

**DNA-kodierte Substanzbibliotheken:
Chemische Stabilisierung der DNA,
Entwicklung neuer Synthesemethoden und
Identifizierung von TEAD-YAP-Inhibitoren**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
von der Fakultät für Chemie und Chemische Biologie
der Technischen Universität Dortmund

vorgelegt von

M. Sc. Verena B. K. Kunig

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von Dezember 2017 bis Mai 2021 unter der Anleitung von PD Dr. Andreas Brunschweiler an der Fakultät für Chemie und Chemische Biologie der Technischen Universität Dortmund.

Dekan: Prof. Dr. Stefan Kast

1. Gutachter: PD Dr. Andreas Brunschweiler

2. Gutachter: Prof. Dr. Daniel Rauh

Eingereicht am: 31.05.2021

Tag der mündlichen Prüfung: 20.09.2021

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen veröffentlicht:

1. Synthesis of DNA-coupled isoquinolones and pyrrolidines by solid phase ytterbium- and silver-mediated imine chemistry

M. Potowski,[‡] V. B. K. Kunig,[‡] F. Losch, A. Brunschweiler, *MedChemComm* **2018**, *10*, 1082-1093.

2. Isocyanide Multicomponent Reactions on Solid-Phase-Coupled DNA Oligonucleotides for Encoded Library Synthesis

V. B. K. Kunig, C. Ehrt, A. Dömling, A. Brunschweiler, *Org. Lett.* **2019**, *21*, 7238-7243.

3. TEAD–YAP Interaction Inhibitors and MDM2 Binders from DNA-Encoded Indole-Focused Ugi Peptidomimetics

V. B. K. Kunig, M. Potowski, M. Akbarzadeh, M. Klika Škopić, D. Dos Santos Smith, L. Arendt, I. Dormuth, H. Adihou, B. Andlovic, H. Karatas, S. Shaabani, T. Zarganes-Tzitzikas, C. G. Neochoritis, R. Zhang, M. Groves, S. M. Guéret, C. Ottmann, J. Rahnenführer, R. Fried, A. Dömling, A. Brunschweiler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 20338-20342.

4. Chemically Stabilized DNA Barcodes for DNA-Encoded Chemistry

M. Potowski,[‡] V. B. K. Kunig,[‡] L. Eberlein, A. Vakalopoulos, S. M. Kast, A. Brunschweiler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 19744-19749.

[‡] Diese Autoren haben gleichermaßen zur Publikation beigetragen.

Teile dieser Arbeit wurden in folgender Patentschrift veröffentlicht:

A. Brunschweiler, M. Klika Škopić, M. Potowski, V. B. K. Kunig, EP 20 166 145.1.

In Erinnerung an meine Mutter

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Kurzfassung.....	V
Abstract.....	VII
1 Einleitung	1
1.1 DNA-kodierte Substanzbibliotheken.....	1
1.2 Protein-Protein-Interaktionen als attraktive pharmazeutische Targets.....	14
1.2.1 MDM2-p53-Protein-Protein-Interaktion.....	14
1.2.2 TEAD-YAP-Protein-Protein-Interaktion.....	18
1.3 Multikomponentenreaktionen	21
1.4 1,3-dipolare Cycloaddition.....	28
2 Zielsetzung.....	31
3 Synthese und Selektion einer tiDEL mit anschließender Hit-Resynthese und -Validierung	35
3.1 Synthese der tiDEL	35
3.1.1 Synthese der hexT-Ugi-Konjugate	35
3.1.2 Kodierung der hexT-Ugi-Konjugate mittels enzymatischer Ligation.....	39
3.1.3 Derivatisierung der kodierten DNA-Konjugate über die Kupfer-vermittelte Alkin-Azid-Cycloaddition	41
3.2 Selektion der tiDEL	47
3.3 Hit-Resynthese	50
3.4 Hit-Validierung	51
3.4.1 Hit-Validierung – MDM2	51
3.4.2 Hit-Validierung – hTEAD4	52
4 Überführung chemischer Reaktionen auf CPG-gebundenen DNA-Oligonukleotiden und Entwicklung einer neuen Kodierungsstrategie	57
4.1 Optimierung der Ugi-Vierkomponentenreaktion auf CPG-gebundenen DNA-Oligonukleotiden.....	57
4.2 Experimente zur Überführung der Ugi-Azid-Vierkomponentenreaktion zur Darstellung von Tetrazolen auf CPG-gebundenen DNA-Oligonukleotiden	67
4.3 Experimente zur Überführung der Ugi-Vierkomponenten-aza-Wittig- Reaktionssequenz zur Darstellung von 1,3,4-Oxadiazolen auf CPG-gebundenen DNA-Oligonukleotiden	70
4.4 Experimente zur Überführung der Groebke-Blackburn-Bienaymé- Dreikomponentenreaktion zur Darstellung von Imidazo[1,2- α]-Heterozyklen auf CPG-gebundenen DNA-Oligonukleotiden	74

Inhaltsverzeichnis

4.5	Experimente zur Überführung der 1,3-dipolaren Azomethin-Ylid-Cycloaddition zur Darstellung von substituierten Pyrrolidinen auf CPG-gebundenen DNA-Oligonukleotiden	77
4.6	Experimente zur Überführung der Yb(III)-vermittelten Dreikomponentenreaktion zur Darstellung von substituierten Pyrazolen auf CPG-gebundenen DNA-Oligonukleotiden	84
4.7	Entwicklung einer Kodierungsstrategie für kurze DNA-Barcodes	89
5	Studien zur chemischen Stabilisierung von DNA-Oligonukleotiden für die DEL-Synthese.....	93
5.1	Stabilitätsscreening von CPG-gebundenen, chemisch modifizierten DNA-Oligonukleotiden	93
5.2	Anwendung der DNA-Haarnadelstruktur-basierten Kodierungsstrategie unter Verwendung chemisch modifizierter DNA	95
5.3	Überführung von ATCG-DNA-kompatiblen sowie -inkompatiblen chemischen Reaktionen auf CPG-gebundenen 7De-dATC-DNA-Sequenzen	101
5.4	Experimente zur Boc-Entschützung von 7De-dATC-gebundenen U-4CR/aza-Wittig-Produkten.....	107
6	Diskussion und Zusammenfassung.....	109
7	Experimenteller Teil	116
7.1	Chemikalien und Lösungsmittel	116
7.2	DEL-basierte chemische Methoden	116
7.3	Chemisch synthetische Methoden	118
7.4	Reagenzien sowie Geräte für biologische Methoden	119
7.5	Geräte für biophysikalische Methoden	121
7.6	Reagenzien und Geräte für zellbiologische Methoden	121
7.7	Allgemeine Vorschriften für biologische Methoden.....	122
7.8	Synthese und Selektion einer tiDEL mit anschließender Hit-Resynthese und -Validierung.....	123
7.8.1	Synthese der tiDEL	123
7.8.2	Selektion der tiDEL	131
7.8.3	Hit-Resynthese	135
7.8.4	Hit-Validierung	144
7.9	Überführung chemischer Reaktionen auf CPG-gebundenen DNA-Oligonukleotiden und Entwicklung einer neuen Kodierungsstrategie.....	147
7.9.1	Allgemeine Synthesevorschriften	147
7.9.2	Testligation zur Etablierung einer neuen DNA-Haarnadelstruktur-basierten Kodierungsstrategie	159
7.10	Studien zur chemischen Stabilisierung von DNA-Oligonukleotiden für die DEL-Synthese.....	160

Inhaltsverzeichnis

7.10.1	Kupfer-vermittelte Alkin-Azid-Cycloaddition eines Fmoc-geschützten PEG(4)-Linkermoleküls an CPG-gebundenen 7De-dATC-DNA-Oligonukleotiden	160
7.10.2	Testligationen zur Anwendung der DNA-Haarnadelstruktur-basierten Kodierungsstrategie unter Verwendung chemisch modifizierter DNA	161
7.10.3	PCR-Amplifikation von chemisch modifizierten Ligationsprodukten.....	162
7.10.4	Sanger-Sequenzierung von chemisch modifizierter DNA	163
7.10.5	Echtzeit-PCR von chemisch modifizierten Ligationsprodukten	163
8	Abkürzungsverzeichnis	164
9	Literaturverzeichnis	168
	Danksagung	177
	Curriculum Vitae.....	178
	Eidesstattliche Versicherung (Affidavit).....	181
	Anhang.....	182

Kurzfassung

Die Identifizierung kleiner organischer Moleküle, welche mit pathophysiologisch relevanten, biologischen Zielstrukturen interagieren, ist eine der großen Herausforderungen der medizinischen Chemie. Solche bioaktiven Moleküle können dabei helfen, komplexe zelluläre Prozesse aufzuklären oder können als Startpunkte zur Entwicklung eines Arzneistoffes dienen. Die Technologie der DNA-kodierten Substanzbibliotheken (DELs) hat sich in den letzten Jahren als eine vielversprechende Alternative zum Hochdurchsatz-Screening etabliert. DELs bestehen aus einer Vielzahl an DNA-kodierten Molekülen, welche gleichzeitig in Affinitäts-basierten Selektionsassays gegenüber einer Zielstruktur getestet und im Anschluss anhand ihrer einzigartigen DNA-Sequenz leicht „entschlüsselt“ werden können. Die meisten in der Literatur beschriebenen DELs werden über „*split and pool*“-Synthesen in wässriger Lösung synthetisiert. Dies hat zur Folge, dass viele gängige Synthesemethoden der organischen Chemie, die auf trockene Lösungsmittel angewiesen sind, nicht für die DEL-Synthese zur Anwendung kommen können. Eine weitere Limitierung zur Herstellung von DELs stellt die Stabilität der DNA gegenüber verschiedenen Reaktionsbedingungen dar. Für eine erfolgreiche Selektion ist es notwendig, dass die kodierende DNA im Verlauf der DEL-Synthese nicht beschädigt wird. Daher können auch viele als Katalysatoren standardmäßig in der präparativen organischen Chemie eingesetzte Metallsalze sowie stark saure Reaktionsbedingungen in der DEL-Produktion nicht verwendet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher der Fokus auf die Synthese von DELs basierend auf einer Festphasenstrategie gelegt. Diese bietet neben der freien Wahl des Lösungsmittels den Vorteil, dass die Nukleobasen der DNA vollständig geschützt vorliegen und somit die gesamte DNA eine höhere Stabilität aufweist. Im ersten Teil der Arbeit wird die Synthese einer Indol-fokussierten DNA-kodierten Substanzbibliothek, ausgehend von dem chemisch sehr stabilen, *controlled pore glass* (CPG)-gebundenen Hexathymidin („hexT“)-Adapteroligonukleotid beschrieben (*thymidine-initiated DNA-encoded chemistry*, TIDEC). Die im Vergleich zu anderen DELs recht kleine Bibliothek von 8.112 Molekülen konnte im Selektionsscreening vielversprechende Wirkstoffkandidaten für schwierig zu adressierende Proteine wie dem Transkriptionsfaktor TEAD4 liefern. Das in diesem Verfahren verwendete Adapteroligonukleotid hexT erlaubt jedoch keine Kodierung von Startmaterialien. Dieser Einschränkung wird im weiteren Verlauf der Arbeit Rechnung getragen, in dem die Übertragung von insgesamt sechs neuen organischen Synthesen auf ein neues DNA-Kodierungsformat, das den Einsatz von kodierten Startmaterialien ermöglicht, beschrieben wird. So konnten die

Ugi (U-4CR)- sowie die Ugi-Azid-Vierkomponentenreaktion (UA-4CR), die Groebke-Blackburn-Bienaymé-Dreikomponentenreaktion (GBB-3CR) und die AgOAc-vermittelte 1,3-dipolare Azomethin-Ylid-Cycloaddition ohne detektierbare DNA-Degradation auf eine CPG-gebundene ATCG-DNA-Sequenz überführt werden. Zur Anwendung dieser Reaktionsmethoden in einer DEL-Synthese wurde ferner eine neue, effizientere Kodierungsstrategie basierend auf einer DNA-Haarnadelstruktur entwickelt, die die Kodierung von Startmaterialien ermöglicht. Mit der Ugi-Vierkomponenten-aza-Wittig-Reaktion (U-4CR/aza-Wittig) sowie einer Yb(PFO)₃-vermittelten Dreikomponenten-Pyrazolsynthese werden aber auch zwei Reaktionen beschrieben, die auf der CPG-gebundenen ATCG-DNA-Sequenz zu massiver DNA-Degradation führten und daher lediglich unter Verwendung einer stabilen Pyrimidin-DNA in der DEL-Produktion Anwendung finden können. Diese Limitierung wurde im letzten Teil der vorliegenden Arbeit mit der Etablierung von chemisch modifizierten und daher stabileren DNA-Oligonukleotiden bewältigt. Die vulnerable Purinbase Adenin wurde durch die chemisch modifizierte Base 7-Deazaadenin (7De-dA) in ATC-DNA-Sequenzen ausgetauscht. Es zeigte sich, dass 7De-dATC-DNA-Sequenzen nicht nur eine deutlich höhere Stabilität, besonders gegenüber Säuren, aufweisen, sondern ebenfalls korrekt von Enzymen erkannt und damit ligiert, amplifiziert sowie sequenziert werden können. Neben den ATCG-kompatiblen Reaktionen, welche problemlos auf die chemisch modifizierte, Festphasen-gebundene DNA übertragen werden konnten, konnten ebenso die U-4CR/aza-Wittig-Reaktion sowie die Yb(PFO)₃-vermittelte Dreikomponentenreaktion mit verringerter DNA-Degradation überführt werden. Besonders hervorzuheben ist, dass auch eine TFA-vermittelte Boc-Entschützung von DNA-Molekül-Konjugaten in wässriger Lösung unter Verwendung der chemisch modifizierten DNA ohne detektierbare DNA-Degradation durchgeführt werden konnte.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden robuste Methoden zur Selektionierung von DNA-kodierten Molekülbibliotheken aufgesetzt. Es gelang die Identifizierung neuer Startpunkte für die Entwicklung von TEAD-YAP-Inhibitoren durch die Selektionierung einer neu designten, peptidomimetischen DEL, die mit dem TiDEC-Kodierungssystem hergestellt wurde. Zukünftige DELs werden mit einem hier neu entwickelten und zum Patent angemeldeten Kodierungsverfahren synthetisiert, das chemisch stabilisierte DNA-Barcodes nutzt und so die Stabilitätsvorteile des hexT-Adapters mit der Effizienz der kodierten, kombinatorischen Chemie vereint. Dieses Kodierungssystem ermöglicht die Kodierung eines sehr breiten Spektrums an Synthesemethoden und die Darstellung strukturell diverser Molekülklassen.

Abstract

Identifying small organic molecules that interact with pathophysiologically relevant biological targets is one of the great challenges of medicinal chemistry. Such bioactive molecules can help elucidate complex cellular processes or serve as starting points for drug development. DNA-encoded compound libraries (DELs) technology has emerged in recent years as a promising alternative to high-throughput screening. DELs consist of a large number of DNA-encoded molecules that can be simultaneously tested in affinity-based selection assays against a target structure and subsequently easily "decoded" based on their unique DNA sequence. Most DELs described in literature are synthesized via "split-and-pool" syntheses in an aqueous solution. As a result, many common organic chemistry synthesis methods that rely on dry solvents cannot be applied to DEL synthesis. Another limitation is the stability of the DNA. For successful selection, it is necessary that the coding DNA is not damaged during DEL synthesis. Therefore, many metal salts used as catalysts in preparative organic chemistry and strongly acidic reaction conditions cannot be used in DEL synthesis either.

In this work, the focus was placed on the synthesis of DELs based on a solid-phase strategy. In addition to the free choice of solvent, the solid-phase strategy offers the advantage that the nucleobases of the DNA are entirely protected, and thus the entire DNA has a higher stability. In the first part of this work, the synthesis of an indole-focused DNA-encoded compound library starting from the chemically very stable controlled pore glass (CPG)-bound hexathymidine ("hexT") adapter oligonucleotide is described (thymidine-initiated DNA-encoded chemistry, TiDEC). The library of 8,112 molecules, which is relatively small compared to other DELs, was able to yield promising drug candidates in selection screenings for difficult-to-address proteins such as the transcription factor TEAD4. However, the adapter oligonucleotide hexT used in this method does not allow encoding of starting materials. This limitation is addressed in the remainder of this work, which describes the transfer of a total of six new organic syntheses to a new DNA encoding format that allows the use of encoded starting materials. Thus, the Ugi (U-4CR) as well as the Ugi-azide four-component reaction (UA-4CR), the Groebke-Blackburn-Bienaymé three-component reaction (GBB-3CR), and the AgOAc-mediated 1,3-dipolar azomethine ylide cycloaddition could be transferred to a CPG-coupled ATCG-DNA sequence without detectable DNA degradation. To apply these reaction methods in a DEL synthesis, a novel and more efficient encoding strategy based on a hairpin DNA was also developed to enable encoding of starting materials. However, with the Ugi four-component-aza-Wittig reaction (U-4CR/aza-Wittig) as well as a Yb(PFO)₃-mediated three-

Abstract

component pyrazole synthesis, two reactions are also described that led to massive DNA degradation of the CPG-linked ATCG sequence and therefore can only be applied in DEL production using a stable pyrimidine DNA. This limitation was overcome in the latter part of the present work by establishing chemically modified and more stable DNA oligonucleotides. The vulnerable purine base adenine was replaced by the chemically modified base 7-deazaadenine (7De-dA) in ATC-DNA sequences. It was shown that 7De-dATC-DNA sequences have significantly higher stability, especially towards acids, and can be correctly recognized by enzymes and thus be ligated, amplified, and sequenced. In addition to the ATCG-compatible reactions, which could easily be transferred to the chemically modified, solid-phase-bound DNA, the U-4CR/aza-Wittig reaction and the Yb(PFO)₃-mediated three-component reaction could also be transferred with reduced DNA degradation. Of particular note, TFA-mediated Boc deprotection of DNA-molecule conjugates in aqueous solution using the chemically modified DNA could also be performed without detectable DNA degradation.

Robust methods for the selection of DNA-encoded molecular libraries were set up in this PhD thesis. We succeeded in identifying new starting points for TEAD-YAP inhibitor development by selecting a newly designed peptidomimetic DEL prepared using the TiDEC encoding system. Future DELs will be produced using a newly developed and patent-pending encoding method developed here that utilizes chemically stabilized DNA barcodes, combining the stability advantages of the hexT adapter with the efficiency of encoded combinatorial chemistry. This encoding system enables the coding of a vast range of synthetic methods and the representation of structurally diverse classes of molecules.

1 Einleitung

1.1 DNA-kodierte Substanzbibliotheken

Die Entwicklung neuer Arzneistoffe zur Behandlung von Krankheiten beginnt häufig mit der Entdeckung von bioaktiven Molekülen. Bioaktive Moleküle sind Moleküle, beispielsweise Proteine, Peptide, Nucleinsäuren, Naturstoffe oder kleine organische Moleküle, welche mit biologischen Zielstrukturen interagieren und dadurch bestimmte biologische Prozesse beeinflussen. Die Identifizierung solcher Moleküle stellt die pharmazeutische Industrie als auch akademische Einrichtungen vor eine große Herausforderung. Um eine Vielzahl von Molekülen auf ihre Bioaktivität gegenüber einer pharmazeutisch relevanten Zielstruktur (Target) zu testen, wurde das Hochdurchsatz-Screening (HTS) diskreter Molekülbibliotheken entwickelt.^[1] Das Hochdurchsatz-Screening stellt die herkömmliche, vor allem von der pharmazeutischen Industrie angewandte, Vorgehensweise zur Identifizierung von neuen Wirkstoffen dar. Beim HTS werden Substanzbibliotheken bestehend aus Zehntausenden bis zu einigen Millionen kleiner organischer Moleküle hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität gegen eine Zielstruktur in automatisierten Testverfahren untersucht. Der Prozess des Hochdurchsatz-Screenings ist langwierig, da jedes Molekül individuell getestet wird, kostenaufwendig und benötigt hohen logistischen Aufwand für die Lagerung einzelner Substanzen.^[1] Es besteht daher ein Bedarf an alternativen Technologien zur Identifizierung von Startpunkten für die Arzneistoffentwicklung. Eine Möglichkeit zur Entdeckung von Bindungspartnern bestimmter Zielproteine stellen die auf darwinistischen Prinzipien beruhenden Display-Technologien dar (Abb. 1).^[2-7] Die Grundlage aller Display-Technologien ist dabei die Kopplung des Phänotyps mit dem Genotyp. In vielen Fällen wird DNA, welche besonders attraktiv ist aufgrund ihrer hohen Datendichte sowie der Möglichkeit der parallelen Sequenzierung im großen Maßstab, als Träger der Information für den Phänotyp verwendet. Im Unterschied zu dem traditionellen Hochdurchsatz-Screening können bei Display-Techniken eine große Anzahl an potenziellen Liganden hinsichtlich der Bindung an ein spezifisches Target als komplexe Gemische, also gleichzeitig in einem einzelnen Selektionsexperiment, untersucht werden. In der Regel handelt es sich bei den zu präsentierenden Liganden um Peptide, Antikörper oder um RNA- bzw. DNA-Oligonukleotide. Der Nachteil von Display-Technologien ist die eingeschränkte Anwendbarkeit. Sie können lediglich verwendet werden, um biosynthetische Produkte zu selektionieren und nicht, um chemisch synthetisierte Moleküle als Binder von biologischen Zielstrukturen zu identifizieren.

Einleitung

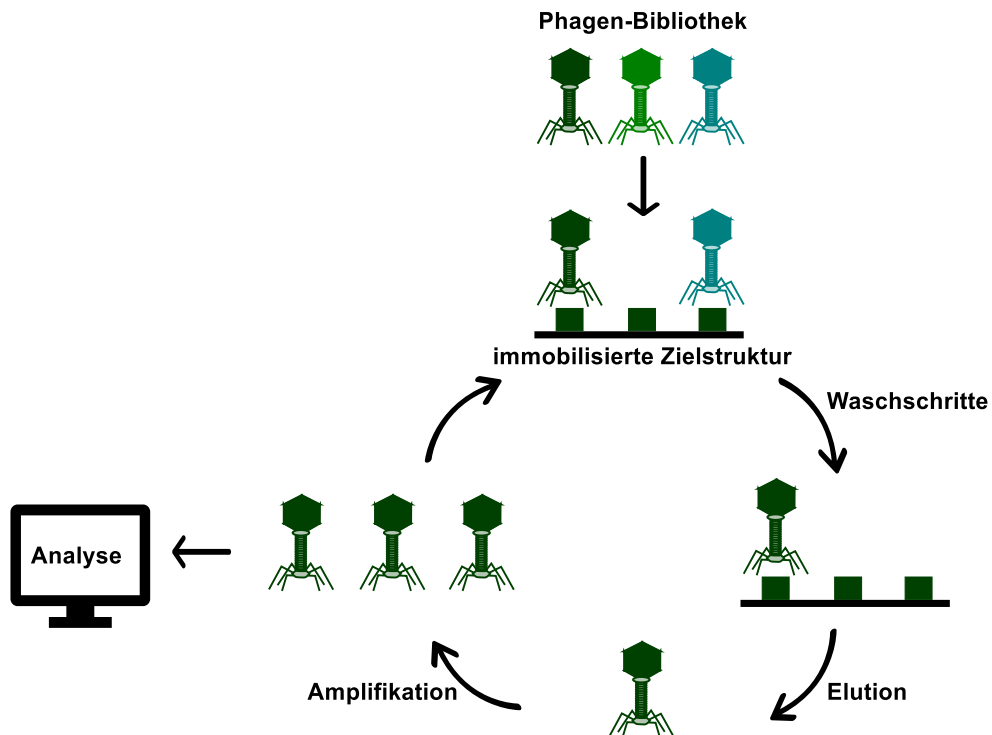


Abbildung 1: Schematische Darstellung von Phagen-Display.

Im Jahr 1992 wurde durch Brenner und Lerner das Prinzip der Verknüpfung vom Genotyp mit dem Phänotyp, in diesem Fall allerdings mit synthetischen Molekülen, erneut aufgegriffen.^[8] Brenner und Lerner postulierten die Kodierung von synthetischen Peptiden mit spezifischen, amplifizierbaren DNA-Oligonukleotiden auf einer festen Phase. Die von Brenner und Lerner vorgeschlagene Technologie gilt als Ursprung der DNA-kodierten Substanzbibliotheken und wurde kurze Zeit später von einigen Arbeitsgruppen verwirklicht. Nielsen *et al.* und Needels *et al.* stellten DNA-kodierte Substanzbibliotheken auf kontrolliertem Porenglas (*controlled pore glass*, CPG) her, an welchem zwei Linkermoleküle vorhanden waren zur chemischen Kopplung von Aminosäurebausteinen sowie zur chemischen Ligation von spezifischen DNA-Sequenzen.^[9,10] Die Synthese der DNA-kodierten Peptidbibliotheken erfolgte iterativ und kombinatorisch durch Kopplung der Aminosäurebausteine und der DNA-Nukleotide. Im Nachfolgenden wurde von drei Arbeitsgruppen (Forschungsgruppen um Dario Neri, David R. Liu sowie Pehr B. Harbury) unabhängig voneinander beschrieben, dass DNA-kodierte Bibliotheken auch in Abwesenheit einer festen Phase in Lösung synthetisiert und selektioniert werden können.^[11–13] Seitdem wurde eine Vielzahl an Strategien zur Synthese und zur Selektion von Substanzbibliotheken bestehend aus kleinen organischen Molekülen, welche kovalent mit einem DNA-Strang verbunden sind, beschrieben (Abb. 2A).

Einleitung

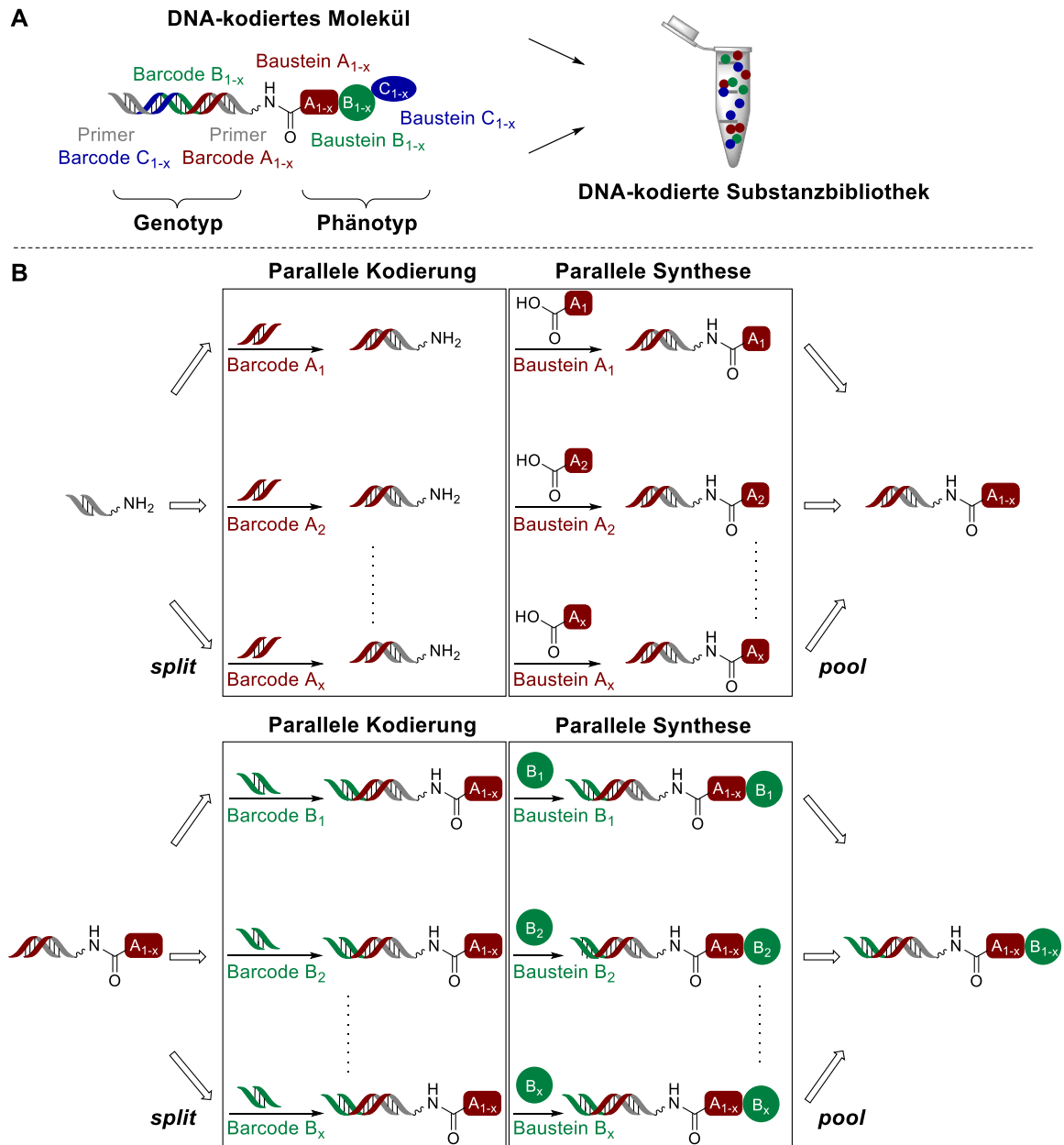


Abbildung 2: Schematische Darstellung von einem DNA-kodierten Molekül (A) sowie der Synthese von DNA-kodierten Substanzbibliotheken mit Hilfe des kombinatorischen „split and pool“-Ansatzes (B).

Heute wird von einem Großteil der Forscher im Feld der DEL (*DNA-encoded library*)-Technologie die Synthesestrategie der sogenannten „*DNA-recorded libraries*“ angewandt (Abb. 2B).^[14,15] Bei dieser Herangehensweise der DEL-Synthese wird ein doppelsträngiges Oligonukleotid, welches oft als „*headpiece*“ (Kopfgruppe) bezeichnet wird, oder ein einzelsträngiges Oligonukleotid mit einem Linkermolekül versehen, in Reaktionsgefäße aufgeteilt („*split*“) und mit spezifischen DNA-Barcodes zur Kodierung der im nachfolgenden Schritt eingeführten Molekülbausteine ligiert. Bei einer Vielzahl von DNA-kodierten Substanzbibliotheken handelt es sich bei dem ersten Syntheseschritt um eine Amidkupplung. Die so entstandenen DNA-Molekül-Konjugate werden gereinigt, im Anschluss vereinigt („*pool*“) und erneut für den nächsten Zyklus bestehend aus Kodierung

und Synthese aufgeteilt. Dieser Vorgang führt zu einem exponentiellen Anstieg der Anzahl an DNA-kodierten Molekülen und kann (theoretisch) beliebig oft wiederholt werden, so dass erheblich große Molekülbibliotheken höchst effizient synthetisiert werden können. Die Arbeitsgruppe um David R. Liu entwickelte den Ansatz der „*DNA-templated synthesis*“ (DTS) von DELs (Abb. 3A).^[12,16] Hierbei werden einzelsträngige DNA-Templatsequenzen verwendet, welche bereits zu Beginn der DEL-Synthese in Form von DNA-Codons die vollständige Strukturinformation für das endgültige Bibliotheksmitglied aufweisen. Die unterschiedlichen DNA-Matrizen werden mit kurzen DNA-Oligonukleotiden (Anti-Codons), die über einen spaltbaren Linker mit reaktiven Molekülbausteinen verbunden sind, gemischt. Basierend auf komplementärer Basenpaarung der DNA-Oligomere mit der jeweiligen DNA-Templatsequenz werden die chemischen Bausteine in räumliche Nähe und damit zur Reaktion gebracht. Nach der Linkerspaltung kann dieser Vorgang mehrmals wiederholt werden. Eine Herausforderung dieses Ansatzes, besonders bei der Synthese von sehr großen Bibliotheken, beruht darauf, dass für jedes Bibliotheksmitglied eine eindeutige DNA-Templatsequenz entwickelt und synthetisiert werden muss. Eine Strategie zur Synthese von DELs, welche der DTS-Technologie sehr ähnlich ist, stellt der sogenannte „*YoctoReactor*“ dar (yR, Abb. 3B).^[17,18] Das yR-Format basiert auf der Selbstorganisation komplementärer DNA-Sequenzen zu dreidimensionalen DNA-Strukturen, wodurch DNA-gebundene Molekülbausteine im Zentrum des Reaktors in räumliche Nähe gebracht werden, um so die kombinatorische Synthese zu erleichtern. Der Name der Technologie ist auf das Volumen im Inneren des Reaktors zurückzuführen, welches sich in einer Größenordnung von einem Yoctoliter (10^{-24} L) befindet und wodurch Reaktionen im millimolaren Konzentrationsbereich ermöglicht werden. Pehr B. Harbury und David Halpin entwickelten einen als „*DNA-routing*“ bezeichneten und der klassischen „*split and pool*“-Strategie sehr ähnlichen Ansatz zur Generierung von DNA-kodierten Substanzbibliotheken (Abb. 3C).^[19] Hiernach werden vollständig kodierte DNA-Templatsequenzen durch ein Netzwerk bestehend aus DNA-beladener Festphasenharze geleitet. DNA-vermittelte Hybridisierung an Harz-gebundenen, komplementären DNA-Sequenzen führt zur räumlichen Trennung und ermöglicht so diskrete chemische Reaktionen der Unterbibliotheken, welche anschließend vereinigt und erneut durch ein Netzwerk aus DNA-beladenen Harzen geleitet werden. Dieser Vorgang wird so lange wiederholt, bis alle gewünschten Bausteine entsprechend der DNA-Templatsequenz eingebaut wurden.

Einleitung

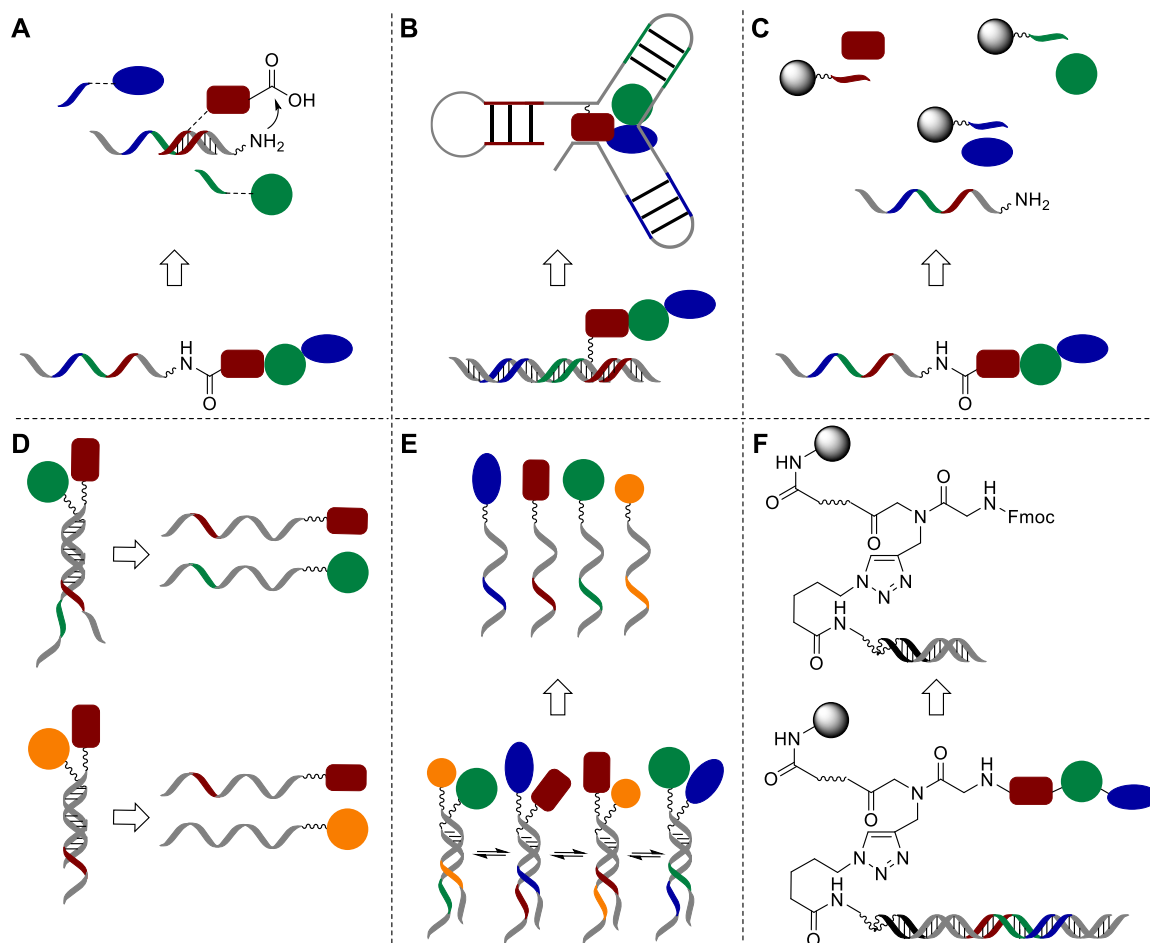


Abbildung 3: Schematische Darstellung weiterer Synthesemethoden von DNA-kodierten Substanzbibliotheken. A. „DNA-templated synthesis“. B. „YoctoReactor“. C. „DNA-routing“. D. „Encoded self-assembled chemical libraries“ (dual-pharmacophore, affinity maturation). E. „Dynamic chemical DNA-encoded libraries“. F. „DNA-encoded solid phase synthesis“.

Neri *et al.* entwickelten eine Strategie zur Synthese von sogenannten „*encoded self-assembled chemical (ESAC) libraries*“ (Abb. 3D).^[11] Die Grundlage der ESAC-Technologie basiert auf der kombinatorischen Zusammenlagerung von Molekülfragmenten durch Hybridisierung komplementärer DNA-Sequenzen. Die Molekülbausteine sind dabei mit DNA-Einzelsträngen verknüpft, welche neben kodierenden Regionen auch aus konstanten Regionen für die komplementäre Basenpaarung bestehen. Der ESAC-Ansatz wurde unter anderem verwendet, um bekannte Liganden von Humanalbumin und der Rinder-carboanhydrase in ihrer Affinität zu verbessern („*affinity maturation*“). Eine der ESAC-Technologie sehr ähnlichen Strategie zur Synthese von sogenannten „*dynamic chemical DNA-encoded libraries*“ nutzt die Vorteile der dynamischen kombinatorischen Chemie aus (Abb. 3E). Substanzbibliotheken, welche der dynamischen kombinatorischen Chemie zugrunde liegen, zeichnen sich dadurch aus, dass die einzelnen Bausteine der Produkte sich im ständigen, thermodynamisch kontrollierten Austausch befinden. Ein externer Stimulus, wie beispielsweise eine biologische Zielstruktur, kann zur Verschiebung des Gleichgewichts

und damit zur Veränderung der Bibliothekszusammensetzung führen.^[20] Im Bereich der DEL-Technologie kann ein dynamisches Gleichgewicht durch relativ kurze, komplementäre DNA-Stränge erreicht werden.^[21,22] Die Arbeitsgruppe um Brian M. Paegel zeigte kürzlich einen neuen, auf der Festphasenchemie-beruhenden Ansatz zur Synthese von DELs (Abb. 3F). Sie modifizierten TentaGel-Harz mit einer Amin- und einer Alkin-Funktionalität, um so Startpunkte für die Molekülsynthese und gleichzeitig für die DNA-Kodierung an der festen Phase zu generieren.^[23]

DNA-kodierte Substanzbibliotheken werden typischerweise in Affinitäts-basierten Selektionsassays bezüglich der Bindung an bestimmte biologische Zielstrukturen untersucht (Abb. 4).^[10,24–26] Hierbei wird zunächst die DEL mit einem Zielprotein, welches in vielen Fällen auf einer festen Phase immobilisiert vorliegt, inkubiert. Die Immobilisierung des Proteins kann dabei über Affinitäts-Tags, wie beispielsweise einem His₆-Tag, Flag-Tag oder Streptavidin-Tag, erfolgen. In darauffolgenden Waschschrritten werden die nicht-bindenden DNA-Molekül-Konjugate entfernt und anschließend werden die bindenden Moleküle von der Zielstruktur, beispielsweise durch Hitzedenaturierung des Proteins, eluiert. Die DNA-Sequenzen der Binder werden daraufhin über eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt und um experimentspezifische DNA-Sequenzen sowie um für die nachfolgende Sequenzierung benötigten DNA-Adaptersequenzen verlängert. Im Anschluss werden die DNA-Sequenzen zur Identifizierung der Molekülstruktur der Binder über *next generation sequencing* (NGS) ausgelesen. Zuletzt müssen die Moleküle ohne kodierenden DNA-Strang resynthetisiert und in biochemischen und/oder biophysikalischen Assays validiert werden. Bis heute gibt es kein allgemeingültiges Protokoll zur Durchführung von Affinitäts-basierten Selektionsassays von DELs. Das Protein kann vor oder nach der Inkubation mit der DEL immobilisiert werden, das Verfahren der Proteinimmobilisierung und die Inkubations-, Wasch- und Elutionsbedingungen können variiert werden. All diese experimentellen Parameter können erheblichen Einfluss auf die Proteinintegrität und die Bindung der DNA-Molekül-Konjugate an das Protein haben und müssen oftmals für jedes Zielprotein angepasst werden.^[24]

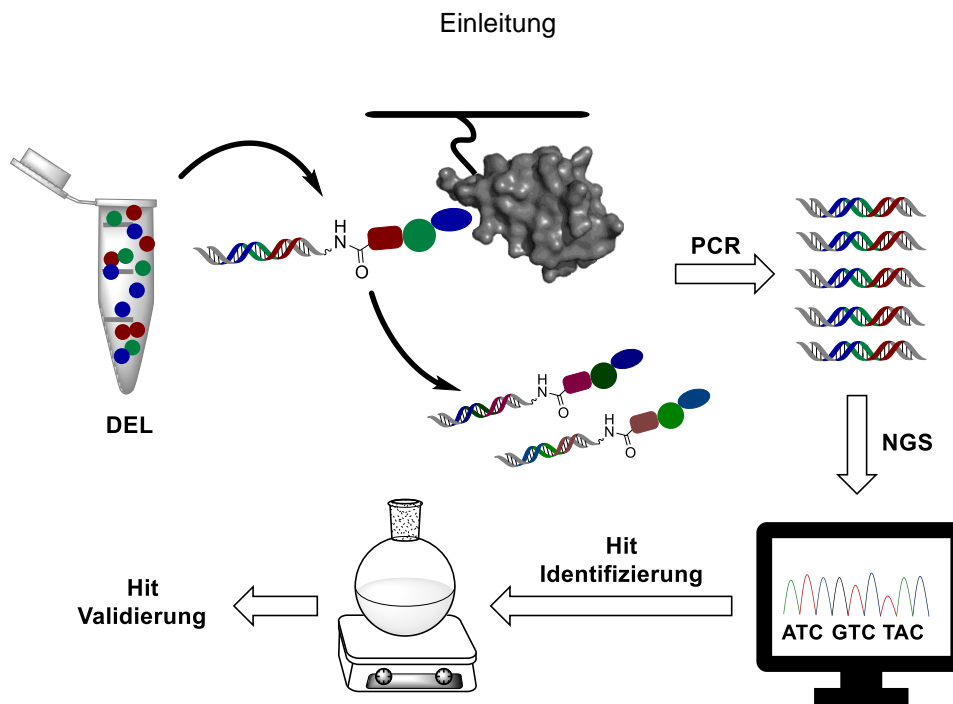


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Affinitäts-basierten Selektionsassays von DNA-kodierten Substanzbibliotheken mit anschließender Hit-Identifizierung und -Validierung.

Neben den Festphasen-basierten Selektionsassays wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen Technologien entwickelt, die ohne Immobilisierung des Zielproteins durchgeführt werden können. Die Arbeitsgruppe von David R. Liu entwickelte eine als „*interaction-dependent PCR*“ (IDPCR) bezeichnete Methode, bei welcher selektiv DNA-Sequenzen von Molekülen, welche an das Zielprotein binden, PCR-amplifiziert werden (Abb. 5A).^[27] Diese Technologie basiert auf der Hybridisierung der DNA-Sequenz eines DNA-Protein-Konjugats mit dem einzelsträngigen DNA-Oligonukleotid des bindenden Moleküls. Die Bildung eines solchen DNA-Heteroduplexes ermöglicht die nachfolgende Vervielfältigung der DNA über PCR. Ferner konnte kürzlich gezeigt werden, dass diese Strategie auch mit komplexen Mischungen (beispielsweise Zelllysate) aus DNA-markierten Proteinen durchgeführt werden kann.^[28] In diesem Fall erfolgt die DNA-Markierung des Zielproteins entweder nicht-kovalent über DNA-modifizierte Antikörper oder kovalent über Protein-Tags wie das *self-labeling protein tag* (SNAP-Tag). Eine Screeningtechnologie von DELs, welche in Wasser-Öl-Emulsionen stattfindet, ist das „*binder trap enrichment*“ (BTE, Abb. 5B).^[18] Bei der BTE-Methode werden Bindungspaare bestehend aus DNA-Molekül-Konjugaten und DNA-markierten Zielproteinen in Wasser-Öl-Tröpfchen eingeschlossen, was wiederum eine enzymatische Ligation der DNA-Sequenzen initiiert. PCR-Amplifizierung und Sequenzierung ermöglichen letztendlich die Identifizierung des bindenden Moleküls. „*DNA-programmed affinity labeling*“ stellt eine weitere Technologie zum Screening von DELs gegen unmodifizierte, nicht-immobilisierte Zielproteine dar (Abb. 5C).^[29] Bei dieser Strategie wird die DEL mit dem Zielprotein und mit einem kurzen, komplementären DNA-Oligonukleotid (PC-DNA),

welches über eine photoreaktive Gruppe verfügt, inkubiert. Die Bindung von Bibliotheksmitgliedern bringt die photoreaktive Gruppe in räumliche Nähe zum Zielprotein, so dass in Folge von UV-Bestrahlung ein kovalenter DNA-Protein-Komplex entsteht. Eine Möglichkeit zur Identifizierung der bindenden Moleküle basiert in der Verwendung des Enzyms Exonuclease I (ExoI), welches die DNA-Sequenzen von nicht-bindenden Molekülen abbaut, während die hybridisierten DNA-Oligonukleotide der Binder vor dem Enzymverdau geschützt sind.^[30]

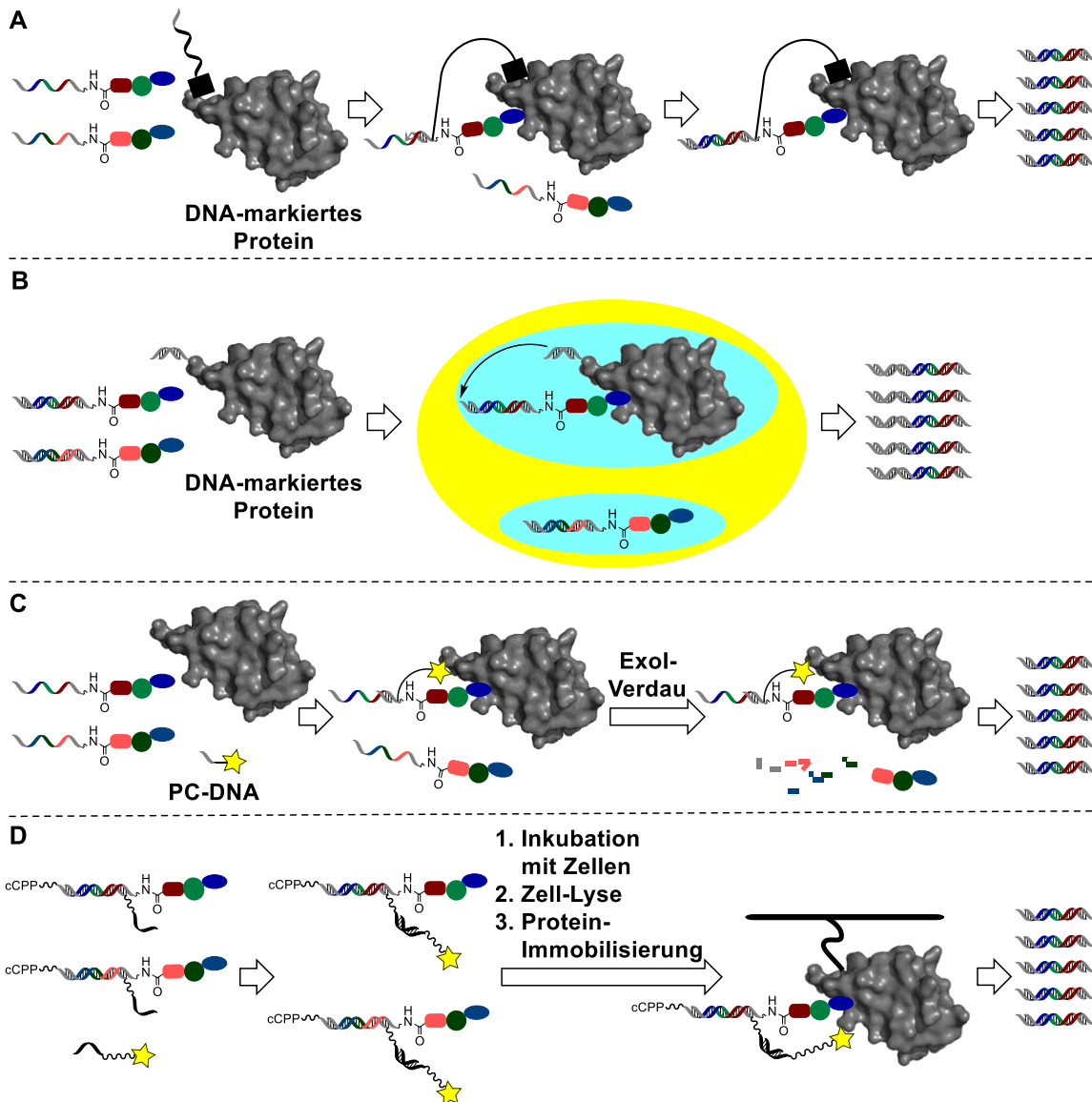


Abbildung 5: Schematische Darstellung weiterer Formate des Affinitäts-basierten Selektionsassays von DNA-kodierten Substanzbibliotheken. A. „interaction-dependent PCR“. B. „binder trap enrichment“. C. „DNA-programmed affinity labeling“. D. *In vivo*-Selektionsassay mittels cCPPs.

Kürzlich zeigte die Arbeitsgruppe von Krusemark die Selektion von „proof of concept“-DELs in lebenden Zellen (Abb. 5D).^[31] Um über die Zellmembran ins Zytosol der Zelle zu gelangen, wurden die Bibliotheksmitglieder der DEL mit einem zyklischen, zellpenetrierenden Peptid (*cyclic cell-penetrating peptide*, cCPP) konjugiert. Weiterhin

verfügen die DNA-Molekül-Konjugate über eine photoreaktive Gruppe, welche die Bildung eines kovalenten Komplexes zwischen dem bindenden Bibliotheksmitglied und einem Halo-Tag modifizierten Zielprotein ermöglicht.

Die Technologie der DNA-kodierten Substanzbibliotheken hat sich in den letzten Jahren als eine Möglichkeit zur Identifizierung von bioaktiven Molekülen in der Forschung etabliert (Abb. 6). Im Jahr 2016 untersuchte das Pharmaunternehmen *GlaxoSmithKline* (GSK) eine aus 7,7 Billionen Molekülen bestehende DEL bezüglich ihrer Bindung gegen die *receptor interacting protein kinase 1* (RIPK1).^[32] Bei diesem Screening konnte ein neuartiger, hochpotenter als auch selektiver RIPK1-Inhibitor gefunden werden, welcher durch nachfolgende medizinisch-chemische Optimierung zu einem klinischen Kandidaten **1** entwickelt wurde und sich derzeit in klinischen Studien zur Behandlung von Patienten mit Psoriasis, rheumatoider Arthritis und Colitis ulcerosa befindet (Stand 2021, Abb. 6).^[33] Ein weiteres Beispiel für ein Molekül, welches ebenfalls durch ein DEL-Screening von GSK gefunden wurde und mittlerweile die klinischen Phasen durchläuft, ist der *soluble epoxide hydrolase* (sEH) Inhibitor **2** (Stand 2021, Abb. 6).^[34]

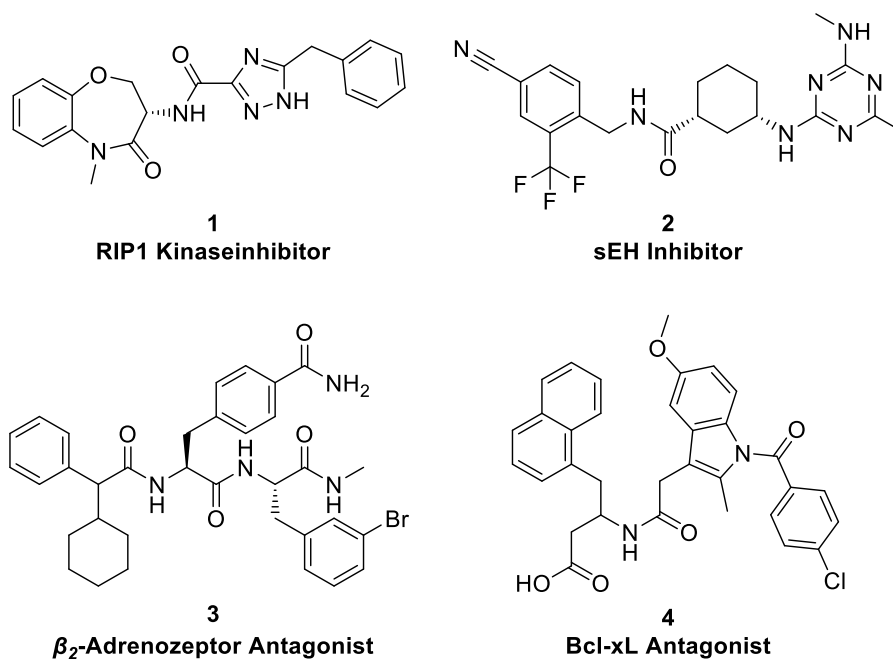


Abbildung 6: Auswahl an bioaktiven Molekülen, welche aus Selektionsassays mit DNA-kodierten Substanzbibliotheken identifiziert wurden.

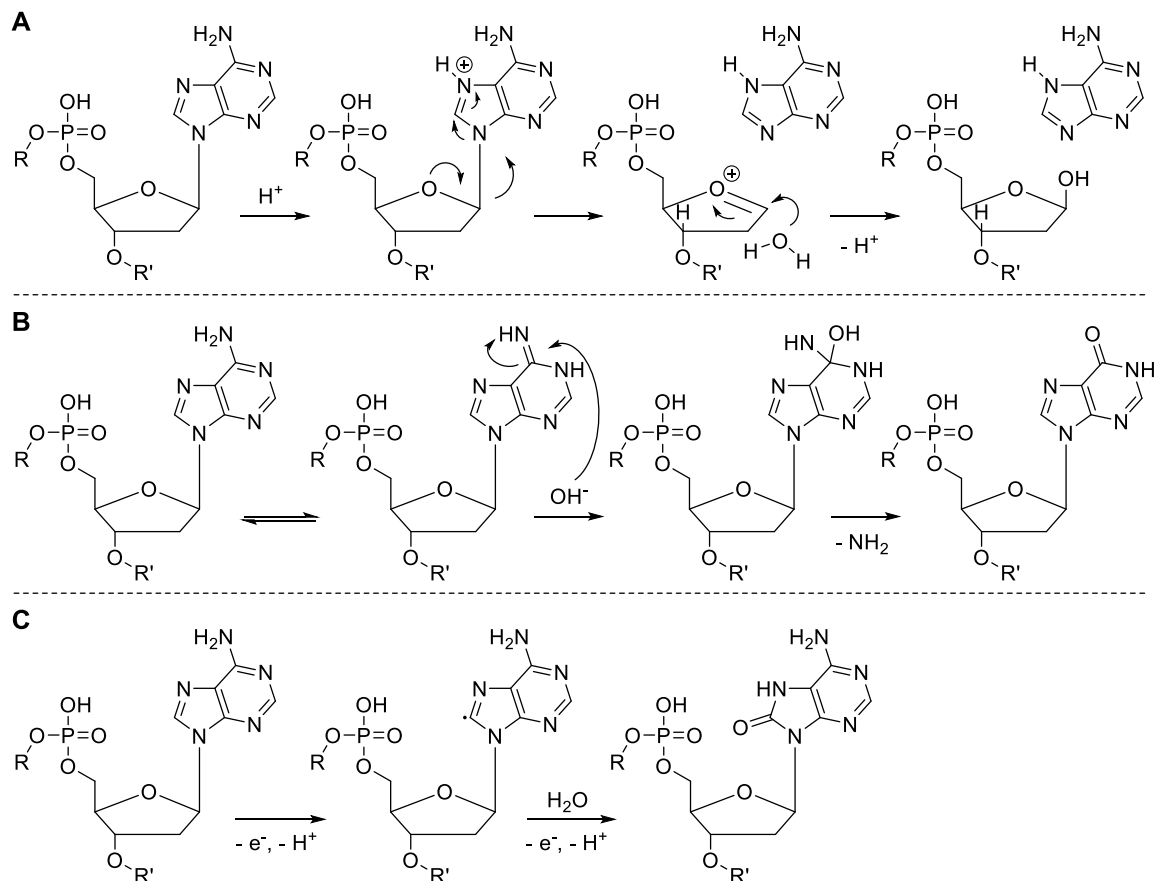
Nicht nur die pharmazeutische Industrie, sondern auch einige akademische Labore konnten Erfolge in der Identifizierung von neuen bioaktiven Molekülen für interessante Zielproteine mittels der DEL-Technologie verzeichnen. Die Arbeitsgruppe von Lefkowitz testete eine von der Firma *NuEvolution* erworbene DNA-kodierte Substanzbibliothek bestehend aus 190 Millionen Molekülen gegen den zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) gehörenden β_2 -Adrenozeptor.^[35] Die Screeningkampagne gegen

den β_2 -Adrenozeptor, welcher für den Selektionsassay in einem Detergenz (*N*-Dodecyl- β -*D*-Maltopyranosid) eingebettet wurde, lieferte einen allosterischen Binder **3** mit mikromolarer Affinität zum genannten Rezeptor (Abb. 6). Die Suche nach Molekülen, welche an Proteinoberflächen binden und damit die Wechselwirkung zu anderen Biomolekülen hemmen, stellt eine große Herausforderung dar, weist aber gleichzeitig immenses therapeutisches Potential zur Entwicklung neuer Arzneimittel auf. Mit Hilfe der Technologie der DNA-kodierten Substanzbibliotheken konnten bisher nur eine geringe Anzahl an Molekülen zur Inhibition von Protein-Protein-Interaktionen (PPI) identifiziert werden. Ein Beispiel für einen PPI-Inhibitor, entdeckt durch ein DEL-Screening, stellt der von der Arbeitsgruppe von Dario Neri identifizierte Binder **4** des Proteins Bcl-xL (*B-cell lymphoma-extra large*) dar (Abb. 6).^[36] Bcl-xL gehört zu den anti-apoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie und liegt bei einer Vielzahl von Tumoren überexprimiert vor.^[37] Der Inhibitor **4** wurde aus einer relativ kleinen Bibliothek bestehend aus 4.000 DNA-konjugierten Molekülen entdeckt und ist in der Lage, ein vom Bcl-2-Antagonisten BAK (*Bcl-2 homologous antagonist/killer*) abgeleitetes Peptid zu verdrängen.^[36]

In den letzten Jahrzehnten wurden vergleichsweise große DNA-kodierte Substanzbibliotheken von mehreren Forschungsgruppen hergestellt. Überwiegend erfolgte die DEL-Synthese mit einem begrenzten Spektrum an chemischen Reaktionen mit Fokus auf Carbonylchemie, nukleophilen (aromatischen) Substitutionsreaktionen sowie sp^2 - sp^2 -Kreuzkupplungen.^[38–40] Die DELs bestanden damit oftmals aus peptidomimetischen sowie flachen, aromatischen Molekülen und repräsentierten nur einen relativ kleinen Bereich des chemischen Strukturraums. Das Forschungsinteresse im Feld der DEL-Technologie hat sich in den letzten Jahren zur Entwicklung neuer Synthesemethoden, insbesondere zur Darstellung von genetisch markierten Heterozyklen, verschoben. Heterozyklische Strukturen sind überrepräsentiert in Naturstoffen sowie in synthetischen, bioaktiven Molekülen und sind demnach in einer Screeningbibliothek von großer Bedeutung.^[41–43] Die Entwicklung neuer Synthesemethoden zur Herstellung von chemisch diversen DNA-kodierten Substanzbibliotheken stellt allerdings eine Herausforderung dar. Synthesemethoden müssen kompatibel sein mit

- der DNA
- dem wässrigen Lösungsmittel
- dem kombinatorischen „*split and pool*“-Prozess.

Um die Integrität der DNA-Sequenzen zu bewahren, müssen alle eingesetzten chemischen Reaktionen DNA-kompatibel sein.^[44] Stark saure Reaktionsbedingungen, Oxidationsmittel und einige Schwermetallsalze können zu einem Verlust der genetischen Information durch DNA-Degradation, beispielsweise durch Depurinierung, Desaminierung oder Purin-Oxidation, führen (Schema 1). Ebenfalls können stark nukleophile Moleküle sowie (UV-)Strahlungen zu Schädigungen der DNA-Sequenzen führen, so dass die eindeutige Identifizierung der Molekülstruktur durch Sequenzierung nicht gewährleistet ist. Weiterhin sollten Synthesemethoden von DNA-Molekül-Konjugaten Wasser oder wässrige Lösungsmittelgemische tolerieren, da die kodierende DNA als ein polyanionisches Biomakromolekül in den meisten organischen Lösungsmitteln unlöslich ist. Zuletzt sollten chemische Reaktionen zur Generierung von DNA-Molekül-Konjugaten zu einer möglichst hohen Produktausbeute sowie geringer Nebenproduktbildung führen und gleichzeitig auf ein breites Spektrum an Reaktanden zurückgreifen können.^[45]

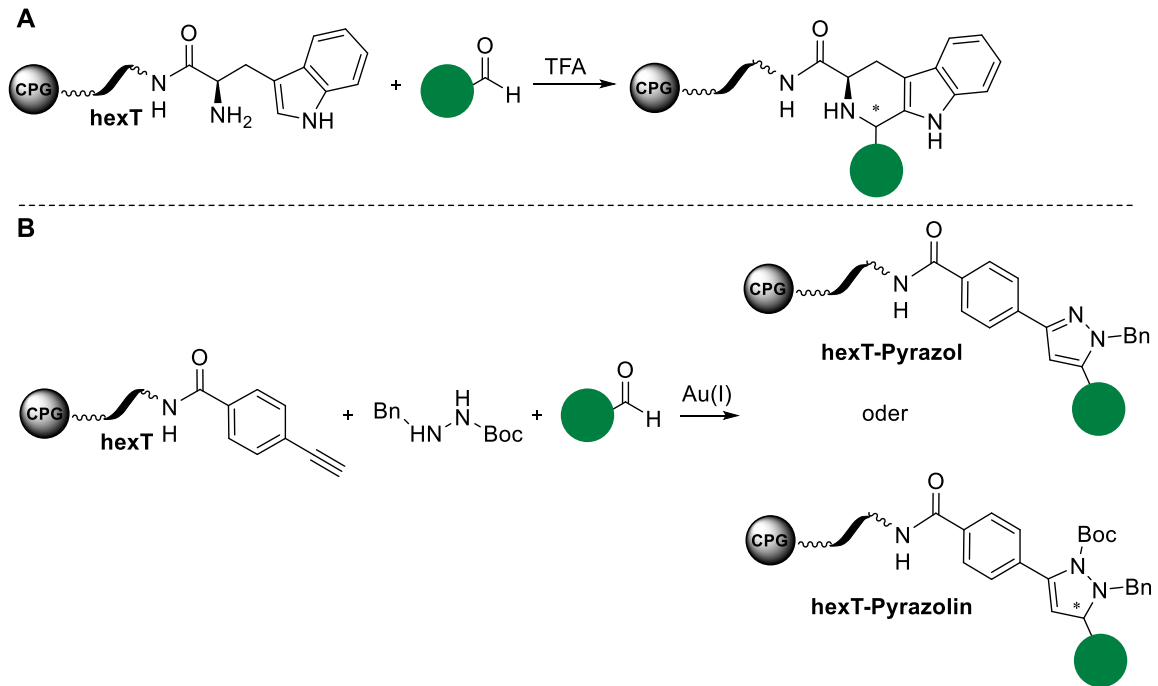


Schema 1: Depurinierung (A), Desaminierung (B) und Purin-Oxidation (C) als Beispiele für DNA-Schädigungen.

Die Übertragung von organischen Reaktionen in das Feld der DEL-Technologie erfordert in vielen Fällen einen hohen Bedarf an Optimierungsarbeit, weshalb nach Strategien zur Umgehung einiger der aufgelisteten Probleme geforscht wird. Eine mögliche Strategie basiert auf der Durchführung von chemischen Reaktionen auf den

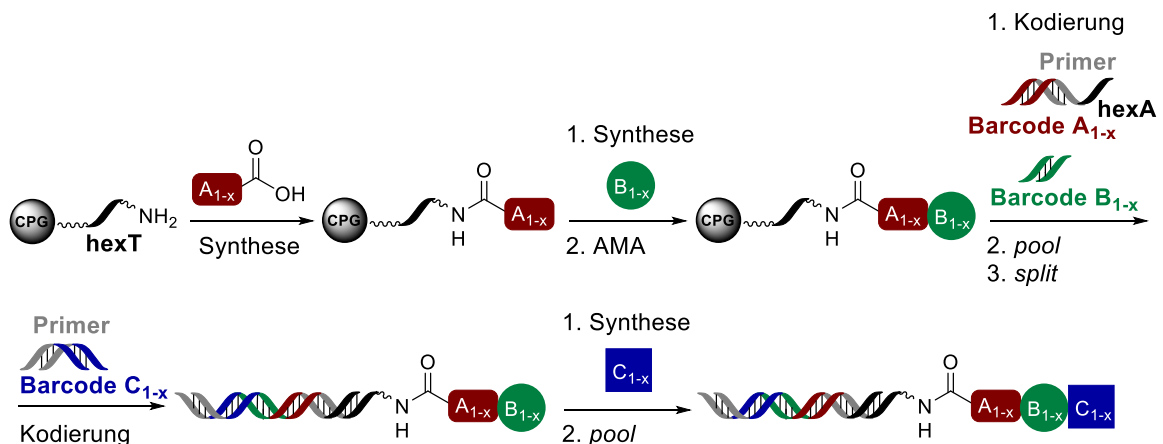
Festphasen-gebundenen Produkten der DNA-Oligonukleotidsynthese. Die Herstellung von DNA-Oligonukleotiden, welche für Folgereaktionen oftmals mit einem Aminolinker modifiziert werden, erfolgt standardmäßig über das Phosphoramidit-Verfahren auf *controlled pore glass*. Die Strategie der organischen Festphasensynthese profitiert unter anderem von einer großen Auswahl an (trockenen) Lösungsmitteln und der Möglichkeit, Reagenzien und Reaktanden durch simple Filtrations- sowie Waschschrte zu entfernen, aber auch von einer erhöhten Stabilität der CPG-gebundenen Oligonukleotide durch das Vorhandensein von Schutzgruppen.^[46] Allerdings stellt ein Nachteil des Festphasen-basierten Ansatzes die Entfernung der Schutzgruppen sowie Abspaltung der DNA-Oligonukleotide vom CPG durch stark basische Bedingungen dar, welche zur Degradierung von basenlabilen Molekülen führen können und im Design von DNA-kodierten Substanzbibliotheken berücksichtigt werden müssen. Die Festphasen-basierte Strategie wurde unter anderem bei der Synthese einer aus makrozyklischen Verbindungen bestehenden DEL angewendet. Die Arbeitsgruppe von David R. Liu zeigte dabei, dass CPG-gebundene DNA eine kurzzeitige Inkubation mit konzentrierter Trifluoressigsäure (TFA) zur Entschützung von *tert*-Butyloxycarbonyl (Boc)-Schutzgruppen toleriert.^[16] Die Forschungsgruppe um Andreas Brunschweiler etablierte für organische Reaktionen, welche harschere Bedingungen benötigen, die sehr stabile, aus sechs Thymin-Nukleobasen bestehende, CPG-gebundene Hexathymidin (hexT)-DNA-Sequenz als Adapter für die Synthese von DNA-kodierten Substanzbibliotheken. Die Verwendung des CPG-gebundenen hexT-Adapteroligonukleotids ermöglichte sowohl die TFA-vermittelte Pictet-Spengler-Reaktion als auch die Au(I)-medierte Pyrazol(in)synthese (Schema 2).^[47]

Einleitung



Schema 2: Verwendung des chemisch sehr stabilen, CPG-gebundenen hexT-Adapters zur Überführung von chemischen Reaktionen auf DNA. A. TFA-vermittelte Pictet-Spengler-Reaktion. B. Au(I)-vermittelte Pyrazol(in)synthese.^[47]

Ausgehend von diesen Ergebnissen beschrieben Brunschweiler *et al.* die Synthese einer sogenannten „*oligothymidine-initiated DNA-encoded library*“ (tiDEL) unter Verwendung der zuvor genannten Reaktionen (Schema 3).^[47] Mit Hilfe der TiDEC (*thymidine-initiated DNA-encoded chemistry*)-Strategie können im ersten Schritt der DEL-Synthese harschere Reaktionsbedingungen angewendet werden, da keine Risiken für DNA-Degradierungen durch Depurinierung, Desaminierung und/oder Purin-Oxidation bestehen.^[48] Gleichzeitig erfordert die Darstellung einer tiDEL jedoch die Generierung diskreter Unterbibliotheken aufgrund der Abwesenheit eines DNA-Barcodes im ersten Syntheseschritt.



Schema 3: Schematische Darstellung der TiDEC-Strategie zur Synthese von DNA-kodierten Substanzbibliotheken. AMA = 1:1-Mischung aus wässriger Ammoniak-Lösung (30 %) und wässriger Methylamin-Lösung (40 %).

1.2 Protein-Protein-Interaktionen als attraktive pharmazeutische Targets

Protein-Protein-Interaktionen steuern eine Vielzahl von zellulären Prozessen. Sie sind unter anderem an der Zellproliferation, Zellteilung, Transkription, Translation, Apoptose und in zahlreichen Signaltransduktionskaskaden beteiligt.^[49] Darüber hinaus spielen sie eine zentrale Rolle bei der Entstehung einer Vielzahl von Krankheiten.^[50] Die Modulation von Protein-Protein-Interaktionen stellt eine vielversprechende Strategie zur Entwicklung von neuen Arzneimitteln dar.^[51] Allerdings stellt das Adressieren von PPIs die aktuelle Forschung vor eine anspruchsvolle Herausforderung. PPIs sind dynamisch und ihre Kontaktoberflächen sind mit etwa $1500-3000 \text{ \AA}^2$ im Vergleich zu denen von Protein-Molekül-Interaktionen ($\sim 300-1000 \text{ \AA}^2$) deutlich größer.^[52-55] Weiterhin weisen die in PPIs beteiligten Oberflächen meist keine definierten Proteintaschen auf, sondern sind in der Regel flach und kaum strukturiert.^[56,57]

1.2.1 MDM2-p53-Protein-Protein-Interaktion

Die Protein-Protein-Interaktion zwischen dem Tumorsuppressorprotein p53 und seinem negativen Regulator MDM2 (*mouse double minute 2 homolog*) gehört zu einer der am intensivsten untersuchtesten Wechselwirkungen und gilt als ein vielversprechendes Target in der Antitumorthherapie (Abb. 7). p53 spielt als Transkriptionsfaktor eine wichtige Rolle bei der DNA-Reparatur, dem Zellzyklusarrest sowie der Apoptose als Antwort auf zellulären Stress durch beispielsweise DNA-Schädigungen oder Hypoxie.^[58,59] In Abwesenheit von Stresssignalen liegt p53 mit einer Halbwertszeit von ungefähr 20 min gering konzentriert in der Zelle vor.^[58] Die Menge an p53 wird in einer autoregulatorischen Rückkopplungsschleife, in der die Wechselwirkung mit MDM2 als Hauptregulator von p53 eine zentrale Rolle spielt, kontrolliert. p53 induziert durch seine transkriptionelle Aktivität die vermehrte Expression vom Onkoprotein MDM2, welches gleichzeitig die Transkriptionsaktivität von p53 negativ über verschiedene Mechanismen reguliert.^[60] Zum einen bindet MDM2 an die N-terminale Transaktivierungsdomäne von p53 und blockiert damit die transkriptionelle Aktivität.^[61] Weiterhin ist MDM2 in der Lage durch seine E3-Ligaseaktivität p53 durch Ubiquitylierung zu markieren und dessen Transport vom Nukleus in das Zytoplasma für den proteasomalen Abbau des Proteins zu vermitteln.^[62]

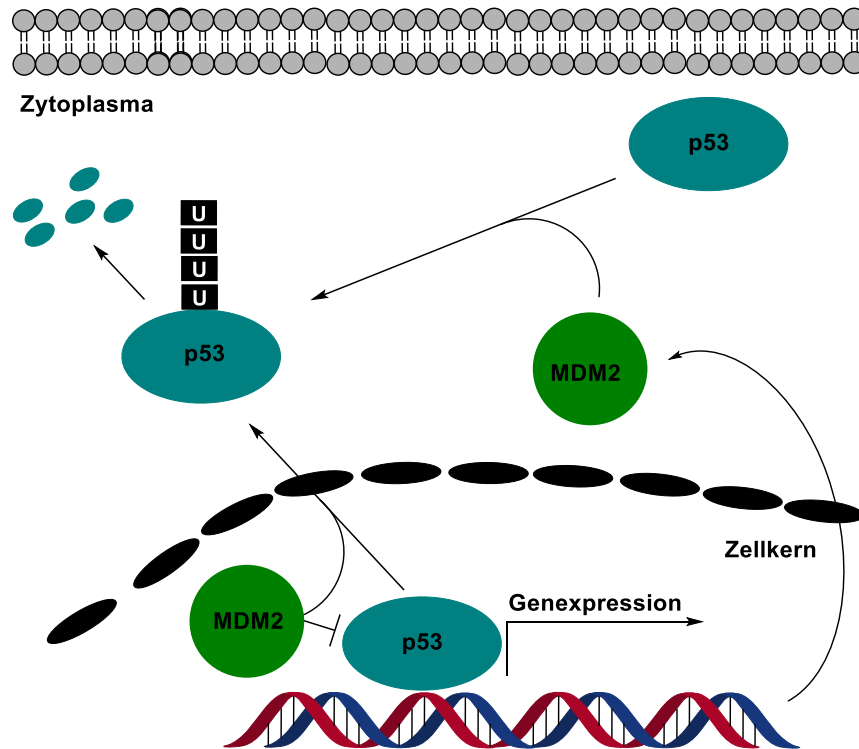


Abbildung 7: Schematische Darstellung der MDM2-p53-Protein-Protein-Interaktion.

Schätzungsweise liegt das Protein p53 bei mehr als 50 % der menschlichen Krebserkrankungen mutiert vor.^[63,64] Ferner wird bei einer Vielzahl an Tumoren der p53-Signalweg negativ moduliert durch beispielsweise der Hochregulierung von p53-Inhibitoren wie MDM2 oder MDMX.^[65] In den Fällen, in denen der Tumor nicht auf eine Mutation im p53-Gen zurückzuführen ist, stellt die Freisetzung von funktionellem p53 durch Inhibition der p53-MDM2-PPI mittels kleiner organischer Moleküle eine attraktive Strategie in der Krebstherapie dar. Die p53-MDM2-Interaktionsfläche unterscheidet sich in einigen Aspekten von einem Großteil bekannter Protein-Protein-Interaktionen.^[66,67] Die Bindestelle ist nicht flach und konvex oder planar, sondern tief und konkav. Die Aminosäuren, welche essenziell für die Interaktion sind und hauptsächlich zur Gibbs-Energie der PPI beitragen, sogenannte „*hot spot*“-Aminosäuren, befinden sich auf einer Helix von p53, welche tief in die Bindetasche von MDM2 hineinragt. Es handelt sich hierbei um die hydrophoben Aminosäuren Phe19, Trp23 und Leu26. Die MDM2-Bindestelle, welche zudem ähnlich groß ist wie solche, die normalerweise effektiv von kleinen organischen Molekülen adressiert werden, weist damit einen stark hydrophoben Charakter auf.

Einleitung

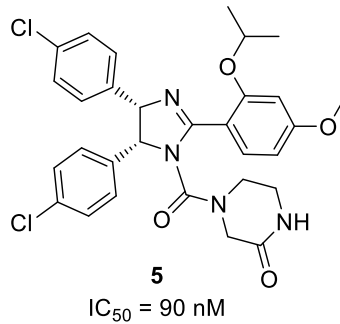


Abbildung 8: Nutlin-3.^[68]

Seit der Entdeckung von Nutlin-3 (**5**) als einer der ersten potenten und selektiven MDM2-Antagonisten durch die Pharmafirma *Hoffmann-La Roche* (Abb. 8), wurde eine Vielzahl an Molekülen, darunter die Moleküle **6**, **7**, **8** und **9**, welche durch Bindung an die MDM2-Bindetasche die Protein-Protein-Interaktion zu p53 inhibieren, beschrieben (Abb. 9).^[59,69–71]

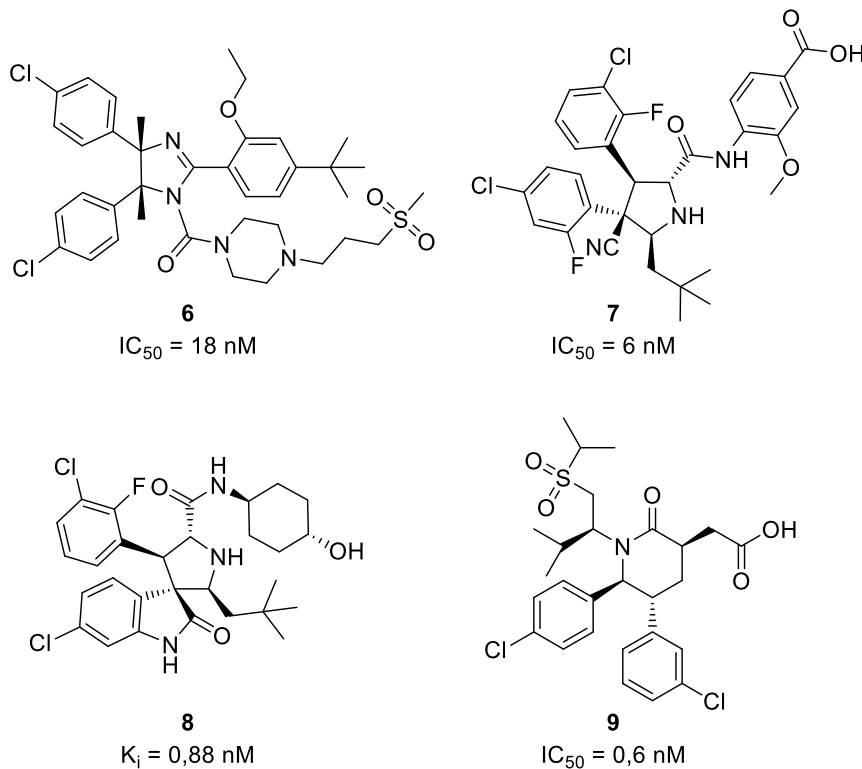


Abbildung 9: Repräsentative Auswahl an MDM2-Inhibitoren. Die Moleküle **7**, **8** und **9** befinden sich derzeit in klinischen Studien zur Behandlung von Krebserkrankungen (Stand 2021).^[72–79]

Ein Großteil der p53-MDM2-Antagonisten ahmt die „*hot spot*“-Aminosäuren nach. Strukturelle Analyse der Wechselwirkung von MDM2 mit p53-abgeleiteten Peptiden sowie kleinen organischen Molekülen führte zur Entwicklung eines mittlerweile weit anerkannten Pharmakophor-Modells, welches als „*three finger pharmacophore*“ bezeichnet wird und einen Großteil der publizierten MDM2-Inhibitoren charakterisiert.^[70]

Eine Möglichkeit zur Identifizierung von PPI-Inhibitoren bietet die frei zugängliche Software *AnchorQuery*, welche eine Pharmakophor-basierte Screeningtechnologie darstellt.^[80] Die Plattform *AnchorQuery* baut auf das Prinzip von „*anchor*“-Aminosäureseitenketten von PPIs, welche chemisch nachgeahmt und in virtuelle Bibliotheken aufgenommen werden. Die Bibliotheken von *AnchorQuery* basieren auf Multikomponentenreaktionen (MCR) zur schnellen und effizienten Synthese neuer Inhibitoren. Die Arbeitsgruppe von Alexander Dömling konnte mit Hilfe von *AnchorQuery* neuartige p53-MDM2-Inhibitoren identifizieren.^[80,81] Hierbei wurde Trp23 als „*anchor*“ ausgewählt. Von den drei „*hot spot*“-Aminosäuren der p53-MDM2-Interaktion ist Trp23 die Aminosäure, welche zentral positioniert vorliegt, am tiefsten in die MDM2-Bindetasche hineinragt und zusätzlich zu Van-der-Waals-Kontakten eine Wasserstoffbrückenbindung zur Carbonylgruppe des Rückgrats von Leu54 (MDM2) aufweist. Für Trp23 als „*anchor*“ wurden anfänglich Indol- sowie 4-Chlorphenyl-Derivate in die Bibliothek aufgenommen. Die beiden verbliebenden „*hot spot*“-Aminosäuren, Phe19 und Leu26, wurden zusätzlich in das Pharmakophor-Modell miteinbezogen. Mit Hilfe der Screeningplattform *AnchorQuery* konnte eine Vielzahl an MCR-basierenden Strukturen identifiziert werden, welche in der Lage waren die p53-MDM2-PPI zu stören und damit vielversprechende Startpunkte zur Entwicklung von neuen Arzneimitteln in der Antitumorthherapie darbieten.^[66,80–84] Unter anderem konnte hierdurch kürzlich ein potenter, auf der Ugi-Vierkomponentenreaktion (U-4CR) basierender Inhibitor **10** gefunden werden, welcher eine zusätzliche Bindetasche in MDM2 besetzt und damit zur Erweiterung des „*three finger pharmacophor*“-Modells führte (Abb. 10).^[84]

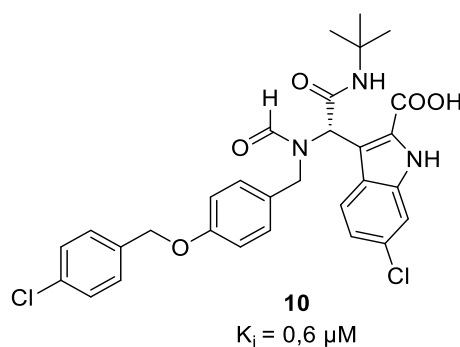


Abbildung 10: Struktur von **10**.^[84]

1.2.2 TEAD-YAP-Protein-Protein-Interaktion

Eine weitere Protein-Protein-Interaktion, die zunehmend in den Fokus der Wirkstoffforschung rückt, ist die Wechselwirkung zwischen dem Transkriptionsfaktor *transcriptional enhanced associate domain* (TEAD) und seinem Co-Aktivatorprotein *Yes-associated protein* (YAP) bzw. dessen Paralog *transcriptional co-activator with PDZ-binding motif* (TAZ), welche die Effektoren des Hippo-Signalweges darstellen (Abb. 11). Der Hippo-Signalweg ist ein evolutionär hoch-konservierter Signalweg, welcher eine wichtige Rolle bei der Regulation der Organgröße, Geweberegeneration als auch - im Fall von Dysregulation - in der Karzinogenese spielt.^[85] In Säugetieren besteht der Hippo-Signalweg aus den Serin-Threonin-Kinasen MST1/2 (*mammalian STE20-like kinases 1 and 2*), welche im Komplex mit dem Adaptorprotein SAV1 (*salvador family WW domain containing protein 1*), die nachgeschalteten Proteinkinasen LATS1/2 (*large tumour suppressor kinases 1 and 2*) phosphorylieren und damit aktivieren. LATS1/2 interagieren mit den ebenfalls von MST1/2 phosphorylierten Adaptorproteinen MOB1A/B (*mps one binder kinase activator-like 1A and 1B*) und der resultierende, aktive LATS1/2-MOB1A/B-Komplex phosphoryliert die transkriptionellen Co-Aktivatorproteine YAP und TAZ. Die Phosphorylierung von YAP und TAZ führt entweder dazu, dass deren nukleare Translokation durch Bindung an 14-3-3-Proteine verhindert wird oder dass sie durch das Ubiquitin-Proteasom-System degradiert werden.^[86,87] Liegen die Kinasen des Hippo-Signalweges inaktiv vor, migrieren YAP/TAZ in den Zellkern, wo sie mit TEAD-Transkriptionsfaktoren interagieren und die Expression bestimmter Zielgene, wie beispielsweise von *CTGF* (*connective tissue growth factor*), *CYR61* (*cysteine-rich angiogenic inducer 61*), *AXL* (*AXL receptor tyrosine kinase*) sowie *BIRC5* (*baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5* bzw. *survivin*), steigern.^[88]

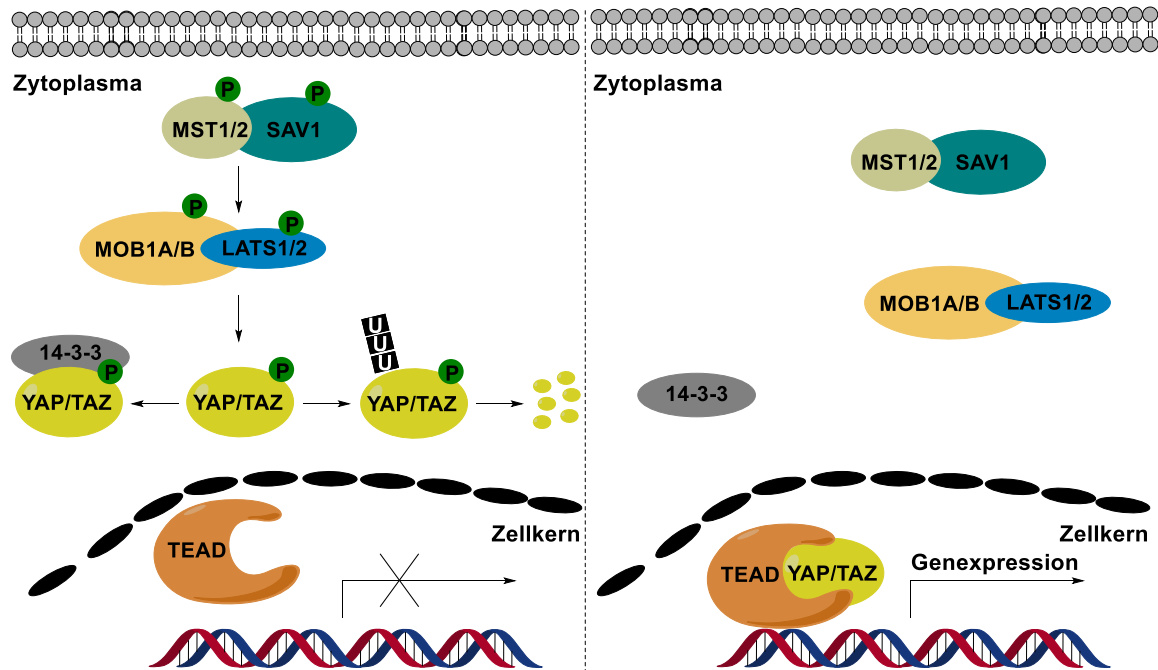


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Hippo-Signalweges.

Deregulierung des Hippo-Signalweges oder Überexpression von YAP/TAZ und TEAD-Proteinen spielen bei verschiedenen Krankheitsbildern, einschließlich Krebs, eine wichtige Rolle.^[89] Insbesondere wird eine erhöhte Amplifikation oder Überexpression der YAP-Gene mit zahlreichen Tumorentitäten wie Darm-, Lungen- oder Eierstockkrebs in Verbindung gebracht.^[90,91]

Da einige der vorgeschalteten Proteine des Hippo-Signalweges mit Bestandteilen anderer Signalnetzwerke in Kontakt stehen, kann ein direktes Adressieren des finalen YAP/TAZ-TEAD-Proteinkomplexes mögliche Nebeneffekte verringern. Ein vielversprechendes therapeutisches Target zur Modulation des Hippo-Signalweges sind die TEAD-Transkriptionsfaktoren, welche im Gegensatz zu den Co-Aktivatorproteinen YAP und TAZ aus strukturierten Proteindomänen bestehen, welche leichter mit kleinen organischen Molekülen adressiert werden können. TEAD-Proteine bestehen aus einer N-terminalen DNA-Bindungsdomäne (DBD) zur spezifischen Erkennung von bestimmten DNA-Sequenzen sowie aus einer C-terminalen YAP/TAZ-Bindungsdomäne (YBD) zur Interaktion mit Co-Aktivatoren.^[92] Die YBD wird durch eine posttranslationale Palmitoylierung an einer konservierten Cystein-Aminosäure, welche sich in einer hydrophoben Bindetasche im Zentrum der YBD („central pocket“) befindet, stabilisiert.^[93] Eine Störung der Palmitoylierung hingegen beeinflusst die Interaktion zwischen YAP und TEAD negativ und verringert die Stabilität des Proteins.^[94] Durch die Interaktion von TEAD mit YAP entstehen insgesamt drei hoch-konservierte Proteingrenzflächen, wobei der dritten Grenzfläche eine zentrale Rolle bei der TEAD-YAP-Wechselwirkung zugeschrieben werden kann (Abb. 12).^[95]

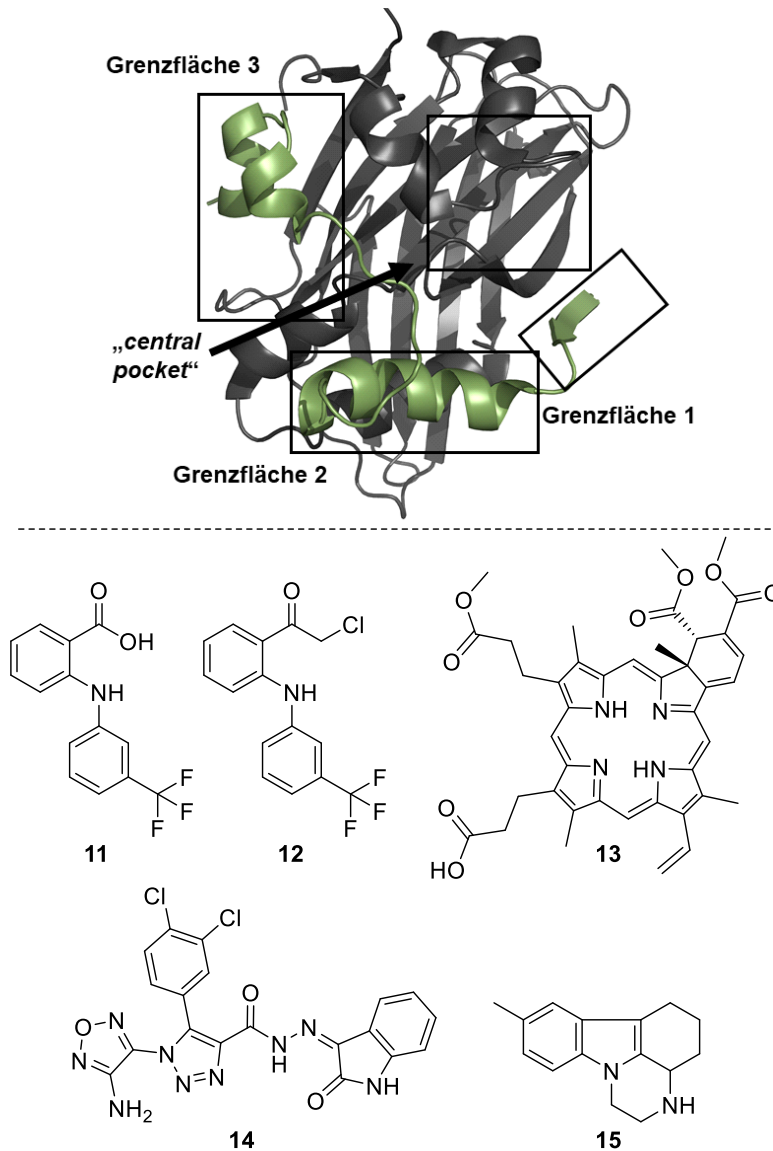


Abbildung 12: TEAD-YAP-Protein-Protein-Interaktion als therapeutisches Target zur Modulation des Hippo-Signalweges in der Antitumorforschung. Oben: Struktur des TEAD-YAP-Proteinkomplexes (PDB ID: 3KYS); TEAD in grau und YAP in grün. Unten: Auswahl an TEAD-YAP-PPI-Inhibitoren.^[96–100]

In einem Fragment-basierten Screening der YBD von TEAD wurde Flufenaminsäure **11** als Ligand der „central pocket“ gefunden (Abb. 12).^[96] Die Behandlung von Zellen mit Flufenaminsäure **11** führte zu einer Abnahme der transkriptionellen Aktivität von TEAD.^[96] Weiterhin konnte eine Abnahme der Palmitoylierung von TEAD durch Flufenaminsäure **11** beobachtet werden.^[101] Basierend auf der Struktur von Flufenaminsäure **11** wurde der kovalente Inhibitor TED-347 (**12**) konzipiert (Abb. 12).^[97] TED-347 bindet an einen konservierten Cystein-Aminosäurerest innerhalb der zentralen Bindetasche von TEAD, was zur Inhibition der TEAD-YAP-Interaktion führt.^[97] In einer weiteren Screeningkampagne konnte Verteporfin **13**, ein Porphyrin-Farbstoff, welcher bereits als Fotosensibilisator zur Behandlung von Makuladegeneration eingesetzt wird, als bisher einziger Binder von YAP identifiziert werden (Abb. 12).^[98,102] Es zeigte sich hierbei, dass

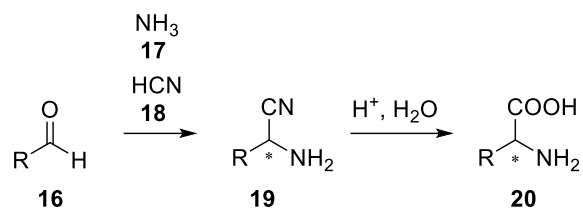
durch die Bindung von Verteporfin **13** an YAP die TEAD-YAP-PPI inhibiert und YAP-induziertes Wachstum von Leberkrebs gelindert werden konnte. Weitere TEAD-YAP-PPI-Inhibitoren, welche mit Hilfe von *in silico* Screenings gefunden wurden, sind die Moleküle **14** und **15** (Abb. 12).^[99,100] Eine andere Strategie zur Adressierung der TEAD-YAP-PPI, insbesondere der dritten Grenzfläche, beruht auf Peptid-basierten Molekülen. Zhang *et al.* konzipierten einen potenten zyklischen Peptidinhibitor der TEAD-YAP-Wechselwirkung basierend auf der YAP⁸⁴⁻¹⁰⁰-Sequenz.^[103] Ebenfalls basierend auf der Aminosäuresequenz von YAP (YAP⁸⁵⁻⁹⁹) wurde ein Peptid bestehend aus 15, teils unnatürlichen, Aminosäuren gefunden, welches in der Lage ist die TEAD-YAP-PPI im nanomolaren Bereich zu inhibieren.^[104] Allerdings gehören zu den Nachteilen der Peptid-basierten Ansätze im Rahmen der Arzneistoffentwicklung unter anderem eine geringe orale Bioverfügbarkeit sowie Membranpermeabilität von Peptiden bei gleichzeitiger metabolischer Instabilität.^[105]

1.3 Multikomponentenreaktionen

Multikomponentenreaktionen stellen effiziente Synthesemethoden dar, bei denen in einem einzigen Syntheseschritt (Eintopfverfahren) drei oder mehr Komponenten zu komplexen Molekülstrukturen verknüpft werden.^[106-108] Im Gegensatz zu konventionellen linearen und mehrstufigen Synthesemethoden zeichnen sie sich durch eine herausragende Atomökonomie aus, da die Mehrheit der Atome der Ausgangsverbindungen auch im Reaktionsprodukt wiederzufinden sind. Ein weiteres Merkmal von MCRs ist die hohe *bond forming efficiency* durch die gleichzeitige Knüpfung einer Vielzahl an neuen chemischen Bindungen. Da es sich bei MCRs um Eintopfreaktionen handelt und in der Regel kaum Nebenprodukte entstehen, sind nur eine geringe Anzahl an (simplen) Reinigungsschritten notwendig. Dadurch werden sowohl Kosten und Zeit eingespart als auch die Bildung von Abfällen verringert. Von besonderem Interesse sind Multikomponentenreaktionen für die kombinatorische Chemie. In nur einem einzigen Reaktionsschritt können Ausgangsmaterialien, welche kommerziell in großer Zahl erhältlich sind, zu strukturell diversen und komplexen Reaktionsprodukten umgesetzt werden.^[109,110] Durch Variation der eingesetzten Edukte lassen sich so innerhalb kürzester Zeit große Substanzbibliotheken aufbauen.

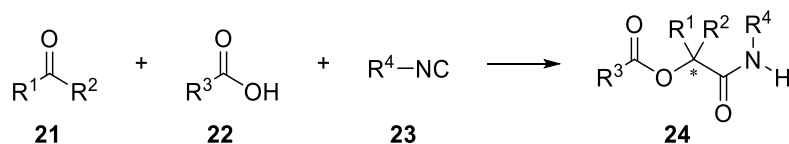
Die im Jahre 1850 publizierte Strecker-Reaktion wird als erste dokumentierte Mehrkomponentenreaktion angesehen (Schema 4). Es handelt sich hierbei um eine Dreikomponentenreaktion (*three component reaction*, 3CR) zwischen einem Aldehyd **16**,

Ammoniak **17** und Cyanwasserstoff **18** zur Herstellung von α -Aminonitrilen **19**, welche im Anschluss zu Aminosäuren **20** hydrolysiert werden können.^[111]



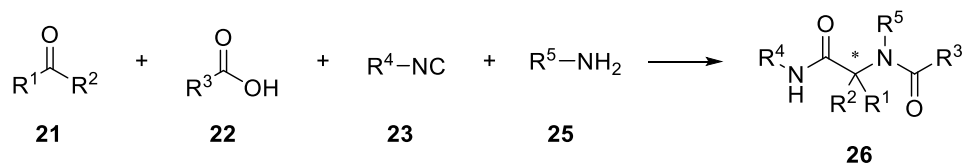
Schema 4: Strecker-Synthese.

In zahlreichen MCRs nehmen Isocyanide eine zentrale Rolle ein. Dies ist auf die funktionellen Eigenschaften der Isocyanide zurückzuführen, zu denen die α -Acidität, die α -Addition von Nucleophilen als auch Elektrophilen an das Isocyanid-Kohlenstoffatom sowie die leichte Bildung von Radikalen gehören.^[112] Die Passerini-Reaktion ist die erste beschriebene Isocyanid-basierte Multikomponentenreaktion (Schema 5). Bei dieser Dreikomponentenreaktion reagieren eine Carbonylkomponente (Aldehyd oder Keton) **21**, eine Carbonsäure **22** sowie ein Isocyanid **23** zu einem α -Acyloxycarboxamid **24**.^[113]



Schema 5: Passerini-3CR.

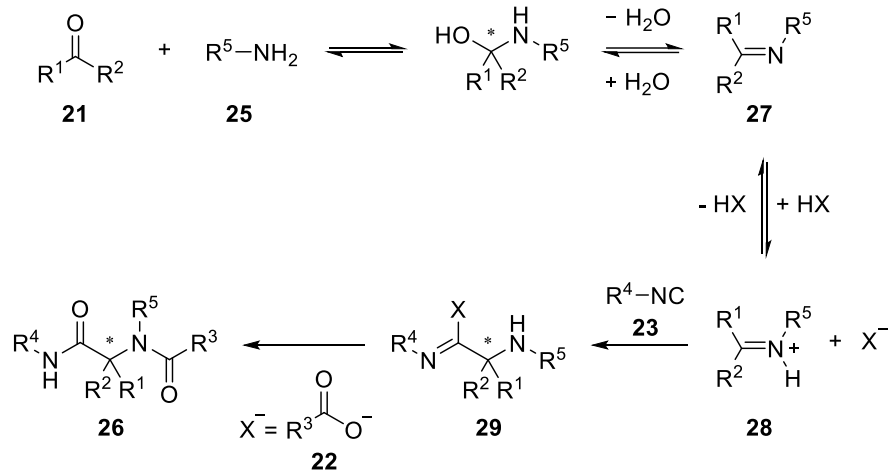
Eine nah mit der Passerini-3CR verwandte Reaktion ist die Ugi-Vierkomponentenreaktion (*Ugi four component reaction*, Schema 6). Die U-4CR wurde im Jahre 1959 von Ivar Ugi beschrieben und stellt eine der vielseitigsten Multikomponentenreaktionen dar.^[114,115] Klassischerweise handelt es sich hierbei um eine Reaktion zwischen einer Carbonylverbindung (Aldehyd oder Keton) **21**, einer Carbonsäure **22**, einem Isocyanid **23** und einem primären Amin **25** zur Darstellung von Diamiden **26**.



Schema 6: U-4CR.

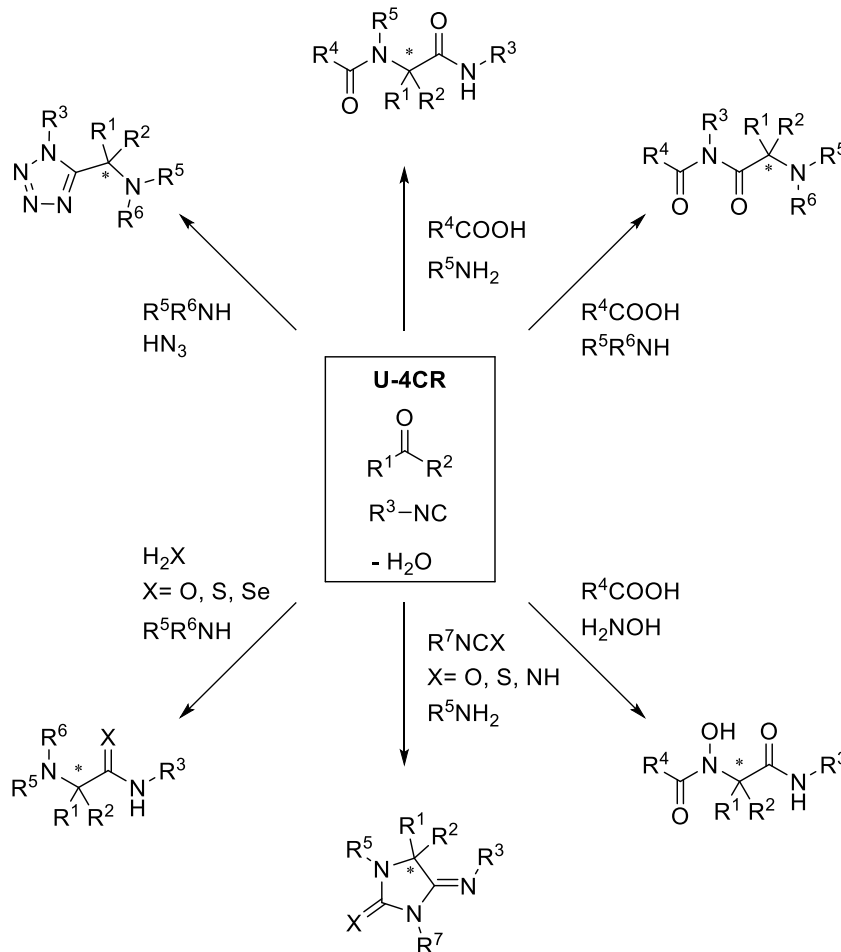
Im ersten Reaktionsschritt der U-4CR kondensiert das Amin **25** unter Wasserabspaltung mit einer Carbonylverbindung **21** zu einem Imin **27** (Schema 7). Das auch als Schiff'sche Base bezeichnete Imin **27** wird anschließend von der Säurekomponente protoniert und das so entstandene Iminiumion **28** wird daraufhin von dem negativ geladenen Kohlenstoffatom des Isocyanids **23** nucleophil angegriffen. Im nächsten Reaktionsschritt

kommt es zur Addition der Säurekomponente **22** und dadurch zur Entstehung eines hochreaktiven α -Addukts **29**, welches irreversibel zum Produkt **26** umgelagert wird.



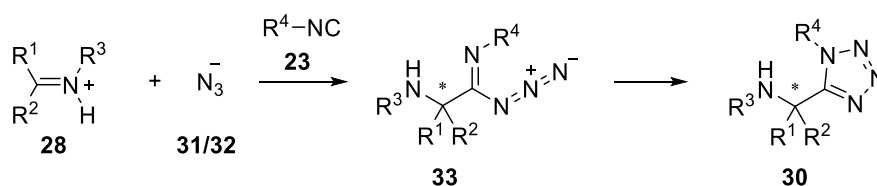
Schema 7: Reaktionsverlauf der U-4CR.^[116]

Aufgrund ihrer großen Bandbreite an einsetzbaren Substraten, vor allem durch die Säurekomponente, sind mittlerweile einige Varianten der U-4CR bekannt (Schema 8).^[114,115,117–119]



Schema 8: Überblick zur Produktvielfalt verschiedener Varianten der U-4CR.^[114,115,117–119]

Eine besonders interessante Variante der U-4CR stellt die Ugi-Azid-Vierkomponentenreaktion (UA-4CR) zur Synthese von 1,5-disubstituierten Tetrazolen **30** dar.^[117] Bei dieser Reaktion kann als Säurekomponente die Stickstoffwasserstoffsäure HN_3 **31** oder Trimethylsilylazid TMSN_3 **32** verwendet werden. Analog zur U-4CR wird zunächst ein Iminiumion **28** gebildet, an welches das Isocyanid **23** und das Azid-Ion addiert. Das dadurch gebildete α -Addukt **33** lagert sich anschließend über einen intramolekularen Ringschluss zum 1,5-disubstituierten Tetrazol **30** um (Schema 9).



Schema 9: Reaktionsverlauf der UA-4CR.^[120]

Tetrazole kommen zwar in Naturprodukten nicht vor, sie sind allerdings von besonderer Bedeutung in der medizinischen Chemie und in der Entwicklung von Arzneimitteln. Während sich 5-substituierte Tetrazole als bioisosterer Ersatz für Carbonsäuren und 1,5-disubstituierte Tetrazole für *cis*-Amidbindungen in Peptidomimetika etabliert haben (Abb. 13A), zeichnen sich Tetrazole ebenso durch eine hohe metabolische Stabilität sowie anderer vorteilhafter physikochemischer Eigenschaften aus.^[121] Eine Vielzahl an Medikamenten mit Tetrazol-Substituenten wurde bislang von der *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassen. Dazu gehören beispielsweise die Angiotensin-II-Rezeptor-Blocker Valsartan **34**, Candesartan **35** sowie Losartan **36** zur Behandlung von Hypertonie (Abb. 13B).^[122–124]

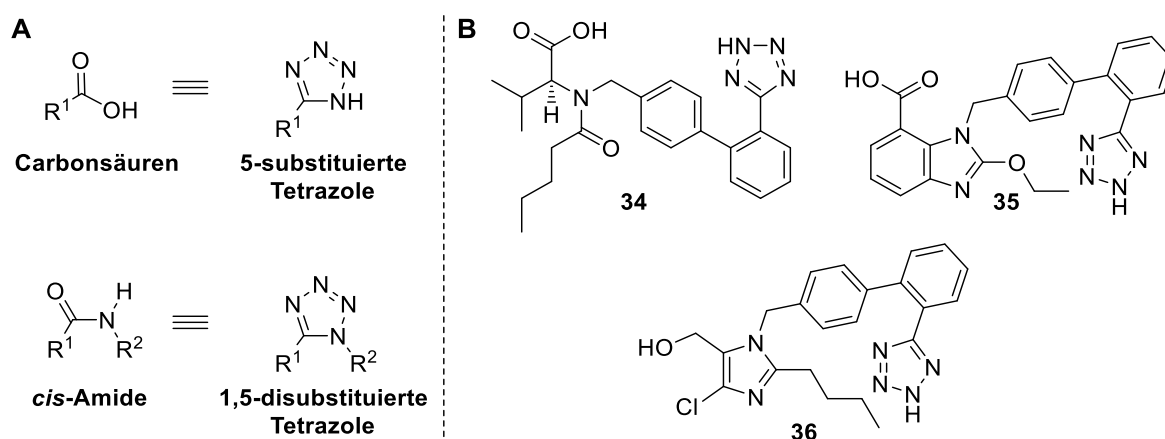
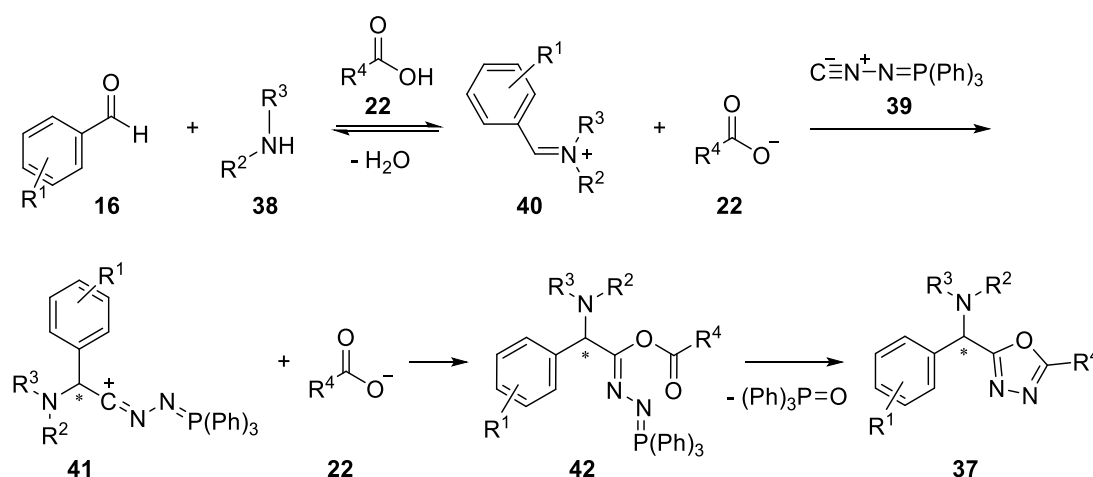


Abbildung 13: Tetrazole als bioisosterer Ersatz für Carbonsäuren bzw. *cis*-Amide (A) und als Bestandteile in Medikamenten (B).

Eine schnelle und effiziente Darstellung von 2,5-disubstituierten 1,3,4-Oxadiazolen **37** stellt die U-4CR/aza-Wittig-Reaktionssequenz dar.^[125] Das Interesse an Oxadiazol-Derivaten stieg in den letzten Jahrzehnten stark an. Oxadiazolringe werden in der Arzneimittelentwicklung häufig als bioisosterer Ersatz für Ester und Amide verwendet und weisen zudem eine hohe hydrolytische und metabolische Stabilität auf.^[125] Insgesamt gibt es, basierend auf der Position des Stickstoffs und Sauerstoffs im Ringsystem, vier beschriebene Oxadiazol-Isomere (1,2,3-, 1,2,4-, 1,2,5-, und 1,3,4-Oxadiazol). Von diesen Isomeren sind 1,2,4- sowie 1,3,4-Oxadiazole am besten erforscht und besonders besitzen davon die 1,3,4-Oxadiazol-Derivate ein breites Spektrum an biologischen Aktivitäten. Ihnen werden unter anderem anti-mikrobielle, anti-proliferative, anti-tuberkuläre sowie entzündungshemmende Eigenschaften zugeschrieben.^[126] Bei der U-4CR/aza-Wittig-Reaktion handelt es sich um eine Reaktion zwischen einem aromatischen Aldehyd **16**, einer Carbonsäure **22**, einem sekundären Amin **38** und der Isocyanidkomponente (*N*-Isocyanimino)triphenylphosphoran **39** (Schema 10).

