 127,60; 127,26; 126,10; 124,63; 124,58; 46,34; 41,12.

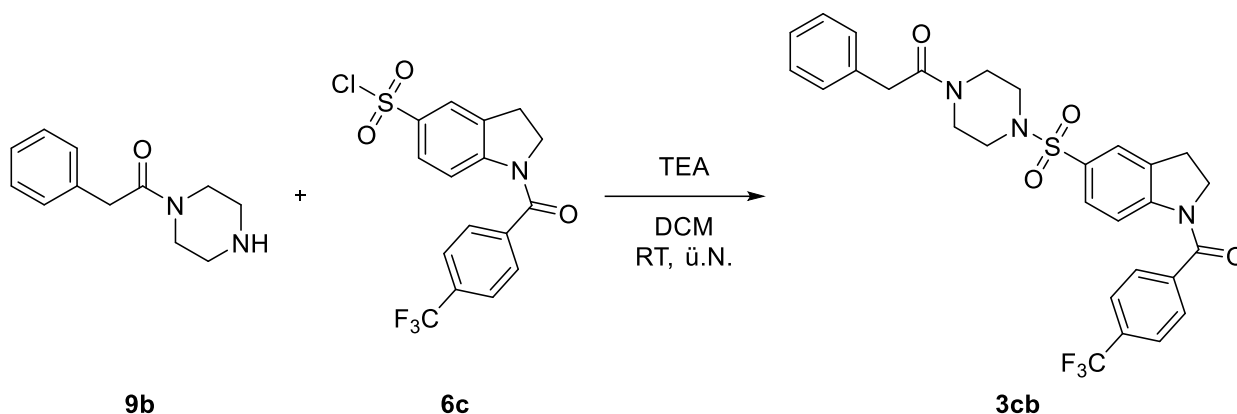
LC/MS (ESI +): $m/z = 544,2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{27}\text{H}_{24}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 544,15124$

gefunden: $m/z = 544,15161$

Inhibitor 3cb



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6c** (20,00 mg; 51,31 μmol), **9b** (15,00 mg; 73,43 μmol) und TEA (14,60 mg; 20,00 μl ; 144,28 μmol) durchgeführt.

Ausbeute: 6,70 mg (12,02 μmmol) \rightarrow 23 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 7,80 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H); 7,72 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H); 7,58 – 7,50 (m, 2H); 7,37 – 7,29 (m, 3H); 7,28 – 7,22 (m, 1H); 7,17 (d, $J = 6,8$ Hz, 2H); 4,16 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H); 3,78 – 3,73 (m, 4H); 3,58 - 3,54 (m, 2H); 3,25 (t, $J = 8,4$ Hz, 2H); 3,00 - 2,98 (m, 2H); 2,85 - 2,81 (m, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (126 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 134,41; 129,33; 128,85; 128,55; 127,85; 127,58; 126,35; 46,24; 46,08; 46,02; 41,77; 41,18.

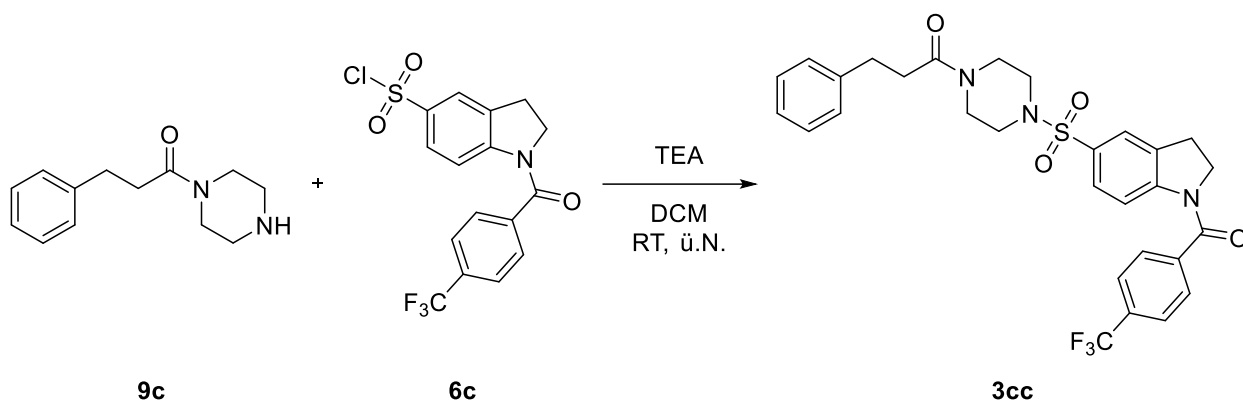
LC/MS (ESI +): $m/z = 572,3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{28}\text{H}_{26}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 558,16689$

gefunden: $m/z = 558,16725$

Inhibitor 3cc



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6c** (20,00 mg; 51,31 μmol), **9c** (15,00 mg; 68,71 μmol) und TEA (14,60 mg; 20,00 μl ; 144,28 μmol) durchgef\u00fchrt.

Ausbeute: 8,10 mg (14,17 μmmol) \rightarrow 28 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 8,22 (bs, 1H); 7,80 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H); 7,72 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H); 7,59 (s, 1H); 7,21 (dt, $J = 14,8; 7,9$ Hz, 6H); 4,17 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H); 3,74 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H); 3,44 (m, 2H); 3,26 (t, $J = 8,3$ Hz, 2H); 2,99 – 2,92 (m, 4H); 2,82 - 7,76 (m, 2H); 2,64 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (126 MHz, CDCl_3):

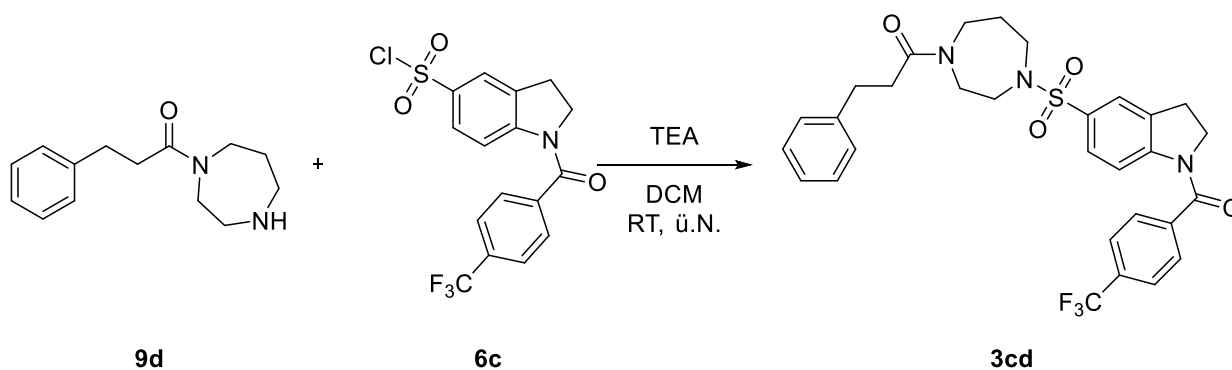
δ [ppm] = 172,24; 129,00; 128,81; 128,62; 127,84; 126,90; 126,38; 124,88; 46,16; 45,70; 41,67; 35,07; 32,02.

HRMS (ESI +): $\text{C}_{29}\text{H}_{28}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 572,18254$

gefunden: $m/z = 572,18268$

Inhibitor 3cd



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6c** (20,00 mg; 51,31 μmol), **9d** (18,00 mg; 77,48 μmol) und TEA (25,55 mg; 35,00 μl ; 252,50 μmol) durchgef\u00fchrt.

Ausbeute: 15,00 mg (25,61 μmmol) \rightarrow 50 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 8,16 (s, 1H); 7,78 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H); 7,69 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H); 7,63 (s, 1H); 7,62 – 7,30 (m, 1H); 7,27 (dd, $J = 6,1; 1,6$ Hz, 2H); 7,20 (dd, $J = 14,3; 7,1$ Hz, 3H); 4,13 (s, 2H); 3,70 (dt, $J = 12,1; 5,5$ Hz, 2H); 3,55 (dd, $J = 14,1; 7,6$ Hz, 2H); 3,31 – 3,12 (m, 6H); 2,97 (dd, $J = 15,1; 7,2$ Hz, 2H); 2,60 (dd, $J = 14,2; 6,8$ Hz, 2H); 2,00 – 1,85 (m, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (151 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 172,02; 141,24; 128,65; 128,60; 127,59; 126,39; 126,03; 50,47; 49,93; 49,81; 48,40; 48,08; 47,26; 46,79; 44,85; 35,26; 34,87; 31,51; 31,46; 28,95; 27,63.

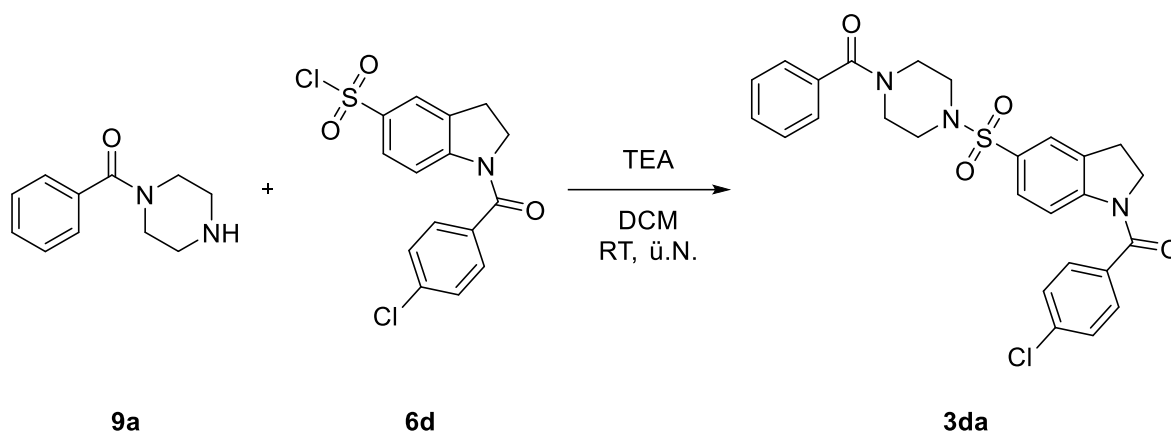
LC/MS (ESI +): $m/z = 586,4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{30}\text{H}_{30}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 586,19819$

gefunden: $m/z = 586,19870$

Inhibitor 3da



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6d** (20,00 mg; 56,14 μmol), **9a** (19,00 mg; 99,87 μmol) und TEA (14,60 mg; 20,00 μl ; 144,28 μmol) durchgeführt.

Ausbeute: 11,60 mg (22,74 μmmol) \rightarrow 41 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 7,60 – 7,53 (m, 4H); 7,50 – 7,39 (m, 6H); 7,34 (d, $J = 7,8$ Hz, 2H); 4,17 (t, $J = 8,4$ Hz, 2H); 3,89 (bs, 2H); 3,57 (bs, 2H); 3,23 (t, $J = 8,3$ Hz, 2H); 3,04 (d, $J = 5,7$ Hz, 4H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (151 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 176,53; 170,60; 168,67; 147,08; 137,38; 134,88; 134,44; 130,39; 129,27; 128,79; 127,26; 122,20; 70,68; 69,48; 63,18; 47,32; 25,58; 22,77; 14,10; 11,94.

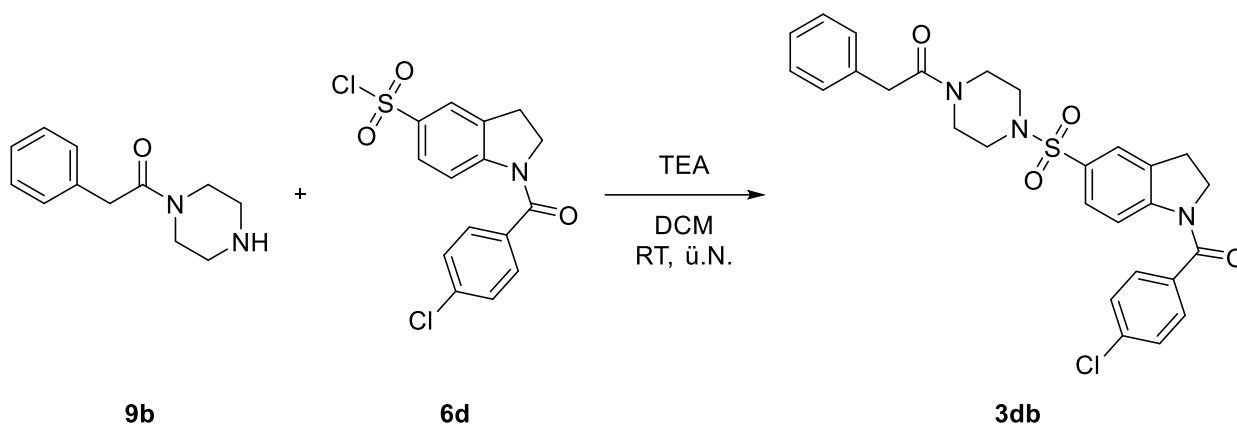
LC/MS (ESI +): $m/z = 510,3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{ClN}_3\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 510,12488$; 512,12193

gefunden: $m/z = 510,12504$; 512,12215

Inhibitor 3db



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6d** (20,00 mg; 56,14 μmol), **9b** (15,00 mg; 73,43 μmol) und TEA (14,60 mg; 20,00 μl ; 144,28 μmol) durchgeführt.

Ausbeute: 7,60 mg (14,50 μmmol) \rightarrow 26 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 7,52 (dt, $J = 27,4$; 8,7 Hz, 6H); 7,37 – 7,29 (m, 3H); 7,27 (d, $J = 7,1$ Hz, 1H); 7,16 (d, $J = 6,7$ Hz, 2H); 4,19 (t, $J = 8,3$ Hz, 2H); 3,79 – 3,74 (m, 4H); 3,59 – 3,56 (m, 2H); 3,24 (t, $J = 8,3$ Hz, 2H); 3,01 – 2,98 (m, 2H); 2,85 – 2,80 (m, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (126 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 171,23; 169,24; 147,16; 137,81; 134,43; 134,09; 129,59; 129,40; 129,05; 128,81; 128,47; 127,70; 124,82; 51,60; 46,17; 46,10; 41,97; 41,05; 28,26.

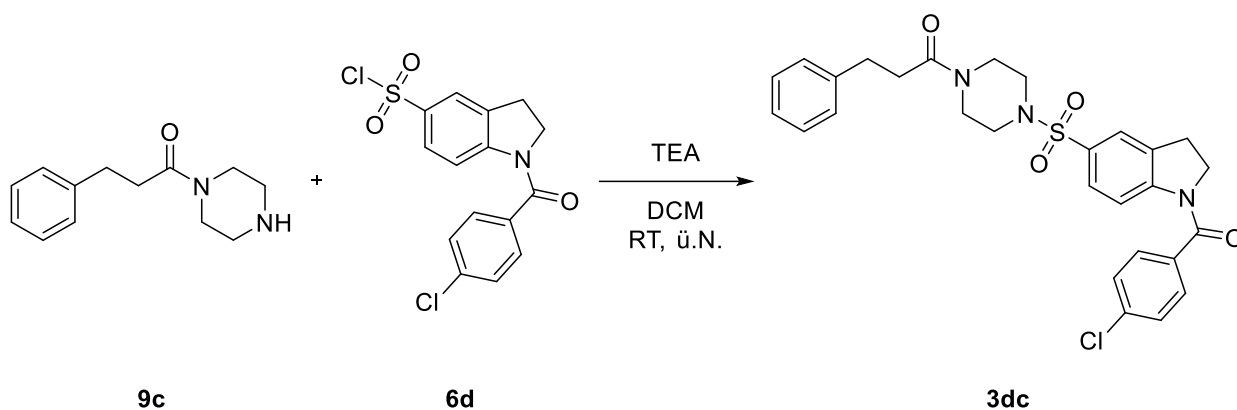
LC/MS (ESI +): $m/z = 524,3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{ClN}_3\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 524,14053$; 526,13758

gefunden: $m/z = 524,14059$; 526,13785

Inhibitor 3dc



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6d** (20,00 mg; 56,14 μmol), **9c** (15,00 mg; 68,71 μmol) und TEA (14,60 mg; 20,00 μl ; 144,28 μmol) durchgeföhrt.

Ausbeute: 15,20 mg (28,25 μmmol) \rightarrow 50 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 7,96 (bs, 1H); 7,59 – 7,48 (m, 6H); 7,24 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H); 7,17 (dd, $J = 10,8$; 4,5 Hz, 3H); 4,19 (t, $J = 8,3$ Hz, 2H); 3,74 - 3,72 (m, 2H); 3,42 - 3,44 (m, 2H); 3,25 (t, $J = 8,4$ Hz, 2H); 2,99 – 2,89 (m, 4H); 2,76 - 278 (m, 2H); 2,66 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (126 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 172,72; 169,39; 147,13; 140,39; 137,87; 134,31; 130,77; 129,61; 129,03; 128,82; 128,53; 126,97; 124,87; 51,64; 46,77; 46,11; 45,83; 41,81; 34,99; 32,10; 28,27; 8,93.

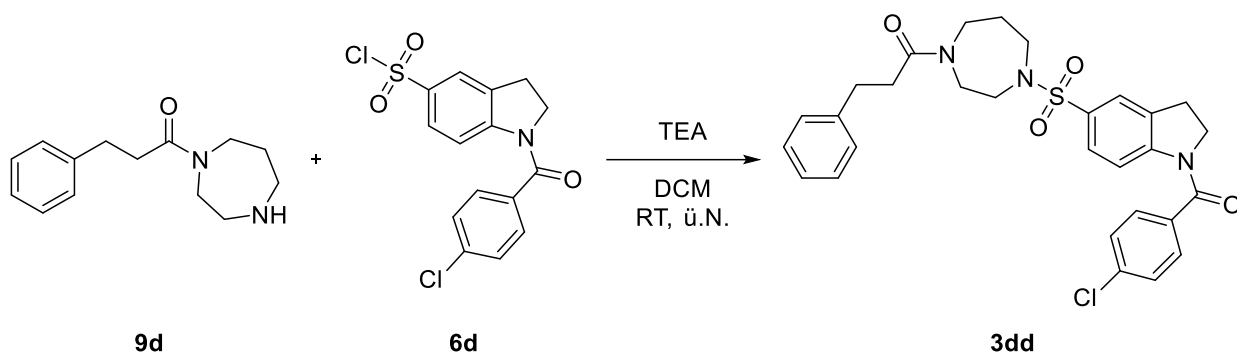
LC/MS (ESI +): $m/z = 538,4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{ClN}_3\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 538,15618$; 540,15323

gefunden: $m/z = 538,15645$; 540,15373

Inhibitor 3dd



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6d** (20,00 mg; 56,14 μmol), **9d** (18,00 mg; 77,48 μmol) und TEA (25,55 mg; 35,00 μl ; 252,50 μmol) durchgeführt.

Ausbeute: 17,80 mg (23,24 μmmol) \rightarrow 57 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 7,86 (bs, 1H); 7,64 – 7,56 (m, 2H); 7,53 (dd, $J = 8,5; 2,2$ Hz, 2H); 7,48 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H); 7,27 (dd, $J = 7,5; 2,5$ Hz, 2H); 7,24 – 7,17 (m, 3H); 4,15 (t, $J = 8,3$ Hz, 2H); 3,70 - 3,98 (m, 2H); 3,54 (dd, $J = 14,1; 7,7$ Hz, 2H); 3,37 – 3,05 (m, 6H); 2,97 (dd, $J = 14,5; 7,1$ Hz, 2H); 2,60 (dd, $J = 14,4; 7,0$ Hz, 2H); 1,94 - 1,90 (m, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (176 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 171,96; 141,29; 141,22; 129,19; 128,79; 128,57; 127,25; 126,35; 126,30; 50,42; 49,89; 49,77; 48,37; 48,02; 47,22; 46,75; 44,80; 35,22; 34,83; 31,48; 31,43; 28,93; 27,61.

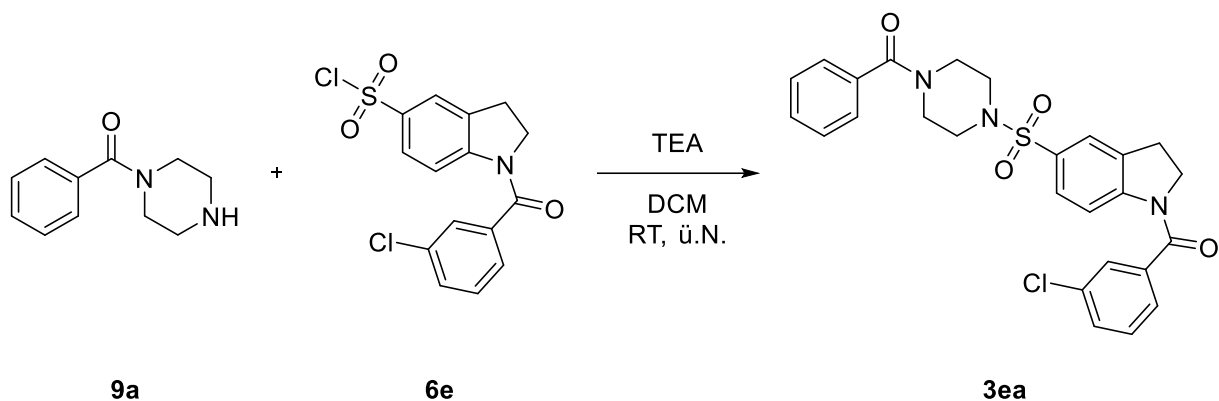
LC/MS (ESI +): $m/z = 552,3; 554,2$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{29}\text{H}_{30}\text{ClN}_3\text{O}_4\text{S}$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$

berechnet: $m/z = 552,17183; 554,16888$

gefunden: $m/z = 552,17240; 554,16967$

Inhibitor 3ea



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6e** (20,00 mg; 56,14 μmol), **9a** (19,00 mg; 99,87 μmol) und TEA (14,60 mg; 20,00 μl ; 144,28 μmol) durchgeführt.

Ausbeute: 14,60 mg (28,63 μmmol) \rightarrow 51 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 7,50 - 7,47 (m, 3H); 7,45 - 7,42 (m, 1H); 7,40 - 7,30 (m, 6H); 7,27 - 7,23 (m, 2H); 4,08 (t, $J = 8,4$ Hz, 2H); 3,79 (s, 2H); 3,53 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H); 3,16 (t, $J = 8,4$ Hz, 2H); 2,97 (d, $J = 15,3$ Hz, 4H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (126 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 171,04; 168,17; 146,83; 137,59; 134,97; 134,16, 133,73; 131,11; 130,52; 130,27; 129,85; 128,74; 128,21; 127,26; 127,10; 125,14; 124,46; 122,07; 122,04; 70,53; 69,35; 63,06; 51,17; 47,20; 46,21; 31,71; 30,94; 29,57; 27,89; 26,48; 25,44; 22,69; 22,62.

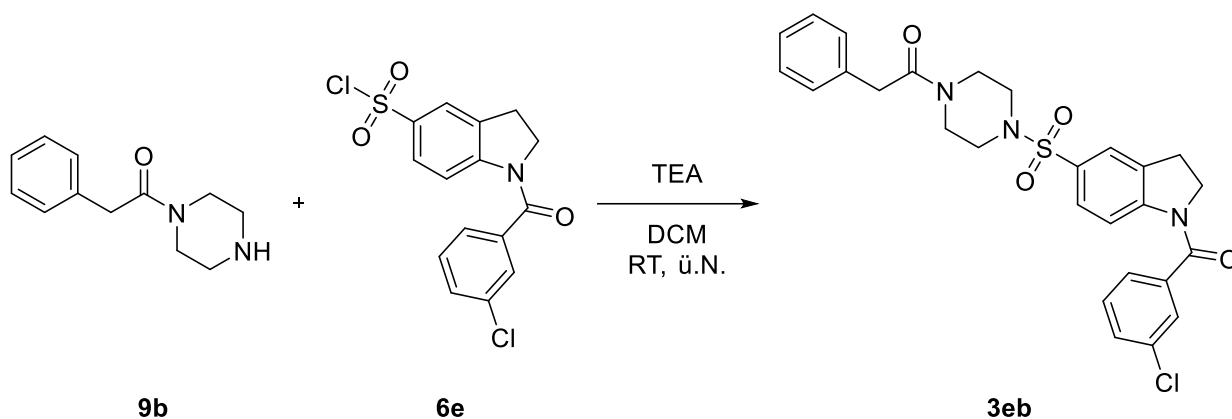
LC/MS (ESI +): $m/z = 510,3; 512,0$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 510,12488; 512,12193$

gefunden: $m/z = 510,12483; 512,12195$

Inhibitor 3eb



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6e** (20,00 mg; 56,14 μmol), **9b** (15,00 mg; 73,43 μmol) und TEA (14,60 mg; 20,00 μl ; 144,28 μmol) durchgeführt.

Ausbeute: 8,90 mg (16,98 μmmol) \rightarrow 30 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 7,49 (s, 1H); 7,48 – 7,32 (m, 6H); 7,22 – 7,19 (m, 2H); 7,18 – 7,15 (m, 1H); 7,07 (d, $J = 6,5$ Hz, 2H); 4,08 (t, $J = 8,4$ Hz, 2H); 3,66 (d, $J = 9,6$ Hz, 4H); 3,49 - 3,45 (m, 2H); 3,14 (t, $J = 8,4$ Hz, 2H); 2,89 – 2,91 (m, 2H); 2,72 -2,74 (m, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (126 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 170,63; 137,52; 135,00; 133,80; 131,12; 130,39; 130,26; 128,98; 128,42; 128,11; 127,26; 127,23; 125,10; 124,40; 45,79; 45,69; 41,52; 40,71; 27,86.

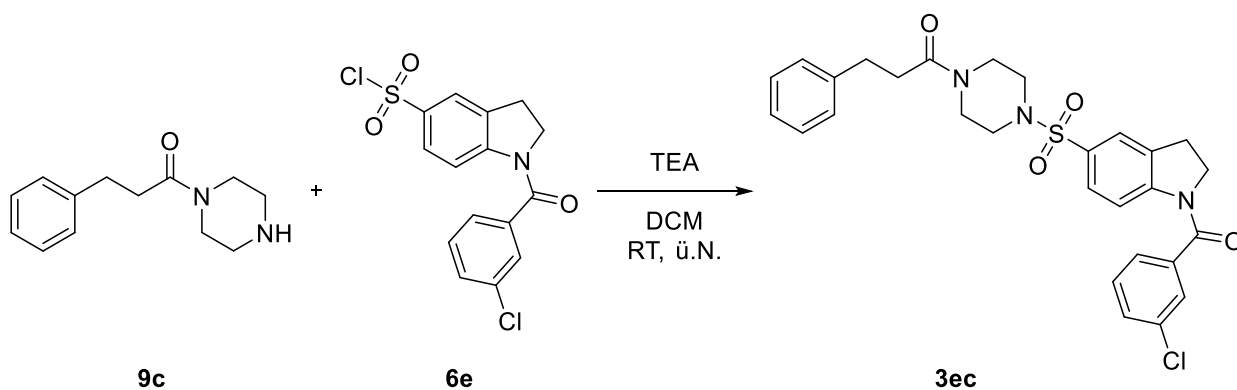
LC/MS (ESI +): $m/z = 524,3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{ClN}_3\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 524,14053$; 526,13758

gefunden: $m/z = 524,14073$; 526,13808

Inhibitor 3ec



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6e** (20,00 mg; 56,14 μmol), **9c** (15,00 mg; 68,71 μmol) und TEA (14,60 mg; 20,00 μl ; 144,28 μmol) durchgeführt.

Ausbeute: 20,00 mg (73,17 μmmol) \rightarrow 66 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 7,95 (bs, 1H); 7,58 – 7,43 (m, 6H); 7,23 (d, $J = 7,3$ Hz, 2H); 7,19 - 7,15 (m, 3H); 4,18 (t, $J = 8,3$ Hz, 2H); 3,73 - 3,70 (m, 2H); 3,45 - 3,40 (m, 2H); 3,25 (t, $J = 8,3$ Hz, 2H); 2,95 (dd, $J = 15,3; 7,6$ Hz, 4H); 2,79 ($J = 8,4$ Hz, 2H); 2,64 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (126 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 171,86; 168,17; 146,72; 140,25; 137,53; 134,99; 131,12; 130,41; 130,25; 128,59; 128,43; 128,17; 127,24; 126,48; 125,11; 124,44; 51,11; 45,82; 45,77; 45,31; 41,29; 34,67; 31,63; 27,85.

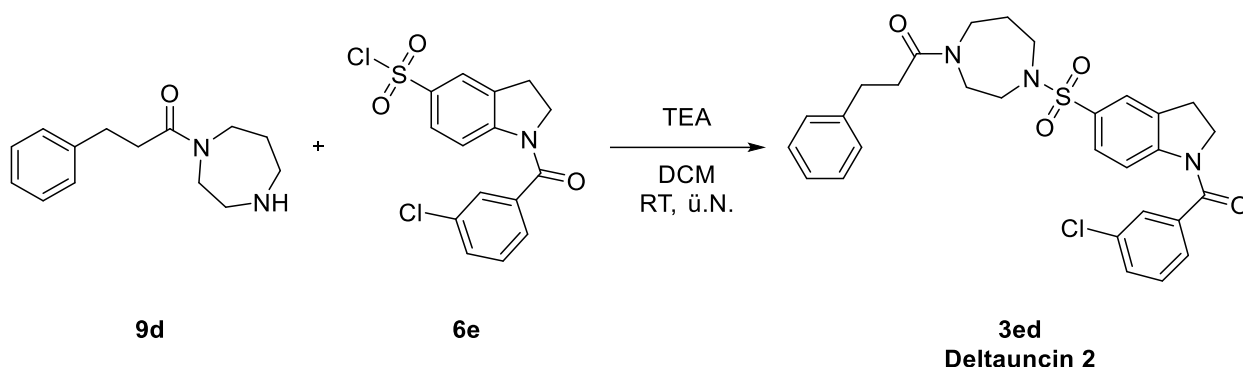
LC/MS (ESI +): $m/z = 538,4; 540,2$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$

berechnet: $m/z = 538,15618; 540,15323$

gefunden: $m/z = 538,15626; 540,15358$

Inhibitor 3ed, Deltauncin 2



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6e** (20,00 mg; 56,14 μmol), **9d** (18,00 mg; 77,48 μmol) und TEA (25,55 mg; 35,00 μl ; 252,50 μmol) durchgeführt.

Ausbeute: 21,50 mg (38,94 μmmol) \rightarrow 69 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 8,00 (bs, 1H); 7,65 – 7,54 (m, 3H); 7,53 – 7,49 (m, 1H); 7,47 – 7,43 (m, 2H); 7,27 (dd, $J = 7,7; 2,5$ Hz, 2H); 7,22 – 7,16 (m, 3H); 4,15 (t, $J = 8,2$ Hz, 2H); 3,71 – 3,69 (m, 2H); 3,57 – 3,52 (m, 2H); 3,31 – 3,29 (m, 1H); 3,27 – 3,14 (m, 4H); 3,13 (t, $J = 6,0$ Hz, 1H); 2,97 (dd, $J = 14,8; 7,1$ Hz, 2H), 2,60 (qui, $J = 5,5$ Hz, 2H); 1,99 – 1,86 (m, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (126 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 171,97; 135,01; 134,35; 131,08; 130,31; 128,63; 128,58; 127,37; 127,31; 127,28; 126,37; 126,32; 125,25; 123,86; 123,80; 51,20; 50,45; 49,94; 49,81; 48,40; 48,06; 47,24; 46,79; 44,83; 35,25; 34,85; 31,51; 31,46; 28,95; 27,98; 27,64.

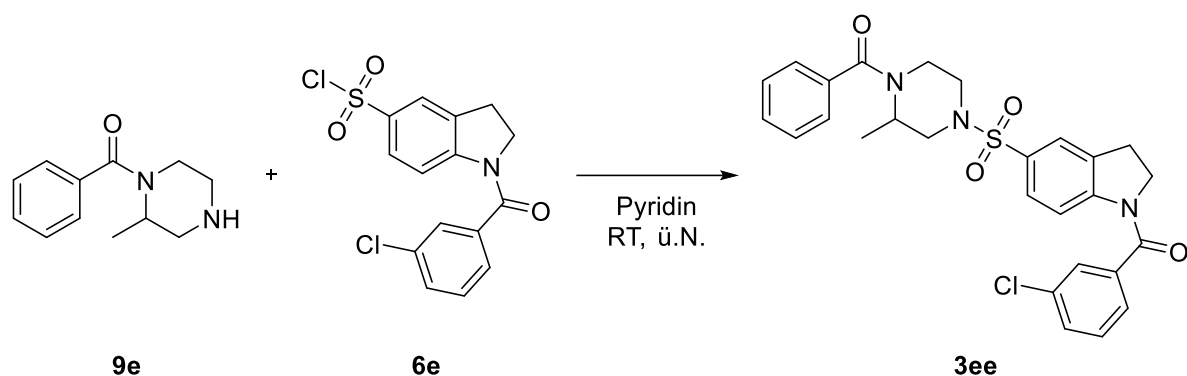
LC/MS (ESI +): $m/z = 552,3; 554,2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{29}\text{H}_{30}\text{ClN}_3\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 552,17183; 554,1688$

gefunden: $m/z = 552,17244; 554,16969$

Inhibitor 3ee



Allgemeine Vorschrift VIb wurde mit **6e** (25,00 mg; 70,18 μmol) und **9e** (14,00 mg; 68,54 μmol) durchgeführt.

Ausbeute: 5,90 mg (11,26 μmmol) \rightarrow 16 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, Aceton- d_6):

δ [ppm] = 8,13 (s, 1H); 7,70 (s, 1H); 7,67 – 7,56 (m, 5H); 7,47 – 7,41 (m, 3H); 7,37 (dd, $J = 7,7$; 1,6 Hz, 2H); 4,21 (t, $J = 8,5$ Hz, 2H); 3,74 (d, $J = 10,3$ Hz, 1H); 3,59 (d, $J = 11,5$ Hz, 1H); 3,39 – 3,26 (m, 5H); 2,51 (dd, $J = 11,6$; 3,5 Hz, 1H); 2,36 (td, $J = 11,8$; 3,3 Hz, 1H); 1,38 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H).

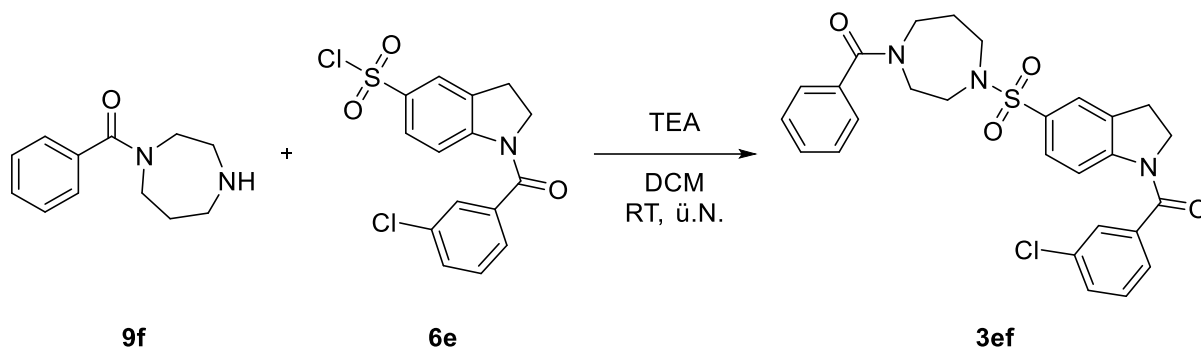
LC/MS (ESI +): $m/z = 524,2$; 526,1 [M+H] $^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{ClN}_3\text{O}_4\text{S}$ [M+H] $^+$

berechnet: $m/z = 524,114053$; 526,16758

gefunden: $m/z = 524,14525$; 526,13971

Inhibitor 3ef



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6e** (35,00 mg; 98,25 μmol), **9f** (20,00 mg; 97,91 μmol) und TEA (36,50 mg; 50,00 μl ; 360,71 μmol) durchgeführt.

Ausbeute: 1,40 mg (2,67 μmmol) \rightarrow 3 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, Aceton- d_6):

δ [ppm] = 8,09 (s, 1H); 7,84 – 7,65 (m, 3H); 7,65 – 7,56 (m, 3H); 7,48 – 7,31 (m, 5H); 4,24 – 4,12 (m, 2H); 3,80 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H); 3,50 (dd, $J = 5,1; 2,4$ Hz, 5H); 3,35 (s, 1H); 3,28 – 3,22 (m, 4H).

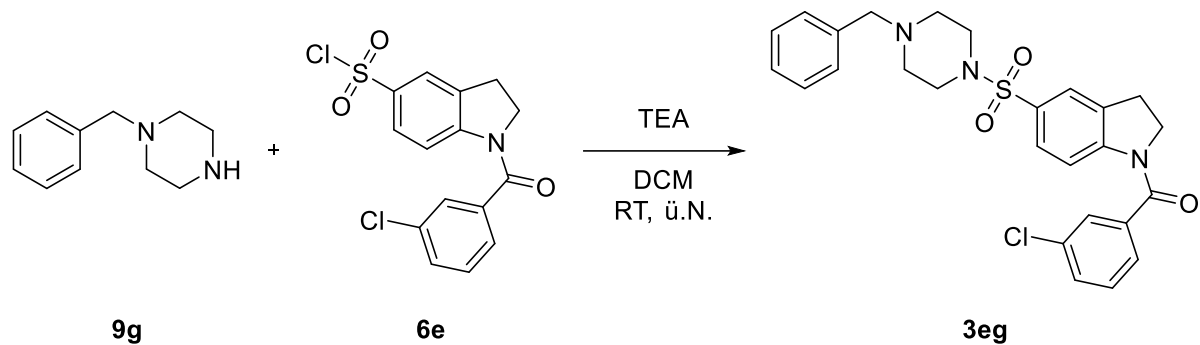
LC/MS (ESI +): $m/z = 524,2; 525,9$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{ClN}_3\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 524,14053; 526,13758$

gefunden: $m/z = 524,14184; 526,13911$

Inhibitor 3eg



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6e** (25,00 mg; 70,18 μmol), **9g** (12,00 mg; 68,08 μmol) und TEA (36,50 mg; 50,00 μl ; 360,71 μmol) durchgeführt.

Ausbeute: 16,70 mg (33,67 μmmol) \rightarrow 49 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, Aceton- d_6):

δ [ppm] = 8,24 – 7,95 (m, 1H); 7,67 – 7,55 (m, 8H); 7,48 – 7,43 (m, 3H); 4,46 (s, 2H); 4,18 (t, $J = 8,5$ Hz, 2H); 4,15 – 3,66 (m, 1H); 3,62 – 3,31 (m, 6H); 3,26 (t, $J = 8,3$ Hz, 2H); 3,22 – 2,87 (m, 1H).

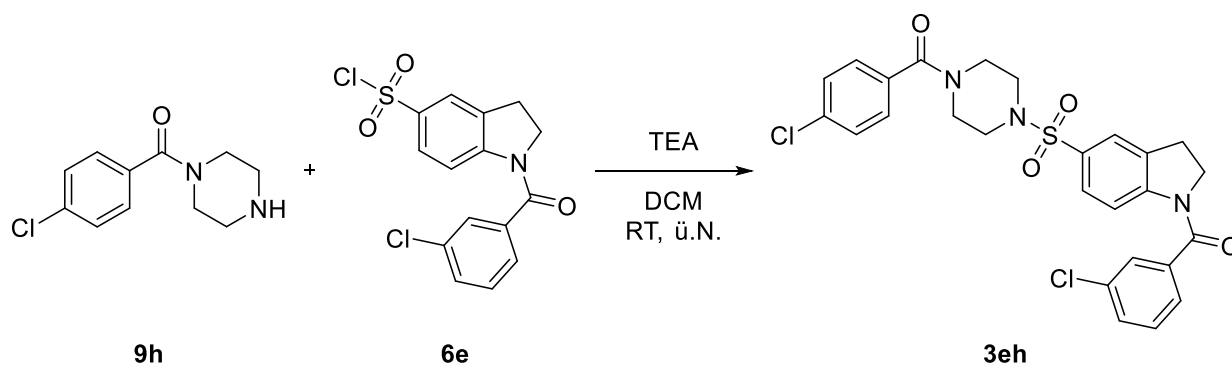
LC/MS (ESI +): $m/z = 496,1; 498,0$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{ClN}_3\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 496,14562; 498,14267$

gefunden: $m/z = 496,14757; 498,14441$

Inhibitor 3eh



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6e** (25,00 mg; 70,18 μmol), **9h** (15,00 mg; 66,76 μmol) und TEA (36,50 mg; 50,00 μl ; 360,71 μmol) durchgeführt. Es wurde über in PE : E 5 : 1 – 5 : 4 aufgereinigt.

Ausbeute: 21,70 mg (39,86 μmmol) \rightarrow 60 %

R_f-Wert: 0,18 (Silica, PE : E 1 : 1)

¹H-NMR: (500 MHz, Aceton-d₆):

δ [ppm] = 8,11 (bs, 1H); 7,68 – 7,54 (m, 6H); 7,50 - 7,41 (m, 2H); 4,19 (t, $J = 8,5$ Hz, 2H); 3,68 (bs, 4H); 3,28 (t, $J = 8,5$ Hz, 2H); 3,05 (s, 4H).

¹³C-NMR: (126 MHz, Aceton-d₆):

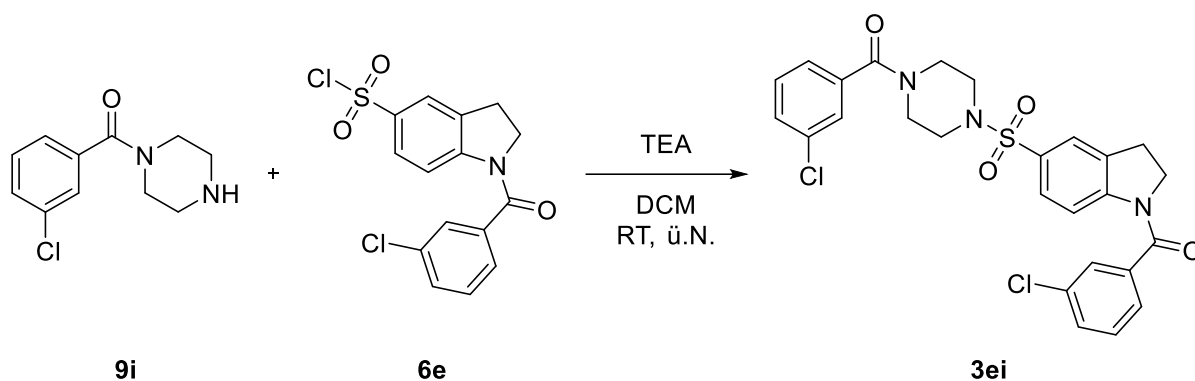
δ [ppm] = 168,75; 135,48; 134,90; 134,76; 134,39; 130,89; 130,81; 130,67; 129,50; 128,87; 128,20; 127,38; 125,84; 124,93.

HRMS (ESI +): C₂₆H₂₃Cl₂N₃O₄S [M+H]⁺

berechnet: $m/z = 544,08591; 546,08296; 548,08001$

gefunden: $m/z = 544,08693; 546,08383; 548,08043$

Inhibitor 3ei



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6e** (25,00 mg; 70,18 μmol), **9i** (15,00 mg; 66,76 μmol) und TEA (36,50 mg; 50,00 μl ; 360,71 μmol) durchgeführt. Es wurde über in PE : E 5 : 1 – 5 : 4 aufgereinigt.

Ausbeute: 10,20 mg (18,73 μmol) \rightarrow 28 %

R_f-Wert: 0,18 (Silica, PE : E 1 : 1)

¹H-NMR: (500 MHz, Aceton-d₆):

δ [ppm] = 8,14 (bs, 1H); 7,70 – 7,59 (m, 5H); 7,51 – 7,41 (m, 4H); 7,35 (tt, $J = 7,2$; 1,4 Hz, 1H); 4,22 (td, $J = 8,4$; 3,8 Hz, 2H); 3,69 (s, 4H); 3,30 (t, $J = 8,4$ Hz, 2H); 3,09 (s, 4H).

¹³C-NMR: (151 MHz, CDCl₃):

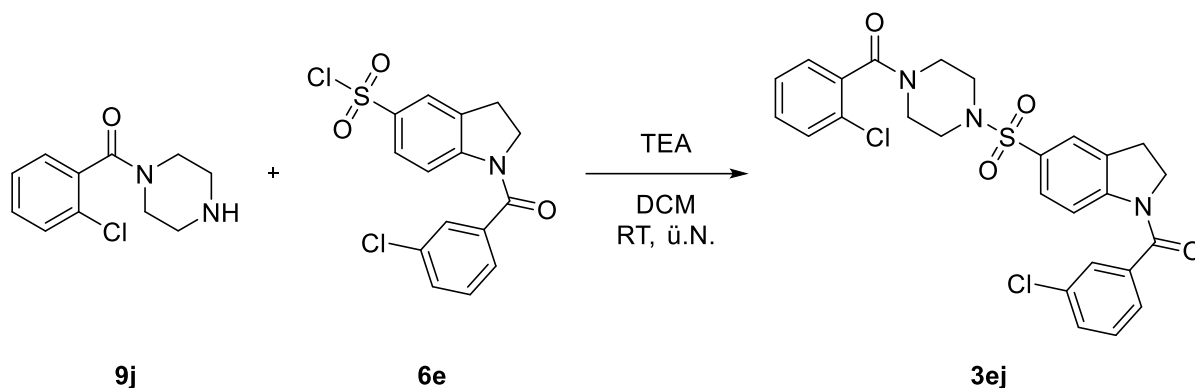
δ [ppm] = 168,98; 168,15; 147,02; 137,80; 136,63; 135,08; 134,97; 131,20; 130,51; 130,38; 130,17; 128,34; 127,48; 127,41; 125,27; 125,26; 124,58.

HRMS (ESI +): C₂₆H₂₃Cl₂N₃O₄S [M+H]⁺

berechnet: $m/z = 546,08296$; 548,08001

gefunden: $m/z = 546,08440$; 548,08092

Inhibitor 3ej



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6e** (25,00 mg; 70,18 μmol), **9j** (15,00 mg; 66,76 μmol) und TEA (36,50 mg; 50,00 μl ; 360,71 μmol) durchgeführt. Es wurde säulenchromatographisch im Lösemittelverhältnis PE : E 5 : 1–5 : 4 getrennt.

Ausbeute: 26,20 mg (48,12 μmmol) \rightarrow 72 %

R_f-Wert: 0,18 (Silica, PE : E 1 : 1)

¹H-NMR: (500 MHz, Aceton-d₆):

δ [ppm] = 8,13 (bs, 1H); 7,73 – 7,53 (m, 6H); 7,51 – 7,40 (m, 3H); 7,35 – 7,30 (m, 1H); 4,21 (t, $J = 8,5$ Hz, 2H); 3,88 (d, $J = 7,8$ Hz, 4H); 3,29 (t, $J = 8,4$ Hz, 2H); 3,09 (s, 4H).

¹³C-NMR: (126 MHz, Aceton-d₆):

δ [ppm] = 168,29; 167,83; 147,49; 139,28; 138,22; 136,17; 134,77; 134,40; 134,26; 130,92; 130,81; 130,68; 130,56; 130,01; 129,84; 128,46; 128,20; 127,82; 127,55; 127,39; 125,97; 125,85; 124,94; 116,96; 51,39; 46,69; 46,49; 46,28; 40,99.

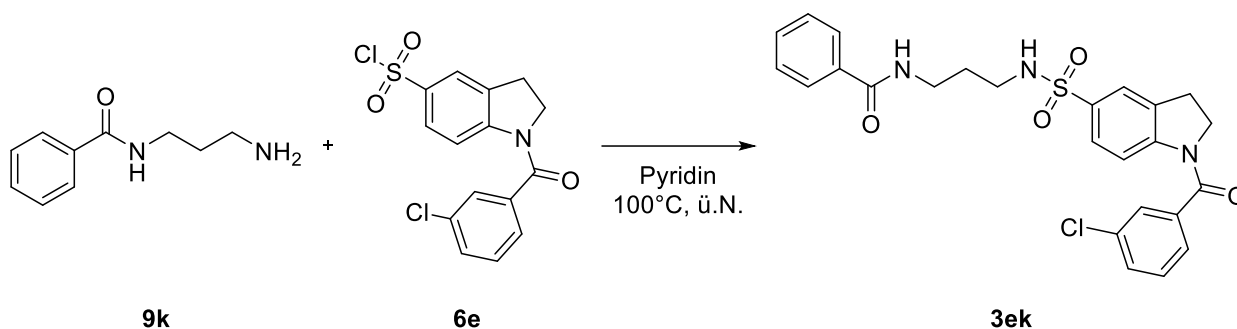
LC/MS (ESI +): $m/z = 544,22; 546,2$ [M+H]⁺

HRMS (ESI +): C₂₆H₂₃Cl₂N₃O₄S [M+H]⁺

berechnet: $m/z = 544,08591; 546,08296; 548,08001$

gefunden: $m/z = 544,08738; 546,08433; 548,08069$

Inhibitor 3ek



Allgemeine Vorschrift VIb wurde mit **6e** (25,00 mg; 70,18 μmol) und **9k** (12,00 mg; 67,33 μmol) durchgeführt.

Ausbeute: 11,40 mg (22,89 μmmol) \rightarrow 34 %

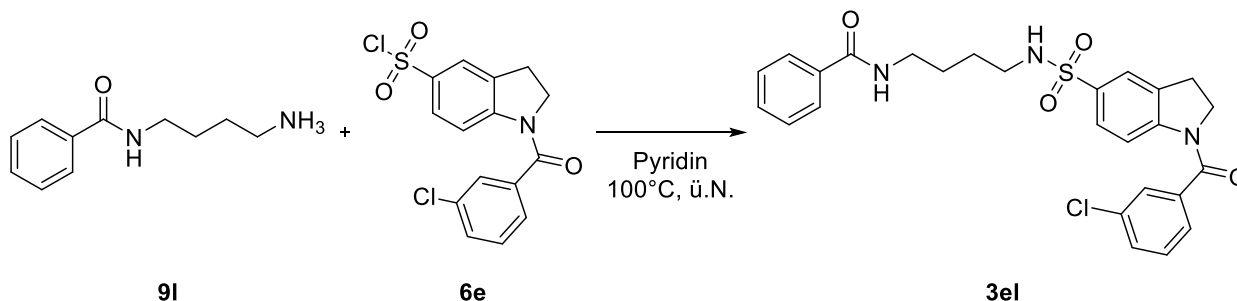
$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CD_3OD):

δ [ppm] = 8,60 (s, 1H); 7,91 – 7,88 (m, 3H); 7,68 – 7,55 (m, 4H); 7,50 (t, $J = 7,5$ Hz, 4H); 4,14 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H); 3,57 – 3,40 (m, 4H); 3,22 (t, $J = 8,3$ Hz, 1H); 2,00 – 1,90 (m, 4H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (126 MHz, CD_3OD):

δ [ppm] = 170,37; 135,63; 132,68; 129,59; 128,26; 38,35; 30,41.

Inhibitor 3el



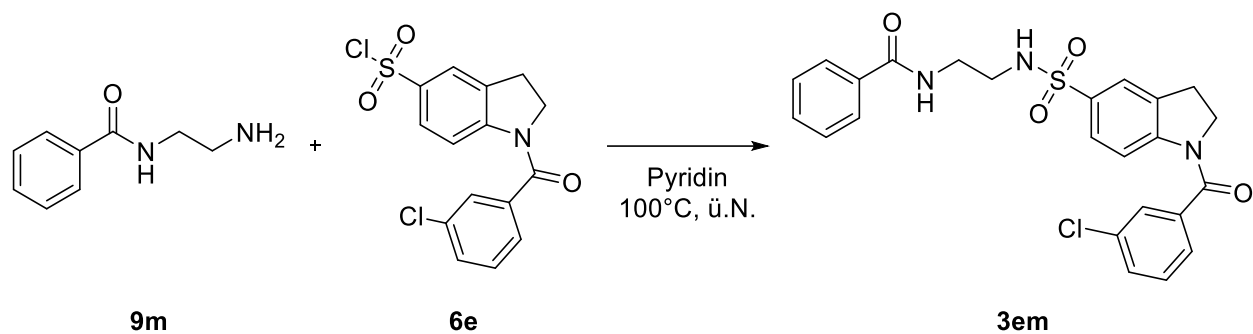
Allgemeine Vorschrift VIb wurde mit **6e** (25,00 mg; 70,18 μmol) und **9l** (13,00 mg; 67,62 μmol) durchgeführt.

Ausbeute: 30,10 mg (58,79 μmmol) \rightarrow 87 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CD_3OD):

δ [ppm] = 8,66 (bs, 1H); 8,45 (bs, 1H); 8,00 - 7,95 (m, 1H); 7,83 – 7,31 (m, 9H); 4,43 – 4,10 (m, 2H); 3,25 – 3,19 (m, 6H); 1,36 - 1,33 (m, 5H).

