



**BERGISCHE
UNIVERSITÄT
WUPPERTAL**

**Design und Synthese neuer Liganden für die SI/II- und
SII-Bindestellen des onkogenen K-Ras4B Proteins**

Dissertation zur Erlangung des Grades Dr. rer. nat.

Angefertigt

an der Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften

der Bergischen Universität Wuppertal

von Daniel Gülden

geboren am 21.02.1992 in Düren

Wuppertal, Oktober 2024

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. Jürgen Scherkenbeck
Arbeitsgruppe für Bioorganische Chemie
Bergische Universität Wuppertal

Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. Fabian Mohr
Arbeitsgruppe für Anorganische Chemie
Bergische Universität Wuppertal

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig am Institut für Organische Chemie der Bergischen Universität Wuppertal unter der Leitung von Prof. Dr. Jürgen Scherkenbeck ohne unzulässige fremde Hilfe und unter Beachtung der Grundsätze zur Sicherung der guten wissenschaftlichen Praxis verfasst habe. Alle direkt oder indirekt aus fremden Quellen übernommenen Gedanken sind entsprechend gekennzeichnet. Diese Arbeit wurde außerdem an keiner anderen Stelle eingereicht.

Hilden, den 14.10.2024

D. Gülden

Daniel Gülden

Die vorliegende Arbeit ist meinen Großmüttern und meinem Onkel Peter gewidmet.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen Dank zum Ausdruck bringen.

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. Jürgen Scherkenbeck für die Gelegenheit danken, meine experimentellen Arbeiten im Rahmen meiner Promotion in seinem Arbeitskreis durchführen zu dürfen. Die Unterstützung, die spannende Themenwahl sowie der regelmäßige wissenschaftliche Austausch haben diese Arbeit maßgeblich geprägt. Des Weiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. Jürgen Scherkenbeck für die Begutachtung meiner Dissertation danken.

Ebenso möchte ich Herrn Prof. Dr. Fabian Mohr für seine Bereitschaft danken, die Funktion des Zweitgutachters meiner Arbeit zu übernehmen.

Meinen Dank richte ich auch an die Mitglieder des Arbeitskreises. Die produktive Zusammenarbeit sowie die zahlreichen anregenden Gespräche stellten eine außerordentliche Bereicherung dar. Neben der wissenschaftlichen Arbeit haben auch die gemeinsamen Aktivitäten sowie unser Interesse an Pen-and-Paper-Abenden dazu beigetragen, eine angenehme Atmospäre zu schaffen, in der die Zusammenarbeit reibungslos und effektiv vonstattengehen konnte. In diesem Kontext sei auch der vorherigen Doktorandengeneration gedankt, die insbesondere während der schwierigen Corona-Zeit in Wuppertal einen wichtigen Anteil daran hatte, meinen Einstieg an der Universität zu erleichtern.

Des Weiteren möchte ich meinen Mitbewohnerinnen, die mich über die Jahre begleitet haben, meinen aufrichtigen Dank aussprechen.

Mein aufrichtiger Dank gilt insbesondere meiner Familie. Hierbei möchte ich vor allem meine Eltern, Großeltern und meinen jüngeren Bruder nennen, die mich stets mit voller Unterstützung begleitet haben. Da das Thema Krebs uns in der Vergangenheit oft unerwartet und schwer getroffen hat, war ihr Rückhalt für mich von unschätzbarem Wert. In diesem Kontext möchte ich auch meine Partnerin Sarah nennen, die während der gesamten Zeit an meiner Seite war, in schwierigen Momenten Beistand geleistet und mich immer wieder motiviert hat.

Abschließend sei allen Personen gedankt, die mich während des gesamten Prozesses unterstützt haben, auch wenn sie hier nicht namentlich erwähnt wurden. Euer Verständnis und eure Hilfe waren für mich von großem Wert und ich möchte mich auf diesem Wege nochmals bei euch bedanken.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
Abstract	VII
1 Einleitung	1
1.1 Einführung in die Krebsforschung: Eine epidemiologische Analyse	1
1.2 Therapieformen bei Krebs	2
2 Allgemeiner Teil	6
2.1 Struktureller Aufbau von K-RAS und dessen Schaltfunktion	6
2.1.1 Aufbau des Proteins	6
2.1.2 Rolle von Ras in der Zelle	7
2.1.3 Bekannte Mutationen und deren Auswirkung auf die Funktionalität	9
2.2 Aktuelle K-RAS-Inhibitoren und Strategien zur Inhibierung	10
2.2.1 Direkte Inhibierung des RAS-SOS-Komplexes	11
2.2.2 Katalytischer Abbau des RAS-Proteins durch PROTACs	21
2.2.3 Inhibierung der Membran-Einbettung von RAS	24
2.3 Vorarbeiten innerhalb der Arbeitsgruppe SCHERKENBECK	27
2.3.1 Bisphenolische Grundstrukturen zur Inhibierung von RAS	27
2.3.2 PROTACs zum Abbau von onkogenem RAS	29
2.3.3 Optimierung der STOCKWELL-Verbindung	30
2.3.4 Peptidische Liganden zur Inhibierung des RAS-Proteins	31
3 Zielsetzung	33
4 Ergebnisse und Diskussionen	34
4.1 Benzophenon-Derivate und strukturähnliche Verbindungen als RAS-Inhibitoren ..	34
4.1.1 <i>In Silico</i> Berechnungen an der SI/II-Bindetasche	36
4.1.2 Synthese der Hydrazone und Hydrazon-ähnlichen Verbindungen	43
4.1.3 Synthese verschiedener Oxim-Derivate	53
4.1.4 Biologische Untersuchung der synthetisierten Liganden	54
4.2 <i>In Silico</i> Screening und Synthesearbeiten für die SII-Bindestelle mit MRTX1133 als Referenz	59

4.2.1	Erzeugung und Optimierung eines geeigneten <i>in silico</i> Screening-Models.....	59
4.2.2	High-Throughput unterstütztes Virtual Screening mehrerer Ligand-Bibliotheken	62
4.2.3	Ähnlichkeitsanalyse der Top-Hits mittels <i>InfiniSee</i> ®	71
4.2.4	Synthese mehrerer berechneter Scaffolds	76
4.2.5	Biologische Untersuchung der Verbindungen	83
4.2.6	Interpretation der von MRTX1133 induzierten Bindestelle.....	86
4.3	PROTAC-Synthese für den katalytischen Abbau von RAS-Proteinen.....	89
4.3.1	Synthese mehrerer PROTACs auf Basis des derivatisierten STOCKWELL-Liganden.....	89
4.3.2	Synthese mehrerer PROTACs auf Basis der BI-2852 Verbindung	95
4.3.3	Biologische Untersuchung der PROTAC-Verbindungen	99
5	Zusammenfassung und Ausblick.....	102
6	Experimentalteil.....	105
6.1	Allgemeine Angaben zur Laborpraxis	105
6.1.1	Informationen zu Chemikalien, Lösungsmittel, Glas- und Laborgeräte	105
6.1.2	Reaktionskontrollen	105
6.1.3	Säulenchromatographische Aufarbeitung	106
6.1.4	Analytische Messungen der erhaltenen Verbindungen	106
6.2	Synthesevorschriften	108
6.2.1	Benzophenon-Derivate und strukturähnliche Verbindungen	108
6.2.2	Synthese diverser berechneter Scaffolds.....	149
6.2.3	PROTAC-Synthese	172
6.3	Informationen zum <i>Molecular Modeling</i>	204
6.4	Informationen zu verwendeten biologischen Assays	205
7	Literaturverzeichnis	208

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erläuterung		
		Cdc25	<i>cell division cycle gene</i>
ABL1	Tyrosin-Protein Kinase	CDI	1,1'-Carbonyldiimidazol
Ac	Acetyl	CH	Cyclohexan
AC ₅₀	halbmaximale aktivierende Konzentration	CL	<i>Clearance (</i>
AGS	Adenokarzinom	CML	chronische myeloische Leukämie
AIBN	2,2'-Azobisisobutyronitril	CRNB	Cereblon
Akt	Proteinkinase	CTG	Cell Titer Glo [®] (Assay-Typ)
Äq.	Äquivalent	CuAAC	Kupfer(I)-Azid-Alkin-Cycloaddition
ARF	Adenosyl-Ribosylierungs-Faktor	DCC	<i>dynamic combinatorial chemistry</i>
AS	Aminosäure(n)	DCM	Dichlormethan
ATP	Adenosintriphosphat	DCVC	<i>Dry Column Vacuum Chromatography</i>
BCR-ABL1	Tyrosin-Kinase-Fusionsprotein	Dha	Dehydroalanin
ber.	berechnet	DHBP	Dihydroxybenzophenon
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl	DIPEA	<i>N,N'</i> -Diisopropylethylamin
BPA	Bisphenol A	DMDO	Dimethyldioxiran
BPS	Bisphenol S	DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (Zellkulturmedium)
B-RAF	Serin/Threonin Kinase	DMF	<i>N,N'</i> -Dimethylformamid
BRET	<i>bioluminescence resonance energy transfer</i>	DMP	Dess-Martin-Periodinan
Bu	Butyl	DMSO	Dimethylsulfoxid
CAAX	C-terminale Region eines Proteins mit spezifischen AS	DNS	Desoxyribonukleinsäure
		ds	<i>docking score</i>

EGF	<i>Epidermal growth factor</i>	GTP	Guanosintriphosphat
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>	GTPase	Guanosintriphosphatase
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinase</i> (Protein der Signaltransduktion)	HATU	[O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat]
Et	Ethyl	HDI	<i>Human Development Index</i>
EtOAc	Essigsäureethylester	HER	<i>Human epidermal growth factor receptor</i>
FA	Ameisensäure	HLL	<i>Hit Locator Library</i>
FCS	Fetales Kälberserum	HI-Virus	Humanes Immundefizienz-Virus
FDP	Farnesyldiphosphat	HPLC	<i>high resolution mass spectrometry</i>
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl		(Hochauflösende Massenspektrometrie)
FRET	Floreszenz Resonanz Energetransfer		
FTase	Farnesyltransferase	HRAS	<i>Harvey rat sarcoma virus</i>
FTI	Farnesyltransferase-Inhibitor	HRMS	<i>high resolution mass spectrometry</i>
GAP	GTPase-aktivierende Proteine		(Hochauflösende Massenspektrometrie)
GDP	Guanosindiphosphat		
gef.	gefunden	HTRF	<i>homogeneous time-resolved fluorescence</i> (homogene zeitaufgelöste Fluoreszenz)
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factors</i>		
GGT1	Geranylgeranyltransferase I	HTVS	<i>high throughput virtual screening</i> (virtuelles Hochdurchsatz-Screening)
GGTI	GGTase I-Inhibitoren		
GppNHp	nicht-hydrolisierbares GTP-Analog	HVR	Hypervariable Region
GSP	Guanosindiphosphat-monothiophosphat	IAP	<i>Inhibitors of Apoptosis</i>

IC ₅₀	halbmaximale inhibitorische Konzentration	Pbf	2,2,4,6,7-
ICMT	<i>isoprenylcysteine carboxymethyltransferase</i>	PDB	Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
IP	Intraperitoneal	PAINS	<i>Pan-assay interference compound</i>
JL	JEUKEN-Library		
kat	katalytisch	PEG	Polyethylenglykol
K _D	Dissoziationskonstante	pERK	phosphoryliertes ERK
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma virus</i>	Ph	Phenyl
LDC	Lead Discovery Center GmbH in Dortmund	PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
MDM2	<i>mouse double minute 2 homologe</i>	POI	<i>protein of interest</i> (Protein von Interesse)
Me	Methyl	PROTAC	<i>proteolysis targeting chimera</i>
MS	Massenspektrometrie	PTP	Protein-Tyrosin-Phosphatase
Ms	Mesyl		
MST	<i>microscale thermophoresis</i> (Assay-Typ)	PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytrityrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
MW	Mikrowelle	RAB	<i>RAS-related in brain</i>
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid		(GTPase)
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernmagnetresonanz)	RAL-GDS	<i>Ral guanine nucleotide dissociation stimulator</i>
NRAS	Neuroblastom RAS-Virus-Onkogen-Homolog	RAN	<i>RAS-related Nuclear Protein</i>
NSCLC	<i>non-small-cell lung cancer</i> (nicht-kleinzeliges Lungenkarzinom)	RAF	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i> (Protein)
		RAS	<i>Rat sarcoma</i> (GTPase)
		RCE1	<i>RAS-converting CAAX endopeptidase 1</i>

RHO	<i>RAS-homologe</i> (GTPase)	STAMP	<i>specifically targeting the ABL myristoyl pocket</i>
RP	<i>reversed phase</i>	SWI	Switch I Region
SI/II	Region zwischen Switch I und Switch II	SWII	Switch II Region
SAR	<i>structure-activity relationship</i> (Struktur-Wirkungs-Beziehung)	TBN	<i>tert</i> -Butylnitrit
		TBSCl	<i>tert</i> -Butyldimethylsilylchlorid
SHP2	<i>SRC homology region 2 domain-containing phosphatase-2</i>	TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
SMI	<i>small molecule inhibitor</i>	TFA	Trifluoressigsäure
SMILES	<i>Simplified Molecular Input Line Entry Specification</i>	TFE	Trifluorethanol
S _N Ar	nukleophile aromatische Substitution	THF	Tetrahydrofuran
TKI	Tyrosin-Kinase-Inhibitor	TKI	Tyrosin-Kinase-Inhibitor
Trt	Triphenylmethyl	Trt	Triphenylmethyl
SOS	<i>Son of Sevenless</i> (GEF-Protein)	Ts	Tosyl
SP	<i>standard precision</i>	VHL	Van-Hippel-Lindau
SPR	<i>surface plasmon resonance spectroscopy</i> (Oberflächenplasmonen-resonanzspektroskopie)	WHO	<i>World Health Organization</i> (Weltgesundheitsorganisation)
WT	Wildtyp	WT	Wildtyp
STAB	Natriumtriacetoxyborhydrid	XP	<i>extreme precision</i>

Abstract

Deutsche Version

Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeiten wurden verschiedene Konzepte zur Inhibition von onkogenen KRAS-Proteinen evaluiert. Der Fokus lag dabei auf der Optimierung von Bisphenol-Hydrazone-Inhibitoren, die für die Bindung an die SI/II-Bindetasche entwickelt wurden. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Derivatisierungsmöglichkeiten sowie *In-silico*-Berechnungen durchgeführt, in denen der Einfluss von Wassermolekülen auf die Wechselwirkung untersucht wurde. Parallel dazu wurde eine umfassende Untersuchung durchgeführt, um neue potenzielle Inhibitoren zu identifizieren, die spezifische Wechselwirkungen mit der SII-Bindetasche eingehen. Ein weiterer Schwerpunkt lag auf der Entwicklung und Evaluierung von PROTACs, die auf bekannten Verbindungen basierten und durch verschiedene Linkersysteme variiert wurden. Ziel war die Erweiterung der strukturellen Diversität sowie die Evaluierung möglicher katalytischer Effekte dieser PROTACs.

English version

As part of the work presented here, various concepts for the inhibition of oncogenic KRAS proteins were evaluated. The focus was on the optimisation of bisphenol-hydrazone inhibitors developed for binding to the SI/II binding pocket. To this end, various derivatisation options and *in-silico* calculations were carried out in which the influence of water molecules on the interaction was investigated. In parallel, a comprehensive study was carried out to identify new potential inhibitors that interact specifically with the SII binding pocket. Another focus was on the development and evaluation of PROTACs based on known compounds and varied by different linker systems. The aim was to expand the structural diversity and to evaluate possible catalytic effects of these PROTACs.

1 Einleitung

1.1 Einführung in die Krebsforschung: Eine epidemiologische Analyse

Krebs, eine Erkrankung, bei der körpereigene Zellen unkontrolliert wachsen und sich vermehren, stellt eine enorme Hürde im Bestreben nach einer höheren Lebenserwartung dar. Geschichtlich ist diese Erkrankung eng mit der Menschheit verstrickt und wurden beispielsweise bereits in ägyptischen und peruanischen Mumien aus dem Zeitraum ~1500 v. Chr. nachgewiesen.¹ In der heutigen Zeit hat sich Krebs zu einer weitverbreiteten Krankheit entwickelt, wobei die Anzahl der Todesopfer signifikant mit der zunehmenden Verbreitung korreliert.

Laut einer Statistik der Weltgesundheitsorganisation (WHO) aus dem Jahr 2019 stellte Krebs in 112 von 183 Ländern mindestens die zweithäufigste Todesursache für Menschen im Alter von <70 Jahren dar.² Im Jahr 2020 lag die geschätzte Zahl der Todesfälle für beide Geschlechter weltweit bei ca. 10 Millionen Menschen. 12.5% der männlichen Bevölkerung stirbt an Krebs. Lungenkrebs ist in der Statistik die häufigste Todesursache bei den Krebserkrankungen der Männer.³ Bei der weiblichen Bevölkerung liegt die Krebs-Sterblichkeit bei 9.1%, mit Brustkrebs als häufigster Todesursache.³ Prognostiziert wird von der WHO, dass die Fallzahlen bis 2040 stark ansteigen. Die Zahl der Neuerkrankungen wird auf 30 Millionen Fälle geschätzt, die Zahl der krebsbezogenen Todesfälle wird mit 16.3 Millionen angegeben. Über die Jahre verändert sich neben der Anzahl auch die Art der Krebserkrankungen. Die Zahlen korrelieren hierbei stark mit der ökonomischen und sozialen Entwicklung eines Landes. Eine wichtige Kenngröße in der epidemiologischen Untersuchung von Krebs ist der *Human Development Index*, kurz HDI. Der HDI ist eine Kennzahl zwischen 0 und 1, die die durchschnittlichen Leistungen eines Landes in drei grundlegenden Bereichen der menschlichen Entwicklung widerspiegelt: Gesundheit, Wissen und Lebensstandard. In Ländern mit hohem HDI ändert sich das Krankheitsbild stark von infektions- und armutsbezogenen Krebsarten hin zu Krebserkrankungen, die durch falsche Ernährung (Fettleibigkeit, Tabak- und Alkoholmissbrauch) oder durch vermehrten Kontakt mit Kanzerogenen begünstigt werden.² Die wohl bekanntesten infektionsbezogenen Krebsarten sind Gebärmutterhalskrebs oder das Kaposi-Sarkom, das vor allem durch seine Verbindung zum HI-Virus Bekanntheit erlangt hat.⁴

Im Jahr 2020 gab es schätzungsweise 222 krebsbezogene Todesfälle pro 100.000 Einwohner in Ländern mit sehr hohem HDI.² Bei Ländern mit geringem HDI lag die entsprechende Zahl der Todesfälle bei schätzungsweise 44 pro 100.000 Einwohner.² In weiterentwickelten Ländern, zu

denen größtenteils Länder des europäischen und nordamerikanischen Kontinents sowie Australien und einige asiatische Länder gehören, tritt vermehrt Lungen-, Darm- und Pankreaskrebs auf (**Abbildung 1**).³ In den meisten afrikanischen Ländern, die zum größten Teil zu den Ländern mit niedrigem HDI gezählt werden, treten weiterhin meist infektionsbezogene Krebsarten wie Gebärmutterhalskrebs auf.⁵ Der Grund hierfür sind medizinische Fortschritte in der Behandlung und Prävention von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Schlaganfällen, aber auch Infektionskrankheiten, welche in Ländern mit niedrigerem HDI oftmals zum Tode führen.

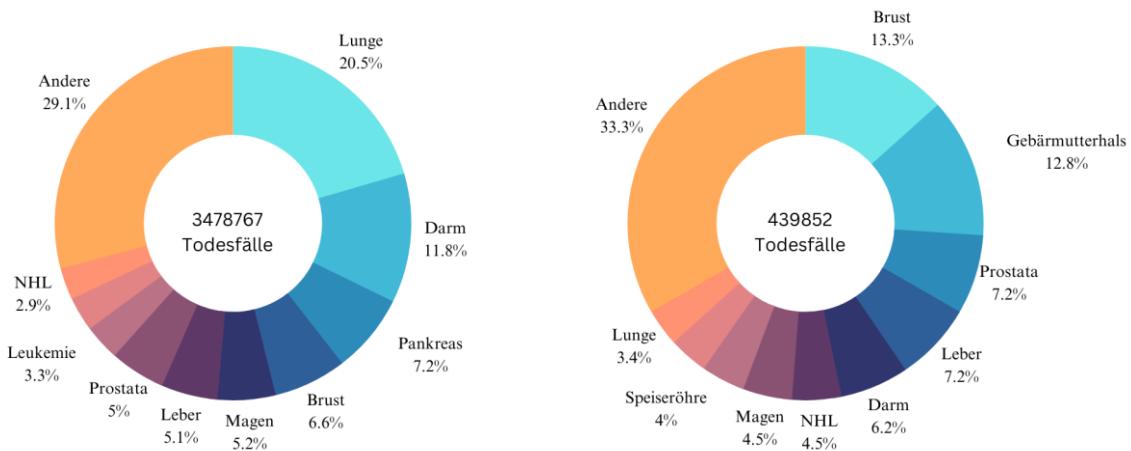


Abbildung 1: Mortalitätsraten verschiedener Krebsarten im Vergleich zwischen Ländern mit sehr hohem HDI (links) und Ländern mit geringem HDI (rechts). WHO-Statistik von 2020.²

1.2 Therapieformen bei Krebs

Im Falle einer diagnostizierten Krebserkrankung wird in frühen Stadien meist eine chirurgische Entfernung des Tumorgewebes angestrebt. Zusätzlich kann dieses Verfahren mit einer Strahlentherapie kombiniert werden. Bei der Bestrahlung von Krebszellen wird die DNS schwerwiegend geschädigt, sodass die Wahrscheinlichkeit der Apoptose von Zellzyklus zu Zellzyklus immens zunimmt.⁶ Bei Krebsarten, die die Apoptose jedoch umgehen können, greift ein solches Verfahren nicht. Für solche Erkrankungen bleibt größtenteils nur eine kombinierte Behandlung aus Strahlentherapie und Chemotherapie. Unter Letzterer versteht man die Verabreichung von Zytostatika, die vorwiegend Zellen mit hoher Proliferationsrate schädigen. Hierbei wird im Gegensatz zur Strahlentherapie die Zellteilung über unterschiedliche Mechanismen verhindert.⁷ Der Ursprung der modernen Chemotherapie lässt sich bis in den Zweiten Weltkrieg zurück datieren, als das erste Mal festgestellt wurde, dass Senfgas sowohl Lymphgewebe als auch Knochenmark schädigt.⁸ Der erstmalige Einsatz von Stickstoffsenf erfolgte bei einem 48-Jährigen mit Lymphdrüsenkrebs.⁹ Die Verabreichung dieses Medikaments führte zu einer vorübergehenden Regression und vollständigen Remission des Krebses.⁹ Nach einem Rückfall verstarb der Patient; die Behandlung an der Universität Yale

markierte jedoch einen wichtigen Meilenstein in der medizinischen Onkologie und den Einsatz chemischer Substanzen.⁹ Mit dem Erlangen neuer Kenntnisse über die Physiologie von Krebszellen wurden über die Jahre weitere Zytostatika mit unterschiedlichen Wirkmechanismen entwickelt. Je nach Mechanismus lassen sich diese Wirkstoffe in Alkylantien, Antimetabolite, Topoisomeraseinhibitoren, Mitosehemmer, Antibiotika mit zytostatischer Wirkung und hormonelle Präparate unterteilen.^{7, 9-11} Die meisten dieser Wirkstoffe stören die DNS-Replikation oder behindern generelle Apparate der Zellteilung. Wichtige Vertreter dieser verschiedenen Substanzklassen sind in **Abbildung 2** dargestellt.

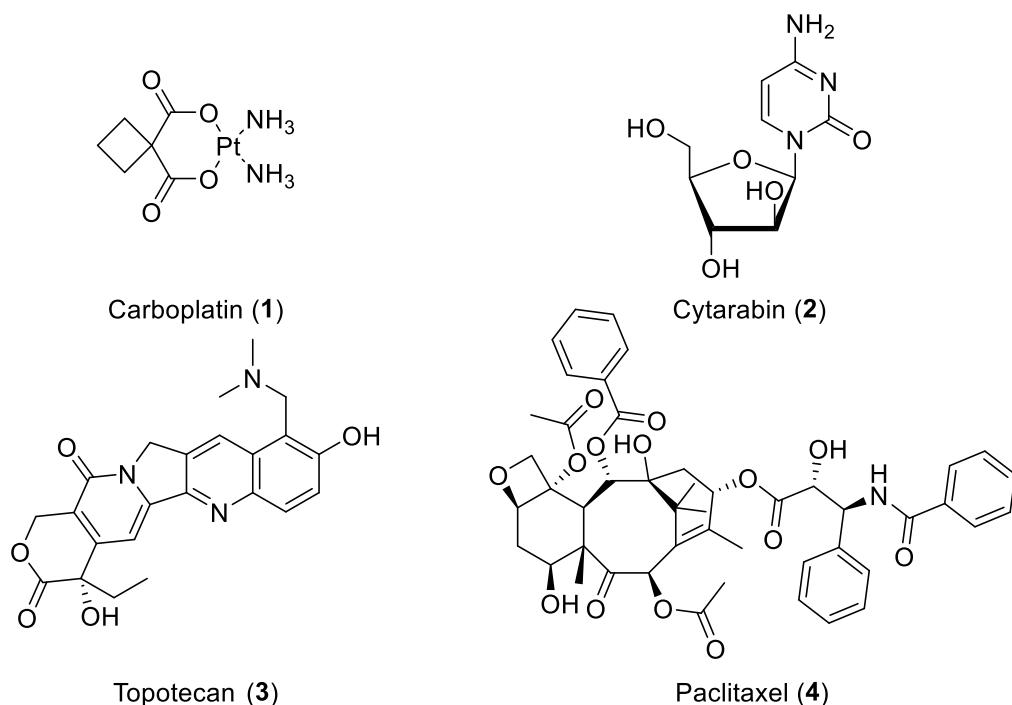


Abbildung 2: Auswahl einzelner Vertreter der unterschiedlichen Substanzklassen: Carboplatin (1, Alkylans), Cytarabin (2, Antimetabolit), Topotecan (3, Topoisomerase-Inhibitor), Paclitaxel (4, Mitose-Inhibitor).⁷

Die oben genannten Zytostatika gehen allerdings mit einigen Nebenwirkungen einher. Sie reagieren oft unspezifisch und sind bei allen Zellen mit hohen Proliferationsraten potent. Dadurch werden auch Zellen des Knochenmarks, des Haut- und Schleimhautgewebes und der Haarfollikel attackiert. Einige Substanzen sind zudem selbst stark karzinogen oder mutagen und führen zur Entstehung neuer Tumore. Strahlen- und Chemotherapie werden auch als Erstlinientherapie bezeichnet.

Die aktuelle Forschung entfernt sich daher von den klassischen Zytostatika hin zu der sogenannten *targeted Therapy* (gezielten Therapie), welche in der Behandlung von Krebs die Position der Zweitlinientherapie einnimmt. Diese Behandlungsvariante beschäftigt sich hauptsächlich mit der Aktivierung oder Inhibierung spezifischer Zellproteine, die eine existenzielle Rolle im Zellwachstum von Tumoren einnehmen. Ein Meilenstein im Bereich der

personalisierten Behandlung von Krebs ist die Entwicklung von Protein-Kinase-Inhibitoren, bei der gezielt onkogene Protein-Kinasen inhibiert werden. Dadurch wird das Krebszellwachstum behindert.¹² Das menschliche Genom kodiert rund 518 Kinasen, ca. 1.7% aller Gene.¹³ Protein-Kinasen sind wichtige Proteine in der Signaltransduktion der Zelle und regulieren die selektive Phosphorylierung anderer Proteine.¹⁴ Eine abnormale Funktionalität dieser Kinasen, meist ausgelöst durch eine spezifische Mutation des jeweiligen Codons, führt zu einer erhöhten Aktivität, einer Überexpression oder dem Verlust der Regulation. Dies hat Einfluss auf wichtige Charakteristika der Tumobiologie.¹⁵ Ihre wichtige Funktionalität innerhalb des Regulationsprozesses der Zelle machen sie daher zu einem interessanten Ziel für die Entwicklung von Inhibitoren.

In den letzten zwei Jahrzehnten wurden diverse Protein-Kinase-Inhibitoren entwickelt, die sowohl selektiv agieren als auch gute pharmakologische Eigenschaften aufweisen. Imatinib (**5**) ist ein solches Medikament und wird seit 2001 als Tyrosin-Kinase-Inhibitor (TKI) bei chronischer myeloischer Leukämie (CML) eingesetzt.¹⁶ In über 90% der CML-Erkrankungen liegt das sogenannte Philadelphia-Chromosom vor, das durch Austausch von Erbmaterial zwischen den Chromosomen 9 und 22 entsteht.¹⁶ Durch diesen Austausch wird ein dauerhaft aktives Tyrosin-Kinase-Fusionsprotein (BCR-ABL1) codiert.¹⁶ Imatinib (**5**) inhibiert BCR-ABL1, indem es an die ATP-Bindestelle bindet und die Phosphorylierung des Tyrosins verhindert.¹⁷ Die Lebenserwartung von CML-Patienten, die mit Imatinib (**5**) erfolgreich behandelt wurden, ähnelt denen der Allgemeinbevölkerung.¹⁸ Trotz der hohen Selektivität und Wirksamkeit von Imatinib (**5**) sorgen weitere Mutationen der Protein-Kinase dafür, dass der Wirkstoff das ATP-Bindestzentrum nicht mehr inhibieren kann. Der Patient entwickelt eine Resistenz gegen das entsprechende Medikament. Im August 2022 erfolgte die EU-Zulassung für den Wirkstoff Asciminib (**6**). Dieser hat einen bisher neuartigen Wirkmechanismus, wodurch nun eine Behandlungsmethode für eine Drittlinientherapie gegeben ist. Asciminib (**6**), der erste STAMP-Inhibitor („*specifically targeting the ABL myristoyl pocket*“), bindet nicht wie die bekannten TKI an die ATP-Bindestelle, sondern an der Myristoyl-Bindetasche.^{19, 20} Beim ursprünglichen ABL1-Protein erfolgt die Autoinhibierung durch eine N-terminale Myristoysäure-Einheit. Beim Fusionsprotein ist der N-Terminus durch die BCR-Protein-Untereinheit ausgetauscht, wodurch dem Protein der Selbstinhibierungsmechanismus fehlt.

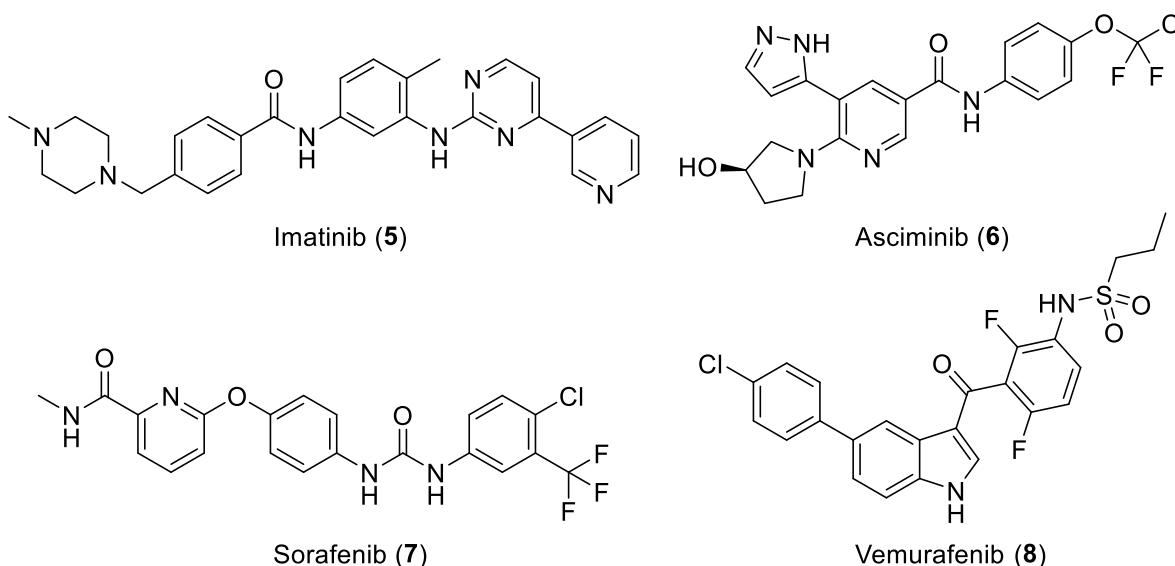


Abbildung 3: Imatinib (5) und Asciminib (6) zur Behandlung von CML mit BCR-ABL1 (oben). Sorafenib (7) als Medikament für diverse Nieren- und Leber-Erkrankungen, und Vemurafenib (8) zur Behandlung von B-RAF-induziertem Hautkrebs.^{16, 19, 21, 22}

Asciminib bindet selektiv in der Myristoyl-Bindetasche und induziert eine Konformationsänderung, die der ursprünglichen Konformation des autoinhibierten Proteins entspricht.²³ Asciminib (6) zeigt zudem eine bessere Verträglichkeit und eine geringere Abbruchrate im Vergleich zu bekannten TKIs zur Behandlung von CML.²⁰

Die Behandlung von Krebserkrankungen hat in den letzten 20 Jahren bedeutende Fortschritte durch die Entwicklung von Protein-Kinase-Inhibitoren gemacht. Ein medizinisches Interesse besteht jedoch darin, die Signaltransduktion bereits an ihrem Ursprung zu unterbinden. In diesem Zusammenhang stehen die RAS-Proteine im Mittelpunkt, da sie bei der Signalübertragung von extrazellulären zu intrazellulären Signalen eine entscheidende Funktion haben. Bereits Anfang der 1980er Jahre wurde mutiertes RAS-Protein in menschlichen Lungenkrebszellen entdeckt.²⁴ Aufgrund ihrer molekularen Oberflächenstruktur galten RAS-Proteine lange Zeit als nicht adressierbar, und die wissenschaftlichen Fortschritte auf diesem Forschungsgebiet blieben größtenteils aus. Dass RAS-Mutationen allerdings bei ca. 19% aller Krebspatienten vorliegen, zeigt, wie wichtig das Protein als Ziel in der Krebsforschung ist.²⁵ Von den drei RAS-Isoformen nimmt KRAS (*Kirsten rat sarcoma virus*) die bedeutendste Rolle ein. KRAS wird in 90% aller Pankreas-, in 30-50% aller Speiseröhren- und in ca. 20% aller Lungen-Krebserkrankungen nachgewiesen.²⁶⁻²⁹ KRAS bzw. im Falle der Krebserkrankung, mutiertes KRAS, nimmt im RAF-MEK-ERK-Signalweg und im PI3K-Signalweg eine entscheidende Rolle ein und ist somit ein überaus interessantes Ziel für die Wirkstoffentwicklung.

2 Allgemeiner Teil

Die RAS-Superfamilie enthält über 150 bekannte kleine Guanosintriphosphatasen (GTPasen). Diese kleinen GTPasen (~20 kD) weisen eine hohe Affinität gegenüber Guanosindiphosphat (GDP) und Guanosintriphosphat (GTP) auf.³⁰ Durch einen GDP/GTP-Austausch wechseln diese monomeren G-Proteine zwischen einer inaktiven und einer aktiven Form.²⁶ Die RAS-Superfamilie wird hierbei in fünf GTPase-Unterfamilien unterteilt: RAS, RHO, RAB, RAN und ARF. Die Unterfamilien sind hierbei an unterschiedlichen Zellvorgängen beteiligt. Das hier beschriebene RAS ist unter anderem an der Zellproliferation, der Signaltransduktion und der Zelldifferenzierung beteiligt.³¹

2.1 Struktureller Aufbau von K-RAS und dessen Schaltfunktion

2.1.1 Aufbau des Proteins

Die menschlichen Gene für RAS kodieren drei ähnliche Proteine: HRAS, NRAS und KRAS. KRAS tritt beim Menschen als KRAS4A und KRAS4B auf, wobei letzteres die deutlich häufiger auftretende Spezies ist.²⁶

KRAS4B unterscheidet sich nur minimal in seinem Aufbau von HRAS und NRAS. Das Protein besteht aus drei Untereinheiten: Der Effektor-Domäne, dem allosterischen Bereich und der hypervariablen Region (HVR).³² Die dreidimensionale Struktur des Proteins setzt sich aus insgesamt sechs β -Faltblättern und fünf α -Helices zusammen.³³ Diese Strukturelemente sind durch zehn Schleifen miteinander verbunden.²⁴ Die Effektor-Domäne beinhaltet die Switch I (SWI, gelb, AS 30-40) und die Switch-II-Region (SWII, cyan, AS 60-76).³² Der allosterische Bereich stimmt zu 86% zwischen den bekannten Isoformen überein.

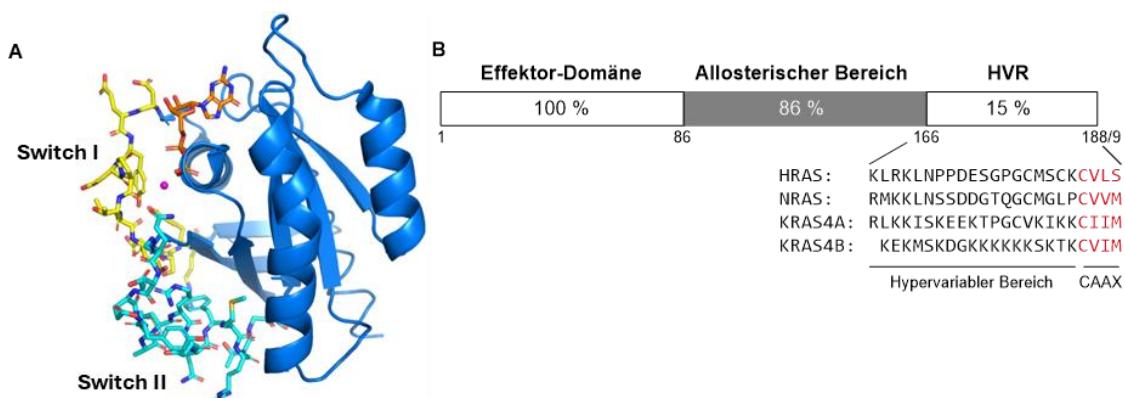


Abbildung 4: Anatomie des RAS-Proteins. A) Kristallstruktur von RAS^{GDP} (PDB: 4Q21). B) Schematische Darstellung des RAS-Proteins; Aufteilung des HVR nach bekannten Formen von HRAS, NRAS und KRAS.^{24, 32, 33}

Gemeinsam bilden die Effektor-Domäne und der allosterische Bereich die G-Domäne des Proteins aus. In der G-Domäne findet die Bindung und der Austausch von GDP zu GTP statt.

Signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Isoformen des RAS-Proteins zeigen sich erst in der HVR des Proteins. Die HVR ist für die Ausrichtung der G-Domäne zur Zellmembran ausschlaggebend. Jede der vier Isoformen besitzt eine C-terminale CAAX-Sequenz bestehend aus Cystein (C), zwei aliphatischen Aminosäuren (A) und einer beliebigen Aminosäure (X). Durch posttranskriptionale Modifikationen wird das im Cytoplasma befindliche RAS, auch als Pro-RAS bezeichnet, an der inneren Zellmembran verankert. Ein wichtiger Schritt nimmt hierbei die Farnesylierung der sogenannten CAAX-Sequenz ein, bei der ein 15-Kohlenstoff-Farnesylisoprenoid durch FTase an das Cystein über einen Thioether gebunden wird.³⁴ Während der posttranskriptionalen Modifikation werden an HRAS, NRAS und KRAS4A weitere Fettsäuren gebunden, die für die Membraneinbettung entscheidend sind. Die dominante menschliche Spezies KRAS4B durchläuft diese Modifikation nicht, da sie eine lange ununterbrochene Sequenz aus Lysin-Resten besitzt, die als weiteres Signal für die Membranausrichtung dient.^{32, 34}

2.1.2 Rolle von Ras in der Zelle

Das RAS-Protein, wie alle kleinen GTPasen der RAS-Superfamilie, fungiert innerhalb der Zelle als binärer Schalter. Diese Schaltfunktion entsteht durch den Austausch von GDP des inaktiven RAS-Proteins zu GTP. Durch den GDP/GTP-Austausch findet in der Effektor-Domäne, genauer gesagt in der SWI- und SWII-Region, eine Konformationsänderung statt.³⁵ RAS^{GTP} ist die aktive Form des Proteins und ist in der Lage mit weiteren Effektor-Proteinen (RAF, PI3K, RAL-GDS) innerhalb der RAS-Downstream-Kaskade zu interagieren.³³

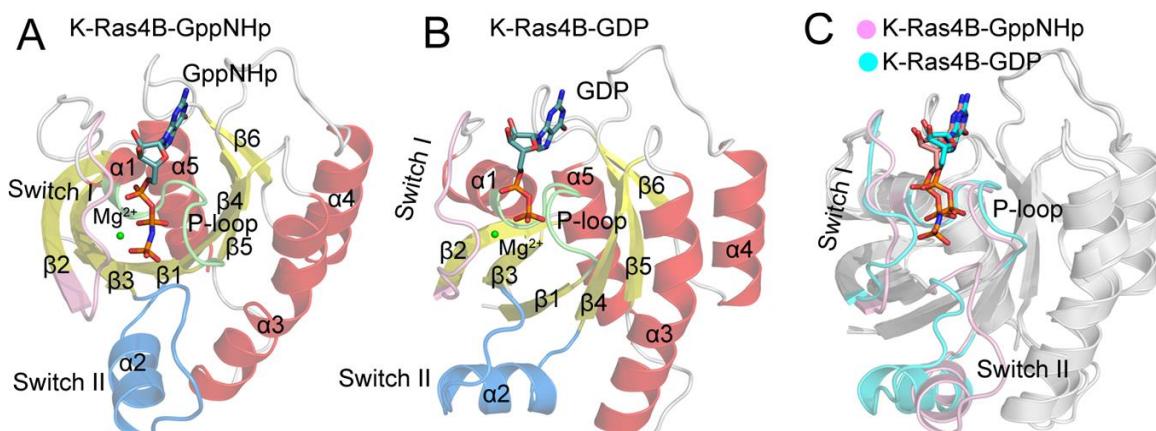


Abbildung 5: Darstellung von KRAS4B im aktiven GppNHp-gebundenen Zustand (A) und dem inaktiven GDP-gebundenen Zustand (B). Konformationsänderung in den Bereichen der SI (gelb) und SII (blau). (C) Überlagerung der beiden Strukturen zeigt die Konformationsänderung. Darstellung von ZHANG *et al.* übernommen.³³

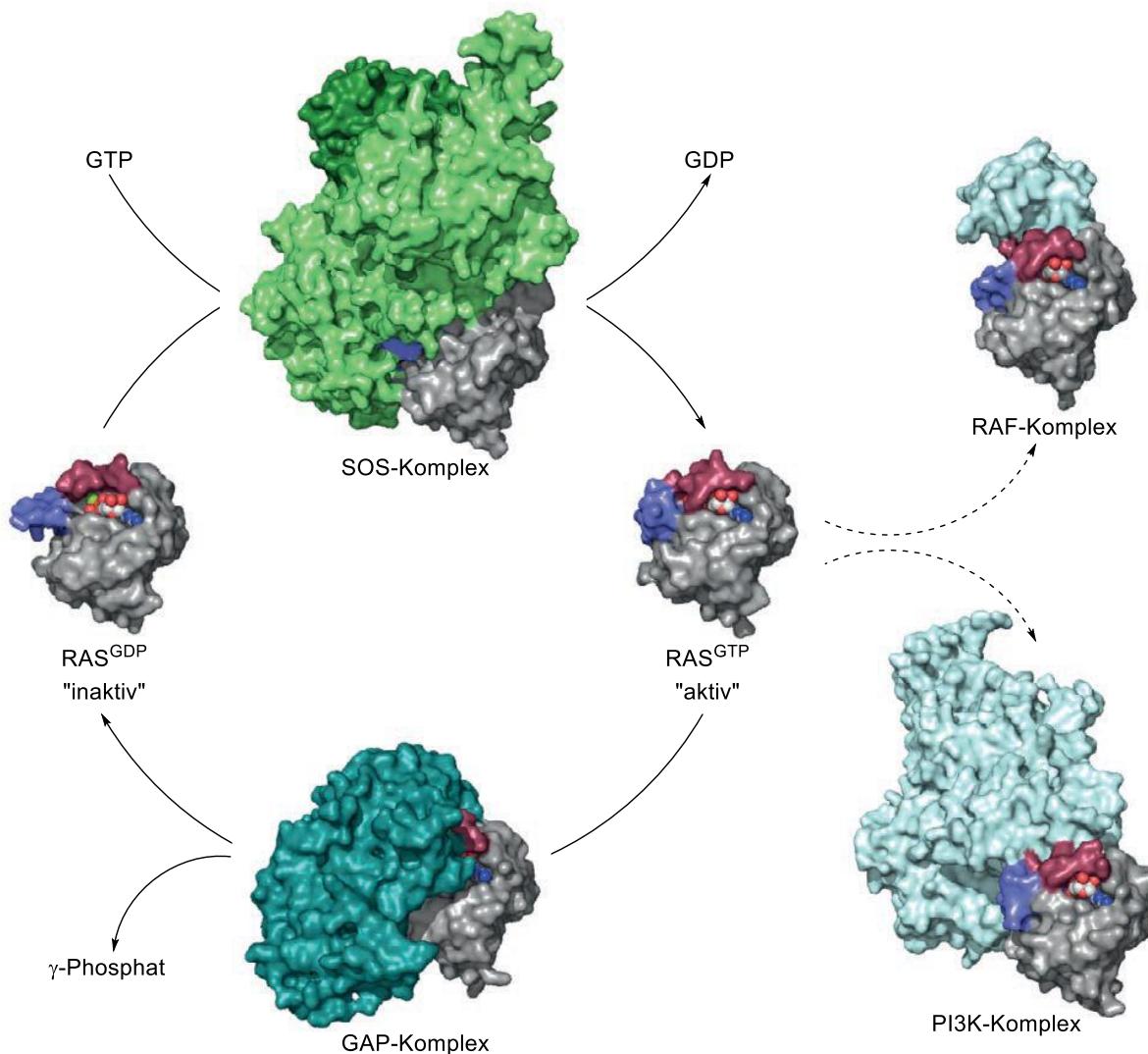


Abbildung 6: RAS-GTPase-Zyklus und Interaktion mit GEF (SOS) und GAP für GDP/GTP-Austausch. Aktives RAS^{GTP} ist in der Lage mit weiteren Effektor-Proteinen zu interagieren (z.B. RAF oder PI3K). Darstellung von SHOKAT *et al.* übernommen.³⁵

Die Konformationsänderung entsteht durch die Bildung verschiedener Wasserstoffbrücken zwischen der γ -Phosphat-Einheit des GTPs mit verschiedenen AS des Proteins. In der SI-Region betrifft dies Threonin35 und in der SII-Region Glycin60. Die Konformationsänderung führt dazu, dass die GTP-gebundene Bindetasche geschlossener vorliegt.

Die intrinsische Dissoziation von GDP an KRAS ist mit $1.6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ sehr gering. Für die zwei anderen Isoformen des Proteins liegen die Dissoziationskonstanten für GDP in einem ähnlichen Bereich.³⁶ Durch einen epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) wird ein Rezeptor der Zellmembran aktiviert, der anschließend RAS-spezifische Regulationsproteine zur Zellmembran rekrutiert. Bei diesen Proteinen handelt es sich um GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*). Diese Proteine, zu denen SOS1 (*son of sevenless*) und Cdc25 (*cell division cycle gene*) gehören, induzieren eine Konformationsänderung des Proteins. Die Affinität gegenüber GDP wird durch die strukturelle Änderung deutlich verringert.³⁷

Bei der anschließenden Bindung eines Guanosin-Phosphats begünstigt der GEF-Komplex weder GDP noch GTP. Aufgrund der zehnfach höheren Konzentration von GTP gegenüber GDP im Zellmedium, ist es statistisch begründet, dass sich mit der Zeit aktives RAS^{GTP} bildet.³⁷ Das aktive RAS^{GTP} ist nun in der Lage mit verschiedenen Effektor-Proteinen zu interagieren (**Abbildung 6**).

Für die Rückbildung des inaktiven RAS^{GDP} und die damit verbundene Unterbrechung der Signalweitergabe, muss das gebundene GTP zu GDP hydrolysiert werden. Da die intrinsische Hydrolyse von GTP sehr langsam verläuft ($6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$), wird dieser Schritt durch eine Interaktion mit GAPs (*GTPase activating proteins*) beschleunigt.³⁸ Durch den RAS-GAP-Komplex wird Glutamin61 innerhalb der SII-Region stabilisiert. Q61 koordiniert nach Stabilisierung das katalytisch wirkende Wassermolekül, welches die γ -Phosphat-Einheit des GTP hydrolysiert.³⁹ Arginin789 des GAPs, auch als „Arginin-Finger“ bekannt, interagiert während des RAS/GAP-Komplexes ebenfalls mit den α - und β -Phosphat-Einheiten des GTP und begünstigt durch dessen Interaktion die stattfindende Hydrolyse.⁴⁰

2.1.3 Bekannte Mutationen und deren Auswirkung auf die Funktionalität

In gesunden Zellen liegt ein Gleichgewicht zwischen inaktivem RAS^{GDP} und aktivem RAS^{GTP} vor. Dieser Zustand wird durch die oben beschriebenen Regulationsproteinklassen GAP und GEF kontrolliert. Im Falle einer KRAS-Mutation ist es möglich, dass unter bestimmten Bedingungen die Interaktion mit einem dieser Regulationsproteine gestört wird. Hierbei handelt es sich oft um die Interaktion mit GAP. Das gebundene GTP wird nicht mehr hydrolysiert und RAS^{GTP} bleibt in seiner aktiven Form.^{41, 42} Das dauerhaft aktive RAS-Protein interagiert mit Downstream-Effektorproteinen, wodurch die Zelle essenzielle Funktionen, die das Zellwachstum oder die Überlebensfähigkeit regulieren, verliert. Die Folge aus dieser dauerhaften Signalweitergabe ist eine Krebserkrankung.

Die meisten Mutationen von KRAS, die in Krebszellen identifiziert wurden, liegen auf Exon1 bzw. Exon2 des Genoms. Mutationen der Aminosäuren G12, G13 und Q61 treten hierbei im Vergleich zu anderen Mutationen vermehrt auf (**Abbildung 7**).^{25, 43} In der COSMIC-Datenbank (*Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer*, Stand 10.10.2023) trat eine KRAS^{G12D}-Mutation bei ca. 35% der 47148 untersuchten Zellproben mit Mutationen auf.⁴³ Dahinter kommen KRAS-Varianten mit G12V (~24%), G13D (~13%) und G12C (~12%).

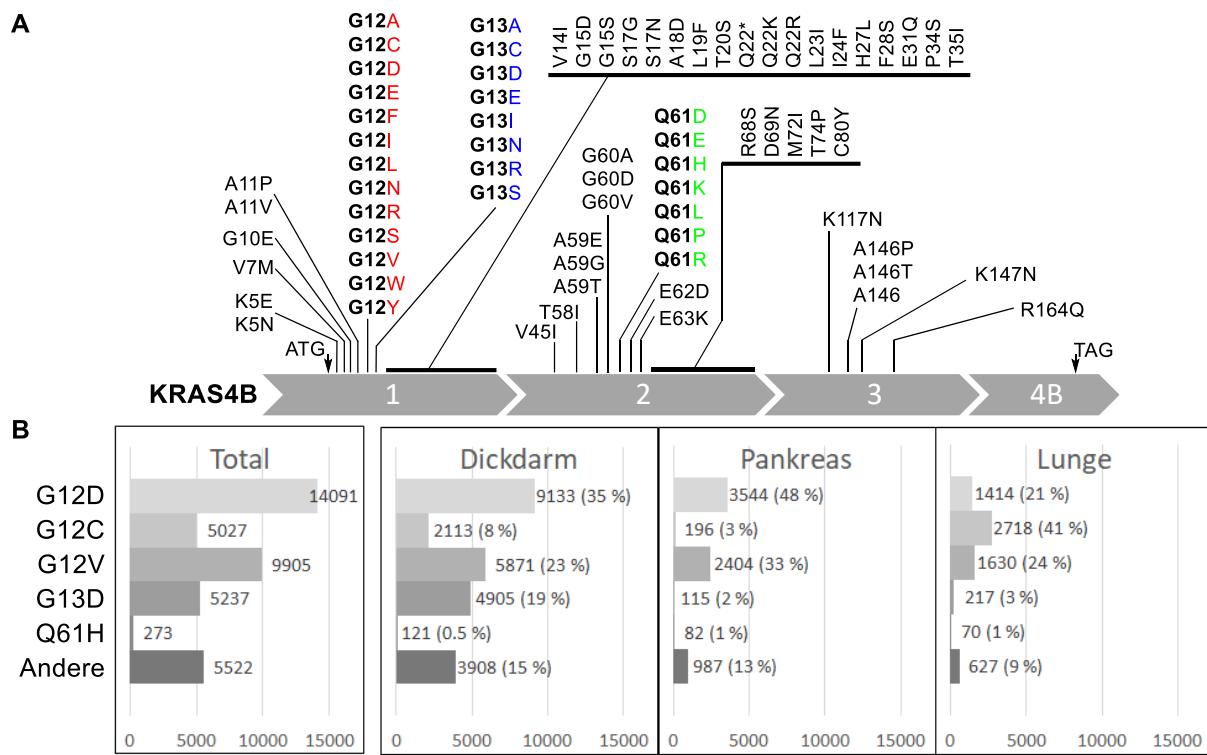


Abbildung 7: A) Schematische Exon-Darstellung des KRAS4B-Gens. Auflistung aller bisher identifizierter Mutanten in humanen Krebszellen. B) Verteilung der jeweiligen KRAS-Mutation in Abhängigkeit zur Krebserkrankung.^{25, 43, 44}

Die Art der Mutation unterscheidet sich zudem stark vom jeweiligen Zelltyp. Während KRAS^{G12C}-Mutationen nur mit 8% in KRAS-mutierten Dickdarm-Krebserkrankungen auftritt, nimmt diese Mutation den größten Teil bei KRAS-induzierten Lungen-Krebserkrankungen ein (**Abbildung 7**). Eine KRASG12D-Mutation stellt bei Pankreaskrebserkrankungen fast die Hälfte aller festgestellten Mutationen dar.