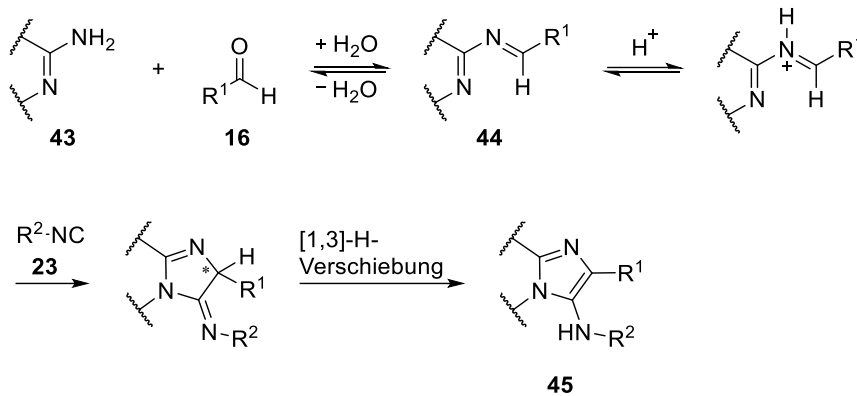


Schema 10: Reaktionsverlauf der U-4CR/aza-Wittig-Sequenz.^[125]

Das aus dem Amin und dem Aldehyd gebildete Iminiumion **40** wird nukleophil von (*N*-Isocyanimino)triphenylphosphoran **39** angegriffen (Schema 10). Das dadurch entstandene Intermediat **41** wird daraufhin durch die deprotonierte Säure **22** angegriffen, um zum Addukt **42** umgelagert zu werden. Eine intramolekulare aza-Wittig-Reaktion der Phosphoraneinheit mit der Carbonylgruppe der Esterfunktionalität führt zur Bildung des 2,5-disubstituierten 1,3,4-Oxadiazols **37** durch Abspaltung von Triphenylphosphanoxid.^[125]

Eine relativ neue, der Ugi-MCR sehr ähnlichen Reaktion stellt die Groebke-Blackburn-Bienaymé-Dreikomponentenreaktion (GBB-3CR) zur Synthese von Imidazo[1,2- α]-Heterozyklen dar. Es handelt sich hierbei um eine Säure-katalysierte Reaktion zwischen einem Aldehyd **16**, einem Isocyanid **23** und einem heterozyklischen Amidin **43**

(Schema 11), welche unabhängig voneinander von Mitarbeitern der drei Pharmafirmen *Hoffmann La Roche* (Groebke), *Millenium Pharmaceutical* (Blackburn) und *Rhone Poulenc* (Bienaymé) im Jahre 1998 entwickelt wurde.^[127–129] Nach Bildung des Imins **44** wird dieses durch eine Lewis- oder Brønsted-Säure aktiviert, gefolgt von einer [4+1]-Cycloaddition mit dem Isocyanid **23** und anschließender [1,3]-H-Verschiebung zur Bildung der aromatischen Zielstruktur **45** (Schema 11).



Schema 11: Reaktionsverlauf der Groebke-Blackburn-Bienaymé-3CR.^[127–129]

Imidazo[1,2-*a*]-Heterozyklen, insbesondere Imidazo[1,2-*a*]pyridine, sind in vielen kommerziell erhältlichen Arzneimitteln als Kernstrukturen (*scaffolds*), wie beispielsweise in Alpidem **46** als Anxiolytikum, im Schlafmittel Zolpidem **47** oder in Olpridon **48** zur Behandlung von Herzkrankheiten, enthalten (Abb. 14).^[130–132]

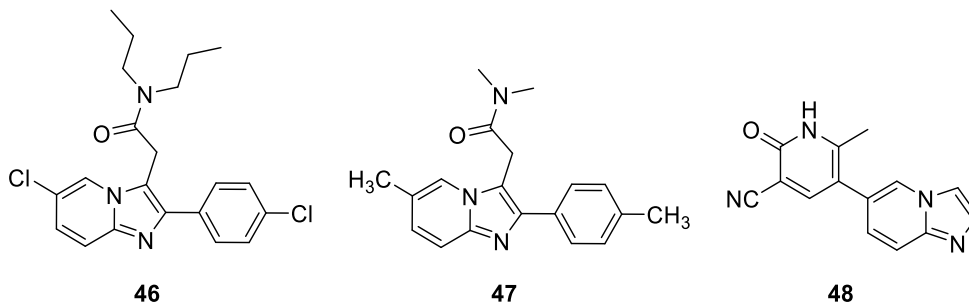
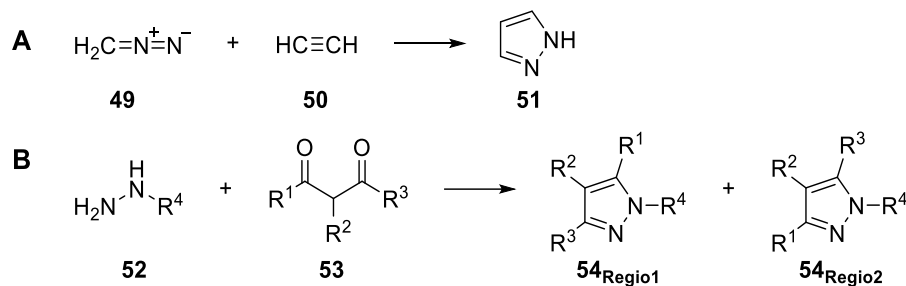


Abbildung 14: Imidazo[1,2-*a*]pyridin als Kernstruktur in kommerziell erhältlichen Arzneimitteln.

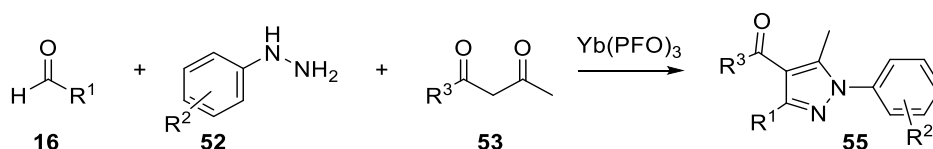
Pyrazole finden als fünfgliedrige, aromatische Heterozyklen in pharmazeutischen, chemischen und in agrochemischen Bereichen der Industrie eine große Anwendung.^[133] Ihnen und ihren Derivaten wird ein breites Spektrum an biologischen Aktivitäten zugeschrieben. Sie können beispielsweise entzündungs- sowie krebshemmend als auch antimykotisch und entkrampfend wirken.^[134–137] Die Synthese des Pyrazol-Grundgerüsts kann über verschiedene Methoden erfolgen. Neben der 1,3-dipolaren Cycloaddition von Diazoverbindungen **49** mit Alkinen **50** (Schema 12A), auch als Pechmann-Pyrazol-Synthese bekannt, stellt die Knorr-Pyrazol-Synthese ein häufig verwendetes Verfahren zur Herstellung von Pyrazolen dar (Schema 12B).^[138,139] Bei der Knorr-Pyrazol-Synthese

handelt es sich um eine Kondensationsreaktion zwischen Hydrazinen **52** und 1,3-Dicarbonylverbindungen **53**.^[139] Werden substituierte Hydrazinverbindungen verwendet, kommt es zur Entstehung von strukturellen Isomeren **54_{Regio1}** und **54_{Regio2}** mit geringer Selektivität.



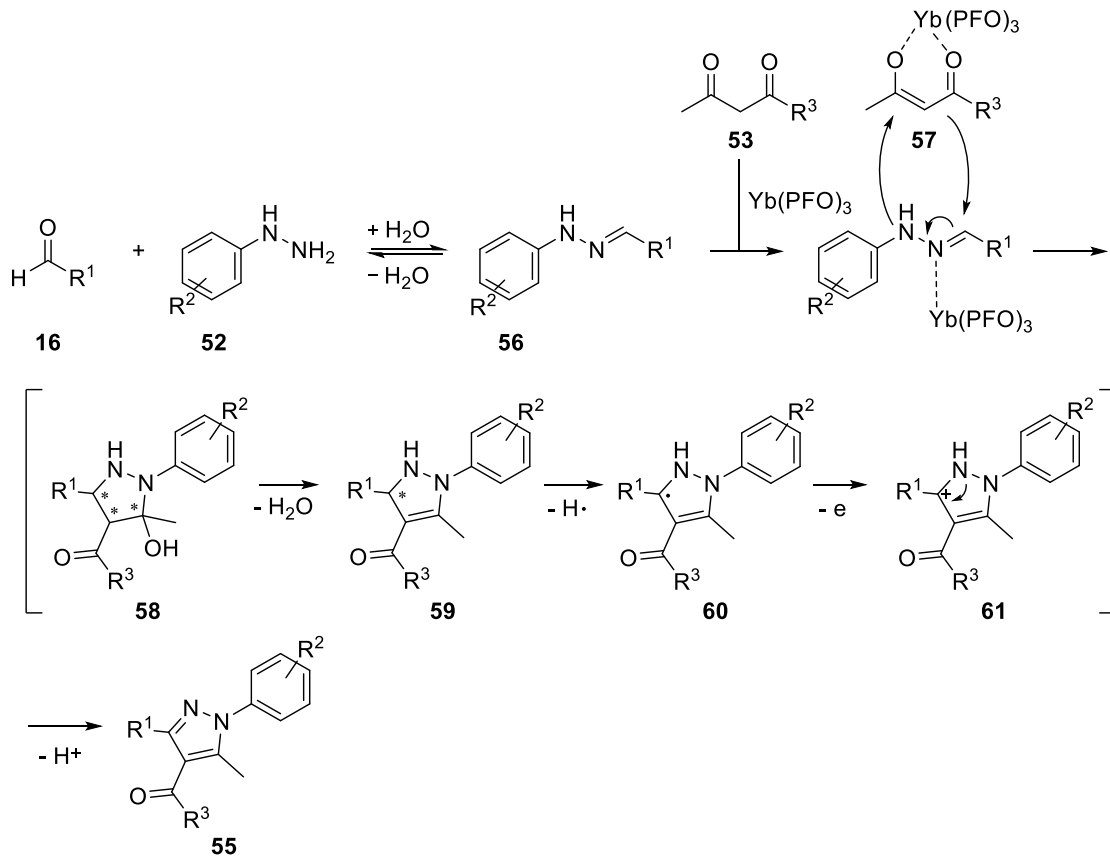
Schema 12: Darstellung von Pyrazolen über die Pechmann-Pyrazol-Synthese (A) und über die Knorr-Pyrazol-Synthese (B).

Die Entwicklung neuer Synthesemethoden zur Darstellung von hochgradig substituierten Pyrazol-Derivaten ist Gegenstand aktueller Forschung. Ein kürzlich beschriebenes Verfahren zur Synthese von vollständig substituierten Pyrazolverbindungen nutzt die Vorteile von Multikomponentenreaktionen unter Verwendung eines Yb(III)-Katalysators aus.^[140] Es handelt sich hierbei um eine nicht auf Isocyaniden basierende, Yb(PFO)₃-katalysierte Dreikomponentenreaktion zwischen einem Aldehyd **16**, einem Phenylhydrazin **52** und einer 1,3-Dicarbonylverbindung **53** unter Ausschluss von Lösungsmitteln (Schema 13).



Schema 13: Yb(PFO)₃-katalysierte Dreikomponentenreaktion zur Darstellung von vollständig substituierten Pyrazolen.

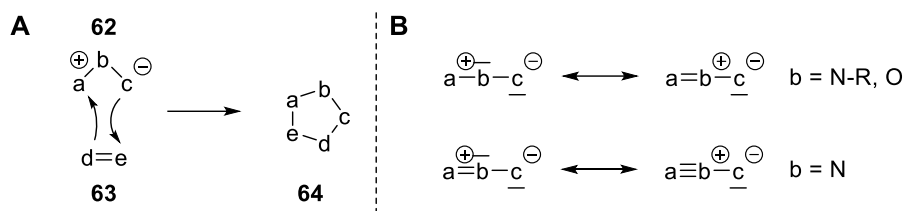
Die Carbonylverbindung **16** reagiert in einer Kondensationsreaktion mit dem Hydrazin **52** zu einem Hydrazon **56**, welches im nachfolgenden Schritt mit dem Enol-Tautomer **57** der 1,3-Dicarbonylverbindung **53** zu dem Intermediat **58** zyklisiert (Schema 14). Es wird vermutet, dass in Folge einer weiteren Dehydrierung ein Pyrazolin-Intermediat **59** generiert wird, welches anschließend durch Oxidationsreaktionen über die Intermediate **60** und **61** zu der Zielstruktur **55** aromatisiert. Außerdem wird angenommen, dass der Yb(PFO)₃-Katalysator das Hydrazon **56** aktiviert und stabilisierend auf das Enol-Tautomer **57** wirkt.



Schema 14: Möglicher Reaktionsmechanismus der $\text{Yb}(\text{PFO})_3$ -katalysierten Dreikomponentenreaktion zur Darstellung von vollständig substituierten Pyrazolen.^[140]

1.4 1,3-dipolare Cycloaddition

Obwohl es bereits seit Jahrzehnten bekannt ist, wurde das Konzept der 1,3-dipolaren Cycloaddition erst im Jahre 1963 durch Rolf Huisgen mechanistisch systematisiert. Seitdem nimmt die 1,3-dipolare Cycloaddition als Syntheseprinzip zum Aufbau von fünfgliedrigen Heterozyklen einen hohen Stellenwert im Repertoire der organisch präparativen Chemie ein und bietet einen effektiven Zugang zur Darstellung von Naturstoffen und bioaktiven Substanzen.^[141] Es handelt sich bei der 1,3-dipolaren Cycloaddition um eine konzertierte, pericyclische Reaktion, bei welcher ein 1,3-Dipol **62** mit einer Mehrfachbindung eines Dipolarophils **63** zu einem fünfgliedrigen Ring **64** reagiert (Schema 15A). Ein 1,3-Dipol kann als zwitterionische Verbindung des Typs a-b-c beschrieben werden, bei welcher das Atom a ein Elektronensextett und damit eine positive Formalladung besitzt, während das Atom c über ein freies Elektronenpaar verfügt und somit eine negative Formalladung aufweist. Der am Atom a vorhandene Elektronenmangel kann durch Mesomerie bei Vorhandensein freier Elektronenpaare am mittleren Atom b stabilisiert werden (Schema 15B). Diese Art von Stabilisierung wird auch als Oktettstabilisierung bezeichnet.^[141]



Schema 15: A. Schematische Darstellung der 1,3-dipolaren Cycloaddition nach Rolf Huisgen. B. Schema der internen Oktettstabilisierung.

Aufgrund ihrer Struktur wird bei 1,3-Dipolen zwischen zwei verschiedenen Typen, dem Allyl-Typ und dem Propargyl-/Allenyl-Typ, unterschieden.^[142] Zu den 1,3-Dipolen des ersten Typs, welche entsprechend des Allyl-Anions gewinkelt sind, zählen unter anderem Azomethin-Ylide, Nitrone, Carbonylimine oder Ozon. Hingegen umfasst der lineare Propargyl-/Allenyl-Typ, bei welchem das mittlere Atom ein Stickstoff sein muss, beispielsweise Nitrilylide, Nitrilimine oder Azide.

Azomethin-Ylide werden häufig als 1,3-Dipole in Cycloadditionsreaktionen zur Darstellung von fünfgliedrigen Stickstoffheterozyklen, insbesondere von substituierten Pyrrolidinen, verwendet.^[143,144] Das Pyrrolidin-Grundgerüst ist in zahlreichen Naturstoffen, bioaktiven Substanzen und in Arzneistoffen sowie Arzneistoffkandidaten vertreten.^[145,146] Ein Beispiel für ein Molekül, welches einen Pyrrolidin-Kern aufweist und ausgehend von einem initialen Hit **65** aus einem HTS-Screen zu einem klinischen Kandidaten zur Behandlung von an zystischer Fibrose leidenden Patienten entwickelt wurde, stellt ABBV/GLPG-3221 **66** dar (Abb. 15).^[147] Einige potente MDM2-Inhibitoren (**67**, **68** und **69**) basieren auf einem Spirooxindol-Grundgerüst, welches schnell und effizient über die 1,3-dipolare Azomethin-Ylid-Cycloaddition generiert werden kann (Abb. 15B).^[148,87,149,150] Azomethin-Ylide werden *in situ* hergestellt. In vielen Fällen erfolgt dies über die N-Metallierung von α -Iminoester-Verbindungen, indem das Metall an den Stickstoff koordiniert und so die Deprotonierung der C α -Position durch eine Base erleichtert wird.^[151]

Einleitung

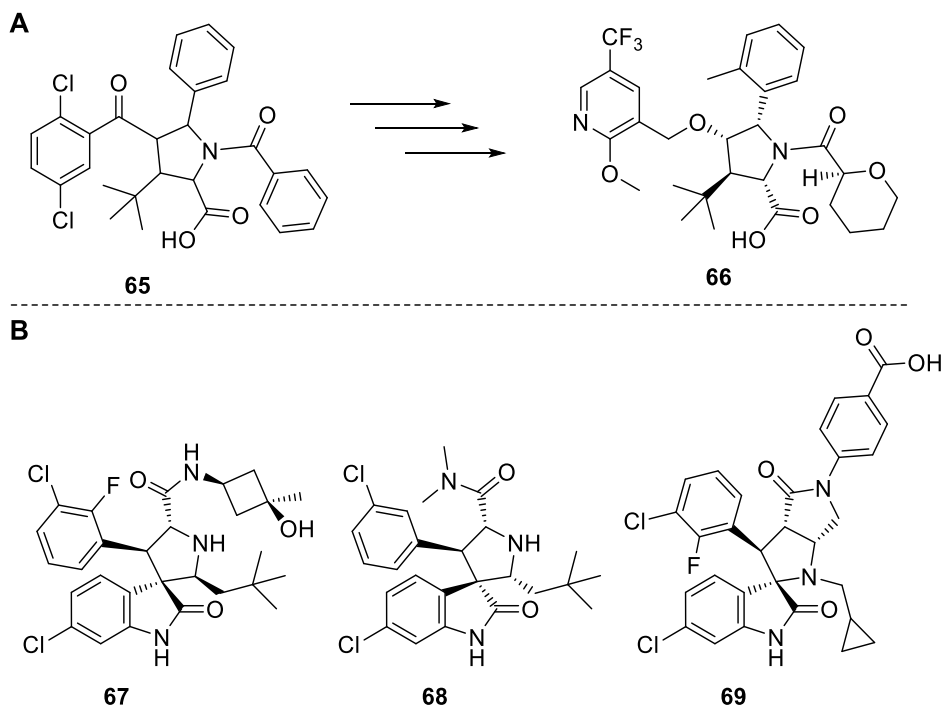
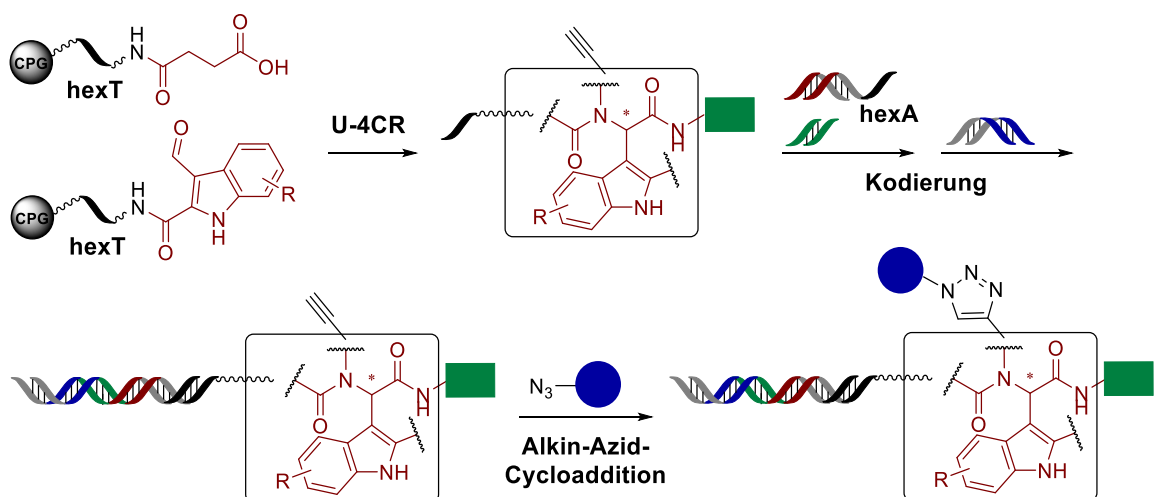


Abbildung 15: Strukturen von bioaktiven Molekülen, welche über die 1,3-dipolare Azomethin-Ylid-Cycloaddition dargestellt werden können. A. Entwicklung des klinischen Kandidaten ABBV/GLPG-3221 **66** ausgehend von einem Hit **65** aus einem HTS-Screen. B. Repräsentative Beispiele für MDM2-Inhibitoren (**67**, **68**, **69**).

2 Zielsetzung

Die Suche nach Molekülstrukturen als neue Kandidaten für die Entwicklung von Arzneimitteln wird häufig mit der Suche nach der Nadel im Heuhaufen verglichen. Die Technologie der DNA-kodierten Substanzbibliotheken kann den Prozess der Identifizierung von Startstrukturen für die Arzneistoffentwicklung beschleunigen und hat sich in den vergangenen Jahren als vielversprechende Alternative zum Hochdurchsatz-Screening diskreter Substanzbibliotheken etabliert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte in einem semirationalen Ansatz eine DNA-kodierte Substanzbibliothek synthetisiert und anschließend gegen die Proteine MDM2 und TEAD4, welche in tumorrelevanten Protein-Protein-Interaktionen involviert sind, selektioniert werden. Ziel war es, die DNA-kodierte Substanzbibliothek mittels der im Arbeitskreis Brunschweiler entwickelten TiDEC-Technologie ausgehend von einem auf CPG als Festphase gebundenen, chemisch sehr stabilen Hexathymidin-Adapteroligonukleotid zu synthetisieren (Schema 16).^[47]



Schema 16: Schematische Darstellung der tiDEL-Synthese.

In einem ersten Syntheseschritt sollten, um die in vielen Protein-Protein-Wechselwirkungen eine wichtige Rolle spielende Aminosäureseitenkette von Tryptophan nachzuahmen, mit Hilfe der Ugi-Vierkomponentenreaktion CPG-gekoppelte hexT-peptidomimetische Moleküle um die heterozyklische Indolstruktur aufgebaut werden. Hierfür wurde in einer vorangegangenen Masterarbeit durch Denise dos Santos Smith die Ugi-Vierkomponentenreaktion unter Verwendung von Indol-Bausteinen auf CPG-gebundenen hexT-Konjugaten optimiert und bereits erste hexT-peptidomimetische Strukturen für die tiDEL-Synthese generiert.^[152] Nach der vollständigen Kodierung der hexT-Ugi-Produkte sollte im zweiten Syntheseschritt unter Ausnutzung einer freien Alkynyl-Funktion eine Kupfer-vermittelte Alkin-Azid-Cycloaddition (CuAAC) zur

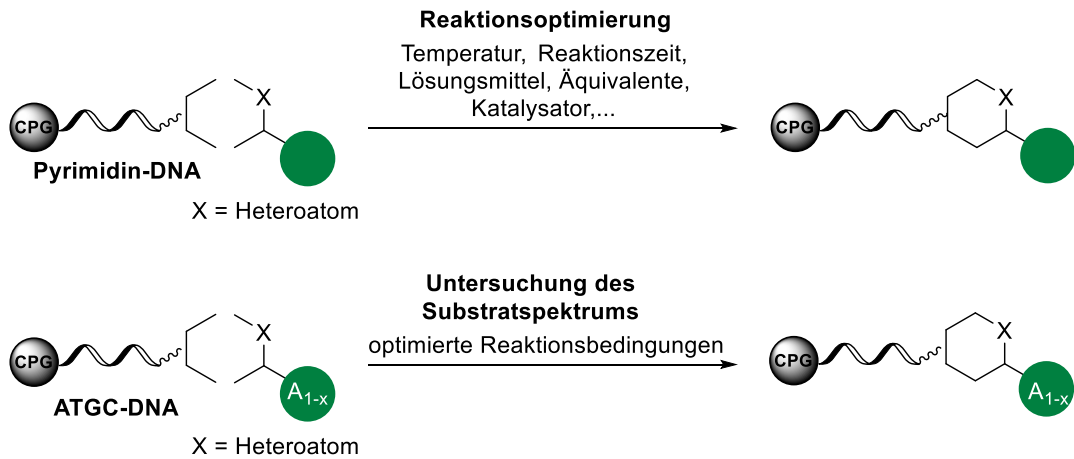
Finalisierung der DNA-kodierten Substanzbibliothek durchgeführt werden. Die tiDEL sollte im Anschluss gegen die Proteine MDM2 und TEAD4 selektioniert werden und angereicherte Molekülstrukturen sollten anschließend ohne DNA-Barcode für die darauffolgende Validierung mittels biochemischer und/oder biophysikalischer Experimente resynthetisiert werden.

Im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit sollte die Ugi-Vierkomponentenreaktion hinsichtlich milderer Reaktionsbedingungen und der Möglichkeit der Übertragung der Reaktion auf ein anderes DNA-Kodierungsformat unter Verwendung der vier natürlichen Nukleobasen (A, T, C und G) analysiert werden.

Ein Großteil der bis heute synthetisierten DNA-kodierten Substanzbibliotheken besteht aufgrund der eingeschränkten Auswahl an DNA-kompatiblen Reaktionen aus sehr strukturähnlichen Molekülen, welche einen relativ kleinen Teil des chemischen Strukturraums abdecken. Um den Zugang zu einer größeren Vielfalt an chemisch diversen Molekülen zu ermöglichen, beschäftigt sich die aktuelle Forschung im Bereich der DEL-Technologie mit der Entwicklung weiterer DNA-kompatibler Reaktionen. Besonderes Augenmerk liegt dabei auf der Übertragung von chemischen Reaktionen zum Aufbau von genetisch markierten Heterozyklen.

Im weiteren Fortgang der vorliegenden Arbeit sollten diverse chemische Reaktionen zur Generierung von DNA-gebundenen heterozyklischen Strukturen basierend auf der Strategie der CPG-Festphasenchemie etabliert werden. Hierfür sollten die Reaktionen zunächst auf einer aus Pyrimidinbasen-bestehenden DNA-Sequenz optimiert werden (Schema 17). Im Anschluss daran sollte die Möglichkeit überprüft werden, die optimierten Reaktionsbedingungen auf eine kodierende DNA-Sequenz, bestehend aus allen vier Nukleobasen, zu übertragen. Bei Erfolg sollte abschließend das Substratspektrum der Reaktion auf der ATCG-DNA-Sequenz untersucht werden (Schema 17).

Zielsetzung



Schema 17: Etablierung diverser chemischer Reaktionen zur Generierung heterozyklischer Strukturen auf CPG-gebundenen DNA-Konjugaten.

Im Vergleich zur TiDEC-Technologie, bei der keine Kodierung der Startmaterialien möglich ist und somit zunächst diskrete Unterbibliotheken für die eigentliche DEL-Synthese generiert werden müssen, können unter Verwendung von kurzen ATCG-DNA-Sequenzen Startmaterialien kodiert und als Gemische eingesetzt werden. Dies setzt allerdings eine Anpassung der Kodierungsstrategie voraus, welche im weiteren Verlauf der Arbeit basierend auf einem DNA-Haarnadel-Oligonukleotid etabliert werden sollte. Damit diese Kodierungsstrategie nicht nur mit Reaktionen kompatibel ist, welche unter milderen Reaktionsbedingungen ablaufen, sollte im weiteren Fortgang dieser Arbeit untersucht werden, ob die vulnerable Purinnukleobase Adenin durch die chemisch modifizierten Basen 7-Deazaadenin (7De-dA) bzw. 8-Aza-7-Deazaadenin (8a7De-dA) ausgetauscht werden kann, wodurch ein chemisch stabiler Drei-Buchstabencode entwickelt wird (Abb. 16). Neben der Untersuchung der Stabilität solcher aus 7De-dA- bzw. 8a7De-dA-bestehenden ATC-Oligonukleotidsequenzen im Vergleich zu der hexT-Sequenz sowie TC-, ATC- als auch ATCG-DNA-Sequenzen sollte sichergestellt werden, dass die chemisch modifizierte DNA von Enzymen in Ligations- als auch in Amplifikationsreaktionen korrekt gelesen wird und damit sequenzierbar bleibt. Abschließend sollte untersucht werden, ob die chemisch modifizierte DNA mit den zuvor etablierten chemischen Reaktionen kompatibel ist.

Zielsetzung

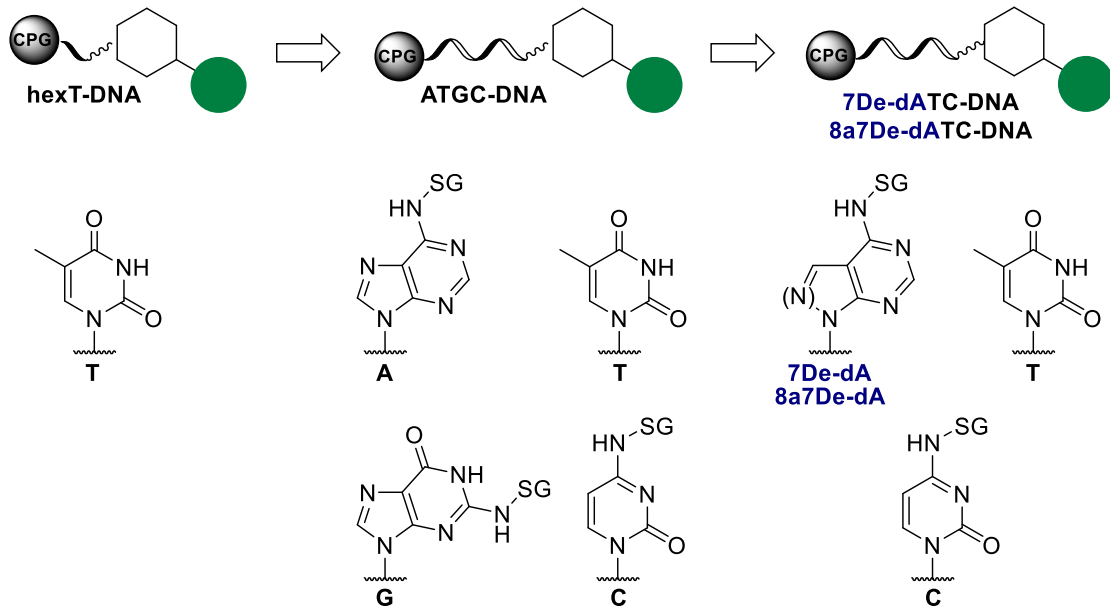


Abbildung 16: Untersuchung der Möglichkeit, die Synthese einer DNA-kodierten Substanzbibliothek mit CPG-gebundenen 7De-dATC- bzw. 8a7De-dATC-DNA-Sequenzen zu initiieren. SG: Schutzgruppe (Dimethylformamidin oder Benzoyl).

3 Synthese und Selektion einer tiDEL mit anschließender Hit-Resynthese und -Validierung

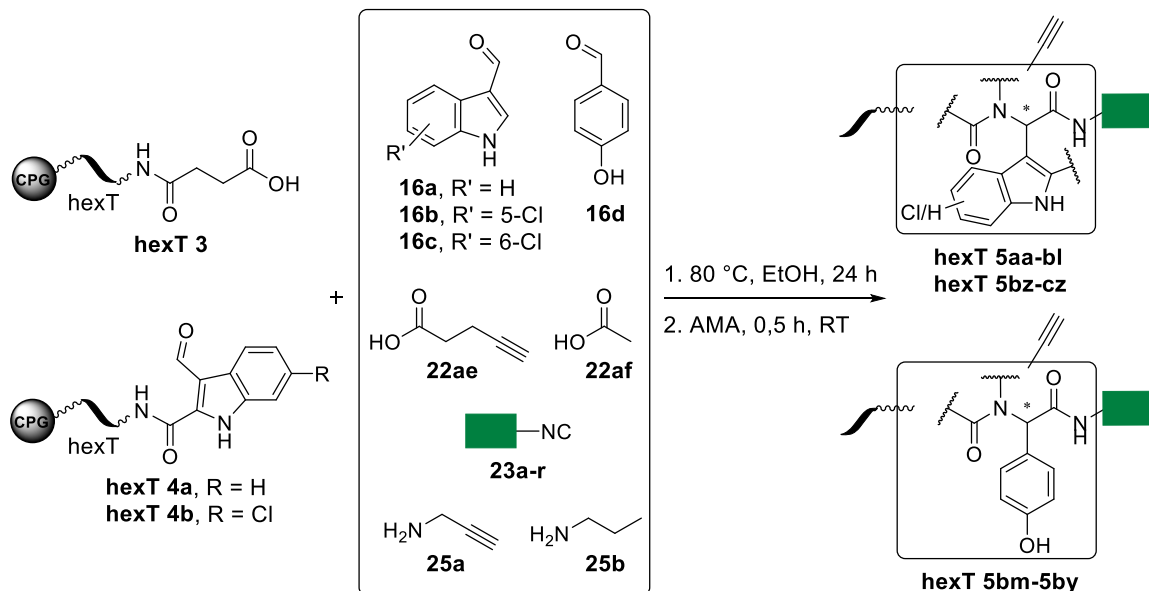
Um Protein-Protein-Interaktionen zu adressieren, sollte eine DNA-kodierte Molekülbibliothek basierend auf der Ugi-Vierkomponentenreaktion unter Verwendung des im Arbeitskreis Brunschweiler etablierten TiDEC-Kodierungsformates konzipiert werden.^[47,153] Der erste Syntheseschritt der kodierten Substanzbibliothek, in diesem Fall die Ugi-Vierkomponentenreaktion, sollte auf dem chemisch sehr stabilen, CPG-gebundenen Hexathymidin-Adapteroligonukleotid „hexT“ stattfinden, welches harsche Reaktionsbedingungen toleriert. Die Ugi-Vierkomponentenreaktion besitzt als Multikomponentenreaktion im Rahmen der Synthese einer kodierten Substanzbibliothek den Vorteil, dass verschiedene Reaktanden an die DNA gekoppelt werden können und somit die resultierenden Ugi-Produkte unterschiedlich mit dem DNA-Strang verknüpft vorliegen. Dies ist von Bedeutung, da die Orientierung des organischen Moleküls und die Position des DNA-Strangs einen erheblichen Einfluss auf die Interaktion mit der biologischen Zielstruktur haben kann. Außerdem können sowohl verschiedene Diversitätselemente als auch Moleküle mit funktionellen Gruppen für die darauffolgende Post-Ugi-Derivatisierung der Substanzbibliothek eingeführt werden. Weiterhin erlaubt die U-4CR als Multikomponentenreaktion die schnelle und effiziente als auch parallele Synthese von komplexen Molekülstrukturen ausgehend von einfachen Startmaterialien. Zur Adressierung von Protein-Protein-Interaktionen sollten im Rahmen der Ugi-Vierkomponentenreaktion, welche bereits zur Darstellung von Peptidomimetika führt, Indol-basierte Molekülstrukturen eingeführt werden. Der Indol-Heterozyklus ist als zentrales Strukturelement der Aminosäure Tryptophan in zahlreichen Protein-Protein-Wechselwirkungen beteiligt und sollte demnach zur Nachahmung dieser verwendet werden. Die Derivatisierung und damit die Fertigstellung der DNA-kodierten Substanzbibliothek sollte über die DNA-kompatible Kupfer (I)-vermittelte Alkin-Azid-Cycloaddition erfolgen.

3.1 Synthese der tiDEL

3.1.1 Synthese der hexT-Ugi-Konjugate

Zur Synthese der DNA-kodierten Molekülbibliothek wurden drei verschiedene CPG-gebundene hexT-Konjugate als Startmaterialien synthetisiert: hexT-Carbonsäure-Konjugat **hexT 3** und zwei verschiedene hexT-Aldehyd-Konjugate (**hexT 4a** und **hexT 4b**)

(Schema 18).^[153] Es wurde hierfür zunächst die DMT-entschützte, CPG-gebundene 5'-Aminolinker-modifizierte hexT-DNA **hexT 1** über Amidkupplung mit einem Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-geschützten, Polyethylenglykol (PEG)-basierten Linker (Fmoc-NH-PEG(4)-COOH **22aa**) versehen, daraufhin Fmoc-entschützt (**hexT 2**) und über eine zweite Amidkupplungsreaktion mit Mono-*tert*-butyl-succinat **22ab**, 3-Formyl-1*H*-indol-2-carbonsäure **22ac** sowie 6-Chloro-3-formyl-1*H*-indol-2-carbonsäure **22ad** zu den zuvor genannten Startmaterialien **hexT 3** und **hexT 4a/b** umgesetzt (Schema 18). Für die U-4CR wurden die bereits etablierten Reaktionsbedingungen aus einer vorausgegangenen Masterarbeit von Denise Dos Santos Smith verwendet.^[152] Hiernach wurden die CPG-gebundenen Startmaterialien **hexT 3-4a/b** mit jeweils 1000 Äquivalenten an Reaktionspartnern bei 80 °C für 24 h in Ethanol zu den entsprechenden hexT-Ugi-Produkten **hexT 5aa-cz** umgesetzt. Um die CuAAC als Post-Ugi-Reaktion zu ermöglichen, wurde über die Reaktanden der U-4CR eine Alkin-Funktionalität eingeführt (Schema 18). Propargylamin **25a** wurde für **hexT 3-4a/b** verwendet und für **hexT 4a** kam zusätzlich 4-Pentinsäure **22ae** zur Anwendung. Weiterhin wurden zur Nachahmung von Tryptophan oder Tyrosin drei verschiedene Indolcarbaldehyde **16a-16c** und ein *para*-Hydroxybenzaldehyd **16d** eingesetzt (Schema 18). Als Diversitätselement dienten insgesamt 18 strukturell diverse Isocyanide **23a-r**, die von der Arbeitsgruppe Dömling (Universität Groningen) zur Verfügung gestellt wurden (Schema 18).

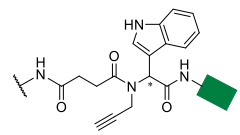
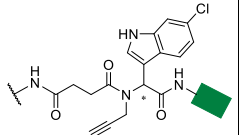
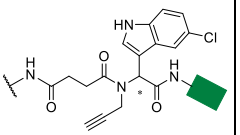
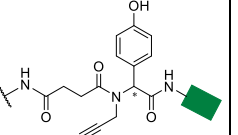
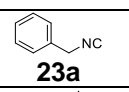

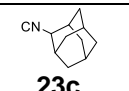
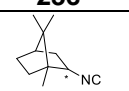
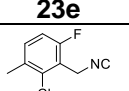
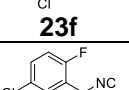
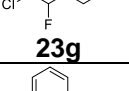
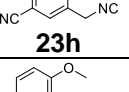
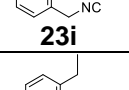
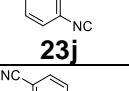
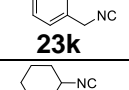
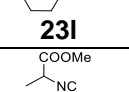
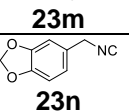


Schema 18: Überblick zur U-4CR auf CPG-gebundenen hexT-Konjugaten zur Synthese der Indol-fokussierten, peptidomimetischen DNA-kodierten Substanzbibliothek.^[153]

Insgesamt konnten 78 peptidomimetische hexT-Konjugate **hexT 5aa-cz** synthetisiert werden (Tabellen 1 und 2). Diese wurden im Anschluss an die U-4CR unter basischen

Bedingungen mittels AMA (1:1-Mischung aus wässriger Ammoniak-Lösung (30 %) und wässriger Methylamin-Lösung (40 %)) von der festen Phase abgespalten, über präparative RP-HPLC isoliert und mit Hilfe von MALDI-MS charakterisiert (Anhang). Ein Teil der hexT-Ugi-Produkte (**hexT 5aa-bl** und **hexT 5cf-cs**) wurde in der vorangegangenen Masterarbeit durch Denise Dos Santos Smith synthetisiert.^[152]

Tabelle 1: Überblick der auf dem CPG-gebundenen hexT-Carbonsäure-Konjugat **hexT 3** durchgeführten U-4CR unter Verwendung diverser Isocyanide als Diversitätselement. Grün: erfolgreiche U-4CR, rot: nicht erfolgreiche U-4CR, grau: nicht durchgeführte U-4CR.^[153]

				
 23a	hexT 5aa	hexT 5ao	hexT 5bc	hexT 5bm
 23b	hexT 5ab	hexT 5ap	hexT 5bd	hexT 5bn
 23c	hexT 5ac	hexT 5aq		hexT 5bo
 23d	hexT 5ad	hexT 5ar	hexT 5be	
 23e	hexT 5ae	hexT 5as	hexT 5bf	hexT 5bp
 23f	hexT 5af		hexT 5bg	
 23g	hexT 5ag		hexT 5bh	
 23h	hexT 5ah	hexT 5at	hexT 5bi	hexT 5bq
 23i	hexT 5ai	hexT 5au		hexT 5br
 23j	hexT 5aj	hexT 5av		hexT 5bs
 23k	hexT 5ak	hexT 5aw	hexT 5bj	hexT 5bt
 23l		hexT 5ax	hexT 5bk	hexT 5bu
 23m		hexT 5ay	hexT 5bl	
 23n	hexT 5al	hexT 5az		hexT 5bv

Synthese und Selektion einer tiDEL mit anschließender Hit-Resynthese und -Validierung

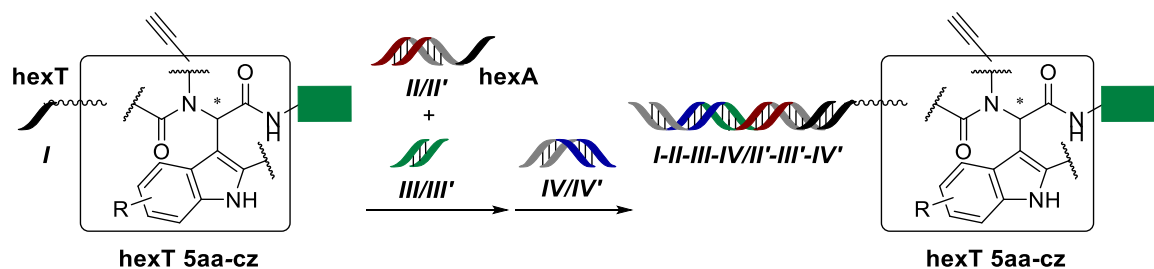
23o	hexT 5am	hexT 5ba		hexT 5bw
23p				
23q	hexT 5an	hexT 5bb		hexT 5bx
23r				hexT 5by

Tabelle 2: Überblick der auf den CPG-gebundenen hexT-Aldehyd-Konjugaten **hexT 4a** und **hexT 4b** durchgeführten U-4CR unter Verwendung diverser Isocyanide als Diversitätselement. Grün: erfolgreiche U-4CR, rot: nicht erfolgreiche U-4CR, grau: nicht durchgeführte U-4CR.^[153]

23a	hexT 5cf	hexT 5ct	
23b	hexT 5bz	hexT 5cg	hexT 5cu
23c	hexT 5ca	hexT 5ch	hexT 5cv
23d		hexT 5ci	
23e		hexT 5cj	hexT 5cw
23f		hexT 5ck	
23g			
23h		hexT 5cl	
23i		hexT 5cm	
23j	hexT 5cb	hexT 5cn	
23k	hexT 5cc	hexT 5co	

 23l	 23m	 23n	 23o
hexT 5cd		hexT 5cq	
hexT 5cp		hexT 5cr	hexT 5cy
			hexT 5cz
	hexT 5cs		

3.1.2 Kodierung der hexT-Ugi-Konjugate mittels enzymatischer Ligation



Schema 19: Kodierung der hexT-Ugi-Produkte **hexT 5aa-cz** (DNA-Sequenz **I**) mittels enzymatischer Ligation mit Peptidrückgrat (**III/III'**)-, Isocyanid (**III/III'**)- und Azid-kodierenden DNA-Sequenzen (**IV/IV'**). Beispielhaft wurde die Kodierung der Indol-basierten hexT-Ugi-Produkte gezeigt.^[153]

Die Kodierung der 78 hexT-Ugi-Produkte **hexT 5aa-cz** (DNA-Sequenz **I**) erfolgte durch enzymatische Ligation der *sticky ends* der komplementären DNA-Stränge unter Verwendung einer T4 DNA-Ligase.^[153] Die hexT-Konjugate **I** wurden zunächst mit DNA-Sequenzen **III/III'**, welche neben Peptidrückgrat-kodierenden Bereichen ebenso über eine Primer-Region und über ein Hexaadenosin (hexA)-Adapteroligonukleotid verfügen, als auch mit Isocyanid-kodierenden DNA-Sequenzen **III/III'** in einer Eintopfreaktion zu doppelsträngiger DNA **I-II-III-IV/II'-III'-IV'** ligiert (Schema 19). Der Erfolg der Ligation wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft (Abb. 17, Spuren 1 und 2). Anhand der Verschiebung der DNA-Bande zu einer höheren Anzahl an Basenpaaren (Abb. 17, Spur 1) im Vergleich zur Negativkontrolle (Abb. 17, Spur 2), kann geschlussfolgert werden, dass die hexT-Sequenzen **I** der Ugi-Produkte **hexT 5aa-cz** vollständig mit den

Peptidrückgrat-kodierenden (**III/II'**) sowie den Isocyanid-kodierenden DNA-Sequenzen (**III/III'**) ligiert wurden. Die DNA-kodierten Ugi-Produkte **I-II-III/II'-III'** wurden im Anschluss über ethanolische Fällung gereinigt (Abb. 17, Spur 3), daraufhin vereinigt („*pool'*“) und für den nachfolgenden Kodierungsschritt wieder aufgeteilt („*split'*“). Zuletzt wurden die Ligationsprodukte **I-II-III/II'-III'** mit den DNA-Sequenzen **IV/IV'**, welche einen Azid-kodierenden Bereich für die nachfolgende Derivatisierung mit Hilfe der CuAAC sowie eine Primer-Region für spätere Amplifikationsreaktionen mittels PCR besitzen, zu den vollständig kodierten DNA-Konjugaten **I-II-III-IV/II'-III'-IV'** ligiert (Schema 19). Mittels Agarose-Gelelektrophorese konnte beobachtet werden, dass das Ligationsprodukt **I-II-III/II'-III'** nahezu vollständig zum finalen Ligationsprodukt **I-II-III-IV/II'-III'-IV'** umgesetzt wurde, wobei gleichzeitig noch nicht-ligierte DNA-Sequenzen **IV/IV'** im Reaktionsansatz vorlagen (Abb. 17, Spur 4). Die Reinigung der kodierten DNA-Konjugate erfolgte erneut über ethanolische Fällung.

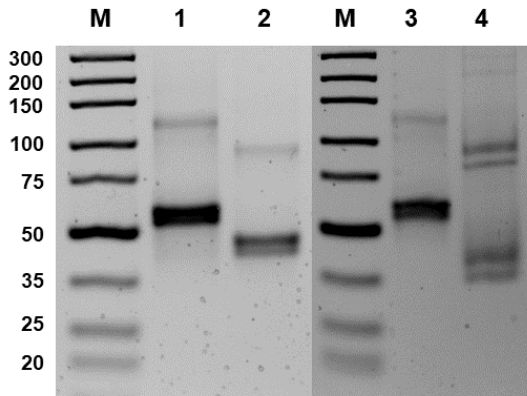
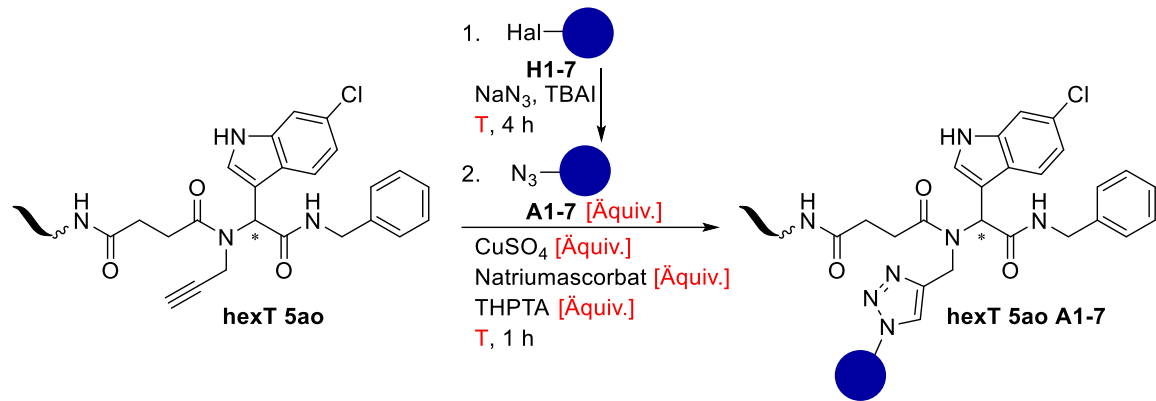


Abbildung 17: Visualisierung der Kodierung der hexT-Ugi-Konjugate über enzymatische Ligation mittels Agarose-Gelelektrophorese (5,5 %iges Agarose-Gel). M: Marker (*GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder*), 1: Ligation der hexT-Konjugate (DNA-Sequenz **I**) mit Peptidrückgrat (**III/II'**)- sowie Isocyanid (**III/III'**)-kodierenden DNA-Sequenzen in einer Eintopf-Ligation, 2: Negativkontrolle der Eintopf-Ligation ohne T4 DNA-Ligase, 3: Ethanolische Fällung des Ligationsproduktes **I-II-III/II'-III'**, 4: Ligation von **I-II-III/II'-III'** mit Azid-kodierenden DNA-Sequenzen (**IV/IV'**).^[153]

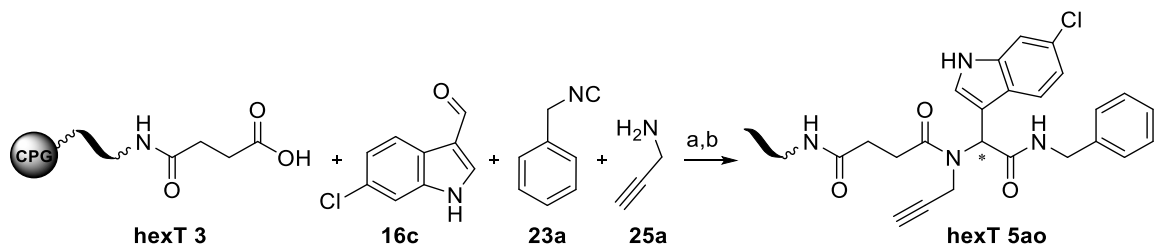
3.1.3 Derivatisierung der kodierten DNA-Konjugate über die Kupfer-vermittelte Alkin-Azid-Cycloaddition

Im Vorfeld des letzten Schrittes der tiDEL-Synthese, der Derivatisierung, wurden Experimente zur Untersuchung der CuAAC von DNA-Ugi-Konjugaten in Lösung unter Verwendung des Liganden Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amin (THPTA) durchgeführt (Schema 20).



Schema 20: Etablierung der CuAAC von DNA-Ugi-Konjugaten in Lösung.

Hierfür wurde zunächst analog zur tiDEL-Synthese (Kapitel 3.1.1) ein repräsentatives hexT-Ugi-Produkt **hexT 5ao** als Startmaterial hergestellt: Die CPG-gebundene, 5'-Aminolinker-modifizierte hexT-DNA wurde über Amidkupplung mit einem PEG(4)-Linker (**22aa**) modifiziert und über eine zweite Amidkupplungsreaktion mit Mono-*tert*-butylsuccinat **22ab** und anschließender *tert*-Butylester (*t*Bu)-Entschützung zum CPG-gebundenen hexT-Carbonsäure-Konjugat **hexT 3** umgesetzt. Durch die Ugi-Reaktion des Festphasen-gebundenen hexT-Carbonsäure-Konjugats **hexT 3** mit 6-Chloro-1*H*-indol-3-carbaldehyd **16c**, Benzylisocyanid **23a** sowie Propargylamin **25a** bei 80 °C in Ethanol für 24 h mit anschließender basischer Abspaltung von der festen Phase und darauffolgender Aufreinigung mittels präparativer RP-HPLC konnte das hexT-Ugi-Konjugat **hexT 5ao** erhalten werden (Schema 21).



Schema 21: U-4CR zur Darstellung des Startmaterials für die Etablierung der CuAAC von DNA-Ugi-Konjugaten in Lösung. a) 80 °C, EtOH, 24 h; b) AMA, 0,5 h, RT.

Synthese und Selektion einer tiDEL mit anschließender Hit-Resynthese und -Validierung

Die Azide wurden ausgehend von den entsprechenden Haliden mit NaN_3 *in situ* gebildet und ohne weitere Reinigung eingesetzt. In ersten Experimenten zur Alkin-Azid-Cycloaddition wurden verschiedene Äquivalentmengen an Azid sowie unterschiedliche Temperaturen getestet (Abb. 18). Es wurden 400 pmol hexT-Ugi-Konjugat **hexT 5ao** mit 30 Äquiv. bzw. 50 Äquiv. Benzylazid **A1**, 25 Äquiv. einer wässrigen THPTA/ CuSO_4 -Lösung und 40 Äquiv. Natriumascorbat bei Raumtemperatur bzw. bei 40 °C für 60 min in Wasser mit einem Gesamtvolumen von 50 μL geschüttelt. Die *in situ* Bildung von Benzylazid **A1** aus Benzylbromid **H1** erfolgte zuvor bei Raumtemperatur für 4 h. Alle getesteten Reaktionsbedingungen führten zu einem vollständigen Umsatz des Startmaterials zum gewünschten Zielprodukt (Abb. 18).

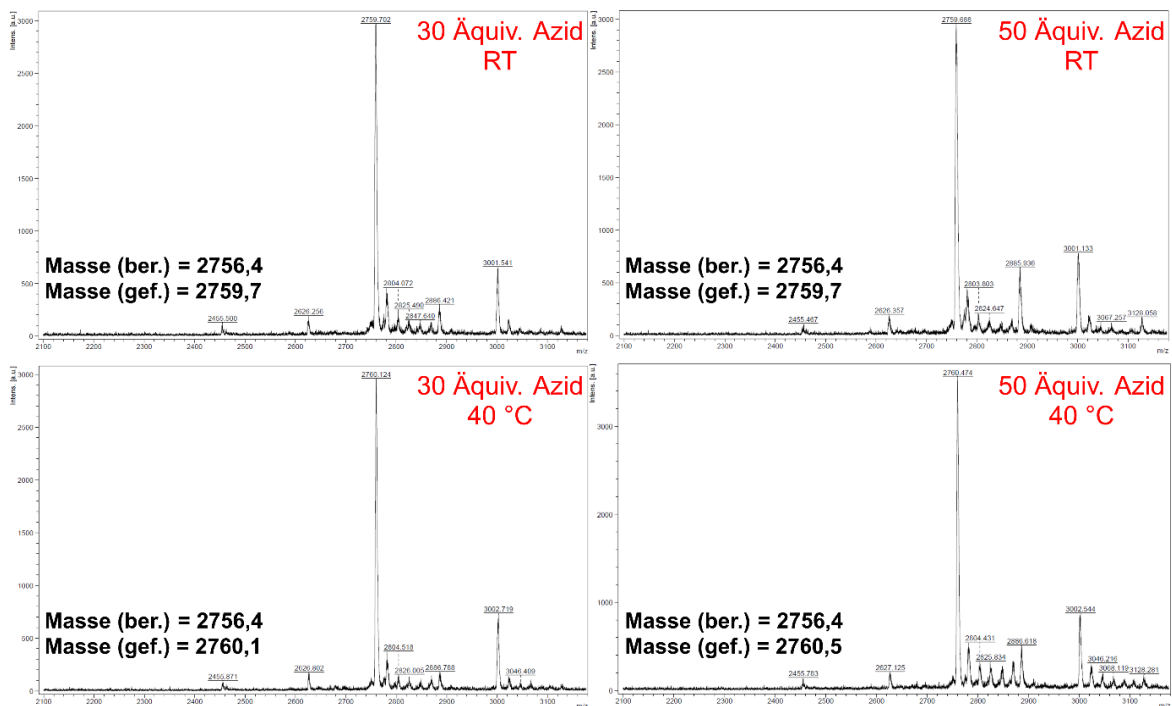
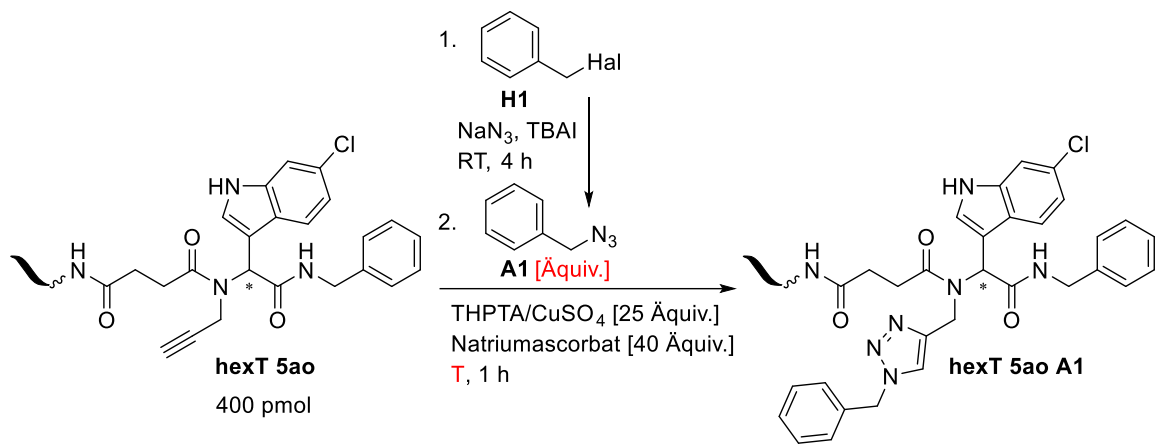
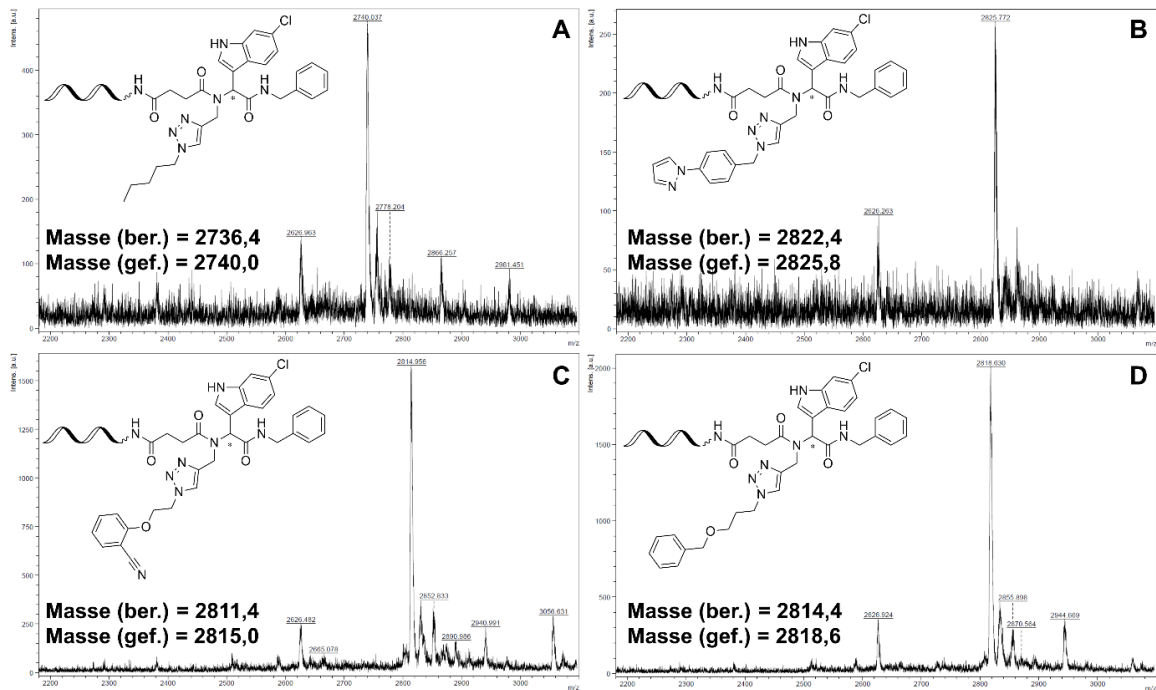
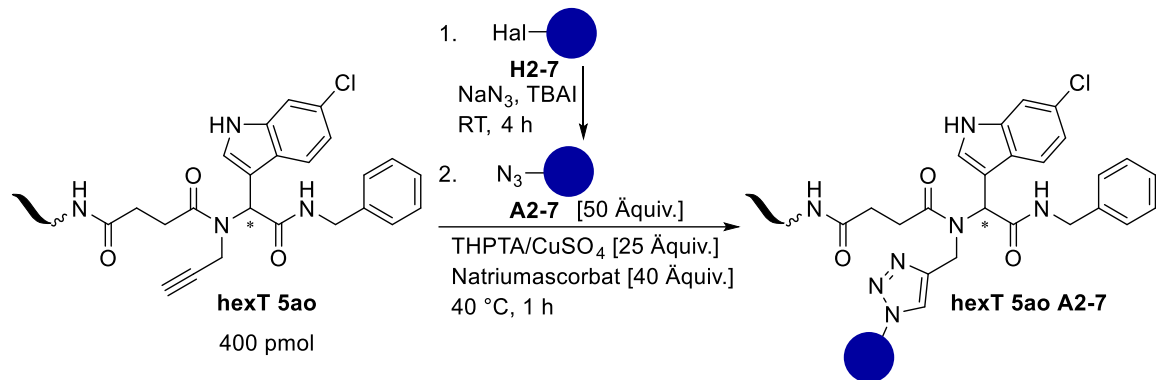


Abbildung 18: MALDI-MS-Analyse der CuAAC des hexT-Ugi-Konjugats **hexT 5ao** mit Benzylazid **A1**.

Synthese und Selektion einer tiDEL mit anschließender Hit-Resynthese und -Validierung

Darauffolgend wurden unter Verwendung forcierender Bedingungen mit 50 Äquiv. Azid und einer Reaktionstemperatur von 40 °C sechs unterschiedliche Azide (**A2-7**), welche auch in der eigentlichen DEL-Synthese verwendet werden sollten, getestet (Abb. 19). Erneut wurden die Azide mit NaN_3 bei Raumtemperatur für 4 h aus den entsprechenden Haliden generiert. Es konnte beobachtet werden, dass der Einsatz von vier der sechs getesteten Azide zu nahezu quantitativer Produktbildung führte (Abb. 19A-D). Lediglich für 5-(Azidomethyl)-3-propyl-1,2,4-oxadiazol **A6** konnte nur eine mäßige Produktbildung beobachtet werden (Abb. 19E) und die Verwendung von 2-Azidoacetonitril **A7** führte nur zu Spuren des gewünschten Produkts (Abb. 19F).



Synthese und Selektion einer tiDEL mit anschließender Hit-Resynthese und -Validierung

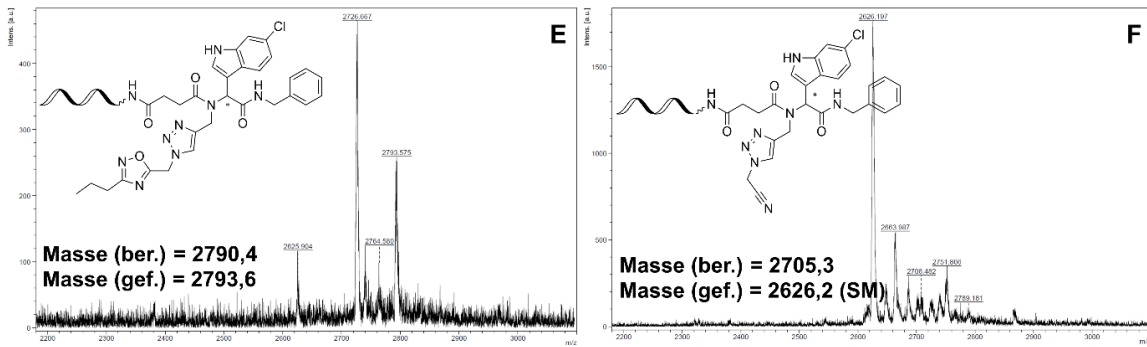


Abbildung 19: MALDI-MS-Analyse der CuAAC des hexT-Ugi-Konjugats **hexT 5ao** mit sechs unterschiedlichen Aziden **A2-7**.

Für die letzten beiden Beispiele wurde die CuAAC daher wiederholt, wobei die *in situ* Generierung der Azide dieses Mal bei 70 °C für 4 h durchgeführt wurde. Auf diese Weise ließ sich die Produktbildung für 5-(Azidomethyl)-3-propyl-1,2,4-oxadiazol **A6** deutlich erhöhen (Abb. 20A). Allerdings konnten erneut nur Spuren des Produkts mit 2-Azidoacetonitril **A7** detektiert werden (Abb. 20B). Im Nachfolgenden wurde die *in situ* Bildung der Azide bei 70 °C statt bei Raumtemperatur durchgeführt.

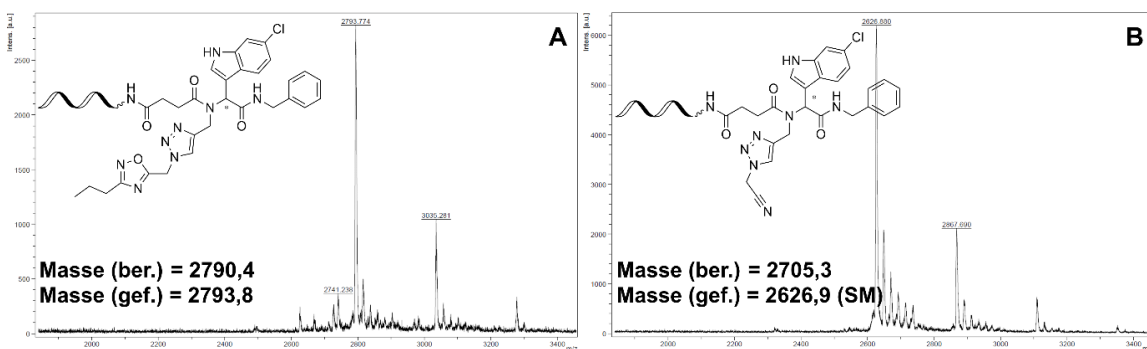
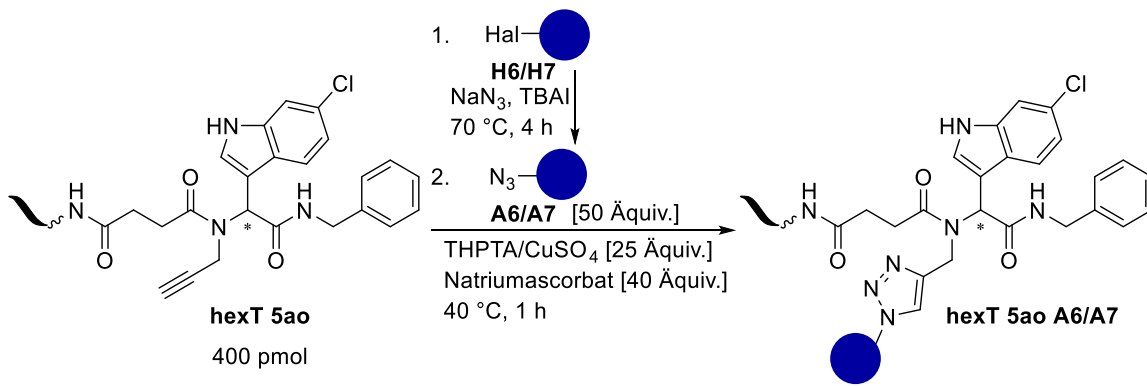
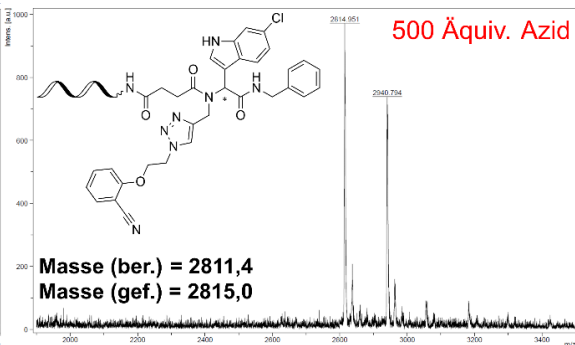
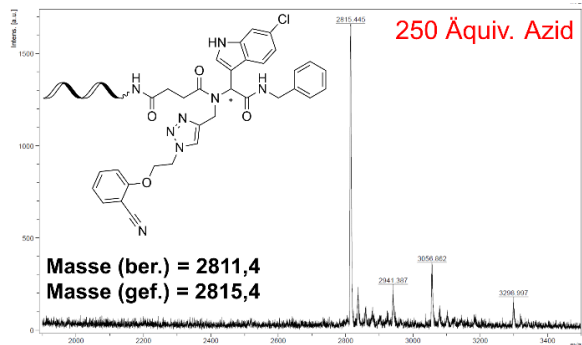
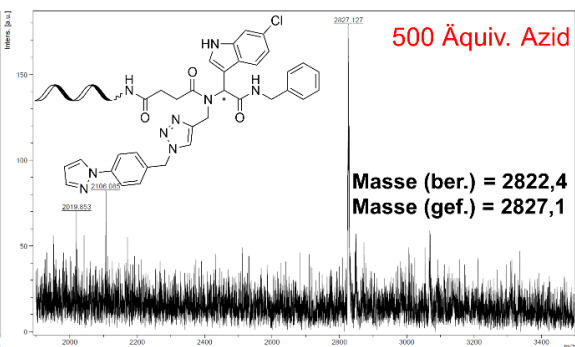
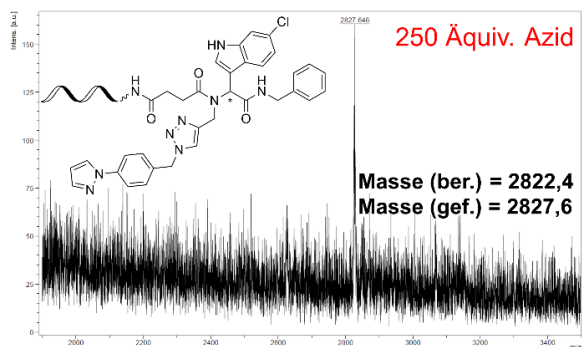
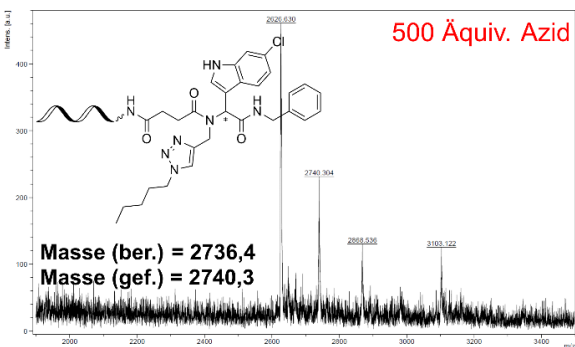
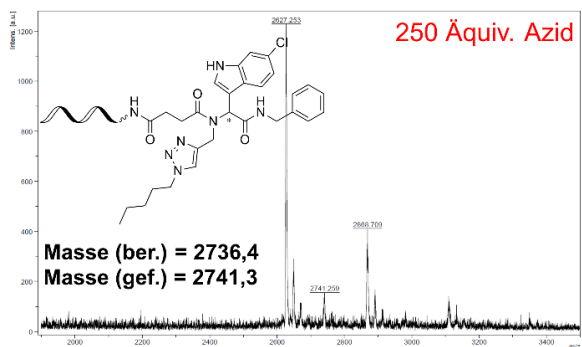
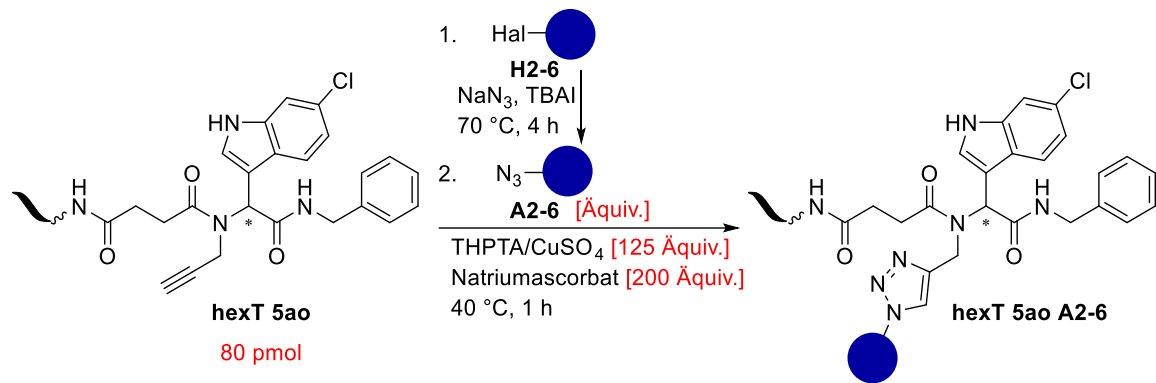


Abbildung 20: MALDI-MS-Analyse der CuAAC des hexT-Ugi-Konjugats **hexT 5ao** mit den Aziden **A6** und **A7**.

Im letzten Schritt der tiDEL-Synthese sollten allerdings statt 400 pmol lediglich 80 pmol der vollständig kodierten DNA-Konjugate eingesetzt werden. Aus diesem Grund wurden entsprechende Untersuchungen zur CuAAC mit 80 pmol hexT-Ugi-Konjugat **hexT 5ao** bei ansonsten gleichbleibenden Bedingungen durchgeführt. Diese führten zu keiner Produktbildung, weshalb im Nachfolgenden die Äquivalentmenge aller Reaktanden erhöht

Synthese und Selektion einer tiDEL mit anschließender Hit-Resynthese und -Validierung

wurde. Hierbei wurden 80 pmol hexT-Ugi-Konjugat **hexT 5ao** mit 250 Äquiv. bzw. 500 Äquiv. Azid, 125 Äquiv. einer wässrigen THPTA/CuSO₄-Lösung und 200 Äquiv. Natriumascorbat in einem Gesamtvolumen von 50 µL Wasser bei 40 °C für 60 min umgesetzt. Es konnte in allen Fällen Produktbildung detektiert werden (Abb. 21). Im Vergleich zu den Reaktionen mit 500 Äquiv. Azid konnte unter Einsatz von 250 Äquiv. Azid eine etwas geringere Nebenproduktbildung beobachtet werden.



Synthese und Selektion einer tiDEL mit anschließender Hit-Resynthese und -Validierung

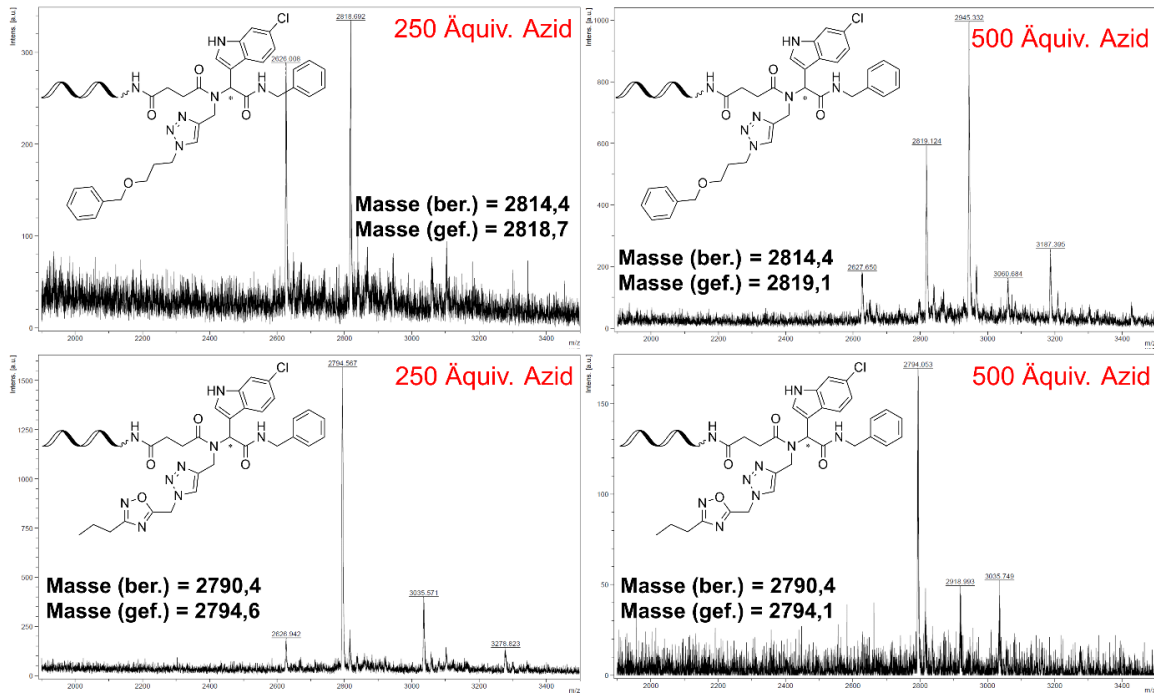
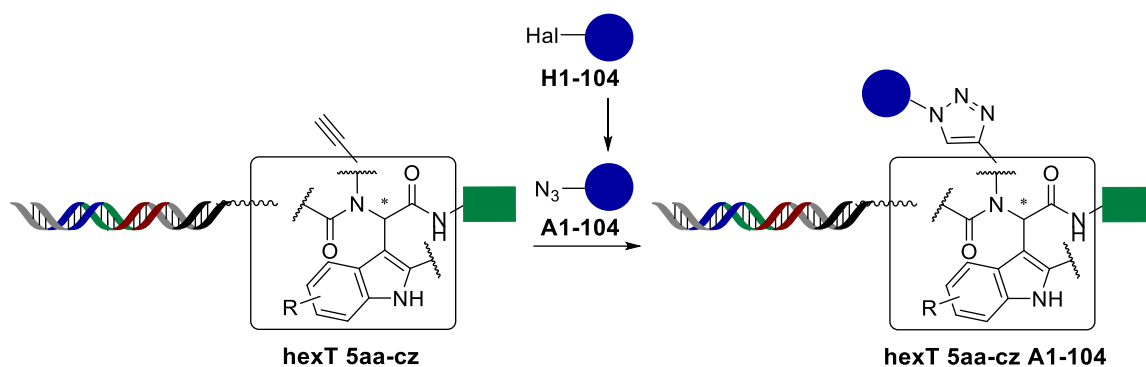


Abbildung 21: MALDI-MS-Analyse der CuAAC des hexT-Ugi-Konjugats **hexT 5a0** mit den Aziden **A2-6**.

Zuletzt wurde untersucht, ob die Verlängerung der Reaktionszeit zu einer Steigerung des Umsatzes führt. Es konnte kein Unterschied im Reaktionsumsatz nach einer, zwei und fünf Stunden beobachtet werden.

Unter Verwendung der optimierten Reaktionsbedingungen der CuAAC auf DNA-Ugi-Konjugaten in Lösung wurden die vollständig kodierten und gereinigten DNA-Ugi-Konjugate mit insgesamt 104 Aziden **A1-104** (Übersicht im Anhang, Tabelle 27), welche zuvor *in situ* gebildet wurden, umgesetzt (Schema 22).^[153] Die CuAAC wurde nach einer Stunde gestoppt, die Reaktionsprodukte wurden vereinigt und anschließend ethanolisch präzipitiert. Die ethanolische Fällung unter Zugabe von EDTA wurde insgesamt dreimal durchgeführt, bis die anfängliche intensive Blaufärbung durch die Kupfersalze nicht mehr zu beobachten war. Das DNA-Pellet der finalen Indol-fokussierten, peptidomimetischen DNA-kodierten Substanzbibliothek wurde in Puffer (10 mM Tris, 0,1 mM EDTA) resuspendiert und aliquotiert.



Schema 22: CuAAC der DNA-kodierten Ugi-Konjugate **hexT 5aa-cz** mit 104 strukturell diversen Aziden **A1-104** zur Synthese der Indol-fokussierten, peptidomimetischen DNA-kodierten Substanzbibliothek. Beispielhaft wurde die CuAAC der Indol-basierten DNA-Ugi-Produkte gezeigt.^[153]

3.2 Selektion der tiDEL

Zur Identifizierung von möglichen Protein-Protein-Inhibitoren wurde die finale Indol-fokussierte DNA-kodierte Substanzbibliothek unter anderem gegen die p53-bindende Domäne von MDM2 als auch gegen die YAP-interagierende Domäne des humanen Transkriptionsfaktors TEAD4 (hTEAD4) selektioniert.^[153] Im Rahmen des Selektionsassays wurden die Zielproteine auf magnetischen Kügelchen immobilisiert und mit der tiDEL inkubiert. Im Anschluss wurden nicht-bindende DNA-konjugierte Moleküle durch Waschschriffe entfernt. Parallel dazu wurde als Negativkontrolle gegen „leere“ Magnetkügelchen und in einem weiteren Selektionsexperiment, um die tiDEL-Synthese sowie den Prozess der Selektionierung zu validieren, gegen Streptavidin-beschichtete Magnetkügelchen anstelle von auf magnetischen Kügelchen immobilisierten Proteinen selektioniert. Nach der ersten Selektionsrunde wurden die bindenden DNA-Molekül-Konjugate durch Hitzedenaturierung des Proteins eluiert und in eine zweite Selektion eingespeist. Im Anschluss an die zweite Selektionsrunde wurden die DNA-Sequenzen der im Selektionsexperiment angereicherten Oligonukleotid-Molekül-Konjugate mittels PCR vervielfältigt und gleichzeitig um experimentspezifische DNA-Sequenzen sowie um Adapter-Sequenzen für das nachfolgende *next generation sequencing*, in diesem Fall mittels Illumina-Sequenzierung, verlängert. Insgesamt wurden hierfür zwei nacheinander folgende PCR-Amplifikationen durchgeführt. Während in der ersten PCR die DNA-Sequenzen um eine Adapter-Sequenz für die nachfolgende PCR verlängert wurden, erfolgte in der zweiten PCR die Kodierung der einzelnen Selektionsexperimente sowie die Einführung der für die Illumina-Sequenzierung benötigten Adapter-DNA. Als zusätzliche Kontrolle wurde die finale DEL ebenfalls mittels PCR vervielfältigt. Die PCR-Amplifikationen wurden über Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert (Abb. 22). Im Vergleich zur finalen, nicht-amplifizierten tiDEL (Kapitel 3.1.2,

Abb. 17, Spur 4) konnte nach der ersten PCR eine Verschiebung der DNA-Bande von 100 zu etwa 150 Basenpaaren beobachtet werden (Abb. 22, PCR 1, Spuren 1-8). Für einige der Proben ist neben der Bande bei 150 Basenpaaren noch eine weitere Bande bei etwa 40 Basenpaaren vorhanden, die gegebenenfalls den verwendeten DNA-Primern zugeordnet werden kann (Abb. 22, PCR 1, Spuren 2-5, 7 und 8). Die zweite PCR verlief ebenfalls erfolgreich. Es konnte eine einzelne, um etwa 70 Basenpaare verschobene Bande für alle Proben im Anschluss an die zweite PCR detektiert werden (Abb. 22, PCR 2, Spuren 1-8). Die PCR-Produkte wurden darauffolgend über ein Kit-System gereinigt, äquimolar vereinigt und durch die Firma *CeGat* sequenziert.

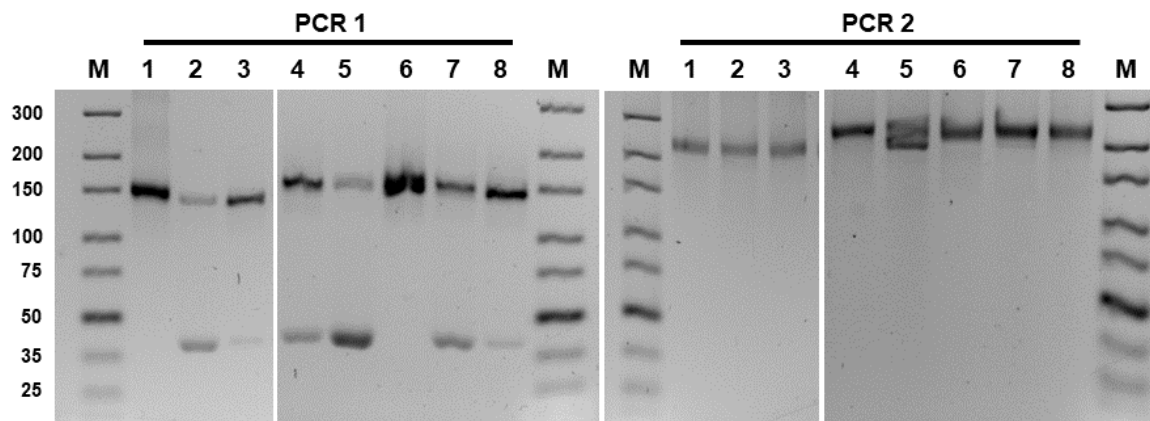


Abbildung 22: Visualisierung der PCR-Amplifikationen der Selektionsexperimente mittels Agarose-Gelelektrophorese (4 %iges Agarose-Gel). M: Marker (*GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder*), 1: tiDEL (ohne Selektion), 2: Selektion gegen Streptavidin-beschichtete Magnetkügelchen, 3: Selektion gegen „leere“ Magnetkügelchen, 4: Selektion gegen die p53-bindende Domäne von MDM2, 5: Selektion gegen die YAP-interagierende Domäne von hTEAD4, 6-8: Selektion gegen diverse Proteine, deren Hits Gegenstand laufender Untersuchungen sind.

Die Sequenzierungsdaten wurden mit Hilfe der in Kollaboration mit Lukas Arendt und Ina Dormuth (Prof. Dr. Jörg Rahnenführer und Prof. Dr. Roland Fried, Fakultät für Statistik, TU Dortmund) entwickelten Software *ECEC* („*encoded compound enrichment calculator*“) ausgewertet.^[153] Die Software ermittelt die Anreicherungsfaktoren (*enrichment factors*) von bestimmten Konnektivitäten der Molekülbausteine in den einzelnen Selektionsexperimenten. Zur Visualisierung werden die Anreicherungsfaktoren in zweidimensionalen Diagrammen, beispielsweise in Abhängigkeit der *rank abundance* (Häufigkeit von Konnektivitäten), dargestellt. Dabei werden die Anreicherungsfaktoren eines bestimmten Selektionsexperiments mit einer Kontrolle, in der Regel der Negativkontrolle bestehend aus „leeren“ Magnetkügelchen, verglichen.

Die Selektion gegen die Streptavidin-beschichteten Magnetkügelchen reicherte lediglich desthiobiotinylierte DNA-Barcodes an (violette Quadrate, eingerahmt durch einen Kasten, Abb. 23A) und validierte damit die tiDEL-Synthese sowie den Prozess der Selektionierung.

Für das Zielprotein MDM2 wurden während der tiDEL-Selektion mehrere DNA-Molekül-Konjugate angereichert (Abb. 23B). Viele von ihnen entsprechen dem mittlerweile anerkannten Pharmakophor-Modell kleiner organischer Moleküle zur Entwicklung von MDM2-Inhibitoren. Der Großteil der angereicherten DNA-Molekül-Konjugate besteht unter anderem aus einer 6-Chloroindol-Struktur, welche die Aminosäure Tryptophan imitiert. Überraschenderweise wurde allerdings 2,4-Dimethylphenylacetamid **A48** als einziger aus insgesamt 104 verschiedenen Azidbausteinen angereichert.

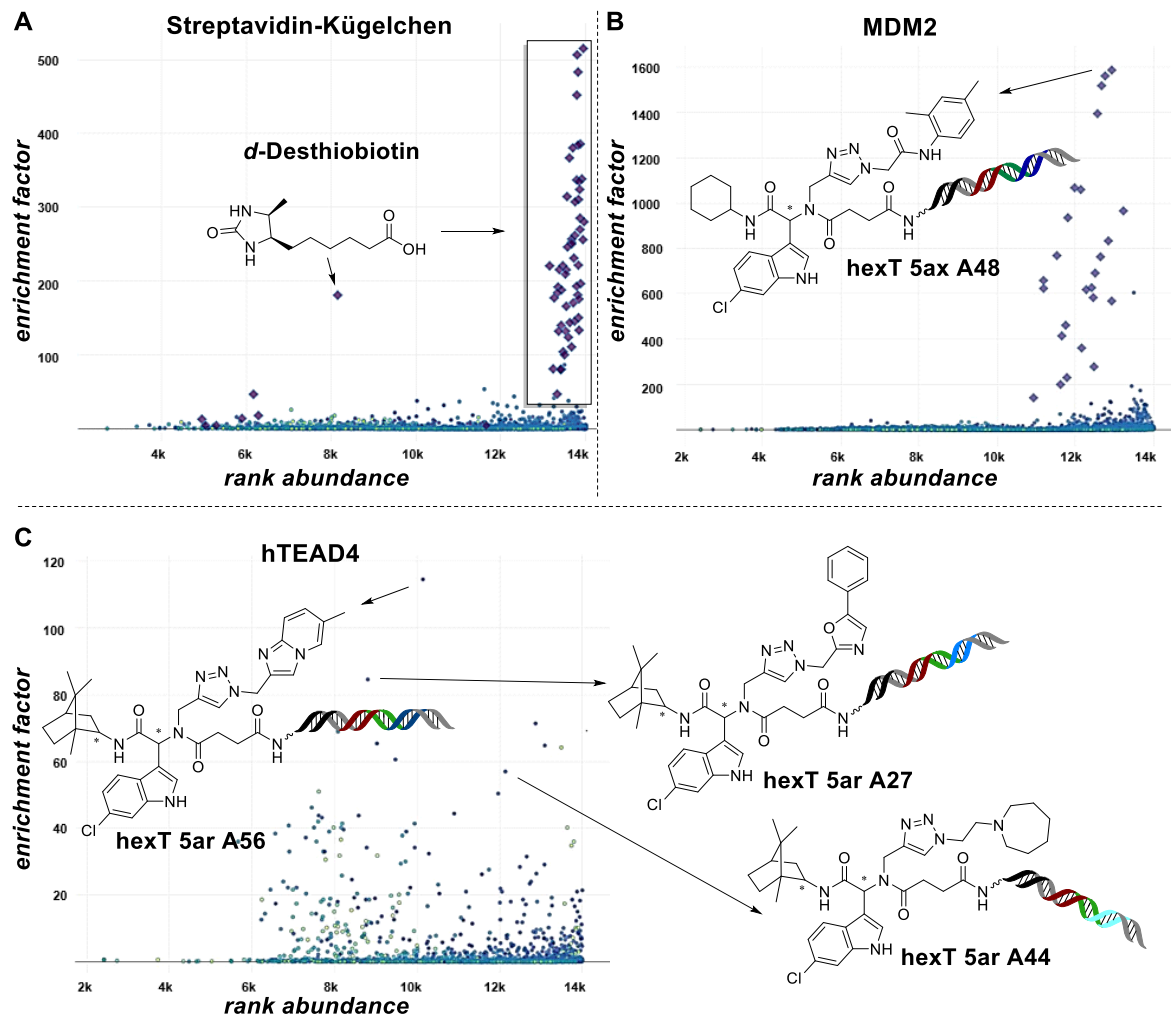


Abbildung 23: Darstellung der Sequenzierungsergebnisse in Form von zweidimensionalen Diagrammen. A. Selektion gegen Streptavidin-beschichtete Magnetkügelchen. B. Selektion gegen die p53-bindende Domäne von MDM2. C. Selektion gegen die YAP-interagierende Domäne von hTEAD4. Farbkodierung der 2D-Diagramme: Azide, welche im finalen Syntheseschritt der tiDEL als Diversitätselement verwendet wurden, wurden unterschiedlich farblich markiert.^[153]

Im Vergleich zur vorherigen Selektion führte die Selektion der tiDEL gegen den Transkriptionsfaktor TEAD4 zur Identifizierung von DNA-Molekül-Konjugaten mit deutlich geringeren Anreicherungsfaktoren (Abb. 23C). Das am stärksten angereicherte DNA-konjugierte Molekül **hexT 5ar A56** besitzt neben der 6-Chloroindol-Struktur einen

stark lipophilen Rest, zurückzuführen auf das verwendete Isocyanid (2-Isocyano-1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptan **23d**), und ist über das Triazol mit dem Heterozyklus Imidazopyridin verbunden. Weitere Moleküle, welche im Selektionsassay angereichert wurden, ähneln diesem Molekül stark und unterscheiden sich in einigen Fällen lediglich durch den jeweiligen Azidbaustein. Beispielsweise weisen die DNA-konjugierten Moleküle **hexT 5ar A27** und **hexT 5ar A44** statt der Imidazopyridin-Struktur die ebenfalls heterozyklischen Verbindungen 2-Methyl-5-phenyloxazol sowie 1-Ethylazepan auf.

3.3 Hit-Resynthese

Zur Validierung ihrer Bioaktivität gegenüber dem jeweiligen Zielprotein wurden die im Selektionsassay angereicherten DNA-Molekül-Konjugate ohne den kodierenden DNA-Strang resynthetisiert.^[153] Analog zur tiDEL-Synthese erfolgten die Resynthesen zunächst über die U-4CR, gefolgt von der CuAAC (Abb. 24A). Insgesamt wurden acht Moleküle in Zusammenarbeit mit Dr. Marco Potowski (AG Brunschweiler, TU Dortmund) dargestellt (Abb. 24B).

Unter den synthetisierten Molekülen befand sich mit Verbindung **70** das im Selektionsexperiment der p53-bindenden Domäne von MDM2 am stärksten angereicherte DNA-konjugierte Molekül **hexT 5ax A48** (Abb. 24B). Zudem wurde eine kleine Serie von sieben Molekülen um den am stärksten angereicherten initialen Binder **hexT 5ar A56 (71)** der YAP-bindenden Domäne von hTEAD4 synthetisiert (Abb. 24B). Dabei wurde die Isocyanid-Komponente (**72** und **73**) variiert und der Bernsteinsäure-Linker durch ein simples Acetylamid ausgetauscht (**76**). Außerdem wurden zwei weitere, ebenfalls stark angereicherte Hits **hexT 5ar A27** und **hexT 5ar A44** des Transkriptionsfaktors TEAD4 ohne kodierenden DNA-Strang synthetisiert (**74** und **75**).

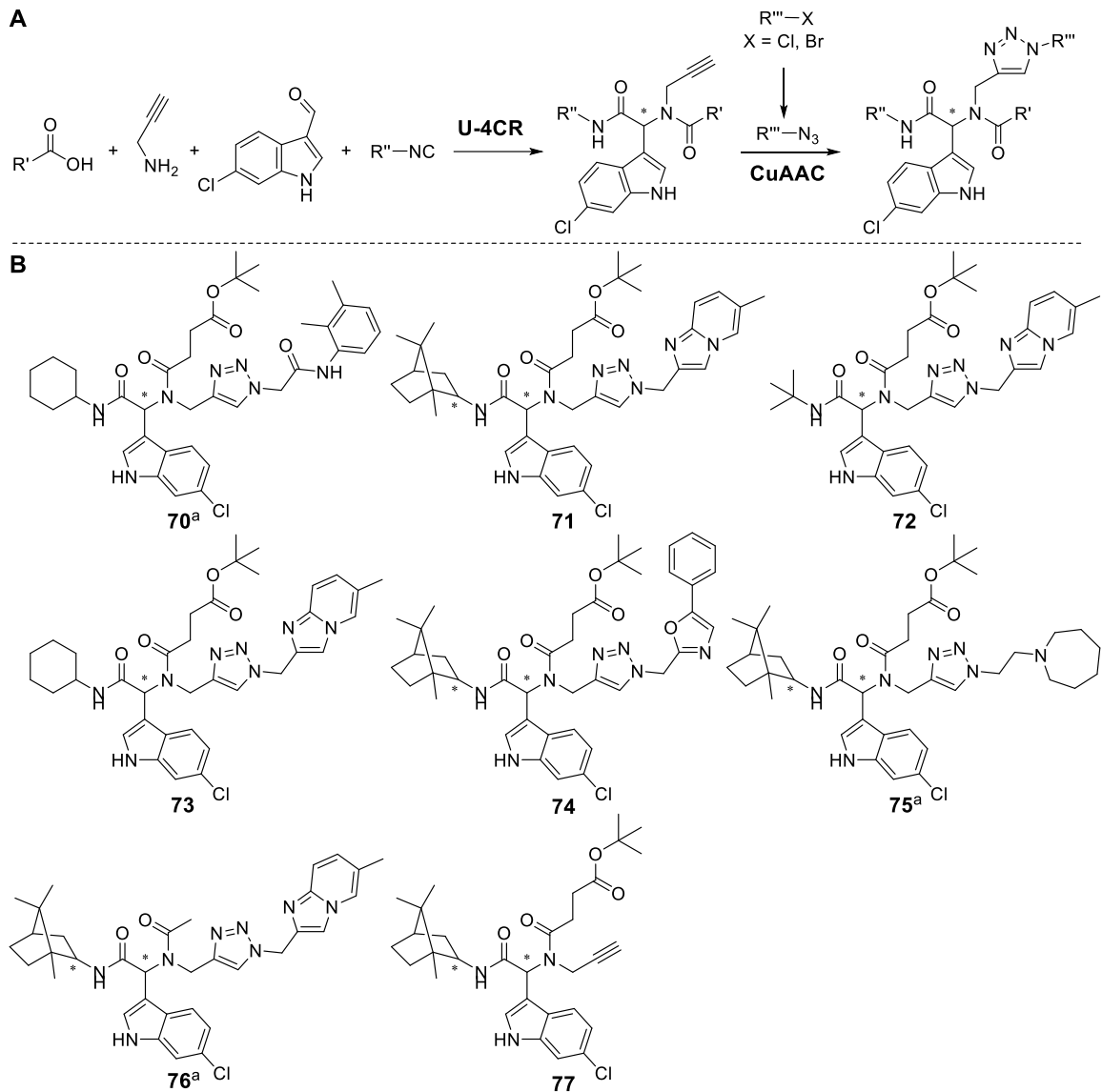


Abbildung 24: Hit-Resynthese der im Selektionsassay angereicherten Moleküle ohne kodierenden DNA-Strang. A. Allgemeines Syntheschema zur Darstellung der Moleküle. B. Übersicht der resynthetisierten Moleküle. ^a Molekül wurde von Dr. Marco Potowski synthetisiert.

3.4 Hit-Validierung

3.4.1 Hit-Validierung – MDM2

Das im Selektionsexperiment angereicherte Molekül **70** wurde zur Vorhersage des Bindungsmodus an MDM2 mit Hilfe von molekularen Dockingexperimenten durch den Arbeitskreis von Prof. Dr. Alexander Dömling (Universität Groningen) untersucht (Abb. 25).^[153]

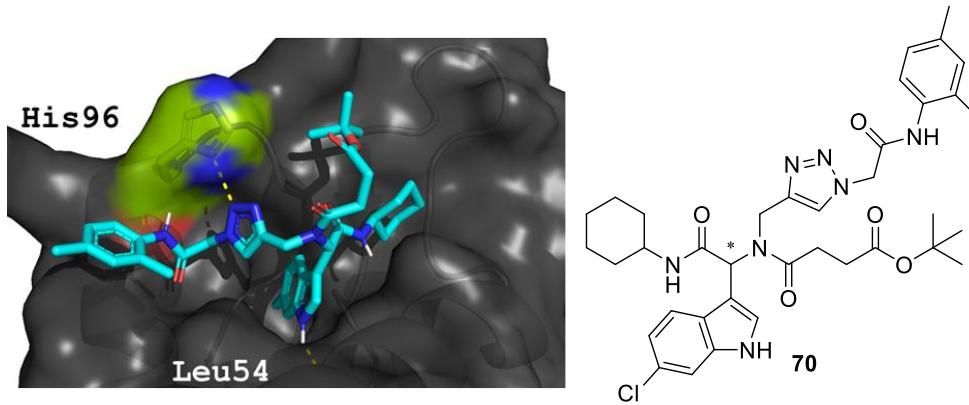


Abbildung 25: Molekulares Docking der Verbindung **70** in die Co-Kristallstruktur von MDM2 und der p53-Transaktivierungsdomäne.^[153]

Der plausible Bindungsmodus wurde zusätzlich durch Bindungsexperimente mittels der *microscale thermophoresis* (MST)-Technologie, durchgeführt von Ran Zhang (Universität Groningen, Prof. A. Dömling), bestätigt (Abb. 26). Die MST-Technologie ermöglicht die Quantifizierung von molekularen Interaktionen durch Messung der Fluoreszenzintensität (extrinsisch oder intrinsisch) eines Zielproteins entlang eines Temperaturgradienten. In diesem Fall wurde die temperaturinduzierte Änderung des fluoreszenzmarkierten Zielproteins MDM2 in Abhängigkeit des Moleküls **70** untersucht. Dabei wurde ein K_D -Wert von 33 μM ermittelt.

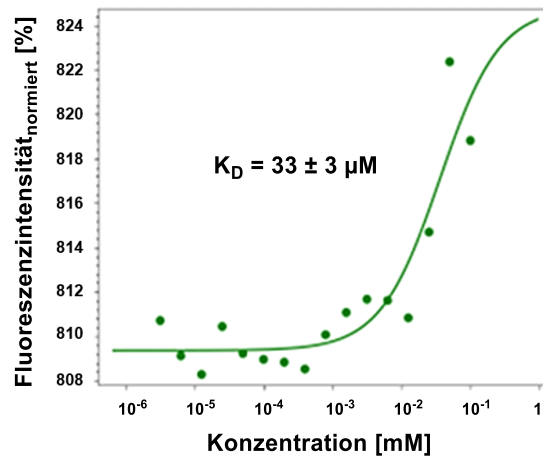


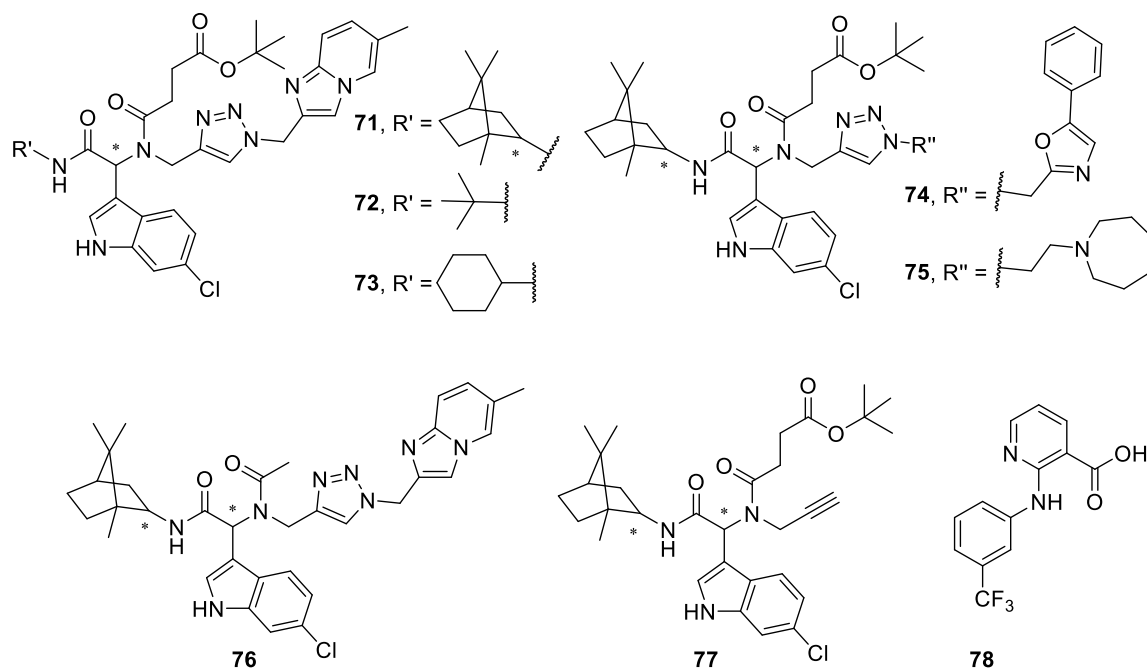
Abbildung 26: Untersuchung der Bindung von **70** an MDM2 mittels MST.^[153]

3.4.2 Hit-Validierung – hTEAD4

Die Bindung der im Selektionsassay angereicherten, im Anschluss *off*-DNA resynthetisierten Moleküle an den humanen Transkriptionsfaktor TEAD4 wurde mit Hilfe von *nano differential scanning fluorimetry* (nanoDSF) durch Dr. Hélène Adihou (AstraZeneca Max Planck Institute of Molecular Physiology (MPI) Satellite Unit) untersucht.^[153] Bei der nanoDSF-Technologie kann der Einfluss von kleinen organischen

Molekülen auf die Proteinstabilität durch Messung der intrinsischen Fluoreszenzintensität bei chemischen oder, wie in diesem Fall, thermalen Entfaltungsprozessen ermittelt werden. Als Positivkontrolle wurde der bekannte „*central pocket*“-Binder Nifluminsäure **78** verwendet. Die ermittelten Schmelztemperaturen T_m wurden verglichen mit der jeweiligen Schmelztemperatur von hTEAD4 in Abwesenheit eines der Moleküle (ΔT_m , Tabelle 3). Eine positive Differenz der Schmelztemperaturen ΔT_m deutet auf eine thermische Stabilisierung des Proteins hin, während eine negative Differenz auf einen destabilisierenden Effekt hinweist.

In Anwesenheit der Positivkontrolle Nifluminsäure **78** wurde für hTEAD4 eine Schmelztemperatur von 45,5 °C und damit eine Differenz von $\Delta T_m = +1,2$ °C zur Negativkontrolle bestimmt (Tabelle 3). Höhere Differenzen in der Schmelztemperatur ($\Delta T_m = +3,1 - +5,1$ °C) und damit einen höheren Einfluss auf die thermale Stabilität von hTEAD4 konnten für die Moleküle **71-73** beobachtet werden. Die Moleküle **71-73** unterscheiden sich lediglich in dem eingesetzten Isocyanid während der U-4CR. Während der initiale Hit **71** zu einer Differenz von $\Delta T_m = +3,1$ °C führte, konnten für die Moleküle mit dem Cyclohexyl- (**73**) sowie mit dem *tert*-Butyl-Amid (**72**) Differenzen von $\Delta T_m = +4,1$ und $5,1$ °C detektiert werden. Des Weiteren wurde in Gegenwart von **74**, welches auch auf ein im Selektionsassay angereichertes DNA-Molekül-Konjugat zurückzuführen ist, ebenfalls ein Einfluss auf die thermale Stabilität von hTEAD4 durch Ermittlung einer Schmelztemperatur von 45,8 °C und damit einer Differenz von $\Delta T_m = +1,5$ °C beobachtet. Im Vergleich zum initialen Hit **71** besitzt **74** statt der Imidazopyridin-Struktur einen 2-Methyl-5-phenyloxazol-Rest. Ein weiteres Molekül, welches im Selektionsexperiment mit hTEAD4 angereichert wurde, allerdings keinen signifikanten Einfluss auf die Proteinstabilität ausübt, ist **75**. Das Molekül **76** beeinflusst wiederum die thermale Stabilität von hTEAD4 positiv und führte zu einer Differenz in der Schmelztemperatur von $\Delta T_m = +1,8$ °C. In **76** wurde der Bernsteinsäure-Linker, welcher die Verbindung zur kodierenden DNA-Sequenz im DNA-Molekül-Konjugat in der finalen DEL darstellt, durch einen simplen Acetylamid-Baustein ersetzt. Hingegen wurde für hTEAD4 in Gegenwart des Ugi-Peptoid-Zwischenproduktes **77** eine geringere Differenz von $\Delta T_m = +0,7$ °C ermittelt, was die Bedeutung des durch die CuAAC eingeführten Bausteins für die Bindung des Moleküls an hTEAD4 unterstreicht.

Tabelle 3: Untersuchung der Bindung der Moleküle **71-78** an den humanen Transkriptionsfaktor TEAD4 mittels nanoDSF.^[153]


Molekül	T_m [°C]	ΔT_m [°C]
71	47,4 ± 0,4	3,1
72	49,4 ± 0,4	5,1
73	48,4 ± 0,3	4,1
74	45,8 ± 0,0	1,5
75	44,0 ± 0,1	-0,3
76	46,1 ± 0,7	1,8
77	45,0 ± 0,1	0,7
78	45,5 ± 0,4	1,2

Als nächstes wurden das Molekül (**72**), welches den stärksten Einfluss auf die thermale Proteinstabilität von hTEAD4 ausübte, sowie der initiale Hit **71** im Rahmen von Fluoreszenzpolarisationsexperimenten (FP-Experimenten) durch Dr. Hacer Karatas und Dr. Mohammad Akbarzadeh (MPI Dortmund, Abt. 4, Prof. H. Waldmann) näher untersucht.^[154,153] Zunächst wurde analysiert, ob die Moleküle **71** und **72** die Interaktion zwischen dem Transkriptionsfaktor hTEAD4 und der Palmitinsäure, welche posttranslational an die hydrophobe Bindetasche im Zentrum der YAP-bindenden Domäne von TEAD bindet, hemmen können (Abb. 27A). Für die Experimente wurde eine Fluorophor-markierte Palmitinsäure und als Positivkontrolle das kovalent an die zentrale Bindetasche interagierende Molekül TED-347 (**12**) verwendet.^[97] Während der initiale Hit **71** die Wechselwirkung zwischen der Palmitinsäure und dem Zielprotein mit einem IC_{50} -Wert von 0,41 μ M inhibierte, zeigte die Verbindung **72** eine deutlich schwächere

Hemmung der Palmitinsäure-hTEAD4-Interaktion, was zusammen mit dem nanoDSF-Ergebnis auf einen anderen Bindungsmodus hinweisen könnte (Abb. 27A).

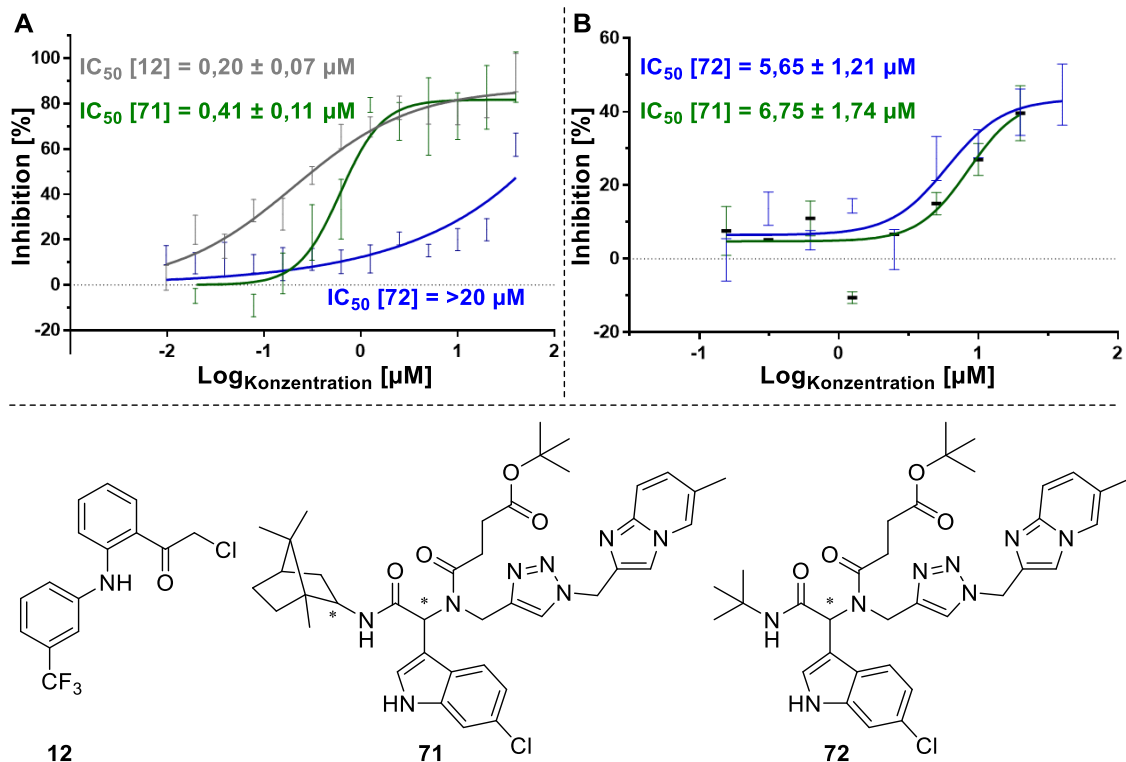


Abbildung 27: Untersuchung der Hemmung der Palmitinsäure-hTEAD4 (A)- sowie YAP-hTEAD4 (B)-Interaktion durch die Peptidomimetika **71** und **72** sowie durch die Positivkontrolle TED-327 **12** mittels FP-Experimenten.^[153]

In einem weiteren FP-Experiment wurde der Einfluss der Moleküle auf die YAP-TEAD-Interaktion untersucht (Abb. 27B).^[154,153] Hierfür wurde ein Fluorophormarkiertes, von der YAP-Aminosäuresequenz abgeleitetes Peptid verwendet. Es konnte beobachtet werden, dass die Verbindungen **71** und **72** die Wechselwirkung zwischen YAP und hTEAD4 mit IC_{50} -Werten von $6,75 \mu\text{M}$ und $5,65 \mu\text{M}$ inhibieren (Abb. 27B).