Inhibitor 3em



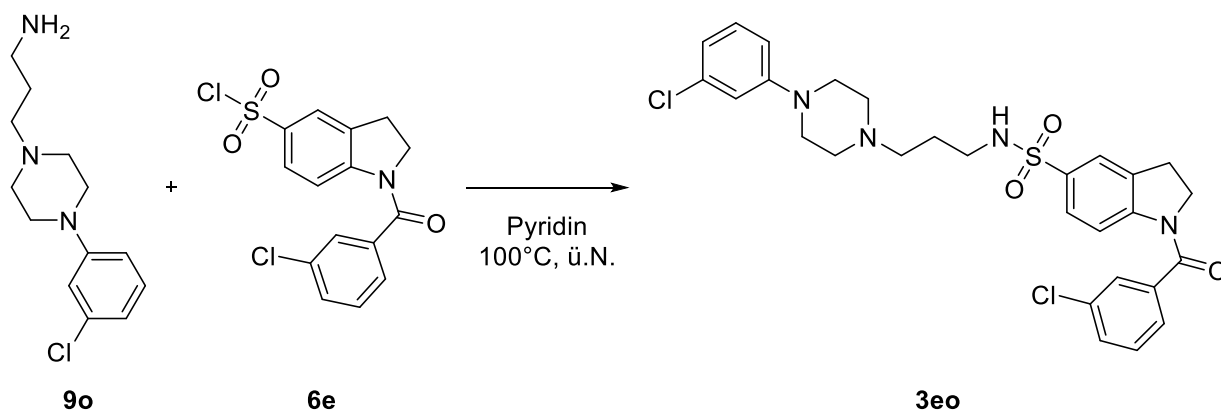
Allgemeine Vorschrift VIb wurde mit **6e** (25,00 mg; 70,18 μmol) und **9m** (11,00 mg; 66,99 μmol) durchgeführt.

Ausbeute: 5,80 mg (11,98 μmmol) \rightarrow 18 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CD_3OD):

δ [ppm] = 8,05 – 8,00 (m, 1H); 7,95 – 7,86 (m, 1H); 7,78 – 7,31 (m, 10H); 4,12 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H); 3,27 – 3,17 (m, 4H); 2,73 (s, 1H); 1,97 (s, 2H).

Inhibitor 3eo



Allgemeine Vorschrift VIb wurde mit **6e** (50,00 mg; 140,36 μmol) und **9o** (36,00 mg; 141,86 μmol) durchgeführt.

Ausbeute: 19,10 mg (33,30 μmol) \rightarrow 24 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, Aceton- d_6):

δ [ppm] = 8,32 (bd, 1H); 7,76 – 7,46 (m, 6H); 7,30 – 7,20 (m, 1H); 7,11 – 7,02 (m, 1H); 7,01 – 6,88 (m, 2H); 4,19 (sept, 2H); 3,55 – 3,52 (m, 2H); 3,36 – 3,32 (m, 2H); 3,28 – 3,23 (m, 4H); 3,15 – 3,13 (m, 2H); 1,52 – 1,46 (m, 2H); 1,42 – 1,31 (m, 2H); 0,93 – 0,90 (m, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (126 MHz, Aceton- d_6):

δ [ppm] = 151,67; 134,98; 134,57; 134,38; 130,89; 130,79; 130,74; 130,64; 61,54; 54,35; 51,53; 51,36; 48,48; 46,37; 46,13; 46,02; 39,90; 35,39; 24,27.

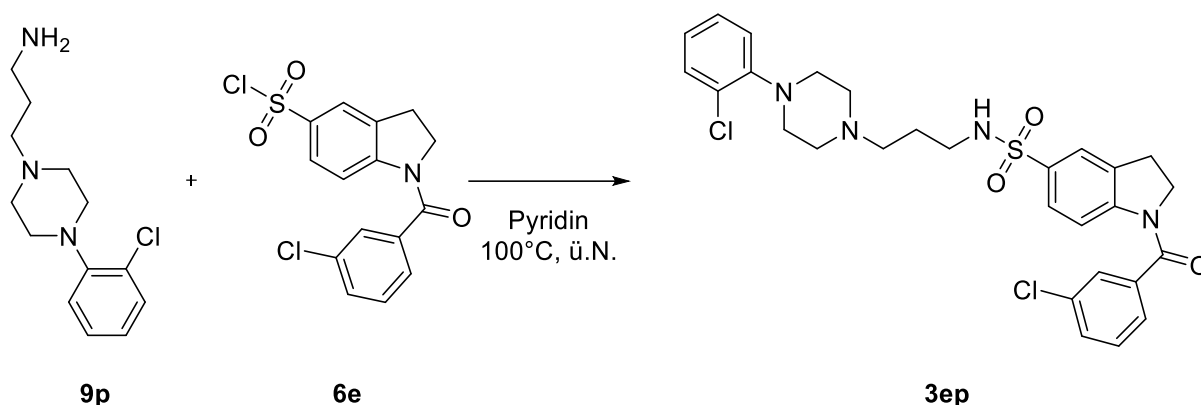
LC/MS (ESI +): $m/z = 573,36; 575,2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 573,14884; 575,14589; 577,14294$

gefunden: $m/z = 573,15009; 575,14709; 577,14364$

Inhibitor 3ep



Allgemeine Vorschrift VIb wurde mit **6e** (50,00 mg; 140,36 μmol) und **9p** (36,00 mg; 141,86 μmol) durchgeführt.

Ausbeute: 30,30 mg (52,83 μmol) \rightarrow 38 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, Aceton- d_6):

δ [ppm] = 8,02 – 7,99 (m, 1H); 7,80 – 7,69 (m, 2H); 7,67 (d, $J = 1,5$ Hz, 1H); 7,62 – 7,55 (m, 3H); 7,45 (dd, $J = 7,9; 1,3$ Hz, 1H); 7,35 (td, $J = 8,0; 1,4$ Hz, 1H); 7,22 (dd, $J = 8,0; 1,2$ Hz, 1H); 7,13 (td, $J = 7,9; 1,3$ Hz, 1H); 4,19 (t, $J = 8,4$ Hz, 2H); 3,80 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H); 3,54 (d, $J = 9,2$ Hz, 2H); 3,44 – 3,41 (m, 2H); 3,34 (t, $J = 7,3$ Hz, 4H); 3,26 (t, $J = 8,4$ Hz, 2H); 3,09 (t, $J = 6,3$ Hz, 2H); 2,15 – 2,12 (m, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (126 MHz, Aceton- d_6):

δ [ppm] = 167,72; 148,17; 146,84; 139,35; 135,93; 134,58; 134,38; 130,91; 130,78; 130,63; 128,83; 128,54; 127,31; 125,85; 125,32; 124,14; 121,40; 109,98; 54,41; 52,36; 51,36; 48,39; 46,32; 40,48; 27,99; 24,30.

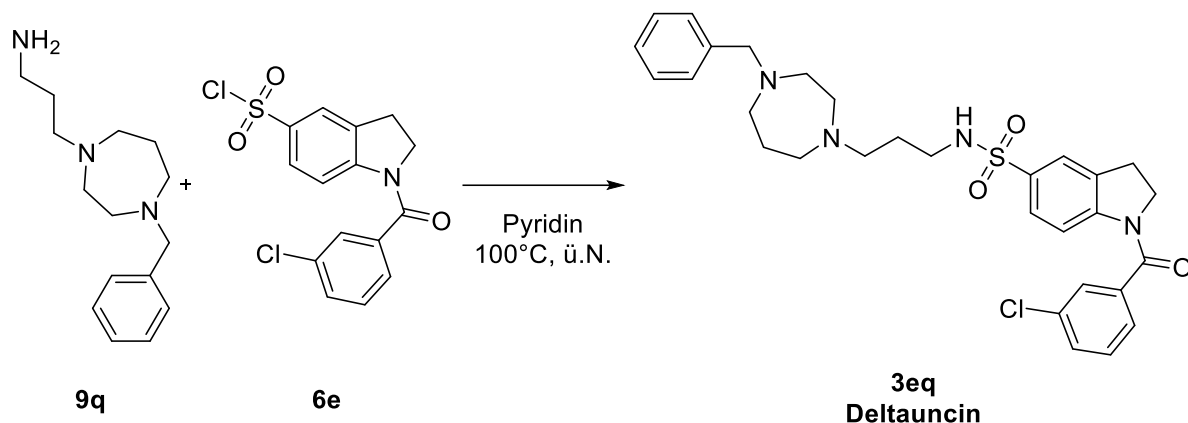
LC/MS (ESI +): $m/z = 573,4; 575,3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 573,14884; 575,14589; 577,14294$

gefunden: $m/z = 573,14980; 575,14664; 577,14369$

Inhibitor 3eq, Deltauncin



Allgemeine Vorschrift VIb wurde mit **6e** (50,00 mg; 140,36 μmol) und **9q** (35,00 mg; 141,48 μmol) durchgeführt.

Ausbeute: 16,70 mg (29,45 μmol) \rightarrow 21 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, Aceton- d_6):

δ [ppm] = 8,05 (s, 1H); 7,74 – 7,70 (m, 2H); 7,67 (s, 1H); 7,65 – 7,63 (m, 2H); 7,61 – 7,58 (m, 2H); 7,57 (s, 1H); 7,55 (dd, $J = 7,4; 2,6$ Hz, 1H); 7,45 (d, $J = 7,5$ Hz, 2H); 4,52 (s, 2H); 4,24 – 4,09 (m, 3H); 3,99 – 3,61 (m, 8H); 3,42 – 3,35 (m, 2H); 3,22 (dt, $J = 22,8; 8,3$ Hz, 3H); 3,05 (t, $J = 6,3$ Hz, 2H); 2,52 (s, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (126 MHz, Aceton- d_6):

δ [ppm] = 139,36; 139,36; 134,36; 130,76; 129,94; 129,35; 127,41; 125,51; 124,13; 60,71; 55,19; 53,20; 52,68; 40,40; 24,64.

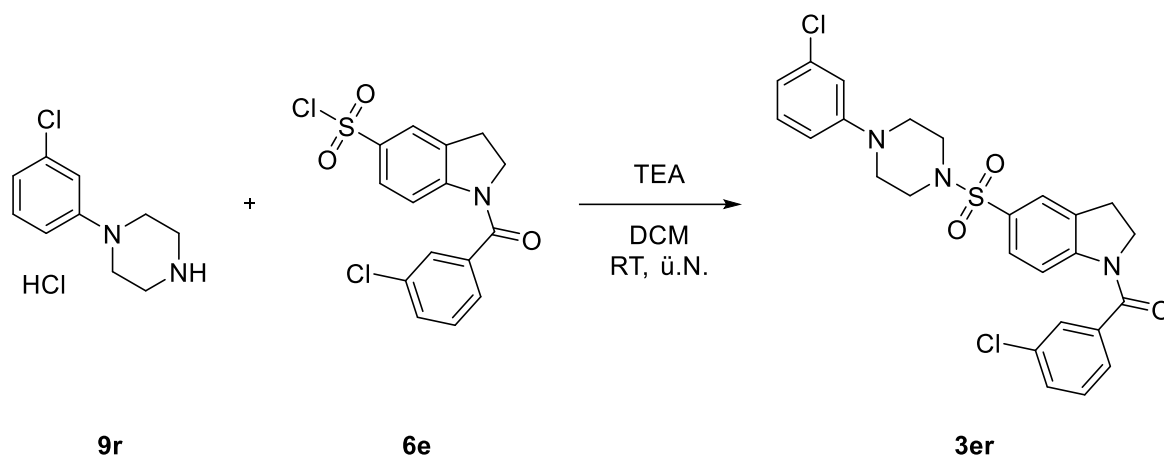
LC/MS (ESI +): $m/z = 567,4; 569,3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{30}\text{H}_{35}\text{ClN}_4\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 567,21912; 569,21617$

gefunden: $m/z = 567,21980; 569,21715$

Inhibitor 3er



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6e** (25,00 mg; 70,18 μmol), 1-(3-Chlorphenyl)piperazin Hydrochlorid **9r** (25,00 mg; 107,23 μmol) und TEA (0,15 g; 200,00 μl ; 1,44 mmol) durchgeführt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch in PE : E 5 : 1 getrennt.

Ausbeute: 28,80 mg (55,77 μmol) \rightarrow 79 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, DMSO- d_6):

δ [ppm] = 8,15 (bs, 1H); 7,70 – 7,53 (m, 6H); 7,21 (t, $J = 8,1$ Hz, 1H); 6,94 (t, $J = 2,0$ Hz, 1H); 6,88 (dd, $J = 8,4$; 1,9 Hz, 1H); 6,81 (dd, $J = 7,8$; 1,3 Hz, 1H); 4,07 (t, $J = 8,4$ Hz, 2H); 3,30 – 3,27 (m, 4H); 3,19 (t, $J = 8,5$ Hz, 2H); 3,00 – 2,98 (m, 4H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (151 MHz, CD $_3$ OD):

δ [ppm] = 161,91; 161,45; 129,52; 129,38; 64,53; 61,91; 58,50; 45,93; 33,49; 31,67; 29,37; 29,08; 28,76; 26,75; 24,62; 22,33; 13,06.

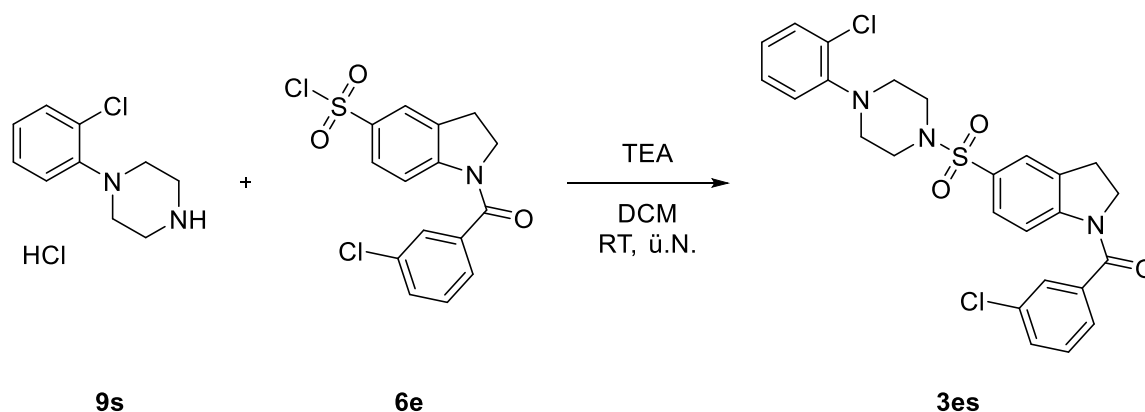
LC/MS (ESI +): $m/z = 516,2$; 518,2 [M+H] $^+$

HRMS (ESI +): C $_{25}$ H $_{23}$ Cl $_2$ N $_3$ O $_3$ S [M+H] $^+$

berechnet: $m/z = 516,09099$; 518,08804; 520,08509

gefunden: $m/z = 516,09283$; 518,08930; 520,08627

Inhibitor 3es



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6e** (25,00 mg; 70,18 μmol), 1-(2-Chlorphenyl)piperazin Hydrochlorid **9s** (25,00 mg; 107,23 μmol) und TEA (0,15 g; 200,00 μl ; 1,44 mmol) durchgef\u00fchrt. Das Rohprodukt wurde s\u00e4ulenchromatographisch in PE : E 5 : 1 getrennt.

Ausbeute: 28,50 mg (55,19 μmol) \rightarrow 79 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, Aceton- d_6):

δ [ppm] = 8,17 (s, 1H); 7,71 – 7,70 (m, 3H); 7,65 – 7,55 (m, 3H); 7,39 (dd, $J = 7,9$; 1,4 Hz, 1H); 7,32 (td, $J = 8,0$; 1,4 Hz, 1H); 7,22 – 7,19 (m, 1H); 7,07 (td, $J = 7,8$; 1,5 Hz, 1H); 4,21 (t, $J = 8,5$ Hz, 2H); 3,31 (t, $J = 8,4$ Hz, 2H); 3,16 (dd, $J = 16,2$; 4,3 Hz, 8H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (126 MHz, Aceton- d_6):

δ [ppm] = 167,82; 149,12; 147,46; 139,37; 134,75; 134,39; 130,78; 130,63; 128,85; 128,37; 128,28; 127,40; 125,85; 124,98; 124,82; 121,46; 51,37; 50,97; 46,89; 28,01.

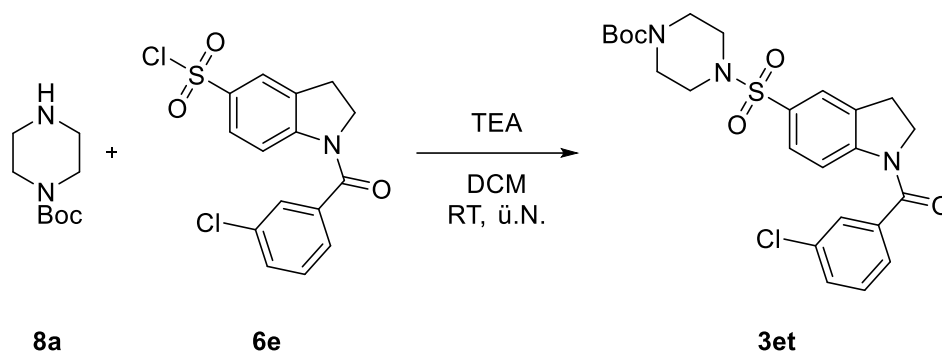
LC/MS (ESI +): $m/z = 516,38$; 518,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 516,09099$; 518,08804; 520,08509

gefunden: $m/z = m/z = 516,09261$; 518,08919; 520,08598

Inhibitor 3et



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6e** (210,00 mg; 0,54 mol), **8a** (100,00 mg; 0,59 μ mol) und TEA (0,16 mg; 0,23 ml; 1,61 mmol) durchgeführt.

Ausbeute: 237,00 mg (0,47 μ mmol) \rightarrow 87 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CD_2Cl_2):

δ [ppm] = 7,90 (bs, 1H), 7,62 – 7,42 (m, 6H); 4,14 (t, $J = 8,3$ Hz, 2H); 3,54 – 3,52 (m, 4H); 3,39 (s, 2H); 3,24 (t, $J = 8,4$ Hz, 2H); 2,98 (s, 2H); 1,48 (s, 9H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (126 MHz, CD_2Cl_2):

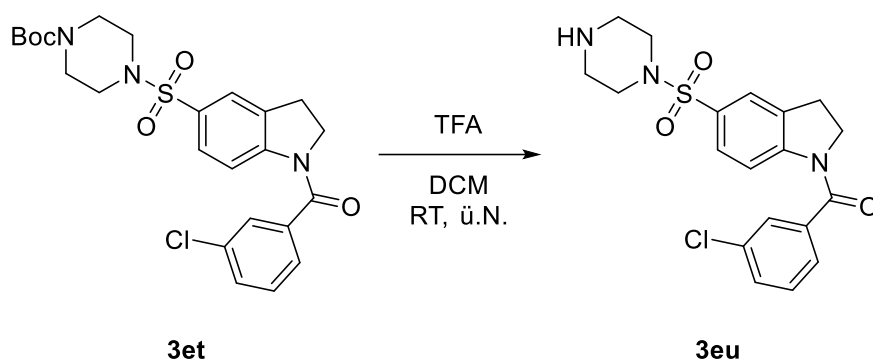
δ [ppm] = 154,34; 135,05; 131,12; 130,57; 128,36; 127,56; 125,55; 124,84; 80,33; 79,94; 46,39; 28,46; 28,38.

HRMS (ESI +): $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{ClN}_3\text{O}_5\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 506,15110; 508,14815$

gefunden: $m/z = 506,15210; 508,14859$

Inhibitor 3eu



Allgemeine Vorschrift Va wurde mit **3et** (668,00 mg; 1,32 mmol) und TFA (1,48 g; 1,00 ml; 12,98 mmol) durchgeführt.

Ausbeute: 535,00 mg (1,32 mmol) → quant.

¹H-NMR: (500 MHz, Aceton-d₆):

δ [ppm] = 8,08 (s, 1H); 7,70 – 7,46 (m, 6H); 4,19 (t, *J* = 8,5 Hz, 2H); 3,54 – 3,40 (m, 8H); 3,31 – 3,29 (m, 2H).

¹³C-NMR: (126 MHz, Aceton-d₆):

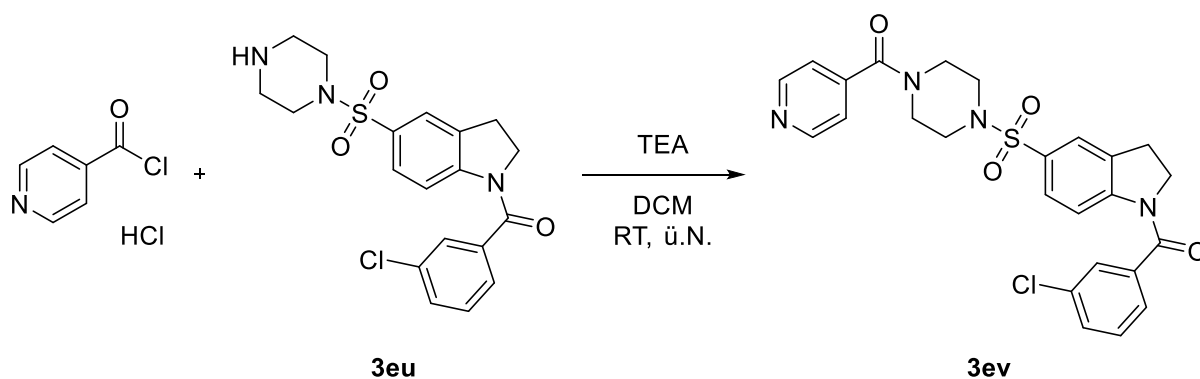
δ [ppm] = 167,77; 147,22; 139,35; 134,54; 134,39; 131,10; 130,80; 130,65; 128,15; 127,41; 125,86; 124,90; 116,79; 54,47; 51,37; 47,38; 46,45; 45,47; 45,38.

HRMS (ESI +): C₁₉H₂₀ClN₃O₃S [M+H]⁺

berechnet: m/z = 408,09572

gefunden: m/z = 408,09770

Inhibitor 3ev



Allgemeine Vorschrift Ia wurde mit Isonicotinoylchlorid Hydrochlorid (25,00 mg; 140,44 μmol), **3eu** (50,00 mg; 123,18 μmol) und TEA (219,00 mg; 300,00 μl ; 2,16 mmol) durchgeführt.

Ausbeute: 10,40 mg (20,35 μmmol) \rightarrow 17 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, Aceton- d_6):

δ [ppm] = 8,82 (bs, 2H); 8,12 (bs, 1H); 7,72 – 7,54 (m, 8H); 4,22 (t, $J = 8,5$ Hz, 2H); 3,74 (d, 4H); 3,32 – 3,28 (m, 2H); 3,15 – 3,08 (m, 4H).

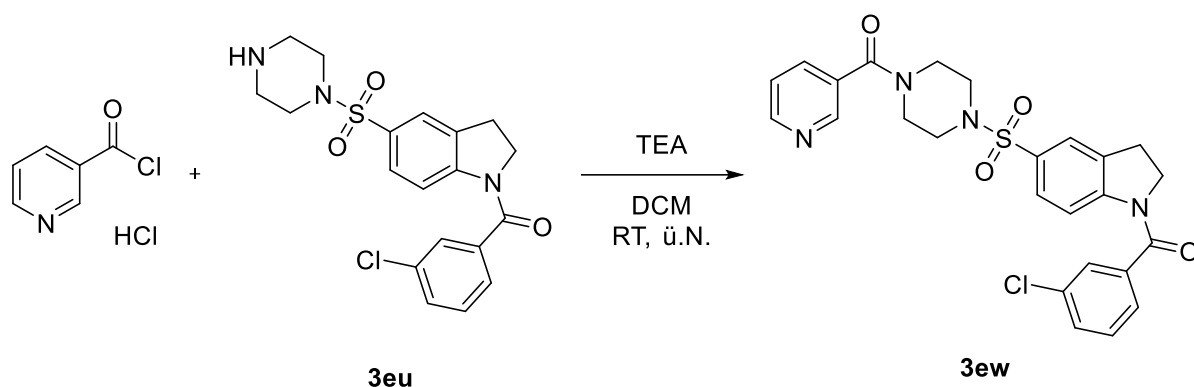
LC/MS (ESI +): $m/z = 511,4; 513,1$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{ClN}_4\text{O}_4\text{S}$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$

berechnet: $m/z = 511,12013; 513,11718$

gefunden: $m/z = 511,12007; 513,11720$

Inhibitor 3ew



Allgemeine Vorschrift Ia wurde mit Nicotinoylchlorid Hydrochlorid (25,00 mg; 140,44 μmol), **3eu** (50,00 mg; 123,18 μmol) und TEA (219,00 mg; 300,00 μl ; 2,16 mmol) durchgeführt.

Ausbeute: 10,40 mg (20,35 μmmol) \rightarrow 17 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, Aceton- d_6):

δ [ppm] = 8,68 (d, $J = 24,0$ Hz, 2H); 8,08 (bs, 1H); 7,93 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H); 7,70 – 7,44 (m, 7H); 4,16 (t, $J = 8,4$ Hz, 2H); 3,70 (d, $J = 8,7$ Hz, 4H); 3,31 – 3,21 (m, 2H); 3,07 (s, 4H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (126 MHz, Aceton- d_6):

δ [ppm] = 167,84; 147,51; 139,29; 136,54; 134,79; 134,40; 130,81; 130,68; 128,21; 127,38; 125,85; 124,94; 51,39; 46,38.

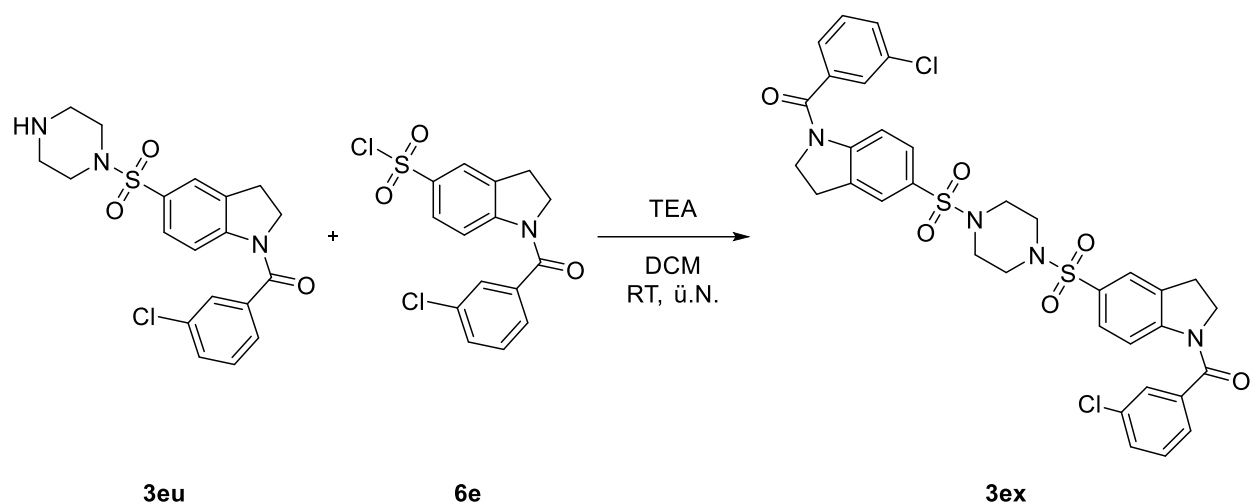
LC/MS (ESI +): $m/z = 511,4; 513,1$ [M+H] $^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{ClN}_4\text{O}_4\text{S}$ [M+H] $^+$

berechnet: $m/z = 511,12013; 513,11718$

gefunden: $m/z = 511,12007; 513,11720$

Inhibitor 3ex



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6e** (50,00 mg; 140,36 μmol), **3eu** (50,00 mg; 123,18 μmol) und TEA (219,00 mg; 300,00 μl ; 2,16 μmol) durchgeführt.

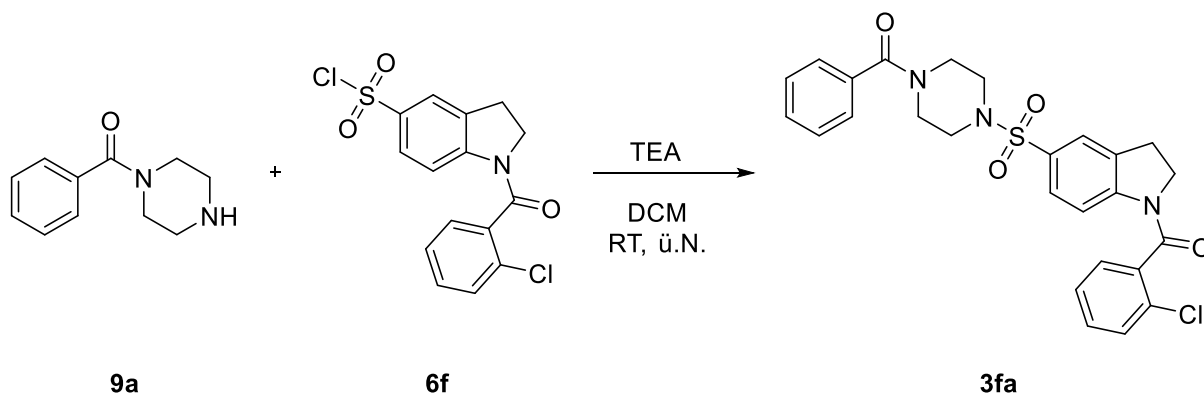
Ausbeute: 4,60 mg (6,34 μmol) \rightarrow 5 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, Aceton- d_6):

δ [ppm] = 7,98 (bs, 2H); 7,80 – 7,40 (m, 12H); 4,21 (t, $J = 8,5$ Hz, 4H); 3,50 – 3,48 (m, 5H); 3,42 (d, $J = 5,0$ Hz, 3H); 3,31 (d, $J = 8,8$ Hz, 4H).

LC/MS (ESI +): $m/z = 406,21; 408,2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

Inhibitor 3fa



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6f** (20,00 mg; 56,14 μmol), **9a** (19,00 mg; 99,87 μmol) und TEA (14,60 mg; 20,00 μl ; 144,28 μmol) durchgeführt.

Ausbeute: 12,50 mg (24,51 μmmol) \rightarrow 44 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 8,72 – 8,49 (m, 1H); 7,69 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H); 7,60 (s, 1H); 7,51 (d, $J = 6,9$ Hz, 1H); 7,45 – 7,41 (m, 6H); 7,36 (d, $J = 7,0$ Hz, 2H); 3,94 (bs, 2H); 3,73 – 3,71 (m, 2H); 3,59 (bs, 2H); 3,25 (t, $J = 8,1$ Hz, 2H); 3,08 (bs, 4H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (151 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 170,50; 166,70; 146,58; 136,31; 134,75; 133,41; 131,00; 130,24; 130,02; 128,66; 128,46; 127,58; 127,13; 124,31; 122,07; 117,36; 49,62; 47,19; 29,70; 27,74; 25,45; 22,64; 13,96; 11,80.

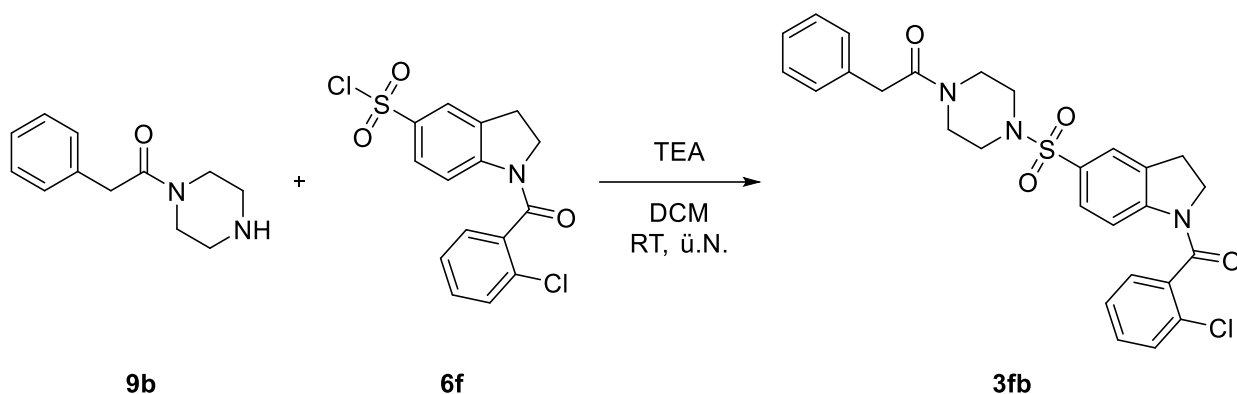
LC/MS (ESI +): $m/z = 510,3; 512,1$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{ClN}_3\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 510,12488; 512,12193$

gefunden: $m/z = 510,12507; 512,12218$

Inhibitor 3fb



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6f** (20,00 mg; 56,14 μmol), **9b** (15,00 mg; 73,43 μmol) und TEA (14,60 mg; 20,00 μl ; 144,28 μmol) durchgeführt.

Ausbeute: 11,50 mg (21,95 μmmol) \rightarrow 39 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 8,39 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H); 7,51 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H); 7,45 – 7,31 (m, 6H); 7,21 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H); 7,10 (dd, $J = 26,8$; 15,4 Hz, 3H); 3,87 (s, 1H); 3,65 (d, $J = 10,0$ Hz, 3H); 3,46 (s, 2H); 3,18 – 3,12 (m, 3H); 2,99 (s, 2H); 2,89 (d, $J = 3,3$ Hz, 2H); 2,69 (s, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (151 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 169,59; 166,66; 146,48; 136,33; 134,36; 133,25; 131,00; 130,02; 128,85; 128,51; 127,42; 127,09; 124,25; 49,61; 46,43; 45,89; 45,76; 45,49; 41,17; 40,97; 27,72; 8,70.

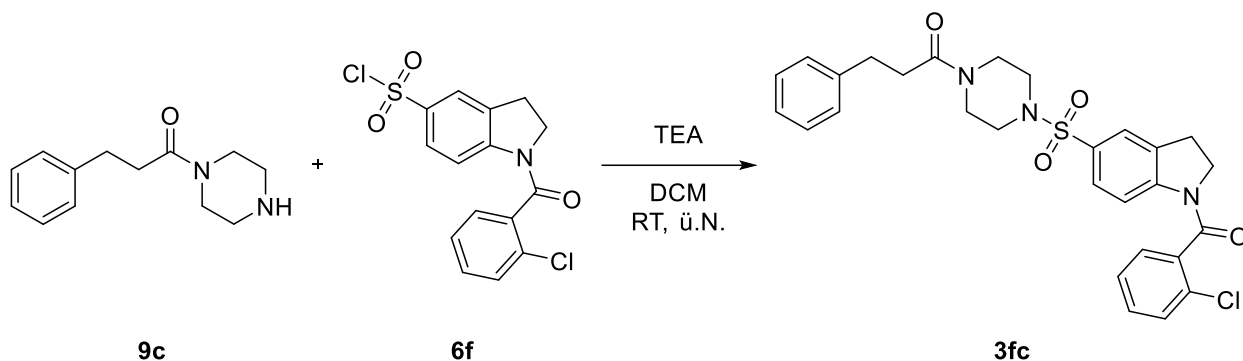
LC/MS (ESI +): $m/z = 542,3$; 526,3 $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{ClN}_3\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 524,14053$; 526,13758

gefunden: $m/z = 524,14071$; 526,13806

Inhibitor 3fc



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6f** (20,00 mg; 56,14 μmol), **9c** (15,00 mg; 68,71 μmol) und TEA (14,60 mg; 20,00 μl ; 144,28 μmol) durchgeführt.

Ausbeute: 9,20 mg (17,10 μmmol) \rightarrow 30 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 8,60 – 8,40 (m, 1H); 7,56 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H); 7,47 (s, 1H); 7,40 (d, $J = 5,8$ Hz, 1H); 7,37 – 7,29 (m, 3H); 7,14 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H); 7,07 (d, $J = 7,3$ Hz, 3H); 3,86 (s, 1H); 3,64 – 3,35 (m, 4H); 3,15 (t, $J = 7,9$ Hz, 2H); 2,86 – 2,52 (m, 9H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (126 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 171,58; 140,33; 131,05; 130,02; 128,56; 128,42; 127,87; 127,41; 126,45; 125,20; 124,25; 117,42; 49,64; 45,81; 45,25; 41,20; 34,66; 31,61; 27,73.

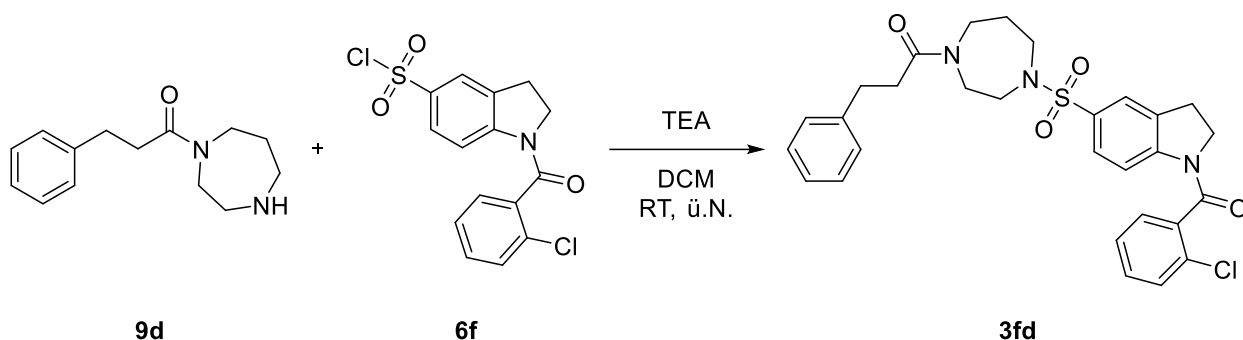
LC/MS (ESI +): $m/z = 538,4; 540,1$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{ClN}_3\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 538,15618; 540,15323$

gefunden: $m/z = 538,15631; 540,15361$

Inhibitor 3fd



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6f** (20,00 mg; 56,14 μmol), **9d** (18,00 mg; 77,48 μmol) und TEA (25,55 mg; 35,00 μl ; 252,50 μmol) durchgeführt.

Ausbeute: 23,20 mg (42,02 μmmol) \rightarrow 69 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 8,62 – 8,58 (m, 1H); 7,69 (t, $J = 7,1$ Hz, 1H); 7,62 – 7,54 (m, 1H); 7,49 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H); 7,43 - 7,34 (dd, $J = 27,8; 8,7$ Hz, 3H); 7,27 - 7,20 (m, 5H); 3,92 (bs, 1H); 3,73 – 3,62 (m, 2H); 3,54 (dd, $J = 13,2; 6,2$ Hz, 2H); 3,48 – 3,01 (m, 7H); 2,99 – 2,95 (m, 2H); 2,62 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H); 1,98 – 1,88 (m, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (151 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 172,00; 131,03; 130,07; 128,59; 128,57; 127,64; 127,50; 126,34; 126,29; 123,67; 117,39; 49,79; 49,69; 48,00; 47,24; 46,76; 44,81; 35,21; 34,83; 31,48; 28,91; 27,82; 27,60.

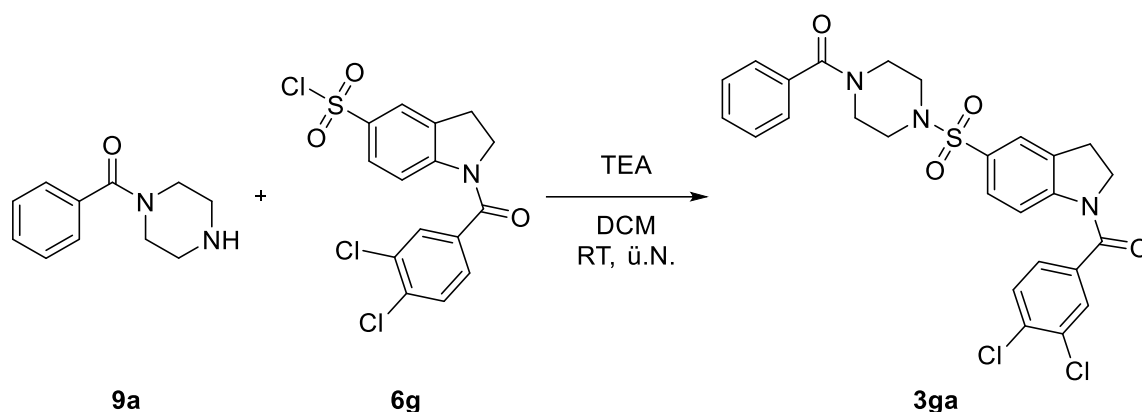
LC/MS (ESI +): $m/z = 552,3; 554,1$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{29}\text{H}_{30}\text{ClN}_3\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 552,17183; 554,16888$

gefunden: $m/z = 552,17240; 554,16963$

Inhibitor 3ga



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6g** (20,00 mg; 51,19 μmol), **9a** (19,00 mg; 99,87 μmol) und TEA (14,60 mg; 20,00 μl ; 144,28 μmol) durchgeführt.

Ausbeute: 11,60 mg (22,74 μmmol) \rightarrow 41 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 7,71 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H); 7,60 (dd, $J = 8,2$; 5,9 Hz, 3H); 7,45 (tt, $J = 14,7$; 7,2 Hz, 5H), 7,35 (d, $J = 6,8$ Hz, 2H); 4,18 (t, $J = 8,3$ Hz, 2H); 3,89 (bs, 2H); 3,59 (bs, 2H); 3,26 (t, $J = 8,2$ Hz, 2H); 3,05 (bs, 4H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (151 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 170,59; 167,20; 146,81; 135,79; 135,64; 134,87; 133,53; 131,11; 130,57; 130,40; 129,46; 128,79; 128,35; 127,32; 127,25; 126,52; 124,63; 51,33; 47,21; 46,20; 41,62; 41,12; 28,08.

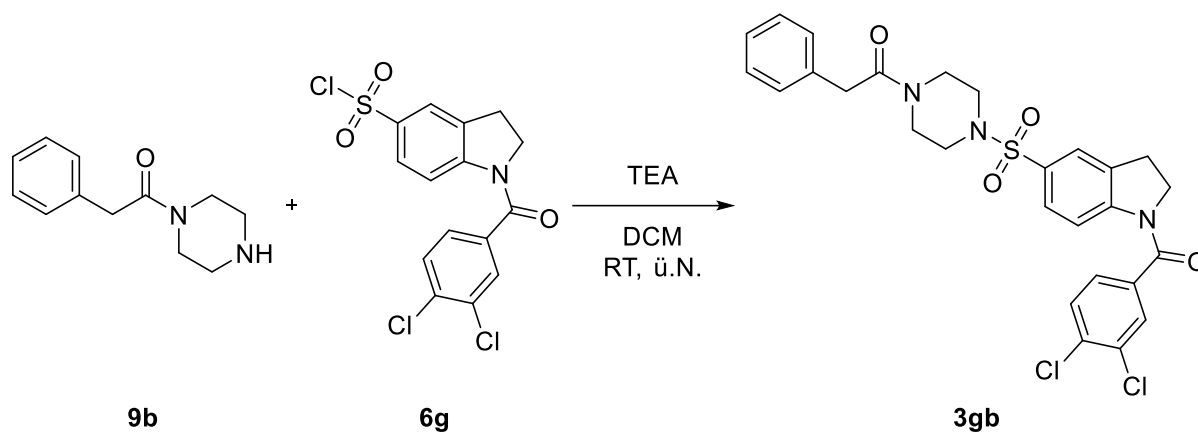
LC/MS (ESI +): $m/z = 544,2$; 546,0; 548,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 544,08591$; 546,08296; 548,08001

gefunden: $m/z = 544,08629$; 546,08320; 548,07955

Inhibitor 3gb



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6g** (20,00 mg; 51,19 μmol), **9b** (15,00 mg; 73,43 μmol) und TEA (14,60 mg; 20,00 μl ; 144,28 μmol) durchgeführt.

Ausbeute: 7,30 mg (13,07 μmmol) \rightarrow 26 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 7,71 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H); 7,63 – 7,37 (m, 5H); 7,31 (d, $J = 6,7$ Hz, 2H); 7,28 – 7,24 (m, 1H); 7,18 (d, $J = 6,8$ Hz, 2H); 4,18 (t, $J = 8,3$ Hz, 2H); 3,76 – 3,70 (m, 4H); 3,55 (s, 2H); 3,24 (t, $J = 8,3$ Hz, 2H); 2,98 (s, 2H); 2,82 (s, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (151 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 170,74; 167,17; 146,76; 140,95; 135,79; 135,63; 133,63; 133,53; 131,10; 130,59; 129,45; 128,66; 128,56; 128,34; 126,51; 126,44; 124,62; 46,13; 46,01; 45,06; 41,11; 35,00; 31,52; 28,07.

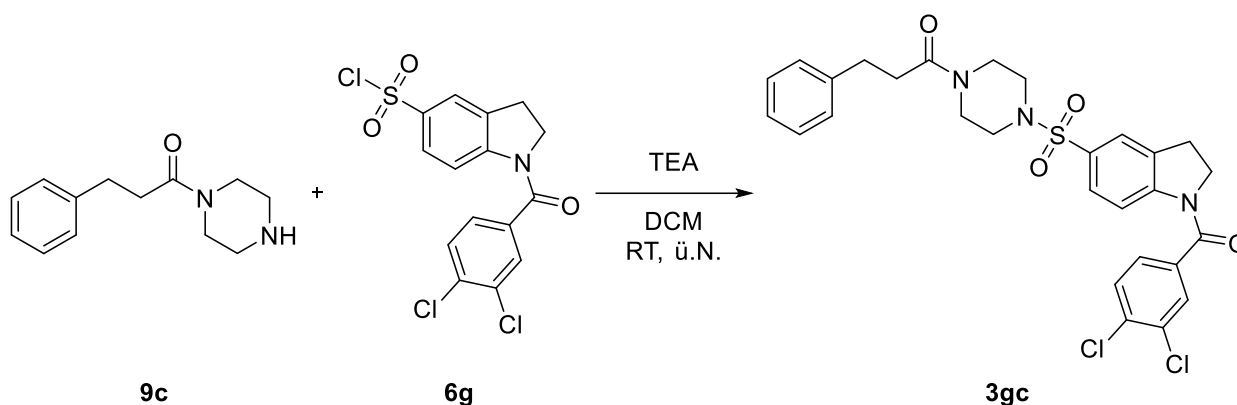
LC/MS (ESI +): $m/z = 558,3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{27}\text{H}_{25}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 558,10156$; 560,09861; 562,09566

gefunden: $m/z = 558,10206$; 560,09908; 562,09536

Inhibitor 3gc



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6g** (20,00 mg; 51,19 μmol), **9c** (15,00 mg; 68,71 μmol) und TEA (14,60 mg; 20,00 μl ; 144,28 μmol) durchgeführt.

Ausbeute: 12,60 mg (22,01 μmmol) \rightarrow 43 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 8,00 (bs, 1H); 7,70 (t, $J = 5,2$ Hz, 1H); 7,65 – 7,54 (m, 3H); 7,46 – 7,39 (m, 1H); 7,27 – 7,22 (m, 2H); 7,17 (t, $J = 5,8$ Hz, 3H); 4,18 (t, $J = 8,3$ Hz, 2H); 3,73 (s, 2H); 3,45 (s, 2H); 3,26 (t, $J = 8,2$ Hz, 2H); 2,95 (dd, $J = 15,4; 7,7$ Hz, 4H); 2,81 (s, 2H); 2,64 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (151 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 170,74; 167,17; 146,76; 140,95; 135,79; 135,63; 133,63; 133,53; 131,10; 130,59; 129,45; 128,66; 128,56; 128,34; 126,51; 126,44; 124,62; 46,13; 46,01; 45,06; 41,11; 35,00; 31,52; 28,07.

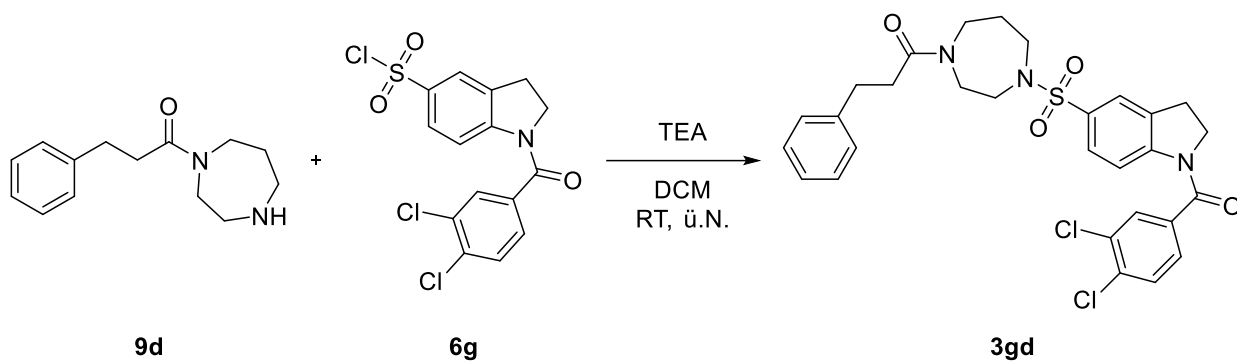
LC/MS (ESI +): $m/z = 572,2; 574,1; 576,2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{28}\text{H}_{27}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 572,11721; 574,11426; 576,11131$

gefunden: $m/z = 572,11797; 574,11482; 576,11156$

Inhibitor 3gd



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6g** (20,00 mg; 51,19 μmol), **9d** (18,00 mg; 77,48 μmol) und TEA (25,55 mg; 35,00 μl ; 252,50 μmol) durchgeführt.

Ausbeute: 30,00 mg (51,15 μmmol) \rightarrow quant.

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 7,69 - 7,58 (m, 4H); 7,44 - 7,41 (m, 1H); 7,29 (bs, 1H); 7,28 - 7,16 (m, 5H); 4,16 (t, $J = 8,2$ Hz, 2H); 3,71 (dt, $J = 12,1; 5,1$ Hz, 2H); 3,55 (dd, $J = 13,0; 6,4$ Hz, 2H); 3,31 - 3,29 (m, 1H); 3,23 (dd, $J = 14,5; 7,5$ Hz, 4H); 3,13 (t, $J = 5,9$ Hz, 1H); 2,97 (dd, $J = 15,3; 7,6$ Hz, 2H); 2,64 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H); 1,99 - 1,86 (m, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (151 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 172,02; 171,75; 167,03; 141,22; 141,15; 133,40; 131,01; 129,39; 128,60; 128,54; 126,47; 126,35; 126,29; 50,36; 49,69; 48,36; 48,00; 47,20; 46,78; 45,88; 44,81; 35,19; 34,80; 31,47; 28,92; 27,60.

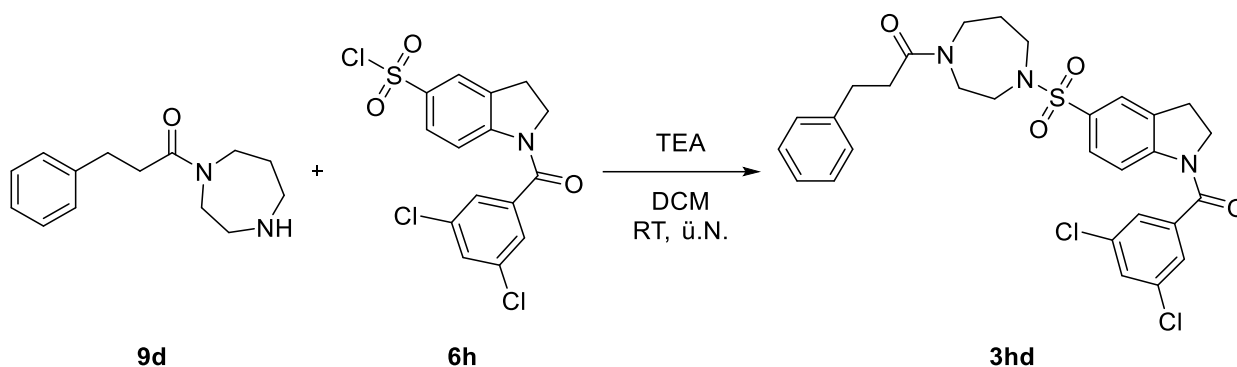
LC/MS (ESI +): $m/z = 586,2; 588,1; 590,3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{29}\text{H}_{29}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 586,13382; 588,12991; 590,12751$

gefunden: $m/z = 586,13286; 588,13066; 590,12696$

Inhibitor 3hd



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6h** (25,00 mg; 63,99 μmol), **9a** (14,00 mg; 60,26 μmol) und TEA (36,50 mg; 50,00 μl ; 360,71 μmol) durchgeführt.