Die Aminosäuren G12 und G13 liegen im Bereich, in dem der Arginin-Finger des GAP-Proteins mit RAS interagiert. Eine Mutation an dieser Stelle führt dazu, dass die Protein-Protein-Interaktion (PPI) geschwächt wird. Eine Q61-Mutation tritt vergleichsweise weniger auf, bewirkt aber, dass die Koordination des für die Hydrolyse benötigten Wassermoleküls gestört wird.³⁸

2.2 Aktuelle K-RAS-Inhibitoren und Strategien zur Inhibierung

RAS galt aufgrund seiner strukturellen Eigenschaften jahrelang als nicht adressierbar. Abgesehen von der GDP/GTP-Bindetasche zeigt die Oberfläche des Proteins nur wenige polare Vertiefungen für mögliche Interaktionen. Die Adressierung der GDP/GTP-Bindetasche, ähnlich wie bei anderen ATP-basierten Inhibitoren, gilt aufgrund der ausgeprägt hohen Affinität gegenüber GDP bzw. GTP als aussichtslos. Um RAS zu inhibieren, wurden

verschiedene Ausweichstrategien entwickelt.³⁵ Die direkte Inhibierung von RAS kann somit in vier Konzepte unterteilt werden:

- Anteil von RAS^{GTP} verringern.
- Unterbindung von RAS-GTP-Effektor-Interaktionen
- Stabilisierung nicht produktiver RAS-Protein-Komplexe
- Senkung der RAS-Konzentration an der Zellmembran

Diese Wirkkonzepte haben unterschiedliche Erfolge gezeigt. Kristallstrukturen und NMR-Untersuchungen mit verschiedenen Liganden zeigten in den vergangenen Jahren, dass das RAS-Protein, entgegen der ursprünglichen Annahme, einige Angriffsflächen bietet. Das Protein zeigt eine gewisse Flexibilität, die die Entstehung diverser Bindetaschen ermöglicht. Die SII-Bindetasche und eine Bindestelle zwischen der SI- und SII-Region, die als SI/II-Bindetasche bezeichnet wird, sind neben der Nukleotid-Bindetasche die bekanntesten Bindetaschen des Proteins.

2.2.1 Direkte Inhibierung des RAS-SOS-Komplexes

Wie oben bereits geschildert, ist es eine sinnvolle Strategie zur Inhibierung des RAS-Signalweges, die Konzentration von aktivem RAS^{GTP} möglichst gering zu halten. Biologische Untersuchungen veranschaulichten, dass die Aufrechterhaltung einer hohen RAS^{GTP}-Konzentration abhängig von der RAS-GEF-Interaktion ist. Die meisten KRAS-Mutanten weisen weiterhin eine, wenn auch im Vergleich zum Wildtyp schlechtere, intrinsische Hydrolyse-Aktivität auf.³⁸ Eine Inhibierung der Interaktion mit GEF würde auf Dauer dazu führen, dass die Konzentration von RAS^{GTP} sinkt.

Die ersten Inhibitoren, die diesen Wirkmechanismus zeigten, wurden 1997 von TAVERAS *et al.* in Zusammenarbeit mit *Agouron Pharmaceuticals* entwickelt. Das ursprüngliche Vorhaben, Nukleotid-Antagonisten zu entwickeln, scheiterte. Jedoch wurde mittels computergestützter Bindungsstudien, NMR-Untersuchungen und massenspektroskopischer Methoden gezeigt, dass die in **Abbildung 8** dargestellten Verbindungen in der direkten Nachbarschaft zur Nukleotid-Bindetasche in einer neuen, zu diesem Zeitpunkt unbekannten hydrophoben Bindetasche nicht-kovalent binden.⁴⁵⁻⁴⁷ Da sie in der SII-Region des Proteins lag, wurde diese fortan als SII-Bindetasche bezeichnet. Verbindung **9** zeigte erste positive Ergebnisse, überzeugte aber aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit nicht. Auf dieser Basis wurden die Verbindungen **10** und **11** entwickelt.

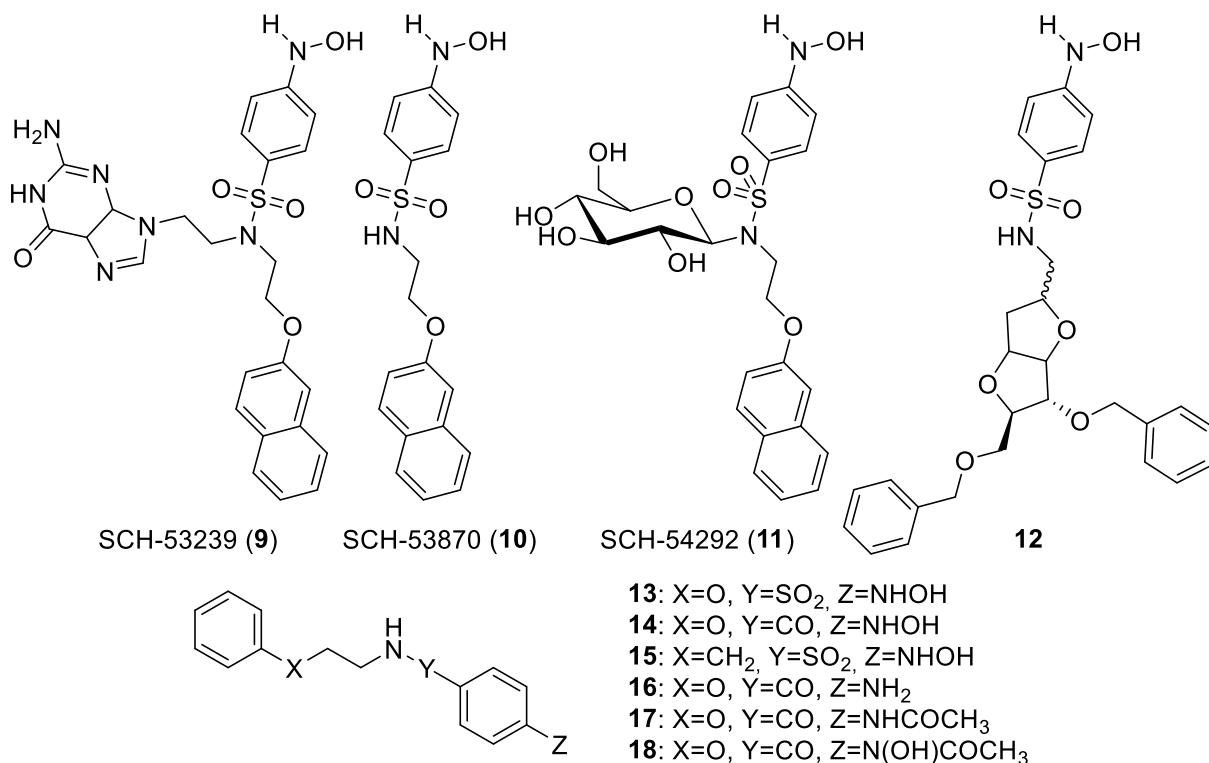


Abbildung 8: Struktur der von TAVERAS et al. (SCH-53239, **9**; SCH-53870, **10**; SCH-54292, **11**) und PERI et al. (**12** - **18**) entwickelten RAS-Inhibitoren der SII-Bindetasche.^{45, 48, 49}

Die Co-Kristallisation zwischen Ligand **11** und dem RAS-Protein, die für zusätzliche Untersuchungen erforderlich war, scheiterte, weshalb sich TAVERAS *et al.* auf die bereits erwähnten Untersuchungsmethoden beschränkten. Auf Grundlage der Ergebnisse von TAVERAS *et al.* wurden 2004 und 2005 von PERI *et al.* weitere Inhibitoren entwickelt.^{48, 49} Computergestützte Docking-Untersuchungen lieferten die Diastereomere **12**.⁴⁸ Im Vergleich zu den ursprünglich entwickelten Verbindungen von TAVERAS *et al.*, erzielten diese Strukturen in der Schrödinger-Software *Glide* ähnliche *docking scores*. *In vitro*-Assays, bei denen der Nukleotid-Austausch in Anwesenheit von Cdc25 untersucht wurde, zeigten, dass diese Strukturen den Austausch von GDP zu GTP störten. Erste *in vivo*-Untersuchungen an Hefezellen mit KRAS^{G12D} deuteten ebenfalls darauf hin, dass das C-2'-R-Isomer (**12**) das KRAS-abhängige Zellwachstum bei einer Konzentration von 100 µM inhibierte.⁴⁸ Untersuchungen ergaben zudem, dass für die biologische Aktivität die Hydroxylamin-Funktion der Moleküle entscheidend ist.⁴⁹ Trotz der gezeigten Inhibierung des Zellwachstums waren die Verbindungen nicht besonders potent. Die Tatsache, dass es nicht gelang, Kristallstrukturen des Protein-Ligand-Komplexes aufzunehmen, erschwerte eine Optimierung der Verbindungen.

Einen weiteren Ansatz zur Inhibierung des Nukleotid-Austausches lieferten im Jahr 2011 PATGIRI *et al.* mit der Entwicklung eines auf der Struktur von SOS1 basierenden Peptids.⁵⁰ Der strukturelle Aufbau des Inhibitors entspricht hierbei der Struktur der α H-Helix des SOS1-Proteins. Diese interagiert, neben der α I-Helix, mit dem RAS-Protein, wodurch angenommen wurde, dass ein Derivat dieser α -Helix die Bildung des RAS-SOS-Komplexes stört.

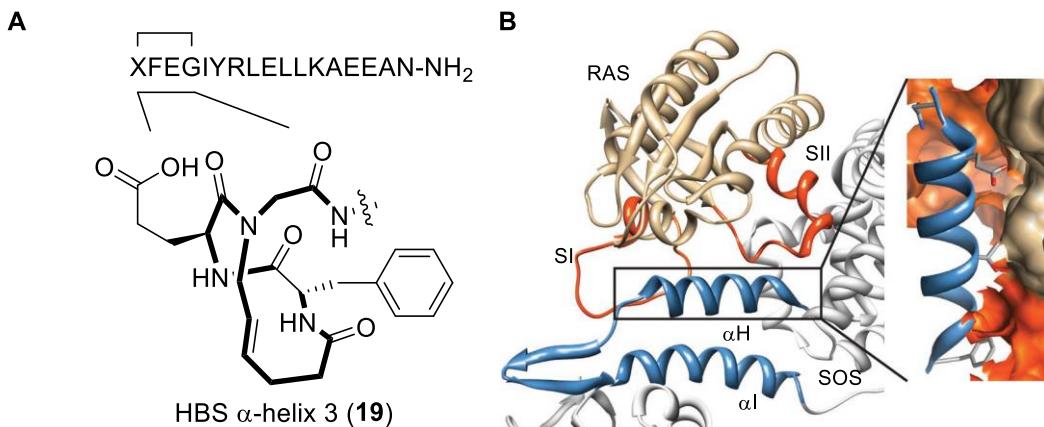


Abbildung 9: A) Darstellung der Peptidsequenz von HBS 3 (19). B) RAS-SOS-Interface (PDB: 1INVW). Es wird die Interaktion der α -Helix mit dem RAS-Protein innerhalb der SI- und SII-Region gezeigt. Darstellung von PATGIRI *et al.* übernommen.⁵⁰

Das entwickelte Peptid war in der Lage, die Konzentration von RAS^{GTP} zu senken. *In vivo*-Zellassays mit HeLa-Zellen zeigten ebenfalls, dass das Niveau an aktiviertem RAS in Gegenwart von HBS 3 (19) reduziert war. Zudem hemmte HBS 3 (19) den RAS-ERK-Signalweg.⁵⁰ Durch weitere Untersuchungen wurde festgestellt, dass das Peptid nicht passiv in die Tumorzellen diffundierte, sondern über einen energieabhängigen Mechanismus in die Zellen gelangte. Der genaue Mechanismus ist zum jetzigen Zeitpunkt jedoch noch nicht bekannt.⁵⁰

Zwei weitere Arbeitsgruppen, MAURER *et al.* und FESIK *et al.*, identifizierten im Jahr 2012 unabhängig voneinander weitere Liganden. Diese adressierten eine bisher für kleine Moleküle unbekannte Bindestelle des RAS-Proteins, die zwischen der SI- und SII-Region liegt und fortan als SI/II-Bindetasche bezeichnet wurde.^{51, 52} Beide Arbeitsgruppen untersuchten die Struktur-Wirkungsbeziehung verschiedener Fragmente mittels Kernspinresonanzspektroskopie (SAR-NMR) und entwickelten auf Basis der erzielten Ergebnisse die in **Abbildung 10** dargestellten Verbindungen.

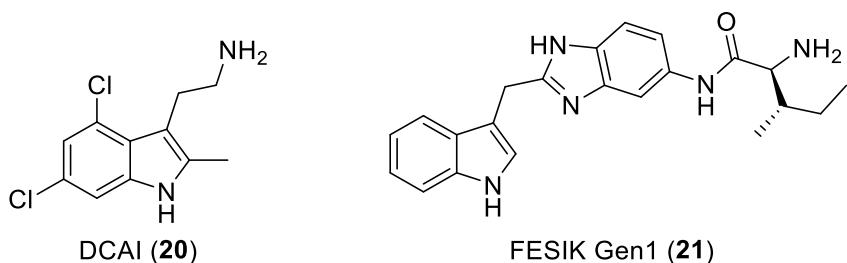


Abbildung 10: Strukturformeln der von MAURER *et al.* entwickelten Verbindung DCAI (20) und der von FESIK *et al.* entwickelten Verbindung 21.^{51, 52}

Ähnlich wie das von PATGIRI *et al.* entwickelte Peptid, schränken die hier dargestellten Verbindungen **20** und **21** die RAS-SOS-Komplexbildung ein und stören somit den Nukleotid-Austausch von GDP zu GTP. Die Verbindungen sind jedoch, ähnlich wie die bereits bekannten Verbindungen für die SII-Bindetasche, nicht besonders potent. Im Jahr 2019 führten FESIK *et al.* und RABBITTS *et al.* unabhängig voneinander Optimierungsstudien und Fragment-Assays durch, um diese Liganden weiter zu verbessern. Das Resultat waren Verbindung CH-3 (22) und BI-2852 (23).^{53, 54} BI-2852 (23) basiert, wie bereits die FESIK-Verbindung der ersten Generation (21) und DCAI (20), auf einer Indol-Einheit, die in der SI/II-Bindetasche mit den entsprechenden Aminosäuren interagiert (siehe **Abbildung 11**).

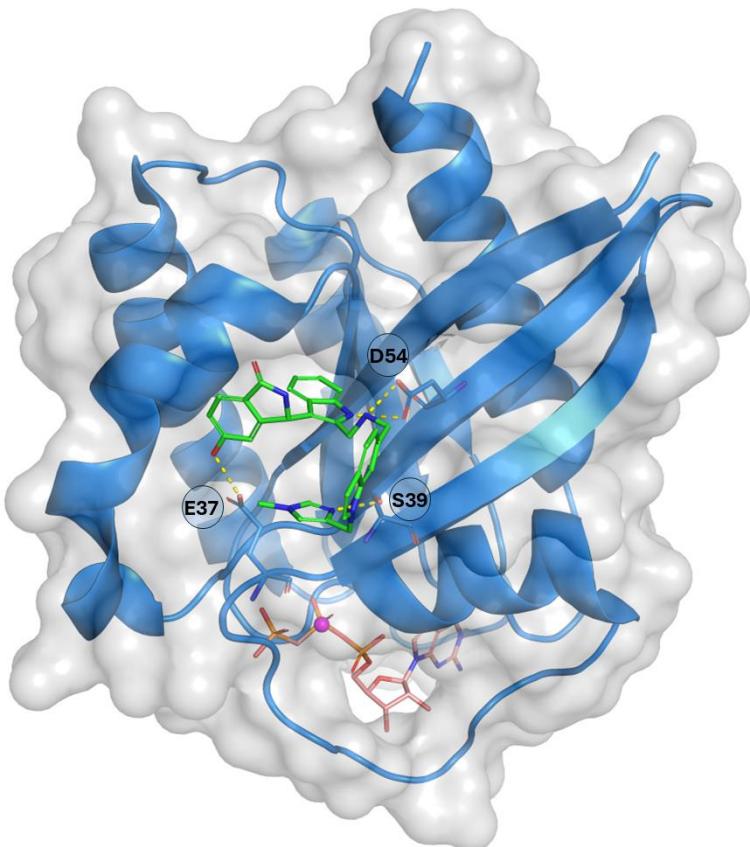


Abbildung 11: Darstellung der Protein-Ligand-Interaktion zwischen BI-2852 (23, grün) und KRAS^{G12D} (blau), cokristallisiert mit GCP (orange) (PDB: 6GJ8). Der Ligand interagiert mit Glu37, Ser39 und Asp54 innerhalb der SI/II-Bindetasche.

Die Aktivität von BI-2852 (**23**) wurde in drei unterschiedlichen Assays getestet: a) Inhibierung der Interaktion von KRAS^{GDP} mit der katalytischen Bindestelle von SOS, b) Inhibierung der Interaktion von KRAS^{GTP} mit der allosterischen Seite von SOS und c) Inhibierung von KRAS^{GTP} mit Effektorproteinen (c-RAF und PI3K α). BI-2852 (**23**) zeigte in den verschiedenen Assays nanomolare Messwerte. Die Verbindung wies jedoch nur eine geringe Selektivität gegenüber den unterschiedlichen Mutanten im Vergleich zum Wildtyp des Proteins auf. Zudem inhibierte die Verbindung neben dem GDP/GTP-SOS-Austausch auch die Interaktion mit GAP und weiteren Effektorproteinen. Da sowohl der SOS1 katalysierte Austausch als auch der GAP katalysierte Austausch gehemmt wurde, blieb die Konzentration von RAS^{GTP} unverändert. Inhibitoren, die mutationsunabhängig das RAS-Protein inhibieren, werden auch als pan-RAS-Inhibitoren bezeichnet und sind kritisch zu betrachten, da eine vollständige Inhibierung aller RAS-Isoformen zytotoxisch ist.⁵⁴

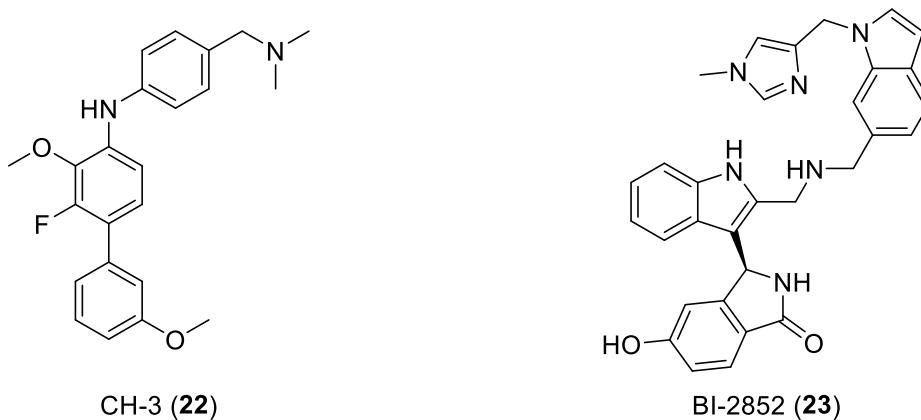


Abbildung 12: Strukturformeln der von RABBITTS *et al.* entwickelten Verbindung CH-3 (**22**) und der von FESIK *et al.* entwickelten Verbindung BI-2852 (**23**).

Für die Adressierung der SII-Bindestelle bietet sich die Mutation G12C an, da diese Aminosäure die Entwicklung kovalent bindender Inhibitoren ermöglichte. Die ersten kovalent bindenden Fragmente dieser Art wurden von OSTREM *et al.* mithilfe eines Bindungsassays mit 480 Disulfid-haltigen Fragmenten entdeckt.⁵⁵ Weitere Verbindungen dieser Art zeigten, dass eine kovalente Bindung dieser Strukturen die Affinität von RAS^{G12C} gegenüber GTP reduziert. Durch Optimierungsarbeiten an der Disulfid-Kopfgruppe entstand Acrylamid **24**. Auf Basis dieses Inhibitors entwickelte *Wellspring Biosciences* im Jahr 2016 die Verbindung ARS-853 (**25**) sowie die später publizierte und optimierte Verbindung ARS-1620 (**26**).^{56, 57} Kristalluntersuchungen beider Verbindungen zeigten ähnliche Interaktionen innerhalb der SII-Bindetasche, wobei die Quinazolin-basierte Verbindung ARS-1620 (**26**) im direkten Vergleich deutlich potenter war als ARS-853 (**25**). Insbesondere die orale Bioverfügbarkeit ($F > 60\%$) wurde im Vergleich zur Glycin-Linker-basierten Verbindung (**25**) verbessert. Mit diesen

Verbindungen legte *Wellspring Biosciences* den Grundstein für irreversibel kovalent bindende Inhibitoren der G12C-Mutante des RAS-Proteins.

Basierend auf Verbindung **26** entwickelten LANMAN *et al.* bei *Amgen* weitere Inhibitoren. Dabei wurde die Hypothese verfolgt, dass ein Hybrid-Molekül aus ARS-1620 (**26**) und einer eigens entwickelten Leitstruktur eine höhere Aktivität liefern könnte.⁵⁸ Die von LANMAN *et al.* entwickelte Leitstruktur stammte ebenfalls aus vorangegangenen Bindungsstudien. Erste Untersuchungen an einem Phthalazin-Grundgerüst zeigten jedoch, dass die Potenz der ursprünglichen Verbindung **26** nicht übertroffen wurde (SOS-Austauschassay $IC_{50} = 0.939 \mu M$).⁵⁸ Der Austausch der Phthalazin-Einheit durch eine Quinazolinon-Einheit und die Einführung mehrerer gezielt gewählter Substituenten führte schließlich zur Verbindung AMG 510 (**27**). Die Optimierungsschritte ermöglichen die Adressierung einer weiteren, kleineren Bindestelle (H95/Y96/Q99) gegenüber der SII-Region. Dies führte zu einer deutlichen Steigerung der Affinität gegenüber RAS^{G12C}. AMG 510 (**27**) zeigte zudem vielversprechende Ergebnisse in *in vitro* und *in vivo* Assays und ist seit Januar 2022 unter dem Handelsnamen *Lumykras®* bzw. *Sotorasib* zur Behandlung des nicht-kleinzelligen Lungenkrebses (NSCLC) in Verbindung mit einer KRAS^{G12C} Mutation zugelassen.

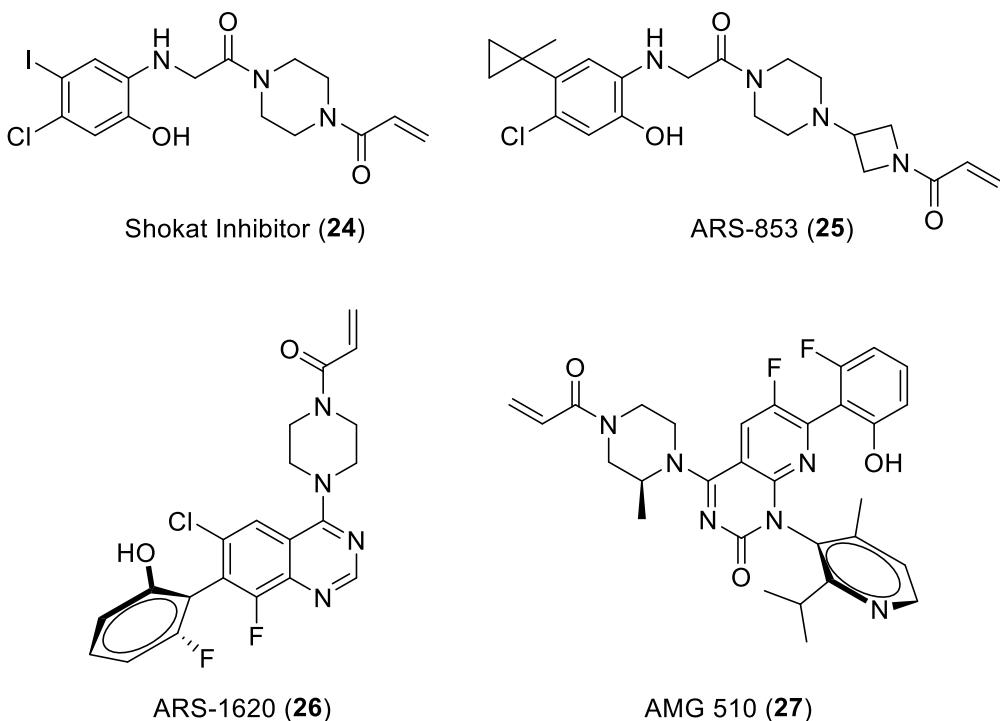


Abbildung 13: Strukturformeln der von OSTREM *et al.* entwickelten Verbindung **24**, der von *Wellspring Biosciences* entwickelten Verbindungen ARS-853 (**25**) und ARS-1620 (**26**) und der von *Amgen* entwickelten Verbindung AMG 510 (**27**).

Mirati Therapeutics folgte einer ähnlichen Vorgehensweise bei der Entwicklung ihres eigenen Inhibitors. In Kooperation mit *Array BioPharma* wurde eine Bibliothek kovalent bindender

Fragmente untersucht. Die Ergebnisse des Screenings wurden anschließend in ein strukturbasiertes Wirkstoffdesign integriert, das zur Entwicklung von Verbindung **28** führte.⁵⁹ Über weitere Optimierungsschritte entstand schließlich der irreversibel kovalent bindende Inhibitor **29**, der im p-ERK-Assay einen IC_{50} von 70 nM für KRAS^{G12C} aufwies.⁵⁹ Trotz seiner sehr guten antitumoralen Eigenschaften zeigte die Verbindung pharmakokinetische Einschränkungen in Untersuchungen an CD1-Mäusen. Insbesondere wies sie Schwächen im Bereich der oralen Bioverfügbarkeit (2.4% bei 100 mg/kg PO-Dosis) und der Ausscheidungsrate ($CL = 46$ mL/min/kg bei 3 mg/kg IP-Dosis) auf.⁵⁹

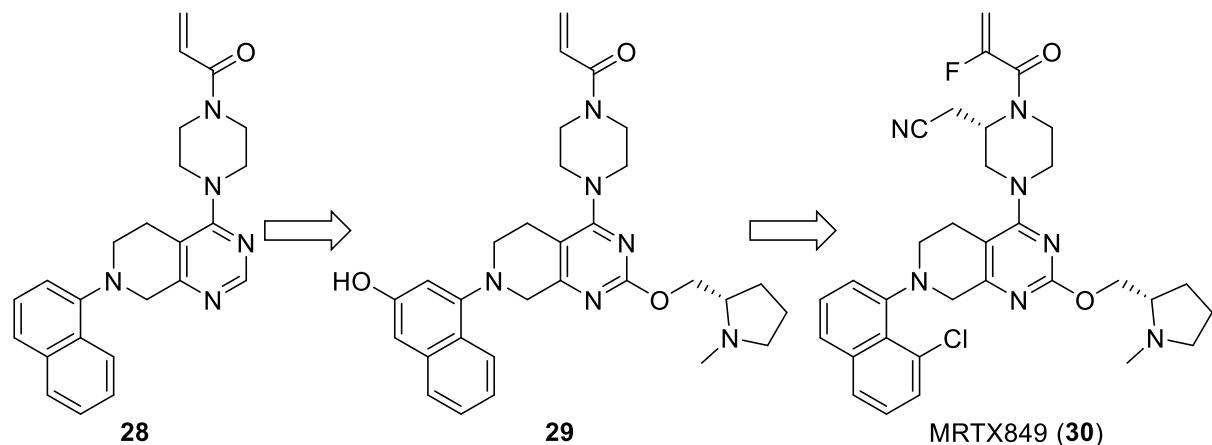


Abbildung 14: Optimierungsarbeiten von *Mirati Therapeutics* an der Leitstruktur **28**. Über Verbindung **29** wurde MRTX849 (**30**) entwickelt.

In einer im Jahr 2020 veröffentlichten Publikation beschreibt *Mirati Therapeutics* die strategische Vorgehensweise zur Entwicklung des optimierten Inhibitors MRTX849 (**30**, **Abbildung 15**).⁶⁰ Zu Beginn wurde festgestellt, dass die Hydroxygruppe eine Ursache für die metabolische Instabilität des Inhibitors darstellte. Nach Entfernung der Hydroxygruppe war es unter Verwendung von Kristallstrukturen möglich, die Protein-Ligand-Interaktionen der einzelnen Optimierungsschritte zu untersuchen und die Substituenten, die mit entsprechenden Aminosäuren wechselwirken, anzupassen. Hierbei wurde beobachtet, dass die Substitution des Piperazins mit $-\text{CH}_2\text{CN}$ die Wirkung des Inhibitors drastisch steigerte. Das *S*-Diastereomer war hierbei in zellulären Assays nahezu 300-mal potenter als das Deshydroxyanalogon der Verbindung **29**.⁶⁰ Im folgenden Verlauf gelang es, den Inhibitor an die Oberfläche des RAS^{G12C}-Proteins anzupassen, wodurch MARX *et al.* zwei wirksame Inhibitoren erhielten. Für beide Strukturen wurden in zellulären Assays Werte im einstellig nanomolaren Bereich ermittelt.⁶⁰ Die Acrylamid-Einheit dieser beiden Verbindungen zeigte allerdings in Studien an Beagle-Hunden eine geringe metabolische Stabilität ($CL = 225$ bzw. 151 mL/min/kg). Durch die Einführung eines 2-Fluoroacrylamids (**MRTX849, 30**) verschlechterte sich zwar der

zelluläre IC₅₀-Wert (IC₅₀ = 14±3 nM) geringfügig, jedoch wurde die speziesübergreifende Stabilität der Verbindung im Blut (Maus, Hund, Mensch) drastisch erhöht. Weitere Untersuchungen zeigten, dass MRTX849 (**30**) bei Mäusen zur Regression von Tumoren führte und hochgradig selektiv für KRAS^{G12C} war.⁶⁰ MRTX849 (**30**) bzw. *Adagrasib* befindet sich aktuell in Phase III einer klinischen Studie zur Behandlung von nicht-kleinzeligem Lungenkrebs (NSCLC) und in Phase II zur Behandlung von Pankreaskrebs und anderen Tumoren.⁶¹

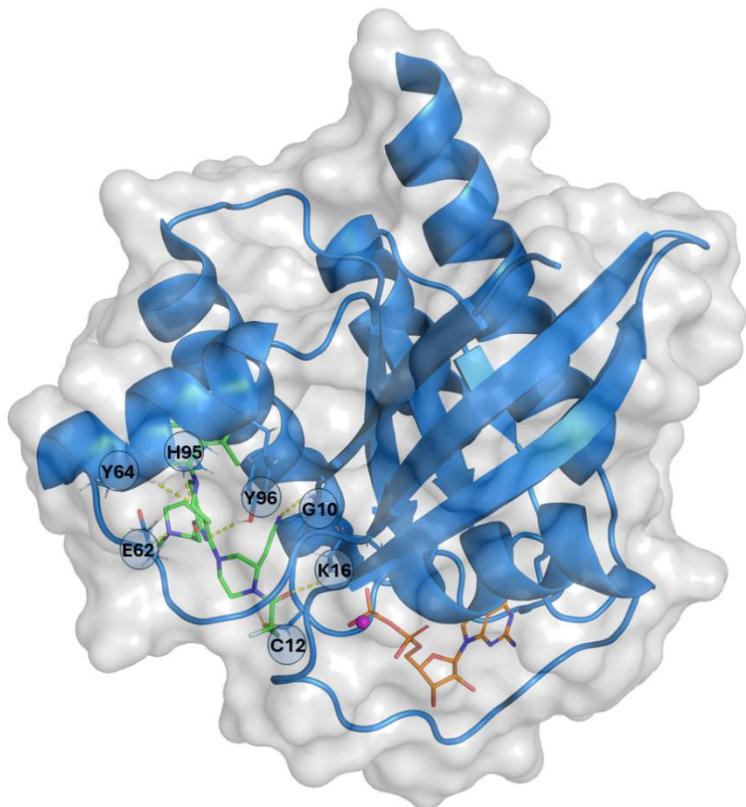


Abbildung 15: Darstellung der Protein-Ligand-Interaktion zwischen MRTX849 (**30**, grün) und KRAS^{G12D} (blau), cokristallisiert mit GDP (orange) (PDB: 6UT0). Der an Cys12 kovalent bindende Ligand interagiert mit Gly10, Lys16, Glu62, Tyr64, His95 und Tyr96 innerhalb der SII-Bindetasche.⁶⁰

Wellspring Bioscience, Amgen als auch *Mirati Therapeutics* zeigten mit ihren Inhibitoren, dass Cystein12 in KRAS^{G12C} mittels reaktiver Kopfgruppen selektiv adressierbar war. Für KRAS^{G12D} und anderen Mutanten des Proteins, für die nicht kovalent bindende Inhibitoren benötigt werden, gab es bis vor kurzem jedoch noch keine weiteren Anhaltspunkte für einen selektiven Inhibitor. Durch ihre Expertise im strukturbasierten Wirkstoffdesign an der G12C-Mutante, nahm *Mirati Therapeutics* die Herausforderung an, einen selektiven und potenzen Inhibitor für die KRAS^{G12D} zu entwickeln. Aufgrund der fehlenden kovalenten Bindestelle in der SII-Bindetasche des RAS-Proteins, versuchten MARX *et al.*, die Affinität jedes Bausteins gegenüber der SII-Bindetasche zu maximieren.⁶² Unter der Annahme, dass das protonierte

Piperazin-System mit der Aminosäure Asp12 interagieren könnte, wurde zunächst das Grundgerüst und der entsprechende Substituent angepasst.^{62, 63} Das entsprechende Derivat mit Pyrido[4,3-*d*]pyrimidin-System und freiem Piperazin-Ring erzielte eine K_D von 3.5 μM in einem KRAS^{G12D} SPR-Assay.⁶² Eine Verbindung mit dem ursprünglichen *Adagrasib*-Grundkörper war deutlich inaktiver, sodass das neue Grundgerüst für zukünftige Strukturen verwendet wurde. Zudem wurde der C7-Naphthol-Substituent aus Verbindung **29** eingesetzt. In einer ersten Versuchsreihe untersuchten MARX *et al.* den Einsatz eines Piperazin-Substituent und möglichen Alternativen. Am vielversprechendsten erschien hierbei Verbindung **31**. Der [3,2,1]-bicyclische Diamino-Substituent zeigte in der Kristallstruktur mit dem KRAS^{G12D}-Protein mehrere Interaktionen innerhalb der Bindetasche (**Abbildung 16**).

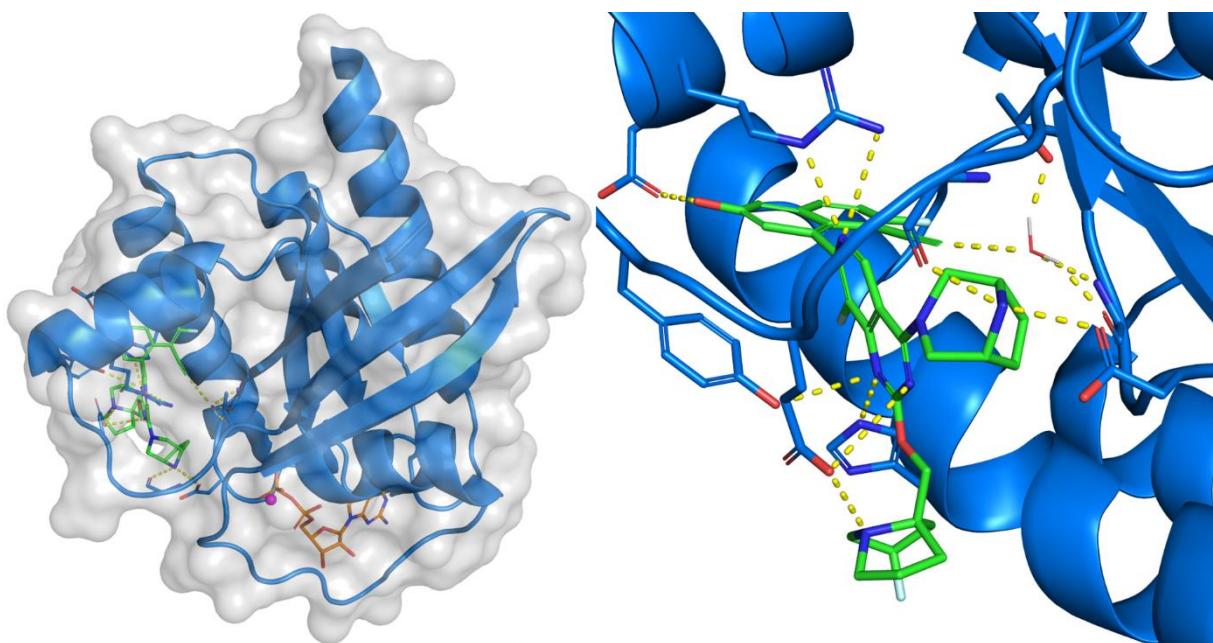


Abbildung 16: A) Darstellung der Protein-Ligand-Interaktion zwischen MRTX1133 (34, grün) und KRAS^{G12D} (blau), cokristallisiert mit GDP (orange) (PDB: 7RPZ). B) Detaillierte Ansicht des Liganden in der SII-Bindetasche. Der Ligand interagiert mit Asp12, Gly60, Glu62, Asp69, Arg68, His95 und bildet über ein Wassermolekül weitere Interaktion zu Gly10 und Thr58 aus.⁶²

Durch die Konformation des Substituenten wurde zudem die geladene Aminogruppe so positioniert, dass sie optimal mit Asp12 und Gly60 interagieren konnte. In einem Assay zur Messung des ERK-Signalwegs bei AGS-Zellen (Zellen mit einer KRAS^{G12D}-Mutation) wies Verbindung **31** einen IC_{50} von 0.530 μM auf.⁶² Nach weiteren Optimierungsschritten der C2- und der C7-Substituenten des Pyrido[4,3-*d*]pyrimidin-Systems mit den wirksamsten Kandidaten in Form von Verbindung **32** und **33** (**Abbildung 17**), synthetisierten MARX *et al.* MRTX1133 (34). Untersuchungen verdeutlichten, dass MRTX1133 (34) sowohl den SOS1-katalysierten GDP/GTP-Austausch, als auch die Interaktionen von GTP-beladenem KRAS^{G12D} mit RAF1 inhibiert, wodurch die KRAS-abhängige Signalübertragung unterbrochen wird.⁶² In

weiteren Untersuchungen stellte sich heraus, dass die Verbindung ebenfalls hoch selektiv gegenüber der G12D-Mutante war (500-fache Selektivität im Vergleich zum Wildtyp). Die Verbindung besaß zudem eine signifikante Antitumor-Aktivität (94% Wachstumsinhibierung) in CD-1 Mäusen.⁶²

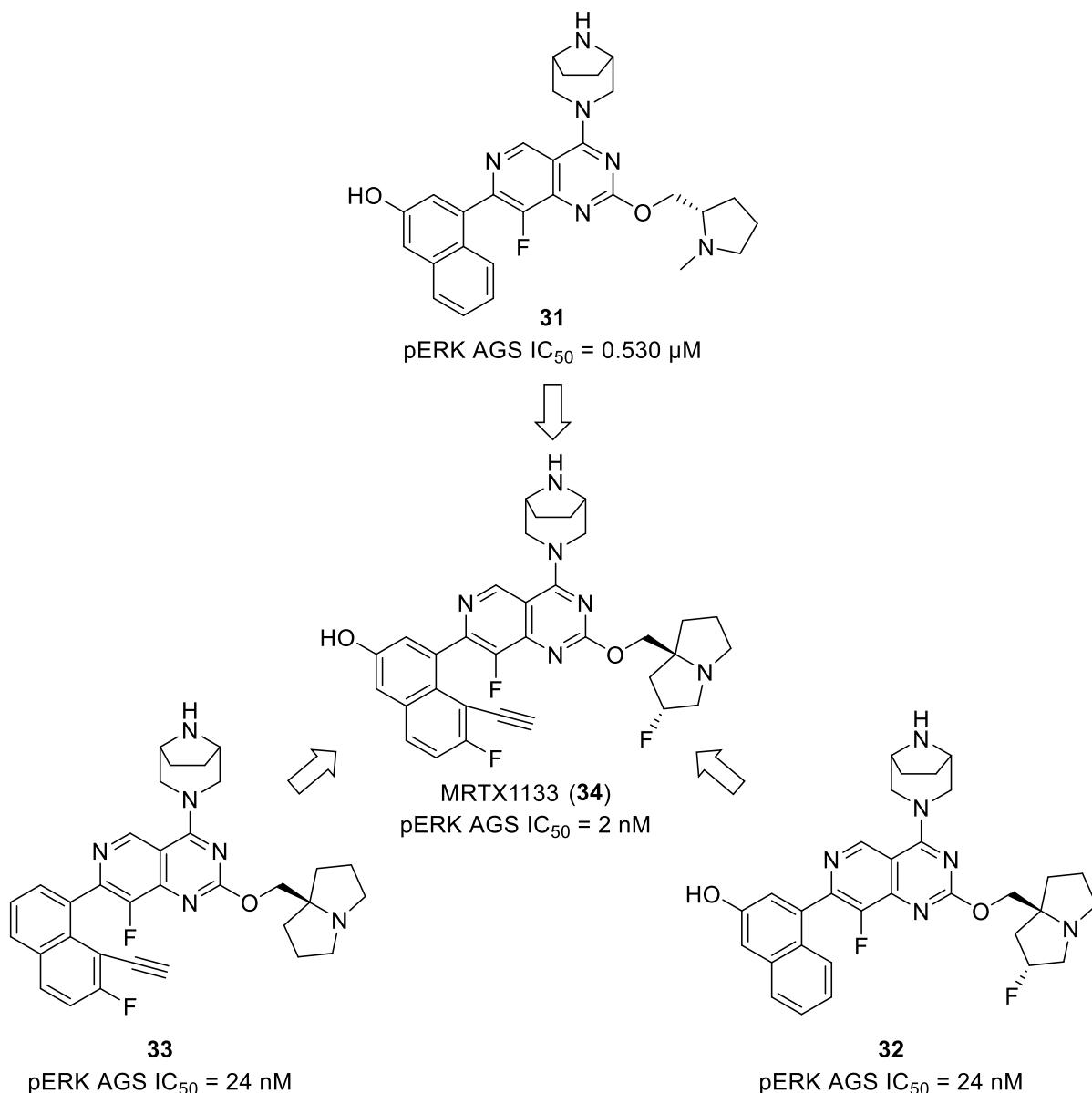


Abbildung 17: Optimierung von MRTX849 (**30**) durch Änderung des Grundgerüsts und Optimierung der drei Substituenten in der 2-, 4- und 7-Position des Pyrido[4,3-d]pyrimidins liefert MRTX1133 (**34**), einen potenzen und selektiven Inhibitor für KRAS^{G12D}. Darstellung von MARX *et al.* übernommen.⁶²

Die veröffentlichten *in vivo* Daten an Mausmodellen erwiesen sich als vielversprechend und zeigten erstmals, dass auch eine schwierig zu adressierende Mutante inhibierbar war. MRTX1133 (**34**) befindet sich aktuell in Phase 1/1b der klinischen Studie zur Behandlung von Pankreaskrebs, Darmkrebs, NSCLC und anderen Tumoren.⁶¹ Erste Daten für die Monotherapie-Studie für diese Testphase werden im ersten Halbjahr 2024 erwartet.⁶¹

2.2.2 Katalytischer Abbau des RAS-Proteins durch PROTACs

PROteolysis Targeting Chimeras (PROTACs) sind kleine bifunktionale Moleküle, die den Abbau eines Zielproteins induzieren. Der erste PROTAC wurde im Jahr 2001 von SAKAMOTO *et al.* publiziert.⁶⁴ Aufgrund ihres Potentials entwickelten sich PROTACs in kürzester Zeit zu einer vielversprechenden Strategie zur Behandlung diverser Krankheiten.⁶⁵⁻⁷⁴ Medikamente wurden bisher immer mit dem Ziel konzipiert, krankheitsfördernde Proteine und deren Funktionen zu inhibieren. Ein hohes Maß der Inhibierung benötigt in der Regel eine hohe Konzentration des Wirkstoffs im Körper. Dies kann wiederum zu sogenannten „off-target“-Effekten führen.⁷² Da PROTACs das POI, neben einem möglichen inhibierenden Effekt, jedoch hauptsächlich für den Abbau markieren, wird in der Theorie eine geringere Konzentration des Wirkstoffs benötigt.

Der strukturelle Aufbau von PROTACs basiert auf drei kovalent miteinander verbundenen Untereinheiten: Einem Liganden, der das Zielprotein bindet; einem Liganden, der eine E3-Ubiquitin-Ligase bindet; sowie einer Linker-Einheit, die beide Liganden miteinander verknüpft (vgl. **Abbildung 18**).⁷¹

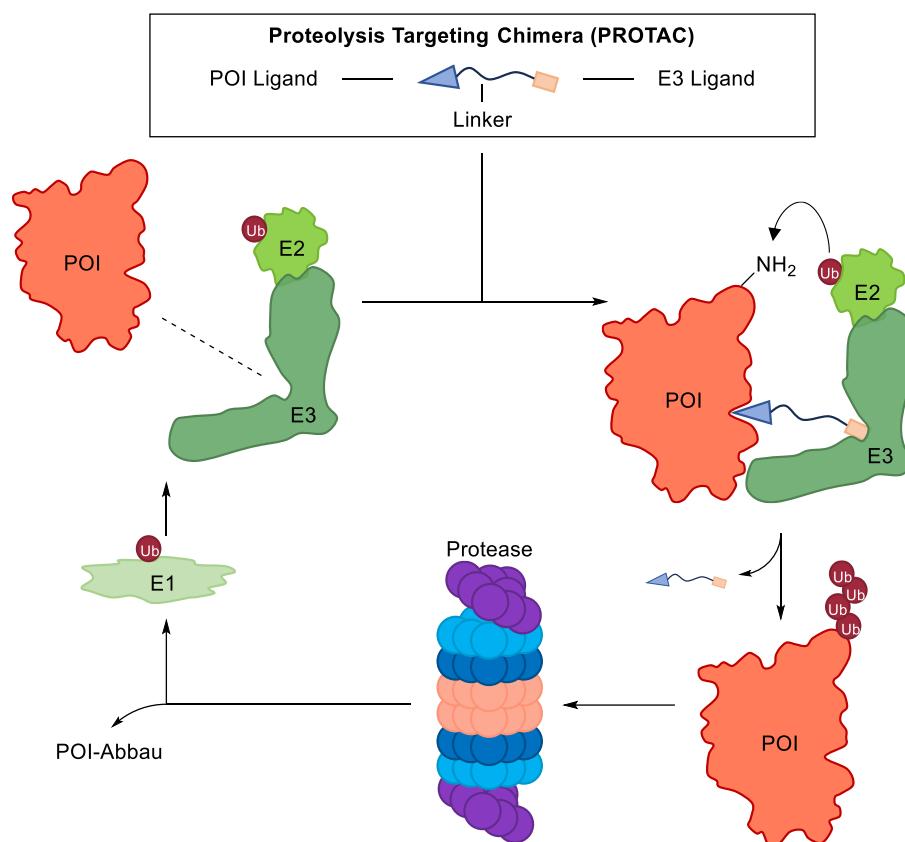


Abbildung 18: Schematische Darstellung des PROTAC-induzierten POI-Abbaus durch das Ubiquitin-Protease-System (UPS).⁶⁵

PROTACs nutzen für ihren Wirkmechanismus das Ubiquitin-Protease-System (UPS), welches in eukaryotischen Zellen für den Abbau von normalen oder fehlerhaft gefalteten Proteinen verantwortlich ist.⁷¹ Die abzubauenden Proteine sind im Vorfeld durch kovalent gebundenes Ubiquitin (8.6 kDa) markiert worden, wodurch sie von einer 26S Protease abgebaut werden können.⁷⁵ Am Ubiquitinierungsprozess des Proteins sind drei Enzyme beteiligt. E1 aktiviert Ubiquitin und überträgt dieses anschließend über eine Umesterung auf E2. Durch einen ternären Komplex aus dem POI, E2 und der E3-Ligase findet nun die Ubiquitinierung statt. Hierbei kommt es zu einer kovalenten Bindung des C-Terminus des Ubiquitins mit der Seitenkette eines Lysins an der POI-Oberfläche. Dieser Prozess kann auf zwei unterschiedliche Arten erfolgen und ist abhängig von der verwendeten E3-Ligase. Man unterscheidet hierbei die direkte E2-POI-Ubiquitinierung von der E2-E3-POI-Ubiquitinierung.⁶⁵ Dieser Prozess wird mehrfach wiederholt, sodass sich eine Poly-Ubiquitin-Kette am POI ausbildet, die wiederrum von einer 26S Protease erkannt wird. Da der PROTAC nicht kovalent an das POI bindet, wird dieser nicht mit dem POI abgebaut und kann weitere Proteine adressieren. Ein PROTAC ist daher theoretisch im Stande, nacheinander mehrere Zielproteine mithilfe der E3-Ligase für den UPS-Abbau zu markieren, bevor er selbst durch körpereigene Prozesse abgebaut wird. Auf diese Weise zeigt sich ein geringer katalytischer Effekt der PROTACs.

Obwohl bereits mehr als 600 verschiedene E3-Ligasen im menschlichen Genom identifiziert wurden, finden nur wenige davon im Rahmen des PROTAC-Designs Verwendung. Bei der Entwicklung von PROTACs zur Behandlung diverser Krebserkrankungen wurden insbesondere Liganden der E3-Ligasen CCRN (Cereblon), VHL (von Hippel-Lindau), IAPs (*Inhibitors of Apoptosis*) und MDM2 (*mouse double minute 2 homolog*) verwendet.⁷⁶⁻⁸⁰ Die ersten PROTACs basierten auf phosphopeptidischen Strukturen, die die E3-Ligase adressierten.^{64, 81, 82} Aufgrund ihrer Größe wiesen sie eine schlechte Zellpermeabilität auf, sodass die Injektion mithilfe eines Druckinjektionssystems über eine Mikrokapillarnadel direkt in die Zelle erfolgte.⁸¹ Die Zellen blieben bei diesem Verfahren intakt. Das Problem der Zellpermeabilität wurde später durch weitere Modifikation der Peptidsequenz umgangen.⁸² Großen Durchbruch erlangte die PROTAC-Forschung mit der im Jahr 2010 bzw. 2012 veröffentlichten Entdeckung von kleinen Molekülen als Liganden für die CCRN- bzw. VHL-E3-Ligase durch IMAMURA *et al.* bzw. CREWS *et al* (**Abbildung 19**).^{83, 84} Auf Basis dieser Liganden wurden diverse PROTACs synthetisiert, mit deren Hilfe ihre Funktionsweise und Optimierungsmöglichkeiten verständlicher wurden.