Zuletzt wurde die zelluläre Aktivität der Verbindung **71** mit Hilfe eines Echtzeit-PCR-basierten Experiments durch Blaž Andlovic (*Lead Discovery Center* (LDC), Dortmund) getestet.^[153] Dabei wurde untersucht, ob der initiale Hit **71** die Expression des durch die TEAD-YAP-Interaktion kontrollierten Zielgens *CTGF* (*connective tissue growth factor*) modulieren kann (Abb. 28). Es wurden hierfür HEK-Zellen mit **71** sowie mit einer Kombination aus **71** und XMU-MP-1 (**79**) behandelt. Die Verbindung **79** ist ein potenter und selektiver Inhibitor der im Hippo-Signalweg vorgeschalteten Kinasen MST1/2 (Abb. 28A). Durch die Inhibierung von MST1/2 wird die Phosphorylierung der nachgeschalteten Kinasen LATS1/2 gehemmt, was zu einer verstärkten Translokation von YAP in den Zellkern führt und wodurch letztendlich die Wechselwirkung mit dem Transkriptionsfaktor TEAD ermöglicht wird. Die Behandlung der Zellen mit **71** alleine hatte

keinen Einfluss auf die *CTGF*-Transkription (Abb. 28B). Erst nachdem der Hippo-Signalweg durch XMU-MP-1 (**79**) inhibiert wurde, konnte eine signifikante Reduktion der Genexpression von *CTGF* beobachtet werden. Dies lässt darauf schließen, dass die Verbindung **71** in der Lage ist, die TEAD-YAP-PPI auch in einem zellulären Kontext zu hemmen.

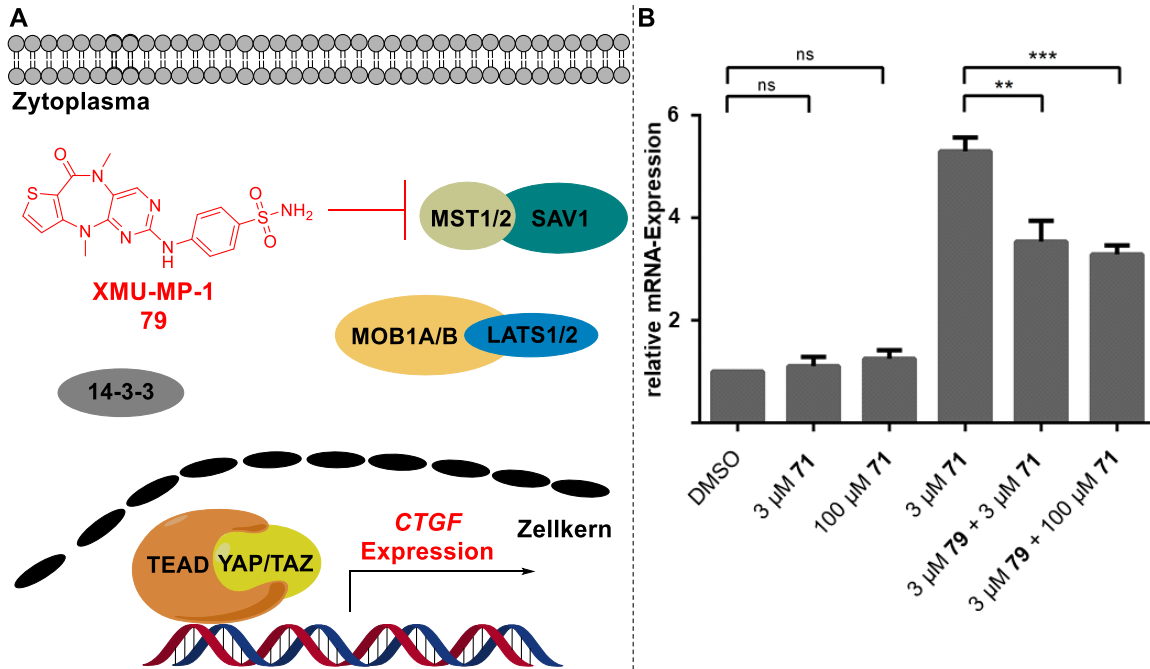


Abbildung 28: Untersuchung der zellulären Hippo-Signalweg-modulierenden Aktivität des TEAD-YAP-Inhibitors **71** durch Messung der *CTGF*-Expression mittels quantitativer PCR nach Behandlung der Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von **71**. A. Schematische Darstellung des Hippo-Signalweges. B. Modulation der *CTGF*-Genexpression durch **71**. ns = nicht signifikant.^[153]

4 Überführung chemischer Reaktionen auf CPG-gebundenen DNA-Oligonukleotiden und Entwicklung einer neuen Kodierungsstrategie

Zum Beginn der vorliegenden Arbeit bestand das Repertoire an chemischen Reaktionen zur Herstellung von DELs größtenteils aus nukleophilen (aromatischen) Substitutionsreaktionen, Carbonylchemie sowie sp^2 - sp^2 -Kreuzkupplungen. Um möglichst einen großen Teil des chemischen Strukturraums mit zukünftigen DELs abdecken zu können, sollten im Folgenden diverse chemische Reaktionen, darunter unterschiedliche (Isocyanid-basierte) Multikomponentenreaktionen sowie eine Cycloaddition, mit Hilfe der CPG-Festphasenstrategie auf DNA-Molekül-Konjugaten übertragen werden.^[155,156] Ferner sollten weitere Optimierungen zur U-4CR hinsichtlich milderer Reaktionsbedingungen, welche mit einer aus allen vier Nucleobasen bestehenden DNA kompatibel sind, durchgeführt sowie eine neue, effizientere Kodierungsstrategie entwickelt werden.^[156] Diese Kodierungsstrategie soll im Rahmen zukünftiger DEL-Synthesen die Kodierung von Startmaterialien, gebunden an kurzen CPG-gebundenen DNA-Oligonukleotiden, erlauben.

4.1 Optimierung der Ugi-Vierkomponentenreaktion auf CPG-gebundenen DNA-Oligonukleotiden

Um die U-4CR nicht nur im Rahmen der TiDEC-Kodierungsstrategie auf dem chemisch sehr stabilen hexT-Adapteroligonukleotid nutzen zu können, sondern ebenfalls in Kombination mit einer effizienteren Kodierungsstrategie, die die Verwendung von Gemischen aus kodierten Startmaterialien erlaubt, wurden Untersuchungen hinsichtlich der Überführung der Ugi-Vierkomponentenreaktion auf aus allen vier natürlichen Nucleobasen bestehenden, CPG-gekoppelten DNA-Oligonukleotiden durchgeführt.^[156]

Es erfolgten zunächst Experimente auf einem CPG-gebundenen hexT-Aldehyd-Konjugat **hexT 4c**, welches über Amidkupplung mit 2-(4-Formylphenoxy)-Essigsäure **22ag** hergestellt wurde. Im Gegensatz zu den zuvor durch die Masterstudentin Denise dos Santos Smith etablierten Reaktionsbedingungen,^[152] wurde ein zusätzlicher Reaktionsschritt zur Bildung des Imins zwischen dem CPG-gekoppelten hexT-Aldehyd-Konjugat **hexT 4c** und dem Amin **25** der eigentlichen Reaktion vorangeschaltet. Hierfür wurde das CPG-gekoppelte hexT-Aldehyd-Konjugat **hexT 4c** mit 1000 Äquiv. Propylamin **25b** bei Raumtemperatur für drei Stunden inkubiert. Anschließend wurden 1000 Äquiv.

Essigsäure **22af** sowie 1000 Äquiv. *tert*-Butylisocyanid **23s** zum CPG-gebundenen hexT-Imin-Konjugat hinzugegeben und die Reaktionsmischung über Nacht geschüttelt. In den ersten Experimenten wurden verschiedene Lösungsmittel bei Raumtemperatur getestet (Tabelle 4, Einträge 1-5). Während der Einsatz von Acetonitril und 1,2-Dichlorethan zu keiner Produktbildung führte (Tabelle 4, Einträge 1 und 2), wurde das gewünschte hexT-Ugi-Produkt **hexT 5da** in Toluol und Ethanol mit einem niedrigen Umsatz von 18 bzw. 21 % generiert (Tabelle 4, Einträge 3 und 4). Einen Umsatz von 89 % konnte bei der Verwendung von Methanol als Lösungsmittel beobachtet werden (Tabelle 4, Eintrag 5). Als nächstes wurde die Temperatur von Raumtemperatur auf 50 °C erhöht, wodurch der Umsatz auf über 95 % gesteigert werden konnte (Tabelle 4, Eintrag 6). Ferner wurde untersucht, ob im Falle von in reinem Methanol schwer löslichen Reaktanden, ebenfalls bestimmte Additive zur Erhöhung der Löslichkeit von stark lipophilen, hydrophilen oder als Hydrochlorid vorliegenden Edukten verwendet werden können. Es wurden folgende Lösungsmittelgemische getestet: MeOH/CH₂Cl₂ (9:1, v/v) für lipophile Reaktanden, MeOH/H₂O (9:1, v/v) als auch MeOH/DMSO (9:1, v/v) für hydrophile Reaktanden sowie MeOH mit 1 % (v/v) Triethylamin für Reaktanden, welche als Hydrochloride vorliegen (Tabelle 4, Einträge 7-10). In allen vier Fällen konnte im Rahmen der Messgenauigkeit ein quantitativer Umsatz vom Startmaterial zum Zielprodukt beobachtet werden.

Zusammengefasst sind die optimalen Reaktionsbedingungen für die Darstellung von Diamiden über die U-4CR die zunächst durchzuführende Iminbildung von CPG-gekoppelten DNA-Aldehyd-Konjugaten mit 1000 Äquiv. Amin bei Raumtemperatur in Methanol für drei Stunden. Im Anschluss werden 1000 Äquiv. Carbonsäure sowie 1000 Äquiv. Isocyanid zugegeben und die Reaktionsmischung über Nacht bei 50 °C geschüttelt. Im Falle von schwer löslichen Reaktanden können unterschiedliche Lösungsmittelgemische gewählt werden.

Überführung chemischer Reaktionen auf CPG-gebundenen DNA-Oligonukleotiden und Entwicklung einer neuen Kodierungsstrategie

Tabelle 4: Optimierung der U-4CR auf CPG-gebundenem hexT-Aldehyd-Konjugat **hexT 4c**.^{a [156]}

Eintrag	T [°C]	Lösungsmittel	Umsatz [%] ^b
1	22	ACN	n.d.
2	22	1,2-Dichlorethan	n.d.
3	22	Toluol	18
4	22	EtOH	21
5	22	MeOH	89
6	50	MeOH	>95
7	50	MeOH/CH ₂ Cl ₂ (9:1)	>95
8	50	MeOH/H ₂ O (9:1)	>95
9	50	MeOH/DMSO (9:1)	>95
10	50	MeOH + 1 % TEA	>95

^a Das CPG-gebundene hexT-Aldehyd-Konjugat **hexT 4c** (20 nmol) und Propylamin **25b** (1000 Äquiv., 20 µmol) wurden in 50 µL Lösungsmittel bei Raumtemperatur für drei Stunden zur Iminbildung inkubiert. Anschließend wurden *tert*-Butylisocyanid **23s** (1000 Äquiv., 20 µmol) und Essigsäure **22af** (1000 Äquiv., 20 µmol) hinzugegeben und die Reaktionsmischung wurde bei T für 16 h geschüttelt. Die Entschüttung sowie die Abspaltung der DNA von der festen Phase erfolgte mit AMA-Lösung bei Raumtemperatur für 0,5 h.

^b Umsatzbestimmung mittels analytischer RP-HPLC-Analyse aus dem Verhältnis von Startmaterial **hexT 4c** und Produkt **hexT 5da**. n.d. = nicht detektiert.

Die TiDEC-Technologie, eine DNA-kodierte Substanzbibliothek ausgehend von einem CPG-gebundenen Hexathymidin-Adapteroligonukleotid zu initiieren, ermöglicht zwar die Nutzung harscher Reaktionsbedingungen, besitzt allerdings den Nachteil, dass eine Kodierung von Startmaterialien mit der hexT-Sequenz nicht möglich ist und dementsprechend zunächst diskrete Unterbibliotheken aus kodierten hexT-Konjugaten synthetisiert werden müssen (Kapitel 3.1.1). Eine effizientere Strategie zur Herstellung von DELs würde hingegen auf der Generierung von kodierten, CPG-gekoppelten Startmaterialien basieren, welche anschließend als Gemische für die Synthesen von *scaffolds* eingesetzt werden können. Aufgrund dessen wurde als nächstes untersucht, ob die auf CPG-gekoppelter hexT-DNA optimierten Reaktionsbedingungen ebenfalls auf CPG-gebundenen 10mer ATCG-DNA-Oligonukleotiden übertragen werden können. Entsprechend wurde hierfür das benötigte CPG-gebundene 10mer ATCG-Aldehyd-Konjugat **ATCG₁₀ 2a** ausgehend von einer CPG-gekoppelten, Aminolinker-funktionalisierten ATCG-DNA **ATCG₁₀ 1** mittels Amidkupplung hergestellt. Unter

Anwendung der zuvor auf hexT-DNA optimierten Reaktionsbedingungen der U-4CR konnte das gewünschte 10mer ATCG-Konjugat **ATCG₁₀ 3aa** mit exzellentem Umsatz gebildet werden (Tabelle 5, Eintrag 1).

Um das Substratspektrum der U-4CR auf CPG-gekoppelten ATCG-DNA-Oligonukleotiden zu untersuchen, wurde das 10mer ATCG-Aldehyd-Konjugat **ATCG₁₀ 2a** mit verschiedenen Isocyaniden **23**, unterschiedlichen Carbonsäuren **22** und diversen Aminen **25** zur Reaktion gebracht (Tabelle 5). Als erstes wurden vier verschiedene Isocyanide getestet, wobei sowohl die Aminkomponente (Propylamin **25b**) als auch die Säurekomponente (Essigsäure **22af**) konstant gehalten wurden. Es konnte ein quantitativer Umsatz beim Einsatz von *tert*-Butylisocyanid **23s**, Cyclohexylisocyanid **23i** sowie Benzylisocyanid **23a** beobachtet werden (Tabelle 5, Einträge 1-3). Hingegen wurde bei Verwendung von Ethylisocanoacetat **23t** kein Produkt generiert (Tabelle 5, Eintrag 4). Um die Substrattoleranz gegenüber diversen Carbonsäuren zu testen, wurden erneut Propylamin **25b** und *tert*-Butylisocyanid **23s** verwendet (Tabelle 5, Einträge 5-14). Der Einsatz von Acrylsäure **22ah** führte zu einem sehr guten Umsatz von 88 % (Tabelle 5, Eintrag 5). Allerdings zeigte die MALDI-MS-Analyse, dass das in der AMA-Lösung enthaltene Methylamin während der Entschützung und Abspaltung der DNA von der Festphase mit dem Zielprodukt **ATCG₁₀ 3ae** über eine nukleophile Additionsreaktion an der Doppelbindung der Acrylsäure **22ah** reagierte. Die Verwendung der aliphatischen 4-Biphenyllessigsäure **22ai** und Zimtsäure **22aj** führte zu niedrigeren Umsätzen von 27 und 19 % (Tabelle 5, Einträge 6 und 7). Durch den Einsatz aromatischer Carbonsäuren konnten mit wenigen Ausnahmen gute bis sehr gute Umsätze verzeichnet werden (Tabelle 5, Einträge 8-14). Die unsubstituierte Benzoesäure **22ak** führte zu einem vollständigen Umsatz des Startmaterials zum gewünschten Produkt **ATCG₁₀ 3ah** (Tabelle 5, Eintrag 8). Durch den Einsatz von elektronenziehenden Substituenten in *ortho*- und/oder *para*-Stellung (2-Chlorbenzoesäure **22al**, 2,4-Dichlorbenzoesäure **22am** und 4-Hydroxybenzoesäure **22aq**) wurden ebenfalls gute Umsätze zwischen 65 und 90 % detektiert (Tabelle 5, Einträge 9-10 und 14). Ferner konnte mit einem *meta*-ständigen Iodsubstituenten (3-Iodobenzoesäure **22an**) das Zielprodukt **ATCG₁₀ 3ak** mit 76 %igen Umsatz gebildet werden (Tabelle 5, Eintrag 11). Hingegen wurden bei Einsatz von 3-Hydroxybenzoesäure **22ao** und 3-Ethynylbenzoesäure **22ap** lediglich mäßige Umsätze von 32 und 38 % beobachtet (Tabelle 5, Einträge 12 und 13). Zur Untersuchung der Toleranz gegenüber diversen Aminen wurden *tert*-Butylisocyanid **23s** und Essigsäure **22af** verwendet (Tabelle 5, Einträge 15-25). Mit Benzylamin **25c**, *para*-Iodobenzylamin **25d** und *para*-Methoxybenzylamin **25e** wurden drei unterschiedliche benzyliche Amine getestet, welche zu Umsätzen zwischen 67 und >95 % führten

(Tabelle 5, Einträge 15-17). Ferner wurden verschiedene Aniline und der Einfluss ihres Substitutionsmusters auf die U-4CR von CPG-gebundenen DNA-Konjugaten untersucht (Tabelle 5, Einträge 18-24). Aniline mit einem *ortho*-Substituenten zur Aminofunktion wurden nur schlecht (2-*tert*-Butylanilin **25f**, 14 %iger Umsatz, Tabelle 5, Eintrag 18) oder gar nicht toleriert (2-Nitroanilin **25g**, keine Produktbildung, Tabelle 5, Eintrag 19). Dieses Ergebnis kann auf sterische Hinderung durch die Position und/oder auf die Größe der Substituenten zurückzuführen sein. Der Einsatz eines Anilins mit einem elektronenschiebenden Substituenten in *meta*-Position (3-Ethylanilin **25h**) resultierte ebenso in einem niedrigen Umsatz von 36 % (Tabelle 5, Eintrag 20), während ein *meta*-positionierter, elektronenziehender Fluorsubstituent (3-Fluoroanilin **25i**) zu dem gewünschten Produkt **ATCG₁₀ 3au** mit 73 % Umsatz führte (Tabelle 5, Eintrag 21). Aniline mit elektronenschiebenden als auch -ziehenden, *para*-ständigen Gruppen wie -*tert*-Butyl (**25j**), -Phenyl (**25k**) oder -Brom (**25l**) generierten gute Umsätze zwischen 56 und 64 % (Tabelle 5, Einträge 22-24). Ferner konnte bei der Untersuchung der verschiedenen Aniline die Bildung von nicht identifizierbaren Nebenprodukten, welche im Vergleich zu den jeweiligen Zielprodukten eine höhere Retentionszeit aufwiesen und damit chromatographisch abgetrennt werden konnten, beobachtet werden. Im Hinblick auf eine mögliche Anwendung der U-4CR in der DEL-Synthese wurde das bifunktionelle Boc-geschützte Aminopiperidin **25m** getestet. In einer möglichen DEL-Synthese könnte das entsprechende Produkt nach Boc-Entschützung über die freie Aminofunktion, beispielsweise durch Amidkupplung oder reduktive Aminierung, weiter derivatisiert werden. Erfreulicherweise führte der Einsatz von 4-Amino-1-Boc-piperidin **25m** zu dem gewünschten Ugi-Produkt **ATCG₁₀ 3ay** mit 80 % Umsatz (Tabelle 5, Eintrag 25). Zur Entfernung der Boc-Schutzgruppe wurde das CPG-gebundene DNA-Ugi-Produkt **ATCG₁₀ 3ay** für eine Minute mit 50 % TFA in CH₂Cl₂ inkubiert,^[16] wodurch die vollständige Abspaltung der Schutzgruppe (**ATCG₁₀ 4**), ohne eine merkliche DNA-Degradation zu beobachten, demonstriert werden konnte. Abschließend wurden zwei weitere CPG-gekoppelte DNA-Aldehyd-Konjugate **ATCG₁₀ 2b** und **ATCG₁₀ 2c** mittels Amidkupplung hergestellt und im Rahmen ihrer Anwendbarkeit der U-4CR untersucht. Sowohl das *meta*-substituierte (**ATCG₁₀ 2b**) als auch das *ortho*-substituierte CPG-gekoppelte DNA-Aldehyd-Konjugat (**ATCG₁₀ 2c**) resultierten in einem quantitativen Umsatz in die jeweiligen gewünschten Zielprodukte **ATCG₁₀ 3az** bzw. **ATCG₁₀ 3ba** (Tabelle 5, Einträge 26 und 27).

Überführung chemischer Reaktionen auf CPG-gebundenen DNA-Oligonukleotiden und
Entwicklung einer neuen Kodierungsstrategie


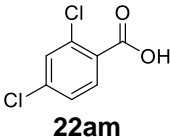
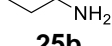

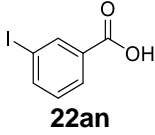
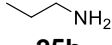

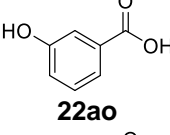
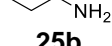

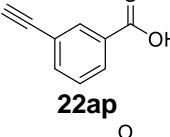


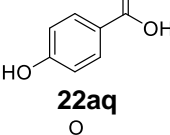
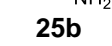


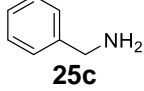


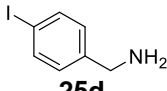


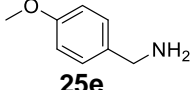


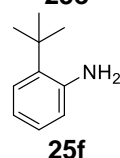


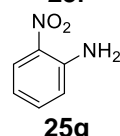


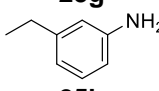


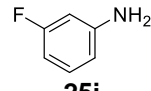


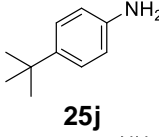


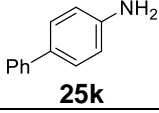
Tabelle 5: Untersuchung des Substratspektrums der U-4CR auf CPG-gebundenen 10mer ATCG-Aldehyd-Konjugaten **ATCG₁₀ 2a-c** durch Einsatz diverser Isocyanide, Säuren und Amine.^{a [156]}

1. MeOH, RT, 3 h
2. R²-NC
23
R³
OH
22
50 °C, 16 h
3. AMA, RT, 4 h



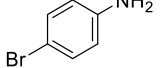


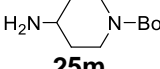


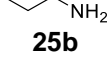


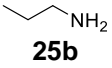
Eintrag	Produkt	Isocyanid	Säure	Amin	Umsatz [%] ^b	Masse _{ber.} Masse _{gef.} ^c
1	ATCG₁₀ 3aa	 23s	 22af	 25b	>95	3543,6 3544,2
2	ATCG₁₀ 3ab	 23l	 22af	 25b	>95	3569,6 3570,3
3	ATCG₁₀ 3ac	 23a	 22af	 25b	93	3577,6 3579,5
4	ATCG₁₀ 3ad	 23t	 22af	 25b	n.d.	3558,6 n.d.
5	ATCG₁₀ 3ae	 23s	 22ah	 25b	88	3586,7 3584,4
6	ATCG₁₀ 3af	 23s	 22ai	 25b	27	3695,8 3696,1
7	ATCG₁₀ 3ag	 23s	 22aj	 25b	19	3631,7 3631,7
8	ATCG₁₀ 3ah	 23s	 22ak	 25b	>95	3605,7 3604,4
9	ATCG₁₀ 3ai	 23s	 22al	 25b	65	3640,1 3640,2

Überführung chemischer Reaktionen auf CPG-gebundenen DNA-Oligonukleotiden und
Entwicklung einer neuen Kodierungsstrategie

Fortsetzung Tabelle 5

10	ATCG ₁₀ 3aj	 23s	 22am	 25b	83	3674,6 3675,7
11	ATCG ₁₀ 3ak	 23s	 22an	 25b	76	3731,6 3731,4
12	ATCG ₁₀ 3al	 23s	 22ao	 25b	32	3621,7 3621,7
13	ATCG ₁₀ 3am	 23s	 22ap	 25b	38	3629,7 3628,4
14	ATCG ₁₀ 3an	 23s	 22aq	 25b	90	3621,7 3622,0
15	ATCG ₁₀ 3ao	 23s	 22af	 25c	>95	3591,6 3593,2
16	ATCG ₁₀ 3ap	 23s	 22af	 25d	67	3717,5 3716,7
17	ATCG ₁₀ 3aq	 23s	 22af	 25e	84	3619,8 3623,8
18	ATCG ₁₀ 3ar	 23s	 22af	 25f	14	3633,7 3632,0
19	ATCG ₁₀ 3as	 23s	 22af	 25g	n.d.	3622,6 n.d.
20	ATCG ₁₀ 3at	 23s	 22af	 25h	36	3605,7 3606,4
21	ATCG ₁₀ 3au	 23s	 22af	 25i	73	3595,6 3595,5
22	ATCG ₁₀ 3av	 23s	 22af	 25j	64	3633,7 3635,0
23	ATCG ₁₀ 3aw	 23s	 22af	 25k	56	3651,8 3654,4

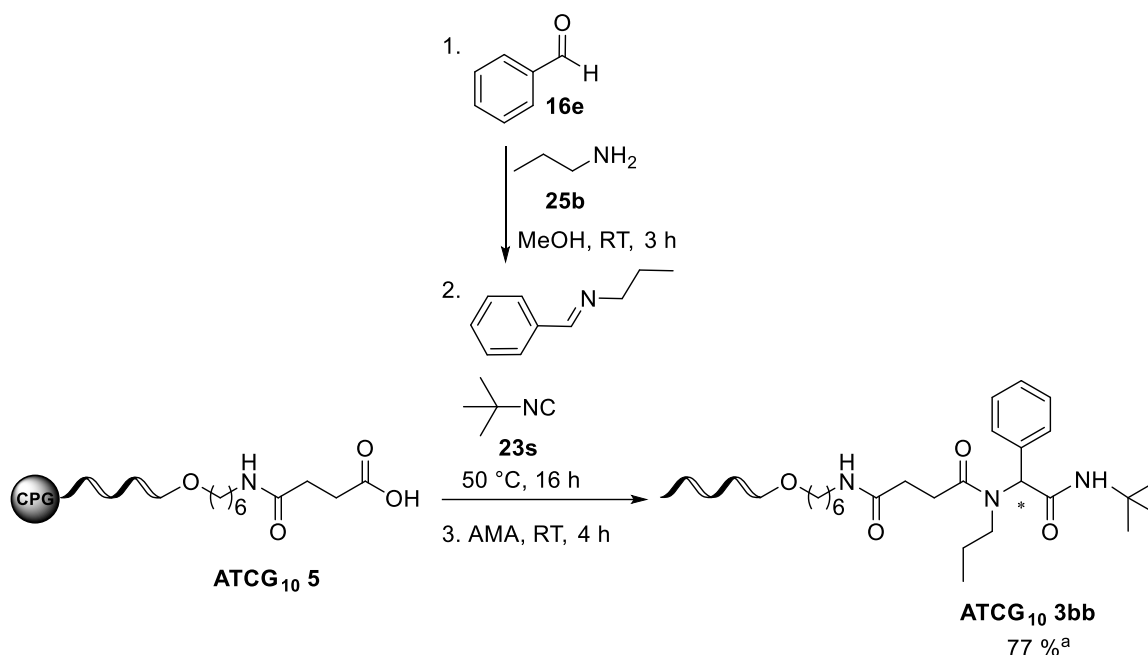
Fortsetzung Tabelle 5

24	ATCG₁₀ 3ax	 23s	 22af	 25l	64	3656,5 3655,5
25	ATCG₁₀ 3ay	 23s	 22af	 25m	80	3684,8 3685,7
26 ^d	ATCG₁₀ 3az	 23s	 22af	 25b	>95	3593,7 3593,4
27 ^e	ATCG₁₀ 3ba	 23s	 22af	 25b	>95	3578,0 3580,4

^a Das CPG-gebundene 10mer ATCG-Aldehyd-Konjugat **ATCG₁₀ 2a** (20 nmol) und das Amin **25** (1000 Äquiv., 20 µmol) wurden in 50 µL MeOH bei Raumtemperatur für drei Stunden zur Iminbildung inkubiert. Anschließend wurden das Isocyanid **23** (1000 Äquiv., 20 µmol) und die Säure **22** (1000 Äquiv., 20 µmol) hinzugegeben und die Reaktionsmischung wurde bei 50 °C für 16 h geschüttelt. Die Entschützung sowie die Abspaltung der DNA von der festen Phase erfolgte mit AMA-Lösung bei Raumtemperatur für 4 h. ^b Umsatzbestimmung mittels analytischer RP-HPLC-Analyse aus dem Verhältnis von Startmaterial **ATCG₁₀ 2** und Produkt **ATCG₁₀ 3**. ^c Massendetektion mittels MALDI-MS. ^d Es wurde das CPG-gebundene 10mer ATCG-Aldehyd-Konjugat **ATCG₁₀ 2b** als Startmaterial verwendet. ^e Es wurde das CPG-gebundene 10mer ATCG-Aldehyd-Konjugat **ATCG₁₀ 2c** als Startmaterial verwendet. 10mer ATCG = 5'-GTC ATG ATC T-3'. n.d. = nicht detektiert.

Die Ugi-Reaktion bietet als eine Multikomponentenreaktion zwischen drei (U-3CR) bzw. vier Reaktanden (U-4CR) mehrere Möglichkeiten organische Moleküle mit der DNA zu verbinden. Aufgrund dessen wurde neben Aldehyd-funktionalisierten, CPG-gekoppelten 10mer ATCG-Startmaterial-Konjugaten auch ein CPG-gebundenes 10mer ATCG-Carbonsäure-Konjugat **ATCG₁₀ 5** über Amidkupplung synthetisiert, um die Substrattoleranz der U-4CR auf Festphasen-gebundenen DNA-Oligonukleotiden zu untersuchen. Das CPG-gebundene 10mer ATCG-Carbonsäure-Konjugat **ATCG₁₀ 5** wurde mit einem aus Benzaldehyd **16e** und Propylamin **25b** gebildeten Imin sowie mit *tert*-Butylisocyanid **23s** versetzt und bei 50 °C über Nacht geschüttelt. Das Produkt **ATCG₁₀ 3bb** wurde mit einem Umsatz von 77 % gebildet (Schema 23).

Überführung chemischer Reaktionen auf CPG-gebundenen DNA-Oligonukleotiden und Entwicklung einer neuen Kodierungsstrategie



Schema 23: U-4CR auf CPG-gebundenem 10mer ATCG-Carbonsäure-Konjugat **ATCG₁₀ 5**.
^a Umsatzbestimmung mittels analytischer RP-HPLC-Analyse aus dem Verhältnis von Startmaterial **ATCG₁₀ 5** und Produkt **ATCG₁₀ 3bb**.^[156]

Als nächstes erfolgten Experimente zur Kopplung eines Isocyanids auf CPG-gebundener 10mer ATCG-DNA, was sich als nicht erfolgreich herausstellte. Als Amin-funktionalisiertes Startmaterial wurde die CPG-gebundene, 5'-Aminolinker-modifizierte 10mer ATCG-DNA **ATCG₁₀ 1** verwendet und zur Iminbildung mit diversen Aldehyden **16** für drei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden *tert*-Butylisocyanid **23s** und Essigsäure **22af** hinzugegeben und die Reaktionsmischung über Nacht bei 50 °C geschüttelt. Der höchste Umsatz mit 79 % wurde beim Einsatz von Cyclohexancarbaldehyd **16f** erzielt (Tabelle 6, Eintrag 1). Die Verwendung von diversen Benzaldehyden **16h-16l** führte unabhängig vom Substituenten (-Br, -Me) sowie dessen Positionierung zu moderaten Umsätzen zwischen 36 und 57 % (Tabelle 6, Einträge 2-7). Zu beobachten war, dass in allen Fällen Amidbindungen als konkurrierende Reaktion zur U-4CR zwischen der CPG-gebundenen, 5'-Aminolinker-modifizierten 10mer ATCG-DNA **ATCG₁₀ 1** und Essigsäure **22af** geknüpft wurden. Der Umsatz zum Amidkupplungsprodukt lag zwischen 10 bis 21 % (Tabelle 6, Einträge 1-7).

Überführung chemischer Reaktionen auf CPG-gebundenen DNA-Oligonukleotiden und Entwicklung einer neuen Kodierungsstrategie

Tabelle 6: Untersuchung des Substratspektrums der U-4CR auf CPG-gebundener, 5'-Aminolinker-modifizierter 10mer ATCG-DNA **ATCG₁₀ 1** durch Einsatz diverser Aldehyde.^{a [156]}

Eintrag	Produkt	Aldehyd	Umsatz [%] ^b	Amidbindungs- knüpfung [%] ^b	Masse _{ber.} Masse _{gef.} ^c
1	ATCG₁₀ 3bc	 16f	79	10	3434,5 3434,5
2	ATCG₁₀ 3bd	 16g	46	15	3478,5 3478,8
3	ATCG₁₀ 3be	 16h	40	16	3507,4 3508,9
4	ATCG₁₀ 3bf	 16i	57	17	3507,4 3509,1
5	ATCG₁₀ 3bg	 16j	56	15	3507,4 3507,2
6	ATCG₁₀ 3bh	 16k	36	21	3442,5 3443,9
7	ATCG₁₀ 3bi	 16l	42	19	3442,5 3444,4

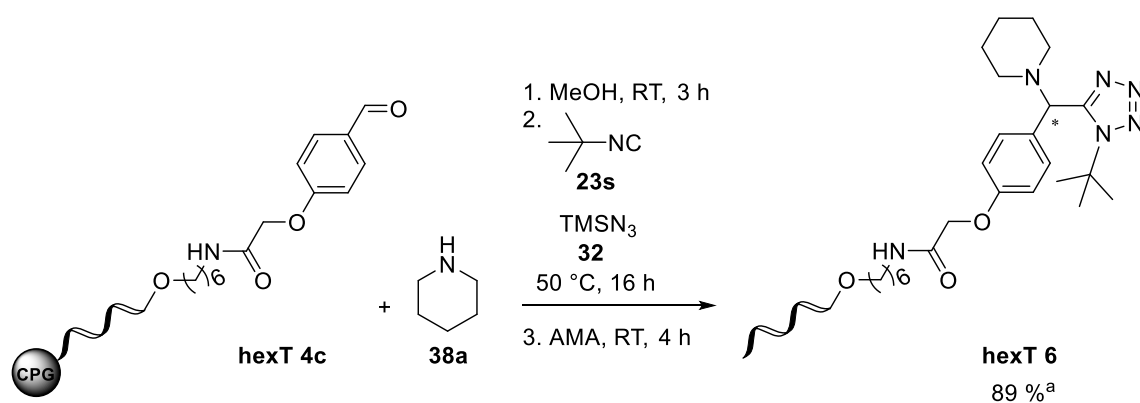
^a Die CPG-gebundene, 5'-Aminolinker-modifizierte 10mer ATCG-DNA **ATCG₁₀ 1** (20 nmol) und das Aldehyd **16** (1000 Äquiv., 20 µmol) wurden in 50 µL MeOH bei Raumtemperatur für drei Stunden zur Iminbildung inkubiert. Anschließend wurden *tert*-Butylisocyanid **23s** (1000 Äquiv., 20 µmol) und Essigsäure **22af** (1000 Äquiv., 20 µmol) hinzugegeben und die Reaktionsmischung wurde bei 50 °C für 16 h geschüttelt. Die Entschützung sowie die Abspaltung der DNA von der festen Phase erfolgte mit AMA-Lösung bei Raumtemperatur für 4 h. ^b Umsatzbestimmung mittels analytischer RP-HPLC-Analyse aus dem Verhältnis von Startmaterial **ATCG₁₀ 1** und Produkt **ATCG₁₀ 3**. ^c Massendetektion mittels MALDI-MS. 10mer ATCG = 5'-GTC ATG ATC T-3'.

Insgesamt konnte anhand der Untersuchungen zur U-4CR unter Verwendung milderer Reaktionsbedingungen demonstriert werden, dass die U-4CR zu keiner signifikanten DNA-Degradation der aus allen vier Nucleobasen bestehenden DNA-Sequenz führt und somit im Rahmen einer neuen Strategie zur Kodierung von Startmaterialien mittels ATCG-Oligonukleotiden eingesetzt werden kann.

4.2 Experimente zur Überführung der Ugi-Azid-Vierkomponentenreaktion zur Darstellung von Tetrazolen auf CPG-gebundenen DNA-Oligonukleotiden

Zur Erweiterung des Repertoires an organischen Synthesemethoden auf DNA-Oligonukleotiden wurde die Darstellung von 1,5-disubstituierten Tetrazolen über die von der herkömmlichen U-4CR abgeleiteten Ugi-Azid-Vierkomponentenreaktion ausgewählt.^[156]

In Anlehnung an die optimierten Reaktionsbedingungen der zuvor auf DNA-Oligonukleotiden etablierten U-4CR wurde das CPG-gebundene hexT-Aldehyd-Konjugat **hexT 4c** mit 1000 Äquiv. Piperidin **38a** für drei Stunden bei Raumtemperatur in Methanol zur Iminbildung inkubiert. Anschließend wurde die Zyklisierung zum gewünschten DNA-Konjugat **hexT 6** durch Zugabe von 1000 Äquiv. *tert*-Butylisocyanid **23s** und 1000 Äquiv. TMSN₃ **32** initiiert. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei 50 °C geschüttelt. Das Zielprodukt wurde mit einem Umsatz von 94 % generiert, weshalb keine weiteren Optimierungen vorgenommen wurden (Schema 24).



Schema 24: UA-4CR auf CPG-gebundenem hexT-Aldehyd-Konjugat **hexT 4c**. ^a Umsatzbestimmung mittels analytischer RP-HPLC-Analyse aus dem Verhältnis von Startmaterial **hexT 4c** und Produkt **hexT 6**.^[156]

Als nächstes wurde untersucht, ob die oben genannten Reaktionsbedingungen der UA-4CR auf 10mer ATCG-DNA-Oligonukleotiden übertragen werden können. Ausgehend von dem CPG-gebundenen ATCG-Aldehyd-Konjugat **ATCG**₁₀ **2a** konnte das gewünschte

10mer ATCG-Ugi-Azid-Konjugat **ATCG₁₀ 6a** mit einem Umsatz von 89 % gebildet werden, wobei keine DNA-Degradierung detektierbar war (Tabelle 7, Eintrag 1).

Um das Substratspektrum der UA-4CR auf dem CPG-gekoppelten 10mer ATCG-Aldehyd-Konjugat **ATCG₁₀ 2a** zu untersuchen, wurden unterschiedliche Isocyanide sowie verschiedene aliphatische und (hetero-)aromatische Amine getestet (Tabelle 7). Der Einsatz von *tert*-Butyl- **23s**, Cyclohexyl- **23l** sowie Benzylisocyanid **23a** resultierte in sehr guten Umsätzen zwischen 89 und 92 % des Startmaterials zu den jeweiligen Zielprodukten **ATCG₁₀ 6a-c** (Tabelle 7, Einträge 1-3). Im Gegensatz zu der zuvor getesteten U-4CR konnte bei der UA-4CR mit Ethylisocyanoacetat **23t** eine gute Produktbildung (67 %iger Umsatz) detektiert werden (Tabelle 7, Eintrag 4). Als nächstes wurden die benzyllischen Amine Benzylamin **25c**, *p*-Iodobenzylamin **25d** und *p*-Methoxybenzylamin **25e** in der UA-4CR untersucht und hierbei exzellente Umsätze zu den gewünschten Produkten **ATCG₁₀ 6e-g** beobachtet (Tabelle 7, Einträge 5-7). Außerdem verlief der Einsatz des heteroaromatischen Amins 2-Aminopyridin **43a** mit 73 % Umsatz erfolgreich (Tabelle 7, Eintrag 8) und Propylamin **25b** überzeugte mit 94 % Umsatz (Tabelle 7, Eintrag 9). Ferner wurde der Einfluss des Substitutionsmusters von Anilinen auf die UA-4CR untersucht (Tabelle 7, Einträge 10-16). *Ortho*-substituierte Aniline wurden nicht bzw. nur schlecht toleriert. Während *ortho*-substituiertes *tert*-Butylanilin **25f** zu einem 15 %igen Umsatz führte (Tabelle 7, Eintrag 10), konnte mit einer Nitrogruppe in *ortho*-Stellung (**25g**) kein Produkt detektiert werden (Tabelle 7, Eintrag 11). Erneut kann dies auf die Position und/oder auf die Größe der Substituenten zurückzuführen sein. Hingegen konnte sowohl mit einer elektronenschiebenden Ethylgruppe als auch mit einem elektronenziehenden Fluorsubstituenten in *meta*-Position Umsätze von 84 und >95 % erzielt werden (Tabelle 7, Einträge 12 und 13). Weiterhin führte auch der Einsatz von verschiedenen *para*-substituierten Anilinen (**25j-25l**) zur Bildung der jeweiligen Produkte **ATCG₁₀ 6n-p** mit sehr guten Umsätzen (Tabelle 7, Einträge 14-16). Dabei war es gleichgültig, ob der Substituent von elektronenschiebender oder elektronenziehender Natur war. Im Vergleich zu der zuvor auf CPG-gekoppelten DNA-Oligonukleotiden durchgeführten U-4CR konnte beobachtet werden, dass die UA-4CR in deutlich geringerer Nebenproduktbildung bei der Untersuchung der verschiedenen Aniline resultierte. Abschließend wurde ein Boc-geschütztes Aminopiperazin **38b** getestet und hierbei ein Umsatz zum Zielprodukt **ATCG₁₀ 6q** von über 95 % beobachtet (Tabelle 7, Eintrag 17). Dieses konnte daraufhin durch einminütige Inkubation mit 50 % TFA^[16] mit 66 %igen Umsatz zum gewünschten Produkt **ATCG₁₀ 7** entschützt werden.


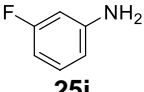

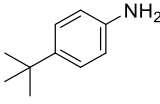

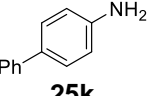

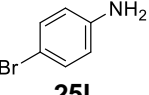

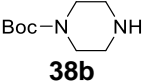
Überführung chemischer Reaktionen auf CPG-gebundenen DNA-Oligonukleotiden und
Entwicklung einer neuen Kodierungsstrategie

Tabelle 7: Untersuchung des Substratspektrums der UA-4CR auf CPG-gebundenem 10mer ATCG-Aldehyd-Konjugat **ATCG₁₀ 2a** durch Einsatz diverser Isocyanide und Amine.^{a [156]}

1. MeOH, RT, 3 h
2. R³-NC
23
TMSN₃
32
50 °C, 16 h
3. AMA, RT, 4 h

Eintrag	Produkt	Isocyanid	Amin	Umsatz [%] ^b	Masse _{ber.} Masse _{gef.} ^c
1	ATCG₁₀ 6a	23s	38a	89	3552,6 3551,3
2	ATCG₁₀ 6b	23l	38a	92	3578,7 3577,6
3	ATCG₁₀ 6c	23a	38a	90	3586,6 3585,9
4	ATCG₁₀ 6d	23t	38a	67	3567,6 3566,9
5	ATCG₁₀ 6e	23s	25c	>95	3574,6 3573,5
6	ATCG₁₀ 6f	23s	25d	92	3700,5 3701,2
7	ATCG₁₀ 6g	23s	25e	93	3604,6 3604,4
8	ATCG₁₀ 6h	23s	43a	73	3561,6 3560,5
9	ATCG₁₀ 6i	23s	25b	94	3526,6 3526,1
10	ATCG₁₀ 6j	23s	25f	15	3616,7 3615,9
11	ATCG₁₀ 6k	23s	25g	n.d.	3605,6 n.d.
12	ATCG₁₀ 6l	23s	25h	>95	3588,7 3589,6

Fortsetzung Tabelle 7

13	ATCG₁₀ 6m	 23s	 25i	84	3578,6 3579,1
14	ATCG₁₀ 6n	 23s	 25j	90	3616,7 3616,9
15	ATCG₁₀ 6o	 23s	 25k	90	3636,7 3636,7
16	ATCG₁₀ 6p	 23s	 25l	88	3639,5 3639,7
17	ATCG₁₀ 6q	 23s	 38b	>95	3653,7 3653,9

^a Das CPG-gebundene 10mer ATCG-Aldehyd-Konjugat **ATCG₁₀ 2a** (20 nmol) und das (primäre/sekundäre) Amin **25/38** (1000 Äquiv., 20 μ mol) wurden in 50 μ L MeOH bei Raumtemperatur für drei Stunden zur Iminbildung inkubiert. Anschließend wurden das Isocyanid **23** (1000 Äquiv., 20 μ mol) und TMSN₃ **32** (1000 Äquiv., 20 μ mol) hinzugegeben und die Reaktionsmischung wurde bei 50 °C für 16 h geschüttelt. Die Entschützung sowie die Abspaltung der DNA von der festen Phase erfolgte mit AMA-Lösung bei Raumtemperatur für 4 h. ^b Umsatzbestimmung mittels analytischer RP-HPLC-Analyse aus dem Verhältnis von Startmaterial **ATCG₁₀ 2a** und Produkt **ATCG₁₀ 6**. ^c Massendetektion mittels MALDI-MS. 10mer ATCG = 5'-GTC ATG ATC T-3'. n.d. = nicht detektiert.

Die Synthese von 1,5-disubstituierten Tetrazolen über die UA-4CR konnte problemlos auf CPG-gebundenen DNA-Oligonukleotiden übertragen werden. Drei von vier getesteten Isocyaniden lieferten die gewünschten DNA-Tetrazol-Konjugate mit sehr guten Umsätzen (Tabelle 7). Mit Ausnahme von *ortho*-substituierten Anilinen konnte bei Einsatz diverser Amine ebenfalls gute bis exzellente Umsätze erzielt werden.

4.3 Experimente zur Überführung der Ugi-Vierkomponenten-aza-Wittig-Reaktionssequenz zur Darstellung von 1,3,4-Oxadiazolen auf CPG-gebundenen DNA-Oligonukleotiden

Eine weitere Reaktion, die ausgewählt wurde, um das Spektrum an chemischen Reaktionen zur Synthese von DELs zu erweitern, ist die Ugi-Vierkomponenten-aza-Wittig-Reaktionssequenz, welche zur Darstellung von 1,3,4-Oxadiazolen dient.^[156]

Ähnlich zur U-4CR und UA-4CR wurde das CPG-gebundene hexT-Aldehyd-Konjugat **hexT 4c** zunächst mit 1000 Äquiv. Piperidin **38a** für drei Stunden bei Raumtemperatur zur Bildung eines Imins inkubiert. Die eigentliche Zyklisierung zum gewünschten hexT-U-4CR/aza-Wittig-Konjugat **hexT 7a** wurde durch Zugabe von 1000 Äquiv. Benzoesäure **22ak** und 1000 Äquiv. (*N*-Isocyanimino)triphenylphosphoran **39**

Überführung chemischer Reaktionen auf CPG-gebundenen DNA-Oligonukleotiden und Entwicklung einer neuen Kodierungsstrategie

initiiert. Im Unterschied zu den zuvor etablierten Reaktionen wurde in Anlehnung von publizierten Bedingungen statt Methanol das Lösungsmittel 1,2-Dichlorethan verwendet.^[125] Auch musste für den Schritt der Iminbildung, um die Reaktanden zu lösen, ein höheres Volumen an Lösungsmittel (50 μL vs. 110 μL) verwendet werden. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei 50 °C geschüttelt. Das Zielprodukt wurde mit exzellentem Umsatz gebildet, weshalb keine weiteren Optimierungen vorgenommen wurden (Tabelle 8, Eintrag 1).

Motiviert durch diesen Befund wurde als nächstes die Überführung der U-4CR/aza-Wittig-Reaktion auf CPG-gekoppelten 10mer ATCG-DNA-Oligonukleotiden untersucht. Ausgehend von dem 10mer ATCG-Aldehyd-Konjugat **ATCG₁₀ 2a** konnte die Bildung des Zielprodukts **ATCG₁₀ 8a** über MALDI-MS detektiert werden, allerdings kam es gleichzeitig zu erheblicher Degradation der DNA (Abb. 29).

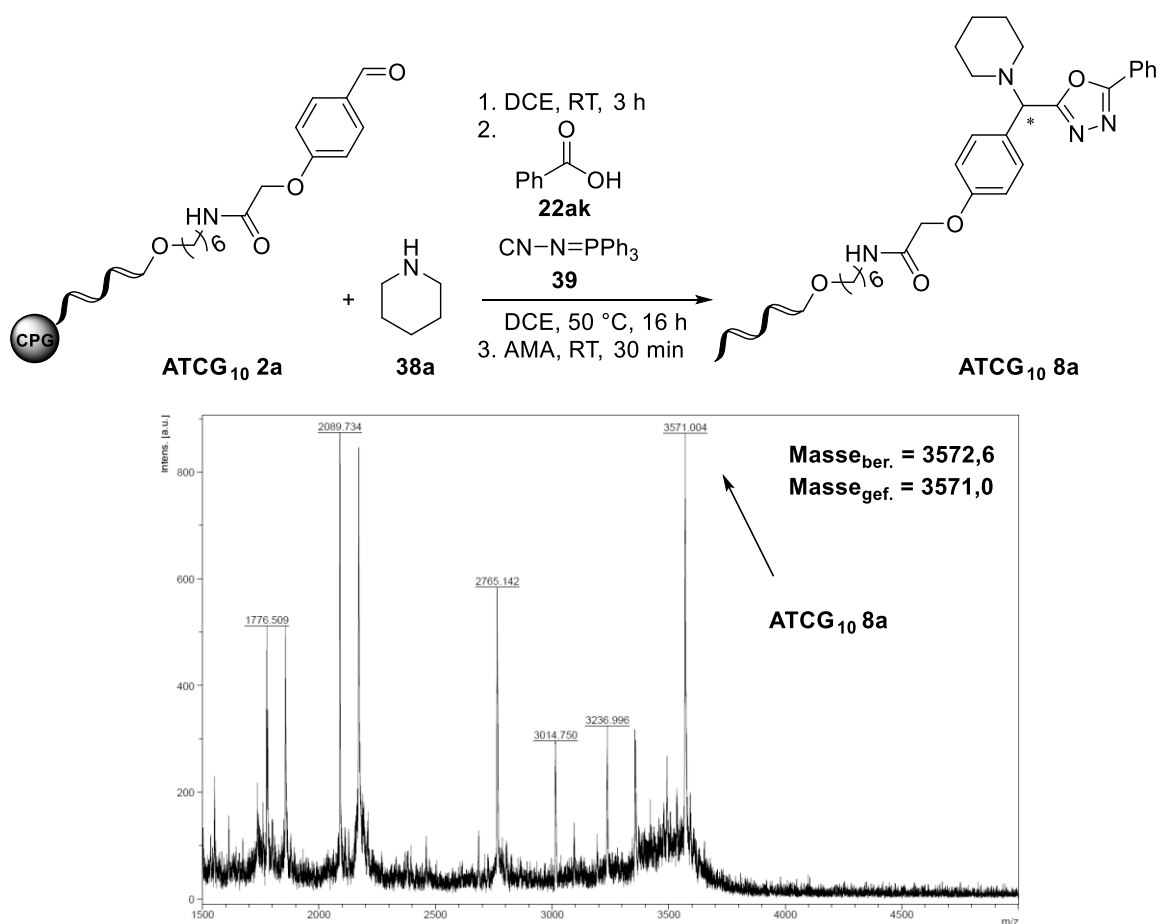


Abbildung 29: U-4CR/aza-Wittig-Reaktion auf CPG-gebundener 10mer ATCG-DNA und MALDI-MS-Analyse der Reaktionsmischung.^[156]

Aufgrund der signifikanten Degradation der ATCG-DNA wurde das Substratspektrum der U-4CR/aza-Wittig-Reaktion hinsichtlich unterschiedlicher Benzoesäuren auf dem CPG-gebundenen hexT-Aldehyd-Konjugat **hexT 4c** untersucht (Tabelle 8). Der Einsatz von *ortho*-substituierten Benzoesäuren (**22aI**, **22aM** und **22aR**) resultierte in geringen

Überführung chemischer Reaktionen auf CPG-gebundenen DNA-Oligonukleotiden und Entwicklung einer neuen Kodierungsstrategie


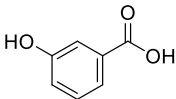

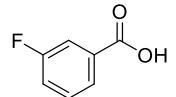

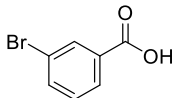

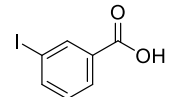

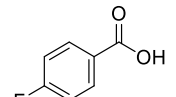

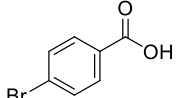
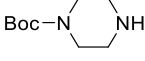
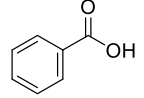
Umsätzen zwischen 13 und 31 % zu den gewünschten Produkten **hexT 7b-d** (Tabelle 8, Einträge 2-4). Einen ebenfalls niedrigen Umsatz von 29 % wurde mit *meta*-Hydroxybenzoesäure **22ao** erzielt (Tabelle 8, Eintrag 5). Die Verwendung von *meta*-substituierter Fluoro- **22as** bzw. Brombenzoesäure **22at** führte hingegen mit sehr guten Umsätzen zu den jeweiligen Zielprodukten **hexT 7f** und **hexT 7g** (Tabelle 8, Einträge 6 und 7). Ein *meta*-positionierter Iodsubstituent reduzierte den Umsatz wiederum auf 61 % (Tabelle 8, Eintrag 8). Ebenfalls gute Umsätze von 69 und 73 % konnten mit *para*-substituierten Halid-Benzoesäuren (4-Fluoro- **22au** und 4-Brombenzoesäure **22av**) beobachtet werden (Tabelle 8, Einträge 9 und 10). Hinsichtlich einer möglichen DEL-Synthesestrategie wurde abschließend Boc-geschütztes Aminopiperazin **38b** getestet. Dies resultierte in einem Umsatz von 81 % zu dem gewünschten Boc-geschützten Zielprodukt **hexT 7k** (Tabelle 8, Eintrag 11), welches im Anschluss durch Inkubation mit 10 % TFA für 4 h^[47] vollständig zu **hexT 8** entschützt werden konnte.

Tabelle 8: Untersuchung des Substratspektrums der U-4CR/aza-Wittig-Reaktion auf CPG-gebundenem hexT-Aldehyd-Konjugat **hexT 4c** durch Einsatz diverser Säuren und Aminen.^{a [156]}

Eintrag	Produkt	Amin	Säure	Umsatz [%] ^b	Masse _{ber.} Masse _{gef.} ^c
1	hexT 7a	 38a	 22ak	>95	2316,8 2317,7
2	hexT 7b	 38a	 22al	30	2351,2 2353,0
3	hexT 7c	 38a	 22am	31	2385,7 2386,3
4	hexT 7d	 38a	 22ar	13	2395,7 2395,7

Überführung chemischer Reaktionen auf CPG-gebundenen DNA-Oligonukleotiden und
Entwicklung einer neuen Kodierungsstrategie

Fortsetzung Tabelle 8

5	hexT 7e	 38a	 22ao	29	2332,8 2333,5
6	hexT 7f	 38a	 22as	>95	2334,8 2336,1
7	hexT 7g	 38a	 22at	>95	2395,7 2396,6
8	hexT 7h	 38a	 22an	61	2442,7 2443,8
9	hexT 7i	 38a	 22au	73	2334,8 2336,1
10	hexT 7j	 38a	 22av	68	2395,7 2397,6
11	hexT 7k	 38b	 22ak	81	2417,9 2415,7

^a Das CPG-gebundene hexT-Aldehyd-Konjugat **hexT 4c** (20 nmol) und das Amin **38** (1000 Äquiv., 20 µmol) wurden in 30 µL DCE bei Raumtemperatur für drei Stunden zur Iminbildung inkubiert. Anschließend wurden das Isocyanid **39** (1000 Äquiv., 20 µmol) und die Säure **22** (1000 Äquiv., 20 µmol), gelöst in 80 µL DCE, hinzugegeben und die Reaktionsmischung wurde bei 50 °C für 16 h geschüttelt. Die Entschützung sowie die Abspaltung der DNA von der festen Phase erfolgte mit AMA-Lösung bei Raumtemperatur für 0,5 h.
^b Umsatzbestimmung mittels RP-HPLC-Analyse aus dem Verhältnis von Startmaterial **hexT 4c** und Produkt **hexT 7**. ^c Massendetektion mittels MALDI-MS.

Die hier etablierten Reaktionsbedingungen zur U-4CR/aza-Wittig-Reaktion haben sich als nicht kompatibel mit ATCG-DNA-Sequenzen herausgestellt. Um die U-4CR/aza-Wittig-Reaktion trotzdem in einer DEL-Synthese einsetzen zu können, müsste erneut auf das im Arbeitskreis Brunschweiger etablierte TiDEC-Kodierungsformat zurückgegriffen werden. Demnach müssten zunächst diskrete Unterbibliotheken bestehend aus hexT-gekoppelten 1,3,4-Oxadiazolen hergestellt werden. Ferner wurden bei den Untersuchungen zur U-4CR/aza-Wittig-Reaktion Unterschiede in der Reaktivität der Substrate deutlich (Tabelle 8). Während mit *meta*- und *para*-substituierten Benzoesäuren, mit Ausnahme von *meta*-Hydroxybenzoesäure, gute bis sehr gute Umsätze erzielt werden konnten, wurden bei Einsatz von *ortho*-substituierten Benzoesäuren lediglich geringe Umsätze beobachtet.

4.4 Experimente zur Überführung der Groebke-Blackburn-Bienaymé-Dreikomponentenreaktion zur Darstellung von Imidazo[1,2- α]-Heterozyklen auf CPG-gebundenen DNA-Oligonukleotiden

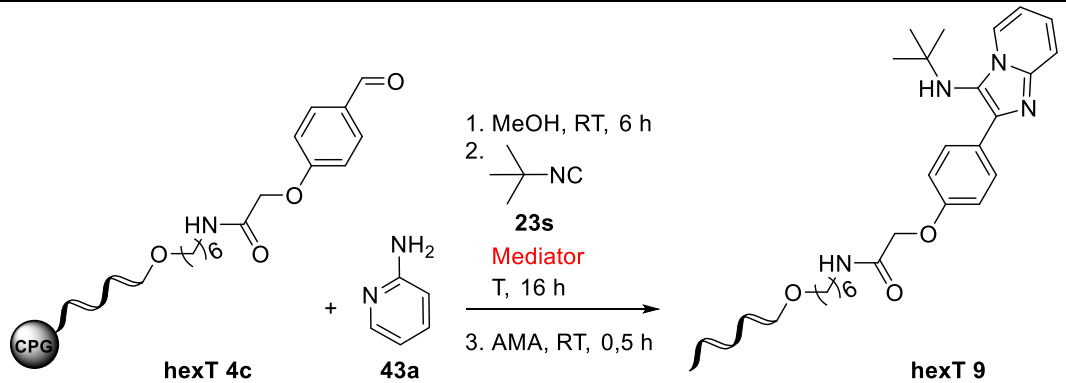
Die Groebke-Blackburn-Bienaymé-Dreikomponentenreaktion stellt eine attraktive Synthesemethode zur Darstellung von Imidazo[1,2- α]-Heterozyklen dar.

Um auch die GBB-3CR im Rahmen einer DEL-Synthese einsetzen zu können, erfolgten zunächst Experimente zur Überführung dieser Reaktion auf dem CPG-gebundenen hexT-Aldehyd-Konjugat **hexT 4c**.^[156] Da die GBB-3CR sowohl Brønsted- als auch Lewis-Säure-vermittelt durchgeführt werden kann,^[127–129] wurden in ersten Experimenten unterschiedliche saure Katalysatoren untersucht. Hierfür wurde das CPG-gekoppelte hexT-Aldehyd-Konjugat **hexT 4c** zunächst mit 1000 Äquiv. 2-Aminopyridin **43a** für sechs Stunden bei Raumtemperatur in Methanol zur Iminbildung inkubiert. Anschließend wurde die Zyklisierung zum gewünschten DNA-Konjugat **hexT 9** durch Zugabe von 1000 Äquiv. *tert*-Butylisocyanid **23s** in Gegenwart von 150 Äquiv. Lewis-Säure bzw. 1 % (v/v) Brønsted-Säure initiiert. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt. Es konnte bei allen getesteten Lewis- als auch Brønsted-Säuren Produktbildung detektiert werden (Tabelle 9). Während bei den untersuchten Lewis-Säuren (Sc(OTf)₃, Yb(OTf)₃ und InCl₃) das Zielprodukt **hexT 9** mit relativ ähnlichen Umsätzen zwischen 59 und 78 % generiert wurde (Tabelle 9, Einträge 1-3), wobei Sc(OTf)₃ den höchsten Umsatz erzielte, konnten in Anwesenheit der Brønsted-Säuren (HClO₄, TFA, pTsOH und AcOH) drastische Unterschiede im Umsatz beobachtet werden (Tabelle 9, Einträge 4-7). Der Einsatz von 1 %iger Perchlorsäure führte lediglich zu einem Umsatz von 20 % bei gleichzeitiger starker Nebenproduktbildung (Tabelle 9, Eintrag 4). Die Bildung von Nebenprodukten konnte ebenfalls in Gegenwart von Trifluoressigsäure beobachtet werden, wobei durch Verwendung von TFA ein höherer Umsatz von 54 % erzielt werden konnte (Tabelle 9, Eintrag 5). Sowohl mit *para*-Toluolsulfonsäure als auch mit Essigsäure konnte ein exzellenter Umsatz von 93 bzw. 97 % zum gewünschten hexT-Konjugat **hexT 9** detektiert werden (Tabelle 9, Einträge 6 und 7). Im Nachfolgenden wurde auf Essigsäure als Mediator der GBB-3CR aufgrund der Verfügbarkeit und der Handhabung zurückgegriffen.

Zusammengefasst sind die optimalen Reaktionsbedingungen für die GBB-3CR die Iminbildung von CPG-gekoppelten DNA-Aldehyd-Konjugaten mit 1000 Äquiv. Amin bei Raumtemperatur in Methanol für sechs Stunden. Im Anschluss werden 1000 Äquiv. Isocyanid und 1 % AcOH zugegeben und die Reaktionsmischung über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt.

Überführung chemischer Reaktionen auf CPG-gebundenen DNA-Oligonukleotiden und Entwicklung einer neuen Kodierungsstrategie

Tabelle 9: Optimierung der GBB-3CR auf CPG-gebundenem hexT-Aldehyd-Konjugat **hexT 4c**.^{a [156]}



Eintrag	Mediator	Umsatz [%] ^b
1	150 Äquiv. Sc(OTf) ₃	78
2	150 Äquiv. Yb(OTf) ₃	66
3	150 Äquiv. InCl ₃	59
4	1 % HClO ₄	20
5	1 % TFA	54
6	1 % pTSA	93
7	1 % AcOH	97

^a Das CPG-gebundene hexT-Aldehyd-Konjugat **hexT 4c** (20 nmol) und das 2-Aminopyridin **43a** (1000 Äquiv., 20 µmol) wurden in 50 µL MeOH bei Raumtemperatur für sechs Stunden zur Iminbildung inkubiert. Anschließend wurden *tert*-Butylisocyanid **23s** (1000 Äquiv., 20 µmol) und entweder MeOH sowie eine Brønsted-Säure (finale Säurekonzentration: 1 % (v/v) in 80 µL MeOH) oder 30 µL einer Suspension aus Lewis-Säure (150 Äquiv., 3 µmol) in MeOH hinzugegeben und die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur für 16 h geschüttelt. Die Entschützung sowie die Abspaltung der DNA von der festen Phase erfolgte mit AMA-Lösung bei Raumtemperatur für 0,5 h. ^b Umsatzbestimmung mittels analytischer RP-HPLC-Analyse aus dem Verhältnis von Startmaterial **hexT 4c** und Produkt **hexT 9**.

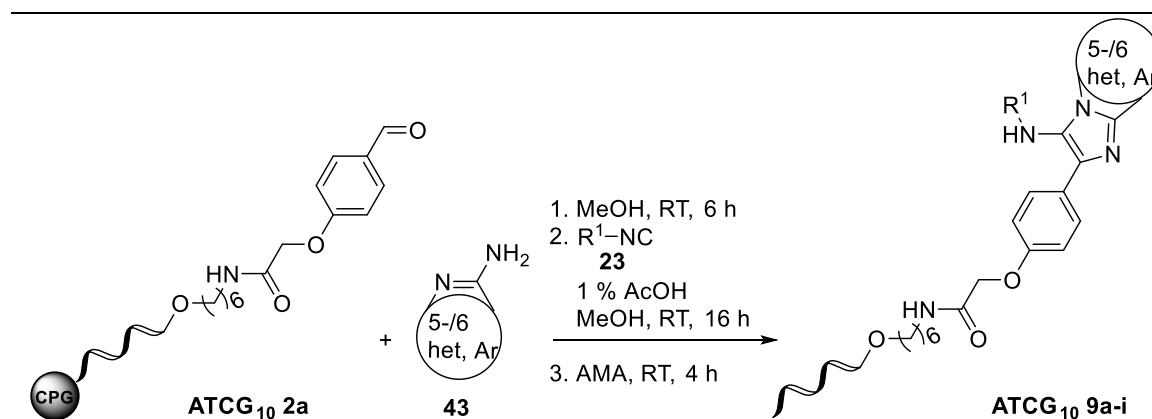
Als nächstes wurde untersucht, ob die auf CPG-gekoppelter hexT-DNA etablierten Reaktionsbedingungen auf das entsprechende 10mer ATCG-Aldehyd-Konjugat **ATCG₁₀ 2a** übertragen werden können. Erfreulicherweise konnte das gewünschte 10mer ATCG-GBB-3CR-Produkt **ATCG₁₀ 9a** mit einem Umsatz von 84 % und keiner detektierbaren DNA-Degradation gebildet werden (Tabelle 10, Eintrag 1).

Da die GBB-CR problemlos auf die ATCG-DNA-Sequenz übertragen werden konnte, wurden im Folgenden Untersuchungen zum Substratspektrum der Reaktion auf dem CPG-gekoppelten 10mer ATCG-Aldehyd-Konjugat **ATCG₁₀ 2a** unter Verwendung von verschiedenen Isocyaniden **23** und heterozyklischen Amidinen **43** durchgeführt (Tabelle 10). Der Einsatz von *tert*-Butyl- **23s**, Cyclohexyl- **23l** sowie Benzylisocyanid **23a** führte zu guten Umsätzen zwischen 79 und 85 % (Tabelle 10, Einträge 1-3). Lediglich mit Ethylisocanoacetat **23t** konnte ein moderater Umsatz von 52 % detektiert werden (Tabelle 10, Eintrag 4). Ein deutlicher Unterschied in der Reaktivität konnte beim Einsatz unterschiedlich substituierter heteroaromatischer Amine beobachtet werden (Tabelle 10, Einträge 5-9). *Ortho*-substituiertes 2-Amino-3-Methylpyridin **43b** führte zu einem vergleichsweise geringen Umsatz von 23 % gegenüber unsubstituiertem 2-Aminopyridin

Überführung chemischer Reaktionen auf CPG-gebundenen DNA-Oligonukleotiden und Entwicklung einer neuen Kodierungsstrategie

43a (84 %iger Umsatz) als auch gegenüber 2-Amino-5-methylpyridin **43c** mit einer Methylgruppe in *para*-Position zur Aminofunktion (Umsatz >95 %) (Tabelle 10, Einträge 1, 5 und 6). Ferner resultierte der Einsatz von 2-Aminopyrimidin **43d** sowie 2-Aminothiazol **43e**, welche über ein zusätzliches Heteroatom in *ortho*-Stellung zur Aminofunktion verfügen, zu niedrigen Umsätzen von 29 und 26 % (Tabelle 10, Einträge 7 und 8), während 2-Aminopyrazin **43f** mit einem weiteren *meta*-positionierten Stickstoff zur freien Aminofunktion das gewünschte Zielprodukt **ATCG₁₀ 9i** in quantitativem Umsatz generierte (Tabelle 10, Eintrag 9).

Tabelle 10: Untersuchung des Substratspektrums der GBB-3CR auf CPG-gebundenem 10mer ATCG-Aldehyd-Konjugat **ATCG₁₀ 2a** durch Einsatz unterschiedlicher Isocyanide und Amine.^{a [156]}



Eintrag	Produkt	Isocyanid	Amin	Umsatz [%] ^b	Masse _{ber.} Masse _{gef.} ^c
1	ATCG₁₀ 9a	23s	43a	84	3518,6 3518,2
2	ATCG₁₀ 9b	23l	43a	85	3544,6 3544,2
3	ATCG₁₀ 9c	23a	43a	79	3552,6 3551,0
4	ATCG₁₀ 9d	23t	43a	52	3531,7 3533,6
5	ATCG₁₀ 9e	23s	43b	23	3532,6 3531,4
6	ATCG₁₀ 9f	23s	43c	>95	3532,6 3531,7
7	ATCG₁₀ 9g	23s	43d	29	3519,5 3519,3
8	ATCG₁₀ 9h	23s	43e	26	3524,6 3525,2

Fortsetzung Tabelle 10

9	ATCG₁₀ 9i	 23s	 43f	>95	3519,5 3516,9
---	---------------------------------------	---	---	-----	------------------

^a Das CPG-gebundene 10mer ATCG-Aldehyd-Konjugat **ATCG₁₀ 2a** (20 nmol) und das Amin **43** (1000 Äquiv., 20 µmol) wurden in 50 µL MeOH bei Raumtemperatur für sechs Stunden zur Iminbildung inkubiert. Anschließend wurden das Isocyanid **23** (1000 Äquiv., 20 µmol) und AcOH hinzugegeben (finale Essigsäurekonzentration: 1 % (v/v) in 80 µL MeOH) und die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur für 16 h geschüttelt. Die Entschützung sowie die Abspaltung der DNA von der festen Phase erfolgte mit AMA-Lösung bei Raumtemperatur für 4 h. ^b Umsatzbestimmung mittels analytischer RP-HPLC-Analyse aus dem Verhältnis von Startmaterial **ATCG₁₀ 2a** und Produkt **ATCG₁₀ 9**. ^c Massendetektion mittels MALDI-MS. 10mer ATCG = 5'-GTC ATG ATC T-3'.

Die Groebke-Blackburn-Bienaymé-Dreikomponentenreaktion zur Darstellung von Imidazo[1,2-*α*]-Heterozyklen konnte erfolgreich auf der CPG-gebundenen hexT-DNA etabliert werden und ohne detektierbare DNA-Degradation auf eine ebenfalls CPG-gebundene ATCG-DNA überführt werden. Das hier untersuchte Substratspektrum zeigt deutliche Unterschiede in der Reaktivität der Reaktanden. Mit Ausnahme von *ortho*-substituierten, heterozyklischen Amidinen, welche zu geringeren Umsätzen des Startmaterials zu jeweiligen Produkten führten, wurden gute bis exzellente Umsätze beobachtet (Tabelle 10).

4.5 Experimente zur Überführung der 1,3-dipolaren Azomethin-Ylid-Cycloaddition zur Darstellung von substituierten Pyrrolidinen auf CPG-gebundenen DNA-Oligonukleotiden

Die nächste Reaktion, die hinsichtlich der Überführung auf DNA-Molekül-Konjugaten untersucht wurde, ist die Ag(I)-vermittelte 1,3-dipolare Azomethin-Ylid-Cycloaddition.^[155]

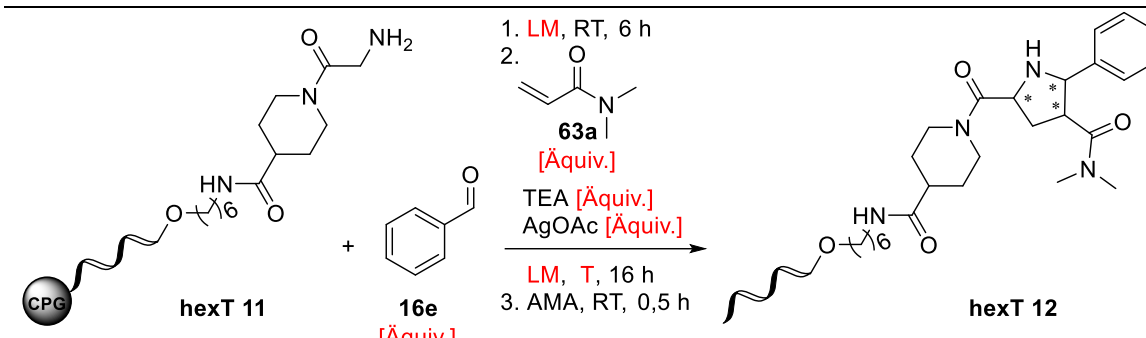
Zur Etablierung der Ag(I)-vermittelten 1,3-dipolaren Azomethin-Ylid-Cycloaddition zur Darstellung von substituierten Pyrrolidinen auf CPG-gekoppelten DNA-Oligonukleotiden wurde als Startmaterial ein CPG-gebundenes hexT-Glycin-Konjugat **hexT 11** über die Zwischenstufe eines CPG-gebundenen hexT-Piperidin-Konjugats **hexT 10** mit Hilfe von Amidkupplungsreaktionen hergestellt. Anfänglich wurde das CPG-gekoppelte hexT-Glycin-Konjugat **hexT 11** mit 1000 Äquiv. Benzaldehyd **16e** zur Bildung des Imins bei Raumtemperatur für sechs Stunden in Acetonitril inkubiert. Die Cycloaddition erfolgte durch Zugabe von 1000 Äquiv. *N,N*-Dimethylacrylamid **63a** als Dipolarophil, 1000 Äquiv. Triethylamin als Base sowie 100 Äquiv. des Mediators AgOAc bei gleichbleibender Temperatur über Nacht. Es konnte ein Reaktionsumsatz von 31 % zum Zielprodukt **hexT 12** beobachtet werden (Tabelle 11, Eintrag 1). Um den Reaktionsumsatz zu steigern, wurden zunächst unterschiedliche Mengen an AgOAc bei zwei verschiedenen

Temperaturen getestet (Tabelle 11, Einträge 2-4). Bei Raumtemperatur konnte kein Unterschied in der Verwendung von 100 Äquiv. bzw. 200 Äquiv. AgOAc beobachtet werden (Tabelle 11, Einträge 1 und 2). Wurde die Temperatur während des Schrittes der Cycloaddition von Raumtemperatur auf 40 °C erhöht, so zeigte die Verwendung von 200 Äquiv. AgOAc einen Umsatz von bis zu 36 % (Tabelle 11, Eintrag 4), während eine niedrigere Mediatormenge von 100 Äquiv. AgOAc in einem Umsatz von 48 % zum gewünschten DNA-Konjugat **hexT 12** resultierte (Tabelle 11, Eintrag 3). Als nächstes wurden die Äquivalente der Reaktanden bei einer gleichbleibenden Mediatormenge von 100 Äquiv. erhöht (Tabelle 11, Einträge 5 und 6). Während mit 2000 Äquiv. an Reaktanden ein 41 %iger Umsatz des Startmaterials **hexT 11** zum Zielprodukt **hexT 12** beobachtet wurde (Tabelle 11, Eintrag 5), konnte mit 4000 Äquiv. an Reaktanden ein Umsatz von 53 % erzielt werden (Tabelle 11, Eintrag 6). In den nächsten Experimenten wurde der Einfluss unterschiedlicher Reaktandenverhältnisse auf die Reaktion untersucht und gleichzeitig die Temperatur des Cycloadditionsschrittes auf 50 °C erhöht (Tabelle 11, Einträge 7 und 8). Der Umsatz konnte auf 68 bzw. 70 % erhöht werden durch die Veränderung des Verhältnisses von Benzaldehyd **16e** zu *N,N*-Dimethylacrylamid **63a** und Triethylamin von 1:1:1 zu 1:3:3 bzw. 1:4:4 (Tabelle 11, Einträge 7 und 8). Die zusätzliche Verwendung des Trocknungsmittels Triethylorthoformiat (TEOF), welches in einem 1:2-Verhältnis mit Acetonitril gemischt wurde, führte ebenfalls zu einem Umsatz von 70 % (Tabelle 11, Eintrag 9), weshalb in den Folgeexperimenten weiterhin TEOF als wasserbindendes Mittel für die Reaktion genutzt wurde. Ferner wurden unterschiedliche Silbersalze als Mediatoren untersucht: AgTFA, AgSbF₆ sowie AgOTf (Tabelle 11, Einträge 10-12). Es wurde festgestellt, dass die Veränderung des Silbersalzes keinen nennenswerten Einfluss auf den Reaktionsumsatz hat. Hingegen konnte eine deutliche Abnahme des Umsatzes auf 43 % bei gleichzeitiger Bildung von mehreren Nebenprodukten beobachtet werden, wenn Methanol als Lösungsmittel genutzt wurde (Tabelle 11, Eintrag 13). Die Verwendung von Toluol führte lediglich zu einer geringfügigen Abnahme des Umsatzes auf 59 % (Tabelle 11, Eintrag 14), während mit Tetrahydrofuran ebenfalls ein Reaktionsumsatz von 70 % erzielt wurde (Tabelle 11, Eintrag 15).

Die systematische Untersuchung unterschiedlicher Parameter zur Etablierung der Ag(I)-vermittelten Azomethin-Ylid-Cycloaddition auf DNA-Molekül-Konjugaten führte letztendlich zu folgenden optimierten Reaktionsbedingungen: Im ersten Schritt erfolgt die Iminbildung zwischen dem DNA-Glycin-Konjugat und 1000 Äquiv. Aldehyd in einem Lösungsmittelgemisch bestehend aus Acetonitril/TEOF (2:1) bei Raumtemperatur für sechs Stunden. Der Schritt der Cycloaddition erfolgt durch Zugabe von 4000 Äquiv. eines Dipolarophils, 4000 Äquiv. einer Base und 100 Äquiv. AgOAc über Nacht bei 50 °C.

Überführung chemischer Reaktionen auf CPG-gebundenen DNA-Oligonukleotiden und Entwicklung einer neuen Kodierungsstrategie

Tabelle 11: Optimierung der Ag(I)-vermittelten 1,3-dipolaren Azomethin-Ylid-Cycloaddition auf CPG-gebundenem hexT-Glycin-Konjugat **hexT 11**.^a[155]



Eintrag	16e [Äquiv.]	63a + TEA [Äquiv.]	AgOAc [Äquiv.]	T [°C]	Lösungsmittel	Umsatz [%] ^b
1	1000	1000	100	22	ACN	31
2	1000	1000	200	22	ACN	29
3	1000	1000	100	40	ACN	48
4	1000	1000	200	40	ACN	36
5	2000	2000	100	40	ACN	41
6	4000	4000	100	40	ACN	53
7	1000	3000	100	50	ACN	68
8	1000	4000	100	50	ACN	70
9	1000	4000	100	50	ACN/TEOF (2:1)	70
10 ^c	1000	4000	100	50	ACN/TEOF (2:1)	66
11 ^d	1000	4000	100	50	ACN/TEOF (2:1)	68
12 ^e	1000	4000	100	50	ACN/TEOF (2:1)	68
13	1000	4000	100	50	MeOH/TEOF (2:1)	43
14	1000	4000	100	50	Toluol/TEOF (2:1)	59
15	1000	4000	100	50	THF/TEOF (2:1)	70

^a Das CPG-gebundene hexT-Glycin-Konjugat **hexT 11** (20 nmol) und Benzaldehyd **16e** (X Äquiv.) wurden in 50 μ L Lösungsmittel bei Raumtemperatur für sechs Stunden zur Iminbildung inkubiert. Anschließend wurden *N,N*-Dimethylacrylamid **63a** (X Äquiv.), Triethylamin (X Äquiv.) und AgOAc (X Äquiv.), gelöst in 30 μ L Lösungsmittel, hinzugegeben und die Reaktionsmischung wurde bei T für 16 h geschüttelt. Die Entschützung sowie die Abspaltung der DNA von der festen Phase erfolgte mit AMA-Lösung bei Raumtemperatur für 0,5 h.

^b Umsatzbestimmung mittels analytischer RP-HPLC-Analyse aus dem Verhältnis von Startmaterial **hexT 11** und Produkt **hexT 12**. ^c AgTFA wurde statt AgOAc als Mediator verwendet. ^d AgSbF₆ wurde statt AgOAc als Mediator verwendet. ^e AgOTf wurde statt AgOAc als Mediator verwendet.

Als nächstes wurde untersucht, ob die optimierten Reaktionsbedingungen auf eine 10mer ATCG-DNA-Sequenz überführt werden können. Entsprechend wurde hierfür das benötigte CPG-gebundene ATCG-Glycin-Konjugat **ATCG₁₀ 11** mittels Amidkupplung hergestellt. Erfreulicherweise wurde das gewünschte 10mer ATCG-Produkt **ATCG₁₀ 12a** mit 50 %igem Umsatz gebildet und es konnte keine DNA-Degradation beobachtet werden (Tabelle 12, Eintrag 1).

Unter Verwendung der optimierten Reaktionsbedingungen wurden Untersuchungen zum Substratspektrum der Ag(I)-vermittelten 1,3-dipolaren Azomethin-Ylid-Cycloaddition auf dem CPG-gekoppelten 10mer ATCG-Glycin-Konjugat **ATCG₁₀ 11** durchgeführt. Es wurden hierbei unterschiedliche Aldehyde **16**, darunter zum großen Teil aromatische Aldehyde, als auch verschiedene Dipolarophile **63** getestet (Tabelle 12). Aromatische Aldehyde mit elektronenziehenden Gruppen in *para*-Position führten zur Bildung der gewünschten Produkte **ATCG₁₀ 12b-f** mit einem Umsatz zwischen 26 und 67 % (Tabelle 12, Einträge 2-6), wobei Halogensubstituenten (-Br, -Cl und -F) zu relativ ähnlichen Umsätzen führten (41-48 %, Tabelle 12, Einträge 2-4) und ein *para*-substituiertes Nitril den höchsten Umsatz mit 67 % erzielte (Tabelle 12, Eintrag 6). In *para*-Position vorhandene elektronenschiebende Substituenten wie eine Methoxy- oder *tert*-Butyl-Gruppe wurden weniger toleriert und führten zu geringeren Umsätzen des Startmaterials zu den jeweiligen Zielprodukten **ATCG₁₀ 12g** und **ATCG₁₀ 12h** mit 24 bzw. 38 % (Tabelle 12, Einträge 7 und 8). Hingegen konnten mit aromatischen Gruppen wie -Phenyl oder -Pyridyl in *para*-Stellung die Bildung der gewünschten Produkte **ATCG₁₀ 12i** und **ATCG₁₀ 12j** mit 54 bzw. 58 % Umsatz beobachtet werden (Tabelle 12, Einträge 9 und 10). Ferner konnte trotz sterischer Hinderung durch die Benzylethergruppe in *ortho*-Position mit 2-Phenylmethoxybenzaldehyd **16u** ebenfalls ein guter Umsatz von 48 % erzielt werden (Tabelle 12, Eintrag 11). Die Verwendung des aliphatischen Aldehyds Propionaldehyd **16w** führte wiederum zu keiner Produktbildung (Tabelle 12, Eintrag 13). Neben *N,N*-Dimethylacrylamid **63a** wurden zusätzlich die Dipolarophile Acrylsäuremethylester **63b** sowie Maleinsäuredimethylester **63c** untersucht, welche allerdings zu deutlich geringeren Umsätzen von 20 und 10 % bei gleichzeitiger starker Nebenproduktbildung führten (Tabelle 12, Einträge 14 und 15).

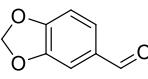
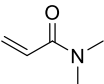

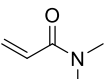
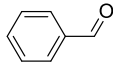
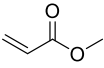
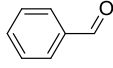
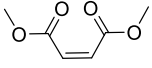
Überführung chemischer Reaktionen auf CPG-gebundenen DNA-Oligonukleotiden und
Entwicklung einer neuen Kodierungsstrategie

Tabelle 12: Untersuchung des Substratspektrums der Ag(I)-vermittelten 1,3-dipolaren Azomethin-Ylid-Cycloaddition auf CPG-gebundenem ATCG-Glycin-Konjugat **ATCG₁₀ 11** durch Einsatz diverser Aldehyde und Dipolarophile.^{a [155]}

Eintrag	Produkt	Aldehyd	Dipolarophil	Umsatz [%] ^b	Masse _{ber.} Masse _{gef.} ^c
1	ATCG₁₀ 12a	 16e	 63a	50	3552,6 3553,3
2	ATCG₁₀ 12b	 16j	 63a	48	3631,5 3633,3
3	ATCG₁₀ 12c	 16m	 63a	41	3587,1 3589,8
4	ATCG₁₀ 12d	 16n	 63a	47	3570,6 3572,6
5	ATCG₁₀ 12e	 16o	 63a	26	3576,6 3578,6
6	ATCG₁₀ 12f	 16p	 63a	67	3577,6 3579,0
7	ATCG₁₀ 12g	 16q	 63a	24	3582,6 3583,7
8	ATCG₁₀ 12h	 16r	 63a	38	3608,7 3613,4
9	ATCG₁₀ 12i	 16s	 63a	54	3628,7 3630,9
10	ATCG₁₀ 12j	 16t	 63a	58	3629,7 3630,0
11	ATCG₁₀ 12k	 16u	 63a	48	3658,7 3659,1

Überführung chemischer Reaktionen auf CPG-gebundenen DNA-Oligonukleotiden und
Entwicklung einer neuen Kodierungsstrategie

Fortsetzung Tabelle 12

12	ATCG₁₀ 12l			30	3596,6 3599,4
13	ATCG₁₀ 12m			n.d.	3504,6 n.d.
14	ATCG₁₀ 12n			20	3538,6 3541,2
15	ATCG₁₀ 12o			10	3595,6 3598,5

^a Das CPG-gebundene 10mer ATCG-Glycin-Konjugat **ATCG₁₀ 11** (20 nmol) und das Aldehyd **16** (1000 Äquiv., 20 µmol) wurden in 50 µL ACN/TEOF (2:1) bei Raumtemperatur für sechs Stunden zur Iminbildung inkubiert. Anschließend wurden das Dipolarophil **63** (4000 Äquiv., 80 µmol), Triethylamin (4000 Äquiv., 80 µmol) sowie AgOAc (100 Äquiv., 2 µmol), gelöst in 30 µL ACN/TEOF (2:1), hinzugegeben und die Reaktionsmischung wurde bei 50 °C für 16 h geschüttelt. Die Entschützung sowie die Abspaltung der DNA von der festen Phase erfolgte mit AMA-Lösung bei Raumtemperatur für 4 h. ^b Umsatzbestimmung mittels analytischer RP-HPLC-Analyse aus dem Verhältnis von Startmaterial **ATCG₁₀ 11** und Produkt **ATCG₁₀ 12**. ^c Massendetektion mittels MALDI-MS. 10mer ATCG = 5'-GTC ATG ATC T-3'. n.d. = nicht detektiert.

Abschließend wurde in einem letzten Experiment überprüft, ob die optimierten Reaktionsbedingungen der 1,3-dipolaren Cycloaddition ebenfalls auf sehr langen CPG-gebundenen DNA-Oligonukleotiden übertragen werden können. Im Hinblick auf eine neue Kodierungsstrategie könnten solche DNA-Sequenzen neben dem spezifischen DNA-Barcode zur Kodierung des Startmaterials auch eine Primer-Sequenz für spätere enzymatische Amplifikationsreaktionen aufweisen. Aufgrund dessen wurde ein CPG-gekoppeltes 31mer ATCG-Glycin-Konjugat **ATCG₃₁ 1** unter Anwendung der optimierten Reaktionsbedingungen mit Benzaldehyd **16e** und *N,N*-Dimethylacrylamid **63a** umgesetzt. Es konnte ein Reaktionsumsatz von 45 % erzielt werden. Allerdings konnte beobachtet werden, dass eine saubere Isolierung des gewünschten Produktes **ATCG₃₁ 2** mittels präparativer RP-HPLC nicht möglich ist, da Startmaterial und Produkt aufgrund der Länge des Oligonukleotids mit zu ähnlichen Retentionszeiten eluieren (Abb. 30).

Überführung chemischer Reaktionen auf CPG-gebundenen DNA-Oligonukleotiden und Entwicklung einer neuen Kodierungsstrategie

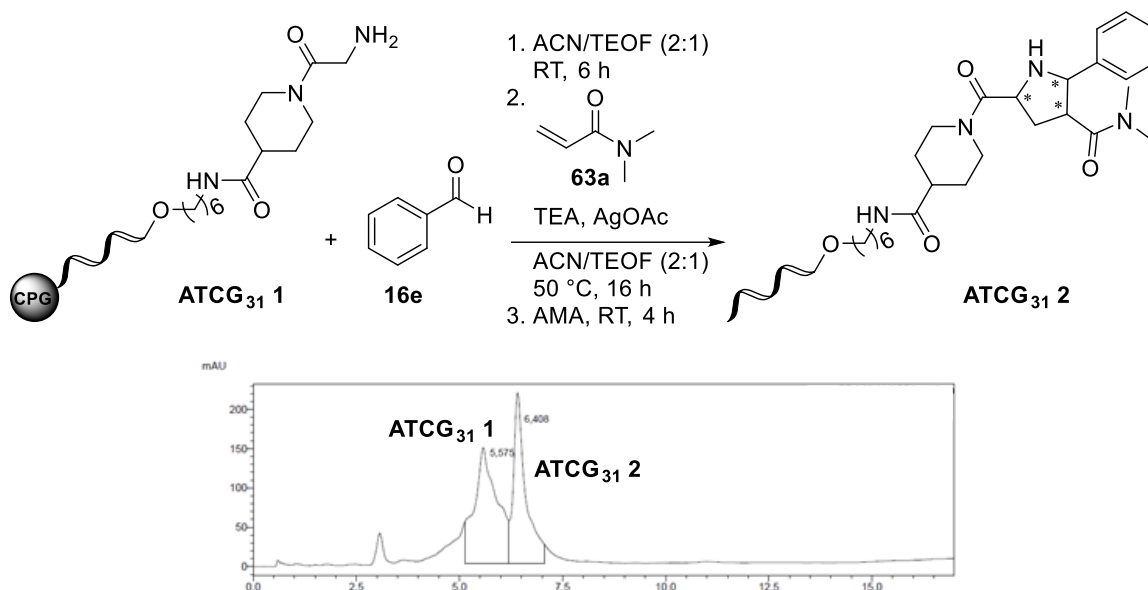


Abbildung 30: Ag(I)-vermittelte 1,3-dipolare Azomethin-Ylid-Cycloaddition auf CPG-gebundenem 31mer DNA-Glycin-Konjugat **ATCG₃₁ 1** und chromatographische Analyse (präparative RP-HPLC) der Reaktionsmischung.^[155]

Zur Etablierung einer neuen Synthesestrategie, welche die Verwendung von unterschiedlich kodierten, CPG-gekoppelten Startmaterialien ermöglicht, dürften dementsprechend nicht beliebig lange CPG-gebundene DNA-Sequenzen verwendet werden. Eine 31mer-Sequenz würde zu schwer trennbaren Mischungen aus DNA-gekoppelten Startmaterialien und Zielprodukten führen, insbesondere im Rahmen von „*split and pool*“-Synthesen. In diesem Fall müsste auf kürzere, beispielsweise 10 bis 16mer DNA-Sequenzen, zurückgegriffen werden.

Die Ag(I)-vermittelte 1,3-dipolare Azomethin-Ylid-Cycloaddition zur Darstellung von substituierten Pyrrolidinen konnte erfolgreich auf der CPG-gebundenen hexT-DNA optimiert und auf eine ebenfalls CPG-gebundene ATCG-DNA überführt werden. Zur Untersuchung des Substratspektrums dieser Reaktion wurden diverse aromatische Aldehyde bei gleichzeitiger Verwendung von *N,N*-Dimethylacrylamid **63a** als Dipolarophil untersucht und dabei mäßige bis gute Umsätze zu den jeweiligen Zielprodukten beobachtet (Tabelle 12). Die Verwendung von aliphatischen Aldehyden führte hingegen zu keiner Produktbildung. Wurden Acrylsäuremethylester **63b** sowie Maleinsäuredimethylester **63c** als Dipolarophile verwendet, konnten ferner nur geringe Umsätze bei starker Nebenproduktbildung erzielt werden.

4.6 Experimente zur Überführung der Yb(III)-vermittelten Dreikomponentenreaktion zur Darstellung von substituierten Pyrazolen auf CPG-gebundenen DNA-Oligonukleotiden

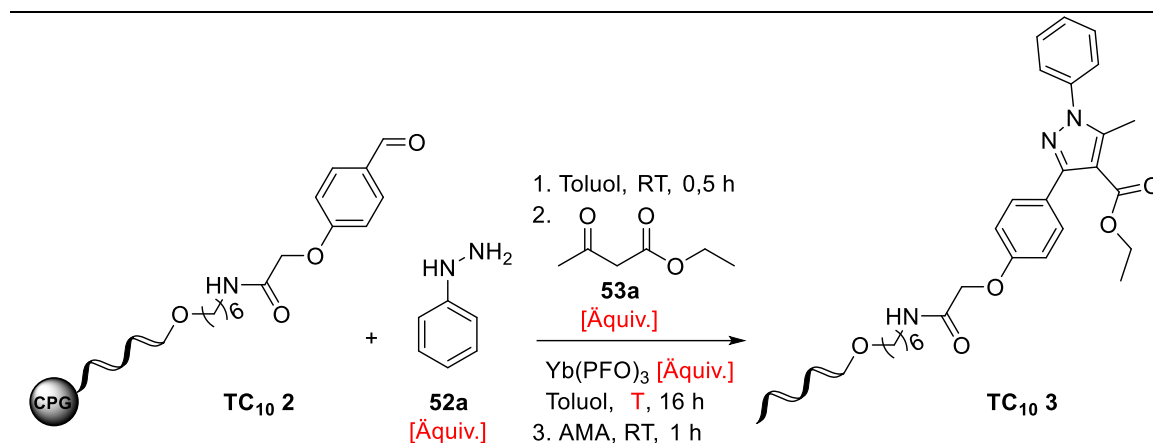
Zuletzt wurde eine Yb(PFO)₃-vermittelte Dreikomponentenreaktion zwischen Aldehyden, Hydrazinen und 1,3-Dicarbonylverbindungen zur Darstellung von DNA-gekoppelten Pyrazolen untersucht.

Anstelle der hexT-DNA, welche für die vorherigen Optimierungen diverser chemischer Reaktionen verwendet wurde, wurde nun auf eine 10mer TC-DNA-Sequenz zurückgegriffen. Eine DNA-Sequenz bestehend aus den Pyrimidinbasen Thymin und Cytosin weist ein ähnliches Stabilitätsprofil wie die hexT-DNA auf,^[46] besitzt allerdings den Vorteil, dass mit bereits zwei verschiedenen Nukleobasen Moleküle kodiert werden können. Aufgrund dessen wurde über Amidkupplung, ausgehend von einer CPG-gebundenen, Aminolinker-funktionalisierten 10mer TC-DNA **TC₁₀ 1**, ein entsprechendes CPG-gekoppeltes TC-Aldehyd-Konjugat **TC₁₀ 2** dargestellt und als Startmaterial zur Etablierung der Yb(PFO)₃-vermittelten Dreikomponentenreaktion eingesetzt. In Anlehnung an bereits publizierte Reaktionsbedingungen wurde in ersten Experimenten das CPG-gekoppelte TC-Aldehyd-Konjugat **TC₁₀ 2** zur Iminbildung mit 1000 Äquiv. Phenylhydrazin **52a** bei Raumtemperatur für 30 min in Toluol inkubiert.^[140] Die Reaktion erfolgte durch Zugabe von 1000 Äquiv. Acetessigester **53a** und 100 Äquiv. des Mediators Yb(PFO)₃ bei 80 °C über Nacht (Tabelle 13, Eintrag 1). Neben einer Vielzahl an Nebenprodukten konnten geringe Spuren des Zielproduktes **TC₁₀ 3a** mittels MALDI-MS nachgewiesen werden. Um den Reaktionsumsatz zum gewünschten DNA-gekoppelten Konjugat **TC₁₀ 3a** zu steigern und gleichzeitig die Nebenproduktbildung zu verringern, wurden geringere Phenylhydrazin-Mengen getestet. Durch die Verwendung von 250 Äquiv. bzw. 500 Äquiv. Phenylhydrazin **52a** erhöhte sich der Umsatz auf 31 bzw. 33 %, während eine DNA-Degradation von 44 bzw. 47 % detektiert wurde (Tabelle 13, Einträge 2 und 3). Um weiterhin den Reaktionsumsatz zu steigern, wurde als nächstes die Mediatormenge auf 250 Äquiv. erhöht und zusätzlich der Einfluss unterschiedlicher Reaktandenverhältnisse sowie Temperaturen untersucht (Tabelle 13, Einträge 4-7). Die Erhöhung der Mediatormenge von 100 auf 250 Äquiv. Yb(PFO)₃ resultierte in einer deutlichen Steigerung des Reaktionsumsatzes von 31 auf 64 % (Tabelle 13, Einträge 3 und 4). Ferner zeigte sich, dass die Veränderung des Verhältnisses der Reaktanden (1:4 bzw. 1:12 Phenylhydrazin **52a** zu Acetessigester **53a**) bei einer Temperatur von 50 °C nur geringfügig Einfluss auf den Reaktionsumsatz hatte (63 % bzw. 67 % Umsatz, Tabelle 13, Einträge 6 und 7). Wurde die Reaktion hingegen bei 80 °C

Überführung chemischer Reaktionen auf CPG-gebundenen DNA-Oligonukleotiden und Entwicklung einer neuen Kodierungsstrategie

durchgeführt, stieg der Umsatz von 64 auf 83 % (Tabelle 13, Einträge 4 und 5). Neben der Menge des Mediators beeinflusst die Temperatur, besonders im Hinblick auf das Ausmaß der DNA-Degradierung, die Reaktion erheblich. Die Verringerung der Temperatur von 80 °C auf 50 °C hatte zur Folge, dass der Grad der DNA-Degradation von 56-76 % (Tabelle 13, Einträge 4 und 5) auf 23-26 % sank (Tabelle 13, Einträge 6 und 7).

Tabelle 13: Optimierung der Yb(PFO)₃-vermittelten Dreikomponentenreaktion zur Darstellung von substituierten Pyrazolen auf CPG-gebundenem TC-Aldehyd-Konjugat **TC₁₀ 2**.^a



Eintrag	52a [Äquiv.]	53a [Äquiv.]	Yb(PFO) ₃ [Äquiv.]	T [°C]	Umsatz [%] ^b	DNA-Degradierung [%] ^b
1	1000	1000	100	80	geringe Produktpuren	
2	500	1000	100	80	33	47
3	250	1000	100	80	31	44
4	250	1000	250	80	64	56
5	250	3000	250	80	83	76
6	250	1000	250	50	63	26
7	250	3000	250	50	67	23
8	250	3000	0	50	0	17

^a Das CPG-gebundene TC-Aldehyd-Konjugat **TC₁₀ 2** (20 nmol) und Phenylhydrazin **52a** (X Äquiv.) wurden in 30 µL Toluol bei Raumtemperatur für 30 min zur Iminbildung inkubiert. Anschließend wurden Acetessigester **53a** (X Äquiv.) und Yb(PFO)₃ (X Äquiv.), gelöst in 50 µL Toluol, hinzugegeben und die Reaktionsmischung wurde bei T für 16 h geschüttelt. Die Entschützung sowie die Abspaltung der DNA von der festen Phase erfolgte mit AMA-Lösung bei Raumtemperatur für 1 h. ^b Umsatzbestimmung mittels analytischer RP-HPLC-Analyse aus dem Verhältnis von Startmaterial **TC₁₀ 2** und Produkt **TC₁₀ 3**. 10mer TC = 5'-TTC CTC TCC T-3'.

Die systematische Untersuchung unterschiedlicher Parameter zur Etablierung der Yb(III)-vermittelten Dreikomponentenreaktion zur Darstellung von substituierten Pyrazolverbindungen führte letztendlich zu folgenden optimierten Reaktionsbedingungen: Im ersten Schritt erfolgt die Iminbildung zwischen dem CPG-gebundenen DNA-Aldehyd-Konjugat und 250 Äquiv. Phenylhydrazin in Toluol bei Raumtemperatur für 30 min. Die Ringbildung wird durch Zugabe von 3000 Äquiv. einer 1,2-Dicarbonylverbindung und 250 Äquiv. Yb(PFO)₃ initiiert und die resultierende Reaktionsmischung wird daraufhin über Nacht bei 50 °C geschüttelt.

Überführung chemischer Reaktionen auf CPG-gebundenen DNA-Oligonukleotiden und Entwicklung einer neuen Kodierungsstrategie

Für die Überprüfung der Kompatibilität der $\text{Yb}(\text{PFO})_3$ -vermittelten Dreikomponentenreaktion zur Darstellung von substituierten Pyrazolverbindungen auf aus allen vier Nucleobasen bestehenden DNA-Sequenzen wurde ein entsprechendes CPG-gebundenes 10mer ATCG-Aldehyd-Konjugat **ATCG₁₀ 2a** über Amidkupplung hergestellt. Das CPG-gekoppelte 10mer ATCG-Aldehyd-Konjugat **ATCG₁₀ 2a** wurde unter Anwendung der zuvor etablierten Reaktionsbedingungen mit Phenylhydrazin **52a** und Acetessigsäure **53a** zur Reaktion gebracht. Das Zielprodukt **ATCG₁₀ 13** wurde mit lediglich 34 % Umsatz gebildet und gleichzeitig wurde eine DNA-Degradation von 69 % beobachtet (Abb. 31).

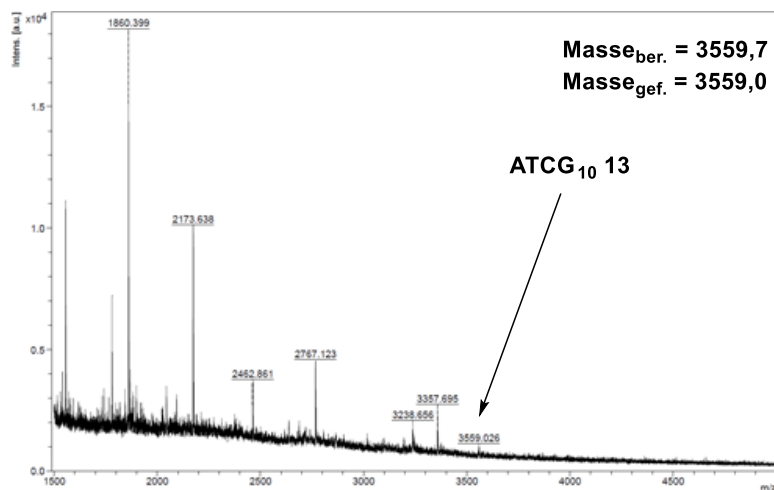
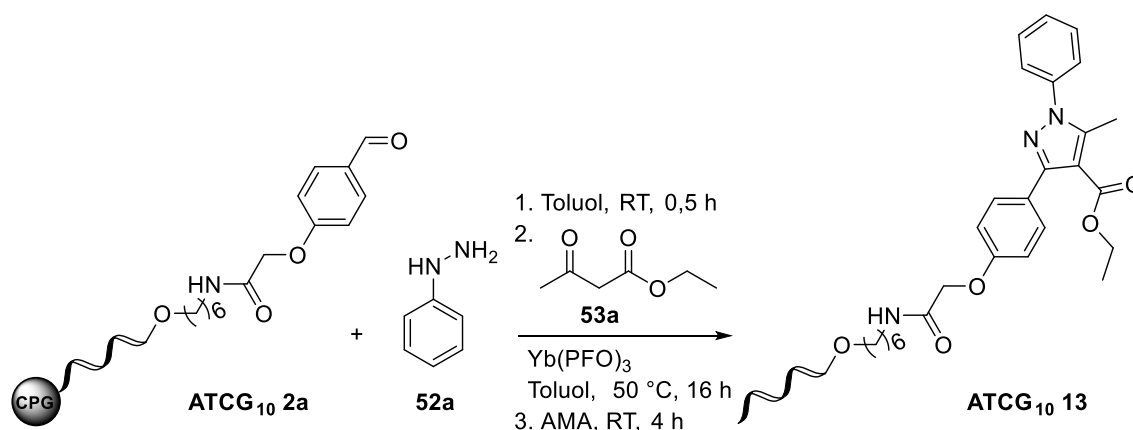


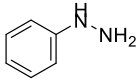
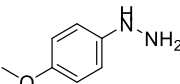
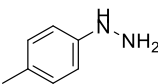
Abbildung 31: $\text{Yb}(\text{PFO})_3$ -vermittelte Dreikomponentenreaktion zur Darstellung von substituierten Pyrazolverbindungen auf CPG-gebundener 10mer ATCG-DNA und MALDI-MS-Analyse der Reaktionsmischung.

Aufgrund der erheblichen DNA-Degradation der ATCG-Sequenz wurden die Untersuchungen zum Substratspektrum unter Einsatz diverser aromatischer Hydrazine **52** auf dem CPG-gebundenen TC-Aldehyd-Konjugat **TC₁₀ 2** durchgeführt (Tabelle 14). Die Verwendung von Phenylhydrazin mit der elektronenschiebenden Methoxy-Gruppe in *para*-Position **52b** wurde mit einem Umsatz von 23 % nur geringfügig toleriert (Tabelle 14, Eintrag 2). Etwas höhere Umsätze zwischen 33 und 53 % wurden mit *para*-, *meta*- und

Überführung chemischer Reaktionen auf CPG-gebundenen DNA-Oligonukleotiden und
Entwicklung einer neuen Kodierungsstrategie


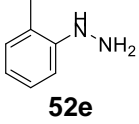
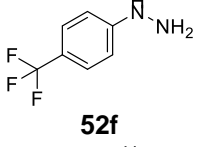
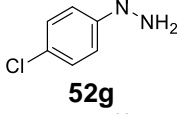
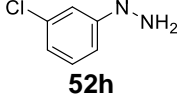
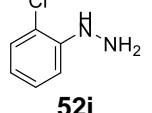
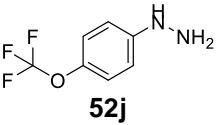
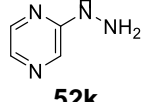
ortho-substituierten Methylphenylhydrazinen **52c-e** beobachtet (Tabelle 14, Einträge 3-5). Gute Umsätze zwischen 70 und 83 % des Startmaterials **TC₁₀ 2** zu den gewünschten Produkten **TC₁₀ 3f-i** konnten bei Einsatz von Phenylhydrazinen mit elektronenziehenden Gruppen (-CF₃, -Cl) detektiert werden (Tabelle 14, Einträge 6-9). Hingegen wurde kein Produkt bei Verwendung des heteroaromatischen Hydrazins 2-Hydrazinopyrazin **52k** generiert (Tabelle 14, Eintrag 11). Neben den Unterschieden im Reaktionsumsatz bei Verwendung von Phenylhydrazinen mit elektronenschiebenden und elektronenziehenden Gruppen, konnte ebenso ein signifikanter Unterschied im Ausmaß der DNA-Degradation in Abhängigkeit des induktiven Effektes der Substituenten beobachtet werden. Der Einsatz von Phenylhydrazinen mit elektronenziehenden Gruppen führte zu einer vergleichsweise geringen DNA-Degradation zwischen 10 und 28 % (Tabelle 14, Einträge 6-10), während bei Phenylhydrazinen mit hoher Elektronendichte, trotz der Verwendung einer relativ stabilen TC-DNA-Sequenz, eine DNA-Degradation von 48-57 % beobachtet werden konnte (Tabelle 14, Einträge 2-5).

Tabelle 14: Untersuchung des Substratspektrums der Yb(PFO)₃-vermittelten Dreikomponentenreaktion auf CPG-gebundenem 10mer TC-Aldehyd-Konjugat **TC₁₀ 2** durch Einsatz diverser aromatischer Hydrazine.^a

Eintrag	Produkt	Hydrazin	Umsatz [%] ^b	DNA-Degradation [%] ^c	Masse _{ber.} Masse _{gef.} ^d
1	TC₁₀ 3a	 52a	67	23	3446,5 3445,9
2	TC₁₀ 3b	 52b	23	57	3476,5 3476,4
3	TC₁₀ 3c	 52c	33	57	3460,5 3460,0

Überführung chemischer Reaktionen auf CPG-gebundenen DNA-Oligonukleotiden und
Entwicklung einer neuen Kodierungsstrategie

Fortsetzung Tabelle 14

4	TC₁₀ 3d		40	56	3460,5 3459,9
5	TC₁₀ 3e		53	48	3460,5 3460,1
6	TC₁₀ 3f		70	14	3514,5 3513,9
7	TC₁₀ 3g		83	16	3480,9 3480,8
8	TC₁₀ 3h		81	10	3480,9 3481,0
9	TC₁₀ 3i		70	14	3480,9 3481,1
10	TC₁₀ 3j		48	28	3530,7 3531,2
11	TC₁₀ 3k		n.d.	-	3448,4 n.d.

^a Das CPG-gebundene TC-Aldehyd-Konjugat **TC₁₀ 2** (20 nmol) und das aromatische Hydrazin **52** (250 Äquiv., 5 µmol) wurden in 30 µL Toluol bei Raumtemperatur für 30 min zur Iminbildung inkubiert. Anschließend wurden Acetessigester **53a** (3000 Äquiv., 60 µmol) und Yb(PFO)₃ (250 Äquiv., 5 µmol), gelöst in 50 µL Toluol, hinzugegeben und die Reaktionsmischung wurde bei 50 °C für 16 h geschüttelt. Die Entschützung sowie die Abspaltung der DNA von der festen Phase erfolgte mit AMA-Lösung bei Raumtemperatur für 1 h. ^b Umsatzbestimmung mittels analytischer RP-HPLC-Analyse aus dem Verhältnis von Startmaterial **TC₁₀ 2** und Produkt **TC₁₀ 3**. ^c DNA-Degradation ermittelt mittels analytischer RP-HPLC-Analyse. ^d Massendetektion mittels MALDI-MS. 10mer TC = 5'-TTC CTC TCC T-3'. n.d. = nicht detektiert.