Ausbeute: 17,80 mg (30,35 μmol) \rightarrow 50 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, Aceton- d_6):

δ [ppm] = 8,17 (bs, 1H); 7,70 – 7,63 (m, 5H); 7,25 (dd, $J = 8,7; 4,6$ Hz, 4H); 7,19 – 7,11 (m, 1H); 4,22 – 4,18 (m, 2H); 3,68 – 3,58 (m, 2H); 3,58 (dd, $J = 13,5; 7,0$ Hz, 2H); 3,38 – 3,26 (m, 4H); 3,23 (dt, $J = 7,7; 6,2$ Hz, 2H); 2,89 (dt, $J = 10,0; 7,8$ Hz, 2H); 2,63 (td, $J = 7,7; 5,1$ Hz, 2H), 1,89 – 1,82 (m, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (126 MHz, Aceton- d_6):

δ [ppm] = 171,58; 166,27; 146,70; 140,52; 135,42; 135,15; 134,75; 130,26; 128,84; 128,64; 127,28; 127,21; 126,25; 126,05; 124,20; 51,29; 50,16; 49,38; 49,11; 48,26; 47,33; 47,07; 46,72; 44,79; 34,73; 34,50; 31,46; 28,01.

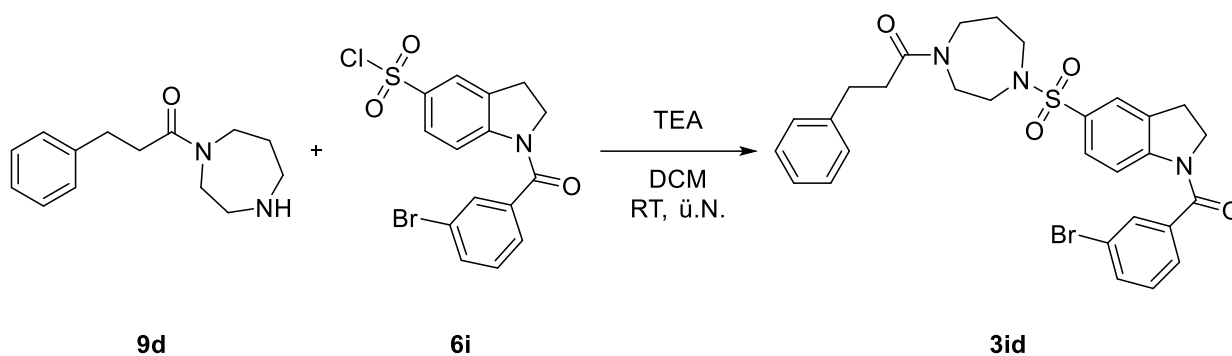
LC/MS (ESI +): $m/z = 588,1; 586,2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{29}\text{H}_{29}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 608,11480; 610,11185; 612,10890$

gefunden: $m/z = 608,11709; 610,11439; 612,11063$

Inhibitor 3id



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6i** (50,00 mg; 124,79 μ mol), **9d** (27,00 mg; 116,22 μ mol) und TEA (36,50 mg; 50,00 μ l; 360,71 μ mol) durchgeführt.

Ausbeute: 38,70 mg (64,87 μ mmol) \rightarrow 56 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, Aceton- d_6):

δ [ppm] = 8,10 (bs, 1H); 7,83 – 7,79 (m, 1H); 7,74 (dd, J = 8,0; 0,9 Hz, 1H); 7,72 – 7,62 (m, 3H); 7,50 (td, J = 7,8; 2,5 Hz, 1H); 7,25 (dd, J = 4,9; 0,5 Hz, 4H); 7,19 – 7,13 (m, 1H); 4,18 (t, J = 8,4 Hz, 2H); 3,69 – 3,64 (m, 2H); 3,60 – 3,55 (m, 2H); 3,37 – 3,20 (m, 6H); 2,89 (dd, J = 15,7; 8,1 Hz, 2H); 2,62 (td, J = 7,8; 3,4 Hz, 2H); 1,88 – 1,81 (m, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (126 MHz, Aceton- d_6):

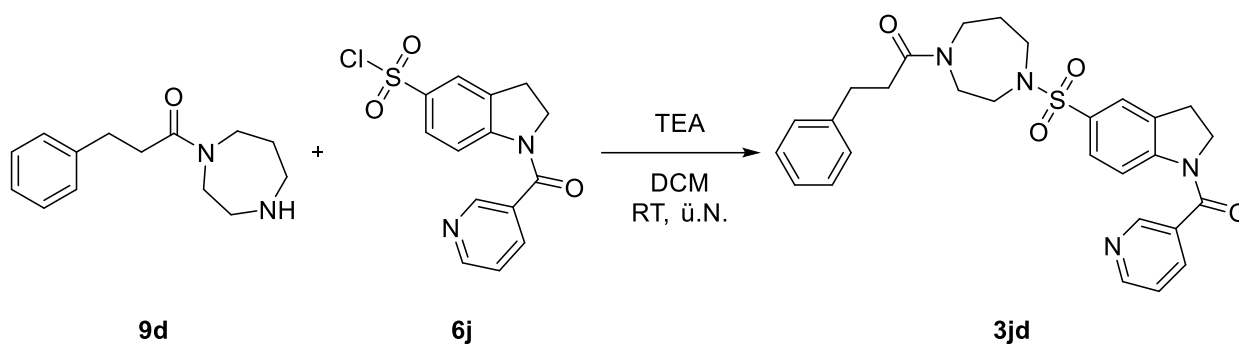
δ [ppm] = 171,27; 167,59; 146,95; 142,21; 139,54; 135,28; 133,61; 131,01; 130,29; 128,86; 128,63; 127,21; 126,21; 124,12; 122,40; 116,96; 60,05; 51,36; 50,22; 49,26; 48,27; 47,36; 47,04; 46,65; 44,73; 34,62; 31,45; 28,11; 20,35; 14,02.

HRMS (ESI +): $\text{C}_{29}\text{H}_{30}\text{BrN}_3\text{O}_4\text{S}$ [M+H] $^+$

berechnet: m/z = 618,10326; 620,10121

gefunden: m/z = 618,10478; 620,10290

Inhibitor 3jd



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6j** (25,00 mg; 77,46 μmol), **9d** (17,00 mg; 73,17 μmol) und TEA (36,50 mg; 50,00 μl ; 360,71 μmol) durchgef\u00fchrt.

Ausbeute: 1,50 mg (2,89 μmmol) \rightarrow 4 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, Aceton- d_6):

δ [ppm] = 8,87 - 8,77 (m, 2H); 8,06 (t, $J = 8,7$ Hz, 2H); 7,66 (d, $J = 13,7$ Hz, 2H); 7,58 (bs, 1H); 7,23 - 7,21 (m, 4H); 7,13 (dt, $J = 12,6$; 4,3 Hz, 1H); 4,23 - 4,19 (m, 2H); 3,65 (t, $J = 9,2$ Hz, 2H); 3,56 (dd, $J = 13,5$; 7,0 Hz, 2H); 3,35 - 3,24 (m, 8H); 3,19 (dt, $J = 10,0$; 6,0 Hz, 2H); 2,87 (dt, $J = 15,6$; 8,0 Hz, 2H); 2,61 (td, $J = 7,7$; 4,4 Hz, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (151 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 28,68; 128,63; 126,42; 49,88; 48,12; 47,28; 46,80; 41,16; 35,30; 34,90; 31,54; 31,45; 29,85; 28,98.

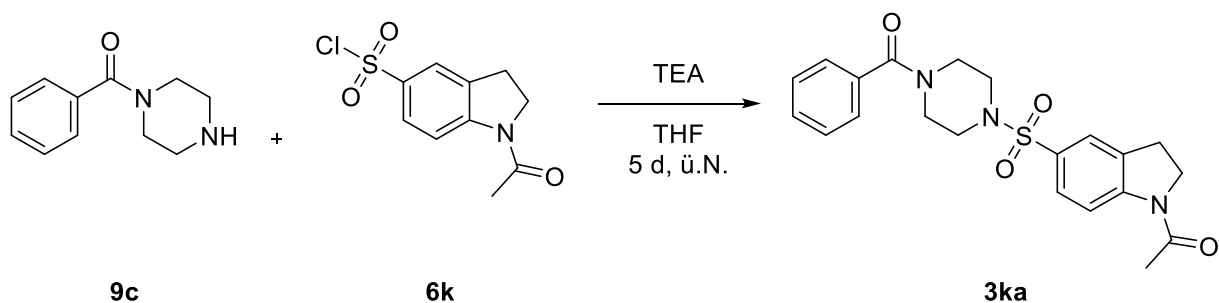
LC/MS (ESI +): $m/z = 552,3$; 554,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 552,17183$; 554,1688

gefunden: $m/z = 552,17244$; 554,16969

Inhibitor 3ka



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6k** (20,00 mg; 77,01 μmol), **9a** (19,00 mg; 99,87 μmol) und TEA (14,60 mg; 20,00 μl ; 144,28 μmol) durchgef\u00fchrt.

Ausbeute: 11,50 mg (27,81 μmmol) \rightarrow 36 %

$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 8,38 – 8,26 (m, 3H); 7,63 – 7,33 (m, 5H); 4,19 (t, $J = 8,5$ Hz, 2H); 3,89 – 3,56 (m, 4H); 3,09 – 2,95 (m, 2H); 3,02 (bd, $J = 23,2$ Hz, 4H); 2,38 – 2,30 (m, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (126 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 171,67; 158,68; 158,35; 133,45; 130,77; 128,79; 128,75; 128,45; 127,05; 127,02; 124,13; 117,34; 49,26; 30,89; 27,59; 23,92; 23,71; 8,42.

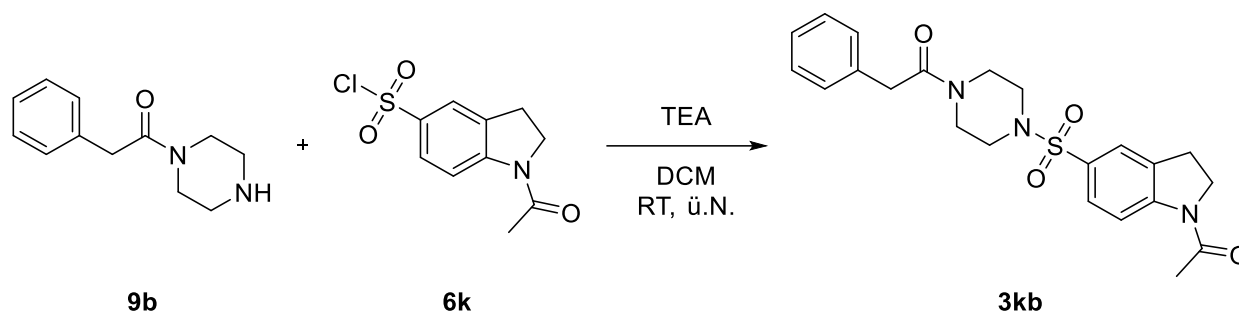
LC/MS (ESI +): $m/z = 414,3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 414,14820$

gefunden: $m/z = 414,14866$

Inhibitor 3kb



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6k** (20,00 mg; 77,01 μmol), **9b** (20,00 mg; 97,91 μmol) und TEA (14,60 mg; 20,00 μl ; 144,28 μmol) durchgeführt.

Ausbeute: 13,80 mg (32,28 μmol) \rightarrow 42 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 7,71 – 7,50 (m, 4H); 7,28 – 7,23 (m, 2H); 7,15 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H); 4,22 (t, $J = 8,5$ Hz, 2H); 3,76 (d, $J = 8,0$ Hz, 4H); 3,57 – 3,35 (m, 2H); 3,32 (t, $J = 8,2$ Hz, 2H); 2,98 (s, 4H); 2,36 (s, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (126 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 171,43; 133,98; 133,05; 130,28; 129,41; 129,34; 128,85; 128,76; 127,74; 124,50; 117,65; 116,35; 49,65; 46,12; 46,03; 42,03; 41,02; 27,98; 24,38.

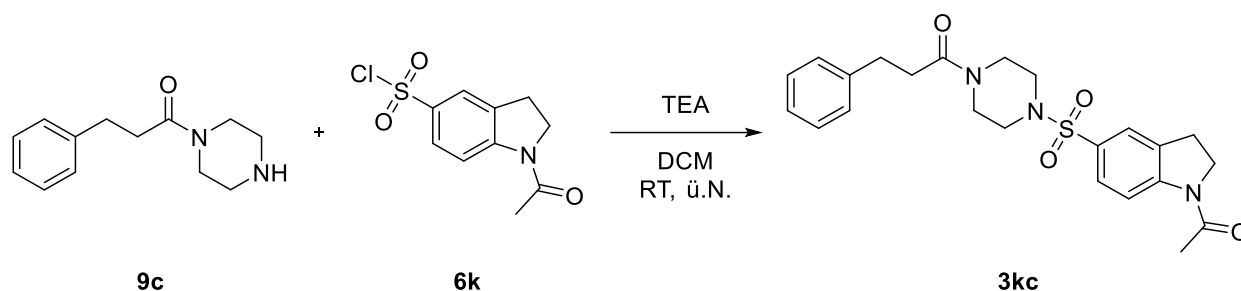
LC/MS (ESI +): $m/z = 428,3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 428,16385$

gefunden: $m/z = 428,16399$

Inhibitor 3kc



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6k** (20,00 mg; 77,01 μmol), **9c** (20,00 mg; 91,62 μmol) und TEA (25,55 mg; 35,00 μl ; 252,50 μmol) durchgeföhrt.

Ausbeute: 16,20 mg (36,99 μmmol) \rightarrow 48 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 8,37 – 8,35 (m, $J = 8,5$ Hz, 3H); 7,59 – 7,51 (m, 4H); 7,22 – 7,19 (m, 4H); 7,13 (d, $J = 7,6$ Hz, 3H); 4,21 (t, $J = 8,5$ Hz, 2H); 3,73 – 3,71 (m, 2H); 3,42 – 3,40 (m, 2H); 3,32 (t, $J = 8,3$ Hz, 2H); 2,92 (dd, $J = 14,6; 7,0$ Hz, 4H); 2,74 (s, 2H); 2,65 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H); 2,34 (d, $J = 6,2$ Hz, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (126 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 172,34; 158,96; 158,64; 139,96; 130,02; 128,60; 128,58; 128,40; 126,56; 126,49; 124,12; 117,28; 116,02; 49,26; 45,74; 45,43; 41,41; 34,54; 31,72; 27,59; 23,94.

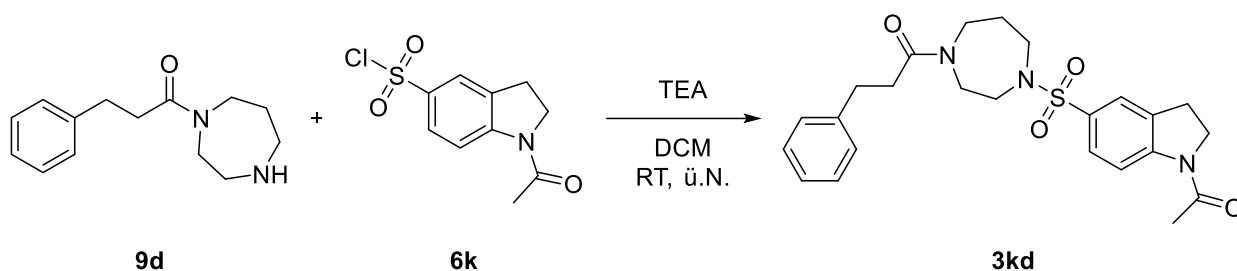
LC/MS (ESI +): $m/z = 442,3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 442,17950$

gefunden: $m/z = 442,17948$

Inhibitor 3kd



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6k** (20,00 mg; 77,01 μmol), **9d** (18,00 mg; 77,48 μmol) und TEA (25,55 mg; 35,00 μl ; 252,50 μmol) durchgeführt.

Ausbeute: 24,60 mg (54,00 μmmol) \rightarrow 70 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 8,40 (bs, 1H); 7,59 (dd, $J = 17,1$; 8,9 Hz, 2H); 7,41 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H); 7,28 – 7,24 (m, 2H); 7,19 (dd, $J = 7,1$; 5,2 Hz, 2H); 4,16 (t, $J = 8,5$ Hz, 2H); 3,74 – 3,63 (m, 2H); 3,55 – 3,49 (m, 2H); 3,31 – 3,25 (m, 3H); 3,20 (dd, $J = 12,0$; 7,2 Hz, 4H); 3,10 (t, $J = 5,9$ Hz, 1H); 2,96 (dd, $J = 15,2$; 7,4 Hz, 2H); 2,64 – 2,59 (m, 2H); 2,29 (s, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (176 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 172,01; 141,19; 128,55; 127,55; 126,33; 50,35; 49,89; 49,73; 49,23; 48,33; 47,99; 47,18; 46,78; 45,90; 44,79; 35,17; 34,79; 31,47; 28,87; 27,72; 27,58; 24,34.

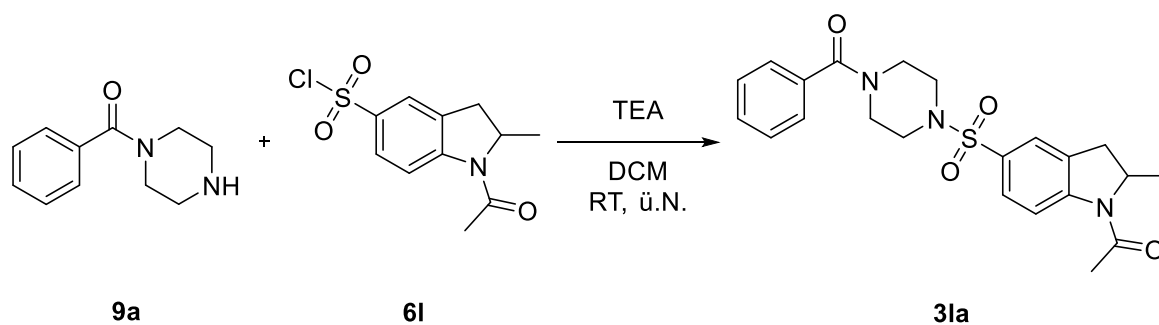
LC/MS (ESI +): $m/z = 456,3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 456,19515$

gefunden: $m/z = 456,19540$

Inhibitor 3la



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6l** (20,00 mg; 73,06 μmol), **9a** (19,00 mg; 99,87 μmol) und TEA (14,60 mg; 20,00 μl ; 144,28 μmol) durchgeführt.

Ausbeute: 7,70 mg (18,01 μmmol) \rightarrow 25 %

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 8,51 – 8,29 (m, 1H); 7,62 – 7,28 (m, 7H); 4,58 (bs, 1H); 4,01 – 3,27 (m, 6H); 3,15 – 2,72 (m, 4H); 2,34 (d, $J = 12,5$ Hz, 3H); 1,36 (s, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (126 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 170,70; 134,89; 134,55; 130,32; 129,82; 127,90; 128,40; 56,98; 46,11; 30,94; 21,81.

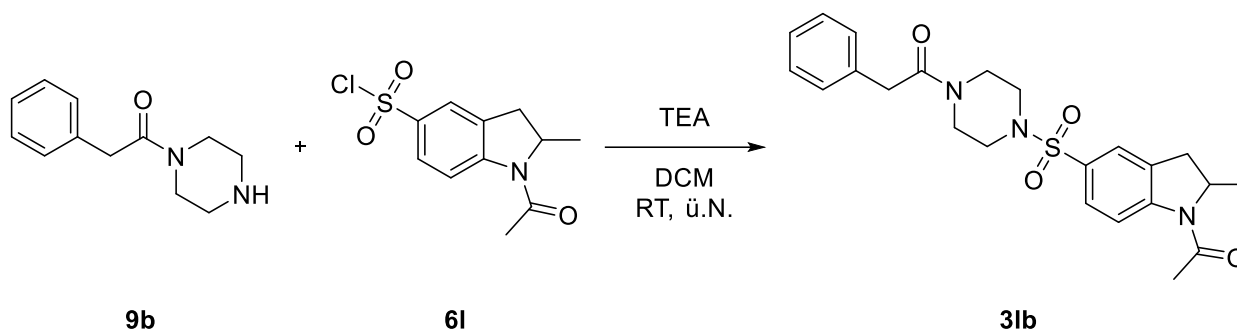
LC/MS (ESI +): $m/z = 428,3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 428,16385$

gefunden: $m/z = 428,16399$

Inhibitor 3lb



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6l** (20,00 mg; 73,06 μmol), **9b** (15,00 mg; 73,43 μmol) und TEA (14,60 mg; 20,00 μl ; 144,28 μmol) durchgeführt.

Ausbeute: 5,50 mg (12,46 μmmol) \rightarrow 17 %

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 8,31 – 8,311 (m, 1H); 7,55 (d, $J = 11,8$ Hz, 1H); 7,49 – 7,34 (m, 1H); 7,28 – 7,13 (m, 5H); 4,63 (s, 1H); 3,74 (s, 4H); 3,56 (d, $J = 4,2$ Hz, 2H); 3,06 (s, 2H); 2,97 (s, 2H); 2,84 – 2,75 (m, 2H); 2,40 (d, $J = 8,6$ Hz, 3H); 1,40 (d, $J = 5,6$ Hz, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (126 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 170,92; 129,34; 129,28; 128,87; 128,80; 128,71; 127,63; 127,51; 46,10; 46,06; 41,89; 41,14.

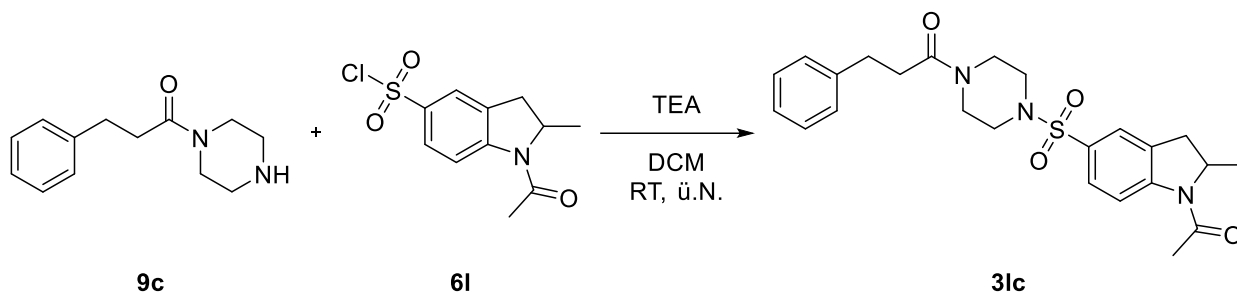
LC/MS (ESI +): $m/z = 442,2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{28}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 442,17950$

gefunden: $m/z = 442,17996$

Inhibitor 3lc



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6l** (20,00 mg; 73,06 μmol), **9c** (15,00 mg; 68,71 μmol) und TEA (14,60 mg; 20,00 μl ; 144,28 μmol) durchgeführt.

Ausbeute: 8,80 mg (19,32 μmol) \rightarrow 28 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 8,54 – 8,08 (m, 1H); 7,60 – 7,56 (m, 1H); 7,48 – 7,40 (m, 1H); 7,26 – 7,12 (m, 5H); 4,62 (s, 1H); 3,78 – 3,42 (m, 4H); 3,06 (s, 1H); 3,02 – 2,90 (m, 4H); 2,88 – 2,66 (m, 3H); 2,63 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H); 2,39 (d, $J = 8,8$ Hz, 3H); 1,40 (d, $J = 4,9$ Hz, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (126 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 172,21; 172,08; 140,68; 129,06; 128,96; 128,81; 126,86; 126,80; 57,49; 46,19; 45,68; 41,63; 35,04; 32,00.

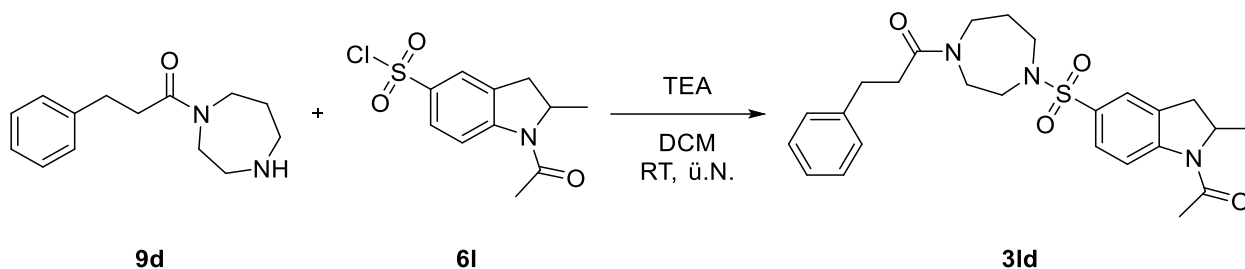
LC/MS (ESI +): $m/z = 456,3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{28}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 456,19515$

gefunden: $m/z = 456,19545$

Inhibitor 3ld



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6l** (20,00 mg; 73,06 μmol), **9d** (18,00 mg; 77,48 μmol) und TEA (25,55 mg; 35,00 μl ; 252,50 μmol) durchgeföhrt.

Ausbeute: 17,30 mg (36,84 μmmol) \rightarrow 50 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 8,55 – 8,29 (m, 1H); 7,66 – 7,48 (m, 2H); 7,26 (dd, $J = 7,2; 3,9$ Hz, 2H); 7,23 – 7,17 (m, 3H); 4,58 (s, 1H); 3,77 – 3,72 (m, 1H); 3,67 – 3,65 (m, 1H); 3,56 – 3,46 (m, 3H); 3,37 – 3,09 (m, 5H); 2,98 (dd, $J = 13,7; 6,4$ Hz, 2H); 2,76 (d, $J = 15,6$ Hz, 1H); 2,62 – 2,57 (m, 2H); 2,34 (d, $J = 14,1$ Hz, 2H); 1,99 – 1,85 (m, 2H); 1,36 (d, $J = 5,0$ Hz, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (126 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 171,86; 171,56; 141,11; 128,46; 127,40; 126,22; 56,85; 50,36; 49,89; 49,76; 49,69; 48,26; 48,03; 47,12; 46,65; 45,72; 44,69; 35,12; 34,71; 31,39; 28,80; 27,50.

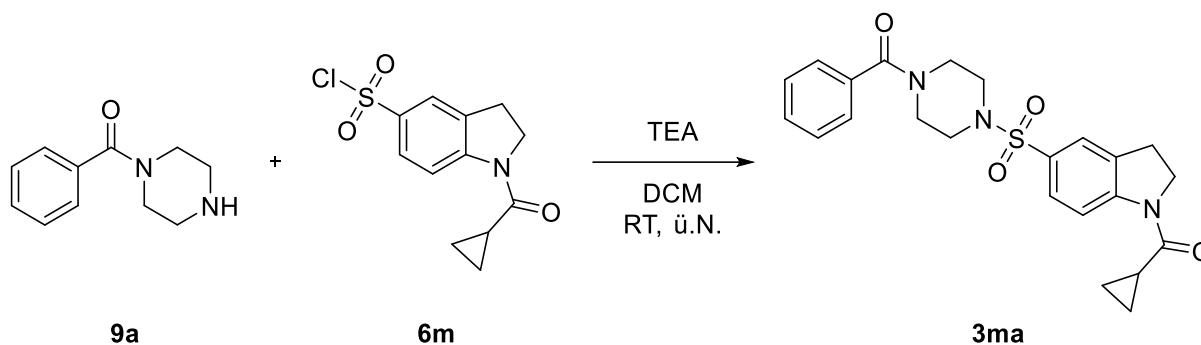
LC/MS (ESI +): $m/z = 470,3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 470,21080$

gefunden: $m/z = 470,21096$

Inhibitor 3ma



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6m** (20,00 mg; 69,99 μmol), **9a** (19,00 mg; 99,87 μmol) und TEA (14,60 mg; 20,00 μl ; 144,28 μmol) durchgeführt.

Ausbeute: 5,20 mg (11,83 μmmol) \rightarrow 17 %

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 8,32 (m, 1H); 7,52 – 7,46 (m, 2H); 7,39 – 7,30 (m, 4H); 7,24 (dd, $J = 8,0$; 1,5 Hz, 2H); 4,32 (t, $J = 8,6$ Hz, 2H); 3,79 (bs, 2H); 3,47 (bs, 2H); 3,24 (t, $J = 8,5$ Hz, 2H); 2,95 (m, 4H); 1,72 (bs, 1H); 1,14 – 1,07 (m, 2H); 0,92 – 0,86 (m, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (126 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 170,86; 134,38; 130,38; 129,00; 128,70; 128,46; 127,09; 124,15; 48,61; 30,94; 27,56; 13,84; 8,97.

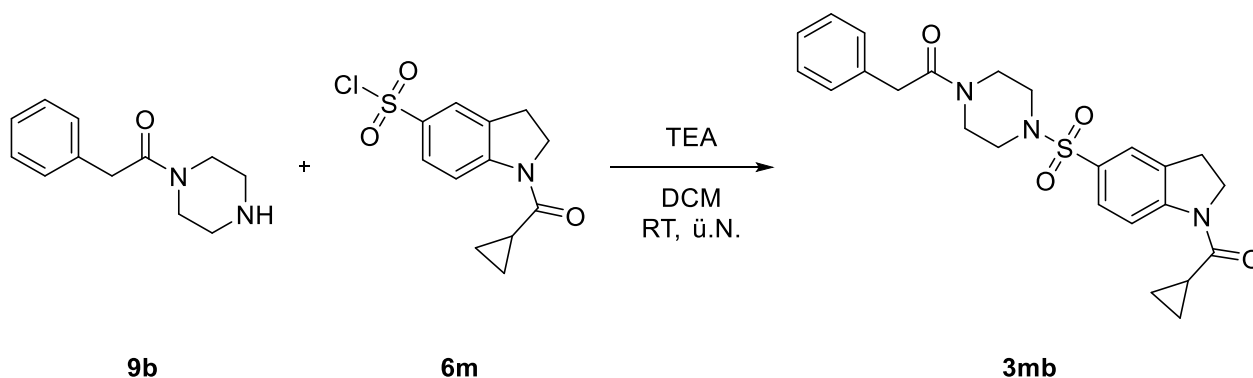
LC/MS (ESI +): $m/z = 440,3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 440,16385$

gefunden: $m/z = 440,16411$

Inhibitor 3mb



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6m** (20,00 mg; 69,99 μmol), **9b** (15,00 mg; 73,43 μmol) und TEA (14,60 mg; 20,00 μl ; 144,28 μmol) durchgeführt.

Ausbeute: 3,10 mg (5,99 μmmol) \rightarrow 10 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 8,48 – 8,28 (m, 1H); 7,52 (d, $J = 7,9$ Hz, 2H); 7,47 – 7,31 (m, 1H); 7,27 – 7,16 (m, 4H); 4,41 (t, $J = 8,3$ Hz, 2H); 3,73 (d, $J = 14,5$ Hz, 4H); 3,54 (s, 2H); 3,32 (t, $J = 8,4$ Hz, 2H); 2,97 – 2,78 (m, 4H); 1,82 (s, 1H); 1,20 (d, $J = 2,8$ Hz, 2H); 1,00 (dd, $J = 7,6; 2,8$ Hz, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (126 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 169,62; 134,56; 129,12; 128,98; 128,64; 128,54; 127,18; 124,22; 48,71; 46,03; 45,91; 45,62; 41,27; 41,17; 41,11; 27,69; 9,06.

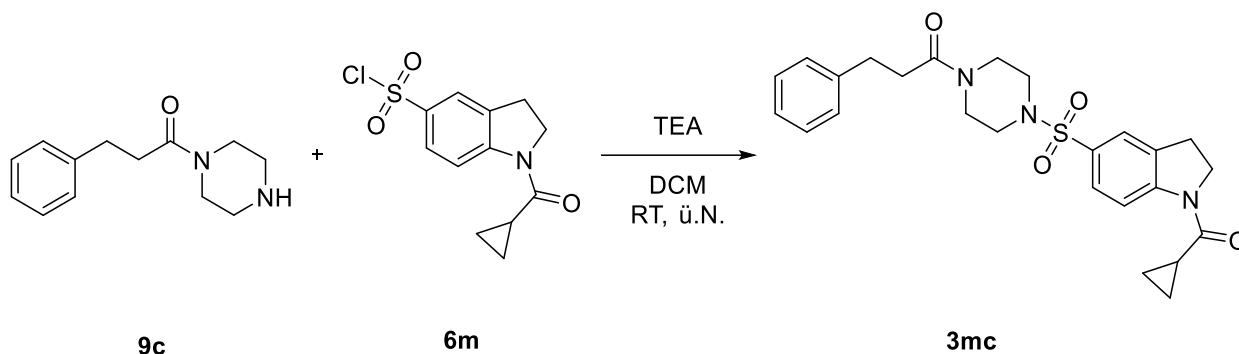
LC/MS (ESI +): $m/z = 454,2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 454,17950$

gefunden: $m/z = 454,17967$

Inhibitor 3mc



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6m** (20,00 mg; 69,99 μmol), **9c** (15,00 mg; 68,71 μmol) und TEA (14,60 mg; 20,00 μl ; 144,28 μmol) durchgeführt.

Ausbeute: 6,70 mg (14,33 μmol) \rightarrow 21 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 8,40 (m, 1H); 7,59 – 7,49 (m, 2H); 7,22 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H); 7,15 (d, $J = 7,2$ Hz, 3H); 4,41 (t, $J = 8,3$ Hz, 2H); 3,72 (s, 2H); 3,43 (s, 2H); 3,33 (t, $J = 8,2$ Hz, 2H); 2,99 – 2,90 (m, 4H); 2,77 (s, 2H); 2,61 (s, 2H); 1,82 (d, $J = 5,7$ Hz, 1H); 1,22 – 1,16 (m, 2H); 0,99 (dd, $J = 7,5$; 3,0 Hz, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (126 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 128,96; 128,93; 128,0; 126,84; 124,51; 48,99; 46,20; 41,57; 35,06; 31,30; 27,94; 9,35.

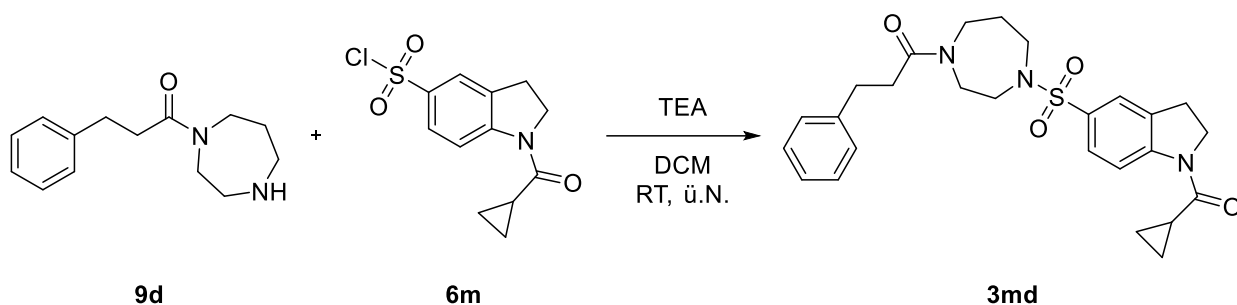
LC/MS (ESI +): $m/z = 468,3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 468,19515$

gefunden: $m/z = 468,19533$

Inhibitor 3md



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6m** (20,00 mg; 69,99 μmol), **9d** (18,00 mg; 77,48 μmol) und TEA (25,55 mg; 35,00 μl ; 252,50 μmol) durchgeführt.

Ausbeute: 8,60 mg (17,86 μmmol) \rightarrow 26 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 8,51 – 8,27 (m, 1H); 7,63 – 7,57 (m, 2H); 7,28 – 7,24 (m, 2H); 7,32 – 7,18 (m, 3H); 4,39 (t, $J = 8,2$ Hz, 2H); 3,68 – 3,65 (m, 1H); 3,53 (dd, $J = 13,2$; 6,6 Hz, 2H); 3,33 – 3,08 (m, 7H); 2,96 (dd, $J = 14,7$; 7,2 Hz, 2H); 2,67 – 2,63 (m, 2H); 1,91 (m, 2H); 1,81 (s, 1H); 1,21 – 1,17 (m, 2H); 1,01 – 0,97 (m, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (151 MHz, CDCl_3):

172,01; 141,26; 133,14; 128,64; 128,61; 127,60; 127,56; 126,38; 126,33; 50,46; 49,97; 49,86; 48,37; 48,07; 47,24; 46,80; 44,84; 35,26; 34,87; 31,53; 31,48; 28,89; 27,68; 27,61.

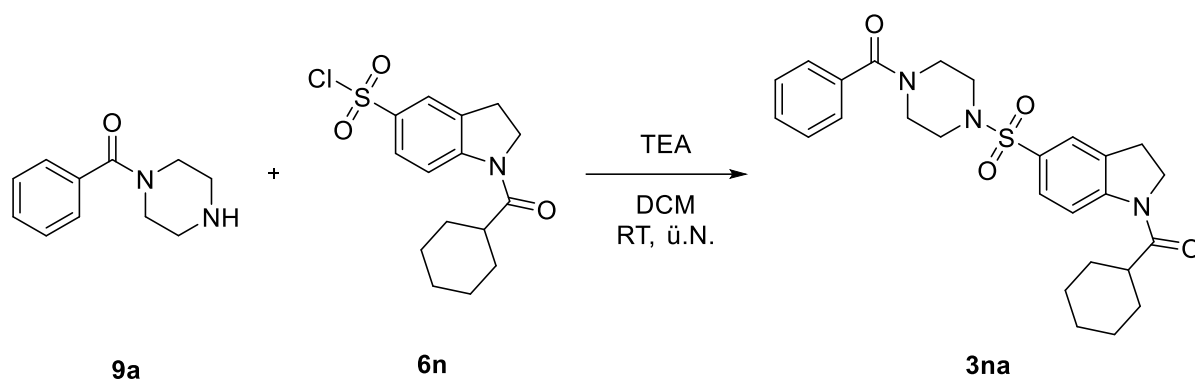
LC/MS (ESI +): $m/z = 482,3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 482,21080$

gefunden: $m/z = 482,21098$

Inhibitor 3na



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6n** (20,00 mg; 61,01 μmol), **9a** (15,00 mg; 78,85 μmol) und TEA (14,60 mg; 20,00 μl ; 144,28 μmol) durchgeführt.

Ausbeute: 3,10 mg (6,44 μmmol) \rightarrow 11 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 7,60 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H); 7,56 (s, 1H); 7,44 (dt, $J = 11,1; 5,0$ Hz, 4H); 7,34 (d, $J = 6,8$ Hz, 2H); 4,27 (td, $J = 8,6; 3,6$ Hz, 2H); 3,90 (s, 2H); 3,67 – 3,57 (m, 2H); 3,31 (dd, $J = 14,7; 6,8$ Hz, 2H); 3,16 – 2,94 (m, 4H); 2,55 – 2,48 (m, 1H); 1,90 (d, $J = 9,4$ Hz, 3H); 1,78 (s, 1H); 1,64 (d, $J = 9,1$ Hz, 1H); 1,34 – 1,29 (m, 5H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (176 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 170,60; 130,34; 128,79; 128,74; 128,60; 127,25; 25,90; 25,85; 25,83.

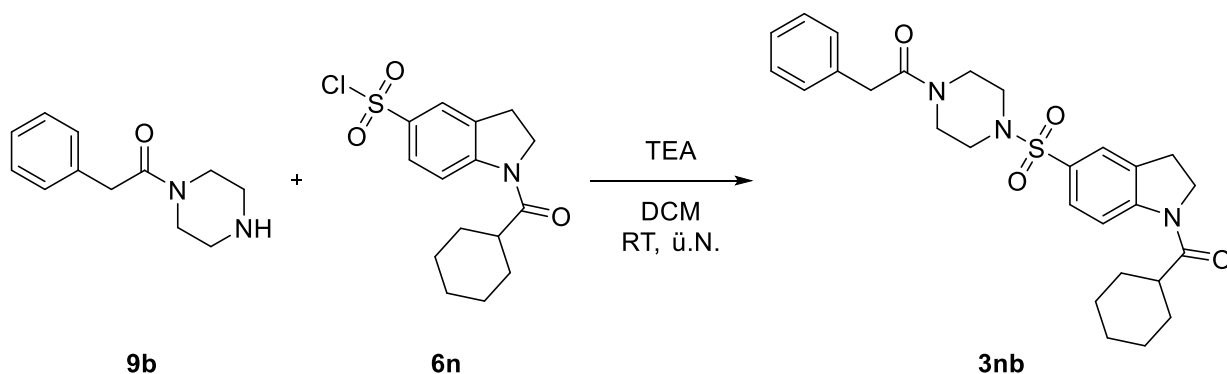
LC/MS (ESI +): $m/z = 482,3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 482,21080$

gefunden: $m/z = 482,21104$

Inhibitor 3nb



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6n** (20,00 mg; 61,01 μmol), **9b** (15,00 mg; 73,43 μmol) und TEA (14,60 mg; 20,00 μl ; 144,28 μmol) durchgeführt.

Ausbeute: 3,40 mg (6,44 μmmol) \rightarrow 11 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 8,58 – 8,39 (m, 1H); 7,56 – 7,47 (m, 2H); 7,43 – 7,31 (m, 2H); 7,27 – 7,23 (m, 1H); 7,17 (dd, $J = 12,7; 5,9$ Hz, 2H); 4,27 (t, $J = 8,6$ Hz, 2H); 3,74 (d, $J = 8,7$ Hz, 4H); 3,55 (d, $J = 4,2$ Hz, 2H); 3,38 – 3,23 (m, 2H); 2,99 (d, $J = 19,7$ Hz, 3H); 2,81 – 2,78 (m, 1H); 2,52 (d, $J = 12,9$ Hz, 1H); 1,91 (d, $J = 10,0$ Hz, 4H); 1,78 (d, $J = 4,7$ Hz, 1H); 1,64 (d, $J = 11,3$ Hz, 2H); 1,40 – 1,28 (m, 3H).

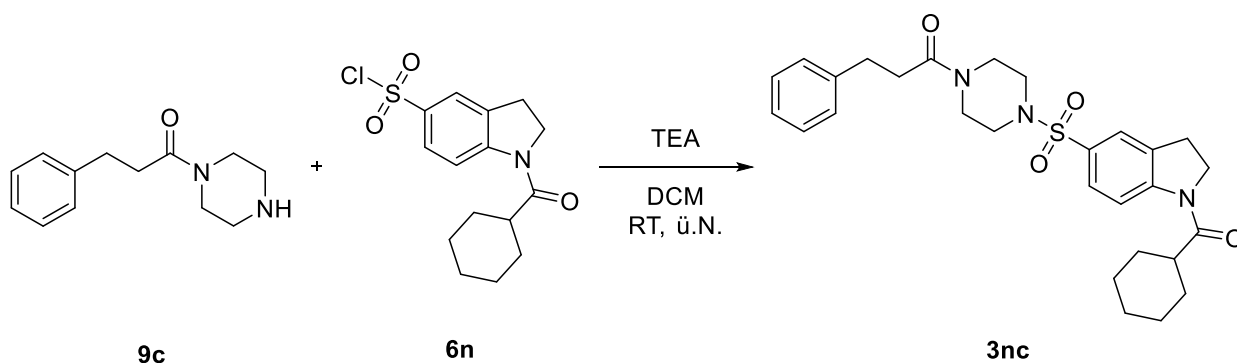
LC/MS (ESI +): $m/z = 495,3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$

berechnet: $m/z = 518,20840$

gefunden: $m/z = 518,20854$

Inhibitor 3nc



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6n** (20,00 mg; 61,01 μmol), **9c** (15,00 mg; 68,71 μmol) und TEA (14,60 mg; 20,00 μl ; 144,28 μmol) durchgeführt.

Ausbeute: 4,80 mg (6,44 μmmol) \rightarrow 12 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 8,59 – 8,42 (m, 1H); 7,58 – 7,52 (m, 1H); 7,48 – 7,38 (m, 1H); 7,34 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H), 7,25 – 7,22 (m, 2H); 7,16 (d, $J = 7,5$ Hz, 2H); 4,27 (t, $J = 8,5$ Hz, 2H); 3,73 – 3,71 (m, 2H); 3,46 – 3,40 (m, 2H); 3,34 – 3,26 (m, 2H); 2,95 – 2,93 (m, 4H); 2,61 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H); 1,90 (d, $J = 9,8$ Hz, 4H); 1,77 (s, 1H); 1,34 – 1,28 (m, 6H); 0,91 (dd, $J = 12,7; 7,3$ Hz, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (126 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 128,53; 126,32; 46,01; 45,74; 44,92; 40,87; 34,87; 31,96; 31,41; 29,73; 29,02; 25,71; 22,73; 22,66; 14,17; 8,55.

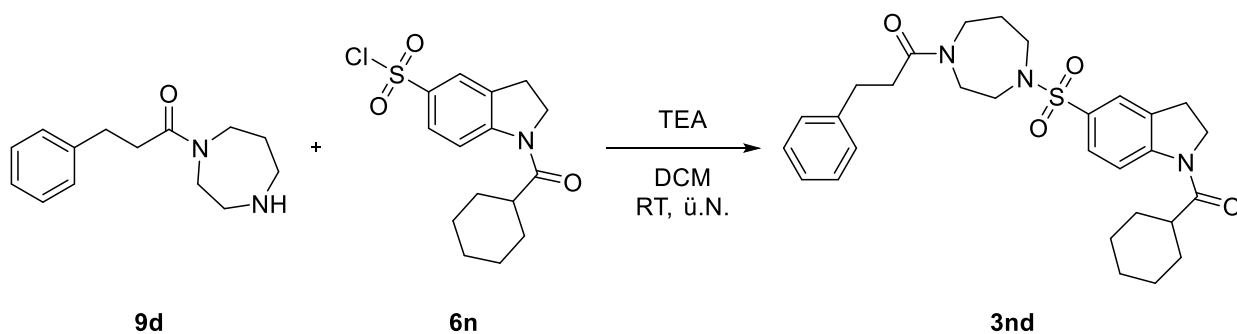
LC/MS (ESI +): $m/z = 510,3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{28}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$

berechnet: $m/z = 532,22405$

gefunden: $m/z = 532,22377$

Inhibitor 3nd



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6n** (20,00 mg; 61,01 μmol), **9d** (18,00 mg; 77,48 μmol) und TEA (25,55 mg; 35,00 μl ; 252,50 μmol) durchgeföhrt.

Ausbeute: 7,60 mg (14,51 μmmol) \rightarrow 24 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 8,64 – 8,37 (m, 1H); 7,86 – 7,43 (m, 3H); 7,26 (d, $J = 6,2$ Hz, 1H); 7,21 – 7,15 (m, 3H); 4,23 (t, $J = 8,3$ Hz, 2H); 3,72 (d, $J = 3,7$ Hz, 1H); 3,65 (t, $J = 5,9$ Hz, 1H); 3,53 (dd, $J = 11,4$; 5,1 Hz, 2H); 3,14 – 3,08 (m, 4H); 3,12 – 3,08 (m, 1H); 2,97 (dd, $J = 14,2$; 6,9 Hz, 2H); 2,65 – 2,43 (m, 4H); 1,98 – 1,86 (m, 6H); 1,76 (s, 1H); 1,63 (dd, $J = 21,7$; 10,5 Hz, 2H); 1,34 (m, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (176 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 175,61; 171,98; 128,64; 127,59; 127,55; 126,37; 126,33; 123,39; 50,48; 49,97; 49,89; 48,38; 48,26; 48,07; 47,26; 46,79; 44,84; 44,07; 41,16; 35,28; 34,90; 31,54; 28,92; 27,62.

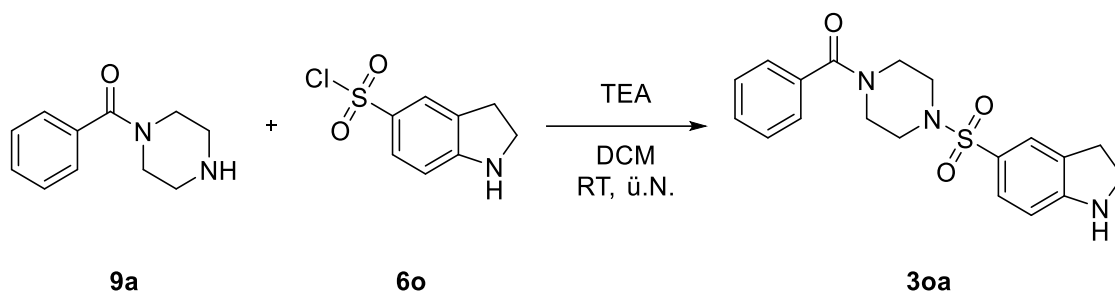
LC/MS (ESI +): $m/z = 524,4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{29}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 524,25775$

gefunden: $m/z = 524,25822$

Inhibitor 30a



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6o** (25,00 mg; 114,85 μmol), **9a** (20,00 mg; 105,13 μmol) und TEA (36,50 mg; 50,00 μl ; 360,71 μmol) durchgef\u00fchrt.

Ausbeute: 4,90 mg (13,19 μmmol) \rightarrow 13 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 7,58 – 7,32 (m, 8H); 3,90 (bs, 1H); 3,83 (t, $J = 8,3$ Hz, 2H); 3,58 (bs, 3H); 3,26 (t, $J = 8,3$ Hz, 2H); 3,07 (d, $J = 59,8$ Hz, 4H).

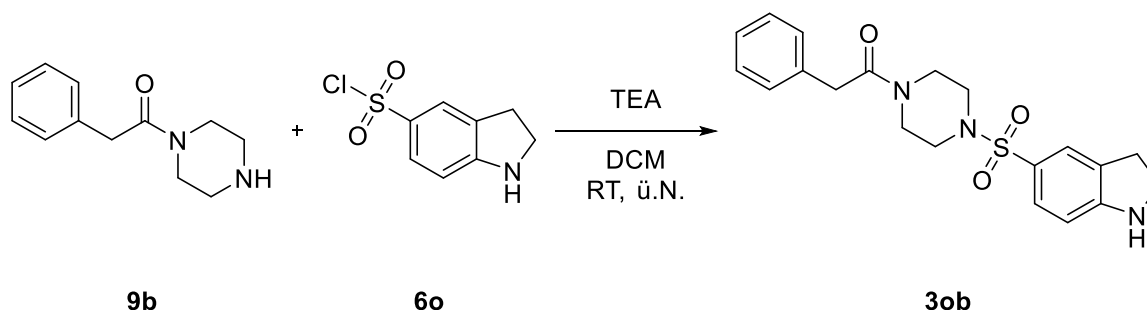
LC/MS (ESI +): $m/z = 372,1$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 372,13764$

gefunden: $m/z = 372,13812$

Inhibitor 30b



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6o** (25,00 mg; 114,85 μmol), **9b** (23,00 mg; 112,60 μmol) und TEA (36,50 mg; 50,00 μl ; 360,71 μmol) durchgef\u00fchrt.

Ausbeute: 3,60 mg (9,34 μmmol) \rightarrow 8 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CD_3OD):

δ [ppm] = 7,41 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H); 7,26 – 7,14 (m, 7H); 3,74 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H); 3,70 – 3,68 (m, 2H); 3,62 – 3,60 (m, 2H); 3,26 – 3,20 (m, 3H); 2,96 – 2,94 (m, 2H); 2,77 – 2,71 (m, 2H).

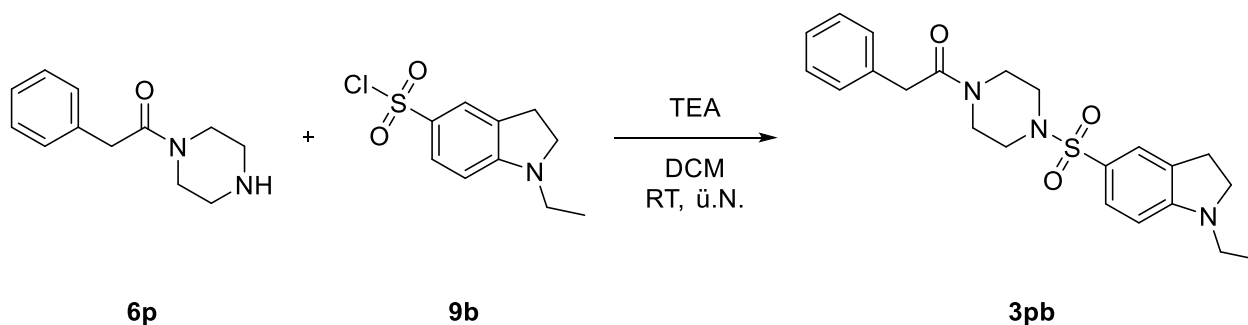
LC/MS (ESI +): $m/z = 386,2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 386,15329$

gefunden: $m/z = 386,15381$

Inhibitor 3pb



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6p** (20,00 mg; 81,39 μmol), **9b** (18,00 mg; 88,12 μmol) und TEA (14,60 mg; 20,00 μl ; 144,28 μmol) durchgeföhrt.

Ausbeute: 17,70 mg (42,80 μmmol) \rightarrow 53 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 7,69 (bs, 2H); 7,27 (d, $J = 5,1$ Hz, 2H); 7,20 – 7,14 (m, 4H); 3,75 (d, $J = 5,8$ Hz, 4H); 3,66 (t, $J = 8,2$ Hz, 2H); 3,55 – 3,53 (m, 2H); 3,33 (q, $J = 7,2$ Hz, 2H); 3,17 (t, $J = 8,2$ Hz, 2H); 3,03 – 3,01 (m, 2H); 2,86 – 2,85 (m, 2H); 1,28 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (176 MHz, CDCl_3):

169,61; 1,52,96; 136,20; 134,53; 131,14; 128,89; 128,62; 127,06; 124,43; 121,54; 118,02; 117,06; 110,12; 104,38; 101,98; 51,98; 45,98; 45,63; 42,40; 41,47; 15,63; 11,76.