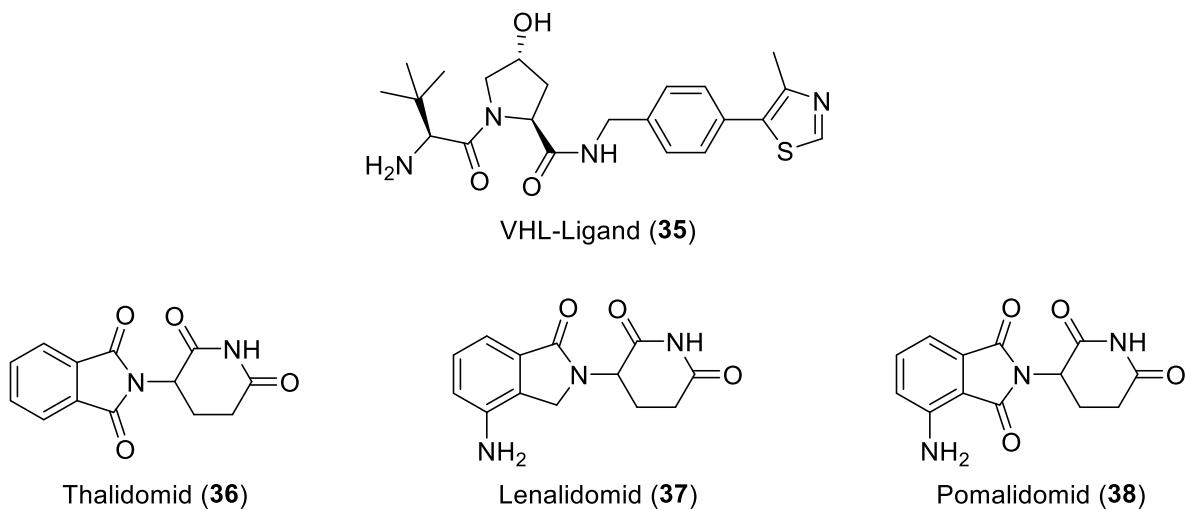


Abbildung 19: Strukturformel des VHL-Liganden (35), sowie von Thalidomid (36) und seinen Analoga.^{83, 84}

Grundsätzlich werden für die Erstellung von PROTACs hochaffine Liganden für das POI benötigt. Aufgrund der Tatsache, dass PROTACs einen ternären Komplex bilden, können die Proteine, abhängig vom Aufbau des PROTACs, ungünstig zueinander ausgerichtet werden. Trotz hoher Affinität der Liganden für POI und Ligase kann der PROTAC-Effekt so nicht eintreten und die Markierung des Proteins bleibt aus. Im Entwicklungsprozess wird der PROTAC dann weiter, über unterschiedliche Linker-Systeme, variiert. Wie wichtig die Wahl des Linkers ist, zeigten CREWS *et al.* am Beispiel eines EGFR-PROTACs (*Epidermal growth factor receptor*).⁸⁵ *Lapatinib*, ein Inhibitor für HER1 (*Human epidermal growth factor receptor*) und andere Rezeptor-Tyrosin-Kinasen der HER-Familie, wurde zur Herstellung zweier unterschiedlicher PROTACs verwendet. Beide PROTACs unterschieden sich hierbei nur durch unterschiedliche Polyethylenglykol-(PEG)-Ketten. Während der erste PROTAC, mit einer Linkerlänge von zwei PEG-Einheiten, in der Lage war HER1 und HER2 abzubauen, induzierte der zweite PROTAC, mit einer Linkerlänge von drei PEG-Einheiten, ausschließlich den Abbau von HER1.⁸⁵ Neben der Wirksamkeit der PROTACs lassen sich ebenfalls die metabolischen Eigenschaften durch den Einsatz unterschiedlicher Linker-Einheiten steuern. GORACCI *et al.* veröffentlichten im Jahr 2020 hierzu eine systematische Studie, in der der Einfluss verschiedener Linker-Einheiten auf die metabolische Stabilität untersucht wurde.⁸⁶

Mit der Entdeckung mehrerer kovalent-bindender Inhibitoren für die KRAS^{G12C}-Mutante entwickelten Forschungsgruppen bereits erste PROTACs auf Basis dieser SMIs (*small molecule inhibitor*). ZENG *et al.* entwickelten 2020 einen PROTAC auf Basis von ARS1620 (**26**) in Kombination mit Pomalidomid (**38**) als Ligand für die CRBN-E3-Ligase.⁸⁷ Obwohl der PROTAC in der Lage war, KRAS^{G12C} und CRBN zu dimerisieren, wurde kein Abbau von endogenem KRAS^{G12C} beobachtet. CREWS *et al.* entwickelten im gleichen Jahr ebenfalls einen

PROTAC auf Basis von MRTX849 (**30**) und einem Liganden zur Rekrutierung der VHL-E3-Ligase. Dieser führte zum erfolgreichen Abbau des Proteins.⁸⁸ Aufgrund des kovalent-irreversiblen Charakters von MRTX849 blieb der katalytische Effekt des PROTACs aus. Für die G12D-Mutante des KRAS-Proteins ist besonders der Inhibitor MRTX1133 (**34**) aufgrund seiner nicht-kovalenten Bindung interessant. Erst Anfang 2024 berichteten ZHOU *et al.* von mehreren PROTACs auf Basis dieses Inhibitors.⁸⁹ Der vielversprechendste PROTAC (**39**) wies hierbei einen erfolgreichen Abbau von KRAS^{G12D} ($DC_{50} = 38.06 \text{ nM}$ in AsPC-1 Zellen) auf und zeigte eine hohe Selektivität für die G12D-Mutante im Screening mit verschiedensten KRAS-Mutanten und dem Wildtyp des Proteins.

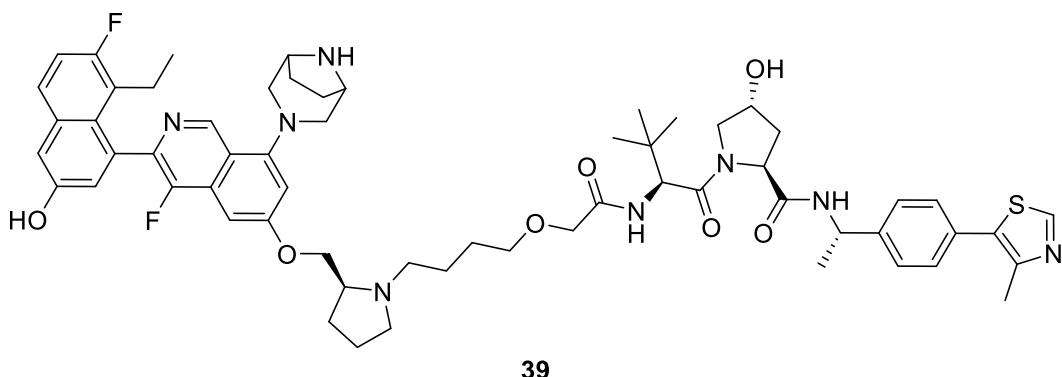


Abbildung 20: Struktur des von ZHOU *et al.* entwickelten PROTACs für die KRAS^{G12D}-Mutante.⁸⁹

Obwohl MRTX1133 (**34**) eine hohe Aktivität gegen die G12D-Mutante vorweist, zeigt es auch für die übrigen Mutanten, insbesondere für die G12V und G12C-Mutante von KRAS, eine potenzielle Wirkung. Der von ZHOU *et. al.* entwickelte PROTAC zeigte im direkten Vergleich eine verbesserte Selektivität für KRAS^{G12D}.⁸⁹ Darüber hinaus wurden die Proteine in unterschiedlichen Zelllinien mit einer niedrigen Konzentration des PROTACs vollständig abgebaut. Auf den ersten Blick scheint die PROTAC-Technologie somit den ursprünglichen Inhibitor in Bezug auf seine Selektivität verbessert zu haben. Inwiefern sich der PROTAC in klinischen Studien im Vergleich zu MRTX1133 verhält, bleibt abzuwarten.

2.2.3 Inhibierung der Membran-Einbettung von RAS

Um als Schalter fungieren zu können, muss RAS in die Zellmembran eingebaut werden. Wie bereits in **Kapitel 2.1.1** beschrieben, sind hierfür mehrere posttranskriptionale Modifikationen nötig. Im ersten Schritt wird Farnesyldiphosphat (FDP) durch eine Farnesyltransferase (FTase) an das C-terminale Cystein der CAAX-Box gebunden. Nach dieser Modifikation kann, durch RCE1 (*RAS-converting CAAX endopeptidase 1*) katalysiert, die AAX-Einheit abgespalten

werden. Im Anschluss findet eine durch ICMT (*isoprenylcysteine carboxymethyltransferase*) katalysierte Carboxymethylierung statt.^{34, 90, 91}

In Kombination mit einer zweiten Struktureinheit des hypervariablen Bereichs wird das RAS-Protein in Richtung der Zellmembran befördert und integriert. Im Fall des humanen KRAS4B sind sechs Lysine in der HVR verantwortlich. Dieser basische Bereich des Proteins sorgt durch seine elektrostatische Ladung für eine korrekte Orientierung an die Membran (siehe **Abbildung 21**). Die Farnesylierung von RAS durch eine FTase repräsentiert den ersten, irreversiblen und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der posttranslationalen Modifikation, wodurch schnell die Erkenntnis aufkam, dass es sich hierbei um eine unabdingbare Modifikation für die biologische Aktivität des RAS-Proteins handelt. Die genau definierte Bindetasche der FTase ermöglichte die vergleichsweise einfache Entwicklung erster FTase-Inhibitoren (FTIs) wie *Lonafarnib* oder *Tipifarnib*.^{92, 93} Kurz nach der Entwicklung der ersten FTIs wurde deutlich, dass KRAS und NRAS durch eine alternative Prenylierung in die Zellmembran integriert werden. Hierbei wird durch eine Geranylgeranyltransferase I (GGTase I) ein C20-Isoprenoid an die Seitenkette des Cysteins gekoppelt.⁹⁴ Mit der Entwicklung mehrerer GGTase I-Inhibitoren (GGTI), wie GGTI-2418 oder GGTI-DU40, und einiger DPIs (*dual prenyltransferase inhibitors*), wie AZD3409 von *AstraZeneca*, wurde gezeigt, dass die Prenylierung inhibierbar ist. Aufgrund toxischer Nebeneffekte wurde in klinischen Studien nur eine begrenzte Einsetzbarkeit festgestellt.^{93, 95-98}

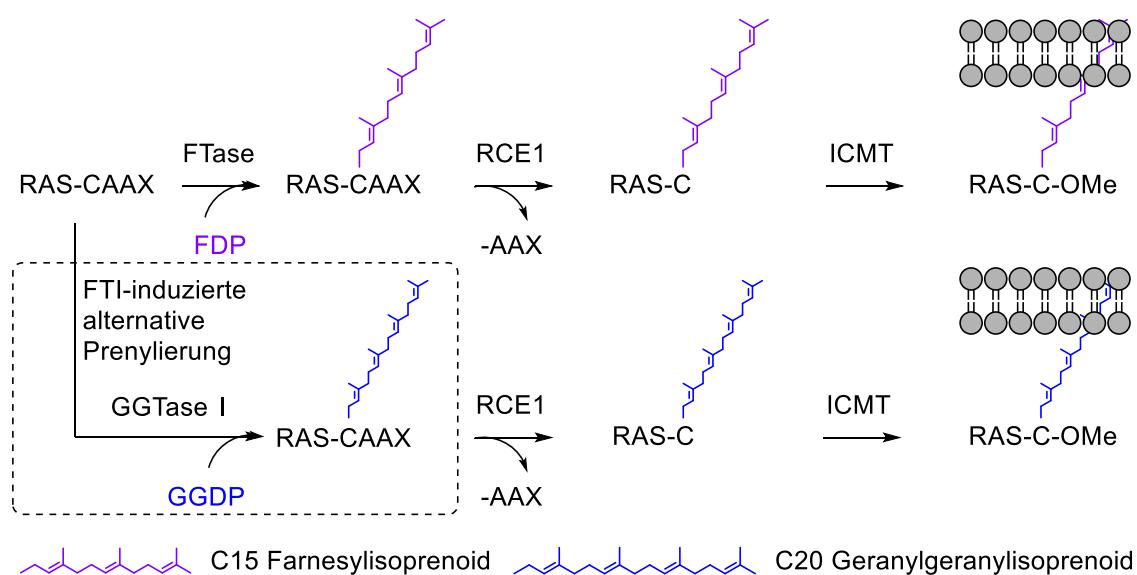


Abbildung 21: Posttranskriptionale Modifikation des cytosolischen RAS zur Membraneinbettung.^{90, 91}

Inhibitoren, die später für RCE1 und ICMT entwickelt wurden, verhinderten den entsprechenden Modifikationsschritt, wiesen jedoch auch eine Toxizität auf.⁹⁹⁻¹⁰²

Einen anderen Mechanismus zur Inhibierung der Membraneinbettung verfolgten NESTLER *et al.*¹⁰³ In ihrer Arbeit wurde ein Peptid (**40**) entwickelt, das die CAAX-Box maskierte und somit die Farnesylierung des Proteins verhinderte. Obwohl der angestrebte Effekt beobachtet wurde, reichte die Inhibition der Farnesylierung mit einem IC₅₀-Wert von über 100 µM nicht für eine klinische Weiterentwicklung aus.¹⁰³

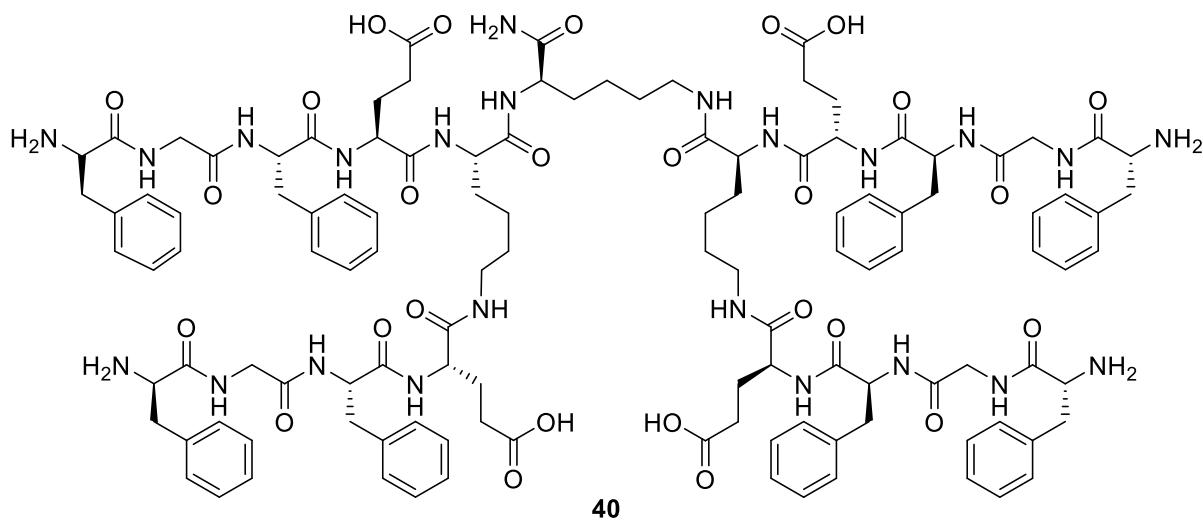


Abbildung 22: Strukturformel des Nestler-Rezeptors (**40**).

2.3 Vorarbeiten innerhalb der Arbeitsgruppe SCHERKENBECK

2.3.1 Bisphenolische Grundstrukturen zur Inhibierung von RAS

SCHERKENBECK *et al.* veröffentlichten in Zusammenarbeit mit STOLL *et al.* mehrere Publikationen über bisphenolische Grundstrukturen als zusätzliche Liganden der SI/II-Bindestelle von KRAS4B mit Affinitäten im sub-millimolaren Bereich. Die Bindung dieser Substanzen wurde konsequent durch den Einsatz von 2D-NMR-Spektroskopie nachgewiesen. Durch Auswertung einer Fragmentbibliothek von 100 Verbindungen wurde Bisphenol A (BPA, **41**) als Ligand für KRAS identifiziert.¹⁰⁴ SCHERKENBECK *et al.* wiesen in einer weiteren Publikation nach, dass auch die Ersatzsubstanz für BPA, Bisphenol S (BPS, **42**), eine Wirkung an KRAS besitzt.¹⁰⁵ Beide Verbindungen zeigten Interaktionen mit den jeweiligen Aminosäuren der bereits bekannten SI/II-Bindetasche des RAS-Proteins. Nachdem bereits zwei deutliche Treffer für die Bisphenole als Liganden für KRAS erzielt wurden, wurden weitere Derivate dieses Grundkörpers mittels NMR-Studien getestet. Einige dieser Derivate wiesen sub-millimolare Dissoziationskonstanten auf.¹⁰⁶

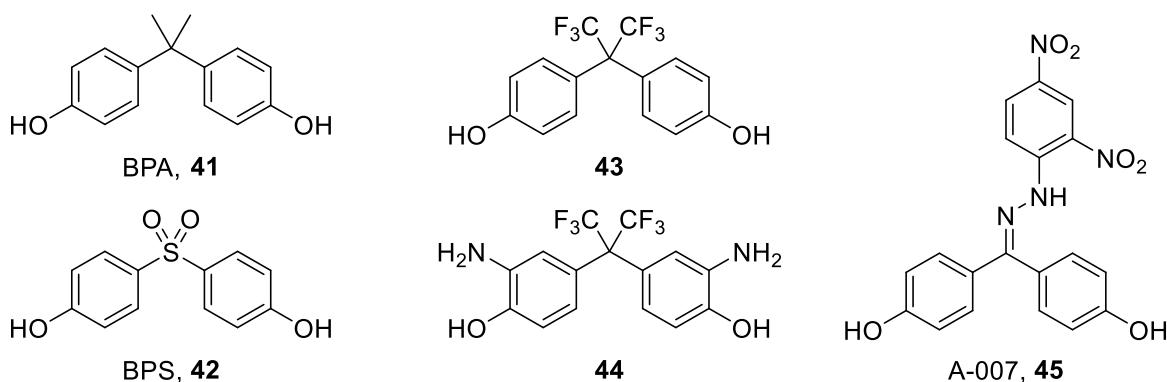


Abbildung 23: Strukturformel von Bisphenol A (**41**), Bisphenol S (**42**), Bisphenol **43**, Bisphenol **44** und A-007 (**45**) als Liganden der SI/II-Bindetasche des RAS-Proteins.¹⁰⁴⁻¹⁰⁷

Aufgrund des Einflusses der Substanzen auf die Konzentration von pERK und Akt in *in vivo* Untersuchungen wurde die Hypothese aufgestellt, dass sie als nicht-kovalente allosterische Agonisten für GDP-gebundenes KRAS wirken.¹⁰⁶ Basierend auf der von MORGAN *et al.* veröffentlichten positiven Wirkung von 4,4'-DHBP-Nitrophenylhydrazenen (**45**) auf verschiedene Tumorzellen, wurden weitere Derivate innerhalb der Arbeitsgruppe SCHERKENBECK synthetisiert. Die bis dahin erlangten Erkenntnisse über die Protein-Ligand-Interaktion der zuvor hergestellten Bisphenole wurden in der Syntheseplanung berücksichtigt.^{107, 108}

Viele dieser Verbindungen zeigten im KRAS4B^{GDP}/SOS^{cat}-Austauschassay Werte im sub-millimolaren Bereich mit einer geringfügigen Selektivität für die G12D-Mutante. In zellulären

Assays wurden Werte im Bereich von $IC_{50} = \sim 30 \mu M$ beobachtet. Aufgrund des fehlenden Einflusses der Substanzen auf den ERK- oder Akt-Signalweg und der häufig beobachteten geringen Stabilität der Verbindungen im Zellmedium, wurde vermutet, dass sich die Verbindungen zersetzen. Das dabei entstehende toxische Arylhydrazin könnte durch *off-target*-Effekte für die hohe zelluläre Aktivität verantwortlich sein.¹⁰⁸ Für den wirksamsten Hydrazon-Liganden (Verbindung **46**) wurden in NMR-Untersuchungen Bindungscluster für die SI/II-Bindetasche identifiziert. Für Verbindung **47**, welche Aufgrund der Oxim-Bindung eine erhöhte Stabilität im Zellmedium vorwies, wurden zudem mehrere Posen in der SII-Bindetasche identifiziert. Auf der Suche nach einem stabileren Grundkörper und um gleichzeitig den Effekt von 4,4'-Dihydroxybenzophenon (DHBP) als bekannte unspezifisch reagierende Verbindung (*Pan-assay interference compound, PAINS*) auszuschließen, erstellten SCHERKENBECK *et al.* eine virtuelle Bibliothek von 360.000 Verbindungen. Die Strukturen bestanden aus zwei aromatischen und/oder heteroaromatischen Systemen, die über sp^2 - oder sp^3 -hybridisierte Fragmente miteinander verknüpft waren. Die Bibliothek wurden mithilfe der Docking-Software *Glide* unter Einsatz einer KRAS^{G12D}-Kristallstruktur (PDB: 4DSO) untersucht. Die aus dem Screening resultierende Verbindung **48** zeigte die besten Werte in allen biologischen Untersuchungen und konnte eine leichten Selektivität für die G12D-Mutante vorweisen. NMR-Untersuchungen zeigten ebenfalls, dass die Verbindung mit Aminosäuren der SI/II-Bindetasche interagiert. Der Oxim-Ether der Verbindung **48**, Verbindung **49**, konnte ebenfalls gute Werte in den biologischen Untersuchungen erzielen. Aufgrund der schlechten Löslichkeit war eine Untersuchung der Protein-Ligand-Wechselwirkung nicht möglich.¹⁰⁸

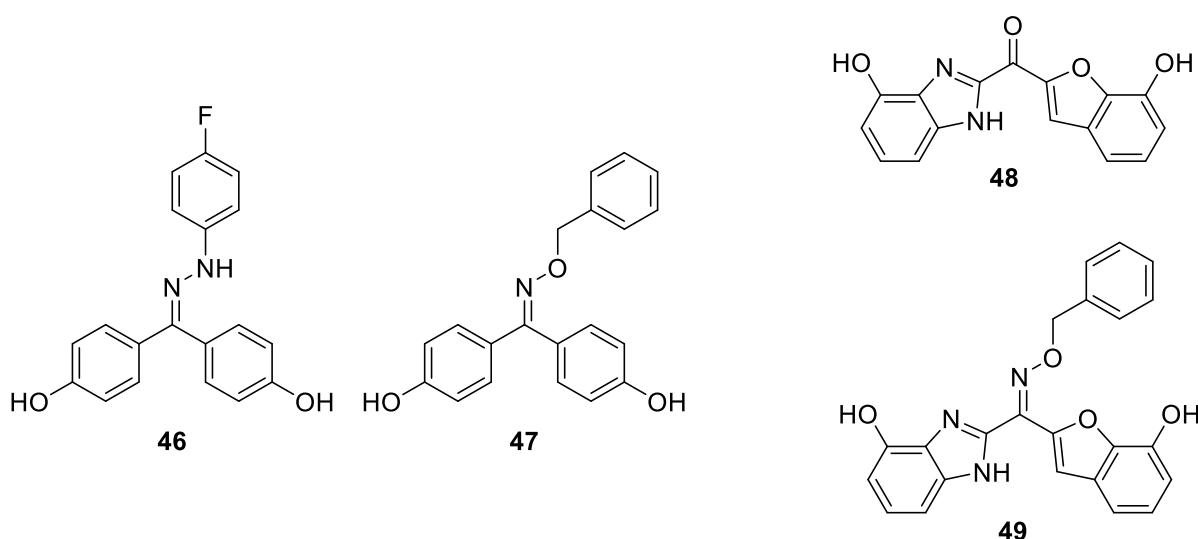


Abbildung 24: Hydrazon **46**, Oxim **47**, Docking-Grundkörper **48** und Oxim **49** als Liganden für RAS.¹⁰⁸

2.3.2 PROTACs zum Abbau von onkogenem RAS

Innerhalb der Arbeitsgruppe SCHERKENBECK wurden bereits mehrere PROTACs literaturbekannter RAS-Liganden synthetisiert. Im Zuge zweier Forschungsprojekte wurden hierbei PROTACs auf Basis der FESIK-Verbindung der ersten Generation (21), der RABBITTS-Verbindung (22), sowie der GORFE-Verbindung (50) durch JEUKEN und ROEGER synthetisiert.¹⁰⁹

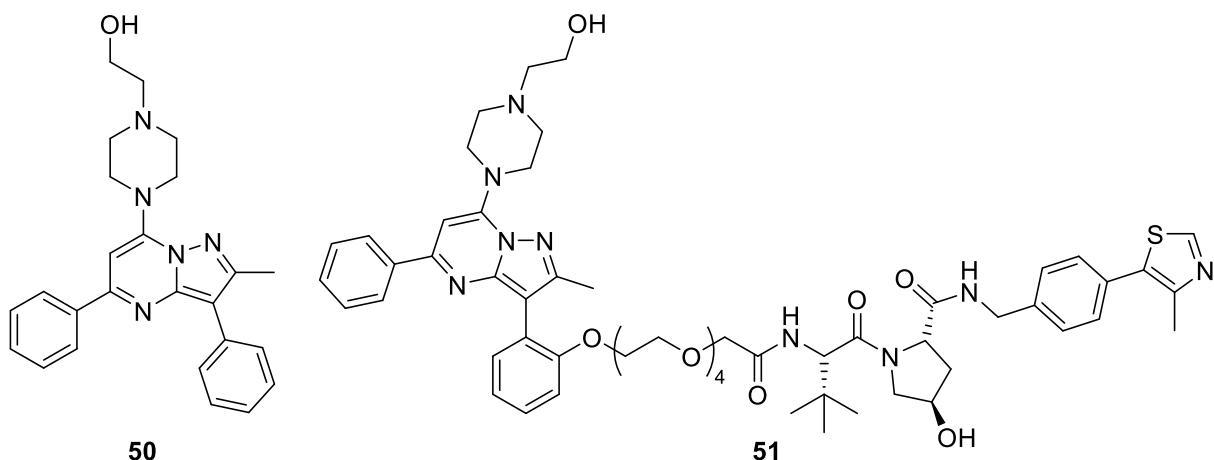


Abbildung 25: Strukturformeln der GORFE-Verbindung (50) und des innerhalb der Arbeitsgruppe SCHERKENBECK entwickelten PROTACs (51).¹⁰⁹

In ersten Untersuchungen durch die *Lead Discovery Center GmbH* (kurz: *LDC*), einem Kooperationspartner der Arbeitsgruppe SCHERKENBECK mit Sitz in Dortmund, wurde in zellulären Untersuchungen, dem CTG-Assay (*Cell-Titer-Glo*), gezeigt, dass die entwickelten PROTACs einen Einfluss auf die Zellproliferation haben.

Der von ROEGER synthetisierte RABBITS-PROTAC weist ebenfalls eine Aktivität im KRAS4B^{G12D}/SOS1-Austauschassay auf ($IC_{50} = 260.17 \mu M$ an KRAS^{G12D} und $AC_{50} = 13.08 \mu M$ an KRAS^{WT}). Zudem wurde bei den biologischen Untersuchungen deutlich, dass die systematische Gestaltung des Linker-Systems eine entscheidende Rolle einnimmt. Untersuchungen der Membranpermeabilität an CACO-2-Zelllinien zeigten, dass die PROTACs nur schwer in die Zelle diffundierten und wieder aus dem Zellinneren transportiert wurden.

In einem durchgefhrten Test zur Überprüfung des PROTAC-Effekts wurde für eine G12C-Referenzverbindung ein induzierter Abbau von KRAS^{G12C} nachgewiesen. Die zwei getesteten PROTACs auf Basis der GORFE- und RABBITTS-Liganden (JES-219 (**51**) und RMN-195) zeigten in Untersuchungen im entsprechenden Assay an der G12D-Mutante jedoch keinen Abbau des Proteins. Weitere PROTACs mit unterschiedlichen Linker-Systemen wurden zum jetzigen Zeitpunkt nicht in diesem PROTAC-Assay untersucht.

2.3.3 Optimierung der STOCKWELL-Verbindung

Im Jahr 2017 publizierten STOCKWELL *et al.* einen auf *in silico*-Rechnungen basierten pan-RAS-Inhibitor (**52**). Mit Hilfe der Schrödinger-Software Glide wurde für die Verbindung ein *docking score* von $(ds) = -9.33$ kcal/mol bestimmt (PDB: 4DSN, *standard precision*). Die *in silico*-Berechnungen deuteten ebenfalls auf eine Interaktion mit einem Bereich zwischen der SI- und SII-Region hin. In MST (*microscale thermophoresis*) und NMR-Titrationsexperimenten wurde für die Verbindung **52** eine Dissoziationskonstante von ~ 10 μM (GppNHp-beladenes KRAS^{G12D}) bestimmt.¹¹⁰ Aufgrund auftretender Off-Target Effekte war eine Optimierung der Leitstruktur unumgänglich.

In der Arbeitsgruppe SCHERKENBECK wurden anhand der von STOCKWELL *et al.* beschriebenen Bindestelle (PDB: 4DSN) *in silico*-Berechnungen durchgeführt. Auf Basis dieser Ergebnisse wurden verschiedene Derivate von Verbindung **52** entwickelt. In ersten Versuchen wurde die Seitenkette des Indol-Grundkörpers (**53**) durch eine Sulfon-Einheit ersetzt. Weitere Experimente führten zum Austausch des Piperidin-Systems durch eine Histidin-Einheit (**54**). Für die Entwicklung diverser PROTACs im Rahmen dieser Dissertation diente Verbindung **53** als Leitstruktur.

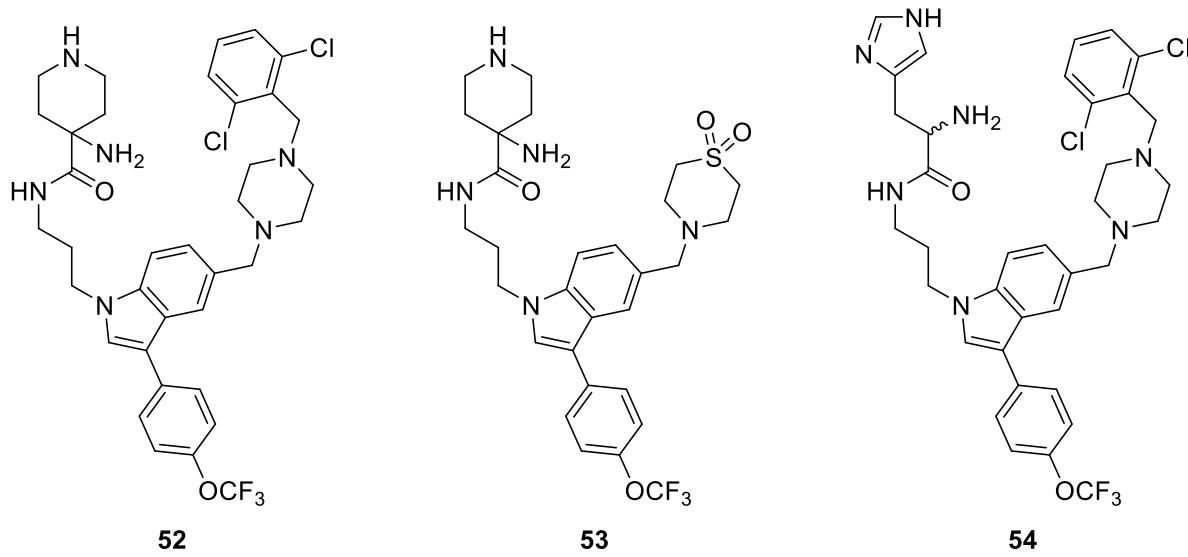


Abbildung 26: Strukturformeln der von STOCKWELL *et al.* publizierten Verbindung **52** und des innerhalb der AG SCHERKENBECK synthetisierten Derivat **53** und **54**.¹¹⁰

2.3.4 Peptidische Liganden zur Inhibierung des RAS-Proteins

Innerhalb der Arbeitsgruppe SCHERKENBECK wurden mehrere peptidische Strukturen zur Inhibierung des RAS-Proteins oder der Membraneinbettung synthetisiert. Auf Grundlage der von NESTLER *et al.* publizierten Daten entwickelten SCHERKENBECK *et al.* kleinere CAAX-Box-Rezeptoren, die ebenfalls in der Lage waren, den C-Terminus des Proteins zu maskieren.^{111, 112} Die ursprünglich von SCHMUCK *et al.* entwickelte Guanidiniopyrrol-Einheit (**Abbildung 27**, blau) diente in den synthetisierten Peptiden als Kopfgruppe und somit zur Steigerung der Affinität.¹¹³⁻¹¹⁵

Die Interaktion zwischen Peptid und CAAX-Box wurde anfänglich in spektroskopischen Untersuchungen festgestellt und in Zellversuchen an HCT116-Zellen (Darmkrebs) und NCI-H358-Zellen (Lungenkrebs) bestätigt. Für eine vollständige Inhibierung von KRAS waren diese Effekte jedoch nicht ausreichend.

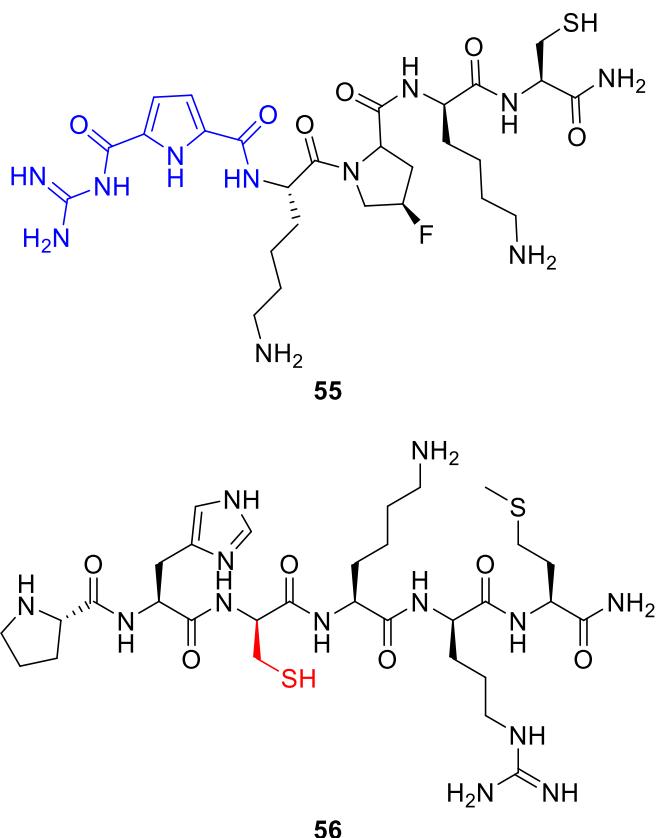


Abbildung 27: Strukturformel eines von SCHERKENBECK *et al.* entwickelten CAAX-Box-Rezeptors (**55**) sowie eines für die S39C-Mutante entwickelten Peptids (**56**).¹¹¹⁻¹¹⁵ Die Guanidiniopyrrol-Einheit, die von SCHMUCK *et al.* entwickelt wurde, ist in Blau abgebildet, während die Cystein-Einheit zur kovalenten Bindung an KRAS^{S39C} in Rot abgebildet ist.

Des Weiteren wurden peptidische Strukturen für eine nicht natürlich vorkommende Mutante des KRAS-Proteins entwickelt. Bei KRAS^{S39C} wurde das in der Sequenz natürlich vorkommende Serin gentechnisch durch ein Cystein ersetzt.¹¹⁶ Die künstlich erzeugte Mutation befindet sich in der SI-Region des RAS-Proteins. Im Unterschied zu Serin ermöglicht das neu eingeführte Cystein, ähnlich wie bei der Entwicklung von MRTX849 (**30**) für KRAS^{G12C}, eine kovalente Bindung potenzieller Liganden. So entstanden peptidische Strukturen, die mit der Oberfläche des Proteins durch eine Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinen in Wechselwirkung treten. Anschließend wurde der übrige Teil der Peptide speziell für die jeweilige Region angepasst. Die so entwickelten Peptide wurden von SCHERKENBECK *et al.* synthetisiert oder erworben. Erste NMR-Untersuchungen wiesen auf eine Interaktion zwischen Peptid **56** (Abbildung 27) und der mutationsspezifischen Proteinoberfläche hin. Darüber hinaus wurde in MST-Messungen eine Gleichgewichtsdissoziationskonstante im mikromolaren Bereich am Wildtyp des Proteins ($K_D = 62.8 \mu\text{M}$) ermittelt. Ziel dieser Versuche sollte es anschließend sein, ein Peptid zu erzeugen, welches durch gezielte Affinitätsmaximierung mit der natürlich vorkommenden Aminosäure Ser39 interagiert.

3 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Dissertation sollen neue Liganden und Konzepte für die Inhibierung onkogener KRAS-Proteine erarbeitet werden.

Das primäre Ziel dieser Arbeit besteht in der Steigerung der Stabilität der in Abschnitt **2.3.1** beschriebenen Bisphenol-Hydrazone-Inhibitoren. Um dieses Ziel zu erreichen, werden verschiedene Derivatisierungsmöglichkeiten untersucht. Die Steigerung der metabolischen Stabilität stellt dabei lediglich einen Aspekt dar; vielmehr zielt die Vorgehensweise darauf ab, Zielmoleküle zu synthetisieren, die sich durch eine erhöhte biologische Aktivität auszeichnen. Im Rahmen der zunächst durchzuführenden computergestützten Berechnungen erfolgt eine Identifikation von Strukturen, die der Hydrazon-Einheit der Ursprungsverbindung **46** ähneln und innerhalb der *Glide*-Software ähnliche oder bessere *docking scores* erzielen. Der Einfluss von Wassermolekülen in diesen Berechnungen wird in diesem Kontext ebenfalls untersucht. Nachdem die Verbindungen synthetisiert und biochemisch getestet wurden, sollen sie mit den Originalverbindungen der ersten Generation verglichen werden.

Ein weiterer Fokus liegt auf der jüngst, im zeitlichen Rahmen dieser Dissertation, publizierten und hochpotenten Verbindung MRTX1133 (**34**). Im Rahmen dieser Arbeit soll eine Methode für ein *in-silico* Screening entwickelt werden, die die spezifischen Wechselwirkungen von MRTX1133 (**34**) mit der Proteinoberfläche berücksichtigt. Die angestrebte Suche zielt darauf ab, neue potenziell wirksame Strukturen zu identifizieren. Die in der *Glide*-Software als vielversprechend identifizierten Verbindungen sollen im Anschluss auf ihre Eignung als Inhibitoren untersucht werden. Dazu werden sie hergestellt oder zugekauft und in entsprechenden biochemischen Assays vermessen und evaluiert. In diesem Kontext erfolgt darüber hinaus ein Vergleich des strukturellen Aufbaus der vielversprechendsten Kandidaten mit Verbindungen, die über Fragmente in der Software *infiniSee*® virtuell synthetisierbar sind. Nachdem der *docking score* dieser Verbindungen evaluiert wurde, werden die so erhaltenen Strukturen synthetisiert und ebenfalls untersucht.

Des Weiteren ist die Synthese weiterer PROTACs auf der Grundlage von in der Literatur bekannten Verbindungen bzw. innerhalb der Arbeitsgruppe optimierten Substanzen geplant. Dabei soll eine Variation des strukturellen Aufbaus dieser PROTACs durch den Einsatz unterschiedlicher Linker-Systeme erreicht werden. Die PROTACs sollen anschließend hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität und dem eventuell auftretenden katalytischen Effekts bewertet werden.

4 Ergebnisse und Diskussionen

4.1 Benzophenon-Derivate und strukturähnliche Verbindungen als RAS-Inhibitoren

Wie bereits zuvor erläutert, wurden innerhalb der Arbeitsgruppe SCHERKENBECK das Hydrazon-Derivat **46** sowie das Oxim-Derivat **47** synthetisiert. Beide Verbindungen wiesen für den damaligen Kenntnisstand der Arbeitsgruppe gute Werte auf, wobei eine entsprechende Selektivität für die G12D-Mutante des Proteins gegenüber dem Wildtyp beobachtet wurde (siehe **Tabelle 1**).

Tabelle 1: Biologische Daten der Verbindungen **46** und **47** im GDP/GTP-Austauschassay und im zellulären Assay.¹⁰⁸

KRAS4B ^{GDP} /SOS-Austauschassay (IC ₅₀ [μM])		Zelluläre Aktivität (CTG-Assay) (IC ₅₀ [μM])					Stabilität im Zellkulturmedium (24h, pH 9 [%])
G12D	WT	SNU-1 (G12D)	NCI-H441 (G12V)	H358 (G12C)	A549 (G12S)	RKo (WT)	
46	413±28	1036±427	23.7±14.4	24.7±8.3	33.7±0.6	28.7±4.7	>30
47	431±22	1332±343	41.7±4.2	62.2±4.8	58.6±0.5	54.3±3.6	47.8±2.3

Untersuchungen zu Verbindung **46** zeigten eine geringe Stabilität im Zellmedium, da nach 24 Stunden nur noch 2,2 % der ursprünglichen Menge nachweisbar waren. Außerdem entstehen durch Hydrolyse das toxische Arylhydrazin und 4,4'-Dihydroxybenzophenon (DHBP), eine bekannte PAINS-Verbindung (*Pan-Assay Interference Compounds*) mit unspezifischen biologischen Wirkungen. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass die beobachtete zelluläre Aktivität von Verbindung **46** teilweise auf Off-Target-Effekten beruht.^{108, 117} Bei Verbindung **47** wurde diese Instabilität nicht beobachtet, dennoch wurden ähnliche biologische Aktivitäten festgestellt.

Zur Erhöhung der Stabilität wurden verschiedene heterocyclische Grundkörper untersucht (**Abbildung 28**). Triazine, Pyrazole und andere cyclische Strukturen gehörten zu den Verbindungen, in denen die Hydrazon-Einheit ähnlich integriert ist. Zudem wurde die Verbindung GS493 (**67**) als weitere Referenzverbindung berücksichtigt. GS493 (**67**) ist ein SHP2-Inhibitor (*SRC homology region 2 domain-containing phosphatase-2*) mit antitumoralen Eigenschaften, der 2015 von RADEMANN *et al.* veröffentlicht wurde.¹¹⁸ Als Inhibitor der Protein-Tyrosin-Phosphatase (PTP) greift GS493 (**67**), ähnlich wie die im Vorfeld beschriebenen TKIs (Kapitel **1.2**), in die zelluläre Signaltransduktion ein. Aufgrund dieser

Merkmale und des Hydrazon-Strukturelements wurden in die folgenden Berechnungen GS493 (**67**) und eine Hybridverbindung (**68**) gemäß Verbindung **46** einbezogen.

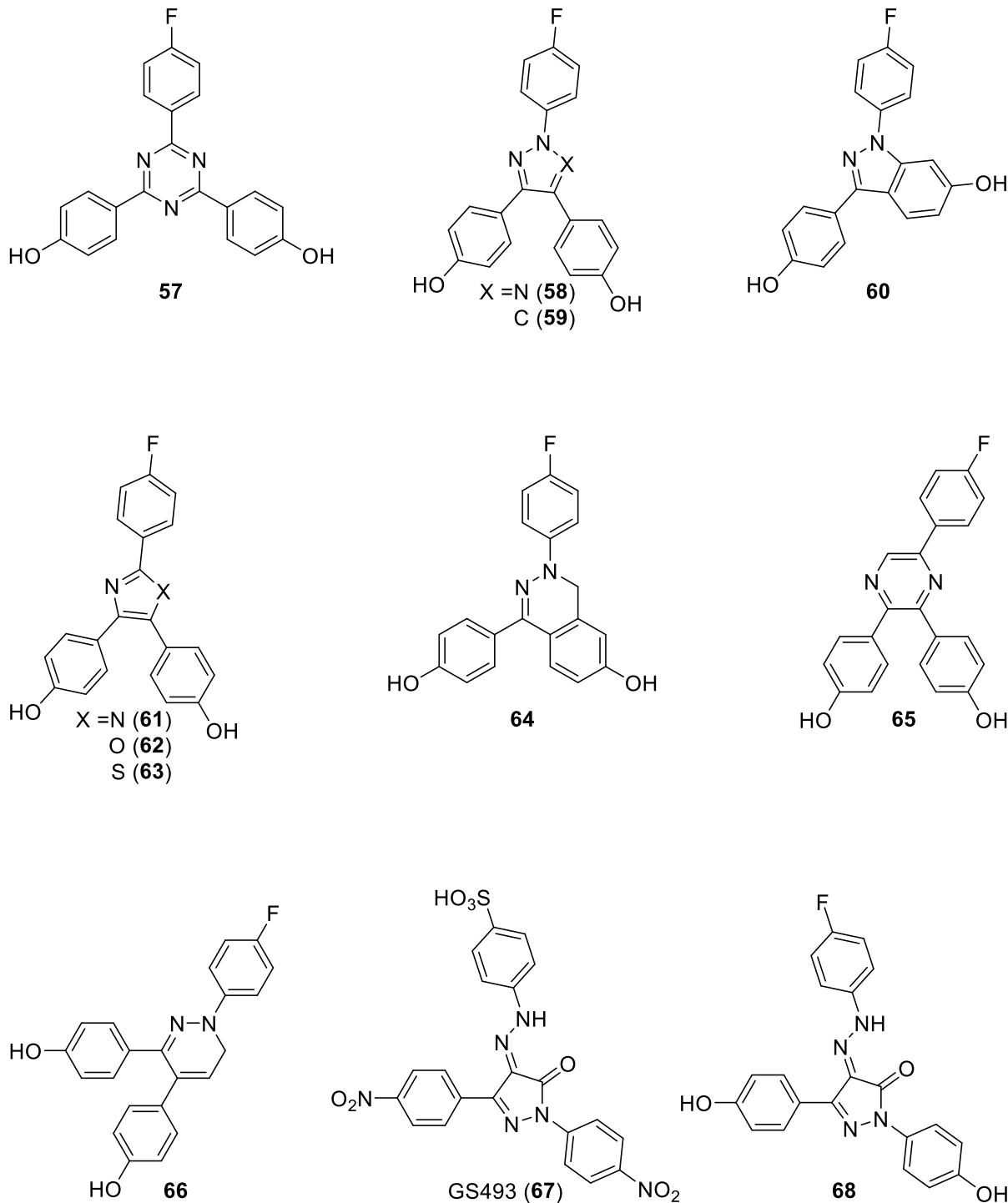


Abbildung 28: Strukturkonzepte auf Basis von Verbindung **46**.

4.1.1 *In Silico* Berechnungen an der SI/II-Bindetasche

Die genauere Untersuchung der entworfenen Strukturen erfolgte durch ein *in silico* Docking unter Verwendung des Schrödinger-Softwarepaketes *Glide*. Als Kristallstruktur wurde das von MAURER *et al.* veröffentlichte KRAS4B^{G12D}-Protein verwendet (PDB: 4DST). Die Röntgenstruktur enthält das hydrolysestabile GTP-Analogon GCP.⁵¹ Neben der bekannten SI/II-Bindetasche des Proteins wurden mit *SiteMap*, einem Tool dieses Softwarepaketes, nach weiteren potentiellen Bindestellen gesucht. Durch Verschieben eines Wassermoleküls auf der Proteinoberfläche untersucht das Programm die Polarität, die Ladungszustände der verschiedenen Aminosäuren sowie die Taschengröße auf der Proteinoberfläche.¹¹⁹ Auf der mittels *Protein Preparation* erzeugten Proteinoberfläche wurden auf diese Weise insgesamt fünf unterschiedliche Bindestellen (*Sites*) gefunden (siehe **Abbildung 29**).

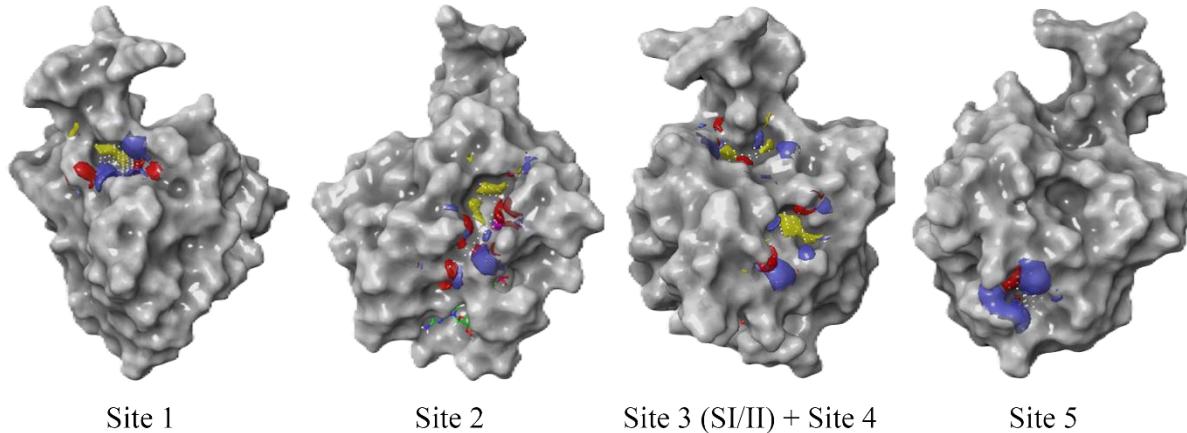


Abbildung 29: Gefundene Bindetaschen mittels *SiteMap* an 4DST.

Bei *Site 3* handelt es sich um die literaturbekannte SI/II-Bindetasche. Anschließend erfolgte die Berechnung der *docking scores* für die oben dargestellten Verbindungen (**Abbildung 28**) in den entsprechenden Bindetaschen. Die Reihenfolge der Einträge folgt der Strukturreihenfolge, wie in **Abbildung 28** angegeben (z.B. *source file index* 2 = **57**, *source file index* 3 = **58**, etc.). Die Referenzverbindung **46** nimmt in allen Berechnungen den *source file index* 1 ein. Der *source file index* der *Glide*-Software referenziert eine Nummer oder Kennung, welche dazu dient, die ursprüngliche Eingabedatei eines Liganden in einem Dockinglauf zu identifizieren.

Die in **Abbildung 30** dargestellten Werte repräsentieren die zehn besten Positionen des entsprechenden Liganden auf der Oberfläche des Proteins. Hierbei werden die Posen der einzelnen Liganden anhand ihres erzielten *docking scores* geordnet. Der *docking score* [kcal/mol], im Zusammenhang mit *Glide* oft als *GlideScore* bezeichnet, ist ein Maß für die Bindungsaffinität zwischen einem Liganden und seinem Rezeptor. Er wird aus einer Kombination von Energietermen berechnet, darunter Van-der-Waals-Wechselwirkungen, die

die anziehenden oder abstoßenden Kräfte zwischen dem Liganden und den Rezeptormolekülen berücksichtigen, und elektrostatische Wechselwirkungen, die die Wechselwirkungen zwischen geladenen Gruppen innerhalb des Liganden und des Proteins widerspiegeln. Der *docking score* berücksichtigt auch Solvationseffekte, die den Einfluss des Lösungsmittels, in der Regel Wasser, auf die Wechselwirkung zwischen Ligand und Protein berücksichtigen, sowie Wasserstoffbrückenbindungen, die die Anzahl und Stärke der zwischen Ligand und Rezeptor gebildeten Wasserstoffbrückenbindungen bewerten. Zusätzlich können Straferme einbezogen werden, um Faktoren wie gespannte Ligandenkonformationen oder unrealistische Wechselwirkungen zu berücksichtigen.^{120, 121} Ein niedriger (mehr negativer) *docking score* deutet im Allgemeinen auf eine höhere Bindungsaffinität hin, was bedeutet, dass der Ligand wahrscheinlich effektiver an den Rezeptor bindet.

Außerdem weisen die verschiedenen Posen eine farbliche Kennzeichnung auf. Der *emodel score* der einzelnen Pose kann anhand der entsprechenden Skala (**Abbildung 30**) abgelesen werden. Der *glide emodel*-Wert ist eine weitere Bewertungsfunktion, die in *Glide* verwendet wird, sich aber mehr auf die physikalische Realitätsnähe der Ligandenkonformation in der Bindestasche konzentriert, insbesondere durch Berücksichtigung der internen Dehnung des Liganden. Neben einigen Komponenten des *docking scores* enthält der *emodel-score* auch die Ligandendehnungsenergie, die die interne Dehnung im Liganden angibt, wenn dieser eine bestimmte Konformation an der Bindungsstelle annimmt. *Glide emodel* ist besonders nützlich, um verschiedene Positionen des Liganden innerhalb der Bindestelle zu klassifizieren, wobei niedrigere (mehr negativere) *emodel*-Werte bessere, physikalisch realistischere Anpassungen anzeigen.^{120, 121} Der *docking score* liefert somit eine Schätzung der gesamten Bindungsaffinität zwischen einem Liganden und seinem Rezeptor, während *glide emodel* einen Einblick in die physikalische Wirklichkeit der Konformation des Liganden innerhalb der Bindungsstelle gibt. Beide Kennzahlen sind für die Bewertung von Docking-Ergebnissen wichtig: Der *docking score* hilft bei der Identifizierung von Liganden mit hohem Bindungspotenzial und der *emodel score* stellt sicher, dass die Konformation des Liganden physikalisch plausibel ist.