Die Yb(PFO)₃-vermittelte Dreikomponentenreaktion zur Darstellung von Pyrazolen wurde erfolgreich auf einer CPG-gekoppelten TC-DNA etabliert. Die Überführung dieser Reaktion auf eine CPG-gebundene ATCG-DNA resultierte in starker DNA-Degradation, weshalb das Substratspektrum auf der CPG-gebundenen TC-DNA untersucht wurde (Tabelle 14). Es konnte dabei ein deutlicher Unterschied in der Reaktivität der verschiedenen aromatischen Hydrazine beobachtet werden. Gute Umsätze zu den gewünschten DNA-Pyrazol-Konjugaten konnten bei Verwendung von Phenylhydrazinen mit elektronenziehenden Gruppen detektiert werden, während der Einsatz von Phenylhydrazinen mit elektronenschiebenden Substituenten lediglich geringe bis mäßige Umsätze lieferte. Ferner konnte selbst bei Verwendung einer stabilen TC-DNA-Sequenz eine signifikante DNA-Degradation bei Verwendung von Phenylhydrazinen mit einer

hohen Elektronendichte beobachtet werden. Möglicherweise kommt es zu einer Addition der stark nukleophilen Hydrazine an die 5,6-Doppelbindung der Pyrimidine, was letztendlich in einer Abspaltung der Pyrimidinbasen resultiert.^[157]

4.7 Entwicklung einer Kodierungsstrategie für kurze DNA-Barcodes

In Kapitel 3.1.1 wurde bereits dargelegt, dass die TiDEC-Technologie durch die Verwendung der hexT-Sequenz zwar die Anwendung von härteren Reaktionsbedingungen ermöglicht, gleichzeitig verhindert sie allerdings die effiziente Kodierung von Startmaterialien. Mit der Ugi-Vierkomponentenreaktion, der Ugi-Azid-Vierkomponentenreaktion, der Groebke-Blackburn-Bienaymé-Dreikomponentenreaktion sowie der AgOAc-vermittelten 1,3-dipolaren Azomethin-Ylid-Cycloaddition konnten insgesamt vier Reaktionen etabliert werden, die nicht nur auf der sehr stabilen, CPG-gekoppelten hexT-Sequenz durchgeführt werden können, sondern ebenso auf Purinbasen-enthaltenen ATCG-Oligonukleotiden. Ferner konnte im Falle der Yb(PFO)₃-vermittelten Dreikomponentenreaktion eine Reaktion auf DNA überführt werden, deren Reaktionsbedingungen in einer erheblichen Degradierung von ATCG-Sequenzen resultiert, aber auf einer ebenfalls zur Kodierung geeigneten TC-DNA die Darstellung von Pyrazolen mit verringerter DNA-Degradation ermöglicht.

Parallel zur Überführung der oben genannten chemischen Reaktionen auf CPG-gebundener ATCG-DNA wurden im Arbeitskreis Brunschweiler weitere organische Reaktionen mittels der CPG-Festphasenstrategie auf DNA-Oligonukleotide etabliert. Es wurden die Yb(III)-vermittelte Castagnoli-Cushman-Reaktion, eine ZnCl₂-medierte aza-Diels-Alder-Reaktion unter Verwendung des Danishefsky-Diens, eine (*R*)-(-)-BNDHP-vermittelte Povarov- sowie die Biginelli-Reaktion als auch eine Kupfer(I)/Bipyridin-vermittelte Petasis-Reaktion auf Festphasen-gebundenen DNA-Sequenzen übertragen.^[155,46,158]

Um diese auf kurzen, CPG-gebundenen Oligonukleotiden etablierten Reaktionen in einer effizienteren Synthesestrategie von DELs anwenden zu können, wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Marco Potowski eine neue Kodierungsstrategie entwickelt (Abb. 32A).^[155] Basierend auf den Untersuchungen zur Übertragung diverser chemischer Reaktionen auf DNA-Sequenzen, wurde zur Kodierung der Startmaterialien auf kurze DNA-Sequenzen zurückgegriffen. Längere DNA-Oligonukleotide, bestehend aus einer Primer-Sequenz sowie einem spezifischen DNA-Barcode, stellen keine Option dar, da diese, wie bereits im Kapitel 4.5 gezeigt, keine saubere Isolierung der gewünschten

Überführung chemischer Reaktionen auf CPG-gebundenen DNA-Oligonukleotiden und Entwicklung einer neuen Kodierungsstrategie

DNA-Moleküle-Konjugate ermöglichen. Damit eine Ligation zwischen den DNA-Sequenzen und den DNA-Molekül-Konjugaten möglich ist, wurde die Verbindung zum organischen Molekül vom 5'-Terminus der DNA zu einer Position innerhalb des Überhangs verschoben. Dies wurde durch ein Alkin-modifiziertes Thymidin, welches während der Festphasen-basierten Phosphoramidit-Synthese in den DNA-Strang eingebaut wird, realisiert.

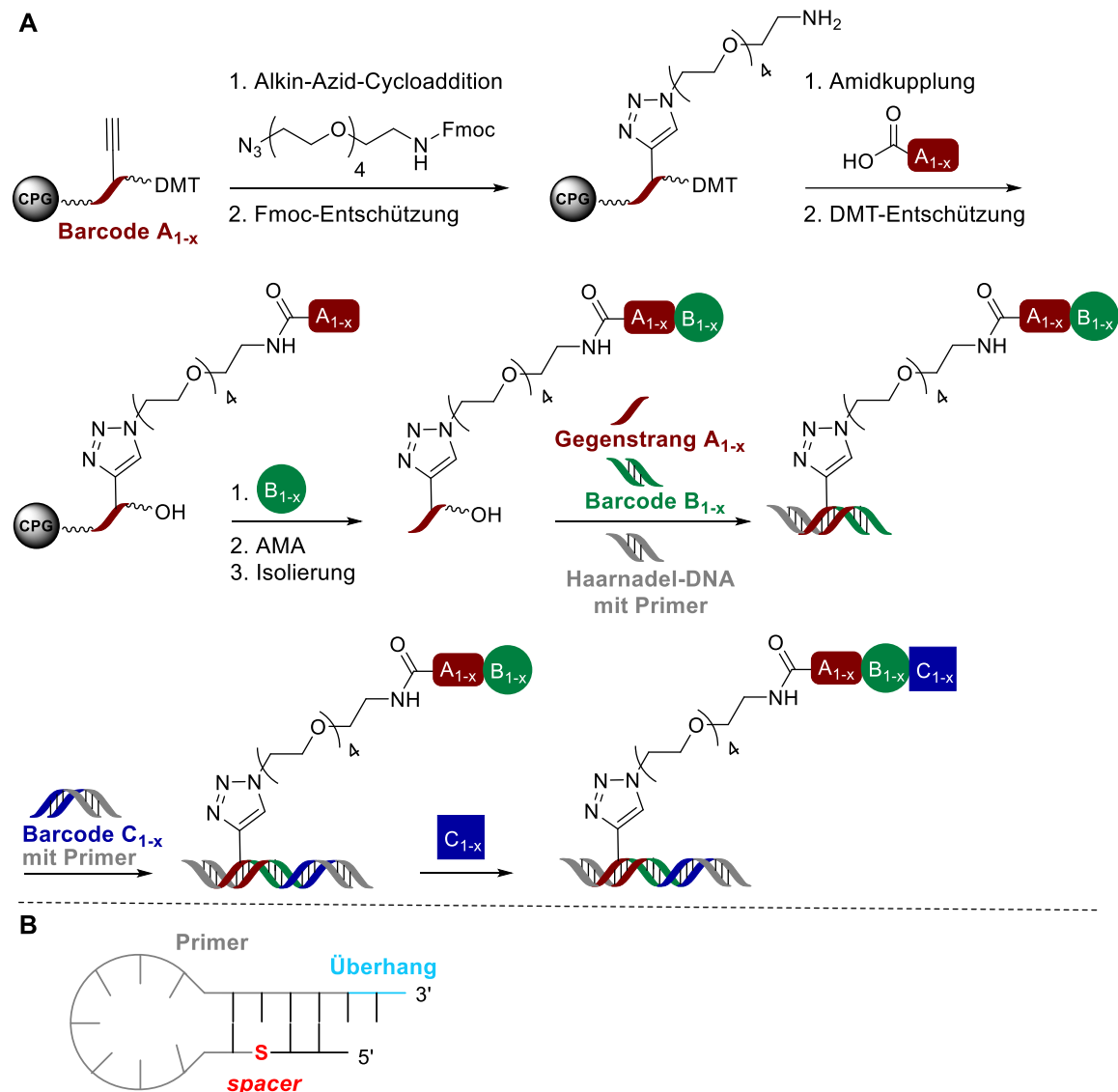


Abbildung 32: Kodierungsstrategie für kurze, einzelsträngige DNA-Molekül-Konjugate (A) basierend auf einer DNA-Haarnadelstruktur (B).^[155]

Im Rahmen einer möglichen DEL-Synthese sollen die Alkin-modifizierten Thymidin-Einheiten der unterschiedlichen CPG-gebundenen DNA-Barcodes in einer CuAAC zunächst PEGyliert werden, um einen Abstand zwischen der DNA und dem organischen Molekül zu generieren (Abb. 32A). Über Amidkupplungsreaktionen sollen dann die unterschiedlich kodierten, CPG-gebundenen Startmaterialien dargestellt werden, welche im Anschluss gemischt und als *pool* für darauffolgende chemische Reaktionen

eingesetzt werden sollen. Nach Abspaltung von der festen Phase sollen die unterschiedlichen DNA-Molekül-Konjugate über präparative RP-HPLC isoliert und anschließend mittels enzymatischer Ligation kodiert werden. In einem ersten Ligationsschritt soll dann neben den DNA-Gegensträngen der Startmaterialien und den kodierenden DNA-Sequenzen des zweiten Syntheseschritts auch eine DNA-Haarnadelstruktur (*hairpin*) mit den isolierten DNA-Molekül-Konjugaten verknüpft werden. Der *hairpin* weist dabei einen Überhang, eine Primer-Sequenz und einen *spacer* auf (Abb. 32B). Der *spacer*, welcher in diesem Fall aus einer Alkylkette (*C₉-spacer*) besteht, soll dafür sorgen, dass die Amplifikation durch die Polymerase an dieser Stelle gestoppt wird. Die so kodierten DNA-Molekül-Konjugate sollen danach erneut gemischt und für den darauffolgenden Schritt bestehend aus Kodierung und Synthese aufgeteilt werden (Abb. 32A).

Die Haarnadel-DNA-basierte Kodierungsstrategie sollte im Rahmen von Testligationen validiert werden. Hierfür wurde zunächst von Dr. Marco Potowski eine 14mer ATCG-DNA **ATCG₁₄ 1** mit einem Azid-modifizierten, Fmoc-geschützten Amino-PEG(4)-Linker **80** über CuAAC modifiziert, anschließend Fmoc-entschützt (**ATCG₁₄ 2**) und daraufhin mit 2-(4-Formylphenoxy)-Essigsäure **22ag** gekoppelt. Das resultierende Amidkupplungsprodukt **ATCG₁₄ 3** wurde über die Castagnoli-Cushman-Reaktion zum gewünschten 14mer ATCG-Zielprodukt **ATCG₁₄ 4** umgesetzt, welches daraufhin mittels präparativer RP-HPLC gereinigt und über MALDI-MS charakterisiert wurde (Abb. 33A).

Überführung chemischer Reaktionen auf CPG-gebundenen DNA-Oligonukleotiden und Entwicklung einer neuen Kodierungsstrategie

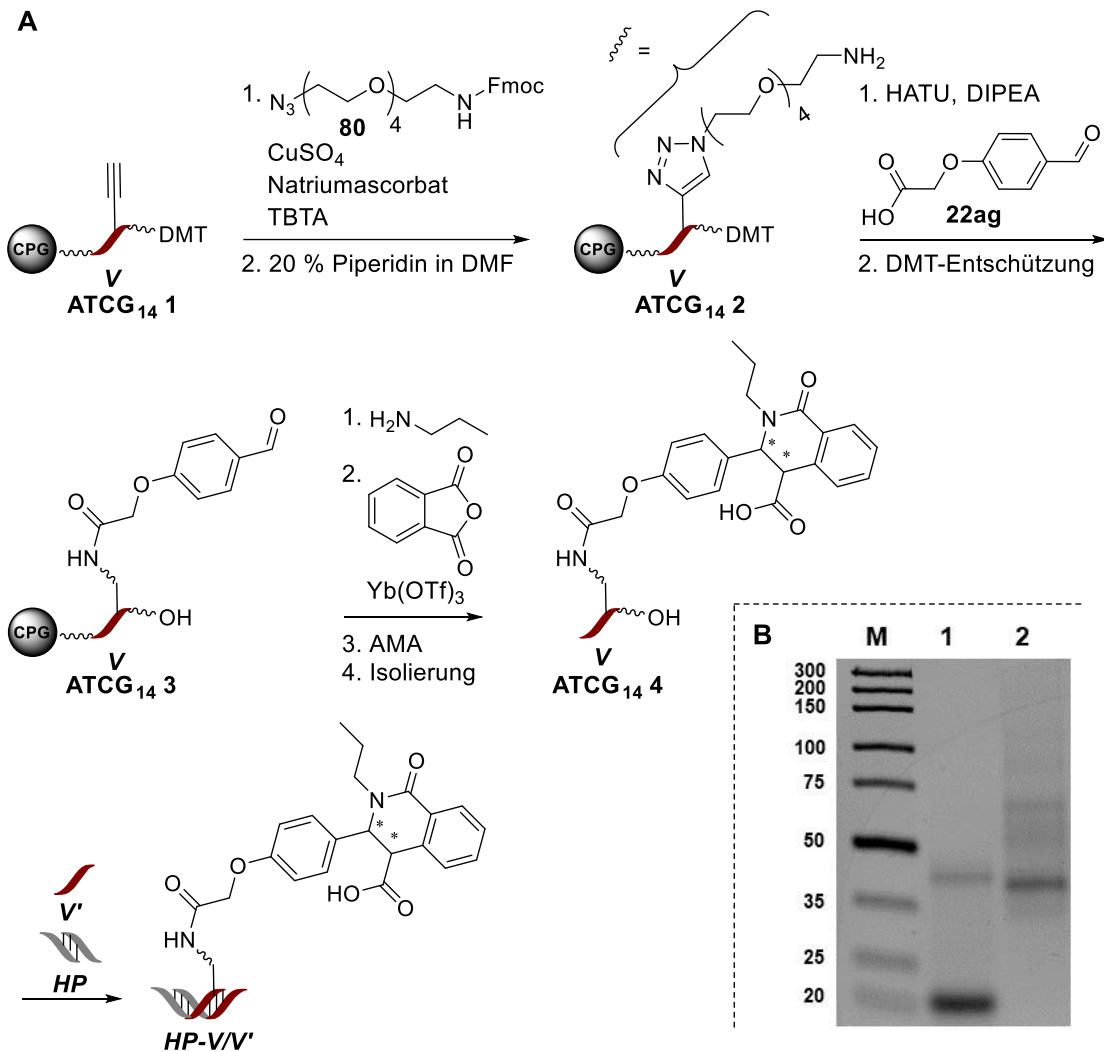


Abbildung 33: Untersuchung der Haarnadel-DNA-basierten Kodierungsstrategie. A. Synthese des 14mer ATCG-Zielprodukts **ATCG₁₄ 4** (DNA-Sequenz **V**) über die Castagnoli-Cushman-Reaktion und anschließende Testligation mit dem entsprechenden komplementären Gegenstrang (**V'**) und der Haarnadel-DNA **HP**. B. Visualisierung der Testligation mittels Agarose-Gelelektrophorese (5,5 %iges Agarose-Gel). M: Marker (*GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder*), 1: Haarnadel-DNA **HP**, 2: Ligation des 14mer ATCG-Konjugates **ATCG₁₄ 4** (**V**) mit dem komplementären Gegenstrang **V'** und der Haarnadel-DNA **HP**.^[155]

Gemeinsam mit Dr. Marco Potowski wurde im Anschluss die Testligation durchgeführt. Hierfür wurden sowohl die DNA-Haarnadelstruktur **HP** als auch das DNA-Castagnoli-Cushman-Konjugat **ATCG₁₄ 4** (**V**) mittels einer Polynukleotidkinase 5'-phosphoryliert und darauffolgend mit dem jeweiligen nicht-phosphorylierten, komplementären DNA-Strang **V'** sowie der DNA-Haarnadelstruktur **HP** durch eine T4 DNA-Ligase miteinander ligiert. Mittels Agarose-Gelelektrophorese wurde die Ligation analysiert. Der Erfolg der Ligation konnte durch die Verschiebung der Banden zu höheren Molekulargewichten beobachtet werden (Abb. 33B).

5 Studien zur chemischen Stabilisierung von DNA-Oligonukleotiden für die DEL-Synthese

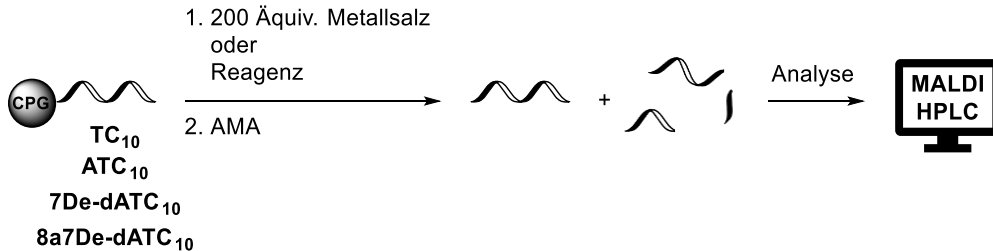
Die Technologie, eine DNA-kodierte Substanzbibliothek ausgehend von dem chemisch stabilen, CPG-gekoppelten Hexathymidin-Adapteroligonukleotid zu initiieren, ermöglicht zwar den Zugang zu einer Vielzahl an organischen Reaktionen, besitzt allerdings den Nachteil, dass eine Kodierung mit der hexT-Sequenz nicht möglich ist und dementsprechend zunächst diskrete Unterbibliotheken aus kodierten hexT-Konjugaten synthetisiert werden müssen. Eine effizientere Strategie zur Herstellung von DELs würde hingegen auf der Generierung von kodierten, CPG-gekoppelten Startmaterialien basieren, welche anschließend als Gemische für die Synthesen von (beispielsweise heterozyklischen) *scaffolds* eingesetzt werden. Eine neue Kodierungsstrategie, bei welcher kurze, einzelsträngige und aus allen vier natürlichen Nukleobasen bestehenden DNA-Barcodes zur Kodierung der Startmaterialien verwendet werden, wurde bereits im Kapitel 4.7 vorgestellt. Der Nachteil dieser Strategie ist, dass diese nur mit chemischen Reaktionen kompatibel ist, welche die DNA nicht im größeren Ausmaß degradieren. Um also eine solche Synthesestrategie zu realisieren und gleichzeitig (mindestens) das Stabilitätsprofil einer TC-Sequenz beizubehalten, sollte im Nachfolgenden die Möglichkeit untersucht werden, anstelle der natürlichen Purinbase Adenin die chemisch modifizierten Basen 7-Deazaadenin (7De-dA) bzw. 8-Aza-7-Deazaadenin (8a7De-dA) in ATC-DNA-Sequenzen, welche sich ebenfalls zur Kodierung von Startmaterialien eignen, zu verwenden.

5.1 Stabilitätsscreening von CPG-gebundenen, chemisch modifizierten DNA-Oligonukleotiden

Zur Zeit der Erstellung der vorliegenden Arbeit wurde von Potowski *et al.* systematisch die Kompatibilität von CPG-gebundenen DNA-Sequenzen (hexT, 10mer TC, 10mer ATC, 10mer ATCG) mit verschiedenen, häufig in der präparativen Chemie verwendeten Metallsalzen, Säuren sowie organischen Reagenzien untersucht.^[46] Es konnte dabei gezeigt werden, dass die mit Schutzgruppen versehene, CPG-gebundene DNA in Gegenwart einer Vielzahl unterschiedlicher Reagenzien, auch über einen längeren Zeitraum, eine hohe Stabilität aufweist. Allerdings wurde auch beobachtet, dass die aus Purinbasen bestehenden ATC- und ATCG-Sequenzen durch starke Brønsted-Säuren wie TFA oder HCl, Oxidationsmitteln und durch höhere Konzentrationen an Pd(OAc)₂ degradiert werden (Tabelle 15, Einträge 1-7). Zur Einordnung der Stabilität der aus

chemisch modifizierten Adenin-Basen bestehenden CPG-gebundenen Oligonukleotidsequenzen wurde das Stabilitätsscreening von Dr. Marco Potowski mit 10mer 7De-dATC- und 10mer 8a7De-dATC-DNA-Sequenzen (**7De-dATC₁₀** und **8a7De-dATC₁₀**) wiederholt (Tabelle 15).

Tabelle 15: Auszug aus dem Stabilitätsscreening unterschiedlicher CPG-gebundener DNA-Sequenzen in Gegenwart verschiedener Säuren, Metallsalze sowie Organokatalysatoren.^{a [46]}



Eintrag	Reagenz	Lösungsmittel	TC ₁₀	ATC ₁₀	7De-dATC ₁₀	8a7De-dATC ₁₀	
1	10 % TFA	H ₂ O					
2	3,7 % HCl	H ₂ O					
3	Ce(NH ₄) ₂ (NO ₃) ₆	MeOH					
4	Pd(OAc) ₂	ACN					
5	RuCl ₃	ACN					
6	DDQ	EtOH					
7	PIDA	ACN					
			0-20 %	21-40 %	41-60 %	>61 %	DNA-Degradation

^a Die CPG-gebundene DNA (20 nmol) wurde in 50 µL Lösungsmittel in Gegenwart von 200 Äquiv. eines Metallsalzes oder in Gegenwart eines organischen Reagenzes bei Raumtemperatur für 22 h inkubiert. Die Entschützung sowie die Abspaltung der DNA von der festen Phase erfolgte mit AMA-Lösung bei Raumtemperatur für 1 h (**TC₁₀**) oder 4 h (**ATC₁₀**, **7De-dATC₁₀**, **8a7De-dATC₁₀**). Die Massendetektion erfolgte mittels MALDI-MS und die Umsatzbestimmung mittels analytischer RP-HPLC-Analyse. 10mer TC = 5'-TTC CTC TCC T-3', 10mer ATC = 5'-TTA CTA CCT A-3', 10mer 7De-dATC = 5'-TT7De-dA CT7De-dA CCT 7De-dA-3', 10mer 8a7De-dATC = 5'-TT8a7De-dA CT8a7De-dA CCT 8a7De-dA-3'. DDQ = 2,3-Dichlor-5,6-dicyano-1,4-benzochinon, PIDA = Phenyliodiddiacetat.

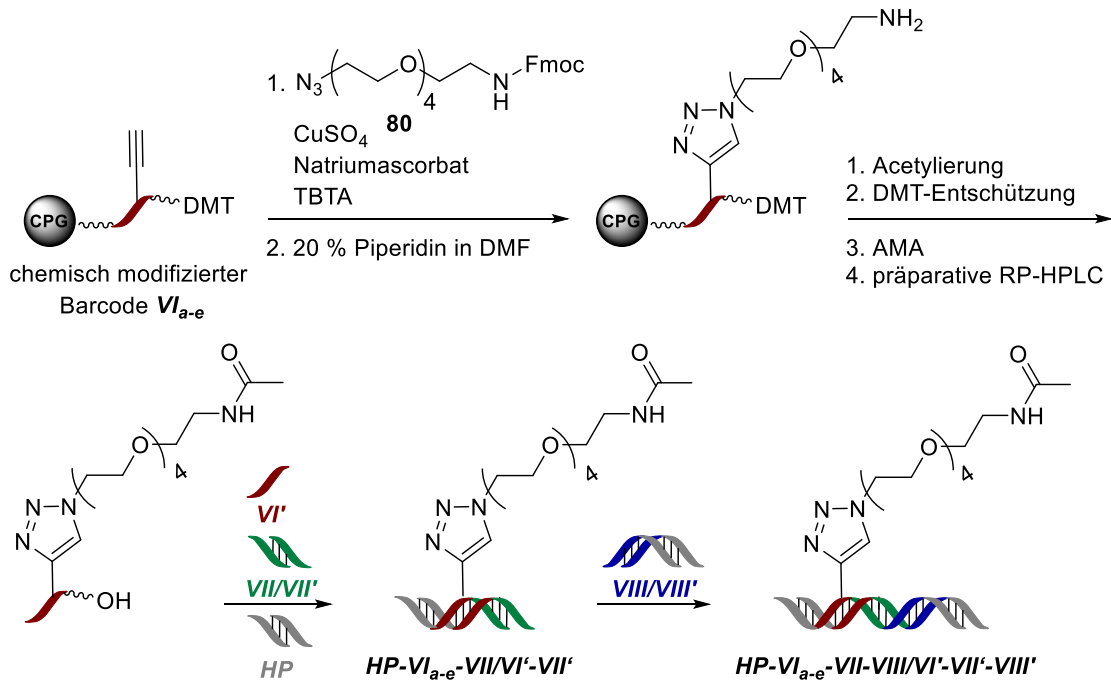
Es konnte dabei festgestellt werden, dass die 7De-dATC- und die 8a7De-dATC-DNA-Sequenzen eine vergleichbar hohe chemische Stabilität, besonders gegenüber starker Säuren wie TFA und HCl, besitzen wie eine 10mer TC-Sequenz, welche wiederum vergleichbar chemisch stabil ist wie hexT (Tabelle 15). Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass beide untersuchten chemisch modifizierten ATC-DNA-Sequenzen ein ähnliches Stabilitätsprofil besitzen. Basierend auf diesen Ergebnissen und auf der Tatsache, dass die Base 7-Deazaadenin günstiger im Einkauf ist als 8-Aza-7-Deazaadenin wurde im weiteren Verlauf der Untersuchungen sowie im Hinblick auf zukünftige DEL-Synthesen auf 7De-dATC-DNA-Sequenzen zur Kodierung von Startmaterialien zurückgegriffen. Abschließend ist bezüglich der Anwendbarkeit der modifizierten Basen zu erwähnen, dass sowohl 7-Deazaadenin als auch

8-Aza-7-Deazaadenin für die eigentliche DNA-Synthese über das Phosphoramidit-Verfahren zunächst geschützt und in die jeweiligen Phosphoramidate überführt werden müssen.

5.2 Anwendung der DNA-Haarnadelstruktur-basierten Kodierungsstrategie unter Verwendung chemisch modifizierter DNA

Damit die Oligonukleotide, die die chemisch modifizierte Base 7-Deazaadenin enthalten, zur Synthese von genetischen Substanzbibliotheken eingesetzt werden können, müssen sie als Substrate der Enzyme DNA-Polynukleotidkinase und DNA-Ligase für die Ligation von DNA-Barcodes akzeptiert werden und nach der Selektionierung von einer DNA-Polymerase gelesen und amplifiziert werden. Um dies zu untersuchen, wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Marco Potowski Testligationen gemäß der zuvor etablierten DNA-Haarnadelstruktur-basierten Kodierungsstrategie durchgeführt (Kapitel 4.7). Es wurden hierfür insgesamt fünf verschiedene 16mer 7De-dATC-Sequenzen, welche jeweils aus zwei 4mer-Überhängen sowie einem 8mer DNA-Barcode bestehen, getestet. Im Gegensatz zur vorherigen Kodierungsstrategie sollte in diesem Fall anstelle von komplementären Gegensträngen zu den aus 7De-dATC-bestehenden DNA-Barcodes eine Universaladapter-DNA **VI'** aus Inosin-Nukleotiden und abasischen Stellen verwendet werden.

Im Vorfeld der Testligationen wurden die CPG-gekoppelten 16mer 7De-dATC-Sequenzen zunächst mit einem Fmoc-geschützten Amino-PEG(4)-Linker **80** über CuAAC modifiziert, anschließend Fmoc-entschützt und daraufhin acetyliert (Schema 25). Im Anschluss an die DMT-Entschützung wurden die 16mer 7De-dATC-Sequenzen basisch von der festen Phase abgespalten, mittels präparativer RP-HPLC gereinigt und über MALDI-MS charakterisiert. Die chemisch modifizierten DNA-Barcodes **VI_{a-e}**, die Universaladapter-DNA **VI'**, die Haarnadel-DNA **HP** sowie ein aus natürlichen Nukleobasen bestehender DNA-Barcode **VII** wurden an ihren 5'-Enden enzymatisch phosphoryliert und darauffolgend zusammen mit dem nicht-phosphorylierten, komplementären DNA-Strang **VII'** miteinander ligiert (Schema 25).



Schema 25: Untersuchung der DNA-Haarnadelstruktur-basierten Kodierungsstrategie unter Verwendung von chemisch modifizierten DNA-Sequenzen.

Die Ligationsansätze wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert (Abb. 34). Da in den Spuren 1-5 keine Bande auf der Höhe zu sehen ist, welche der einzelnen Haarnadel-DNA entspricht, ist davon auszugehen, dass die DNA-Haarnadelstruktur vollständig ligiert wurde (Abb. 34, Vergleich Spuren 1-5 mit Spur 6). Allerdings sind in den jeweiligen Spuren zwei nah beieinander laufende Banden bei etwa 50-60 Basenpaaren zu beobachten, welche darauf hinweisen, dass neben dem gewünschten Ligationsprodukt $HP-VI_{a-e}-VII/VI'-VII'$ ebenso ein Zwischenprodukt vorhanden ist. Bei dem Zwischenprodukt könnte es sich um das Ligationsprodukt bestehend aus Haarnadel-DNA und den chemisch modifizierten DNA-Barcodes handeln ($HP-VI_{a-e}/VI'$).

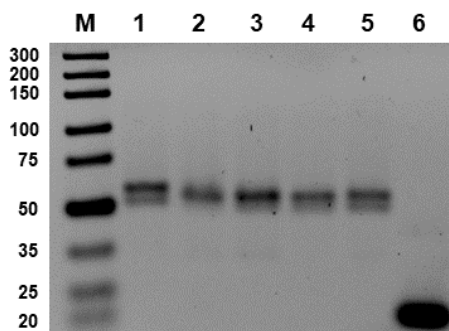


Abbildung 34: Visualisierung der Ligationen von insgesamt fünf verschiedenen chemisch modifizierten 7De-dATC-Barcodes mit einer DNA-Haarnadelstruktur, dem Universaladapter und einem weiteren aus natürlicher DNA bestehenden Barcode sowie dem entsprechenden komplementären Gegenstrang mittels Agarose-Gelelektrophorese (4 %iges Agarose-Gel). M: Marker (*GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder*), 1-5: Ligation der fünf verschiedenen chemisch modifizierten Barcodes VI_{a-e} mit dem Universaladapter VI' , der Haarnadel-DNA HP sowie einem weiteren DNA-Barcode ($VIII/VIII'$) in einer Eintopf-Reaktion, 6: Haarnadel-DNA HP .

Für den nächsten und finalen Ligationsschritt wurden die Ligationsansätze mittels ethanolischer Fällung gereinigt und über UV-Spektroskopie quantitativ analysiert. Die Ligationsprodukte $HP-VI_{a-e}-VII/VI'-VII'$ sowie der DNA-Barcode $VIII$ wurden 5'-phosphoryliert und mit dem jeweiligen komplementären DNA-Barcode $VIII'$ ligiert (Schema 25). Aufgrund der vielen auf dem Agarose-Gel vorhandenen Banden kann

geschlussfolgert werden, dass der finale Ligationsschritt in allen fünf Ansätzen nicht mit einem hohen Umsatz zu den gewünschten Zielprodukten **HP-VI_{a-e}-VII-VIII/VI'-VII'-VIII'** abläuft (Abb. 35, Spuren 1-5). Es handelt sich bei der Bande bei etwa 35 Basenpaaren wohlmöglich um den DNA-Barcode **VIII**, hybridisiert mit dem jeweiligen komplementären Gegenstrang **VIII'**. Bei der auf der Höhe von 50 Basenpaaren vorhandenen Bande könnte es sich erneut um das vermutete Zwischenprodukt **HP-VI_{a-e}/VI'** handeln. Da mit Hilfe der ethanolischen Fällung das gewünschte Ligationsprodukt **HP-VI_{a-e}-VII-VIII/VI'-VII'-VIII'** nicht von verunreinigenden Zwischenprodukten oder nicht-reagierten DNA-Strängen abgetrennt werden kann, wurden die Ligationsprodukte **HP-VI_{a-e}-VII-VIII/VI'-VII'-VIII'** aus dem Agarose-Gel extrahiert und mit einem Kit gereinigt. Für die Gelextraktion wurden die Banden bei etwa 100 Basenpaaren ausgewählt.

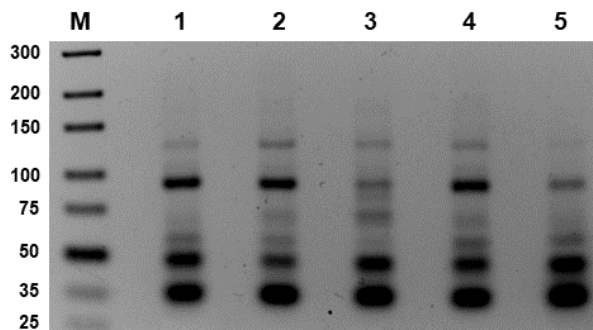


Abbildung 35: Visualisierung der Ligationen der Ligationsprodukte **HP-VI_{a-e}-VII/VI'-VII'** mit dem Barcode **VIII/VIII'** mittels Agarose-Gelelektrophorese (4 %iges Agarose-Gel). M: Marker (*GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder*), 1-5: Ligation von **HP-VI_{a-e}-VII/VI'-VII'** mit einem DNA-Barcode (**VIII/VIII'**).

Damit die chemisch modifizierten DNA-Barcodes zur Kodierung einer DNA-kodierten Substanzbibliothek eingesetzt werden können, ist das korrekte Lesen und Vervielfältigen durch Polymerasen essenziell. Um dies zu untersuchen, wurden PCR-Amplifikationen mit den geextrahierten Ligationsprodukten **HP-VI_{a-e}-VII-VIII/VI'-VII'-VIII'** unter Verwendung von Primer-Sequenzen, welche die Templat-DNA verlängern, durchgeführt. Der Erfolg der PCR wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert (Abb. 36). Da die theoretische Länge der PCR-Produkte 155 Basenpaare beträgt, kann geschlussfolgert werden, dass die Ligationsprodukte **HP-VI_{a-e}-VII-VIII/VI'-VII'-VIII'** erfolgreich geextrahiert, amplifiziert und mit den jeweiligen Primer-Sequenzen verlängert werden konnten.

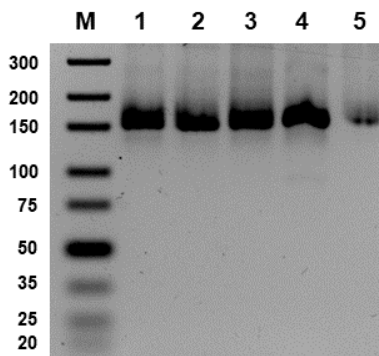


Abbildung 36: Visualisierung der PCR-Amplifikation der Ligationsprodukte **HP-VI_{a-e}-VII-VIII/VI'-VII'-VIII'** mittels Agarose-Gelelektrophorese (4 %iges Agarose-Gel). M: Marker (*GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder*), 1-5: PCR-Amplifikation von **HP-VI_{a-e}-VII-VIII/VI'-VII'-VIII'**.

Um einen experimentellen Nachweis zu führen, dass die aus chemisch modifizierten Barcodes bestehenden Ligationsprodukte korrekt gelesen und amplifiziert wurden, wurden die PCR-Produkte mittels eines Kits aufgereinigt und mit dem Sanger-Verfahren sequenziert. Die Auswertung der Sequenzierungsdaten zeigte, dass die chemisch modifizierten Barcodes **VI_{a-e}** durch die Taq Polymerase korrekt gelesen und kopiert wurden (Anhang, Tabelle 28). Allerdings ist aufgefallen, dass in einigen Fällen bei der Sequenzierung von zwei benachbarten 7-Deazaadenin-Basen unter Verwendung des Vorwärtsprimers lediglich ein (7-Deaza-)Adenin detektiert werden konnte (Beispiel: Barcode **VI_b**). Wurde hingegen der Rückwärtsprimer verwendet, konnten in den entsprechenden Gegensträngen korrekt die zwei benachbarten Thymin-Nukleobasen sequenziert werden. Diese Beobachtung konnte allerdings nicht nur für zwei benachbarte 7-Deazaadenin-Basen gemacht werden, sondern auch in einigen Fällen für zwei benachbarte natürliche Adenin-Basen. Es kann somit geschlossen werden, dass es sich nicht um ein Problem der Lesbarkeit der stabilisierten DNA durch die Polymerase handelt, da zum einen die Gegenstränge korrekt gelesen werden konnten und zum anderen die gleiche Problematik bei benachbarten natürlichen Adenin-Basen aufgetreten ist, sondern um ein Problem der Sequenzierung.

Zuletzt wurde, um die Amplifikationseffizienz eines 7-Deazaadenin-enthaltenden Ligationsproduktes mit dem jeweiligen nativen Ligationsprodukt zu vergleichen, eine Echtzeit-PCR unter Verwendung des DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes *SYBR Green* durchgeführt (Abb. 37 und Anhang, Abb. 46 und 47). Hierbei zeigte sich, dass für die chemisch modifizierte Templat-DNA **HP-VI_a-VII-VIII/VI'-VII'-VIII'** im Vergleich zur nativen DNA das exponentielle Wachstum etwa drei bis vier Zyklen später erreicht wird. Dies ist wohlmöglich darauf zurückzuführen, dass die DNA-Polymerase etwas länger benötigt, um die chemisch modifizierte Base 7De-dA zu lesen. Eine andere Möglichkeit wäre, dass der im Vergleich zur nativen DNA vorhandene PEG(4)-Linker die Amplifikation durch die DNA-Polymerase in den ersten Zyklen aufgrund von sterischer Hinderung verlangsamt. Nachdem jedoch die chemisch modifizierte DNA in native DNA während des Amplifikationsprozesses umgeschrieben wurde, werden nach Eintritt in die exponentielle Wachstumsphase beide DNA-Templates mit vergleichbarer Effizienz vervielfältigt.

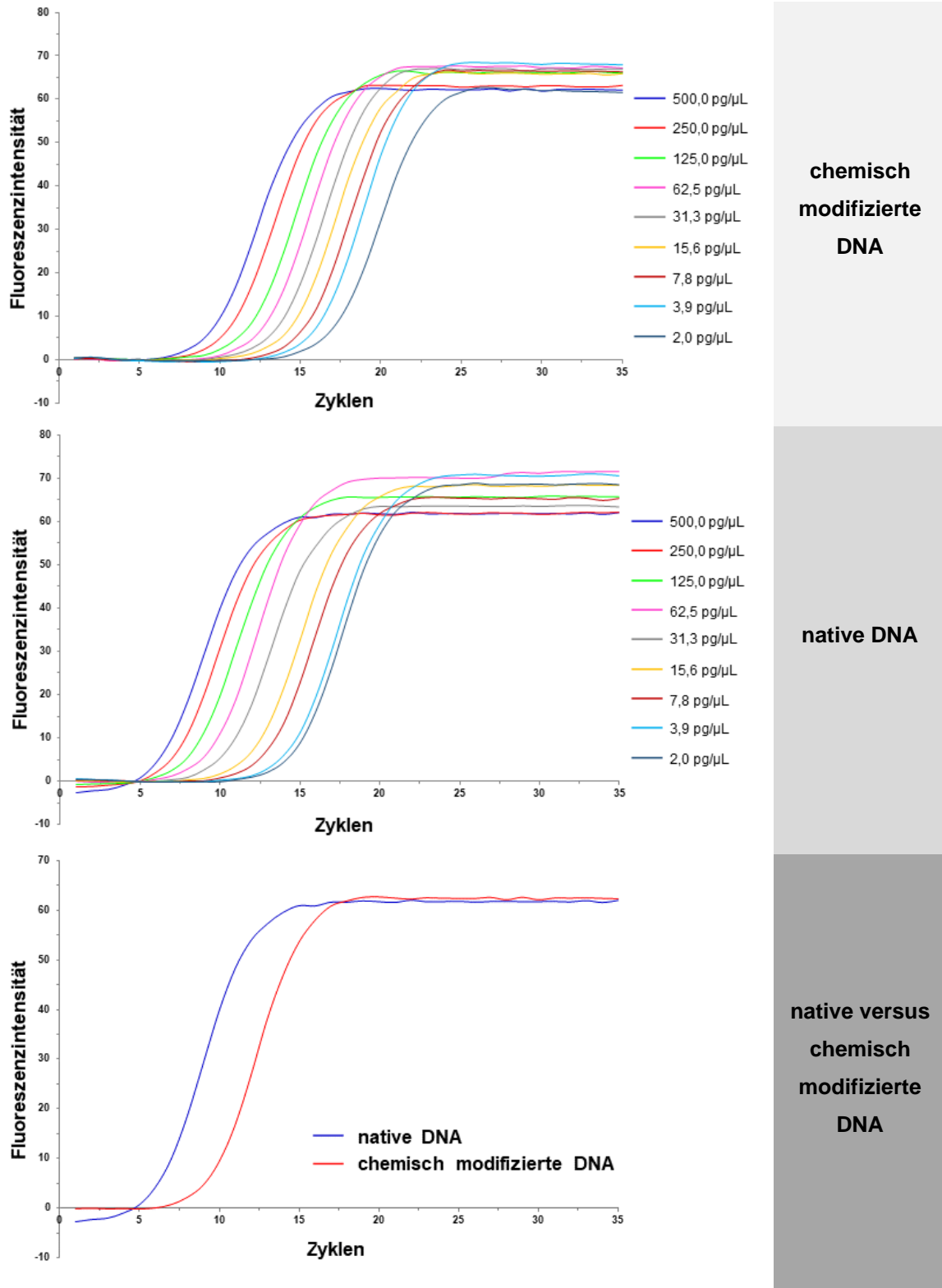


Abbildung 37: Amplifikationskurven der Echtzeit-PCR des 7-Deazaadenin-enhaltenden Ligationproduktes *HP-VI_d-VII-VIII/VI-VII-VIII* und des jeweiligen nativen Ligationproduktes. Für die Echtzeit-PCR wurde eine Verdünnungsreihe des jeweiligen DNA-Templats verwendet. Für den Vergleich der chemisch modifizierten DNA mit der nativen DNA wurden die Amplifikationskurven bei einer DNA-Templat-Konzentration von 500 pg/μL gezeigt.

Um die beobachteten Ergebnisse zu untermauern, wurde von den übrigen chemisch modifizierten Ligationsprodukten *HP-VI_{a-c,e}-VII-VIII/VI'-VII'-VIII'* ebenfalls eine Echtzeit-PCR durchgeführt und die Ergebnisse mit der natürlichen DNA verglichen (Abb. 38 und Anhang, Abb. 46 und 47). Es zeigte sich hierbei erneut, dass die exponentielle Amplifikationsphase der chemisch modifizierten Ligationsprodukte *HP-VI_{a-e}-VII-VIII/VI'-VII'-VIII'* durchschnittlich drei bis vier Zyklen später erreicht wird. Ferner konnten minimale Unterschiede zwischen den verschiedenen chemisch modifizierten Ligationsprodukten *HP-VI_{a-e}-VII-VIII/VI'-VII'-VIII'* beobachtet werden, die gegebenenfalls auf die Position sowie die Anzahl an 7-Deazaadenin-Einheiten zurückzuführen ist. Im Hinblick auf eine DEL-Synthese sollte dies das zu erwartende Ausmaß der Amplifikationsunterschiede darstellen, da in zukünftigen DEL-Synthesen die DNA-Barcodes durchschnittlich nicht mehr als die getesteten drei bis fünf 7-Deazaadenine enthalten werden.

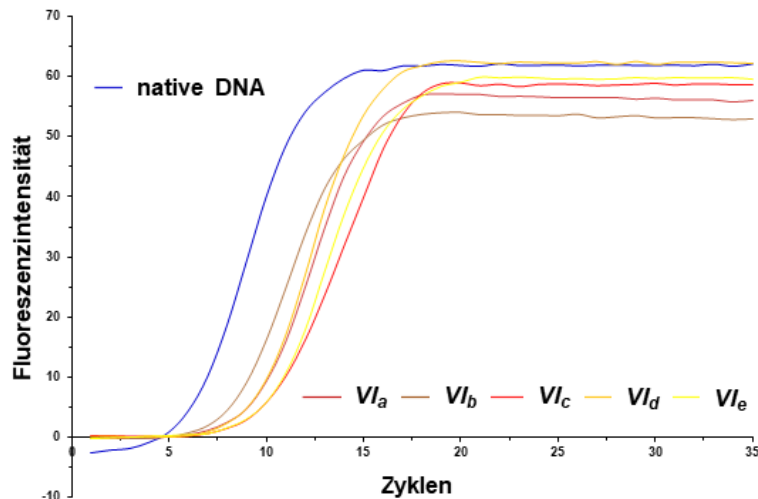
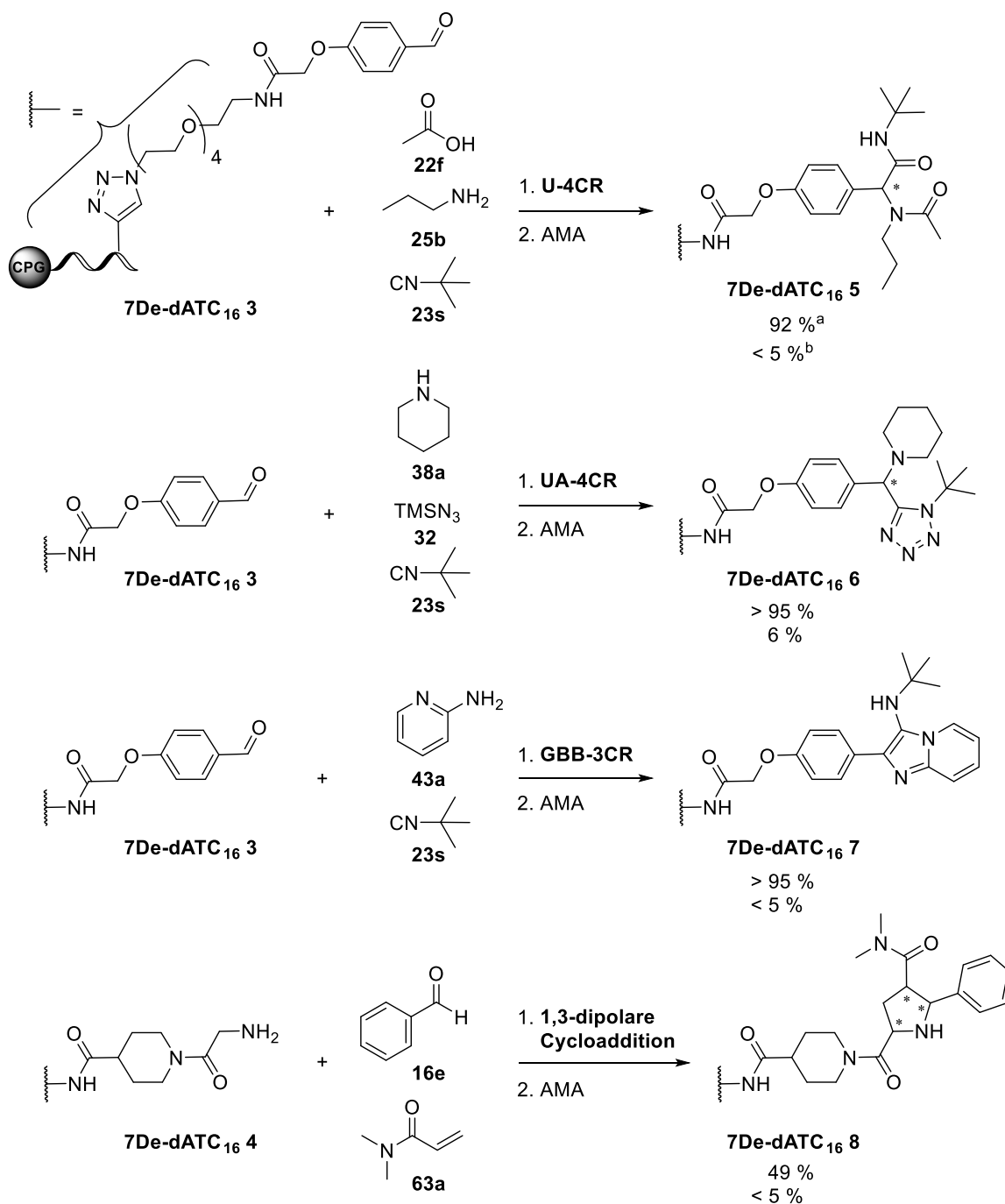


Abbildung 38: Amplifikationskurven der Echtzeit-PCR der 7-Deazaadenin-enthaltenen Ligationsprodukte *HP-VI_{a-e}-VII-VIII/VI'-VII'-VIII'* und des nativen Ligationsproduktes *HP-VI_a-VII-VIII/VI'-VII'-VIII'*. Für den Vergleich der chemisch modifizierten DNA mit der nativen DNA wurden die Amplifikationskurven bei einer DNA-Templat-Konzentration von 500 pg/μL gezeigt.

Die Ligations-, Amplifikations- als auch Sequenzierungsergebnisse zeigen, dass die Nukleobase Adenin durch die chemisch stabilere Struktur 7-Deazaadenin ersetzt und im Rahmen der DNA-Haarnadelstruktur-basierten Kodierungsstrategie zur DEL-Synthese eingesetzt werden kann.

5.3 Überführung von ATCG-DNA-kompatiblen sowie -inkompatiblen chemischen Reaktionen auf CPG-gebundenen 7De-dATC-DNA-Sequenzen

Basierend auf den Erkenntnissen, dass 7De-dATC-DNA-Sequenzen nicht nur chemisch stabiler sind, sondern ebenso korrekt von Enzymen erkannt und damit ligiert, amplifiziert sowie sequenziert werden können, wurden die zuvor etablierten DNA-kompatiblen als auch die DNA-inkompatiblen Reaktionen auf CPG-gekoppelte 7De-dATC-DNA-Sequenzen überführt. Für die Isocyanid-basierten Multikomponentenreaktionen sowie die Yb(III)-katalysierte Pyrazolsynthese wurde ein CPG-gebundenes 16mer 7De-dATC-Aldehyd-Konjugat **7De-dATC₁₆ 3** und für die Ag(I)-vermittelte 1,3-dipolare Cycloaddition ein entsprechendes Glycin-Konjugat **7De-dATC₁₆ 4** als Startmaterialien verwendet. Die CPG-gebundene 16mer 7De-dATC-DNA **7De-dATC₁₆ 1** wurde, wie zuvor bereits beschrieben, zunächst mit einem Fmoc-geschützten PEG(4)-Linker **80** über CuAAC modifiziert und nach erfolgter Fmoc-Entschützung (**7De-dATC₁₆ 2**) zu den jeweiligen CPG-gekoppelten Startmaterialien **7De-dATC₁₆ 3** und **7De-dATC₁₆ 4** über Amidkupplung umgesetzt.

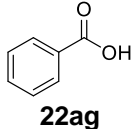
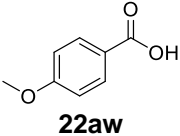
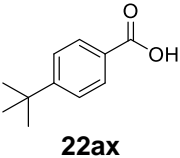
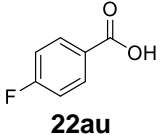
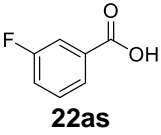
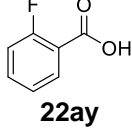
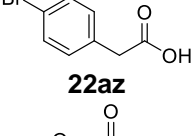
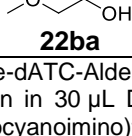


Scheme 26: Überführung DNA-kompatibler Reaktionen auf CPG-gebundene 16mer 7De-dATC-Konjugate. Isocyanid-basierte MCRs wurden auf dem CPG-gebundenen 16mer 7De-dATC-Aldehyd-Konjugat **7De-dATC₁₆ 3** und die 1,3-dipolare Cycloaddition auf dem CPG-gebundenen 16mer 7De-dATC-Glycin-Konjugat **7De-dATC₁₆ 4** durchgeführt. U-4CR: 1. Iminbildung mit Propylamin **25b** in MeOH für 3 h bei RT, dann Zugabe von *tert*-Butylisocyanid **23s** und Essigsäure **22af**, Reaktion bei 50 °C für 16 h; 2. AMA für 4 h. UA-4CR: 1. Iminbildung mit Piperidin **38a** in MeOH für 3 h bei RT, dann Zugabe von *tert*-Butylisocyanid **23s** und TMSN₃ **32**, Reaktion bei 50 °C für 16 h; 2. AMA für 4 h. GBB-3CR: Iminbildung mit 2-Aminopyridin **43a** in MeOH für 6 h bei RT, dann Zugabe von *tert*-Butylisocyanid **23s** und 1 % Essigsäure, Reaktion bei RT für 16 h; 2. AMA für 4 h. 1,3-Dipolare Cycloaddition: Iminbildung mit Benzaldehyd **16e** in ACN/TEOF (2:1) für 6 h bei RT, dann Zugabe von *N,N*-Dimethylacrylamid **63a**, TEA und AgOAc, Reaktion bei 50 °C für 16 h; 2. AMA für 4 h. ^a Umsatzbestimmung mittels analytischer RP-HPLC-Analyse aus dem Verhältnis von Startmaterial **7De-dATC₁₆ 3/4** und Produkt **7De-dATC₁₆ 5-8**. ^b DNA-Degradation ermittelt mittels analytischer RP-HPLC-Analyse. 16mer 7De-dATC = 5'-CT*CTCTTT7De-dA7De-dACT7De-dACC T-3'. T* = Ethynyl-dU wurde mit N₃-PEG(4)-NH-Fmoc **80** mittels CuAAC modifiziert, gefolgt von einer Fmoc-Entschützung und darauffolgenden Amidkupplung(en) zur Darstellung der CPG-gebundenen Startmaterialien.

Die U-4CR, die UA-4CR sowie die Säure-vermittelte GBB-3CR, welche zuvor auf einem CPG-gebundenen 10mer ATCG-Konjugat hinsichtlich des Substratspektrums untersucht wurden, konnten unter Verwendung der optimierten Reaktionsbedingungen problemlos auf dem CPG-gekoppelten 16mer 7De-dATC-Aldehyd-Konjugat **7De-dATC₁₆ 3** durchgeführt werden. Für alle drei Reaktionen konnte im Rahmen der Messgenauigkeit ein quantitativer Umsatz zu den jeweiligen Zielprodukten **7De-dATC₁₆ 5-7** bei minimaler DNA-Degradation von bis zu 6 % beobachtet werden (Schema 26). Bei der Übertragung der ebenso DNA-kompatiblen Ag(I)-vermittelten 1,3-dipolaren Azomethin-Ylid-Cycloaddition auf das CPG-gebundene 16mer 7De-dATC-Glycin-Konjugat **7De-dATC₁₆ 4** konnte die Bildung des Zielproduktes **7De-dATC₁₆ 8** mit einem Umsatz von 49 % sowie vernachlässigbaren Mengen an DNA-Degradierung (<5 %) detektiert werden (Schema 26). Im Vergleich zu der auf einem CPG-gekoppelten 10mer ATCG-Glycin-Konjugat **ATCG₁₀ 11** durchgeführten 1,3-dipolaren Cycloaddition entspricht dies einen um 21 % geringeren Umsatz (Kapitel 4.5, Tabelle 12, Eintrag 1). Der nun niedrigere Umsatz ist möglicherweise auf die verlängerte DNA-Sequenz (10mer vs. 16mer) oder den nun verwendeten PEG-Linker (vs. C₆-Aminolinker) zurückzuführen, welche die Reaktivität des Startmaterials beeinflussen können.

Als nächstes wurde die U-4CR/aza-Wittig-Reaktion, welche sich zuvor als nicht kompatibel mit einer CPG-gebundenen 10mer ATCG-DNA erwies, auf der CPG-gekoppelten 16mer 7De-dATC-Sequenz untersucht. Das CPG-gebundene 16mer 7De-dATC-Aldehyd-Konjugat **7De-dATC₁₆ 3** wurde mit *N*-Boc-Piperazin **38b**, Benzoesäure **22ag** und (Isocyanoimino)triphenylphosphoran **39** unter Anwendung der optimierten Reaktionsbedingungen umgesetzt. *N*-Boc-Piperazin **38b** wurde deshalb ausgewählt, um im Hinblick auf eine zukünftige DEL-Synthese in Folge einer Boc-Entschützung eine freie Aminofunktion zu generieren, welche durch Folgereaktionen weiter derivatisiert werden kann. Das Zielprodukt **7De-dATC₁₆ 9a** wurde mit 39 % Umsatz gebildet und es konnte im Vergleich zur Verwendung eines CPG-gekoppelten 10mer ATCG-Aldehyd-Konjugats **ATCG₁₀ 2a** eine um 8 % geringere DNA-Degradation von 24 % beobachtet werden (Tabelle 16, Eintrag 1). Darauf folgend wurde der Einsatz diverser Säuren im Rahmen der U-4CR/aza-Wittig-Reaktion auf chemisch modifizierter, CPG-gebundener 16mer 7De-dATC-DNA untersucht (Tabelle 16). Insgesamt führte die U-4CR/aza-Wittig-Reaktion (im Vergleich zur Untersuchung auf hexT) zu geringeren Umsätzen von 32-49 % bei einer DNA-Degradation zwischen 14 und 35 %. Der im Vergleich zum analysierten Substratspektrum auf hexT-DNA verringerte Umsatz ist gegebenenfalls auf die um 10 Basenpaare verlängerte DNA-Sequenz zurückzuführen (Vergleich Tabelle 16 mit Tabelle 8 aus Kapitel 4.3).

Tabelle 16: Untersuchung des Substratspektrums der U-4CR/aza-Wittig-Reaktion auf CPG-gebundenem 16mer 7De-dATC-Aldehyd-Konjugat **7De-dATC₁₆ 3** durch Einsatz diverser Säuren.^a

Eintrag	Produkt	Säure	Umsatz [%] ^b	DNA-Degradierung [%] ^c	Masse _{ber.} Masse _{gef.} ^d
1	7De-dATC₁₆ 9a	 22ag	39	24	5488,0 5489,1
2	7De-dATC₁₆ 9b	 22aw	39	28	5518,0 5518,4
3	7De-dATC₁₆ 9c	 22ax	32	22	5556,0 5557,2
4	7De-dATC₁₆ 9d	 22au	49	18	5506,0 5507,5
5	7De-dATC₁₆ 9e	 22as	33	14	5506,0 5507,7
6	7De-dATC₁₆ 9f	 22ay	41	23	5506,0 5506,9
7	7De-dATC₁₆ 9g	 22az	41	35	5580,9 5581,9
8	7De-dATC₁₆ 9h	 22ba	49	29	5456,0 5457,0

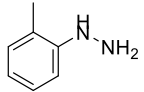
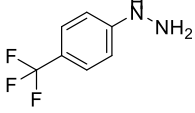
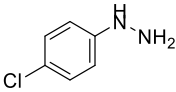
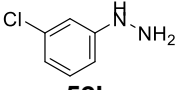
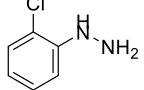
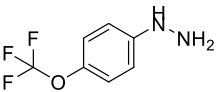
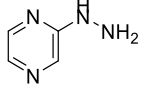
^a Das CPG-gebundene 16mer 7De-dATC-Aldehyd-Konjugat **7De-dATC₁₆ 3** (20 nmol) und *N*-Boc-Piperazin **38b** (1000 Äquiv., 20 µmol) wurden in 30 µL DCE bei Raumtemperatur für drei Stunden zur Iminbildung inkubiert. Anschließend wurden (Isocyanoimino)triphenylphosphoran **39** (1000 Äquiv., 20 µmol) und die Säure **22** (1000 Äquiv., 20 µmol), gelöst in 80 µL DCE, hinzugegeben und die Reaktionsmischung wurde bei 50 °C für 16 h geschüttelt. Die Entschützung sowie die Abspaltung der DNA von der festen Phase erfolgte mit AMA-Lösung bei Raumtemperatur für 4 h. ^b Umsatzbestimmung mittels analytischer RP-HPLC-Analyse aus dem Verhältnis von Startmaterial **7De-dATC₁₆ 3** und Produkt **7De-dATC₁₆ 9**. ^c DNA-Degradation ermittelt mittels analytischer RP-HPLC-Analyse. ^d Massendetektion mittels MALDI-MS. 16mer 7De-dATC = 5'-CT^{*}C TCT TT7De-dA 7De-dACT 7De-dACC T-3'. T^{*} = Ethynyl-dU wurde mit N₃-PEG(4)-NH-Fmoc **80** mittels CuAAC modifiziert, gefolgt von einer Fmoc-Entschützung und darauffolgender Amidkupplung zur Darstellung des CPG-gebundenen Startmaterials.

Eine weitere Reaktion, die zu erheblicher Degradation nativer DNA (bis zu 69 %) führte, stellt die zuvor auf 10mer TC-DNA etablierte Yb(PFO)₃-katalysierte Dreikomponentenreaktion zur Darstellung von substituierten Pyrazolverbindungen dar. Um die Kompatibilität dieser Reaktion mit chemisch modifizierter DNA zu analysieren, wurde das CPG-gekoppelte 16mer 7De-dATC-Aldehyd-Konjugat **7De-dATC₁₆ 3** unter Anwendung der optimierten Reaktionsbedingungen mit Phenylhydrazin **52a** und Acetessigester **53a** zur Reaktion gebracht. Im Vergleich zur Reaktion auf CPG-gebundener 10mer ATCG-DNA unter Verwendung der gleichen Substrate, bei welcher eine DNA-Degradation von 69 % festgestellt wurde, konnte hierbei eine deutliche Reduktion der DNA-Degradation auf 33 % beobachtet werden (Tabelle 17, Eintrag 1). Gleichzeitig führte die Reaktion zur Bildung des Zielprodukts **7De-dATC₁₆ 10a** mit einem Umsatz von 50 %. Als nächstes wurden Untersuchungen zum Substratspektrum der Yb(III)-katalysierten Pyrazolsynthese auf dem CPG-gekoppelten 16mer 7De-dATC-Aldehyd-Konjugat **7De-dATC₁₆ 3** durchgeführt. Im Rahmen dieser Untersuchung wurden diverse aromatische Hydrazine getestet (Tabelle 17).

Tabelle 17: Untersuchung des Substratspektrums der Yb(PFO)₃-vermittelten Dreikomponentenreaktion zur Darstellung von substituierten Pyrazolen auf CPG-gebundenem 16mer 7De-dATC-Aldehyd-Konjugat **7De-dATC₁₆ 3** durch Einsatz diverser aromatischer Hydrazine.^a

Eintrag	Produkt	Hydrazin	Umsatz [%] ^b	DNA-Degradierung [%] ^c	Masse _{ber.} Masse _{gef.} ^d
1	7De-dATC₁₆ 10a		50	33	5373,9 5371,0
2	7De-dATC₁₆ 10b		27	50	5403,9 5405,0
3	7De-dATC₁₆ 10c		44	29	5387,9 5388,7
4	7De-dATC₁₆ 10d		39	35	5387,9 5389,6

Fortsetzung Tabelle 17

5	7De-dATC₁₆ 10e		41	46	5387,9 5390,4
		52e			
6	7De-dATC₁₆ 10f		44	17	5441,9 5443,5
		52f			
7	7De-dATC₁₆ 10g		56	20	5408,3 5409,5
		52g			
8	7De-dATC₁₆ 10h		51	20	5408,3 5410,1
		52h			
9	7De-dATC₁₆ 10i		56	25	5408,3 5409,6
		52i			
10	7De-dATC₁₆ 10j		47	25	5457,9 5459,5
		52j			
11	7De-dATC₁₆ 10k		n.d.	-	5375,8 n.d.
		52k			

^a Das CPG-gebundene 16mer 7De-dATC-Aldehyd-Konjugat **7De-dATC₁₆ 3** (20 nmol) und das Hydrazin **52** (250 Äquiv., 5 μ mol) wurden in 30 μ L Toluol bei Raumtemperatur für 30 min zur Iminbildung inkubiert. Anschließend wurden Acetessigester **53a** (3000 Äquiv., 60 μ mol) sowie Yb(PFO)₃ (250 Äquiv., 5 μ mol), gelöst in 50 μ L Toluol, hinzugegeben und die Reaktionsmischung wurde bei 50 °C für 16 h geschüttelt. Die Entschützung sowie die Abspaltung der DNA von der festen Phase erfolgte mit AMA-Lösung bei Raumtemperatur für 4 h. ^b Umsatzbestimmung mittels analytischer RP-HPLC-Analyse aus dem Verhältnis von Startmaterial **7De-dATC₁₆ 3** und Produkt **7De-dATC₁₆ 10**. ^c DNA-Degradation ermittelt mittels analytischer RP-HPLC-Analyse. ^d Massendetektion mittels MALDI-MS. 16mer 7De-dATC = 5'-CT^{*}C TCT TT7De-dA 7De-dACT 7De-dACC T-3'. n.d. = nicht detektiert. T^{*} = Ethynyl-dU wurde mit N₃-PEG(4)-NH-Fmoc **80** mittels CuAAC modifiziert, gefolgt von einer Fmoc-Entschützung und darauffolgender Amidkupplung zur Darstellung des CPG-gebundenen Startmaterials.

Erneut konnte beobachtet werden, dass Phenylhydrazine mit elektronenschiebenden Gruppen zu einer höheren DNA-Degradierung (29-50 %; Tabelle 17, Einträge 2-5) führen als Phenylhydrazine mit einer geringeren Elektronendichte (17-25 %; Tabelle 17, Einträge 6-10). Allerdings konnte für die Yb(III)-vermittelte Pyrazolsynthese auf dem CPG-gekoppelten 7De-dATC-Aldehyd-Konjugat **7De-dATC₁₆ 3** im Vergleich zum CPG-gebundenen TC-DNA-Aldehyd-Konjugat **Tc₁₀ 2** bei Einsatz von elektronenschiebenden Substituenten eine insgesamt geringere DNA-Degradierung um 2-28 % detektiert werden, wobei gleichzeitig ähnliche Umsätze erzielt wurden (Vergleich Tabelle 17 mit Tabelle 14 aus Kapitel 4.6). Hingegen konnte unter Verwendung von Phenylhydrazinen mit elektronenziehenden Gruppen eine ähnliche DNA-Degradierung der 7De-dATC- und der TC-DNA detektiert werden, jedoch wurden in

diesem Fall etwas geringere Umsätze zum jeweiligen 7De-dATC-Produkt generiert (Vergleich Tabelle 17 mit Tabelle 14 aus Kapitel 4.6).

5.4 Experimente zur Boc-Entschützung von 7De-dATC-gebundenen U-4CR/aza-Wittig-Produkten

In vielen Fällen wird bei der Synthese von DNA-kodierten Substanzbibliotheken auf Schutzgruppenchemie zurückgegriffen. Eine der kommerziell am häufigsten verwendeten Schutzgruppen von Molekülbausteinen stellt die Boc-Schutzgruppe dar. Der Einsatz von Boc-Schutzgruppen in der DEL-Synthese basierend auf der CPG-Strategie hat den Vorteil, dass es bei der chromatographischen Aufreinigung der DNA-Molekül-Konjugate zu einer signifikanten Verschiebung der Retentionszeit im Vergleich zu den Startmaterialien und den DNA-Degradationsprodukten sowie DNA-Abbruchsequenzen kommt und somit eine Isolierung der jeweiligen Zielprodukte und folglich eine hohe Reinheit der finalen DEL erzielt werden kann. Die Entfernung von Boc-Schutzgruppen erfolgt typischerweise unter stark sauren Bedingungen und stellt damit eine Herausforderung in der DEL-Technologie dar, da native DNA unter stark sauren Bedingungen degradiert wird.

Im vorausgegangenen Stabilitätsscreening wurde gezeigt, dass die chemisch modifizierte, Festphasen-gebundene 7De-dATC-DNA in Gegenwart wässriger TFA-Lösung über einen längeren Zeitraum stabil ist (Kapitel 5.1). Ermutigt durch diesen Befund, wurde das vom CPG-abgespaltene, 7De-dATC-gekoppelte U-4CR/aza-Wittig-Produkt **7De-dATC₁₆ 9f** ebenfalls mit wässriger 10 %iger TFA-Lösung für 4 h behandelt. Nach ethanolischer Fällung der Reaktionsmischung konnte in der Tat das gewünschte Boc-entschützte DNA-Konjugat **7De-dATC₁₆ 11**, auch in diesem Fall ohne detektierbare Degradation der chemisch modifizierten DNA, nachgewiesen werden (Abb. 39).

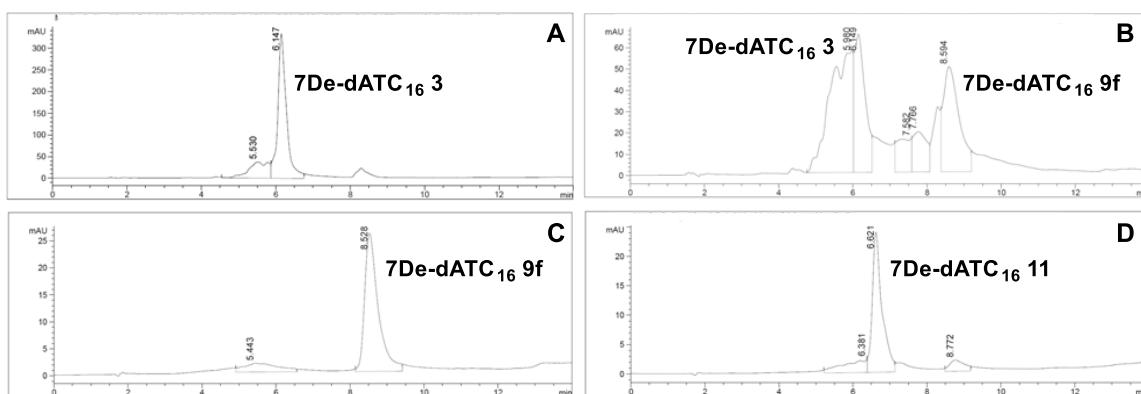
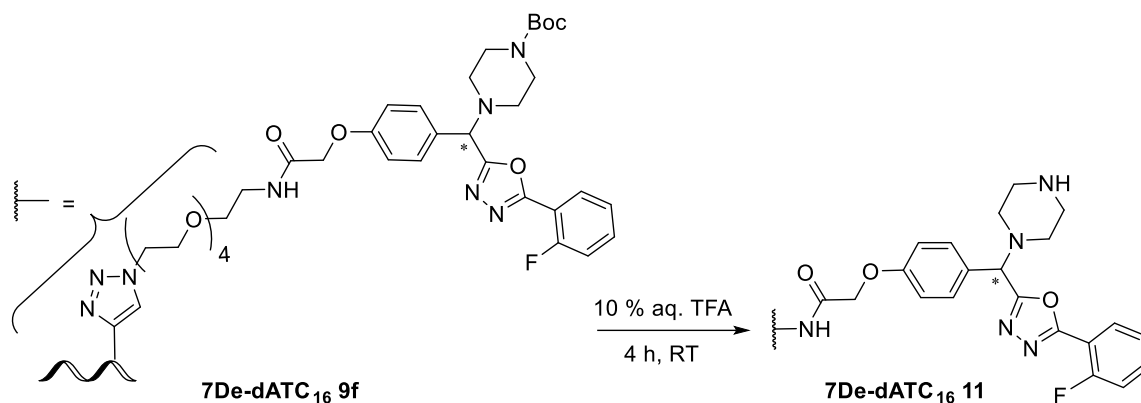
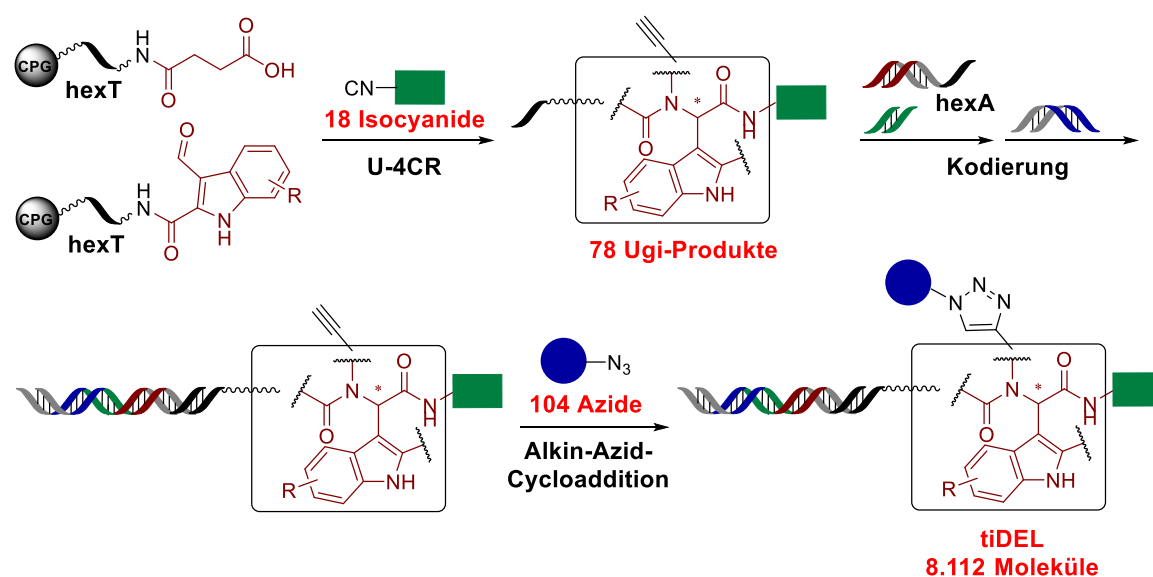


Abbildung 39: TFA-vermittelte Boc-Entschützung eines 7De-dATC-DNA-U-4CR/aza-Wittig-Produktes. A. RP-HPLC-Chromatogramm des 7De-dATC-DNA-Aldehyd-Konjugats **7De-dATC₁₆ 3**. B. RP-HPLC-Chromatogramm der Reaktionsmischung der durchgeführten U-4CR/aza-Wittig-Reaktion auf dem CPG-gebundenen 7De-dATC-DNA-Aldehyd-Konjugat **7De-dATC₁₆ 3** mit *N*-Boc-Piperazin **38b**, 2-Fluorbenzoesäure **22ay** und (Isocyanoimino)triphenylphosphoran **39**. C. RP-HPLC-Chromatogramm des über präparativer RP-HPLC isolierten 7De-dATC-DNA-U-4CR/aza-Wittig-Produktes **7De-dATC₁₆ 9f**. D. RP-HPLC-Chromatogramm der Reaktionsmischung in Folge der TFA-vermittelten Boc-Entschützung des 7De-dATC-DNA-U-4CR/aza-Wittig-Produktes **7De-dATC₁₆ 11**.

6 Diskussion und Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der Technologie der DNA-kodierten Substanzbibliotheken und wurde in drei Abschnitte unterteilt.

Im ersten Teil wurde eine Indol-fokussierte DNA-kodierte Substanzbibliothek basierend auf der Ugi-Vierkomponentenreaktion unter Verwendung des im Arbeitskreis Brunschweiger etablierten TiDEC-Kodierungsformates erfolgreich synthetisiert und gegen die Proteine MDM2 und TEAD4 selektioniert (Schema 27 und Abb. 40).^[47,153]



Schema 27: tiDEL-Synthese.^[153]

Trotz ihrer im Vergleich zu anderen DELs (10^8 - 10^9 Moleküle in drei bis vier Syntheszyklen) geringen Bibliotheksgröße (8.112 Moleküle), war diese DEL sehr produktiv und es konnten mehrere Moleküle, welche im Selektionsassay angereichert wurden, nach erfolgter Hit-Resynthese als MDM2- bzw. TEAD4-Binder validiert werden.^[153] Einer der identifizierten TEAD4-Binder war außerdem in der Lage, die TEAD-YAP-Protein-Protein-Wechselwirkung nicht nur *in vitro*, sondern auch in Zellen zu inhibieren. Unter Verwendung dieser kleinen, aber fokussierten DEL konnte somit für ein Proteintarget, welches als schwierig zu adressieren gilt und für welches es bislang kaum bekannte Inhibitoren gibt, ein PPI-Inhibitor identifiziert werden. Der Bindungsmodus der im Selektionsassay gefundenen Moleküle konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden und bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen. Ebenfalls eröffnet diese Arbeit Raum für Studien zu einem besseren Verständnis der Struktur-Wirkungs-Beziehungen.

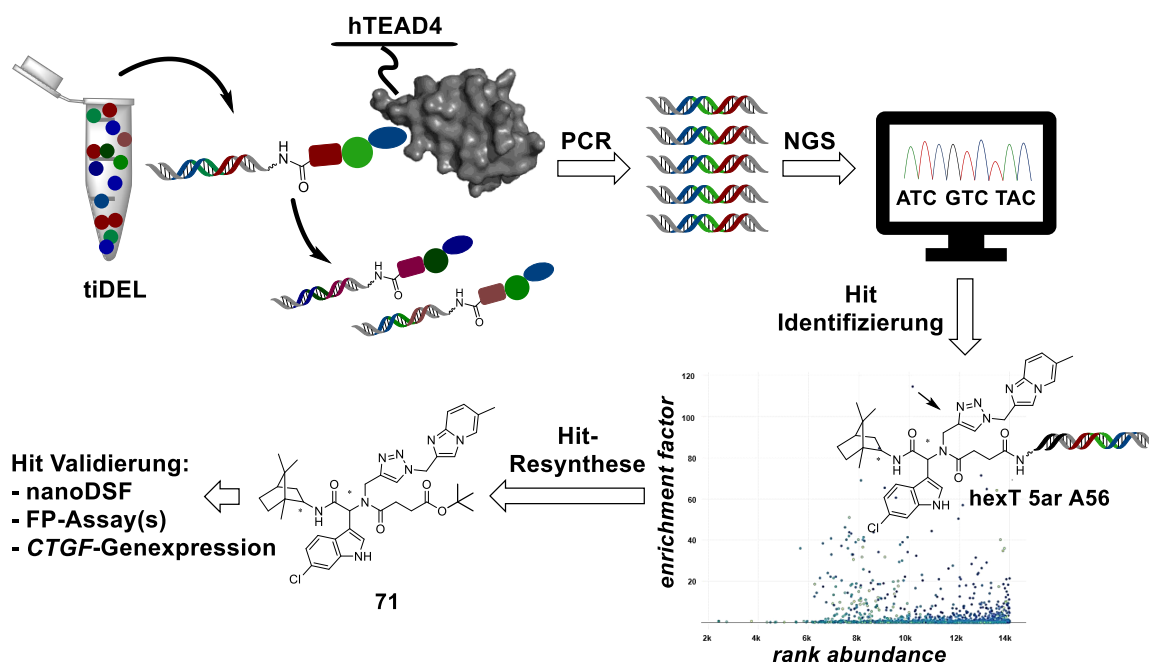
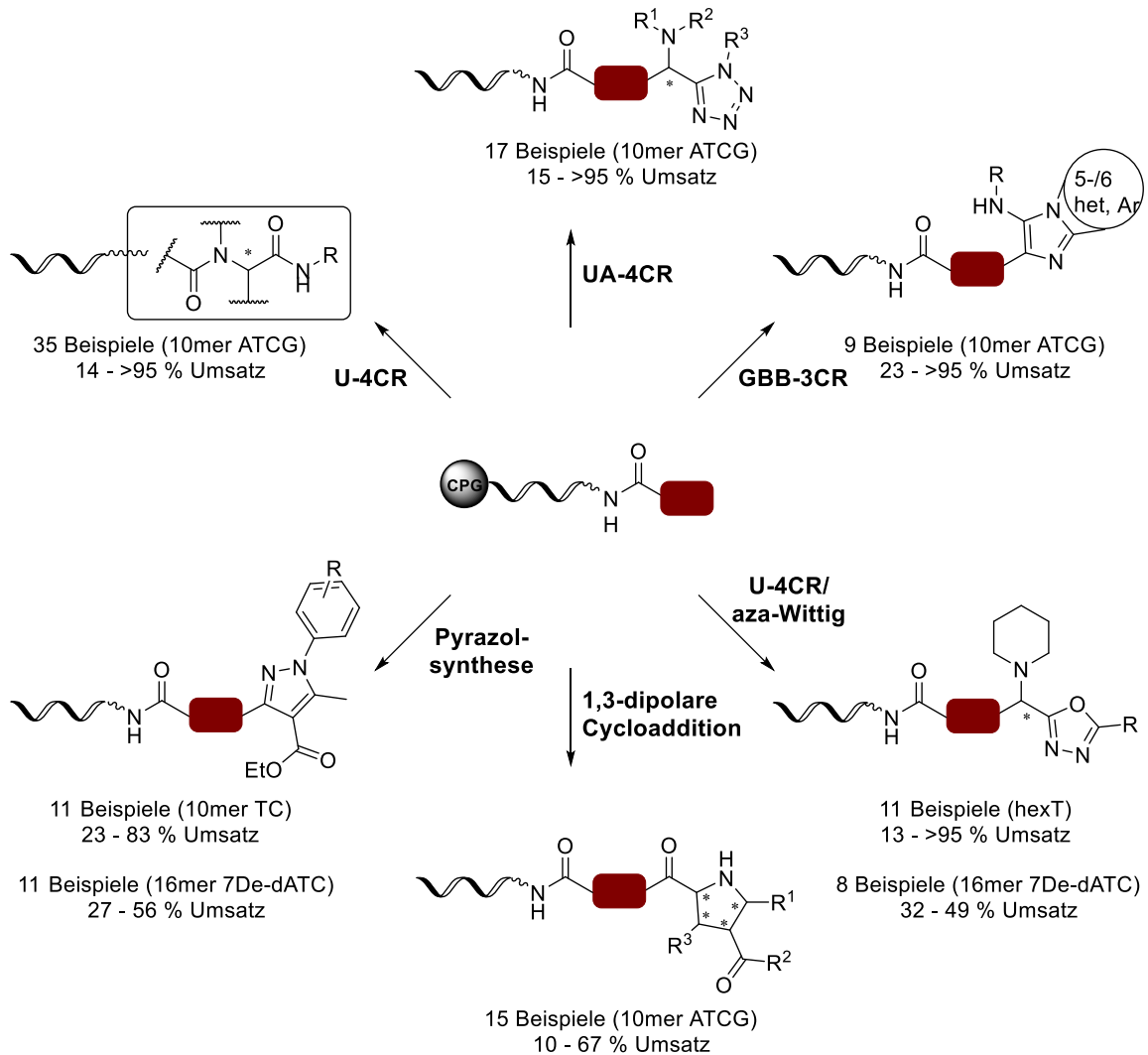


Abbildung 40: Affinitäts-basiertes Selektionsassay der tiDEL gegen hTEAD4 mit anschließender Hit-Identifizierung, -Resynthese und -Validierung.^[153]

Ein weiterer Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Überführung diverser chemischer Reaktionen auf DNA zur Erweiterung des Spektrums an Synthesemethoden für das Design von DELs. Zu Beginn dieser Arbeit (Dezember 2017) beinhaltete dieses größtenteils Carbonyl-basierte Chemie, nukleophile (aromatische) Substitutionsreaktionen sowie sp^2 - sp^2 -Kreuzkupplungen. Viele der bislang publizierten Synthesestrategien von DNA-kodierten Molekülen finden, da sie auf der „headpiece“-Strategie beruhen, in Wasser oder in wässrigen Lösungsmittelgemischen statt. In der vorliegenden Arbeit wurde hingegen auf den im Arbeitskreis Brunschweiler etablierten Festphasen-basierten Ansatz zurückgegriffen. Neben der freien Auswahl an organischen (trockenen) Lösungsmitteln sowie der Möglichkeit, Reaktionsmischungen über Filtration zu reinigen, profitiert dieser Ansatz von einer erhöhten Stabilität der Festphasen-gebundenen DNA-Oligonukleotide durch das Vorhandensein von Schutzgruppen an den einzelnen Nukleotiden. In einer systematischen Analyse, welche parallel zur Erstellung dieser Arbeit erfolgte, wurde die deutlich erhöhte Stabilität CPG-gebundener DNA-Sequenzen in Anwesenheit von diversen Metallsalzen und organischen Reagenzien gezeigt.^[46]

Basierend auf der CPG-Festphasenstrategie konnten insgesamt sechs verschiedene Reaktionen auf ein DNA-Kodierungsformat übertragen werden (Schema 28). Dabei ließen sich die Ugi- sowie die Ugi-Azid-Vierkomponentenreaktion, die Groebke-Blackburn-Bienaymé-Dreikomponentenreaktion und die AgOAc-vermittelte 1,3-dipolare Azomethin-Ylid-Cycloaddition erfolgreich auf CPG-gebundenen ATCG-DNA-Oligonukleotiden ohne

größere DNA-Degradation durchführen.^[155,156] Die Ugi-Vierkomponenten-aza-Wittig-Reaktion und die Yb(PFO)₃-vermittelte Dreikomponentenreaktion zur Pyrazolsynthese konnten hingegen zunächst lediglich auf der sehr stabilen, CPG-gebundenen hexT-Sequenz bzw. auf der ebenfalls CPG-gekoppelten TC-Sequenz etabliert werden.^[156] Im Gegensatz zur hexT-DNA wäre mit TC-Sequenzen, die ein ähnliches Stabilitätsprofil wie hexT besitzen, eine Kodierung von einigen wenigen Startmaterialien möglich.



Schema 28: Etablierung diverser chemischer Reaktionen auf CPG-gebundener DNA.^[155,156]

Die U-4CR, die GBB-3CR sowie die 1,3-dipolare Cycloaddition wurden zunächst auf der stabilen CPG-gebundenen hexT-Sequenz optimiert und im Anschluss wurden die optimierten Reaktionsbedingungen auf eine CPG-gekoppelte 10mer ATCG-DNA überführt und dadurch auf ihre DNA-Kompatibilität untersucht. In Zukunft sollte die Optimierung der Reaktionsbedingungen direkt auf einer ATCG-DNA-Sequenz, oder wenigstens auf einer TC-Sequenz aufgrund der Möglichkeit der Kodierung, unter Berücksichtigung der DNA-Stabilität, durchgeführt werden. Reaktionsbedingungen, die im Laufe einer Optimierung getestet werden und in geringen Umsätzen resultieren, könnten

gegebenenfalls gleichzeitig zu einer geringeren Degradierung der ATCG-DNA führen, während die optimierten Reaktionsbedingungen die ATCG-DNA komplett degradieren können.

Im Hinblick auf eine mögliche Anwendung der Isocyanid-basierten MCRs zur Synthese von DELs wurden, mit Ausnahme der GBB-3CR, bifunktionelle Boc-geschützte Molekülbausteine (Boc-geschütztes Aminopiperidin **25m** und Boc-geschütztes Aminopiperazin **38b**) getestet. Da die Verfügbarkeit der Isocyanide ein limitierender Faktor zur Synthese größerer Substanzbibliotheken darstellt, würde sich für die GBB-3CR ein Boc-geschütztes Isocyanid eignen. Im weiteren Verlauf einer möglichen DEL-Synthese könnte im Anschluss an die Boc-Entschützung die freie Aminofunktion, beispielsweise über Amidkupplung mit unterschiedlichen Carbonsäuren, modifiziert werden. Die Herstellung einer DEL über die Yb(PFO)₃-vermittelte Dreikomponentenreaktion zur Darstellung von DNA-Pyrazol-Konjugaten weist hingegen einen deutlich limitierten Anwendungsbereich bezüglich der einsetzbaren Hydrazine auf. Für den weiteren Verlauf einer möglichen DEL-Synthese könnte der im DNA-Pyrazol-Konjugat vorhandene Ester gespalten und anschließend in einer Amidkupplung mit Aminen als Diversitätselement umgesetzt werden. Eine Strategie zur Darstellung von substituierten Pyrrolidinen über die Ag(I)-vermittelte 1,3-dipolare Azomethin-Ylid-Cycloaddition im Rahmen einer DEL-Synthese wurde bislang noch nicht näher untersucht. Die Verwendung des Dipolarophils *N,N*-Dimethylacrylamid **63a** resultiert in schwer spaltbaren Amiden und der Einsatz von Acrylsäuremethylester **63b** sowie Maleinsäuredimethylester **63c** führte zur Bildung der Zielprodukte in geringen Umsätzen zwischen 10-20 %. Eine Möglichkeit zur Anwendung der 1,3-dipolaren Azomethin-Ylid-Cycloaddition im Rahmen einer DEL-Synthese könnte darauf basieren, den Pyrrolidin-Stickstoff durch Amidkupplung bzw. reduktiver Aminierung zu derivatisieren. In diesem Fall müsste jedoch die Reaktivität dieses Stickstoffs näher untersucht werden.

Der große Nutzen der eingesetzten CPG-Festphasenstrategie zeigt sich auch daran, dass parallel zur vorliegenden Arbeit weitere organische Reaktionen in der Arbeitsgruppe Brunschweiler erfolgreich auf CPG-gebundener DNA überführt werden konnten. Unter anderem wurde die Yb(III)-vermittelte Castagnoli-Cushman-Reaktion, eine ZnCl₂-medierte aza-Diels-Alder-Reaktion, eine (*R*)-(-)-BNDHP-vermittelte Povarov- sowie die Biginelli-Reaktion als auch eine Kupfer(I)/Bipyridin-vermittelte Petasis-Reaktion auf Festphasen-gekoppelten DNA-Sequenzen beschrieben.^[155,46,158]

Die Relevanz dieser Forschung wird außerdem dadurch untermauert, dass seit Beginn der vorliegenden Arbeit ebenso von anderen Arbeitsgruppen eine Vielzahl an chemischen

Reaktionen, wie beispielsweise eine sp^2 - sp^3 -Kreuzkupplung zwischen DNA-gekoppelten Arylhalogeniden und redoxaktiven Esterverbindungen, eine Ir-/Ni-katalysierte Photoredoxreaktion zwischen Carbonsäuren und DNA-gebundenen Arylhaliden oder die Synthese von gesättigten Heterozyklen unter Verwendung von SnAP-Reagenzien, dem Synthespektrum von DELs hinzugefügt werden konnte.^[159–161]

Eine weitere Möglichkeit zur Übertragung von chemischen Reaktionen, besonders solchen, die harschere Reaktionsbedingungen benötigen, ist der Einsatz von chemisch modifizierten DNA-Oligonukleotiden. Im letzten Abschnitt der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ATC-DNA-Sequenzen, in denen die natürliche Nukleobase Adenin durch die Base 7-Deazaadenin ausgetauscht wurde, im Rahmen einer Kodierungsstrategie ligiert, amplifiziert und auch sequenziert werden können (Abb. 42). Der eigentliche Vorteil der Verwendung der chemisch modifizierten 7De-dATC-DNA basiert auf der deutlich erhöhten Stabilität gegenüber Reaktionsbedingungen, die zu Depurinierung der DNA führen können. Neben den ATCG-kompatiblen chemischen Reaktionen (U-4CR, UA-4CR, GBB-3CR, 1,3-dipolare Cycloaddition), welche problemlos auf CPG-gebundene 7De-dATC-DNA überführt werden konnten, konnten ebenso die U-4CR/aza-Wittig-Reaktion sowie die $Yb(PFO)_3$ -vermittelte Pyrazolsynthese auf CPG-gekoppelte, chemisch modifizierte DNA mit verringerter DNA-Degradation übertragen werden (Schema 28). Parallel dazu konnte durch die AG Brunschweiler ferner die TFA-vermittelte Pictet-Spengler-Reaktion als auch die Au(I)-vermittelte Pyrazol(in)synthese auf CPG-gebundener, chemisch modifizierter DNA ohne detektierbarer DNA-Degradation überführt werden. Beide genannten Reaktionen konnten zuvor lediglich auf der sehr stabilen, CPG-gekoppelten hexT-Sequenz erfolgreich durchgeführt werden. Zuletzt konnte im Hinblick auf eine mögliche DEL-Synthese die Abspaltung von Boc-Schutzgruppen in wässriger Lösung demonstriert werden. Die Boc-Schutzgruppe ist nicht nur eine der am häufigsten verwendeten Schutzgruppen in Molekülbausteinen, sondern sie sorgt aufgrund ihrer ausgeprägten Hydrophobizität für eine signifikante Verschiebung der Retentionszeit während der chromatographischen Aufreinigung von DNA-Molekül-Konjugaten. Der Einsatz von chemisch modifizierten DNA-Sequenzen erweitert demnach nicht nur das Repertoire an möglichen Synthesemethoden von DELs, sondern erleichtert gleichzeitig die Synthese von DELs mit höherer Reinheit.

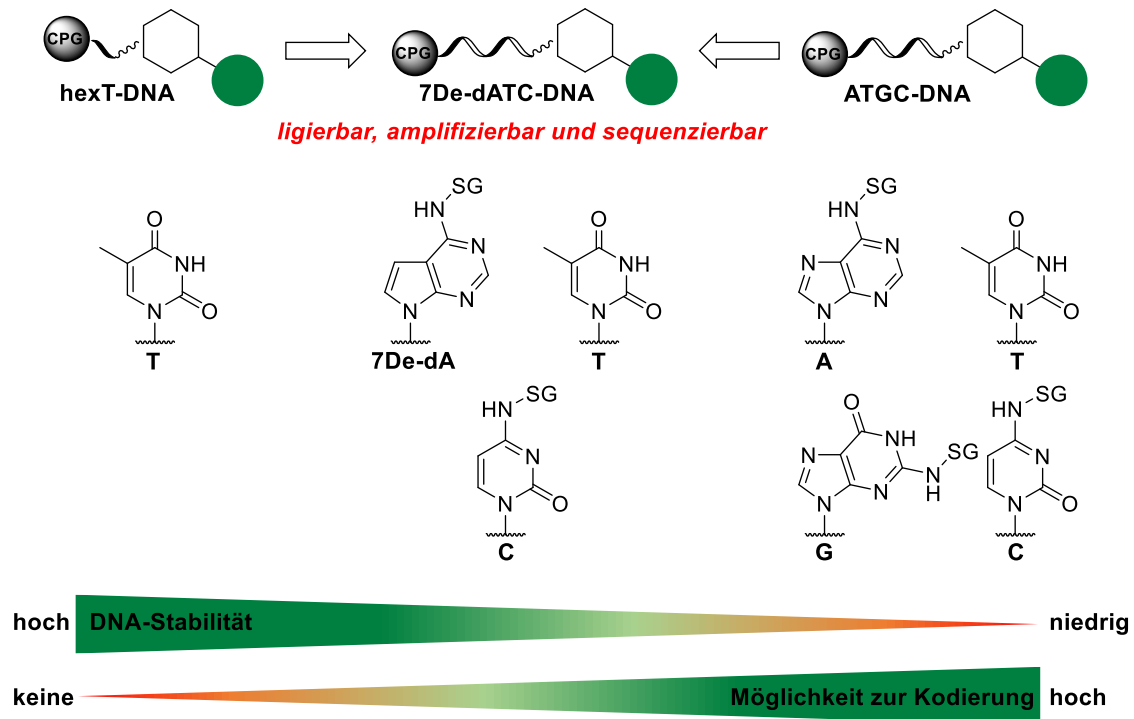
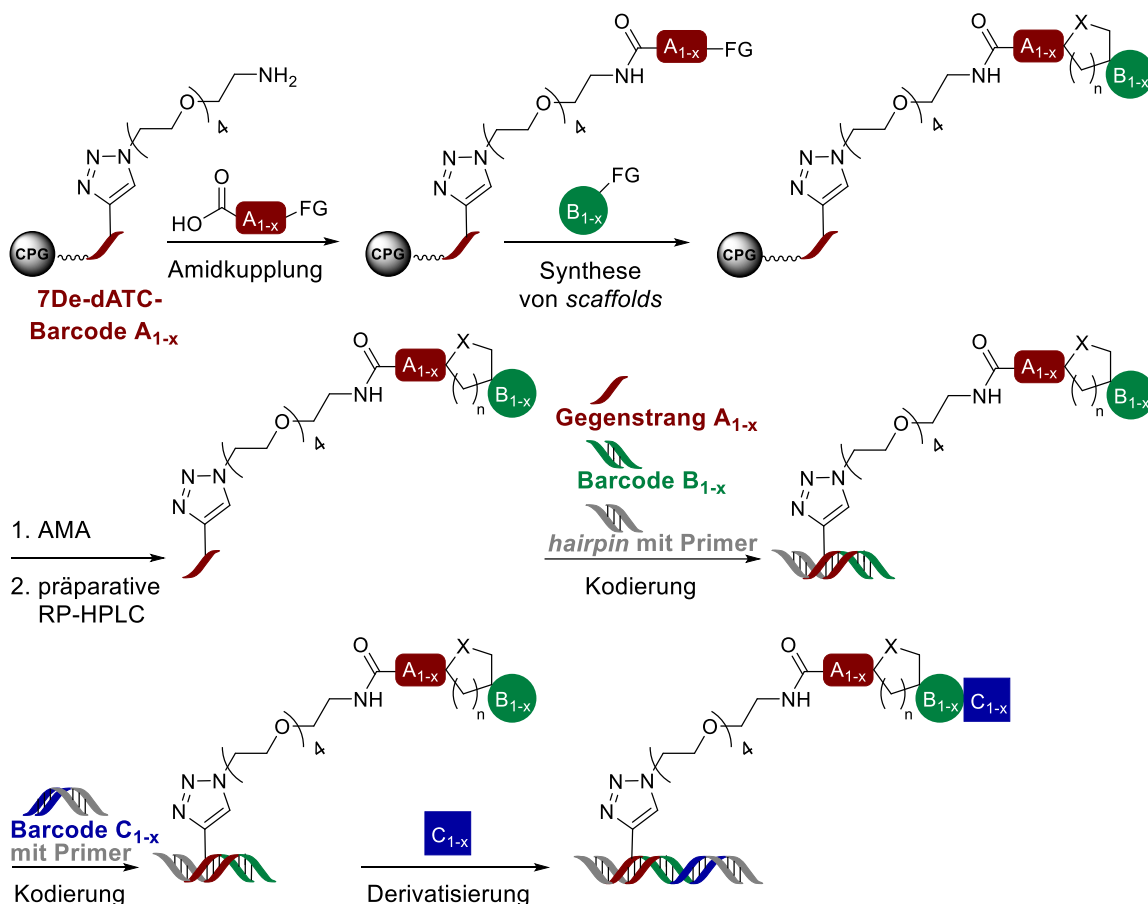


Abbildung 42: Vergleich der chemisch stabilisierten 7De-dATC-DNA mit hexT- sowie ATCG-DNA.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde erfolgreich eine neue, effizientere Kodierungsstrategie entwickelt, die es erlaubt, Gemische von kodierten, CPG-gebundenen Startmaterialien einzusetzen.^[155] Im Vorfeld dieser Strategie wurde gezeigt, dass für die Kodierung der Startmaterialien auf kurze DNA-Sequenzen (10-16mere) zurückgegriffen werden muss, da längere DNA-Oligonukleotide aufgrund von zu ähnlichen Retentionszeiten der Produkte gegenüber den Startmaterialien keine saubere Isolierung der DNA-Molekül-Konjugate durch chromatographische Aufreinigung gewährleisten. Demnach müssen die für spätere Amplifikationsreaktionen notwendigen Primer-Sequenzen nachträglich eingeführt werden. In dieser Strategie erfolgt dies unter anderem über eine DNA-Haarnadelstruktur. Eine weitere Besonderheit der neuen Kodierungsstrategie ist die Verwendung einer Universaladapter-DNA als Gegenstrang zu den jeweiligen DNA-Barcodes der CPG-gebundenen Startmaterialien, welche die Kodierung von Gemischen erleichtert. Gegenstand aktueller Forschung ist die Synthese einer „*proof of concept*“-DEL basierend auf der neuen Kodierungsstrategie unter Verwendung von 7De-dATC-Oligonukleotiden zur Kodierung der Startmaterialien (Schema 29). Ferner sollen in dieser DEL geeignete Schutzgruppen, welche zu einer signifikanten Verschiebung der Retentionszeiten führen, eingesetzt werden, um eine DEL mit hoher Reinheit zu generieren.



Schema 29: Schema zur Synthese einer „proof of concept“-DEL unter Verwendung von chemisch stabilisierten DNA-Barcodes im Rahmen der neuen Haarnadel-DNA-basierten Kodierungsstrategie. FG = Funktionelle Gruppe

In der vorliegenden Arbeit konnte somit eine neue, effizientere Strategie zur Synthese von DNA-kodierten Substanzbibliotheken entwickelt werden, die es nicht nur erlaubt, DELs mit höherer Reinheit zu generieren, sondern es ebenso ermöglicht, DELs herzustellen, welche einen größeren Teil des chemischen Strukturraums abdecken. Die chemische Stabilisierung der Purinbase Adenin erhöht besonders die Säurestabilität der DNA, wodurch Säure-katalysierte Reaktionen, die normalerweise in DNA-Depurinierung resultieren, nun möglich werden. Ferner wurde durch den Austausch von Adenin zu 7-Deazaadenin neben der Säurestabilität ebenso die Toleranz gegenüber einigen Metallsalzen erhöht. Da das Spektrum an Synthesemethoden durch die Stabilisierung der DNA vergrößert wurde, aber noch nicht ansatzweise ausgeschöpft ist, ist die Überführung weiterer chemischer Reaktionen Teil aktueller Forschung. Zwar ermöglicht das etablierte kombinatorische „split and pool“-Verfahren die Synthese zahlenmäßig extrem großer DNA-kodierter Substanzbibliotheken, allerdings können ebenso kleinere, (Target-) fokussierte DELs zielführend sein, wie auch die hier vorliegende Arbeit zeigt. Die neue Kodierungsstrategie kann zu einem Paradigmenwechsel im DEL-Design in Richtung kleinerer, strukturell diverser kodierter Screeningbibliotheken beitragen.

7 Experimenteller Teil

7.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel wurden bei den Firmen *abcr*, *Acros Organics*, *Aldrich Market Select*, *Alfa Aesar*, *Fisher Scientific*, *Fluorochem*, *Merck*, *Roth*, *Sigma Aldrich*, *TCI* und *VWR* erworben. Sofern nicht zusätzlich vermerkt, wurden alle kommerziell erhältlichen Chemikalien und trockenen Lösungsmittel (ACN, CH₂Cl₂, 1,2-Dichlorethan, DMF, EtOH, MeOH, THF, Toluol) wie vom Hersteller erhältlich verwendet. Wasser wurde vor der Verwendung durch das Wasseraufbereitungssystem *MicroPure* (Firma *TKA*) gereinigt.

Auf *controlled pore glass* (CPG, 1000 Å)-gebundene, mit einem 5'-Aminolinker-modifizierte DNA-Oligonukleotide (hexT, 10mer TC, 10mer ATCG, 31mer ATCG) wurden von der Firma *IBA* synthetisiert und die CPG (1000 Å)-gebundenen 16mer 7De-dATC-Alkin-Konjugate wurden von der Firma *Ella Biotech* erworben.

7.2 DEL-basierte chemische Methoden

Vakuumverteiler. CPG-gebundene DNA-Molekül-Konjugate wurden gefiltert und gewaschen über Synthesäulen (*HTI Bio-X*) unter Verwendung eines *Vac-Man*-Vakuumverteilers der Firma *Promega* und der Firma *Sigma Aldrich*.

Vakuumzentrifugen. Die Entfernung von Lösungsmitteln aus Proben mit DNA-Oligonukleotiden erfolgte mit Hilfe der Zentrifuge des Modells *Concentrator 5301* von der Firma *Eppendorf*, mit der von der Firma *GeneVac* hergestellten Zentrifuge *miVac Duo concentrator* sowie mit der Zentrifuge *RVC 2-18 CDplus* von *Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen*.

Präparative Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC).

Oligonukleotid-Molekül-Konjugate wurden über eine *Shimadzu Prominence*-HPLC, ausgestattet mit einer C₁₈-Säule von *Phenomenex (Gemini, 5 µm, 110 Å, 50 x 10 mm)* und dem Detektor *SPD-M20A (Shimadzu)*, gereinigt. Es wurde ein Gradient aus 100 mM Triethylammoniumacetat (TEAA)-Puffer (pH = 8,0, Eluent A) und MeOH (Eluent B) mit einer Flussrate von 5 mL·min⁻¹ verwendet. Produkt-enhaltene Fraktionen wurden gesammelt und aufkonzentriert.

Methode 1: Schrittweiser Gradient von 30 % zu 80 % B in 13 min, dann 80 % zu 100 % B innerhalb einer Minute, gefolgt von 100 % B für drei Minuten.

Methode 2: Schrittweiser Gradient von 20 % zu 70 % B in 13 min, dann 70 % zu 100 % B innerhalb einer Minute, gefolgt von 100 % B für drei Minuten.

Analytische Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC I). Die HPLC-Analyse von Oligonukleotid-Molekül-Konjugaten erfolgte unter anderem über eine *Shimadzu Prominence*-HPLC, ausgestattet mit einer C_{18} -Säule von *Phenomenex (Gemini, 5 μ m, 110 Å, 50 x 4,6 mm)*. Der Produktumsatz wurde durch Integration der Peaks bei einer Wellenlänge von 254 nm ermittelt.

Methode: Schrittweiser Gradient von 10 % zu 80 % B in neun Minuten, dann 80 % zu 100 % B innerhalb einer halben Minute, gefolgt von 100 % B für drei Minuten unter Verwendung eines 10 mM TEAA-Puffers (pH = 8,0, Eluent A) und MeOH (Eluent B) bei einer Flussrate von 1 mL·min⁻¹.

Analytische Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC II). Außerdem wurde ein HPLC-System des Modells *Agilent 1200* der Firma *Agilent Technologies*, ausgestattet mit einer *Eclipse Plus- C_{18} -Säule (Agilent Technologies, 3,5 μ m, 100 x 4,6 mm)* sowie einem *1100 Multi-Wavelength Detector (Agilent Technologies, G1365B)*, zur HPLC-Analyse von Oligonukleotid-Molekül-Konjugaten verwendet. Der Produktumsatz wurde durch Integration der Peaks bei einer Wellenlänge von 254 nm ermittelt.

Methode 1: Schrittweiser Gradient von 10 % zu 60 % B in zehn Minuten, dann 60 % zu 100 % B innerhalb zwei Minuten, gefolgt von 100 % B für zwei Minuten unter Verwendung eines 10 mM TEAA-Puffers (pH = 8,0, Eluent A) und MeOH (Eluent B) bei einer Flussrate von 0,6 mL·min⁻¹.

Methode 2: Schrittweiser Gradient von 10 % zu 70 % B in zehn Minuten, dann 70 % zu 100 % B innerhalb zwei Minuten, gefolgt von 100 % B für zwei Minuten unter Verwendung eines 10 mM TEAA-Puffers (pH = 8,0, Eluent A) und MeOH (Eluent B) bei einer Flussrate von 0,6 mL·min⁻¹.

Konzentrationsbestimmung. Die Konzentration von Oligonukleotiden sowie Oligonukleotid-Molekül-Konjugaten wurde mit Hilfe eines Photometers des Modells *NanoDrop 2000* von *Thermo Fisher Scientific* durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

Matrix–assistierte Laser–Desorption–Ionisierung mit Flugzeitanalyse (MALDI-TOF).

Die Massenanalyse erfolgte mit einem MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometer der Firma *Bruker Daltonics* unter Verwendung einer Matrix basierend auf 2',4',6'-Trihydroxyacetophenon (THAP, *Dichrom*).

7.3 Chemisch synthetische Methoden

Dünnschichtchromatographie. Zur Verfolgung des Reaktionsverlaufes mittels Dünnschichtchromatographie (DC) wurden DC-Platten mit Fluoreszenzindikator UV₂₅₄ (*ALUGRAM Xtra SIL G*) der Firma *Macherey-Nagel* verwendet. Moleküle wurden visualisiert durch Bestrahlung mit ultraviolettem Licht oder durch Kaliumpermanganat.

Säulenchromatographie. Kleine organische Moleküle wurden chromatographisch unter Verwendung von Kieselgel (*NORMASIL 60*, 0,040-0,063 mm, *VWR*) als Säulenmaterial aufgereinigt.

NMR-Spektroskopie. Die Aufnahme von ¹H-NMR- und ¹³C-NMR-Spektren zur Charakterisierung der organischen Verbindungen erfolgte mittels der Spektrometer *Bruker AVANCE 400* (400 MHz), *Bruker AVANCE 500* (500 MHz) oder *Bruker AVANCE 600* (600 MHz) unter Verwendung von CDCl₃, CD₂Cl₂ oder MeOD als deuterierte Lösungsmittel (*VWR*). Die chemische Verschiebung δ wurde in *parts per million* (ppm) angegeben. Als internen Standard dienten die Restprotonen der Lösungsmittel (CDCl₃: δ = 7,26 ppm für ¹H, δ = 77,16 ppm für ¹³C; CD₂Cl₂: δ = 5,32 ppm für ¹H, δ = 54,00 ppm für ¹³C; MeOD: δ = 4,87 ppm für ¹H, δ = 49,00 ppm für ¹³C). Multiplizitäten wurden wie folgt wiedergegeben: s (Singulett), d (Dublett), t (Triplett), q (Quartett), dd (Dublett von Dublett), m (Multipllett) und br s (breites Singulett). Die Kopplungskonstante J wurde in Hertz (Hz) angegeben.

Analytische Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (I).

Die Aufnahme von Massenspektren erfolgte mit einer *Dionex UltiMate 3000*-HPLC (*Thermo Scientific*), ausgestattet mit einem *DAD-300*-Detektor (210, 254, 280 und 350 nm, *Thermo Scientific*) und gekoppelt mit einem *LCQ Fleet*-Massenspektrometer (*Thermo Scientific*) (Ionisierungsmethode: Elektrospray-Ionisation). Es handelt sich bei der verwendeten C₁₈-Säule um eine des Modells *NUCLEODUR Gravity* (1,8 μ m, 50 x 3 mm) der Firma *Macherey-Nagel*. Der Gradient wurde aus zwei Lösungsmitteln (A = 0,1 % TFA in dH₂O, B = 0,1 % TFA in ACN) zusammen gemischt. Die Flussrate betrug 0,4 mL·min⁻¹.

Methode: Schrittweiser Gradient von 10 % zu 10 % B für eine halbe Minute, gefolgt von 10 % zu 95 % B in sieben Minuten.

Analytische Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (II).

Außerdem erfolgte die Aufnahme von Massenspektren mit einem HPLC-System von *Agilent Technologies* (1100 Serie), ausgestattet mit einem *ESA Corona*-Detektor und gekoppelt mit einem *Finnigan LCQ Advantage Max*-Massenspektrometer (*Thermo Scientific*) (Ionisierungsmethode: Elektrospray-Ionisation). Es handelt sich bei der verwendeten C₁₈-Säule um eine des Modells *NUCLEODUR Gravity* (3,0 µm, 125 x 4 mm) der Firma *Macherey-Nagel*. Der Gradient wurde aus zwei Lösungsmitteln (A = 0,1 % TFA in dH₂O, B = 0,1 % TFA in ACN) zusammen gemischt. Die Flussrate betrug 0,4 mL/min⁻¹.

Methode: Schrittweiser Gradient von 1 % zu 10 % B für eine Minute, gefolgt von 10 % zu 95 % B in neun Minuten.

Hochauflösende Massenspektrometrie. Hochauflösende Massenspektren wurden mit Hilfe eines *LTQ Orbitrap*-Massenspektrometers (*Thermo Scientific*), gekoppelt an ein *Accela*-HPLC-System (*Thermo Scientific*) und unter Verwendung einer *Hypersil GOLD*-Säule (1,9 µm, 50 x 1 mm, *Thermo Scientific*), aufgenommen (Ionisierungsmethode: Elektrospray-Ionisation).

7.4 Reagenzien sowie Geräte für biologische Methoden

DNA-Barcodes, DNA-Primer und die Haarnadel-DNA wurden von der Firma *Integrated DNA Technologies (IDT)* bezogen. Außerdem wurde der IDTE-Puffer (10 mM Tris, 0,1 mM EDTA) von *IDT* verwendet, um DNA-Oligonukleotide zu resuspendieren oder zu verdünnen.

Zur **Phosphorylierung** der 5'-Enden von DNA-Oligonukleotiden wurden eine T4 Polynukleotidkinase (T4 PNK, *Thermo Fisher Scientific*), 1x PNK-Puffer A (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 0,1 mM Spermidin, pH = 7,6 bei 25 °C, *Thermo Fisher Scientific*) und ATP (*Thermo Fisher Scientific*) verwendet.

Ligationen von DNA-Oligonukleotiden erfolgten enzymatisch mit einer T4 DNA-Ligase (*T4 DNA ligase rapid*, *Biozym* oder *T4 DNA ligase*, *New England Biolabs*) in 1x T4 DNA-Ligasepuffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 1 mM ATP, pH = 7,6 bei 25 °C, *Biozym* oder 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, pH = 7,5 bei 25 °C, *New England Biolabs*).

Zur Vervielfältigung von DNA-Oligonukleotiden mit Hilfe der **Polymerasekettenreaktion** wurden eine Taq DNA-Polymerase (*Thermo Fisher Scientific*), 1x Taq-Puffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0,08 % (v/v) Nonidet P40, pH = 8,8 bei 25 °C, *Thermo Fisher Scientific*), MgCl₂ (*Thermo Fisher Scientific*) und dNTP Mix (*Biozym*) verwendet. Die Amplifikation von DNA-Strängen erfolgte in einem Thermocycler des Modells *Biometra TAdvanced* von *Analytik Jena*. PCR-Produkte wurden aufgereinigt mit Hilfe des Kits *QIAquick PCR Purification* (*Qiagen*) unter Zuhilfenahme der Zentrifuge des Modells *5415R* von *Eppendorf*.