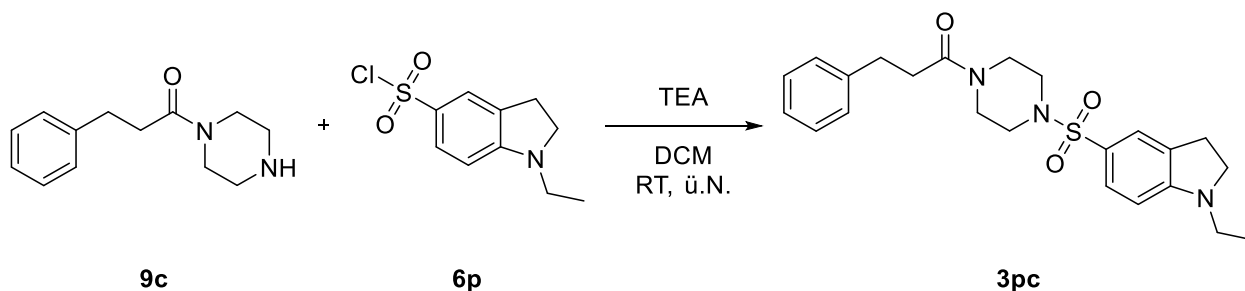
LC/MS (ESI +): $m/z = 414,3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 414,18459$

gefunden: $m/z = 414,18464$

Inhibitor 3pc



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6p** (25,00 mg; 101,74 μmol), **9c** (21,00 mg; 96,20 μmol) und TEA (36,50 mg; 50,00 μl ; 360,71 μmol) durchgef\u00fchrt.

Ausbeute: 3,00 mg (7,02 μmmol) \rightarrow 7 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 7,79 – 7,77 (m, $J = 8,9$ Hz, 1H); 7,40 (dd, $J = 5,8; 2,3$ Hz, 2H); 7,16 (s, 1H); 7,10 (d, $J = 3,1$ Hz, 2H); 6,96 – 6,90 (m, 1H); 6,65 (d, $J = 2,9$ Hz, 1H); 4,29 (q, $J = 7,3$ Hz, 2H); 3,74 – 3,72 (m, 2H); 3,67 (bs, 2H); 3,41 (d, $J = 4,7$ Hz, 2H); 3,00 - 3,99 (m, 2H); 2,90 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H); 2,73 – 2,71 (m, 2H); 2,59 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H); 1,55 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H); 1,37 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (151 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 170,56; 140,76; 134,60; 131,04; 128,43; 128,38; 126,20; 121,48; 118,01; 110,04; 101,92; 45,97; 45,02; 41,39; 40,93; 34,75; 31,48; 15,55.

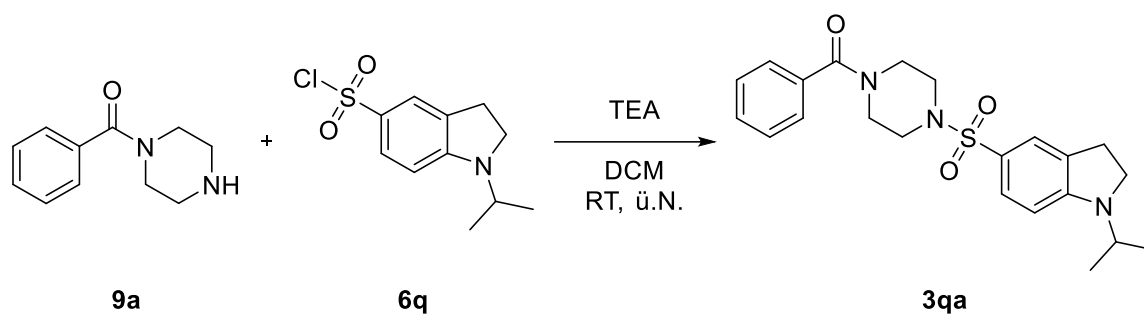
LC/MS (ESI +): $m/z = 428,2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 428,20024$

gefunden: $m/z = 428,19911$

Inhibitor 3qa



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6q** (25,00 mg; 96,25 μmol), **9a** (18,00 mg; 94,62 μmol) und TEA (36,50 mg; 50,00 μl ; 360,71 μmol) durchgeführt.

Ausbeute: 10,30 mg (24,91 μmmol) \rightarrow 26 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 7,69 (m, 2H); 7,42 (d, $J = 7,1$ Hz, 5H); 7,50 – 7,48 (m, 1H); 4,24 – 4,19 (m, 1H); 3,93 (t, $J = 8,0$ Hz, 2H); 3,59 (s, 2H); 3,36 (t, $J = 7,9$ Hz, 2H); 3,12 (d, $J = 3,6$ Hz, 6H); 1,33 (d, $J = 6,6$ Hz, 6H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (126 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 170,54; 134,90; 134,48; 132,10; 130,26; 128,71; 127,91; 127,21; 121,62; 118,11; 110,28; 102,13; 47,74; 46,00; 45,68; 28,02; 18,33.

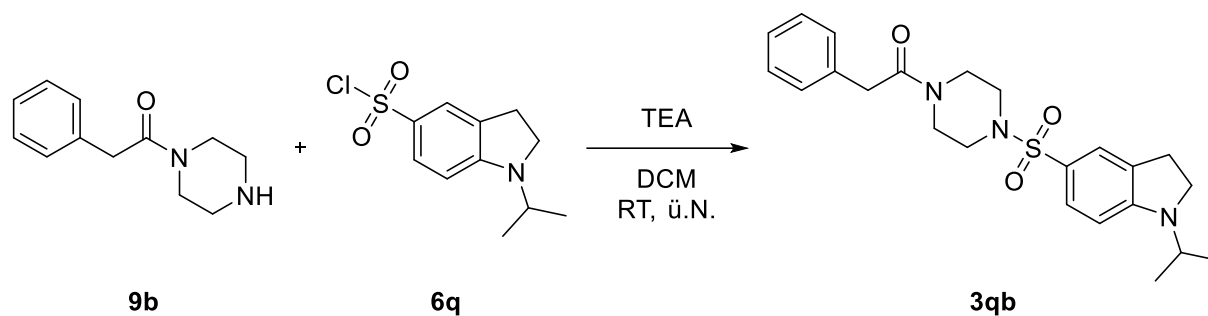
LC/MS (ESI +): $m/z = 414,3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 414,18459$

gefunden: $m/z = 414,18435$

Inhibitor 3qb



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6q** (20,00 mg; 77,00 μmol), **9b** (18,00 mg; 88,12 μmol) und TEA (14,60 mg; 20,00 μl ; 144,28 μmol) durchgeführt.

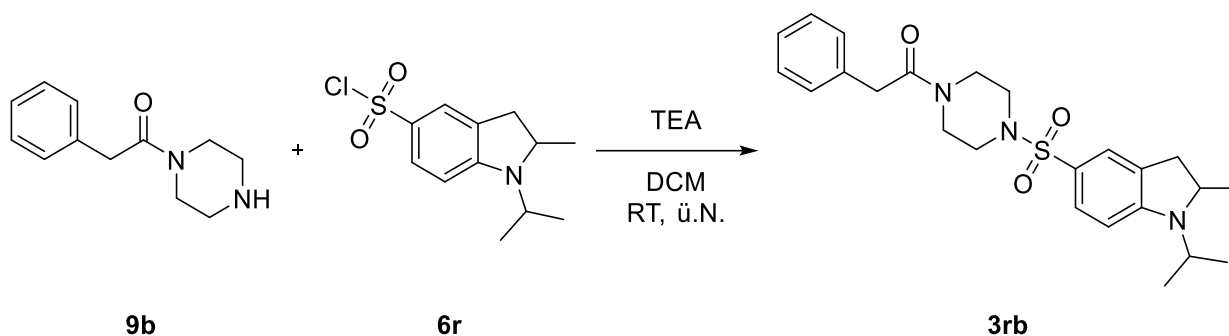
Ausbeute: 1,70 mg (3,98 μmol) \rightarrow 5 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 7,52 – 7,47 (m, 1H); 7,36 (dd, $J = 20,1; 11,4$ Hz, 1H); 7,26 (s, 1H); 7,19 – 7,15 (m, 3H); 7,02 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H); 6,78 (s, 1H); 3,89 (p, $J = 6,5$ Hz, 1H); 3,74 (d, $J = 10,7$ Hz, 4H); 3,58 – 3,52 (m, 4H); 3,09 (t, $J = 8,4$ Hz, 2H); 3,02 – 2,99 (m, 2H); 2,86 – 2,80 (m, 2H); 1,22 (d, $J = 6,6$ Hz, 6H).

LC/MS (ESI +): $m/z = 428,3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

Inhibitor 3rb



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6r** (25,00 mg; 91,31 μmol), **9b** (17,00 mg; 83,22 μmol) und TEA (36,50 mg; 50,00 μl ; 360,71 μmol) durchgeföhrt.

Ausbeute: 15,30 mg (35,65 μmmol) \rightarrow 42 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, Aceton- d_6):

δ [ppm] = 7,89 (d, $J = 1,0$ Hz, 1H); 7,70 – 7,58 (m, 1H); 7,32 (dd, $J = 8,3; 1,5$ Hz, 1H); 7,25 – 7,20 (m, 2H); 7,16 – 7,15 (m, 2H); 7,14 – 7,08 (m, 1H); 4,98 – 4,85 (m, 1H); 3,75 (s, 1H); 3,70 – 3,64 (m, 8H); 2,95 (s, 2H); 2,80 (s, 2H); 1,65 (d, $J = 7,0$ Hz, 6H); 1,31 (dd, $J = 6,3; 1,2$ Hz, 3H).

126

$^{13}\text{C-NMR}$: (126 MHz, CDCl_3):

169,64; 141,12; 134,45; 132,30; 128,88; 128,55; 127,03; 125,51; 120,13; 117,89; 111,30; 101,62; 47,69; 45,97; 45,91; 45,85; 45,63; 41,31; 21,88; 8,64.

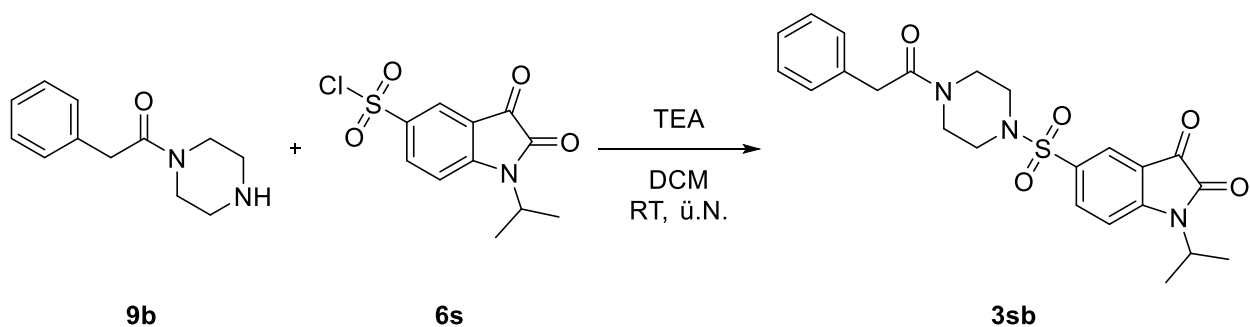
LC/MS (ESI +): $m/z = 456,2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 456,15877$

gefunden: $m/z = 456,15967$

Inhibitor 3sb



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6s** (25,00 mg; 86,89 μmol), **9b** (16,00 mg; 78,33 μmol) und TEA (36,50 mg; 50,00 μl ; 360,71 μmol) durchgeführt.

Ausbeute: 4,70 mg (10,32 μmmol) \rightarrow 13 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, Aceton- d_6):

δ [ppm] = 7,98 (dd, $J = 8,5; 2,0$ Hz, 1H); 7,78 (d, $J = 1,7$ Hz, 1H); 7,71 – 7,60 (m, 1H); 7,55 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H); 7,33 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H); 7,24 (d, $J = 7,1$ Hz, 1H); 7,22 – 7,19 (m, 2H); 4,66 – 4,58 (m, 1H); 3,77 – 3,61 (m, 6H); 2,98 – 2,71 (m, 4H); 1,59 – 1,51 (m, 6H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (176 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 137,54; 134,51; 130,84; 130,63; 129,23; 129,00; 128,99; 128,68; 128,67; 127,21; 127,17; 124,93; 111,65; 110,15; 49,47; 45,77; 44,90; 19,53; 19,26.

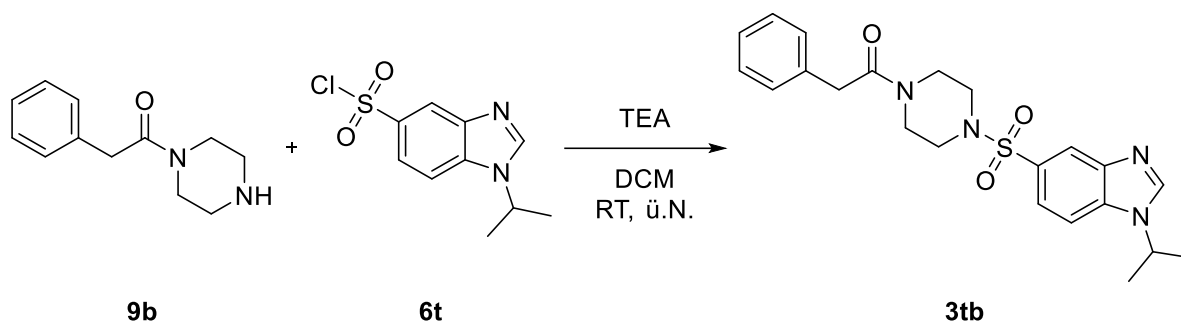
LC/MS (ESI +): $m/z = 456,2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 456,15877$

gefunden: $m/z = 456,15967$

Inhibitor 3tb



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6t** (25,00 mg; 96,63 μmol), **9b** (18,00 mg; 88,12 μmol) und TEA (36,50 mg; 50,00 μl ; 360,71 μmol) durchgeführt.

Ausbeute: 16,20 mg (37,98 μmmol) \rightarrow 43 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, Aceton- d_6):

δ [ppm] = 9,38 – 9,25 (m, 1H); 8,33 (s, 1H); 8,19 (dd, $J = 13,6; 8,7$ Hz, 1H); 7,86 (td, $J = 8,7; 1,5$ Hz, 1H); 7,20 – 7,13 (m, 5H); 5,33 – 5,15 (m, 1H); 3,71 (d, $J = 5,3$ Hz, 2H); 3,68 – 3,66 (m, 4H); 3,02 – 2,84 (m, 4H); 1,81 (d, $J = 6,7$ Hz, 6H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (176 MHz, Aceton- d_6):

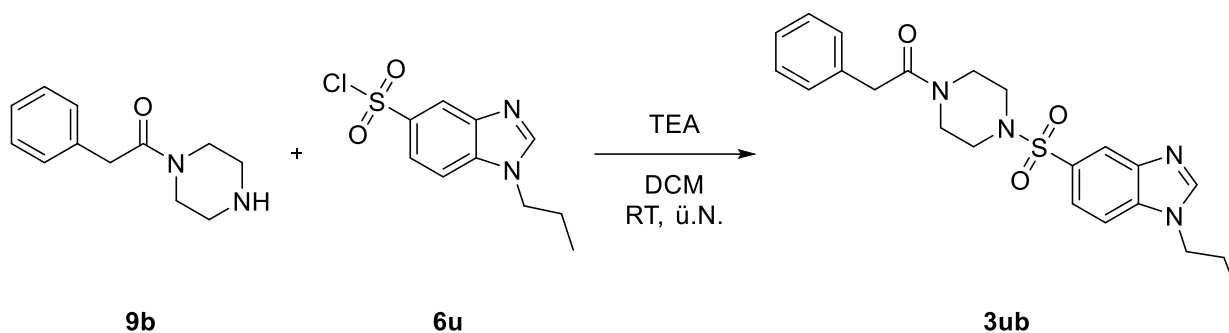
δ [ppm] = 169,65; 134,43; 128,93; 128,87; 128,65; 128,56; 127,11; 122,76; 122,32; 120,47; 111,45; 49,17; 46,10; 45,97; 45,90; 45,88; 45,61; 41,26; 22,77; 22,71.

HRMS (ESI +): $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 427,17984$

gefunden: $m/z = 427,18021$

Inhibitor 3ub



Allgemeine Vorschrift VIa wurde mit **6u** (25,00 mg; 96,63 μmol), **9b** (18,00 mg; 88,12 μmol) und TEA (36,50 mg; 50,00 μl ; 360,71 μmol) durchgeföhrt.

Ausbeute: 13,60 mg (31,88 μmmol) \rightarrow 36 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, Aceton- d_6):

δ [ppm] = 9,13 – 8,99 (m, 1H); 8,26 (dd, $J = 7,2; 1,0$ Hz, 1H); 8,15 – 8,06 (m, 1H); 7,79 (dd, $J = 9,3; 0,7$ Hz, 1H); 7,19 – 7,12 (m, 5H); 4,66 – 4,57 (m, 2H); 3,70 (d, $J = 5,3$ Hz, 2H); 3,67 – 3,65 (m, 4H); 2,98 (d, $J = 17,0$ Hz, 2H); 2,83 (d, $J = 12,6$ Hz, 2H); 1,38 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H); 1,03 (td, $J = 7,3; 0,7$ Hz, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (126 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 169,65; 134,39; 130,48; 128,91; 128,54; 127,09; 122,90; 122,15; 120,54; 111,14; 47,72; 46,08; 45,86; 45,78; 23,29; 11,42; 8,63.

LC/MS (ESI +): $m/z = 427,3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI +): $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 427,17984$

gefunden: $m/z = 427,18022$

7.1.2 Synthese der Hedgehog-Coaktivatoren

Synthese der Pyrrolidin-2,4-dione 12a-f (allgemeine Vorschrift VIIa)¹³⁷

Meldrumsäure (1,1 eq.) und 1,4 eq. DMAP wurden in DCM bei 0 °C gelöst. Anschließend wurde 1 eq. der *N*-Boc-geschützte Aminosäure und 1,2 eq. 1-Ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimid HCl hinzugegeben. Es wurde unter Argon über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Mischung wurde in EtOAc (3,33-facher Menge des DCMs) gegeben und mit konz. NaCl-Lösung (2-mal 1,3-fache Menge des DCMs), 5% Zitronensäure (3-mal fünffache Menge des DCMs) und dann wieder konz. NaCl-Lösung (fünffache Menge des DCMs) gewaschen. Die organische Phase wurde für 30 min bis 1,5 h unter Rückfluss gerührt. Anschließend wurde das Lösemittel abgezogen und 10 eq. TFA sowie DCM (0,66-faches Volumen des Start-DCMs) hinzugegeben und über Nacht gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum abgezogen. Es wurde ein reines Produkt erhalten, dass nicht säulenchromatographisch aufgereinigt werden musste.

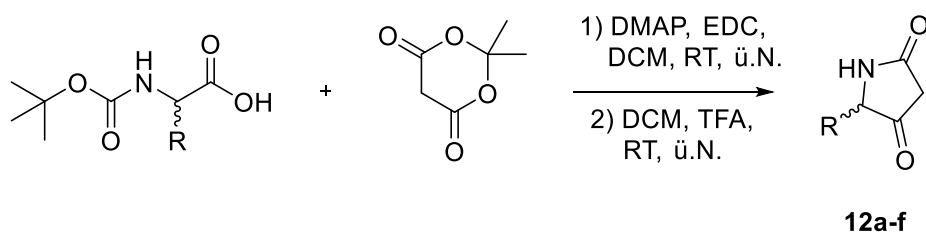
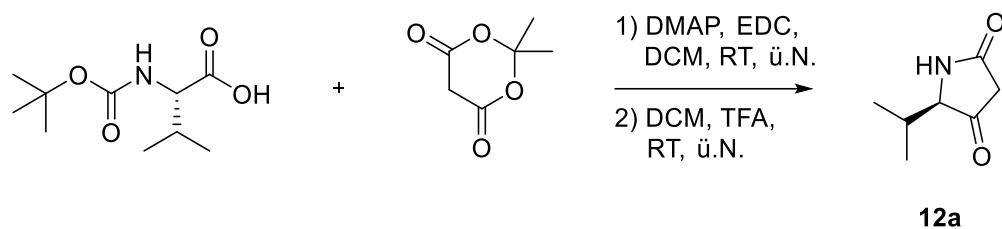


Abb. 7.11. Generelles Reaktionsschema der allgemeinen Vorschrift VIIa für die Synthese der Pyrrolidin-2,4-dione 12a-f.¹³⁷ R = *R*-Isopropyl (**12a**), *S*-Isopropyl (**12b**), *R*-Benzyl (**12c**), *R*-Isobutyl (**12d**), *R*-Methyl (**12e**), H (**12f**).

(R)-5-Isopropylpyrrolidin-2,4-dion (12a)



Allgemeine Vorschrift VIIa wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

Meldrumsäure (364,85 mg; 2,53 mmol), DMAP (393,61 mg; 3,22 mmol), *Boc*-Val-OH (500,00 mg; 2,30 mmol), EDC (529,41 mg; 2,76 mmol) und TFA (1,77 ml; 23,01 mmol) in 15 ml DCM.

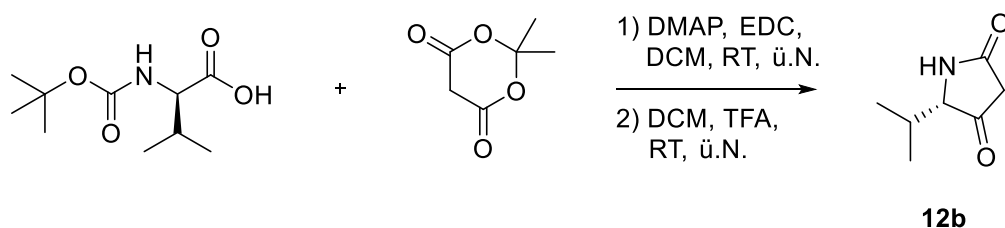
Aussehen: braune, zähviskose Flüssigkeit

Ausbeute: 324,88 mg (2,30 mmol) → quant.

¹H-NMR: (500 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 3,88 (d, *J* = 4,0 Hz, 1H); 3,03 – 2,92 (m, 2H); 2,17 (ddt, *J* = 9,6; 6,8; 2,6 Hz, 1H); 1,04 (d, *J* = 7,0 Hz, 3H); 0,93 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H).

(S)-5-Isopropylpyrrolidin-2,4-dion (12b)



Allgemeine Vorschrift VIIa wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

Meldrumsäure (3,65 g; 25,32 mmol), DMAP (3,94 g; 32,22 mmol), *Boc*-D-Val-OH (5,00 g; 23,01 mmol), EDC (4,85 g; 25,32 mmol) und TFA (17,00 ml; 220,60 mmol) in 30 ml DCM.

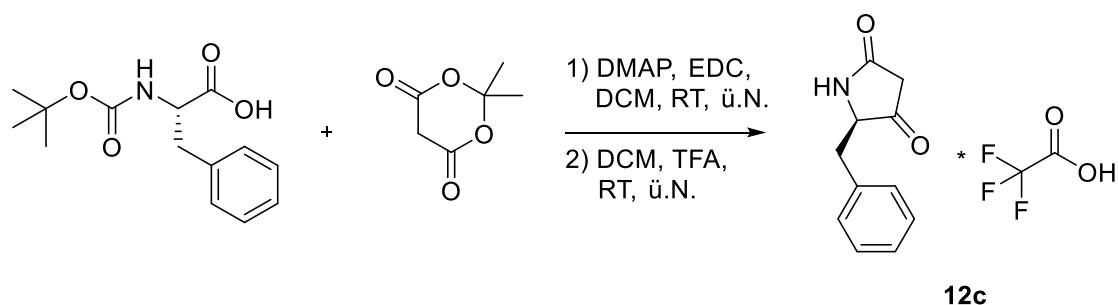
Aussehen: braune, zähviskose Flüssigkeit

Ausbeute: 3,25 g (23,01 mmol) → quant.

¹H-NMR: (500 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 3,93 (dd, *J* = 4,9; 3,5 Hz, 1H); 2,10 (ddd, *J* = 17,9; 10,9; 6,9; 3,6 Hz, 1H); 1,02 (dd, *J* = 12,9; 7,0 Hz, 3H); 0,91 (d, *J* = 6,8 Hz, 2H); 0,82 (d, *J* = 6,8 Hz, 1H).

(R)-5-benzylpyrrolidin-2,4-dion*TFA (12c)



Allgemeine Vorschrift VIIa wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

Meldrumsäure (597,57 mg; 4,52 mmol), DMAP (644,67 mg; 5,28 mmol), *Boc*-Phe-OH (1,00 g; 5,29 mmol), EDC (867,08 mg; 4,52 mmol) und TFA (2,90 ml; 37,69 mmol) in 25 ml DCM. Das Produkt wurde im rohen Zustand weiterverwendet.

Aussehen: oranger, amorpher Feststoff

Ausbeute: 808,00 mg (2,66 mmol) → 71 %

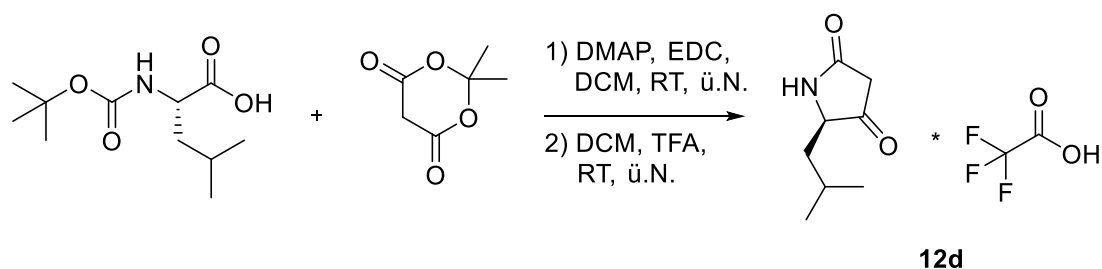
¹H-NMR: (500 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 7,27 (ddd, *J* = 16,4; 11,6; 7,0 Hz, 5H); 4,36 – 4,31 (m, 1H); 3,17 – 2,86 (m, 2H).

¹³C-NMR: (126 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 129,62; 129,38; 128,18; 127,73; 48,13; 47,96; 47,79; 47,62; 47,45; 47,28; 47,11.

(R)-5-Isobutylpyrrolidin-2,4-dion*TFA (12d)



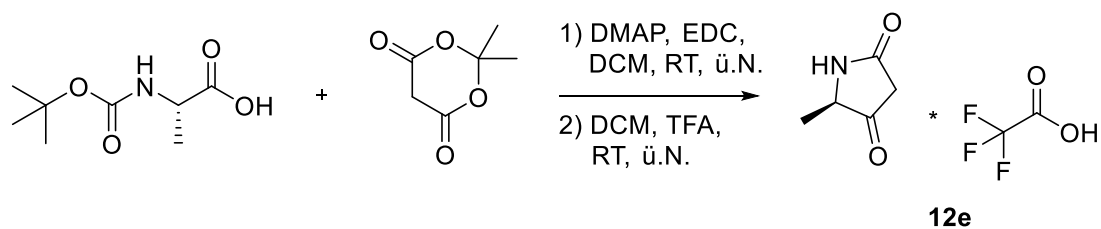
Allgemeine Vorschrift VIIa wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

Meldrumsäure (685,45 mg; 4,76 mmol), DMAP (739,49 mg; 6,05 mmol), *Boc*-Leu-OH (1,00 g; 4,32 mmol), EDC (994,61 g; 5,19 mmol) und TFA (3,33 ml; 43,24 mmol) in 25 ml DCM. Das Produkt wurde ohne weiter Aufreinigung weiterverwendet.

Aussehen: braune, zähviskose Flüssigkeit

Ausbeute: 779,00 mg (2,89 mmol) → 67 %

Pyrrolidin-2,4-dion*TFA (12e)



Allgemeine Vorschrift VIIa wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

Meldrumsäure (943,99 mg; 4,98 mmol), DMAP (852,42 mg; 6,98 mmol), *Boc*-Ala-OH (943,00 mg; 4,98 mmol), EDC (1,11 g; 5,98 mmol) und TFA (3,84 ml; 49,84 mmol) in 25 ml DCM. Das Produkt, das noch Verunreinigungen enthielt, wurde ohne weiter Aufreinigung weiterverwendet.

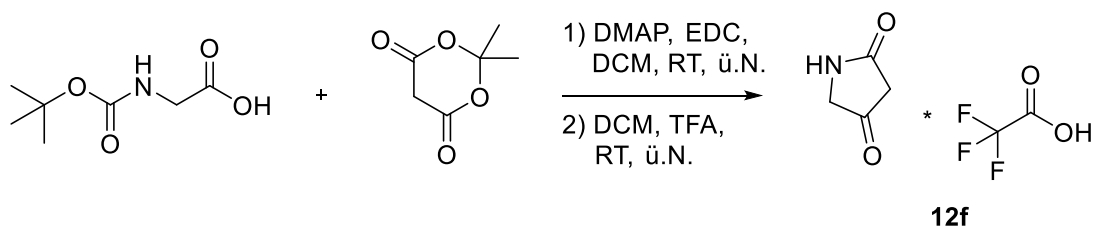
Aussehen: gelber, amorpher Feststoff

Ausbeute: 1,05 g (2,32 mmol) → 92 %

¹H-NMR: (500 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 4,07 (q, *J* = 6,9 Hz, 1H); 1,31 (dd, *J* = 6,8; 5,5 Hz, 3H).

Pyrrolidin-2,4-dion*TFA (12f)



Allgemeine Vorschrift VIIa wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

Meldrumsäure (904,99 mg; 6,28 mmol), DMAP (976,32 mg; 7,99 mmol), *Boc*-Gly-OH (1,00 g; 5,71 mmol), EDC (1,31 g; 6,85 mmol) und TFA (4,40 ml; 57,08 mmol) in 25 ml DCM. Das Produkt, das noch Verunreinigungen enthielt, wurde ohne weiter Aufreinigung weiterverwendet.

Aussehen: gelber, amorpher Feststoff

Ausbeute: 494,00 mg (2,32 mmol) → 41 %

Synthese der *Boc*-geschützten Pyrrolidin,2,4-dione 12g-h (allgemeine Vorschrift VIIb)

Synthese der *Boc*-geschützten nach **allgemeiner Vorschrift VIIa**, wobei nach Extraktion des Produktes keine Behandlung mit TFA durchgeführt wurde.

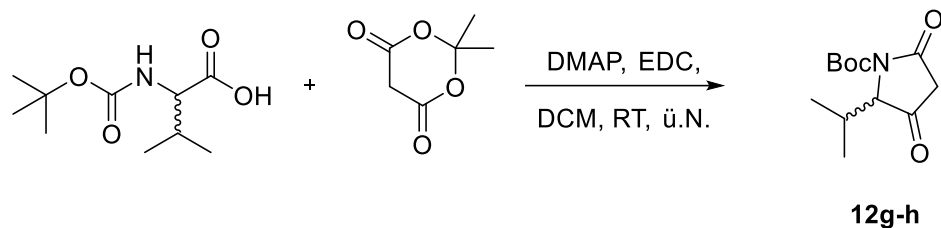
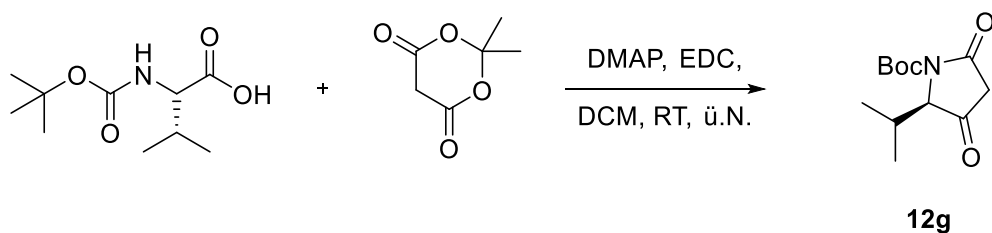


Abb. 7.12. Generelles Reaktionsschema der allgemeinen Vorschrift VIIb für die Synthese der *Boc*-geschützten Pyrrolidin-2,4-dione 12g-h. **R** = *R*-Isopropyl (12g), *S*-Isopropyl (12h).

Tert-butyl-(R)-2-isopropyl-3,5-dioxopyrrolidin-1-carboxylat (12g)



Allgemeine Vorschrift VIIb wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

Meldrumsäure (2,19 g; 15,19 mmol), DMAP (2,36 g; 19,33 mmol), *Boc*-Val-OH (3,00 g; 13,81 mmol) und EDC (3,18 g; 16,57 mmol) in 15 ml DCM.

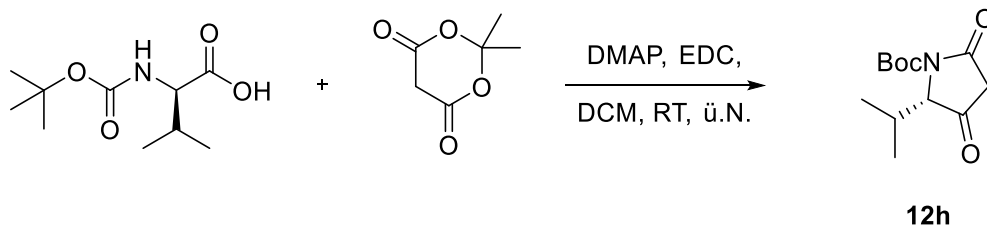
Aussehen: gelber, amorpher Feststoff

Ausbeute: 3,12 g (12,94 mmol) → 94 %

¹H-NMR: (500 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 4,37 (d, *J* = 2,7 Hz, 1H); 2,46 (pd, *J* = 7,1; 2,7 Hz, 1H); 1,53 (s, 10H); 1,15 (d, *J* = 7,2 Hz, 3H); 0,85 (d, *J* = 7,0 Hz, 3H).

Tert-butyl-(S)-2-isopropyl-3,5-dioxopyrrolidin-1-carboxylat (12h)



Allgemeine Vorschrift VIIb wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

Meldrumsäure (1,46 g; 10,13 mmol), DMAP (1,57 g; 12,89 mmol), *Boc*-D-Val-OH (2,00 g; 9,21 mmol) und EDC (2,12 g; 11,05 mmol) in 15 ml DCM.

Aussehen: gelber, amorpher Feststoff

Ausbeute: 2,16 g (8,93 mmol) → 97 %

¹H-NMR: (500 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 4,37 (d, *J* = 2,7 Hz, 1H); 2,46 (heptd, *J* = 7,1; 2,7 Hz, 1H); 1,53 (s, 9H); 1,45 (s, 1H); 1,15 (d, *J* = 7,2 Hz, 3H); 0,85 (d, *J* = 7,0 Hz, 3H).

Synthese der Pyrrolidin-2,4-dion-enamine 13aa-fb (allgemeine Vorschrift VIII)¹³⁸

Zu vorgelegtem Aminosäureamid, 10 mol% Kupfer(I)-chlorid und 3 Å Molekularsieb (im Ofen getrocknet, 5 ml) wurde etwa 1 eq. des Pyrrolidin-2,4-dion-Derivats **12a-f** in i-PrOH:AcOH 9:1 hinzugegeben. Die Mischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur und unter Argonatmosphäre gerührt. Die Mischung wurde über Celite gefiltert und das Lösemittel verdampft. Das Produkt wurde säulenchromatographisch im angegebenen Gradienten getrennt. Die Nomenklatur erfolgte analog zur Literatur bzw. basiert auf dessen Bausteinen.^{137, 138}

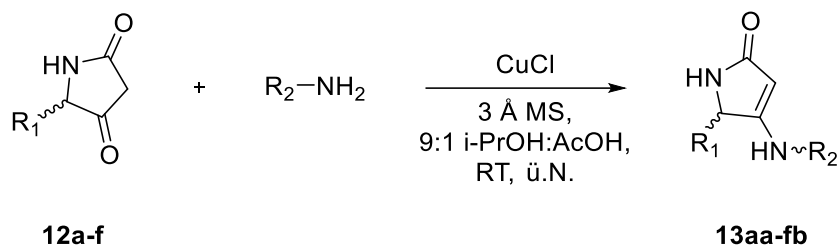
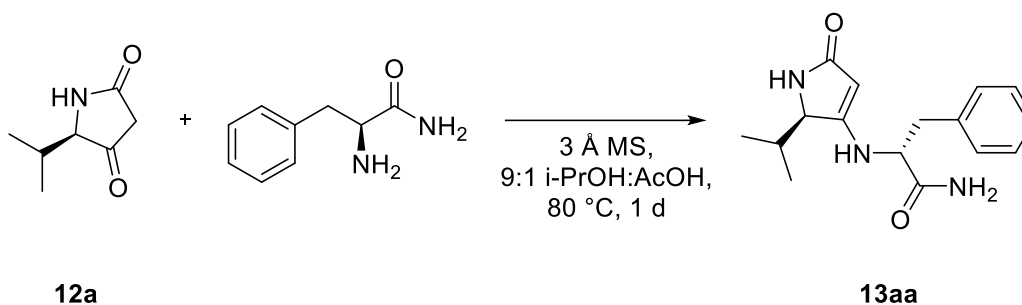


Abb. 7.13. Generelles Reaktionsschema der allgemeinen Vorschrift VIII für die Synthese der Pyrrolidin-2,4-dion-enamine 13aa-fb.¹³⁸ R₁ = *R*-Isopropyl; R₂ = *R*-Phenylalaninamid (**13aa**), R₁ = *R*-Isopropyl; R₂ = *S*-Phenylalaninamid (**13ab**), R₁ = *S*-Isopropyl; R₂ = *S*-Phenylalaninamid (**13bb**), R₁ = *S*-Isopropyl; R₂ = *R*-Phenylalaninamid (**13ba**), R₁ = *R*-Benzyl; R₂ = *S*-Phenylalaninamid (**13cb**), R₁ = *R*-Isobutyl; R₂ = *S*-Phenylalaninamid (**13db**), R₁ = *R*-Methyl; R₂ = *S*-Phenylalaninamid (**13eb**), R₁ = H; R₂ = *S*-Phenylalaninamid (**13fb**), R₁ = *R*-Isopropyl; R₂ = *S*-Phenylalaninamidmethylester (**13ac**), R₁ = *R*-Isopropyl; R₂ = *S*-Phenylglycinamid (**13ad**), R₁ = *R*-Isopropyl; R₂ = *S*-Glycinamid (**13ae**), R₁ = *R*-Isopropyl; R₂ = Phenylethyl (**13af**), R₁ = *R*-Isopropyl; R₂ = Benzyl (**13ag**), R₁ = *R*-Isopropyl; R₂ = Phenyl (**13ah**).

pyen-Val-Phe-NH₂ (13aa)



Allgemeine Vorschrift VIII wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

12a (149,00 mg; 1,06 mmol) und Phenylalaninamid (157,00 mg; 0,96 mmol) in 10 ml iPrOH:AcOH 9:1. Es wurde bei 80 °C für einen Tag ohne CuCl₂ gerührt. Es wurde über Silica (EtOAc:MeOH 95:5-9:1) getrennt.

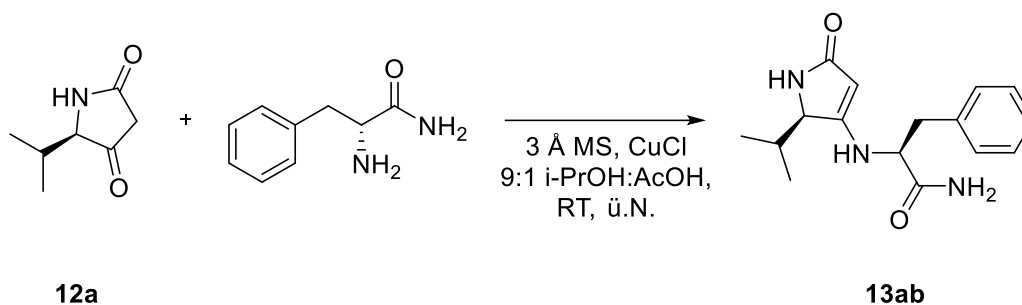
Aussehen: brauner, amorpher Feststoff

Ausbeute: 219,00 mg (762,12 μmol) → 72 %

¹H-NMR: (500 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 7,38 – 7,26 (m, 5H); 7,21 (tt, *J* = 5,9; 2,7 Hz, 1H); 4,58 (s, 1H); 4,03 (t, *J* = 7,2 Hz, 1H); 3,98 (s, 1H); 3,12 (dd, *J* = 13,7; 6,8 Hz, 1H); 3,01 (dd, *J* = 13,6; 7,6 Hz, 1H); 2,14 (ddt, *J* = 11,0; 6,8; 3,8 Hz, 1H); 2,00 (d, *J* = 15,1 Hz, 1H); 1,06 (d, *J* = 7,0 Hz, 3H); 0,68 (d, *J* = 6,7 Hz, 3H).

pyen-Val-D-Phe-NH₂ (13ab)



Allgemeine Vorschrift VIII wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

12a (500,00 mg; 3,54 mmol), D-Phenylalaninamid (550,00 mg; 3,35 mmol) und CuCl (70,00 mg; 707,08 μ mol) in 7 ml iPrOH:AcOH 9:1. Es wurde über Silica (EtOAc:MeOH 95:5-9:1) getrennt.

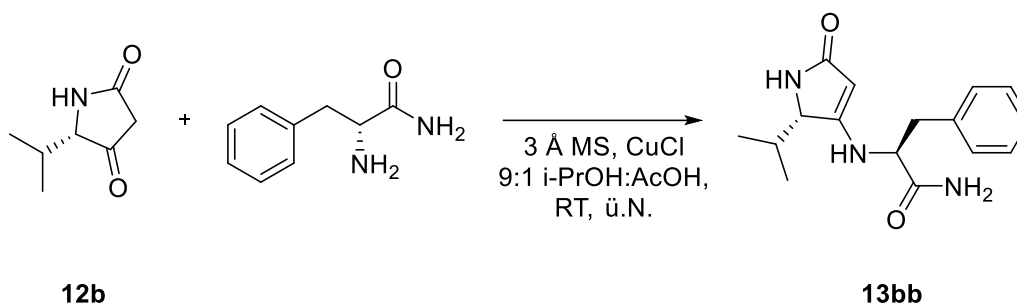
Aussehen: brauner, amorpher Feststoff

Ausbeute: 619,00 mg (2,15 mmol) \rightarrow 64 %

¹H-NMR: (500 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 7,30 (d, J = 6,9 Hz, 4H); 7,25 – 7,21 (m, 1H); 4,55 (s, 1H); 4,04 (d, J = 2,7 Hz, 1H); 3,94 (dd, J = 10,2; 4,7 Hz, 1H); 3,22 (dd, J = 13,9; 4,7 Hz, 1H); 2,92 (dd, J = 13,9; 10,3 Hz, 1H); 1,87 (dtt, J = 13,6; 6,8; 3,5 Hz, 1H); 1,00 (d, J = 7,0 Hz, 3H); 0,28 (d, J = 6,7 Hz, 3H).

pyen-D-Val-D-Phe-NH₂ (13bb)



Allgemeine Vorschrift VIII wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

12b (500,00 mg; 3,54 mmol), D-Phenylalaninamid (550,00 mg; 3,35 mmol) und CuCl (35,00 mg; 353,54 μ mol) in 15 ml iPrOH:AcOH 9:1. Es wurde über Silica (EtOAc:MeOH 95:5-9:1) getrennt.

Aussehen: gelber, amorpher Feststoff

Ausbeute: 733,00 mg (2,55 mmol) \rightarrow 76 %

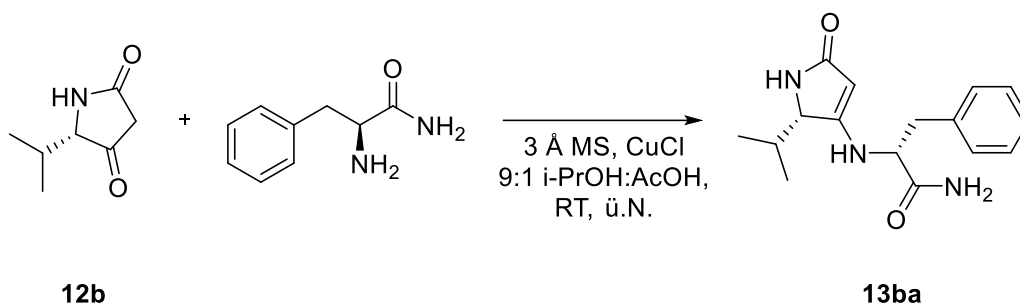
¹H-NMR: (500 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 7,27 (s, 5H); 7,23 – 7,18 (m, 1H); 4,59 (s, 1H); 4,03 (t, J = 7,2 Hz, 1H); 3,98 (s, 1H); 3,12 (dd, J = 13,7; 6,7 Hz, 1H); 3,01 (dd, J = 13,7; 7,7 Hz, 1H); 2,14 (pd, J = 6,8; 2,7 Hz, 1H); 1,94 (s, 1H); 1,06 (d, J = 7,0 Hz, 3H); 0,68 (d, J = 6,7 Hz, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 180,07; 175,95; 167,87; 138,23; 130,29; 129,46; 127,84; 88,54; 63,97; 60,79; 39,26; 31,38; 20,65; 13,90.

***pyen*-D-Val-Tyr-NH₂ (13ba)**



Allgemeine Vorschrift VIII wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

12b (500,00 mg; 3,54 mmol), Phenylalaninamid (550,00 mg; 3,35 mmol) und CuCl (35,00 mg; 353,54 μ mol) in 15 ml iPrOH:AcOH 9:1. Es wurde über Silica (EtOAc:MeOH 95:5-9:1) getrennt.

Aussehen: gelber, amorpher Feststoff

Ausbeute: 799,00 mg (2,78 mmol) \rightarrow 79 %

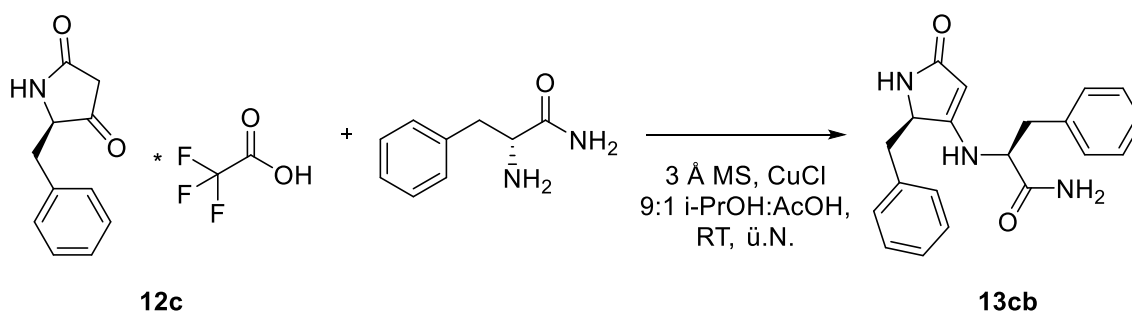
¹H-NMR: (500 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 7,28 (d, J = 6,7 Hz, 5H); 7,21 (d, J = 6,5 Hz, 1H); 4,54 (s, 1H); 4,02 (s, 1H); 3,95 – 3,91 (m, 1H); 3,20 (dd, J = 13,9; 4,7 Hz, 2H); 1,90 – 1,81 (m, 1H); 0,98 (d, J = 7,0 Hz, 3H); 0,28 (d, J = 6,7 Hz, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 138,66; 130,15; 129,52; 127,85; 110,99; 88,33; 64,11; 61,35; 39,50; 31,50; 20,50; 13,62.

pyen-Phe-D-Phe-NH₂ (13cb)



Allgemeine Vorschrift VIII wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

12c (150,00 mg; 494,67 μmol), D-Phenylalaninamid (80,00 mg; 487,20 μmol) und CuCl (10,00 mg; 101,01 μmol) in 7 ml iPrOH:AcOH 9:1. Es wurde über Silica (EtOAc:MeOH 95:5-9:1) getrennt.

Aussehen: braunes, amorpher Feststoff

Ausbeute: 104,00 mg (310,08 μmol) \rightarrow 63 %

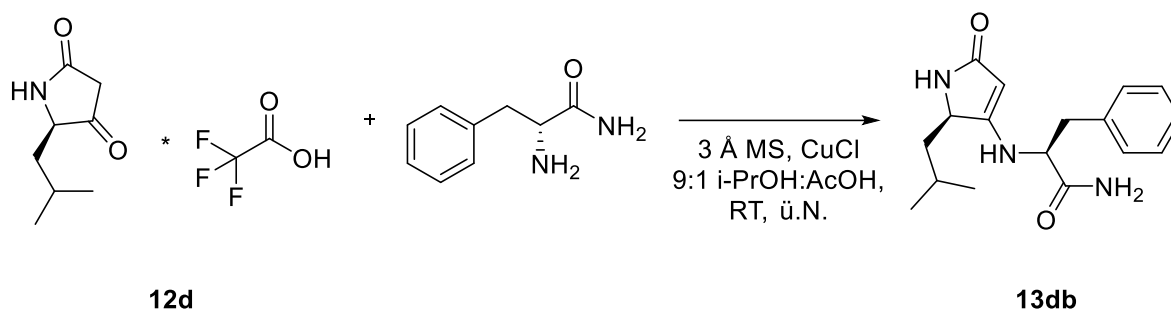
¹H-NMR: (500 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 8,95 – 8,90 (m, 4H); 8,84 – 8,81 (m, 1H); 8,66 – 8,59 (m, 3H); 8,35 (d, $J = 6,9$ Hz, 2H); 5,95 (s, 1H); 5,88 (t, $J = 5,0$ Hz, 1H); 5,48 (dd, $J = 9,8; 4,5$ Hz, 1H); 4,78 (dd, $J = 13,9; 4,7$ Hz, 1H); 4,57 – 4,50 (m, 2H); 4,17 (dd, $J = 13,8; 5,8$ Hz, 1H)

¹³C-NMR: (126 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 176,71; 138,83; 136,63; 130,80; 130,42; 129,71; 128,94; 128,08; 127,42; 59,49; 39,63; 39,53.

pyen-Leu-D-Phe-NH₂ (13db)



Allgemeine Vorschrift VIII wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

12d (150,00 mg; 557,17 μmol), D-Phenylalaninamid (90,00 mg; 548,10 μmol) und CuCl (11,00 mg; 111,11 μmol) in 7 ml iPrOH:AcOH 9:1. Es wurde über Silica (EtOAc:MeOH 95:5-9:1) getrennt.

Aussehen: oranger, amorpher Feststoff

Ausbeute: 126,00 mg (418,07 μmol) \rightarrow 75 %, dr: 1:5

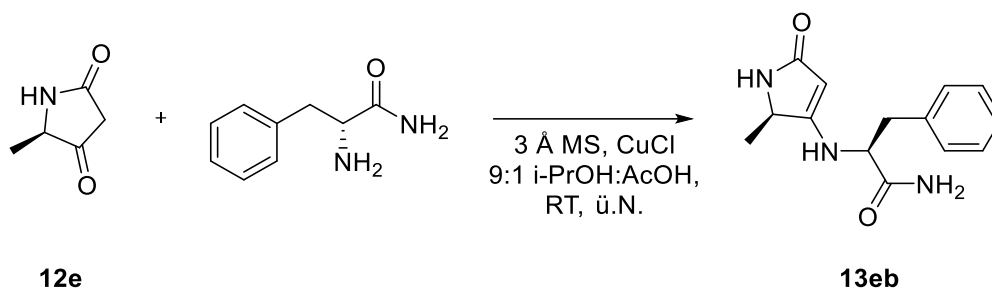
¹H-NMR: (500 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 7,33 (d, $J = 5,9$ Hz, 1H); 7,28 (d, $J = 4,4$ Hz, 4H); 7,24 – 7,20 (m, 1H); 4,53 (s, 1H); 4,11 (dd, $J = 9,7; 3,1$ Hz, 1H); 3,97 (dd, $J = 9,5; 5,2$ Hz, 1H); 3,21 (dd, $J = 13,9; 5,2$ Hz, 1H); 2,95 (dd, $J = 13,9; 9,6$ Hz, 1H); 1,42 (ddd, $J = 13,4; 9,9; 3,2$ Hz, 1H); 1,11 (ddd, $J = 13,8; 9,8; 4,1$ Hz, 1H); 1,00 – 0,96 (m, 1H); 0,91 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H); 0,82 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 176,57; 169,80; 169,73; 138,53; 130,51; 130,28; 129,90; 129,46; 128,44; 127,85; 87,26; 61,17; 57,68; 57,65; 44,06; 39,36; 26,09; 24,35; 21,82.

pyen-Ala-D-Phe-NH₂ (13eb)



Allgemeine Vorschrift VIII wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

12e (150,00 mg; 1,33 mmol), D-Phenylalaninamid (210,00 mg; 1,28 mmol) und CuCl (26,00 mg; 262,63 μ mol) in 7 ml iPrOH:AcOH 9:1. Es wurde über Silica (EtOAc:MeOH 95:5-9:1) getrennt.