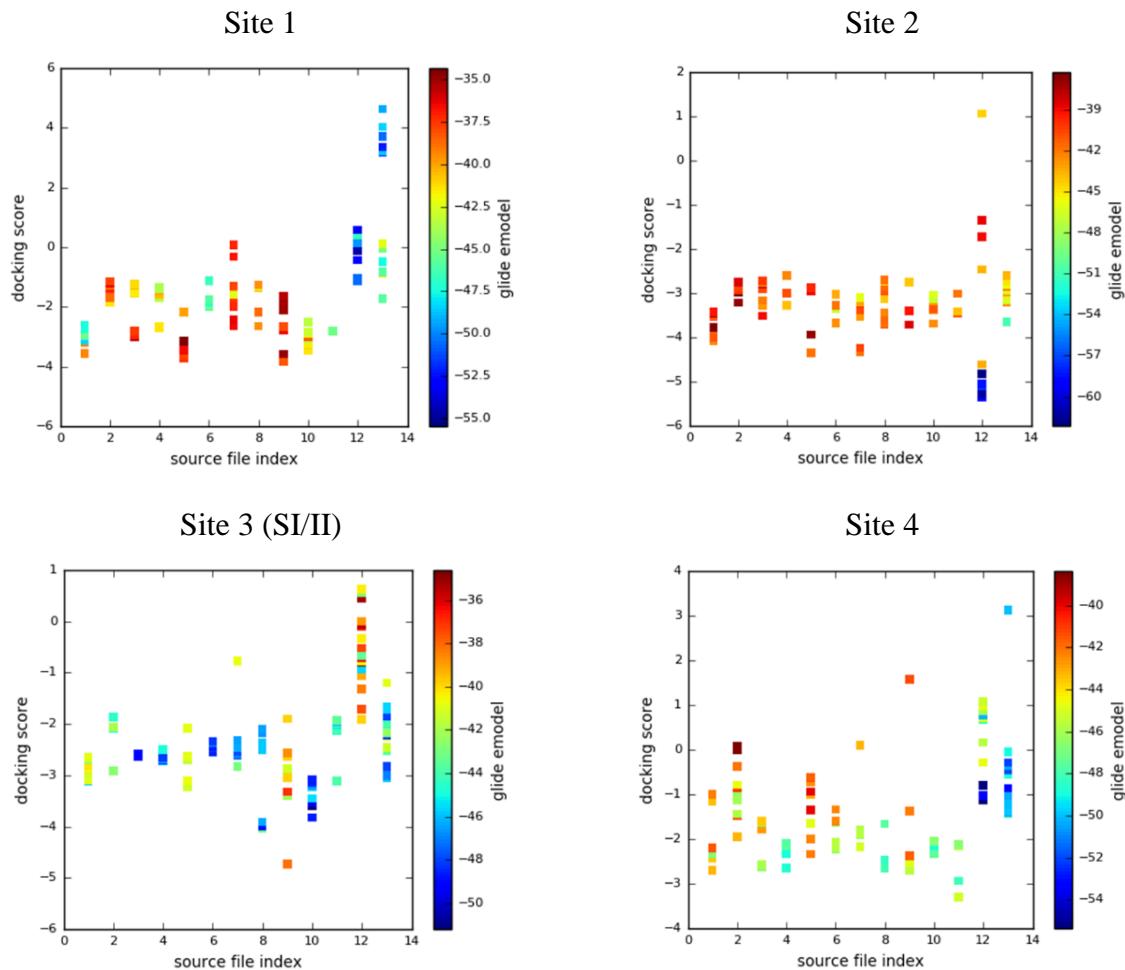


Abbildung 30: Darstellung der verschiedenen *docking scores* und *glide emodel*-Werte mit Bezug zur entsprechenden Bindetasche an 4DST.

Die in **Abbildung 30** dargestellten Ergebnisse zeigen, dass alle berechneten Verbindungen, mit Ausnahme von Verbindung **67**, die vielversprechendsten Werte für die Kombination aus *docking score* und *glide emodel* an der literaturbekannten SI/II-Bindetasche aufweisen. Die Verbindung **67** zeigte jedoch an der mittels SiteMap identifizierten Site 2 den niedrigsten *docking score* sowie den niedrigsten *emodel-score*.

Zur Verifizierung der Ergebnisse wurden die Berechnungen unter denselben Einstellungen an einer weiteren Kristallstruktur (PDB:4EPY) durchgeführt.⁵² Bei dieser Kristallstruktur wurde KRAS4B^{G12V} mit GDP und einem Derivat von Verbindung **21** cokristallisiert. Drei mögliche Bindetaschen wurden mit Hilfe von SiteMap in dieser Kristallstruktur identifiziert. Bei einer dieser Bindetaschen handelt es sich ebenfalls um die literaturbekannte SI/II-Bindetasche. Die erhaltenen *docking scores* und *emodel*-Werte waren für die entsprechenden Bindetaschen mit den in **Abbildung 30** dargestellten Werten vergleichbar. Unter Berücksichtigung der aus den beiden *Glide*-Berechnungen an unterschiedlichen Kristallstrukturen gewonnenen Erkenntnisse wurde beschlossen, die Verbindungen **57**, **59** und **68** zu synthetisieren.

Die Verbindungen **57** und **59** sollen dabei durch die 1,3,5-Triazin- bzw. Pyrazol-Einheit an das Hydrazon-Element der Verbindung **46** erinnern. Verbindung **68**, ein Hybrid aus GS493 (**67**) und Verbindung **46**, zeigte in den *in silico*-Berechnungen stark abweichende Ergebnisse im Vergleich zu den anderen Liganden. Insbesondere ist der *emodel*-Wert von Verbindung **68** sowie von Verbindung GS493 (**67**) für die meisten Posen stark negativ. Dies deutet auf für die entsprechende Bindetasche optimierte Ligandenkonformation hin.

Im Rahmen zusätzlicher Untersuchungen konnte der signifikante Einfluss unterschiedlicher Wassermoleküle auf den *docking score* nachgewiesen werden, welcher bei der Analyse von Ligand-Protein-Interaktionen eine zentrale Rolle spielt. Innerhalb der Arbeitsgruppe SCHERKENBECK erfolgt die Vorbereitung der Proteinstruktur normalerweise unter Verwendung einer bestimmten Standardeinstellung, welche die Beibehaltung bestimmter Wassermoleküle in der Nähe des aktiven Zentrums oder der Bindungstasche gewährleistet. Diese Vorgehensweise ist von großer Bedeutung, da Wassermoleküle häufig eine entscheidende Rolle bei der Stabilisierung von Ligand-Protein-Komplexen spielen können. Dies erfolgt beispielsweise durch die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen oder die Vermittlung von elektrostatischen Wechselwirkungen. In Bezug auf die Behandlung von Wassermolekülen während der Vorbereitung der Proteinstruktur stehen innerhalb der *Protein Preparation* zwei unterschiedliche Optionen zur Verfügung. Bei der ersten Einstellung erfolgt eine Entfernung von Wassermolekülen, die sich in einem definierten Abstand von 1 bis 5 Å zu den Seitenketten der Aminosäuren befinden. Eine solche Entfernung kann dazu führen, dass bestimmte Wassermoleküle, die möglicherweise zur Stabilisierung des Liganden beitragen, nicht mehr in der Bindungstasche vorhanden sind, was sich direkt auf den *docking score* auswirken kann. Die zweite Einstellung erlaubt die Eliminierung von Wassermolekülen, die weniger als eine bis vier Wasserstoffbrückenbindung mit Nichtwassermolekülen, wie beispielsweise Aminosäuren oder dem Liganden, eingegangen sind. Die Variation der genannten Parameter resultierte in der Erzeugung sämtlicher möglicher Wasserzustände für das Protein, basierend auf der Kristallstruktur (PDB: 4EPY). Dies ermöglichte eine systematische Untersuchung der Auswirkungen verschiedener Wasserkonstellationen auf die Docking-Ergebnisse.

Die **Abbildung 31** veranschaulicht diesen Effekt, indem sie die *docking scores* aller in der **Abbildung 28** dargestellten Verbindungen für die verschiedenen durch Wassermoleküle modifizierten Proteinzustände aufzeigt. Da Liganden neben der Interaktion mit der Proteinoberfläche auch Wasserstoffbrückenbindungen zu den vorhandenen Wassermolekülen ausbilden können, ist die teilweise erhebliche Abweichung der erhaltenen *docking scores* für die unterschiedlichen Zustände des Proteins nicht überraschend. Die Ergebnisse verdeutlichen

die signifikante Rolle, die Wassermoleküle bei der Bestimmung der Bindungsaffinität spielen können. Interessanterweise zeigen die Ergebnisse für die Proteinzustände mit den Einstellungen 3Å4H (3 Å und Entfernen von Wasser mit vier Wasserstoffbrückenbindungen) und 3Å3H, dass unter bestimmten Bedingungen keine signifikanten Unterschiede in den *docking scores* zu beobachtet sind (siehe **Abbildung 31**). Dies deutet darauf hin, dass es unter diesen spezifischen Bedingungen keinen signifikanten Unterschied zwischen Wassermolekülen gibt, die drei oder vier Wasserstoffbrückenbindungen eingehen. Folglich befinden sich die Proteine in beiden Fällen in einem vergleichbaren Zustand, was die Ähnlichkeit der erhaltenen *docking scores* erklärt. Durch das gezielte Hinzufügen von Wassermolekülen zur Proteinstruktur bei den Einstellungen 3Å2H und 3Å1H konnte erneut eine signifikante Interaktion zwischen Ligand und Wasser nachgewiesen werden, was sich in den erhaltenen *docking scores* widerspiegelt. Ähnliche Beobachtungen wurden für die *docking scores* bei den Einstellungen 2 Å und 1 Å gemacht. Bei 1 Å wichen die Werte jedoch aufgrund des weitgehenden Fehlens von Wassermolekülen nicht weiter voneinander ab.

Die dargestellten Ergebnisse unterstreichen die zentrale Rolle, die Wassermoleküle bei der Simulation von Ligand-Protein-Interaktionen spielen können. Zudem verdeutlichen sie die Notwendigkeit, diese bei der Strukturvorbereitung sorgfältig zu berücksichtigen.

Die Ermittlung des optimalen Protein-Wasser-Zustandes gestaltet sich aufgrund der 20 möglichen Zustände als komplexes Unterfangen, welches einen erheblichen Rechenaufwand erfordert. Der ohnehin hohe Rechenaufwand wird zusätzlich dadurch erhöht, dass die verschiedenen Liganden sehr unterschiedlich mit der Proteinoberfläche sowie den vorhandenen Wassermolekülen interagieren. Dies impliziert, dass für jedes Ligand-Protein-Paar spezifische Wassermolekül-Konstellationen untersucht werden müssen, um genaue und verlässliche Ergebnisse zu erzielen. Insbesondere bei Strukturen, die dem ursprünglichen Liganden stark ähneln, ist es von entscheidender Bedeutung, den exakten Proteinzustand sowie die korrekten Verhältnisse innerhalb der Bindetasche zu bestimmen. Auf diese Weise kann gewährleistet werden, dass Wassermoleküle, die für die Bindungsaffinität von entscheidender Bedeutung sind, korrekt berücksichtigt werden.

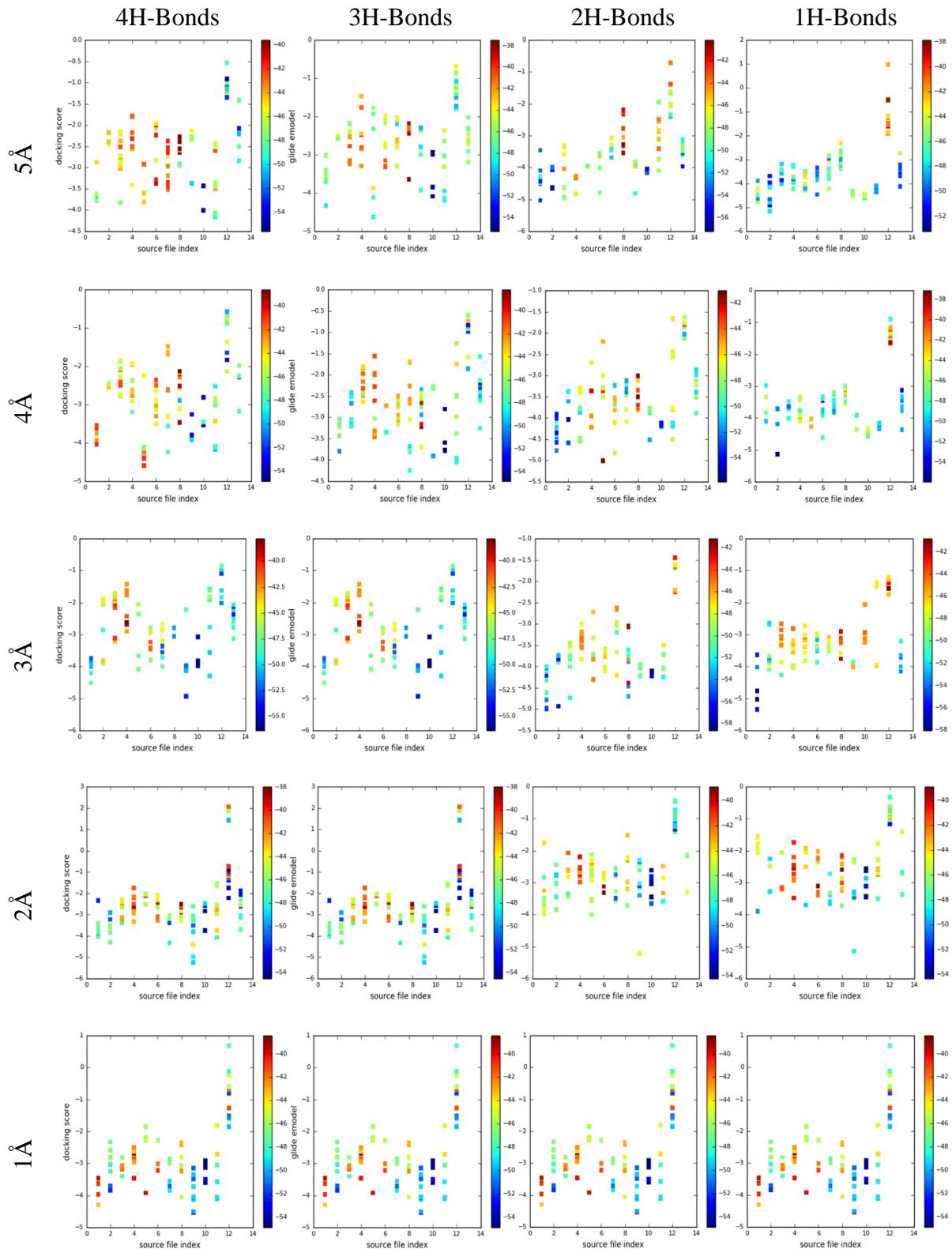


Abbildung 31: Darstellung des *docking scores* und der *emodel*-Werte der ausgewählten Verbindungen für der SI/II-Bindetasche in der Kristallstruktur 4EPY in Abhängigkeit zu den verschiedenen Wasserzuständen.

Ein anschauliches Beispiel hierfür ist die Verbindung MRTX1133 (**34**), bei der bereits in **Abbildung 16** dargestellt wurde, dass Wassermoleküle in der Bindetasche einen signifikanten Einfluss auf die Bindungsaffinität haben. Diese Beobachtung verdeutlicht die signifikante Rolle von Wassermolekülen und unterstreicht die Notwendigkeit einer sorgfältigen Analyse ihrer Präsenz und Position.

Da der Einfluss einer unterschiedlichen Anzahl von Wassermolekülen in der Bindetasche jedoch noch nicht vollständig verstanden ist und es keine eindeutigen Kriterien für die optimale Anzahl gibt, wurde entschieden, weiterhin die Standard-Einstellung bei zukünftigen Docking Berechnungen zu verwenden. Ein weiterer Faktor, der diese Entscheidung stützt, ist die Tatsache, dass Wassermoleküle innerhalb der Kristallstruktur statisch sind und somit nicht wie unter realen Bedingungen durch den Liganden verdrängt werden können. Diese Vorgehensweise führt zu einer Einschränkung bei der Simulation von Ligand-Protein-Interaktionen, da in der Realität Wassermoleküle dynamischer agieren und sich im Laufe der Bindung neu orientieren können.

Um die realen Wassereigenschaften und deren Einfluss auf die Ligand-Protein-Interaktion präziser abzubilden, wäre eine Moleküldynamik-Simulation (MDS) erforderlich. Die Simulationen erlauben die Untersuchung der Bewegung und Interaktion der Wassermoleküle über die Zeit, wodurch realistischere Bedingungen geschaffen werden können. Allerdings ist dieses Verfahren mit einem hohen Ressourcenaufwand verbunden. Eine Moleküldynamik-Simulation für einen einzelnen Liganden an einem RAS-Protein nimmt in der Regel etwa ein bis zwei Tage in Anspruch. Der Zeitaufwand für die Berechnung einer größeren Bibliothek von Liganden beläuft sich hingegen auf mehrere Tage bis Wochen. Diese Methode erweist sich somit als zu zeitaufwändig und ressourcenintensiv für die Suche nach einer optimalen wässrigen Umgebung für jeden einzelnen Liganden, noch bevor eine Selektion basierend auf dem *docking score* durchgeführt wurde. Aus den genannten Gründen wurde beschlossen, zunächst die Standardoption beizubehalten und sich auf effizientere, wenngleich weniger detaillierte Methoden zu konzentrieren.

4.1.2 Synthese der Hydrazone und Hydrazon-ähnlichen Verbindungen

4.1.2.1 Benzophenon- und Fluorenon-Derivate

In einem ersten Schritt wurden analog zu Verbindung **46** weitere Derivate synthetisiert (**Abbildung 32**). Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde die Benzophenon-Einheit durch weitere Hydroxygruppen ergänzt und der Einfluss verschiedener Fluorenon-Einheiten analysiert.

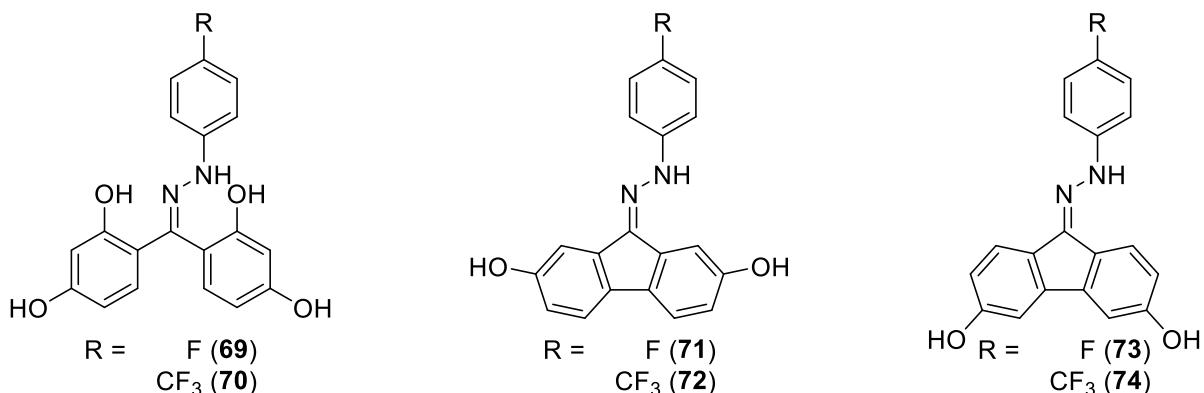


Abbildung 32: Benzophenon-Derivate (**69**, **70**) und Fluorenon-Derivate (**71** – **74**) auf Basis von Verbindung **46**.

Die Synthese der Verbindungen **69** bis **72** erwies sich hierbei als unkompliziert, da die benötigten Edukte der Kondensationsreaktion kommerziell erhältlich waren. Analog zur Synthesevorschrift für Verbindung **46** wurden so verschiedene Hydrazone synthetisiert.¹²² Für die Synthese der Verbindungen **69** und **70** wurde 4,4'-Dihydroxybenzophenon verwendet. Im Vergleich zur Ausbeute der Referenzverbindung **46** von 36% wurde für das CF₃-Derivat eine Ausbeute von 71% erzielt.¹²² Verbindung **69** konnte mit einer Ausbeute von 27% hergestellt werden. Das gleiche Verfahren wurde für die Synthese der Verbindungen **71** und **72** angewandt, jedoch wurde hier 2,7-Dihydroxy-9-fluorenon verwendet. Die entsprechenden Produkte wurden mit Ausbeuten von 38% bzw. 59% erhalten.

Das für die Synthese der Verbindungen **73** und **74** benötigte 3,6-Dihydroxy-9-fluorenon war kommerziell nicht erhältlich und musste selbst hergestellt werden. In der Literatur finden sich zwei Quellen, die eine effiziente Synthese erlauben. CHENG *et al.* und SHI *et al.* zeigten hierbei unabhängig voneinander die Palladium-katalysierte dehydrierende Zyclisierung von Benzophenon-Derivaten zu Fluorenon.^{123, 124} Das von CHENG *et al.* und SHI *et al.* entwickelte Verfahren bietet eine direkte Methode zur Darstellung von Fluorenonen aus günstigen und meist kommerziell erhältlichen Benzophenon-Derivaten. Es unterscheidet sich von herkömmlichen Synthesestrategien wie Friedel-Crafts-Acylierungen, Pd-katalysierten C-H-Funktionsierungen mit Arylhalogeniden, Carbonylierungen und Decarboxylierungen, die

häufig mehrstufig ablaufen und funktionalisierte Edukte erfordern.¹²⁵⁻¹²⁷ Der von SHI *et al.* postulierte Mechanismus ist in **Abbildung 33** dargestellt.¹²⁴ Auf diese Weise war es möglich, das bereits vorhandene 4,4'-Dihydroxybenzophenon zur Synthese der entsprechenden Fluorenon-Derivate **73** und **74** zu nutzen.

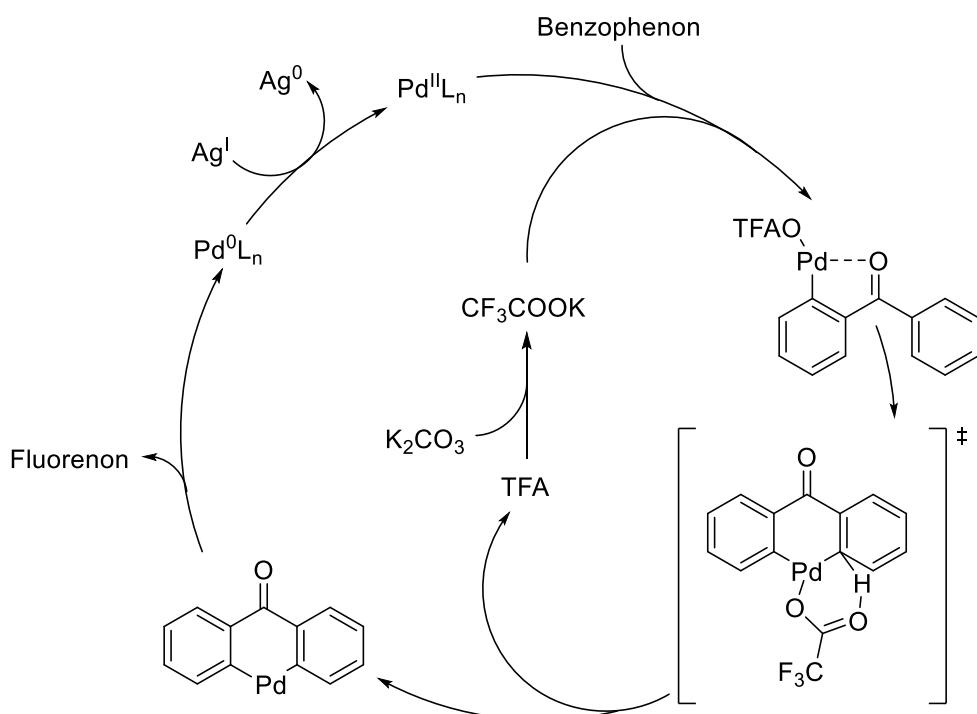


Abbildung 33: Postulierter Mechanismus der Pd-katalysierten oxidativen dehydrierenden Zyklisierung von Benzophenon von SHI *et al.*¹²⁴

Die Synthese wurde gemäß dem in der Literatur beschriebenen Verfahren durchgeführt, wobei das gewünschte Fluorenon-Derivat **76** mit einer Ausbeute von 37% erhalten wurde. Im Anschluss wurden weitere Kondensationsreaktionen durchgeführt, wodurch die gewünschten Hydrazone **73** und **74** (**Abbildung 34**) entstanden sind. Die Ausbeuten beliefen sich auf 38% bzw. 64%. Die so synthetisierten Derivate wurden zur Ermittlung der biologischen Daten an das Lead Discovery Center in Dortmund übergeben.

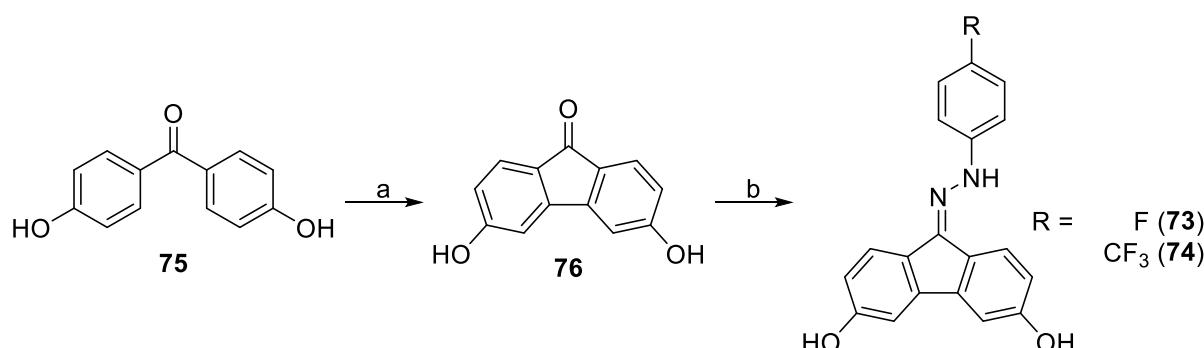


Abbildung 34: Synthese von Verbindung **73/74** ausgehend von 4,4'-Dihydroxybenzophenon. a) $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (5 mol%), Ag_2O , K_2CO_3 , TFA, 140°C , 24 h, 37%. b) MeOH , 4-R-Aryl- NHNH_2 , AcOH , 50°C , 12 h.

4.1.2.2 Pyrazol-Derivate

Die Synthese von Verbindung **59** erfolgte über den in **Abbildung 35** dargestellten 5-stufigen Syntheseweg. Weitere Zwischenprodukte wurden synthetisiert und isoliert, um die Auswirkungen verschiedener Strukturelemente auf die biologische Wirkung der Verbindungen genauer zu untersuchen. Im Rahmen der ursprünglichen Planung wurde neben dem Fluor-Derivat **59** die Herstellung von zwei weiteren Derivaten anvisiert. Hierbei handelt es sich um das Trifluormethyl-Derivat **77** sowie das Trifluormethoxy-Derivat **78**. Wie bereits in früheren Studien nachgewiesen wurde, kann die biologische Wirkung durch die Derivatisierung der *para*-Stellung des Hydrazon-Systems beeinflusst werden.¹⁰⁸

Als Ausgangsmaterial wurde 4-Methoxybenzoylacetonitril (**79**) eingesetzt. Dieses wurde in einer säurekatalysierten Kondensationsreaktion mit dem entsprechenden 4-substituierten Aryl-Hydrazin in ein disubstituiertes 5-Aminopyrazol (**80**, **81**, **82**) überführt. Die Kondensationsreaktion ist auch als *Knorr-Pyrazol-Synthese* bekannt, bei der 1,3-Dieletrophile mit Hydrazinen zu Aminopyrazolen reagieren.¹²⁸⁻¹³⁰ Die Durchführung basiert auf der von CHEN *et al.* publizierten Reaktion (**Abbildung 35**).¹³¹ Die Ausbeuten der jeweiligen Synthesen sind **Abbildung 35** zu entnehmen.

Die so erhaltenen 5-Aminopyrazol-Derivate wurden anschließend in zwei unterschiedlichen Reaktionen eingesetzt. Die Umsetzung der Edukte mit einer Bortribromid-Lösung in Dichlormethan resultierte in den Verbindungen **83**, **84** und **85**. In den Reaktionsansätzen wurden jeweils drei Hauptprodukte beobachtet. Im Rahmen der Entschützung der Hydroxygruppe wurde zu einem gewissen Anteil die 4-Position des Aminopyrazol-Systems bromiert. Zudem konnte zusätzlich die bromierte Spezies in ihrer entschützten Form beobachtet werden. Bei dem Fluor-Derivat **77** wurde als Hauptprodukt mit einer Ausbeute von 69% das entschützte Produkt (**83**) erhalten. Zudem wurden geringe Mengen der bromierten Verbindungen **86** und **89** isoliert. Ähnliche Ausbeuten wurden beim Einsatz des CF₃-Derivats (**81**) und des -OCF₃-Derivats (**82**) beobachtet.

Die gezielte Bromierung des Pyrazol-Rings wurde unter Einsatz von *N*-Bromosuccinimid durchgeführt. Die erhaltenen Produkte (Verbindung **86** - **88**) wurden zur Synthese der Alkohole mit Bortribromid versetzt. Da die 4-Position des Rings bereits bromiert war, fand diese Reaktion ohne die Bildung signifikanter Nebenprodukte statt.

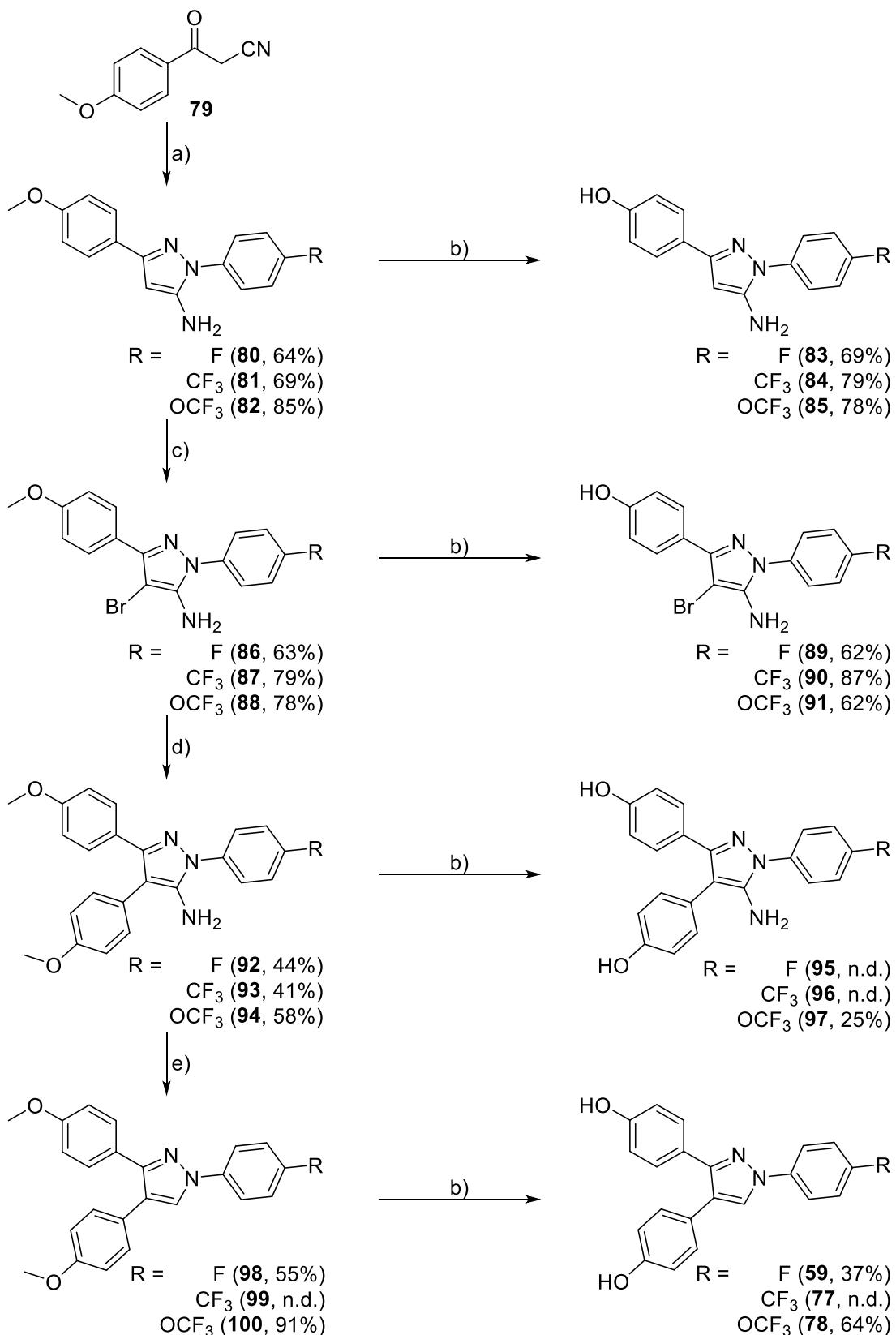


Abbildung 35: Syntheseroute zur Darstellung verschiedener Pyrazol-Derivate und Zwischenstufen. a) EtOH/AcOH (1:1), 4-substituiertes Aryl-Hydrazin, 100°C , 12 h; b) DCM, BBr_3 (1 M in DCM), rt, 24 h; c) NBS, DMF , 0°C , 3 h; d) 4-Methoxyphenylboronsäure, $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (98%), Cs_2CO_3 , Toluol, 70°C , 24 h; e) TBN , THF, 65°C , 3 h.

Im Rahmen der weiteren Untersuchungen wurde eine SUZUKI-Kupplung durchgeführt, die für die mehrstufige Synthese von entscheidender Bedeutung war. Dies lag zum einen daran, dass die Reaktion sehr langsam verlief, zum anderen wies die Ausbeute eine signifikante Variation zwischen den einzelnen Wiederholungen auf. Der Versuch, den Maßstab des Reaktionsansatzes zu erhöhen, war nicht erfolgreich. Dies resultierte in einer erheblichen Verschlechterung der Ausbeute sowie der Bildung diverser Nebenprodukte. Die Reaktionen wurden stattdessen in wiederholter Ausführung parallel in kleineren Maßstäben durchgeführt. Während der Synthese wies das -OCF₃-Derivat (**94**) eine positive Tendenz auf. Im Vergleich zu den beiden anderen Derivaten wurde es deutlich schneller gebildet und wies in der Regel auch höhere Ausbeuten auf. Die Synthese des -CF₃-Derivats (**93**) verlief in besonderem Maße enttäuschend. Obgleich die optimalen Bedingungen mit höchster Präzision befolgt wurden – trockene Lösungsmittel und Inertgasatmosphäre – konnte lediglich ein moderater Umsatz festgestellt werden. Zudem war es notwendig, den Katalysator nach ca. 16 Stunden erneut hinzuzugeben, da kein weiterer Umsatz des Edukts beobachtet wurde.

In Übereinstimmung mit der Publikation von CHEN *et al.* wurde zur Desaminierung des Pyrazolringes *tert*-Butylnitrit (TBN) eingesetzt.¹³¹ Die Desaminierung des -OCF₃-Derivats (**100**) verlief ohne Schwierigkeiten, was sich in der erhaltenen Ausbeute widerspiegelt. Allerdings konnte das Resultat nicht für die analogen -F- und -CF₃-Derivate reproduziert werden. Die Ausbeute für das -F-Derivat (**98**) war mit 55% ausreichend für die anschließende BBr₃-Reaktion. Die Synthese des -CF₃-Derivats (**99**) hingegen verlief, wie bereits bei den vorherigen Stufen, problematisch. Obwohl das eingesetzte Ausgangsmaterial eine Reinheit von >95% auswies, traten bei dieser Reaktion eine Vielzahl von Nebenprodukten auf. Das tatsächliche Produkt wurde ausschließlich in einer sehr geringen Konzentration in der Reaktionslösung beobachtet. Nach wiederholten, jedoch erfolglosen Versuchen, das entsprechende CF₃-Derivat unter verschiedenen Bedingungen zu erhalten, wurde die Synthese dieses Derivats abgebrochen.

Im finalen Schritt der Synthese wurden die erhaltenen Pyrazol-Derivate **98** und **100** unter Einsatz von Bortribromid in die entsprechenden Endverbindungen überführt. Infolge der im späteren Verlauf dargelegten biologischen Ergebnisse erfolgte die Umsetzung der Zwischenstufe **94** in das Alkohol-Derivat **97** lediglich für das -OCF₃-Derivat. Die Synthese der Verbindungen **59** und **78** konnte folglich erfolgreich über einen fünfstufigen Syntheseweg realisiert werden.

4.1.2.3 Pyrazolon-Derivat auf Basis von GS-493

Die Synthese des Hybrids (**68**) aus der Verbindung **46** und GS-493 (**67**) erfolgte analog nach der von RADEMANN *et al.* publizierten Syntheseroute eines SHP2-Inhibitors.¹¹⁸ Im ersten Reaktionsschritt wurde Methyl(triphenylphosphoranylidene)acetat (**102**) mit 4-Methoxybenzoylchlorid (**101**) acyliert. Hierbei wurde eine Ausbeute von 71% erzielt. Im darauffolgenden Schritt war die Abtrennung der PPh_3 -Gruppe durch ein Oxidationsmittel erforderlich. RADEMANN *et al.* führten diesen Prozess unter Verwendung einer eigens hergestellten Dimethyldioxiran (DMDO)/Aceton-Lösung durch. Die nicht kommerziell erhältliche DMDO-Lösung wurde bei RADEMANN *et al.* durch Zugabe von Oxone® in Aceton gemäß einer Anleitung von TABER *et al.* aus dem Jahr 2013 hergestellt.¹³² Aus Sicherheitsgründen wurden eine Methode gewählt, die es ermöglicht, DMDO *in situ* zu erzeugen. Auf diese Weise sollte das erzeugte DMDO sofort mit dem Reaktionspartner reagieren und die potenzielle Explosionsgefahr minimiert werden.

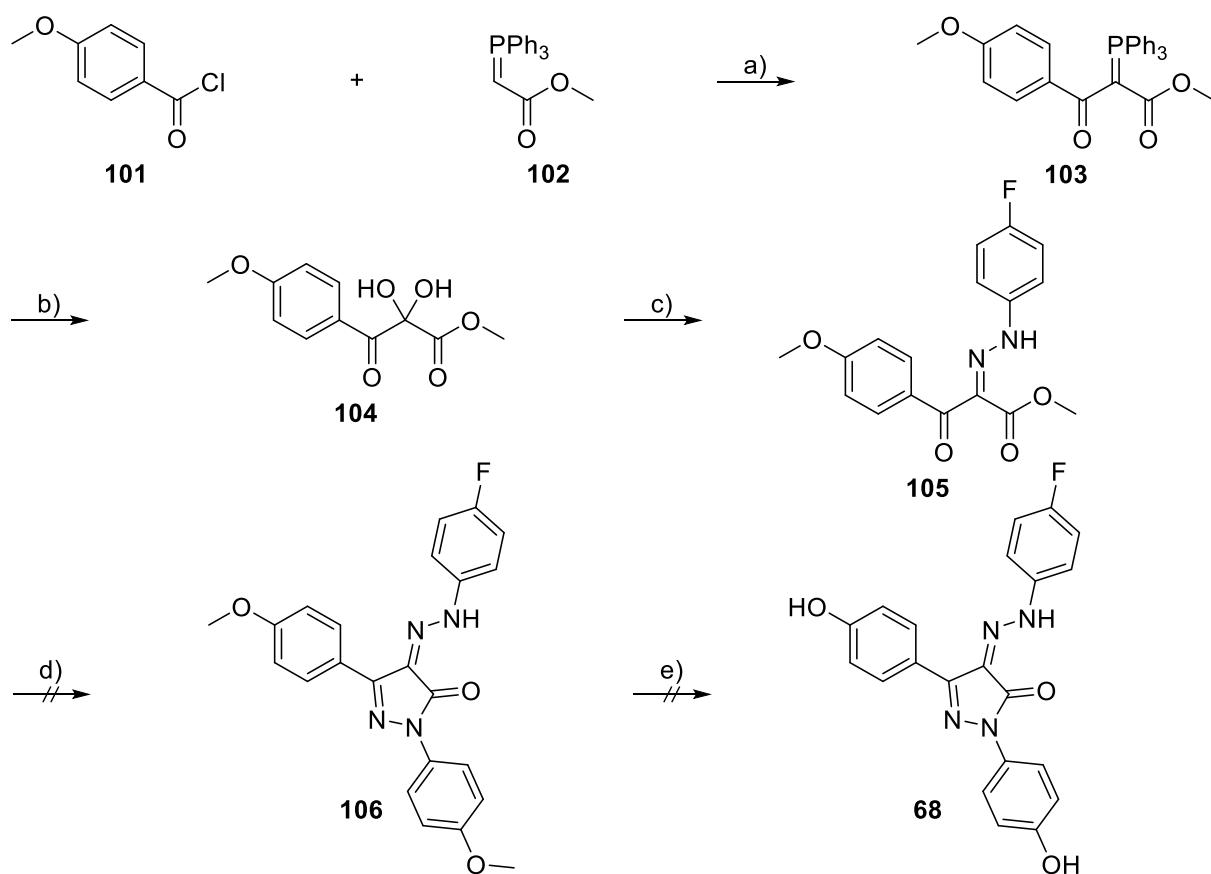


Abbildung 36: Syntheseroute für den GS-493-Hybrid. a) 2,6-Lutidin, DCM, rt, 16 h; b) Oxone® (moist), DCM, rt, 24 h; c) 4-Fluorphenylhydrazin hydrochlorid, EtOH, HCl, 85 °C, 16 h; d) 4-Methoxyphenylhydrazin hydrochlorid, EtOH, HCl, 85 °C, 16 h; e) DCM, BBr_3 (1 M in DCM), rt, 24 h.¹¹⁸

Die Synthesestrategie wurde anhand der von DONDONI *et al.* veröffentlichten Ergebnisse entwickelt.¹³³ Hierbei bildet sich in der Aceton/Wasser-Phase DMDO unter Verwendung eines NaHCO₃-Puffers. In der organischen Phase, bestehend aus DCM und dem Ausgangsmaterial, wird das Edukt zum Produkt oxidiert. Trotz mehrerer Versuche mit unterschiedlichen Oxone[®]-Konzentrationen wurde allerdings keine Reaktion beobachtet.

Nach weiterer Literaturrecherche wurde ein Syntheseverfahren von LEE *et al.* gefunden, bei dem die Oxidation des Edukts direkt durch feuchtes Oxone[®] ohne Bildung von DMDO erfolgte.¹³⁴

Tabelle 2: Screening-Reaktionen für optimale Menge an Oxone[®]. Reaktionszeit t = 24 h.

Substanzmenge	Oxone [®]	Oxone [®]	Wasser	Reaktionskontrolle
[mg]	[Äq.]	[mg; mmol]	[µL]	[%]
20	4.0	105; 0.17	34	0
20	5.0	131; 0.21	42	7
20	6.0	158; 0.26	52	15
20	7.0	184; 0.30	60	40
20	8.0	210; 0.34	68	80
20	9.0	236; 0.38	76	85

Um mögliche Fehler in der Übertragung auf das hier vorliegende System auszuschließen, wurden Screening-Reaktionen durchgeführt. Anhand der in **Tabelle 2** dargestellten Screening-Reaktionen, wurde die benötigte Menge Oxone[®] zur vollständigen Oxidation des Edukts (**103**) ermittelt. Erst bei der Verwendung von acht Äquivalenten Oxone[®] wurde eine zufriedenstellende Ausbeute beobachtet. In der Reaktionskontrolle wurden zwei unterschiedliche Formen des Zielmoleküls festgestellt (**Abbildung 37**). Sowohl das gewünschte Diol **104** als auch die Tricarbonylverbindung **107** waren in HPLC-MS-Messungen zu erkennen. Der Versuch, das erhaltene Rohprodukt mittels RP-Flash-Chromatographie aufzureinigen, führte zur vollständigen Zersetzung des Produkts. Das Rohprodukt wies laut NMR- und HPLC-Messungen nur geringfügige Verunreinigungen auf, sodass die folgenden Schritte mit dem Rohprodukt durchgeführt wurden. Die Verbindung **104** wurde in Ethanol gelöst und mit konzentrierter Salzsäure (1% v/v) angesäuert. Die Zugabe von Salzsäure führte

zur Aktivierung der elektrophilen 2-Carbonyl-Funktion, woraufhin eine Kondensationsreaktion mit dem ersten Hydrazin erfolgte.

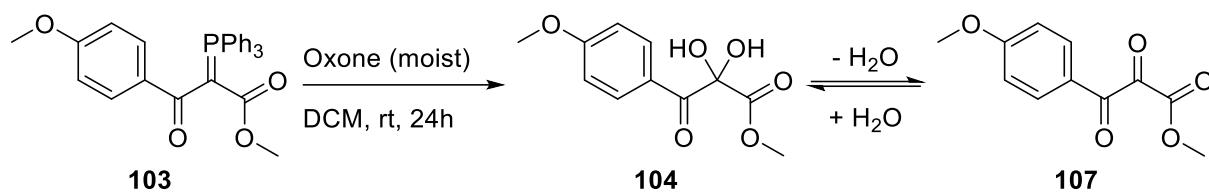


Abbildung 37: Oxidation des Phosphoranylids zur Darstellung des geminalen Diols.

Das entsprechende Hydrazin wurde nur im geringen Überschuss eingesetzt, um eine weitere Kondensationsreaktion in der 3-Position zu verhindern. Nachdem das Rohprodukt vollständig zu Verbindung **105** umgesetzt war, wurde der pH-Wert der Reaktionslösung erneut durch Zugabe konzentrierter Salzsäure sauer eingestellt. Hierdurch wurde die 3-Position aktiviert und das zweite Hydrazin-Derivat wurde in einer weiteren Kondensationsreaktion umgesetzt. Der Methylester spaltet sich durch die stattfindende Cyclisierung ab, wodurch die entstehende Pyrazolon-Struktur gebildet wird (**Abbildung 38**).¹¹⁸

Im Rahmen der Synthesearbeiten wurde jedoch festgestellt, dass die zweite Kondensationsreaktion mit 4-Methoxyphenylhydrazin nicht zum gewünschten Produkt führte. Der Versuch, 4-Hydrazinylphenol als direkten Ersatz einzusetzen, war ebenfalls nicht erfolgreich. Um die Vergleichbarkeit mit dem zuvor berechneten Molekül **68** sicherzustellen, wurde im weiteren Verlauf der Synthesearbeiten mit 4-Trifluormethoxyphenylhydrazin als Reagenz weitergearbeitet. Die so erhaltenen Verbindungen **108** und **109** (**Abbildung 38**) wurden erfolgreich synthetisiert und isoliert. Verbindung **109** wurde hierbei mit einer Gesamtausbeute von 40% über fünf Syntheseschritte erhalten.

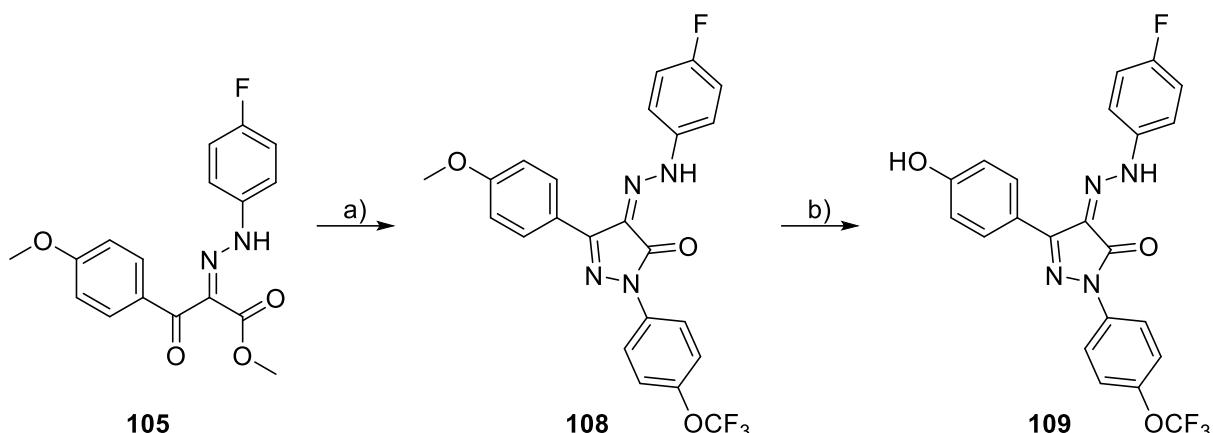


Abbildung 38: Alternative Syntheseplanung zur Darstellung der Verbindung **109**. a) 4-OCF₃-Phenylhydrazin-Hydrochlorid, EtOH, HCl, 85 °C, 16 h; b) DCM, BBr₃ (1 M in DCM), rt, 24 h.

4.1.2.4 1,3,5-Triazin-Derivate

Für die Synthese der aus den Modeling-Arbeiten ausgewählten Verbindung **57** (**Abbildung 28**) wurde ein von ZOU *et al.* entwickeltes Verfahren zur Darstellung asymmetrischer Aryltriazine durch sequenzielle SUZUKI-Kupplungen verwendet.¹³⁵

Zuerst wurde Trichlor-S-Triazin im Überschuss vorgelegt und danach mit *p*-Fluorphenylboronsäure versetzt. Die Monosubstitution verlief vollständig mit einer Ausbeute von 92%, da die eingesetzte Boronsäure die limitierende Komponente darstellte. In einem nachfolgenden Schritt wurde das monosubstituierte Triazin mit einem Überschuss an *p*-Methoxyphenylboronsäure versetzt. Die Reaktionsbedingungen entsprachen denen der SUZUKI-Kupplung aus dem ersten Syntheseschritt. Die Reaktion erreichte keinen vollständigen Umsatz, wodurch Rückstände des eingesetzten monosubstituierten als auch des teilweise disubstituierten Triazins vom angestrebten Produkt **112** abgetrennt werden mussten. Nach entsprechender chromatografischer Trennung wurde das gewünschte Produkt mit einer Ausbeute von 45% isoliert. Die Entschützung der Methoxy-Gruppen zum Erhalt der freien Hydroxy-Gruppen erfolgte unter Einsatz von Bortribromid.

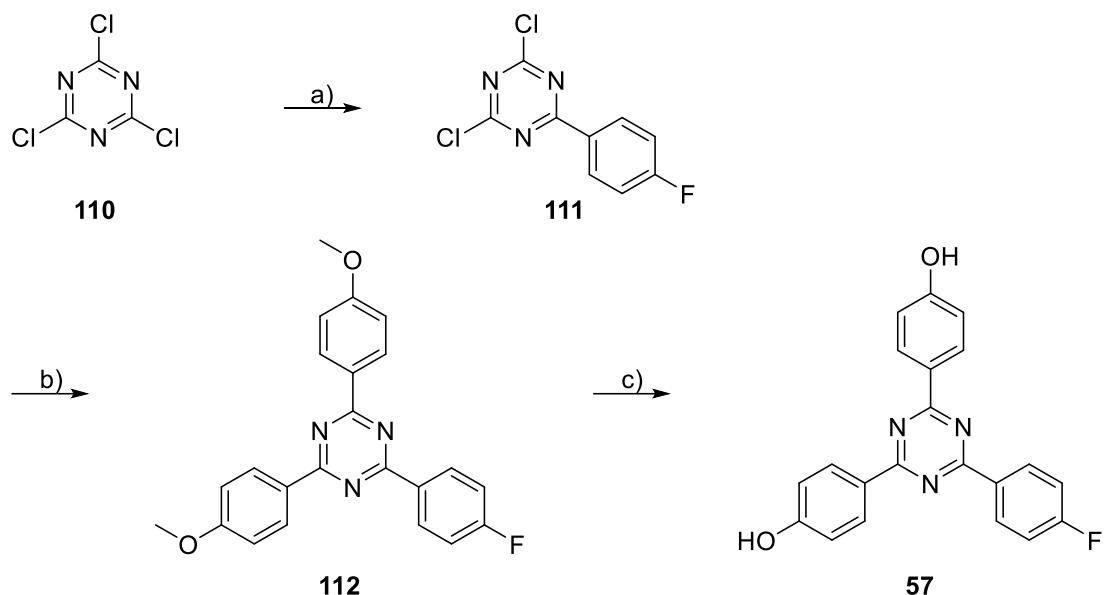


Abbildung 39: Synthese von Triazin **57** über sequenzielle SUZUKI-Kupplung. a) *p*-Fluorophenylboronsäure, Pd(PPh₃)₂Cl₂ (0.5 mmol%), K₂CO₃, Toluol, 60 °C, 12 h; b) *p*-Methoxyphenylboronsäure, Pd(PPh₃)₂Cl₂ (1 mmol%), K₂CO₃, Toluol, 60 °C, 12 h; c) BBr₃ (1 M in DCM), rt, 24 h.