Für die Auftrennung von DNA-Oligonukleotiden nach ihrer Länge mittels **Agarose-Gelelektrophorese** wurde Agarose der Firma *Biozym* bezogen. Die für die Gelelektrophorese benötigten Kammern stammten von der Firma *Febikon Labortechnik* und wurden mit dem Netzgerät *Powerpac Universal* von *Bio-Rad* betrieben. Zur Visualisierung der DNA-Oligonukleotide wurde der Farbstoff *Midori Green Direct* (*NIPPON Genetics Europe*) und als Referenz der DNA-Marker *GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder* (*Thermo Fisher Scientific*) verwendet. Die Aufnahme von Gelbildern erfolgte über ein *Bio-Rad Gel Doc XR*-System sowie über ein Imaging-System des Modells *FastGene FAS-Digi PRO* von *Nippon Genetics*.

Die einzelnen Schritte der **Kodierung** der DEL (Phosphorylierung, Hybridisierung und Ligation) wurden in einem *LightCycler 480* von der Firma *Roche* in Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten (*Kisker Biotech*) mit selbstklebenden Verschlussfolien (*AB-1170*, *Thermo Scientific*) durchgeführt. Die Zentrifugation der Mikrotiterplatten erfolgte in der *Heraeus Megafuge 8R* (*Thermo Scientific*).

Für den **Selektionsassay** wurden *HisPur™ Ni-NTA Magnetic Beads* (12,5 mg·mL⁻¹ in 20 % Ethanol) sowie *Pierce™ Streptavidin Magnetic Beads* (10 mg·mL⁻¹ in Wasser mit 0,05 % NaN₃) von *Thermo Scientific* bezogen. Der Selektionsassay wurde mit Hilfe eines Magnettracks von *New England Biolabs* durchgeführt. Das Rinderserumalbumin (BSA, pH = 7,0) stammte von *Fisher BioReagents*, die *herring sperm-DNA* (10 mg·mL⁻¹) von *Invitrogen* und das Tween-20 von *Sigma-Aldrich*. Die Inkubation der Proteine bzw. der DNA-kodierten Bibliothek mit den (Protein-beschichteten) magnetischen Kügelchen erfolgte auf dem Plattformschüttler *Unimax 1010* von *Heidolph Instruments*. Die Elution der bindenden DNA-Molekül-Konjugate über Hitzedenaturierung der Proteine erfolgte in einem Thermoschüttler des Modells *TS-100* von der Firma *BioSan*. Die Kodierung der spezifischen Selektionsexperimente und die Einführung der *Illumina Adapter*-Sequenzen erfolgte über Primer aus dem *Nextera XT Index Kit* (*Illumina*).

Zur Untersuchung der Amplifikationseffizienz im Rahmen der **Echtzeit-PCR** wurde der *LightCycler 480* der Firma *Roche* verwendet. Weiterhin wurden hierfür die Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten von *Kisker Biotech*, selbstklebende Verschlussfolien (*AB-1170*, *Thermo Scientific*) und der *SsoAdvanced universal SYBR Green supermix* von *Bio-Rad* genutzt.

7.5 Geräte für biophysikalische Methoden

Zur Ermittlung der Bindungsaffinität von Molekülen an Proteinen mittels der **MST**-Technologie wurde das Gerät *Monolith NT.115* mit den *NT.115 MST Premium Capillaries (Monolith)* verwendet. Die hierfür benötigte Fluoreszenzmarkierung des gereinigten Proteins erfolgte entsprechend des Protokolls vom *Monolith Protein Labeling Kit RED-NHS* (MD-L001).

Zur Untersuchung der Bindung von Molekülen an Proteinen mit Hilfe der **nanoDSF**-Technologie wurde das Analysegerät *Prometheus NT.48* und die zugehörigen *high sensitivity NanoDSF capillaries* der Firma *NanoTemper Technologies* verwendet.

Für die **Fluoreszenzpolarisationsexperimente** wurden Mikrotiterplatten (*Corning 4514*) von *Corning* verwendet. Die Mikrotiterplatten wurden mit dem Fluoreszenzreader *Spark* von *Tecan* vermessen.

7.6 Reagenzien und Geräte für zellbiologische Methoden

Zur Untersuchung des Genexpressionslevels von *CTGF* wurden die Zellen in Mikrotiterplatten (6 Kavitäten) der Firma *Greiner Bio-One* ausplattiert. Das Medium für die Zellen bestand aus DMEM (*Dulbecco's modified eagle medium*, P04-03590, *PAN Biotech*), hitzeinaktiviertes FBS (*fetal bovine serum*, *Capricorn Scientific*) sowie aus L-Glutamin (P04-80100, *PAN Biotech*). Weiterhin wurden für die zellbiologischen Arbeiten DMSO (Zellkulturgrad) von *PanReac AppliChem*, XMU-MP-1 von *MedChemExpress*, eine Lösung bestehend aus 0,05 % Trypsin sowie 0,02 % EDTA in *phosphate buffered saline* (PBS)-Puffer (P10-0231SP) von *PAN Biotech* und DPBS (*Dulbecco's phosphate-buffered saline*, P04-36500) von *PAN Biotech* verwendet. Die RNA wurde mit Hilfe des Kits *RNeasy Mini* von *Qiagen* extrahiert. Die reverse Transkription mit anschließender quantitativer PCR erfolgte unter Anleitung des Kits *SensiFAST Probe Hi-ROX One-Step* (*Bioline*) mit Hilfe des *StepOnePlus Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems)*. Die Primer sowie

die Fluorophor-markierten DNA-Sonden wurden von der Firma *Integrated DNA Technologies* bezogen.

7.7 Allgemeine Vorschriften für biologische Methoden

Phosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Oligonukleotiden

Für die 5'-Phosphorylierung von 280 pmol DNA in 20 µL wurden 10 U T4 Polynukleotidkinase, 1x PNK-Puffer A und 1 mM ATP verwendet. Die Reaktionsmischungen wurden bei 37 °C für 20 min inkubiert, im Anschluss bei 75 °C für 15 min hitzeinaktiviert und langsam auf 4 °C runtergekühlt.

Ligation von doppelsträngigen DNA-Oligonukleotiden

Im Vorfeld der Ligation wurden die komplementären DNA-Einzelstränge hybridisiert durch Inkubation bei 85 °C für zehn Minuten und anschließendes Abkühlen auf 4 °C. Die Ligation erfolgte in einem 40 µL Reaktionsansatz mit entweder 80 pmol oder 100 pmol der jeweiligen DNA-Oligonukleotide, 600 U bzw. 400 U T4 DNA-Ligase sowie 1x T4 DNA-Ligasepuffer bei 25 °C über Nacht. Im Anschluss an die Hitzeinaktivierung der DNA-Ligase bei 75 °C für 15 min wurden die Ligationsansätze auf 4 °C runtergekühlt.

Agarose-Gelelektrophorese

Die Analyse von Ligationen oder PCR-Amplifikationen erfolgte mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Oligonukleotide nach ihrer Länge wurde mit 4 oder 5,5 %igen Agarose-Gelen in Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer (89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH = 8,3) bei 150 V für etwa 45 min durchgeführt. Als DNA-Marker wurde der *GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder* von *Thermo Fisher Scientific* verwendet. Die Visualisierung der DNA-Oligonukleotide erfolgte mit dem DNA-Farbstoff *Midori Green Direct* (*NIPPON Genetics Europe*) über ein Dokumentationssystem (*Gel Doc XR-System* von *Bio-Rad* sowie *FastGene FAS-Digi PRO* von *Nippon Genetics*).

Ethanolische Fällung von DNA-Oligonukleotiden

Die Präzipitation von DNA-Oligonukleotiden erfolgte durch Zugabe von 1/10 Volumen an 3 M wässriger NaOAc-Lösung (pH = 5,2) sowie 3 oder 4 Volumen 100 %igem Ethanol und anschließender Inkubation bei -80 °C über Nacht. Nach der Zentrifugation der Proben bei 4 °C für 30 min und einer Drehzahl von 13.200 rpm wurde der Überstand abgenommen und der DNA-Rückstand getrocknet. In einigen Fällen wurde eine erneute ethanolische

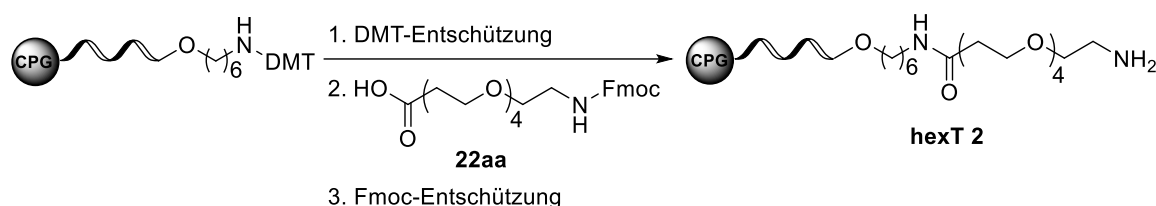
Fällung durch Zugabe von 100 %igem Ethanol und Inkubation bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 1 h durchgeführt. Die DNA-Proben wurden nach der Präzipitation in ddH₂O oder IDTE-Puffer aufgenommen.

7.8 Synthese und Selektion einer tiDEL mit anschließender Hit-Resynthese und -Validierung

7.8.1 Synthese der tiDEL

Die Darstellung der für die tiDEL-Synthese verwendeten Isocyanide (**23a**,^[162] **23b**,^[163] **23c**,^[163] **23e**,^[164] **23f**,^[165] **23g**,^[165] **23h**,^[166] **23i**,^[166] **23l**,^[167] **23m**,^[168] **23n**,^[169] **23p**,^[162] **23q**,^[170] **23r**^[171]) erfolgte durch Dr. Constantinos Neochoritis und Tryfon Zarganes-Tzitzikas (Universität Groningen, Prof. A. Dömling) nach publizierten Bedingungen.

7.8.1.1 Amidkupplung von Fmoc-NH-PEG(4)-COOH an CPG-gebundene, 5'-Aminolinker-modifizierte hexT-DNA



Schritt 1. Die DMT-Schutzgruppe der CPG-gebundenen, 5'-Aminolinker-modifizierten hexT-DNA (1 μmol , $\sim 36\text{ mg}$ CPG-gebundene DNA) wurde durch Inkubation mit 200 μL 3 %iger Trichloressigsäure (TCA) in CH₂Cl₂ für eine Minute entfernt. Die DMT-Entschützung erfolgte in einer Filtersäule auf einem Vakuumverteiler. Eine gelb-orangene Färbung der Reaktionslösung zeigte die erfolgreiche Abspaltung der DMT-Schutzgruppe. Der Vorgang wurde so lange wiederholt, bis keine Färbung der Lösung zu beobachten war. Die CPG-gebundene, DMT-entschützte hexT-DNA **hexT 1** wurde dreimal mit je 200 μL 1 % TEA in ACN, DMF, MeOH, ACN und CH₂Cl₂ gewaschen und im Anschluss *in vacuo* getrocknet.

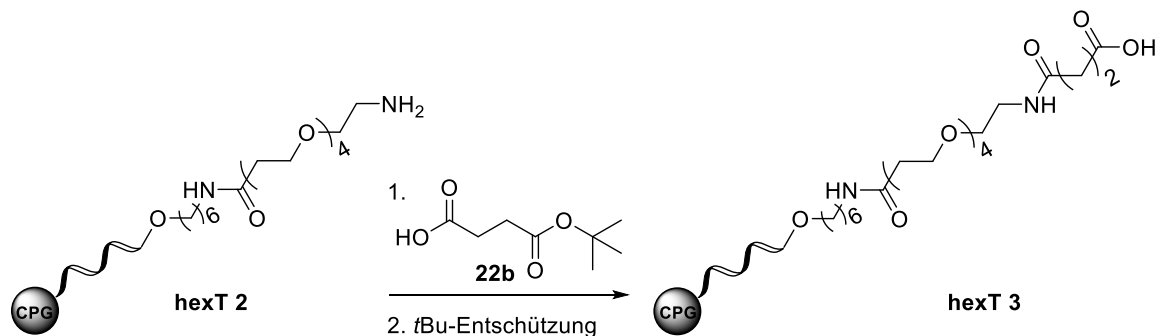
Schritt 2. Die CPG-gebundene, DMT-entschützte hexT-DNA **hexT 1**, Fmoc-NH-PEG(4)-COOH **22aa** und das Kupplungsreagenz HATU wurden *in vacuo* für 15 min getrocknet. Anschließend wurden Fmoc-NH-PEG(4)-COOH **22aa** (25 μmol , 100 Äquiv.) und HATU (25 μmol , 100 Äquiv.) in jeweils 300 μL trockenem DMF gelöst und daraufhin miteinander vermischt. Zu diesem Reaktionsgemisch wurde DIPEA (62,5 μmol , 250 Äquiv.) gegeben.

Die resultierende Reaktionsmischung wurde für fünf Minuten geschüttelt und anschließend zu der in 300 µL trockenem DMF suspendierten, CPG-gebundenen und DMT-entschützten hexT-DNA **hexT 1** (250 nmol, 1 Äquiv.) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur für zwei Stunden geschüttelt. Im Anschluss wurde das CPG-gebundene hexT-PEG(4)-Konjugat über eine Filtersäule auf einem Vakuumverteiler gefiltert, dreimal mit je 200 µL DMF, MeOH, ACN und CH₂Cl₂ gewaschen und daraufhin *in vacuo* getrocknet. Die Amidkupplungsreaktion wurde ein weiteres Mal wiederholt. Zur Überprüfung des Reaktionserfolges wurde eine kleine Menge des CPG-gebundenen DNA-Konjugats (0,7-0,9 mg, ~20 nmol) mit 500 µL AMA bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit 20 µL Tris-Puffer (1 M, pH = 7,5) versetzt, in einer Vakuumzentrifuge getrocknet, der Rückstand in 200 µL ddH₂O aufgenommen und gefiltert. Mittels präparativer RP-HPLC sowie MALDI-MS wurde der Erfolg der Reaktion analysiert. Bei einer unvollständigen Amidkupplung (<90 %) wurde die Reaktion ein drittes Mal wiederholt.

Schritt 3. Um nicht reagierte Aminofunktionen zu schützen, wurde das CPG-gebundene hexT-PEG(4)-Konjugat in einer Filtersäule dreimal mit 200 µL einer *capping*-Lösung (1:1-Mischung aus THF/Methylimidazol 9:1 (v/v) und THF/Pyridin/Acetanhydrid 8:1:1 (v/v)) für 30 s behandelt. Im Anschluss wurde das CPG-gebundene DNA-Konjugat dreimal mit je 200 µL DMF, MeOH, ACN und CH₂Cl₂ gewaschen und daraufhin *in vacuo* getrocknet.

Schritt 4. Zur Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe des CPG-gebundenen hexT-PEG(4)-Konjugats (1 µmol) wurde dieses mit 500 µL einer 20 %igen Piperidinlösung in DMF behandelt und für fünf Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Im Anschluss wurde das CPG-gebundene, Fmoc-entschützte hexT-PEG(4)-Konjugat **hexT 2** in eine Filtersäule überführt und dreimal mit je 200 µL DMF, MeOH, ACN sowie CH₂Cl₂ gewaschen und daraufhin *in vacuo* getrocknet.

7.8.1.2 Amidkupplung von Mono-*tert*-butyl-succinat an CPG-gebundene, PEGylierte hexT-DNA



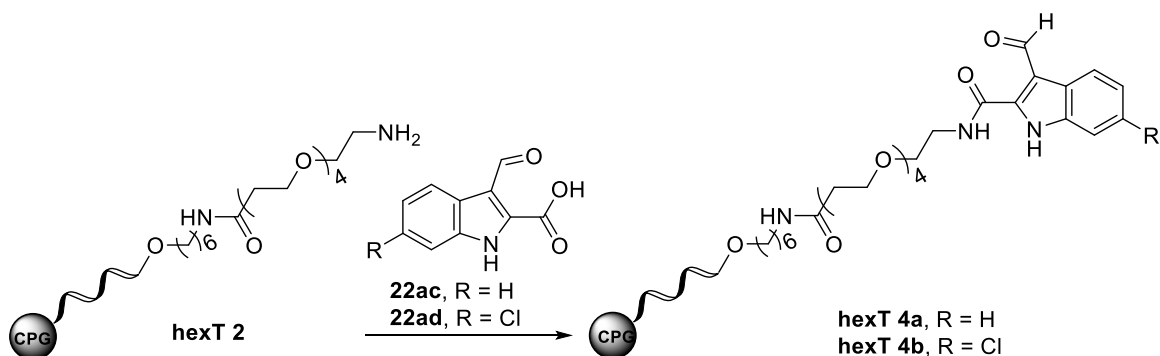
Schritt 1. Das CPG-gebundene, Fmoc-entschützte hexT-PEG(4)-Konjugat **hexT 2**, Mono-*tert*-butyl-succinat **22ab** und das Kupplungsreagenz HATU wurden *in vacuo* für 15 min getrocknet. Anschließend wurden Mono-*tert*-butyl-succinat **22ab** (25 µmol, 100 Äquiv.) und HATU (25 µmol, 100 Äquiv.) in jeweils 300 µL trockenem DMF gelöst und daraufhin miteinander vermischt. Zu diesem Reaktionsgemisch wurde DIPEA (62,5 µmol, 250 Äquiv.) gegeben. Die resultierende Reaktionsmischung wurde für fünf Minuten geschüttelt und anschließend zu dem in 300 µL trockenem DMF suspendierten, CPG-gebundenen und Fmoc-entschützten hexT-PEG(4)-Konjugat **hexT 2** (250 nmol, 1 Äquiv.) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur für zwei Stunden geschüttelt. Im Anschluss wurde das CPG-gebundene hexT-Succinat-Konjugat über eine Filtersäule auf einem Vakuumverteiler gefiltert, dreimal mit je 200 µL DMF, MeOH, ACN und CH₂Cl₂ gewaschen und daraufhin *in vacuo* getrocknet. Die Amidkupplungsreaktion wurde ein weiteres Mal wiederholt. Zur Überprüfung des Reaktionserfolges wurde eine kleine Menge des CPG-gebundenen hexT-Succinat-Konjugats (0,7-0,9 mg, ~20 nmol) mit 500 µL AMA bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit 20 µL Tris-Puffer (1 M, pH = 7,5) versetzt, in einer Vakuumzentrifuge getrocknet, der Rückstand in 200 µL ddH₂O aufgenommen und gefiltert. Mittels präparativer RP-HPLC sowie MALDI-MS wurde der Erfolg der Reaktion analysiert.

Schritt 2. Um nicht reagierte Aminofunktionen zu schützen, wurde das CPG-gebundene hexT-Succinat-Konjugat in einer Filtersäule dreimal mit 200 µL einer *capping*-Lösung (1:1-Mischung aus THF/Methylimidazol 9:1 (v/v) und THF/Pyridin/Acetanhydrid 8:1:1 (v/v)) für 30 s behandelt. Im Anschluss wurde das CPG-gebundene DNA-Konjugat dreimal mit je 200 µL DMF, MeOH, ACN und CH₂Cl₂ gewaschen und daraufhin *in vacuo* getrocknet.

Schritt 3. Zur Entfernung der *t*Bu-Schutzgruppe des CPG-gebundenen hexT-Succinat-Konjugats wurde dieses mit 200 µL einer 10 %igen TFA-Lösung in CH₂Cl₂ für 4 h

inkubiert. Im Anschluss wurde das CPG-gebundene, *t*Bu-entschützte hexT-Säure-Konjugat **hexT 3** in eine Filtersäule überführt und dreimal mit je 200 μ L DMF, MeOH, ACN sowie CH_2Cl_2 gewaschen und daraufhin *in vacuo* getrocknet. Zur Überprüfung des Erfolges der Entschützung wurde eine kleine Menge des CPG-gebundenen hexT-Säure-Konjugats **hexT 3** (0,7-0,9 mg, \sim 20 nmol) mit 500 μ L AMA bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit 20 μ L Tris-Puffer (1 M, pH = 7,5) versetzt, in einer Vakuumzentrifuge getrocknet, der Rückstand in 200 μ L ddH₂O aufgenommen und gefiltert. Mittels präparativer RP-HPLC sowie MALDI-MS wurde der Erfolg der Reaktion analysiert.

7.8.1.3 Amidkupplung von 3-Formyl-1*H*-indol-2-carbonsäure bzw. 6-Chloro-3-formyl-1*H*-indol-2-carbonsäure an CPG-gebundene, PEGylierte hexT-DNA

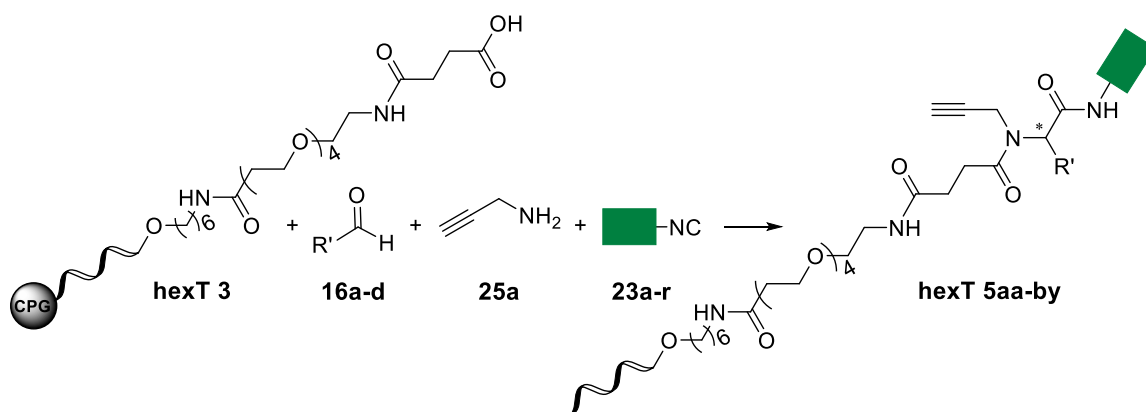


Schritt 1. Das CPG-gebundene, Fmoc-entschützte hexT-PEG(4)-Konjugat **hexT 2**, die 3-Formyl-1*H*-indol-2-carbonsäure **22ac** bzw. die 6-Chloro-3-formyl-1*H*-indol-2-carbonsäure **22ad** und das Kupplungsreagenz HATU wurden *in vacuo* für 15 min getrocknet. Anschließend wurden 3-Formyl-1*H*-indol-2-carbonsäure **22ac** bzw. 6-Chloro-3-formyl-1*H*-indol-2-carbonsäure **22ad** (25 μ mol, 100 Äquiv.) und HATU (25 μ mol, 100 Äquiv.) in jeweils 300 μ L trockenem DMF gelöst und daraufhin miteinander vermischt. Zu diesem Reaktionsgemisch wurde DIPEA (62,5 μ mol, 250 Äquiv.) gegeben. Die resultierende Reaktionsmischung wurde für fünf Minuten geschüttelt und anschließend zu dem in 300 μ L trockenem DMF suspendierten, CPG-gebundenen sowie Fmoc-entschützten hexT-PEG(4)-Konjugat **hexT 2** (250 nmol, 1 Äquiv.) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur für zwei Stunden geschüttelt. Im Anschluss wurde das CPG-gebundene hexT-Aldehyd-Konjugat **hexT 4a** bzw. **hexT 4b** über eine Filtersäule auf einem Vakuumverteiler gefiltert, dreimal mit je 200 μ L DMF, MeOH, ACN und CH_2Cl_2 gewaschen und daraufhin *in vacuo* getrocknet. Die Amidkupplungsreaktion wurde ein weiteres Mal wiederholt. Zur Überprüfung des Reaktionserfolges wurde eine kleine Menge des CPG-gebundenen

hexT-Aldehyd-Konjugats **hexT 4a** bzw. **hexT 4b** DNA (0,7-0,9 mg, ~20 nmol) mit 500 μ L AMA bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit 20 μ L Tris-Puffer (1 M, pH = 7,5) versetzt, in einer Vakuumzentrifuge getrocknet, der Rückstand in 200 μ L ddH₂O aufgenommen und gefiltert. Mittels präparativer RP-HPLC sowie MALDI-MS wurde der Erfolg der Reaktion analysiert.

Schritt 2. Um nicht reagierte Aminofunktionen zu schützen, wurde das CPG-gebundene hexT-Aldehyd-Konjugat **hexT 4a** bzw. **hexT 4b** in einer Filtersäule dreimal mit 200 μ L einer *capping*-Lösung (1:1-Mischung aus THF/Methylimidazol 9:1 (v/v) und THF/Pyridin/Acetanhydrid 8:1:1 (v/v)) für 30 s behandelt. Im Anschluss wurde das CPG-gebundene hexT-Aldehyd-Konjugat **hexT 4a** bzw. **hexT 4b** dreimal mit je 200 μ L DMF, MeOH, ACN und CH₂Cl₂ gewaschen und daraufhin *in vacuo* getrocknet.

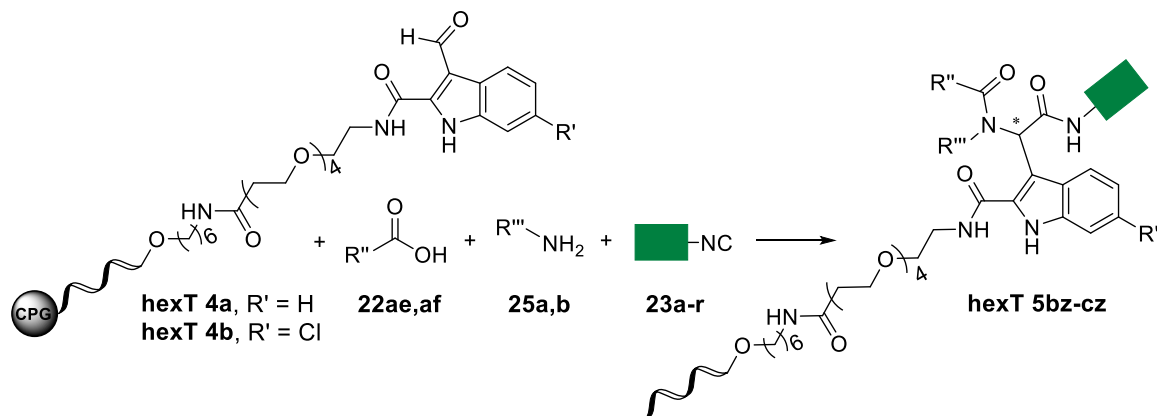
7.8.1.4 Ugi-Vierkomponentenreaktion an CPG-gebundenem hexT-Säure-Konjugat



Das Aldehyd **16a-d** (20 μ mol, 1000 Äquiv.), Propargylamin **25a** (20 μ mol, 1000 Äquiv.) und das Isocyanid **23a-r** (20 μ mol, 1000 Äquiv.) wurden zum CPG-gebundenen hexT-Säure-Konjugat **hexT 3** gegeben und es wurde mit Ethanol auf ein Volumen von 50 μ L aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde bei 80 °C für 24 h geschüttelt. Das CPG-gebundene hexT-Ugi-Konjugat **hexT 5aa-by** wurde in eine Filtersäule überführt und dreimal mit je 200 μ L DMF, MeOH, ACN sowie CH₂Cl₂ gewaschen und daraufhin *in vacuo* getrocknet. Das CPG-gebundene DNA-Konjugat wurde mit 500 μ L AMA für 30 min bei Raumtemperatur von der festen Phase abgespalten und entschützt. Anschließend wurde die Lösung mit 20 μ L Tris-Puffer (1 M, pH = 7,5) versetzt, in einer Vakuumzentrifuge getrocknet, der Rückstand in 200 μ L ddH₂O aufgenommen und gefiltert. Das Produkt wurde mit Hilfe der präparativen RP-HPLC (Methode 1) gereinigt. Produkt-enthaltene Fraktionen wurden eingeeengt und dreimal mit Wasser/Ethanol (1:1, v/v) co-evaporiert,

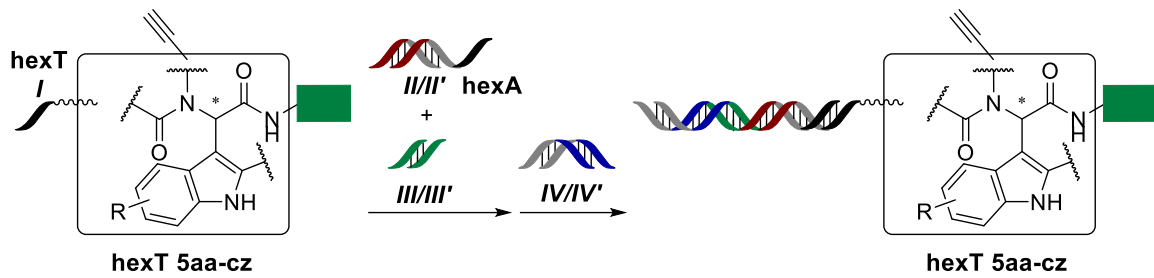
anschließend in 40 μL ddH₂O aufgenommen, über MALDI-MS analysiert und die Konzentration mit Hilfe der Absorptionsmessung bei 260 nm bestimmt.

7.8.1.5 Ugi-Vierkomponentenreaktion an CPG-gebundenen hexT-Aldehyd-Konjugaten



Die Säure **22ae** bzw. **22af** (20 μmol , 1000 Äquiv.), das Amin **25a** bzw. **25b** (20 μmol , 1000 Äquiv.) und das Isocyanid **23a-r** (20 μmol , 1000 Äquiv.) wurden zum CPG-gebundenen hexT-Aldehyd-Konjugat **hexT 4a** bzw. **hexT 4b** gegeben und es wurde mit Ethanol auf ein Volumen von 50 μL aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde bei 80 °C für 24 h geschüttelt. Das CPG-gebundene hexT-Ugi-Konjugat **hexT 5bz-cz** wurde in eine Filtersäule überführt und dreimal mit je 200 μL DMF, MeOH, ACN sowie CH₂Cl₂ gewaschen und daraufhin *in vacuo* getrocknet. Das CPG-gebundene DNA-Konjugat wurde mit 500 μL AMA für 30 min bei Raumtemperatur von der festen Phase abgespalten und entschützt. Anschließend wurde die Lösung mit 20 μL Tris-Puffer (1 M, pH = 7,5) versetzt, in einer Vakuumzentrifuge getrocknet, der Rückstand in 200 μL ddH₂O aufgenommen und gefiltert. Das Produkt wurde mit Hilfe der präparativen RP-HPLC (Methode 1) gereinigt. Produkt-enthaltene Fraktionen wurden eingengt und dreimal mit Wasser/Ethanol (1:1, v/v) co-evaporiert, anschließend in 40 μL ddH₂O aufgenommen, über MALDI-MS analysiert und die Konzentration mit Hilfe der Absorptionsmessung bei 260 nm bestimmt.

7.8.1.6 Kodierung der DNA-kodierten Substanzbibliothek

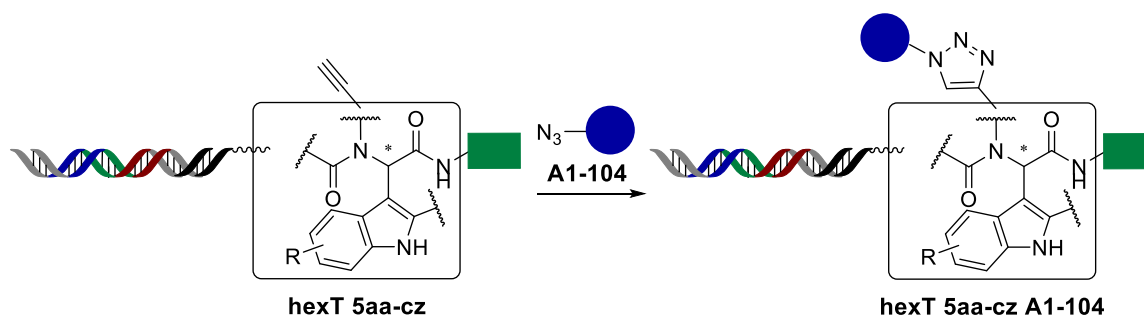


Die Kodierung des Peptidrückgrats sowie der für die U-4CR verwendeten Isocyanide der 78 hexT-Ugi-Produkte **hexT 5aa-cz** (dargestellt als Oligonukleotid **I**) erfolgte in einer Eintopfreaktion in Mikrotiterplatten (DNA-Sequenzen sind der Tabelle 18 zu entnehmen). Hierfür wurden zunächst die einzelsträngigen DNA-Oligonukleotide (**II**, **II'** und **III**) separat an ihren 5'-Phosphatenden enzymatisch phosphoryliert. Für die Hybridisierung der komplementären DNA-Einzelstränge wurden die hexT-Ugi-Produkte **hexT 5aa-cz** (**I**), die phosphorylierten Oligonukleotide **II**, **II'** und **III** sowie nicht-modifiziertes Oligonukleotid **III'** äquimolar zusammen gemischt, auf 85 °C für zehn Minuten erhitzt und anschließend langsam auf 4 °C runtergekühlt. Im Anschluss erfolgte die Ligation von 100 pmol hexT-Ugi-Produkt (**I**) mit Peptidrückgrat- (**III/III'**) sowie Isocyanid-kodierenden (**III/III'**) DNA-Oligonukleotiden in 40 µL bei 25 °C über Nacht. Die Ligation wurde gestoppt durch Hitzeinaktivierung der DNA-Ligase bei 75 °C für 15 Minuten. Die DNA-kodierten Ugi-Produkte **I-II-III/III'-III'** wurden vereinigt und über ethanolische Fällung gereinigt. Das DNA-Präzipitat wurde in IDTE-Puffer aufgenommen und die Konzentration über Messung der Absorption bei 260 nm mittels eines UV-Spektrometers ermittelt. Die Kodierung der Azide erfolgte im Vorfeld der CuAAC. Hierfür wurden zunächst 80 pmol der DNA-kodierten Ugi-Produkte **I-II-III/III'-III'** und das Azid-kodierende Oligonukleotid **IV** in Mikrotiterplatten separat aufgeteilt und 5'-phosphoryliert. Für die Hybridisierung wurden das phosphorylierte, doppelsträngige Ligationsprodukt **I-II-III/III'-III'**, das phosphorylierte Oligonukleotid **IV** sowie der komplementäre, nicht-modifizierte Gegenstrang **IV'** vereinigt, für zehn Minuten auf 85 °C erhitzt und erneut auf 4 °C abgekühlt. Die Ligation von 80 pmol Duplex-DNA **I-II-III/III'-III'** mit 104 verschiedenen Azid-kodierenden (**IV/IV'**) DNA-Sequenzen in 40 µL erfolgte bei 25 °C über Nacht. Nach der Hitzeinaktivierung der Ligase bei 75 °C für 15 min wurden die 104 doppelsträngigen DNA-Oligonukleotide **I-II-III-IV/IV'-III'-IV'** separat voneinander präzipitiert, in 45 µL ddH₂O aufgenommen und für die nachfolgende CUAAC in kleine Glasgefäße überführt.

Tabelle 18: Übersicht der verwendeten DNA-Sequenzen zur Kodierung der DNA-kodierten Substanzbibliothek.

DNA	Sequenz (5'-3')
I	TTT TTT
II	GAA TTC AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG XXX XXX XX
II	ATA CXX XXX XXX CAA ATC CGT TCA CAC CGA CCT GAA TTC AAA AAA
III	GTA TXX XXX XXX
III'	TAG GXX XXX XXX
IV	CCT AXX XXX XXX TGA CCT CAA CTA CAT GGT CTA CA
IV'	TGT AGA CCA TGT AGT TGA GGT CAX XXX XXX X

7.8.1.7 Kupfer-vermittelte Alkin-Azid-Cycloaddition an DNA-Ugi-Reaktionsprodukten



Die für die CuAAC benötigten Azide **A1-104** wurden im Vorfeld der Reaktion *in situ* aus den entsprechenden Haliden **H1-104** mit Natriumazid generiert. Hierfür wurden 10 μmol Halid in 800 μL DMF gelöst. Zu dieser Lösung wurden 100 μL einer wässrigen NaN_3 -Lösung (123 μmol , 8 $\text{mg} \cdot 100 \mu\text{L}^{-1}$) und 100 μL Tetrabutylammoniumiodid (TBAI) in DMF (20 μmol , 7,5 $\text{mg} \cdot 100 \mu\text{L}^{-1}$) gegeben. Zur *in situ* Bildung des jeweiligen Azids wurde die Reaktionsmischung bei 70 $^\circ\text{C}$ für vier Stunden geschüttelt. Im Anschluss wurden 2 μL des Azids (20 nmol , 250 Äquiv.), 1,5 μL eines wässrigen Gemisches aus THPTA/ CuSO_4 (10 nmol , 125 Äquiv.) und 1,6 μL einer wässrigen Natriumascorbat-Lösung (16 nmol , 200 Äquiv.) zu den DNA-kodierten Ugi-Produkten **hexT 5aa-cz** (80 pmol , 1 Äquiv.), gelöst in 45 μL ddH₂O, gegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei 40 $^\circ\text{C}$ für eine Stunde geschüttelt. Anschließend wurden die Reaktionsmischungen der 104 parallel durchgeführten Kupfer-vermittelten Alkin-Azid-Cycloadditionsreaktionen gemischt, dreimal durch Fällung mit 75 %igem Ethanol unter Verwendung von 0,1 mM EDTA bei -80 $^\circ\text{C}$ über Nacht aufgereinigt und in IDTE-Puffer aufgenommen. Die Konzentration der DNA-kodierten Substanzbibliothek wurde über Messung der Absorption bei 260 nm ermittelt.

7.8.2 Selektion der tiDEL

7.8.2.1 Selektionsassay

Die für den Selektionsassay benötigten Lösungen wurden frisch hergestellt und gekühlt gelagert. Die magnetischen Mikropartikel wurden vor der Verwendung gründlich durchgemischt. Es wurden jeweils 4 μL der Mikropartikel-Suspension pro Selektionsexperiment benötigt. Für insgesamt zwölf Proben wurden daher 48 μL Suspension in ein Reaktionsgefäß überführt und auf ein magnetisches Gestell platziert. Nach 30-60 s wurde der Überstand abpipettiert und verworfen. Die Mikropartikel wurden in 100 μL PBS-Puffer (+ 0,01 % Tween-20) erneut suspendiert, das Reaktionsgefäß mit der Suspension wurde auf das Magnetrack gestellt und der Überstand nach kurzer Zeit verworfen. Dieser Waschvorgang wurde dreimal wiederholt. Entsprechend der Anzahl an Selektionsexperimenten wurden die Mikropartikel anschließend in weitere Reaktionsgefäße überführt und mit 100 μL Proteinpuffer zweimal, wie oben beschrieben, gewaschen. Die Inkubation der magnetischen Mikropartikel mit Affinitäts-Tag modifizierten Proteinen (10 μL Proteinlösung, 4,8 μg Protein) erfolgte bei 4 °C auf einem nicht-magnetischen Gestell für 30 min bei kontinuierlichem Schütteln. Nach der Inkubationszeit wurden die Reaktionsgefäße erneut in das magnetische Gestell platziert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die mit Protein-beschichteten, magnetischen Kügelchen zweimal mit 100 μL des Proteinpuffers und, um unspezifische Bindungen zu reduzieren, mit 100 μL eines *bead blocking*-Puffers (Proteinpuffer mit 0,1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ BSA und 0,2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ *herring sperm*-DNA) sowie erneut zweimal mit 100 μL des Proteinpuffers gewaschen. Die magnetischen Mikropartikel wurden in 49 μL Proteinpuffer suspendiert und mit 1 μL DEL (250 fmol) versetzt. Die Inkubation der DEL mit den auf magnetischen Kügelchen immobilisierten Proteinen erfolgte für 45 min bei Raumtemperatur auf einem nicht-magnetischen Gestell bei kontinuierlichem Schütteln. Im Anschluss an die Inkubationszeit wurden die magnetischen Partikel achtmal mit 100 μL Proteinpuffer zur Entfernung von nicht-bindenden DNA-Molekül-Konjugaten gewaschen. Die Elution der bindenden Moleküle erfolgte durch Hitzedenaturierung der Proteine. Hierfür wurden die magnetischen Kügelchen in 20 μL ddH₂O resuspendiert und im Anschluss bei 80 °C für fünf Minuten inkubiert. Mit Hilfe des magnetischen Gestells konnte das Eluat von den magnetischen Partikeln abgetrennt und in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden. Der Vorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt. Der Selektionsassay wurde im Anschluss ein zweites Mal durchgeführt, wobei in diesem Fall 20 μL des Eluats aus der ersten Selektionsrunde verwendet wurden anstelle der DNA-kodierten Substanzbibliothek. Als Kontrollen wurden Selektionsexperimente ohne immobilisiertes Protein („*empty beads*“) durchgeführt und zur Validierung der Synthese

der DNA-kodierten Substanzbibliothek und des Selektionsassays erfolgte ein *pull-down* des in der DEL-Synthese eingeführten Molekülbausteins *d*-Desthiobiotin mit Hilfe von Streptavidin-beschichteten magnetischen Kügelchen. Für die Kontrollen wurde statt eines spezifischen Pufferpuffers ein PBS-Puffer mit 0,01 % Tween-20 verwendet.

Tabelle 19: Auflistung der für das Selektionsassay verwendeten Puffer.

Puffer	Zusammensetzung
PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , pH = 7,4
hTEAD4-Puffer	25 mM MES, pH = 6,5, 0,05 % CHAPS
MDM2-Puffer	25 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM TCEP, pH = 8,0, 5 % Glycerol, 0,01% Tween-20

7.8.2.2 Barcode-Polymerasekettenreaktion

Nach dem Selektionsassay wurden die DNA-Sequenzen der Oligonukleotid-Molekül-Konjugate amplifiziert und gleichzeitig um experimentspezifische Sequenzen sowie um Adapter-Sequenzen für das darauffolgende *next generation sequencing* mittels PCR verlängert (DNA-Sequenzen sind der Tabelle 20 zu entnehmen). Zur Amplifizierung und Einführung der Adapter-Sequenzen wurden in einer ersten PCR (PCR I) 10 µL des nicht-aufgereinigten Eluats aus der zweiten Selektionsrunde als DNA-Vorlage, 5 U Taq DNA-Polymerase, 1x Taq-Puffer, 3 mM MgCl₂, 0,625 mM je dNTP sowie 1 µM der jeweiligen Primer in einem Reaktionsansatz von 40 µL eingesetzt und nachfolgendes PCR-Programm verwendet:

T [°C]	t [s]	Schritt	
95	180	Initiale Denaturierung	
95	30	Denaturierung	} 25x
55	30	Annealing	
72	30	Elongation	
72	300	finale Elongation	
4	-	abschließende Temperatur	

In einer zweiten PCR (PCR II) wurden die einzelnen Selektionsexperimente kodiert und die *Illumina Adapter*-Sequenzen eingeführt. Hierfür wurden 10 µL nicht-aufgereinigte DNA-Vorlage aus der ersten PCR, 5 U Taq DNA-Polymerase, 1x Taq-Puffer, 3 mM MgCl₂, 0,625 mM je dNTP und 5 µL *Nextera XT Index 1 Primer* sowie 5 µL *Nextera XT Index 2 Primer* in einem Reaktionsvolumen von 40 µL eingesetzt und nachfolgendes PCR-Programm verwendet:

T [°C]	t [s]	Schritt	
95	180	Initiale Denaturierung	
95	30	Denaturierung	} 15x
55	30	Annealing	
72	30	Elongation	
72	300	finale Elongation	
4	-	abschließende Temperatur	

Tabelle 20: Übersicht der DNA-Sequenzen der verwendeten Primer zur Kodierung der Selektionsexperimente sowie Einführung von Adapter-Sequenzen für die nachfolgende Illumina-Sequenzierung.

DNA	Sequenz (5'-3')
<i>forward primer</i> (PCR I)	TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG
<i>reverse primer</i> (PCR I)	GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GTG TAG ACC ATG TAG TTG AGG TCA
<i>forward primer</i> (PCR II)	AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACX XXX XXX XTC GTC GGC AGC GTC
<i>reverse primer</i> (PCR II)	CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT XXX XXX XXG TCT CGT GGG CTC GG

Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert, über das *QIAquick PCR Purification Kit* aufgereinigt und die Konzentration über Messung der Absorption bei 260 nm ermittelt. Die um experimentspezifische DNA-Sequenzen sowie um Sequenzen für die Illumina-Sequenzierung verlängerten DNA-Oligonukleotide wurden äquimolar zusammen gemischt und durch die Firma *CeGat* mittels *next generation sequencing* ausgelesen.

7.8.2.3 Auswertung der Sequenzierungsdaten

Der durch das *next generation sequencing* generierte Datensatz wurde mittels der Software „*encoded compound enrichment calculator*“ (*ECEC*), welche in Kollaboration mit der Fakultät für Statistik (Lukas Arendt, Ina Dormuth, Prof. Dr. Roland Fried, Prof. Dr. Jörg Rahnenführer, TU Dortmund) entwickelt wurde und auf der freien Programmiersprache *R* basiert, ausgewertet. Zur Analyse der Sequenzierungsergebnisse wird ein sogenanntes *structure sheet* verwendet, welches Informationen über mögliche Kombinationen von kodierenden DNA-Sequenzen, die den kodierenden DNA-Sequenzen zugrundeliegenden chemischen Molekülstrukturen sowie die nicht-kodierenden Teilsequenzen enthält. Bei den Teilsequenzen handelt es sich um DNA-Sequenzen, welche als Überhänge zur

Ligation von kodierenden DNA-Sequenzen sowie um DNA-Sequenzen zur Einführung bestimmter Adapter-Sequenzen für das nachfolgende *next generation sequencing* benötigt werden. Die Auswertung der Sequenzierungsergebnisse eines spezifischen Selektionsexperiments erfolgt, indem die DNA-Sequenzen in bestimmte Blöcke bestehend aus den Buchstaben A, T, C, G und N aufgeteilt werden. Die Buchstaben A, T, C und G entsprechen dabei den jeweiligen Nucleobasen, während N eine nicht-lesbare Nucleobase darstellt. Durch die Information über die nicht-kodierenden Teilsequenzen wird ermöglicht, dass der Algorithmus die Start- als auch die Endpunkte von kodierenden DNA-Sequenzen identifizieren kann. Weiterhin besitzt der Algorithmus die Funktion, dass jeder Block aus DNA-Sequenzen nach möglichen Fehlern, welche durch Mutationen, Insertionen oder Deletionen zustande gekommen sind, abgesucht wird und nur Blöcke aus DNA-Sequenzen, welche eine Maximalanzahl an zwei Fehlern aufweisen, letztendlich zur Analyse der Sequenzierungsdaten herangezogen werden. Die Bindung von bestimmten Konnektivitäten an Proteine bzw. deren Anreicherung in einem Selektionsexperiment wird dargestellt in Form von Anreicherungsfaktoren (*enrichment factors*, EF). Unter der Konnektivität wird die Kombination aus den jeweiligen Molekülbausteinen verstanden, die durch die Blöcke aus DNA-Sequenzen kodiert ist. Zur Ermittlung der Anreicherungsfaktoren wird die Häufigkeit (*frequency*) einer bestimmten Konnektivität für ein spezifisches Selektionsexperiment ($\text{freq}_{\text{protein}}(\text{connect}_{x,y,z})$) mit der jeweiligen eines Kontrollexperiments $\text{freq}_{\text{control}}(\text{connect}_{x,y,z})$ verglichen und gleichzeitig in Relation zur Menge an DNA-Sequenzen ($\text{reads}_{\text{protein}}$, $\text{reads}_{\text{control}}$) gesetzt.

$$\text{EF}_{\text{protein, control}}(\text{connect}_{x,y,z}) = \frac{\text{freq}_{\text{protein}}(\text{connect}_{x,y,z}) * \text{reads}_{\text{control}}}{\text{freq}_{\text{control}}(\text{connect}_{x,y,z}) * \text{reads}_{\text{protein}}}$$

Zur Visualisierung werden die Anreicherungsfaktoren eines Selektionsexperiments oft in Zusammenhang mit der sogenannten *rank abundance* (RA, Häufigkeit von Konnektivitäten) gestellt. Die *rank abundance* einer bestimmten Konnektivität wird dabei über den mathematischen Operator *rank* (Rang) in Beziehung zu allen Konnektivitäten mit einer Häufigkeit >0 eines kompletten Sequenzierungsdatensatzes (einschließlich Kontrollexperimenten, C) gesetzt.

$$\text{RA}(\text{connect}_{x,y,z}) = \text{rank}(\text{connect}_{x,y,z} | C).$$

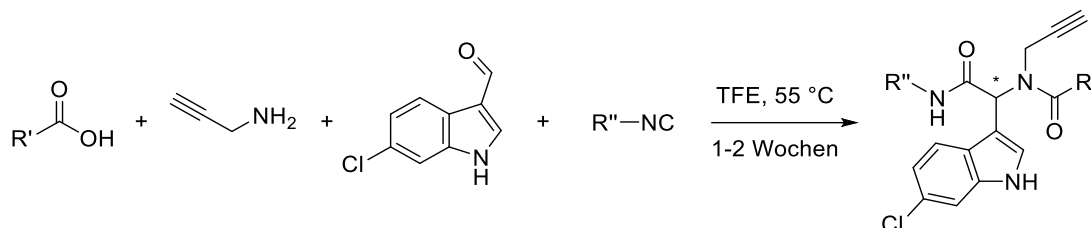
Die peptidomimetische tiDEL besteht aus insgesamt drei Blöcken kodierender DNA-Sequenzen. Der erste Block repräsentiert den peptidischen Rückgrat, generiert durch die U-4CR an hexT-Startmaterial-Konjugaten. Der zweite Block beinhaltet DNA-Sequenzen für das erste Diversitätselement, nämlich die für die U-4CR verwendeten Isocyanide. Die für die CuAAC an hexT-Ugi-Reaktionsprodukten verwendeten Azide

stellen das zweite Diversitätselement der tiDEL dar und werden durch den dritten Block an kodierenden DNA-Sequenzen wiedergegeben.

7.8.3 Hit-Resynthese

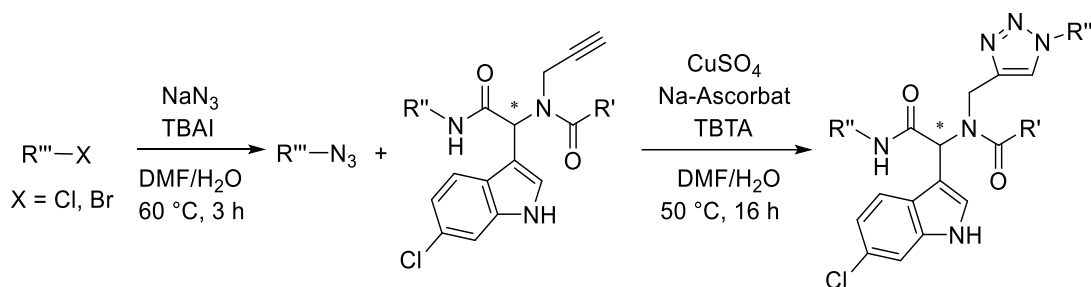
7.8.3.1 Allgemeine Synthesevorschriften (AV)

7.8.3.1.1 Ugi-Vierkomponentenreaktion (AV-01)



Die Carbonsäure (1 Äquiv., 0,17 mmol), Propargylamin (1 Äquiv., 10,9 μ L, 0,17 mmol), 6-Chloro-1*H*-indol-3-carbaldehyd (1 Äquiv., 30,9 mg, 0,17 mmol) und das Isocyanid (1 Äquiv., 0,17 mmol) wurden in 200 μ L 2,2,2-Trifluoroethanol suspendiert. Die Reaktionsmischung wurde bei 55 °C für 1-2 Wochen gerührt. Das Reaktionsvolumen wurde jeden dritten Tag kontrolliert und es wurde, falls notwendig, frisches 2,2,2-Trifluoroethanol (200 μ L) hinzugegeben. Nach Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum wurde das Rohprodukt durch Silica-Säulenchromatographie unter Verwendung von Petroleumether/Ethylacetat als Laufmittel gereinigt.

7.8.3.1.2 Kupfer-vermittelte Alkin-Azid-Cycloaddition (AV-02)

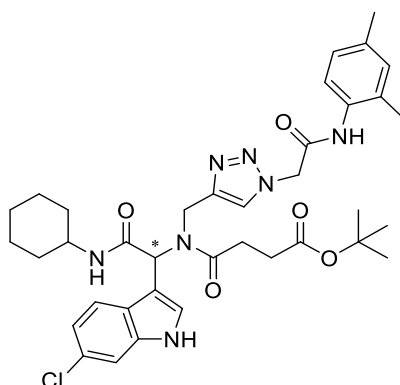


Zu einer Lösung aus einem Alkyl- oder Benzylhalid (1 Äquiv., 0,041 mmol) in 400 μ L DMF wurden TBAI (20 mol%, 3,1 mg, 0,008 mmol), gelöst in 100 μ L DMF, und Natriumazid (1,2 Äquiv., 3,2 mg, 0,049 mmol), gelöst in 200 μ L H₂O, gegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei 60 °C für drei Stunden gerührt. Das U-4CR-Produkt (1,2 Äquiv., 0,049 mmol), in 400 μ L DMF gelöst, Tris(benzyltriazolylmethyl)amin (TBTA, 10 mol%, 2,2 mg, 0,004 mmol), in 200 μ L DMF gelöst, sowie Natriumascorbat (25 mol%, 2,1 mg,

0,01 mmol) und Kupfer(II)sulfat (5 mol%, 0,5 mg, 0,002 mmol), jeweils in 200 μL H_2O gelöst, wurden nacheinander hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei 50 $^\circ\text{C}$ für 16 Stunden gerührt. Anschließend wurden 10 mL kaltes H_2O hinzugegeben und die wässrige Phase wurde dreimal mit 10 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit einer 1 M EDTA-Lösung sowie einer gesättigten NaCl-Lösung gewaschen und anschließend über MgSO_4 getrocknet und eingedampft. Die Reinigung erfolgte durch Silica-Säulenchromatographie unter Verwendung von $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ als Laufmittel.

7.8.3.2 Synthese der Verbindungen

tert-Butyl 4-((1-(6-chloro-1*H*-indol-3-yl)-2-(cyclohexylamino)-2-oxoethyl)((1-(2-((2,4-dimethyl-phenyl)amino)-2-oxoethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)-4-oxobutanoat (70)



Darstellung: Im ersten Syntheseschritt wurde die U-4CR nach **AV-01** zwischen Mono-*tert*-butyl-succinat **22ab** (30 mg, 0,17 mmol), Propargylamin **25a** (10,9 μL , 0,17 mmol), 6-Chloro-1*H*-indol-3-carbaldehyd **16c** (30,9 mg, 0,17 mmol) und Cyclohexylisocyanid **23l** (21,4 μL , 0,17 mmol) durchgeführt. Das Produkt wurde mit einer Ausbeute von 39 % als orangene Mischung mit unreaktiertem 6-Chloro-1*H*-indol-3-carbaldehyd (1:1-Verhältnis) isoliert und ohne weitere Reinigung im nächsten Syntheseschritt eingesetzt. Die CuAAC des Produkts der Ugi-Vierkomponentenreaktion (24,5 mg, 0,049 mmol) mit dem Azid **A48**, welches ausgehend von 2-Bromo-*N*-(2,4-dimethylphenyl)acetamid **H48** (10 mg, 0,041 mmol) *in situ* hergestellt wurde, erfolgte nach **AV-02**. Das Produkt **70** wurde mit einer Ausbeute von 44 % als farbloser, amorpher Feststoff isoliert.

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, CDCl_3) δ = 8.30 (s, 1H), 7.50 – 7.45 (m, 1H), 7.37 – 7.34 (m, 1H), 7.31 – 7.26 (m, 2H), 7.24 (s, 1H), 7.11 (s, 1H), 7.01 – 6.96 (m, 1H),

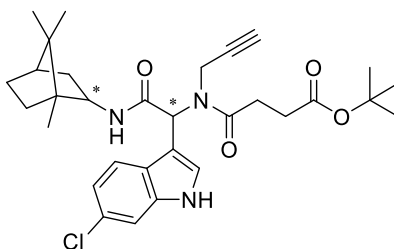
6.95 (s, 1H), 6.47 (s, 1H), 5.53 (s, 1H), 4.26 (s, 1H), 2.81 – 2.63 (m, 3H), 2.26 (s, 3H), 2.06 (s, 2H), 1.80 (d, J = 10.6 Hz, 2H), 1.69 – 1.52 (m, 4H), 1.46 (s, 6H), 1.25 (s, 9H), 1.19 – 1.04 (m, 4H) ppm.

¹³C-NMR: (101 MHz, CDCl₃) δ = 173.30, 172.72, 136.23, 135.97, 134.14, 131.40, 129.36, 129.12, 128.59, 128.26, 127.88, 127.36, 124.50, 123.60, 120.96, 119.77, 111.46, 80.84, 54.67, 53.23, 46.19, 40.63, 32.87, 32.06, 30.76, 29.83, 29.50, 29.03, 28.24, 25.56, 24.91, 22.83, 21.01, 17.67, 14.26 ppm.

HPLC-MS (I): t_R = 6,8 min, [M+H]⁺ = 704,1.

HRMS: Für [M+H]⁺ C₃₇H₄₇O₅N₇³⁵Cl berechnet = 704,33217, gefunden = 704,33200;
Für [M+H]⁺ C₃₇H₄₇O₅N₇³⁷Cl berechnet = 706,32922, gefunden = 706,32946.

***tert*-Butyl 4-((1-(6-chloro-1*H*-indol-3-yl)-2-oxo-2-(((1*S*,2*R*,4*R*)-1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-yl)amino)ethyl)(prop-2-yn-1-yl)amino)-4-oxobutanoat (**77**)**



Darstellung: Verbindung **77** wurde durch die U-4CR nach **AV-01** zwischen Mono-*tert*-butyl-succinat **22ab** (30 mg, 0,17 mmol), Propargylamin **25a** (10,9 µL, 0,17 mmol), 6-Chloro-1*H*-indol-3-carbaldehyd **16c** (30,9 mg, 0,17 mmol) und 2-Isocyano-1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptan **23d** (32,0 µL, 0,17 mmol) synthetisiert. Das Produkt **77** wurde mit einer Ausbeute von 44 % als ein amorpher Feststoff und einer Mischung aus Diastereomeren im Verhältnis von 2:1 isoliert.

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃) δ = 8.54 (m, 1H), 7.70 – 7.61 (m, 1H), 7.40 – 7.32 (m, 3H), 7.08 – 7.03 (m, 2H), 6.48 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 5.30 (s, 1H), 4.06 (s, 1H), 4.05 – 4.02 (m, 2H), 2.83 – 2.76 (m, 3H), 2.71 – 2.64 (m, 3H), 2.59 (t, J = 6.7 Hz, 1H), 2.45 (t, J = 6.7 Hz, 1H), 1.95 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 1.81 (dd, J = 13.1, 9.2 Hz, 1H), 1.73 – 1.70 (m, 3H), 1.73 – 1.55 (m, 4H), 1.47 (s, 9H), 1.44 (s, 5H), 1.30 – 1.23 (m, 2H), 1.18 – 1.11 (m, 2H), 0.88 – 0.84 (m, 4H), 0.84 – 0.78 (m, 9H) ppm.

¹³C-NMR: (126 MHz, CDCl₃) δ = 173.07, 173.03, 172.40, 172.25, 128.68, 128.60, 127.01, 125.89, 125.79, 121.02, 120.95, 120.06, 111.35, 111.32, 81.17, 80.72, 72.22, 72.01, 71.73, 48.83, 47.19, 44.96, 38.87, 38.78, 36.16, 36.05,

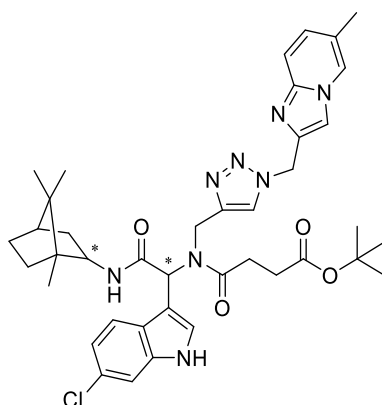
31.18, 30.82, 30.61, 29.39, 28.94, 28.26, 28.20, 27.16, 20.35, 20.31, 12.04 ppm.

HPLC-MS (I): $t_R = 9,1$ min, $[M+H]^+ = 553,8$.

HRMS: Für $C_{31}H_{41}O_4N_3^{35}Cl$ $[M+H]^+$ berechnet = 554,27801, gefunden = 554,27783;

Für $C_{31}H_{41}O_4N_3^{37}Cl$ $[M+H]^+$ berechnet = 556,27506, gefunden = 556,27504.

tert-Butyl 4-((1-(6-chloro-1H-indol-3-yl)-2-oxo-2-(((1S,2R,4R)-1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-yl)amino)ethyl)((1-((6-methylimidazo[1,2-a]pyridin-2-yl)methyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)-4-oxobutanoate (71)



Darstellung: Die CuAAC des Produkts der Ugi-Vierkomponentenreaktion **77** (36,4 mg, 0,066 mmol) mit dem Azid **A56**, welches ausgehend von 2-(Chloromethyl)-6-methylimidazo[1,2-a]pyridin-hydrochlorid (12 mg, 0,055 mmol) **H56** mit Natriumazid (7,9 mg, 0,120 mmol, 2,2 Äquiv.) *in situ* hergestellt wurde, erfolgte nach **AV-02**. Das Produkt **71** wurde mit einer Ausbeute von 56 % als farbloser, amorpher Feststoff und einer Mischung aus Diastereomeren im Verhältnis von 1:1 isoliert.

¹H-NMR: (400 MHz, CD₂Cl₂) $\delta = 8.94$ (s, 1H), 8.91 (s, 1H), 7.92 (s, 2H), 7.55 (dd, $J = 7.6, 2.1$ Hz, 2H), 7.47 – 7.30 (m, 6H), 7.30 – 7.23 (m, 2H), 7.18 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H), 7.12 – 7.05 (m, 3H), 6.98 – 6.92 (m, 3H), 6.66 (s, 1H), 6.51 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 6.44 – 6.35 (m, 3H), 5.27 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H), 4.61 – 4.50 (m, 4H), 3.87 – 3.74 (m, 2H), 2.81 – 2.71 (m, 4H), 2.62 – 2.55 (m, 4H), 2.32 (s, 1H), 2.31 (s, 1H), 1.69 (s, 6H), 1.59 (s, 5H), 1.44 (s, 19H), 1.33 – 1.11 (m, 7H), 0.86 – 0.72 (m, 18H) ppm.

¹³C-NMR: (151 MHz, CD₂Cl₂) $\delta = 173.78, 173.09, 173.00, 170.71, 170.56, 169.76, 169.63, 145.51, 145.45, 145.33, 139.92, 139.89, 136.70, 136.67, 136.56, 136.42, 132.85, 132.71, 129.59, 128.74, 128.24, 128.15, 128.09, 127.97, 127.65, 127.57, 127.50, 126.48, 126.02, 125.99, 123.28, 123.18, 123.10,$

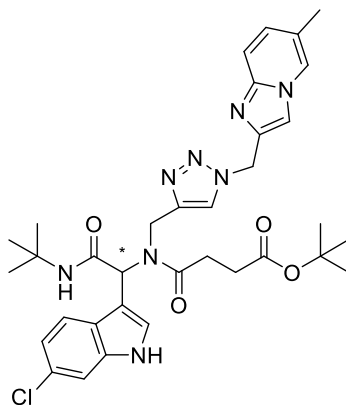
120.75, 120.66, 120.54, 120.17, 113.56, 113.51, 113.43, 111.35, 111.33, 111.17, 110.04, 110.00, 109.84, 80.86, 80.83, 80.81, 57.61, 57.48, 54.75, 54.68, 50.09, 50.03, 49.22, 49.20, 48.67, 48.64, 47.48, 47.46, 45.50, 45.48, 44.08, 44.05, 43.97, 43.89, 40.70, 40.63, 40.58, 39.18, 39.02, 37.38, 37.34, 36.53, 36.52, 31.23, 31.17, 31.15, 29.62, 29.59, 29.56, 28.56, 28.40, 28.27, 27.51, 20.52, 20.40, 20.05, 18.91, 18.89, 18.43, 18.42, 14.14, 14.12, 12.26, 12.08 ppm.

HPLC-MS (I): $t_R = 8,4$ min, $[M+H]^+ = 741,1$.

HRMS: Für $C_{40}H_{50}O_4N_8^{35}Cl$ $[M+H]^+$ berechnet = 741,36381, gefunden = 741,36420;

Für $C_{40}H_{50}O_4N_8^{37}Cl$ $[M+H]^+$ berechnet = 743,36086, gefunden = 743,36061.

***tert*-Butyl 4-((2-((*tert*-butylamino)-1-(6-chloro-1*H*-indol-3-yl)-2-oxo-113-ethyl)((1-((6-methylimidazo[1,2-*a*]pyridin-2-yl)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)-4-oxo-butanoate (72)**



Darstellung: Im ersten Syntheseschritt wurde die U-4CR nach **AV-01** zwischen Mono-*tert*-butyl-succinat **22ab** (77,6 mg, 0,44 mmol), Propargylamin **25a** (28,5 μ L, 0,44 mmol), 6-Chloro-1*H*-indol-3-carbaldehyd **16c** (80,0 mg, 0,44 mmol) und *tert*-Butylisocyanid **23s** (99,6 μ L, 0,44 mmol) durchgeführt. Das Produkt wurde mit einer Ausbeute von 50 % als orangener Feststoff isoliert. Die CuAAC des Produkts der Ugi-Vierkomponentenreaktion (103,8 mg, 0,22 mmol) mit dem Azid **A56**, welches ausgehend von 2-(Chloromethyl)-6-methylimidazo[1,2-*a*]pyridin-hydrochlorid **H56** (40,0 mg, 0,18 mmol) und Natriumazid (18,0 mg, 0,27 mmol, 1,5 Äquiv.) *in situ* hergestellt wurde, erfolgte nach **AV-02**. Das Produkt **72** wurde mit einer Ausbeute von 32 % als farbloser, amorpher Feststoff isoliert.

¹H-NMR: (500 MHz, $CDCl_3$) $\delta = 9.78$ (s, 1H), 8.01 (s, 1H), 7.63 – 7.58 (m, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.38 (s, 1H), 7.30 – 7.27 (m, 1H), 7.22 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.13 (s,

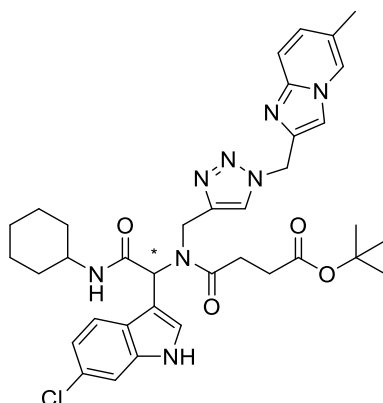
1H), 6.83 (dd, J = 8.5, 1.6 Hz, 1H), 6.63 (s, 1H), 6.43 (s, 1H), 5.40 – 5.29 (m, 2H), 4.63 (d, J = 4.4 Hz, 2H), 2.85 – 2.78 (m, 2H), 2.66 – 2.61 (m, 2H), 2.38 (s, 3H), 1.44 (s, 9H), 1.32 (s, 9H) ppm.

¹³C-NMR: (126 MHz, CDCl₃) δ = 173.69, 172.87, 169.50, 145.29, 136.39, 128.14, 127.18, 126.15, 124.86, 122.67, 120.75, 120.05, 111.50, 110.13, 80.72, 51.81, 40.91, 31.10, 29.43, 28.96, 28.48, 18.50 ppm.

HPLC-MS (I): t_R = 4,6 min, [M+H]⁺ = 661,1.

HRMS: Für C₃₄H₄₂O₄N₈³⁵Cl [M+H]⁺ berechnet = 661,30121, gefunden = 661,30143;
Für C₃₄H₄₂O₄N₈³⁷Cl [M+H]⁺ berechnet = 663,29826, gefunden = 663,29927.

tert-Butyl 4-((1-(6-chloro-1H-indol-3-yl)-2-(cyclohexylamino)-2-oxo-1H-ethyl)((1-((6-methyl-imidazo[1,2-a]pyridin-2-yl)methyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)-4-oxo-butanoat (73)



Darstellung: Im ersten Syntheseschritt wurde die U-4CR nach **AV-01** zwischen Mono-*tert*-butyl-succinat **22ab** (67,9 mg, 0,39 mmol), Propargylamin **25a** (25,0 µL, 0,39 mmol), 6-Chloro-1*H*-indol-3-carbaldehyd **16c** (70,0 mg, 0,39 mmol) und Cyclohexylisocyanid **23I** (48,4 µL, 0,39 mmol) durchgeführt. Das Produkt wurde mit einer Ausbeute von 43 % als orangene Mischung mit unreaktiertem 6-Chloro-1*H*-indol-3-carbaldehyd **16c** (1:1-Verhältnis) isoliert und ohne weitere Reinigung im nächsten Syntheseschritt eingesetzt. Die CuAAC des Produkts der Ugi-Vierkomponentenreaktion (82,09 mg, 0,16 mmol) mit dem Azid **A56**, welches ausgehend von 2-(Chloromethyl)-6-methylimidazo[1,2-*a*]pyridinhydrochlorid **H56** (30,0 mg, 0,14 mmol) und Natriumazid (13,48 mg, 0,21 mmol, 1,5 Äquiv.) *in situ* hergestellt wurde, erfolgte nach **AV-02**. Das Produkt **73** wurde mit einer Ausbeute von 40 % als farbloser, amorpher Feststoff isoliert.

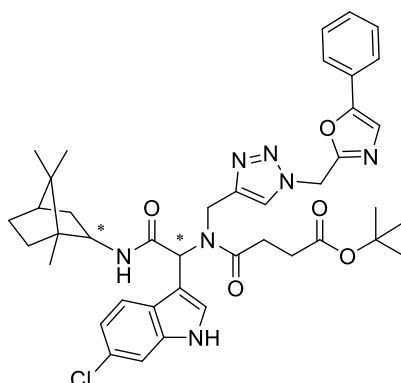
¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃) δ = 9.87 (s, 1H), 8.07 (s, 1H), 7.73 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.51 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.40 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 7.21 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.15 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 6.80 (dd, J = 8.5, 1.7 Hz, 1H), 6.59 (s, 1H), 6.54 (s, 1H), 5.40 (dd, J = 37.7, 15.5 Hz, 2H), 4.62 (dd, J = 49.2, 17.0 Hz, 2H), 2.93 – 2.56 (m, 5H), 2.41 (s, 3H), 1.87 (t, J = 14.7 Hz, 2H), 1.68 (dd, J = 9.7, 3.7 Hz, 2H), 1.58 (dd, J = 8.6, 4.2 Hz, 1H), 1.45 (s, 9H), 1.32 – 1.09 (m, 7H) ppm.

¹³C-NMR: (126 MHz, CDCl₃) δ = 173.56, 172.82, 168.90, 145.01, 136.10, 127.76, 127.03, 125.93, 124.92, 122.56, 120.48, 119.80, 114.57, 112.22, 111.22, 109.77, 80.62, 53.65, 48.79, 40.64, 32.89, 31.01, 29.11, 28.24, 25.61, 25.04, 24.99, 18.27 ppm.

HPLC-MS (I): t_R = 4,7 min, [M+H]⁺ = 687,2.

HRMS: Für C₃₆H₄₄O₄N₈³⁵Cl [M+H]⁺ berechnet = 687,31686, gefunden = 687,31676.

tert-Butyl 4-((1-(6-chloro-1H-indol-3-yl)-2-oxo-2-(((1S,4R)-1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]-heptan-2-yl)amino)-113-ethyl)((1-((5-phenyloxazol-2-yl)methyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-methyl)amino)-4-oxobutanoat (74)



Darstellung: Die CuAAC des Produkts der Ugi-Vierkomponentenreaktion **77** (17,0 mg, 0,031 mmol) mit dem Azid **A27**, welches ausgehend von 2-(Chloromethyl)-5-phenyloxazol **H27** (5,0 mg, 0,026 mmol) mit Natriumazid (2,5 mg, 0,038 mmol, 1,5 Äquiv.) *in situ* hergestellt wurde, erfolgte nach **AV-02**. Das Produkt **74** wurde mit einer Ausbeute von 76 % als farbloser, amorpher Feststoff und einer Mischung aus Diastereomeren im Verhältnis von 2:1 isoliert.

¹H-NMR: (500 MHz, CD₂Cl₂) δ = 8.74 (d, J = 17.3 Hz, 1H), 7.63 – 7.59 (m, 4H), 7.43 (t, J = 7.6 Hz, 4H), 7.36 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 7.32 (d, J = 2.1 Hz, 2H), 7.30 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 7.29 – 7.27 (m, 1H), 7.26 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 7.01 – 6.97 (m, 2H), 6.41 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.38 (d, J = 6.5 Hz, 1H), 5.42 (s, 1H), 5.38

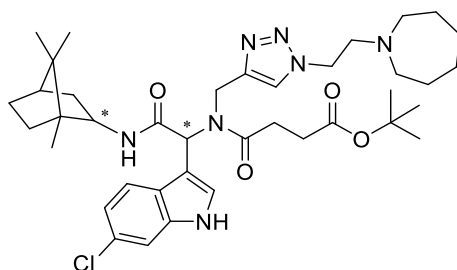
(s, 1H), 5.33 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H), 4.61 (dd, $J = 16.1, 5.8$ Hz, 2H), 4.53 (dd, $J = 17.3, 7.2$ Hz, 1H), 2.79 – 2.52 (m, 7H), 1.79 – 1.66 (m, 5H), 1.58 – 1.49 (m, 2H), 1.44 (s, 5H), 1.44 (s, 9H), 1.27 – 1.09 (m, 4H), 0.83 (s, 2H), 0.80 – 0.77 (m, 7H), 0.74 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$: (126 MHz, CD_2Cl_2) $\delta = 173.70, 172.83, 172.73, 169.46, 169.38, 156.69, 156.64, 153.30, 153.24, 145.94, 145.84, 136.57, 136.40, 129.53, 129.50, 128.63, 128.58, 127.82, 127.80, 127.69, 127.59, 126.38, 126.33, 124.86, 123.16, 123.13, 122.95, 121.04, 121.02, 120.33, 120.30, 111.71, 111.66, 110.16, 110.09, 80.82, 80.74, 57.41, 57.37, 49.24, 49.14, 47.47, 47.43, 47.01, 46.90, 45.45, 41.24, 40.97, 39.05, 39.02, 36.51, 36.46, 31.08, 30.99, 29.50, 28.36, 27.50, 20.53, 20.50, 20.40, 20.37, 20.06, 14.17, 14.12, 12.24, 12.09$ ppm.

HPLC-MS (II): $t_R = 11,2$ min, $[\text{M}+\text{H}]^+ = 754,0$.

HRMS: Für $\text{C}_{41}\text{H}_{49}\text{O}_5\text{N}_7^{35}\text{Cl}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ berechnet = 754,34782, gefunden = 754,34665;
Für $\text{C}_{41}\text{H}_{49}\text{O}_5\text{N}_7^{37}\text{Cl}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ berechnet = 756,34487, gefunden = 756,34439.

tert-Butyl 4-(((1-(2-(azepan-1-yl)ethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)(1-(6-chloro-1*H*-indol-3-yl)-2-oxo-2-(((1*S*,2*R*,4*R*)-1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-yl)amino)ethyl)amino)-4-oxobutanoat (75)



Darstellung: Die CuAAC des Produkts der Ugi-Vierkomponentenreaktion **77** (33,2 mg, 0,060 mmol) mit dem Azid **A44**, welches ausgehend von 1-(2-Chloroethyl)azepanhydrochlorid **H44** (10 mg, 0,050 mmol) mit Natriumazid (7,2 mg, 0,110 mmol, 2,2 Äquiv.) *in situ* hergestellt wurde, erfolgte nach **AV-02**. Das Produkt **75** wurde mit einer Ausbeute von 76 % als farbloser, amorpher Feststoff und einer Mischung aus Diastereomeren im Verhältnis von 2:1 isoliert.

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CD_2Cl_2) $\delta = 7.62$ (s, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.37 – 7.35 (m, 2H), 7.31 (dd, $J = 8.5, 2.3$ Hz, 2H), 7.02 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 6.94 (s, 1H), 6.68 (s, 1H), 6.46 (s, 1H), 6.43 (s, 1H), 4.64 – 4.58 (m, 3H), 4.13 – 3.96 (m, 5H), 3.90 – 3.82 (m, 2H), 3.24 – 3.18 (m, 3H), 2.73 – 2.64 (m, 6H), 2.63 – 2.55 (m, 12H),

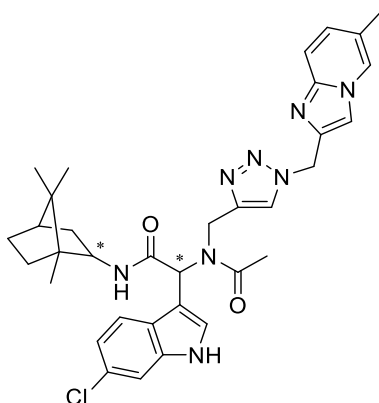
1.80 – 1.75 (m, 2H), 1.72 – 1.70 (m, 3H), 1.67 – 1.62 (m, 5H), 1.46 (s, 6H), 1.45 (s, 9H), 1.44 – 1.40 (m, 5H), 1.30 – 1.25 (m, 4H), 1.19 – 1.12 (m, 3H), 0.87 – 0.85 (m, 3H), 0.83 – 0.78 ppm (m, 12H) ppm.

¹³C-NMR: (126 MHz, CD₂Cl₂) δ = 122.83, 120.41, 57.46, 55.70, 55.65, 49.21, 47.49, 47.44, 45.47, 41.43, 41.14, 39.03, 36.56, 36.49, 31.07, 29.45, 28.86, 28.38, 27.52, 24.57, 20.54, 20.27, 13.94, 12.24, 12.15 ppm.

HPLC-MS (II): t_R = 7,7 min, [M+H]⁺ = 722,2.

HRMS: Für C₃₉H₅₇O₄N₇³⁵Cl [M+H]⁺ berechnet = 722,41551, gefunden = 722,41544;
Für C₃₉H₅₇O₄N₇³⁷Cl [M+H]⁺ berechnet = 724,41256, gefunden = 724,41399.

2-(6-Chloro-1*H*-indol-3-yl)-2-(*N*-((1-((6-methylimidazo[1,2-*a*]pyridin-2-yl)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)acetamido)-*N*-((1*S*,2*R*,4*R*)-1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-yl)acetamid (76**)**



Darstellung: Im ersten Syntheseschritt wurde die U-4CR nach **AV-01** zwischen Essigsäure **22af** (9,5 µL, 0,17 mmol), Propargylamin **25a** (10,9 µL, 0,17 mmol), 6-Chloro-1*H*-indol-3-carbaldehyd **16c** (30,9 mg, 0,17 mmol) und 2-Isocyano-1,7,7-trimethylbicyclo-[2.2.1]heptan **23d** (32,0 µL, 0,17 mmol) durchgeführt. Das Produkt wurde mit einer Ausbeute von 41 % als orangene Mischung mit unreactiertem 6-Chloro-1*H*-indol-3-carbaldehyd **16c** (1:1-Verhältnis) isoliert und ohne weitere Reinigung im nächsten Syntheseschritt eingesetzt. Die CuAAC des Produkts der Ugi-Vierkomponentenreaktion (28,9 mg, 0,066 mmol) mit dem Azid **A56**, welches ausgehend von 2-(Chloromethyl)-6-methylimidazo[1,2-*a*]pyridinhydrochlorid **H56** (12 mg, 0,055 mmol) mit Natriumazid (7,9 mg, 0,120 mmol, 2,2 Äquiv.) *in situ* hergestellt wurde, erfolgte nach **AV-02**. Das Produkt **76** wurde mit einer Ausbeute von 47 % als farbloser, amorpher

Feststoff und einer Mischung aus Diastereomeren im Verhältnis von 1:1 isoliert.

¹H-NMR: (600 MHz, MeOD) δ = 8.21 (s, 2H), 7.59 (s, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.44 – 7.40 (m, 2H), 7.34 (s, 1H), 7.31 (s, 1H), 7.26 – 7.22 (m, 5H), 7.19 – 7.14 (m, 2H), 6.94 (s, 1H), 6.85 (s, 1H), 6.84 – 6.81 (m, 2H), 6.35 (s, 1H), 6.31 (s, 1H), 5.42 – 5.28 (m, 4H), 4.75 – 4.63 (m, 3H), 3.85 – 3.77 (m, 1H), 2.35 (s, 6H), 2.29 (s, 3H), 2.27 (s, 3H), 1.77 – 1.53 (m, 10H), 1.27 – 1.11 (m, 4H), 0.82 (s, 3H), 0.82 – 0.80 (m, 6H), 0.79 (s, 3H), 0.79 (s, 6H) ppm.

¹³C-NMR: (151 MHz, MeOD) δ = 174.69, 174.53, 172.36, 172.30, 146.37, 146.19, 145.79, 140.22, 140.15, 137.92, 137.82, 130.78, 128.89, 128.45, 128.19, 127.08, 127.05, 125.86, 124.42, 123.53, 123.41, 121.06, 120.99, 120.57, 120.51, 116.75, 112.86, 112.24, 112.15, 110.34, 110.29, 58.67, 58.63, 56.20, 55.61, 50.57, 50.12, 47.88, 47.83, 46.31, 46.29, 42.96, 42.80, 38.66, 38.35, 37.23, 37.11, 28.01, 22.65, 22.62, 20.79, 20.36, 20.25, 20.21, 20.17, 19.01, 17.95, 14.49, 14.37, 12.41, 12.15 ppm.

HPLC-MS (I): t_R = 4,4 min, $[M+H]^+$ = 627,1.

HRMS: Für $C_{34}H_{40}O_2N_8^{35}Cl$ $[M+H]^+$ berechnet = 627,29573, gefunden = 627,29591;
Für $C_{34}H_{40}O_2N_8^{37}Cl$ $[M+H]^+$ berechnet = 629,29278, gefunden = 629,29346.

7.8.4 Hit-Validierung

7.8.4.1 Untersuchung der Bindung an MDM2 durch molekulares *Docking*

Das Molekül **70** wurde in die Co-Kristallstruktur von MDM2 mit der p53-Transaktivierungsdomäne mit Hilfe der Software *MOLOC* durch Prof. Dr. Alexander Dömling (Universität Groningen) gedockt. Hierfür wurde zunächst das p53-abgeleitete Peptid aus dem Strukturmodell entfernt und anschließend wurde das Molekül **70** dem Strukturmodell so angepasst, dass der Indolbaustein von **70** entsprechend dem Trp23-Indol von p53 ausgerichtet wurde. Energetisch günstige Konformationen wurden durch Energieminimierungen ermittelt.

7.8.4.2 Untersuchung der Bindung an MDM2 mittels MST

Die Bindung des Moleküls **70** an MDM2 wurde mittels MST durch Ran Zhang (Universität Groningen, Prof. A. Dömling) untersucht. Es wurde eine 100 mM Stammlösung des Moleküls **70** in DMSO hergestellt und diese entsprechend einer Verdünnungsreihe mit PBS-Puffer (+0,05 % Tween-20) verdünnt. 10 μ L Fluoreszenzmarkiertes MDM2 wurden

mit **70** gemischt, bei Raumtemperatur für 20 min inkubiert und anschließend wurde die Fluoreszenzintensität gemessen (mittlere MST-Power: 20 %, 22 °C). Die Bindungsaffinität wurde durch die integrierte Software des Herstellers ermittelt.

7.8.4.3 Untersuchung der Bindung an TEAD4 mittels nanoDSF

Die Bindung der Moleküle **71-78** an humanes TEAD4²¹⁷⁻⁴³⁴ wurde mittels nanoDSF durch Dr. Hélène Adihou (AstraZeneca MPI Satellite Unit) untersucht. hTEAD4²¹⁷⁻⁴³⁴ (5 μ M, depalmitoyliert) wurde inkubiert mit 10 \ddot{A} quiv. **71-78** (verdünnt in 25 mM HEPES, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM TCEP, pH = 7,4) für 60 min bei Raumtemperatur. Im Anschluss an die Inkubationszeit wurden die nanoDSF-Kapillaren mit 10 μ L Probe gefüllt. Die intrinsische Fluoreszenz (F_{350}/F_{330}) wurde in Abhängigkeit der Temperatur von 20 bis 85 °C (1 °C pro Minute) gemessen. Die Schmelztemperatur wurde anhand des Wendepunktes der Schmelzkurve ermittelt.

7.8.4.4 Untersuchung der kompetitiven Inhibition der zentralen Bindetasche von TEAD4 mittels Fluoreszenzpolarisation

Die kompetitive Hemmung der Bindung von Palmitinsäure an die zentrale Bindetasche von humanen TEAD4 durch die Moleküle **12**, **71** und **72** wurde mit Hilfe von FP-Experimenten durch Dr. Hacer Karatas und Dr. Mohammad Akbarzadeh (MPI Dortmund, Abt. 4, Prof. H. Waldmann) untersucht.^[154] Für die FP-Experimente wurde depalmitoyliertes hTEAD4²¹⁷⁻⁴³⁴ sowie FITC-markierte Palmitinsäure verwendet. Da die Moleküle in wässrigen Lösungen eine geringe Löslichkeit aufwiesen, wurde eine Stammlösung der jeweiligen Moleküle bestehend aus 7 % DMSO und 1 % Triton X100 hergestellt. 5 μ L Puffer (150 mM NaCl, 25 mM HEPES, pH = 6,5), gefolgt von 5 μ L des jeweiligen Moleküls (**12**, **71** bzw. **72**) und 5 μ L hTEAD4²¹⁷⁻⁴³⁴ wurden in Mikrotiterplatten gegeben. Nach einer Inkubationszeit von zehn Minuten wurden 5 μ L FITC-markierte Palmitinsäure hinzu pipettiert und die Mikrotiterplatten wurden bei Raumtemperatur für zwei Stunden auf einem Plattenschüttler erneut inkubiert. Im Anschluss wurde die Fluoreszenzpolarisation gemessen (Anregung bei 485 nm, Emission bei 535 nm) und die IC₅₀-Werte mit Hilfe der Software *Prism 7 (GraphPad)* kalkuliert. Die finalen Konzentrationen von hTEAD4²¹⁷⁻⁴³⁴ sowie der FITC-markierten Palmitinsäure betragen 50 nM sowie 10 nM.

7.8.4.5 Untersuchung der kompetitiven Inhibition der TEAD4-YAP-Interaktion mittels Fluoreszenzpolarisation

Die kompetitive Hemmung der TEAD4-YAP-Protein-Protein-Interaktion durch die Moleküle **71** und **72** wurde mit Hilfe von FP-Experimenten durch Dr. Hacer Karatas und Dr. Mohammad Akbarzadeh (MPI Dortmund, Abt. 4, Prof. H. Waldmann) untersucht.^[154] Für die FP-Experimente wurde depalmitoyliertes hTEAD4²¹⁷⁻⁴³⁴ sowie FITC-markiertes YAP⁵⁰⁻¹⁰⁰ verwendet. Da die Moleküle in wässrigen Lösungen eine geringe Löslichkeit aufwiesen, wurde eine Stammlösung der jeweiligen Moleküle bestehend aus 7 % DMSO und 1 % Triton X100 hergestellt. 5 µL PBS-Puffer, gefolgt von 5 µL des jeweiligen Moleküls (**71** bzw. **72**) und 5 µL hTEAD4²¹⁷⁻⁴³⁴ wurden in Mikrotiterplatten gegeben. Nach einer Inkubationszeit von zehn Minuten wurden 5 µL FITC-markiertes YAP⁵⁰⁻¹⁰⁰ hinzu pipettiert und die Mikrotiterplatten wurden bei 4 °C für 24 h auf einem Plattenschüttler erneut inkubiert. Im Anschluss wurde die Fluoreszenzpolarisation gemessen (Anregung bei 485 nm, Emission bei 535 nm) und die IC₅₀-Werte mit Hilfe der Software *Prism 7* (*GraphPad*) kalkuliert. Die finalen Konzentrationen von hTEAD4²¹⁷⁻⁴³⁴ sowie des FITC-markierten YAP⁵⁰⁻¹⁰⁰ betragen 5 nM sowie 2 nM.

7.8.4.6 Untersuchung der CTGF-Genexpression mittels quantitativer Echtzeit-PCR

Um den Einfluss des Moleküls **71** auf das Expressionslevel des Gens *CTGF*, welches unter der Kontrolle der TEAD-YAP-Interaktion steht, zu untersuchen, erfolgten quantitative Echtzeit-PCR-Experimente durch Blaž Andlovic (LDC, Dortmund). Es wurden hierfür 5·10⁵ HEK293-Zellen pro *Well* ausplattiert. Das Zellkulturmedium bestand aus DMEM, 10 % hitzeinaktiviertes, fetales Kälberserum sowie 2 mM *L*-Glutamin. Nach 24 h wurden die Zellen mit 3 bzw. 100 µM **71**, mit 3 bzw. 100 µM **71** in Kombination mit 3 µM **79** oder lediglich mit DMSO als Kontrolle behandelt. Die Zellen wurden für insgesamt vier Stunden inkubiert. Im Anschluss wurde die RNA mit Hilfe des *RNeasy Mini Kits* nach dem Protokoll des Herstellers aus den Zellen extrahiert. Die reverse Transkription von 100 ng RNA mit anschließender quantitativer PCR erfolgte unter Verwendung des Kits *SensiFAST Probe Hi-ROX One-Step* mit dem nachfolgenden PCR-Programm. Die finale Primerkonzentration betrug 500 nM, während die finale Konzentration der Fluorophor-markierten DNA-Sonden 250 nM war (DNA-Sequenzen sind der Tabelle 21 zu entnehmen).

T [°C]	t [s]	Schritt	
45	600	Reverse Transkription	
95	120	Aktivierung der Polymerase	
95	5	Denaturierung] 30x
60	20	Annealing	

Tabelle 21: Übersicht der in der quantitativen Echtzeit-PCR verwendeten DNA-Primer und Fluorophor-markierten DNA-Sonden.

Primer und Fluorophor-markierte DNA-Sonden	
CTGF-Gen	5'-GCTCGGTATGTCTTCATGCTG-3'
	5'-GAAGCTGACCTGGAAGAGAAC-3'
	5'-HEX-CAGCCAGAA-ZEN-AGCTCAAACCTTGATAGGC-IBFQ-3'
ACTB-Gen	5'-ACAGAGCCTCGCCTTTG-3'
	5'-CCTTGACACATGCCGGAG-3'
	5'-FAM-TCATCCATG-ZEN-GTGAGCTGGCGG-IFBQ-3'

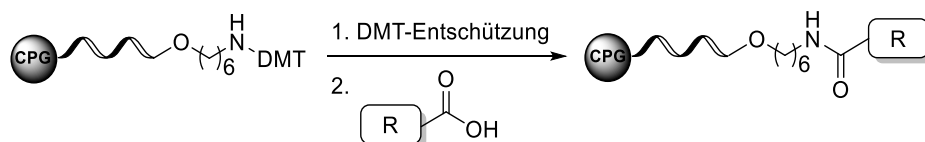
HEX = Hexachloro-Fluorescein; ZEN = Quencher; IBFQ = *Iowa Black Fluorescent Quencher*; FAM = Fluorescein.

Die *CTGF*-Genexpression wurde auf das *housekeeping gene* *ACTB* normalisiert und analysiert mit Hilfe der Software *Relative Quantification (Applied Biosystems)*. Mittels *Prism 6 (GraphPad)* erfolgte die statistische Analyse (Zweistichproben-t-Test, $p < 0,05$).

7.9 Überführung chemischer Reaktionen auf CPG-gebundenen DNA-Oligonukleotiden und Entwicklung einer neuen Kodierungsstrategie

7.9.1 Allgemeine Synthesevorschriften

7.9.1.1 Amidkupplung von Carbonsäuren an CPG-gebundenen, 5'-Aminolinker-modifizierten DNA-Oligonukleotiden



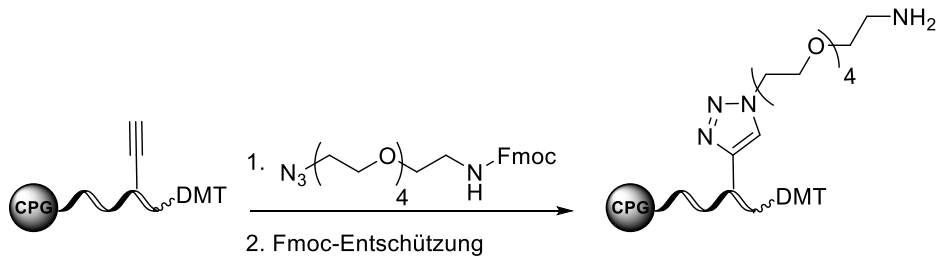
Schritt 1. Die DMT-Schutzgruppe der CPG-gebundenen, 5'-Aminolinker-modifizierten DNA (250 nmol, 9-10 mg CPG-gebundene DNA) wurde durch Inkubation mit 200 μL 3 %iger TCA in CH_2Cl_2 für eine Minute entfernt. Die DMT-Entschützung erfolgte in einer Filtersäule auf einem Vakuumverteiler. Eine gelb-orangene Färbung der Reaktionslösung

zeigte die erfolgreiche Abspaltung der DMT-Schutzgruppe. Der Vorgang wurde so lange wiederholt, bis keine Färbung der Lösung zu beobachten war. Die CPG-gebundene, DMT-entschützte DNA wurde dreimal mit je 200 μL 1 % TEA in ACN, DMF, MeOH, ACN und CH_2Cl_2 gewaschen und im Anschluss *in vacuo* getrocknet.

Schritt 2. Die CPG-gebundene, DMT-entschützte DNA, die Carbonsäure und das Kupplungsreagenz HATU wurden *in vacuo* für 15 min getrocknet. Anschließend wurden die Carbonsäure (25 μmol , 100 Äquiv.) und HATU (25 μmol , 100 Äquiv.) in jeweils 75 μL trockenem DMF gelöst und daraufhin miteinander vermischt. Zu diesem Reaktionsgemisch wurde DIPEA (62,5 μmol , 250 Äquiv.) gegeben. Die resultierende Reaktionsmischung wurde für fünf Minuten geschüttelt und anschließend zu der in 75 μL trockenem DMF suspendierten, CPG-gebundenen sowie DMT-entschützten DNA (250 nmol, 1 Äquiv.) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur für zwei Stunden geschüttelt. Im Anschluss wurde das CPG-gebundene DNA-Konjugat über eine Filtersäule auf einem Vakuumverteiler gefiltert, dreimal mit je 200 μL DMF, MeOH, ACN und CH_2Cl_2 gewaschen und daraufhin *in vacuo* getrocknet. Die Amidkupplungsreaktion wurde ein weiteres Mal wiederholt. Zur Überprüfung des Reaktionserfolges wurde eine kleine Menge des CPG-gebundenen DNA-Konjugats (0,7-0,9 mg, ~ 20 nmol) mit 500 μL AMA bei Raumtemperatur für 30 min (hexT), 1 h (TC-Sequenz) oder 4 h (ATCG-Sequenzen) inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit 20 μL Tris-Puffer (1 M, pH = 7,5) versetzt, in einer Vakuumzentrifuge getrocknet, der Rückstand in 200 μL ddH₂O aufgenommen und gefiltert. Mittels analytischer RP-HPLC sowie MALDI-MS wurde der Erfolg der Reaktion analysiert. Bei einer unvollständigen Amidkupplung (<90 %) wurde die Reaktion ein drittes Mal wiederholt.

Schritt 3. Um nicht reagierte Aminofunktionen zu schützen, wurde das CPG-gebundene DNA-Konjugat in einer Filtersäule dreimal mit 200 μL einer *capping*-Lösung (1:1-Mischung aus THF/Methylimidazol 9:1 (v/v) und THF/Pyridin/Acetanhydrid 8:1:1 (v/v)) für 30 s behandelt. Im Anschluss wurde das CPG-gebundene DNA-Konjugat dreimal mit je 200 μL DMF, MeOH, ACN und CH_2Cl_2 gewaschen und daraufhin *in vacuo* getrocknet.

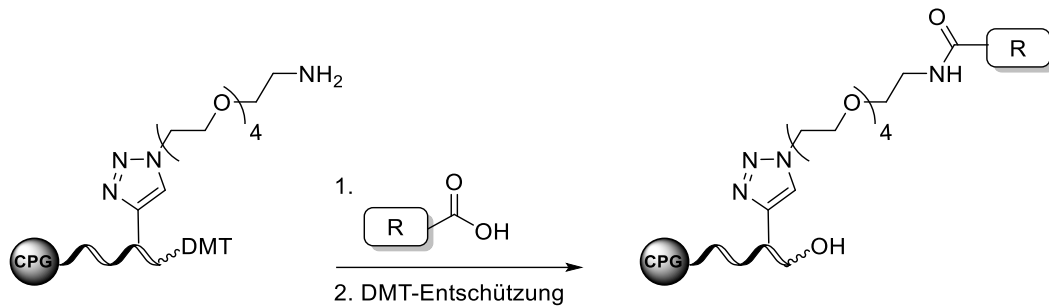
7.9.1.2 Kupfer-vermittelte Alkin-Azid-Cycloaddition eines Fmoc-geschützten PEG(4)-Linkermoleküls an CPG-gebundenen DNA-Oligonukleotiden



Schritt 1. Zur Suspension der CPG-gebundenen DNA (400 nmol, 1 Äquiv.) in 280 μL MeOH/ddH₂O (1:1) wurde N₃-PEG(4)-NH-Fmoc (33,6 μmol , 84 Äquiv.), gelöst in 100 μL DMF, gefolgt von TBTA (16,8 μmol , 42 Äquiv.), gelöst in 120 μL DMF, sowie Natriumascorbat (16,8 μmol , 42 Äquiv.) und CuSO₄·5H₂O (1,68 μmol , 4,2 Äquiv.), beides gelöst in jeweils 10 μL ddH₂O, gegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei 50 °C für 16 h geschüttelt. Im Anschluss wurde das CPG-gebundene DNA-Konjugat über eine Filtersäule auf einem Vakuumverteiler gefiltert, dreimal mit je 200 μL 0,1 M EDTA-Lösung, 0,1 M MgCl₂-Lösung, ddH₂O, DMF, MeOH, ACN und CH₂Cl₂ gewaschen und daraufhin *in vacuo* getrocknet. Zur Überprüfung des Reaktionserfolges wurde eine kleine Menge des CPG-gebundenen DNA-Konjugats (0,7-0,9 mg, ~20 nmol) mit 500 μL AMA bei Raumtemperatur für 4 h (ATCG- und 7De-dATC-Sequenzen) inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit 20 μL Tris-Puffer (1 M, pH = 7,5) versetzt, in einer Vakuumzentrifuge getrocknet, der Rückstand in 200 μL ddH₂O aufgenommen und gefiltert. Mittels analytischer RP-HPLC sowie MALDI-MS wurde der Erfolg der Reaktion analysiert.

Schritt 2. Zur Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe des CPG-gebundenen DNA-Konjugats (400 nmol, 1 Äquiv.) wurde dieses mit 200 μL einer 20 %igen Piperidinlösung in DMF behandelt und für fünf Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Im Anschluss wurde das CPG-gebundene, Fmoc-entschützte DNA-Konjugat in eine Filtersäule überführt und dreimal mit je 200 μL DMF, MeOH, ACN sowie CH₂Cl₂ gewaschen und daraufhin *in vacuo* getrocknet.

7.9.1.3 Amidkupplung von Carbonsäuren an CPG-gebundenen, PEG(4)-Linker-modifizierten DNA-Oligonukleotiden



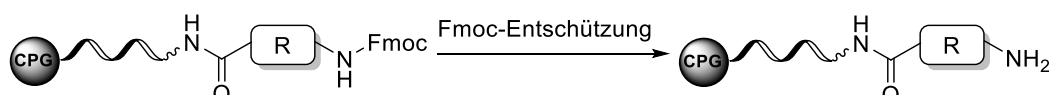
Schritt 1. Die CPG-gebundene DNA, die Carbonsäure und das Kupplungsreagenz HATU wurden *in vacuo* für 15 min getrocknet. Anschließend wurden die Carbonsäure (25 μmol , 100 Äquiv.) und HATU (25 μmol , 100 Äquiv.) in jeweils 75 μL trockenem DMF gelöst und daraufhin miteinander vermischt. Zu diesem Reaktionsgemisch wurde DIPEA (62,5 μmol , 250 Äquiv.) gegeben. Die resultierende Reaktionsmischung wurde für fünf Minuten geschüttelt und anschließend zu der in 75 μL trockenem DMF suspendierten, CPG-gebundenen DNA (250 nmol, 1 Äquiv.) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur für zwei Stunden geschüttelt. Im Anschluss wurde das CPG-gebundene DNA-Konjugat über eine Filtersäule auf einem Vakuumverteiler gefiltert, dreimal mit je 200 μL DMF, MeOH, ACN und CH_2Cl_2 gewaschen und daraufhin *in vacuo* getrocknet. Die Amidkupplungsreaktion wurde ein weiteres Mal wiederholt. Zur Überprüfung des Reaktionserfolges wurde eine kleine Menge des CPG-gebundenen DNA-Konjugats (0,7-0,9 mg, ~ 20 nmol) mit 500 μL AMA bei Raumtemperatur für 4 h (ATCG- und 7De-dATC-Sequenzen) inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit 20 μL Tris-Puffer (1 M, pH = 7,5) versetzt, in einer Vakuumzentrifuge getrocknet, der Rückstand in 200 μL ddH₂O aufgenommen und gefiltert. Mittels analytischer RP-HPLC sowie MALDI-MS wurde der Erfolg der Reaktion analysiert. Bei einer unvollständigen Amidkupplung (<90 %) wurde die Reaktion ein drittes Mal wiederholt.

Schritt 2. Um nicht reagierte Aminofunktionen zu schützen, wurde das CPG-gebundene DNA-Konjugat in einer Filtersäule dreimal mit 200 μL einer *capping*-Lösung (1:1-Mischung aus THF/Methylimidazol 9:1 (v/v) und THF/Pyridin/Acetanhydrid 8:1:1 (v/v)) für 30 s behandelt. Im Anschluss wurde das CPG-gebundene DNA-Konjugat dreimal mit je 200 μL DMF, MeOH, ACN und CH_2Cl_2 gewaschen und daraufhin *in vacuo* getrocknet.

Schritt 3. Die DMT-Schutzgruppe des CPG-gebundenen DNA-Konjugats (250 nmol) wurde durch Inkubation mit 200 μL 3 %iger TCA in CH_2Cl_2 für eine Minute entfernt. Die DMT-Entschützung erfolgte in einer Filtersäule auf einem Vakuumverteiler. Eine

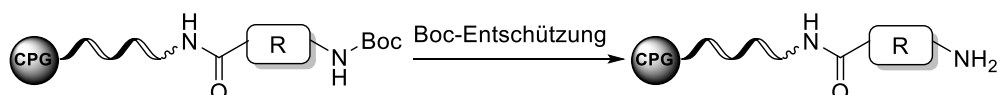
gelb-orangene Färbung der Reaktionslösung zeigte die erfolgreiche Abspaltung der DMT-Schutzgruppe. Der Vorgang wurde so lange wiederholt, bis keine Färbung der Lösung zu beobachten war. Die CPG-gebundene, DMT-entschützte DNA wurde dreimal mit je 200 μL 1 % TEA in ACN, DMF, MeOH, ACN und CH_2Cl_2 gewaschen und im Anschluss daraufhin *in vacuo* getrocknet.

7.9.1.4 Fmoc-Entschützung von CPG-gebundenen DNA-Konjugaten



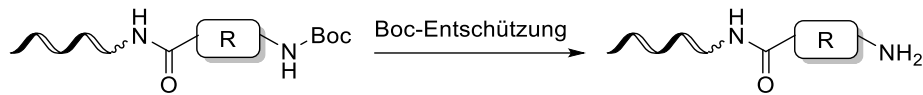
Zur Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe von CPG-gebundenen DNA-Konjugaten (250 nmol) wurden diese mit 200 μL einer 20 %igen Piperidinlösung in DMF behandelt und für fünf Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Im Anschluss wurde das CPG-gebundene, Fmoc-entschützte DNA-Konjugat in eine Filtersäule überführt und dreimal mit je 200 μL DMF, MeOH, ACN sowie CH_2Cl_2 gewaschen und daraufhin *in vacuo* getrocknet.

7.9.1.5 Boc-Entschützung von CPG-gebundenen DNA-Konjugaten



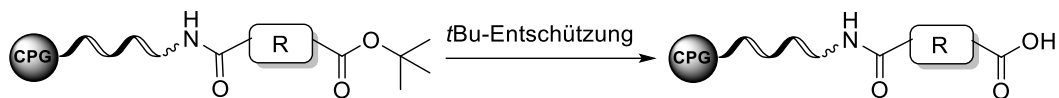
Zur Entfernung der Boc-Schutzgruppe von CPG-gebundenen DNA-Konjugaten (250 nmol) wurden diese mit 200 μL einer 10 %igen TFA-Lösung in CH_2Cl_2 für 4 h (hexT)^[47] oder mit 50 % TFA in CH_2Cl_2 für eine Minute (ATCG-Sequenzen)^[16] bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde das CPG-gebundene, Boc-entschützte DNA-Konjugat in eine Filtersäule überführt und dreimal mit je 200 μL DMF, MeOH, ACN sowie CH_2Cl_2 gewaschen und daraufhin *in vacuo* getrocknet. Zur Überprüfung des Erfolges der Entschützung wurde eine kleine Menge des CPG-gebundenen DNA-Konjugats (0,7-0,9 mg, ~ 20 nmol) mit 500 μL AMA bei Raumtemperatur für 30 min (hexT) oder 4 h (ATCG-Sequenzen) inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit 20 μL Tris-Puffer (1 M, pH = 7,5) versetzt, in einer Vakuumzentrifuge getrocknet, der Rückstand in 200 μL ddH₂O aufgenommen und gefiltert. Mittels analytischer RP-HPLC sowie MALDI-MS wurde der Erfolg der Reaktion analysiert.

7.9.1.6 Boc-Entschützung von DNA-Konjugaten in Lösung



Zur Entfernung der Boc-Schutzgruppe von DNA-Konjugaten in Lösung (~20 nmol) wurden diese mit 20 μL einer wässrigen 10 %igen TFA-Lösung für 4 h bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde das Boc-entschützte DNA-Konjugat mittels ethanolischer Fällung gereinigt, indem 80 μL 100 %iges Ethanol und 2 μL einer wässrigen NaOAc-Lösung (3 M, pH = 5,2) hinzugegeben und die resultierende Mischung bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ für 16 h inkubiert wurde. Nach der Zentrifugation der Probe bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ für 30 min und einer Drehzahl von 13.200 rpm wurde der Überstand abgenommen. Es wurde eine erneute ethanolische Fällung durch Zugabe von 100 %igem Ethanol (100 μL) und Inkubation bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ für 1 h durchgeführt. Im Anschluss wurde die Probe zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Probe getrocknet. Die DNA-Probe wurde nach der Präzipitation in 15 μL ddH₂O aufgenommen. Mittels analytischer RP-HPLC sowie MALDI-MS wurde der Erfolg der Reaktion analysiert.

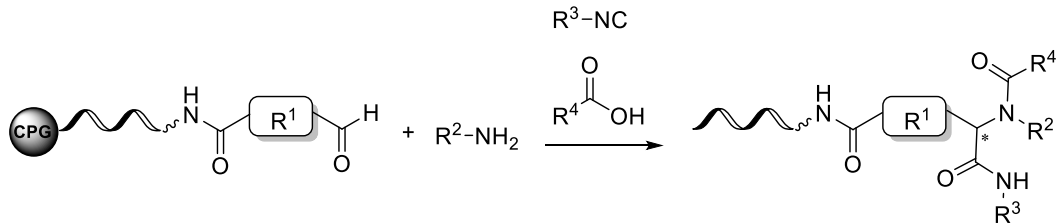
7.9.1.7 *t*Bu-Entschützung von CPG-gebundenen DNA-Konjugaten



Zur Entfernung der *t*Bu-Schutzgruppe von CPG-gebundenen hexT-Konjugaten (250 nmol) wurden diese mit 200 μL einer 10 %igen TFA-Lösung in CH₂Cl₂ für 4 h inkubiert.^[47] Zur Entfernung der *t*Bu-Schutzgruppe von CPG-gebundenen ATCG-Konjugaten wurden diese fünfmal mit je 200 μL einer 75 %igen TFA-Lösung in CH₂Cl₂ für 30 s auf einer Filtersäule bei Raumtemperatur inkubiert.^[46] Zwischen den einzelnen Entschützungsschritten wurde das CPG-gebundene DNA-Konjugat zweimal mit 200 μL CH₂Cl₂, einmal mit 200 μL 1% TEA in ACN sowie erneut einmal mit 200 μL CH₂Cl₂ gewaschen. Nach der Entschützung wurde das CPG-gebundene, *t*Bu-entschützte DNA-Konjugat in eine Filtersäule überführt und dreimal mit je 200 μL DMF, MeOH, ACN sowie CH₂Cl₂ gewaschen und daraufhin *in vacuo* getrocknet. Zur Überprüfung des Erfolges der Entschützung wurde eine kleine Menge des CPG-gebundenen DNA-Konjugats (0,7-0,9 mg, ~20 nmol) mit 500 μL AMA bei Raumtemperatur für 30 min (hexT) oder 4 h (ATCG-Sequenzen) inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit 20 μL Tris-Puffer (1 M, pH = 7,5) versetzt, in einer Vakuumzentrifuge getrocknet, der Rückstand in 200 μL ddH₂O

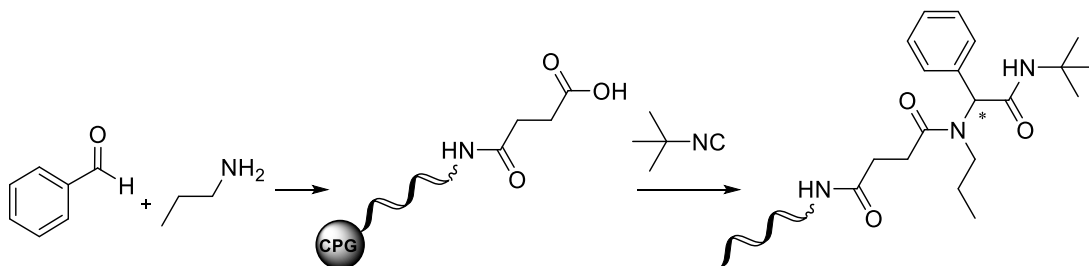
aufgenommen und gefiltert. Mittels analytischer RP-HPLC sowie MALDI-MS wurde der Erfolg der Reaktion analysiert.

7.9.1.8 Ugi-Vierkomponentenreaktion an CPG-gebundenen DNA-Aldehyd-Konjugaten



Die Suspension aus CPG-gebundenem DNA-Aldehyd-Konjugat (20 nmol, 1 Äquiv.) und Amin (20 μ mol, 1000 Äquiv.) in 50 μ L MeOH wurde bei Raumtemperatur für drei Stunden geschüttelt. Im Anschluss wurden die Carbonsäure (20 μ mol, 1000 Äquiv.; feste Säuren in 15 μ L MeOH gelöst) und das Isocyanid (20 μ mol, 1000 Äquiv.) zur Reaktionsmischung pipettiert. Der Reaktionsansatz wurde bei 50 °C für 16 h geschüttelt. Das CPG-gebundene DNA-Konjugat wurde in eine Filtersäule überführt und dreimal mit je 200 μ L DMF, MeOH, ACN sowie CH_2Cl_2 gewaschen und daraufhin *in vacuo* getrocknet. Zur Überprüfung des Reaktionserfolges wurde das CPG-gebundene DNA-Konjugat mit 500 μ L AMA bei Raumtemperatur für 30 min (hexT) oder 4 h (ATCG- und 7De-dATC-Sequenzen) inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit 20 μ L Tris-Puffer (1 M, pH = 7,5) versetzt, in einer Vakuumzentrifuge getrocknet, der Rückstand in 200 μ L ddH₂O aufgenommen und gefiltert. Mittels analytischer RP-HPLC sowie MALDI-MS wurde der Erfolg der Reaktion analysiert. Das Produkt wurde mittels präparativer RP-HPLC gereinigt.