Aussehen: brauner, amorpher Feststoff

Ausbeute: 156,00 mg (601,61 μ mol) \rightarrow 45 %

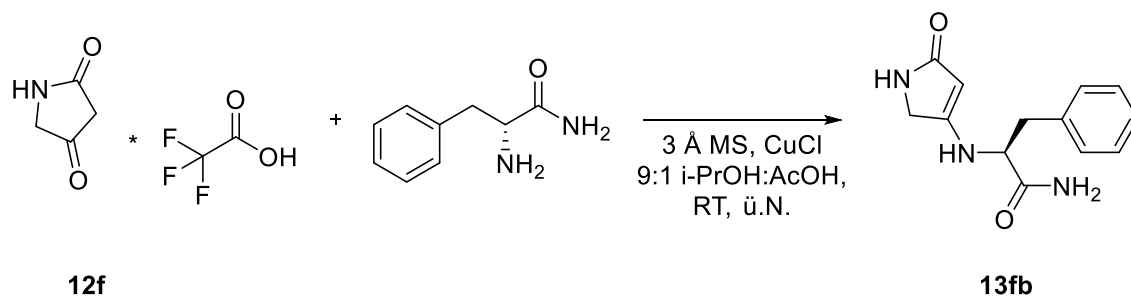
¹H-NMR: (500 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 7,33 (s, 1H); 7,28 (d, J = 4,4 Hz, 4H); 7,21 (dq; J = 8,6; 4,1 Hz, 1H); 4,49 (s, 1H); 4,07 (q; J = 6,7 Hz, 1H); 3,97 (dd, J = 9,2; 5,4 Hz, 1H); 3,19 (dd, J = 13,8; 5,3 Hz, 1H); 2,95 (dd, J = 13,9; 9,2 Hz, 1H); 1,14 (d, J = 6,7 Hz, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 178,88; 176,38; 170,33; 138,45; 130,30; 129,42; 127,84; 86,71; 60,97; 54,76; 49,85; 39,40; 19,76.

pyen-Gly-D-Phe-NH₂ (13fb)



Allgemeine Vorschrift VIII wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

12f (150,00 mg; 703,86 μmol), D-Phenylalaninamid (115,00 mg; 700,35 μmol) und CuCl (14,00 mg; 141,42 μmol) in 7 ml iPrOH:AcOH 9:1. Es wurde über Silica (EtOAc:MeOH 95:5-9:1) getrennt.

Aussehen: brauner, amorpher Feststoff

Ausbeute: 26 mg (106,00 μmol) \rightarrow 15 %

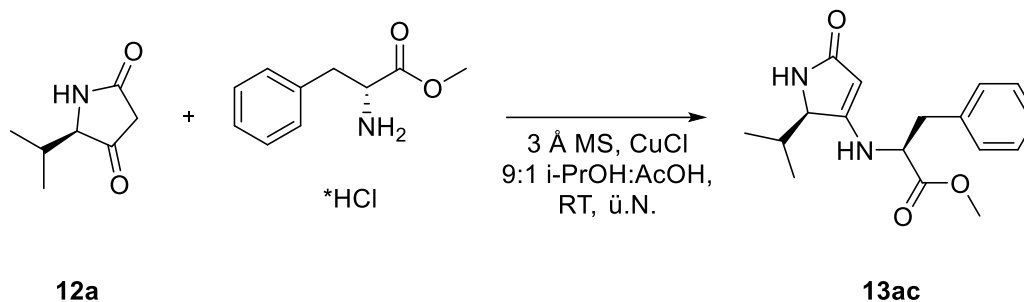
¹H-NMR: (500 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 7,39 – 7,16 (m, 7H); 3,91 (bs, 1H); 3,16 (s, 1H); 2,94 (s, 1H); 1,97 (s, 1H).

¹³C-NMR: (126 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 137,58; 130,47; 129,78; 128,22; 49,85.

pyen-Val-D-Phe-OMe (13ac)



Allgemeine Vorschrift VIII wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

12a (150,00 mg; 1,06 mmol), D-Phenylalaninmethylester*HCl (230,00 mg; 1,07 mmol) und CuCl (20,00 mg; 202,02 μmol) in 7 ml iPrOH:AcOH 9:1. Es wurde über Silica (DCM:MeOH 8:2-9:2, EtOAc:MeOH 9:1) getrennt.

Aussehen: brauner, amorpher Feststoff

Ausbeute: 218,00 mg (720,98 μmol) \rightarrow 68 %

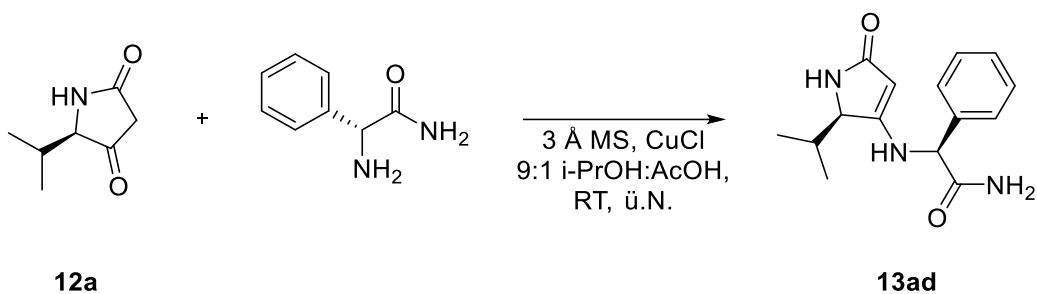
$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CD_3OD):

δ [ppm] = 7,26 (p; $J = 7,2$ Hz, 5H); 4,49 (s, 1H); 4,08 (dd, $J = 9,9; 4,9$ Hz, 1H); 4,01 – 3,96 (m, 1H); 3,72 (s, 3H); 3,21 (dd, $J = 13,8; 4,8$ Hz, 1H); 2,99 – 2,93 (m, 1H); 1,88 (dd, $J = 11,8; 6,6$ Hz, 1H); 0,99 (d, $J = 7,0$ Hz, 3H); 0,31 (d, $J = 6,7$ Hz, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (126 MHz, CD_3OD):

δ [ppm] = 173,86; 138,29; 130,19; 130,15; 129,54; 127,93; 64,14; 60,35; 52,76; 38,63; 31,57; 20,61; 13,54.

pyen-Val-D-PG-NH₂ (13ad)



Allgemeine Vorschrift VIII wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

12a (200,00 mg; 1,42 mmol), D-Phenylglycinamid (215,00 mg; 1,43 mmol) und CuCl (28,00 mg; 282,83 μ mol) in 7 ml iPrOH:AcOH 9:1. Es wurde über Silica (EtOAc:MeOH 95:5-9:1) getrennt.

Aussehen: brauner, amorpher Feststoff

Ausbeute: 124,00 mg (453,66 μ mol) \rightarrow 32 %

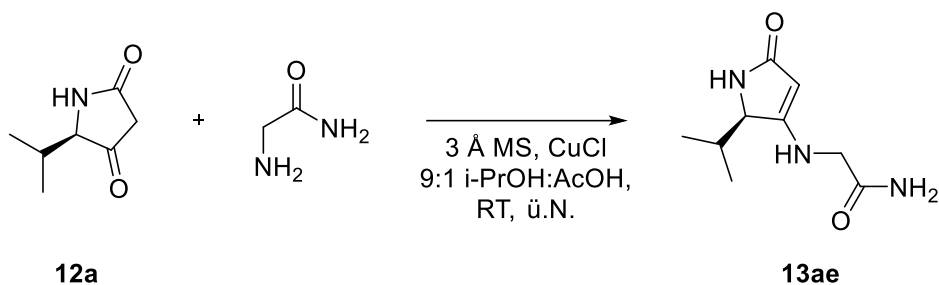
¹H-NMR: (500 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 7,49 (d, J = 7,0 Hz, 2H); 7,38 (dt, J = 12,2; 6,9 Hz, 3H); 4,88 (s, 1H); 4,53 (s, 1H); 4,15 (d, J = 2,0 Hz, 1H); 2,50 (bs, 1H); 2,18 – 2,11 (m, 1H); 1,08 (d, J = 6,9 Hz, 3H); 0,62 (d, J = 6,7 Hz, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 174,54; 167,27; 138,94; 129,83; 129,54; 128,55; 64,02; 63,08; 31,60; 20,60; 13,92.

pyen-Val-Gly-NH₂ (13ae)



Allgemeine Vorschrift VIII wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

12a (150,00 mg; 1,06 mmol), Glycinamid (80,00 mg; 1,08 mmol) und CuCl (21,00 mg; 212,12 μ mol) in 7 ml iPrOH:AcOH 9:1. Es wurde über Silica (EtOAc:MeOH 95:5-9:1) getrennt.

Aussehen: brauner, amorpher Feststoff

Ausbeute: 73,00 mg (370,12 μ mol) \rightarrow 35 %

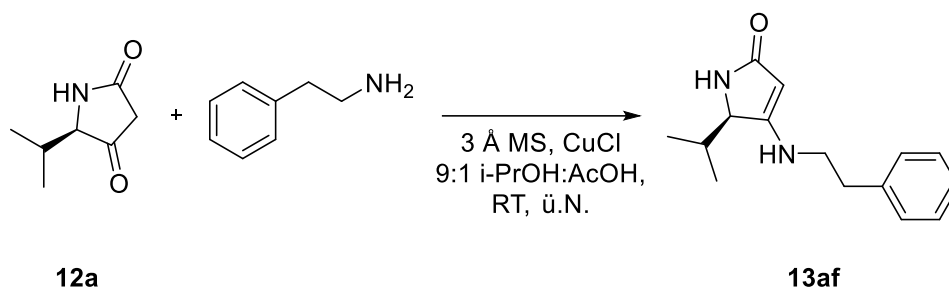
¹H-NMR: (500 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 4,12 (d, J = 2,4 Hz, 1H); 3,75 (q; J = 16,9 Hz, 2H); 2,14 – 2,06 (m, 1H); 1,09 (d, J = 7,0 Hz, 3H); 0,74 (d, J = 6,7 Hz, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 173,98; 64,02; 49,85; 47,95; 31,36; 20,59; 14,07.

pyen-Val-Phenylethylamin (13af)



Allgemeine Vorschrift VIII wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

12a (150,00 mg; 1,06 mmol), 2-Phenylethylamine (200,00 μ l; 1,58 mmol) und CuCl (20,00 mg; 202,02 μ mol) in 7 ml iPrOH:AcOH 9:1. Es wurde über Silica (EtOAc:MeOH 97,5:2,5-95:5) getrennt.

Aussehen: braunes Öl

Ausbeute: 234,00 mg (957,71 μ mol) \rightarrow 90 %

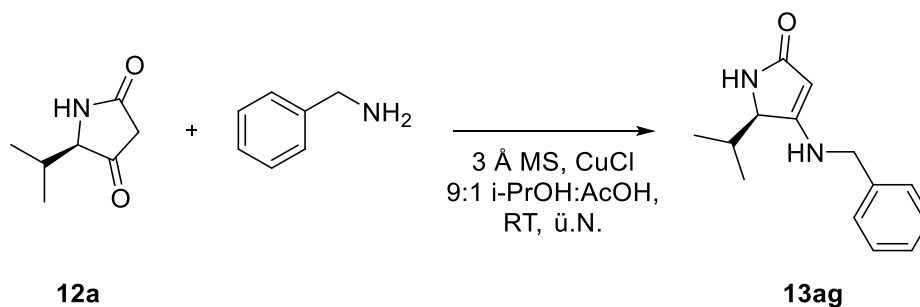
$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CD_3OD):

δ [ppm] = 7,28 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H); 7,23 (d, $J = 7,1$ Hz, 2H); 7,18 (t, $J = 7,2$ Hz, 1H); 3,99 (s, 1H); 2,87 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H); 2,39 (bs, 4H); 2,03 – 1,97 (m, 1H); 1,04 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H); 0,63 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (126 MHz, CD_3OD):

δ [ppm] = 140,43; 129,79; 129,53; 127,41; 47,10; 35,62; 31,47; 20,62; 13,88.

pyen-Val-Benzylamin (13ag)



Allgemeine Vorschrift VIII wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

12a (150,00 mg; 1,06 mmol), Benzylamin (200,00 μ l; 1,83 mmol) und CuCl (20,00 mg; 202,02 μ mol) in 7 ml iPrOH:AcOH 9:1. Es wurde über Silica (EtOAc:MeOH 97,5:2,5-95:5) getrennt.

Aussehen: brauner, amorpher Feststoff

Ausbeute: 184,00 mg (798,94 μ mol) \rightarrow 75 %

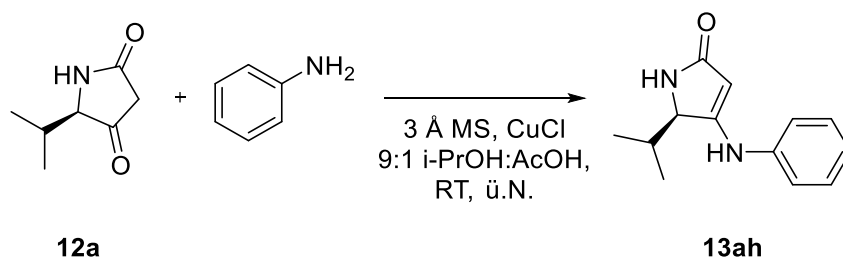
$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CD_3OD):

δ [ppm] = 7,43 b(s, 1H); 7,31 (d, $J = 4,3$ Hz, 4H); 7,24 (dq; $J = 8,4; 4,0$ Hz, 1H); 4,25 (s, 2H); 4,06 (s, 1H); 2,17 – 2,08 (m, 1H); 1,07 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H); 0,68 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (126 MHz, CD_3OD):

δ [ppm] = 139,46; 130,22; 129,57; 128,53; 128,38; 64,32; 31,50; 20,71; 13,95.

pyen-Val-Anilin (13ah)



Allgemeine Vorschrift VIII wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

12a (150,00 mg; 1,06 mmol), Anilin (100,00 μ l; 1,10 mmol) und CuCl (20,00 mg; 202,02 μ mol) in 7 ml iPrOH:AcOH 9:1. Es wurde über Silica (EtOAc:MeOH 97,5:2,5-95:5) getrennt.

Aussehen: brauner, amorpher Feststoff

Ausbeute: 187,00 mg (864,62 μ mol) \rightarrow 81 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CD_3OD):

δ [ppm] = 7,33 (t, $J = 7,8$ Hz, 2H); 7,17 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H); 7,05 (t, $J = 7,4$ Hz, 1H); 5,20 (s, 1H); 4,21 (s, 1H); 2,42 (bs, 1H); 2,23 (dq; $J = 11,0$; 6,1 Hz, 1H); 1,15 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H); 0,77 (d, $J = 6,7$ Hz, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (126 MHz, CD_3OD):

δ [ppm] = 142,34; 130,35; 124,27; 120,45; 120,40; 64,86; 31,61; 20,82; 13,76.

Synthese der Coaktivatoren 14aa-fb (allgemeine Vorschrift IX)¹³⁸

Pyrrolidin-2,4-dion-enamin **13aa-ag/aa-fb** und 6 eq. NaCNBH₃ wurden in 10 ml einer trockenen 9:1 MeOH:AcOH-Lösung über zwei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung in 20 ml destilliertes Wasser gegeben und dreimal mit 50 ml DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel abgezogen. Das Rohprodukt wurde über eine präparative HPLC (C18-Säule; Acetonitril:Wasser 5:95-100:0 in 30 Minuten) getrennt. Die Nomenklatur erfolgte analog zur Literatur bzw. der Bausteine.^{137, 138}

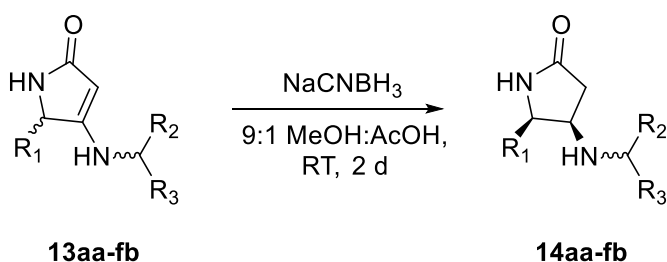
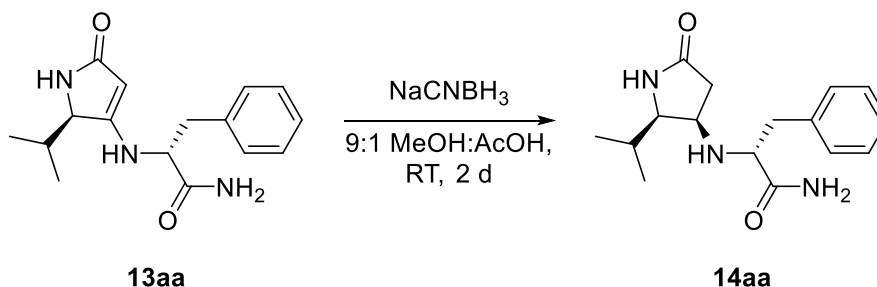


Abb. 7.14. Generelles Reaktionsschema der allgemeinen Vorschrift IX für die Synthese der Coaktivatoren 14aa-fa.¹³⁸ R₁ = *R*-Isopropyl; R₂ = *R*-Phenylalaninamid (**14aa**), R₁ = *R*-Isopropyl; R₂ = *S*-Phenylalaninamid (**14ab**), R₁ = *S*-Isopropyl; R₂ = *S*-Phenylalaninamid (**14bb**), R₁ = *S*-Isopropyl; R₂ = *R*-Phenylalaninamid (**14ba**), R₁ = *R*-Benzyl; R₂ = *S*-Phenylalaninamid (**14cb**), R₁ = *R*-Isobutyl; R₂ = *S*-Phenylalaninamid (**14db**), R₁ = *R*-Methyl; R₂ = *S*-Phenylalaninamid (**14eb**), R₁ = H; R₂ = *S*-Phenylalaninamid (**14fb**), R₁ = *R*-Isopropyl; R₂ = *S*-Phenylalaninamidmethylester (**14ac**), R₁ = *R*-Isopropyl; R₂ = *S*-Phenylglycinamid (**14ad**), R₁ = *R*-Isopropyl; R₂ = *S*-Glycinamid (**14ae**), R₁ = *R*-Isopropyl; R₂ = Phenylethyl (**14af**), R₁ = *R*-Isopropyl; R₂ = Benzyl (**14ag**), R₁ = *R*-Isopropyl; R₂ = Phenyl (**14ah**).

py-Val-Phe-NH₂ (14ab)



Allgemeine Vorschrift IX wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

13ab (304,00 mg; 1,06 mmol) und NaCNBH₃ (403,00 mg; 6,41 μmol).

Aussehen: weißer, amorpher Feststoff

Ausbeute: 306,00 mg (1,06 mmol) → quant.

¹H-NMR: (500 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 7,42 – 7,29 (m, 5H); 4,16 – 4,11 (m, 1H); 3,71 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H); 3,61 (d, *J* = 5,5 Hz, 1H); 3,27 – 3,12 (m, 3H); 2,92 – 2,82 (m, 1H); 2,50 (d, *J* = 18,4 Hz, 1H); 1,86 (d, *J* = 6,4 Hz, 1H); 1,37 – 1,29 (m, 2H); 0,99 (dd, *J* = 26,4; 6,8 Hz, 6H).

¹³C-NMR: (126 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 179,17; 178,13; 138,28; 129,47; 128,56; 126,80; 63,56; 55,95; 40,17; 37,89; 27,82; 19,36; 17,39.

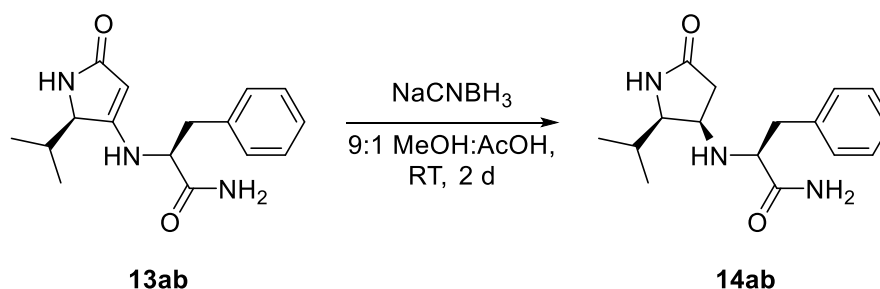
HRMS (ESI +): [M+H]⁺

berechnet: *m/z* = 289,3790

gefunden: *m/z* = 290,1861

[α]²⁰_D (c 5,39; MeOH): 7,394

py-Val-D-Phe-NH₂ (14ab)



Allgemeine Vorschrift IX wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

13ab (221,00 mg; 769,08 μmol) und NaCNBH_3 (290,00 mg; 4,61 mmol).

Aussehen: weißer, amorpher Feststoff

Ausbeute: 137,00 mg (473,44 μmol) \rightarrow 62 %

¹H-NMR: (500 MHz, CD_3OD):

δ [ppm] = 7,38 – 7,29 (m, 5H); 4,04 – 4,00 (m, 1H); 3,84 (tt, $J = 5,5; 2,7$ Hz, 1H); 3,58 (dd, $J = 9,2; 5,3$ Hz, 1H); 3,20 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H); 2,78 (dd, $J = 17,6; 7,1$ Hz, 1H); 2,51 (dd, $J = 17,6; 2,5$ Hz, 1H); 2,02 (ddt, $J = 13,0; 9,1; 6,5$ Hz, 1H); 1,09 (t, $J = 6,9$ Hz, 6H).

¹³C-NMR: (126 MHz, CD_3OD):

δ [ppm] = 175,64; 135,16; 129,55; 128,87; 127,60; 63,65; 61,19; 56,21; 37,10; 35,25; 27,47; 19,10; 18,72.

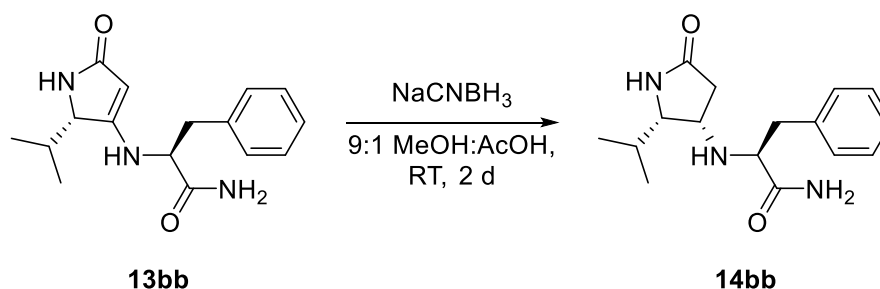
HRMS (ESI +): $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 290,18630$

gefunden: $m/z = 290,18658$

$[\alpha]^{20}_{\text{D}}$ (c 1,04; MeOH): 7,26

py-D-Val-D-Phe-NH₂ (14bb)



Allgemeine Vorschrift IX wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

13bb (100,00 mg; 348,00 μ mol) und NaCNBH₃ (130,00 mg; 2,07 mmol).

Aussehen: weißer, amorpher Feststoff

Ausbeute: 48,10 mg (166,22 μ mol) \rightarrow 48 %

¹H-NMR: (500 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 7,39 – 7,30 (m, 5H); 3,96 (q; J = 8,1 Hz, 1H); 3,89 (t, J = 7,5 Hz, 1H); 3,64 (dd, J = 6,8; 4,6 Hz, 1H); 3,17 (d, J = 7,5 Hz, 2H); 2,52 (qd, J = 16,8; 8,3 Hz, 2H); 1,84 (d, J = 4,8 Hz, 1H); 0,92 (dd, J = 11,0; 6,7 Hz, 6H).

¹³C-NMR: (126 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 175,53; 135,55; 129,55; 128,93; 127,59; 62,86; 61,85; 56,17; 37,68; 34,99; 27,89; 19,89; 16,92.

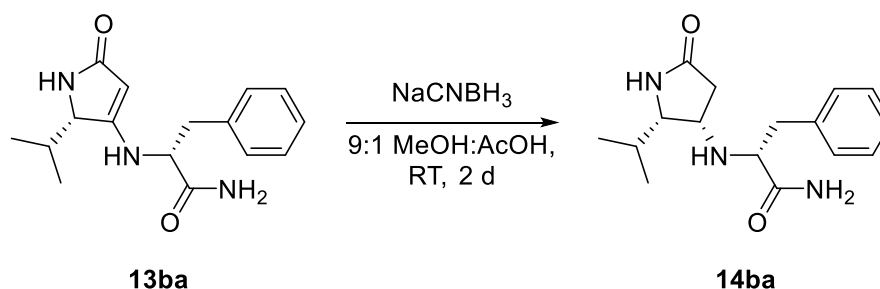
HRMS (ESI +): C₁₆H₂₃N₃O₂ [M+H]⁺

berechnet: m/z = 290,18630

gefunden: m/z = 290,18641

$[\alpha]^{20}_D$ (c 5,46; MeOH): -8,23

py-D-Val-Phe-NH₂ (14ba)



Allgemeine Vorschrift IX wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

13ba (100,00 mg; 348,00 μ mol) und NaCNBH₃ (130,00 mg; 2,07 mmol).

Aussehen: weißer, amorpher Feststoff

Ausbeute: 79,00 mg (273,00 μ mol) \rightarrow 78 %

¹H-NMR: (500 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 7,36 – 7,26 (m, 5H); 4,00 (dd, J = 14,4; 6,3 Hz, 1H); 3,82 (ddd, J = 7,3; 5,5; 2,6 Hz, 1H); 3,56 (dd, J = 9,2; 5,3 Hz, 1H); 3,18 (d, J = 7,7 Hz, 2H); 2,77 (dd, J = 17,6; 7,1 Hz, 1H); 2,50 (dd, J = 17,6; 2,5 Hz, 1H); 2,00 (ddd, J = 13,1; 6,5; 2,7 Hz, 1H); 1,10 – 1,03 (m, 6H).

¹³C-NMR: (126 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 175,56; 135,07; 129,56; 128,88; 127,62; 63,63; 61,17; 56,26; 48,84; 37,00; 35,17; 27,46; 19,13; 18,71.

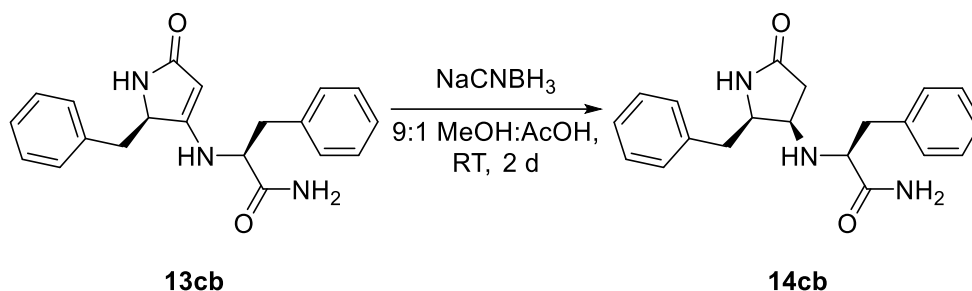
HRMS (ESI +): [M+H]⁺

berechnet: m/z = 290,18630

gefunden: m/z = 290,18645

$[\alpha]^{20}_D$ (c 9,35; MeOH): -4,73

***py*-Phe-D-Phe-NH₂ (13cb)**



Allgemeine Vorschrift IX wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

13cb (84,00 mg; 250,45 μ mol) und NaCNBH₃ (95,00 mg; 1,51 mmol).

Aussehen: weißer, amorpher Feststoff

Ausbeute: 15,00 mg (44,46 μ mol) \rightarrow 18 %

¹H-NMR: (500 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 7,40 – 7,23 (m, 10H); 4,19 – 4,04 (m, 3H); 3,37 – 3,34 (m, 1H); 3,24 – 3,11 (m, 2H); 2,89 – 2,63 (m, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 173,22; 169,25; 136,44; 134,21; 129,23; 128,97; 128,59; 128,56; 127,37; 126,78; 61,32; 56,96; 54,74; 36,50; 35,64; 32,19.

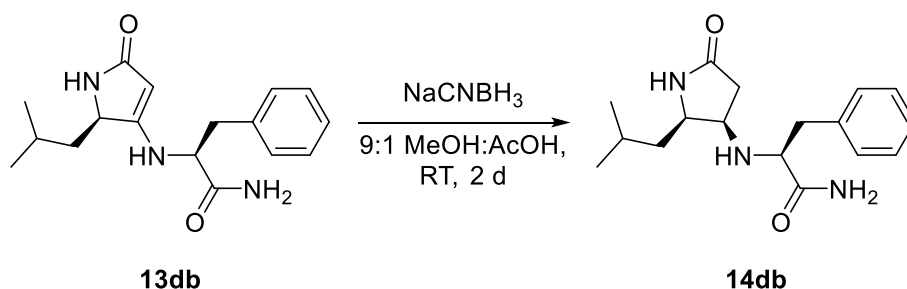
HRMS (ESI +): C₂₀H₂₃N₃O₂ [M+H]⁺

berechnet: m/z = 338,18630

gefunden: m/z = 338,18670

$[\alpha]^{20}_D$ (c 1,85; MeOH): -46,32

py-Leu-D-Phe-NH₂ (14db)



Allgemeine Vorschrift IX wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

13db (106,00 mg; 351,71 μmol) und NaCNBH_3 (135,00 mg; 2,15 mmol).

Aussehen: weißer, amorpher Feststoff mit unbekannter Verunreinigung

Ausbeute: 48,00 mg (158,21 μmol) \rightarrow 45 %

¹H-NMR: (500 MHz, CD_3OD):

δ [ppm] = 7,35 – 7,27 (m, 5H); 4,01 (ddd, $J = 21,9; 10,8, 4,6$ Hz, 2H); 3,30 (dd; $J = 13,5; 4,1$ Hz, 1H); 3,16 (dd; $J = 12,8, 10,6$ Hz, 1H); 2,72 – 2,62 (m, 2H); 1,84 – 1,37 (m, 3H); 1,06 – 0,95 (m, 6H).

¹³C-NMR: (126 MHz, CD_3OD):

δ [ppm] = 173,51; 169,05; 134,22; 129,21; 128,51; 127,32; 61,11; 54,89; 53,37; 37,80; 36,31; 32,28; 24,20; 22,97; 19,51.

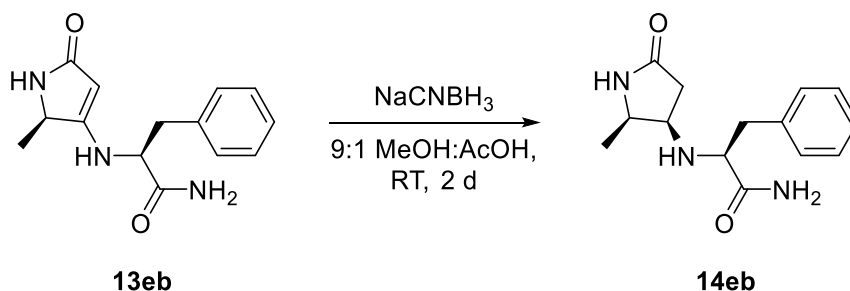
HRMS (ESI +): $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 304,20195$

gefunden: $m/z = 304,20224$

$[\alpha]^{20}_{\text{D}}$ (c 4,99; MeOH): -19,36

***py*-Ala-D-Phe-NH₂ (14eb)**



Allgemeine Vorschrift IX wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

13eb (136,00 mg; 524,48 μmol) und NaCNBH₃ (200,00 mg; 3,18 mmol).

Aussehen: weißer, amorpher Feststoff

Ausbeute: 5,00 mg (19,13 μmol) → 4 %

¹H-NMR: (500 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 7,39 – 7,27 (m, 5H); 4,09 – 3,94 (m, 3H); 3,28 – 3,13 (m, 2H); 2,72 – 2,53 (m, 2H); 1,36 (d, *J* = 6,6 Hz, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 173,12; 168,88; 134,09; 129,19; 128,57; 127,40; 60,93; 54,67; 51,04; 36,25; 32,20; 14,31.

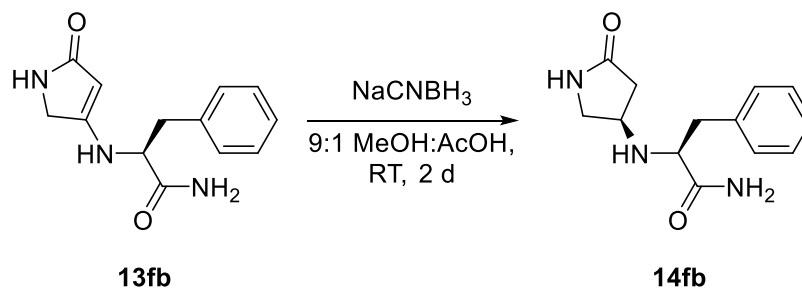
HRMS (ESI +): C₁₄H₁₉N₃O₂ [M+H]⁺

berechnet: *m/z* = 262,15500

gefunden: *m/z* = 262,15519

[α]²⁰_D (c 0,625; MeOH): 12,8

***py*-Gly-D-Phe-NH₂ (14fb)**



Allgemeine Vorschrift IX wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

13fb (114,00 mg; 464,78 μ mol) und NaCNBH₃ (175,00 mg; 2,78 mmol).

Aussehen: gelber, amorpher Feststoff

Ausbeute: 70,00 mg (283,06 μ mol) \rightarrow 61 %

¹H-NMR: (500 MHz, CD₃OD):

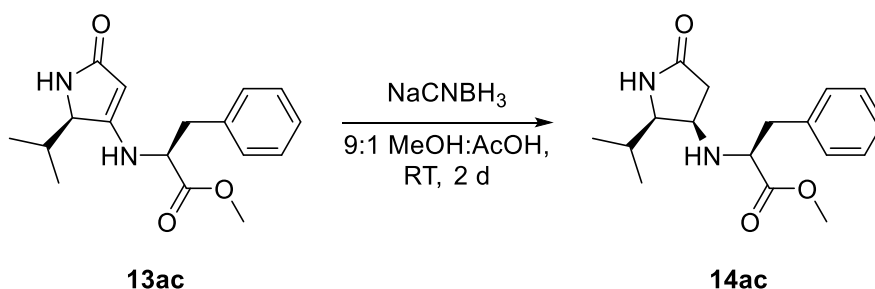
δ [ppm] = 7,38 – 7,29 (m, 5H); 4,92 (s, 5H); 4,18 – 4,12 (m, 1H); 3,16 (m; 2H).

¹³C-NMR: (126 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 170,56; 134,27; 129,12; 128,65; 127,39; 54,16; 37,15.

$[\alpha]^{20}_D$ (c 8,78; MeOH): -11,30

***py*-Val-D-Phe-O-Me (14ac)**



Allgemeine Vorschrift IX wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

13ac (200,00 mg; 661,45 μmol) und NaCNBH_3 (250,00 mg; 3,98 mmol).

Aussehen: grüner, amorpher Feststoff

Ausbeute: 96,00 mg (315,39 μmol) \rightarrow 48 %

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CD_3OD):

δ [ppm] = 7,37 – 7,23 (m, 5H); 4,15 (dd, $J = 9,2; 6,0$ Hz, 1H); 3,85 (td, $J = 6,9; 3,6$ Hz, 1H); 3,61 (s, 3H); 3,53 (dd, $J = 8,5; 5,6$ Hz, 1H); 3,29 – 3,13 (m, 2H); 2,71 – 2,47 (m, 2H); 2,01 – 1,94 (m, 1H); 1,06 (d, $J = 6,5$ Hz, 6H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (126 MHz, CD_3OD):

δ [ppm] = 175,69; 170,53; 134,92; 128,93; 128,36; 127,11; 63,33; 60,31; 55,82; 51,74; 36,86; 35,20; 27,15; 18,51; 18,42.

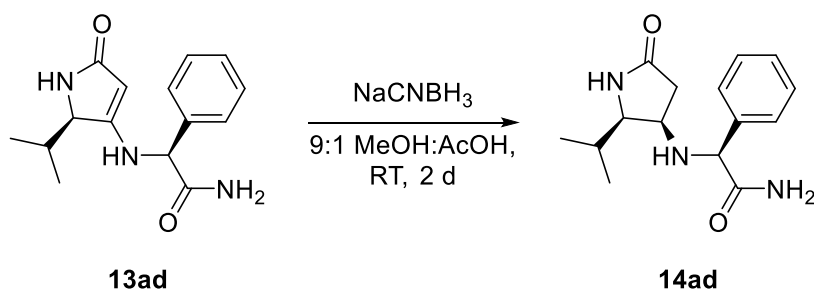
HRMS (ESI +): $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 305,18597$

gefunden: $m/z = 305,18599$

$[\alpha]^{20}_{\text{D}}$ (c 11,74; MeOH): 0,755

***py*-Val-D-PG-NH₂ (14ad)**



Allgemeine Vorschrift IX wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

13ad (103,00 mg; 376,83 μmol) und NaCNBH_3 (142,00 mg; 2,26 mmol).

Aussehen: weißer, amorpher Feststoff

Ausbeute: 15,00 mg (54,48 μmol) \rightarrow 15 %

¹H-NMR: (500 MHz, CD_3OD):

δ [ppm] = 7,61 (dd, $J = 6,4$; 2,8 Hz, 2H); 7,50 (dd, $J = 5,1$; 1,5 Hz, 3H); 5,03 (s, 1H); 4,08 – 4,05 (m, 1H); 3,64 (dd, $J = 7,9$; 6,0 Hz, 1H); 2,74 (dd, $J = 17,5$; 7,6 Hz, 1H); 2,55 (dd, $J = 17,6$; 4,1 Hz, 1H); 2,07 (dq, $J = 13,4$; 6,6 Hz, 1H); 1,15 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H); 1,06 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, CD_3OD):

δ [ppm] = 174,59; 168,75; 131,69; 130,14; 129,13; 128,91; 63,45; 62,59; 56,92; 34,80; 27,10; 18,90; 18,30.

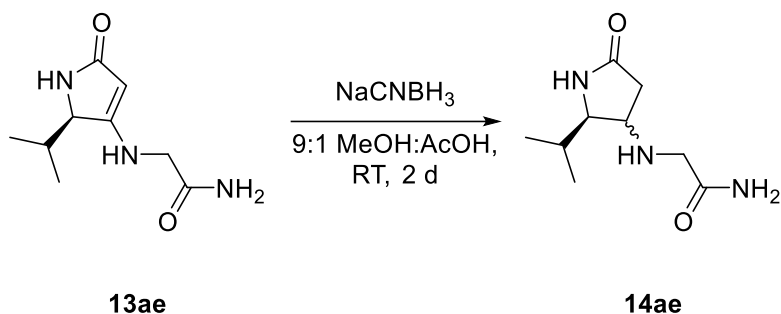
HRMS (ESI +): $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

berechnet: $m/z = 276,17080$

gefunden: $m/z = 276,17065$

$[\alpha]^{20}_{\text{D}}$ (c 1,8; MeOH): -40,76

***py*-Val-D-Gly-NH₂ (14ae)**



Allgemeine Vorschrift IX wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

13ae (56 mg; 283,93 μ mol) und NaCNBH₃ (110,00 mg; 1,75 mmol).

Aussehen: weißer, amorpher Feststoff eines Diastereomerengemisches

Ausbeute: 37,00 mg (185,70 μ mol) \rightarrow 65 %

¹H-NMR: (500 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 4,17 (s, 1H); 3,91 (s, 2H); 3,66 (s, 1H); 2,93 (d, J = 7,0 Hz, 1H); 2,84 – 2,47 (m, 2H); 1,93 (dt, J = 13,6; 6,7 Hz, 1H); 1,12 (dd, J = 22,8; 6,3 Hz, 6H); 0,98 (dd, J = 24,0; 6,8 Hz, 1H).

¹³C-NMR: (126 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 174,89; 167,13; 157,72; 157,39; 115,77; 113,51; 62,59; 45,63; 35,60; 31,90; 30,26; 27,29; 18,50; 18,47; 17,49; 15,74.

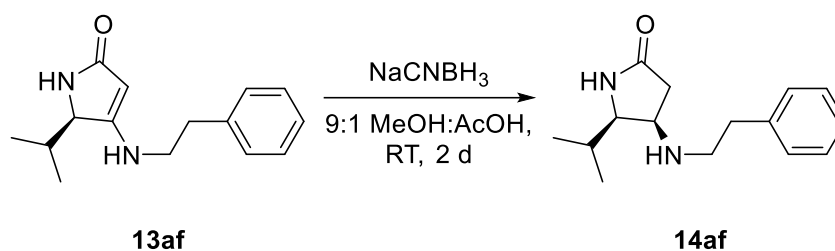
HRMS (ESI +): C₉H₁₇N₃O₂ [M+H]⁺

berechnet: m/z = 200,13935

gefunden: m/z = 200,13982

$[\alpha]^{20}_D$ (c 4,8; MeOH): 2,45

py-Val-Phenylethylamin (14af)



Allgemeine Vorschrift IX wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

13af (214,00 mg; 875,86 μ mol) und NaCNBH₃ (330,00 mg; 5,25 mmol).

Aussehen: weißer, amorpher Feststoff

Ausbeute: 54,00 mg (219,20 μ mol) \rightarrow 25 %

¹H-NMR: (500 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 7,38 – 7,26 (m, 5H); 4,22 – 4,16 (m, 1H); 3,72 (t, J = 6,5 Hz, 1H); 3,42 – 3,27 (m, 3H); 3,09 (m, 2H); 2,82 – 2,65 (m, 2H); 1,98 (h, J = 6,6 Hz, 1H); 1,06 (dd, J = 13,7; 6,6 Hz, 6H).

¹³C-NMR: (126 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 174,64; 136,26; 128,65; 128,61; 128,43; 127,01; 126,94; 61,82; 55,99; 48,18; 48,15; 47,98; 47,81; 47,64; 47,47; 47,30; 47,13; 33,48; 31,42; 27,17; 19,37; 17,54.

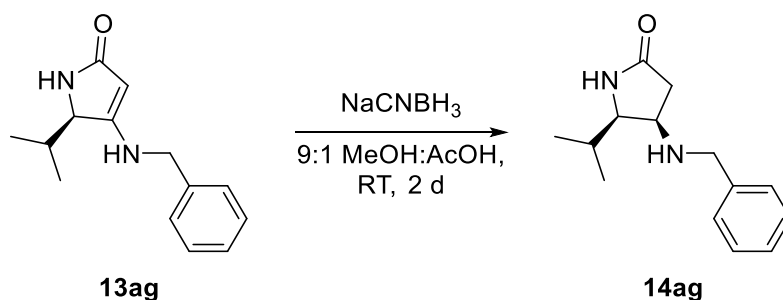
HRMS (ESI +): C₁₅H₂₂N₂O [M+H]⁺

berechnet: m/z = 247,18049

gefunden: m/z = 247,18086

$[\alpha]^{20}_D$ (c 5,15; MeOH): 10,5

py-Val-Benzylamin (14ag)



Allgemeine Vorschrift IX wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

13ag (184,00 mg; 798,94 μ mol) und NaCNBH₃ (303,00 mg; 4,82 mmol).

Aussehen: weißer, amorpher Feststoff

Ausbeute: 66,00 mg (284,09 μ mol) \rightarrow 36 %

¹H-NMR: (500 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 7,57 (dd, J = 6,4, 2,9 Hz, 2H); 7,51 – 7,45 (m, 3H); 4,47 – 4,27 (m, 2H); 3,95 (q, J = 6,6; 6,2 Hz, 1H); 3,66 – 3,56 (m, 1H); 2,82 – 2,61 (m, 2H); 1,93 (dq, J = 13,2; 6,6 Hz, 1H); 1,04 (d, J = 6,5 Hz, 3H); 0,89 (d, J = 6,6 Hz, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 174,63; 130,17; 129,93; 129,69; 129,07; 61,84; 54,71; 49,83; 48,46; 33,63; 27,11; 18,92; 17,68.

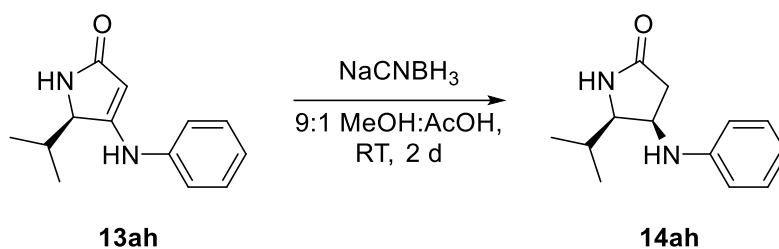
HRMS (ESI +): C₁₄H₂₀N₂O [M+H]⁺

berechnet: m/z = 233,16484

gefunden: m/z = 233,16500

$[\alpha]^{20}_D$ (c 5,39; MeOH): 12,83

py-Val-Anilin (14ah)



Allgemeine Vorschrift IX wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

13ah (175,00 mg; 809,14 μ mol) und NaCNBH₃ (305,00 mg; 4,85 mmol).

Aussehen: weißer, amorpher Feststoff

Ausbeute: 132,00 mg (604,69 μ mol) \rightarrow 75 %

¹H-NMR: (500 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 7,17 – 7,12 (m, 2H); 6,67 (m, 3H); 4,31 (q; J = 6,7 Hz, 1H); 3,69 (t; J = 6,4 Hz, 1H); 2,66 – 2,34 (m, 2H); 1,93 (dq, J = 13,3; 6,6 Hz, 1H); 1,01 (d; J = 6,6 Hz, 3H); 0,92 (d; J = 6,8 Hz, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 177,62; 147,19; 128,88; 117,12; 112,63; 63,56; 51,76; 37,37; 27,76; 18,95; 17,48.

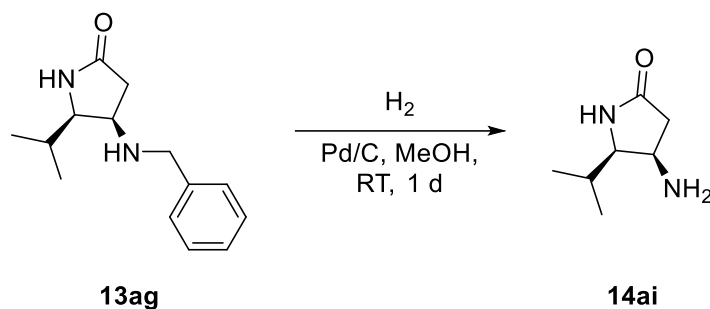
HRMS (ESI +): C₁₃H₁₈N₂O [M+H]⁺

berechnet: m/z = 219,14919

gefunden: m/z = 219,14975

$[\alpha]^{20}_D$ (c 14,06; MeOH): 0,38

py-Val-Amin (14ai)



13ag (8,00 mg; 34,44 μ mol) und 10% Pd/C (10,00 mg; 15,91 mmol) wurden unter H₂ Atmosphäre in trockenem Methanol für einen Tag bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde über Celite gefiltert und das Lösemittel entfernt.

Aussehen: weißes Öl

Ausbeute: 4,00 mg (28,13 μ mol) \rightarrow 82 %

¹H-NMR: (500 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 3,75 (s, 1H); 3,31 – 3,23 (m, 1H); 2,62 (dd, J = 16,8; 5,6 Hz, 1H); 2,08 (d, J = 17,1 Hz, 1H); 1,73 (dq, J = 13,1; 6,5 Hz, 1H); 0,95 (d, J = 6,4 Hz, 3H); 0,89 (d, J = 6,6 Hz, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 177,27; 26,99; 18,88; 18,22.

HRMS (ESI +): C₇H₁₄N₂O [M+H]⁺

berechnet: m/z = 143,11789

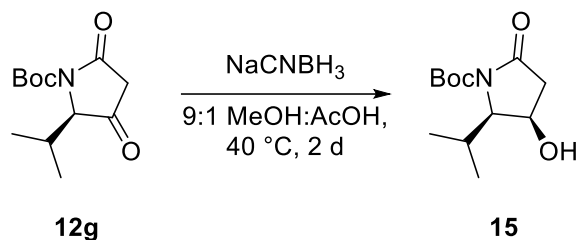
gefunden: m/z = 143,11784

$[\alpha]^{20}_D$ (c 0,81; MeOH): -3,41

Synthese der *trans*-Pyrrolidinon-Dipeptidbausteine 15-21

Synthese der reduzierten Pyrrolidin-2,4-dione

Py-Val-OH (15)



12g (2,00 g; 8,29 mmol) und NaCNBH₃ (4,00 g; 63,65 mmol) wurden in MeOH (trocken) : AcOH 9 : 1 (10 ml) gelöst. Es wurde über zwei Tage bei 40 °C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung in 50 ml Wasser gegeben und dreimal mit 75 ml DCM extrahiert. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösemittel wurde abgezogen. Das Rohprodukt wurde im nächsten Schritt ohne Aufreinigung eingesetzt.

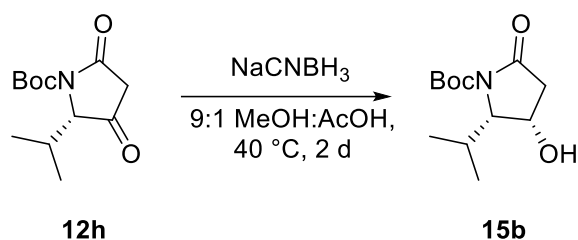
Aussehen: transparentes Öl

Ausbeute: 1,63 g (6,72 mmol) → 81 %

¹H-NMR: (500 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 4,56 (dt, *J* = 9,6; 7,9 Hz, 1H); 4,07 (dd, *J* = 7,3; 5,1 Hz, 1H); 2,64 – 2,49 (m, 2H); 2,35 (dtd, *J* = 14,0; 7,0; 5,2 Hz, 1H); 1,52 (s, 9H); 1,02 (d, *J* = 6,9 Hz, 3H); 1,08 (d, *J* = 7,1 Hz, 3H).

Py-D-Val-OH (15b)



12h (2,00 g; 8,29 mmol) und NaCNBH₃ (4,00 g; 63,65 mmol) wurden in MeOH (trocken) : AcOH 9 : 1 (10 ml) gelöst. Es wurde über zwei Tage bei 40 °C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung in 50 ml Wasser gegeben und dreimal mit 75 ml DCM extrahiert. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösemittel wurde abgezogen. Das Rohprodukt wurde im nächsten Schritt ohne Aufreinigung eingesetzt.

Aussehen: transparentes Öl

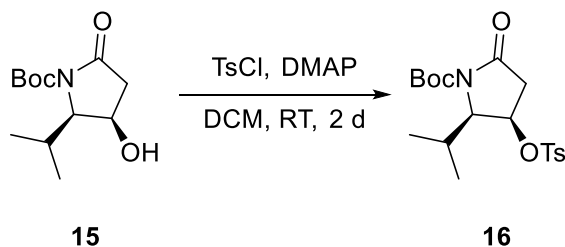
Ausbeute: 1,85 g (7,62 mmol) → 92 %

¹H-NMR: (500 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 4,57 (dt, *J* = 9,7; 7,5 Hz, 1H); 4,07 (dd, *J* = 7,3; 5,1 Hz, 1H); 2,65 – 2,49 (m, 2H); 2,33 (pd, *J* = 7,0; 5,1 Hz, 1H); 1,52 (s, 9H); 1,09 (d, *J* = 6,9 Hz, 3H); 1,03 (d, *J* = 7,1 Hz, 3H).

Synthese der tosylierten Pyrrolidin-2,4-dione

Py-Val-OTs (16)



15 (100,00 mg; 0,41 mmol) wurde bei 0 °C in DCM (10 ml) gelöst und Tosylchlorid (95,00 mg; 0,50 mmol) sowie DMAP (100,00 mg; 0,82 mmol) wurden hinzugegeben. Es wurde über zwei Tage gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit 50 ml DCM versetzt und zweimal mit 20 ml 1 M HCl gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet. Das Produkt wurde über Silica säulenchromatographisch in PE : E 5 : 1 aufgereinigt. Das Produkt enthielt etwas Startmaterial, da die Trennung schwierig war.

Aussehen: transparentes Öl

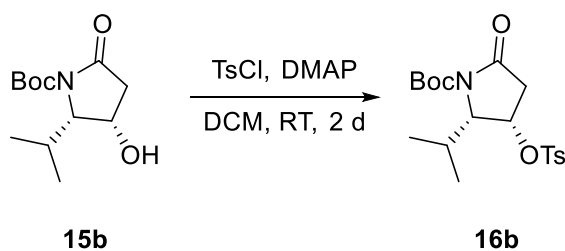
Ausbeute: 107,00 mg (177,67 μmol) → 43 %

R_f-Wert: 0,3 (Silica, PE : E 5 : 1)

¹H-NMR: (500 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 7,96 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H); 7,55 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H); 5,81 (s, 1H); 4,50 (dd, *J* = 2,7; 0,9 Hz, 1H); 2,86 – 2,62 (m, 1H); 2,49 (s, 3H); 2,41 (td, *J* = 7,1; 2,7 Hz, 1H); 2,10 (s, 1H); 1,50 (s, 9H); 0,99 (d, *J* = 7,3 Hz, 3H); 0,66 (d, *J* = 7,0 Hz, 3H).