Nach chromatographischer Aufreinigung wurde Verbindung **57** mit einer Ausbeute von 58% isoliert.

In einer weiteren Synthese (**Abbildung 40**) wurde zudem das symmetrische Triazin **113** mit einer Ausbeute von 52% synthetisiert. Der Versuch die Ether-Bindungen zu spalten war jedoch ohne Erfolg. Andere Spaltungsbedingungen, wie beispielsweise die Verwendung von Aluminiumtrichlorid (AlCl₃) oder die von MAGANO *et al.* publizierte Variante unter Einsatz von 2-(Diethylamino)ethanethiol führten bei Verbindung **113** zur vollständigen Zersetzung.¹³⁶⁻¹³⁸

138

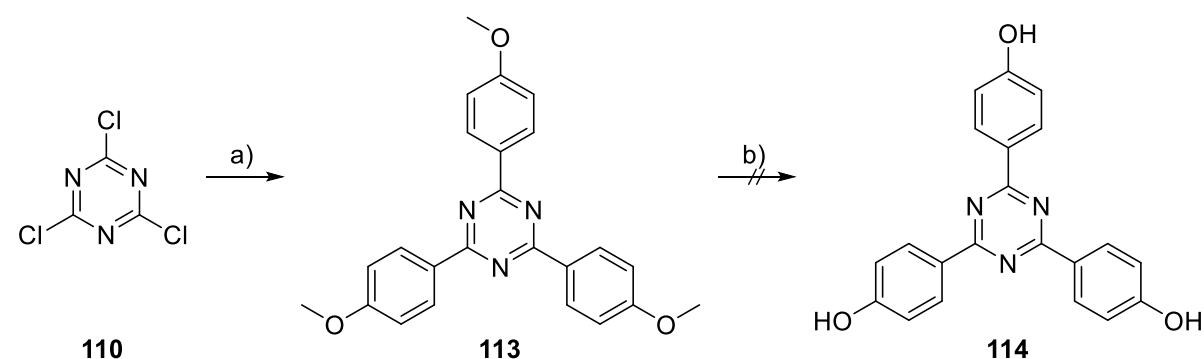


Abbildung 40: Synthese des symmetrischen Triazin **114** für Vergleichbarkeit der biologischen Daten. a) *p*-Methoxyphenylboronsäure, Pd(PPh₃)₂Cl₂ (1.5 mmol%), K₂CO₃, Toluol, 60 °C, 12 h; b) BBr₃ (1 M in DCM), rt, 24 h.

4.1.3 Synthese verschiedener Oxim-Derivate

Wie bereits erwähnt, erzielte neben der Verbindung **46** als Hydrazonderivat auch die Verbindung **47** als Oxim-Spezies positive Ergebnisse in den biologischen Untersuchungen an der G12D-Mutante des KRAS-Proteins.¹⁰⁸ Um die strukturelle Wirkung der Oxim-Verbindung besser zu verstehen, wurden, in Anlehnung an die Synthese von Verbindung **46**, verschiedene Derivate hergestellt, bei denen, um den ursprünglichen Charakter von Verbindung **47** zu bewahren, lediglich der Oxim-Teil des Moleküls modifiziert wurde. Die Synthesen sind in **Abbildung 41** dargestellt.

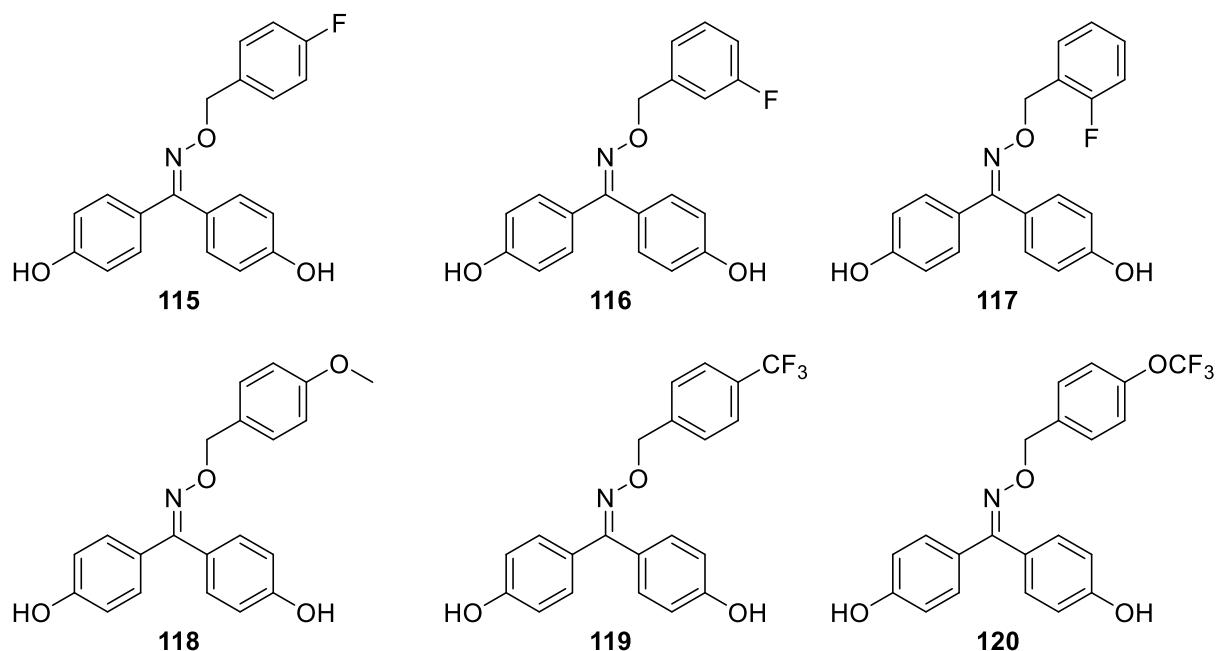


Abbildung 41. Oxim-Derivate auf Basis der Verbindung **47**.

Das Hydroxylamin, das für die Synthese von Verbindung **120** erforderlich war, war zum Zeitpunkt der Durchführung kommerziell nicht erhältlich und musste synthetisiert werden. Hierfür wurde 4-(Trifluoromethoxy)benzylbromid mit N-Hydroxyphthalimid und Triethylamin in Acetonitril versetzt.

Das Hydroxylamin wurde im nächsten Schritt durch Zugabe von Hydrazin Monohydrat zur in Ethanol gelösten Verbindung **123** hergestellt. Nach drei Stunden bei 80 °C war Verbindung **123** vollständig umgesetzt, sodass das Lösungsmittel unter verminderter Druck vollständig entfernt wurde. Der erhaltene Rückstand, in dem sich Verbindung **124** befand, wurde nun, analog zur Synthese der vorherigen Derivate, in Pyridin gelöst und zu einer Lösung aus 4,4'-

Dihydroxybenzophenon in Dichlormethan gegeben. Nach der Reaktion und entsprechender Aufarbeitung wurde Verbindung **120** mit einer Ausbeute von 54% erhalten.

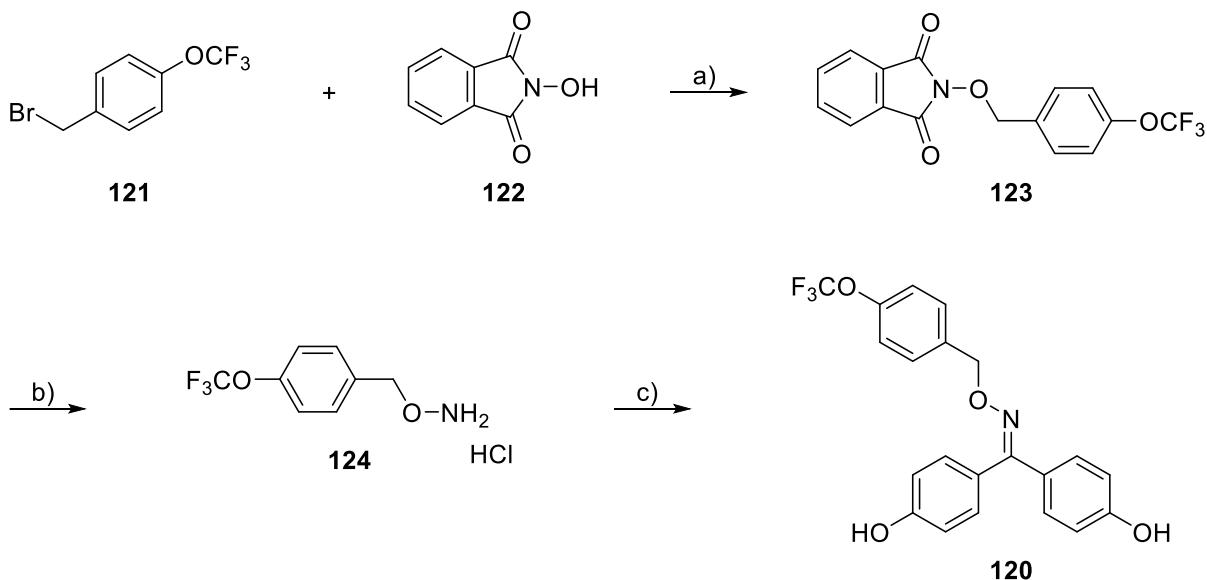


Abbildung 42: Syntheseroute zur Darstellung des für Verbindung **120** benötigten Hydroxylamins. a) MeCN , Et_3N , 2.5 h, 80°C ; b) Hydrazin Monohydrat, EtOH , 3 h, 80°C ; c) 4,4'-DHPB, Pyridin, DCM , 4 h, rt.

4.1.4 Biologische Untersuchung der synthetisierten Liganden

Die im Vorfeld beschriebenen Verbindungen wurden von der Lead Discovery Center GmbH in Dortmund hinsichtlich ihrer potenziellen Interaktionen mit dem KRAS-Protein analysiert. Der Fokus der Untersuchungen lag auf der Erhebung von Daten zu den übergebenen Verbindungen im KRAS4B^{GDP}/SOS-Austauschassay und im Cell-Titer-Glo-Assay. Der erste Assay liefert Informationen über den durch SOS1 initiierten Austausch von GDP zu GTP, während der zweite eine Untersuchung darstellt, bei der der Lebendanteil verschiedener Zelllinien nach Zugabe einer Substanzprobe analysiert wird. Eine detaillierte Beschreibung der durchgeföhrten biologischen Untersuchungen ist in **Kapitel 6.4** zu finden. In **Tabelle 3** sind die gemessenen biologischen Daten für die Benzophenon- und Fluorenon-Derivate dargestellt.

Tabelle 3: Biologische Daten der Benzophenon- und Fluorenon-Derivate.

	KRAS4B ^{GDP} /SOS-Austauschassay (IC ₅₀ [μM])		Zellulare Aktivität (CTG-Assay) (IC ₅₀ [μM])	
	G12D	WT	SNU-1 (G12D)	RKo (WT)
23 (BI-2852)	17.9±5.3	13.4	>30	>30
46	413±28	1036±427	23.7±14.4	>30
69	546	>300	>30	>30
70	1134	520	16.4±1.7	11.9±1.4
71	1313	>300	6.3±0.4	6.4±0.1
72	612	967	11.1±0.3	9.2±1.1
73	2603	>300	>30	>30
74	>3000	>3000	15.2±1.3	11.2±0.9

Die vorliegenden biologischen Daten zeigen, dass keine der synthetisierten Verbindungen die Aktivität der Referenzverbindung **46** im KRAS4B^{GDP}/SOS-Austauschassay übertraf. Die gegenüber der G12D-Mutante bei der Referenzverbindung beobachtete spezifische Wirkung konnte in den meisten Fällen nicht reproduziert werden. Die zweistellig mikromolare Inhibierung des Austauschs von GDP zu GTP, wie sie für BI-2852 (**23**) nachgewiesen wurde, konnte mit keiner der untersuchten Verbindungen erreicht werden. Mittels CTG-Assays erfolgte die Untersuchung der zellulären Aktivität in SNU-1- und RKo-Zellen. Die SNU-1-Zellen weisen eine KRAS^{G12D}-Mutation auf, während die RKo-Zelllinie das KRAS^{WT}-Allel besitzt. Letztere eignet sich in diesem Kontext zur Ermittlung möglicher Off-Target-Effekte oder zur Aufdeckung einer unspezifischen Wirkung der Verbindungen. Mit Ausnahme der Verbindungen **69** und **73** wiesen alle synthetisierten Verbindungen zelluläre Aktivität unterhalb der Messgrenze von 30 μM auf. Insbesondere die Verbindungen **71** und **72** verdienen hierbei besondere Beachtung, da im Rahmen des CTG-Assays für diese einstellig mikromolare Messwerte ermittelt wurden. Somit gehören sie zu den wirksamsten Verbindungen innerhalb der Arbeitsgruppe SCHERKENBECK in diesem spezifischen Assay-System. Eine Selektivität ist jedoch nicht erkennbar, wie die ähnliche Aktivität gegen RKo-Zellen demonstriert. Ein direkter Vergleich mit dem GDP/GTP- Austauschassay offenbart, dass die antitumorale Wirkung nicht auf eine Hemmung des GDP-Austauschs beruht und somit als Off-Target bezeichnet werden kann. An dieser Stelle soll das Beispiel BI-2852 (**23**) nochmals aufgeführt werden, um zu verdeutlichen, dass eine messbare Inhibierung im GDP/GTP-Austauschs nicht automatisch auch mit der zellulären Aktivität korreliert.

Die biologischen Werte der synthetisierten Verbindungen der Pyrazol-, Pyrazolon- und Triazin-Derivate sind in **Tabelle 4** aufgeführt. Allerdings zeigen hier nur die Verbindungen **98** und **108** eine schwache Wirkung im KRAS4B^{GDP}/SOS-Austauschassay. Ein signifikanter Unterschied zwischen der G12D-Mutante und dem Wildtyp des KRAS-Proteins konnte bei diesen beiden Verbindungen ebenfalls nicht festgestellt werden. Die Verbindungen **86, 87, 88, 90, 91, 93, 59** und **78** zeigen im CTG-Assay eine zweistellige mikromolare Aktivität, die jedoch offenbar keine Korrelation zum GDP/GTP-Austauschassay aufweist. Die mangelnde Selektivität für eine spezifische Zelllinie lässt den Schluss zu, dass die beobachteten Aktivitäten auf Off-Target-Effekte zurückzuführen sind. Zum Zeitpunkt der Abgabe der Dissertation standen für die übrigen Verbindungen keine Werte für den CTG-Assay zur Verfügung.

Die vorgeschlagene Hybridverbindung aus Verbindung **46** und dem PTP-Inhibitor **67** wurde hinsichtlich ihrer Eigenschaften überprüft, wobei zwei Pyrazolone synthetisiert und im SOS-Austauschassay analysiert wurden. Die höchste Aktivität innerhalb dieses Assays wurde für Verbindung **108** beobachtet, welche einen IC₅₀-Wert von $147,5 \pm 2,1 \mu\text{M}$ für die G12D-Mutante und $243,2 \pm 54 \mu\text{M}$ für den Wildtyp aufweist. Der Unterschied zwischen den beiden Messergebnissen ist jedoch zu gering, um von einer Selektivität gegenüber der G12D-Mutante sprechen zu können. Die Umwandlung der Methoxygruppe in die entsprechende Hydroxygruppe (Verbindung **109**) führte zu einer signifikanten Verschlechterung der Aktivität.

In der letzten Reihe der in **Tabelle 4** dargestellten Daten finden sich die Messwerte der 1,3,5-Triazin-Derivate. Auch für diese Substanzklasse konnten keine aussagekräftigen Ergebnisse erzielt werden, sodass die Derivatisierung der Verbindung **46** auf Basis der vorliegenden Daten eingestellt wurde.

Trotz der negativen Ergebnisse in den biologischen Tests konnte die Struktur-Wirkungsbeziehung von Verbindung **46** durch gezielte Strukturmodifikationen der neuen Verbindungen weiter ausgebaut werden. Dadurch wurden zwei potenziell störende Eigenschaften eliminiert. Von entscheidender Bedeutung ist die Beseitigung der potenziellen Freisetzung toxischen Hydrazins. Der zweite strukturelle Faktor, der durch die Derivatisierungsarbeiten beseitigt wurde, ist der Austausch des Grundgerüstes DHBP als sogenannte PAIN-Substanz. PAINS führen häufig zu falsch positiven Werten in biochemischen Hochdurchsatz-Screenings und sollten daher mit Skepsis betrachtet werden.^{117, 139, 140} Durch den Austausch des DHBP gegen die Pyrazol-, Pyrazolon- und Triazin-Grundgerüste konnte dem beschriebenen Effekt entgegengewirkt werden.

Tabelle 4: Biologische Daten der Pyrazol-, Pyrazolon- und Triazin-Derivate.

	KRAS4B ^{GDP} /SOS-Austauschassay (IC ₅₀ [μM])	Zellulare Aktivität (CTG-Assay)		
		WT	SNU-1 (G12D)	RKo (WT)
G12D				
23 (BI-2852)	17.9±5.3	13.4	>30	>30
46	413±28	1036±427	23.7±14.4	>30
82	>300	>300	>30	>30
83	1796	2101	>30	>30
84	>3000	>3000	n.b.	n.b.
85	>300	>300	>30	>30
86	2817	>3000	10.6±1.1	19.0±2.1
87	>300	>300	20.7±2.2	>30
88	>300	>300	19.7±0.6	25.3±1.1
89	2093	2293	>30	>30
90	>300	>300	14.7±0.4	16.6±2.1
91	>300	>300	17.9±0.9	19.2±3.2
92	>3000	>3000	n.b.	n.b.
93	>300	>300	21.4±0.1	>30
94	>300	>300	>30	>30
97	>300	>300	n.b.	n.b.
98	188.4±19.3	203.0	n.b.	n.b.
100	>3000	>3000	n.b.	n.b.
59	1284	>300	20.9±2.7	24.4±3.0
78	>300	>300	12.2±0.2	11.6±0.3
108	147.5±2.1	243.2±54	n.b.	n.b.
109	798.7±22.6	906.3±98.0	n.b.	n.b.
112	>300	>300	n.b.	n.b.
57	2647	>3000	n.b.	n.b.
113	400.4	>300	n.b.	n.b.

Die biologischen Daten der Oxim-Derivate, basierend auf Verbindung **47**, sind in **Tabelle 5** aufgeführt. Die synthetisierten Derivate verbesserten die Wirksamkeit von Verbindung **47** nicht. Tatsächlich hat die Aktivität im KRAS4B^{GDP}-Austauschassay in allen Fällen abgenommen. Des Weiteren wurde die geringe Selektivität der Verbindung **47** entfernt, was neben dem bereits erwähnten Verlust an Aktivität eine weitere Konsequenz der Derivatisierung darstellt.

Tabelle 5: Biologische Daten der Oxim-Derivate.

KRAS4B^{GDP}/SOS-Austauschassay
(IC₅₀ [μM])

	G12D	WT
23 (BI-2852)	17.9±5.3	13.4
47	431±22	1332±343
115	1281±205	876±241
116	1042±90	1038±68
117	>300	>300
118	1251±183	1130±135
119	1135±38	713
120	>300	>300

Unter Berücksichtigung der gegenwärtigen biologischen Daten lässt sich zusammenfassend feststellen, dass die Derivatisierungen der Verbindungen **46** und **47** zu keinen signifikanten Verbesserungen der biologischen Wirksamkeit, zumindest für den Austauschassay, führten. Dies ist ein überraschendes Ergebnis, wenn man die zuvor durchgeführten *Glide*-Berechnungen berücksichtigt. Die berechneten Verbindungen konnten innerhalb der Proteinstruktur ähnliche *docking scores* und *glide emodel* Werte wie die ursprüngliche Verbindung **46** erzielen. Eine genauere Betrachtung der Wechselwirkungen der vielversprechendsten Posen der Liganden zeigte zudem eine strukturelle Ähnlichkeit innerhalb der SI/II-Bindetasche.

Die Vielzahl der biologischen Daten der verschiedenen Derivate lässt im direkten Vergleich mit potenten Referenzverbindungen aus der Literatur für die SI/II-Bindestelle, wie BI-2852 (**23**), die Hypothese zu, dass Verbindung **46** keine geeignete Ausgangsverbindung für die Suche nach potenziellen KRAS-Inhibitoren war.

4.2 *In Silico* Screening und Synthesearbeiten für die SII-Bindestelle mit MRTX1133 als Referenz

Bislang konzentrierte sich die Forschung zur Inhibierung des RAS/SOS-Komplexes sowohl innerhalb der Arbeitsgruppe als auch im Rahmen dieser Dissertation auf die SI/II-Bindetasche des KRAS^{G12D}-Proteins. Wie bereits erwähnt, sind bekannte Verbindungen für diese Bindetasche durch CH-3 (22) von RABBITS *et al.* oder BI-2852 (23) von FESIK *et al.* publiziert.^{53,54} Diese und andere in der Literatur bekannte Inhibitoren für die SI/II-Bindetasche wurden bereits ausführlich als Ausgangspunkte für die Entwicklung neuer Verbindungen genutzt. Die Veröffentlichung der Verbindung MRTX1133 (34) im Jahr 2021 durch *Mirati Therapeutics* markiert einen Meilenstein, da damit erstmals ein hochaffiner, nicht-kovalent bindender Inhibitor für die SII-Bindetasche des KRAS^{G12D}-Proteins identifiziert wurde.⁶² Interessanterweise konnten HADDOCK-Berechnungen innerhalb der Arbeitsgruppe SCHERKENBECK zeigen, dass auch die Verbindung 47 teilweise die SII-Bindetasche adressiert.¹⁰⁸ Diese Erkenntnis macht die SII-Bindetasche zu einem vielversprechenden Angriffspunkt für das Wirkstoffdesign, insbesondere da durch MRTX1133 (34) zusätzlich eine potente Referenzstruktur zur Verfügung steht. Die zugehörige Kristallstruktur (PDB: 7RPZ) sowie die detaillierte Beschreibung der Wechselwirkung des Liganden mit der Proteinstruktur bieten eine optimale Grundlage für *in silico* Docking-Experimente.⁶²

4.2.1 Erzeugung und Optimierung eines geeigneten *in silico* Screening-Models

Für die Entwicklung von MRTX1133 (34) durch *Mirati Therapeutics*, ausgehend von MRTX849 (30), wurden hauptsächlich biologische Daten und Kristallstrukturen der Zwischenstufen verwendet. Wie bereits erwähnt, wurden auf diese Weise entscheidende Wechselwirkungen zwischen dem Inhibitor und der Proteinoberfläche erzeugt bzw. optimiert. Eine wichtige Voraussetzung für ein valides *in silico* Docking ist zunächst, die exakte Pose des Liganden innerhalb der Docking Software *Glide* zu reproduzieren. Hierzu wurden die Daten der Kristallstruktur (PDB: 7RPZ) in die *Schroedinger*-Software eingefügt. Anschließend wurden mittels *Protein Preparation* unter Verwendung der Arbeitsgruppen-internen Standardeinstellungen (Kapitel 6.3) wichtige Parameter wie Ladungszustände, fehlende Seitenketten, Kraftfelder und Wasserzustände optimiert. Der ursprüngliche Ligand der Kristallstruktur wurde mit Hilfe eines Strukturzeichnungsprogramms nachgebildet und anschließend aus der Proteinstruktur entfernt. Die gezeichnete 2D-Struktur wurde mittels *Ligand Preparation* in eine realistische 3D-Struktur umgewandelt. Dazu wurde analog zur

Protein Preparation ein pH-Bereich für die Protonierung des Liganden festgelegt. Zusätzlich verwendet LigPrep *Epik*, um basierend auf dem pH-Wert und den chemischen Gruppen die wahrscheinlichen Protonierungs- und Ionisierungszustände des Moleküls zu bestimmen. Nach der Herstellung verschiedener Tautomere und Stereoisomere werden die so erzeugten Liganden in einem OPLS4-Kraftfeld optimiert. Dabei wird die Energie der Liganden minimiert und es entstehen konformationell realistische 3D-Strukturen. Anschließend wurde ein *Grid* auf der Proteinoberfläche erzeugt. Ein *Grid* ist ein Raster, das den Raum um die ausgewählte Bindetasche in kleine Bereiche unterteilt. Jeder Bereich stellt einen Raum dar, in dem die Wechselwirkungen zwischen dem Liganden und der Umgebung im Protein berechnet werden. Als Ausgangspunkt für das *Grid* wurde die ursprüngliche Position von MRTX1133 (**34**) in der Kristallstruktur gewählt. Nach Erzeugen des *Grids* und des anschließenden *Dockings* stellte sich schnell heraus, dass die verwendeten Standardeinstellungen nicht zum gewünschten Resultat führten. Der berechnete Ligand befand sich zwar in den wenigen erhaltenen Posen an der SII-Bindetasche, lag jedoch auf der Öffnung der Bindetasche und ragte nicht in diese hinein. Die entscheidenden Protein-Ligand-Wechselwirkungen wurden unter diesen Bedingungen nicht beobachtet. Die Publikation von MARX *et al.* zeigte, dass der Stickstoff des Pyrrolozidin-Systems protoniert ist und somit eine starke ionische Wechselwirkung mit dem negativ geladenen Sauerstoff der Glutaminsäure an Position 62 besteht.⁶²

Unter den verwendeten Standardeinstellungen des *Ligand Preparation Tools* mit einem pH-Wert von $\text{pH} = 7 \pm 1$ war es nicht möglich den so beschriebene Zustand der Verbindung MRTX1133 (**34**) zu erzeugen. Der pH-Wert wurde dementsprechend bei der *Protein Preparation* als auch bei der *Ligand Preparation* auf den Wert $\text{pH} = 7 \pm 2$ gesetzt. Die so erhaltene Struktur entsprach der in der Publikation beschriebenen Konformation (siehe **Abbildung 43**). Das mit der korrekten Konformation durchgeführte *Docking* zeigte die Verbindung MRTX1133 (**34**) mit minimalen Unterschieden zur ursprünglichen Kristallstruktur. Der Prozess der Rezeptor-*Grid*-Generierung wurde um ein Constraint zur Gewährleistung einer besseren Vergleichbarkeit zwischen der berechneten Referenzverbindung und zukünftiger Ligand-Bibliotheken erweitert. In der Publikation von MARX *et al.* wird beschrieben, dass der piperazinartige Baustein von MRTX1133 (**34**) spezifisch mit der Aminosäure Asp12 interagiert. Da die Aminosäure Asp12 zudem die Position der G12D-Mutation im KRASG12D-Protein repräsentiert, wurde es als entscheidend erachtet, dass die zukünftig berechneten Verbindungen ebenfalls eine Wechselwirkung mit dieser Aminosäure eingehen. Der eingeführte Constraint gewährleistet, dass alle berechneten Verbindungen eine Wechselwirkung mit der Carbonylgruppe von Asp12 aufweisen.

Diese Vorgabe dient dazu, die Relevanz der berechneten Liganden hinsichtlich ihrer möglichen biologischen Aktivität sicherzustellen, da eine Interaktion mit Asp12 für die Wirksamkeit gegen das mutierte Protein von essenzieller Bedeutung ist. Zur Validierung des Constraints wurde die Referenzverbindung aus **Abbildung 43** erneut unter Verwendung der angepassten *Grid*-Einstellungen gedockt. Die resultierende Konformation entsprach sowohl der zuvor berechneten Konformation als auch der Kristallstruktur des Liganden, was die räumliche Übereinstimmung bestätigt. Die Docking-Berechnungen resultierten in einem *docking score* von $(ds) = -11.671$, was auf eine signifikante Bindungsaffinität hinweist.

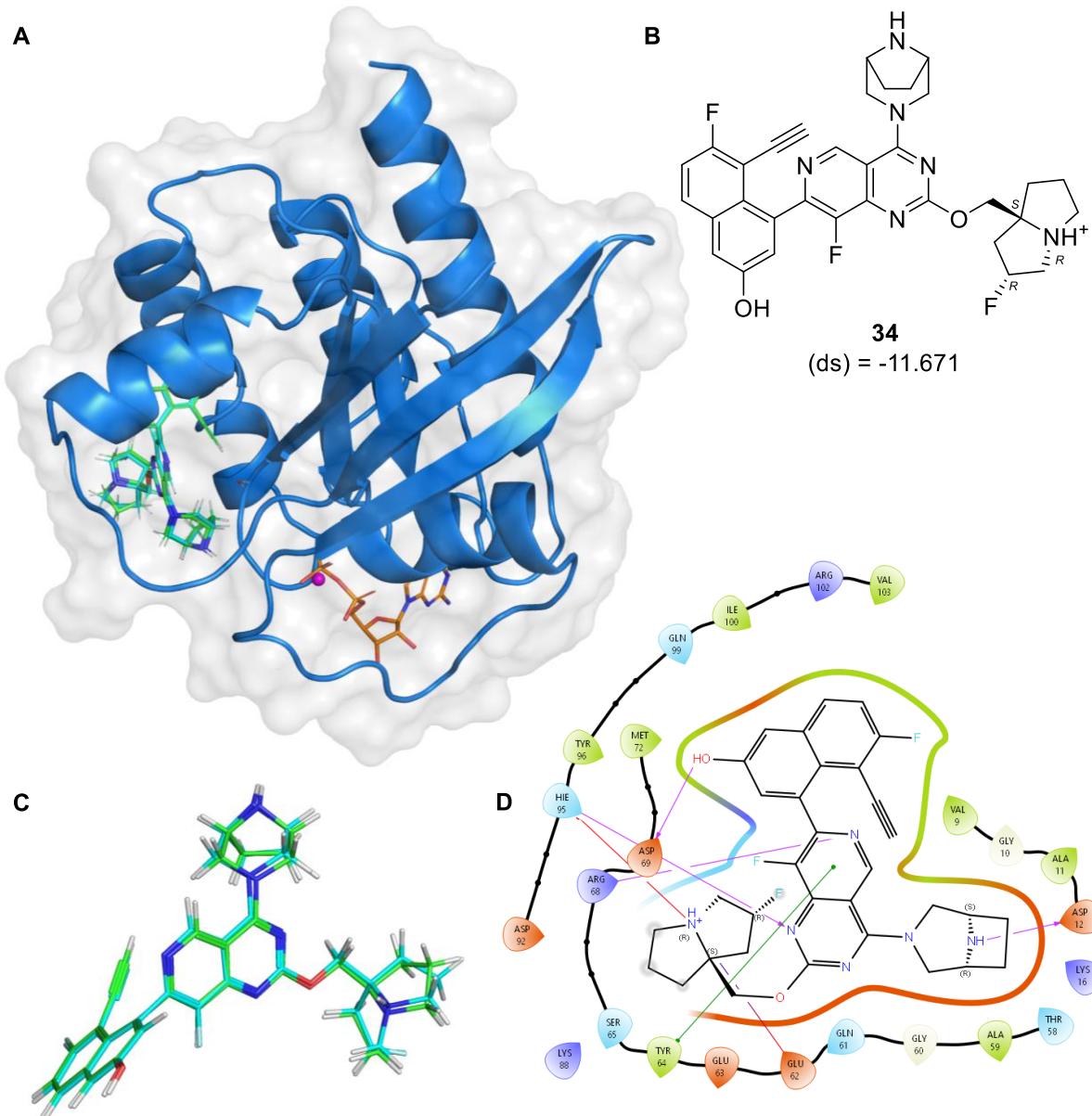


Abbildung 43: A) Darstellung des ursprünglichen Liganden (grün) und berechnetem Liganden (cyan) innerhalb der Kristallstruktur (PDB: 7RPZ). Co-kristallisiert mit GDP (orange). B) MRTX1133 (**34**) in der korrekten *RRSRS*-Konformation mit korrektem Protonierungszustand. C) In *Glide* überlagerte Strukturen von MRTX1133 (**34**, grün, Kristallstruktur) und berechnetem Liganden (cyan). D) Wechselwirkung der berechneten Struktur mit den Aminosäuren von KRAS innerhalb der Kristallstruktur.

4.2.2 High-Throughput unterstütztes Virtual Screening mehrerer Ligand-Bibliotheken

Für das Screening an dem oben beschriebenen *Glide*-Modell wurden zwei unterschiedliche Bibliotheken verwendet. Die erste Screening-Bibliothek wurde von JEUKEN erzeugt und in seinen Arbeiten zur Identifizierung neuer Ras-Liganden für die SI/II-Bindetasche mittels Knime® verwendet.¹²² Sie besteht aus drei Teilkomponenten und wird nachfolgend als JEUKEN-Library (JL) bezeichnet:

- *Enamine Discovery Diversity Set DDS-10* (10560 Verbindungen)
- *Enamine Discovery Diversity Set DDS-50* (50240 Verbindungen)
- *Enamine Hit Locator Library 300* (300115 Verbindungen)

Die Verbindungen der Bibliothek entsprechen hierbei den gängigen Regeln der medizinischen Chemie für Wirkstoffe. Hierunter fallen *Lipinski's rule of five*.^{141, 142}

Die zweite verwendete Screening-Bibliothek basiert auf der neuesten *Enamine Hit Locator Library 460* (HLL 460) mit einer Anzahl von 460160 Verbindungen (Stand von 12.2023) die laut Firmenaussage die gesamte *Enamine Screening Collection*, die mehr als drei Millionen wirkstoffähnliche Verbindungen umfasst, repräsentieren kann.¹⁴³ Ein wichtiges Merkmal dieser Datenbank ist, dass es sich nicht um sogenannte *Singeltons* handelt, sondern jede Substanzklasse von mindestens drei Verbindungen abgedeckt wird. Die 460160 Verbindungen wurden zudem nach Molekulargewicht, dem berechneten Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten (ClogP), der topologischen polaren Fläche (TPSA, der Anzahl an Wasserstoffbrückenakzeptoren (HBA) und -donoren (HBD), der Anzahl an rotierbaren Bindungen, der Anzahl an Atomen, die keine Wasserstoffe darstellen und der Anzahl an sp³-hybridisierten Kohlenstoffen unterteilt. Diese Unterteilung der Verbindungen nach ihren physikochemischen Eigenschaften entspricht Gauß'schen Verteilungskurven (**Abbildung 44**).

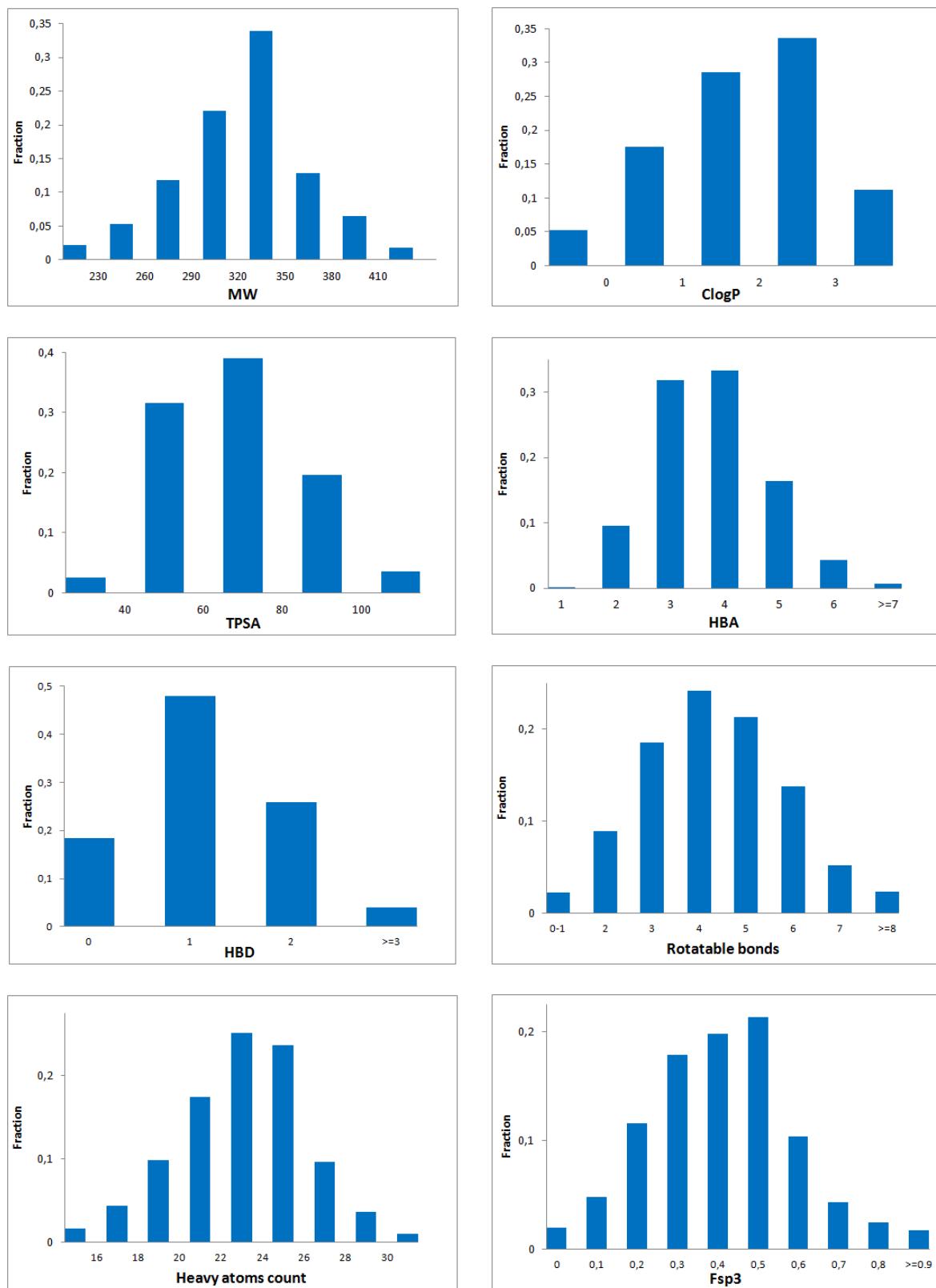


Abbildung 44: Grafische Darstellung der physikochemischen Eigenschaften der Verbindungen aus der *Hit Locator Library* 460 von *Enamine*. Abgebildet ist das Molekulargewicht (MW), der berechnete Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient (ClogP), die topologische polare Fläche (TPSA), die Anzahl an Wasserstoffbrückenakzeptoren (HBA) und -donoren (HBD), die Anzahl an rotierbaren Bindungen, die Anzahl an Atomen, die nicht Wasserstoffe sind und der Anteil an sp^3 -hybridisierten Kohlenstoffen. Die Abbildungen wurden von der Website der *Hit Locator Library* übernommen.¹⁴³

Unter Beibehaltung der gleichen Einstellungen, die bei der Referenzverbindung zur Anwendung kamen, wurden die beiden Datensätze (JL und HLL460) separat mit der Funktion "Ligand Preparation" vorbereitet. Die vorbereiteten Datensätze wurden anschließend mittels Ligand Docking berechnet. Aufgrund der hohen Anzahl an Verbindungen wurde für den ersten Durchgang der sogenannte HTVS-Modus (*High Throughput Virtual Screening*) gewählt. Im HTVS-Modus werden die gleichen Bewertungsfunktionen wie im SP-Modus (*Standard Precision*) angewendet, jedoch wird die Anzahl der Zwischenkonformationen drastisch reduziert. Dies ermöglicht die Berechnung umfangreicherer Bibliotheken in kürzerer Zeit. Für die anschließende Berechnung im SP-Modus wurden die besten 1000 Posen aus dem HTVS-Modus verwendet. Die besten 1000 Posen dieser Berechnung wurden dann im XP-Modus (*Extreme Precision*) verwendet. In der so generierten Bibliothek wurde nun die beste Pose jeder Verbindung gesucht und herausgefiltert. Duplikate einer Verbindung mit schlechterem *docking score* wurden aus der Bibliothek entfernt.

In **Abbildung 45** sind die besten 500 Posen aus der *Hit Locator Library 460* aufgelistet. Die Referenzverbindung, MRTX1133 (**34**) in seiner korrekten Konformation wurde in den Bibliotheken als Kontrolle aufgenommen und ebenfalls berechnet. Die Referenzverbindung MRTX1133 (**34**) trägt den *source file index* = 1 und erzielte für beide Bibliotheken weiterhin den besten *docking score*.

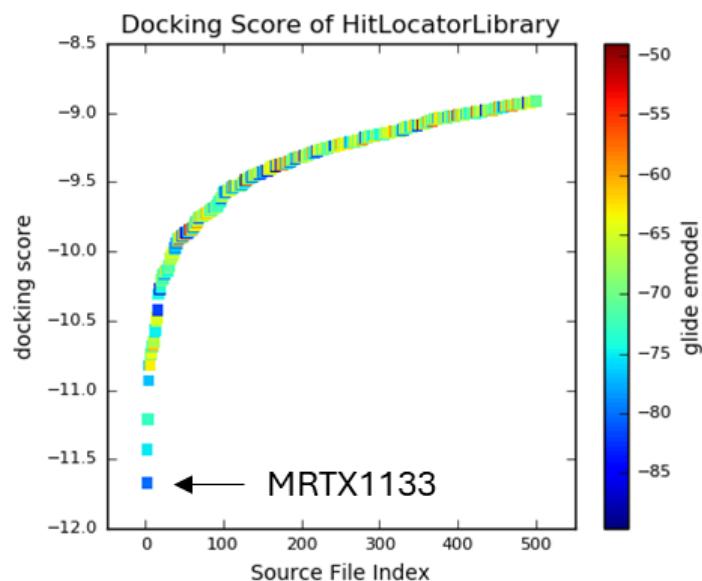


Abbildung 45: *Docking score* und *glide emodel* Wert der besten 500 Verbindungen aus der *Hit Locator Library 460*. Verbindung mit dem *source file index* 1 ist MRTX1133 (**34**) mit einem $ds = -11.671$.

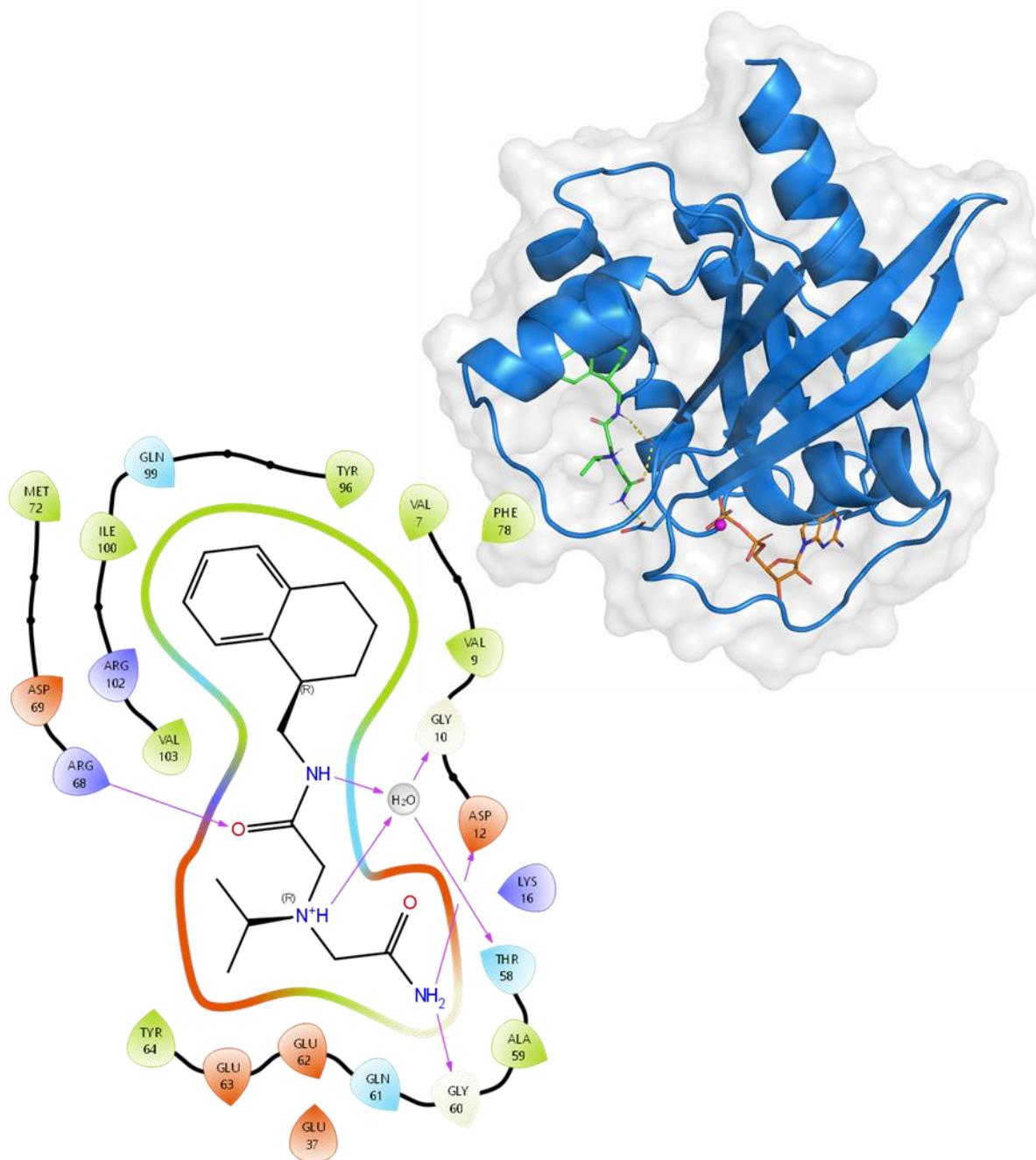


Abbildung 46: Darstellung der berechneten Verbindung **125** (grün) in der verwendeten Proteinstruktur. Die Verbindung erzielte den zweitbesten *docking score* nach MRTX1133 (34). Die gewünschte Interaktion zu Asp12 wurde in den Berechnungen berücksichtigt. Wichtige Wechselwirkungen sind in einem Ligand-Interaktions-Diagramm dargestellt.

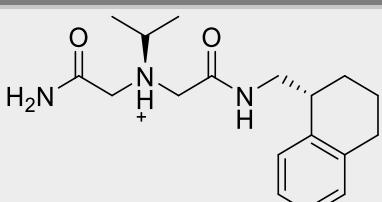
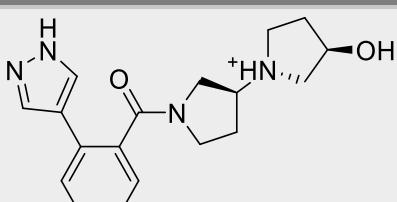
Die in **Abbildung 46** dargestellte Proteinstruktur zeigt die Interaktion der Verbindung mit dem besten *docking score* nach MRTX1133 (34). Die in den Berechnungen vorgegebene Interaktion mit Asp12 wurde berücksichtigt und die gemessene Distanz zwischen Ligand und Aminosäure beträgt 1.7 Å. Des Weiteren konnten Interaktionen mit dem in der Bindetasche vorliegenden Wassermolekül beobachtet werden. Diese Interaktion konnte im Ligand-Interaktionsdiagramm von MRTX1133 (34) trotz der offensichtlichen Nähe innerhalb der Kristallstruktur nicht dargestellt werden. Eine Erklärung für den geringeren *docking score* der Verbindung könnte in

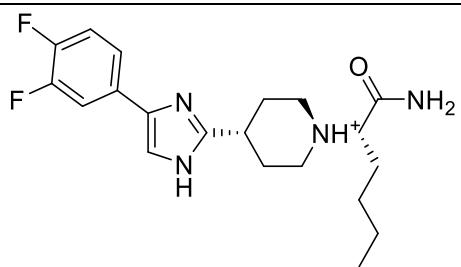
der fehlenden Wechselwirkung zwischen den π -Elektronensystem des aromatischen Systems und Tyr64 sein. Das ausgeprägte aromatische System des Grundgerüsts von MRTX1133 (**34**) zeigte hier eine deutliche Wechselwirkung. Die *docking scores* der restlichen Verbindungen nahmen rapide ab, wobei sich der größte Anteil der Verbindungen bei einem *docking score* von -9.0 bis -10.0 einpendelte (**Abbildung 45**). Zudem wiesen alle Verbindungen eine vollständige Lage innerhalb der SII-Bindetasche auf, wobei die entscheidende Interaktion mit Asp12 festgestellt wurde.

Mithilfe der von JORGENSEN *et al.* entwickelten *QikProp*-Funktion der *Schroedinger*-Software wurden nach Durchsicht der unterschiedlichen Strukturen verschiedene ADME-Werte (*absorption, distribution, metabolism, excretion*) für die erhaltenen Verbindungen simuliert.¹⁴⁴ Neben der Vorhersage der ADME-Werte vergleicht diese Funktion die erhaltenen Werte mit denen von 95% bekannter Wirkstoffe. Darüber hinaus erkennt das Programm 30 reaktive funktionelle Gruppen, die in Hochdurchsatz-Screenings zu falsch positiven Ergebnissen führen können. Um eine Aussage über den Wirkstoffcharakter der erhaltenen Verbindungen treffen zu können, wurde die Anzahl der Eigenschaften gezählt, die außerhalb der 95%-Grenze liegen. Die *QikProp*-Funktion bezeichnet ein solche Grenzüberschreitung der Werte als *stars*.

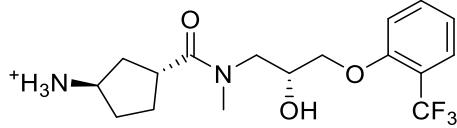
Darüber hinaus wurde überprüft, ob die prognostizierten Werte und die physikochemischen Eigenschaften der Verbindungen gegen die *Lipinski's rule of five* verstößen. In **Tabelle 6** sind die zehn besten Verbindungen der *Hit Locator Library 460* und der *JEUKEN-Library* aufgeführt. Die Einstufung erfolgte nach dem *docking score* der Verbindungen.

Tabelle 6: Auflistung der zehn besten Posen nach *docking score* aus den jeweiligen Screening-Bibliotheken.