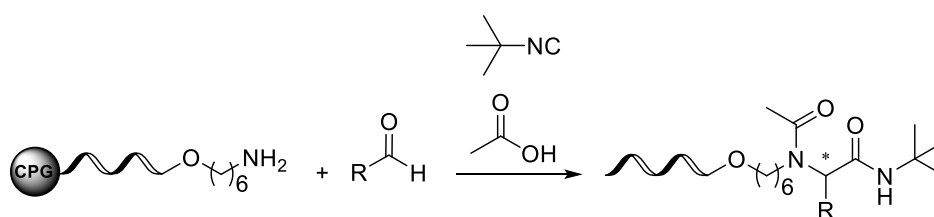
7.9.1.9 Ugi-Vierkomponentenreaktion an CPG-gebundenem DNA-Carbonsäure-Konjugat



Die Lösung aus Amin (20 μ mol, 1000 Äquiv.) und Aldehyd (20 μ mol, 1000 Äquiv.) in 50 μ L MeOH wurde bei Raumtemperatur für drei Stunden geschüttelt. Im Anschluss wurde die

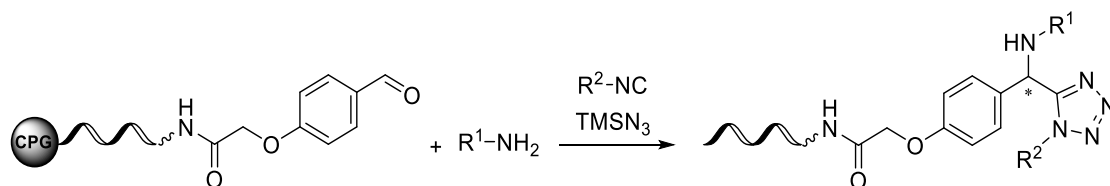
Reaktionsmischung zum CPG-gebundenen DNA-Carbonsäure-Konjugat (20 nmol, 1 Äquiv.), gefolgt vom Isocyanid (20 μ mol, 1000 Äquiv.), pipettiert. Der Reaktionsansatz wurde bei 50 °C für 16 h geschüttelt. Das CPG-gebundene DNA-Konjugat wurde in eine Filtersäule überführt und dreimal mit je 200 μ L DMF, MeOH, ACN sowie CH₂Cl₂ gewaschen und daraufhin *in vacuo* getrocknet. Zur Überprüfung des Reaktionserfolges wurde das CPG-gebundene DNA-Konjugat mit 500 μ L AMA bei Raumtemperatur für 4 h (ATCG-Sequenz) inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit 20 μ L Tris-Puffer (1 M, pH = 7,5) versetzt, in einer Vakuumzentrifuge getrocknet, der Rückstand in 200 μ L ddH₂O aufgenommen und gefiltert. Mittels analytischer RP-HPLC sowie MALDI-MS wurde der Erfolg der Reaktion analysiert. Das Produkt wurde mittels präparativer RP-HPLC gereinigt.

7.9.1.10 Ugi-Vierkomponentenreaktion an CPG-gebundener, 5'-Aminolinker-modifizierter DNA



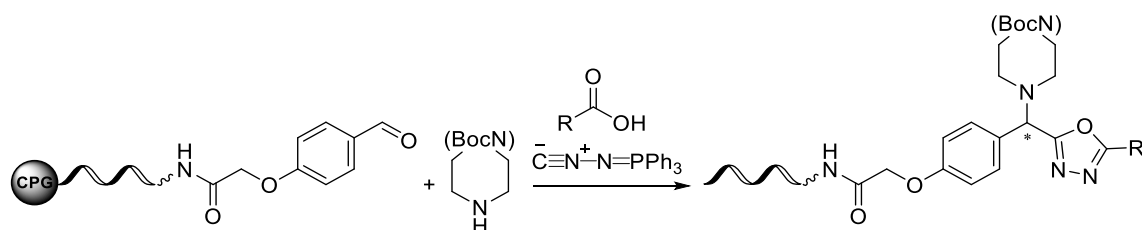
Die Suspension aus CPG-gebundener, 5'-Aminolinker-modifizierter DNA (20 nmol, 1 Äquiv.) und Aldehyd (20 μ mol, 1000 Äquiv.) in 50 μ L MeOH wurde bei Raumtemperatur für drei Stunden geschüttelt. Im Anschluss wurden die Carbonsäure (20 μ mol, 1000 Äquiv.) und das Isocyanid (20 μ mol, 1000 Äquiv.) zur Reaktionsmischung pipettiert. Der Reaktionsansatz wurde bei 50 °C für 16 h geschüttelt. Das CPG-gebundene DNA-Konjugat wurde in eine Filtersäule überführt und dreimal mit je 200 μ L DMF, MeOH, ACN sowie CH₂Cl₂ gewaschen und daraufhin *in vacuo* getrocknet. Zur Überprüfung des Reaktionserfolges wurde das CPG-gebundene DNA-Konjugat mit 500 μ L AMA bei Raumtemperatur für 4 h (ATCG-Sequenz) inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit 20 μ L Tris-Puffer (1 M, pH = 7,5) versetzt, in einer Vakuumzentrifuge getrocknet, der Rückstand in 200 μ L ddH₂O aufgenommen und gefiltert. Mittels analytischer RP-HPLC sowie MALDI-MS wurde der Erfolg der Reaktion analysiert. Das Produkt wurde mittels präparativer RP-HPLC gereinigt.

7.9.1.11 Ugi-Azid-Vierkomponentenreaktion an CPG-gebundenem DNA-Aldehyd-Konjugat



Die Suspension aus CPG-gebundenem DNA-Aldehyd-Konjugat (20 nmol, 1 Äquiv.) und Amin (20 μ mol, 1000 Äquiv.) in 50 μ L MeOH wurde bei Raumtemperatur für drei Stunden geschüttelt. Im Anschluss wurden das Isocyanid (20 μ mol, 1000 Äquiv.) und TMSN_3 (20 μ mol, 1000 Äquiv.) zur Reaktionsmischung pipettiert. Der Reaktionsansatz wurde bei 50 °C für 16 h geschüttelt. Das CPG-gebundene DNA-Konjugat wurde in eine Filtersäule überführt und dreimal mit je 200 μ L DMF, MeOH, ACN sowie CH_2Cl_2 gewaschen und daraufhin *in vacuo* getrocknet. Zur Überprüfung des Reaktionserfolges wurde das CPG-gebundene DNA-Konjugat mit 500 μ L AMA bei Raumtemperatur für 30 min (hexT) oder für 4 h (ATCG- und 7De-dATC-Sequenzen) inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit 20 μ L Tris-Puffer (1 M, pH = 7,5) versetzt, in einer Vakuumzentrifuge getrocknet, der Rückstand in 200 μ L ddH₂O aufgenommen und gefiltert. Mittels analytischer RP-HPLC sowie MALDI-MS wurde der Erfolg der Reaktion analysiert. Das Produkt wurde mittels präparativer RP-HPLC gereinigt.

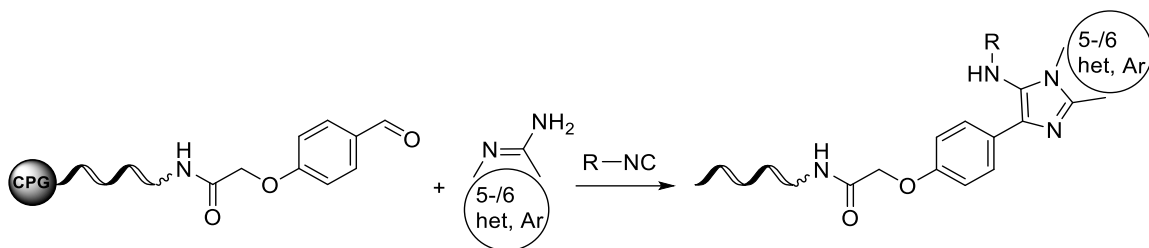
7.9.1.12 Ugi-Vierkomponenten-aza-Wittig-Reaktion an CPG-gebundenem DNA-Aldehyd-Konjugat



Die Suspension aus CPG-gebundenem DNA-Aldehyd-Konjugat (20 nmol, 1 Äquiv.) und Amin (20 μ mol, 1000 Äquiv.) in 30 μ L 1,2-Dichlorethan wurde bei Raumtemperatur für drei Stunden geschüttelt. Im Anschluss wurde die Carbonsäure (20 μ mol, 1000 Äquiv.) in 80 μ L 1,2-Dichlorethan gelöst und zu dem (Isocyanoimino)triphenylphosphoran (20 μ mol, 1000 Äquiv.) gegeben. Die resultierende Lösung wurde zur Reaktionsmischung pipettiert. Der Reaktionsansatz wurde bei 50 °C für 16 h geschüttelt. Das CPG-gebundene DNA-Konjugat wurde in eine Filtersäule überführt und dreimal mit je 200 μ L DMF, MeOH,

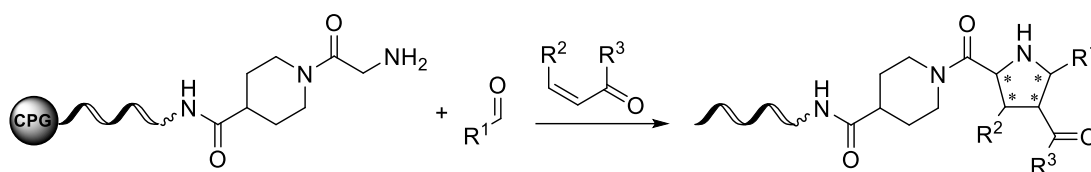
ACN sowie CH_2Cl_2 gewaschen und daraufhin *in vacuo* getrocknet. Zur Überprüfung des Reaktionserfolges wurde das CPG-gebundene DNA-Konjugat mit 500 μL AMA bei Raumtemperatur für 30 min (hexT) oder 4 h (ATCG- und 7De-dATC-Sequenzen) inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit 20 μL Tris-Puffer (1 M, $\text{pH} = 7,5$) versetzt, in einer Vakuumzentrifuge getrocknet, der Rückstand in 200 μL ddH₂O aufgenommen und gefiltert. Mittels analytischer RP-HPLC sowie MALDI-MS wurde der Erfolg der Reaktion analysiert. Das Produkt wurde mittels präparativer RP-HPLC gereinigt.

7.9.1.13 Groebke-Blackburn-Bienaymé-Dreikomponentenreaktion an CPG-gebundenem DNA-Aldehyd-Konjugat



Die Suspension aus CPG-gebundenem DNA-Aldehyd-Konjugat (20 nmol, 1 Äquiv.) und Amin (20 μmol , 1000 Äquiv.) in 50 μL MeOH wurde bei Raumtemperatur für sechs Stunden geschüttelt. Im Anschluss wurde das Isocyanid (20 μmol , 1000 Äquiv.) sowie AcOH zur Reaktionsmischung gegeben und auf ein Volumen von 80 μL mit MeOH aufgefüllt (finale Säurekonzentration: 1 %). Der Reaktionsansatz wurde bei Raumtemperatur für 16 h geschüttelt. Das CPG-gebundene DNA-Konjugat wurde in eine Filtersäule überführt und dreimal mit je 200 μL DMF, MeOH, ACN sowie CH_2Cl_2 gewaschen und daraufhin *in vacuo* getrocknet. Zur Überprüfung des Reaktionserfolges wurde das CPG-gebundene DNA-Konjugat mit 500 μL AMA bei Raumtemperatur für 30 min (hexT) oder 4 h (ATCG- und 7De-dATC-Sequenzen) inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit 20 μL Tris-Puffer (1 M, $\text{pH} = 7,5$) versetzt, in einer Vakuumzentrifuge getrocknet, der Rückstand in 200 μL ddH₂O aufgenommen und gefiltert. Mittels analytischer RP-HPLC sowie MALDI-MS wurde der Erfolg der Reaktion analysiert. Das Produkt wurde mittels präparativer RP-HPLC gereinigt.

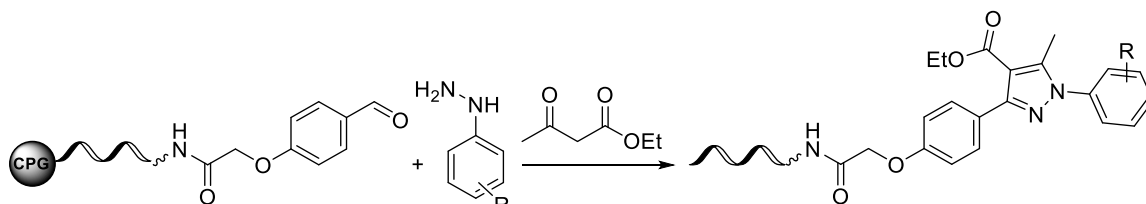
7.9.1.14 1,3-dipolare Cycloaddition an CPG-gebundenem DNA-Glycin-Konjugat



Die Suspension aus CPG-gebundenem DNA-Glycin-Konjugat (20 nmol, 1 Äquiv.) und Aldehyd (20 μmol , 1000 Äquiv.) in 50 μL ACN/TEOF (2:1) wurde bei Raumtemperatur für sechs Stunden geschüttelt. Im Anschluss wurden 30 μL einer homogenen Suspension aus AgOAc (2 μmol , 100 Äquiv.) in ACN/TEOF (2:1), Dipolarophil (80 μmol , 4000 Äquiv.) und TEA (80 μmol , 4000 Äquiv.) zum CPG-gebundenen DNA-Konjugat gegeben. Der Reaktionsansatz wurde bei 50 °C für 16 h geschüttelt. Das CPG-gebundene DNA-Konjugat wurde in eine Filtersäule überführt und dreimal mit je 200 μL 0,1 M EDTA-Lösung, DMF, MeOH, ACN sowie CH_2Cl_2 gewaschen und daraufhin *in vacuo* getrocknet. Zur Überprüfung des Reaktionserfolges wurde das CPG-gebundene DNA-Konjugat mit 500 μL AMA bei Raumtemperatur für 30 min (hexT) oder 4 h (ATCG- und 7De-dATC-Sequenzen) inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit 20 μL Tris-Puffer (1 M, pH = 7,5) versetzt, in einer Vakuumzentrifuge getrocknet, der Rückstand in 200 μL ddH₂O aufgenommen und gefiltert. Um verbliebende Silberionen zu entfernen, wurde das DNA-Konjugat zusätzlich gereinigt. Dies erfolgte entweder durch Verwendung von Chelex-Harz (*Bio-Rad*): Hierfür wurden 5 mg des Chelex-Harzes dreimal gewaschen mit 10 mM TEAA-Puffer (pH = 8,0). Die wässrige DNA-Lösung wurde zum Chelex-Harz gegeben und die Suspension wurde über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt. Der Überstand wurde entfernt, in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und der Rückstand in 45 μL ddH₂O aufgenommen. Eine weitere zusätzliche Reinigungsmethode zur Entfernung überschüssiger Silberionen basierte auf der Verwendung einer 1,3,5-Triazin-2,4,6-trithiol-trinatriumsalz (TMT)-Lösung: Die wässrige DNA-Lösung wurde mit 5 μL der TMT-Lösung versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation der Probe für 30 min und einer Drehzahl von 13.200 rpm wurde der Überstand abgenommen und mittels ethanolischer Fällung gereinigt. Die Probe wurde hierfür mit 1/10 Volumen einer wässrigen NaOAc-Lösung (3 M, pH = 5,2) sowie mit 3-4 Volumen an Ethanol (100%) versetzt und über Nacht bei -80 °C inkubiert. Nach Zentrifugation der Probe bei 4 °C für 30 min und einer Drehzahl von 13.200 rpm wurde der Überstand abgenommen. Im Anschluss erfolgte eine erneute ethanolische Fällung durch Zugabe von 100 μL 100 %igem Ethanol und Inkubation bei -80 °C für 1 h. Die DNA-Probe wurden nach der Präzipitation in 200 μL ddH₂O aufgenommen. Mit Hilfe analytischer RP-HPLC sowie MALDI-MS wurde

der Erfolg der Reaktion analysiert. Das Produkt wurde mittels präparativer RP-HPLC gereinigt.

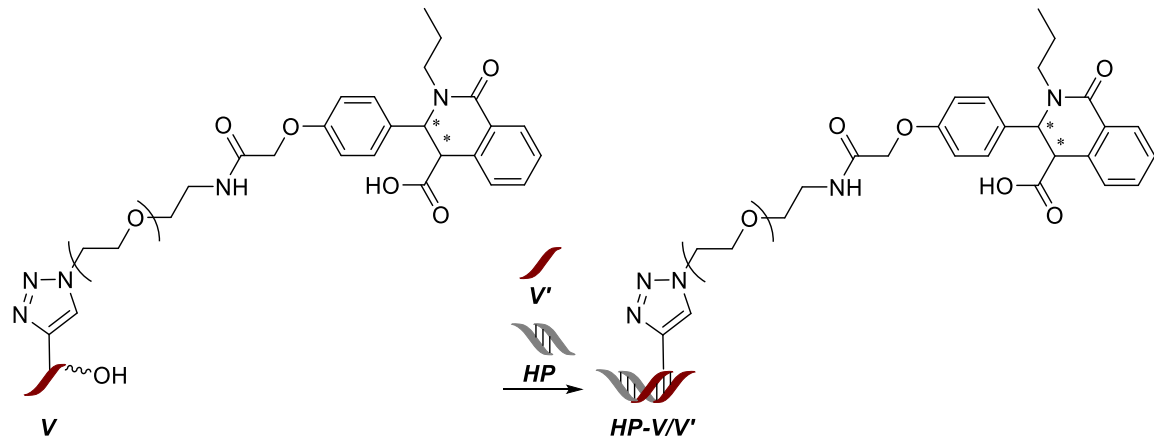
7.9.1.15 Yb(PFO)₃-katalysierte Pyrazolsynthese an CPG-gebundenem DNA-Aldehyd-Konjugat



Vor der Reaktion wurde das Hydrazin, sollte es als Hydrochloridsalz vorgelegen haben, in einer verdünnten Ammoniak-Lösung gelöst, mit CH₂Cl₂ extrahiert, anschließend über MgSO₄ getrocknet und daraufhin *in vacuo* getrocknet. Außerdem wurde im Vorfeld der Reaktion der Katalysator Yb(PFO)₃ entsprechend einer bekannten Vorschrift hergestellt.^[172]

Für die Reaktion wurde das Hydrazin (5 μmol, 250 Äquiv.) in 30 μL Toluol gelöst und zum CPG-gebundenen DNA-Aldehyd-Konjugat gegeben. Zur Bildung des Imins wurde die Reaktionsmischung bei Raumtemperatur für 30 min geschüttelt. Im Anschluss wurde Acetessigester (60 μmol, 3000 Äquiv.) und 50 μL einer homogenen Suspension aus Yb(PFO)₃ (5 μmol, 250 Äquiv.) in Toluol zur Reaktionsmischung gegeben. Der Reaktionsansatz wurde bei 50 °C für 16 h geschüttelt. Das CPG-gebundene DNA-Konjugat wurde in eine Filtersäule überführt und dreimal mit je 200 μL 0,1 M EDTA-Lösung, 0,1 M MgSO₄, ddH₂O, DMF, MeOH, ACN sowie CH₂Cl₂ gewaschen und daraufhin *in vacuo* getrocknet. Zur Überprüfung des Reaktionserfolges wurde das CPG-gebundene DNA-Konjugat mit 500 μL AMA bei Raumtemperatur für 1 h (TC-Sequenz) oder 4 h (ATCG- und 7De-dATC-Sequenzen) inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit 20 μL Tris-Puffer (1 M, pH = 7,5) versetzt, in einer Vakuumzentrifuge getrocknet, der Rückstand in 200 μL ddH₂O aufgenommen und gefiltert. Mittels analytischer RP-HPLC sowie MALDI-MS wurde der Erfolg der Reaktion analysiert. Das Produkt wurde mittels präparativer RP-HPLC gereinigt.

7.9.2 Testligation zur Etablierung einer neuen DNA-Haarnadelstruktur-basierten Kodierungsstrategie



Zur Etablierung einer Kodierungsstrategie, welche die Verwendung von kurzen, einzelsträngigen DNA-Barcodes und damit die Kodierung von CPG-gebundenen Startmaterialien erlaubt, wurde eine Testligation durchgeführt (DNA-Sequenzen sind der Tabelle 22 zu entnehmen). Hierfür wurden zunächst das DNA-gekoppelte Castagnoli-Cushman-Produkt **ATCG₁₄ 4** (**V**), welches von Dr. Marco Potowski synthetisiert wurde, und die Haarnadel-DNA **HP** 5'-phosphoryliert. Für die Hybridisierung der komplementären DNA-Einzelstränge wurden das phosphorylierte, DNA-gekoppelte Castagnoli-Cushman-Produkt **ATCG₁₄ 4** (**V**) und die phosphorylierte Haarnadel-DNA **HP** mit dem nicht-modifizierten, komplementären Gegenstrang **V'** äquimolar (100 pmol) zusammen gemischt, auf 85 °C für zehn Minuten erhitzt und anschließend langsam auf 4 °C runtergekühlt. Im Anschluss erfolgte die Ligation in 20 µL bei 25 °C über Nacht. Die Ligation wurde durch Hitzeinaktivierung der DNA-Ligase bei 75 °C für 15 Minuten gestoppt. Das Ligationsprodukt wurde über ethanolische Fällung gereinigt, in ddH₂O aufgenommen und die Konzentration über Messung der Absorption bei 260 nm mittels eines UV-Spektrometers ermittelt. Die Ligation wurde über Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

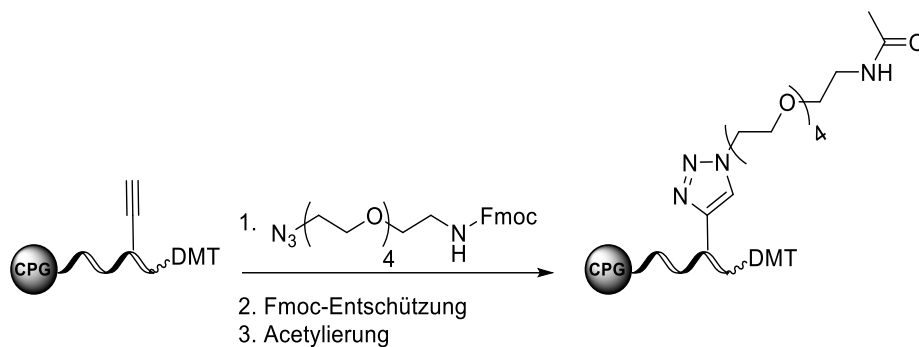
Tabelle 22: Übersicht der für die Testligation verwendeten DNA-Sequenzen.

DNA	Sequenz (5'-3')
HP	CAA ATC CGT TCA S AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG AGT C
V	CTC T*TT ACC TAC CT
V'	ATA CAG GTA GGT AAA GAG GAC T

S = C₉-spacer; T* = Ethynyl-dU wurde mit N₃-PEG(4)-NH-Fmoc **80** mittels CuAAC modifiziert, gefolgt von einer Fmoc-Entschützung, Amidkupplung mit 2-(4-Formylphenoxy)-Essigsäure **22ag** und anschließender Castagnoli-Cushman-Reaktion.

7.10 Studien zur chemischen Stabilisierung von DNA-Oligonukleotiden für die DEL-Synthese

7.10.1 Kupfer-vermittelte Alkin-Azid-Cycloaddition eines Fmoc-geschützten PEG(4)-Linkermoleküls an CPG-gebundenen 7De-dATC-DNA-Oligonukleotiden



Schritt 1. Zur CPG-gebundenen DNA (400 nmol, 1 Äquiv.), in 280 μL MeOH/ddH₂O (1:1) suspendiert, wurde N₃-PEG(4)-NH-Fmoc (33,6 μmol , 84 Äquiv.), gelöst in 100 μL DMF, gefolgt von TBTA (16,8 μmol , 42 Äquiv.), gelöst in 120 μL DMF, sowie Natriumascorbat (16,8 μmol , 42 Äquiv.) und CuSO₄·5H₂O (1,68 μmol , 4,2 Äquiv.), beides gelöst in jeweils 10 μL ddH₂O, gegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei 50 °C für 16 h geschüttelt. Im Anschluss wurde das CPG-gebundene DNA-Konjugat über eine Filtersäule auf einem Vakuumverteiler gefiltert, dreimal mit je 200 μL 0,1 M EDTA-Lösung, 0,1 M MgCl₂-Lösung, ddH₂O, DMF, MeOH, ACN und CH₂Cl₂ gewaschen und daraufhin *in vacuo* getrocknet. Zur Überprüfung des Reaktionserfolges wurde eine kleine Menge des CPG-gebundenen DNA-Konjugats (0,7-0,9 mg, ~20 nmol) mit 500 μL AMA bei Raumtemperatur für 4 h (7De-dATC-Sequenzen) inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit 20 μL Tris-Puffer (1 M, pH = 7,5) versetzt, in einer Vakuumzentrifuge getrocknet, der Rückstand in 200 μL ddH₂O aufgenommen und gefiltert. Mittels analytischer RP-HPLC sowie MALDI-MS wurde der Erfolg der Reaktion analysiert.

Schritt 2. Zur Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe des CPG-gebundenen DNA-Konjugats (400 nmol, 1 Äquiv.) wurde dieses mit 200 μL einer 20 %igen Piperidinlösung in DMF behandelt und für fünf Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Im Anschluss wurde das CPG-gebundene, Fmoc-entschützte DNA-Konjugat in eine Filtersäule überführt und dreimal mit je 200 μL DMF, MeOH, ACN sowie CH₂Cl₂ gewaschen und daraufhin *in vacuo* getrocknet.

Schritt 3. Zur Acetylierung der freien Aminofunktion wurde das CPG-gebundene DNA-Konjugat in einer Filtersäule dreimal mit 200 μL einer *capping*-Lösung (1:1-Mischung

aus THF/Methylimidazol 9:1 (v/v) und THF/Pyridin/Acetanhydrid 8:1:1 (v/v) für 30 s behandelt. Im Anschluss wurde das CPG-gebundene DNA-Konjugat dreimal mit je 200 μ L DMF, MeOH, ACN und CH_2Cl_2 gewaschen und daraufhin *in vacuo* getrocknet.

7.10.2 Testligationen zur Anwendung der DNA-Haarnadelstruktur-basierten Kodierungsstrategie unter Verwendung chemisch modifizierter DNA

Zur Untersuchung der neuen Kodierungsstrategie von DNA-kodierten Substanzbibliotheken unter Verwendung der chemisch modifizierten Base 7-Deazaadenin wurden T4-Ligationen zur Simulation einer vollständigen DEL-Kodierung durchgeführt (DNA-Sequenzen sind der Tabelle 23 zu entnehmen). Im ersten Schritt wurden die 7De-dATC-DNA-Barcodes **VI_{a-e}**, welche mit einem acetylierten PEG(4)-Linker modifiziert wurden, mit einer Haarnadel-DNA **HP**, einem aus Inosin-Nukleotiden sowie abasischen Stellen bestehenden Universaladapter **VI'** und der Duplex-DNA **VII/VII'** in einer Eintopfreaktion ligiert. Hierfür wurden zunächst die einzelsträngigen DNA-Oligonukleotide **VI_{a-e}**, **HP**, **VI'** und **VII** separat an ihren 5'-Phosphatenden enzymatisch phosphoryliert. Für die Hybridisierung der komplementären DNA-Einzelstränge wurden die phosphorylierten DNA-Sequenzen **VI_{a-e}**, **HP**, **VI'** und **VII** sowie das nicht-modifizierte Oligonukleotid **VII'** äquimolar (100 pmol) zusammen gemischt, auf 85 °C für zehn Minuten erhitzt und anschließend langsam auf 4 °C runtergekühlt. Im Anschluss erfolgte die Ligation in 40 μ L bei 25 °C über Nacht. Die Ligation wurde durch Hitzeinaktivierung der DNA-Ligase bei 75 °C für 15 Minuten gestoppt. Die Ligationsprodukte **HP-VI_{a-e}-VII/VI'-VII'** wurden über ethanolische Fällung gereinigt, in ddH₂O aufgenommen und die Konzentration über Messung der Absorption bei 260 nm mittels eines UV-Spektrometers ermittelt. Für die letzte Ligation wurden das Ligationsprodukt **HP-VI_{a-e}-VII/VI'-VII'** und das DNA-Oligonukleotid **VIII** zunächst 5'-phosphoryliert und anschließend wurden das phosphorylierte, doppelsträngige Ligationsprodukt **HP-VI_{a-e}-VII/VI'-VII'**, das phosphorylierte Oligonukleotid **VIII** sowie der komplementäre, nicht-modifizierte Gegenstrang **VIII'** vereinigt, auf 85 °C für zehn Minuten erhitzt und erneut abgekühlt auf 4 °C. Die Ligation von 100 pmol Duplex-DNA **HP-VI_{a-e}-VII/VI'-VII'** mit **VIII/VIII'** erfolgte in 40 μ L bei 25 °C über Nacht. Nach der Hitzeinaktivierung der Ligase bei 75 °C für 15 min mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese wurden die Ligationsprodukte **HP-VI_{a-e}-VII-VIII/VI'-VII'-VIII'** über das *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) gereinigt.

Tabelle 23: Übersicht der für die Testligationen verwendeten DNA-Sequenzen.

DNA	Sequenz (5'-3')
HP	CAA ATC CGT TCA SAG GTC GGT GTG AAC GGA TTT GAG TC
VI_a	CT*C TCT 7De-dATC T7De-dAT 7De-dACC T
VI_b	CT*C TTC 7De-dA7De-dAT TCC 7De-dACC T
VI_c	CT*C T7De-dAC 7De-dACT TT7De-dA 7De-dACC T
VI_d	CT*C TC7De-dA 7De-dATT 7De-dAC7De-dA 7De-dACC T
VI_e	CT*C T7De-dAC CT7De-dA CTT 7De-dACC T
VI'	ATA CAG GTi aai iaa iAG AGG ACT
VII	GTA TCA AGC AGG
VII'	TAG GCC TGC TTG
VIII	CCT ACT CTC GTA TGA CCT CAA CTA CAT GGT CTA CA
VIII'	TGT AGA CCA TGT AGT TGA GGT CAT ACG AGA G

S = C₉-spacer; T* = Ethynyl-dU wurde mit N₃-PEG(4)-NH-Fmoc **80** mittels CuAAC modifiziert, gefolgt von einer Fmoc-Entschützung und darauffolgender Acetylierung der freien Aminofunktion; i = Inosin; a = abasische Stelle.

7.10.3 PCR-Amplifikation von chemisch modifizierten Ligationsprodukten

Für die PCR der DNA-Ligationsprodukte **HP-VI_{a-e}-VII-VIII/VI'-VII'-VIII'** wurden 5 µL der geextrahierten Ligationsprodukte **HP-VI_{a-e}-VII-VIII/VI'-VII'-VIII'** als DNA-Vorlage, 5 U Taq DNA-Polymerase, 1x Taq-Puffer, 3 mM MgCl₂, 0,625 mM je dNTP sowie 1 µM der jeweiligen Primer (Tabelle 24) in einem Reaktionsansatz von 40 µL eingesetzt und nachfolgendes PCR-Programm verwendet:

T [°C]	t [s]	Schritt	
95	180	Initiale Denaturierung	
95	30	Denaturierung	} 30x
55	30	Annealing	
72	30	Elongation	
72	300	finale Elongation	
4	-	abschließende Temperatur	

Tabelle 24: Übersicht der für die PCR verwendeten Primer.

DNA	Sequenz (5'-3')
<i>forward primer</i>	TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG
<i>reverse primer</i>	GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GTG TAG ACC ATG TAG TTG AGG TCA

Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert, über das *QIAquick PCR Purification Kit* aufgereinigt und die Konzentration über Messung der Absorption bei 260 nm ermittelt.

7.10.4 Sanger-Sequenzierung von chemisch modifizierter DNA

Die mittels PCR vervielfältigten Ligationsprodukte *HP-VI_{a-e}-VII-VIII/VI'-VII'-VIII'* wurden für eine nachfolgende Sanger-Sequenzierung durch die Firma *Microsynth SeqLab* (Göttingen) vorbereitet. Es wurden hierfür 12 µL DNA-Vorlage (1,5 ng·µL⁻¹ pro 100 Basenpaare) und 3 µL Primer (20 µM, Tabelle 25) zusammengemischt.

Tabelle 25: Übersicht der für die Sanger-Sequenzierung verwendeten Primer.

DNA	Sequenz (5'-3')
<i>forward primer</i>	TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG
<i>reverse primer</i>	GGG CTC GGA GAT GTG TAT AAG AG

7.10.5 Echtzeit-PCR von chemisch modifizierten Ligationsprodukten

Für die Echtzeit-PCR wurden 5 µL einer Verdünnungsreihe des natürlichen bzw. der chemisch modifizierten, geextrahierten Ligationsprodukte *HP-VI-VII-VIII/VI'-VII'-VIII'* als DNA-Vorlage, 10 µL *SsoAdvanced universal SYBR Green supermix (Bio-Rad)* sowie 200 nM der jeweiligen Primer (Tabelle 26) in einem Reaktionsansatz von 20 µL eingesetzt und nachfolgendes PCR-Programm verwendet:

T [°C]	t [s]	Schritt
95	30	Initiale Denaturierung
95	15	Denaturierung
60	30	Annealing
72	30	Elongation

} 35x

Die Spezifität der Amplifizierung wurde im Anschluss an die PCR durch Messung der Schmelzkurve untersucht. Die Auswertung der Echtzeit-PCR mit anschließender Schmelztemperaturmessung erfolgte über die Software (Version 1.5) des *LightCycler 480*.

Tabelle 26: Übersicht der für die Echtzeit-PCR verwendeten Primer.

DNA	Sequenz (5'-3')
<i>forward primer</i>	AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG AG
<i>reverse primer</i>	GTA GAC CAT GTA GTT GAG GTC A

8 Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
AcOH	Essigsäure
AMA	1:1-Mischung aus wässriger Ammoniak-Lösung (30 %) und wässriger Methylamin-Lösung (40 %)
ATP	Adenosintriphosphat
ber.	berechnet
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
bp	Basenpaar
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
Äquiv.	Äquivalent
CPG	<i>controlled pore glass</i>
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i>
CuAAC	<i>copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition</i>
DCE	1,2-Dichlorethan
DEL	<i>DNA-encoded library</i> (DNA-kodierte Substanzbibliothek)
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT	Dimethoxytrityl
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Et ₃ N	Triethylamin
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
FG	Funktionelle Gruppe

Abkürzungsverzeichnis

Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FP	Fluoreszenzpolarisation
GBB-3CR	Groebke-Blackburn-Bienaymé-Dreikomponentenreaktion
gef.	gefunden
HATU	<i>N</i> -[(Dimethylamino)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i>]pyridin-1-ylmethyl]- <i>N</i> -methylmethanaminiumhexafluorophosphat- <i>N</i> -oxid
hexA	<i>hexaadenosine oligonucleotide adapter</i>
hexT	<i>hexathymidine oligonucleotide adapter</i>
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HRMS	<i>high resolution mass spectrometry</i> (hochauflösende Massenspektroskopie)
HTS	<i>high-throughput screening</i> (Hochdurchsatz-Screening)
IC ₅₀	<i>half maximal inhibitory concentration</i> (halbmaximale Inhibierungskonzentration)
LC-MS	<i>liquid chromatography - mass spectrometry</i>
LM	Lösungsmittel
<i>m</i>	<i>meta</i>
MCR	<i>multicomponent reaction</i> (Multikomponentenreaktion)
MeOH	Methanol
n.d.	nicht detektiert
NGS	<i>next generation sequencing</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance spectroscopy</i> (Kernspinresonanzspektroskopie)
<i>o</i>	<i>ortho</i>
<i>p</i>	<i>para</i>

Abkürzungsverzeichnis

PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PEG	Polyethylenglykol
PNK	Polynukleotidkinase
PPI	Protein-Protein-Interaktion
<i>p</i> TsOH	<i>para</i> -Toluolsulfonsäure
RNA	Ribonukleinsäure
RP	<i>reverse phase</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SG	Schutzgruppe
SM	Startmaterial
TBAI	Tetrabutylammoniumiodid
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBTA	Tris[(1-benzyl-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin)
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butylester
TCA	Trichloressigsäure
TEA	Triethylamin
TEAA	Triethylammoniumacetat
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	2,2,2-Trifluorethanol
THF	Tetrahydrofuran
TiDEC	<i>thymidine-initiated DNA-encoded chemistry</i>
tiDEL	<i>oligothymidine-initiated DNA-encoded library</i>
U-4CR	Ugi-Vierkomponentenreaktion
U-4CR/aza-Wittig	Ugi-Vierkomponenten-aza-Wittig-Reaktion

Abkürzungsverzeichnis

UA-4CR	Ugi-Azid-Vierkomponentenreaktion
UV	ultraviolett

9 Literaturverzeichnis

- [1] R. Macarron, M. N. Banks, D. Bojanic, D. J. Burns, D. A. Cirovic, T. Garyantes, D. V. S. Green, R. P. Hertzberg, W. P. Janzen, J. W. Paslay, U. Schopfer, G. S. Sittampalam, *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2011**, *10*, 188.
- [2] G. P. Smith, *Science* **1985**, *228*, 1315.
- [3] G. P. Smith, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2019**, *58*, 14428.
- [4] Andrew D. Ellington, Jack W. Szostak, *Nature* **1990**, *346*, 818.
- [5] A. R. M. Bradbury, S. Sidhu, S. Dübel, J. McCafferty, *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29*, 245.
- [6] M. Famulok, G. Mayer, *Chem. Biol.* **2014**, *21*, 1055.
- [7] M. R. Gotrik, T. A. Feagin, A. T. Csordas, M. A. Nakamoto, H. T. Soh, *Acc. Chem. Res.* **2016**, *49*, 1903.
- [8] S. Brenner, R. A. Lerner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 5381.
- [9] J. Nielsen, S. Brenner, K. D. Janda, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9812.
- [10] M. C. Needels, D. G. Jones, E. H. Tate, G. L. Heinkel, L. M. Kochersperger, W. J. Dower, R. W. Barrett, M. A. Gallop, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 10700.
- [11] S. Melkko, J. Scheuermann, C. E. Dumelin, D. Neri, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 568.
- [12] Z. J. Gartner, B. N. Tse, R. Grubina, J. B. Doyon, T. M. Snyder, D. R. Liu, *Science* **2004**, *305*, 1601.
- [13] D. R. Halpin, P. B. Harbury, *PLoS Biol.* **2004**, *2*, 1022.
- [14] N. Favalli, G. Bassi, J. Scheuermann, D. Neri, *FEBS Lett.* **2018**, *592*, 2168.
- [15] D. T. Flood, C. Kingston, J. C. Vantourout, P. E. Dawson, P. S. Baran, *Isr. J. Chem.* **2020**, *60*, 268.
- [16] D. L. Usanov, A. I. Chan, J. P. Maianti, D. R. Liu, *Nat. Chem.* **2018**, *10*, 704.
- [17] M. H. Hansen, P. Blakskjaer, L. K. Petersen, T. H. Hansen, J. W. Højfeldt, K. V. Gothelf, N. J. V. Hansen, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1322.
- [18] P. Blakskjaer, T. Heitner, N. J. V. Hansen, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2015**, *26*, 62.
- [19] D. R. Halpin, P. B. Harbury, *PLoS Biol.* **2004**, *2*, E173.
- [20] P. T. Corbett, J. Leclaire, L. Vial, K. R. West, J.-L. Wietor, J. K. M. Sanders, S. Otto, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3652.
- [21] G. Li, W. Zheng, Z. Chen, Y. Zhou, Y. Liu, J. Yang, Y. Huang, X. Li, *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 7097.
- [22] F. V. Reddavid, W. Lin, S. Lehnert, Y. Zhang, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2015**, *54*, 7924.

- [23] A. B. MacConnell, P. J. McEnaney, V. J. Cavett, B. M. Paegel, *ACS Comb. Sci.* **2015**, *17*, 518.
- [24] D. Neri, R. A. Lerner, *Annu. Rev. Biochem.* **2018**, *87*, 479.
- [25] A. I. Chan, L. M. McGregor, D. R. Liu, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2015**, *26*, 55.
- [26] W. Decurtins, M. Wichert, R. M. Franzini, F. Buller, M. A. Stravs, Y. Zhang, D. Neri, J. Scheuermann, *Nat. Protoc.* **2016**, *11*, 764.
- [27] L. M. McGregor, D. J. Gorin, C. E. Dumelin, D. R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 15522.
- [28] L. M. McGregor, T. Jain, D. R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 3264.
- [29] G. Li, Y. Liu, Y. Liu, L. Chen, S. Wu, Y. Liu, X. Li, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2013**, *52*, 9544.
- [30] P. Zhao, Z. Chen, Y. Li, D. Sun, Y. Gao, Y. Huang, X. Li, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, *53*, 10056.
- [31] B. Cai, D. Kim, S. Akhand, Y. Sun, R. J. Cassell, A. Alpsoy, E. C. Dykhuizen, R. M. van Rijn, M. K. Wendt, C. J. Krusemark, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 17057.
- [32] P. A. Harris, B. W. King, D. Bandyopadhyay, S. B. Berger, N. Campobasso, C. A. Capriotti, J. A. Cox, L. Dare, X. Dong, J. N. Finger, L. C. Grady, S. J. Hoffman, J. U. Jeong, J. Kang, V. Kasparcova, A. S. Lakdawala, R. Lehr, D. E. McNulty, R. Nagilla, M. T. Ouellette, C. S. Pao, A. R. Rendina, M. C. Schaeffer, J. D. Summerfield, B. A. Swift, R. D. Totoritis, P. Ward, A. Zhang, D. Zhang, R. W. Marquis, J. Bertin, P. J. Gough, *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 2163.
- [33] P. A. Harris, S. B. Berger, J. U. Jeong, R. Nagilla, D. Bandyopadhyay, N. Campobasso, C. A. Capriotti, J. A. Cox, L. Dare, X. Dong, P. M. Eidam, J. N. Finger, S. J. Hoffman, J. Kang, V. Kasparcova, B. W. King, R. Lehr, Y. Lan, L. K. Leister, J. D. Lich, T. T. MacDonald, N. A. Miller, M. T. Ouellette, C. S. Pao, A. Rahman, M. A. Reilly, A. R. Rendina, E. J. Rivera, M. C. Schaeffer, C. A. Sehon, R. R. Singhaus, H. H. Sun, B. A. Swift, R. D. Totoritis, A. Vossenkämper, P. Ward, D. D. Wisnoski, D. Zhang, R. W. Marquis, P. J. Gough, J. Bertin, *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 1247.
- [34] S. L. Belyanskaya, Y. Ding, J. F. Callahan, A. L. Lazaar, D. I. Israel, *ChemBioChem* **2017**, *18*, 837.
- [35] S. Ahn, A. W. Kahsai, B. Pani, Q.-T. Wang, S. Zhao, A. L. Wall, R. T. Strachan, D. P. Staus, L. M. Wingler, L. D. Sun, J. Sinnaeve, M. Choi, T. Cho, T. T. Xu, G. M. Hansen, M. B. Burnett, J. E. Lamerdin, D. L. Bassoni, B. J. Gavino, G. Husemoen, E. K. Olsen, T. Franch, S. Costanzi, X. Chen, R. J. Lefkowitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, 1708.

- [36] S. Melkko, L. Mannocci, C. E. Dumelin, A. Villa, R. Somnavilla, Y. Zhang, M. G. Grütter, N. Keller, L. Jeremutis, R. H. Jackson, J. Scheuermann, D. Neri, *ChemMedChem* **2010**, *5*, 584.
- [37] S. Wang, D. Yang, M. E. Lippman, *Semin. Cancer Biol.* **2003**, *30*, 133.
- [38] L. Mannocci, Y. Zhang, J. Scheuermann, M. Leimbacher, G. de Bellis, E. Rizzi, C. Dumelin, S. Melkko, D. Neri, *PNAS* **2008**, *105*, 17670.
- [39] M. A. Clark, R. A. Acharya, C. C. Arico-Muendel, S. L. Belyanskaya, D. R. Benjamin, N. R. Carlson, P. A. Centrella, C. H. Chiu, S. P. Creaser, J. W. Cuzzo, C. P. Davie, Y. Ding, G. J. Franklin, K. D. Franzen, M. L. Gefter, S. P. Hale, N. J. V. Hansen, D. I. Israel, J. Jiang, M. J. Kavarana, M. S. Kelley, C. S. Kollmann, F. Li, K. Lind, S. Mataruse, P. F. Medeiros, J. A. Messer, P. Myers, H. O'Keefe, M. C. Oliff, C. E. Rise, A. L. Satz, S. R. Skinner, J. L. Svendsen, L. Tang, K. van Vloten, R. W. Wagner, G. Yao, B. Zhao, B. A. Morgan, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 647.
- [40] A. L. Satz, J. Cai, Y. Chen, R. Goodnow, F. Gruber, A. Kowalczyk, A. Petersen, G. Naderi-Oboodi, L. Orzechowski, Q. Strelbel, *Bioconjug. Chem.* **2015**, *26*, 1623.
- [41] A. A. Shelat, R. K. Guy, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 442.
- [42] R. D. Taylor, M. MacCoss, A. D. G. Lawson, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 5845.
- [43] P. Schneider, G. Schneider, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2017**, *56*, 7971.
- [44] M. L. Malone, B. M. Paegel, *ACS Comb. Sci.* **2016**, *18*, 182.
- [45] R. M. Franzini, C. Randolph, *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 6629.
- [46] M. Potowski, F. Losch, E. Wünnemann, J. K. Dahmen, S. Chines, A. Brunschweiler, *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 10481.
- [47] M. Klika Škopić, H. Salamon, O. Bugain, K. Jung, A. Gohla, L. J. Doetsch, D. Dos Santos, A. Bhat, B. Wagner, A. Brunschweiler, *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 3356.
- [48] K. Götte, S. Chines, A. Brunschweiler, *Tetrahedron Lett.* **2020**, *61*, 151889.
- [49] A. D. Cunningham, N. Qvit, D. Mochly-Rosen, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2017**, *44*, 59.
- [50] D. P. Ryan, J. M. Matthews, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2005**, *15*, 441.
- [51] L. Jin, W. Wang, G. Fang, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2014**, *54*, 435.
- [52] S. Jones, J. M. Thornton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 13.
- [53] L. Lo Conte, C. Chothia, J. Janin, *J. Mol. Biol.* **1999**, *285*, 2177.
- [54] A. C. Cheng, R. G. Coleman, K. T. Smyth, Q. Cao, P. Soulard, D. R. Caffrey, A. C. Salzberg, E. S. Huang, *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 71.
- [55] R. D. Smith, L. Hu, J. A. Falkner, M. L. Benson, J. P. Nerothin, H. A. Carlson, *J. Mol. Graph. Model.* **2006**, *24*, 414.

- [56] H. Jubb, A. P. Higuieruelo, A. Winter, T. L. Blundell, *Trends Pharmacol. Sci.* **2012**, 33, 241.
- [57] G. Fischer, M. Rossmann, M. Hyvönen, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2015**, 35, 78.
- [58] A. J. Levine, *Cell* **1997**, 88, 323.
- [59] A. Dömling (Ed.) *Protein-Protein Interactions in Drug Discovery. p53/MDM2 Antagonists: Towards Nongenotoxic Anticancer Treatments*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2013**.
- [60] Y. Barak, T. Juven, R. Haffner, M. Oren, *EMBO J.* **1993**, 12, 461.
- [61] J. D. Oliner, J. A. Pietenpol, S. Thiagalingam, J. Gyuris, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, *Nature* **1993**, 362, 857.
- [62] R. Honda, H. Tanaka, H. Yasuda, *FEBS Lett.* **1997**, 420, 25.
- [63] P. Hainaut, M. Hollstein, *Adv. Cancer Res.* **1999**, 77, 81.
- [64] A. Feki, I. Irminger-Finger, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2004**, 52, 103.
- [65] M. Wade, Y. V. Wang, G. M. Wahl, *Trends Cell Biol.* **2010**, 20, 299.
- [66] W. Wang, H. Cao, S. Wolf, M. S. Camacho-Horvitz, T. A. Holak, A. Dömling, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, 21, 3982.
- [67] D. C. Fry, *Biopolymers* **2006**, 84, 535.
- [68] S. Shangary, S. Wang, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2009**, 49, 223.
- [69] L. T. Vassilev, B. T. Vu, B. Graves, D. Carvajal, F. Podlaski, Z. Filipovic, N. Kong, U. Kammlott, C. Lukacs, C. Klein, N. Fotouhi, E. A. Liu, *Science* **2004**, 303, 844.
- [70] A. Dömling, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, 12, 281.
- [71] Y. Zhao, A. Aguilar, D. Bernard, S. Wang, *J. Med. Chem.* **2015**, 58, 1038.
- [72] B. Vu, P. Wovkulich, G. Pizzolato, A. Lovey, Q. Ding, N. Jiang, J.-J. Liu, C. Zhao, K. Glenn, Y. Wen, C. Tovar, K. Packman, L. Vassilev, B. Graves, *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, 4, 466.
- [73] M. Andreeff, K. R. Kelly, K. Yee, S. Assouline, R. Strair, L. Popplewell, D. Bowen, G. Martinelli, M. W. Drummond, P. Vyas, M. Kirschbaum, S. P. Iyer, V. Ruvolo, G. M. N. González, X. Huang, G. Chen, B. Graves, S. Blotner, P. Bridge, L. Jukofsky, S. Middleton, M. Reckner, R. Rueger, J. Zhi, G. Nichols, K. Kojima, *Clin. Cancer Res.* **2016**, 22, 868.
- [74] Q. Ding, Z. Zhang, J.-J. Liu, N. Jiang, J. Zhang, T. M. Ross, X.-J. Chu, D. Bartkovitz, F. Podlaski, C. Janson, C. Tovar, Z. M. Filipovic, B. Higgins, K. Glenn, K. Packman, L. T. Vassilev, B. Graves, *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 5979.
- [75] L. L. Siu, A. Italiano, W. H. Miller, J.-Y. Blay, J. A. Gietema, Y.-J. Bang, L. R. Mileskin, H. W. Hirte, M. Reckner, B. Higgins, L. Jukofsky, S. Blotner, J. Zhi, S. Middleton, G. L. Nichols, L. C. Chen, *J. Clin. Oncol.* **2014**, 32, 2535.

- [76] S. Wang, W. Sun, Y. Zhao, D. McEachern, I. Meaux, C. Barrière, J. A. Stuckey, J. L. Meagher, L. Bai, L. Liu, C. G. Hoffman-Luca, J. Lu, S. Shangary, S. Yu, D. Bernard, A. Aguilar, O. Dos-Santos, L. Besret, S. Guerif, P. Pannier, D. Gorge-Bernat, L. Debussche, *Cancer Res.* **2014**, *74*, 5855.
- [77] V. A. de Weger, M. de Jonge, M. H. G. Langenberg, J. H. M. Schellens, M. Lolkema, A. Varga, B. Demers, K. Thomas, K. Hsu, G. Tuffal, S. Goodstal, S. Macé, E. Deutsch, *Br. J. Cancer* **2019**, *120*, 286.
- [78] D. Sun, Z. Li, Y. Rew, M. Gribble, M. D. Bartberger, H. P. Beck, J. Canon, A. Chen, X. Chen, D. Chow, J. Deignan, J. Duquette, J. Eksterowicz, B. Fisher, B. M. Fox, J. Fu, A. Z. Gonzalez, F. Gonzalez-Lopez De Turiso, J. B. Houze, X. Huang, M. Jiang, L. Jin, F. Kayser, J. J. Liu, M.-C. Lo, A. M. Long, B. Lucas, L. R. McGee, J. McIntosh, J. Mihalic, J. D. Oliner, T. Osgood, M. L. Peterson, P. Roveto, A. Y. Saiki, P. Shaffer, M. Toteva, Y. Wang, Y. C. Wang, S. Wortman, P. Yakowec, X. Yan, Q. Ye, D. Yu, M. Yu, X. Zhao, J. Zhou, J. Zhu, S. H. Olson, J. C. Medina, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 1454.
- [79] W. Larry Gluck, M. M. Gounder, R. Frank, F. Eskens, J. Y. Blay, P. A. Cassier, J.-C. Soria, S. Chawla, V. de Weger, A. J. Wagner, D. Siegel, F. de Vos, E. Rasmussen, H. A. Henary, *Invest. New Drugs* **2020**, *38*, 831.
- [80] D. Koes, K. Khoury, Y. Huang, W. Wang, M. Bista, G. M. Popowicz, S. Wolf, T. A. Holak, A. Dömling, C. J. Camacho, *PLoS ONE* **2012**, *7*, e32839.
- [81] A. Czarna, B. Beck, S. Srivastava, G. M. Popowicz, S. Wolf, Y. Huang, M. Bista, T. A. Holak, A. Dömling, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 5352.
- [82] Y. Huang, S. Wolf, D. Koes, G. M. Popowicz, C. J. Camacho, T. A. Holak, A. Dömling, *ChemMedChem* **2012**, *7*, 49.
- [83] Y. Huang, S. Wolf, B. Beck, L.-M. Köhler, K. Khoury, G. M. Popowicz, S. K. Goda, M. Subklewe, A. Twarda, T. A. Holak, A. Dömling, *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 802.
- [84] M. Bista, S. Wolf, K. Khoury, K. Kowalska, Y. Huang, E. Wrona, M. Arciniega, G. M. Popowicz, T. A. Holak, A. Dömling, *Structure* **2013**, *21*, 2143.
- [85] F.-X. Yu, B. Zhao, K.-L. Guan, *Cell* **2015**, *163*, 811.
- [86] B. Zhao, X. Wei, W. Li, R. S. Udan, Q. Yang, J. Kim, J. Xie, T. Ikenoue, J. Yu, L. Li, P. Zheng, K. Ye, A. Chinnaiyan, G. Halder, Z.-C. Lai, K.-L. Guan, *Genes Dev.* **2007**, *21*, 2747.
- [87] Y. Zhao, L. Liu, W. Sun, J. Lu, D. McEachern, X. Li, S. Yu, D. Bernard, P. Ochsenbein, V. Ferey, J.-C. Carry, J. R. Deschamps, D. Sun, S. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 7223.
- [88] G. M. Elisi, M. Santucci, D. D'Arca, A. Lauriola, G. Marverti, L. Losi, L. Scalvini, M. L. Bolognesi, M. Mor, M. P. Costi, *Cancers* **2018**, *10*, 1.

- [89] F. Zanconato, M. Cordenonsi, S. Piccolo, *Cancer Cell* **2016**, *29*, 783.
- [90] D. Pan, *Dev. Cell* **2010**, *19*, 491.
- [91] A. A. Steinhardt, M. F. Gayyed, A. P. Klein, J. Dong, A. Maitra, D. Pan, E. A. Montgomery, R. A. Anders, *Hum. Pathol.* **2008**, *39*, 1582.
- [92] F. Gibault, M. Sturbaut, F. Bailly, P. Melnyk, P. Cotelle, *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 5057.
- [93] C. L. Noland, S. Gierke, P. D. Schnier, J. Murray, W. N. Sandoval, M. Sagolla, A. Dey, R. N. Hannoush, W. J. Fairbrother, C. N. Cunningham, *Structure* **2016**, *24*, 179.
- [94] P. Chan, X. Han, B. Zheng, M. DeRan, J. Yu, G. K. Jarugumilli, H. Deng, D. Pan, X. Luo, X. Wu, *Nat. Chem. Biol.* **2016**, *12*, 282.
- [95] Z. Li, B. Zhao, P. Wang, F. Chen, Z. Dong, H. Yang, K.-L. Guan, Y. Xu, *Genes Dev.* **2010**, *24*, 235.
- [96] A. V. Pobbati, X. Han, A. W. Hung, S. Weiguang, N. Huda, G.-Y. Chen, C. Kang, C. S. B. Chia, X. Luo, W. Hong, A. Poulsen, *Structure* **2015**, *23*, 2076.
- [97] K. Bum-Erdene, D. Zhou, G. Gonzalez-Gutierrez, M. K. Ghosayel, Y. Si, D. Xu, H. E. Shannon, B. J. Bailey, T. W. Corson, K. E. Pollok, C. D. Wells, S. O. Meroueh, *Cell Chem. Biol.* **2019**, *26*, 378.
- [98] Y. Liu-Chittenden, B. Huang, J. S. Shim, Q. Chen, S.-J. Lee, R. A. Anders, J. O. Liu, D. Pan, *Genes Dev.* **2012**, *26*, 1300.
- [99] F. Gibault, M. Coevoet, M. Sturbaut, A. Farce, N. Renault, F. Allemand, J.-F. Guichou, A.-S. Drucbert, C. Foulon, R. Magnez, X. Thuru, M. Corvaisier, G. Huet, P. Chavatte, P. Melnyk, F. Bailly, P. Cotelle, *Cancers* **2018**, *10*, 1.
- [100] S. A. Smith, R. B. Sessions, D. K. Shoemark, C. Williams, R. Ebrahimighaei, M. C. McNeill, M. P. Crump, T. R. McKay, G. Harris, A. C. Newby, M. Bond, *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 1291.
- [101] Y. Li, S. Liu, E. Y. Ng, R. Li, A. Poulsen, J. Hill, A. V. Pobbati, A. W. Hung, W. Hong, T. H. Keller, C. Kang, *Biochem. J.* **2018**, *475*, 2043.
- [102] S. Michels, U. Schmidt-Erfurth, *Semin. Ophthalmol.* **2001**, *16*, 201.
- [103] Z. Zhang, Z. Lin, Z. Zhou, H. C. Shen, S. F. Yan, A. V. Mayweg, Z. Xu, N. Qin, J. C. Wong, Z. Zhang, Y. Rong, D. C. Fry, T. Hu, *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, *5*, 993.
- [104] P. Furet, B. Salem, Y. Mesrouze, T. Schmelzle, I. Lewis, J. Kallen, P. Chène, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2019**, *29*, 2316.
- [105] D. J. Craik, D. P. Fairlie, S. Liras, D. Price, *Chem. Biol. Drug Des.* **2013**, *81*, 136.
- [106] A. Dömling, W. Wang, K. Wang, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 3083.
- [107] S. Brauch, S. S. van Berkel, B. Westermann, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4948.

- [108] R. C. Cioc, E. Ruijter, R. V. A. Orru, *Green Chem.* **2014**, *16*, 2958.
- [109] E. Ruijter, R. Scheffelaar, R. V. A. Orru, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2011**, *50*, 6234.
- [110] A. Váradi, T. C. Palmer, R. Notis Dardashti, S. Majumdar, *Molecules* **2015**, *21*, E19.
- [111] A. Strecker, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1850**, *75*, 27.
- [112] A. Dömling, I. Ugi, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2000**, *39*, 3168.
- [113] M. Passerini, *Gazz. Chim. Ital.* **1921**, *51*, 181.
- [114] I. Ugi, R. Meyr, U. Fetzer, C. Steinbrückner, *Angew. Chem.* **1959**, *71*, 386.
- [115] I. Ugi, C. Steinbrückner, *Angew. Chem.* **1960**, *72*, 267.
- [116] I. Ugi, K. Offermann, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1963**, *2*, 624.
- [117] I. Ugi, C. Steinbrückner, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1961**, *94*, 734.
- [118] I. Ugi, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1962**, *1*, 8.
- [119] G. Zinner, D. Moderhack, W. Kliegel, *Chem. Ber.* **1969**, *102*, 2536.
- [120] A. Maleki, A. Sarvary, *RSC Adv.* **2015**, *5*, 60938.
- [121] C. G. Neochoritis, T. Zhao, A. Dömling, *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 1970.
- [122] S. Aalla, G. Gilla, Y. Bojja, R. R. Anumula, P. R. Vummenthala, P. R. Padi, *Org. Process Res. Dev.* **2012**, *16*, 682.
- [123] T. Yamada, A. Kuno, K. Masuda, K. Ogawa, M. Sogawa, S. Nakamura, T. Ando, H. Sano, T. Nakazawa, H. Ohara, T. Nomura, T. Joh, M. Itoh, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, *307*, 17.
- [124] G. García, M. Rodríguez-Puyol, R. Alajarín, I. Serrano, P. Sánchez-Alonso, M. Griera, J. J. Vaquero, D. Rodríguez-Puyol, J. Alvarez-Builla, M. L. Díez-Marqués, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 7220.
- [125] A. Ramazani, A. Rezaei, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 2852.
- [126] Nagaraj, K. C. Chaluvvaraju, M. S. Niranjana, S. Kiran, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **2011**, *3*, 9.
- [127] K. Groebke, L. Weber, F. Mehlin, *Synlett* **1998**, *1998*, 661.
- [128] C. Blackburn, B. Guan, P. Fleming, K. Shiosaki, S. Tsai, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 3635.
- [129] H. Bienaymé, K. Bouzid, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1998**, *37*, 2234.
- [130] A. Berson, V. Descatoire, A. Sutton, D. Fau, B. Maulny, N. Vadrot, G. Feldmann, B. Berthon, T. Tordjmann, D. Pessayre, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, *299*, 793.
- [131] T. Swainston Harrison, G. M. Keating, *CNS Drugs* **2005**, *19*, 65.
- [132] K. Mizushige, T. Ueda, K. Yukiiri, H. Suzuki, *Cardiovasc. Drug Rev.* **2002**, *20*, 163.
- [133] M. Faisal, A. Saeed, S. Hussain, P. Dar, F. A. Larik, *J. Chem. Sci.* **2019**, *131*.

- [134] N. Gökhan-Kelekçi, S. Yabanoğlu, E. Küpeli, U. Salgin, O. Ozgen, G. Uçar, E. Yeşilada, E. Kendi, A. Yeşilada, A. A. Bilgin, *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 5775.
- [135] A. Balbi, M. Anzaldi, C. Macciò, C. Aiello, M. Mazzei, R. Gangemi, P. Castagnola, M. Miele, C. Rosano, M. Viale, *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 5293.
- [136] C. B. Vicentini, C. Romagnoli, E. Andreotti, D. Mares, *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 10331.
- [137] D. Kaushik, S. A. Khan, G. Chawla, S. Kumar, *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 3943.
- [138] H. v. Pechmann, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1898**, *31*, 2950.
- [139] L. Knorr, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1883**, *16*, 2597.
- [140] L. Shen, S. Cao, N. Liu, J. Wu, L. Zhu, X. Qian, *Synlett* **2008**, *9*, 1341.
- [141] R. Huisgen, *Angew. Chem.* **1963**, *75*, 604.
- [142] K. V. Gothelf, K. A. Jørgensen, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 863.
- [143] I. Coldham, R. Hufton, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2765.
- [144] J. Adrio, J. C. Carretero, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 6784.
- [145] D. O'Hagan, *Nat. Prod. Rep.* **1997**, *14*, 637.
- [146] A. A. Watson, G. W. J. Fleet, N. Asano, R. J. Molyneux, R. J. Nash, *Phytochemistry* **2001**, *56*, 265.
- [147] M. J. C. Scanio, X. B. Searle, B. Liu, J. R. Koenig, R. Altenbach, G. A. Gfesser, A. Bogdan, S. Greszler, G. Zhao, A. Singh, Y. Fan, A. M. Swensen, T. Vortherms, A. Manelli, C. Balut, Y. Jia, W. Gao, H. Yong, M. Schrimpf, C. Tse, P. Kym, X. Wang, *ACS Med. Chem. Lett.* **2019**, *10*, 1543.
- [148] K. Ding, Y. Lu, Z. Nikolovska-Coleska, S. Qiu, Y. Ding, W. Gao, J. Stuckey, K. Krajewski, P. P. Roller, Y. Tomita, D. A. Parrish, J. R. Deschamps, S. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10130.
- [149] A. Gollner, D. Rudolph, H. Arnhof, M. Bauer, S. M. Blake, G. Boehmelt, X.-L. Cockroft, G. Dahmann, P. Etmayer, T. Gerstberger, J. Karolyi-Oezguer, D. Kessler, C. Kofink, J. Ramharter, J. Rinnenthal, A. Savchenko, R. Schnitzer, H. Weinstabl, U. Weyer-Czernilofsky, T. Wunberg, D. B. McConnell, *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 10147.
- [150] A. Gollner, H. Weinstabl, J. E. Fuchs, D. Rudolph, G. Garavel, K. S. Hofbauer, J. Karolyi-Oezguer, G. Gmaschitz, W. Hela, N. Kerres, E. Grondal, P. Werni, J. Ramharter, J. Broeker, D. B. McConnell, *ChemMedChem* **2019**, *14*, 88.
- [151] C. Nájera, J. M. Sansano, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, *44*, 6272.
- [152] D. Dos Santos Smith, *Masterarbeit* **2018**.
- [153] V. B. K. Kunig, M. Potowski, M. Akbarzadeh, M. Klika Škopić, D. Dos Santos Smith, L. Arendt, I. Dormuth, H. Adihou, B. Andlovic, H. Karatas, S. Shaabani, T.

- Zarganes-Tzitzikas, C. G. Neochoritis, R. Zhang, M. Groves, S. M. Guéret, C. Ottmann, J. Rahnenführer, R. Fried, A. Dömling, A. Brunschweiler, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2020**, *59*, 20338.
- [154] H. Karatas, M. Akbarzadeh, H. Adihou, G. Hahne, A. V. Pobbati, E. Yihui Ng, S. M. Guéret, S. Sievers, A. Pahl, M. Metz, S. Zinken, L. Dötsch, C. Nowak, S. Thavam, A. Friese, C. Kang, W. Hong, H. Waldmann, *Genet. Mol. Biol.* **2020**, *63*, 11972.
- [155] M. Potowski, V. B. K. Kunig, F. Losch, A. Brunschweiler, *Medchemcomm* **2019**, *10*, 1082.
- [156] V. B. K. Kunig, C. Ehrt, A. Dömling, A. Brunschweiler, *Org. Lett.* **2019**, *21*, 7238.
- [157] R. F. Kimball, *Mutat. Res.* **1977**, *39*, 111.
- [158] M. Potowski, R. Esken, A. Brunschweiler, *Bioorg. Med. Chem.* **2020**, *28*, 115441.
- [159] D. T. Flood, S. Asai, X. Zhang, J. Wang, L. Yoon, Z. C. Adams, B. C. Dillingham, B. B. Sanchez, J. C. Vantourout, M. E. Flanagan, D. W. Piotrowski, P. Richardson, S. A. Green, R. A. Shenvi, J. S. Chen, P. S. Baran, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 9998.
- [160] Y. Ruff, R. Martinez, X. Pellé, P. Nimsgern, P. Fille, M. Ratnikov, F. Berst, *ACS Comb. Sci.* **2020**, *22*, 120.
- [161] C.-V. T. Vo, M. U. Luescher, J. W. Bode, *Nat. Chem.* **2014**, *6*, 310.
- [162] S. Wu, X. Lei, E. Fan, Z. Sun, *Org. Lett.* **2018**, *20*, 522.
- [163] S. Wu, J. Huang, S. Gazzarrini, S. He, L. Chen, J. Li, L. Xing, C. Li, L. Chen, C. G. Neochoritis, G. P. Liao, H. Zhou, A. Dömling, A. Moroni, W. Wang, *ChemMedChem* **2015**, *10*, 1837.
- [164] H. Cao, H. Liu, A. Dömling, *Chemistry* **2010**, *16*, 12296.
- [165] S. Shaabani, R. Xu, M. Ahmadianmoghaddam, L. Gao, M. Stahorsky, J. Olechno, R. Ellson, M. Kossenjans, V. Helan, A. Dömling, *Green Chem.* **2019**, *21*, 225.
- [166] C. G. Neochoritis, T. Zarganes-Tzitzikas, S. Stotani, A. Dömling, E. Herdtweck, K. Khoury, A. Dömling, *ACS Comb. Sci.* **2015**, *17*, 493.
- [167] A. Guirado, A. Zapata, J. L. Gómez, L. Trabalón, J. Gálvez, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 9631.
- [168] D. W. Carney, J. V. Truong, J. K. Sello, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 10279.
- [169] L. W. Herman, V. Sharma, J. F. Kronauge, E. Barbarics, L. A. Herman, D. Piwnica-Worms, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 2955.
- [170] K. Škoch, I. Císařová, P. Štěpnička, *Chemistry* **2018**, *24*, 13788.
- [171] Y. Kitano, T. Manoda, T. Miura, K. Chiba, M. Tada, *Synthesis* **2006**, *3*, 405.
- [172] L. Wang, J. Han, J. Sheng, H. Tian, Z. Fan, *Catal. Commun.* **2005**, *6*, 201.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlichst bei Herrn PD Dr. Andreas Brunschweiger bedanken für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis und die Möglichkeit, an hochspannenden Projekten forschen zu dürfen. Vielen Dank für die gute Zusammenarbeit und für das entgegengebrachte Vertrauen sowie die zahlreichen, konstruktiven Gespräche.

Bei Herrn Prof. Dr. Daniel Rauh bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Koreferats dieser Arbeit.

Des Weiteren danke ich Dr. Constantinos Neochoritis und Tryfon Zarganes-Tzitzikas (Universität Groningen) für die Synthese der Isocyanide, Lukas Arendt und Ina Dormuth (Fakultät für Statistik, TU Dortmund) für die Entwicklung der Software *ECEC* zur Auswertung der Sequenzierungsdaten, Christiane Heitbrink (MPI Dortmund) für die HRMS-Messungen, der NMR-Abteilung (TU Dortmund) für die Aufnahme von NMR-Spektren, Ran Zhang (Universität Groningen) für die Durchführung des MST-Assays, Dr. Hélène Adihou (AstraZeneca MPI Satellite Unit) für die Testung der Moleküle über den nanoDSF-Assay, Dr. Hacer Karatas und Dr. Mohammad Akbarzadeh (MPI Dortmund) für die Hit-Validierung mittels FP-Experimenten sowie Blaž Andlovic (LDC Dortmund) für die Untersuchung der zellulären Aktivität eines der Moleküle.

Ebenso danke ich Prof. Dr. Herbert Waldmann und Prof. Dr. Daniel Rauh für den Zugang zu analytischen Instrumenten in ihren Arbeitsgruppen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Marco Potowski für die großartige Zusammenarbeit in den letzten dreieinhalb Jahren. Diese war stets geprägt von wertvollen Diskussionen und gegenseitiger Unterstützung.

Des Weiteren bedanke ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe Brunschweiger für die angenehme Atmosphäre und die freundliche Zusammenarbeit im Labor.

Für die kritische Durchsicht des Manuskripts bedanke ich mich bei Dr. Marco Potowski und Kirujan Jeyakumar.

Des Weiteren bedanke ich mich bei meinen zu Freunden gewordenen Kommilitonen Carina Seitz, Kirujan Jeyakumar, Pascal Hommen und Simon Kotnig für die vielen gemeinsamen Studienjahre.

Darüber hinaus gilt mein Dank meiner Familie und meinen Freunden, die mich während dieser Zeit unterstützt haben und stets ein offenes Ohr hatten.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Kunig, Verena Barbara Katharina
Geburtsdatum: 11.11.1991
Geburtsort: Hagen
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Hochschulbildung

12.2017 – 09.2021 Doktorarbeit, Titel: „DNA-kodierte Substanzbibliotheken: Chemische Stabilisierung der DNA, Entwicklung neuer Synthesemethoden und Identifizierung von TEAD-YAP-Inhibitoren“
Fakultät für Chemie und Chemische Biologie, Technische Universität Dortmund
Arbeitskreis: PD Dr. Andreas Brunschweiger

10.2016 – 09.2017 Masterarbeit; Titel: „Charakterisierung und Kristallisation der ADP-Ribosyltransferasen von *Photorhabdus luminescens*“
Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie, Dortmund
Arbeitskreis: Prof. Dr. Stefan Raunser

10.2015 – 09.2017 Studium der Chemischen Biologie, Technische Universität Dortmund
Abschluss: Master of Science

04.2015 – 09.2015 Bachelorarbeit; Titel: „Entwicklung eines zeitaufgelösten FRET Assays zur Analyse von RNA-Protein-Interaktionen“
Chemical Genomics Center II, Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie, Dortmund
Arbeitskreis: Dr. Sven Hennig

10.2012 – 09.2015 Studium der Chemischen Biologie, Technische Universität
Dortmund

Abschluss: Bachelor of Science

Auszeichnungen

10.2015 – 09.2016 Deutschlandstipendium von der Sparkasse Dortmund

10.2016 – 09.2017 Deutschlandstipendium von der Gesellschaft der Freunde
der Technischen Universität Dortmund e.V.

2016 „Fakultätspreis für herausragende Studienleistungen“ der
Fakultät für Chemie und Chemische Biologie, Technische
Universität Dortmund

2017 Jahrgangsbestenpreis der Fakultät für Chemie und
Chemische Biologie (akademische Jahresfeier),
Technische Universität Dortmund

2018 „Fakultätspreis für herausragende Studienleistungen“ der
Fakultät für Chemie und Chemische Biologie, Technische
Universität Dortmund

2018 Posterpreis auf der "7th International Conference on
Multicomponent Reactions and Related Chemistry" in
Düsseldorf

2020 Posterpreis auf dem „European Federation for Medicinal
Chemistry International Symposium on Medicinal
Chemistry“ (EFMC-ISMC, online)

2021 Posterpreis auf der „Frontiers in Medicinal Chemistry“-
Tagung (online)

Publikationsliste

- 1. DNA-encoded libraries – an efficient small molecule discovery technology for the biomedical sciences**
V. Kunig, M. Potowski, A. Gohla, A. Brunschweiler, *Biol. Chem.* **2018**, 399, 691-710.
- 2. Synthesis of DNA-coupled isoquinolones and pyrrolidines by solid phase ytterbium- and silver-mediated imine chemistry**
M. Potowski,[‡] V. B. K. Kunig,[‡] F. Losch, A. Brunschweiler, *MedChemComm* **2018**, 10, 1082-1093.
- 3. Isocyanide Multicomponent Reactions on Solid-Phase-Coupled DNA Oligonucleotides for Encoded Library Synthesis**
V. B. K. Kunig, C. Ehrt, A. Dömling, A. Brunschweiler, *Org. Lett.* **2019**, 21, 7238-7243.
- 4. TEAD–YAP Interaction Inhibitors and MDM2 Binders from DNA-Encoded Indole-Focused Ugi Peptidomimetics**
V. B. K. Kunig, M. Potowski, M. Akbarzadeh, M. Klika Škopić, D. Dos Santos Smith, L. Arendt, I. Dormuth, H. Adihou, B. Andlovic, H. Karatas, S. Shaabani, T. Zarganes-Tzitzikas, C. G. Neochoritis, R. Zhang, M. Groves, S. M. Guéret, C. Ottmann, J. Rahnenführer, R. Fried, A. Dömling, A. Brunschweiler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, 59, 20338-20342.
- 5. Scanning Protein Surfaces with DNA-Encoded Libraries**
V. B. K. Kunig,[‡] M. Potowski,[‡] M. Klika Škopić,[‡] A. Brunschweiler, *ChemMedChem* **2021**, 16, 1048-1062.
- 6. Chemically Stabilized DNA Barcodes for DNA-Encoded Chemistry**
M. Potowski,[‡] V. B. K. Kunig,[‡] L. Eberlein, A. Vakalopoulos, S. M. Kast, A. Brunschweiler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, 60, 19744-19749.

[‡] Diese Autoren haben gleichermaßen zur Publikation beigetragen.

Eidesstattliche Versicherung (Affidavit)

Kunig, Verena Barbara Katharina

161219

Name, Vorname

Matrikel-Nr.

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

Unterschrift

Titel der Dissertation:

DNA-kodierte Substanzbibliotheken: Chemische Stabilisierung der DNA, Entwicklung neuer Synthesemethoden und Identifizierung von TEAD-YAP-Inhibitoren

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.