Py-D-Val-OTs (16b)



15b (1,78 g; 7,33 mmol) wurde bei 0 °C in DCM (20 ml) gelöst und Tosylchlorid (4,20 g; 22,03 mmol) sowie DMAP (1,80 g; 14,73 mmol) wurden hinzugegeben. Es wurde über zwei Tage gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit 200 ml DCM versetzt und zweimal mit 50 ml 1 M HCl gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet. Das Produkt wurde über Silica säulenchromatographisch in PE : E 5 : 1 aufgereinigt. Das Produkt enthielt etwas Startmaterial, da die Trennung schwierig war.

Aussehen: transparentes Öl

Ausbeute: 437,00 mg (1,10 mmol) → 15 %

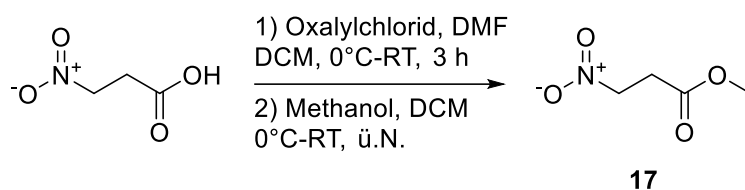
R_f-Wert: 0,25 (Silica, PE : E 5 : 1)

¹H-NMR: (500 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 7,99 – 7,95 (m, 2H); 7,55 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H); 4,50 (d, *J* = 2,6 Hz, 1H); 2,86 – 2,59 (m, 1H); 2,50 (s, 3H); 2,41 (qd, *J* = 7,1; 2,7 Hz, 1H); 2,10 (s, 1H); 2,02 (s, 1H); 1,51 (s, 9H); 1,00 (d, *J* = 7,3 Hz, 3H); 0,65 (d, *J* = 3,0 Hz, 3H)

Synthese des *trans*-4-Aminopyrrolidin-2-ons

3-Nitropropansäuremethylester (17) ¹⁴⁴



Oxalylchlorid (7,50 ml; 87,45 mmol) und DMF (zwei Tropfen) wurden in Argonatmosphäre bei 0 °C zu 3-Nitropropansäure (9,26 g; 77,75 mmol) in 50 ml trockenem DCM gegeben. Die Reaktion wurde für 15 min bei 0 °C und anschließend 2 h 45 min bei Raumtemperatur gerührt (Achtung: Gasentwicklung!). Es wurde bei 0 °C trockenes Methanol (20,00 ml; 494,35 mmol) hinzugegeben, bei 0 °C für 15 min und bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Anschließend wurde das Lösemittel abgezogen und das Rohprodukt destilliert (bis 65 °C, dann Heat-Gun, Destillation ohne Wasserkühlung).

Aussehen: transparentes Öl

Ausbeute: 9,76 g (73,34 mmol) → 94 %

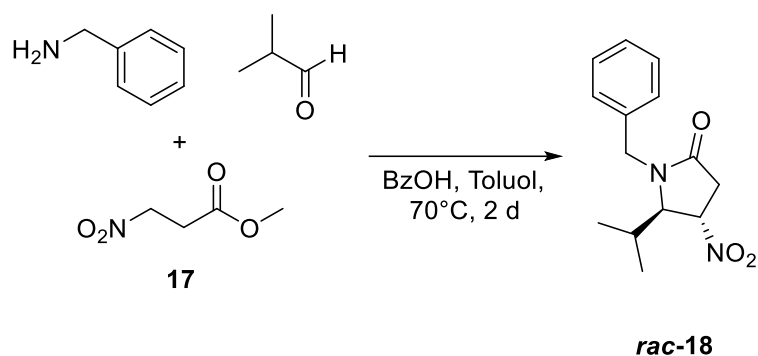
¹H-NMR: (500 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 4,73 – 4,69 (m, 2H); 3,72 (s, 3H); 3,01 – 2,98 (m, 2H).

¹³C-NMR: (126 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 172,21; 70,84; 52,58; 31,68.

Py-*rac-trans*-Val-NO₂ (*rac*-18)¹⁴⁵



Methyl-3-nitropropionat **17** (500,00 mg, 3,76 mmol), Benzoesäure (690,00 mg, 5,65 mmol) und trockenes Toluol (10 ml) wurden mit Argon gespült und mit Benzylamin (0,60 ml; 5,50 mmol) und Isobutyraldehyd (0,60 ml; 6,57 mmol) versetzt. Es wurde bei 70°C zwei Tage gerührt. Die Reaktion wurde in 50 ml 1 M K₂CO₃-Lösung gegeben und dreimal mit 50 ml DCM gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, das Lösemittel entfernt und in Et₂O gesäult. Es wurde das racemische *trans*-Isomer erhalten.

Aussehen: braunes Öl

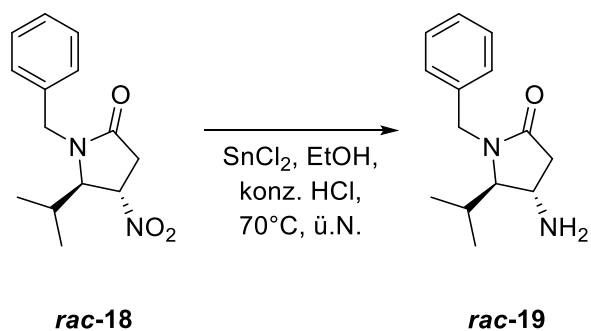
Ausbeute: 9,76 g (73,34 mmol) → 94 %

R_f-Wert: 0,17 (Silica, PE : Et₂O 5 : 2)

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 7,37 – 7,27 (m, 3H); 7,23 (d, *J* = 7,2 Hz, 2H); 5,15 (d, *J* = 15,2 Hz, 1H); 4,85 (dt, *J* = 8,8; 1,9 Hz, 1H); 3,91 (d, *J* = 15,1 Hz, 1H); 3,73 (dd, *J* = 3,6; 1,6 Hz, 1H); 3,14 (dd, *J* = 18,5; 2,0 Hz, 1H); 2,90 (ddd, *J* = 18,5; 8,7; 1,0 Hz, 1H); 2,18 (ddp; *J* = 10,6; 6,9; 3,6 Hz, 1H); 2,00 (bs, 1H); 1,01 (d, *J* = 7,0 Hz, 3H); 0,79 (d, *J* = 6,9 Hz, 3H).

Py-*rac-trans*-Val-NH₂ (*rac*-19)



***rac*-18** (283,00 mg, 1,08 mmol) und Zinnchlorid (1,23 g; 6,49 mmol) wurden vorgelegt und mit 5 ml absolutem Ethanol und mit 2,5 ml konzentrierter HCl versetzt und über Nacht bei 70 °C gerührt. Das Lösemittel wurde entfernt und das Rohprodukt in E – E : MeOH 9 : 1 + 1 % TEA über Silica getrennt.

Aussehen: weiß-gelbes Wachs

Ausbeute: 250,00 mg (1,08 mmol) → quant.

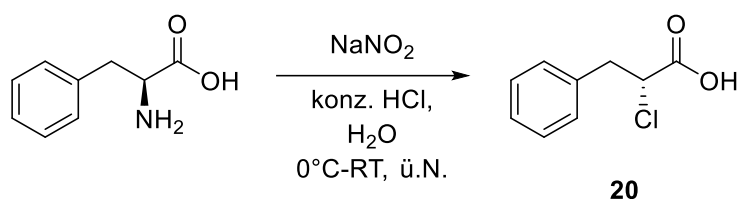
R_f-Wert: 0,08 (Silica, E : MeOH + 1 % TEA 9 : 1)

¹H-NMR: (500 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 7,40 – 7,29 (m, 5H); 4,74 (d, *J* = 15,0 Hz, 1H); 4,32 (d, *J* = 14,9 Hz, 1H); 3,85 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H); 3,64 (s, 1H); 3,47 (dd, *J* = 3,3; 1,2 Hz, 1H); 3,03 – 2,96 (m, 1H); 2,44 (dd, *J* = 18,6; 1,4 Hz, 1H); 2,15 (ddt, *J* = 10,6; 7,0; 3,6 Hz, 1H); 2,11 (s, 1H); 2,02 (s, 1H); 0,98 (d, *J* = 7,0 Hz, 3H); 0,71 (d, *J* = 6,9 Hz, 3H).

Synthese der Aminosäurebausteine

(S)-2-Chlor-3-Phenylpropansäure (**20**)¹⁶¹



L-Phenylalanin (5,00 g; 30,27 mmol) wurde in ca. 100 ml HCl und 100 ml H₂O (minimales Lösemittel bis die Aminosäure gelöst ist) hinzugegeben. NaNO₂ (5,00 g; 72,47 mmol) wurde bei 0 °C hinzugegeben. Es wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit 100 ml Ethylacetat extrahiert, mit 100 ml Wasser gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Produkt war rein genug, um im nächsten Schritt verwendet zu werden.

Aussehen: gelbes Öl

Ausbeute: 5,59 g (30,27 mmol) → quant.

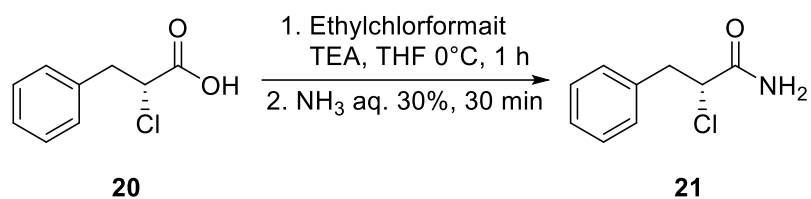
¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 9,28 (s, 1H); 7,37 – 7,29 (m, 3H); 7,25 (s, 1H); 4,51 (t, *J* = 7,3 Hz, 1H); 3,42 (dd, *J* = 14,1; 6,8 Hz, 1H); 3,21 (dd, *J* = 14,1; 7,8 Hz, 1H).

¹³C-NMR: (126 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 174,65; 135,48; 129,51; 129,33; 128,69; 128,60; 127,49; 57,20; 40,80.

(S)-2-Chlor-3-Phenylpropansäureamid (21)



20 (4,54 g; 24,59 mmol) wurde in 20 ml trockenem THF gelöst und bei 0 °C mit trockenem Triethylamin (4,00 ml; 28,86 mmol) versetzt. Nach 15 min bei 0 °C, wurde Ethylchlorformait (2,70 ml; 28,36 mmol) langsam hinzuge tropft und die klare Lösung wurde eine Stunde bei 0 °C gerührt. Anschließend wurden 50 ml 30 % aq. NH₃ hinzugegeben. Nach 30 min bei 0 °C wurden 50 ml Wasser hinzugegeben und dreimal mit 100 ml DCM extrahiert. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel abgezogen. Es wurde in DCM : MeOH 1 : 0-50 : 2-19 : 1 + 1 % TEA über Silica säulenchromatographisch aufgereinigt. Das Produkt eliminiert leicht.

Aussehen: gelbes Wachs

Ausbeute: 1,76 g (9,60 mmol) → 39 %

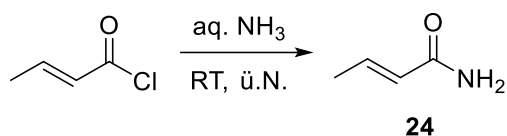
¹H-NMR: (500 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 7,33 – 7,23 (m, 5H); 4,52 (t, *J* = 7,2 Hz, 1H); 3,38 – 3,33 (m, 1H); 3,13 (dd, *J* = 13,9; 7,5 Hz, 1H).

7.1.3 Neue Synthesemethoden zur Zuckerderivatisierung

Synthese der vinylogenen Silvlenolether-Vorstufen

Crotonylamid (24)



Zu einer Lösung aus 140 ml einer 25 % aq. Ammoniaklösung wurde Crotonylchlorid (20,00 ml; 187,86 mmol) langsam bei 0 °C hinzu getropft. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die Mischung wurde filtriert und das Präzipitat gesammelt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit 100 ml E und nach Basifizieren dreimal mit 100 ml E extrahiert. Das Präzipitat wurde in der organischen Phasen gelöst und über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum abgezogen.

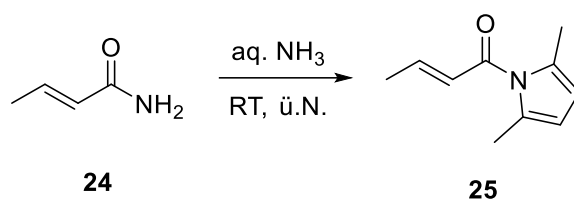
Aussehen: weißer, amorpher Feststoff

Ausbeute: 10,81 g (129,99 mmol) → 68 %

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 6,87 (dq; *J* = 15,3; 6,9 Hz, 1H); 5,85 (dq; *J* = 15,3; 1,7 Hz, 1H); 5,41 (s, 2H); 1,87 (dd, *J* = 6,9; 1,7 Hz, 3H).

Crotonylpyrrolamid (25) ¹⁵³



24 (6,27 g; 73,66 mmol), 2,5-Hexanedion (17,26 ml; 147,32 mmol) und TsOH*2 H₂O (1,53 g; 7,37 mmol) wurde in ca. 200 ml Toluol in einem 250 ml Einhalsrundkolben gelöst. Es wurde bei 140-160 °C in einer Dean-Stark-Anlage für 24 h unter Rückfluss gerührt bis sich kein Wasser mehr bildete. Das Wasser wurde während dem Heizen regelmäßig entleert. Die Lösung wurde mit 100 ml Wasser dreimal gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel abgezogen. Der Rückstand wurde auf Silica gezogen und säulenchromatographisch über Silica in PE : E 10 : 1 aufgereinigt.

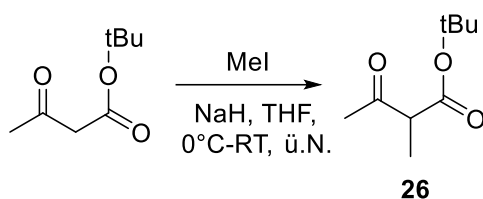
Aussehen: braunes Öl

Ausbeute: 7,88 g (48,29 mmol) → 66 %

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 7,08 – 6,99 (m, 1H); 6,37 (dd, *J* = 15,3; 1,6 Hz, 1H); 5,83 (s, 2H); 2,33 (s, 6H); 1,98 (dd, *J* = 7,0; 1,6 Hz, 3H).

Tert-Butyl-2-Methyl-Acetoacetat (**26**)¹⁵⁴



Zu einer Lösung aus 60%igem NaH (2,63 g; 65,74 mmol) in 250 ml trockenem THF wurde bei 0 °C *tert*-Butylacetoacetate (10,58 ml; 63,21 mmol) hinzugegeben und für eine Stunde gerührt. MeI (7,87 ml, 126,43 mmol) wurde langsam zugegeben und bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die Reaktion wurde in 250 ml gesättigte aq. NH₄Cl gegeben und dreimal mit 250 ml Et₂O extrahiert. Die kombinierten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel abgezogen. Es wurde säulenchromatographisch über Silica in Pentan : E 10 : 1 aufgetrennt.

Aussehen: durchsichtiges Öl

Ausbeute: 8,10 g (47,04 mmol) → 74 %

R_f-Wert: 0,61 (Silica, PE : E 10 : 1)

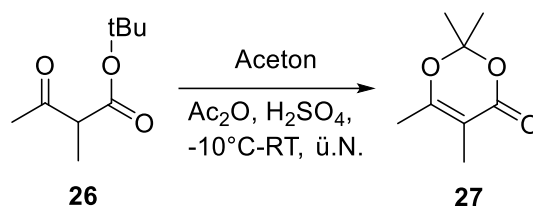
¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 3,39 (q; *J* = 7,1 Hz, 1H); 2,22 (s, 3H); 1,45 (s, 10H); 1,28 (d, *J* = 7,1 Hz, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 204,28; 169,87; 81,90; 54,81; 28,50; 28,00; 12,76.

2-Methyl-Dioxinon (**27**)¹⁵⁴



Zu einer Lösung aus **26** (8,10 g; 47,04 mmol) in 27 ml trockenem Aceton bei -10 °C (1 : 1 Aceton : Eis) wurde Ac₂O (17,79 ml; 188,15 mmol) und katalytische Mengen konzentrierte H₂SO₄ zugegeben. Die Lösung wurde auf Raumtemperatur gebracht und bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. 250 ml Eiswasser wurde zugegeben und die Mischung wurde eine Stunde gerührt. Die wässrige Phase wurde fünfmal mit 100 ml DCM extrahiert. Die organischen Phasen wurden mit konz. NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet sowie das Lösemittel abgedampft. Es wurde säulenchromatographisch über Silica in Pentan : E 20 : 1-15 : 1-10 : 1) aufgereinigt.

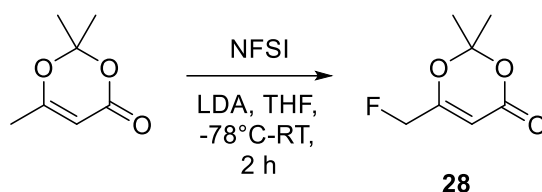
Aussehen: durchsichtiges Öl

Ausbeute: 6,25 g (40,04 mmol) → 85 %

R_f-Wert: 0,27 (Silica, PE : E 10 : 1)

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 4,04 (qd, *J* = 7,1; 1,4 Hz, 1H); 2,03 – 1,89 (m, 6H); 1,65 (dd, *J* = 8,8; 1,5 Hz, 2H); 1,41 – 1,15 (m, 3H).

1-Fluor-Dioxinon (28)¹⁵⁵

Ein ausgeheizter Einhalskolben wurde mit 400 ml THF befüllt und frisch destilliertes Diisoprylamin (10,68 ml; 76,19 mmol) wurde bei 0 °C zugegeben. Anschließend wurde *n*-Butyllithium (2,5 M in Hexan, 30,39 ml; 75,97 mmol) zugegeben und für 30 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde 2,2,6-Trimethyl-4H-1,3-Dioxin-4-one (9,35 ml; 70,35 mmol) bei -75 °C hinzugegropft und für 30 min gerührt. NFSI (44,37 g; 140,69 mmol) gelöst in 200 ml trockenem THF wurde langsam zugegeben. Nach kompletter Zugabe wurde das Kühlbad entfernt und die Reaktion weitere zwei Stunden gerührt. Anschließend wurden 200 ml gesättigte aq. NH₄Cl zugegeben und die Emulsion dreimal mit 300 ml Et₂O extrahiert. Die organischen Phasen wurden anschließend mit 600 ml konz. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, über Silica filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde über Silica in Pentan : E 10 : 1 - 5 : 1 säulenchromatographisch aufgereinigt. Das Produkt enthielt aufgrund der schwierigen Auftrennung Verunreinigungen.

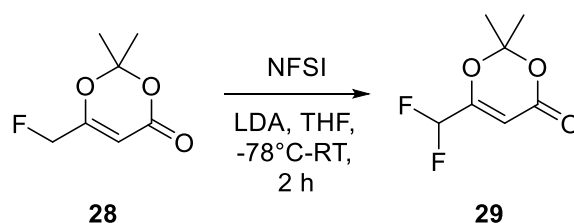
Aussehen: gelbes Öl

Ausbeute: 5,17 g (32,31 mmol) → 46 %

R_f-Wert: 0,35 (Silica, Pentan : E 4 : 1)

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 5,56 (t, *J* = 1,1 Hz, 1H); 4,90 (d, *J* = 1,1 Hz, 1H); 4,78 (d, *J* = 1,1 Hz, 1H); 1,71 (s, 6H).

1,1-Di-Fluor-Dioxinon (29)¹⁵⁵

Ein ausgeheizter Einhalskolben wurde mit 165 ml THF befüllt und frisch destilliertes Diisopropylamin (6,79 ml; 48,43 mmol) wurde bei 0 °C zugegeben. Anschließend wurde *n*-Butyllithium (2,5 M in Hexan, 19,37 ml; 48,43 mmol) zugegeben und für 30 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde **28** (5,17 g; 32,28 mmol) bei -75 °C hinzugegeben und für 30 min gerührt. NFSI (20,36 g; 64,57 mmol) gelöst in 165 ml trockenem THF wurde langsam zugegeben. Nach kompletter Zugabe wurde das Kühlbad entfernt und die Reaktion weitere zwei Stunden gerührt. Anschließend wurden 200 ml gesättigte aq. NH₄Cl zugegeben und die Emulsion dreimal mit 300 ml Et₂O extrahiert. Die organischen Phasen wurden anschließend mit 600 ml konz. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, über Silica filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde über Silica in Pentan : E 10 : 1 - 5 : 1 säulenchromatographisch aufgereinigt.

Aussehen: gelbes Öl

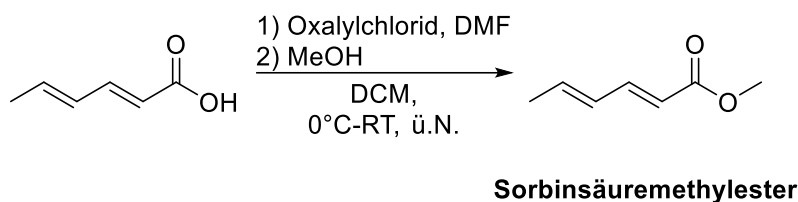
Ausbeute: 854,00 mg (4,79 mmol) → 15 %

R_f-Wert: 0,58 (Silica, Pentan : E 4 : 1)

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 6,05 (d, *J* = 0,5 Hz, 1H); 5,76 (q; *J* = 0,8 Hz, 1H); 1,75 (s, 6H).

Sorbinsäuremethylester ¹⁶²



Sorbinsäure (20,00 g; 178,37 mmol) wurde in 300 ml trockenem DCM bei Raumtemperatur und Argonatmosphäre gelöst. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt und Oxalylchlorid (30,59 ml; 356,74 mmol) wurde tropfenweise zugegeben. Anschließend wurde langsam trockenes DMF (0,27 ml; 3,57 mmol) hinzugegeben. Die Reaktion wurde für eine Stunde bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde trockenes MeOH (20 ml) bei 0 °C langsam hinzugegeben. Die Lösung wurde eine weitere Stunde gerührt. Das Lösemittel wurde abgedampft und die Reaktion auf Silica gezogen. Anschließend wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch über Silica in Pentan : E 20 : 1 aufgetrennt. Das Produkt wurde durch dreimaliges Gefrieren gefriergetrocknet.

Aussehen: durchsichtiges Öl

Ausbeute: 17,28 g (136,94 mmol) → 77 %

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 7,26 (dd, $J = 15,4; 10,0$ Hz, 1H); 6,24 – 6,09 (m, 2H); 5,78 (dq; $J = 15,4; 0,7$ Hz, 1H); 3,74 (s, 3H); 1,85 (d, $J = 6,2$ Hz, 3H).

Synthese der vinylogenen Silylenolether 22a-i

Allgemeine Vorschrift XIa 163



Abb. 7.15. Generelles Reaktionsschema der allgemeinen Vorschrift XIa für die Synthese der Enolether 22a-i.

Ein ausgeheizter Einhalskolben wurde mit trockenem THF (0,5 M im Bezug zum Alkenketon) und 1,1 eq. frisch destilliertem Diisopropylamin beschickt. Anschließend wurde die Lösung im Eisbad gekühlt gefolgt von einer langsamen Zugabe von 1,1 eq. *n*-Butyllithium (2,5 M in Hexan). Die gelbe Lösung wurde 30 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde bei -75 °C 1,2 eq. DMPU zugegeben und bei -75 °C für 30 min gerührt. Die Reaktionslösung wurde trüb. Danach wurde 1 eq. des Alkenketons langsam zugegeben und bei -75 °C für 30 min gerührt. Die Trübung verschwand. Anschließend wurden 1,1 eq. des Silylchlorids langsam hinzugegeben (falls nötig in 5-15 ml trockenem THF gelöst) und die Lösung wurde über 2 h auf Raumtemperatur gebracht. 100 ml Pentan wurden zugegeben. Die organische Phase wurde fünfmal mit 100 ml Eiswasser gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und über Celite filtriert. Das Lösemittel wurde entfernt (40°C, 10 mbar). Abschließend wurde das Produkt in einem Kugelrohr-Apparat destilliert. Das NMR Lösemittel muss basisch gemacht werden. Das Produkt wurde bei -30 °C unter Argon aufbewahrt.

Allgemeine Vorschrift XIb¹⁵³

Zu einer Lösung aus 1,1 eq. NaHMDS (2 M in THF) und 1,2 eq. DMPU in trockenem THF (0,6 M bezogen auf das Allylketon) in einem ausgeheiztem Einhalskolben wurde bei -78 °C 1 eq. des Allylketons in trockenem THF (¼ des Lösemittelvolumens) langsam hinzugegeben. Es wurde für eine Stunde gerührt. Anschließend wurde 1,2 eq. Silylchlorid (falls nötig in 5-10 ml trockenem THF) tropfenweise bei -75 °C hinzugegeben. Die Reaktion wurde 30 min gerührt. Das Kühlbad entfernt und die Reaktion wurde bei Raumtemperatur für eine Stunde gerührt. Die Lösung wurde mit 150 ml kaltem Wasser vermischt und dreimal mit Pentan extrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel entfernt. Abschließend wurde das Produkt in einem Kugelrohr-Apparat destilliert. Das Produkt wurde bei -30 °C unter Argon aufbewahrt.

TMSO-Dioxinonenolat (22a) ¹⁶⁴

Ein ausgeheizter Einhalskolben wurde mit 20 ml trockenem THF und frisch destilliertem Diisopropylamin (2,90 ml; 20,70 mmol) beschickt. Anschließend wurde die Lösung im Eisbad gekühlt, gefolgt von einer langsamen Zugabe von *n*-Butyllithium (8,28 ml; 20,70 mmol, 2,5 M in Hexan). Die gelbe Lösung wurde 30 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde bei -75 °C 2,2,6-Trimethyl-4H-1,3-Dioxin-4-on (2,5 ml; 22,58 mmol) langsam zugegeben und bei -75 °C für 30 min gerührt. Es wurden TMSCl (2,87 ml; 22,58 mmol) langsam hinzugegossen und die Lösung wurde nach 40 min bei -75 °C für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde 100 ml Pentan (über 3 Å Molekularsieb getrocknet) zugegeben und die Mischung über Celite und MgSO₄ getrocknet. Das Lösemittel wurde entfernt (40°C, 10 mbar). Die organische Phase wurde fünfmal mit 100 ml Eiswasser gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und über Celite filtriert. Das Lösemittel wurde entfernt (40°C, 10 mbar). Abschließend wurde das Produkt in einem Kugelrohr-Apparat destilliert (75 °C, 1,1 mbar).

Aussehen: durchsichtiges Öl

Ausbeute: 3,14 g (14,66 mmol) → 78 %

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 4,64 (s, 1H); 4,07 (d, *J* = 0,9 Hz, 1H); 3,88 (d, *J* = 0,8 Hz, 1H); 1,54 (s, 6H); 0,26 (s, 9H).

TBSO-Dioxinonenolat (22b)



Allgemeine Vorschrift XIa wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

2,2,6-Trimethyl-4H-1,3-Dioxin-4-on (10,00 ml; 75,27 mmol), Diisopropylamin (11,60 ml; 82,80 mmol), *n*-Butyllithium (33,12 ml; 82,80 mmol) und TBSCl (12,48 g; 82,80 mmol). Die Kugelrohrdestillation wurde wie folgt durchgeführt: 85 °C, 1,1 mbar.

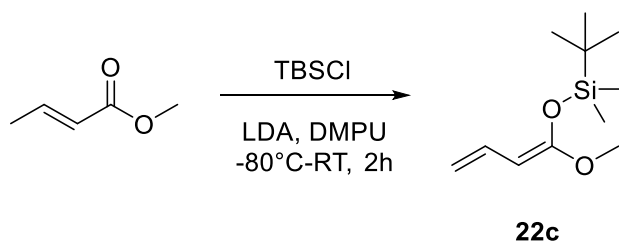
Aussehen: durchsichtiges Öl

Ausbeute: 16,33 g (63,67 mmol) → 85 %

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 4,65 (s, 1H); 4,05 (d, *J* = 0,8 Hz, 1H); 3,86 (d, *J* = 0,8 Hz, 1H); 1,53 (s, 6H); 0,93 (s, 9H); 0,20 (s, 6H).

TBSO-Methylcrotonatenolat (22c)¹⁶⁴



Allgemeine Vorschrift XIa wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

Crotonylmethylester (5,00 ml; 47,15 mmol), Diisopropylamin (7,24 ml; 51,64 mmol), *n*-Butyllithium (20,66 ml; 51,64 mmol), DMPU (6,81 ml; 56,33 mmol) und TBSCl (7,78 g; 51,64 mmol). Die Kugelrohrdestillation wurde wie folgt durchgeführt: 95 °C, 1,1 mbar. Das Produkt liegt im E:Z-Verhältnis 1 : 1 vor.

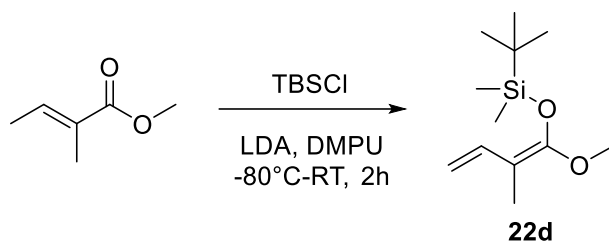
Aussehen: durchsichtiges Öl

Ausbeute: 9,18 g (42,82 mmol) → 91 %

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 6,51 (dtd, *J* = 17,7; 10,5; 7,1 Hz, 1H); 4,82 (tdd, *J* = 16,7; 2,2; 0,6 Hz, 1H); 4,60 (dddd, *J* = 10,5; 3,2; 2,2; 0,7 Hz, 1H); 4,51 – 4,45 (m, 1H); 3,59 (d, *J* = 13,9 Hz, 3H); 0,96 (d, *J* = 4,1 Hz, 9H); 0,25 – 0,09 (m, 6H).

TBSO-3-Methylcrotonsäuremethylesterenolat (22d)



Allgemeine Vorschrift XIa wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

3-Methyl-Crotonylmethylester (5,00 ml; 47,15 mmol), Diisopropylamin (7,24 ml; 51,64 mmol), *n*-Butyllithium (20,66 ml; 51,64 mmol), DMPU (6,81 ml; 56,33 mmol) und TBSCl (7,78 g; 51,64 mmol). Die Kugelrohrdestillation wurde wie folgt durchgeführt: 95 °C, 1,1 mbar. Das Produkt liegt im E:Z-Verhältnis 1 : 1 vor.

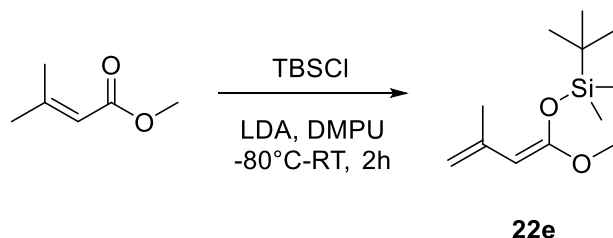
Aussehen: durchsichtiges Öl

Ausbeute: 8,81 g (38,56 mmol) → 93 %

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 6,73 (ddd, *J* = 32,9; 17,5; 10,9 Hz, 1H); 4,90 – 4,77 (m, 2H); 3,59 (d, *J* = 0,5 Hz, 3H); 1,66 (d, *J* = 15,4 Hz, 3H); 0,98 (d, *J* = 2,2 Hz, 9H); 0,18 (d, *J* = 1,9 Hz, 6H).

TBSO-2-Methylcrotonsäuremethylesterenolat (22e)



Allgemeine Vorschrift XIa wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

2-Methyl-Crotonylmethylester (5,00 ml; 41,00 mmol), Diisopropylamin (6,32 ml; 45,10 mmol), *n*-Butyllithium (18,04 ml; 45,10 mmol), DMPU (5,95 ml; 49,20 mmol) und TBSCl (6,80 g; 45,10 mmol). Die Kugelrohrdestillation wurde wie folgt durchgeführt: 100 °C, 1,1 mbar.

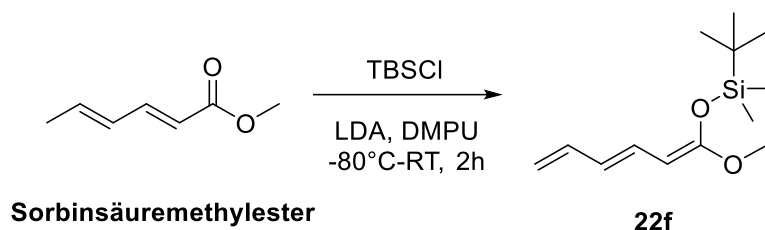
Aussehen: durchsichtiges Öl

Ausbeute: 8,59 g (37,59 mmol) → 92 %

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 4,80 (d, *J* = 2,7 Hz, 1H); 4,55 (dt, *J* = 2,7; 1,3 Hz, 1H); 4,23 (s, 1H); 3,56 (s, 3H); 1,96 – 1,94 (m, 3H); 0,94 (s, 9H); 0,19 (s, 6H).

TBSO-2-Methylcrotonsäuremethylesterenolat (22f)



Allgemeine Vorschrift XIa wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

Sorbinsäuremethylester (5,00 ml; 38,37 mmol), Diisopropylamin (5,91 ml; 42,20 mmol), *n*-Butyllithium (16,88 ml; 42,20 mmol), DMPU (5,57 ml; 46,04 mmol) und TBSCl (6,36 g; 42,20 mmol). Die Kugelrohrdestillation wurde wie folgt durchgeführt: 100 °C, 1,1 mbar.

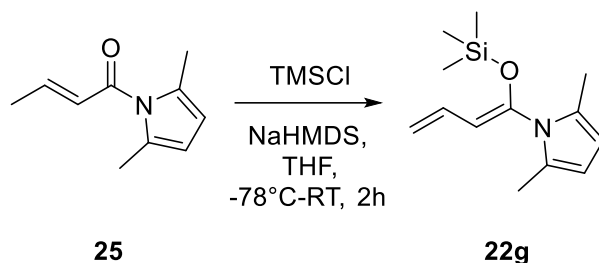
Aussehen: gelbes Öl

Ausbeute: 5,00 g (20,80 mmol) → 54 %

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = δ 6,47 – 6,31 (m, 2H); 6,01 – 5,88 (m, 1H); 4,99 (ddt, *J* = 16,9; 1,7; 0,8 Hz, 1H); 4,83 (ddq; *J* = 10,1; 1,8; 0,9 Hz, 1H); 4,48 (d, *J* = 10,5 Hz, 1H); 3,59 (s, 3H); 0,96 (s, 9H); 0,21 (d, *J* = 23,6 Hz, 6H).

TMSO-Crotonylpyrrolamidenolat (22g)



Allgemeine Vorschrift XIb wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

25 (2,50 g; 15,32 mmol), NaHMDS (8,42 ml; 16,85 mmol), DMPU (2,21 ml; 18,38 mmol) und TMSCl (2,34 g; 18,38 mmol). Die Kugelrohrdestillation wurde wie folgt durchgeführt: 170 °C, 1,1 mbar. Das Produkt liegt im E:Z-Verhältnis 1 : 1 vor.

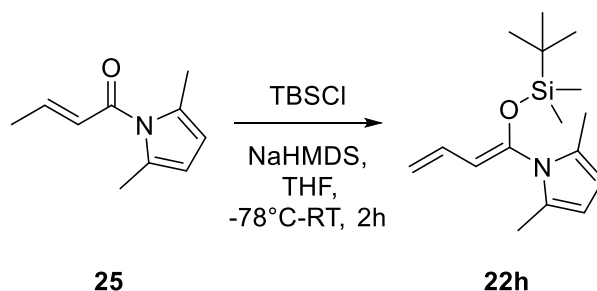
Aussehen: durchsichtiges Öl

Ausbeute: 2,95 g (12,52 mmol) → 82 %

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 5,84 – 5,55 (m, 3H); 5,31 – 4,79 (m, 2H); 2,92 (s, 9H); 2,16 (d, *J* = 23,0 Hz, 5H).

TBSO-Crotonylpyrrolamidenolat (22h)



Allgemeine Vorschrift XIb wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

25 (5,90 g; 36,15 mmol), NaHMDS (19,88 ml; 39,76 mmol), DMPU (5,23 ml; 43,38 mmol) und TBSCl (6,54 g; 43,38 mmol). Die Kugelrohrdestillation wurde wie folgt durchgeführt: 170 °C, 1,1 mbar. Das Produkt liegt im E:Z-Verhältnis 2 : 1 vor.

Aussehen: durchsichtiges Öl

Ausbeute: 9,07 g (32,69 mmol) → 90 %

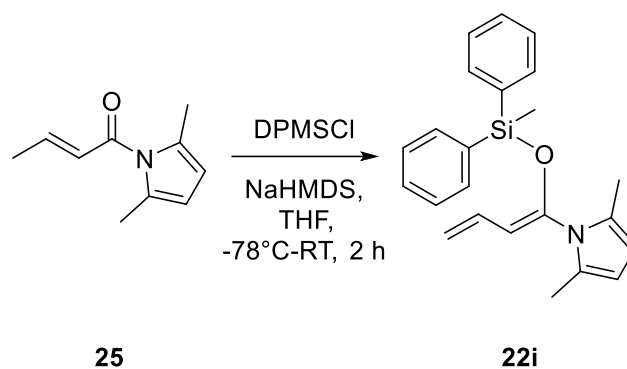
¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 6,67 (dt, *J* = 17,3; 10,6 Hz, *E*-Isomer, 1H); 5,77 (d, *J* = 10,8 Hz, 2H); 5,74 – 5,61 (m, *Z*-Isomer, 1H); 5,33 – 5,26 (m, 1H); 5,11 (ddd, *J* = 29,8; 16,6; 1,8 Hz, 1H); 4,92 (m, 1H); 2,17 (m, 6H); 0,95 (d, *J* = 15,1 Hz, 9H); 0,09 – 0,06 (m, 3H); -0,10 (s, 3H).

¹³C-NMR: (101 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 132,13; 131,04; 128,42; 114,64; 113,93; 109,67; 108,48; 106,61; 106,21; 25,70; 25,63; 18,26; 12,94; 12,49; 2,63; -4,87; -5,23.

DPMSO-Crotonylpyrrolamidenolat (22i)



Allgemeine Vorschrift XIb wurde mit folgenden Edukten durchgeführt:

25 (2,50 g; 15,32 mmol), NaHMDS (8,42 ml; 16,85 mmol), DMPU (2,21 ml; 18,38 mmol) und TMSiCl (2,34 g; 18,38 mmol). Das Produkt wurde nicht destilliert, sondern in Cyclohexan umkristallisiert.

Aussehen: weißer Feststoff

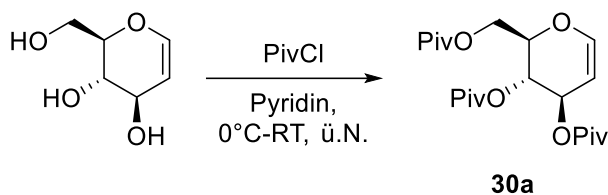
Ausbeute: 1,33 g (3,70 mmol) → 24 %

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 7,55 – 7,50 (m, 4H); 7,43 – 7,34 (m, 6H); 6,80 (dt, $J = 17,2; 10,6$ Hz, 1H); 5,69 (s, 2H); 5,29 (dt, $J = 10,8; 0,6$ Hz, 1H); 5,15 (ddd, $J = 17,2; 1,9; 0,7$ Hz, 1H); 5,04 (ddd, $J = 10,4; 1,9; 0,7$ Hz, 1H); 1,91 (s, 6H); 0,36 (s, 3H).

Synthese der geschützten Zucker 30a-c

3,4,6-Tri-O-(Pivaloyl)-Glucal (30a)



Glucal (1,00 g; 6,84 mmol) wurde in 10 ml trockenem Pyridin gelöst und mit Pivaloylchlorid (4,54 ml; 41,06 mmol) bei 0 °C tropfenweise versetzt. Nachdem über Nacht bei Raumtemperatur gerührt wurde, wurde die Lösung mit 100 ml DCM verdünnt und zweimal mit 50 ml 1 M HCL, zweimal mit 50 ml gesättigter aq. NaHCO₃-Lösung sowie mit 50 ml konz. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet. Anschließend wurde das Rohprodukt auf Silica gezogen und säulenchromatographisch über Silica in Pentan : E 5 : 1 aufgereinigt.

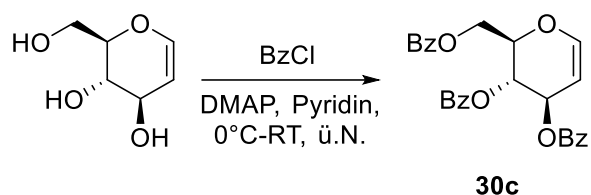
Aussehen: weißer Feststoff

Ausbeute: 2,56 g (6,43 mmol) → 94 %

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 6,45 (dd, $J = 6,2; 1,2$ Hz, 1H); 5,33 – 5,28 (m, 1H); 5,26 (dd, $J = 7,3; 5,9$ Hz, 1H); 4,81 (dd, $J = 6,2; 3,1$ Hz, 1H); 4,32 (dd, $J = 11,6; 5,5$ Hz, 1H); 4,29 – 4,24 (m, 1H); 4,20 (dd, $J = 11,7; 2,6$ Hz, 1H); 1,26 (s, 6H); 1,22 (d, $J = 4,0$ Hz, 9H); 1,17 (d, $J = 2,0$ Hz, 12H).

3,4,6-Tri-O-(Benzoyl)-Glucal (30b)



Glucal (1,00 g; 6,84 mmol) wurde in 10 ml trockenem Pyridin gelöst und mit Benzoylchlorid (4,77 ml; 41,06 mmol) sowie DMAP (83,60 mg; 684,27 μ M) bei 0 °C tropfenweise versetzt. Nachdem über Nacht bei Raumtemperatur gerührt wurde, wurde die Lösung mit 100 ml DCM verdünnt und zweimal mit 50 ml 1 M HCL, zweimal mit 50 ml gesättigter aq. NaHCO₃-Lösung (ges. aq.) sowie mit 50 ml konz. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet. Anschließend wurde das Rohprodukt auf Silica gezogen und säulenchromatographisch über Silica in Pentan : E 7 : 1 aufgereinigt.

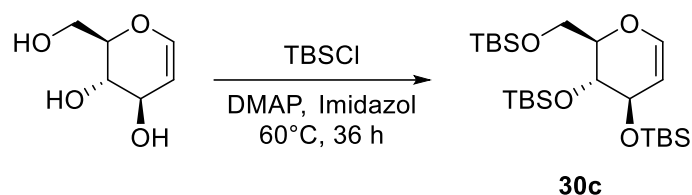
Aussehen: weißes Öl

Ausbeute: 2,24 g (4,88 mmol) \rightarrow 71 %

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 8,07 – 7,99 (m, 6H); 7,59 – 7,51 (m, 3H); 7,45 – 7,39 (m, 6H); 6,61 (d, J = 6,2 Hz, 1H); 5,80 (t, J = 5,6 Hz, 1H); 5,72 (t, J = 4,2 Hz, 1H); 5,12 (dd, J = 6,1; 3,5 Hz, 1H); 4,73 – 4,67 (m, 3H).

3,4,6-Tri-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-Glucal (30c) ¹⁶⁵



Glucal (1,00 g; 6,84 mmol) wurde in 40 ml trockenem DMF gelöst. Imidazol (2,79 g; 41,06 mmol), DMAP (252,75 mg; 684,27 μ mol) und TBSCl (6,19 g; 41,06 mmol) wurde zugegeben. Es wurde bei 60 °C 36 h gerührt. Zerstoßenes Eis und 100 ml Pentan wurden zugegeben und die Phasen wurden getrennt. Es wurde zweimal mit 50 ml Pentan extrahiert. Die organischen Phasen wurden zusammengegeben und zweimal mit 20 ml Wasser und zweimal 20 ml konz. NaCl-Lösung gewaschen. Anschließend wurde über MgSO₄ getrocknet. Das Rohprodukt wurde über Silica in Pentan : E 99 : 1 säulenchromatographisch aufgereinigt.

Aussehen: durchsichtiges Öl

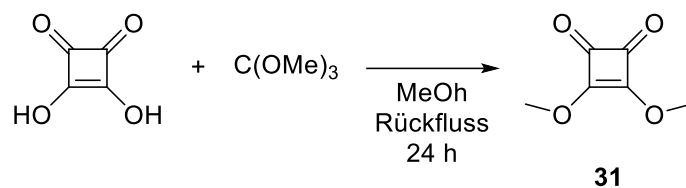
Ausbeute: 3,35 g (6,84 mmol) → quant.

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = δ 6,32 (d, J = 6,7 Hz, 1H); 4,69 (ddd, J = 6,1; 4,4; 1,2 Hz, 1H); 3,99 (dtd, J = 7,3; 3,6; 1,4 Hz, 1H); 3,93 (dd, J = 11,1; 7,4 Hz, 1H); 3,89 (tq; J = 3,4; 1,1 Hz, 1H); 3,81 – 3,74 (m, 2H); 0,92 (s, 1H); 0,90 – 0,88 (m, 26H); 0,87 (s, 2H); 0,10 (d, J = 1,4 Hz, 6H); 0,08 (d, J = 1,3 Hz, 5H); 0,06 (s, 3H); 0,05 (s, 3H); 0,02 (d, J = 5,4 Hz, 2H).

Synthese der H-Donor-Katalysatoren 31-35

Quadratsäuredimethylester (31) ¹⁶⁶



Die Quadratsäure (8,00 g; 70,14 mmol) wurde in 100 ml trockenem MeOH gerührt, während Trimethylorthoformiat (16,00 ml; 146,25 mmol) zugegeben wurde. Anschließend wurde für 24 h unter Rückfluss gerührt, auf Raumtemperatur gebracht und das Lösemittel abgezogen. Das Rohprodukt wurde in Silica säulenchromatographisch (PE : E 1 : 0-1 : 1) aufgereinigt.

Aussehen: weißer Feststoff

Ausbeute: 3,43 g (10,61 mmol) → 86 %

R_f-Wert: 0,088 (Silica, E)

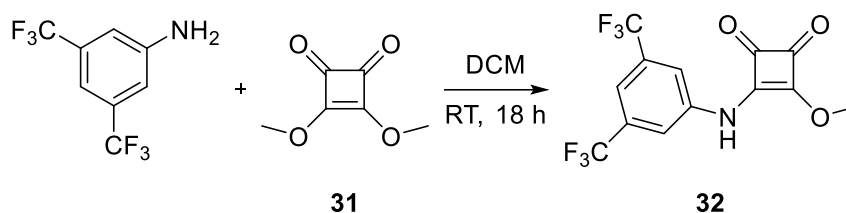
¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 4,35 (s, 6H).

¹³C-NMR: (101 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 189,18; 184,48; 61,04.

(3,5-Bis(Trifluoromethyl)-Anilin-Q-Me (32) ¹⁶⁷



Zu einer Lösung aus **31** (3,00 g; 21,11 mmol) in 80 ml DCM wurde 3,5-Bis(trifluoromethyl)-anilin (3,46 ml; 22,17 mmol) hinzugegeben. Nach 18 h wurde die Reaktion gefiltert und das Filtrat wurde mit 100 ml 1 M aq. HCl gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet. Das Rohprodukt wurde über Silica in PE : E 5 : 1 säulenchromatographisch gereinigt. Das Produkt enthielt etwas an Verunreinigungen.

Aussehen: gelber Feststoff

Ausbeute: 5,66 g (16,70 mmol) → 79 %

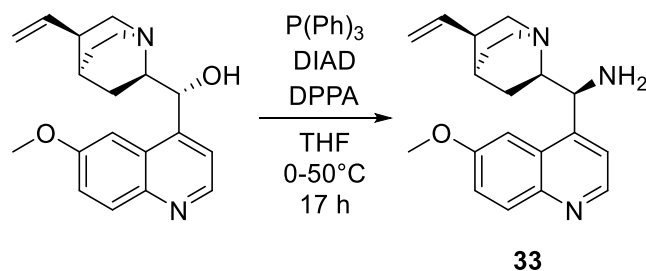
¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆):

δ [ppm] = 11,21 (s, 1H); 8,04 (s, 2H); 7,77 (s, 1H); 4,41 (s, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-d₆):

δ [ppm] = 189,21; 184,14; 150,51; 130,92; 123,72; 112,85; 107,14; 61,05.

Chinidin-NH₂ (33)¹⁵⁹



Chinin (4,00 g; 12,33 mmol) und Triphenylphosphin (3,88 g; 14,80 mmol) wurden bei 0 °C in 50 ml trockenem THF gelöst. Diisopropylazodicarboxylat (2,91 ml; 14,80 mmol) wurde einmal zugegeben. Eine Lösung aus Diphenylphosphorylazid (3,19 ml; 14,80 mmol) in 20 ml trockenem THF wurde bei 0 °C hinzugegeben. Die gelbe Mischung wurde auf Raumtemperatur gebracht. Nach 17 h rühren (trübe Lösung) wurde für 2 h bei 50 °C gerührt. Triphenylphosphin (4,20 g; 16,03 mmol) wurde zugegeben und die Temperatur wurde gehalten bis kein Gas mehr entstand (2 h). Die Lösung wurde auf Raumtemperatur gekühlt und 3 ml destilliertes Wasser wurde zugegeben und 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wurde abgezogen und der Rückstand in 100 ml 1 % aq. HCl und 50 ml DCM gelöst. Es wurde viermal mit 50 ml extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit konzentrierter wässriger Ammoniaklösung basisch gemacht und mit viermal 50 ml DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel entfernt. Das Rohmaterial wurde auf Silica gezogen und über Silica säulenchromatographisch (PE : EtOAc 5 : 1, dann E : MeOH : konzentrierte wässrige NH₄OH = 50 : 50 : 1) aufgereinigt.

Aussehen: gelbes Harz

Ausbeute: 3,43 g (10,61 mmol) → 86 %

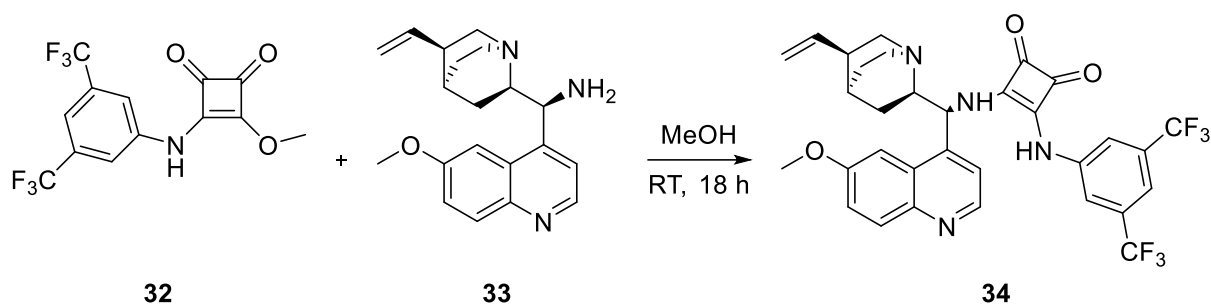
¹H-NMR: (500 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 8,71 (d, *J* = 4,7 Hz, 1H); 7,98 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H); 7,69 (s, 1H); 7,63 (d, *J* = 4,6 Hz, 1H); 7,47 (dd, *J* = 9,2; 2,7 Hz, 1H); 5,91 (ddd, *J* = 17,5; 10,3; 7,7 Hz, 1H); 5,06 (dt, *J* = 17,1; 1,4 Hz, 1H); 5,01 (d, *J* = 10,4 Hz, 1H); 4,77 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H); 4,03 (s, 3H); 3,42 – 3,36 (m, 1H); 3,30 (d, *J* = 10,1 Hz, 1H); 3,24 – 3,15 (m, 1H); 2,89 – 2,81 (m, 2H); 2,36 (s, 1H); 1,65 – 1,60 (m, 3H); 1,47 (t, *J* = 10,0 Hz, 1H); 0,74 (dd, *J* = 13,4; 7,5 Hz, 1H).

¹³C-NMR: (126 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 158,41; 147,87; 147,00; 143,67; 141,50; 130,04; 128,97; 122,06; 119,66; 113,52; 61,91; 55,64; 54,82; 40,29; 39,63; 27,54; 27,41; 27,16; 25,63; 25,14; 10,99.

(3,5-Bis(Trifluoromethyl)-Anilin-Chinidin-Quadratamid (34)¹⁶⁷



Zu einer Lösung aus **32** (500,00 mg; 1,47 mmol) in 10 ml DCM wurde **33** (477,00 mg; 1,47 mmol) hinzugegeben. Nach 18 h wurde das Lösemittel abgedampft und das Rohprodukt wurde aus Silica aufgetragen. Es wurde säulenchromatographisch über Silica in E : MeOH : NH₄OH 100 : 0 : 1 – 50 : 50 : 1 getrennt.