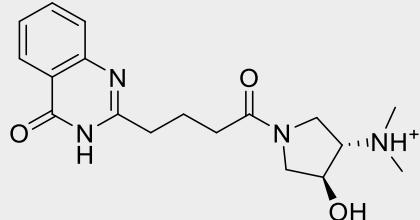
<i>Hit Locator Library 460</i>	<i>JEUKEN Library</i>
 <p><i>ds:</i> -11.433 <i>glide emodel:</i> -75.375 <i>stars:</i> 0 <i>Rule of five:</i> 0</p>	 <p><i>ds:</i> -11.304 <i>glide emodel:</i> -73.229 <i>stars:</i> 0 <i>Rule of five:</i> 0</p>



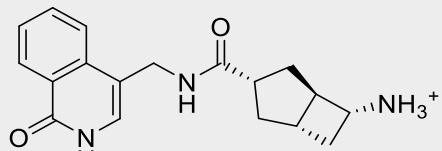
ds: -11.213
glide emodel: -72.765
stars: 1
Rule of five: 0



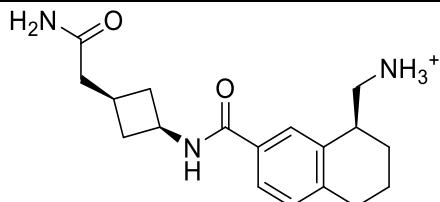
ds: -10.499
glide emodel: -66.244
stars: 0
Rule of five: 0



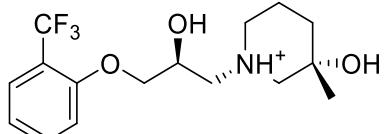
ds: -10.934
glide emodel: -77.005
stars: 0
Rule of five: 0



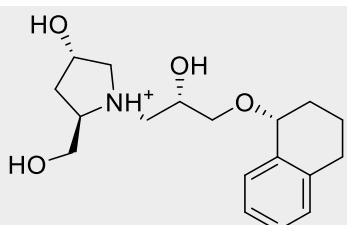
ds: -10.443
glide emodel: -73.940
stars: 0
Rule of five: 0



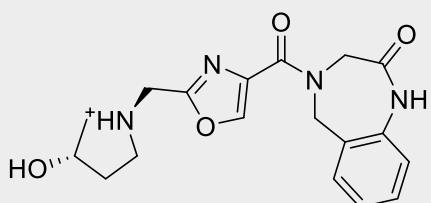
ds: -10.816
glide emodel: -63.104
stars: 0
Rule of five: 0



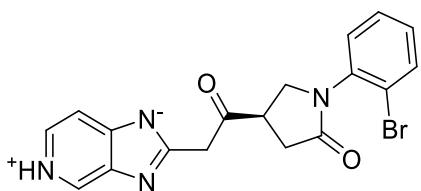
ds: -10.441
glide emodel: -69.959
stars: 0
Rule of five: 0



ds: -10.740
glide emodel: -69.398
stars: 1
Rule of five: 0



ds: -10.203
glide emodel: -82.949
stars: 0
Rule of five: 0

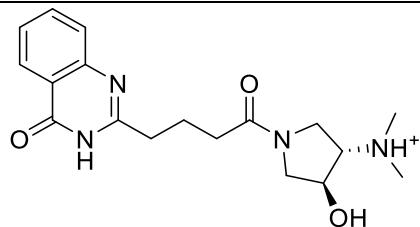


ds: -10.738

glide emodel: -63.953

stars: 0

Rule of five: 0

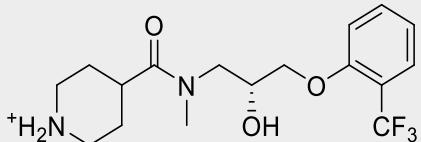


ds: -10.200

glide emodel: -82.074

stars: 0

Rule of five: 0

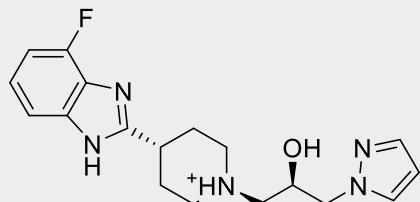


ds: -10.686

glide emodel: -72.084

stars: 0

Rule of five: 0

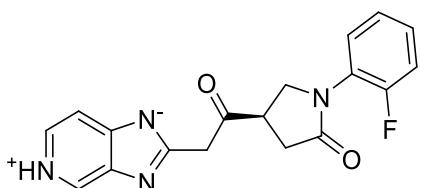


ds: -9.966

glide emodel: -75.819

stars: 0

Rule of five: 0

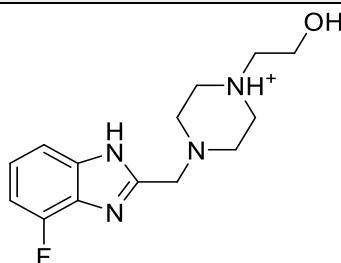


ds: -10.681

glide emodel: -61.549

stars: 0

Rule of five: 0

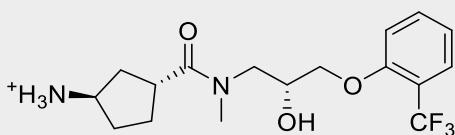


ds: -9.950

glide emodel: -65.269

stars: 0

Rule of five: 0

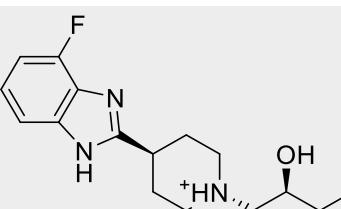


ds: -10.499

glide emodel: -66.244

stars: 0

Rule of five: 0

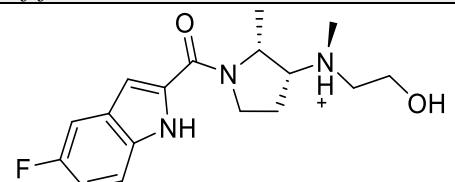


ds: -9.852

glide emodel: -65.460

stars: 0

Rule of five: 0

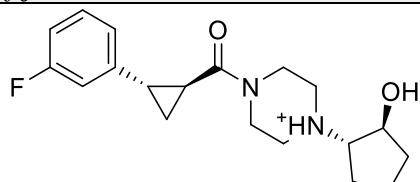


ds: -10.499

glide emodel: -66.244

stars: 0

Rule of five: 0



ds: -9.801

glide emodel: -64.704

stars: 0

Rule of five: 0

Die prognostizierten ADME-Werte der Verbindungen sind, bis auf eine Ausnahme mit einer Verletzung des Wertebereichs, alle innerhalb der vorgegebenen Toleranzgrenzen. Zudem verstößt keine der Verbindungen gegen die *Lipinski's rule of five*. Es sei anzumerken, dass die Referenzverbindung MRTX1133 (**34**) hier gegen mehrere Parameter verstößt. Innerhalb der Auflistung lassen sich zudem einige Übereinstimmungen zwischen den beiden Datensätzen feststellen. Der Datensatz der *Hit Locator Library 460* wurde am 21.02.2022 veröffentlicht. Die von JEUKEN verwendete *Hit Locator Library 300* entspricht einer älteren Version mit weniger Verbindungen. Da die *Hit Locator Library 460* auf dieser Version aufbaut, sind einige Verbindungen zwischen den Datensätzen identisch. Für die durchgeführten Berechnung der *docking scores* ist es jedoch ein positives Zeichen, dass die gleichen Werte für unterschiedliche Datensätze für die entsprechenden Verbindungen erhalten wurden. Auf diese Weise können systematische Fehler bei der Durchführung ausgeschlossen werden.

Bei den berechneten Substanzen handelt es sich um kommerziell verfügbare Verbindungen, die über *Enamine* erhältlich sind. Die in **Abbildung 47** dargestellten Verbindungen wurden bestellt, wobei Verbindung **135** zum Zeitpunkt nicht erhältlich war.

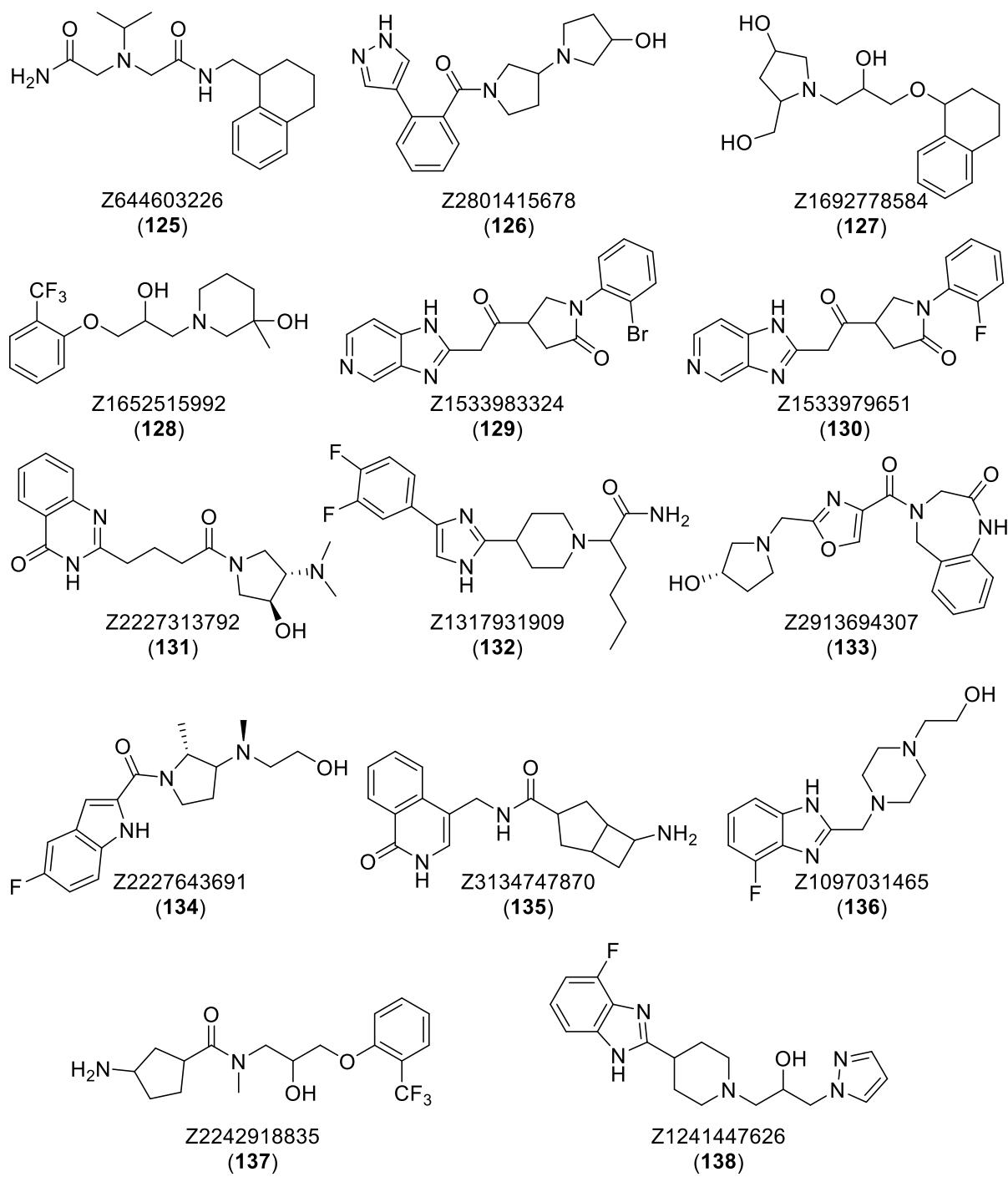


Abbildung 47: Berechnete Verbindungen mit Enamine-Katalognummer. Die Substanzen wurden für biologische Untersuchungen erworben.

4.2.3 Ähnlichkeitsanalyse der Top-Hits mittels *InfiniSee*[®]

Mit dem Ziel, eine breitere Palette von Verbindungen zu erhalten, die zwar nicht direkt aus den oben verwendeten Datensätzen stammen, jedoch ähnliche pharmakophore Eigenschaften aufweisen, wurde eine Ähnlichkeitsanalyse für die in **Abbildung 47** dargestellten Verbindungen durchgeführt. Hierfür wurde das Programm *infiniSee*[®] der Firma BioSolveIT GmbH verwendet.¹⁴⁵ Dieses Programm vergleicht die pharmakophoren Eigenschaften des eingegebenen Referenzmoleküls mit Substanzen, die durch virtuelle Synthesen aus Fragmenten diverser Datenbanken, den sogenannten „*spaces*“, zusammengesetzt werden. Eine dieser Datenbanken ist die *Real Space* von *Enamine*, die etwa 3.2×10^{10} virtuelle Moleküle enthält. Diese virtuellen Moleküle werden durch die Anwendung der *Enamine*-Syntheseprotokolle generiert, die 165 Reaktionsschritte, 100526 verschiedene Reagenzien und 182381 Bausteine umfasst. Die zweite Datenbank, die für die Ähnlichkeitssuche verwendet wurde, ist die sogenannte *Knowledge Space*. Hierbei handelt es sich um 2.9×10^{14} virtuelle Verbindungen, die durch über hundert literaturbekannte Synthesen erzeugt werden.

Wie in **Abbildung 48** dargestellt, besteht im Rahmen des *InfiniSee*[®]-Programms die Möglichkeit, über eine Schaltfläche die entsprechende Referenzverbindung ins System zu integrieren. In der Folge besteht die Möglichkeit, über Regler die zu verwendende Datenbank (*Real Space* oder *Knowledge Space*) sowie die entsprechenden Suchparameter einzustellen. Im Rahmen der Erzeugung der verschiedenen virtuellen Strukturen wurde eine gezielte Ähnlichkeit zur jeweiligen Referenzverbindung von 99 % angestrebt. Da die Berechnungen hauptsächlich auf einem externen Server stattfinden, kommt die Software mit geringen Hardware-Ressourcen aus, sodass sie deutlich schneller abgeschlossen werden kann als die *Glide*-Rechnungen der *Schroedinger*-Software. In der Folge wurde für jede der zuvor selektierten 14 Kaufsubstanzen eine Bibliothek von 100 ähnlichen Verbindungen generiert. Nach Abschluss der Suche wird in der Benutzeroberfläche des Programms eine tabellarische Auflistung der Verbindungen angezeigt. An dieser Stelle besteht die Möglichkeit, einzelne Strukturelemente der Verbindungen einer detaillierten Analyse zu unterziehen und mit der Referenzverbindung zu vergleichen. Die erhaltenen Strukturen wurden, kategorisiert nach Kaufsubstanz, als SMILES (*Simplified Molecular Input Line Entry Specification*) in das *Schroedinger*-Softwarepaket integriert. Da es sich bei SMILES um 2D-Strukturinformationen ohne Informationen über Stereozentren handelt, wurde bei der Generierung der Liganden mittels *LigPrep* die Einstellung zur Erzeugung aller Tautomere verwendet.

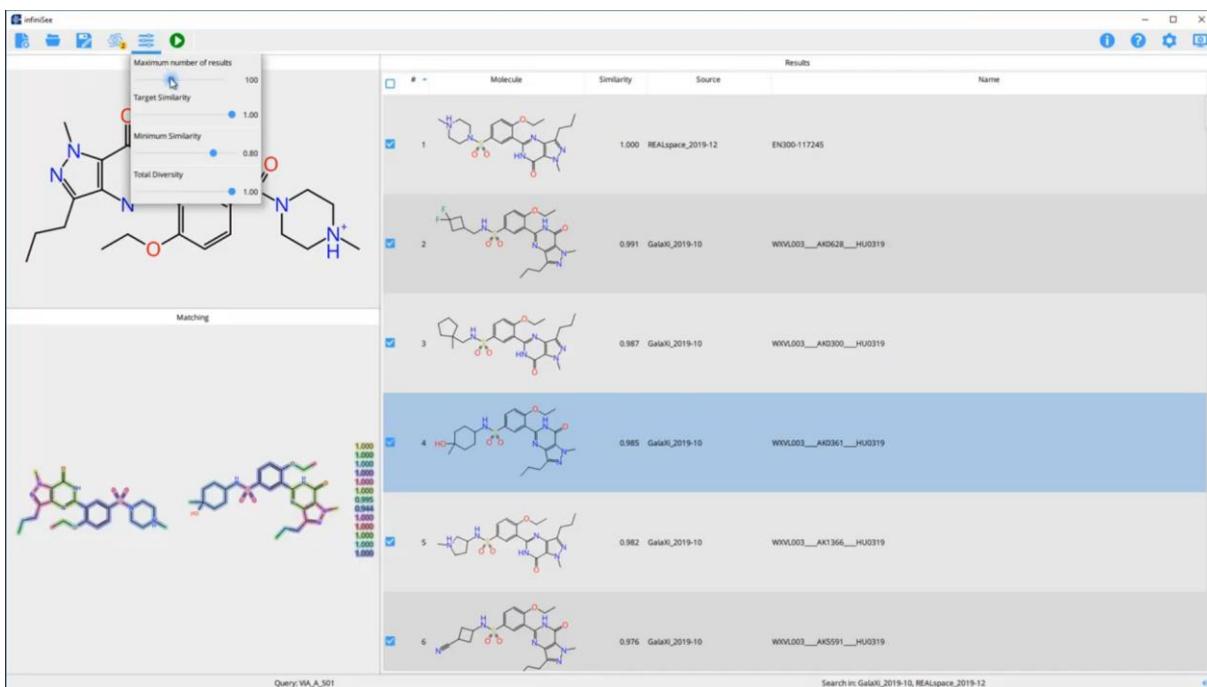
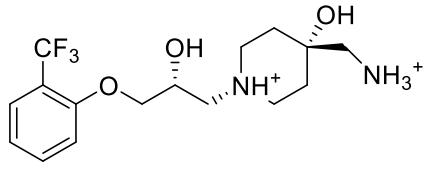
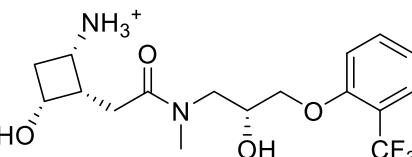
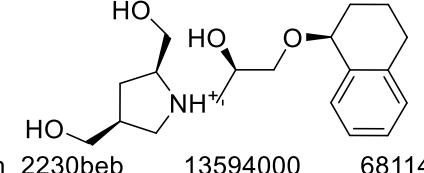
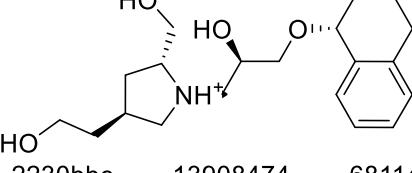
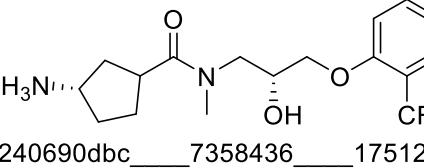
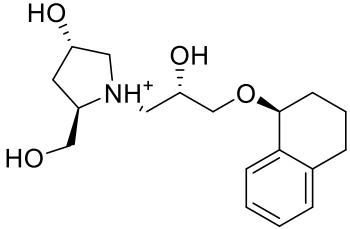
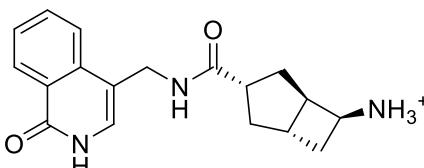
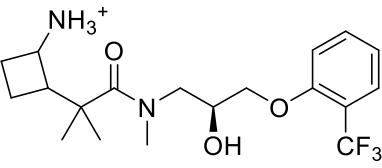


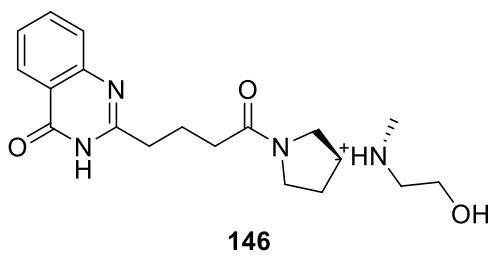
Abbildung 48: Aufnahme der Bedienoberfläche der InfiniSee®-Software.¹⁴⁵

Die maximale Anzahl an erzeugten Tautomeren wurde für jede Verbindung auf maximal 32 Liganden beschränkt. Im Anschluss wurden die so erhaltenen Strukturen unter Verwendung des im Vorfeld verwendeten Docking-Modells im SP-Modus berechnet. Nach der Entfernung von Duplikaten mit geringeren *docking scores* wurden die so erhaltenen Posen ebenfalls im XP-Modus berechnet. Die *docking scores* einiger Verbindungen konnten nun sogar die Referenzverbindung MRTX1133 (**34**) übertreffen. Zur Verifizierung der Berechnungen wurde die Verbindung **34** zusätzlich in allen Läufen integriert. Der *docking score* von (*ds*) = -11.671 war in allen Fällen reproduzierbar.

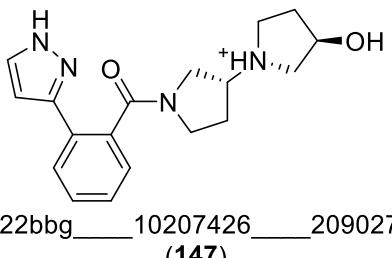
Bei der Auflistung der zwanzig besten Verbindungen wurde beobachtet, dass die meisten dieser Strukturen aus der Ähnlichkeitsanalyse von Z1692778584 (**127**) und Z1652515992 (**128**) stammen. Um andere Substanzklassen stärker einzubeziehen, wurden händisch schlechtere Verbindungen dieser beiden Cluster aussortiert. Dadurch wurde der durchschnittliche *docking score* über alle Verbindungen zwar künstlich verschlechtert, aber gleichzeitig wurde eine höhere Diversität in der Struktur der Substanzen erreicht. Die so veränderte Bestenliste der Liganden aus der Ähnlichkeitsanalyse der 14 Kaufsubstanzen ist in **Tabelle 7** dargestellt.

Tabelle 7: Auflistung der besten zwanzig Verbindungen aus der Ähnlichkeitsanalyse unter Ausschluss zu großer Cluster von Verbindung Z1692778584 (127) und Z1652515992 (128).

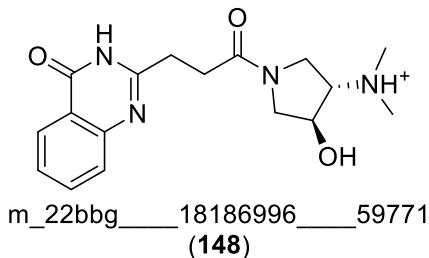
 <p>m_269982bbc 11247148 13193480 (139)</p>	 <p>m_240690dbc 7358436 17512952 (140)</p>
<p><i>ds:</i> -14.188 <i>glide emodel:</i> -82.006 <i>stars:</i> 0 <i>Rule offive:</i> 0</p>	<p><i>ds:</i> -13.404 <i>glide emodel:</i> -72.498 <i>stars:</i> 0 <i>Rule offive:</i> 0</p>
 <p>m_2230beb 13594000 681144 (141)</p>	 <p>m_2230bbc 13908474 681144 (142)</p>
<p><i>ds:</i> -13.233 <i>glide emodel:</i> -76.273 <i>stars:</i> 0 <i>Rule offive:</i> 0</p>	<p><i>ds:</i> -12.499 <i>glide emodel:</i> -66.244 <i>stars:</i> 0 <i>Rule offive:</i> 0</p>
 <p>m_240690dbc 7358436 17512720 (143)</p>	 <p>m_2230bbc 8976674 681144 (144)</p>
<p><i>ds:</i> -12.383 <i>glide emodel:</i> -70.296 <i>stars:</i> 0 <i>Rule offive:</i> 0</p>	<p><i>ds:</i> -12.069 <i>glide emodel:</i> -76.597 <i>stars:</i> 0 <i>Rule offive:</i> 0</p>
 <p>Z3134747870 (135)</p>	 <p>m_240690dbc 7358436 19728538 (145)</p>
<p><i>ds:</i> -11.928 <i>glide emodel:</i> -81.345 <i>stars:</i> 0 <i>Rule offive:</i> 0</p>	<p><i>ds:</i> -11.89 <i>glide emodel:</i> -72.545 <i>stars:</i> 0 <i>Rule offive:</i> 0</p>



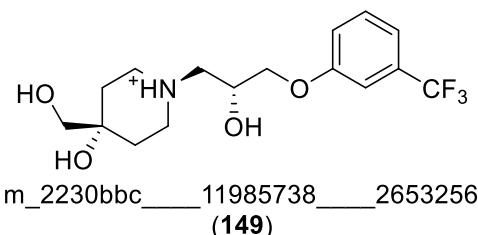
ds: -11.618
glide emodel: -87.841
stars: 1
Rule of five: 0



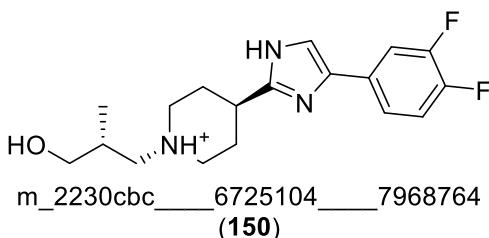
ds: -11.614
glide emodel: -79.912
stars: 0
Rule of five: 0



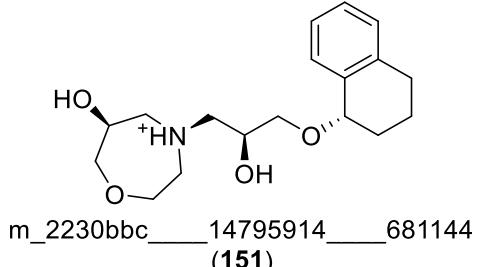
ds: -11.539
glide emodel: -76.967
stars: 0
Rule of five: 0



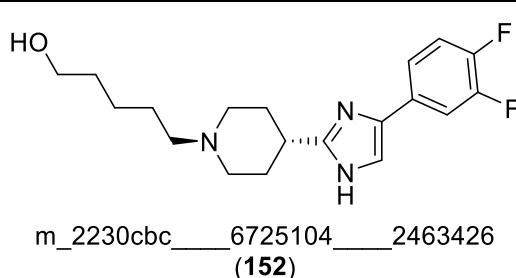
ds: -11.458
glide emodel: -65.883
stars: 0
Rule of five: 0



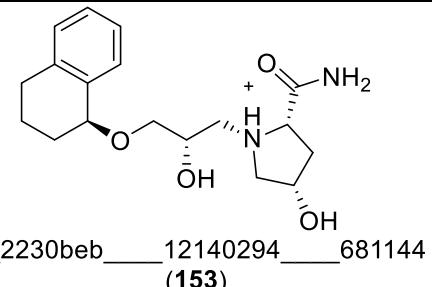
ds: -11.432
glide emodel: -68.803
stars: 0
Rule of five: 0



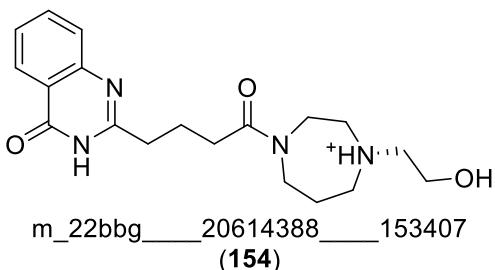
ds: -11.397
glide emodel: -66.872
stars: 0
Rule of five: 0



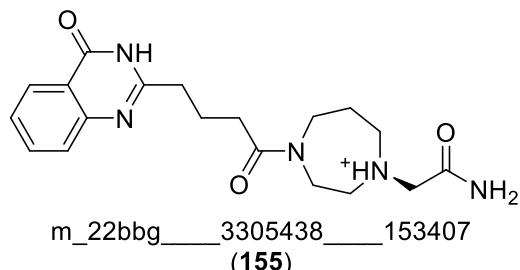
ds: -11.395
glide emodel: -67.635
stars: 0
Rule of five: 0



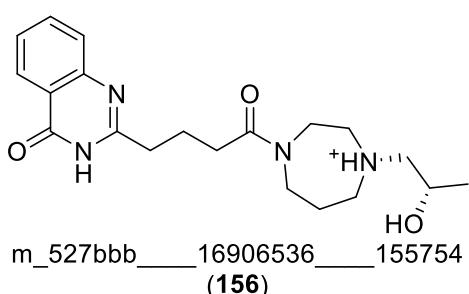
ds: -11.39
glide emodel: -79.782
stars: 0
Rule of five: 0



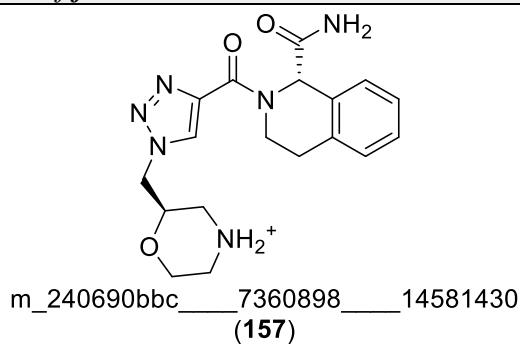
ds: -11.368
glide emodel: -84.912
stars: 0
Rule of five: 0



ds: -11.35
glide emodel: -85.928
stars: 0
Rule of five: 0



ds: -11.308
glide emodel: -84.352
stars: 0
Rule of five: 0



ds: -11.299
glide emodel: -76.528
stars: 0
Rule of five: 0

Die Verbindungen aus der *Real Space*-Datenbank verfügen über einen Substanzcode. Dieser Code dient sowohl als Kennzeichnung ihres Ursprungs als auch als Hinweis auf die von *Enamine* verwendeten Bausteine und Syntheseprotokolle. Verbindung **146** besitzt keinen solchen Substanzcode und kommt demzufolge aus der *Knowledge Space*. Zudem konnte sich mit Z3134747870 (**135**) eine Kaufsubstanz unter die besten zwanzig Verbindungen platzieren. Eine Ähnlichkeitsanalyse unter den verwendeten Einstellungen und Datenbanken lieferte für diese Substanzklasse keine Verbesserung des *docking scores*. Die prognostizierten ADME-Werte der Verbindungen verstößen darüber hinaus nicht gegen die von *QikProp* festgelegten Grenzen für *stars* und auch nicht gegen die *Lipinski's rule of five*. Es ist jedoch wichtig anzumerken, dass die berechneten Substanzen durch die gewählten Einstellungen häufig an primären, sekundären und auch tertiären Stickstoffen protoniert waren. Dies führte zu verschiedenen Posen, die wiederum für die SII-Bindetasche und den verwendeten *Constraint* bevorzugt sein könnten. Ob sich ein solcher Zustand auch innerhalb der durchgeführten Assays bildet, ist nicht zu garantieren. Das Beispiel MRTX1133 (**34**) zeigt jedoch, dass ein solcher Protonierungszustand unter realen Bedingungen möglich ist.

4.2.4 Synthese mehrerer berechneter Scaffolds

Aufgrund der langen Lieferzeit der 13 bestellten Kaufsubstanzen (vgl. **Abbildung 47**) wurde mit der Synthese verschiedener Derivate begonnen. Aufgrund der Tatsache, dass die Substanzen Z1533983324 (**129**) und Z1533979651 (**130**) ein identisches Gerüst vorweisen und in der ursprünglichen Untersuchung der *HLL460* zu den besten Verbindungen gehörten, wurden weitere Derivate dieses Typs zur Synthese ausgewählt. Darüber hinaus wurden die Verbindungen **155** und **157** aufgrund der schnell durchführbaren Syntheserouten als Vertreter der Ähnlichkeitsanalyse ausgewählt.

4.2.4.1 Synthese verschiedener Liganden auf Basis von Z1533983324 und Z1533979651

Die beiden Verbindungen Z1533983324 (**129**) und Z1533979651 (**130**) gehören zum gleichen Cluster an und konnten *docking scores* von -10.738 bzw. -10.681 vorweisen. Für die Synthese verschiedener Derivate wurden vorhandene substituierte Aniline verwendet (**157 – 160**). Als Grundlage der Synthese für den Erhalt des Zwischenprodukts (**Abbildung 49**) wurde ein chinesisches Patent aus dem Jahr 2014 genutzt.¹⁴⁶ In diesem Patent wurde beschrieben, wie Itaconsäure (**158**) mit einem substituierten Anilin unter Abwesenheit von Lösungsmitteln bis zum Schmelzpunkt der Itaconsäure (**158**) reagiert.

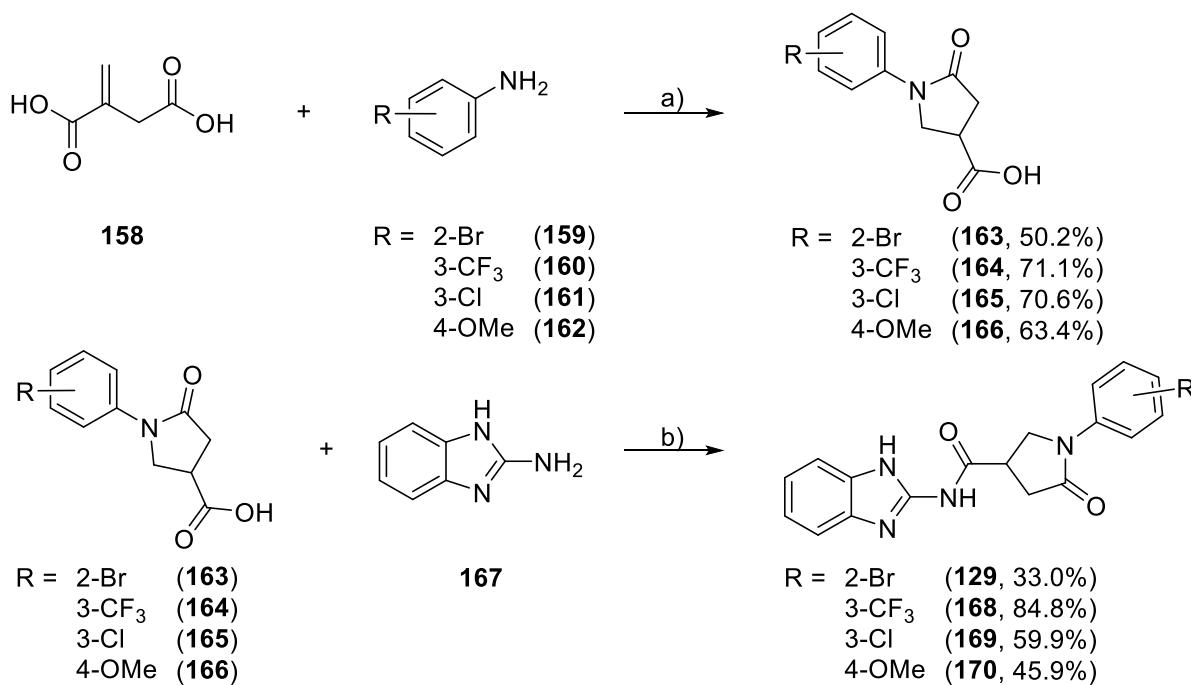


Abbildung 49: Syntheseroute von Z1533983324 (**129**) und drei weiteren Derivaten. a) 175 °C, 30 min; b) **167**, DIPEA, HATU, 0 °C, 1 h, rt, 12 h.

Die Ausbeuten der entsprechenden Zwischenprodukte (**163** – **166**) sind in **Abbildung 49** dargestellt. Im zweiten Syntheseschritt erfolgte eine HATU-Kupplung zwischen den Carbonsäurefunktion der Zwischenstufen (**163** – **166**) und 2-Aminobenzimidazol (**167**).

4.2.4.2 Synthese verschiedener Liganden auf Basis von Z2227313792

Das gewünschte Derivat (**155**) der Kaufsubstanz Z2227313792 (**131**) wurde über eine vierstufige Synthese hergestellt. Der erhaltene Substanzcode aus der *Real Space* Datenbank lieferte erste Hinweise für die mögliche Herstellung des Produkts. Wie bereits erwähnt, enthält der erste Teil des Substanzcodes Informationen über das verwendeten Syntheseprotokoll, während die folgenden Teile Informationen zu den verwendeten Bausteinen liefern. Der Syntheseplan für das Derivat (**155**) ist in **Abbildung 50** dargestellt. Im Rahmen des ersten Reaktionsschritts erfolgte unter Mikrowellenunterstützung die Kondensation von 2-Aminobenzamid (**171**) und Glutarsäureanhydrid (**172**). Es entstand Verbindung **173**, die, nach anschließender pH-Einstellung auf $\text{pH} \leq 4$ mittels 6 M HCl-Lösung, als weißer Feststoff aus der Reaktionslösung präzipitierte. Das 4-Quinazolinon-System **173** wurde mit einer Ausbeute von 75.7% ohne weitere Aufarbeitung isoliert.

Vorab wurde in einer Testreaktion festgestellt, dass sich der spätere Baustein *tert*-Butyl-1,4-diazepan-1-carboxylat (**174**) erfolgreich durch Alkylierung mit 2-Chloracetamid herstellen lässt. Mit dieser Erkenntnis wurde durch eine HATU-Kupplung folglich das Amid (**175**) aus Verbindung **173** und **174** mit einer Ausbeute von 67.7% hergestellt.

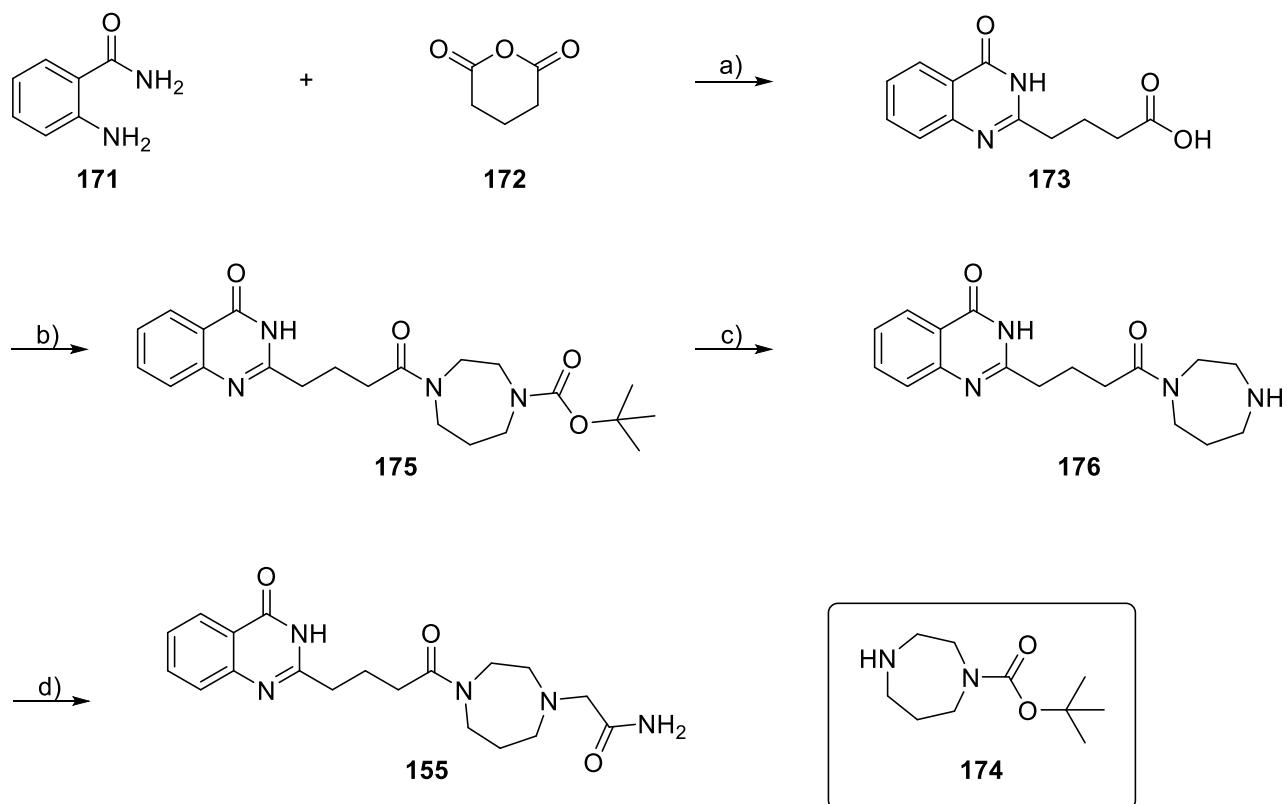


Abbildung 50: Syntheseroute zur Darstellung von Derivat 155. a) 172, Toluol, 150 °C, 30 min, 150 W, NaOH (2 M), 30 min, 100 °C, 150 W; b) 174, DIPEA, HATU, DMF, 0 °C, 1 h, rt, 12 h; c) MeOH, HCl (0.5 M in MeOH); d) 2-Chloracetamid, K₂CO₃, MeCN, 6 h, reflux.

Nach Boc-Entschützung zu Verbindung 176, die eine Ausbeute von 75.9% erreichte, und Alkylierung des 1,4-Diazepan-Systems mit 2-Chloracetamid, wurde das beabsichtigte Derivat 155 mit einer Ausbeute von 75.0% synthetisiert. Die Gesamtausbeute des Synthesewegs belief sich auf 27.8%.

Um potenzielle Struktur-Wirkungsbeziehungen des Liganden genauer zu untersuchen, wurden zusätzliche Derivate dieses Typs synthetisiert. Als Grundlage für diese Synthesen diente das bereits hergestellte Zwischenprodukt 173. Insgesamt wurden drei weitere Derivate synthetisiert (**Abbildung 51**). Bei Verbindung 177 wurde der 1,4-Diazepan-Ring durch einen 1,4-Piperazin-Ring ersetzt. Die Verbindungen 178 und 179 wurden durch den Austausch des Acetamid-Rests mit einem 2-Pyrimidyl- bzw. einem 2-Pyridyl-Rest modifiziert. Dieser Ansatz zielte darauf ab, einerseits den sterischen Einfluss des 7-Rings zu untersuchen und andererseits die Bedeutung der Acetamid-Funktion im Vergleich zu anderen basischen Systemen zu ermitteln.

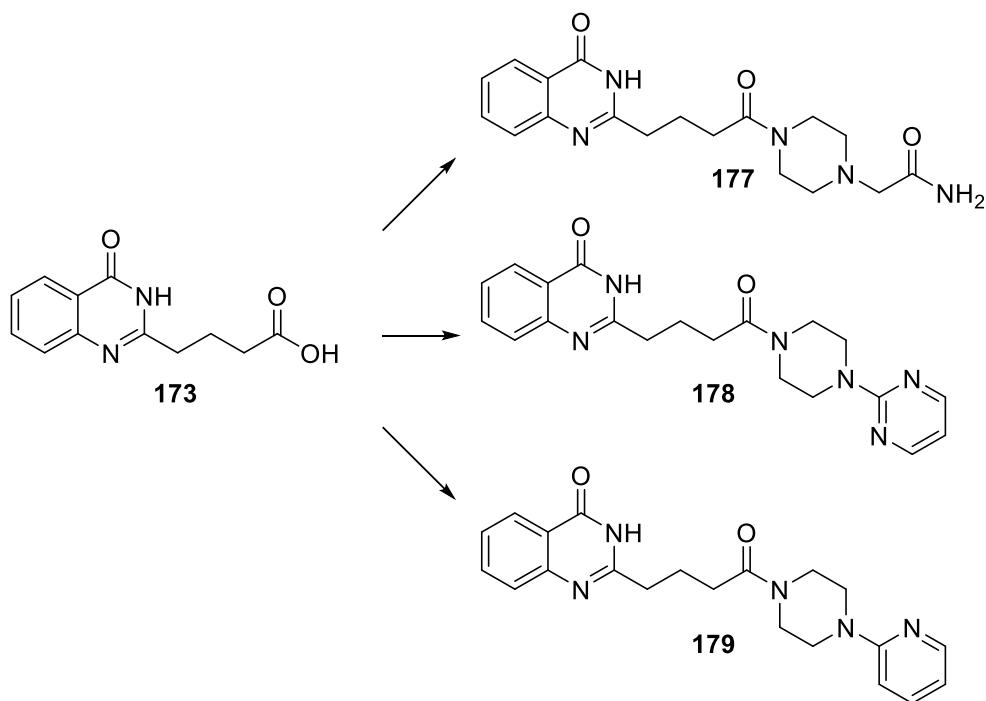


Abbildung 51: Weitere synthetisierte Derivate auf Basis von Verbindung **155**.

4.2.4.3 Synthese eines Liganden auf Basis von Z2913694307

Die Auswahl von Verbindung **157** erfolgte aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu BI-2852 (**23**) und wurde mittels der in **Abbildung 52** dargestellten Syntheseroute hergestellt. Zunächst wurde (*R*)-2-Hydroxymethyl-morphin-4-carbonsäure-*tert*-butylester (**180**) in das entsprechende Azid (**181**) umgewandelt. Diese Umsetzung erfolgte reibungslos und erreichte eine Ausbeute von 95.6%. In vorläufigen Testreaktionen wurde nach der Aufarbeitung des Reaktionsansatzes auch der Methansulfonsäureester isoliert. Die Anpassung der Eduktmengen, insbesondere von Natriumazid, ermöglichen einen vollständigen Umsatz.

Im Anschluss erfolgte die Umsetzung des Azids (**181**) in einer Kupfer(I)-katalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) in der das entsprechende Triazol **183** erhalten wurde. Im Gegensatz zur thermischen 1,3-dipolaren Addition nach HUISGEN, die sowohl, analog zur Diels-Alder-Reaktion, das 1,4- als auch das 1,5-Isomer erzeugte, führte die CuACC ausschließlich zum 1,4-Isomer.¹⁴⁷⁻¹⁴⁹ Das in der Reaktion verwendete Natriumascorbat diente als Reduktionsmittel und generierte aus der inaktiven Kupfer(II)-Spezies des CuSO₄ die für die Reaktion erforderliche aktive Kupfer(I)-Spezies. Der entsprechend postulierte Reaktionsmechanismus, der die Selektivität der Reaktion beschreibt, ist in **Abbildung 53** dargestellt.¹⁴⁸⁻¹⁵⁰

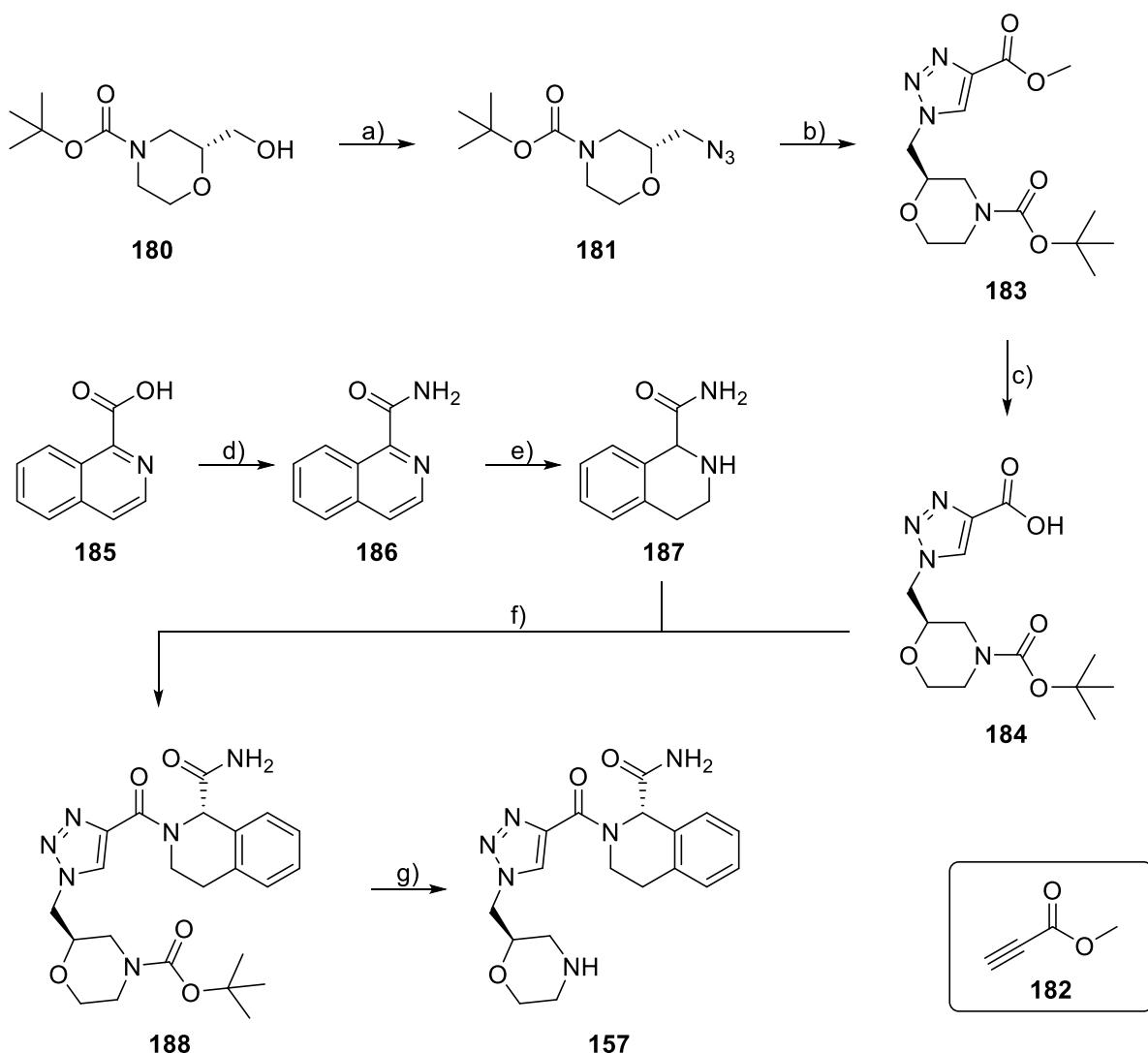


Abbildung 52: Syntheseroute zur Darstellung von Derivat 157. a) Et₃N, MsCl, DCM, 0 °C, 30 min, NaN₃, DMF, 80 °C, 16 h; b) 182, Natriumascorbat, CuSO₄·5H₂O, MeCN, H₂O, 16 h, rt; c) LiOH, THF/H₂O, 23 h, rt; d) CDI, NH₄Cl, Et₃N, THF, 16 h, rt; e) PtO₂, MeOH, H₂, 4.14 bar, 16 h, rt; f) 187, DIPEA, HATU, 0 °C, 30 min, rt, 12 h, g) HCl (0.5 M in MeOH), MeOH.

In situ bildet sich eine Kupfer(I)-Spezies, die einen π -Komplex mit der Dreifachbindung des terminalen Alkins eingeht. Unter Anwesenheit einer weiteren Cu(I)-Spezies erfolgt die Deprotonierung des terminalen aziden Wasserstoffatoms. Dabei bildet sich ein Cu-Acetylid-Zwischenprodukt, wobei ein Cu-Atom mit dem Acetylid verbunden ist und das zweite Cu-Atom das Azid im nächsten Schritt aktiviert. An diesem Punkt erfolgt die Cyclisierung, wobei eines der beiden Cu-Atome den katalytischen Zyklus verlässt. Das verbleibende Kupferatom in der 5-Stellung des neu gebildeten Triazol-Systems wird durch ein Proton ersetzt. Dies führt zur Bildung des 1,4-Triazols, während die Kupfer(I)-Spezies erneut einen π -Komplex mit einem neuen Alkin aufbaut, um den Zyklus fortzusetzen.¹⁵⁰

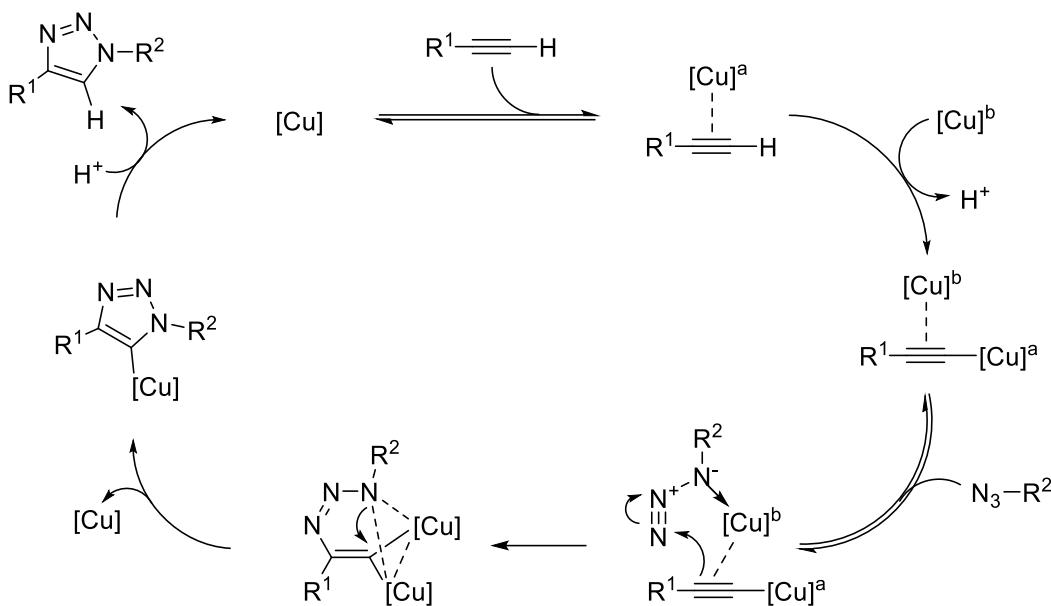


Abbildung 53: Von FOKIN *et al.* postulierter Mechanismus der CuACC zur Bildung von 1,4-Triazolen.¹⁴⁹

Die Synthese des entsprechenden Triazols wurde zunächst durch direkte Umsetzung von Propiolsäure getestet. Jedoch zeigten erste Testreaktionen, dass nur eine geringe Ausbeute auf diese Weise erzielt werden konnte. In nachfolgenden Experimenten wurde daher der entsprechende Methylester **182** verwendet. Die Verwendung des Propionsäuremethylesters (**182**) führte zur Bildung des Triazols **183** mit einer Ausbeute von 95.4%. Im Vergleich dazu wurde bei der Verwendung der freien Säure eine Ausbeute von nur 14.6% für Verbindung **184** beobachtet. Die Spaltung des Methylesters erfolgte dann durch Zugabe von Lithiumhydroxid in einem THF/H₂O-Gemisch. Nach einer Reaktionszeit von 23 h bei Raumtemperatur wurde ein vollständiger Umsatz des Esters beobachtet und Verbindung **184** wurde mit einer Ausbeute von $\geq 99\%$ isoliert.

Das für die folgende Synthese erforderliche Amin **187** wurde in zwei Schritten synthetisiert. Zuerst wurde Isochinolin-1-carbonsäure (**185**) mittels 1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI) und Ammoniumchlorid in das entsprechende primäre Carbonsäureamid **186** umgewandelt. Obwohl in der ursprünglichen Reaktionsanleitung Ammoniakgas verwendet wurde, erzielte der Austausch von Ammoniakgas durch Ammoniumchlorid ähnliche Ergebnisse.¹⁵¹ Verbindung **186** wurde mit einer Ausbeute von 99.0% erhalten. Anschließend wurde der Pyridinring des Isochinolinsystems hydriert. Die Hydrierung verlief nahezu vollständig, und das benötigte Amid **187** wurde mit einer Ausbeute von 98.1% erhalten. Die Hydrierung des Ringsystems führte zu einem neuen Stereozentrum, wodurch Verbindung **187** nur als Racemat hergestellt werden konnte.