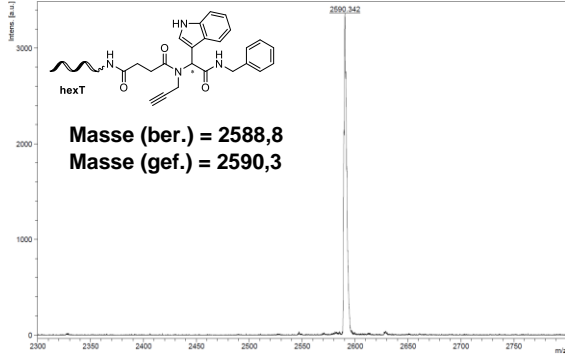
Ort, Datum

Unterschrift

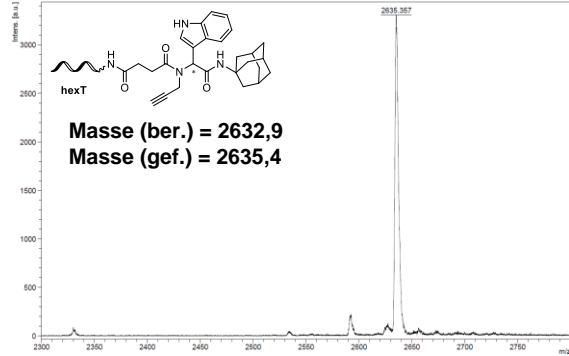
Anhang

MALDI-Massenspektren der hexT-Ugi-Produkte hexT 5aa-cz

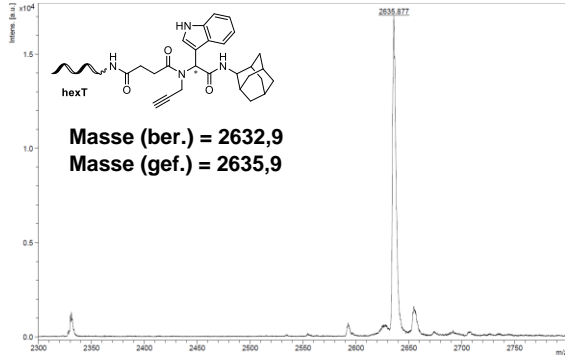
hexT 5aa



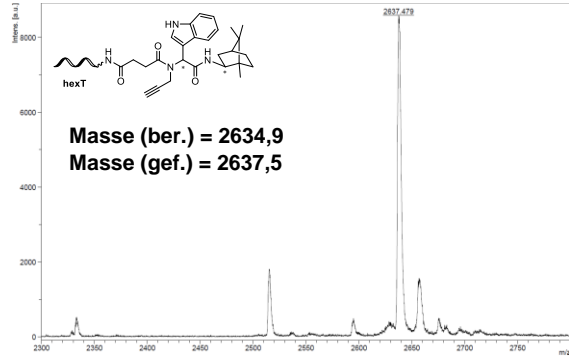
hexT 5ab



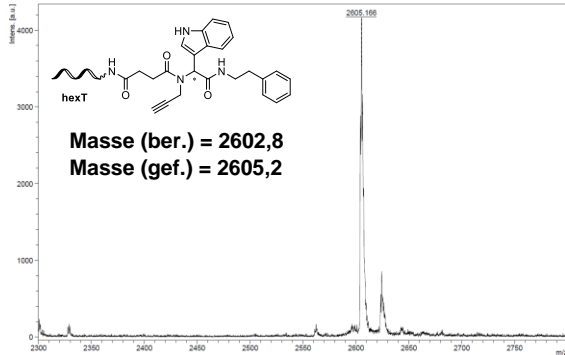
hexT 5ac



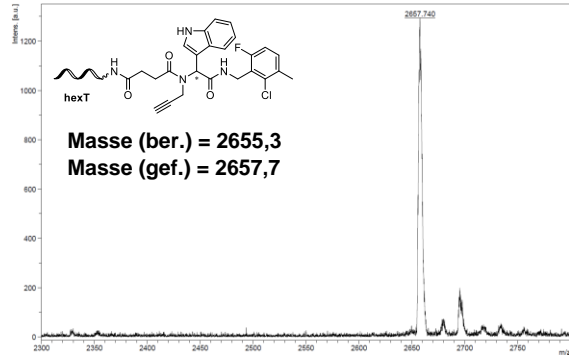
hexT 5ad



hexT 5ae

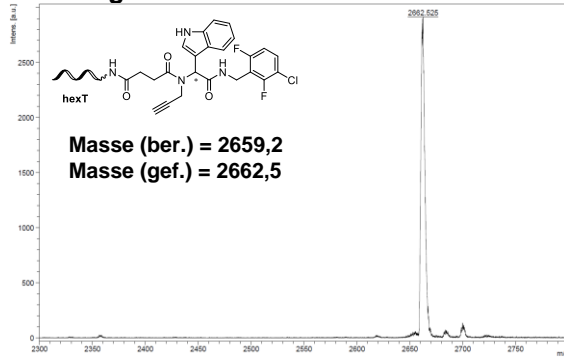


hexT 5af

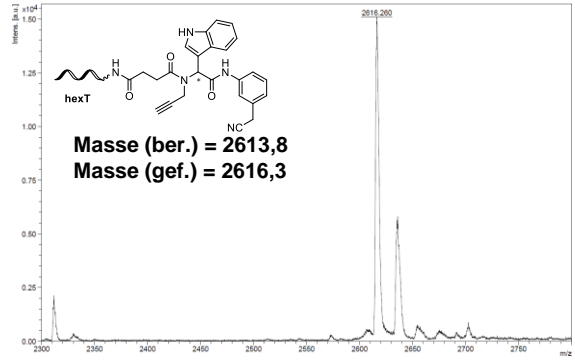


Anhang

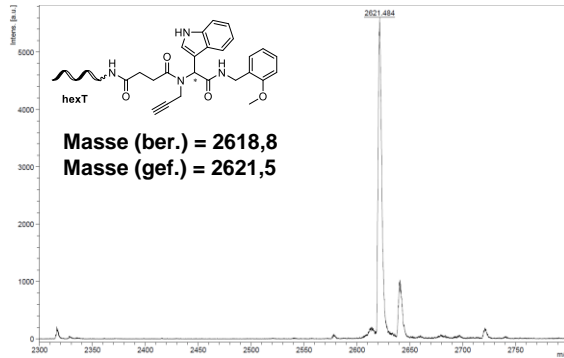
hexT 5ag



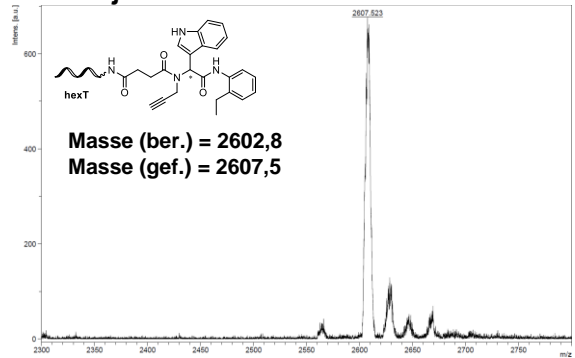
hexT 5ah



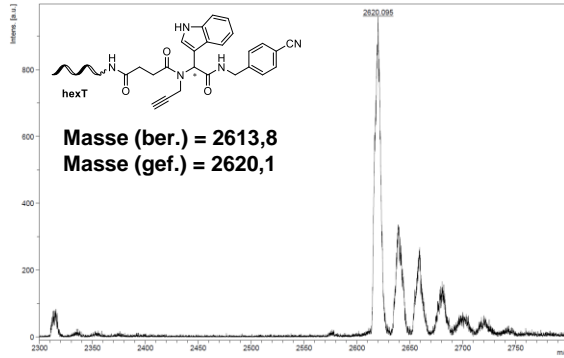
hexT 5ai



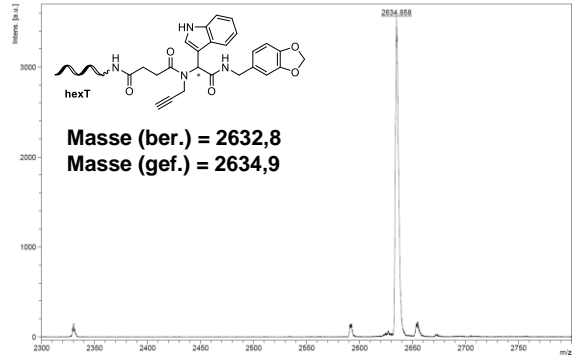
hexT 5aj



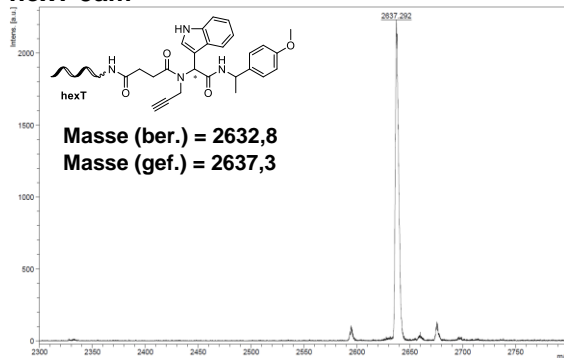
hexT 5ak



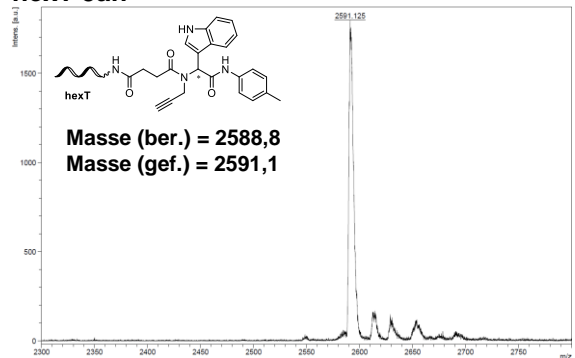
hexT 5al



hexT 5am

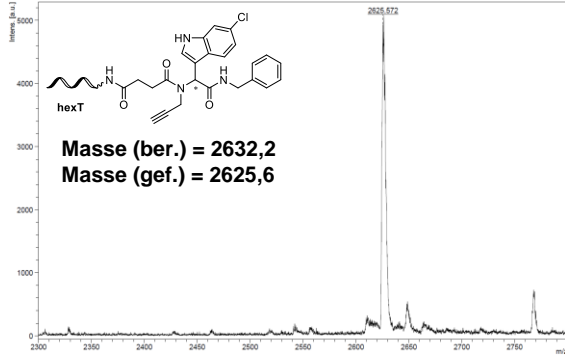


hexT 5an

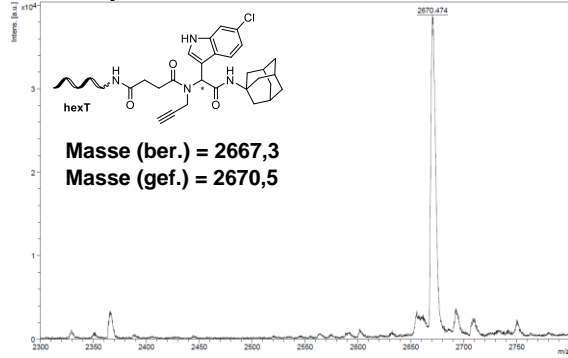


Anhang

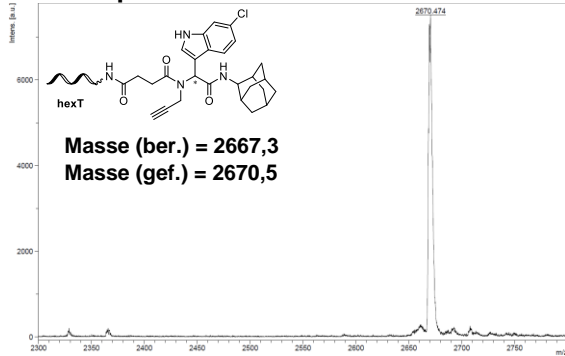
hexT 5ao



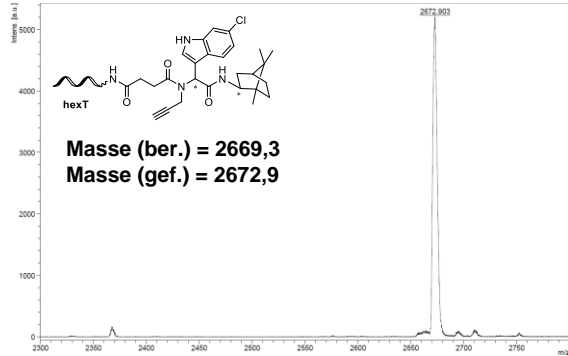
hexT 5ap



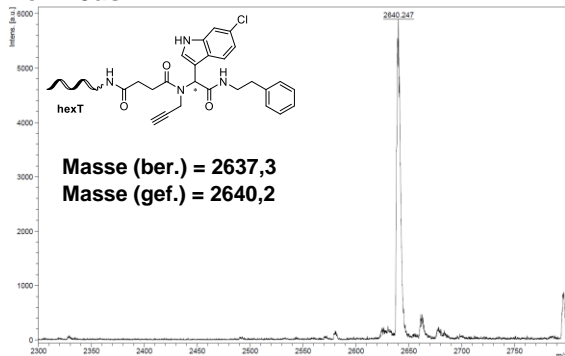
hexT 5aq



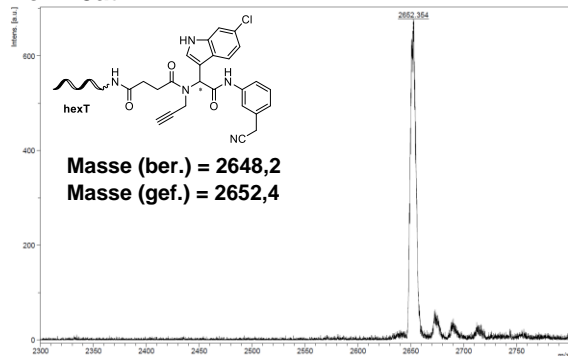
hexT 5ar



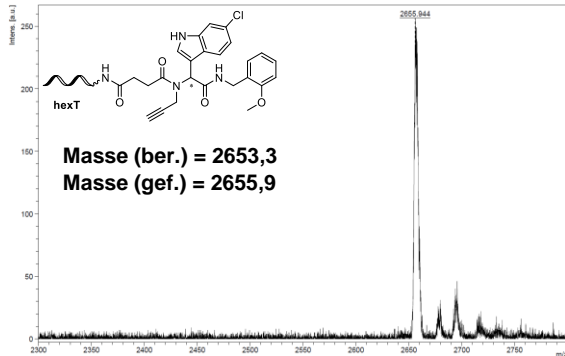
hexT 5as



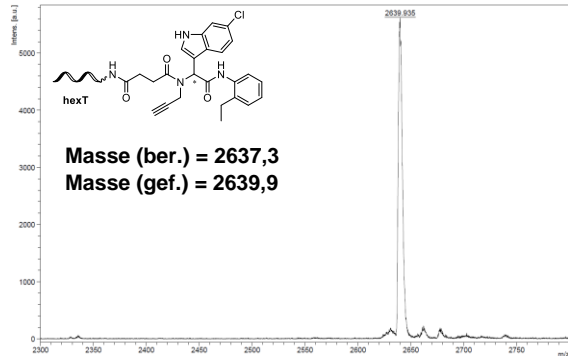
hexT 5at



hexT 5au

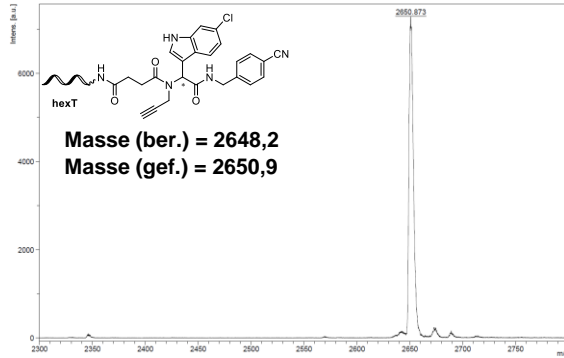


hexT 5av

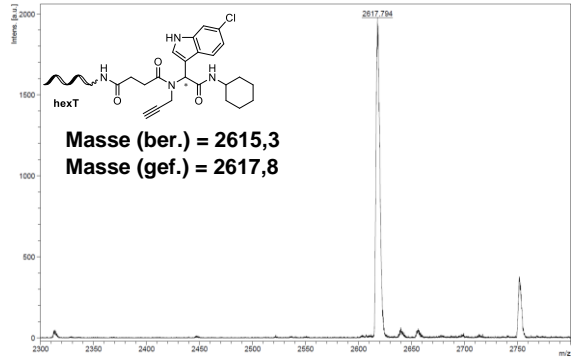


Anhang

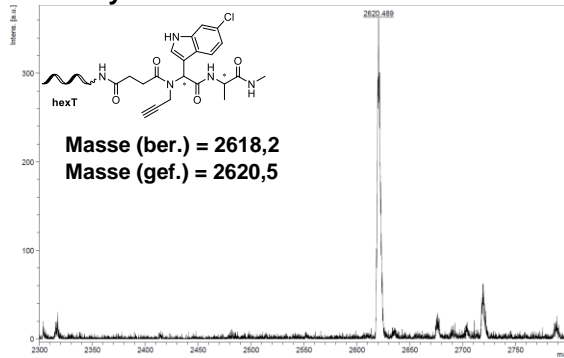
hexT 5aw



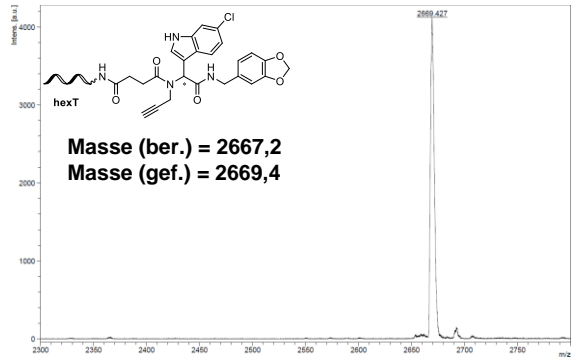
hexT 5ax



hexT 5ay

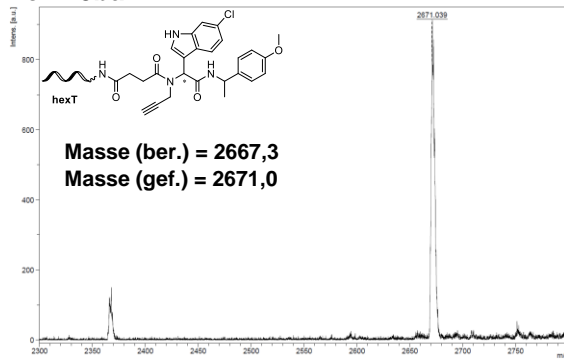


hexT 5az

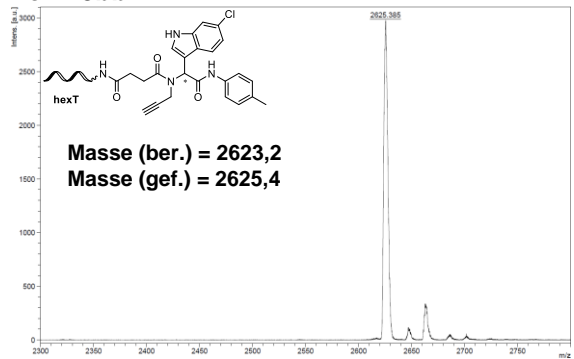


f

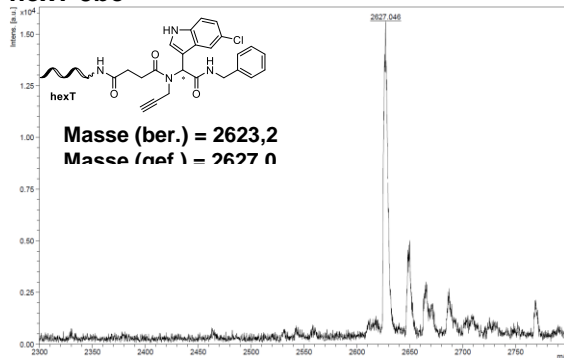
hexT 5ba



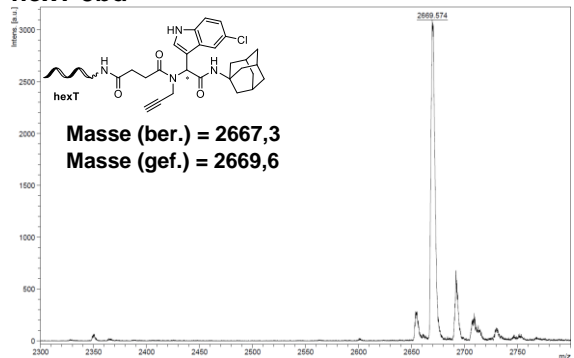
hexT 5bb



hexT 5bc

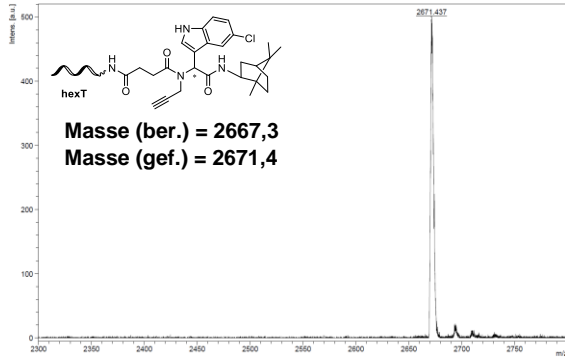


hexT 5bd

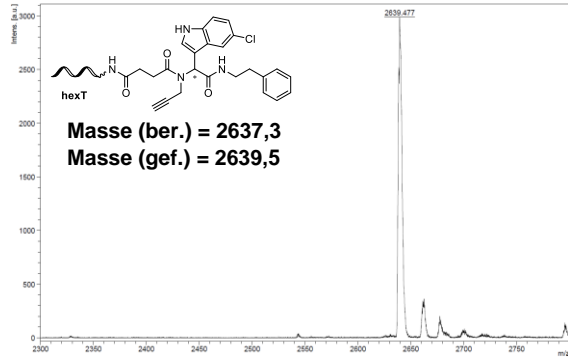


Anhang

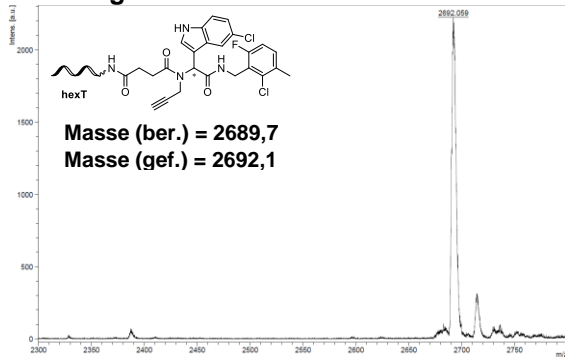
hexT 5be



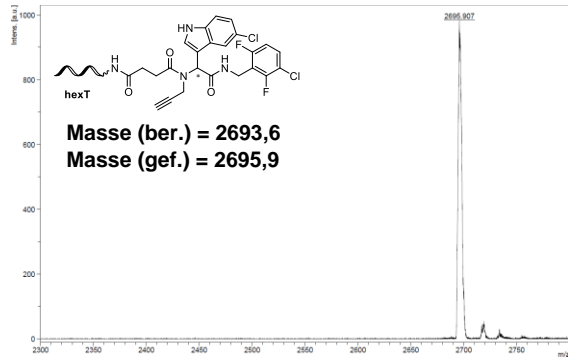
hexT 5bf



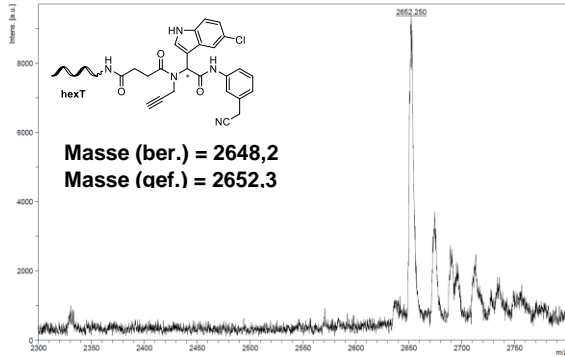
hexT 5bg



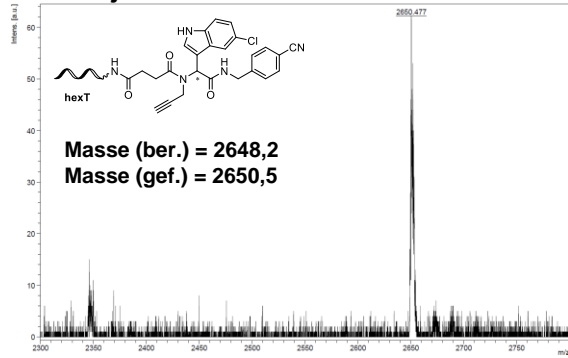
hexT 5bh



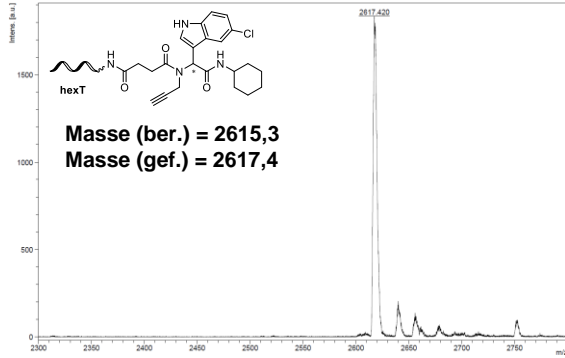
hexT 5bi



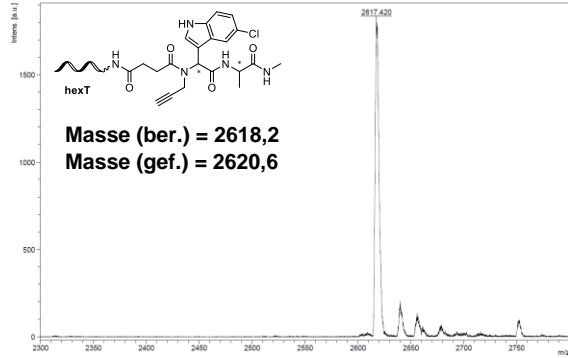
hexT 5bj



hexT 5bk

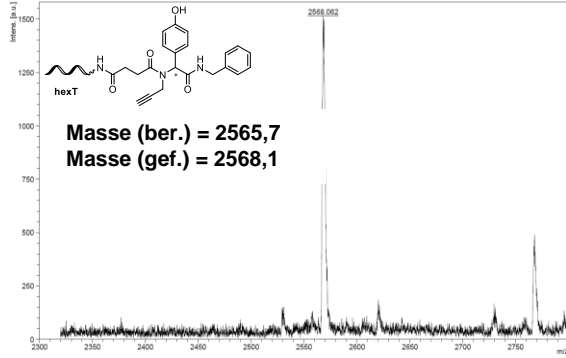


hexT 5bl

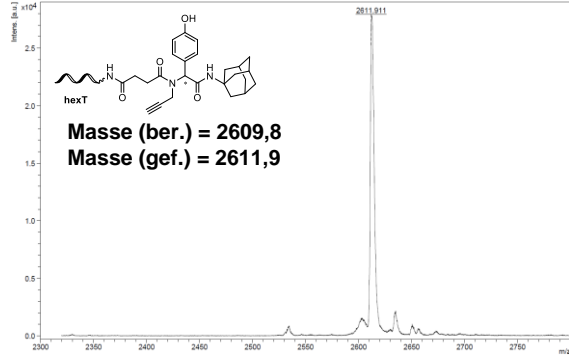


Anhang

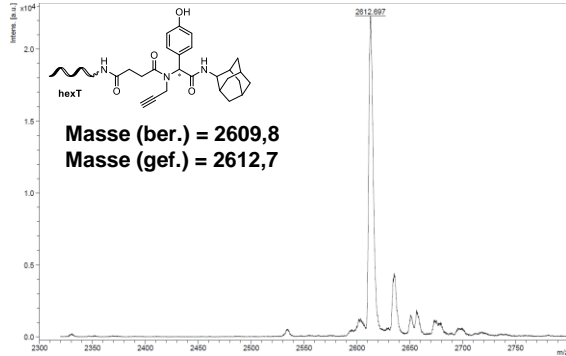
hexT 5bm



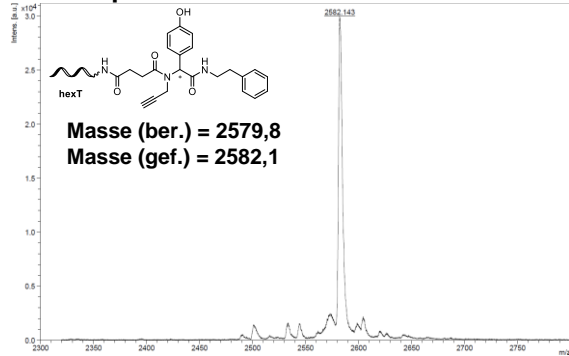
hexT 5bn



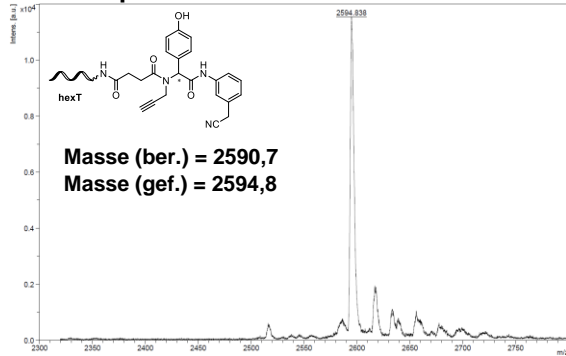
hexT 5bo



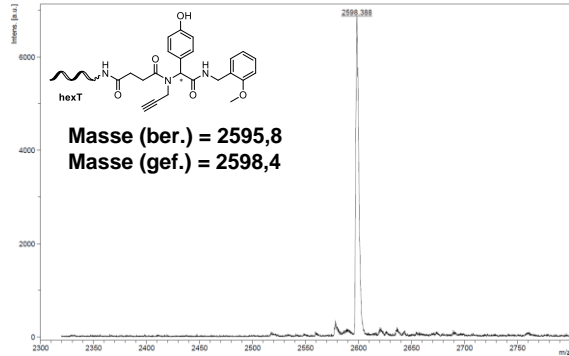
hexT 5bp



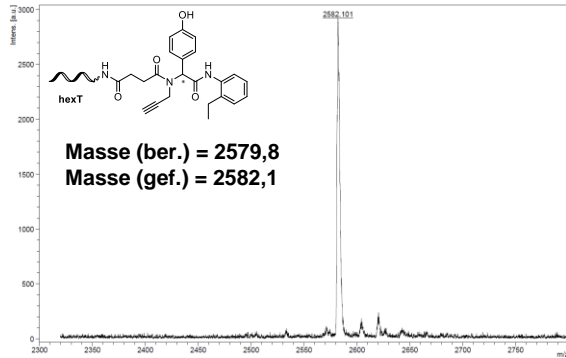
hexT 5bq



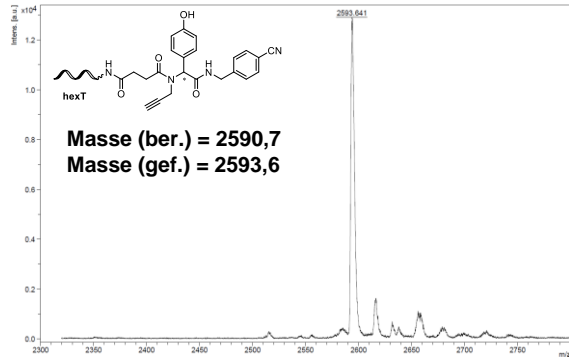
hexT 5br



hexT 5bs

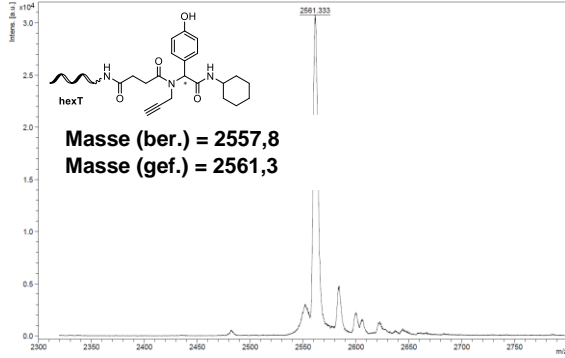


hexT 5bt

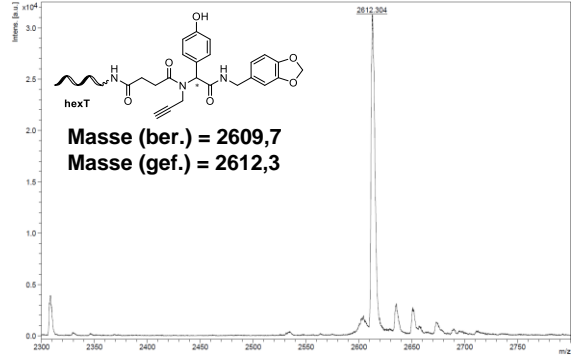


Anhang

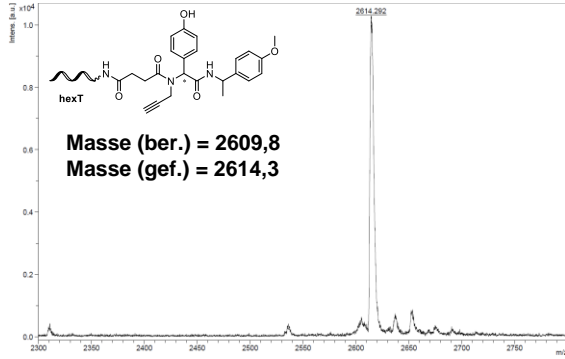
hexT 5bu



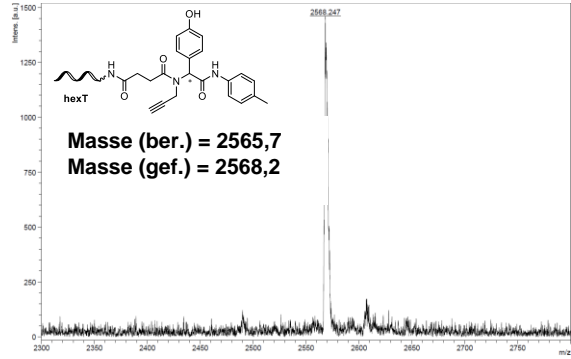
hexT 5bv



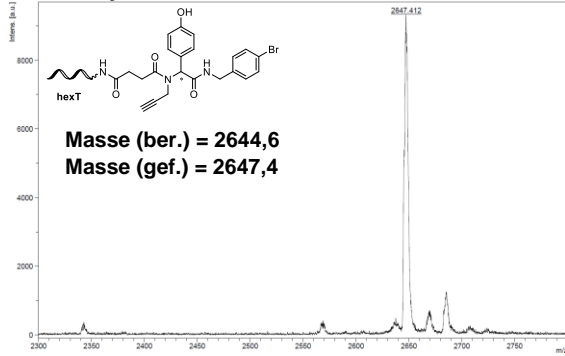
hexT 5bw



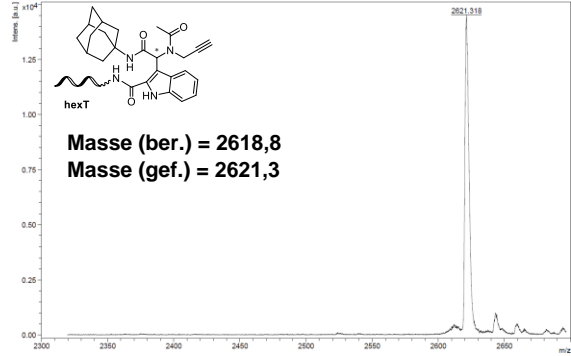
hexT 5bx



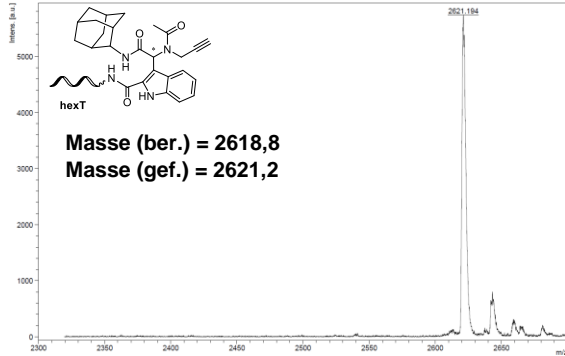
hexT 5by



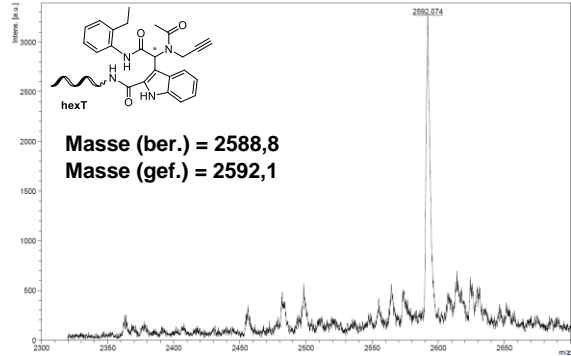
hexT 5bz



hexT 5ca

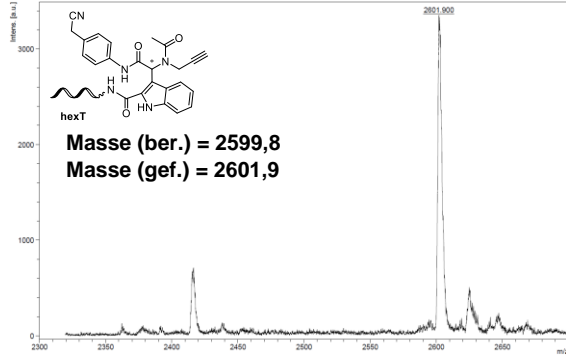


hexT 5cb

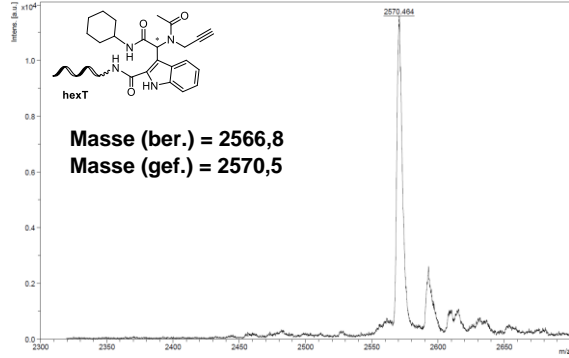


Anhang

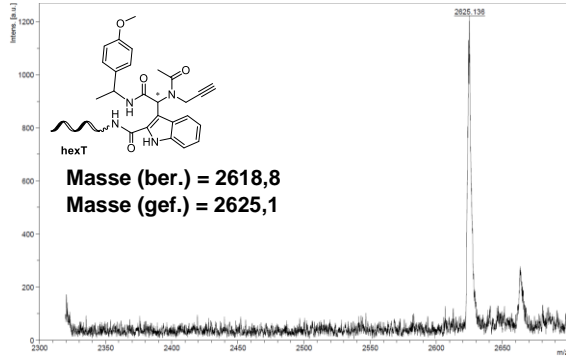
hexT 5cc



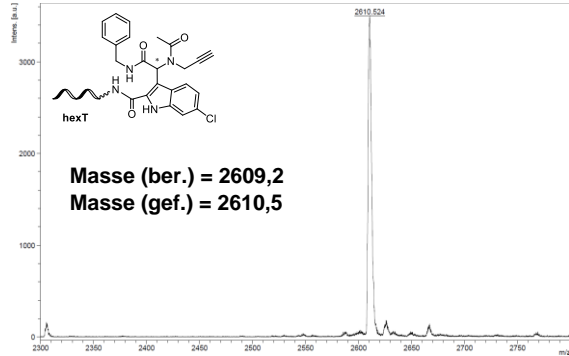
hexT 5cd



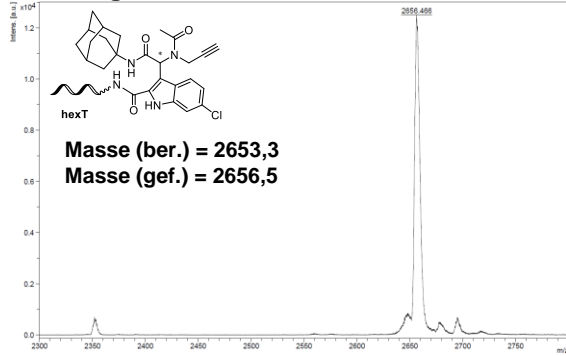
hexT 5ce



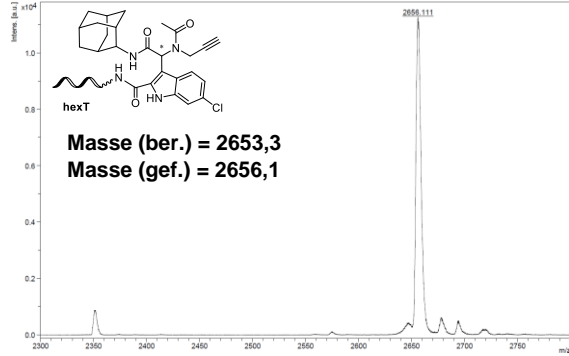
hexT 5cf



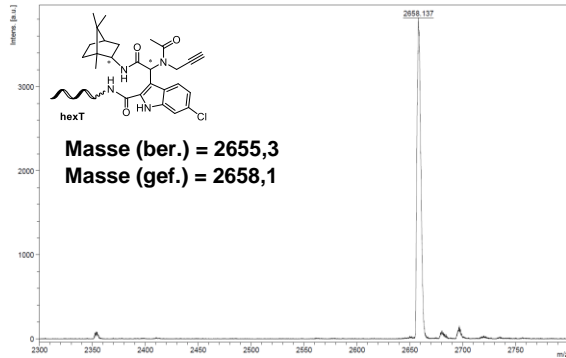
hexT 5cg



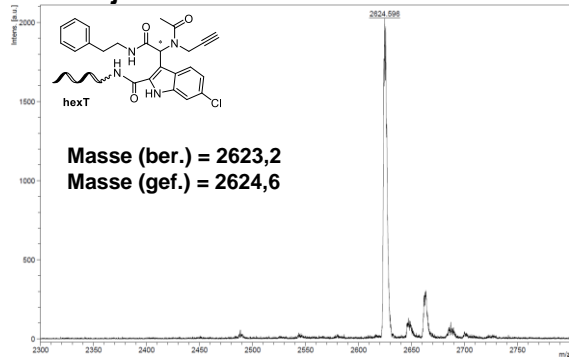
hexT 5ch



hexT 5ci

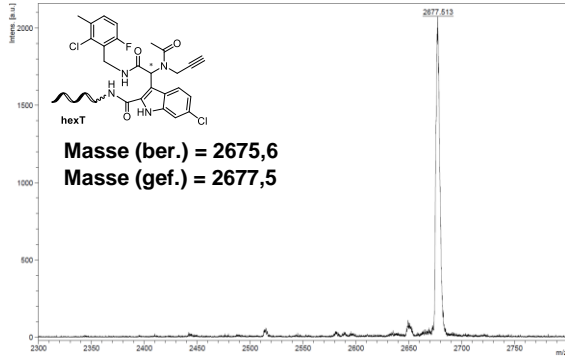


hexT 5cj

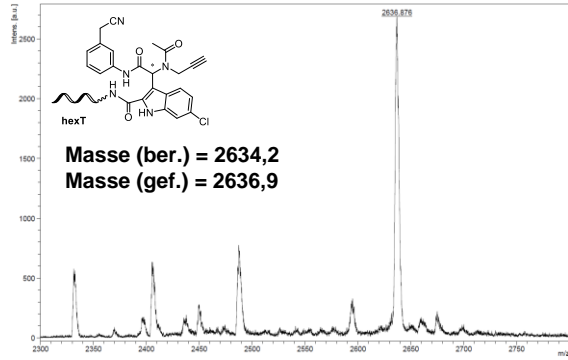


Anhang

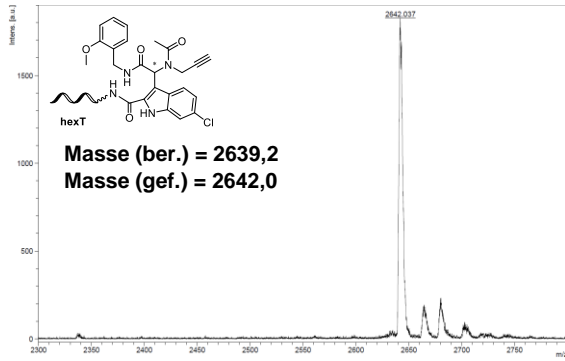
hexT 5ck



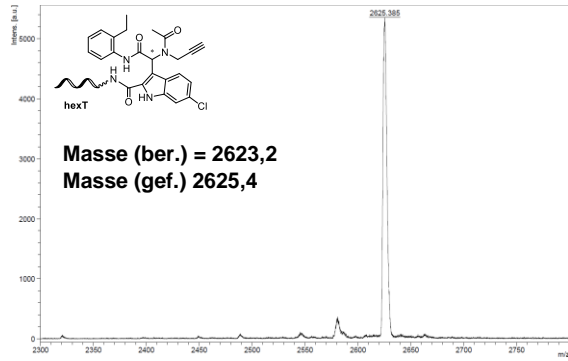
hexT 5cl



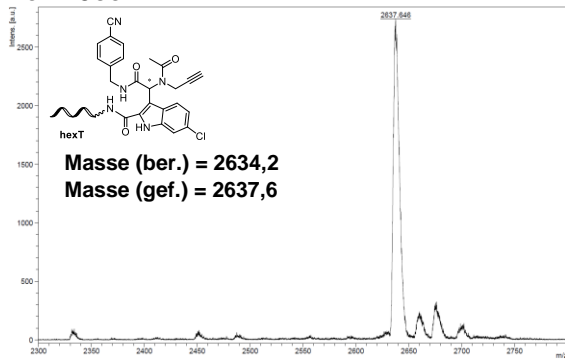
hexT 5cm



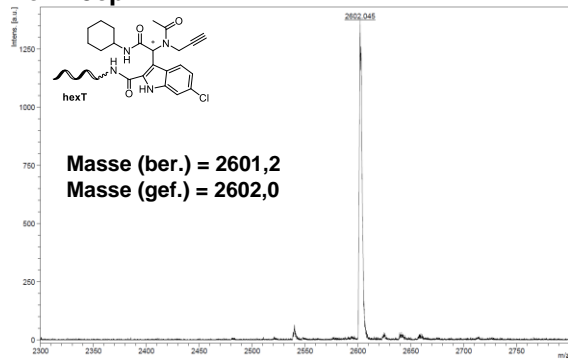
hexT 5cn



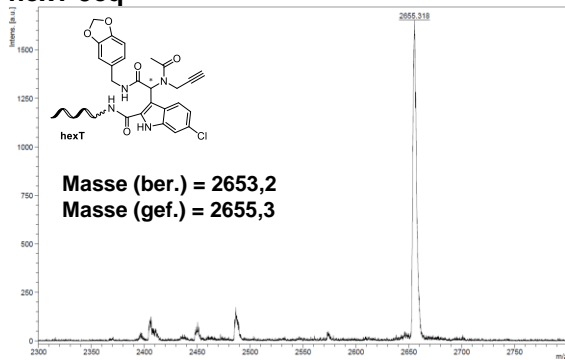
hexT 5co



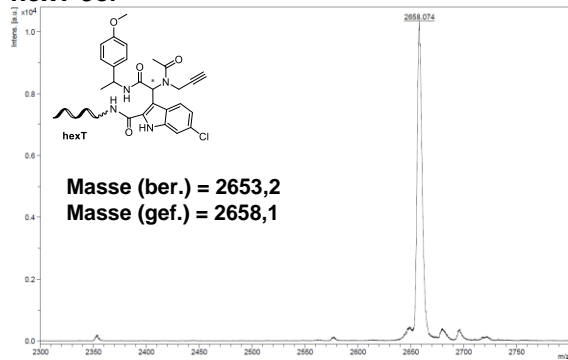
hexT 5cp



hexT 5cq

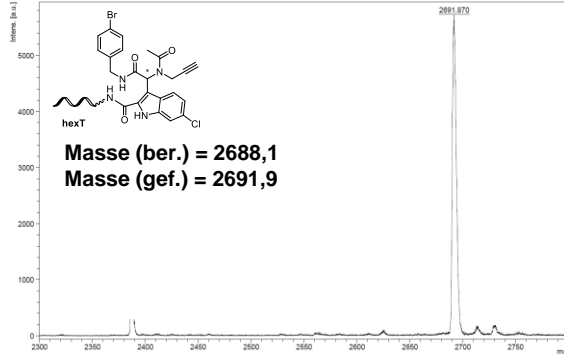


hexT 5cr

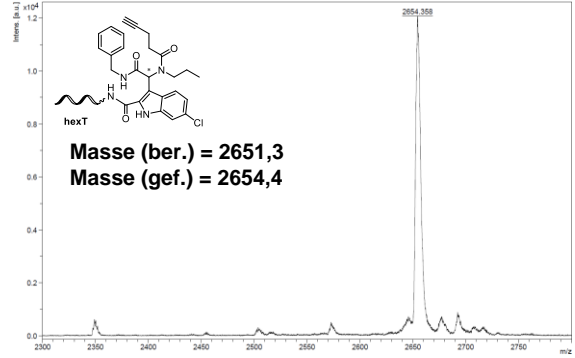


Anhang

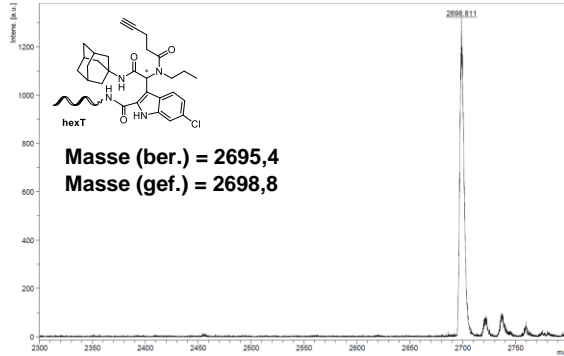
hexT 5cs



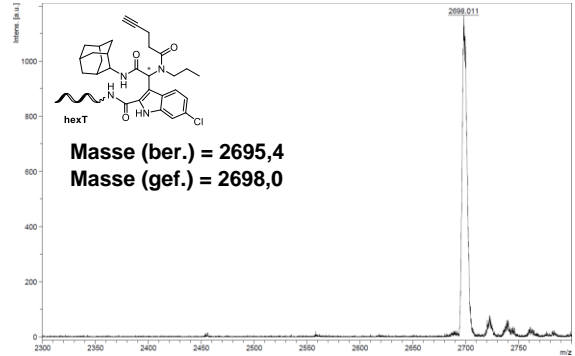
hexT 5ct



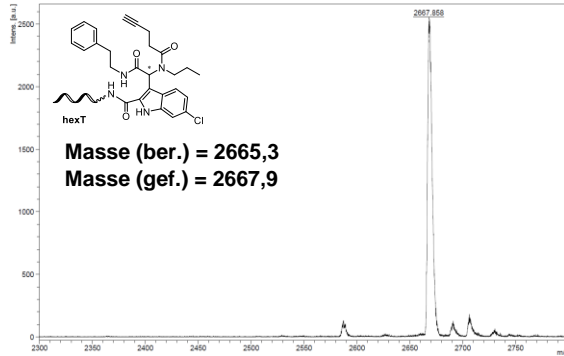
hexT 5cu



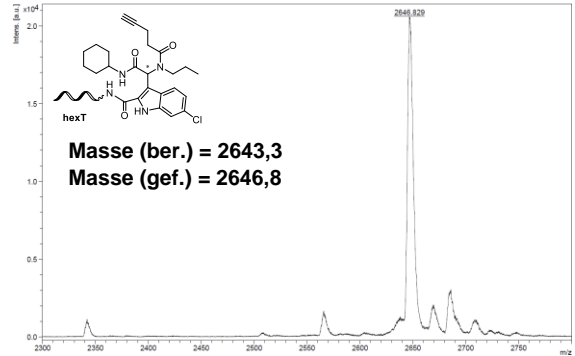
hexT 5cv



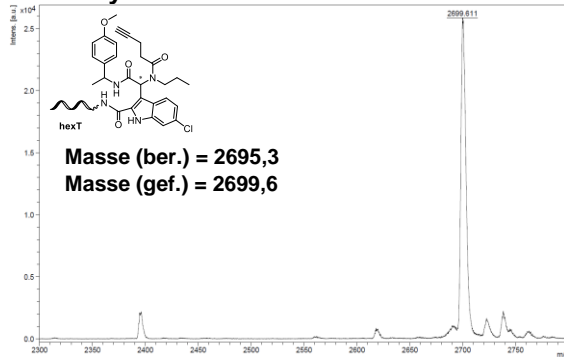
hexT 5cw



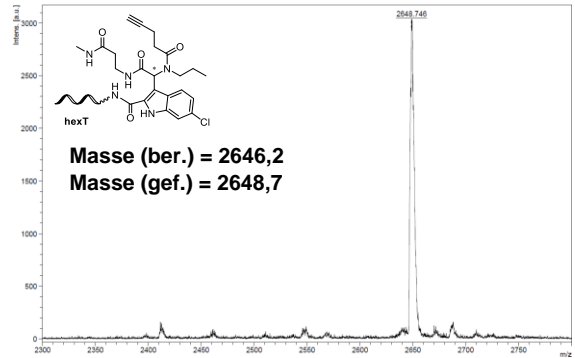
hexT 5cx



hexT 5cy

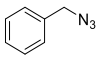

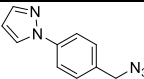
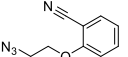
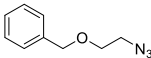
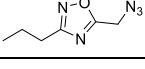

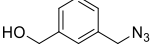
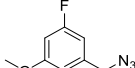
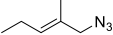
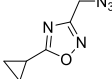
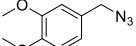
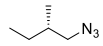


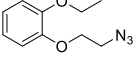
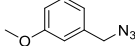
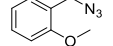
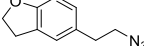
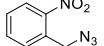
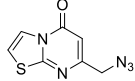
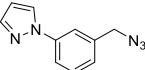
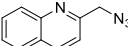
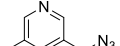
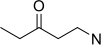

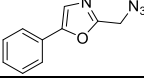
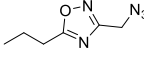
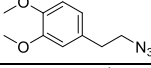
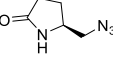
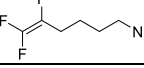
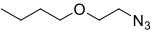
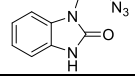
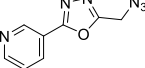
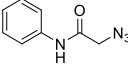
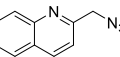
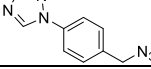
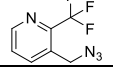

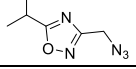
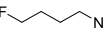


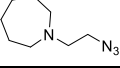
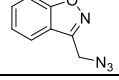

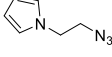
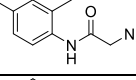
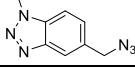
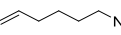
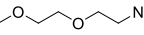
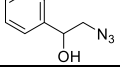
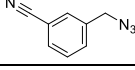
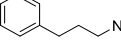
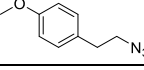
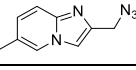
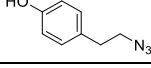
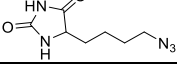
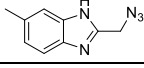
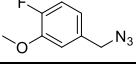
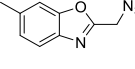
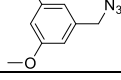
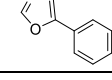
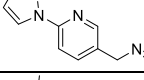
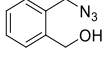
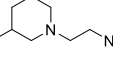

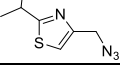
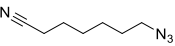
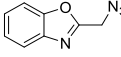
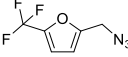
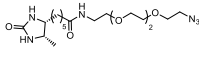
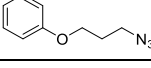
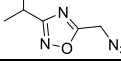
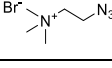
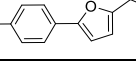
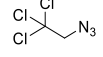
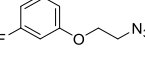
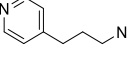
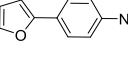
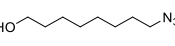
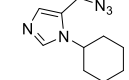
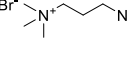
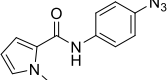


hexT 5cz


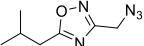
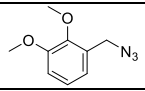
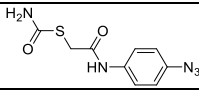
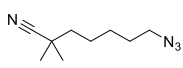
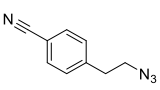
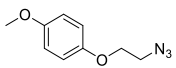
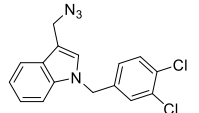
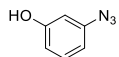
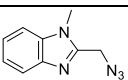
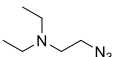

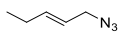
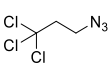
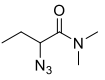
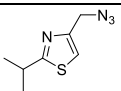
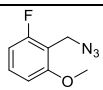


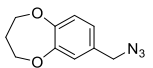


Anhang

Tabelle 27: Übersicht der für die Kupfer-vermittelte Alkin-Azid-Cycloaddition verwendeten Azide.

A1		A2		A3		A4	
A5		A6		A7		A8	
A9		A10		A11		A12	
A13		A14		A15		A16	
A17		A18		A19		A20	
A21		A22		A23		A24	
A25		A26		A27		A28	
A29		A30		A31		A32	
A33		A34		A35		A36	
A37		A38		A39		A40	
A41		A42		A43		A44	
A45		A46		A47		A48	
A49		A50		A51		A52	
A53		A54		A55		A56	
A57		A58		A59		A60	
A61		A62		A63		A64	
A65		A66		A67		A68	
A69		A70		A71		A72	
A73		A74		A75		A76	
A77		A78		A79		A80	
A81		A82		A83		A84	

Anhang

A85		A86		A87		A88	
A89		A90		A91		A92	
A93		A94		A95		A96	
A97		A98		A99		A100	
A101		A102		A103		A104	

Hit-Validierung

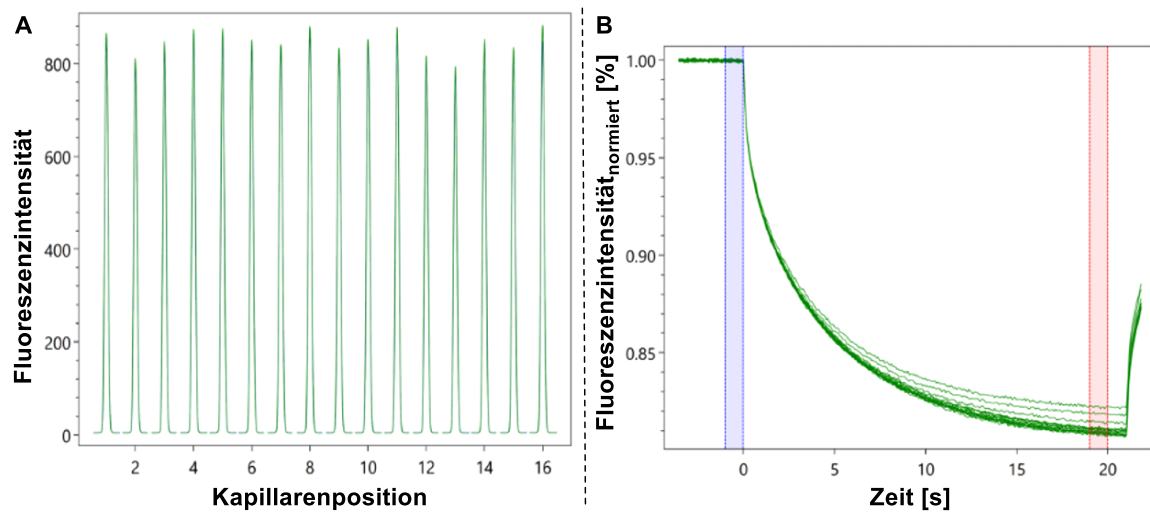


Abbildung 43: Untersuchung der Bindung des Moleküls **70** an MDM2 mittels MST. A. Messung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Kapillarenposition. B. Normierte Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Zeit.

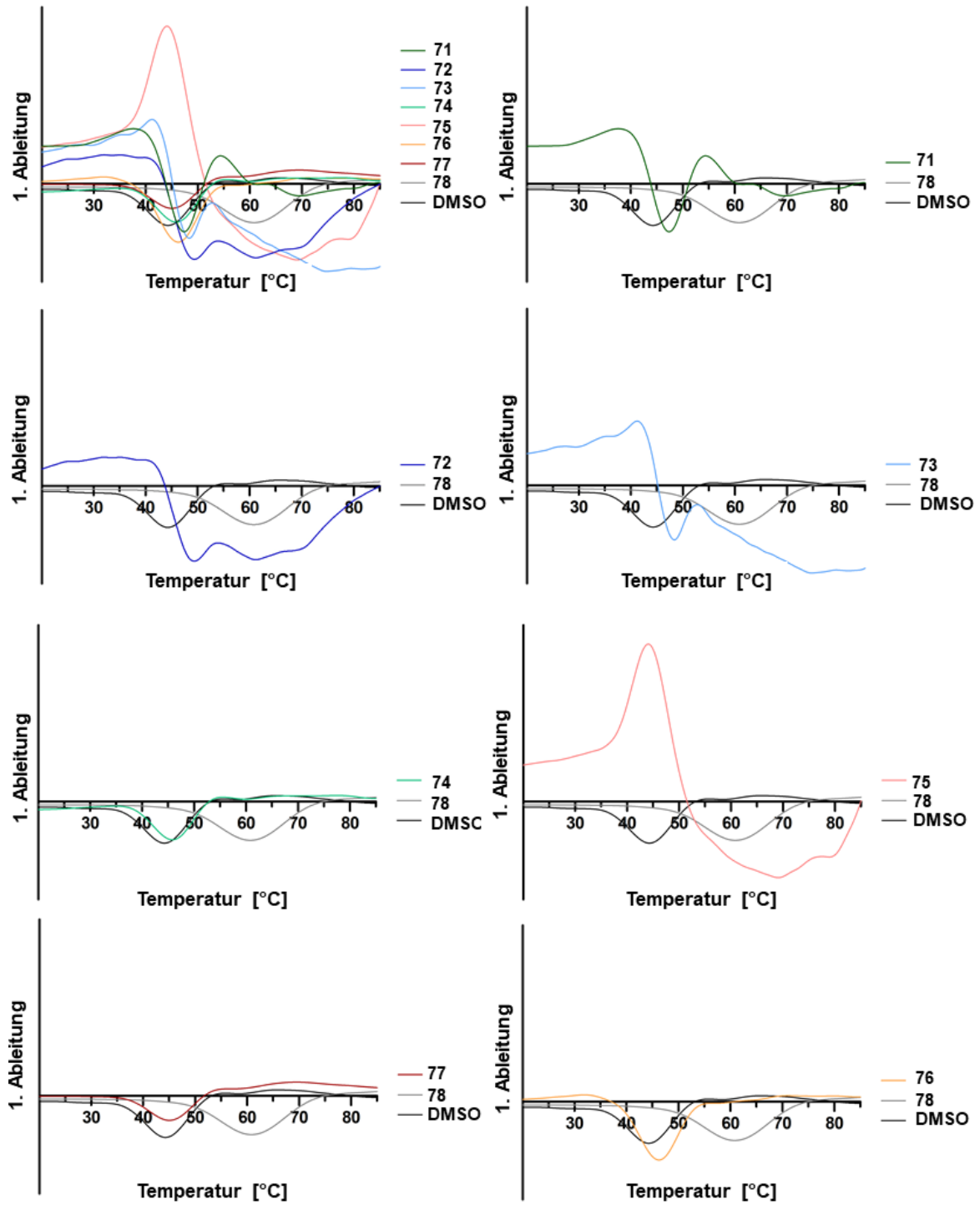
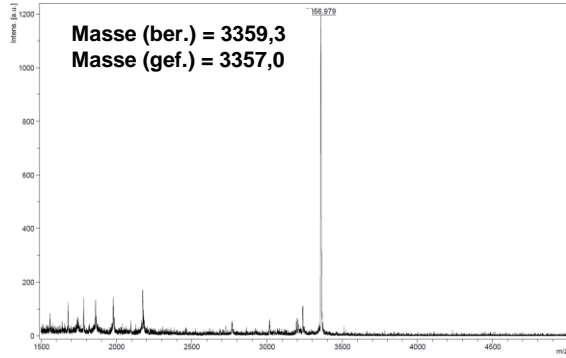
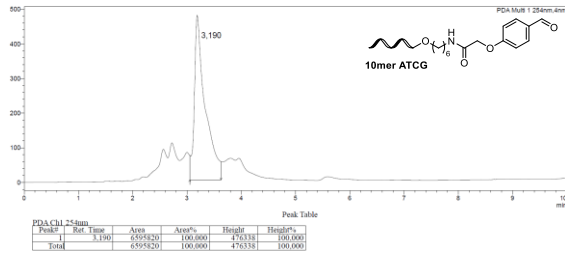


Abbildung 44: Untersuchung der Bindung der Moleküle **71-78** an hTEAD4 mittels nanoDSF. Die Fluoreszenzänderung (1. Ableitung) wurde gegen die Temperatur aufgetragen.

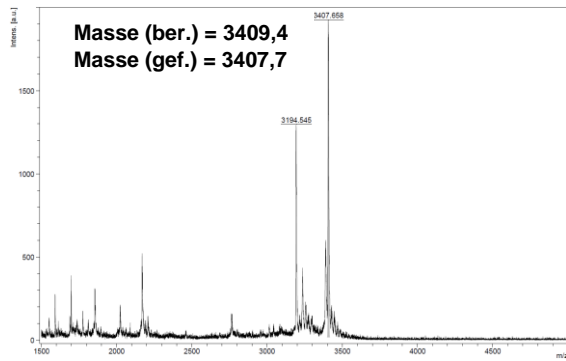
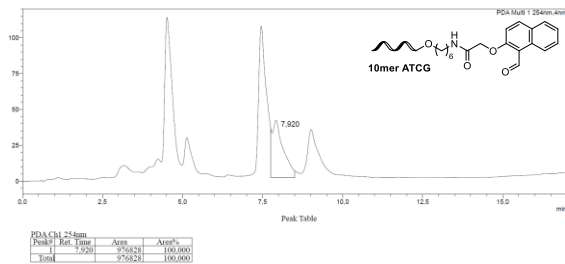
Überführung chemischer Reaktionen auf CPG-gekoppelten DNA-Oligonukleotiden

Isocyanid-basierte MCRs – Startmaterialien

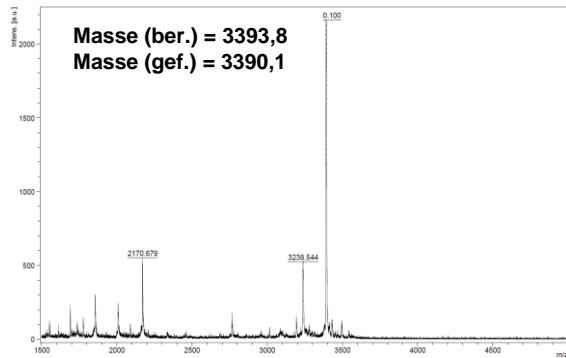
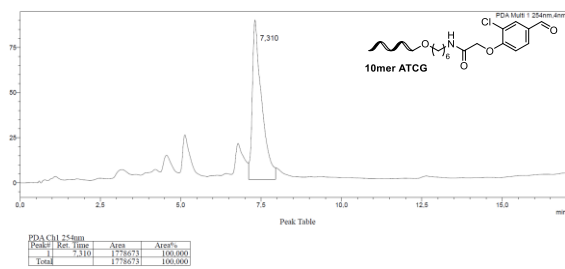
ATCG₁₀ 2a (analytische RP-HPLC I)



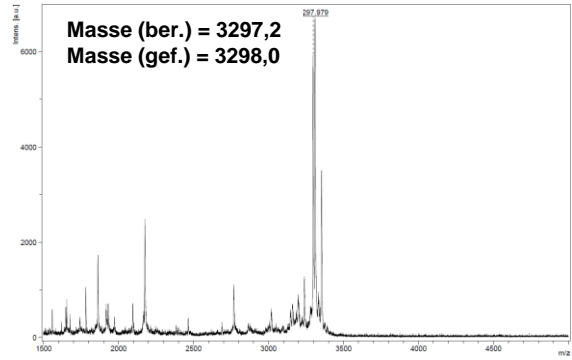
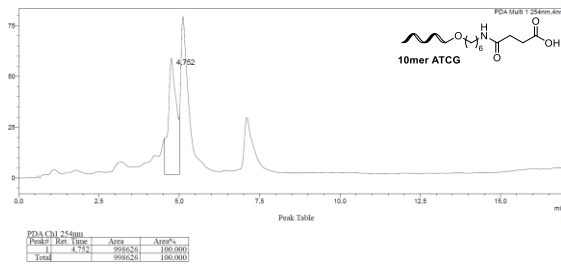
ATCG₁₀ 2b (analytische RP-HPLC I)



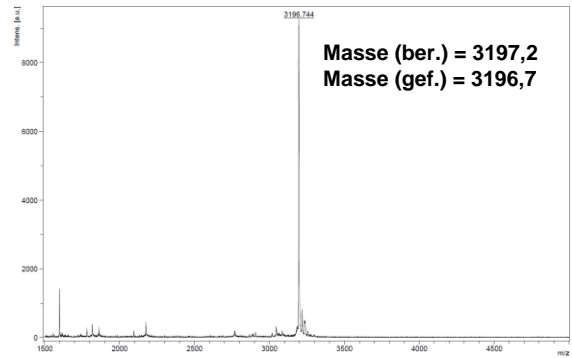
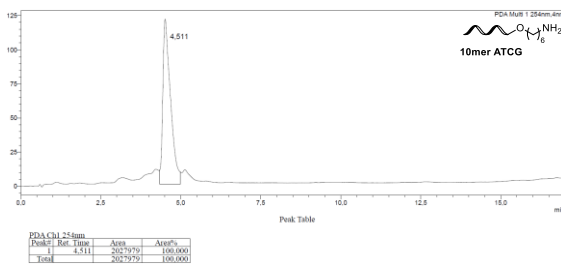
ATCG₁₀ 2c (analytische RP-HPLC I)



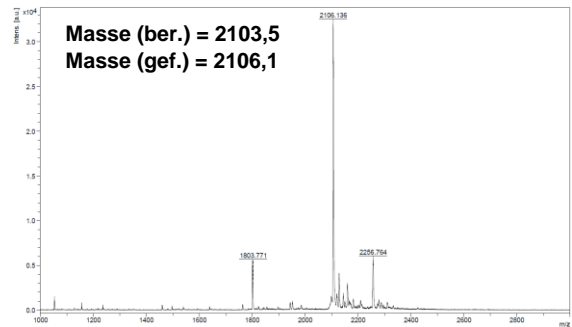
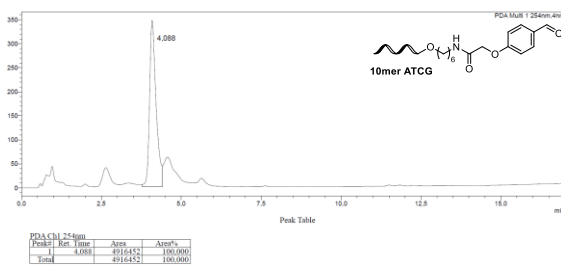
ATCG₁₀ 5 (analytische RP-HPLC I)



ATCG₁₀ 1 (analytische RP-HPLC I)

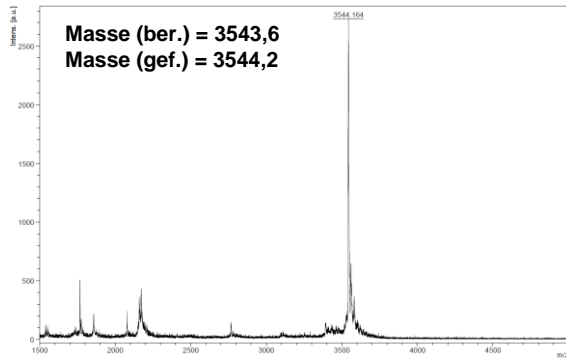
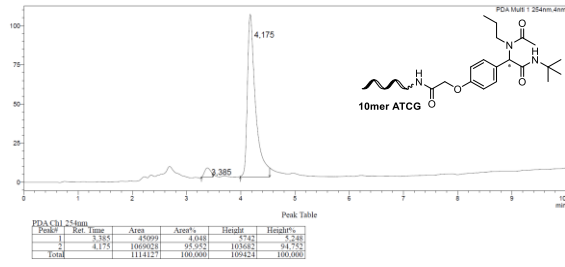


hexT 4c (präparative RP-HPLC, Methode 1)

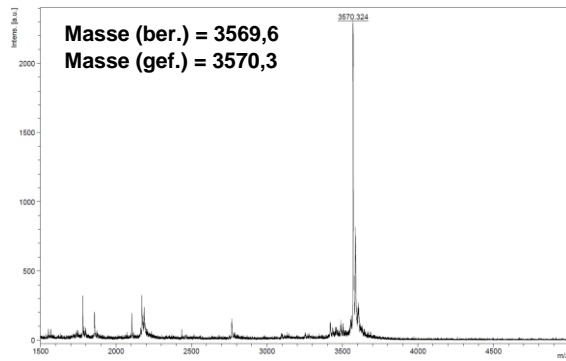
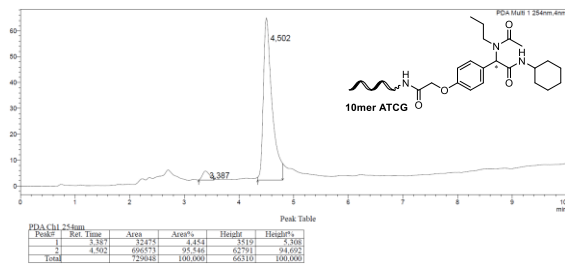


Isocyanid-basierte MCRs – Produkte

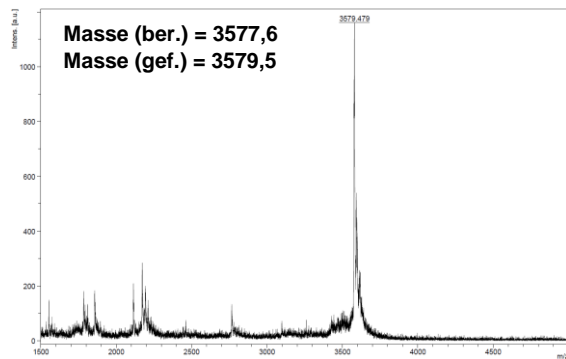
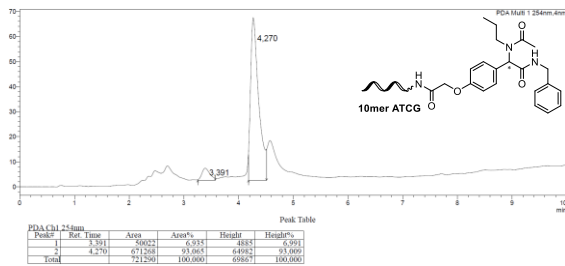
ATCG₁₀ 3aa (analytische RP-HPLC I)



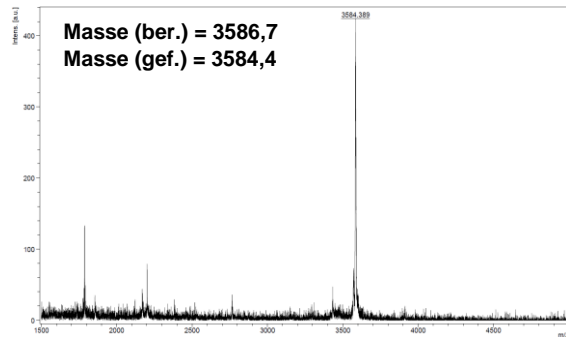
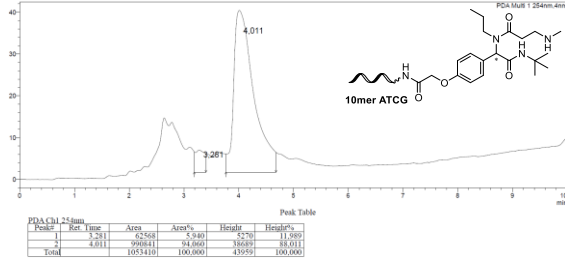
ATCG₁₀ 3ab (analytische RP-HPLC I)



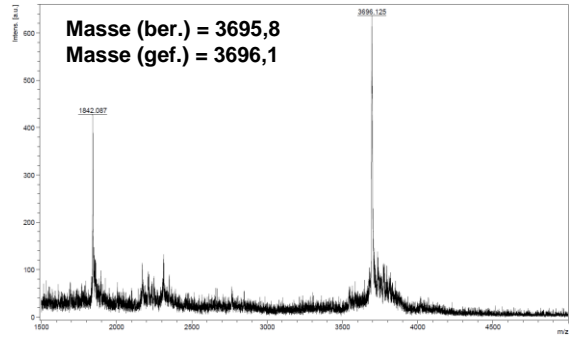
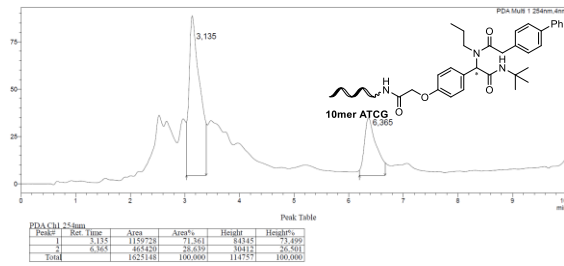
ATCG₁₀ 3ac (analytische RP-HPLC I)



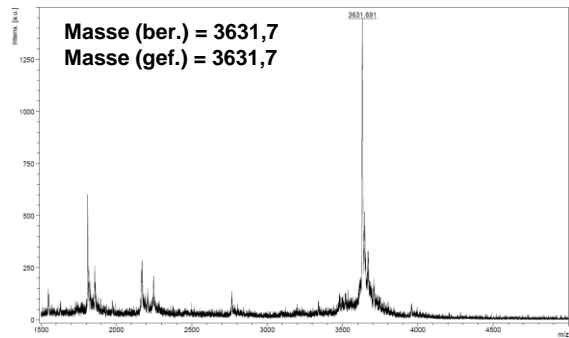
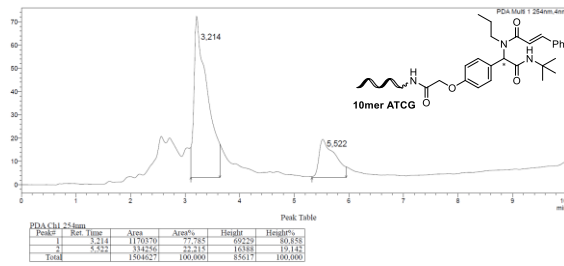
ATCG₁₀ 3ae (analytische RP-HPLC I)



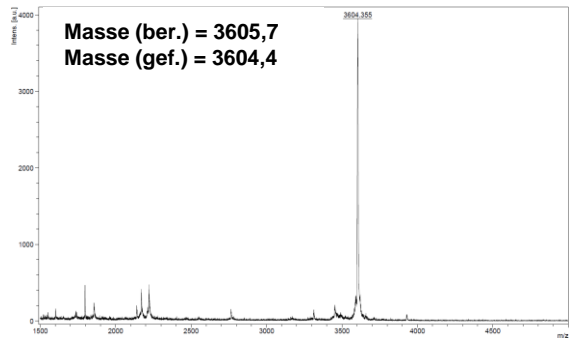
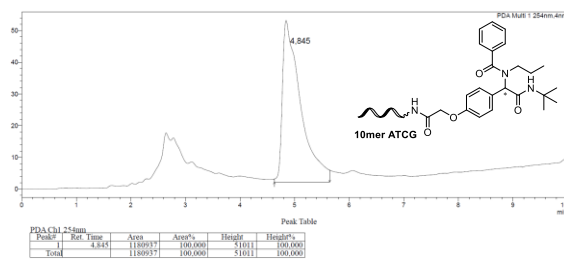
ATCG₁₀ 3af (analytische RP-HPLC I)



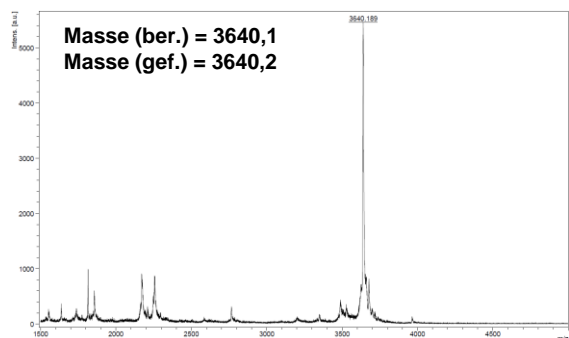
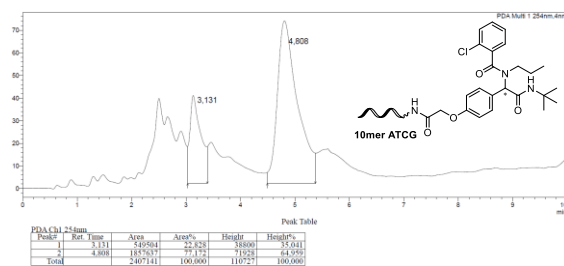
ATCG₁₀ 3ag (analytische RP-HPLC I)



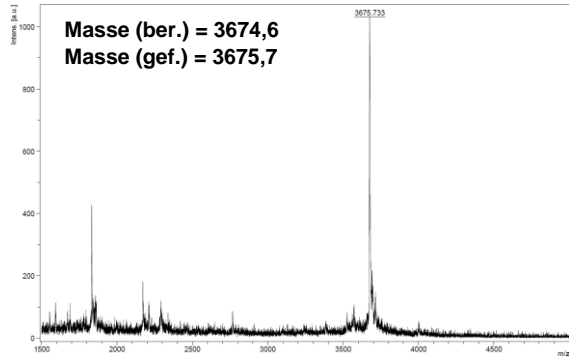
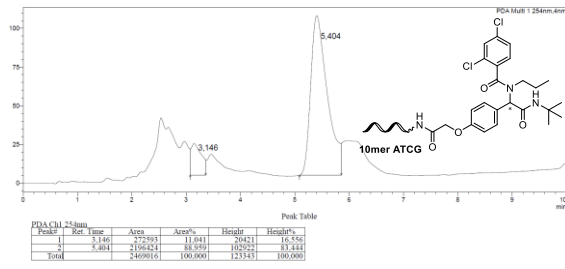
ATCG₁₀ 3ah (analytische RP-HPLC I)



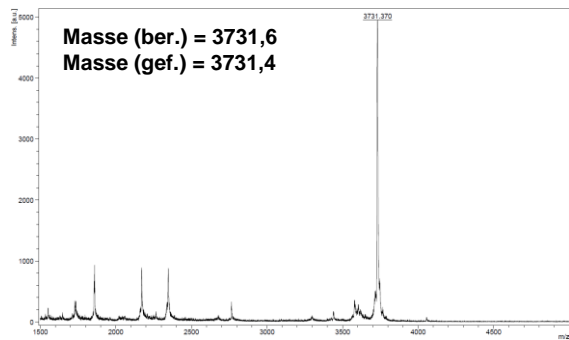
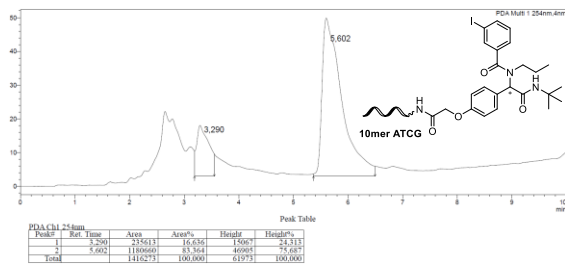
ATCG₁₀ 3ai (analytische RP-HPLC I)



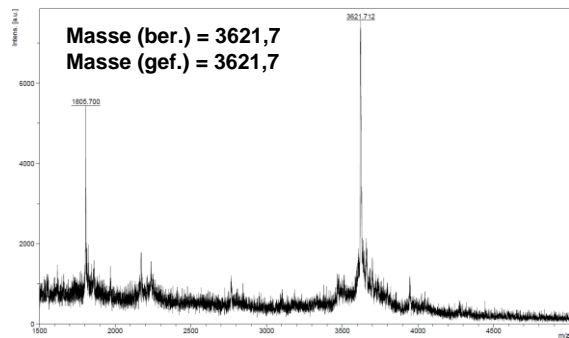
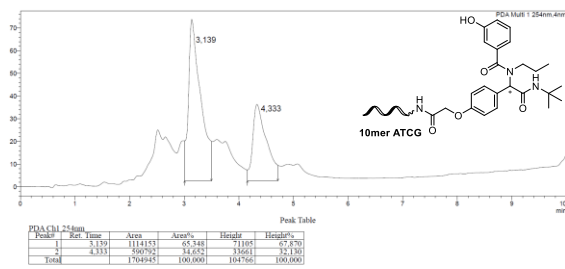
ATCG₁₀ 3aj (analytische RP-HPLC I)



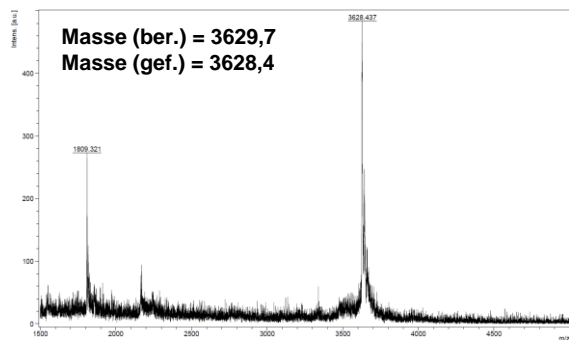
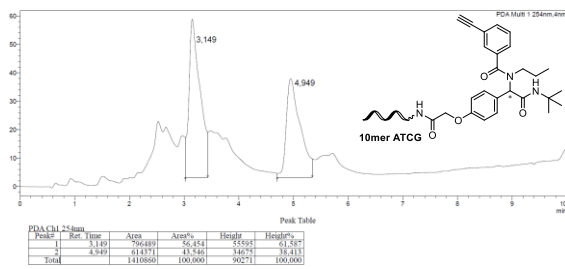
ATCG₁₀ 3ak (analytische RP-HPLC I)



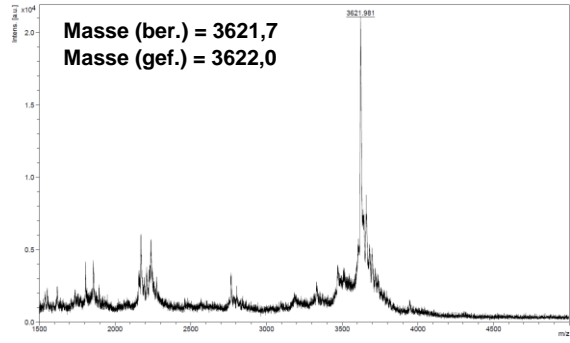
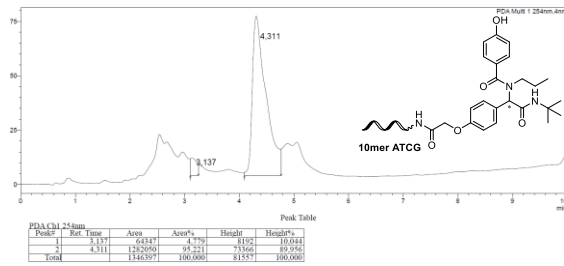
ATCG₁₀ 3al (analytische RP-HPLC I)



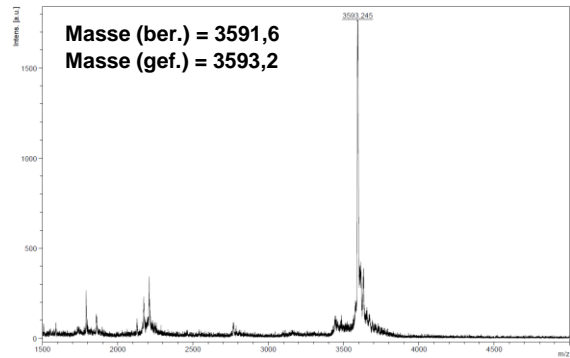
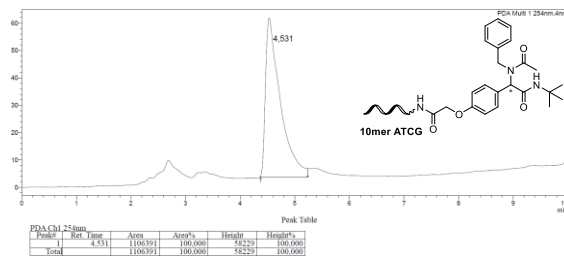
ATCG₁₀ 3am (analytische RP-HPLC I)



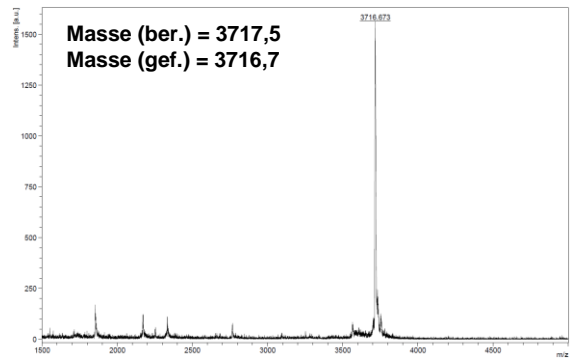
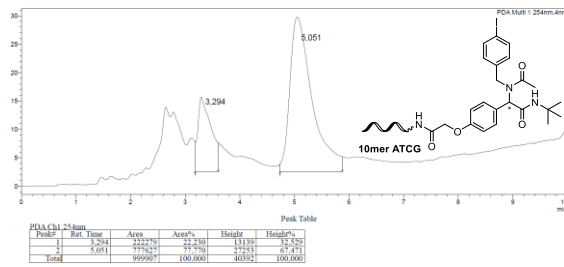
ATCG₁₀ 3an (analytische RP-HPLC I)



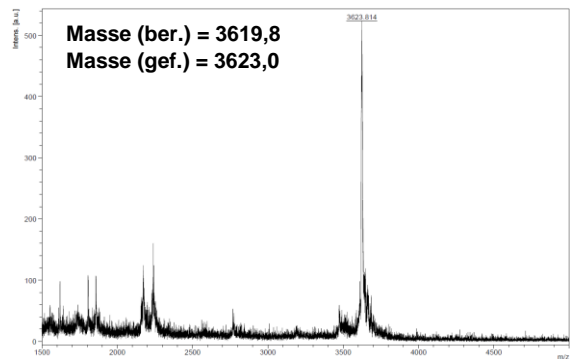
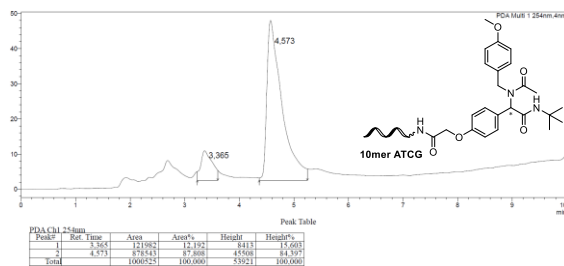
ATCG₁₀ 3ao (analytische RP-HPLC I)



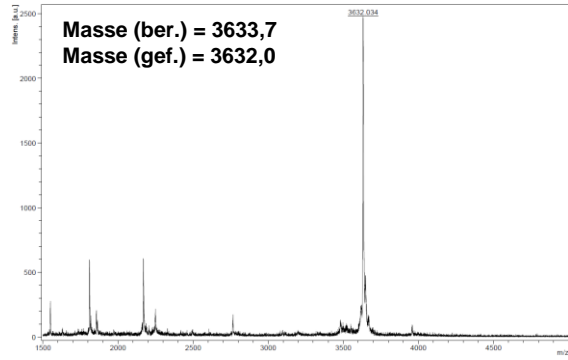
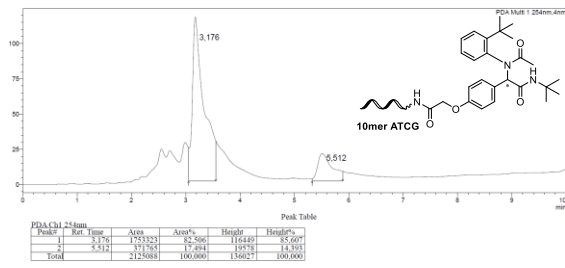
ATCG₁₀ 3ap (analytische RP-HPLC I)



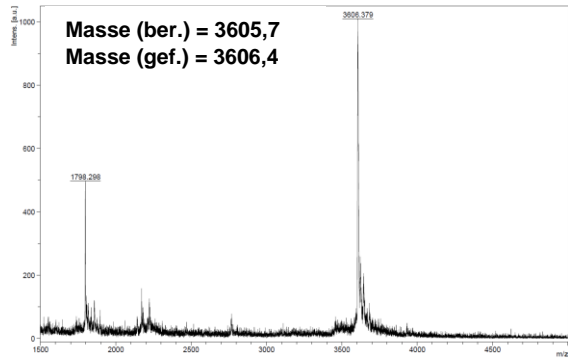
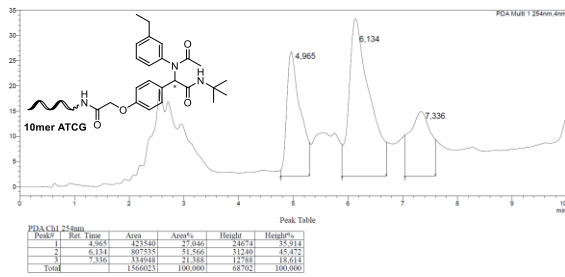
ATCG₁₀ 3aq (analytische RP-HPLC I)



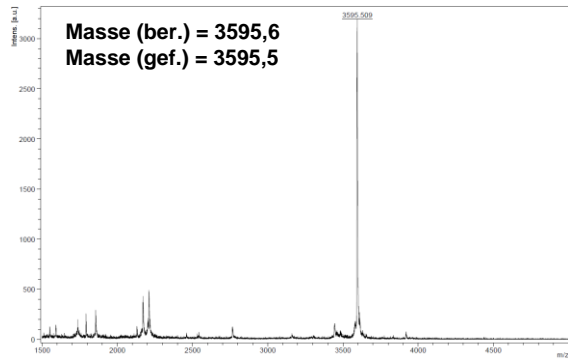
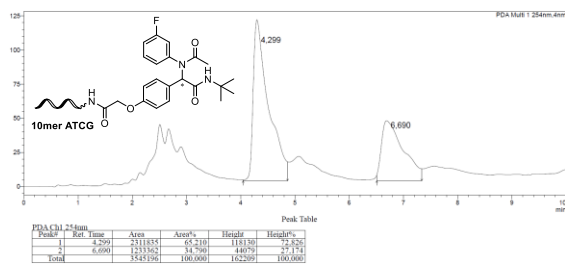
ATCG₁₀ 3ar (analytische RP-HPLC I)



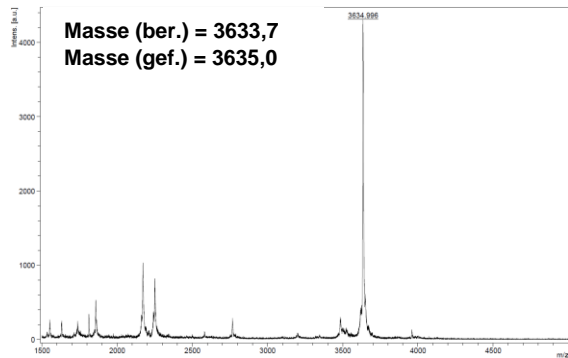
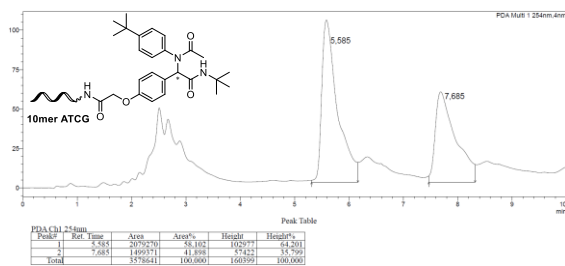
ATCG₁₀ 3at (analytische RP-HPLC I)



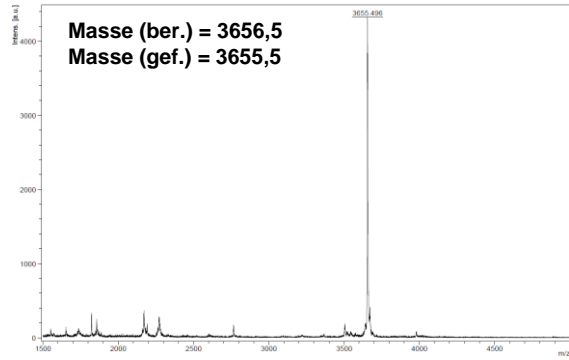
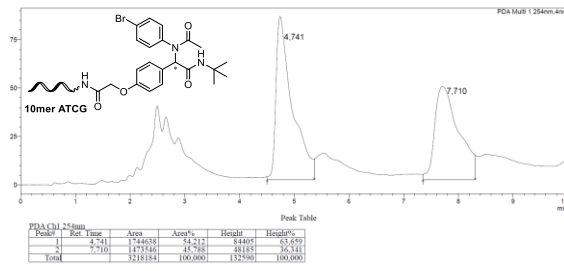
ATCG₁₀ 3au (analytische RP-HPLC I)



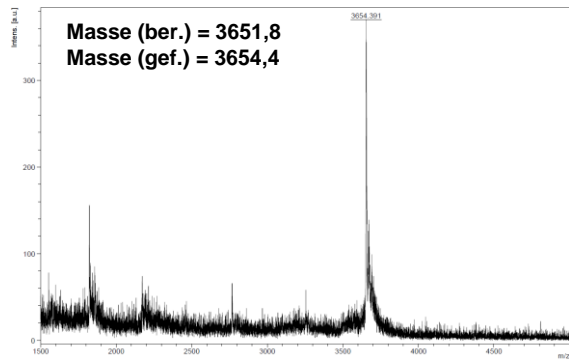
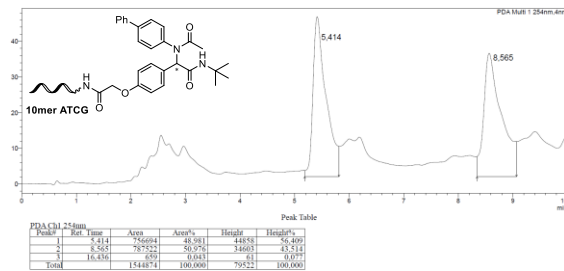
ATCG₁₀ 3av (analytische RP-HPLC I)



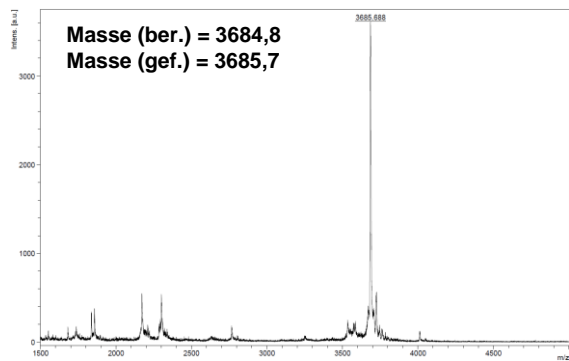
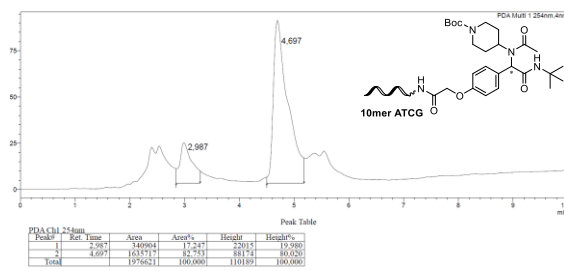
ATCG₁₀ 3aw (analytische RP-HPLC I)



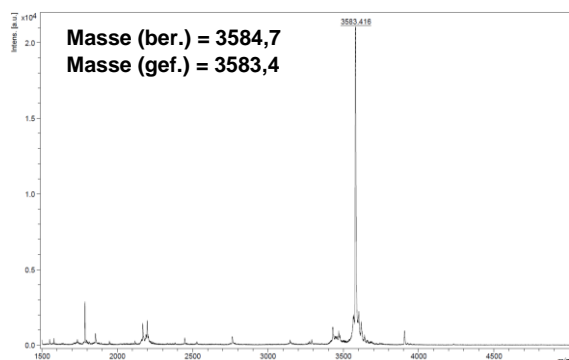
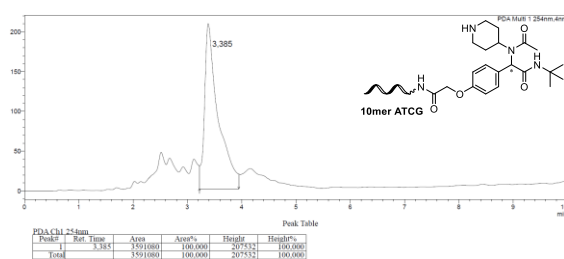
ATCG₁₀ 3ax (analytische RP-HPLC I)



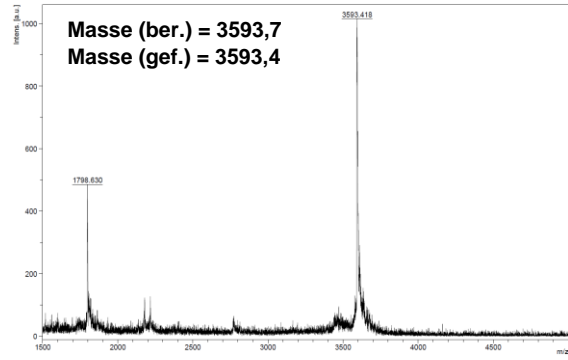
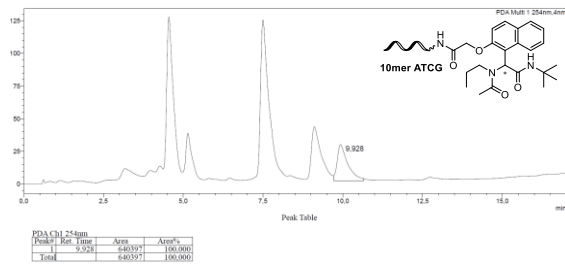
ATCG₁₀ 3ay (analytische RP-HPLC I)



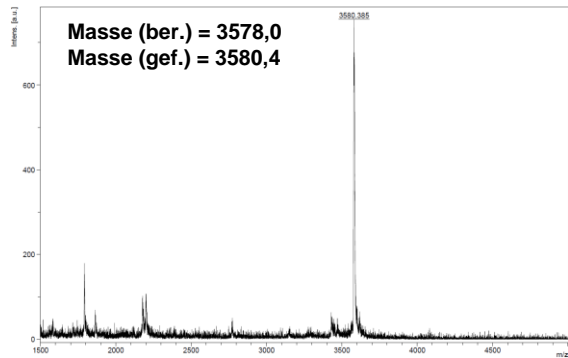
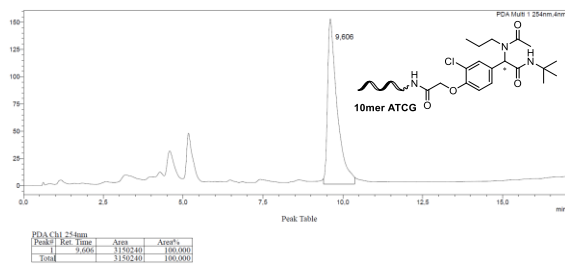
ATCG₁₀ 4 (analytische RP-HPLC I)



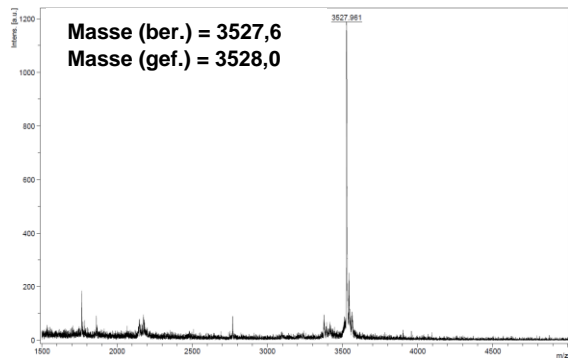
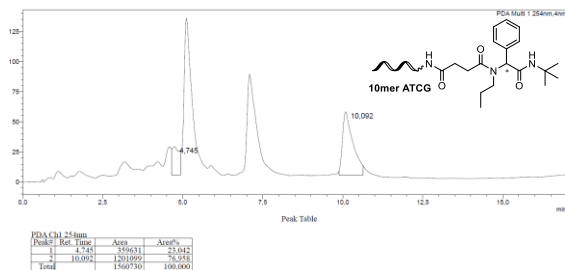
ATCG₁₀ 3az (analytische RP-HPLC I)



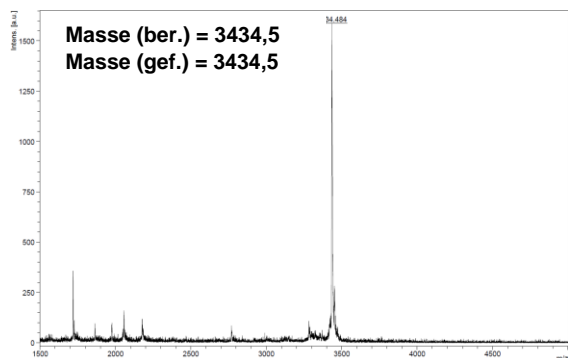
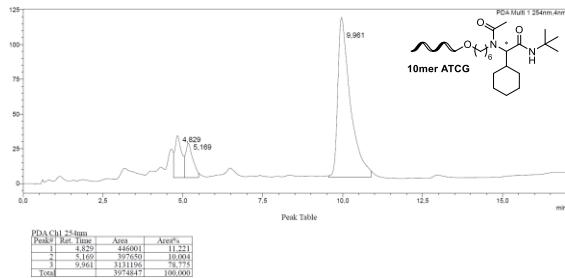
ATCG₁₀ 3ba (analytische RP-HPLC I)



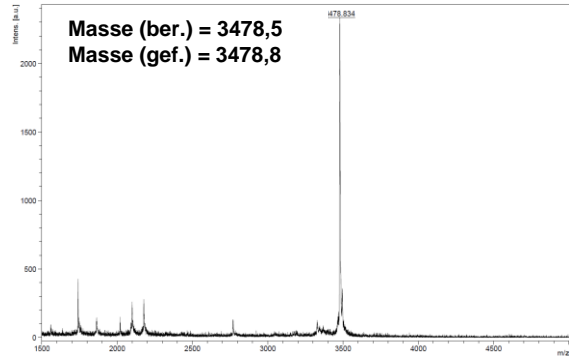
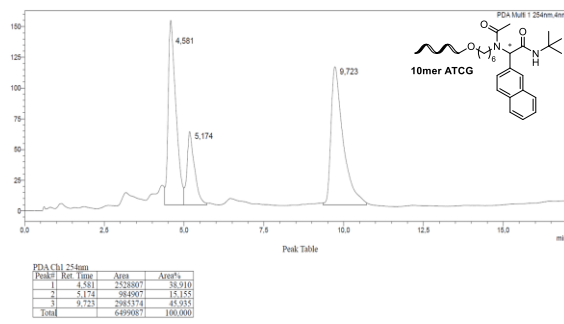
ATCG₁₀ 3bb (analytische RP-HPLC I)



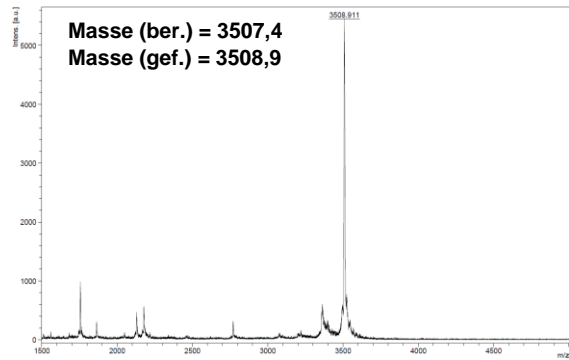
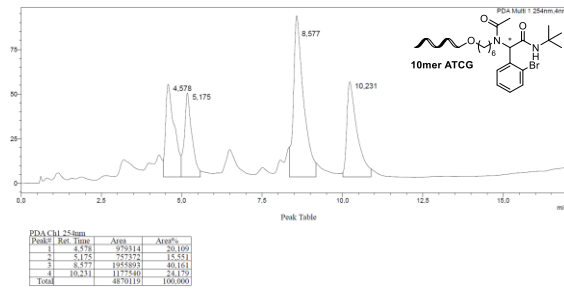
ATCG₁₀ 3bc (analytische RP-HPLC I)



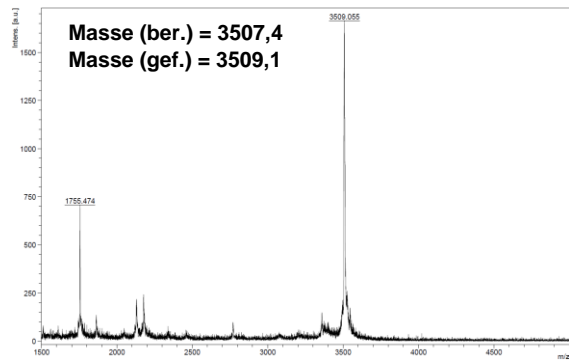
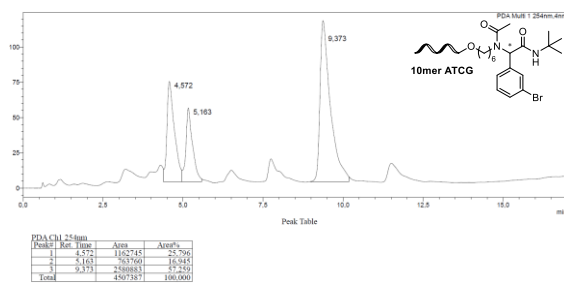
ATCG₁₀ 3bd (analytische RP-HPLC I)



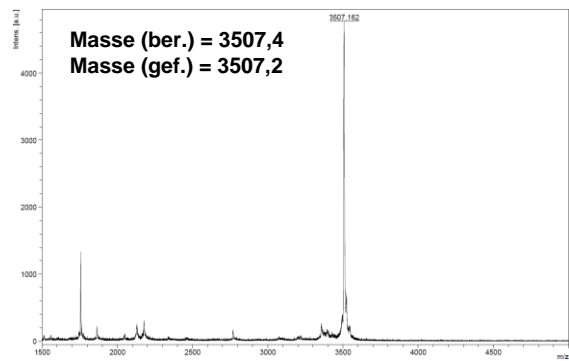
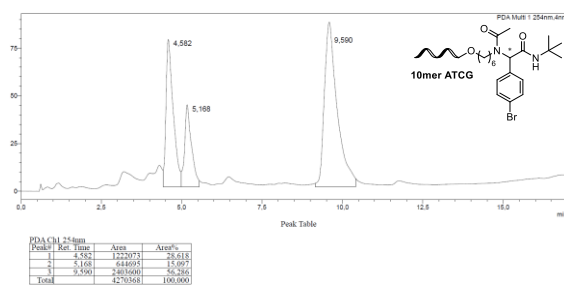
ATCG₁₀ 3be (analytische RP-HPLC I)



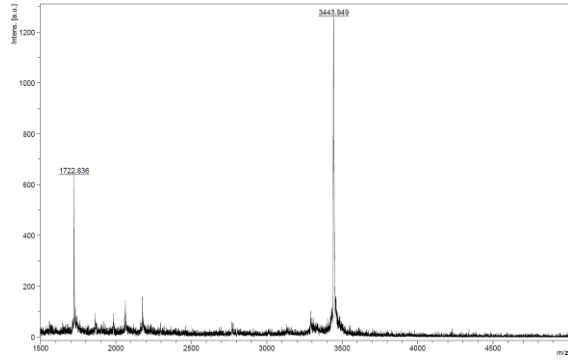
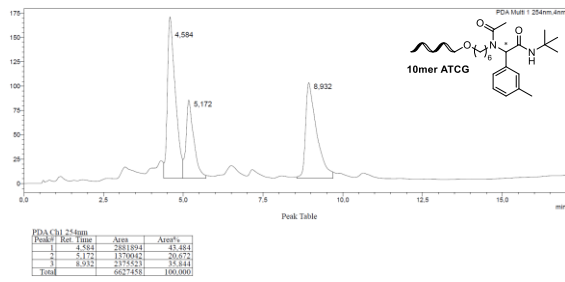
ATCG₁₀ 3bf (analytische RP-HPLC I)



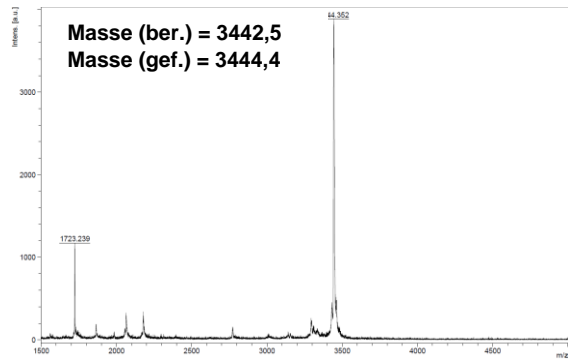
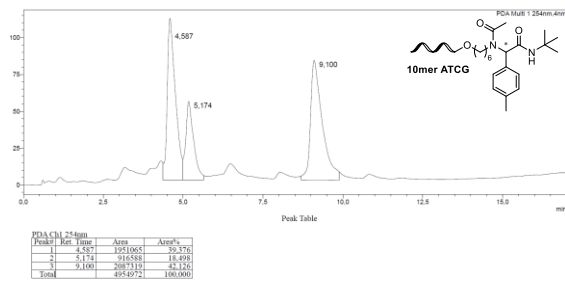
ATCG₁₀ 3bg (analytische RP-HPLC I)



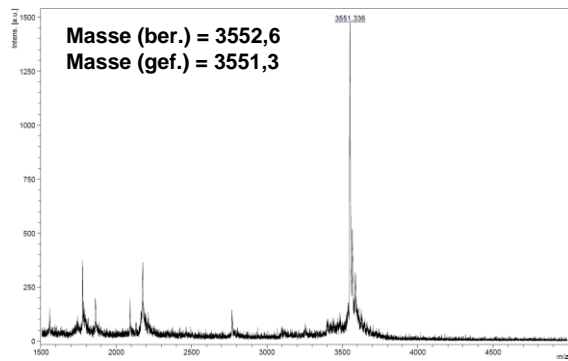
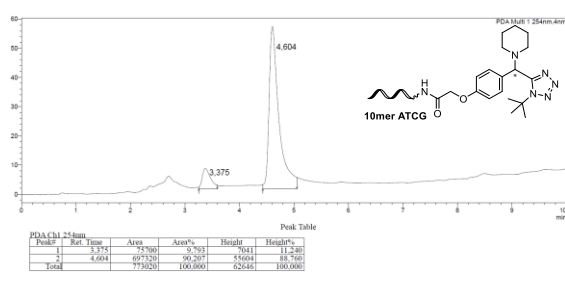
ATCG₁₀ 3b (analytische RP-HPLC I)



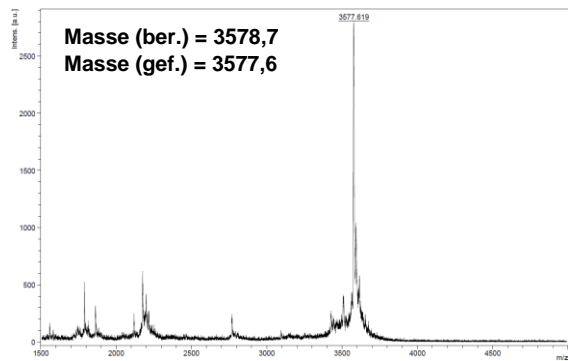
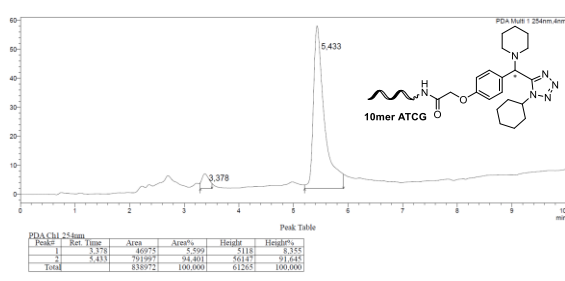
ATCG₁₀ 3bi (analytische RP-HPLC I)



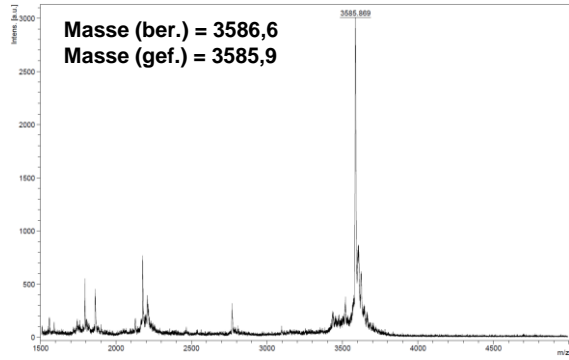
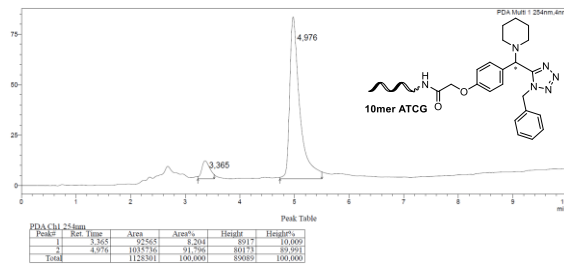
ATCG₁₀ 6a (analytische RP-HPLC I)



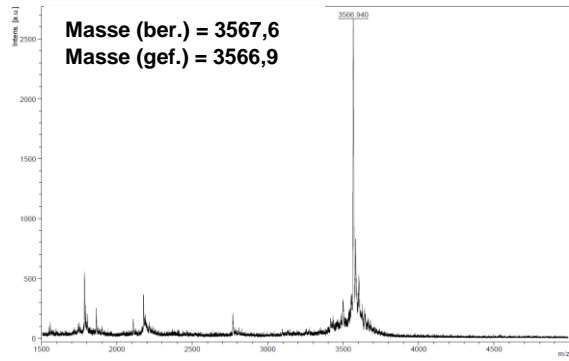
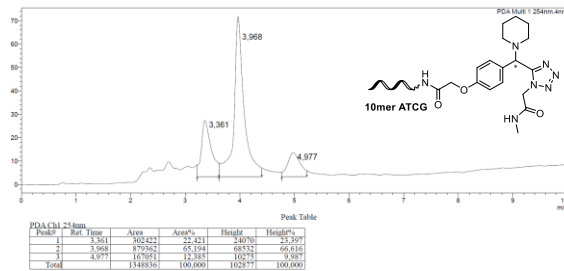
ATCG₁₀ 6b (analytische RP-HPLC I)



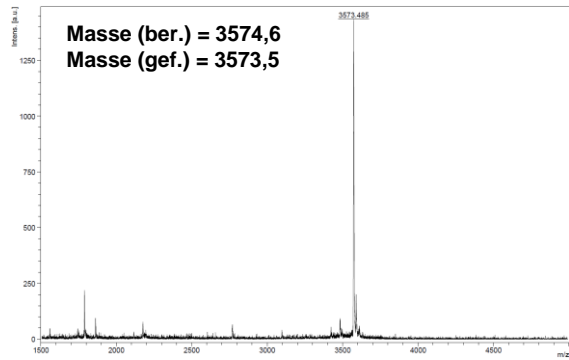
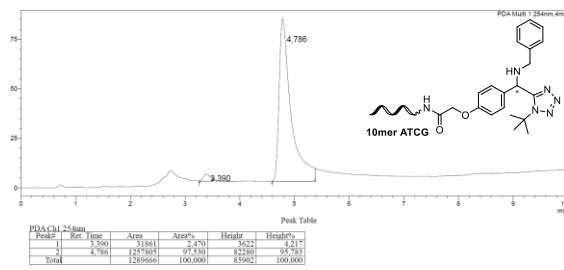
ATCG₁₀ 6c (analytische RP-HPLC I)



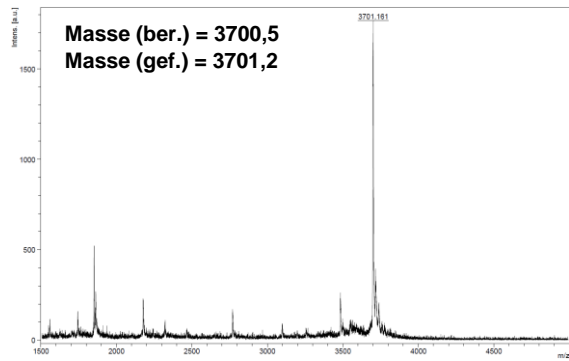
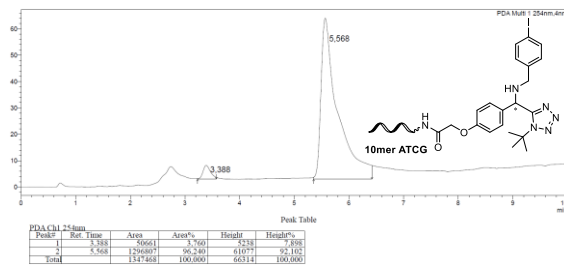
ATCG₁₀ 6d (analytische RP-HPLC I)



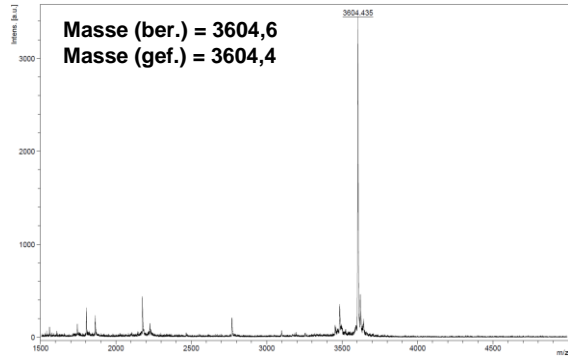
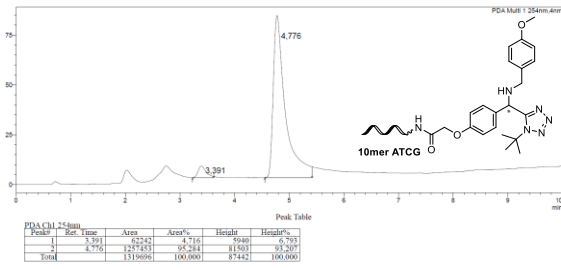
ATCG₁₀ 6e (analytische RP-HPLC I)



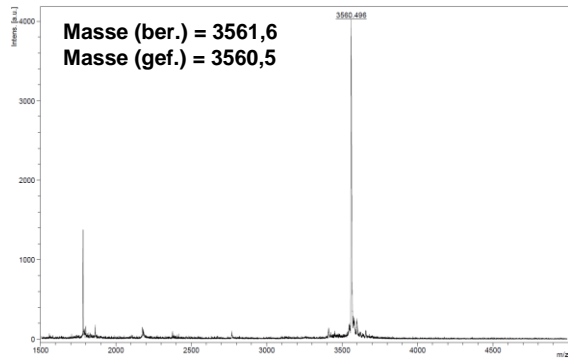
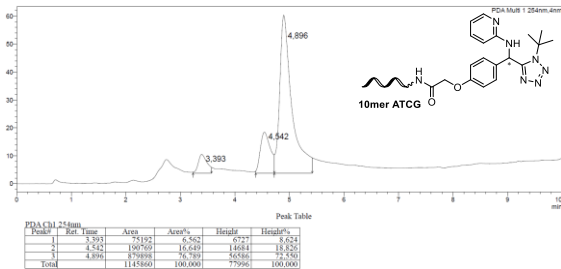
ATCG₁₀ 6f (analytische RP-HPLC I)



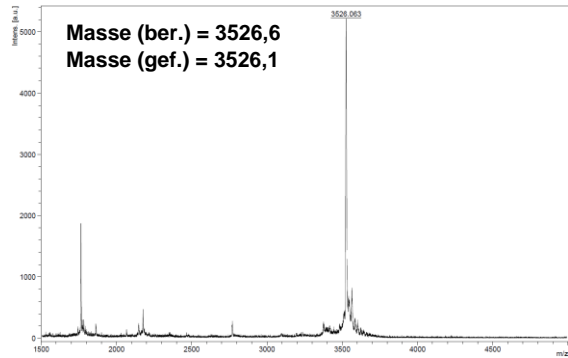
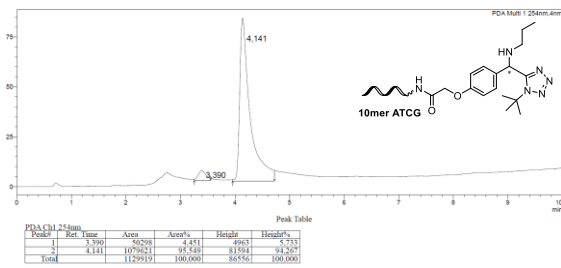
ATCG₁₀ 6g (analytische RP-HPLC I)



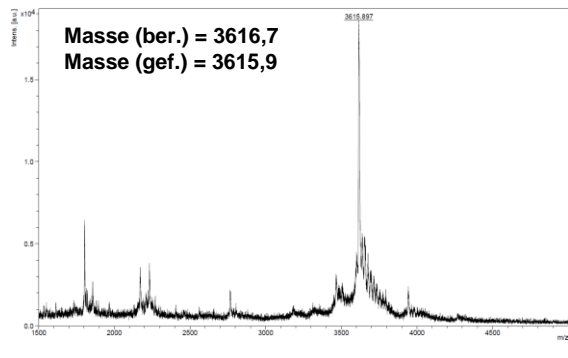
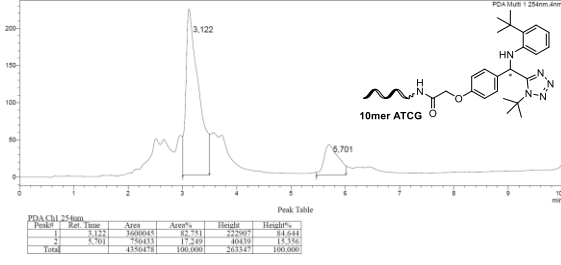
ATCG₁₀ 6h (analytische RP-HPLC I)



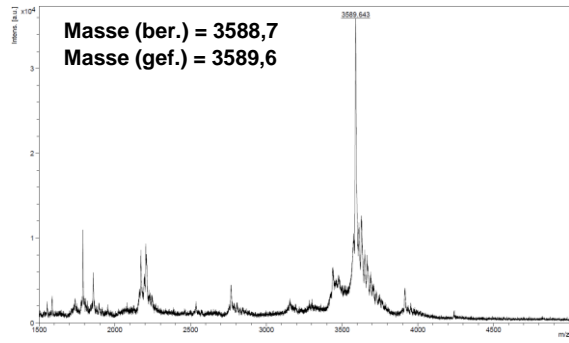
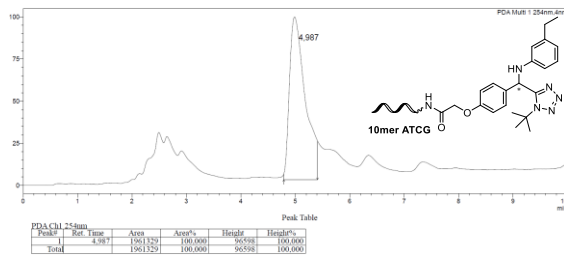
ATCG₁₀ 6i (analytische RP-HPLC I)



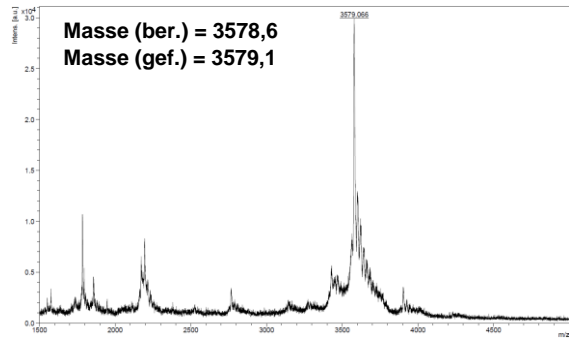
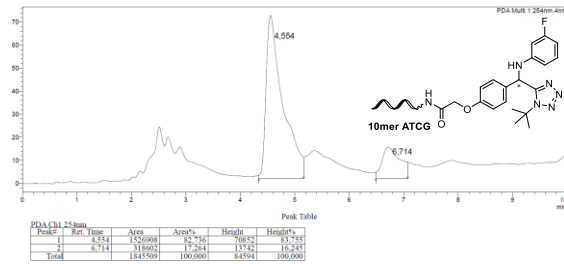
ATCG₁₀ 6j (analytische RP-HPLC I)



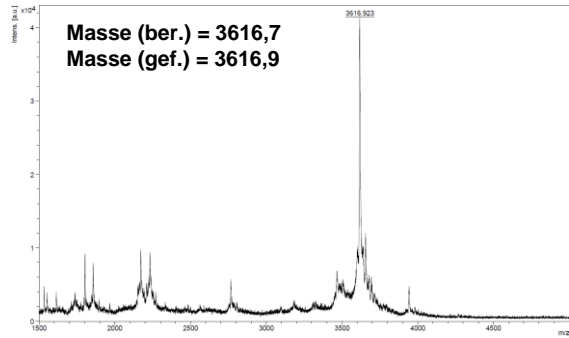
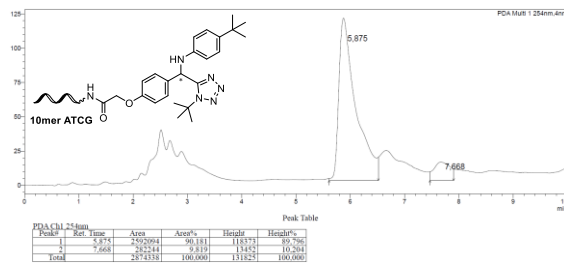
ATCG₁₀ 6I (analytische RP-HPLC I)



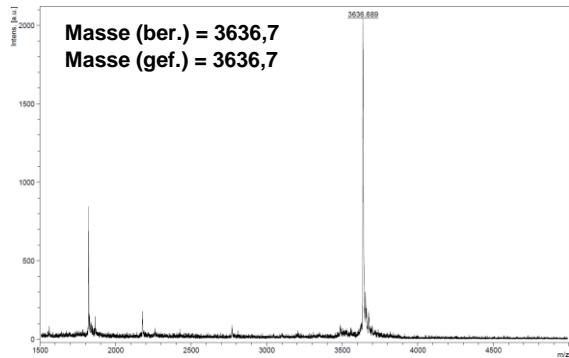
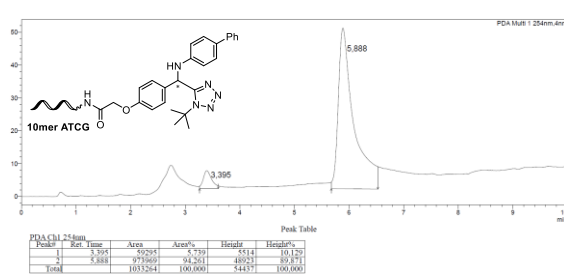
ATCG₁₀ 6m (analytische RP-HPLC I)



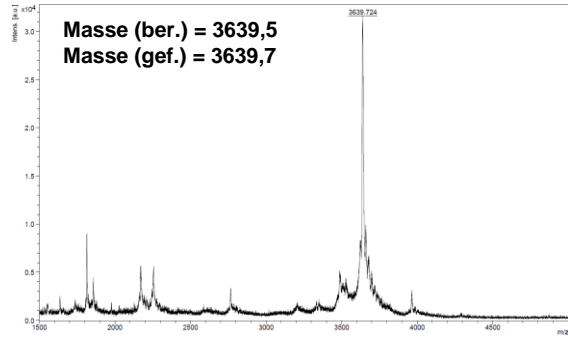
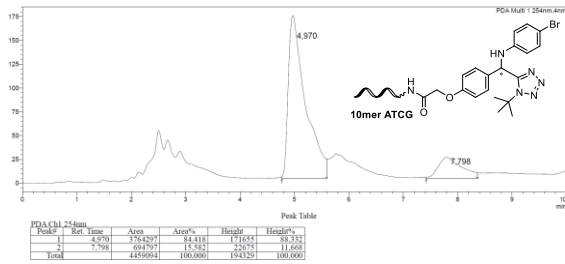
ATCG₁₀ 6n (analytische RP-HPLC I)



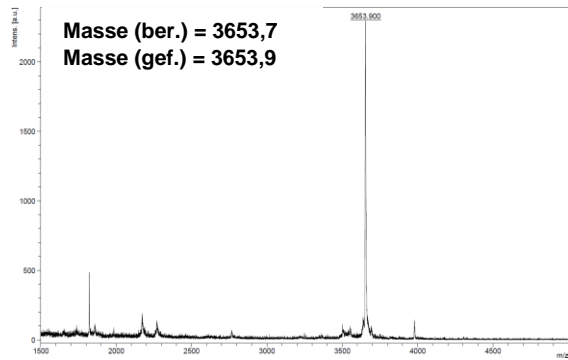
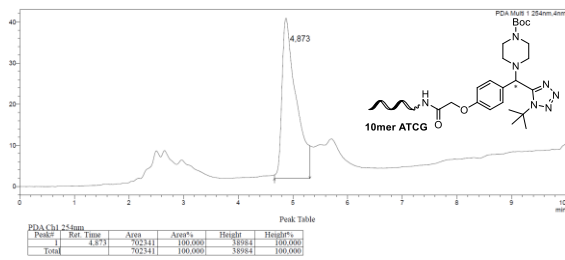
ATCG₁₀ 6o (analytische RP-HPLC I)



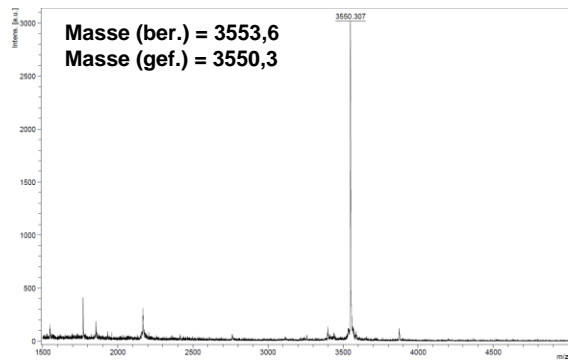
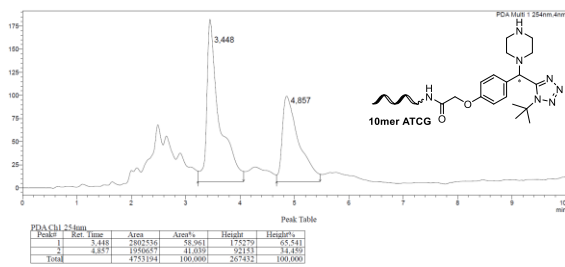
ATCG₁₀ 6p (analytische RP-HPLC I)



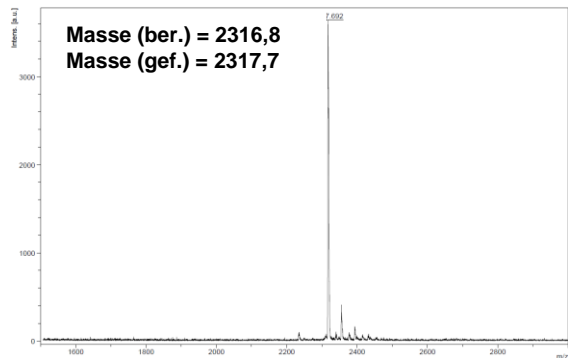
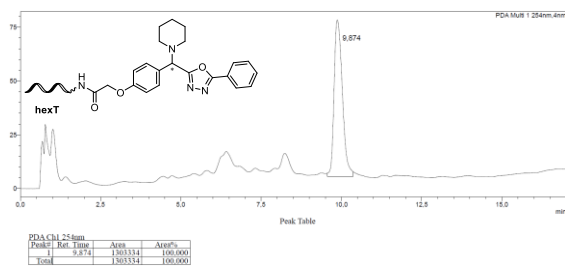
ATCG₁₀ 6q (analytische RP-HPLC I)



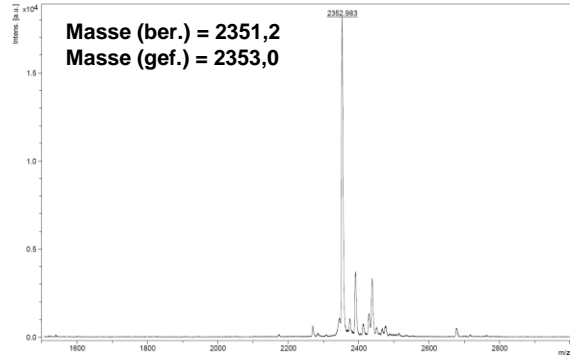
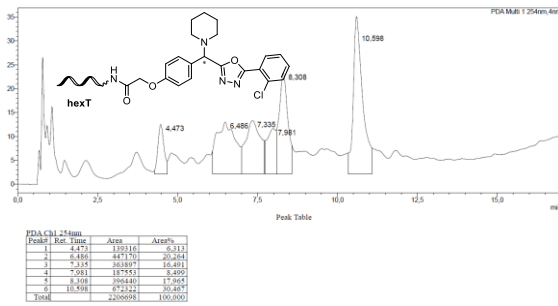
ATCG₁₀ 7 (analytische RP-HPLC I)



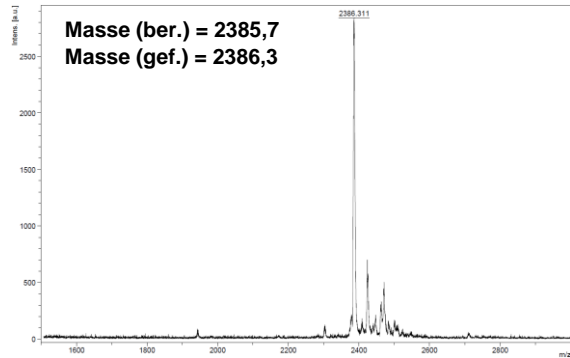
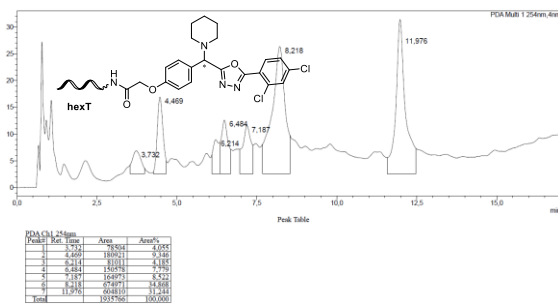
hexT 7a (präparative RP-HPLC, Methode 1)



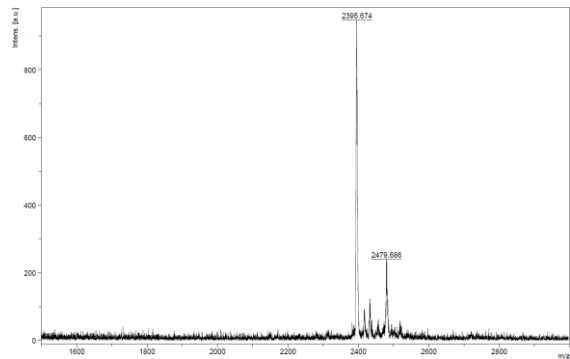
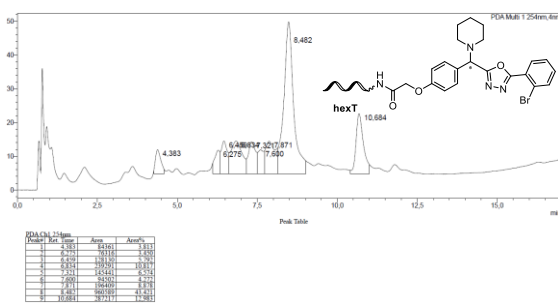
hexT 7b (präparative RP-HPLC, Methode 1)



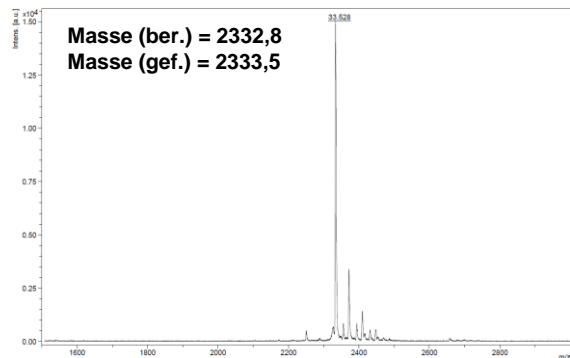
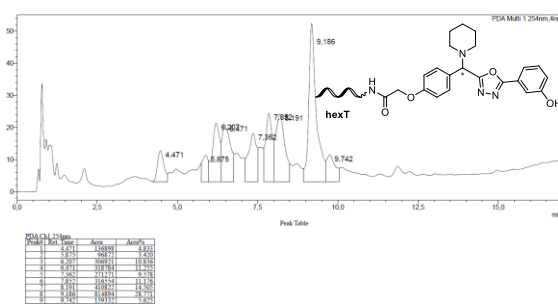
hexT 7c (präparative RP-HPLC, Methode 1)



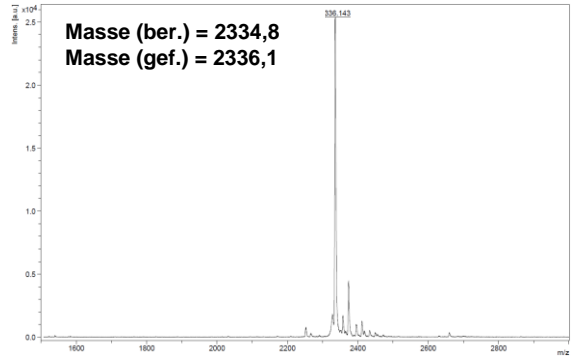
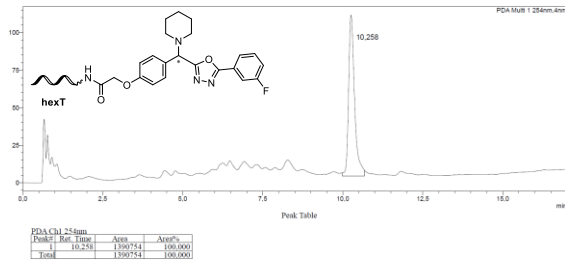
hexT 7d (präparative RP-HPLC, Methode 1)



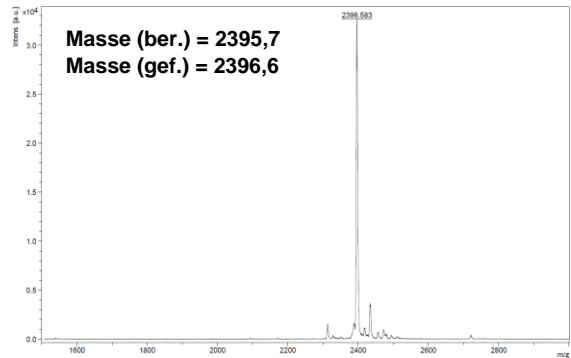
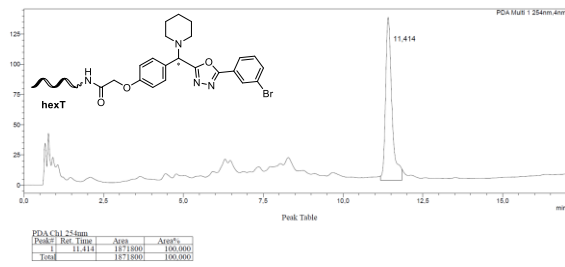
hexT 7e (präparative RP-HPLC, Methode 1)



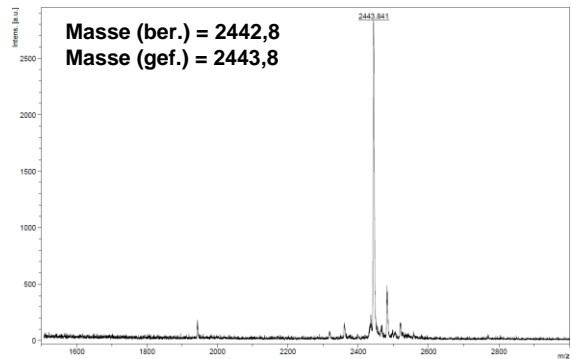
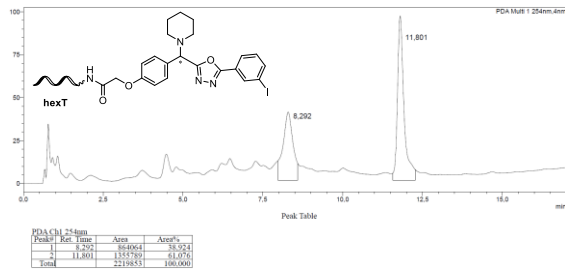
hexT 7f (präparative RP-HPLC, Methode 1)



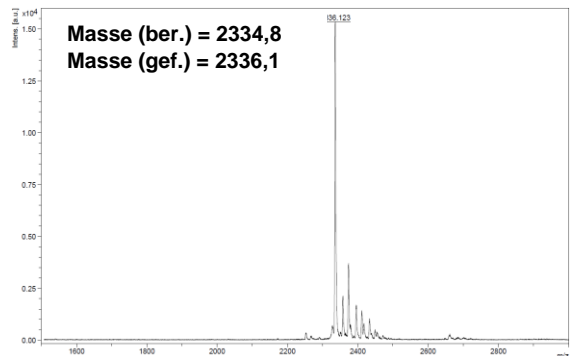
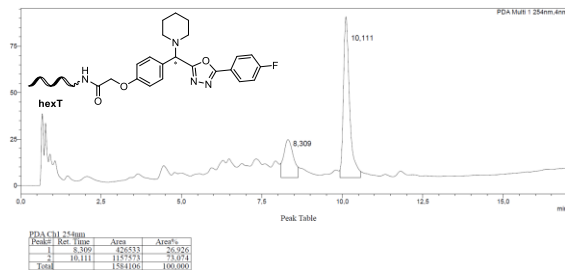
hexT 7g (präparative RP-HPLC, Methode 1)



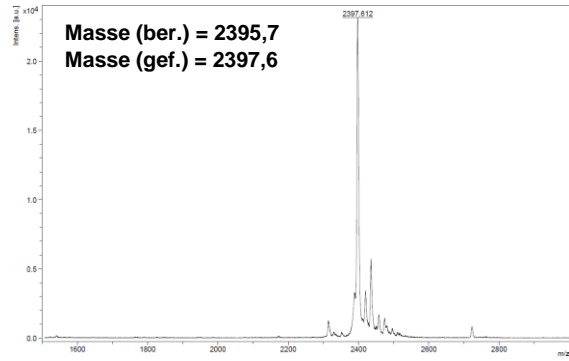
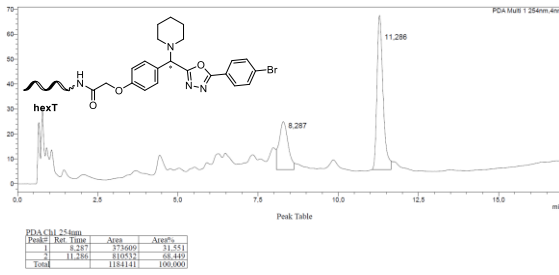
hexT 7h (präparative RP-HPLC, Methode 1)



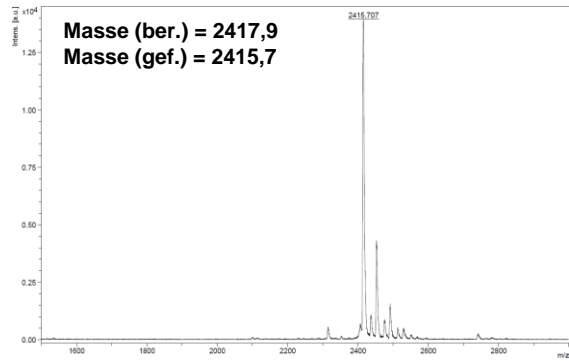
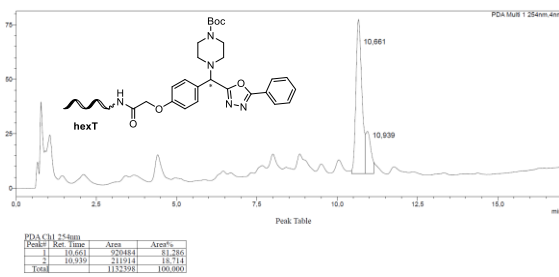
hexT 7i (präparative RP-HPLC, Methode 1)