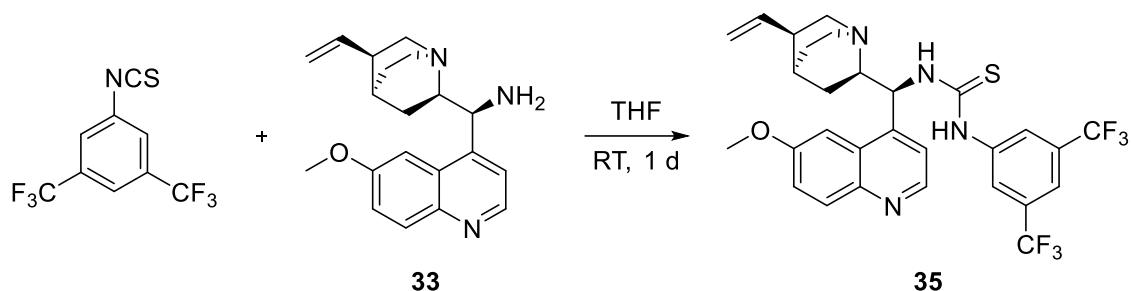
Aussehen: gelber Feststoff

Ausbeute: 5,66 g (16,70 mmol) → 79 %

¹H-NMR: (400 MHz, DMSO-d₆):

δ [ppm] = 8,80 (d, *J* = 4,4 Hz, 1H); 8,05 (s, 2H); 7,97 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H); 7,76 (s, 1H); 7,70 (d, *J* = 3,9 Hz, 1H); 7,59 (s, 1H); 7,44 (dd, *J* = 9,2; 2,2 Hz, 1H); 7,27 (s, 1H); 6,35 (m, 1H); 6,01 – 5,82 (m, 1H); 5,03 (d, *J* = 17,2 Hz, 1H); 4,98 (d, *J* = 10,1 Hz, 1H); 3,50 (d, *J* = 5,8 Hz, 2H); 3,30 (s, 2H); 3,18 (dd, *J* = 13,5; 9,6 Hz, 2H); 2,75 – 2,59 (m, 2H); 2,27 (s, 1H); 2,08 (s, 1H); 1,90 (s, 2H); 1,76 (s, 2H); 1,58 (s, 1H); 1,51 (s, 3H); 0,64 (s, 1H).

(3,5-Bis(Trifluoromethyl))-Anilin-Chinidin-Thioharnstoff (35) ¹⁵⁹



33 (3,54 g; 10,95 mmol) wurden in 20 ml trockenem THF gelöst und es wurde langsam 3,5-Bis(trifluoromethyl)phenylisothiocyanat (2,00 ml; 10,95 mmol) in 10 ml trockenem THF bei Raumtemperatur hinzugegossen. Nach 24 h wurde die Reaktion auf 70 °C für eine Stunde erhitzt und über Nacht gerührt. Das Lösemittel wurde abgezogen und das Rohprodukt auf Silica aufgetragen. Es wurde säulenchromatographisch über Silica in PE : E 5 : 1, dann in E : MeOH : NH₄OH 300 : 5 : 1 getrennt.

Aussehen: gelber Feststoff

Ausbeute: 5,12 g (8,60 mmol) → 81 %

¹H-NMR: (500 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 8,68 (d, *J* = 4,7 Hz, 1H); 8,10 (s, 3H); 7,94 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H); 7,60 (s, 1H); 7,57 (d, *J* = 4,7 Hz, 1H); 7,44 (dd, *J* = 9,2; 2,6 Hz, 1H); 6,38 (d, *J* = 10,1 Hz, 1H); 5,86 (ddd, *J* = 17,5; 10,3; 7,5 Hz, 1H); 5,06 – 4,98 (m, 2H); 4,02 (s, 3H); 3,64 (s, 1H); 3,46 (q; *J* = 10,1 Hz, 1H); 2,90 – 2,80 (m, 2H); 2,38 (s, 1H); 1,75 – 1,63 (m, 3H); 1,52 – 1,45 (m, 1H); 0,88 (dd, *J* = 13,6; 7,0 Hz, 1H).

¹³C-NMR: (126 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 182,49; 159,71; 148,27; 147,46; 145,14; 143,03; 142,39; 132,69; 131,22; 130,15; 125,78; 123,88; 123,64; 121,32; 117,84; 115,15; 104,12; 61,47; 56,59; 42,95; 40,61; 28,72; 28,45; 26,91.

7.2 Biologischer Teil - Arbeitstechniken und Materialien

Verbrauchsmaterial

Material	Firma
1536-Loch-Platten, weiß	Thermo Fisher Scientific (Nidderau)
24-Loch-Platten	Sarstedt AG &Co (Nümbrecht)
384-Loch-Platten	Thermo Fisher Scientific (Nidderau)
6-Loch-Platten	Sarstedt AG &Co (Nümbrecht)
96-Loch-Platten	Sarstedt AG &Co (Nümbrecht)
96-Loch-Platten (Essen Image Lock)	Essen BioScience, Inc. (Ann Arbor, USA)
Blottingfilter (Dicke: 0,83 mm)	Thermo Fisher Scientific (Nidderau)
Countess Zählkammer	Life Technologies GmbH (Darmstadt)
Deckgläser	Carl Roth (Karlsruhe)
Glasröhrchen mit Sieb	Falcon (New York, USA)
Kulturgefäße	Sarstedt AG &Co (Nümbrecht)
Matrixpipettenspitze	Thermo Fisher Scientific (Nidderau)
Objektträger	Carl Roth (Karlsruhe)
Pipettenspitzen	Sarstedt AG &Co (Nümbrecht) Eppendorf AG (Hamburg)
Reaktionsgefäße	Sarstedt AG &Co (Nümbrecht)
serologische Pipetten	Sarstedt AG &Co (Nümbrecht)
Spritzen	B. Braun Melsungen AG (Melsungen)
Sterilfilter (0,2 µM)	Sarstedt AG &Co (Nümbrecht)
Substanzprobenröhrchen	Sarstedt AG &Co (Nümbrecht)
Trägermembran Immobilion-P	Merck (Darmstadt)
Zellkulturgefäße	Sarstedt AG &Co (Nümbrecht)
Zentrifugenröhrchen	Sarstedt AG &Co (Nümbrecht)

Reagenzien und Kits

Reagenz	Firma
$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Acrylamid	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Dasatinib	Tocris (Avonmouth, Großbritannien)
DC Protein Assay	Bio-Rad (München)
DNase freie RNase	Thermo Fisher Scientific (Nidderau)
Einschlussmittel Aqua Poly/Mount	Polysciences Inc. (Warrington)
Fastblotting-Lösung Transfer Buffer	Thermo Fisher Scientific (Nidderau)
Fischhautgelatine	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Glycerin	Carl Roth (Karlsruhe)
Glycin	Carl Roth (Karlsruhe)
HRP Fluoreszenzlösung SuperSignal West Femto bzw. Pico	Thermo Fisher Scientific (Nidderau)
Immersionsöl	Karl Zeiss Microscopy GmbH (Jena)
LI-COR Blocking Puffer	LI-COR Bioscience (Bad Homburg)
Marker für Western Blots, PageRuler	Thermo Fisher Scientific (Nidderau)
Medien	PAN Biotech GmbH (Aidenbach)
NaCl	AnalaR NORMAPUR, VWR (Darmstadt)
PBS-Tabletten	Jena Bioscience (Jena)
PLA-Kit (minus anti-Maus, plus anti- Kaninchen)	DuoLink, Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
SDS-Pellets	Carl Roth (Karlsruhe)
Triton X-100	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Trypanblau 0,4 %	Life Technologies GmbH (Darmstadt)
Trypsin	PAN Biotech GmbH (Aidenbach)
Tween20	Santa Cruz Biotechnology, Inc.(Dallas, USA)
Waschlösungen für Migrationsassay	Essen BioScience, Inc. (Ann Arbor, USA)
Zusätze der Medien	PAN Biotech GmbH (Aidenbach)

Arbeitsinstrumente

Gerät	Firma
Bildgebungssystem Odyssey Clx	LI-COR Bioscience (Bad Homburg)
Bildgebungssystem Odyssey Fc	LI-COR Bioscience (Bad Homburg)
Dampfsterilisator Varioklav 400 EP-Z	Varioki (Oberschleißheim)
Fastblotter Pierce Power Blotter	Thermo Fisher Scientific (Nidderau)
Gelelektrophoresegerät PowerPac HC	Bio-Rad (München)
Gelhalterung	Bio-Rad (München)
Heizbad WB7	memmert GmbH + Co. KG (Büchenbach)
IncuCyte Zoom	Essen BioScience, Inc. (Ann Arbor, USA)
IncuCyte Zoom Migrationsassayscratcher	Essen BioScience, Inc. (Ann Arbor, USA)
Inkubator DHD Autoflow CO2 NU 5510 E	NuAire (Plymouth, USA)
Kreisschüttler GFL 3005	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH (Burgwedel)
Matrixpipette FinTip	Thermo Fisher Scientific (Nidderau)
Mikroskop Primo Vert Mikroskop	Karl Zeiss Microscopy GmbH (Jena)
Mikroskop Zeiss Observer Z1	Karl Zeiss Microscopy GmbH (Jena)
Mikroskopadapter 0.63x Camera Adapter	Karl Zeiss Microscopy GmbH (Jena)
Mikroskopkamera AxioCam MR R3	Karl Zeiss Microscopy GmbH (Jena)
Pipetten research plus	Eppendorf AG (Hamburg)
Pipettierhilfe accu-jet	BRAND GmbH + Co. KG (Wertheim)
Rollenmischer RS-TR05	Phoenix Instrument (Garbsen)
Sterilbank HS12	Heraeus (Hagen)
Sterilbank NU S437- 500E	NuAire (Plymouth, USA)
Thermoblock Thermomixer comfort	Eppendorf AG (Hamburg)
Ultraschallhomogenisator HD2070	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG (Berlin)
UV-Vis Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific (Nidderau)
Zellzähler Countess II	Life Technologies GmbH (Darmstadt)
Zentrifuge Centrifuge 5418 R	Eppendorf AG (Hamburg)
Zentrifuge Centrifuge 5702	Eppendorf AG (Hamburg)
Zentrifuge Centrifuge 5810 R	Eppendorf AG (Hamburg)

Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
Amplifikationslösung	31,5 µl dd-H ₂ O 8 µl 5x Amplifikationsstock 0,5 µl PolymeRAsE (1:80)
HEPES-Puffer	50 mM, pH 7,4
IF Blockingpuffer	2 % Fischhautgelatine in PBS-Tween20 (0,1 %) 0,1 % Triton X-100
Ligationslösung	31 µl dd-H ₂ O 8 µl 5x Ligationsstock 1 µl Ligase (1:40)
Osteogenese-Lysis Puffer	1:100 chemilumineszierendes Substrat CDP-Star
PBS	eine PBS-Tablette in 500 ml dd-H ₂ O

Zellkultur

Medium	Zusätze	Zelllinie
DMEM	10 % (v/v) FBS	BxPC3 (Abteilung 2, MPI Dortmund)
	1 % (v/v) Penicilin/ Streptomycin	HCT116 (Abteilung 2, MPI Dortmund)
	1 % (v/v) Na Pyruvat	HEK239T (ATCC, Manassas, USA)
	1 % (v/v) MEM-NEAA	HeLa (ATCC, Manassas, USA)
		MCF-7 (ATCC, Manassas, USA)
		MDA-MB-231 (ATCC, Manassas, USA)
		MiaPaCa 2 (ATCC, Manassas, USA)
		Panc-I (ATCC, Manassas, USA)
	Panc-Tu-I (Abteilung 2, MPI Dortmund)	
McCoy 5A	10 % (v/v) FBS	HT29 (ATCC, Manassas, USA)
	1 % (v/v) Penicilin/ Streptomycin	
	1 % (v/v) Na Pyruvat	
	1 % (v/v) MEM-NEAA	

Antikörper

AK (IgG Herkunft, Nummer)	Verdünnung (Verwendung)	Herkunft
anti-Kaninchen Alexa Fluor 555 (Esel)	1:500 (IF)	Thermo Fisher Scientific (Nidderau)
anti-Kaninchen IRDye 800 (Esel)	1:500 (ICW)	LI-COR Bioscience (Bad Homburg)
anti-Maus Alexa Fluor 488 (Esel)	1:500 (IF)	Thermo Fisher Scientific (Nidderau)
anti-Maus IRDye 680 (Ziege)	1:500 (ICW)	LI-COR Bioscience (Bad Homburg)
anti-pY416Src (Maus, 6943S)	1:200 (ICW)	Cell Signaling (Danvers, USA)
anti-tSrc (Kaninchen, 2108S)	1:200 (ICW) 1:400 (IF, PLA)	Cell Signaling (Danvers, USA)
anti-tSrc (Maus, clone GD11, Kat. Nr.: 05-184)	1:400 (PLA)	Merck (Darmstadt)
anti-UNC119 (Maus, M01A, clone 2F9-2A9)	1:100 (IF; PLA)	Abnova (Taipey, Taiwan)
anti-WGA Alexa488	1:200.000 (PLA)	Lea Kremer
anti-β Catenin (Maus, Kaninchen)	1:2.500 (PLA)	Dr. Silke Brand

IF: Immunofluoreszenz; ICW: in-cell Western; PLA: proximity ligation assay

7.2.1 *In vitro* Experimente

Homogeneous Time Resolved Fluorescence-High-Throughput Screening¹⁰⁰

In PBS mit 0,05 % CHAPS wurden 3 µl einer UNC119a (Wildtyp UNC119a-GST-Protein, 150 nM Endkonzentration) und Src-Peptid (Myr-GSNKSKPK, 800 nM Endkonzentration)-Lösung in eine 1536-Loch-Platte verteilt. Zu testende Substanzen (7,5 nl in DMSO, 12,5 µM Endkonzentration) wurden durch einen akustischen Echo-Verteiler von Labcyte Inc. hinzugegeben. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 3 µl der HTFR-Reagenzien als Mischung aus anti-GST-Europium und Strepavidin-d2 hinzugegeben. Die Signale wurden durch einen Spectramax Paradigm Plattenleser von Molecular Devices ausgelesen. Hit-Substanzen wurden als aktiv angesehen, wenn das Signal unter 50 % der DMSO-Referenz war. 5632 Hits wurden wiedergetestet, wobei 1,25 µM der Substanzen genutzt wurden. Für 500 Substanzen wurden IC₅₀-Werte bestimmt. Das HTFR-HTS wurde im Compound Managing and Screening Center (COMAS, Dortmund) entwickelt und durchgeführt.

Kinetische Löslichkeit¹⁰⁰

DMSO-Lösungen der Substanzen wurden in wässrigem HEPES-Puffer verdünnt und für 90 min unter ständigem Rühren gelöst. Die Lösung wurde filtriert und die relative kinetische Löslichkeit der Substanzen wurde durch spektrophotometrische Absorption zwischen 250 und 500 nm berechnet. Dabei wurden die Extinktionswerte der wässrigen Lösung mit der 50 %igen Acetonitril-Lösung verglichen. Die kinetische Löslichkeit wurde von Matthias Baumann (Lead Discovery Center, Dortmund) durchgeführt.

Parallel artificial permeability assay – PAMPA¹⁰⁰

DMSO-Lösungen der zu testenden Substanzen wurden in wässrigem HEPS-Puffer verdünnt und zu einem Donorkompartiment einer halb-durchlässigen Transwanne gegeben, welche von dem Empfängerkompartiment durch eine künstliche Membran getrennt war. Nach 20 h Inkubation wurde die Extinktion photometrisch zwischen 250 und 500 nm im Empfängerkompartiment gemessen. Durchfluss wurde als %flux der Extinktion der Lösung als Vergleich zwischen Empfängerwanne und Transwanne ohne künstliche Membran berechnet. Das PAMPA-Experiment wurde von Matthias Baumann (Lead Discovery Center, Dortmund) durchgeführt.

Selektivitätsexperiment¹⁰⁰

Folgende Chaperon-lipidierte Protein-Paare wurden für das Selektivitätsexperiment genutzt: UNC119a-Src, PDE δ -RHEB, AIPL1-RHEB und CaM-RHEB. Die Peptide Src (Myr-GSNKSKPK-Fluorescein) und Rab1 (Fluorescein-SGGGSC(GerGer)-OMe) wurden nach bekannter Methode¹⁶⁸ synthetisiert. Das RHEB-Peptid (Fluorescein-SQGKSSC(Far)-OMe) wurde von JPT Peptide Technologies GmbH (Berlin) gekauft. Es wurden die wildtyp, also ungekürzte Proteine UNC119a, PDE δ , AIPL1 und CaM verwendet. Alle Messungen wurden bei 20 °C im Selektivitätspuffer (für CaM zusätzlich: 10 mM CaCl₂) Die fluoreszierenden lipidierten Peptide wurden in eine Küvette transferiert und das korrespondierende Chaperon UNC119a (200 nM), PDE δ (200 nM), AIPL1 (2 μ M) sowie CaM (5 μ M) hinzugefügt. Steigende Konzentrationen der Inhibitoren (200 nM, 400 nM und 4 μ M) wurden zum Protein-Peptid-Komplex hinzugegeben und die Änderung der Fluoreszenzpolarisation wurde durch deren Anregungs- und Emissionswellenlänge bei 495 nm und 520 nm gemessen. Die Daten wurden durch das Programm GraFit 5.0 (Erithracus Software) analysiert. Das Selektivitätsexperiment wurde durch Dr. Eyad Fansa (MPI für molekulare Physiologie, Dortmund) durchgeführt.

K_d-Bestimmung⁸⁴

Die K_d-Werte wurden nach Zimmermann *et al.* bestimmt.⁸⁴ Dabei wurden fluoreszierendes 0,5 μ M Myr-Src- bzw. Far-RHEB-Peptid und 1,5 μ M UNC119a bzw. 1,5 μ M PDE δ sowie steigende Konzentrationen von **Deltauncin** genutzt. K_d-Werte wurden durch Dr. Eyad Fansa (MPI für molekulare Physiologie, Dortmund) bestimmt.

7.2.2 *In cellulo* Experimente

Generelle Methoden

Um Niederschläge des FBS in den Medien zu vermeiden, wurde diese durch einen Sterilfilter abgetrennt. Angesetzte Medien wurden bei 4 °C gelagert und kurz vor Gebrauch in einem Heizbad auf 37 °C gebracht. Die Kulturgefäße, Loch-Platten, serologischen Pipetten wurden steril erhalten. Spitzen, Reaktionsgefäße, Reservoirs und PBS wurden im hauseigenen Autoklaven autoklaviert. dd-H₂O wurde durch eine mili-Q-Anlage erhalten. Abfall (Plastikwaren, flüssiger Abfall) wurde im Dampfsterilisator sterilisiert.

Auftauen von Zellen

Zellen, die in flüssigem Stickstoff gelagert wurden, wurden im Wasserbad auf 37 °C gebracht. Anschließend wurden diese in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 200 rcf für 5 min zentrifugiert, um das DMSO des Kryomediums zu entfernen. Der Überstand wurde entfernt, die Zellen in 10 ml Medium aufgenommen und in eine 75 cm² Kulturflasche überführt. Die Zellen wurden im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ aufbewahrt.

Subkultivierung der Zellen

Die Zellen wurden im Inkubator bis zur Konfluenz (qualitative Bestimmung durch ein Mikroskop) bzw. bis zur Verwendung bei 37 °C in 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und bei 37 °C in 5 % CO₂ durch Trypsin (10 vol% des Mediums) abgelöst, resuspendiert und bei 200 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in Medium resuspendiert und bei Konfluenz 1 : 10 ausgesät (insgesamt 10 ml Medium). Medien der Zellen wurden regelmäßig auf Mykoplasmen untersucht.

Zellzahlbestimmung

Die suspendierten Zellen wurden 1 : 1 mit 0,4 % Trypanblau angefärbt und in Zellkammern gegeben. Die Anzahl der Zellen wurde durch einen automatischen Zellzähler (Countess II) bestimmt.

Kryokonservierung

Zellen wurden bei etwa 90 % Konfluenz wie bei der Subkultivierung von der Gewebekulturflasche abgelöst. Das Medium wurde mit 10 % DMSO angereichert und die Zellen nach der Zentrifugation darin resuspendiert. 1 ml Zellsuspensat (ca. 10^6 Zellen) wurde anschließend in Kryoröhrchen gegeben, in einem Einfrierkontainer über Nacht bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Allgemeine Arbeitstechniken - Mikroskopie

Antikörper-Inkubation, Aufnahmen und Lagerung der Objektträger wurden im Dunklen durchgeführt, um Schäden der fluoresszierenden Farbstoffe durch Licht zu vermeiden. Bilder wurden mit der Mikroskop-integrierten Kamera aufgenommen. Aufnahmen wurden mit Immersionsöl und 63-facher Vergrößerung gefertigt. Die Objektträger wurden bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Folgende Wellenlängen wurden verwendet:

Farbstoff	Anregungs- /Emissionswellenlänge (nm)	Filter Anregungs- /Emissionswellenlänge (nm)
DAPI	353/465	335-383/420-470
Alexa Fluor 488	493/517	450-490/500-550
Alexa Fluor 555	553/568	538-562/570-640
PLA	580/618	538-562/570-640

Immunfluoreszenzmikroskopie

Ca. 30.000 Zellen/ml wurden auf Deckgläser in 24-Loch-Platten über einen Tag angewachsen. Die Zellen wurden dreimal 5 min mit 0,5 ml PBS gewaschen und mit 0,5 ml 3,7 % Formaldehyd für 5 min bei Raumtemperatur fixiert. Es wurde erneut dreimal mit 0,5 ml PBS gewaschen. Anschließend wurde bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit 0,5 ml 0,1 % Triton X-100 in PBS für 5 min permeabilisiert. Darauffolgend wurde mit 0,5 ml PBS für 5 min und zweimal mit 0,5 ml IF Blockingpuffer für 5 min bei Raumtemperatur gewaschen. Die Zellen wurden in 0,5 ml IF Blockingpuffer für 30 min bei Raumtemperatur blockiert. Die primären Antikörper (UNC119 und Src in IF Blockingpuffer) wurden mit den Zellen über Nacht bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit 0,5 ml PBS für jeweils 5 min gewaschen. anti-Kaninchen-AlexaFluor555-, anti-Maus-AlexaFluor488-Antikörper sowie 1:1000 DAPI in IF Blockingpuffer wurden zugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Abschließend wurde dreimal 5 min mit 0,5 ml PBS (0,5 ml) gewaschen und die Deckgläser mit

Einschlusslösung auf einem Objektträger aufgebracht. Negativkontrollen sind Zellen ohne einen der beiden primären Antikörper.

Proximity Ligation Assay

Für die Durchführung des *Proximity Ligation Assay* (DuoLink, Sigma-Aldrich) wurde das kommerzielle Kit mit dessen Anweisungen verwendet.¹¹³ Dabei wurden 60.000 Zellen/ml auf Deckgläser in 24-Loch-Platten über Nacht angewachsen. Die Zellen wurden dreimal 5 min mit 0,5 ml PBS gewaschen und mit 0,5 ml 3,7 % Formaldehyd für 15 min bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurde erneut dreimal mit 0,5 ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit anti-WGA-AlexaFluor488 in PBS (5 µg/ml, 200 µl) für 10 min bei Raumtemperatur und Dunkelheit behandelt. Anschließend wurde erneut dreimal mit 0,5 ml PBS für 5 min gewaschen. Es wurde bei 4 °C mit 0,5 ml 0,1 % Triton X-100 in PBS für 15 min permeabilisiert. Darauffolgend wurde mit 0,5 ml PBS für 5 min und zweimal mit 0,5 ml IF Blockingpuffer für 5 min bei Raumtemperatur gewaschen. Die Zellen wurden in 0,5 ml IF Blockingpuffer für 30 min bei Raumtemperatur blockiert. Die primären Antikörper (anti-UNC119 und anti-Src in IF Blockingpuffer) wurden mit den Zellen über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit 0,5 ml PBS für jeweils 5 min gewaschen. PLA-Sonden wurden in 1:5 IF Blockingpuffer verdünnt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Deckgläser wurden in eine vorgewärmte Feuchtigkeitskammer gegeben und 40 µl der PLA-Sonden hinzugegeben. Die Feuchtigkeitskammer wurde für eine Stunde bei 37 °C gehalten. Die Lösung wurde durch 1x Wash Buffer A ersetzt und unter leichtem Schütteln für 5 min gewaschen. Dieser Waschschrift wurde nochmals wiederholt. Anschließend wurde die Ligationslösung hinzugegeben und in der Feuchtigkeitskammer für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Deckgläser wurden zweimal 5 Min. mit 1x Wash Buffer A unter leichtem Schütteln gewaschen. Die Amplifikationslösung wurde zugegeben und für 100 min bei 37 °C in der Feuchtigkeitskammer inkubiert. Die Deckgläser wurden zweimal 10 Min. mit 1x Wash Buffer B unter leichtem Schütteln gewaschen. Im ersten Waschschrift wurde 1:1000 DAPI verwendet. Anschließend wurden die Zellen mit 0,01x Wash Buffer B gewaschen und mit Einschlusslösung auf einem Objektträger aufgebracht. Negativkontrollen sind Zellen, die ohne einen der beiden primären Antikörper behandelt wurden. Positivkontrollen sind Zellen, die mit Maus/Kaninchen-anti-β-Catenin- bzw. Src-Antikörper behandelt wurden.

FRET-FLIM Experiment⁶⁷

Das FRET-FLIM Experiment wurde nach Konitiotis *et al.*⁶⁷ und durch Dr. Antonios Konitiotis (MPI für molekulare Physiologie, Dortmund) durchgeführt.

In-cell Western Assay¹⁶⁹

MDA-MB-231 Zellen (2×10^4 Zellen/Loch, 50 μ l) wurden in einer 384-Loch-Platte mit verschiedenen Konzentrationen von Inhibitor für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 50 μ l 3,7 % Paraformaldehydlösung in PBS für 1 h bei Raumtemperatur fixiert. Es wurde dreimal mit 50 μ l PBS bei Raumtemperatur auf einem Kreisschüttler gewaschen und mit 50 μ l 0,1% Triton X-100 für 5 min bei Raumtemperatur permeabilisiert. Die Zellen wurden dreimal mit 50 μ l PBS bei Raumtemperatur auf einem Kreisschüttler gewaschen und mit 45 μ l LI-COR Blocking Puffer über Nacht bei 4°C blockiert. Der Puffer wurde durch 40 μ l primärer Antikörper -Lösung (anti-Src, anti-phospho Y416-Src in LIC-OR Blocking Puffer) ersetzt und für 2 h bei Raumtemperatur und Schütteln inkubiert. Es wurde dreimal 5 min bei Raumtemperatur mit 0,1 % Tween20 in PBS gewaschen. Anschließend wurde die Flüssigkeiten durch sekundärer Antikörper-Lösung (anti-Kaninchen IRDye800, anti-Maus IRDye 680 in LI-COR Blocking Puffer) ersetzt. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit 1 % DMSO behandelt wurden und das Fehlen einer der primären Antikörper. Als Positivkontrolle dienten Zellen, die mit 78 nM Dasatinib behandelt wurden. Die Fluoreszenz wurde bei 700 und 800 nm in einem Plattenleser gemessen. Für die Analyse wurden mit Image Studio 5.2 die Intensitäten der Kanäle 700 und 800 nm integriert. Um das Verhältnis von phospho-Y416-Src/gesamten Src (pSrc/tSrc) zu erhalten, wurde zunächst der Hintergrund für beide Kanäle (Löcher ohne primären Antikörper) normalisiert. Anschließend wurde der Hintergrund beider Kanäle von der Fluoreszenz jedes Loch abgezogen, dann pSrc/tSrc berechnet und auf dem Mittelwert der DMSO-Kontrollen normalisiert. Alle Experimente wurden mit Quadruplikaten und drei biologischen Replikaten durchgeführt. Der In-cell Western wurde durch Guillaume Garivet (MPI für molekulare Physiologie, Dortmund) durchgeführt.

Migrationsassay¹⁷⁰

MDA-MB-231-Zellen (10.000/Loch, 100 μ l) wuchsen in einer 96-Loch-Platte über Nacht an. Das Gerät zum Erstellen gleich großer Migrationskanäle (Wunden, Essen BioScience) wurde wie in der Anleitung¹⁷⁰ vorbereitet und nach Gebrauch gewaschen. Die Wunde wurde durch das Gerät zugefügt, die Zellen einmal mit 100 μ l PBS gewaschen und mit 99 μ l Medium versetzt. 1 μ l DMSO-Lösung der Inhibitoren wurde zugegeben und 24 h im IncuCyte-Gerät

unter Kulturbedingungen inkubiert. Es wurden Fotos jedes Lochs einmal pro Stunde bei einer 10x Vergrößerung aufgenommen. Die relative Wunddichte wurde durch Training der Software und anschließendes Anwenden auf die Zellbilder berechnet. Als Positivkontrolle diente 325 nM Dasatinib, als Negativkontrolle 1 % DMSO.

Kolonieformationsassay

HT29-Zellen (1.000/Loch, 2 ml) oder MDA-MB-231-Zellen (500/Loch, 2 ml) wuchsen in 6-Loch-Platten über 16 h an. Das Medium wurde mit Inhibitoren entsprechend versetzt und mit. Das Medium mit dem Inhibitor wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt. Nach zehn Tagen Inkubation bei Kulturbedingungen wurden die Zellen nach Entfernen des Mediums mit PBS gespült. 500 µl 4 % Paraformaldehyd in PBS wurde zugegeben und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung wurde entfernt und 1 ml 0,1 % Kristallviolett in PBS (Basislösung: 5 % Kristallviolett in EtOH) wurde zugegeben und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung entfernt und mit PBS dreimal (1, 5 und 10 Minuten) gewaschen. Die Platten wurden über Nacht getrocknet. Fotos wurden angefertigt und durch ImageJ analysiert bzw. Kolonien von Hand gezählt. Es wurden drei biologische Replikate von Duplikaten durchgeführt. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit 0,1 % DMSO oder nichts behandelt wurden.

Wachstumsexperimente mit Src-sensitiven Zelllinien

MDA-MB-231- (10.000/Loch, 99 µl) bzw. HT29-Zellen (25.000/Loch, 99 µl) wuchsen in einer 96-Loch-Platte über 16 h an. 0,5 µl vorverdünnte Inhibitoren, die in DMSO gelöst wurden, wurden zugegeben und 72 h im IncuCyte-Gerät unter Kulturbedingungen inkubiert. Es wurden Fotos jedes Lochs einmal pro Stunde (MDA-MB-231) bzw. einmal in zwei Stunden (HT29) bei einer 10x Vergrößerung aufgenommen. Die Konfluenz wurde durch Training der Software und anschließendem Anwenden auf die Zellbilder berechnet. Es wurden drei biologische Replikate von Quadruplikaten durchgeführt. Als Positivkontrolle dienten Zellen, die mit 325 nM Dasatinib behandelt wurden. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit 0,5 % DMSO behandelt wurden.

Wachstumsexperimente mit RAS-abhängigen Zelllinien⁹⁷

BxPC3- (10.000/Loch, 100 µl), Panc-I- (10.000/Loch, 100 µl), Panc-Tu-I- (15.000/Loch, 100 µl), HCT116- (5.000/Loch, 100 µl) bzw. MiaPaCa 2-Zellen (5.000/Loch, 100 µl) wuchsen in einer 96-Loch-Platte über 16 h an. 0,5 µl vorverdünnte DMSO-Lösung der Inhibitoren wurde zugegeben und 72 h im InCuCyte-Gerät unter Kulturbedingungen inkubiert. Es wurden Fotos jedes Lochs einmal in zwei Stunden bei einer 10x Vergrößerung aufgenommen. Die Konfluenz wurde durch Training der Software und anschließendem Anwenden auf die Zellbilder berechnet. Es wurden drei biologische Replikate von Quadruplikaten durchgeführt. Als Positivkontrolle dienten Zellen, die mit 6 µM Deltazinon 1, *S*-Enantiomer⁹⁷ behandelt wurden. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit 0,5 % DMSO behandelt wurden.

Wachstumsexperimente mit Co-Behandlung in RAS- bzw. Src-abhängigen Zelllinien

BxPC3- (10.000/Loch, 100 µl), Panc-I- (10.000/Loch, 100 µl) bzw. Panc-Tu-I- Zellen (15.000/Loch, 100µl) wuchsen in einer 96-Loch-Platte über 16 h an. 0,5 µl vorverdünnte DMSO-Lösung von **11** und *S*-Deltazinon 1 im Mischungsverhältnis 1:1 wurde zugegeben und 72 h im InCuCyte-Gerät unter Kulturbedingungen inkubiert. Es wurden Fotos jedes Lochs einmal in zwei Stunden bei einer 10x Vergrößerung aufgenommen. Die Konfluenz wurde durch Training der Software und anschließendem Anwenden auf die Zellbilder berechnet. Es wurden drei biologische Replikate von Quadruplikaten durchgeführt. Als Positivkontrolle dienten Zellen, die mit Deltazinon 1, *S*-Enantiomer⁹⁷ behandelt wurden. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit 0,5 % DMSO behandelt wurden.

Sphäroidassay

HT29-Zellen (kultiviert in RPMI1640 statt McCoy's 5A Medium, 1.500/Loch, 200 µl) wurden in *ultra-low binding* 96-Loch-Platten (Greiner) ausgesät und drei Tage unter Kulturbedingungen inkubiert. 110 µl Medium wurde entfernt und 100 µl frisches Medium mit 1:60-Verdünnung des PI sowie 10 µl DMSO-Lösung der Substanz zugegeben. Die Zellen wurden für 72-96 h im IncuCyte-Gerät unter Kulturbedingungen inkubiert. Es wurden Fotos jedes Lochs einmal in zwei Stunden bei einer 10x Vergrößerung aufgenommen. Es wurden drei biologische Replikate von Triplikaten durchgeführt. Als Positivkontrolle dienten Zellen, die mit Dasatinib oder Staurosporin behandelt wurden. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit 0,5 % DMSO behandelt wurden. Die Sphäroidexperimente wurden durch Elisabeth Hennes (MPI für molekulare Physiologie, Dortmund) durchgeführt.

Osteoblastendifferenzierungsassay

Für die Identifizierung von Hh-Signalweg Modulatoren wurde ein Osteoblastendifferenzierungsassay durchgeführt. C3H/10T1/2-Zellen (800/Loch) wurden in einer weißen 384-Loch-Platte ausgesät. Nach 16 h Adhärenz wurden Substanzen mit Endkonzentration von 10 µM durch den akustischen Nanoliterdispenser ECHO 520 (Labcyte) zugegeben. Eine Stunde später wurde die Osteogenese durch Zugabe von 1,5 µM Purmorphamin gestartet. Die Platten wurden für 96 h bei Kulturbedingungen inkubiert. Um die Aktivität der alkalischen Phosphatase (ein Osteogenmarker), zu bestimmen wurde das Medium mit 35 µl Osteogenese-Lysis Puffer gewechselt. Die Platten wurden bei 25 °C für eine Stunde im Dunkeln inkubiert. Die Lumineszenz wurde durch einen Paradigm Plattenleser (Molecular Devices, USA) aufgezeichnet. Dosis-Wirkungsanalysen wurden für alle Hit-Substanzen durch eine dreifache Verdünnungsfolge beginnend mit 30 µM durchgeführt. IC₅₀-Werte wurden durch die Quattro Software Suite (Quattro Research, Planegg) berechnet. Dieser Teil des Osteoblastendifferenzierungsassay wurde durch COMAS, Dortmund durchgeführt.

Alternativ dazu wurde das Osteoblastendifferenzierungsassay auch von Hand in 96-Loch-Platten durchgeführt. C3H/10T1/2-Zellen (3000/Loch) wurden in weiße 96-Loch-Platten über 16 h adhärenziert. Anschließend wurden die ausgewählten Substanzen mit Endkonzentration von 10 µM zugegeben. Nach einer Stunde Inkubation unter Kulturbedingungen wurde 1,5 µM Purmorphamin zugegeben und unter vorherigen Bedingungen für 96 h inkubiert. Das Medium wurde durch 100 µl Osteogenese-Lysis Puffer gewechselt. Die Platten wurden bei 25 °C für eine Stunde im Dunkeln inkubiert. Die Lumineszenz wurde durch einen Infinite M200 Plattenleser (Tecan, Österreich) aufgezeichnet. Dieser Teil des Osteoblastendifferenzier-

ungsassay wurde durch Sumersing Patil (MPI für molekulare Physiologie, Dortmund) durchgeführt.

GLI-Repotergenassay

Shh-LIGHT2-Zellen¹⁷¹ (2.5×10^4 /Loch, NIH/3T3-Zellen, die mit einem, GLI-*Firefly* Luciferase Reporter und einem Renilla-Luciferase Expressionsvector cotransfiziert wurden) wurden in einer 96-Loch-Platte für 16 h inkubiert. Das Medium wurde durch Medium mit 0,5 % FCS und 1,5 μ M Purmorphamin ersetzt. Nach einer Stunde Inkubation unter Kulturbedingungen wurden DMSO-Lösungen der Substanzen verschiedener Konzentrationen zugesetzt und weiter 48 h unter vorherigen Bedingungen inkubiert. Leuchtkäfer (*firefly*)- und Renillaluciferaseaktivitäten wurden durch das Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) nach dem Protokoll des Herstellers detektiert. Kurz zusammengefasst wird dabei das Medium entfernt, die Zellen durch 50 μ l 1x *passive lysis buffer* und Schütteln bei 25 °C für 20 min lysiert. 10 μ l Zelllysate wurde mit 10 μ l *Firefly*-Luciferasensubstrat in einer weißen, 96-Loch-Halbflächenplatte gemischt und die Lumineszenz durch einen Infinite M200 Plattenleser (Tecan, Österreich) gemessen. Dazu wurde 10 μ l Renillaluciferasensubstrate hinzugegeben und die resultierende Renillaluciferase-Lumineszenz durch einen Infinite M200 Plattenleser (Tecan, Österreich) bestimmt. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit DMSO behandelt wurden. Das GLI-Reporterassay wurde durch Sumersing Patil und Jana Flegel (MPI für molekulare Physiologie, Dortmund) durchgeführt.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1. Struktureller Aufbau von Src	3
Abb. 2.2. Vereinfachtes Schema des Signalwegs von Src. Der Src-Signalweg führt zur Förderung der Zellteilung, Überleben und Migration	4
Abb. 2.3. Strukturelle Veränderung vor und nach der Aktivierung von Src.....	5
Abb. 2.4. Verschiedene Lipidierungen der SFKs. <i>N</i> -Myristoylierung (Myr) der SFKs und Src und <i>S</i> -Palmitoylierung (Pal) der SFKs	6
Abb. 2.5. Lipidierung von SFKs	6
Abb. 2.6. Verankerung von SFKs in Membranen.....	7
Abb. 2.7. Übereinanderlegen der Kristallstrukturen von UNC119a mit Lau- und Myr-Peptid.	8
Abb. 2.8. Sequenzalignment von UNC119a/b	8
Abb. 2.9. Funktionsweise der kleinen GTPasen ARL2/3	9
Abb. 2.10. Strukturen von ARL2/3 in Komplex mit UNC119a	10
Abb. 2.11. Transport von Src und Fyn in der Zelle	12
Abb. 2.12. Verschiedene Lipidierungen von RAS. <i>S</i> -Farnesylierung (Far) von allen HRAS, NRAS und KRAS4A/B und <i>S</i> -Palmitoylierung (Pal) von KRAS, NRAS und KRAS4A.	12
Abb. 2.13. Verankerung von RAS in Membranen.....	13
Abb. 2.14. Übereinanderlegen der PDE δ -Strukturen mit GerGer- und Far-Peptid (A). Übereinanderlegen von PDE δ mit UNC119a (B)	14
Abb. 2.15. Strukturalignment von UNC119a und PDE δ	15
Abb. 2.16. Struktur von ARL2 im Komplex mit PDE δ (PDB: 1KSH)	16
Abb. 2.17. Direkte Src-Inhibitoren sowie deren IC ₅₀ -Werte.....	17
Abb. 2.18. Strukturen verschiedener Lipidomimetika und ihre Funktion	18
Abb. 2.19. A: Kristallstruktur von Deltazonamid 1 mit PDE δ (PDB: 5ML3). B: Struktur verschiedener PDE δ -Inhibitoren	20
Abb. 2.20. Assay zur Untersuchung der Interaktion vom myr-Src-Peptid mit UNC119a.....	23
Abb. 2.21. Initiale Hits und kombinierte Zielstruktur.....	24
Abb. 2.22. Retrosynthese der Zielstruktur	25
Abb. 2.23. Exemplarische Synthese der Sulfonylchloride 6a-v.....	25
Abb. 2.24. Exemplarische Synthesevorschrift der acetylierten Diamine 9a-m	26
Abb. 2.25. Exemplarische Synthese der Inhibitoren 3a-u,a-x.....	26
Abb. 2.26. Synthese der Substanzbibliothek basierend auf 1 am Beispiel von Deltauncin.	32
Abb. 2.27. Testung der Inhibition der Interaktion von verschiedenen Fluorophor-markierten, lipidierten Peptiden mit deren Chaperons durch Deltauncin mittels Fluoreszenzpolarisation ..	35

Abb. 2.28. Testung der Inhibition der Interaktion von verschiedenen Fluorophor-markierten, lipidierten Peptiden mit deren Chaperons durch Deltauncin 2 mittels Fluoreszenzpolarisation	36
Abb. 2.29. K_d -Bestimmung durch ein Verdrängungsexperiment von Deltauncin mit PDE δ (A) und UNC119a (B)	36
Abb. 2.30. Funktionsweise des PLA	37
Abb. 2.31 PLA für die Detektion der UNC119-Src-Interaktion in HeLa-Zellen	38
Abb. 2.32. Untersuchung der Immunofluoreszenz der Lokalisation von UNC119 und Src....	39
Abb. 2.33. Untersuchung der Funktionstüchtigkeit des PLA-Kits	39
Abb. 2.34. Prinzip des FLIM-FRET Experiments	41
Abb. 2.35. FRET-FLIM Experiment von mCitrine-Src-6Q mit mCherry-UNC119a/b bzw. mCitrine-RHEB mit PDE δ nach Behandlung mit Deltauncin	42
Abb. 2.36. Intrazelluläre Verteilung von Src	43
Abb. 2.37. Einfluss von Deltauncin auf die Y416-Phosphorylierung von Src in MDA-MB-231-Zellen.....	45
Abb. 2.38. Einfluss von Deltauncin auf die Migration von MDA-MB-231 nach 20 h Behandlung mit Deltauncin.....	46
Abb. 2.39. Struktur, IC_{50} im <i>homogeneous time-resolved fluorescence</i> Experiment und Löslichkeit des selektiven UNC119-Inhibitors 11	47
Abb. 2.40. Einfluss von Deltauncin und 11 auf die Bildung von Kolonien.....	48
Abb. 2.41. Einfluss von Deltauncin und 11 auf das Wachstum von MDA-MB-231- und HT29-Zellen mit Konfluenz als Detektionsmethode nach 48 h	49
Abb. 2.42. Einfluss von Deltauncin auf die Konfluenz von HT29- (A) und MDA-MB-231-Zellen (B) nach 70 h Behandlung mit Deltauncin.....	51
Abb. 2.43. Einfluss von 11 auf die Konfluenz von HT29- (A) und MDA-MB-231-Zellen (B) nach 70 h Behandlung mit Deltauncin	52
Abb. 2.44. Einfluss von Deltauncin auf das Wachstum von Panc-Tu-I-, Panc-I-, BxPC3-, HCT116- und MiaPaCa2-Zellen mit Konfluenz als Detektionsmethode nach 48 h.....	54
Abb. 2.45. Einfluss von 11 sowie eine 1:1 Behandlung von 11 und S-Deltazinon 1 auf das Wachstum von MDA-MB-231- und HT29-Zellen mit Konfluenz als Detektionsmethode nach 48 h.....	55
Abb. 2.46. Einfluss von Deltauncin auf die Konfluenz von Panc-Tu-I- (A) und Panc-I-Zellen (B) nach 100 h Behandlung mit Deltauncin.....	56

Abb. 2.47. Einfluss von Deltauncin auf die Konfluenz von BxPC3- (A) und HCT116-Zellen (B) nach 70 h Behandlung mit Deltauncin.....	57
Abb. 2.48. Einfluss von Deltauncin auf die Konfluenz von MiaPaCa2- (A) und Panc-Tu-I-Zellen (B) nach 70 h Behandlung mit Deltauncin bzw. einer 1:1 Mischung von 11 und S-Deltazinon 1 (D+11).....	58
Abb. 2.49. Einfluss von Deltauncin auf die Konfluenz von Panc-I- (A) und BxPC3-Zellen (B) nach 70 h Behandlung mit einer 1:1 Mischung 11 und S-Deltazinon 1 (D+11).....	59
Abb. 2.50. Einfluss von 25 auf die Konfluenz von Panc-Tu-I-Zellen (B) nach 70 h Behandlung mit 11.....	60
Abb. 2.51. Kontrollen des Sphäroidexperiments	61
Abb. 2.52. Auswirkung von Deltauncin auf HT29-Sphäroide.....	62
Abb. 3.1. Die vereinfachte Hh-Signalkaskade	65
Abb. 3.2. SMO-Inhibitoren und -Agonisten	66
Abb. 3.3. Bestätigung der Coaktivatoren-Aktivität aus dem COMAS Osteogenese Experiment durch ein GLI-Reporter-Gen-Assay	69
Abb. 3.4. Syntheseroute des Coaktivator 14aa nach Tønder <i>et al.</i>	70
Abb. 3.5. GLI-Reporter-Gen-Assay für die Substanzen 14aa, 14ab, 14bb und 14ba sowie die Kontrollen DMSO und Ausgangsprobe 107862	71
Abb. 3.6. Synthetisierte <i>cis</i> -Coaktivatoren basierend auf Coaktivator 14aa.....	71
Abb. 3.7. GLI-Reporter-Gen-Assay für die Substanzbibliothek basierend auf 14ab.....	75
Abb. 3.8. Strategie zur Synthese der <i>trans</i> -Isomere.....	77
Abb. 3.9. Syntheseroute der <i>trans</i> -Isomere mit Pyrrolidinonring als Elektrophil	77
Abb. 3.10. Synthese des racemischen Aminopyrrolidinons <i>rac</i> -19 für die Syntheseroute der <i>trans</i> -Isomere mit Pyrrolidinonring als Nukleophil	78
Abb. 3.11. Synthese des elektrophilen Aminosäurebausteins 21.....	78
Abb. 3.12. Syntheseroute der <i>trans</i> -Isomere mit Pyrrolidinonring als Nukleophil	78
Abb. 4.1. Mechanismus der Ferrier Umlagerung.....	82
Abb. 4.2. Vorgeschlagene Reaktionsfolge für die vinyloge C-Glycosylierung durch die Ferrier-Umlagerung.....	82
Abb. 4.3. Reaktionsschema der Ferrier-Umlagerung.....	85
Abb. 4.4. Synthese des Enolat 22a	85
Abb. 4.5. Synthese der Pyrrol-abgeleiteten Enolether 22g-i.....	91
Abb. 4.6. Synthese des Enolethers 22k	93
Abb. 4.7. Synthese des Enolethers 22l	94

Abb. 4.8. Synthese verschieden geschützter Zuckerbausteine.....	94
Abb. 4.9. Synthese des Katalysators 34	97
Abb. 4.10. Synthese des Katalysators 35	98
Abb. 4.11. Reaktionsschema zur Optimierung der vinylogenen Ferrier-Umlagerung im Hinblick auf Katalysatoren.....	98
Abb. 4.12. Verwendete Katalysatoren bei der Ferrier-Umlagerung aus Tab. 4.7.....	98
Abb. 5.1. Struktur-Wirkungsbeziehung des potentesten UNC119-Inhibitors Deltauncin.	103
Abb. 5.2. Schematische Zusammenfassung der Dissertation.....	105
Abb. 6.1. Structure activity relationship of the most potent UNC119-inhibitor Deltauncin .	107
Abb. 6.2. Schematic summary of the dissertation.....	109
Abb. 7.1. Generelles Reaktionsschema der allgemeinen Vorschrift Ia für die Synthese der acetylierten Indole	113
Abb. 7.2. Generelles Reaktionsschema der allgemeinen Vorschrift Ib für die Synthese der alkylierten Indole.....	121
Abb. 7.3. Generelles Reaktionsschema der allgemeinen Vorschrift II für die Synthese der Indolin-5-Sulfonchloride	125
Abb. 7.4. Generelles Reaktionsschema der allgemeinen Vorschrift III für die Synthese der einfach <i>Boc</i> -geschützten Diamine	137
Abb. 7.5. Generelles Reaktionsschema der allgemeinen Vorschrift IVa für die Synthese der acetylierten <i>Boc</i> -geschützten Diamine	141
Abb. 7.6. Generelles Reaktionsschema der allgemeinen Vorschrift IVb für die Synthese der alkylierten Phthalimid geschützten Diamine.....	149
Abb. 7.7. Generelles Reaktionsschema der allgemeinen Vorschrift Va für die Synthese der acetylierten Diamine	153
Abb. 7.8. Generelles Reaktionsschema der allgemeinen Vorschrift Vb für die Synthese der alkylierten Diamine	159
Abb. 7.9. Generelles Reaktionsschema der allgemeinen Vorschrift VIa für die Synthese der Inhibitoren	161
Abb. 7.10. Generelles Reaktionsschema der allgemeinen Vorschrift VIb für die Synthese der Inhibitoren	161
Abb. 7.11. Generelles Reaktionsschema der allgemeinen Vorschrift VIIa für die Synthese der Pyrrolidin-2,4-dione 12a-f.....	236
Abb. 7.12. Generelles Reaktionsschema der allgemeinen Vorschrift VIIb für die Synthese der <i>Boc</i> -geschützten Pyrrolidin-2,4-dione 12g-h	240

Abb. 7.13. Generelles Reaktionsschema der allgemeinen Vorschrift VIII für die Synthese der Pyrrolidin-2,4-dion-enamine 13aa-fb.....	242
Abb. 7.14. Generelles Reaktionsschema der allgemeinen Vorschrift IX für die Synthese der Coaktivatoren 14aa-fa	257
Abb. 7.15. Generelles Reaktionsschema der allgemeinen Vorschrift XIa für die Synthese der Enolether 22a-i	289

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1. IC ₅₀ -Werte der Substanzbibliothek mit <i>N</i> -Alkyl bzw. <i>N</i> -Acetylsubstituenten.....	28
Tab. 2.2. IC ₅₀ -Werte für die Inhibitoren von UNC119 der Substanzbibliothek mit <i>N</i> -Benzoylsubstituenten	29
Tab. 2.3. IC ₅₀ -Werte der Substanzbibliothek mit <i>N</i> -Methachlorbenzoylsubstituenten.....	31
Tab. 2.4. IC ₅₀ -Werte der Substanzbibliothek basierend auf dem initialen Hit 1.....	32
Tab. 2.5. Löslichkeit, PAMPA (<i>parallel artificial permeability assay</i>) und IC ₅₀ -Übersicht der UNC119-Inhibitoren	34
Tab. 3.1. Lewis-Säure-Screening für die Enamin-Bildung.....	72
Tab. 3.2. Synthetisierte Substanzbibliothek basierend auf 14ab, verschiedene Substituenten in Position 5.....	73
Tab. 3.3. Synthetisierte Substanzbibliothek basierend auf 14ab, verschiedene Substituenten in Position 4.....	74
Tab. 3.4. Asymmetrische Hydrogenierung von Enamin 13aa	76
Tab. 4.1. Optimierung der vinylogenen Ferrier-Umlagerung ausgehend von 3,4,6-Triacetylglucal und 22a nach Katalysator, Zeit und Temperatur	86
Tab. 4.2. Optimierung der vinylogenen Ferrier-Umlagerung ausgehend von 3,4,6-Triacetylglucal und Enolether 22a nach Lösungsmittel	88
Tab. 4.3. Optimierung der vinylogenen Ferrier-Umlagerung ausgehend von 3,4,6-Triacetylglucal und Enolether 22b	89
Tab. 4.4. Untersuchung der Anwendung der γ -selektiven Ferrier-Umlagerung auf verschiedene, acetylierte Zucker.....	90
Tab. 4.5. Optimierung der vinylogenen Ferrier-Umlagerung mit verschiedenen Enolaten	92
Tab. 4.6. Optimierung der vinylogenen Ferrier-Umlagerung im Hinblick auf verschiedene Schutzgruppen des Glucals	95
Tab. 4.7. Optimierung der vinylogenen Ferrier-Umlagerung im Hinblick auf Katalysatoren	99

Liste der Abkürzungen

µl	Microliter
µm	micromolar [µmol/l]
¹³ C-NMR	¹³ C <i>nuclear magnetic resonance</i>
¹ H-NMR	¹ H <i>nuclear magnetic resonance</i>
abs.	absolut
ACN	Acetonitril
AG	Abgangsgruppe
AIPL1	<i>aryl hydrocarbon receptor interacting protein like 1</i>
aq.	<i>aqueous</i> (wässrig)
ARL	<i>ADP ribosylation factor like GTPase</i> (ADP Ribosylierungsfaktor-ähnliche GTPase)
BPF	Tris(pentafluorphenyl)bor
BSA	Bovines Serumalbumin
CaM	Calmodulin
CCLE	<i>Cancer Cell Line Encyclopedia</i>
CHAPS	3-[(3-Cholamidpropyl)dimethylammonium]-1-propanesulfonat
COMAS	<i>Compound Managing and Screening Center</i>
COX	Cyclooxygenasen
c-Src	cellular sarcoma (zelluläres Sarkoma)
d	Doublett
d. h.	das heißt
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DCE	Dichlorethan
DCM	Dichloromethan
dd-H ₂ O	doppelt destilliertes Wasser („milli-Q Wasser“)
deion.	deionisiert
Dhh	<i>Desert Hedgehog</i>
DIPA	Diisopropylamin
DMAP	Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (siehe DNS)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
E	Ethylacetat
EGFR	<i>epiderma growth factor receptor</i> (epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor)
eq.	Equivalent(e)
ESI	Elektronen Spray Ionisation
Et ₂ O	Diethylether
evtl.	eventuell
Far	farnesyl
FBS	fetales bovines Serum
FCS	fetales Kalbserum
FLIM	<i>fluorescence lifetime imaging microscopy</i> (Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie)
FRET	Förster-Ressonanzenergietransfer
GDP	Guanosindiphosphat
GerGer	geranylgeranyl
ges.	gesättigt(e)
GLI-1	<i>glioma-associated oncogene 1</i>
GNP	Phosphoaminophosphorsäureguanylatester
h	Stunde(n)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HFIP	Hexafluorisopropanol
Hh	<i>Hedgehog</i>
HHIP	<i>Hedgehog-interacting protein</i>
HPLC/MS	<i>high performance liquid chromatography mass spectrometry</i> (Hochleistungsflüssigchromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie)
HRMS	<i>high resolution mass spectrometry</i> (hochaufgelöste Massenspektrometrie)
HTRF	<i>homogeneous time-resolved fluorescence</i>
HTS	<i>high-throughput screening</i>
ICW	in-cell Western
IgG	Immunglobulin G
Ihh	<i>Indian Hedgehog</i>
INPP5E	Inositol Polyphosphat-5-Phosphatase E

IR	Infrarot
JAK2	Januskinase 2
Kat.	Katalysator
K _d	Dissoziationskonstante
konz.	konzentriert(e)
Lau	lauryl
M	molar [mol/l]
m	Multipllett
MeCN	Acetonitril
MEM-NEAA	<i>minimum essential medium - non-essential amino acids</i> (Minimales essentieles Medium - nicht-essentielle Aminosäuren)
Min.	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	millimolar [mmol/l]
MS	Molekularsieb
Myr	myristoyl
NFSI	<i>N</i> -Fluorbenzolsulfonimid
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernspinresonanz)
NPHP3	Nephrocystin 3
Pal	palmitoyl
PAMPA	<i>parallel artificial membrane permeability assay</i>
PAT	Palmitoyl-Acyl-Transferase
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat gepufferte NaCl-Lösung)
PDE6C	Phosphodiesterase 6C
PDEδ	PDE6δ, <i>retinal rod rhodopsin-sensitive cGMP 3',5'-cyclic phosphodiesterase subunit delta</i>
PE	Petroleum Ether
Pen	Penicillin
PI	Propidiumiodid
PLA	<i>proximity ligation assay</i> (Nachbarschaftsligations Assay)
PPI	Protein-Protein-Interaktion
pSrc	phosphoryliertes Src
pTyr	phosphoryliertes Tyrosin

rcf	<i>relativ centrifugal force</i> (relative Zentrifugalkraft)
RHEB	<i>RAS homolog enriched in brain</i>
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
SAR	<i>structure activity relationship</i> (Struktur-Wirkungsbeziehung)
SFK(s)	Src Familie Kinase(n)
SG	Schutzgruppe
SH	<i>Src homology</i>
Shh	<i>Sonic Hedgehog</i>
sog.	sogenannten
Strep	Streptavidin
t	Triplett
TBAI	Tetrabutylammoniumiodid
TEA	Triethylamin
TFA	trifluoro acetic acid (Trifluoressigsäure)
THF	Tetrahydrofuran
TMS	trimethylsilyl
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tSrc	totales Src
ü. N.	über Nacht
UNC	uncoordinated protein
UNC119	UNCoordinated protein 119
Vgl.	Vergleich
v-Src	virales Src
WB	Westernblot
WGA	<i>wheat germ agglutinin</i>
wt	Wildtyp
Y	Tyrosin
ZAP-70	<i>Zeta-chain-associated protein kinase 70</i> (Zeta-Kette-assozierte Protein Kinase)
zw.	zwischen

Literaturverzeichnis

1. WHO. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> (zugegriffen am 09.10.2017).
2. Hanahan, D.; Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **2004**, *144* (5), 646-674.
3. Guan, X. Cancer metastases: challenges and opportunities. *Acta. Pharm. Sin. B* **2015**, *5* (5), 402-418.
4. Dehm, S. M.; Bonham, K. SRC gene expression in human cancer: the role of transcriptional activation. *Biochem. Cell Biol.* **2004**, *82* (2), 263-274.
5. Manning, G.; Whyte, D. B.; Martinez, R.; T, H.; Sudarsanam, S. The protein kinase complement of the human genome. *Science* **2002**, *298*, 1912-1934.
6. Parsons, S. J.; Parsons, J. T. Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene* **2004**, *23*, 7906-7909.
7. Roskoski, R. J. Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *324*, 1155–1164.
8. Nada, S.; Okada, M.; MacAuley, A.; Cooper, J. A.; Nakagawa, H. Cloning of a complementary DNA for a protein-tyrosine kinase that specifically phosphorylates a negative regulatory site of p60c-src. *Nature* **1991**, *351* (6321), 69-72.
9. Davidson, D.; Chow, L. M. L.; Veillette, A. Chk, a Csk family tyrosine protein kinase, exhibits Csk-like activity in fibroblasts, but not in an antigen-specific T-cell line. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 1355-1362.
10. Roussel, R. R.; Brodeur, S. R.; Shalloway, D.; Laudano, A. P. Selective binding of activated pp60c-src by an immobilized synthetic phosphopeptide modeled on the carboxyl terminus of pp60c-src. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1991**, *88* (23), 10696–10700.
11. Liu, X.; Brodeur, S. R.; Gish, G.; Songyang, Z.; Cantley, L. C.; Laudano, A. P.; Pawson, T. Regulation of c-Src tyrosine kinase activity by the Src SH2 domain. *Oncogene* **1993**, *8* (5), 1119-1126.
12. Bibbins, K. B.; Boeuf, H.; Varmus, H. E. Binding of the Src SH2 domain to phosphopeptides is determined by residues in both the SH2 domain and the phosphopeptides. *Mol. Cel. Biol.* **1993**, *13* (12), 7278–7287.