Bei der folgenden HATU-Kupplung zwischen Verbindung **184** und Verbindung **187** wurde unter Verwendung gleicher Äquivalente nur ein Umsatz von etwa 50% festgestellt. Kontrollen des Reaktionsumsatzes mittels Dünnschichtchromatographie und HPLC-MS zeigten bei diesen Reaktionsbedingungen noch deutliche Signale der beiden Ausgangsstoffe. Ein weiterer Reaktionsansatz, bei dem zwei Äquivalente des Amins eingesetzt wurden, führte zu einem vollständigen Umsatz für Verbindung **184**. In der Reaktionskontrolle blieb neben dem Produkt noch ungefähr 50% des eingesetzten Amins zurück. Diese Beobachtungen legen nahe, dass nur eines der Enantiomere mit Verbindung **184** reagiert, während das andere Enantiomer aufgrund sterischer Hinderungen nicht zum Amid umgesetzt werden kann. Eine Isolierung des verbleibenden Amins aus dem Reaktionsansatz zur Überprüfung dieser Theorie war leider nicht möglich. Verbindung **188** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung in einer Ausbeute von 75% erhalten.

Im letzten Reaktionsschritt wurde die Boc-Schutzgruppe der Verbindung mittels Salzsäure (3 M in MeOH) abgespalten. Hierbei war eine ständige Überprüfung der Reaktion erforderlich, da eine Überschreitung der erforderlichen Reaktionszeit zur Bildung diverser Nebenprodukte und zum Verlust des gewünschten Produkts führte. Das angestrebte Zielmolekül **157** wurde anschließend mit einer Ausbeute von 50% erhalten. Die finale Ausbeute über fünf Stufen, ausgehend von Verbindung **180**, betrug somit 34.3%.

4.2.5 Biologische Untersuchung der Verbindungen

4.2.5.1 Biologische Daten der kommerziell erhältlichen *Enamine*® Verbindungen

Die Evaluierung der biologischen Aktivität der Kaufsubstanzen von *Enamine* im KRAS4B^{GDP}/SOS-Austauschassay ergab, dass nahezu alle untersuchten Verbindungen einen Wert von >300 µM aufweisen (**Tabelle 8**). Eine signifikante Beeinflussung des GDP/GTP-Austauschs durch die gemessenen Verbindungen konnte weder an der G12D-Mutante des KRAS-Proteins noch am Wildtyp nachgewiesen werden. Ein direkter Vergleich mit den von LDC erhobenen biologischen Daten für die Referenzverbindung MRTX1133 (**34**) bestätigt die Unwirksamkeit der Kaufsubstanzen. Weitere Untersuchungen möglicher Effekte auf Downstream-Prozesse der Zelle in anderen Assays wurden aufgrund der vorliegenden Daten nicht durchgeführt. Verbindung **135** konnte zum Zeitpunkt der Dissertation nicht erworben und somit nicht vermessen werden. Verbindung **136** zeigt als einzige Verbindung eine geringe, wenn auch unspezifische Aktivität im GDP/GTP-Austauschassay. Innerhalb der Dissertation sind dies die besten Ergebnisse einer Verbindung innerhalb dieses Assays.

Tabelle 8: Biologische Daten der 14 Kaufsubstanzen. Verbindung **135** war zum Zeitpunkt nicht erhältlich.

KRAS4B^{GDP}/SOS-Austauschassay
(IC₅₀ [µM])

		G12D	WT
34	MRTX1133	<0.03	0.0423±0.007
125	Z644603226	>300	>300
126	Z2801415678	>300	>300
127	Z1692778584	>300	>300
128	Z1652515992	>300	>300
129	Z1533983324	>300	>300
130	Z1533979651	>300	>300
131	Z2227313792	>300	>300
132	Z1317931909	>300	>300
133	Z2913694307	>300	>300
134	Z2227643691	>300	>300
135	Z3134747870	n.b.	n.b.
136	Z1097031465	128.1±35.0	78.3±18.4
137	Z2242918835	>300	>300
138	Z1241447626	>300	>300

LDC führte zusätzlich zu den bisherigen Assay-Systemen die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (*Surface Plasmon Resonance Spectroscopy, SPR*) ein. Dadurch konnte der Bindemechanismus diverser Verbindungen am RAS/SOS-Komplex genauer untersucht werden. Durch spektroskopische Methoden ist dabei die Bindung der Liganden an der Proteinoberfläche in Echtzeit messbar. Der Wert R_{\max} gibt dabei die maximale Bindungskapazität des Oberflächenrezeptormoleküls an und wird gemäß der in **Abbildung 54** dargestellten Formel berechnet.^{152, 153}

$$R_{\max} = \frac{MW_{\text{analmol}}}{MW_{\text{recmol}}} \times R_{\text{rec}} \times V_{\text{rec}}$$

MW_{analmol} = Molekulargewicht Analytmolekül

MW_{recmol} = Molekulargewicht Rezeptormolekül

R_{rec} = gemessene Reaktion des Rezeptormoleküls

V_{rec} = Stöchiometrie der Protein/Ligand-Interaktion

Abbildung 54: Formel zur Berechnung von R_{\max} in der SPR-Spektroskopie.^{152, 153}

Der SPR-Assay wurde sowohl am Histidin-markierten KRAS^{G12D}-Protein als auch am SOS-Protein durchgeführt. Die erhaltenen Werte (**Tabelle 9**) deuten darauf hin, dass Verbindung **136** eher mit der Oberfläche des SOS1-Proteins interagiert.

Tabelle 9: Biologische Daten aus dem SPR-Assay für Verbindung **136**

SPR-Assay					
		KRAS ^{G12D} (%R _{max})	KRAS ^{G12D} [μM]	SOS1 (%R _{max})	SOS1 [μM]
136	Z1097031465	12	>30	21	>30

Das Ziel, die KRAS^{G12D}-Mutante in der SII-Bindetasche analog zu MRTX1133 (**34**) zu adressieren, konnte durch die berechneten Kaufsubstanzen nicht erreicht werden. Unter den 13 erworbenen Verbindungen zeigte lediglich eine Substanz eine geringe Wirkung, die aufgrund der Ergebnisse aus dem SPR-Assay maximal durch eine Interaktion mit SOS1 ausgelöst wird. Eine detaillierte Untersuchung der Ursachen für diese Ergebnisse erfolgt in **Kapitel 4.2.6**.

4.2.5.2 Biologische Daten der synthetisierten Scaffolds

Unter den in **Tabelle 10** aufgelisteten synthetisierten Scaffolds, die auf Verbindung **129** basieren und durch Ähnlichkeitsanalyse an Z2227313792 (**131**) und Z2913694307 (**133**) gefunden wurden, zeigte lediglich die Verbindung **168**, das 3-Trifluormethoxy-Derivat von Verbindung **129**, eine dreistellig mikromolare Inhibierung. Die übrigen Derivate dieses Strukturtyps, einschließlich Verbindung **129** selbst, erwiesen sich als wirkungslos. Trotz niedriger *docking scores* von $(ds) = -11.35$ (**155**) und -11.299 (**157**) blieb die erwartete biologische Aktivität für die ausgewählten Verbindungen der Ähnlichkeitsanalyse aus. Varianten von Verbindung **155** mit Derivatisierungen des ursprünglichen 7-Ring-Systems zeigten ebenfalls keine Wirkung.

Die im SPR-Assay ermittelten Werte für das KRAS-Protein sowie das SOS1-Protein weisen für die Verbindung **168** eine hohe Ähnlichkeit auf, sodass an dieser Stelle keine valide Aussage über die genaue Wirkung des Liganden getroffen werden kann. Im direkten Vergleich mit MRTX1133 (**34**) zeigt sich, dass die Verbindung **168** mit einem IC₅₀-Wert von 202.9 μM für die G12D-Mutante im SOS-Austauschassay als unwirksam klassifiziert werden muss. Eine Selektivität für die Mutante konnte nicht beobachtet werden.

Tabelle 10: Biologische Daten der synthetisierten Scaffolds.

	KRAS4B ^{GDP} /SOS-Austauschassay		SPR-Assay	
	(IC ₅₀ [μM])		(%Rmax)	
	G12D	WT	HIS-KRAS-G12D	SOS1
34 (MRTX1133)	<0.03	0.0423±0.007		n.b.
129	>300	>300		n.b.
168	202.9	148.7	44	39
169	>300	>300	n.b.	n.b.
170	>300	>300	n.b.	n.b.
155	>300	>300	n.b.	n.b.
177	>300	n.b.	n.b.	n.b.
178	>300	>300	n.b.	n.b.
179	>300	>300	n.b.	n.b.
157	>300	>300	n.b.	n.b.

4.2.6 Interpretation der von MRTX1133 induzierten Bindestelle

In Anbetracht der erzielten biologischen Daten und dem Ausbleiben an positiven Messergebnissen, müssen die Berechnungen an der SII-Bindetasche innerhalb der Kristallstruktur 7RPZ neu bewertet werden.

In verschiedenen Kristallstrukturen des KRAS-Proteins, in denen kein Ligand in der Nähe der SII-Bindetasche co-kristallisiert ist, existiert die SII-Bindetasche lediglich als kleine Vertiefung auf der Proteinoberfläche. In der Kristallstruktur 7RPZ entsteht erst durch die Interaktion mit MRTX1133 (34) eine derartig tiefe Bindetasche. Wie bereits beschrieben, wurde MRTX1133 (34) auf Basis eines kovalent bindenden Liganden (30) des KRAS^{G12C}-Proteins entwickelt. Der kovalente Charakter des Liganden erhöht die Affinität zur Proteinoberfläche. Unterschiedliche Strukturelemente des Liganden unterstützen durch Wechselwirkungen mit der Oberfläche diese Bindung, was schließlich zur Änderung der Konformation des Proteins und zur Bildung der vertieften SII-Bindetasche führt.

Durch das Entfernen des kovalenten Charakters des Liganden für die G12D-Mutante war es von großer Bedeutung, dass die restlichen Strukturelemente diese fehlende Eigenschaft kompensieren. Die Optimierung der Struktur begann mit der Modifikation des Grundgerüsts, wobei das Tetrahydropyridopyrimidin-System durch ein Pyrido[4,3-*d*]pyrimidin-System ersetzt wurde. Dieses Scaffold konnte in eine ähnliche Pose wie das Originalgrundgerüst in der aufgezeichneten Kristallstruktur (PDB:6UT0) einnehmen. Erste wichtige Wechselwirkungen des Liganden mit der Bindetasche wurden identifiziert, darunter eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Stickstoff in Position 6 und Arg68 sowie die Besetzung einer kleinen hydrophoben Tasche durch das Fluor-Atom in Position 8. Besonders entscheidend ist der Substituent in Position 4, der mit der mutierten Aminosäure des Proteins interagiert. Der protonierte Stickstoff des Piperazin-Systems interagiert sowohl über ionische Wechselwirkungen als auch über Wasserstoffbrückenbindungen mit Asp12 und Gly60. Die Verwendung des bicyclischen Systems sorgt zudem für eine optimale Positionierung des Stickstoffs. Die Kohlenstoffbrücke füllt hierbei eine kleine Tasche innerhalb der SII-Bindetasche aus, während einer der beiden *endo*-Kohlenwasserstoffe eine nicht-klassische Wasserstoffbrückenbindung mit dem Carbonylsauerstoff von Gly10 eingeht. Der protonierte Stickstoff des C2-Substituenten bildet eine starke ionische Wechselwirkung mit dem negativ geladenen Carboxylat von Glu62, während der Kohlenstoff in Position 3 eine nicht-klassische Wasserstoffbrückenbindung mit dem Carbonylsauerstoff von Glu62 eingeht. Das Fluor-Atom in direkter Nachbarschaft verstärkt den ionischen Charakter der Stickstoff-Sauerstoff-

Wechselwirkung durch seine elektronenziehende Wirkung. Der C7-Ligand füllt eine hydrophobe Tasche aus Val9, Thr58, Met72, Tyr96 und Ile100 aus. Die Ethinylgruppe in Position 8 des Substituenten bildet ein Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen mit einem intrinsischen Wassermolekül in der Bindetasche aus. Thr58 und Gly10 fungieren in diesem Netzwerk als Akzeptoren, das Ethinyl und das Amin des Glycins als Donoren (**Abbildung 55**).⁶² Der Ligand MRTX1133 (**34**) ist somit zum aktuellen Zeitpunkt ein Ligand, der optimal auf seine Umgebung innerhalb dieser, von ihm induzierten, Bindetasche abgestimmt ist.

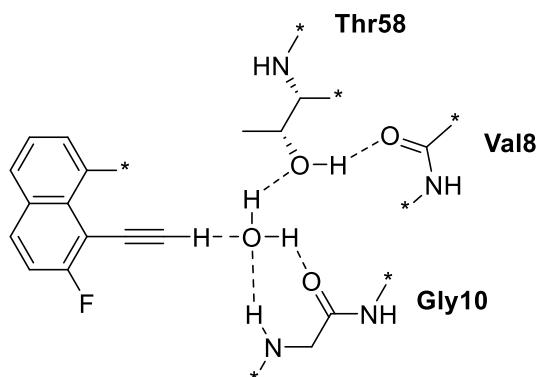


Abbildung 55: Darstellung des Wasserstoffbrückennetzwerks innerhalb der SII-Bindetasche während des Entwicklungsprozesses von MRTX1133 (**34**). Darstellung von MARX *et al.* übernommen.⁶²

Im Gegensatz zu den von *Mirati Therapeutics* angewendeten Methoden zur Entwicklung von MRTX849 (**30**, **Abbildung 13**) und MRTX1133 (**34**, **Abbildung 14**), bei denen zunächst eine Fragmentbibliothek mittels HTS-Screening an der leichter adressierbaren G12C-Mutante des KRAS-Proteins untersucht wurde, basiert der hier durchgeführte Ansatz ausschließlich auf computergestützte Berechnungen zwischen wirkstoffähnlichen Screening-Substanzen und Daten der von *Mirati Therapeutics* publizierten Kristallstruktur. In dieser Kristallstruktur ist die Bindetasche in ihrer räumlichen Anordnung durch MRTX1133 (**34**) bereits vorhanden.

In ihrer Herangehensweise ähneln sich die angewendeten Verfahren stark. In beiden Fällen wurde eine große Bibliothek untersucht, um vielversprechende Verbindungen zu finden.⁵⁹ Ein großer Unterschied besteht jedoch darin, dass *Mirati Therapeutics* durch das Fragment-Screening bereits eine Grundlage für weitere Optimierungsarbeiten geschaffen hatte. Der erhaltene Grundkörper bestätigte in biologischen Untersuchungen eine Interaktion des Liganden mit der SII-Bindetasche und die entsprechenden Modifikationen wurden synthetisch durchgeführt und parallel in entsprechenden Assays validiert.^{60, 62} Aufgenommene Kristallstrukturen der vielversprechendsten Strukturen halfen dabei, die Ligand-Protein-Interaktion weiter zu analysieren.

Die in dieser Dissertation durchgeführten Berechnungen nutzten als Ersatz für diesen Startpunkt den bereits optimierten Liganden MRTX1133 (**34**) und die von ihm induzierte SII-Bindetasche. In der vorliegenden Untersuchung wurde zunächst die Hypothese aufgestellt, dass die identifizierten Substanzen eine ähnliche Funktion wie MRTX1133 (**34**) erfüllen und die SII-Bindetasche induzieren könnten. Um mögliche Patentverletzungen zu vermeiden, musste dabei jedoch auf das ursprüngliche Grundgerüst der Verbindung **34** verzichtet werden. Die erhaltenen Daten in Form von *docking score* und *glide emodel*-Wert und die räumliche Anordnung der Liganden innerhalb der Bindetasche sprachen jedoch für diese Annahme. Hinweise dafür, dass die Verbindungen keine Aktivität in den biologischen Untersuchungen aufweisen, wurden weder in den ermittelten Docking-Ergebnissen noch in den berechneten Protein-Ligand-Komplexen beobachtet.

In der abschließenden Bewertung muss festgehalten werden, dass das angestrebte Modell nicht in der Lage war, einen neuen Wirkstoff für KRAS^{G12D} zu entwickeln. Es bleibt unklar, inwiefern rein computergestützte Berechnungen zur Identifizierung solcher Wirkstoffe geeignet sind. Die Veröffentlichung von MRTX1133 (**34**) zeigt jedoch, dass für die Entwicklung eines potenteren Wirkstoffes eine Kombination aus einer vielversprechenden Ausgangsstruktur (HTS-Screening) und iterativer Strukturoptimierungen (Synthese, biologische Kontrolle, Kristallstruktur) ideal ist. Ob dieser hochpotente Wirkstoff auch ohne die vorher gefundene Leitstruktur in Form von MRTX849 (**30**) gefunden worden wäre, bleibt unklar. Grundsätzlich erscheint es jedoch von Vorteil, zunächst Verbindungen für die G12C-Mutante des KRAS-Proteins zu entwickeln. In einem solchen Entwicklungsprozess kann anschließend, ausgehend von einer nachweislich stattfindenden Interaktion der Ligand für die nicht-kovalent bindende KRAS^{G12D}-Mutante optimiert werden. In diesen Prozess sind anschließend auch *in-silico*-Verfahren integrierbar, die erste Strukturveränderungen ohne synthetischen Aufwand untersuchen. Das computergestützte Verfahren dient somit zum aktuellen Zeitpunkt eher als Unterstützung und kann unter den gegebenen Voraussetzungen nicht mit den aufwendigen Verfahren zur Strukturentwicklung von *Mirati Therapeutics* konkurrieren.

4.3 PROTAC-Synthese für den katalytischen Abbau von RAS-Proteinen

Im Bereich der Wirkstoffentwicklung hat sich die PROTAC-Technologie als vielversprechende Strategie für den gezielten Abbau von Zielproteinen erwiesen. Diese Methode nutzt bifunktionale Moleküle, die aus einem Liganden für das Zielprotein und einem Liganden für die E3-Ubiquitin-Ligase bestehen. In dieser Arbeit liegt der Fokus auf der Synthese verschiedener PROTACs, die auf der von STOCKWELL *et al.* veröffentlichten Verbindung **53** basieren und von SCHERKENBECK *et al.* modifiziert (Verbindung **54**) wurde. Ebenso wurde versucht die von FESIK *et al.* publizierte Verbindung BI-2852 (**23**) als Ligand für den PROTAC zu verwenden. Für die Synthese der PROTACs wurden unterschiedlich lange funktionalisierte Polyethylenglykol-Ketten als Linker-Systeme synthetisiert und eingesetzt. Die Varianz der Linkerlänge spielt eine entscheidende Rolle beim Verständnis der Struktur-Wirkungs-Beziehung dieser Verbindungen. Derzeit gibt es keine bekannte Möglichkeit zur Simulation, die den optimalen Zustand des tertiären Komplexes aus Zielprotein, PROTAC und E3-Ubiquitin-Ligase vorhersagen könnte.

4.3.1 Synthese mehrerer PROTACs auf Basis des derivatisierten STOCKWELL-Liganden

Als Ausgangspunkt für die Synthese der STOCKWELL-PROTACs diente die von SCHERKENBECK *et al.* modifizierte Verbindung **54**. Um einen geeigneten Verknüpfungspunkt für die Bindung des Liganden an den Rest des PROTACs zu erhalten, wurde das Piperidin-System der Grundstruktur entfernt. Die in der Synthese von Verbindung **54** erhaltene Zwischenstufe **198** entspricht der gewünschten Struktur. In der entsprechenden Nachsynthese für Verbindung **198** (Abbildung 56) wurde zunächst N-Boc-Brompropanamin (**190**) aus 3-Bromopropanamin Hydrobromid (**189**) hergestellt. Im nächsten Schritt wurde die N-Alkylierung von Verbindung **191** durchgeführt. Entgegen der veröffentlichten Synthesemethode von STOCKWELL *et al.* erfolgte diese nicht in DMF unter Verwendung von Natriumhydrid als Base.¹¹⁰ In den Synthesen von SCHERKENBECK *et al.* wurde die publizierte Ausbeute nicht erreicht. In der daraufhin durchgeführten Syntheseoptimierung erwies sich die Methode von HONG *et al.*, bei der DMSO und Cäsiumcarbonat verwendet wurden, als wirksam.¹⁵⁴ Auf diese Weise wurde Verbindung **192** mit einer Ausbeute von 66% erhalten. Anschließend erfolgte die Bromierung des Indol-Grundkörpers, gefolgt von einer SUZUKI-Kupplung unter Verwendung der 4-Trifluormethoxyphenylboronsäure (**194**).

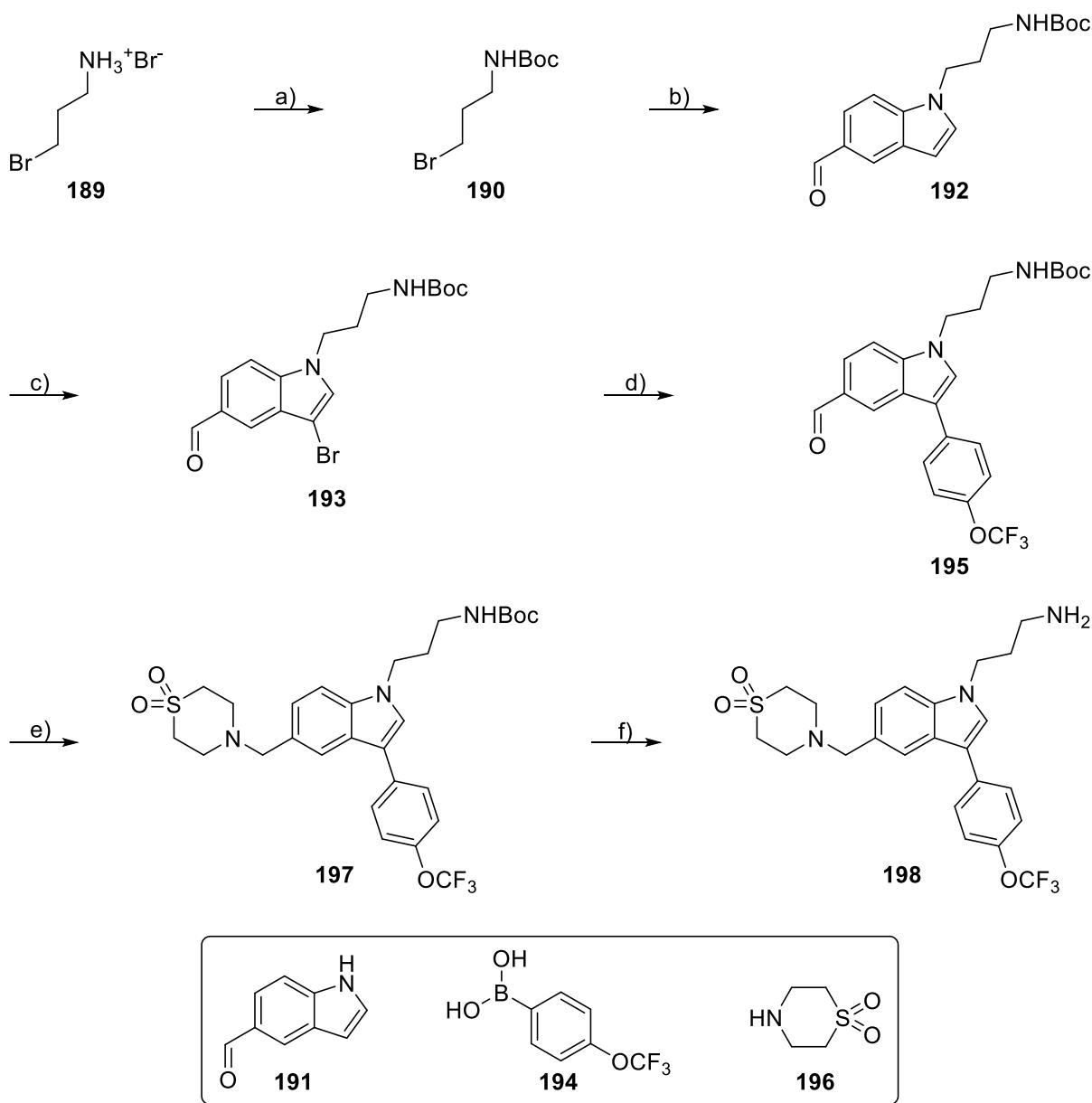


Abbildung 56: Syntheseroute zur Darstellung des für die PROTAC-Synthese verwendeten Stockwell-Derivat **198**. a) Et_3N , Boc_2O , DCM, rt, 12 h; b) **191**, Cs_2CO_3 , DMSO, rt, 2 h; c) Br_2 , THF, -78°C , 3 h; d) **194**, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, Dioxan, K_2CO_3 (2 M), 120°C , 16 h; e) **196**, STAB, DCM, rt, 16 h; f) HCl (4 M in Dioxan), Dioxan, rt, 2 h.

Im Rahmen einer reduktiven Aminierung wurde die Verbindung **195** mit dem Thiomorpholin-1,1-Dioxid (**196**) umgesetzt. Die Reaktion fand in trockenem Dichlormethan unter Verwendung von Natriumtriacetoxyborhydrid (STAB) statt. Das Boc-geschützte Zielderivat (**197**) wurde in einer Ausbeute von 83% erhalten. Für die Entschützung der Boc-Schutzgruppe wurde Verbindung **197** in Dioxan gelöst und mit Salzsäure (4 M in Dioxan) versetzt. Nach zwei Stunden wurde ein vollständiger Umsatz in der Reaktionskontrolle beobachtet und die Zielverbindung **198** wurde chromatographisch aufgereinigt. Die Ausbeute für die Boc-Entschützung betrug 95%.

Im Rahmen der PROTAC-Synthese wurde als E3-Ubiquitin-Ligase-Ligand 4-Fluorothalidomid (**201**) verwendet. Im späteren Verlauf der Synthese fungierte das Fluor-Atom als Angriffspunkt für eine nukleophile aromatische Substitution ($S_{N}Ar$). Die Herstellung von Verbindung **201** erfolgte durch eine Synthese aus 3-Fluorophthalsäureanhydrid (**199**) und 3-Box-amino-dioxopiperidin (**200**). Da bereits einige PROTACs innerhalb der Arbeitsgruppe SCHERKENBECK mit diesem Ligase-Liganden synthetisiert wurden, war die Synthese der Verbindung **201** etabliert.

Die Synthese der Polyethylen-Linker mit den Kettenlängen $n = 3$ und $n = 4$ wurden in dieser Arbeit durchgeführt. Parallel dazu wurden innerhalb des PROTAC-Projekts der Arbeitsgruppe SCHERKENBECK die Linker-Systeme auf Basis von Ethylenglykol ($n = 1$) und Diethylenglykol ($n = 2$) von anderen Doktoranden bearbeitet. In ersten Testreaktionen am Triethylenglykol-System wurde versucht, das Molekül einseitig zu mesylieren. Trotz angepasster Verhältnisse des Mesylchlorids (0.5 Äq.) wurde neben dem Ausgangsmaterial nur das dimesylierte Produkt beobachtet. Angesichts weiterer Arbeitsgruppen, die sich ebenfalls mit der Synthese verschiedener PROTACs als Wirkstoffe befassten, wurde schnell eine Syntheseroute gefunden, bei der die Glykol-Einheit ausschließlich einseitig tosyliert wurde. Die von ZHANG *et al.* publizierte Synthese ähnelt stark der in **Abbildung 57** dargestellten Syntheseroute und wurde daraufhin für die entsprechenden Ethylenglykol-Linker angewendet.¹⁵⁵ Die Einführung der Azid-Funktion und die simultane Entfernung der Tosyl-Gruppe erschwerten die säulenchromatographische Aufreinigung der einzelnen Syntheseschritte erheblich, da die Produkte aufgrund fehlender UV-Aktivität schwer detektierbar waren. Aus diesem Grund wurde für die folgenden Reaktionsschritte, einschließlich des Reaktionsschritts f (**Abbildung 57**), mit Rohprodukten gearbeitet. Trotz dieser Einschränkung zeigten Untersuchungen der Zwischenstufen mittels HPLC-MS, dass der prozentualen Anteil an Verunreinigungen sehr gering war.

Angesichts des hohen Explosionspotentials der Reaktion bei der Verwendung großer Mengen an Natriumazid, wurde die Einführung der Azid-Gruppe mehrfach in kleinerem Maßstab (maximal 100 mg NaN_3) durchgeführt.

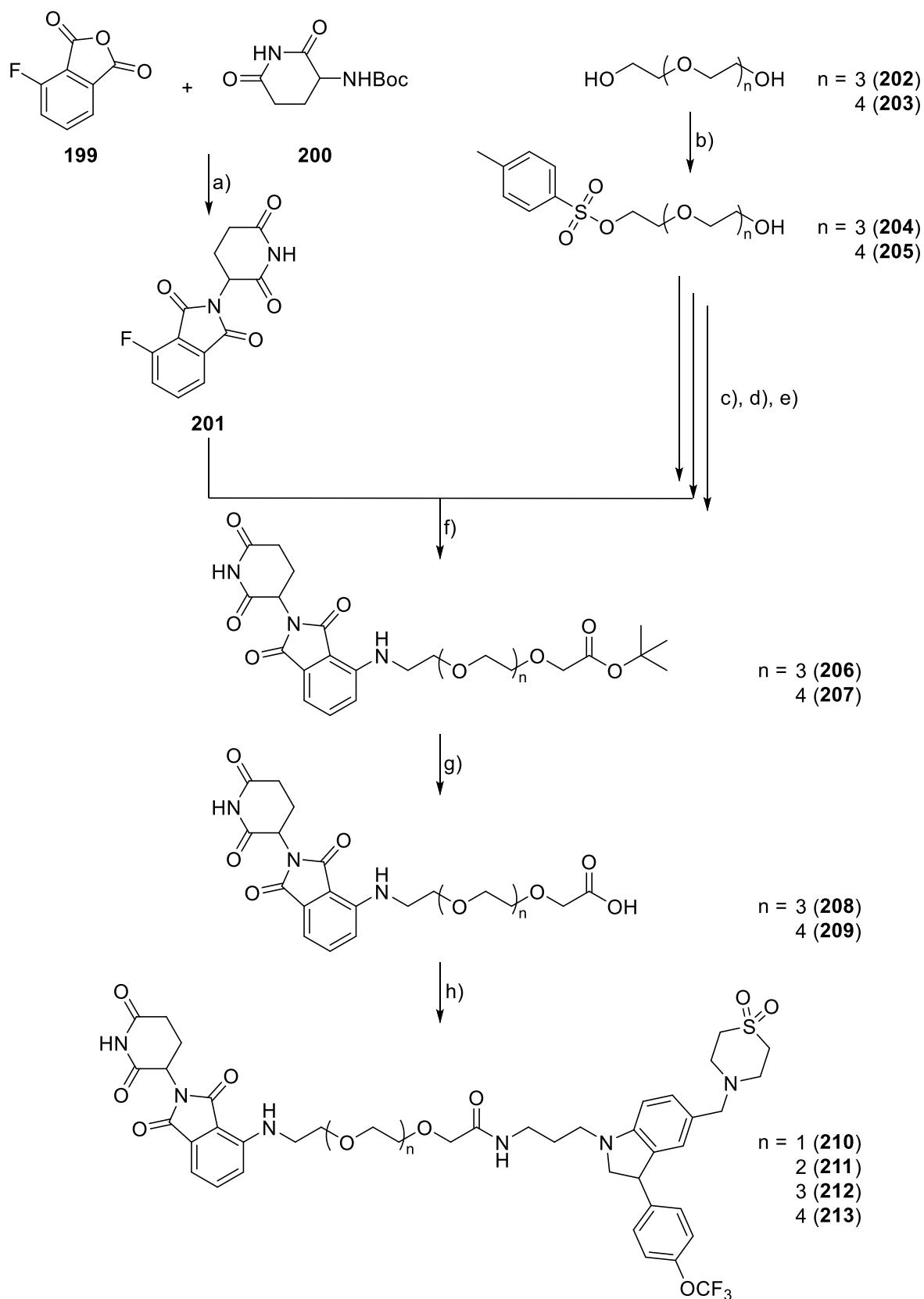


Abbildung 57: Syntheseroute zur Darstellung der unterschiedlichen PEG-Stockwell-PROTACs. a) NaAc, Essigsäure, reflux, 8 h; b) *p*-TsCl, Pyridin, rt, 12 h; c) NaN₃, DMF, 60 °C, 12 h; d) *tert*-Butylbromoacetat, *t*-BuOK, *t*-BuOH, 50 °C, 12 h; e) Pd(OH)₂/C (kat.), H₂, EtOH, rt, 24 h; f) DIPEA, DMSO, 90 °C, 12 h; g) TFA, DCM, rt, 24 h; h) 198, HATU, DIPEA, DMF, rt, 12 h.

Im anschließenden Reaktionsschritt erfolgte die Alkylierung des Rohprodukts mit *tert*-Butylbromoacetat, wodurch die einseitige Einführung der geschützten Carbonsäure-Funktion erfolgte. Daraufhin wurde unter Verwendung von Palladiumhydroxid/Kohle ($\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$) als Katalysator das Azid im Linker-System zum primären Amin reduziert. Das erhaltene Amin wurde im folgenden Schritt mittels nukleophiler aromatischer Substitution mit Verbindung **201** verbunden. Das Fluor-Atom von Verbindung **201** diente hierbei als Abgangsgruppe, was zu einer direkten Verknüpfung des Thalidomid-Grundgerüsts mit dem Amin des Linker-Systems führte.

Die durch die zuvor durchgeführte Reaktion entstandenen PROTAC-Vorläufer **206** und **207** wurden im Anschluss mithilfe von Trifluoressigsäure in die freien Carbonsäuren **208** und **209** überführt. Im nächsten Schritt wurden die Linker-Systeme mittels einer HATU-Kupplung mit dem modifizierten STOCKWELL-Verbindung **198** verknüpft, wodurch die fertigen PROTACs synthetisiert wurden. Der hier beschriebene Prozess wurde zudem für die PROTAC-Vorläufer mit den Kettenlängen $n = 1$ und $n = 2$ durchgeführt. Die STOCKWELL-PEG-PROTACs mit den Kettenlängen $n = 1 - 4$ (**210 – 213**) konnten auf diese Weise erfolgreich synthetisiert werden.

Über die in der Literatur häufig erwähnten PEG-Linker hinaus wurden weitere STOCKWELL-PROTACs mit abweichender Linker-Struktur synthetisiert. Die Herstellung erfolgte unter Verwendung bereits innerhalb der Arbeitsgruppe SCHERKENBECK synthetisierter Linkersysteme. Auf diese Weise wurden STOCKWELL-PROTACs mit aliphatischen Linkersystemen erzeugt. Des Weiteren wurden PROTACs auf Basis eines N-Methyl-Piperazin-Linkers (**215**), eines Piperidin-Linkers (**216**) und eines Pentan-Linkers (**217**) synthetisiert. Zusätzlich wurde ein PROTAC ohne Linker-System (**214**) hergestellt. In diesem Fall wurde der Thalidomid-Grundkörper direkt an das primäre Amin der modifizierten STOCKWELL-Liganden **198** geknüpft. Wie in **Abbildung 58** dargestellt, fungiert dabei die bereits vorhandene Propyl-Kette als Linker und erzeugt somit einen gewissen Abstand zwischen den beiden Liganden.

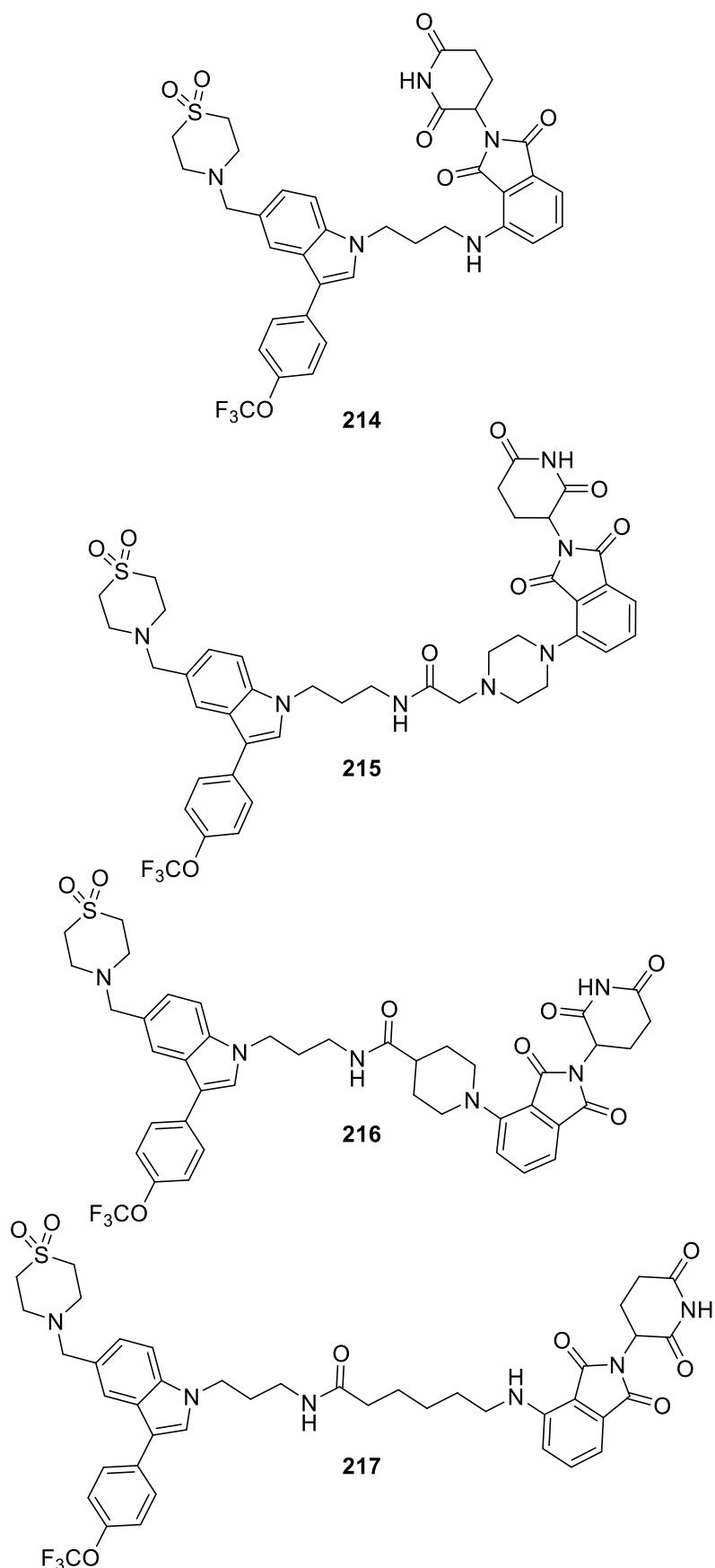


Abbildung 58: Weitere Stockwell-PROTACs auf Basis anderer Linker-Systeme.

4.3.2 Synthese mehrerer PROTACs auf Basis der BI-2852 Verbindung

Die auf der Verbindung BI-2852 (**23**) basierenden PROTACs werden im Folgenden als FESIK-PROTACs bezeichnet. Um die zuvor synthetisierten Linker-Systeme einsetzen zu können, wurde die ursprünglich ausgewählte Verbindung **23** erheblich modifiziert. Diesbezüglich wurde zunächst eine Vorstufe aus dem von FESIK *et al.* publizierten Entwicklungsprozess der Verbindung BI-2852 (**23**) ausgewählt.⁵⁴ Diese Verbindung (Verbindung **218**) zeigte in den aufgenommenen Kristallstrukturen ähnliche Wechselwirkungen mit der Proteinoberfläche wie BI-2852 (**23**) (Abbildung 59). Zudem zeigte Verbindung **218** eine ähnlich zweistellig mikromolare Affinität gegenüber der GCP und GDP-Variante des KRAS-, HRAS- und NRAS-Proteins.⁵⁴ Darüber hinaus wurde bei NCI-H358-Zellen eine vollständige Hemmung bei einer Konzentration von 50 μ M der Verbindung **218** beobachtet.

Als Verknüpfungsstelle zwischen dem ausgewählten KRAS-Ligand und dem PROTAC-System wurde das tertiäre Amin des oberen Ring-Systems (Abbildung 59: A) ausgewählt. Um eine gewisse Ähnlichkeit zu der ursprünglichen Verbindung **23** beizubehalten, wurde das tertiäre Amin um eine Ethylamin-Einheit (**226**, Abbildung 60) erweitert. So wurde angenommen, dass die Bindung an ein PROTAC-System nicht zu einer Veränderung der räumlichen Interaktion des Grundkörpers mit der Proteinoberfläche führen würde und die entscheidenden Wechselwirkungen des Systems erhalten bleibt. Das so eingeführte primäre Amin diente als Angriffspunkt für die Carbonsäure-Funktion des Linker-Thalidomid-Systems.

Die Synthese von Verbindung **226** erfolgte bis zur Zwischenstufe **224** mit minimalen Anpassungen analog zu der von FESIK *et al.* publizierten Syntheseroute.⁵⁴ Zu Beginn der Synthese wurde 4-Hydroxy-2-methylbenzoësäuremethylester (**219**) unter Verwendung von *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (TBSCl) und Imidazol geschützt.

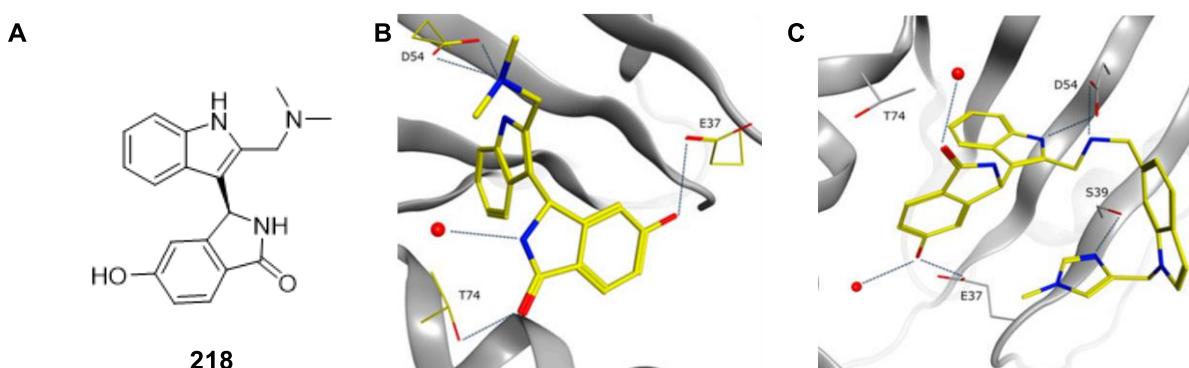


Abbildung 59: A) Strukturformel des für die PROTAC-Synthese verwendeten 5-Hydroxy-Isoindolinons (**218**); B) Ausschnitt aus der Kristallstruktur der Verbindung **218** in GCP-KRAS^{G12D} (PDB: 6GJ6). C) Ausschnitt aus der Kristallstruktur von BI-2852 (**23**) in GCP-KRAS^{G12D} (PDB: 6GJ8). Abbildungen von FESIK *et al.* übernommen.⁵⁴

Nach erfolgreicher Schützung der Hydroxygruppe mit einer TBS-Schutzgruppe und der Isolierung des Produkts als leicht braunes Öl wurde Verbindung **220** in Benzol gelöst und mit N-Bromosuccinimid (NBS) und 2,2'-Azobisisobutyronitril (AIBN) versetzt um Methyl-4-[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy-2-(dibromomethyl)benzoat (**221**) zu erhalten. Es ist wichtig zu betonen, dass das verwendete NBS vor der Reaktion frisch umkristallisiert werden sollte, da dies die Ausbeute der Reaktion erheblich erhöht. Zudem ist eine ausreichende Menge an NBS von großer Bedeutung, da eine zu geringe Menge zur Bildung des monosubstituierten Produkts führt. In einer Hydrolysereaktion wurde Verbindung **221** unter Verwendung von Silbernitrat nun in den Aldehyd **222** überführt. Parallel zu diesem Reaktionsschritt wurde die TBS-Schutzgruppe abgespalten, wodurch die freie Hydroxy-Gruppe erhalten wurde.

Die in der Literatur von FESIK *et al.* beschriebene Reaktion zur Synthese von Verbindung **223** wies in den eigenen Experimenten keinen Umsatz auf. Erst durch Anpassungen der Reaktionsbedingungen und die Verwendung einer Labor-Mikrowelle wurde letztendlich eine Produktbildung erreicht. Durch diese Modifikation wurde zudem die Reaktionszeit auf zwei Stunden verkürzt. Jedoch führte die Durchführung der Reaktion unter diesen Bedingungen auch zur Bildung einiger nicht weiter charakterisierter Nebenprodukte. Die Gesamtausbeute sank dadurch erheblich. Aufgrund der begrenzen Volumina der Mikrowellengefäße konnte in einem Reaktionsansatz eine maximale Menge von 140 mg von Verbindung **222** umgesetzt werden. Um einer möglichen Oxidation von Verbindung **222** zur Carbonsäure vorzubeugen, wurden nicht eingesetzte Mengen des Substrats unter einer Argon-Atmosphäre im Gefrierschrank gelagert.

Während der Bildung von Verbindung **223** entsteht zudem ein neues Stereozentrum, wodurch die Verbindung lediglich als Racemat erhalten wurde. Im Gegensatz zu den Versuchen von FESIK *et al.* konnte im eigenen Labor keine Trennung der Enantiomere mittels überkritischer Flüssigkeitschromatographie unter Verwendung von überkritischem Kohlendioxid erzielt werden. Unter Berücksichtigung der genannten Faktoren wurde zunächst mit dem erhaltenen Racemat der Verbindung **223** weitergearbeitet.

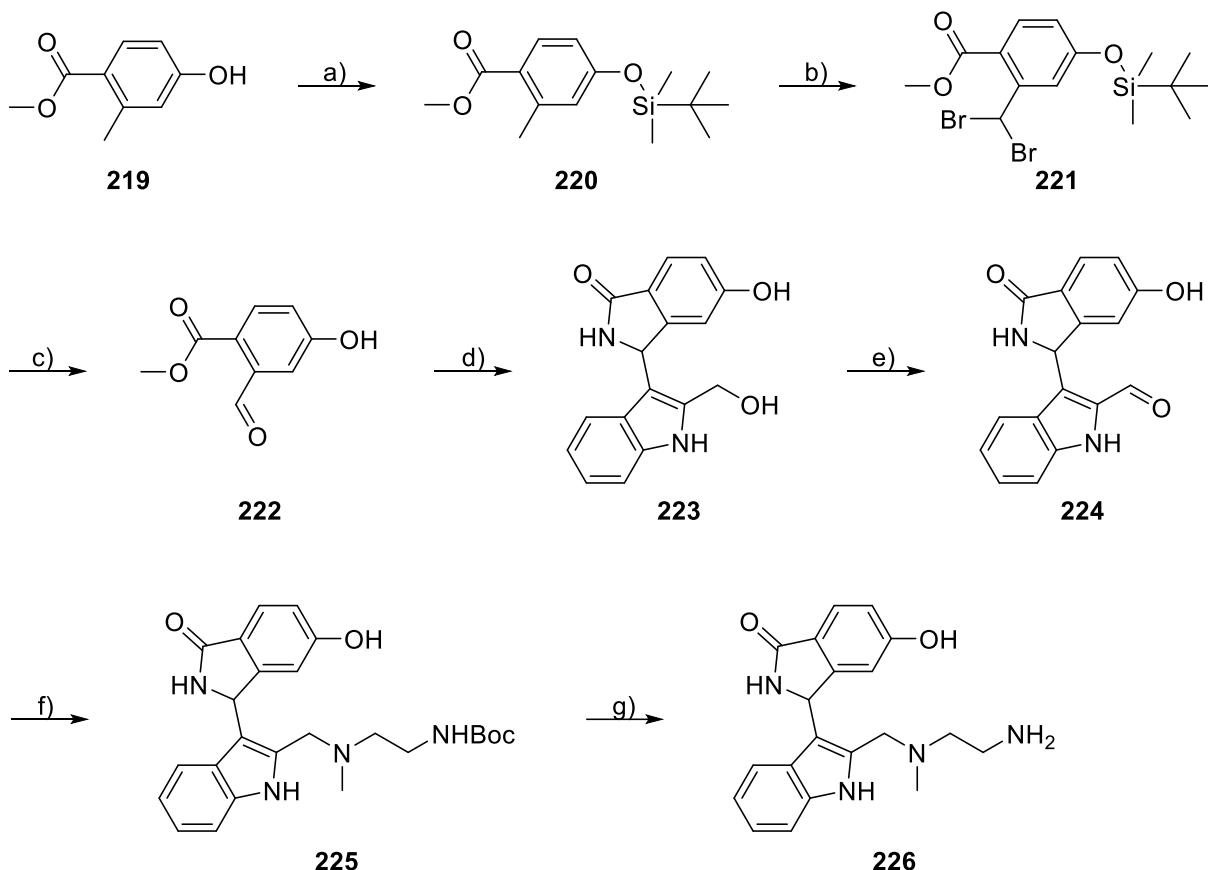


Abbildung 60: Synthese des KRAS^{G12D}-Liganden auf Basis von BI-2852 (**23**) für die PROTAC-Synthese. a) TBSCl, Imidazol, DCM, rt, 18 h; b) NBS, Benzol, 85 °C, 16 h; c) AgNO₃, Aceton/H₂O (5:1), rt, 16 h; d) (1*H*-Indol-2-yl)methanol, NH₃OH (w = 25%), 100 W, 80 °C, 2 h; e) DMP, DMF, rt, 5 h; f) N-Boc-2-methylaminoethylamin, STAB, DMF, rt, 16 h; g) HCl (0.5 M in MeOH), MeOH, rt, 5 h.

In der nachfolgenden Synthese wurde der erhaltene Alkohol **223** in einer zweistufigen Reaktion zu Verbindung **225** überführt. Zunächst erfolgte die selektive Oxidation der aliphatischen Hydroxygruppe mittels Dess-Martin-Periodinan (DMP) zum Aldehyd **224**. Der Fortschritt der Reaktion wurde kontinuierlich überwacht, wobei der Alkohol je nach Reaktionsmaßstab nach drei bis fünf Stunden vollständig zum Aldehyd oxidiert wurde. Abgesehen von einem Versuch, bei dem der hergestellte Aldehyd isoliert und vollständig charakterisiert wurde, wurde Verbindung **224** als Zwischenprodukt ohne weitere Aufarbeitung verwendet. Dem Reaktionsgemisch wurde, um eine reduktive Aminierung durchzuführen, N-Boc-2-methylaminoethylamin und STAB als Reduktionsmittel zugesetzt. Während dieser Reaktion traten einige Nebenprodukte auf, die nur schwer vom Hauptprodukt mittels präparativer HPLC abtrennbar waren. Die Verwendung des isolierten Aldehyds als Ausgangsmaterial zeigte keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Ausbeute und der Aufreinigungsschwierigkeiten. Im letzten Schritt der Synthese wurde die Boc-Schutzgruppe mit einer methanolischen Salzsäure-Lösung sauer abgespalten, wodurch der gewünschte PROTAC-Ligand **226** erhalten wurde.

Für die Synthese der FESIK-PROTACs wurde der zuvor synthetisierte Ligand **226** mittels HATU-Kupplung mit den PEG-Linker-Systemen **208** und **209** gekoppelt. Auf diese Weise wurden FESIK-PEG-PROTACs der Kettenlänge $n = 3$ (**227**) und 4 (**228**) synthetisiert. Darüber hinaus wurde der FESIK-Ligand mit dem in der Arbeitsgruppe SCHERKENBECK synthetisierten Piperazin-Linker kombiniert.

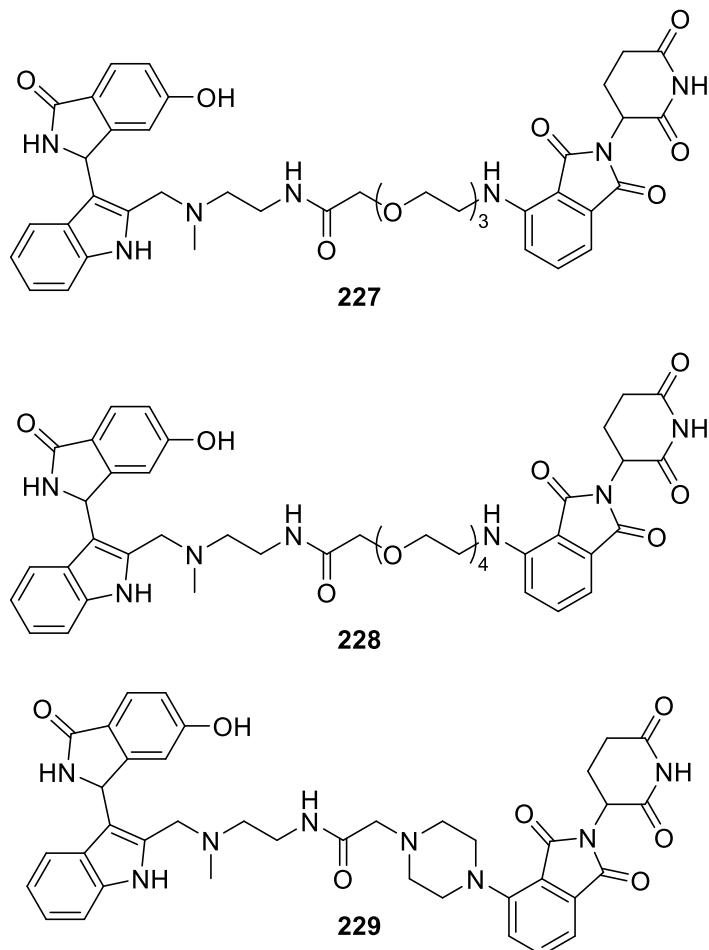


Abbildung 61: Synthetisierte FESIK-PROTACs auf Basis des für die PROTAC-Synthese modifizierten Liganden **237**.