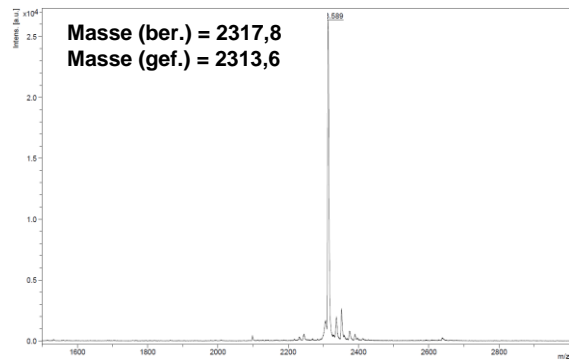
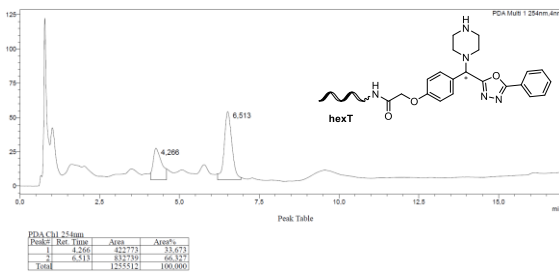
hexT 7j (präparative RP-HPLC, Methode 1)



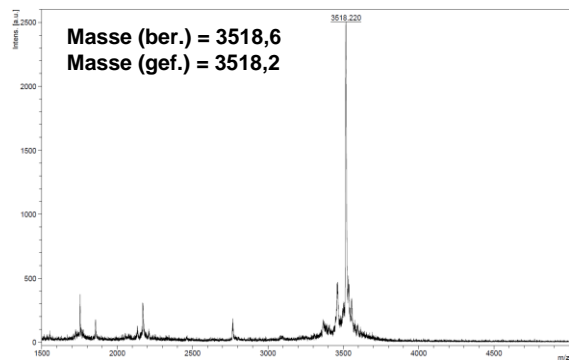
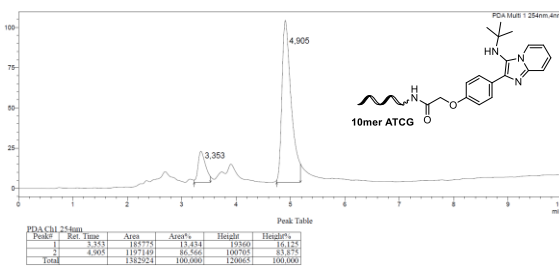
hexT 7k (präparative RP-HPLC, Methode 1)



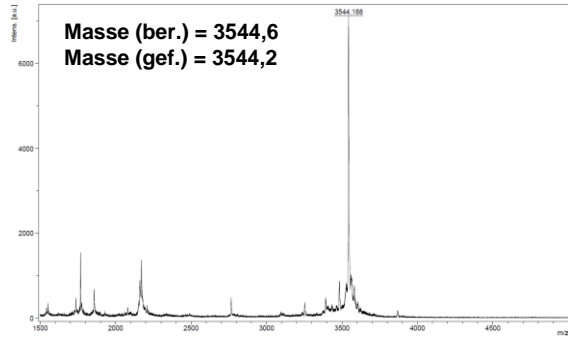
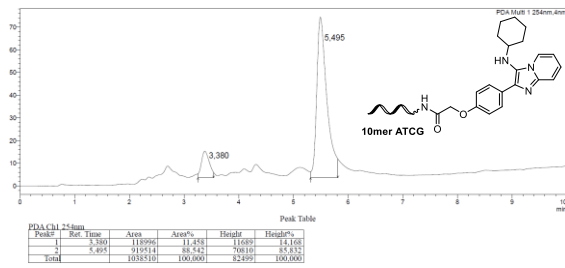
hexT 8 (präparative RP-HPLC, Methode 1)



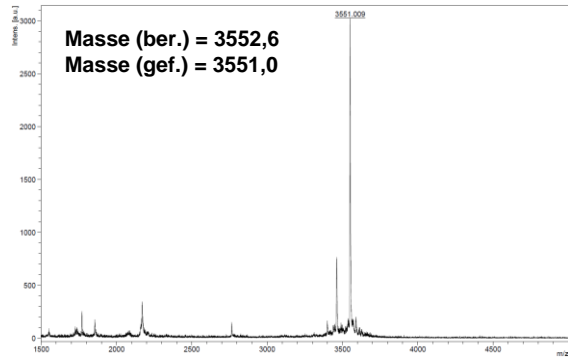
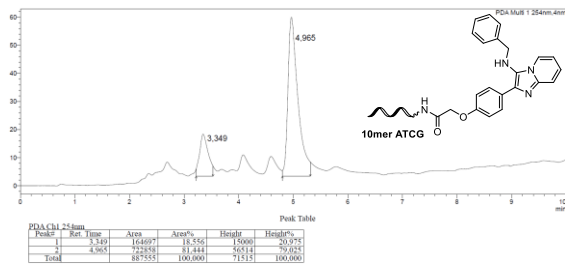
ATCG₁₀ 9a (analytische RP-HPLC I)



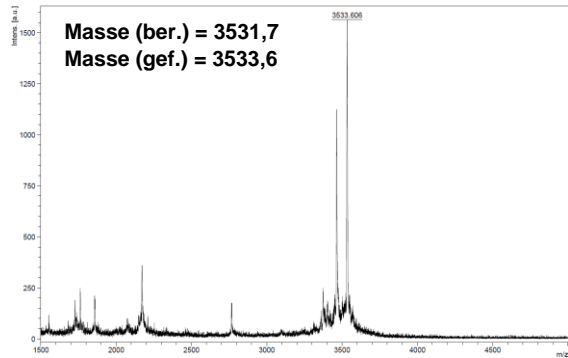
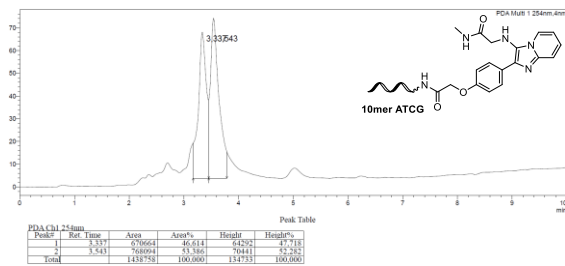
ATCG₁₀ 9b (analytische RP-HPLC I)



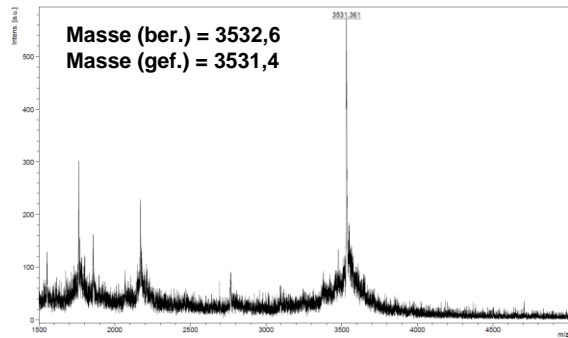
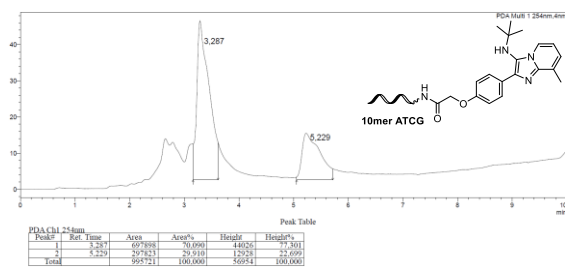
ATCG₁₀ 9c (analytische RP-HPLC I)



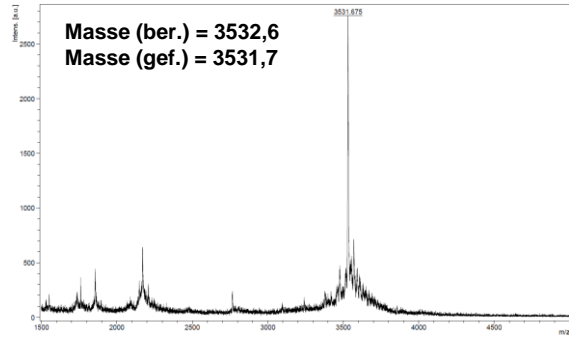
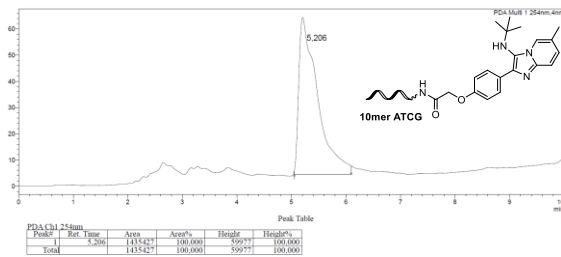
ATCG₁₀ 9d (analytische RP-HPLC I)



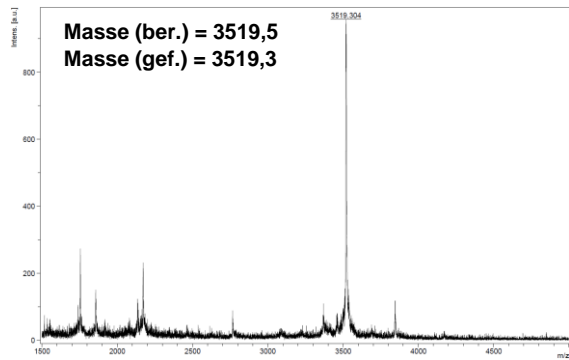
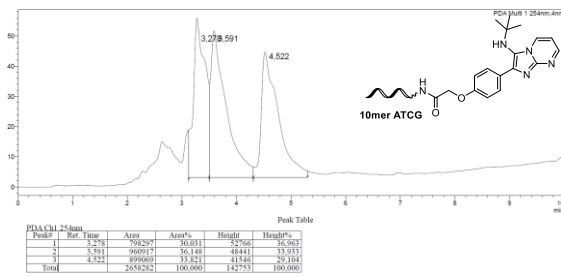
ATCG₁₀ 9e (analytische RP-HPLC I)



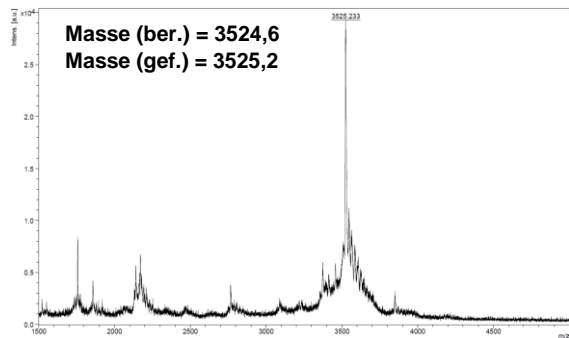
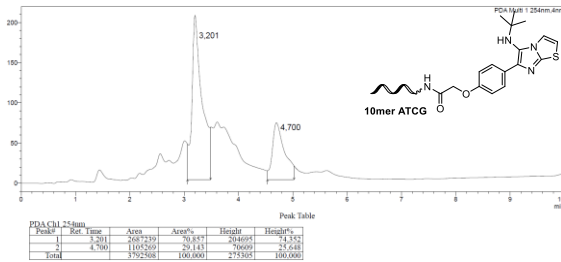
ATCG₁₀ 9f (analytische RP-HPLC I)



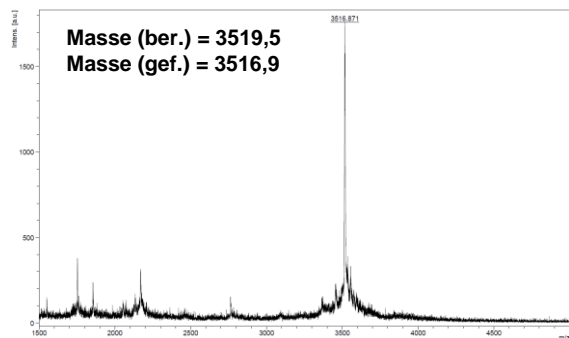
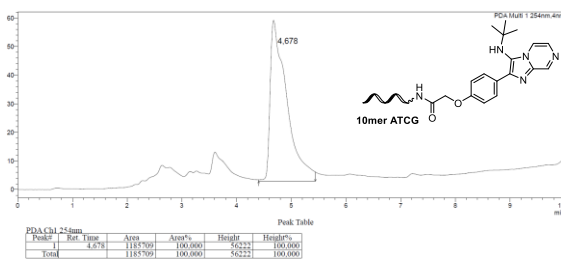
ATCG₁₀ 9g (analytische RP-HPLC I)



ATCG₁₀ 9h (analytische RP-HPLC I)

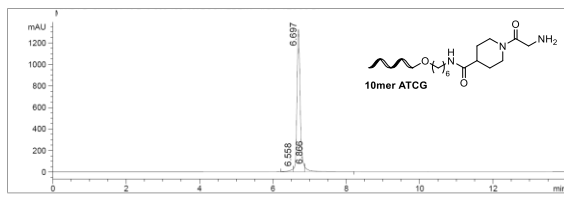


ATCG₁₀ 9i (analytische RP-HPLC I)



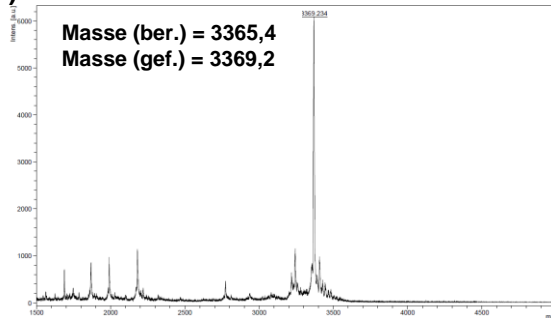
1,3-dipolare Cycloaddition – Startmaterialien

ATCG₁₀ 11 (analytische RP-HPLC II, Methode 1)



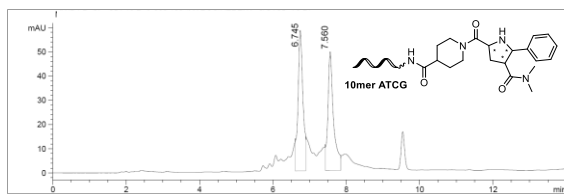
Peak list:

Ret. Time	Width min	Height	Area	Area %
6.558	0.113	28.109	189.879	2.189
6.697	0.102	1326.277	8087.587	93.226
6.866	0.136	48.641	397.785	4.585



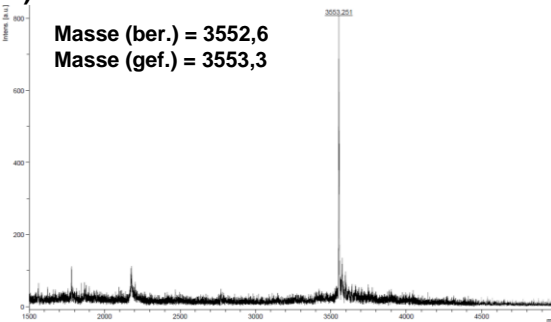
1,3-dipolare Cycloaddition – Produkte

ATCG₁₀ 12a (analytische RP-HPLC II, Methode 1)

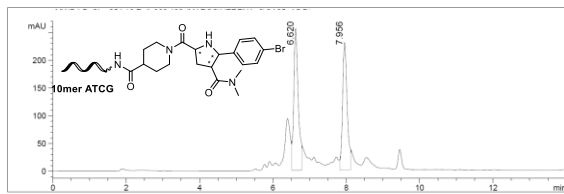


Peak list:

Ret. Time	Width min	Height	Area	Area %
6.745	0.157	57.984	547.737	50.801
7.560	0.180	49.041	530.466	49.199

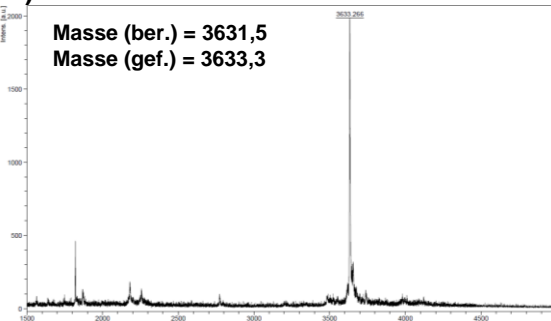


ATCG₁₀ 12b (analytische RP-HPLC II, Methode 1)

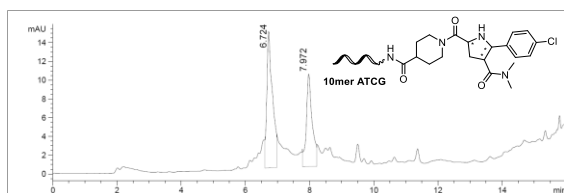


Peak list:

Ret. Time	Width min	Height	Area	Area %
6.620	0.142	256.333	2189.740	52.390
7.956	0.144	229.900	1989.920	47.610

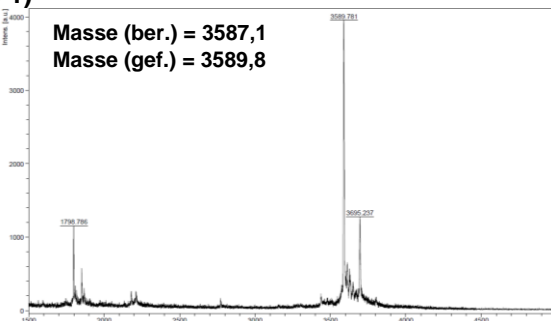


ATCG₁₀ 12c (analytische RP-HPLC II, Methode 1)

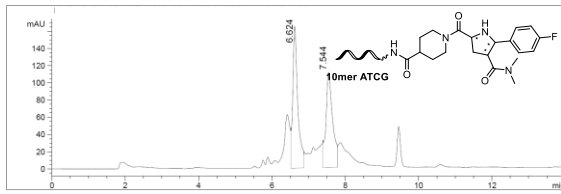


Peak list:

Ret. Time	Width min	Height	Area	Area %
6.724	0.205	14.574	179.067	58.672
7.972	0.213	9.881	126.132	41.328

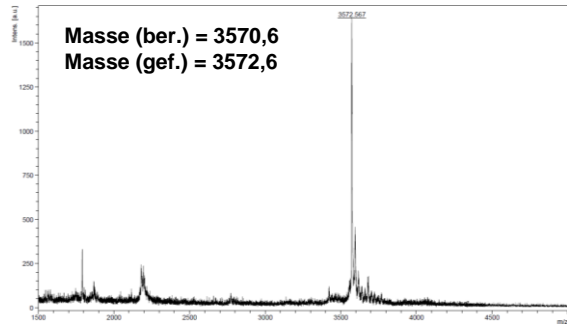


ATCG₁₀ 12d (analytische RP-HPLC II, Methode 1)

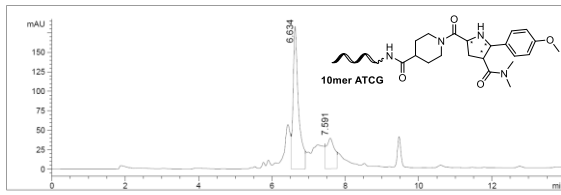


Peak list:

Ret. Time	Width min	Height	Area	Area %
6.624	0.159	164.699	1567.480	52.693
7.544	0.212	110.556	1407.250	47.307

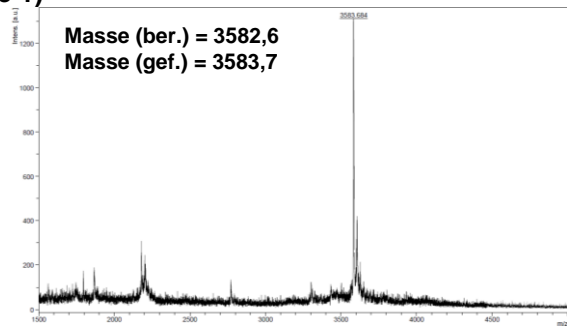


ATCG₁₀ 12e (analytische RP-HPLC II, Methode 1)

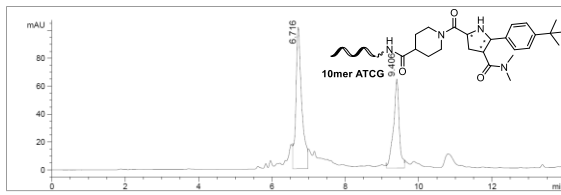


Peak list:

Ret. Time	Width min	Height	Area	Area %
6.634	0.170	183.070	1864.126	75.702
7.591	0.255	39.070	598.326	24.298

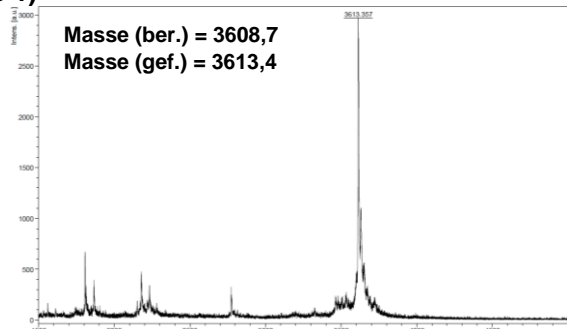


ATCG₁₀ 12f (analytische RP-HPLC II, Methode 1)

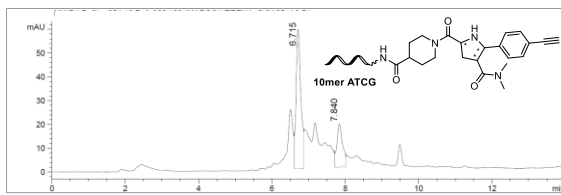


Peak list:

Ret. Time	Width min	Height	Area	Area %
6.716	0.186	101.417	1130.862	62.256
9.406	0.179	63.725	685.621	37.744

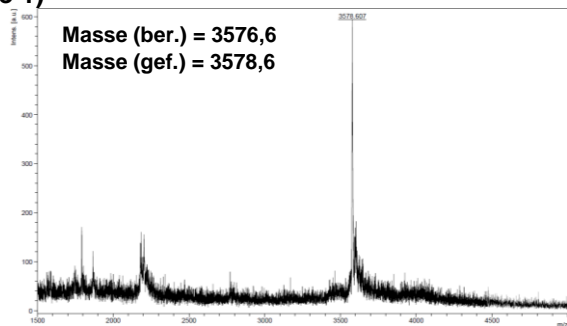


ATCG₁₀ 12g (analytische RP-HPLC II, Methode 1)

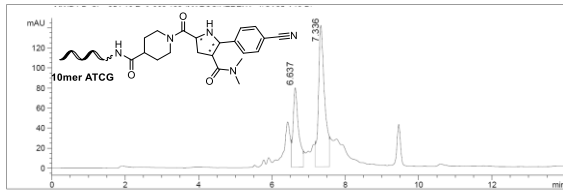


Peak list:

Ret. Time	Width min	Height	Area	Area %
6.715	0.155	58.577	545.278	73.632
7.840	0.180	18.108	195.268	26.368

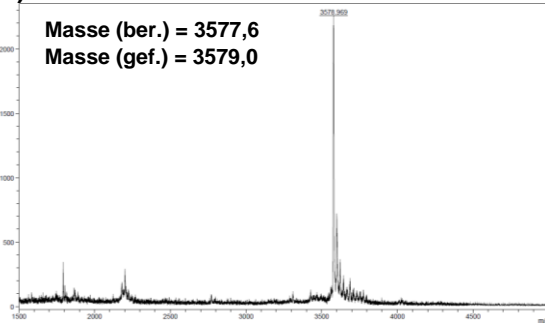


ATCG₁₀ 12h (analytische RP-HPLC II, Methode 1)

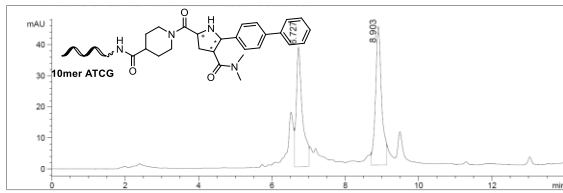


Peak list:

Ret. Time	Width min	Height	Area	Area %
6.637	0.174	79.215	828.028	33.236
7.336	0.197	141.059	1663.362	66.764

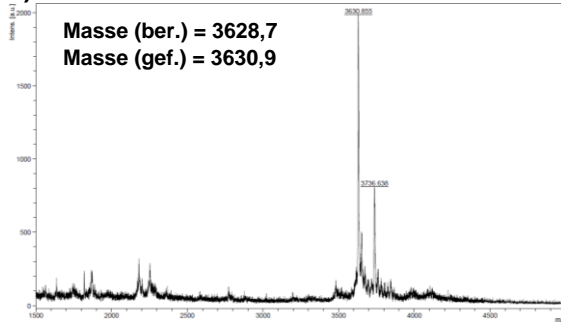


ATCG₁₀ 12i (analytische RP-HPLC II, Methode 1)

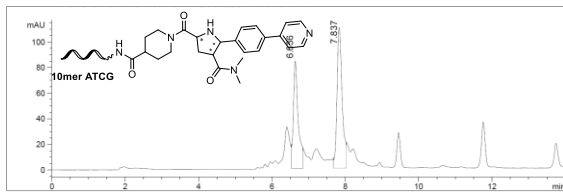


Peak list:

Ret. Time	Width min	Height	Area	Area %
6.727	0.191	38.479	441.614	46.180
8.903	0.192	44.631	514.677	53.820

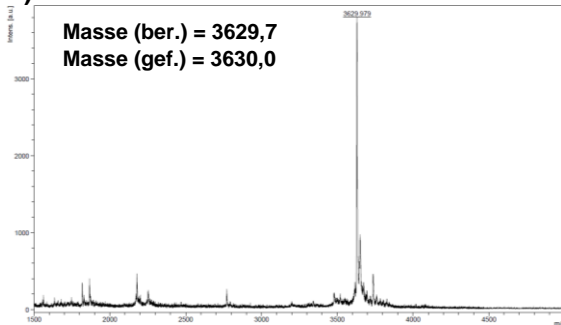


ATCG₁₀ 12j (analytische RP-HPLC II, Methode 1)

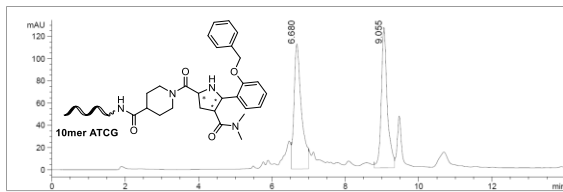


Peak list:

Ret. Time	Width min	Height	Area	Area %
6.636	0.153	84.040	771.274	41.742
7.837	0.163	110.072	1076.442	58.258

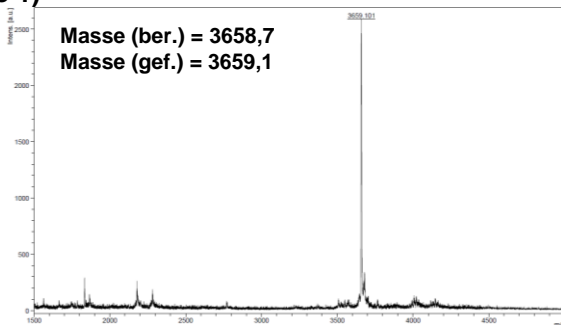


ATCG₁₀ 12k (analytische RP-HPLC II, Methode 1)

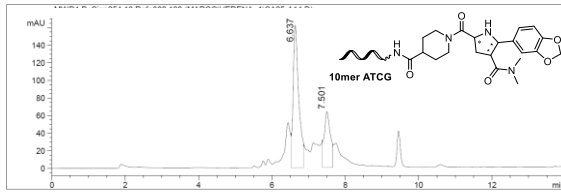


Peak list:

Ret. Time	Width min	Height	Area	Area %
6.680	0.233	112.505	1572.313	51.919
9.055	0.192	126.566	1456.082	48.081

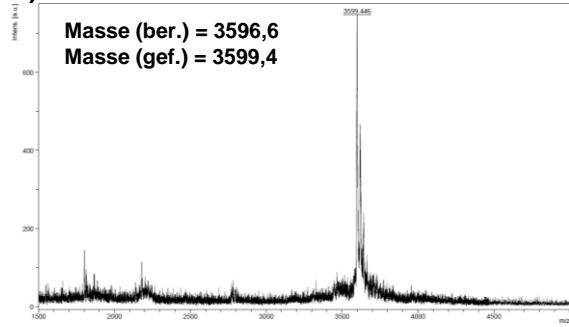


ATCG₁₀ 12i (analytische RP-HPLC II, Methode 1)

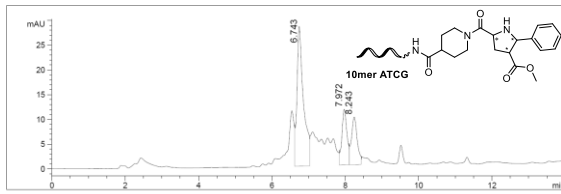


Peak list:

Ret. Time	Width min	Height	Area	Area %
6.637	0.178	161.991	1727.826	69.918
7.501	0.195	63.472	743.381	30.082

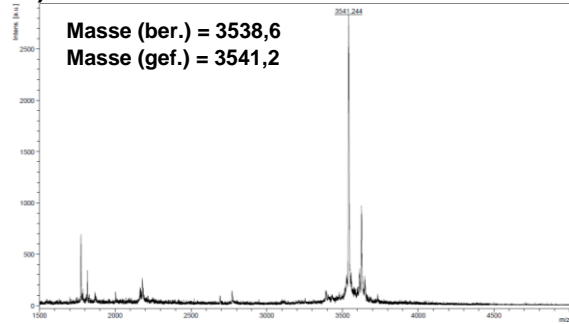


ATCG₁₀ 12n (analytische RP-HPLC II, Methode 1)

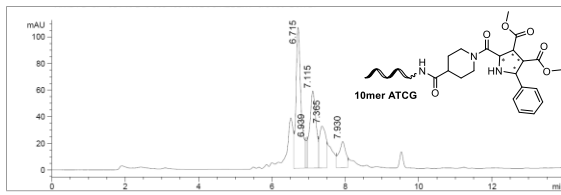


Peak list:

Ret. Time	Width min	Height	Area	Area %
6.743	0.208	28.257	352.390	62.056
7.972	0.162	13.238	109.190	19.229
8.243	0.184	9.626	106.275	18.715

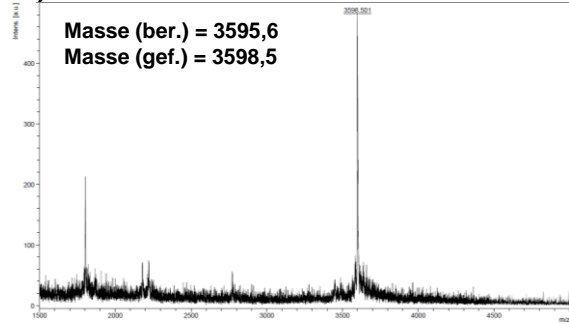


ATCG₁₀ 12o (analytische RP-HPLC II, Methode 1)



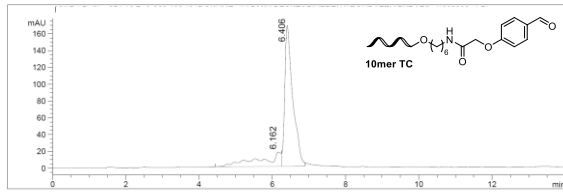
Peak list:

Ret. Time	Width min	Height	Area	Area %
6.715	0.159	105.996	1010.774	42.032
6.939	0.057	21.404	72.647	3.021
7.115	0.201	57.967	699.485	29.087
7.365	0.197	31.390	370.204	15.395
7.930	0.214	19.632	251.653	10.465



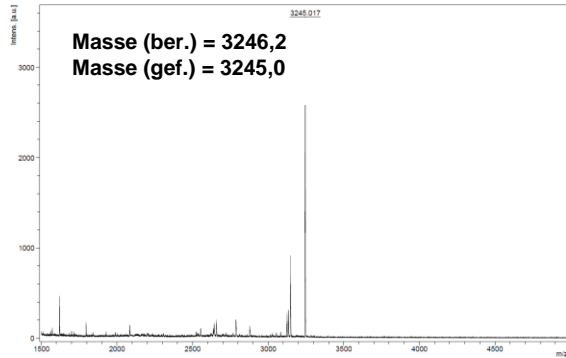
Yb(PFO)₃-vermittelte Dreikomponentenreaktion zur Darstellung von Pyrazolen – Startmaterialien

TC₁₀ 2 (analytische RP-HPLC II, Methode 2)

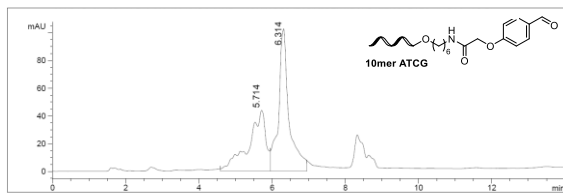


Peak list:

Ret. Time	Width min	Height	Area	Area %
6.162	0.647	17.099	664.211	20.717
6.406	0.253	167.781	2541.909	79.283

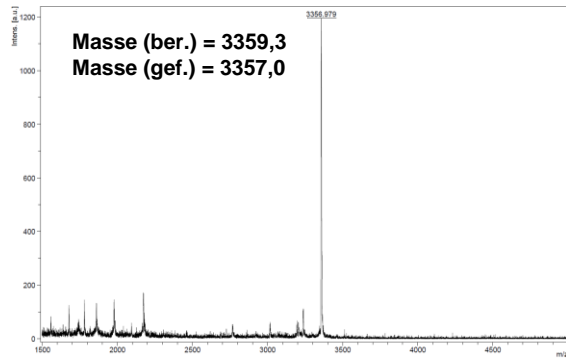


ATCG₁₀ 2a (analytische RP-HPLC II, Methode 2)



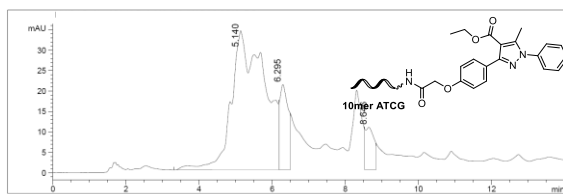
Peak list:

Ret. Time	Width min	Height	Area	Area %
5.714	0.554	43.897	1457.896	41.631
6.314	0.332	102.670	2044.085	58.369



Yb(PFO)₃-vermittelte Dreikomponentenreaktion zur Darstellung von Pyrazolen – Produkte

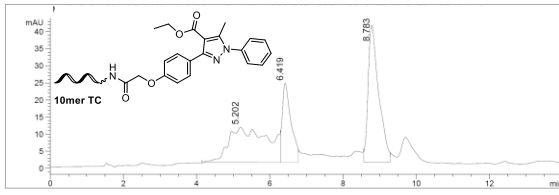
ATCG₁₀ 3 (analytische RP-HPLC II, Methode 2)



Peak list:

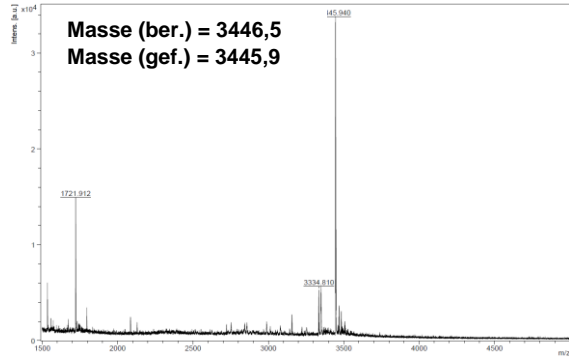
Ret. Time	Width min	Height	Area	Area %
5.140	1.048	33.973	2136.606	81.556
6.295	0.255	20.825	319.143	12.182
8.646	0.264	10.365	164.057	6.262

TC₁₀ 3a (analytische RP-HPLC II, Methode 2)

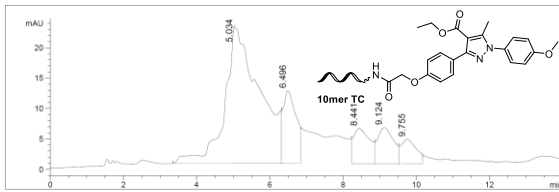


Peak list:

Ret. Time	Width min	Height	Area	Area %
5.202	1.224	10.328	758.468	38.816
6.419	0.277	23.261	387.187	19.815
8.783	0.335	40.175	808.360	41.369

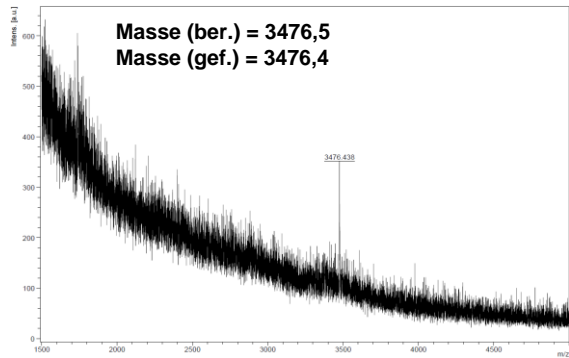


TC₁₀ 3b (analytische RP-HPLC II, Methode 2)

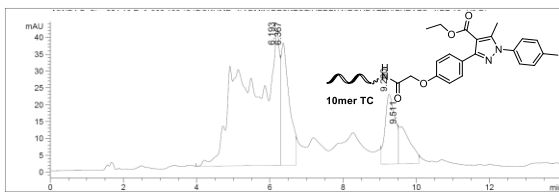


Peak list:

Ret. Time	Width min	Height	Area	Area %
5.034	1.087	22.600	1474.621	65.615
6.496	0.415	11.986	298.494	13.282
8.441	0.520	5.773	180.203	8.038
9.124	0.502	5.930	178.623	7.948
9.755	0.480	4.012	115.444	5.137

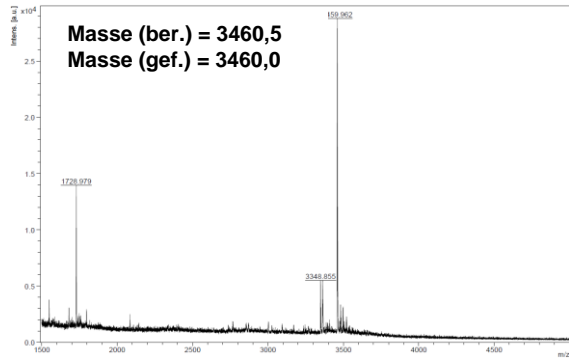


TC₁₀ 3c (analytische RP-HPLC II, Methode 2)

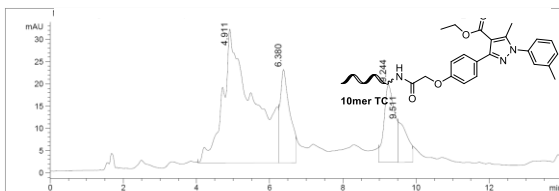


Peak list:

Ret. Time	Width min	Height	Area	Area %
6.393	0.996	40.547	2399.449	66.360
6.367	0.265	36.310	577.148	15.962
9.260	0.319	20.704	396.026	10.953
9.511	0.302	11.021	243.194	6.726

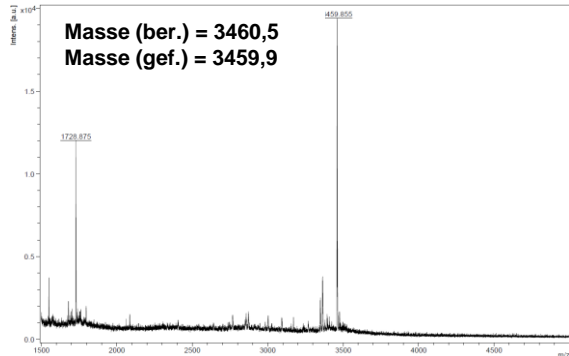


TC₁₀ 3d (analytische RP-HPLC II, Methode 2)

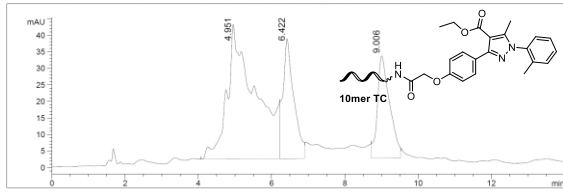


Peak list:

Ret. Time	Width min	Height	Area	Area %
4.911	0.937	30.085	1691.087	65.216
6.380	0.305	20.968	383.136	14.778
9.244	0.344	17.401	358.920	13.842
9.511	0.216	9.159	159.844	6.164

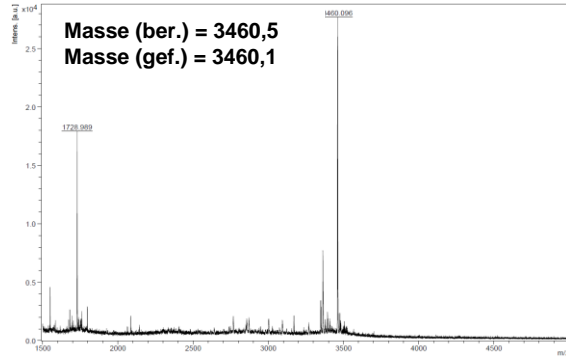


TC₁₀ 3e (analytische RP-HPLC II, Methode 2)

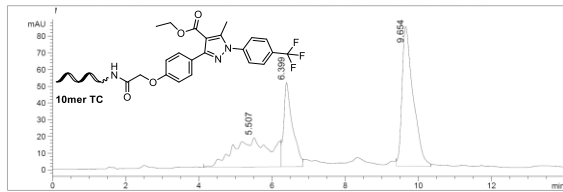


Peak list:

Ret. Time	Width min	Height	Area	Area %
4.951	0.882	40.630	2149.685	59.353
6.422	0.349	36.202	758.679	20.947
9.006	0.385	30.857	713.490	19.700

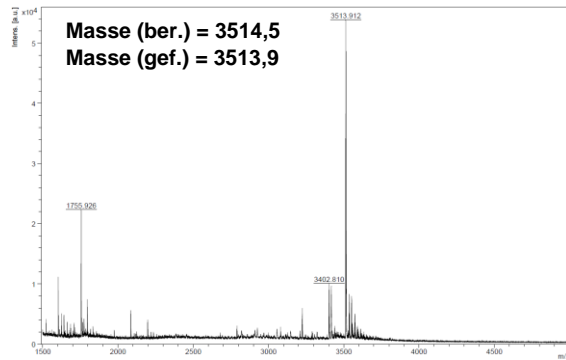


TC₁₀ 3f (analytische RP-HPLC II, Methode 2)

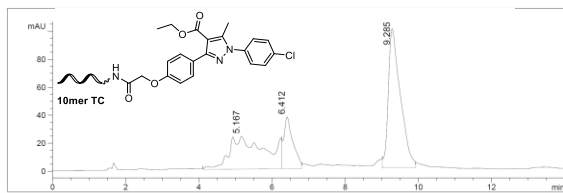


Peak list:

Ret. Time	Width min	Height	Area	Area %
5.507	1.161	17.415	1213.370	31.803
6.399	0.278	50.327	840.584	22.032
9.654	0.352	83.472	1761.365	46.166

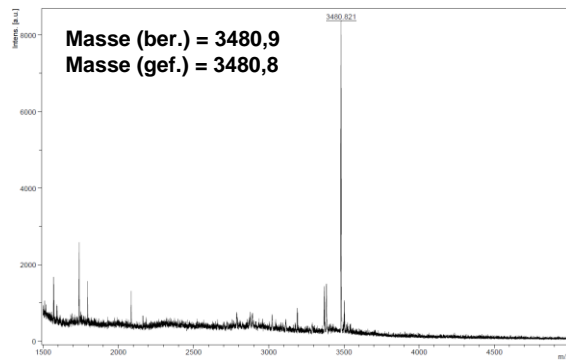


TC₁₀ 3g (analytische RP-HPLC II, Methode 2)

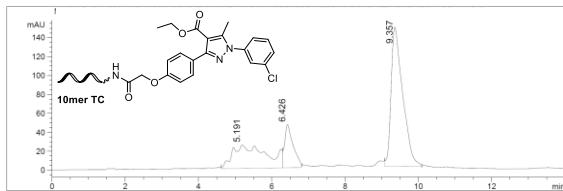


Peak list:

Ret. Time	Width min	Height	Area	Area %
5.167	1.108	23.503	1562.729	34.687
6.412	0.299	37.148	665.384	14.769
9.285	0.382	99.417	2277.163	50.544

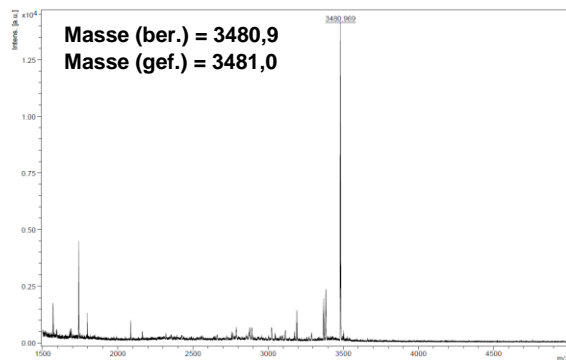


TC₁₀ 3h (analytische RP-HPLC II, Methode 2)

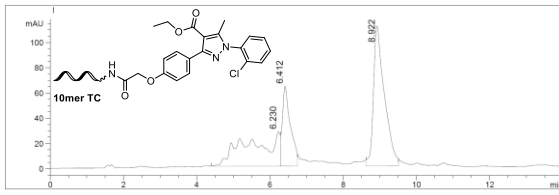


Peak list:

Ret. Time	Width min	Height	Area	Area %
5.191	1.058	24.772	1572.105	28.323
6.426	0.271	45.839	744.919	13.421
9.357	0.367	147.025	3233.514	58.256

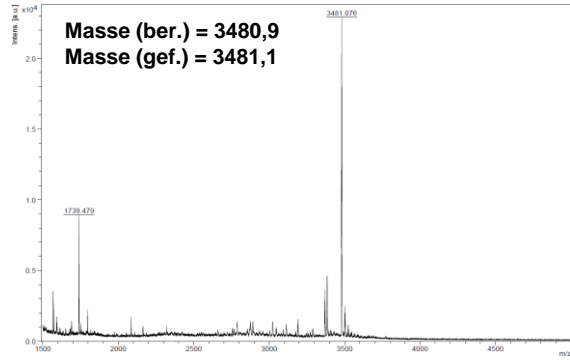


TC₁₀ 3i (analytische RP-HPLC II, Methode 2)

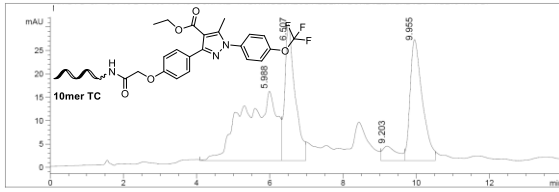


Peak list:

Ret. Time	Width min	Height	Area	Area %
6.230	0.935	27.170	1524.992	31.771
6.412	0.252	63.357	956.994	19.937
8.922	0.348	110.871	2338.004	48.292

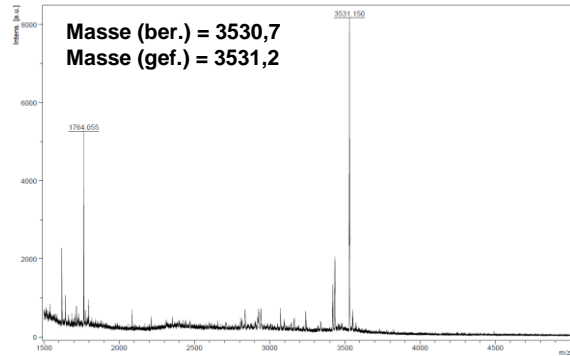


TC₁₀ 3j (analytische RP-HPLC II, Methode 2)



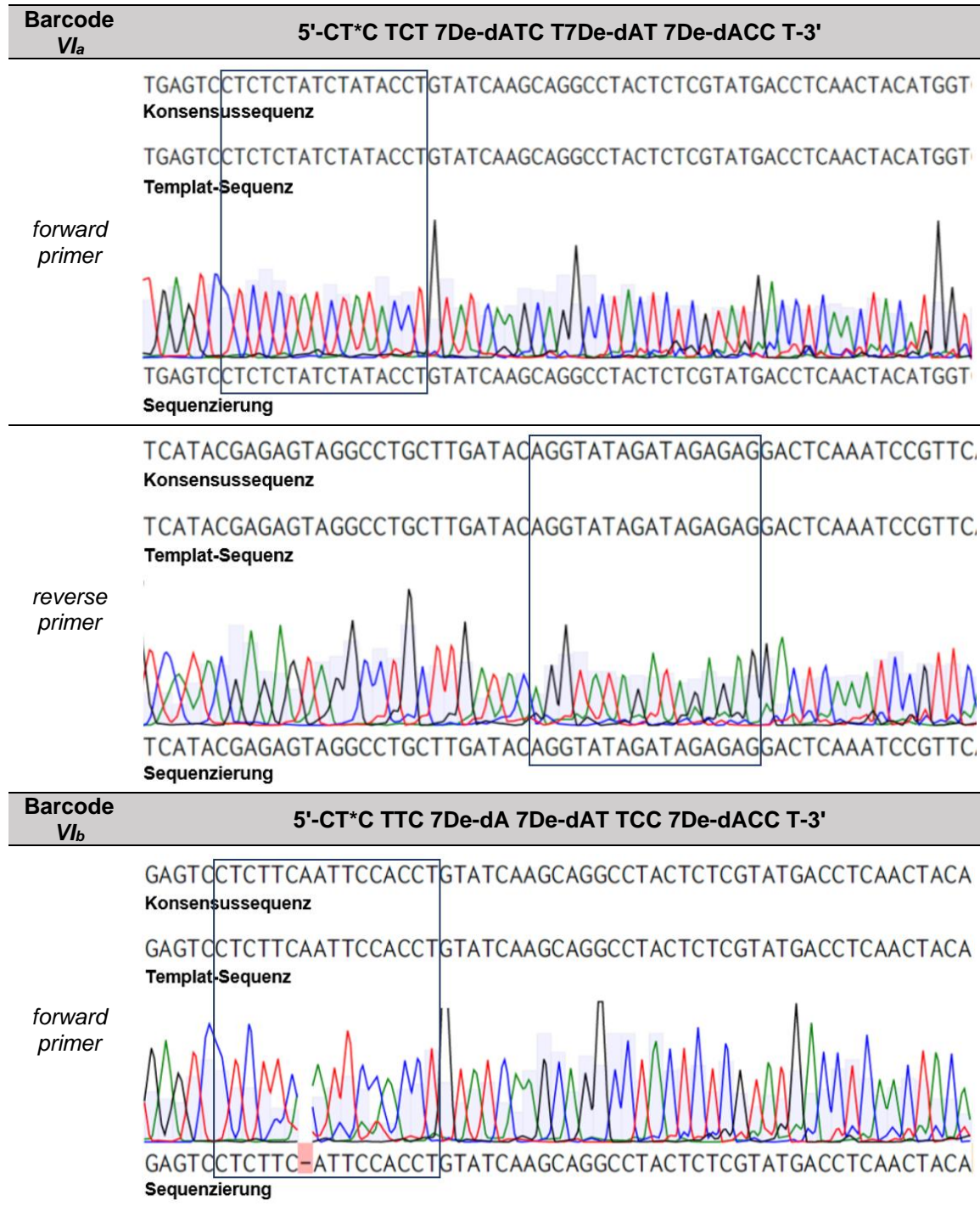
Peak list:

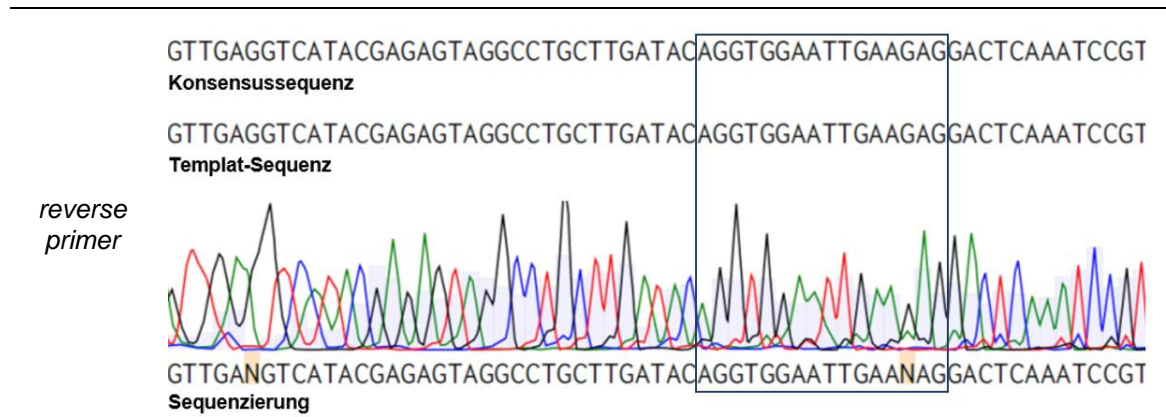
Ret. Time	Width min	Height	Area	Area %
5.988	1.078	14.873	962.057	43.330
6.507	0.324	29.247	569.223	25.637
9.203	0.467	3.132	87.728	3.951
9.955	0.386	25.940	601.274	27.081



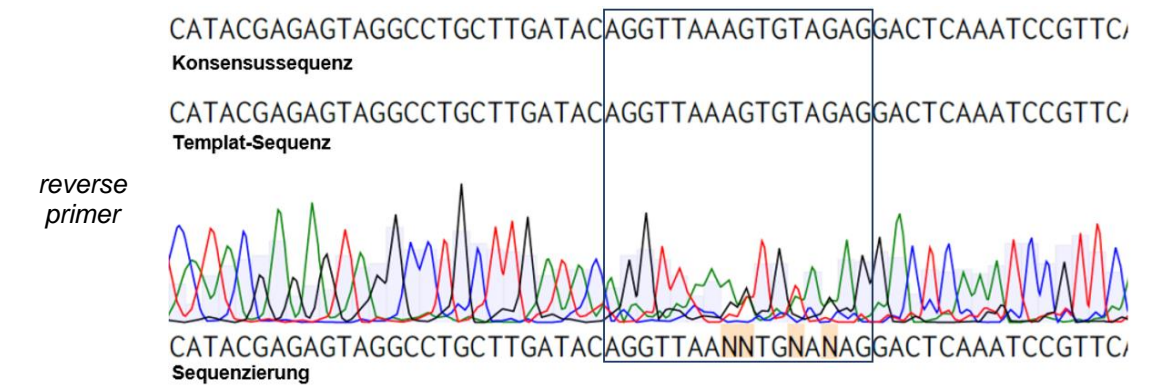
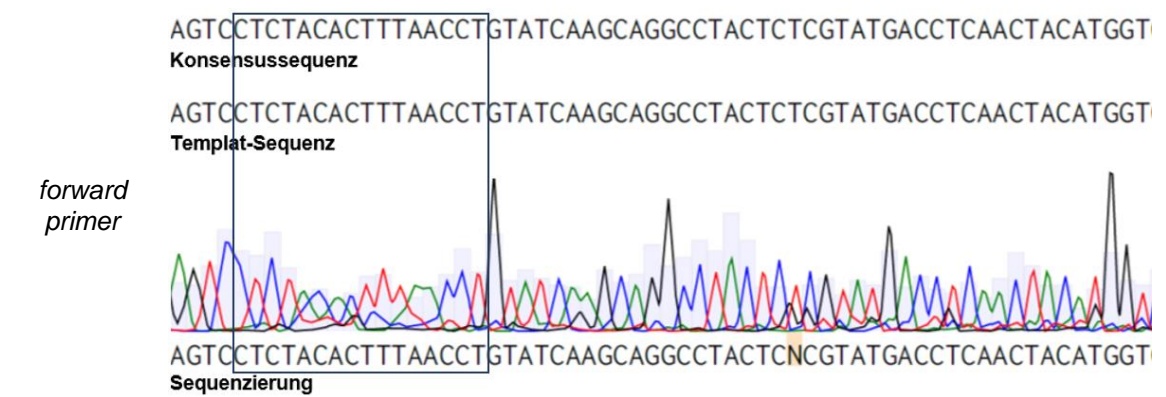
Studien zur chemischen Stabilisierung von DNA-Oligonukleotiden für die DEL-Synthese

Tabelle 28: Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung der amplifizierten Ligationsprodukte *HP-VI_{a-e}-VII-VIII/VI-VII-VIII*. Es wurden die DNA-Sequenzen, welche anstelle der natürlichen Nukleobase Adenin aus chemisch modifiziertem 7-Deazaadenin bestanden, mit einem dunkelblauen Kasten umrandet. Das Alignment der Sequenzierungsdaten erfolgte mit Hilfe der Software *Benchling* (2020). T* = Ethynyl-dU wurde mit N₃-PEG(4)-NH-Fmoc **80** mittels CuAAC modifiziert, gefolgt von einer Fmoc-Entschützung und darauffolgender Acetylierung der freien Aminofunktion.

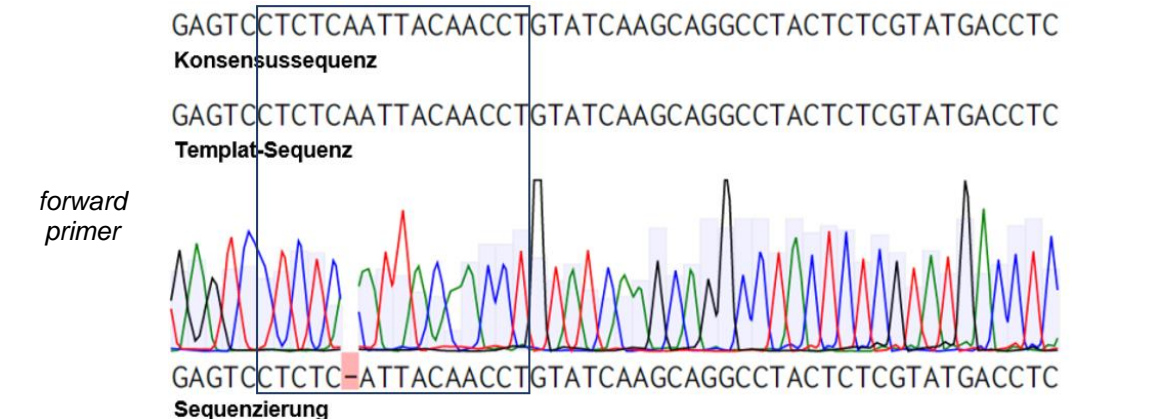


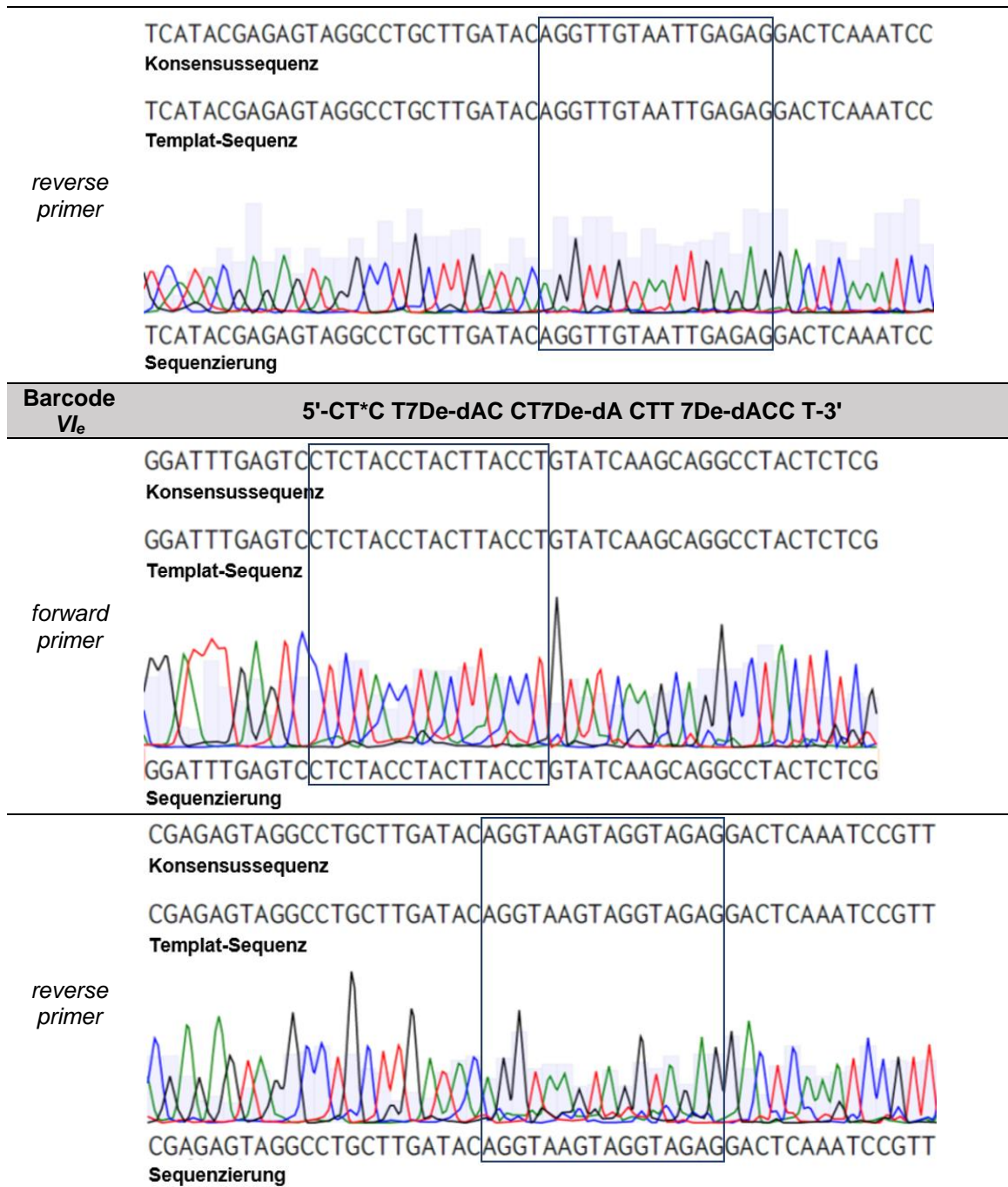


Barcode VI_c **5'-CT*C T7De-dAC 7De-dACT TT7De-dA 7De-dACC T-3'**



Barcode VI_d **5'-CT*C TC7De-dA 7De-dATT 7De-dAC7De-dA 7De-dACC T-3'**





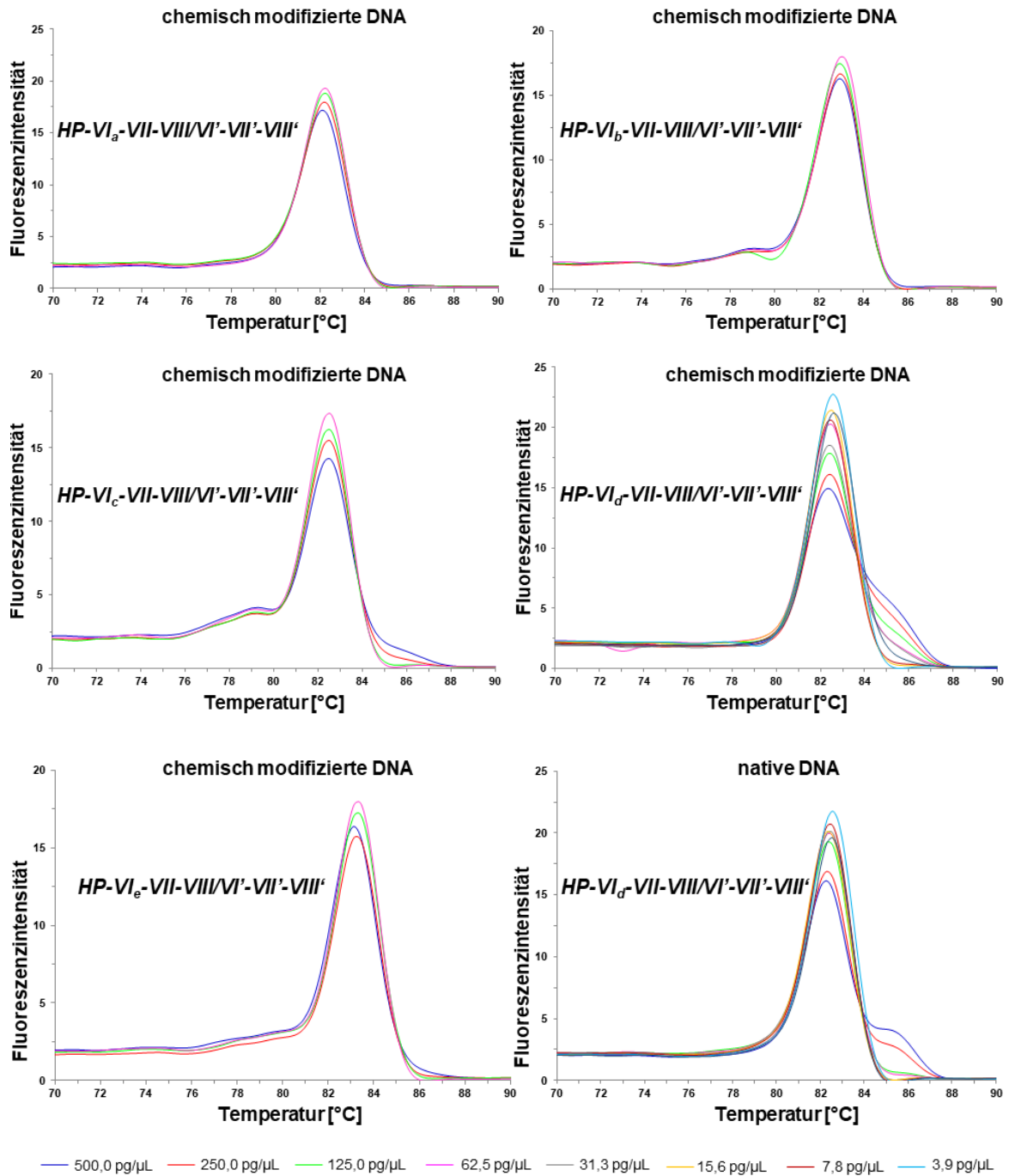


Abbildung 45: Darstellung der Schmelzkurven, welche im Anschluss an die Echtzeit-PCR der 7-Deazaadenin-enhaltenden Ligationsprodukte *HP-VI_{a-e}-VII-VIII/VI'-VII'-VIII'* und des nativen Ligationsproduktes *HP-VI_d-VII-VIII/VI'-VII'-VIII'* ermittelt wurden. Für die Echtzeit-PCR wurde eine Verdünnungsreihe des jeweiligen DNA-Templats verwendet.

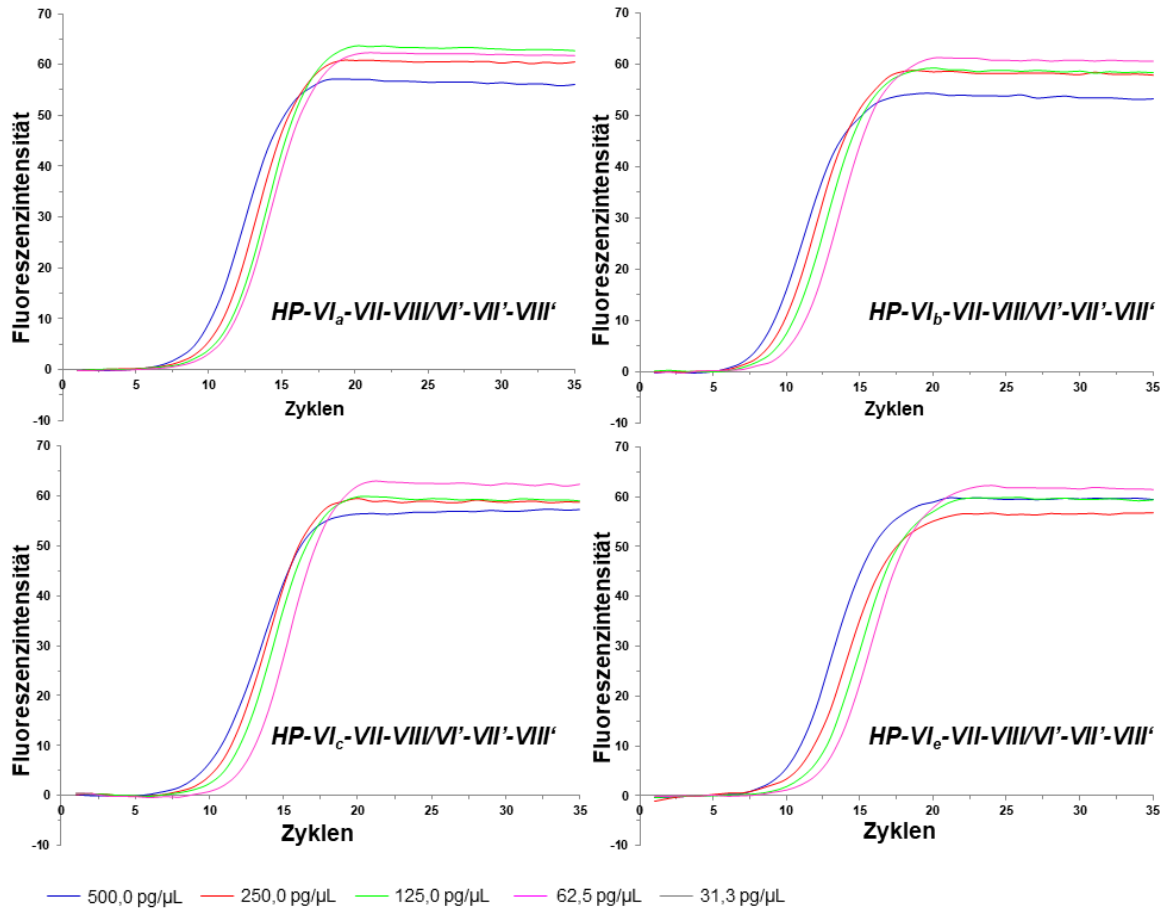


Abbildung 46: Amplifikationskurven (Echtzeit-PCR) der 7-Deazaadenin-enthaltenen Ligationsprodukte *HP-VI_{a-c,e}-VII-VIII/VI'-VII'-VIII'*. Für die Echtzeit-PCR wurde eine Verdünnungsreihe des jeweiligen DNA-Templats verwendet.

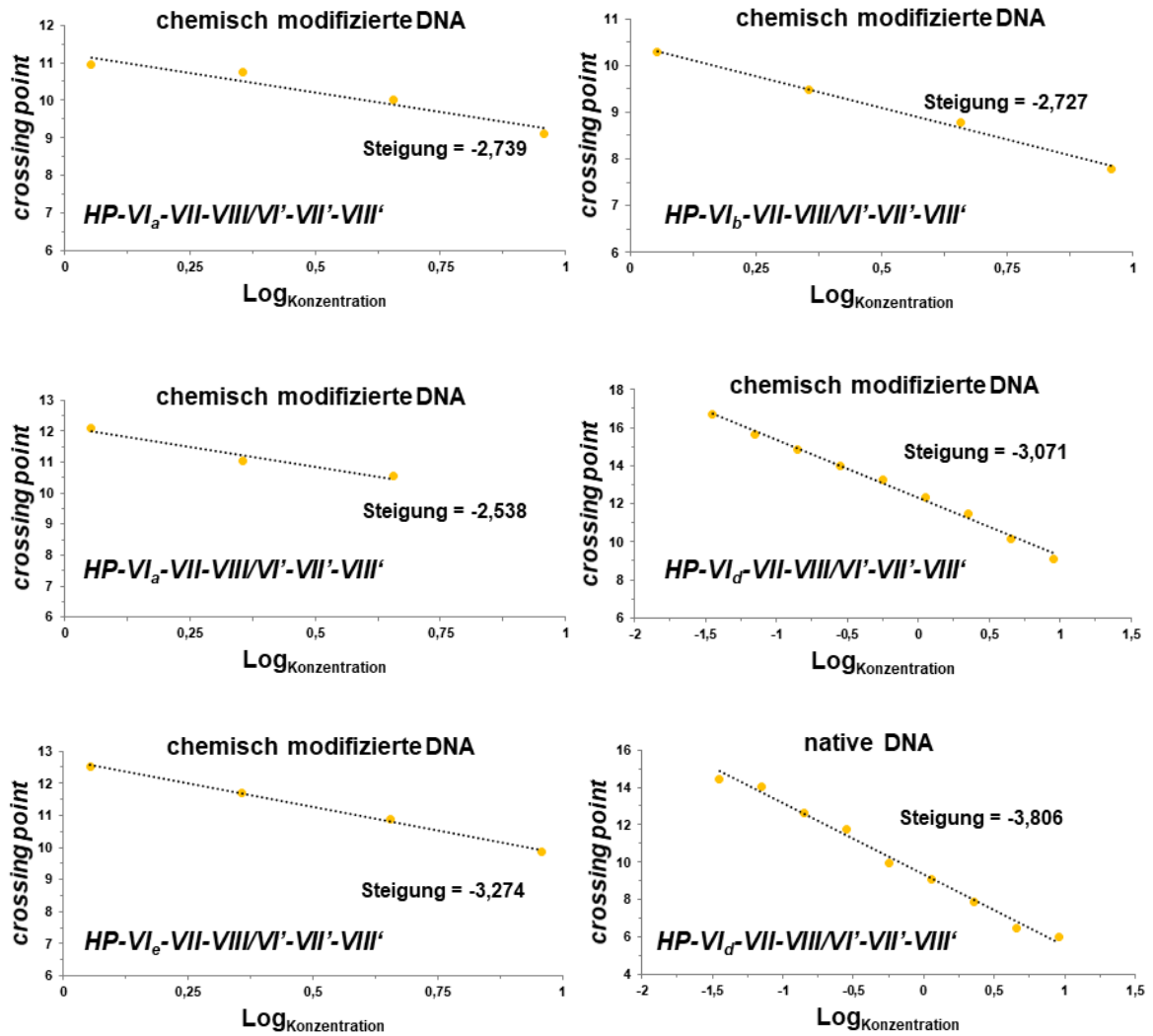
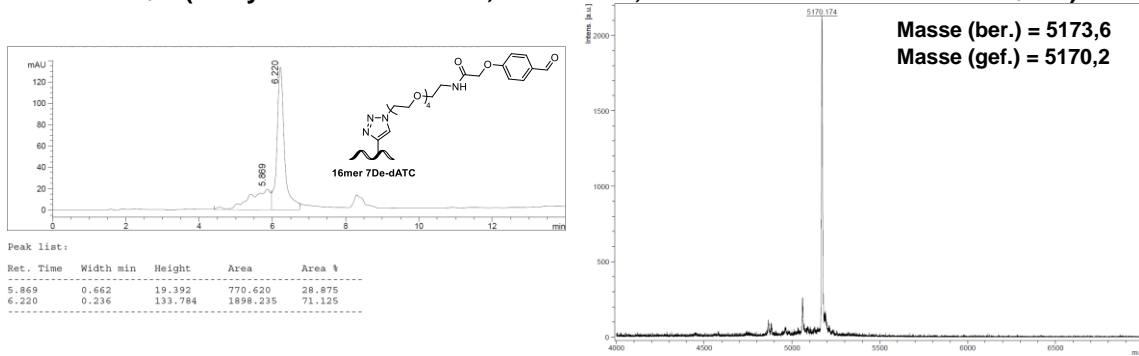


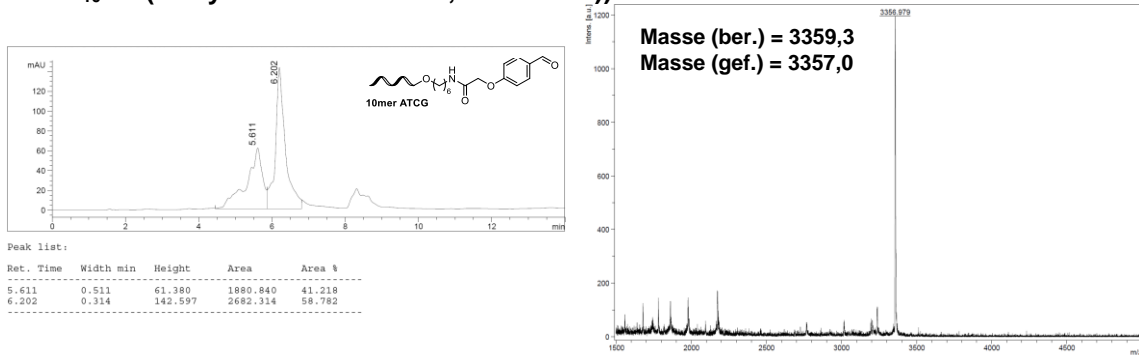
Abbildung 47: Standardkurven (Echtzeit-PCR) der 7-Deazaadenin-enthaltenden Ligationsprodukte *HP-VI_{a-e}-VII-VIII/VI'-VII'-VIII'* und des nativen Ligationsproduktes *HP-VI_d-VII-VIII/VI'-VII'-VIII'*. Für die Echtzeit-PCR wurde eine Verdünnungsreihe des jeweiligen DNA-Templats verwendet.

Überführung von DNA-kompatiblen sowie -inkompatiblen chemischen Reaktionen auf CPG-gebundenen 7De-dATC-DNA-Sequenzen – Startmaterialien

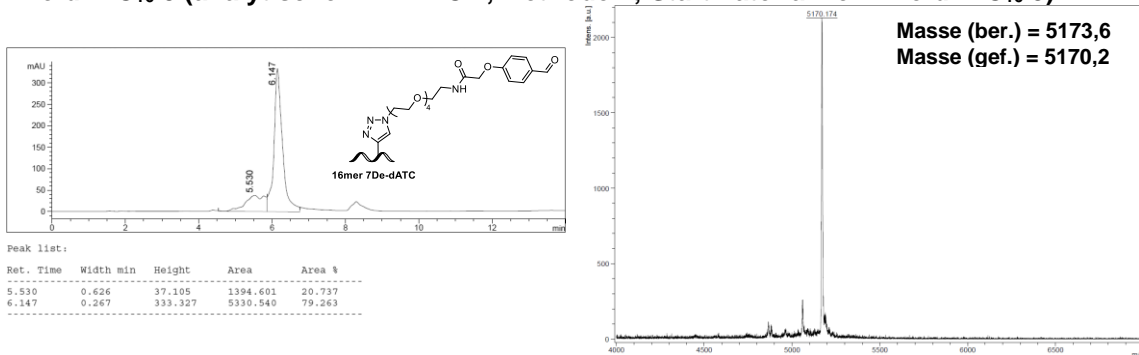
7De-dATC₁₆ 3 (analytische RP-HPLC II, Methode 2; Startmaterial von 7De-dATC₁₆ 5-7)



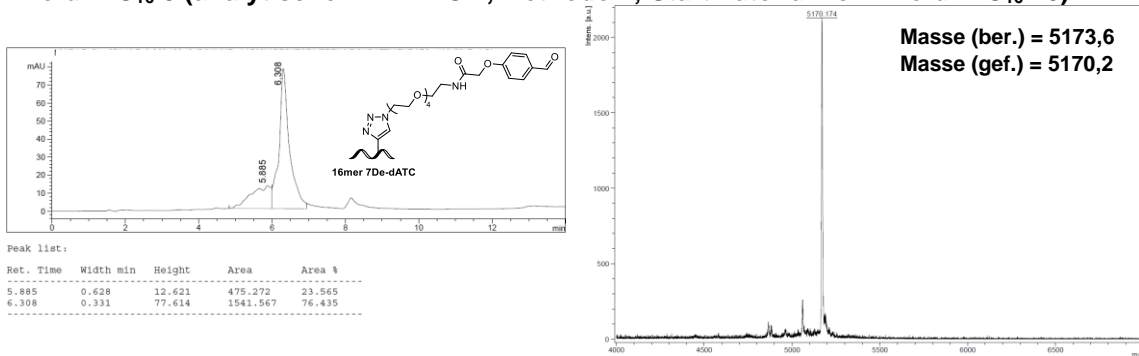
ATCG₁₀ 2a (analytische RP-HPLC II, Methode 2))



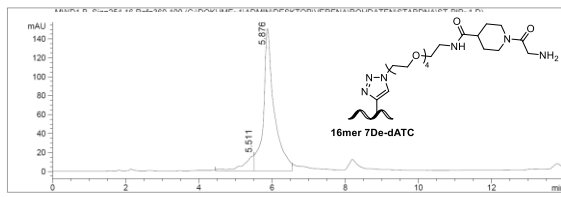
7De-dATC₁₆ 3 (analytische RP-HPLC II, Methode 2; Startmaterial von 7De-dATC₁₆ 9)



7De-dATC₁₆ 3 (analytische RP-HPLC II, Methode 2; Startmaterial von 7De-dATC₁₆ 10)

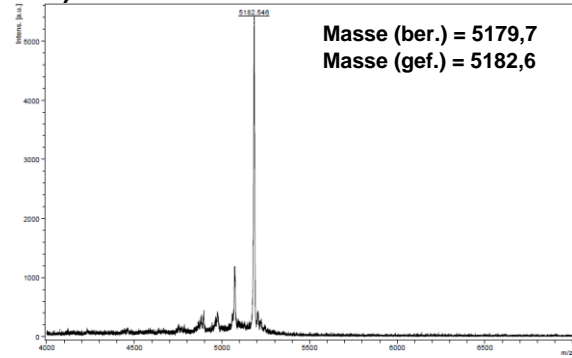


7De-dATC₁₆ 4 (analytische RP-HPLC II, Methode 2)



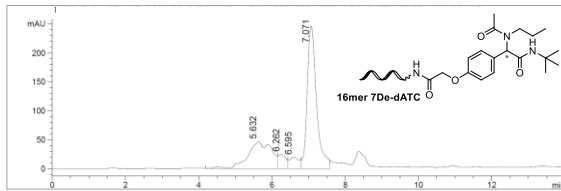
Peak list:

Ret. Time	Width min	Height	Area	Area %
5.511	0.332	16.547	329.330	9.763
5.876	0.338	150.227	3043.931	90.237



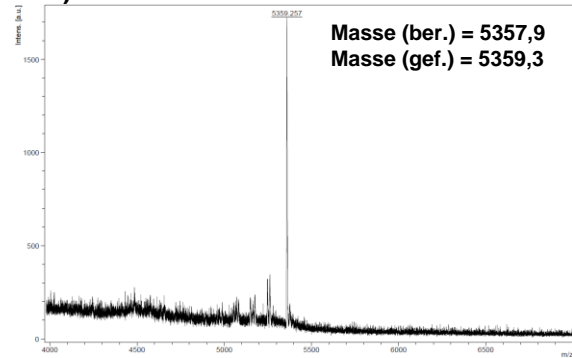
Überführung von DNA-kompatiblen sowie -inkompatiblen chemischen Reaktionen auf CPG-gebundenen 7De-dATC-DNA-Sequenzen – Produkte

7De-dATC₁₆ 5 (analytische RP-HPLC II, Methode 2)

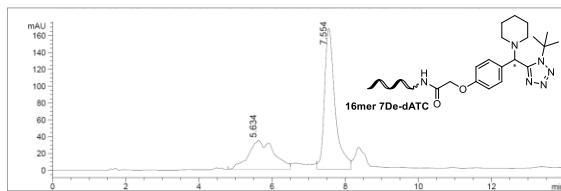


Peak list:

Ret. Time	Width min	Height	Area	Area %
5.632	0.742	46.341	2061.850	29.083
6.262	0.243	24.522	356.809	5.033
6.595	0.299	19.315	346.382	4.886
7.071	0.293	245.685	4324.537	60.999

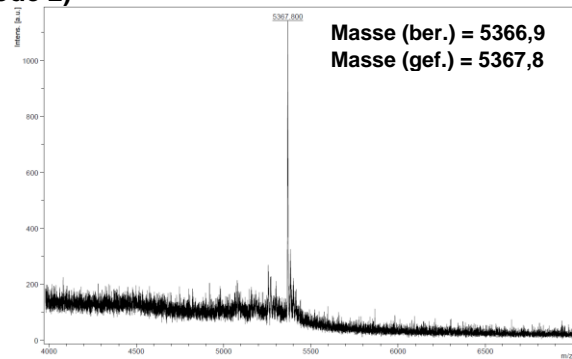


7De-dATC₁₆ 6 (analytische RP-HPLC II, Methode 2)

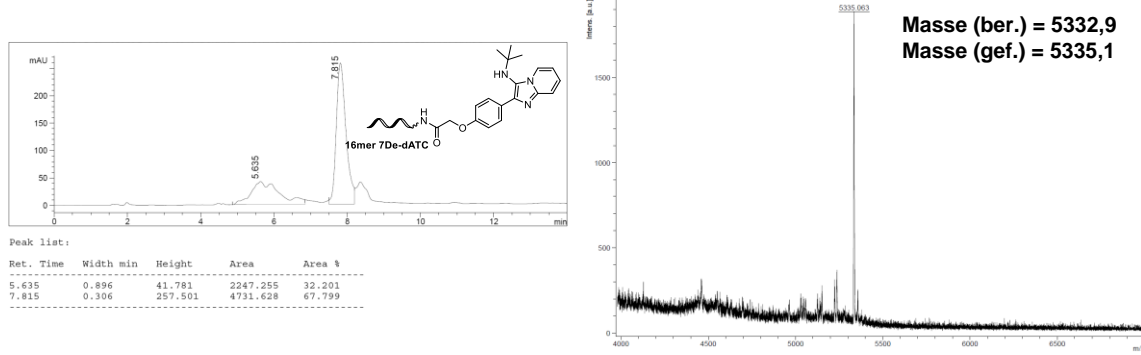


Peak list:

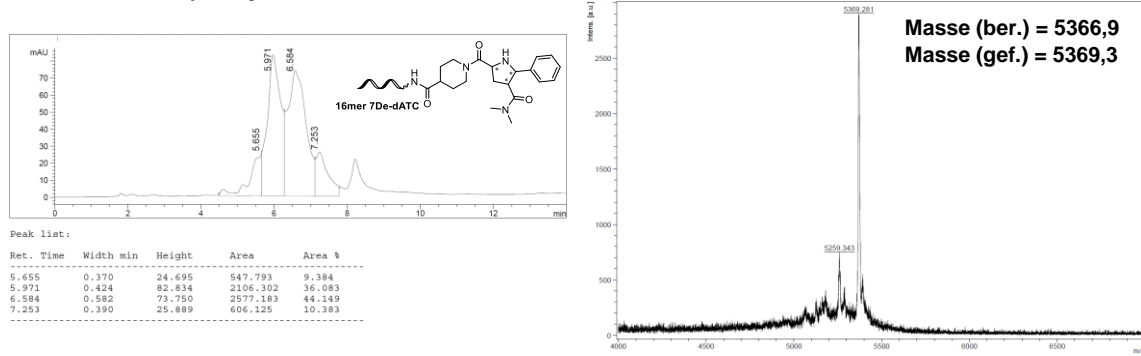
Ret. Time	Width min	Height	Area	Area %
5.634	0.810	34.364	1670.308	33.360
7.554	0.333	167.206	3326.638	66.640



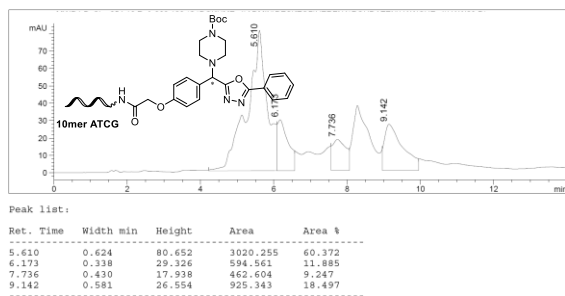
7De-dATC₁₆ 7 (analytische RP-HPLC II, Methode 2)



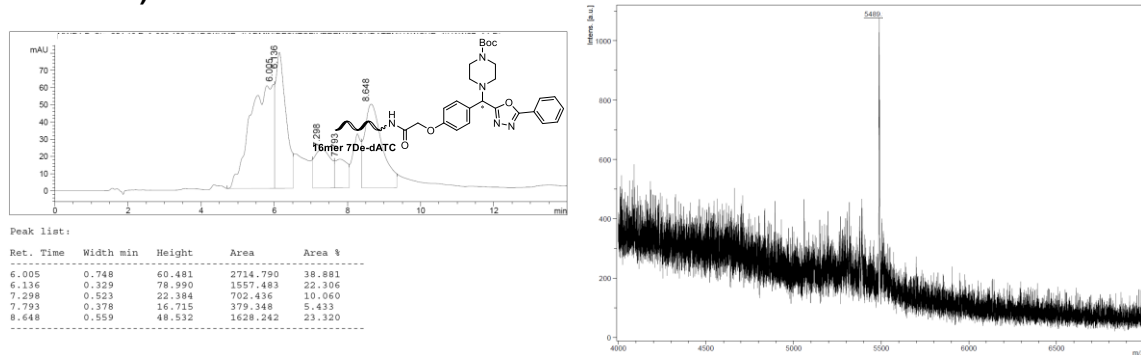
7De-dATC₁₆ 8 (analytische RP-HPLC II, Methode 2)



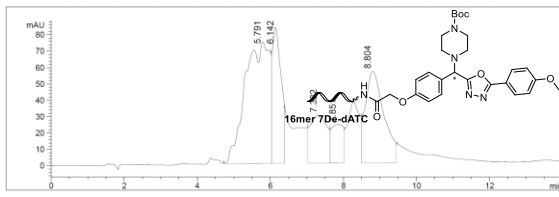
ATCG₁₀ 8b (analytische RP-HPLC II, Methode 2)



7De-dATC₁₆ 9a (analytische RP-HPLC II, Methode 2)

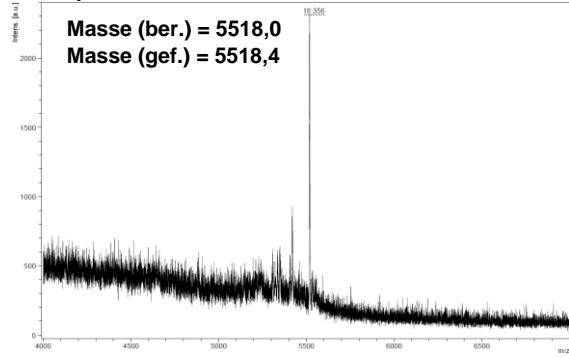


7De-dATC₁₆ 9b (analytische RP-HPLC II, Methode 2)

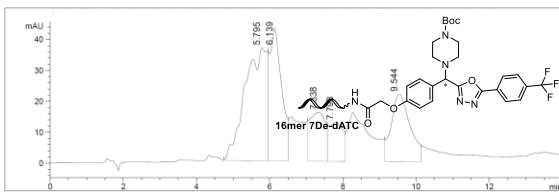


Peak list:

Ret. Time	Width min	Height	Area	Area %
5.791	0.783	74.237	3486.988	42.048
6.142	0.274	82.967	1362.656	16.432
7.322	0.531	29.371	955.861	11.285
7.851	0.372	23.545	525.038	6.331
8.804	0.590	56.038	1982.388	23.905

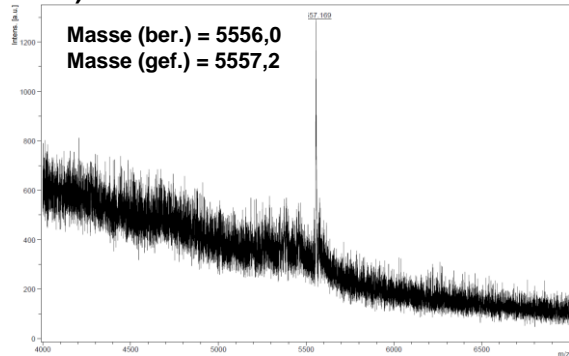


7De-dATC₁₆ 9c (analytische RP-HPLC II, Methode 2)

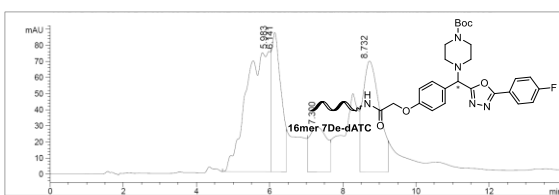


Peak list:

Ret. Time	Width min	Height	Area	Area %
5.795	0.702	36.506	1536.780	37.602
6.139	0.376	42.755	964.435	23.598
7.338	0.490	15.785	464.290	11.360
7.798	0.444	12.619	336.000	8.221
9.544	0.598	21.875	785.493	19.219

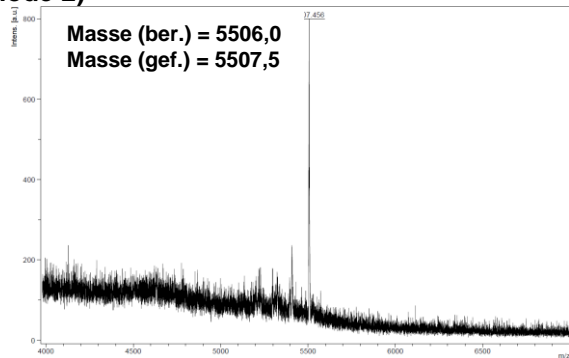


7De-dATC₁₆ 9d (analytische RP-HPLC II, Methode 2)

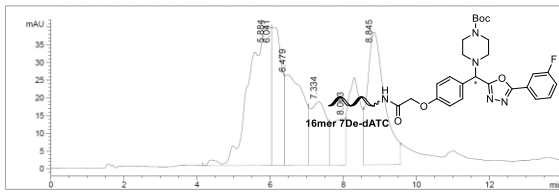


Peak list:

Ret. Time	Width min	Height	Area	Area %
5.983	0.762	74.637	3413.717	42.345
6.341	0.297	86.322	1540.295	19.106
7.300	0.552	27.786	920.575	11.419
8.732	0.529	68.859	2187.067	27.129

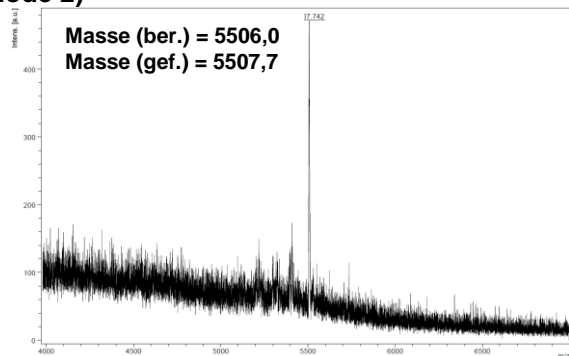


7De-dATC₁₆ 9e (analytische RP-HPLC II, Methode 2)

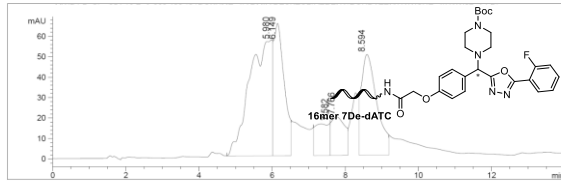


Peak list:

Ret. Time	Width min	Height	Area	Area %
5.884	0.699	39.184	1642.346	30.611
6.041	0.303	38.944	707.594	13.189
6.479	0.575	25.601	881.536	16.468
7.334	0.518	17.844	555.108	10.347
8.063	0.419	13.376	336.287	6.268
8.845	0.553	37.401	1240.281	23.317

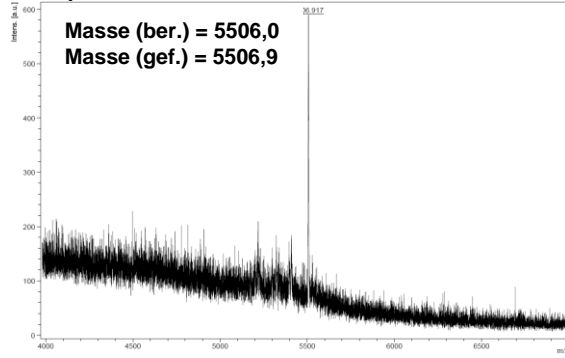


7De-dATC₁₆ 9f (analytische RP-HPLC II, Methode 2)

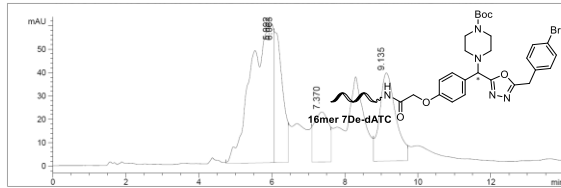


Peak list:

Ret. Time	Width min	Height	Area	Area %
5.980	0.713	56.621	2423.285	39.767
6.149	0.338	64.711	1314.006	21.563
7.582	0.433	15.730	408.723	6.707
7.766	0.431	18.854	487.767	8.004
8.594	0.493	49.305	1459.885	23.957

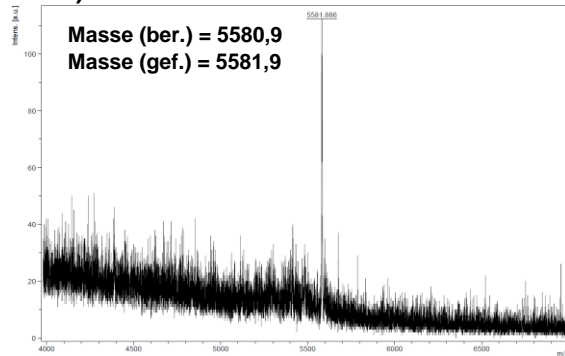


7De-dATC₁₆ 9g (analytische RP-HPLC II, Methode 2)

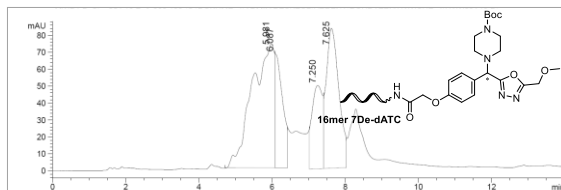


Peak list:

Ret. Time	Width min	Height	Area	Area %
5.992	0.708	59.360	2523.295	49.031
6.063	0.260	56.276	878.387	17.068
7.370	0.455	21.406	584.821	11.364
9.135	0.513	37.662	1159.805	22.537

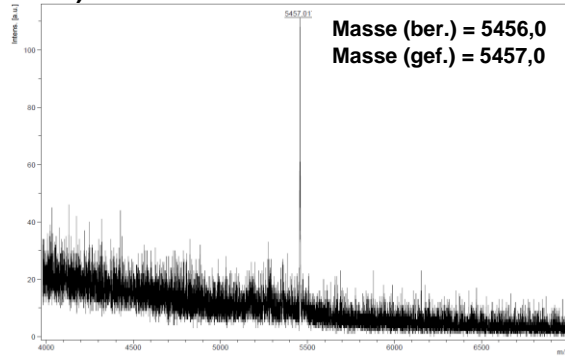


7De-dATC₁₆ 9h (analytische RP-HPLC II, Methode 2)

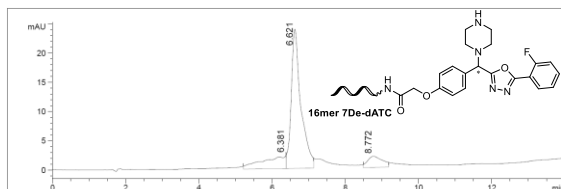


Peak list:

Ret. Time	Width min	Height	Area	Area %
6.087	0.698	73.432	3073.381	44.013
6.687	0.231	67.261	931.621	13.342
7.250	0.334	49.164	985.907	14.119
7.425	0.402	82.573	1991.958	28.526

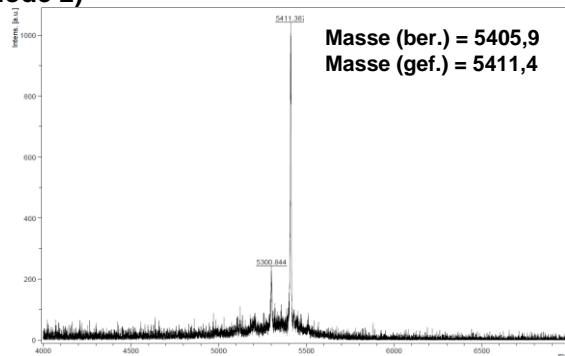


7De-dATC₁₆ 11 (analytische RP-HPLC II, Methode 2)

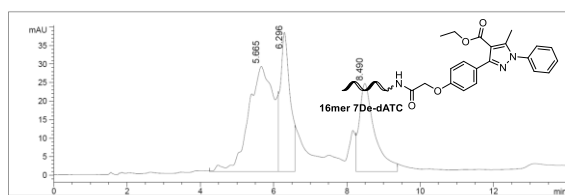


Peak list:

Ret. Time	Width min	Height	Area	Area %
6.381	0.732	2.281	97.477	16.006
6.621	0.305	23.808	434.980	74.101
8.772	0.476	1.910	54.555	9.294

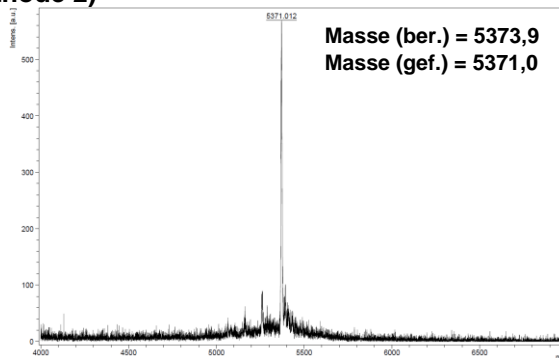


7De-dATC₁₆ 10a (analytische RP-HPLC II, Methode 2)

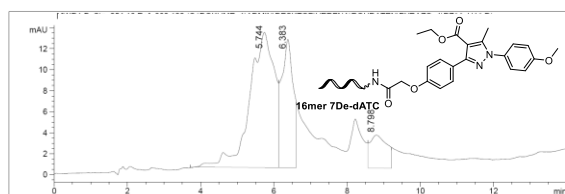


Peak list:

Ret. Time	Width min	Height	Area	Area %
5.665	0.790	28.376	1345.380	49.419
6.296	0.303	37.534	683.324	25.100
8.490	0.487	23.763	693.711	25.481

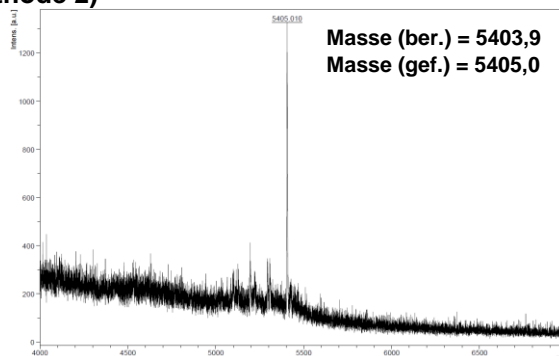


7De-dATC₁₆ 10b (analytische RP-HPLC II, Methode 2)

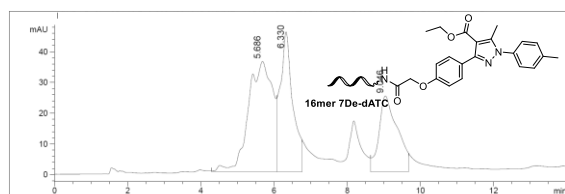


Peak list:

Ret. Time	Width min	Height	Area	Area %
5.744	0.785	12.865	605.765	62.022
6.383	0.368	12.203	269.473	27.590
8.798	0.540	3.133	101.455	10.388

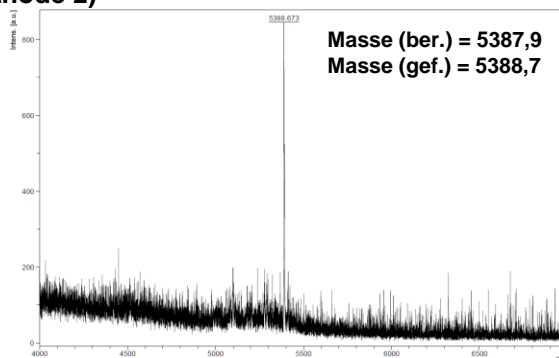


7De-dATC₁₆ 10c (analytische RP-HPLC II, Methode 2)

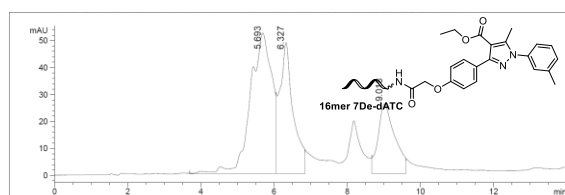


Peak list:

Ret. Time	Width min	Height	Area	Area %
5.686	0.769	35.984	1660.853	45.892
6.330	0.399	45.569	1090.502	30.132
9.046	0.584	24.763	867.683	23.976

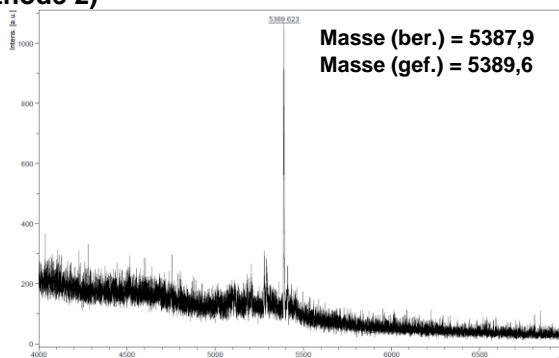


7De-dATC₁₆ 10d (analytische RP-HPLC II, Methode 2)

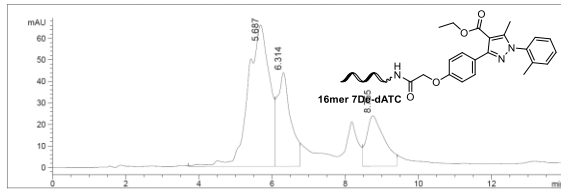


Peak list:

Ret. Time	Width min	Height	Area	Area %
5.693	0.680	52.181	2128.686	50.563
6.327	0.433	48.579	1260.958	29.952
9.018	0.530	25.799	820.354	19.486

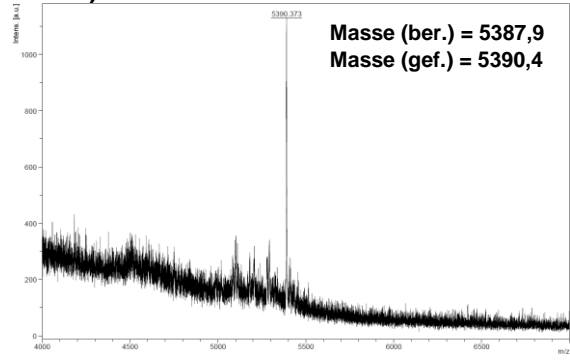


7De-dATC₁₆ 10e (analytische RP-HPLC II, Methode 2)

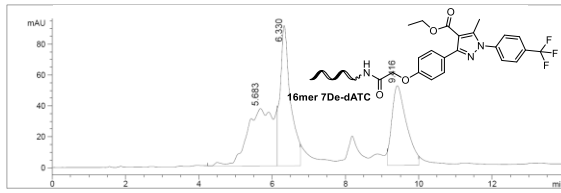


Peak list:

Ret. Time	Width min	Height	Area	Area %
5.687	0.681	65.629	2682.498	58.554
6.314	0.426	43.523	1113.078	24.297
8.755	0.560	23.393	785.640	17.149

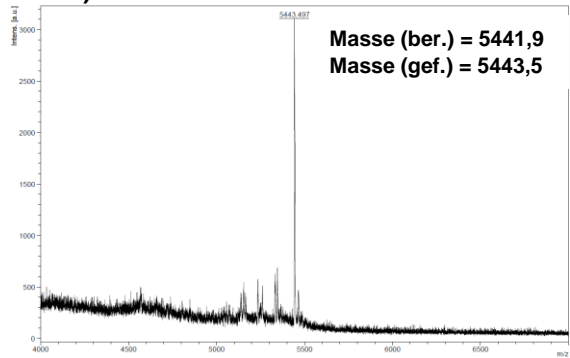


7De-dATC₁₆ 10f (analytische RP-HPLC II, Methode 2)

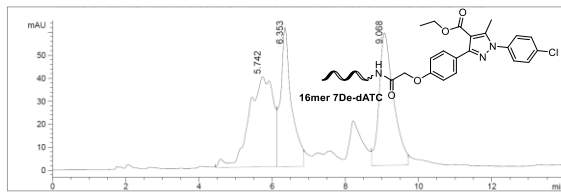


Peak list:

Ret. Time	Width min	Height	Area	Area %
5.683	0.846	37.178	1887.085	36.932
6.330	0.329	90.887	1796.700	35.163
9.416	0.461	51.550	1425.840	27.905

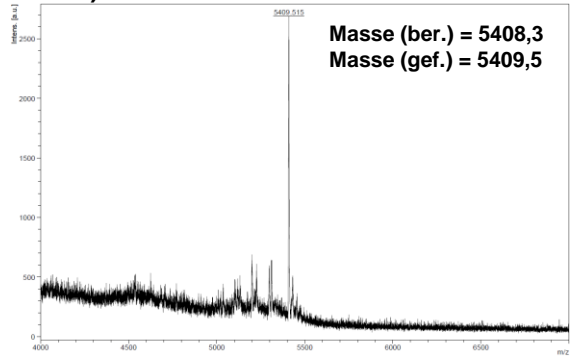


7De-dATC₁₆ 10g (analytische RP-HPLC II, Methode 2)

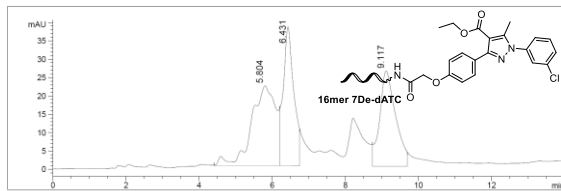


Peak list:

Ret. Time	Width min	Height	Area	Area %
5.742	0.763	39.164	1793.282	38.758
6.353	0.347	60.401	1256.698	27.161
9.068	0.457	57.524	1576.895	34.081

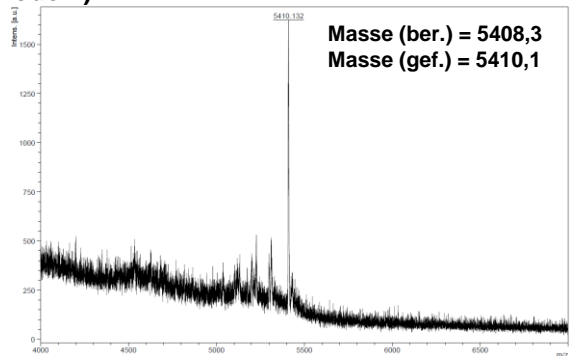


7De-dATC₁₆ 10h (analytische RP-HPLC II, Methode 2)

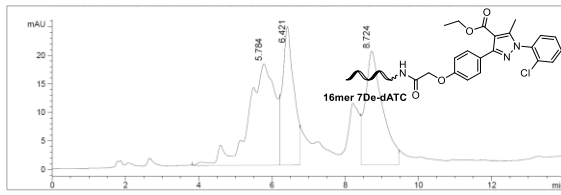


Peak list:

Ret. Time	Width min	Height	Area	Area %
5.804	0.764	21.810	999.686	39.107
6.431	0.335	37.852	759.715	29.872
9.117	0.504	25.925	783.862	30.821

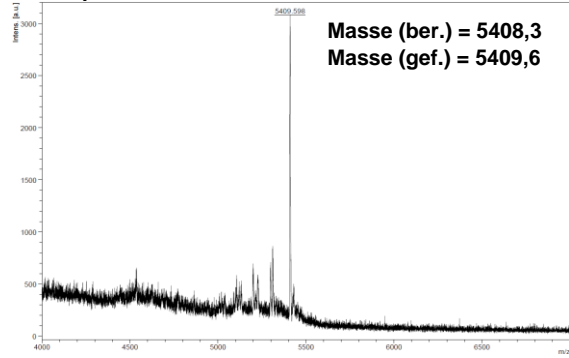


7De-dATC₁₆ 10i (analytische RP-HPLC II, Methode 2)

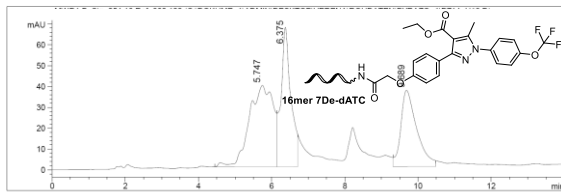


Peak list:

Ret. Time	Width min	Height	Area	Area %
5.784	0.842	17.802	899.453	43.333
6.421	0.356	24.323	520.123	25.058
8.724	0.548	19.955	456.123	31.410



7De-dATC₁₆ 10j (analytische RP-HPLC II, Methode 2)



Peak list:

Ret. Time	Width min	Height	Area	Area %
5.747	0.762	39.069	1785.672	43.099
6.375	0.332	66.879	1251.458	30.295
9.689	0.504	36.587	1106.072	26.696