13. Xu, W.; Harrison, S. C.; Eck, M. J. Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature* **1997**, *385* (6617), 595-602.
14. Bjorge, J. D.; Jakymiw, A.; Fujita, D. J. Selected glimpses into the activation and function of Src kinase. *Oncogene* **2000**, *19*, 5620-5635.
15. Levin, V. A. Basis and importance of Src as a target in cancer. *Cancer Treat. Res.* **2004**, *119*, 89-119.
16. Roskoski, R. J. Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *331*, 1-14.
17. Zheng, X. M.; Wang, Y.; Fallen, C. J. Cell transformation and activation of pp60c-src by overexpression of a protein tyrosine phosphatase. *Nature* **1992**, *359*, 336 - 339.
18. Fang, K. S.; Sabe, H.; Saito, H. S.; Hanafusa, H. Comparative study of three protein-tyrosine phosphatases. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269* (31), 20194-20200.
19. Kypta, R. M.; Goldberg, T. Y.; Ulug, E.; Courtneidge, S. A. Association between the PDGF receptor and members of the src family of tyrosine kinases. *Cell* **1990**, *62* (3), 481-492.
20. Alonso, G.; Koegl, M.; Mazurenko, N.; Courtneidge, S. A. Sequence requirements for binding of src family tyrosine kinases to activated growth factor receptors. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 9840-9848.
21. Cobb, B. S.; Schaller, M. D.; Leu, T. H.; Parsons, J. T. Stable association of pp60src and pp59fyn with the focal adhesion-associated protein tyrosine kinase, pp125FAK. *Mol. Cell Biol.* **1994**, *14* (1), 147-155.
22. Roskoski, R. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacol. Res.* **2014**, *79*, 34-74.
23. Roskoski, R. ErbB/HER protein-tyrosine kinases: structures and smallmolecule inhibitors. *Pharmacol. Res.* **2014**, *42-59*, 87.
24. Roskoski, R. J. Src protein-tyrosine kinase structure, mechanism, and small molecule inhibitors. *Pharmacol. Res.* **2015**, *94*, 9-25.
25. Thomas, S. M.; Brugge, J. S. Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **1997**, *13*, 513-609.
26. Frame, M. C. Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1602* (2), 114-130.

27. Jiang, T.; Qiu, Y. Interaction between Src and a C-terminal proline-rich motif of akt is required for Akt activation. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (18), 15789–115793.
28. Bunda, S.; Heira, P.; Srikumar, T.; Cook, J. D.; Burrell, K.; Kano, Y.; Lee, J. E.; Zadeh, G.; Raught, B.; Ohh, M. Src promotes GTPase activity of Ras via tyrosine 32 phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2014**, *111* (36), E3785-E3794.
29. Piwnica-Worms, H.; Saunders, B. K.; Roberts, T. M.; Smith, A. E.; Cheng, S. H. Tyrosine phosphorylation regulates the biochemical and biological properties of pp60c-src. *Cell* **1987**, *1* (75-82), 49.
30. Summy, J. M.; Gallick, G. E. Src family kinases in tumor progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* **2003**, *22* (4), 337-358.
31. Courtneidge, S. A.; Levinson, A. D.; Bishop, J. M. The protein encoded by the transforming gene of avian sarcoma virus (pp60src) and a homologous protein in normal cells (pp60proto-src) are associated with the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, *77* (7), 3789-3787.
32. Schaller, M. D.; Hildebrand, J. D.; Shannon, J. D.; Fox, J. W.; Vines, R. R.; Parsons, J. T. Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. *Mol. Cell. Biol.* **1994**, *14* (3), 1680-1688.
33. Henderson, D.; Rohrschneider, L. Cytoskeletal association of pp60src. The transforming protein of the rous sarcoma virus. *Exp. Cell Res.* **1987**, *168*, 411-421.
34. Owens, D. W.; McLean, G. W.; Wyke, A. W.; Paraskeva, C.; Parkinson, E. K.; Frame, M. C.; Brunton, V. G. The catalytic activity of the Src family kinases is required to disrupt cadherin-dependent cell–cell contacts. *Mol. Biol. Cell* **2000**, *11* (1), 51-64.
35. Tanaka, T.; Kurth, R. Monoclonal antibodies specific for the avian sarcoma virus transforming protein pp60src. *Virology* **1984**, *133* (1), 202-210.
36. Resh, M. D.; Erikson, R. L. Highly specific antibody to Rous sarcoma virus src gene product recognizes a novel population of pp60v-src and pp60c-src molecules. *J. Cell. Biol.* **1985**, *100* (2), 409-414.
37. Willingham, M. C.; Jay, G.; Pastan, I. Localization of the ASV src gene product to the plasma membrane of transformed cells by electron microscopic immunocytochemistry. *Cell* **1979**, *18* (1), 125–134.
38. Patwardhan, P.; Resh, M. D. Myristoylation and Membrane Binding Regulate c-Src Stability and Kinase Activity. *Mol. Cell. Biol.* **2010**, *30* (17), 4094–4107.

39. Buss, J. E.; Sefton, B. M. Myristic acid, a rare fatty acid, is the lipid attached to the transforming protein of Rous sarcoma virus and its cellular homolog. *J. Virol.* **1985**, *53* (1), 7-12.
40. Kaplan, J. M.; Mardon, G.; Bishop, J. M.; Varmus, H. E. The first seven amino acids encoded by the v-src oncogene act as a myristylation signal: lysine 7 is a critical determinant. *Mol. Cell. Biol.* **1988**, *8* (6), 2435-2441.
41. Resh, M. D. Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1451*, 1-16.
42. Hu, X.; Dang, Y.; Tenney, K.; Crews, P.; Tsai, C. W.; Sixt, K. M.; Cole, P. A.; Liu, J. O. Regulation of c-Src non-receptor tyrosine kinase activity by bengamide a through inhibition of methionine aminopeptidases. *Chem. Biol.* **2007**, *14* (7), 764-774.
43. Resh, M. D. Myristoylation and Palmitoylation of Src family members: the fats of the matter. *Cell* **1994**, *76*, 411-413.
44. Hitosugi, T.; Sato, M.; K. Sasaki, Y. U. Lipid raft specific knockdown of SRC family kinase activity inhibits cell adhesion and cell cycle progression of breast cancer cells. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 8139–8148.
45. Kaplan, J. M.; Varmus, H. E.; Bishop, J. M. The src protein contains multiple domains for specific attachment to membranes. *Mol. Cell. Biol.* **1990**, *10* (3), 1000–1009.
46. Sigal, C. T.; Zhou, W.; Buser, C. A.; McLaughlin, S.; Resh, M. D. Amino-terminal basic residues of Src mediate membrane binding through electrostatic interaction with acidic phospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91* (25), 12253–12257.
47. Sato, I.; Obata, Y.; Kasahara, K.; Nakayama, Y.; Fukumoto, Y.; Yamasaki, T.; Yokoyama, K. K.; Saito, T.; Yamaguchi, N. Differential trafficking of Src, Lyn, Yes and Fyn is specified by the state of palmitoylation in the SH4 domain. *J. Cell Sci.* **2009**, *122*, 965-975.
48. Paige, L. A.; Nadler, M. J. S.; Harrison, M. L.; Cassady, J. M.; Geahlen, R. L. Reversible palmitoylation of the protein-tyrosine kinase p56lck. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 8669-8674.
49. Alland, L.; Peseckis, S. M.; Atherton, R. E.; Berthiaume, L.; Resh, M. D. Dual myristylation and palmitoylation of Src family member p59fyn affects subcellular localization. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 16701-16705.

50. Koegl, M.; Zlatkine, P.; Ley, S. C.; Courtneidge, S. A.; Magee, A. I. Palmitoylation of multiple Src-family kinases at a homologous N-terminal motif. *Biochem. J.* **1994**, *303*, 749-753.
51. Shenoy-Scaria, A. M.; Dietzen, D. J.; Kwong, J.; Link, D. C.; Lublin, D. M. Cysteine 3 of Src family protein tyrosine kinases determines palmitoylation and localization in caveolae. *J. Cell Biol.* **1994**, *126*, 353-353.
52. Kasahara, K.; Nakayama, Y.; Kihara, A.; Matsuda, D.; Ikeda, K.; Kuga, T.; Fukumoto, Y.; Igarashi, Y.; Yamaguchi, N. Rapid trafficking of c-Src, a non-palmitoylated Src-family kinase, between the plasma membrane and late endosomes/lysosomes. *Exp. Cell Res.* **2007**, *313*, 2651-2666.
53. Wright, K. J.; Baye, L. M.; Olivier-Mason, A.; Mukhopadhyay, S.; Sang, L.; Kwong, M.; Wang, W.; Pretorius, P. R.; Sheffield, V. C.; Sengupta, P.; Slusarski, D. C.; Jackson, P. K. An ARL3–UNC119–RP2 GTPase cycle targets myristoylated NPHP3 to the primary cilium. *Genes Dev.* **2011**, *25* (22), 2347-2360.
54. Maduro, M. F.; Gordon, M.; Jacobson, R.; Pilgrim, D. B. The Unc-119 family of neural proteins is functionally conserved between humans, drosophilca and c. elegans. *J. Neurogenetics* **1999**, *13* (4), 191-212.
55. Vardy, E.; Roth, B. L. Vision and olfaction say Unc-le to G proteins. *Nat. Neurosci.* **2011**, *14* (7), 805-806.
56. Constantine, R.; Zhang, H.; Gerstner, C. D.; Frederick, J. M.; Baehr, W. Uncoordinated (UNC)119: Coordinating the trafficking of myristoylated proteins. *Vision Res.* **2012**, *75*, 26-32.
57. Lee, Y.; Chung, S.; Baek, I. K.; Lee, T. H.; Paik, S.-Y.; Lee, J. UNC119a bridges the transmission of Fyn signals to Rab11, leading to the completion of cytokinesis. *Cell Cycle* **2013**, *12* (8), 1303-1315.
58. Bioinformatics. Bioinformatics. www.bioinformatics.org (zugegriffen am 03.11.2017).
59. Zhang, H.; Constantine, R.; Vorobiev, S.; Chen, Y.; Seetharaman, J.; Huang, Y. J.; Xiao, R.; Montelione, G. T.; Gerstner, C. D.; Davis, M. W.; Inana, G.; Whitby, F. G.; Jorgensen, E. M.; Hill, C. P.; Tong, L.; Baehr, W. UNC119 is required for G protein trafficking in sensory neurons. *Nat. Neurosci.* **2011**, *14* (7), 874-880.
60. Jaiswal, M.; Fansa, E. K.; Kosling, S. K.; Mejuch, T.; Waldmann, H.; Wittinghofer, A. Novel Biochemical and Structural Insights into the Interaction of Myristoylated Cargo

- with Unc119 Protein and Their Release by Arl2/3. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291* (39), 20766-20778.
61. Veltel, S.; Kravchenko, A.; Ismail, S.; Wittinghofer, A. Specificity of Arl2/Arl3 signaling is mediated by a ternary Arl3-effector-GAP complex. *FEBS Lett.* **2008**, *582*, 2501-2507.
 62. Bowzard, J. B.; D., C.; Peng, J. K. R. A. ELMOD2 is an Arl2 GTPase-activating protein that also acts on Arfs. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282* (24), 17568-17580.
 63. Veltel, S.; Gasper, R.; Eisenacher, E.; A., W. The retinitis pigmentosa 2 gene product is a GTPase-activating protein for Arf-like 3. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**, *15*, 373-380.
 64. Zhang, Q.; Yan, L.; Zhang, Y.; Torres, V. E.; Harries, C. P.; Ling, K.; Hu, J. GTP-binding of ARL-3 is activated by ARL-13 as a GEF and stabilized by UNC-119. *Sci. Rep.* **2016**, *6*.
 65. Ismail, S. A.; Chen, Y. X.; Miertzschke, M.; Vetter, I. R.; Koerner, C.; Wittinghofer, A. Structural basis for Arl3-specific release of myristoylated ciliary cargo from UNC119. *EMBO J.* **2012**, *31* (20), 4085-4094.
 66. Gotthardt, K.; Lokaj, M.; Koerner, C.; Falk, N.; Gießl, A.; Wittinghofer, A. A G-protein activation cascade from Arl13B to Arl3 and implications for ciliary targeting of lipidated proteins. *eLife* **2015**, *9* (4).
 67. Konitsiotis, A. D.; Roßmannek, L.; Stanoev, A.; Schmick, M.; Bastiaens, P. I. H. Spatial cycles mediated by UNC119 solubilisation maintain Src family kinases plasma membrane localisation. *Nat. Commun.* **2017**, *8* (114), 1-17.
 68. Downwar, D. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 11-22.
 69. Jun, J. E.; Rubio, I.; Roose, J. P. Regulation of Ras exchange factors and cellular localization of Ras activation by lipid messengers in T cells. *Front. Immunol.* **2013**, *239*.
 70. Shapiro, P. Ras-MAP kinase signaling pathways and control of cell proliferation: relevance to cancer therapy. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **2002**, *39* (4-5), 285-330.
 71. Scheidig, A. J.; Burmester, C.; Goody, R. S. The pre-hydrolysis state of p21(ras) in complex with GTP: new insights into the role of water molecules in the GTP hydrolysis reaction of ras-like proteins. *Structure* **1999**, *7* (11), 131-1324.
 72. Buhrman, G.; Holzapfel, G.; Fetics, S.; Mattos, C. Allosteric modulation of Ras positions Q61 for a direct role in catalysis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **2010**, *107* (11), 4931-4936.

73. Scheffzek, K.; Ahmadian, M. R.; Kabsch, W.; Wiesmüller, L.; Lautwein, A.; Schmitz, F.; Wittinghofer, A. The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science* **1997**, *277* (5324), 333-338.
74. Bos, J. L. Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* **1989**, *49* (4), 4682–4689.
75. Downward, J. Targeting ras signalling pathways in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3* (1), 11-22.
76. Lohinai, Z.; Klikovits, T.; Moldvay, J.; Ostoros, G.; Raso, E.; Timar, J.; Fabian, K.; Kovalszky, I.; Kenessey, I.; Aigner, C.; Renyi-Vamos, F.; Klepetko, W.; Dome, B.; Hegedus, B. KRAS-mutation incidence and prognostic value are metastatic site-specific in lung adenocarcinoma: poor prognosis in patients with KRAS mutation and bone metastasis. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (39721).
77. Zeitouni, D.; Pylayeva-Gupta, Y.; C. J. Der, K. L. B. KRAS Mutant Pancreatic Cancer: No Lone Path to an Effective Treatment. *Cancers (Basel)* **2016**, *8* (4), 45.
78. Larki, P.; Gharib, E.; Taleghani, M. Y.; Khorshidi, F.; Nazemalhosseini-Mojarad, E.; Aghdaei, H. A. Coexistence of KRAS and BRAF Mutations in Colorectal Cancer: A Case Report Supporting The Concept of Tumoral Heterogeneity. *Cell. J.* **2017**, *19*, 113-117.
79. Völkert, M.; Wagner, M.; Peters, C.; Waldmann, H. The Chemical Biology of Ras Lipidation. *Biol. Chem.* **2001**, *382*, 1133-1145.
80. Prior, I. A.; Hancock, J. F. Ras trafficking, localization and compartmentalized signalling. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **2012**, *23* (2), 145-153.
81. Laude, A. J.; Prior, I. A. Palmitoylation and localisation of RAS isoforms are modulated by the hypervariable linker domain. *J. Cell. Sci.* **2008**, *121*, 421-427.
82. Ahearn, I. M.; Haigis, K.; Bar-Sagi, D.; Philips, M. R. Regulating the Regulator: Post-Translational Modification of Ras. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2011**, *13* (1).
83. Spiegel, J.; Cromm, P. M.; Zimmermann, G.; Grossmann, T. N.; Waldmann, H. Small-molecule modulation of Ras signaling. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 613-622.
84. Zimmermann, G.; Papke, B.; Ismail, S.; Vartak, N.; Chandra, A.; Hoffmann, M.; Hahn, S. A.; Triola, G.; Wittinghofer, A.; P. I. Bastiaens, H. W. Small molecule inhibition of the KRAS-PDE δ interaction impairs oncogenic KRAS signalling. *Nature* **2013**, *497*, 638-642.

85. Fansa, E. K.; Kösling, S. K.; Zent, E.; Wittinghofer, A.; Ismail, S. PDE6 δ -mediated sorting of INPP5E into the cilium is determined by cargo-carrier affinity. *Nat. Commun* **2016**, *7*, 11366.
86. Fansa, E. K.; O'Reilly, N. J.; Ismail, S.; Wittinghofer, A. The N- and C-terminal ends of RPGR can bind to PDE6 δ . *EMBO Exp.* **2015**, *16* (12), 1583-1585.
87. Ismail, S. A.; Chen, Y.-X.; Rusinova, A.; Chandra, A.; Bierbaum, M.; Gremer, L.; Triola, G.; Waldmann, H.; Bastiaens, P. I. H.; Wittinghofer, A. Arl2-GTP and Arl3-GTP regulate a GDI-like transport system for farnesylated cargo. *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 942-949.
88. Baehr, W. Membrane protein transport in photoreceptors: the function of PDE δ . *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2014**, *55* (12), 8653-8666.
89. Hanzal-Bayer, M.; Renault, L.; Roversi, P.; Wittinghofer, A.; Hillig, R. C. The complex of Arl2-GTP and PDE delta: from structure to function. *EMBO J.* **2002**, *21* (9), 2095-2106.
90. Hanke, J. H.; Gardner, J. P.; Dow, R. L.; Changelian, P. S.; Brissette, W. H.; Weringer, E. J.; Pollok, B. A.; Connelly, P. A. Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271* (2), 695-701.
91. Brandvold, K. R.; Steffey, M. E.; Fox, C. C.; Soellner, M. B. Development of a highly selective c-Src kinase inhibitor. *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7* (8), 1393-1398.
92. Tabariès, S.; A, M. G.; Hsu, B. E.; Tam, C. E.; Savage, P.; Park, M.; Siegel, P. M. Lyn modulates Claudin-2 expression and is a therapeutic target for breast cancer liver metastasis. *Oncotarget* **2015**, *6* (11), 9479-9487.
93. Zhang, S.; Yu, D. Targeting Src family kinases in anti-cancer therapies: turning promise into triumph. *Trends Pharmacol. Sci.* **2012**, *33* (3), 122-128.
94. Puls, L. N.; Eadens, M.; Messersmith, W. Current status of Src inhibitors in solid tumor malignancies. *Oncologist* **2011**, *16* (5), 566-578.
95. Gargalionis, A. N.; Karamouzis, M. V.; G., P. A. The molecular rationale of Src inhibition in colorectal carcinomas. *Int. J. Cancer* **2014**, *134* (9), 2019-2029.
96. Proschak, E.; Heitel, P.; Kalinowsky, L.; Merk, D. Opportunities and challenges for fatty acid mimetics in drug discovery. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 523-5266.
97. Papke, B.; Murarka, S.; Vogel, H. A.; Martín-Gago, P.; Kovacevic, M.; Truxius, D. C.; Fansa, E. K.; Ismail, S.; Zimmermann, G.; Heinelt, K.; Schultz-Fademrecht, C.; Saabi, A. A.; Nussbaumer, M. B. P.; Wittinghofer, A.; Waldmann, H.; Bastiaens, P. I.

- Identification of pyrazolopyridazinones as PDE δ inhibitors. *Nat. Commun.* **2016**, *11360* (7).
98. Martín-Gago, P.; Fansa, E. K.; Klein, C. H.; Murarka, S.; Janning, P.; Schürmann, M.; Metz, M.; Ismail, S.; Schultz-Fademrecht, C.; Baumann, M.; Bastiaens, P. I.; Wittinghofer, A.; Waldmann, H. A PDE6 δ -KRas inhibitor chemotype with up to seven H-bonds and picomolar affinity that prevents efficient inhibitor release by Arl2. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56* (9), 2423-2428.
99. Degorce, F.; Card, A.; Soh, S.; Trinquet, E.; Knapik, G. P.; Xie, B. HTRF: a technology tailored for Drug discovery – a review of theoretical aspects and recent applications. *Curr. Chem. Genomics* **2009**, *3*, 22-32.
100. Mejuch, T.; Garivet, G.; Hofer, W.; Kaiser, N.; Fansa, E. K.; Ehrt, C.; Koch, O.; Baumann, M.; Ziegler, S.; Wittinghofer, A.; Waldmann, H. Small-Molecule Inhibition of the UNC119–Cargo Interaction. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 6181–66186.
101. Evans, B. E.; Rittle, K. E.; Bock, M. G.; DiPardo, R. M.; Freidinger, R. M.; Whittler, W. L.; Lundell, G. F.; Veber, D. F.; Anderson, P. S.; Chang, R. S. Methods for drug discovery: development of potent, selective, orally effective cholecystokeinin antagonist. *J. Med. Chem.* **1988**, *31* (22), 2235-2246.
102. Manetti, D.; Mannelli, L. D. C.; Dei, S.; Galeotti, N.; Carla Ghelardini, M. N. R. S. S. E. T. A. P. A. B.; Gualtieri, F. Design, synthesis, and preliminary pharmacological evaluation of a set of small molecules that directly activate gi proteins. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (20), 6491-6503.
103. Xu, X.-H.; Wang, X.; Liu, G.-K.; Tokunaga, E.; Shibata, N. Regioselective synthesis of heteroaryl triflones by LDA (lithium diisopropylamide)-mediated anionic Thia-Fries rearrangement. *Org. Lett.* **2012**, *14* (10), 2544-2547.
104. Moussa, I. A.; Banister, S. D.; Beinat, C.; Giboureau, N.; Reynolds, A. J.; Kassiou, M. Design, synthesis, and structure-affinity relationships of regioisomeric N-benzyl alkyl ether piperazine derivatives as σ -1 receptor ligands. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 6228-6239.
105. Riva, E.; Comi, D.; Borrelli, S.; Colombo, F.; Danieli, B.; Borlak, J.; Evensen, L.; Lorens, J. B.; Fontana, G.; Gia, O. M.; Via, L. D.; Passarella, D. Synthesis and biological evaluation of new camptothecin derivatives obtained by modification of position 20. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 8660–8668.
106. Sadeghzadeh, M.; Sheibani, S.; Ghi, M.; Daha, F. J.; Amanlou, M.; Arjm, M.; Bozcheloie, A. H. Synthesis and receptor binding studies of novel 4,4-disubstituted

- arylalkyl/arylalkylsulfonyl piperazine and piperidine-based derivatives as a new class of $\sigma 1$ ligands. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *64*, 488-497.
107. Khan, P. M.; Correa, R. G.; Divlianska, D. B.; Peddibhotla, S.; Sessions, E. H.; Magnuson, G.; Brown, B.; Suyama, E.; Yuan, H.; Mangravita-Novo, A.; Vicchiarelli, M.; Su, Y.; Vasile, S.; Smith, L. H.; Diaz, P. W.; Reed, J. C.; Roth, G. P. Identification of inhibitors of NOD1-induced nuclear factor- κ B activation. *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, *2* (10), 780-785.
108. Zhang, H.; Liu, X.-H.; Zhang, K.; Chen, C.-K.; Frederick, J. M.; Baehr, W. Photoreceptor cGMP phosphodiesterase delta subunit (PDEdelta) functions as a prenyl-binding protein. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 407-413.
109. Majumder, A.; Gopalakrishna, K. N.; P. Cheguru, L. G.; Artmeyer, N. O. Interaction of aryl hydrocarbon receptor-interacting protein-like 1 with the farnesyl moiety. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 21320-21328.
110. Sperlich, B.; Kapoor, S.; Waldmann, H.; Winter, R.; Weise, K. Regulation of K-Ras4B Membrane Binding by Calmodulin. *Biophys. J.* **2016**, *111*, 113-122.
111. T. Mejuch, H. v. H. G. T. M. J. H. W. Specificity of lipoprotein chaperones for the characteristic lipidated structural motifs of their cognate lipoproteins. *ChemBioChem* **2015**, *16*, 2460-2465.
112. Chen, Y.-X.; Koch, S.; Uhlenbrock, K.; Weise, K.; Das, D.; Gremer, L.; Brunsveld, L.; Wittinghofer, A.; Winter, R.; Triola, G.; Waldmann, H. Synthesis of the Rheb and K-Ras4B GTPases. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 6090-6095.
113. Sigma-Aldrich. <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/duolink-fluorescence-user-manual.html> (zugegriffen am 07.11.2017).
114. Toseland, C. P. Fluorescent labeling and modification of proteins. *J. Chem. Biol.* **2013**, *6* (3), 85-95.
115. Parker, J.; Cartwright, C. A. Src activity increases and Yes activity decreases during mitosis of human colon carcinoma cells. *Mol. Cell Biol.* **1995**, *15* (5), 2374-2382.
116. Ben-Ari, Y.; Brody, Y.; Kinor, N.; Mor, A.; Tsukamoto, T.; Spector, D. L.; Singer, R. H.; Shav-Tal, Y. The life of an mRNA in space and time. *J. Cell Sci.* **2010**, *123* (10), 1761-1774.

117. Liu, J.; Huang, C.; Zhan, X. Src is required for cell migration and shape changes induced by fibroblast growth factor 1. *Oncogene* **1999**, *18* (48), 6700-6706.
118. Gottesman, M. M.; Pasatan, I. H. The role of multidrug resistance Efflux Pumps in cancer: revisiting a JNCI publication exploring expression of the MDR1 (P-glycoprotein) gene. *J. Natl. Cancer Inst.* **2015**, *107* (9).
119. Chen, J.; Lu, L.; Feng, Y.; Dai, L.; Li, Y.; Zhang, P. PKD2 mediates multi-drug resistance in breast cancer cells through modulation of P-glycoprotein expression. *Cancer Lett.* **2011**, *300* (1), 48-56.
120. Hoffman, R. M. In vitro sensitivity assays in cancer: a review, analysis, and prognosis. *J. Clin. Lab. Anal.* **1991**, *5*, 133-143.
121. Dehm, S.; Senger, M.-A.; Bonham, K. SRC transcriptional activation in a subset of human colon cancer cell lines. *FEBS Lett.* **2001**, *487*, 367-371.
122. Halaschek-Wiener, J.; Wacheck, V.; Schlagbauer-Wadl, H.; Wolff, K.; Kloog, Y.; Jansen, B. A novel Ras antagonist regulates both oncogenic Ras and the tumor suppressor p53 in colon cancer cells. *Mol Med.* **2000**, *6* (8), 693-704.
123. Samoszuk, M.; Tan, J.; Chorn, G. Clonogenic growth of human breast cancer cells co-cultured in direct contact with serum-activated fibroblasts. *Breast Cancer Res.* **2005**, *7* (3), 274-283.
124. Vartanian, S.; Bentley, C.; Brauer, M. J.; Li, L.; Shirasawa, S.; Sasazuki, T.; Kim, J. S.; Haverty, P.; Stawiski, E.; Modrusan, Z.; Waldman, T.; Stokoe, D. Identification of mutant K-Ras-dependent phenotypes using a panel of isogenic cell lines. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288* (4), 2403-2413.
125. Nagaraj, N. S.; Smith, J. J.; Revetta, F.; Washington, M. K.; Merchant, N. B. Targeted inhibition of Src kinase signaling attenuates pancreatic tumorigenesis. *Mol. Cancer Ther.* **2010**, *9* (8), 2322-2332.
126. Mehta, G.; Hsiao, A. Y.; Ingram, M.; Luker, G. D.; Takayama, S. Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. *J. Control. Release* **2012**, *164* (2), 192-204.
127. Howes, A. L.; Richardson, R. D.; Finlay, D.; Vuori, K. 3-Dimensional culture systems for anti-cancer compound profiling and high-throughput screening reveal increases in EGFR inhibitor-mediated cytotoxicity compared to monolayer culture systems. *PLoS One* **2014**, *9* (9).

128. Sirenko, O.; Mitlo, T.; Hesley, J.; Luke, S.; Owens, W.; Cromwell, E. F. High-content assays for characterizing the viability and morphology of 3D cancer spheroid cultures. *Assay Drug Dev. Technol.* **2015**, *13* (7), 402-414.
129. di Magliano, M. P.; Hebrok, M. Hedgehog signalling in cancer formation and maintenance. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 903-911.
130. Nusslein-Volhard, C.; Wieschaus, E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* **1980**, *287*, 795-801.
131. Plaisant, M.; Giorgetti-Peraldi, S.; Gabrielson, M.; Loubat, A.; Dani, C.; Peraldi, P. Inhibition of hedgehog signaling decreases proliferation and clonogenicity of human mesenchymal stem cells. *PLoS One* **2011**, *6* (2).
132. Murdoch, J. N.; Copp, A. J. The relationship between sonic hedgehog signaling, cilia, and neural tube defects. *Birth Defects Res. A Clin. Mol. Teratol.* **2010**, *88* (8), 633-652.
133. Lee, S. T.; Welch, K. D.; Panter, K. E.; Gardner, D. R.; Garrossian, M.; Chang, C. W. Cyclopamine: from cyclops lambs to cancer treatment. *J. Agric Food Chem.* **2014**, *62* (30), 7355-7362.
134. Incardona, J. P.; Gaffield, W.; Kapur, R. P.; Roelink, H. The teratogenic veratrum alkaloid cyclopamine inhibits sonic hedgehog signal transduction. *Development (Cambridge, England)* **1998**, *125*, 3553-3562.
135. Robarge, K. D.; S. A. Brunton, G. M. C.; Cui, Y.; Dina, M. S.; Goldsmith, R.; Gould, S. E.; Guichert, O.; Gunzner, J. L.; Halladay, J.; Jia, W.; Khojasteh, C.; Koehler, M. F.; Kotkow, K.; La, H.; Lalonde, R. L.; Lau, K.; Lee, L.; al., D. M. e. GDC-0449-a potent inhibitor of the hedgehog pathway. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19* (19), 5576-5581.
136. Sinha, S.; Chen, J. K. Purmorphamine activates the Hedgehog pathway by targeting Smoothed. *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2* (1), 29-30.
137. Hosseini, M.; Kringelum, H.; Murray, A.; Tønder, J. E. Dipeptide analogues containing 4-Ethoxy-3-pyrrolin-2-ones. *Org. Lett.* **2006**, *8* (10), 2103-2106.
138. Hosseini, M.; Grau, J. S.; Sørensen, K. K.; Sjøtofte, I.; Tanner, D.; Murray, A.; Tønder, J. E. Short and efficient diastereoselective synthesis of pyrrolidinone-containing dipeptide analogues. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 2207-2210.
139. Galeotti, N.; Poncet, J.; Chiche, L.; Jouin, P. Diastereofacial selectivity in reduction of chiral tetramic acids. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 5370-5376.

140. Ikemoto, N.; Tellers, D. M.; Dreher, S. D.; Liu, J.; Huang, A.; Rivera, N. R.; Njolito, E.; Hsiao, Y.; McWilliams, J. C.; Williams, J. M.; Armstrong, J. D. I.; Sun, Y.; Mathre, D. J.; Grabowski, E. J. J.; Tillyer, R. D. Highly diastereoselective heterogeneously catalyzed hydrogenation of Enamines for the Synthesis of chiral β -amino acid derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3048-3049.
141. Geng, H.; Huang, K.; Sun, T.; Li, W.; Zhang, X.; Zhou, L.; W; Wu; Zhang, X. Enantioselective synthesis of optically pure β -Amino ketones and γ -aryl amines by Rh-catalyzed asymmetric hydrogenation. *J. Org. Chem* **2011**, *76*, 332–334.
142. Zhou, M.; Dong, D.; Zhu, B.; Geng, H.; Wang, Y.; Zhang, X. Rhodium-catalyzed enantioselective hydrogenation of β -acylamino nitroolefins: a new approach to chiral β -amino nitroalkanes. *Org. Lett.* **2013**, *15* (21), 5524–5527.
143. Barrett, A. G. M.; Braddock, D. C.; James, R. A.; Procopiu, P. A. Nucleophilic substitution of (alkoxymethylene)dimethylammonium chloride with potassium phthalimide; a convenient procedure for the synthesis of imides with inversion of configuration. *Chem. Commun.* **1997**, 433-434.
144. Stauffer, F.; Zizzari, E.; Engeloch-Jarret, C.; Faurite, J.; Bobálová, J.; Neier, R. Inhibition studies of porphobilinogen synthase from escherichia coli differentiating between the two recognition sites. *ChemBioChem* **2001**, *2*, 343-354.
145. Pelletier, S. M.; Ray, P. C.; Dixon, D. J. Nitro-Mannich/lactamization cascades for the direct stereoselective synthesis of pyrrolidin-2-ones. *Org. Lett.* **2009**, *11* (20), 4512-4515.
146. Koppenol, W.; Bounds, P. L.; Dang, C. V. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*, 325-337.
147. Kaur, J.; Debnath, J. Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2015**, *16*, 461-472.
148. Efeyan, A.; Comb, W. C.; Sabatini, D. M. Nutrient Sensing Mechanisms and Pathways. *Nature* **2015**, *517* (7534), 302-310.
149. Wang, C.; Hu, Q.; Shen, H. M. Pharmacological inhibitors of autophagy as novel cancer therapeutic agents. *Pharmacol. Res.* **2016**, *105*, 164-175.
150. Ferrier, R. J.; Overend, W. G.; Ryan, A. E. The reaction between 3,4,6-tri-O-acetyl-D-glucal and p-nitrophenol. *J. Chem. Soc* **1962**, *712*, 3667-3670.
151. Gómez, A. M.; Lobo, F.; Uriel, C.; López, J. C. Recent developments in the Ferrier rearrangement. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, *32*, 7221-7262.

152. Ansari, A. A.; Lahiri, R.; Vankar, Y. D. Arkat-USA. <http://www.arkat-usa.org/get-file/46383/> (zugegriffen am 08.11.2017).
153. Basu, S.; Gupta, V.; Nickel, J.; Schneider, C. Organocatalytic enantioselective vinylogous Michael reaction of vinylketene silyl-N-O-acetals. *Org. Lett.* **2013**, *16*, 274-277.
154. Prantz, K.; Mulzer, J. Synthesis of (Z)-trisubstituted olefins by decarboxylative Grob-type fragmentations: epothilone D, discodermolide, and peloruside A. *Chem. Eur. J.* **2009**, *16*, 485-506.
155. Audourd, C.; Bettaney, K.; Doan, C. T.; Rinaudo, G.; Jervis, P. J.; Percy, J. M. An appraisal of oxoketene cycloaddition methodology for synthesis of 2,6-dideoxysugars and fluorinated 2,6-dideoxysugars. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 1573-1582.
156. Santschi, N.; Gilmour, R. Comparative analysis of fluorine-directed glycosylation selectivity: interrogating C2 [OH → F] substitution in d-glucose and d-galactose. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, *32*, 6983-6987.
157. Danishefsky, S.; Kerwin, J. F. J. On the addition of allyltrimethylsilane to glycal acetates. *J. Org. Chem.* **1982**, *47* (19), 3803-3805.
158. Malerich, J. P.; Hagihara, K.; Rawal, V. H. Chiral squaramide derivatives are excellent hydrogen bond donor catalysts. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14416-14417.
159. Vakulya, B.; Varga, S.; Csámpai, A.; Soós, T. Highly enantioselective conjugate addition of nitromethane to chalcones using bifunctional chinchona organocatalysts. *Org. Lett.* **2005**, *7* (10), 1967-1969.
160. Saeeng, R.; Sirion, U.; Sahakitpichan, P.; Isobe, M. Iodine catalyzes C-glycosidation of d-glucal with silylacetylene. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44* (33), 6211-6215.
161. Karrer, P.; Reschofsky, H.; Kasse, W. Bildung von α -Halogen-carbonsäuren aus α -Aminosäuren, Salpetersäure und Salzsäure. *Helv. Chim. Acta* **1947**, *30*, 271-274.
162. Watson, K. D.; Carosso, S.; Miller, M. J. New and concise syntheses of the bicyclic oxamazin core using an intramolecular nitroso Diels-Alder Reaction and ring-closing olefin metathesis. *Org. Lett.* **2013**, *15* (2), 358-361.
163. Ratjen, L.; P. García-García; Lay, F.; Beck, M. E.; List, B. Disulfonimide-catalyzed asymmetric vinylogous and bisvinylogous Mukaiyama aldol reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *123*, 780-784.

164. Fettes, A.; Carreira, E. M. Leucascandrolide A: synthesis and related studies. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 9274-9283.
165. Anquetin, G.; Raw, S. L.; McMahon, K.; Murphy, E. P.; Murphy, P. V. Synthesis of novel migrastatin and Dorrigocin A analogues from D-glucal. *Chem. Eur. J.* **2007**, *14* (5), 1592-1600.
166. Mohamed, M.; Goncalves, T. P.; Whitby, R. J.; Sneddon, H. F.; Harrowven, D. C. New insights into cyclobutenone rearrangements: a total synthesis of the natural ROS-generating anti-cancer agent Cribrostatin 6. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17* (49), 13698–13705.
167. Yang, W.; Du, D.-M. Highly enantioselective Michael addition of nitroalkanes to chalcones using chiral squaramides as hydrogen bonding organocatalysts. *Org. Lett.* **2010**, *12* (23), 5450–5453.
168. T. Mejuch, H. v. H.; Triola, G.; Jaiswal, M.; Waldmann, H. Specificity of lipoprotein chaperones for the characteristic lipidated structural motifs of their cognate lipoproteins. *ChemBioChem* **2015**, *16* (17), 2460–2465.
169. Hannoush, R. N. Kinetics of Wnt-driven β -catenin stabilization revealed by quantitative and temporal imaging. *PLoS One* **2008**, *3* (10), e3498.
170. EssenBioScience. https://www.essenbioscience.com/media/uploads/files/8400-0012-D00_-_Migration_Invasion_User_Manual3_Protocols.pdf (zugegriffen am 25.10.2017).
171. Taipale, J.; Chen, J. K.; Cooper, M. K.; Wang, B.; Mann, R. K.; Milenkovic, L.; Scott, M. P.; Beachy, P. A. Effects of oncogenic mutations in Smoothed and Patched can be reversed by cyclopamine. *Nature* **2000**, *406* (6799), 1005-1009.
172. Ziegler, S.; Pries, V.; Hedberg, C.; Waldmann, H. Target identification for small bioactive molecules: finding the needle in the haystack. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 2744-2792.
173. Baret, P.; Beaujolais, V.; Béguin, C.; Gaude, D.; Pierre, J.-L.-; Serratrice, G. Towards new iron(III) chelators: synthesis and complexing ability of a water-soluble tripodal ligand based on 2,2',9'-dihydroxybiphenyl subunits. *Eur. J. Inorg. Chem.* **1998**, 613-619.
174. Lang, C.; Zhang, X.; Luo, Q.; Dong, Z.; Xu, J.; Liu, J. Powerful bipodal anion transporters based on scaffolds that contain different chalcogens. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 6458-6465.
175. Taylor, S. J.; Shalloway, D. The cell cycle and c-Src. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **1993**, *3*, 26-34.

176. Johnson, F. M.; Saigal, B.; Talpaz, M.; Donato, N. J. Dasatinib (BMS-354825) tyrosine kinase inhibitor suppresses invasion and induces cell cycle arrest and apoptosis of head and neck squamous cell carcinoma and non-small cell lung cancer cells. *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11* (19), 6924-6932.
177. Marchi-Artzner, V.; Brienne, M.-J.; Gulik-Krzywicki, T.; Dedieu, J.-C.; Lehn, J.-M. Selective complexation and transport of europium ions at the interface of vesicles. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 2342-2350.
178. Westhoff, M. A.; Serrels, B.; Fincham, V. J.; Frame, M. C.; Carragher, N. O. Src-mediated phosphorylation of focal adhesion kinase couples actin and adhesion dynamics to survival signaling. *Mol. Cell. Biol.* **2004**, *24* (18), 8113-8133.
179. BioRad. <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/LIT448.pdf> (zugegriffen am 27.11.20017).

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Waldmann bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, am renommierten Max-Planck-Institut und an der TU Dortmund meine Doktorarbeit auf einem Wissenschaftsgebiet anzufertigen, das mir gefällt. Weiterhin möchte ich Prof. Waldmann dafür danken, dass ich hier freie Forschung ohne Hindernisse betreiben konnte und unter seiner Aufsicht viel Neues in der Zeit am Institut gelernt habe.

Ich möchte Prof. Daniel Summerer danken, dass er die Rolle des Zweitprüfers übernommen hat.

Slava, Steffen, Cindy, Heinz und Yen-Chun möchte ich für die Korrektur meiner Doktorarbeit danken. Besonders Slava stand während meiner Doktorarbeit immer mit hilfreichen Ratschlägen zur Seite.

Prof. Bastiaens, Antonios, Guillaume, Eyad Fansa, Elisabeth, Herr Baumann, COMAS, Tom, das HRMS-Team, Sumer, Luca, Alexandra, Charles und Michael möchte ich hier als meine Kooperationspartnern für ihren Beitrag zu meiner Forschung danken. Besonders Antonios möchte ich für seine genauen Instruktionen und Erfahrungen bei Experimenten danken.

Ein Dank geht auch an Lea, Silke, Rishikesh und Shobna, die mir bei Experimenten wichtige Tipps geben konnten. A special thanks goes to Shobna because of our great time outside the lab and the friendship which lasts even over such a long distance.

Als nächstes danke ich Frau Brigitte Rose, die einer der ersten Personen war, mit denen ich am MPI in Kontakt gekommen bin und die mir regelmäßig bei verschiedensten Dingen helfen konnte.

Ein ganz großer Dank geht an Christa und Lucia, die mich während meiner Promotion nicht nur mit organisatorischer Hilfe unterstütz, sondern mir auch ein offenes Ohr bei verschiedenen anderen Dingen gehabt haben. Bei der Gelegenheit möchte ich mich bei euch beiden auch für die Organisation der IMPRS bedanken, die mich nicht nur in Kontakt mit verschiedenen anderen Doktoranden und Fachgebieten gebracht, sondern mich auch bei meiner Promotion unterstütz hat.

Ein weiterer großer Dank geht an Sassi, die mir im Labor nicht nur mit ihrem langjährigen Wissen, sondern auch mit tatkräftigem Zupacken aushelfen konnte. Ich werde die Zeit und die Gespräche mit dir sicher vermissen! Besonders die nicht-wissenschaftliche Gespräche und den Spaß, den wir täglich hatten.

The same compliment also goes to Chinta, who helped me in chemistry questions. I also enjoyed the time beyond the lab and his friendship. Here I also want to thank my former lab mates Michael, Song and Yen-Chun from the uni lab where I had a nice environment for chemistry but also for discussion about everything.

I want to thank Sumer and Yen-Chun for meeting them in the MPI, the time outside the lab and the warm friendship which developed during my PhD.

Besonders für die Anfangszeit während meiner Doktorarbeit möchte ich Chantal und Katharina danken, die mich immer wieder auf den Boden der Nicht-Chemiker-Tatsachen gebracht haben.

Während meiner ganzen Zeit in Dortmund will ich mich bei Daniel, Eike und Jörg bedanken, die mir treue Freundschaft auch noch aus Erlangen gehalten haben. Das ist mehr wert als Gold!

Das wichtigste zum Schluss/the most important for the end:

Als nächstes Danke ich meiner Schwester Cindy für ihre Unterstützung und auch Korrektur meiner Arbeit. Auch meinen Großeltern gebührt ein sehr großer Dank, die trotz ihres hohen Alters sich um mich sorgen, ein offenes Ohr und Vorschläge für verfahrenere Situationen haben.

Ru: I want to thank you so much for your patient support during my hard times in my PhD and that you stick to me through all tough situations! For sure I'm happy that you helped me during the time in the lab and even more outside of it.

Als letztes möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken. Vielen Danke für eure offenen Ohren bei Problemen, vielen Dank bei der Lösung derselben und noch mehr dank für euer Einfühlungsvermögen und eure unablässige Unterstützung in den 26 Jahren meines Lebens!

Eidesstattliche Versicherung (Affidavit)

Name, Vorname
(Surname, first name)

Matrikel-Nr.
(Enrolment number)

Belehrung:

Wer vorsätzlich gegen eine die Täuschung über Prüfungsleistungen betreffende Regelung einer Hochschulprüfungsordnung verstößt, handelt ordnungswidrig. Die Ordnungswidrigkeit kann mit einer Geldbuße von bis zu 50.000,00 € geahndet werden. Zuständige Verwaltungsbehörde für die Verfolgung und Ahndung von Ordnungswidrigkeiten ist der Kanzler/die Kanzlerin der Technischen Universität Dortmund. Im Falle eines mehrfachen oder sonstigen schwerwiegenden Täuschungsversuches kann der Prüfling zudem exmatrikuliert werden, § 63 Abs. 5 Hochschulgesetz NRW.

Die Abgabe einer falschen Versicherung an Eides statt ist strafbar.

Wer vorsätzlich eine falsche Versicherung an Eides statt abgibt, kann mit einer Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft werden, § 156 StGB. Die fahrlässige Abgabe einer falschen Versicherung an Eides statt kann mit einer Freiheitsstrafe bis zu einem Jahr oder Geldstrafe bestraft werden, § 161 StGB.

Die oben stehende Belehrung habe ich zur Kenntnis genommen:

Official notification:

Any person who intentionally breaches any regulation of university examination regulations relating to deception in examination performance is acting improperly. This offence can be punished with a fine of up to EUR 50,000.00. The competent administrative authority for the pursuit and prosecution of offences of this type is the chancellor of the TU Dortmund University. In the case of multiple or other serious attempts at deception, the candidate can also be unenrolled, Section 63, paragraph 5 of the Universities Act of North Rhine-Westphalia.

The submission of a false affidavit is punishable.

Any person who intentionally submits a false affidavit can be punished with a prison sentence of up to three years or a fine, Section 156 of the Criminal Code. The negligent submission of a false affidavit can be punished with a prison sentence of up to one year or a fine, Section 161 of the Criminal Code.

I have taken note of the above official notification.

Ort, Datum
(Place, date)

Unterschrift
(Signature)

Titel der Dissertation:
(Title of the thesis):

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe angefertigt habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie wörtliche und sinngemäße Zitate kenntlich gemacht.

Die Arbeit hat in gegenwärtiger oder in einer anderen Fassung weder der TU Dortmund noch einer anderen Hochschule im Zusammenhang mit einer staatlichen oder akademischen Prüfung vorgelegen.

I hereby swear that I have completed the present dissertation independently and without inadmissible external support. I have not used any sources or tools other than those indicated and have identified literal and analogous quotations.

The thesis in its current version or another version has not been presented to the TU Dortmund University or another university in connection with a state or academic examination.*

***Please be aware that solely the German version of the affidavit ("Eidesstattliche Versicherung") for the PhD thesis is the official and legally binding version.**

Ort, Datum
(Place, date)

Unterschrift
(Signature)