4.3.3 Biologische Untersuchung der PROTAC-Verbindungen

Zur Analyse der biologischen Daten wurden hauptsächlich Daten im KRAS4B^{G12D}/SOS-Austauschassay durch den Kooperationspartner erhoben. Bei den STOCKWELL-PROTACs (**Tabelle 11**) wiesen nahezu alle Verbindungen sowie Ligand **198** Werte im millimolaren Bereich für die G12D-Mutante des KRAS-Proteins auf. Für die Referenzverbindung **54** war zum Zeitpunkt der Abgabe dieser Dissertation kein Messwert für die G12D-Mutante verfügbar. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für den Wildtyp des Proteins erzielt. Für das generelle PROTAC-Konzept sind diese Ergebnisse zunächst nicht aussagekräftig, da die Hauptaufgabe dieser Moleküle nicht die Inhibierung des GDP-Austauschs, sondern die Induktion des katalytischen Abbaus des KRAS-Proteins ist. Auffällig ist jedoch, dass weder Ligand **198** noch die Referenzverbindung **54** aussagekräftige Werte in diesem Assay liefern. Die ursprüngliche, von STOCKWELL *et al.* publizierte, Verbindung **53** ist in den erhobenen Daten nicht enthalten, obwohl sie vor Beginn dieser Promotionsarbeit bereits innerhalb der Arbeitsgruppe SCHERKENBECK synthetisiert wurde. In der Literatur wurde im MST-Assay eine höhere Affinität gegenüber KRAS^{GTP} festgestellt.¹¹⁰ Eine konkrete Inhibierung des GDP/GTP-Austauschs durch Verbindung **53** wurde jedoch nicht festgestellt bzw. beschrieben.¹¹⁰

Tabelle 11: Biologische Daten der STOCKWELL-PROTACs und des verwendeten STOCKWELL-Liganden **198** im Vergleich zur ursprünglich modifizierten STOCKWELL-Verbindung **54**.

KRAS4B ^{GDP} /SOS-Austauschassay (IC ₅₀ [μM])			Zellulare Aktivität (CTG-Assay) (IC ₅₀ [μM])		HTRF-pERK AGSo (IC ₅₀ [μM])		SPR-Assay (%Rmax)	
G12D		WT	SNU-1 (G12D)	RKo (WT)			KRAS ^{G12D}	SOS1
54	n.b.	>3000	60.8±7.3	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
198	1855±49	1779±1070	18.5±7.5	12.6±0.4	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
214	>300	>300	>30	>30	>30	10	-16	
210	1883±180	>3000	16.3	22.0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
211	>300	>300	>30	>30	>30	1	-44	
212	>300	>300	>30	>30	n.b.	0	-33	
213	>3000	>3000	>30	>30	n.b.	0	-40	
215	>3000	>3000	>30	>30	>30	14	-17	
216	>3000	>3000	>30	>30	>30	36	21	
217	>3000	>3000	>30	>30	>30	6	-22	

Im CTG-Assay zeigte die Referenzverbindung **54** eine zweistellig mikromolare Affinität für die SNU-1-Zelllinie mit KRAS^{G12D}-Mutation, während ein entsprechender Wert für eine KRAS^{WT}-Zelllinie fehlt. Ligand **198** zeigte eine erhöhte Aktivität sowohl in SNU-1 als auch in RKO-Zielllinien im Vergleich zur Referenzverbindung, wobei die Aktivität minimal höher bei der Wildtyp-Zielllinie war. Die fehlende Selektivität spricht für die Eigenschaft der ursprünglichen Verbindung **53** als pan-KRAS-Inhibitor. Die synthetisierten PROTACs zeigten im zellulären Assay bis auf PROTAC **210** keine Aktivität. PROTAC **210** mit einer Kettenlänge von $n = 1$ zeigte die besten Werte der gemessenen Verbindungen für die SNU-1-Zelllinie und konnte den Liganden sowie die Referenzverbindung **54** übertreffen. Bei der Auswertung der Ergebnisse zeigte sich, dass von den untersuchten PROTACs lediglich die Verbindung **210** keinen Wert im HTRF-Assay aufwies, der Rückschlüsse auf den Einfluss auf die von KRAS ausgelöste Signaltransduktionskaskade zulässt. Die übrigen PROTACs zeigten in diesem Assay, sowie im kürzlich durchgeführten SPR-Assay, der die Bindungsaffinität gegenüber KRAS sowie SOS1 misst, keine signifikante Bindung.

Daten aus dem von LDC entwickelten PROTAC-Assay fehlen zu den oben aufgelisteten PROTACs. Der Assay wurde nach dem Ausbleiben positiver Messwerte für die GORFE- und RABBITS-PROTACs nicht erneut durchgeführt, wodurch eine genaue Feststellung des PROTAC-Effekts für diese Verbindungen nicht gegeben ist. Angesichts der vorliegenden biologischen Daten deutet vieles auf die Unwirksamkeit der synthetisierten STOCKWELL-PROTACs hin. Nur bei Verbindung **210** gab es eine unspezifische Aktivität in der Zelle. Es bleibt jedoch unklar, ob diese Aktivität durch den unspezifischen katalytischen Abbau von KRAS oder durch Off-Target-Effekte in der Zelle verursacht wurde. Das Fehlen bestimmter Assay-Ergebnisse verhindert das Treffen genauerer Aussagen.

In **Tabelle 12** sind die biologischen Daten der FESIK-PROTACs und der verwendeten FESIK-Vorstufen **223** und **226** aufgeführt. Zur besseren Vergleichbarkeit der Daten sind zudem die von LDC erhobenen biologischen Daten der Referenzverbindung BI-2852 (**23**) angegeben. Im KRAS4B^{G12D}/SOS-Austauschassay erzielte BI-2852 (**23**) einen IC₅₀-Wert von $18.0 \pm 5.6 \mu\text{M}$ für die G12D-Mutante bzw. $13.4 \mu\text{M}$ für den Wildtyp. Die synthetisierten Verbindungen zeigten in diesem Assay alle Werte im einstelligen millimolaren Bereich. Sowohl Verbindung **223** als auch **226** wiesen zudem mikromolare Werte für den Wildtyp des KRAS-Proteins auf, was angesichts der angestrebten Wirkung eher kontraproduktiv erscheint. Biologische Daten der Verbindung **218**, auf der die FESIK-PROTACs basieren, liegen nicht vor.

Tabelle 12: Biologische Daten der FESIK-PROTACs und der verwendeten FESIK-Präkursoren **223** und **226** im Vergleich zur Referenzverbindung BI-2852 (23).

KRAS4B ^{GDP} /SOS-Austauschassay (IC ₅₀ [μM])		Zellulare Aktivität (CTG-Assay) (IC ₅₀ [μM])		HTRF-pERK AGSo (IC ₅₀ [μM])	SPR-Assay (% Rmax)	
G12D	WT	SNU-1 (G12D)	RKo (WT)		KRAS ^{G12D}	SOS1
23	18.0±5.6	13.4	>30	>30	26.2±4.9	91
223	2827±114	619±188	n.b.	n.b.	>30	n.b.
226	1002±35	420±45	n.b.	n.b.	>30	n.b.
227	1113	1756	>30	>30	>30 (0.4)	43
228	>3000	683±232	>30	>30	>30	34
229	>300	>300	>30	>30	>30	27

Eine mögliche Erklärung für die mangelnde Aktivität von Verbindung **223** und **226** könnte der Einsatz als Enantiomerengemisch sein. FESIK *et al.* konnte für das Enantiomer von BI-2852 (**23**) eine Verschlechterung der Protein-Protein-Interaktion von GDP-KRAS^{G12D} und SOS1 um den Faktor 10 feststellen.⁵⁴ Obwohl keine Daten für die PROTACs mit enantiomerenreinem FESIK-Ligand vorliegen, lässt sich anhand der erhaltenen Daten vermuten, dass sie die Werte von BI-2852 (**23**) nicht erreichen würden.

Im CTG-Assay konnte LDC keine Inhibierung des Zellwachstums durch BI-2852 (**23**) feststellen, was auch für die drei FESIK-PROTACs gilt. Das Fehlen dieser Inhibierung lässt darauf schließen, dass die hergestellten PROTACs nicht ihren beabsichtigten Zweck erfüllen. Dies wird auch im HTRF-Assay bestätigt, bei dem kein Einfluss auf die Konzentration von pERK festgestellt wurde. Obwohl die SPR-Messungen der PROTAC-Verbindungen an KRAS^{G12D} und SOS1 eine gewisse Affinität zeigten, scheint dies aufgrund des hohen Molekulargewichts der Verbindungen nicht überraschend zu sein. Die Verwendung eines vermeintlich bindenden Liganden in Kombination mit der Länge und Größe des PROTAC-Systems führt wahrscheinlich zu einer Vielzahl von Wechselwirkungen mit der Proteinoberfläche. Die erhaltenen biologischen Daten deuten darauf hin, dass die FESIK-PROTACs unwirksam sind und ihren beabsichtigten Zweck verfehlten. Eine genauere Beurteilung des PROTAC-Effekts dieser Verbindungen ist jedoch erst nach der Durchführung des PROTAC-Assay seitens LDC möglich.

5 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Dissertation wurden verschiedene Ansätze zur gezielten Inhibierung des KRAS4B^{G12D}-Proteins untersucht. Ein besonderer Schwerpunkt lag auf der Modifikation zweier bisphenolischer Liganden (**46** und **47**), die ursprünglich in der Arbeitsgruppe SCHERKENBECK entwickelt wurden.¹⁰⁸ Die Derivatisierung dieser Liganden führte zur Synthese mehrerer strukturverwandter Verbindungen, die anschließend auf ihre biologische Aktivität hin untersucht wurden.

Nach der Durchführung diverser *in-silico*-Berechnungen an verschiedenen Kristallstrukturen mit Fokus auf die SI/II-Bindestelle wurden mehrere Strukturkonzepte entwickelt. Diese Konzepte hatten das Ziel, die strukturellen Eigenschaften der ursprünglichen Verbindungen zu integrieren, dem System mehr Stabilität zu verleihen und dadurch gegebenenfalls die biologische Aktivität zu steigern.

Lediglich eine geringe Anzahl dieser neu identifizierten Verbindungen wies eine höhere Aktivität im Vergleich zu den Referenzverbindungen im KRAS4B^{GDP}/SOS-Austauschassay auf. Diejenigen Verbindungen, welche im CTG-Assay aktiv waren, wiesen zudem keine mutationsspezifische Wirkung auf. Obgleich die Verbindung im KRAS4BGDP/SOS-Austauschassay als inaktiv bewertet wurde, konnte mit Verbindung **71** eine Verbindung mit einer einstellig mikromolaren Aktivität im CTG-Assay synthetisiert werden. Im Vergleich zur Referenzverbindung **46** wurde lediglich der DHBP-Grundkörper durch 2,7-Dihydroxyfluorenon ausgetauscht. Dieses Vorgehen resultierte in einer geringfügigen Verschlechterung der Wirkung im Austauschassay, jedoch in einer Erhöhung der Wirkung im CTG-Assay um das Dreifache. Eine detaillierte Analyse des Wirkmechanismus der Verbindungen **71**, **72** und **74** konnte aufgrund weiterer noch ausstehender Untersuchungen nicht durchgeführt werden. Die Inaktivität im Austauschassay lässt lediglich den Schluss zu, dass es sich hierbei nicht um eine direkte Inhibierung des GDP/GTP-Austauschs handelt.

Ein weiteres Hindernis bei der Entwicklung eines potennten Inhibitors war die Veröffentlichung von MRTX1133 (**34**), einem Inhibitor mit nanomolarer Inhibition des KRAS^{G12D}-Proteins.⁶² Diese Veröffentlichung setzte einen neuen Standard und erschwerte die Entwicklung eines vergleichbar potennten Inhibitors erheblich. Trotz intensiver *in silico*-Berechnungen zur Analyse verschiedener Screening-Bibliotheken, die sich auf die von MRTX1133 (**34**) induzierte SII-Bindetasche fokussierten, konnten keine Verbindungen mit konkurrierender Aktivität identifiziert werden. Die ausgewählten und synthetisierten Verbindungen blieben ohne signifikante Aktivität, wie bereits detailliert in **Kapitel 4.2.6** dieser Arbeit beschrieben. Eine

Analyse der Ergebnisse der Verbindungen für beide bekannten Bindetaschen in Relation zu den literaturbekannten Verbindungen zeigt, dass trotz guter *docking scores* und *glide emodel*-Werte sowie sinnvoller Positionen innerhalb der Bindetaschen und ähnlicher Wechselwirkungen wie bei den Referenzverbindungen, die biologischen Daten enttäuschend ausfallen.

Die Problematik beider Ansätze, sowohl für die SI/II- als auch für die SII-Bindetasche, wurde erst nach Erhalt der biologischen Daten offensichtlich und resultiert aus der Starrheit innerhalb der *Glide*-Berechnungen. In beiden Fällen wurden die Liganden in ein statisches, nicht bewegliches System integriert. In beiden Fällen wurde die Bindetasche der Kristallstruktur bereits durch den ursprünglichen Liganden geformt, sodass keine Induktion der Bindetasche erforderlich ist. Wasseratome, die potenziell an Wechselwirkungen beteiligt sein könnten, wurden durch den ursprünglichen Liganden aus der Bindetasche verdrängt, mit Ausnahme des Wassermoleküls bei MRTX1133 (34). Die vorliegenden Berechnungen der unterschiedlichen Wasserzustände innerhalb dieser Dissertation sowie das Netzwerk aus Wechselwirkungen zwischen einem Wassermolekül und MRTX1133 (34) verdeutlichen die Relevanz von Wasser und einer damit einhergehenden Flexibilität des Systems.

In Bezug auf die Analyse von Protein-Ligand-Wechselwirkungen ist festzuhalten, dass *Glide*-Rechnungen zwar wertvolle Einblicke liefern, jedoch keine vollständige Erfassung der Komplexität dieser Wechselwirkungen ermöglichen. Eine fundierte, strukturbasierte Wirkstoffentwicklung erfordert eine ganzheitliche Herangehensweise, bei der *in silico*-Berechnungen durch experimentelle Daten ergänzt werden. Insbesondere die Kombination aus Kristallstrukturaufnahmen, SAR-Studien und biologischen Assays ist von entscheidender Bedeutung, um präzise Vorhersagen zu treffen und die Bindungseigenschaften potenzieller Inhibitoren zielgerichtet zu optimieren. Nur durch einen multidisziplinären Ansatz kann eine effektive Hemmung des KRAS4B^{G12D}-Proteins, wie es das Beispiel MRTX1133 (34) zeigt, erzielt werden.

Neben der direkten Inhibierung des KRAS-Proteins wurden zwei Konzepte für die PROTAC-Synthese entwickelt, welche auf bekannten KRAS-Liganden basieren. Acht PROTAC-Systeme auf der von STOCKWELL *et al.* publizierten und von SCHERKENBECK *et al.* modifizierten Verbindung 54 wurden erfolgreich synthetisiert, wobei lediglich PROTAC 210 eine gewisse Aktivität innerhalb der Zelle zeigte. Aufgrund der bislang nicht durchgeführten Messungen im von LDC entwickelten PROTAC-Assay konnte die Frage, ob diese Aktivität auf dem PROTAC-Prinzip beruht, nicht abschließend beantwortet werden. FESIK-basierte PROTACs zeigten keine aussagekräftigen Ergebnisse. Einige dieser Verbindungen wiesen minimale

Aktivität im SOS-Austauschassay vor, waren jedoch im direkten Vergleich mit Referenzverbindung BI-2852 (**23**) wirkungslos. Es sei erneut darauf verwiesen, dass es sich bei dem verwendeten Warhead nicht um die Referenzverbindung BI-2852 (**23**) handelt. Der verwendete Warhead (Verbindung **218**) konnte zwar auch als Racemat niedrige dreistellige mikromolare Werte erzielen, diese Werte spiegelten sich jedoch nicht in den synthetisierten PROTACs wider.⁵⁴

In vorangehenden Untersuchungen an PROTACs aus der Arbeitsgruppe SCHERKENBECK konnte darüber hinaus festgestellt werden, dass die Verbindungen mit hoher Effizienz aus der Zelle transportiert werden. Analog durchgeführte Untersuchungen zu den hier abgebildeten PROTACs liegen nicht vor. Sollte sich jedoch eine PROTAC-induzierte Aktivität bei PROTAC **210** nachweisen lassen, so würde dies, in Kombination mit den zuvor beschriebenen Erkenntnissen, die hohe Relevanz des Linker-Designs bestätigen. Eine Vorhersage der Löslichkeit sowie des Verhaltens an der Zellwand und innerhalb des Zellmediums ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht möglich. Diesbezüglich können lediglich durch biologische Untersuchungen valide Aussagen getroffen werden. Des Weiteren ist es aus technischer Perspektive gegenwärtig nicht möglich, mit den von *Glide* bereitgestellten Berechnungen einen trimeren Komplex aus POI, PROTAC und Ligase zu modellieren. Dies führt dazu, dass aktuell kein optimaler Linker berechnet werden kann, was eine empirische Ermittlung des Linkers für jeden Warhead und jede Ligase-Rekrutiereinheit erforderlich macht.

Die Entwicklung eines adäquaten Modells zur Berechnung eines optimalen Linker-Systems würde das Forschungsgebiet der PROTACs signifikant vorantreiben. Jedoch demonstrierten bereits die Berechnungen an der SI/II- bzw. SII-Bindetasche die essenzielle Bedeutung der Bewahrung der Flexibilität bei solchen Berechnungen. Ein Komplex aus drei Strukturen, die eine freie Beweglichkeit aufweisen sollten, und dennoch eine Interaktion zu simulieren, scheint unter den gegenwärtigen technischen Möglichkeiten nicht realisierbar zu sein.

6 Experimentalteil

6.1 Allgemeine Angaben zur Laborpraxis

6.1.1 Informationen zu Chemikalien, Lösungsmittel, Glas- und Laborgeräte

In sämtlichen durchgeführten Experimenten stammten die verwendeten Chemikalien von den Unternehmen *Alfa Aesar*, *Fischer Scientific*, *ABCR*, *Fluorochem*, *Sigma-Aldrich*, *TCI*, *Chempur*, *VWR*, *Enamine* oder *BLD*. Falls erforderlich, wurden die Substanzen vor dem Einsatz mittels Kristallisation, Destillation oder anderer etablierter Methoden gereinigt. Die eingesetzten Lösungsmittel wurden entweder in Reinform bezogen oder gemäß gängiger Verfahren gereinigt und getrocknet. Die Lösungsmittel Dichlormethan, Tetrahydrofuran, Acetonitril und Diethylether wurden einem Lösungsmittelreinigungssystem der Firma *MBraun* (MB-SPS-800) entnommen, falls redestillierte oder HPLC-Grade Lösungsmittel qualitativ nicht ausreichend waren. Dimethylformamid wurde vor der Verwendung, um enthaltenes Dimethylamin zu entfernen, frisch mit Helium entgast.

Zur Entfernung der Lösungsmittel kamen Rotationsverdampfer der *IKA GmbH & Co. KG*, der *Büchi Labortechnik GmbH* sowie Vakuumpumpen der Firma *Vacuubrand* zum Einsatz. Für die Gefriertrocknung wässriger Lösungen wurde eine Lyophilisationsanlage der Firma *Zirbus* verwendet (GOT2000).

Für wasserempfindliche Reaktionen wurden die verwendeten Glasgeräte und sonstige Materialien zunächst mehrere Stunden im Trockenschrank vorgetrocknet und anschließend mehrfach unter Erhitzen evakuiert. Daraufhin kamen konventionelle Schlenk-Techniken zur Anwendung, um unter Argon-Atmosphäre zu arbeiten.

Mikrowellenreaktionen wurden mit einem *CEM Discover System* Mikrowellenreaktor durchgeführt.

6.1.2 Reaktionskontrollen

Zur Überprüfung des Reaktionsfortschritts oder der Zusammensetzung von Fraktionen während der Säulenchromatographie wurden Dünnschichtchromatographien durchgeführt. Hierbei kamen Aluminium-Fertigfolien mit fluoreszenzmarkiertem Kieselgel (ALUGRAM® Xtra SIL G/UV₂₅₄ oder ALUGRAM® RP 18W/UV₂₅₄) der Firma *Macherey-Nagel* zum Einsatz. Die Detektion der Verbindungen erfolgte durch Fluoreszenz-Lösung unter UV-Licht (254 nm) und/oder durch Anfärbung. Dabei wurden die Platten in unten aufgeführte Lösungen getaucht und anschließend mit einem Heißluftgebläse entwickelt.

Kaliumpermanganatlösung: 3.0 g KMnO₄, 20 g K₂CO₃, 5.0 mL NaOH (w = 5%), 300 mL H₂O.

Cer-Molybdatophosphorsäurelösung: 5.0 g Molybdatophosphorsäure, 200 mL H₂O, 16 mL konz. H₂SO₄, 2.0 g Ce(SO₄)₂.

Ninhydrinlösung: 1.5 g Ninhydrin, 100 mL *n*-BuOH, 3.0 mL AcOH.

Zusätzlich zu den oben beschriebenen Methoden zur Überwachung des Reaktionsfortschritts wurden HPLC-MS-Messungen durchgeführt. Diese erfolgten mithilfe einer *Shimadzu Prominence-i LC-2030C 3D Plus* gekoppelt mit einer *Shimadzu LCMS-2020*. Als HPLC-Säulen kam eine EC 150/3 NUCLEODUR C18 Gravity-SB (5 µm) der Firma *Macherey-Nagel* zum Einsatz. Diese wurde später durch eine *Raptor ARC-18* 1.8 µm 50x2.1 mm

6.1.3 Säulenchromatographische Aufarbeitung

Die säulenchromatographische Aufarbeitung von Substanzgemischen wurde unter Verwendung von Kieselgel 60 M der Firma *Macherey-Nagel* (Partikeldurchmesser 40 – 63 µm, Porendurchmesser 60 Å) sowie vorgepackten Kieselgelkartuschen verschiedener Größen der Firma *Interchim* (PF-15SIHP oder PF-30SIHP) durchgeführt. Die Trennung in der Normalphase erfolgte in der Regel an einer *puriFlash® XS 420* der Firma *Interchim* oder mittels DCVC. Umkehrphasentrennungen wurden an einer *puriFlash® 4250* der Firma *Interchim* durchgeführt. Hierbei wurden verschiedene Flash-Kartuschen unterschiedlicher Größe der Firma *Interchim* (PF-15C18AQ) oder eine präparative HPLC-Säule der Firma *Macherey-Nagel* (SP 250/21 NUCLEODUR 100-5 C18 ec) verwendet. Bei der Normalphasentrennung wurden Lösungsmittel technischer Reinheit, welche redestilliert wurden, eingesetzt. Für die Umkehrphasentrennungen kamen ausschließlich Lösungsmittel in HPLC-Qualität zum Einsatz.

6.1.4 Analytische Messungen der erhaltenen Verbindungen

6.1.4.1 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Die NMR-Spektren wurden von der NMR-Abteilung der Bergischen Universität Wuppertal an Spektrometern der Modelle *Bruker Avance 400* (¹H-Basisfrequenz: 400.13 MHz) und *Bruker Avance III 600* (¹H-Basisfrequenz: 600.13 MHz) aufgenommen. Alle Spektren wurden ausschließlich unter Verwendung deuterierter Lösungsmittel erfasst. Für sämtliche NMR-Spektren sind die Kopplungskonstanten *J* in Hz und die chemischen Verschiebungen *δ* in ppm angegeben.

6.1.4.2 Massenspektrometrie (HPLC-MS und HRMS)

DIE HRMS-Daten wurden an einem *Bruker micrOTOF*-Spektrometer durch die MS-Routineabteilung der Bergischen Universität Wuppertal erhoben. Für die HPLC-MS-Messungen wurde dieses System mit einem Gerät der *Agilent 1100 Serie* gekoppelt (Methode I). Selbstständig durchgeführte HPLC-MS-Messungen erfolgten an dem in Kapitel **6.1.2** beschriebenen System (Methode II)

- Methode I: Bruker micrOTOF + Agilent 1100 Serie; HPLC-Säule: Perfect Sil Target ODS-3 HD 5 μ M 100x4.6 mm; Gradient: 90% H₂O (5 mM NH₄OAc) bis 90% MeCN; 24 min; 1.5 mL/min; 220 nm oder 254 nm; ESI: positiv und /oder negativ.
- Methode II: Shimadzu LCMS-2020 + Shimadzu Prominence-I *LC-2030C 3D Plus*; HPLC-Säule: EC 150/3 NUCLEODUR C18 Gravity-SB (5 μ m) bzw. *Raptor* ARC-18 1.8 μ m 50x2.1 mm; Gradient: 95% H₂O (0.1% HCOOH) bis 95% MeCN (0.1% HCOOH); 16 min, 400 μ L/min; 200 – 800 nm; ESI: positiv und/oder negativ.

Die Masse-zu-Ladungsverhältnisse (m/z), die während der Messungen detektiert wurden, sind in der Einheit u aufgeführt. die angegebenen Werte beziehen sich im Allgemeinen auf die Isotope mit der dominierenden natürlichen Häufigkeit.

6.1.4.3 IR-Spektrometrie

Infrarot-Spektren wurden mit einem Bruker Alpha FT-IR-Spektrometer aufgenommen. Die Proben wurden entweder als Reinsubstanzen oder nach dem Verdampfen des Lösungsmittels aus einer Lösung analysiert. Feststoffe wurden auf einem Träger aufgebracht und mit einem Diamantstempel gepresst. Rückstände aus verdampften Lösungen wurden als dünner Film vermessen.

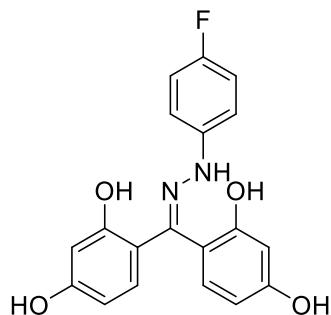
6.2 Synthesevorschriften

6.2.1 Benzophenon-Derivate und strukturähnliche Verbindungen

4,4'-(2-(4-Fluorphenyl)hydrazineyliden)methylen)bis(benzol-1,3-diol)

(69, DAG-039)

In einem 25 mL Rundkolben wurde 4-Fluorophenylhydrazin-Hydrochlorid (505 mg, 1.5 Äq., 3.05 mmol, 98%) in 5 mL Methanol gelöst. Nach Zugabe von Eisessig (0.348 mL, 3 Äq. 6.08 mmol) wurde das Reaktionsgemisch unter Rühren auf 50 °C erwärmt. Nach vollständigem Lösen des Hydrazins wurde eine MeOH-Lösung (7 mL) von Bis(2,4-dihydroxyphenyl)methanon (500 mg, 1 Äq., 2.03 mmol) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 12 h bei 50 °C gerührt. Anschließend wurde der Ansatz am Rotationsverdampfer auf 1/8 des ursprünglichen Volumens eingeengt und mit H₂O (15 mL) versetzt. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3x 15 mL) extrahiert. Die vereinte organische Phase wurde mit ges. NaHCO₃-Lösung (15 mL) gewaschen und anschließend über Na₂SO₄ getrocknet. Das erhaltene Rohprodukt wurde anschließend mittels RP-Flash-Chromatographie (H₂O/MeCN-Gradient) gereinigt. Es wurde ein leicht braunes Pulver mit einer Ausbeute von 27.4% (196.9 mg, 0.56 mmol) erhalten.



¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 12.68 (s, 1H), 9.59 (bs, 3H), 8.49 (s, 1H), 7.11 – 6.96 (m, 4H), 6.85 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.53 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.49 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.41 (dd, *J* = 8.3, 2.3 Hz, 1H), 6.30 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.17 (dd, *J* = 8.6, 2.4 Hz, 1H) ppm.

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆): δ = 159.6, 158.8, 158.7, 157.2, 155.9, 154.8, 148.7, 141.4, 130.7, 130.1, 115.7, 115.5, 113.4, 113.3, 113.0, 108.9, 107.4, 106.5, 103.2, 102.7 ppm.

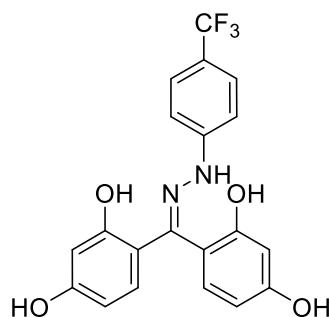
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3617 (w), 3286 (w), 2971 (w), 1599 (m), 1509 (s), 1460 (w), 1411 (w), 1319 (w), 1306 (w), 1255 (s), 1214 (w), 1174 (m), 1118 (m), 979 (m), 960 (w), 820 (s) cm⁻¹.

LCMS (ESI+): t_R = 8.6 min (Methode II) m/z (% relative Intensität): 355.1 [M+H]⁺ (100)

HR-ESI-MS: (C₁₉H₁₆FN₂O₄⁺) ber.: 355.1089 gef.: 355.1092

**4,4'-(2-(4-(Trifluormethyl)phenyl)hydrazineyliden)methylen)bis(benzol-1,3-diol)
(70, DAG-070)**

In einem 25 mL Rundkolben wurde 4-Trifluormethylphenylhydrazin (67.8 mg, 1.5 Äq., 0.37 mmol, 95%) in 3 mL Methanol gelöst. Nach Zugabe von Eisessig (42 µL, 3.0 Äq., 31 mmol) wurde das Reaktionsgemisch unter Rühren auf 50 °C erwärmt. Nach vollständigem Lösen des Hydrazins wurde eine MeOH-Lösung (2 mL) von Bis(2,4-dihydroxyphenyl)methanon (60.0 mg, 1.0 Äq., 0.24 mmol) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 12 h bei 50 °C gerührt. Anschließend wurde der Ansatz am Rotationsverdampfer auf 1/8 des ursprünglichen Volumens eingeengt und mit H₂O (15 mL) versetzt. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3x 15 mL) extrahiert. Die vereinte organische Phase wurde mit ges. NaHCO₃-Lösung (15 mL) gewaschen und anschließend über Na₂SO₄ getrocknet. Das erhaltene Rohprodukt wurde anschließend mittels RP-Flash-Chromatographie (H₂O/MeCN-Gradient) gereinigt. Es wurde ein leicht gelbliches Pulver mit einer Ausbeute von 71.0% (70.4 mg, 0.17 mmol) erhalten.



¹H NMR (400 MHz, MeOH-d₄): δ = 7.48 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.03 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.91 (dt, *J* = 8.5, 1.0 Hz, 1H), 6.67 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 6.54 – 6.48 (m, 2H), 6.38 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.20 (dd, *J* = 8.7, 2.5 Hz, 1H) ppm.

¹³C NMR (101 MHz, MeOH-d₄): δ = 161.5, 160.8, 160.5, 157.3, 152.0, 148.7, 132.2, 132.1, 130.3, 127.6, 127.5, 127.5, 124.9, 122.3, 122.24 122.0, 121.7, 121.3, 114.5, 112.9, 110.7, 108.9, 107.8, 104.2, 103.9 ppm.

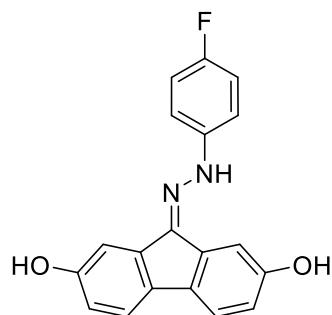
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3290 (w), 1613 (s), 1520 (m), 1063 (s) cm⁻¹.

LCMS (ESI+): *t*_R = 8.5 min (Methode II) m/z (% relative Intensität): 405.0 [M+H]⁺ (100)

HR-ESI-MS: (C₂₀H₁₄F₃N₂O₄⁻) ber.: 403.0911 gef.: 403.0909

9-(2-(4-Fluorophenyl)hydrazineyliden)-9H-fluoren-2,7-diol
(71, DAG-040)

In einem 25 mL Rundkolben wurde 4-Fluorophenylhydrazin-Hydrochlorid (586 mg, 1.5 Äq., 3.53 mmol, 98%) in 5 mL MeOH gelöst. Nach Zugabe von Eisessig (0.404 mL, 3 Äq. 7.06 mmol) wurde das Reaktionsgemisch unter Rühren auf 50 °C erwärmt. Nach vollständigem Lösen des Hydrazins wurde eine MeOH-Lösung (7 mL) von 2,7-Dihydroxy-9-fluorenon (500 mg, 1 Äq., 2.03 mmol) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 12 h bei 50 °C gerührt. Anschließend wurde der Ansatz am Rotationsverdampfer auf 1/8 des ursprünglichen Volumens eingeengt und mit H₂O (15 mL) versetzt. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3x 15 mL) extrahiert. Die vereinte organische Phase wurde mit ges. NaHCO₃-Lösung (15 mL) gewaschen und anschließend über Na₂SO₄ getrocknet. Das erhaltene Rohprodukt wurde anschließend mittels RP-Flash-Chromatographie (H₂O/MeCN-Gradient) gereinigt. Es wurde ein leicht gelbliches Pulver mit einer Ausbeute von 38.0% (286.9 mg, 0.90 mmol) erhalten.



¹H NMR (400 MHz, MeOH-d₄): δ = 7.57 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.46 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.41 – 7.35 (m, 3H), 7.21 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.05 (t, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.83 (dd, *J* = 8.1, 2.1 Hz, 1H), 6.72 (dd, *J* = 8.1, 2.3 Hz, 1H) ppm.

¹³C NMR (101 MHz, MeOH-d₄): δ = 160.2, 158.6, 157.7, 157.5, 143.5, 142.6, 141.0, 134.8, 132.6, 132.4, 120.8, 120.4, 117.0, 116.5, 116.4, 116.3, 116.1, 116.0, 114.0, 108.4 ppm.

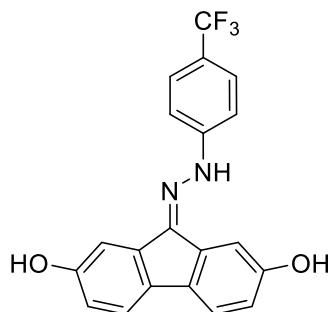
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3176 (w), 2980 (w), 1613 (w), 1578 (m), 1508 (s), 1475 (w), 1458 (m), 1160 (s), 878 (m), 829 (w), 816 (s), 775 (w), 741 (w), 711 (m), 503 (m), 451 (w), 424 (m) cm⁻¹.

LCMS (ESI+): t_R = 8.3 min (Methode B) m/z (% relative Intensität): 321.0 [M+H]⁺ (100)

HR-ESI-MS: (C₁₉H₁₂FN₂O₂⁻) ber.: 319.0888 gef.: 319.0892

**9-(2-(4-(Trifluormethyl)phenyl)hydrazinyliden)-9*H*-fluoren-2,7-diol
(72, DAG-061)**

In einem 25 mL Rundkolben wurde 4-Trifluormethylphenylhydrazin (77.1 mg, 1.5 Äq., 0.42 mmol, 95%) in 3 mL MeOH gelöst. Nach Zugabe von Eisessig (47 µL, 3.0 Äq., 35.2 mmol) wurde das Reaktionsgemisch unter Rühren auf 50 °C erwärmt. Nach vollständigem Lösen des Hydrazins wurde eine MeOH-Lösung (2 mL) von 2,7-Dihydroxy-9-fluorenon (60.0 mg, 1.0 Äq., 0.28 mmol, 98%) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 12 h bei 50 °C gerührt. Anschließend wurde der Ansatz am Rotationsverdampfer auf 1/8 des ursprünglichen Volumens eingeengt und mit H₂O (15 mL) versetzt. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3x 15 mL) extrahiert. Die vereinte organische Phase wurde mit ges. NaHCO₃-Lösung (15 mL) gewaschen und anschließend über Na₂SO₄ getrocknet. Das erhaltene Rohprodukt wurde anschließend mittels RP-Flash-Chromatographie (H₂O/MeCN-Gradient) gereinigt. Es wurde ein leicht gelbliches Pulver mit einer Ausbeute von 59.1% (60.6 mg, 0.16 mmol) erhalten.



¹H NMR (400 MHz, MeOH-d₄): δ = 7.61 – 7.56 (m, 3H), 7.51 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.44 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.36 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.22 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.84 (dd, *J* = 8.2, 2.2 Hz, 1H), 6.74 (dd, *J* = 8.1, 2.4 Hz, 1H ppm.

¹³C NMR (101 MHz, MeOH-d₄): δ = 157.8, 157.6, 150.1, 144.7, 140.8, 135.2, 132.7, 132.5, 127.3, 127.4, 125.0, 123.3, 120.9, 120.5, 117.4, 116.8, 114.5, 114.4, 108.8 ppm.

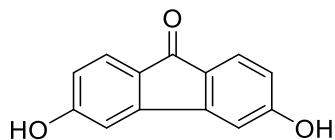
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3273 (m, -OH), 1614 (s, -NH), 1575 (m, Aromat), 1432 (w, Aromat), 1385 (w), 1322 (s, -NH) cm⁻¹.

LCMS (ESI+): *t*_R = 9.3 min (Methode II) *m/z* (% relative Intensität): 370.9 [M+H]⁺ (100)

HR-ESI-MS: (C₂₀H₁₂F₃N₂O₂⁻) ber.: 369.0856 gef.: 369.0856

3,6-Dihydroxy-9H-fluoren-9-on**(76, DAG-048)**

In einem trockenem 25 mL Schlenkgefäß wurden 4,4-DHBP (200 mg, 1 Äq., 0.93 mmol), Pd(Ac)₂ (10.5 mg, 0.05 Äq., 0.05 mmol), Ag₂O (349 mg, 1.5 Äq., 1.40 mmol, 93%) und K₂CO₃ (324 mg, 2.5 Äq., 2.33 mmol) vorgelegt. Die Apparatur wurde mehrfach evakuiert und mit Argon gespült. Anschließend wurde über ein Septum am Rückflusskühler 4 mL TFA hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend für 24 h bei 140 °C unter Rückfluss erhitzt. Nach vollständigem Umsatz des Edukts, wurde TFA abdestilliert und der Rückstand wurde weitestgehend unter Vakuum getrocknet. Anschließend wurde der Rückstand mittels Flash-Chromatographie (CH/EtOAc-Gradient) aufgereinigt. Es wurde ein orangener Feststoff mit einer Ausbeute von 37.4% (74.1 mg, 0.35 mmol) erhalten.



¹H NMR (400 MHz, MeOH-d₄): δ = 7.40 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 6.93 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H), 6.64 (dd, *J* = 8.1, 2.1 Hz, 2H) ppm.

¹³C NMR (101 MHz, MeOH-d₄): δ = 193.7, 165.4, 147.8, 128.0, 126.8, 115.9, 109.2 ppm.

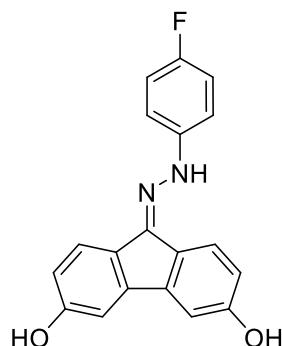
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3258 (m), 2980 (w), 1651 (m), 1574 (s), 1486 (w), 1472 (w), 1449 (m), 1409 (w), 1353 (w), 1311 (w), 1264 (w), 1246 (m), 1206 (s), 1186 (w), 1105 (m), 1086 (w), 1021 (w), 930 (m), 864 (m), 826 (w), 778 (m), 708 (w), 680 (s), 648 (w), 609 (w), 553 (w), 501 (w), 424 (w) cm⁻¹.

LCMS (ESI+): *t*_R = 5.4 min (Methode I) m/z (% relative Intensität): 213.0 [M+H]⁺ (100)

HR-ESI-MS: (C₁₃H₇O₃⁻) ber.: 211.0401 gef.: 211.0402

9-(2-(4-Fluorphenyl)hydrazineyliden)-9H-fluoren-3,6-diol
(73, DAG-049)

In einem 5 mL Rundkolben wurde 4-Fluorphenylhydrazin-hydrochlorid (20.2 mg, 1.5 Äq., 0.12 mmol, 98%) in 1 mL MeOH gelöst. Nach Zugabe von Eisessig (14 µL, 3 Äq., 0.24 mmol) wurde das Reaktionsgemisch unter Rühren auf 50 °C erwärmt. Nach vollständigem Lösen des Hydrazins wurde eine MeOH-Lösung (1 mL) von Verbindung **76** (17.2 mg, 1 Äq., 0.08 mmol) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 12 h bei 50 °C gerührt. Anschließend wurde der Ansatz am Rotationsverdampfer auf 1/8 des ursprünglichen Volumens eingeengt und mit H₂O (15 mL) versetzt. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3x 15 mL) extrahiert. Die vereinte organische Phase wurde mit ges. NaHCO₃-Lösung (15 mL) gewaschen und anschließend über Na₂SO₄ getrocknet. Das erhaltene Rohprodukt wurde anschließend mittels RP-Flash-Chromatographie (H₂O/MeCN-Gradient) gereinigt. Es wurde ein leicht gelbliches Pulver mit einer Ausbeute von 38.0% (286.9 mg, 0.90 mmol) erhalten.



¹H NMR (400 MHz, MeOH-d₄): δ = 8.05 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.66 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.40 – 7.33 (m, 2H), 7.16 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.10 – 7.00 (m, 3H), 6.83 (dd, *J* = 8.3, 2.3 Hz, 1H), 6.77 (dd, *J* = 8.2, 2.2 Hz, 1H) ppm.

¹³C NMR (101 MHz, MeOH-d₄): δ = 160.4, 159.8, 159.5, 158.2, 144.6, 144.2, 143.4, 141.3, 132.1, 127.9, 124.5, 122.8, 116.4, 116.2, 116.0, 115.8, 115.2, 108.3, 107.2 ppm.

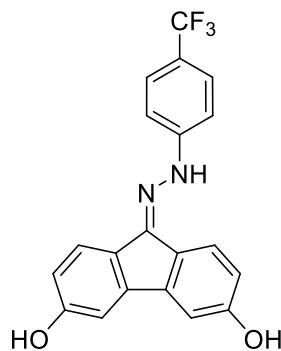
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3316 (w), 2980 (w), 1610 (m), 1514 (m), 1473 (w), 1447 (m), 1393 (w), 1339 (w), 1299 (w), 1242 (w), 1210 (m), 1162 (s), 1126 (m), 1096 (w), 1080 (w), 938 (w), 835 (w), 820 (s), 744 (w), 707 (m), 631 (m), 600 (w), 505 (w), 443 (w), 416 (w) cm⁻¹.

LCMS (ESI+): *t*_R = 8.6 min (Methode I) *m/z* (% relative Intensität): 321.0 [M+H]⁺ (100)

HR-ESI-MS: (C₁₉H₁₄FN₂O₂⁺) ber.: 321.1034 gef.: 321.1038

9-(2-(4-(Trifluormethyl)phenyl)hydrazineyliden)-9H-fluoren-3,6-diol
(74, DAG-062)

In einem 25 mL Rundkolben wurde 4-Trifluormethylphenylhydrazin (21 mg, 1.5 Äq., 0.11 mmol, 95%) in 3 mL Methanol gelöst. Nach Zugabe von Eisessig (13 µL, 3.0 Äq., 0.23 mmol) wurde das Reaktionsgemisch unter Rühren auf 50 °C erwärmt. Nach vollständigem Lösen des Hydrazins wurde eine Methanol-Lösung (2 mL) von DAG-048 (16 mg, 1.0 Äq., 0.08 mmol) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 12 h bei 50 °C gerührt. Anschließend wurde der Ansatz am Rotationsverdampfer auf 1/8 des ursprünglichen Volumens eingeengt und mit Wasser (15 mL) versetzt. Die wässrige Phase wurde mit Essigsäureethylester (3x 15 mL) extrahiert. Die vereinte organische Phase wurde mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung (15 mL) gewaschen und anschließend über Na₂SO₄ getrocknet. Das erhaltene Rohprodukt wurde anschließend mittels RP-Flash-Chromatographie (Wasser/Acetonitril-Gradient) gereinigt. Es wurde ein leicht gelbliches Pulver mit einer Ausbeute von 63.7% (17.8 mg, 0.05 mmol) erhalten.



¹H NMR (400 MHz, MeOH-d₄): δ = 8.03 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.65 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.55 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.47 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.12 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.04 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.80 (dd, *J* = 8.4, 2.3 Hz, 1H), 6.74 (dd, *J* = 8.2, 2.2 Hz, 1H) ppm.

¹³C NMR (101 MHz, MeOH-d₄): δ = 160.8, 160.0, 150.6, 145.1, 145.0, 141.7, 131.8, 128.2, 127.2 (d, *J* = 3.9 Hz), 126.4 (d, *J* = 269.7 Hz), 124.2, 123.2, 122.5 (d, *J* = 32.3 Hz), 116.0, 115.2, 114.2, 108.4, 107.3 ppm.

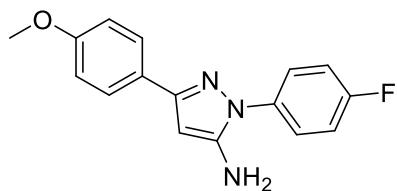
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3339 (w, -OH), 1613 (s, -NH), 1451 (w, Aromat), 1327 (s, -NH) cm⁻¹.

LCMS (ESI+): t_R = 9.7 min (Methode II) m/z (% relative Intensität): 371.0 [M+H]⁺ (100)

HR-ESI-MS: (C₂₀H₁₂F₃N₂O₂⁻) ber.: 369.0856 gef.: 369.0857

**1-(4-Fluorphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)-1*H*-pyrazol-5-amin
(80, DAG-051)**

In einem 25 mL Rundkolben wurde 4-Methoxybenzoylacetonitril (199.3 mg, 1 Äq., 1.1 mmol, 97.0%) in Eisessig (2.5 mL) und abs. EtOH gelöst. Zu dieser Reaktionslösung wurde 4-Fluorphenylhydrazin-Hydrochlorid (366.2 mg, 2 Äq., 2.21 mmol, 98%) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht (12 h) bei 100 °C unter Reflux gerührt. Nach vollständigem Umsatz der Ausgangsmaterialien wurde das Lösungsmittel unter verminderterem Druck entfernt und der Rückstand in DCM (20 mL) gelöst. Die organische Phase wurde mit gesättigter NaHCO₃-Lösung (20 mL) und gesättigter NaCl-Lösung (20 mL) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter verminderterem Druck entfernt und das so erhaltene Rohprodukt wurde mittels RP-Flash-Chromatographie (H₂O/MeOH-Gradient) aufgereinigt. Es wurde ein bräunlicher Feststoff mit einer Ausbeute von 63.7% (199.2 mg, 0.70 mmol) erhalten.



¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ = 7.70 – 7.63 (m, 4H), 7.32 (t, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.95 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 5.84 (s, 1H), 5.40 (s, 2H), 3.77 (s, 3H) ppm.

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-d₆): δ = 161.0, 159.4, 158.9, 149.9, 148.2, 135.7, 135.7, 126.3, 126.2, 125.1, 125.1, 115.9, 115.7, 113.9, 86.8, 55.1 ppm.

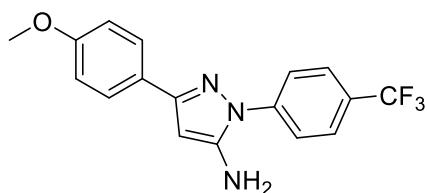
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3424 (w), 3302 (w), 3211 (w), 3073 (w), 1627 (w), 1613 (m), 1565 (m), 1513 (s), 1376 (w), 1299 (w), 1250 (w), 1220 (m), 1175 (w), 1153 (w), 1114 (w), 1058 (w), 1027 (m), 1011 (w), 953 (m), 839 (s), 757 (m), 732 (w), 691 (w), 651 (w), 617 (m), 533 (m) cm⁻¹.

LCMS (ESI+): *t*_R = 7.0 min (Methode I) *m/z* (% relative Intensität): 284.1 [M+H]⁺ (100)

HR-ESI-MS: (C₁₆H₁₅FN₃O⁺) ber.: 284.1194 gef.: 284.1194

**3-(4-Methoxyphenyl)-1-(4-(trifluormethyl)phenyl)-1*H*-pyrazol-5-amin
(81, DAG-064)**

In einem 25 mL Rundkolben wurde 4-Methoxybenzoylacetonitril (213.8 mg, 1 Äq., 1.2 mmol, 97.0%) in Eisessig (2.5 mL) und abs. Ethanol (2.5 mL) gelöst. Zu dieser Reaktionslösung wurde p-Trifluormethylphenylhydrazin (329.2 mg, 1.5 Äq., 1.78 mmol, 95%) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht (12 h) bei 100 °C unter Reflux gerührt. Nach vollständigem Umsatz der Ausgangsmaterialien wurde das Lösungsmittel unter verminderter Druck entfernt und der Rückstand in Dichlormethan (15 mL) gelöst. Die organische Phase wurde mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (20 mL) und gesättigter Natriumchlorid-Lösung (20 mL) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter verminderter Druck entfernt und das so erhaltene Rohprodukt wurde mittels RP-Flash-Chromatographie (Wasser/Methanol-Gradient) aufgereinigt. Es wurde ein bräunlicher Feststoff mit einer Ausbeute von 68.7% (271.1 mg, 0.81 mmol) erhalten.



¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 7.95 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.85 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.74 – 7.68 (m, 2H), 7.03 – 6.91 (m, 2H), 5.91 (s, 1H), 5.65 (s, 2H), 3.78 (s, 3H) ppm.

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆): δ = 159.2, 151.0, 148.9, 142.8, 126.6, 126.3 (d, *J* = 3.8 Hz), 125.9, 125.6, 124.3 (d, *J* = 271.3 Hz), 122.4, 114.0, 87.9, 55.1 ppm.

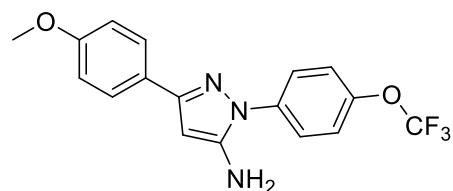
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3316 (w), 1611 (m), 1462 (m), 1131 (s) cm⁻¹.

LCMS (ESI+): t_R = 9.0 min (Methode II) m/z (% relative Intensität): 334.0 [M+H]⁺ (100)

HR-ESI-MS: (C₁₇H₁₅F₃N₃O⁺) ber.: 334.1162 gef.: 334.1163

**3-(4-Methoxyphenyl)-1-(4-(Trifluormethoxy)phenyl)-1H-pyrazol-5-amin
(82, DAG-068)**

In einem 25 mL Rundkolben wurde 4-Methoxybenzoylacetonitril (235.3 mg, 1 Äq., 1.3 mmol, 97.0%) in Eisessig (2.5 mL) und abs. EtOH (2.5 mL) gelöst. Zu dieser Reaktionslösung wurde (4-(Trifluoromethoxy)phenylhydrazin-Hydrochlorid (460.6 mg, 1.5 Äq., 1.95 mmol, 97%) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht (12 h) bei 100 °C unter Reflux gerührt. Nach vollständigem Umsatz der Ausgangsmaterialien wurde das Lösungsmittel unter verminderterem Druck entfernt und der Rückstand in DCM (15 mL) gelöst. Die organische Phase wurde mit gesättigter NaHCO₃-Lösung (20 mL) und gesättigter NaCl-Lösung (20 mL) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter verminderterem Druck entfernt und das so erhaltene Rohprodukt wurde mittels RP-Flash-Chromatographie (H₂O/MeOH-Gradient) aufgereinigt. Es wurde ein bräunlicher Feststoff mit einer Ausbeute von 84.9% (386.3 mg, 1.11 mmol) erhalten.



¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 7.84 – 7.77 (m, 2H), 7.73 – 7.64 (m, 2H), 7.49 (dd, *J* = 9.0, 0.8 Hz, 2H), 7.00 – 6.91 (m, 2H), 5.87 (s, 1H), 5.53 (s, 2H), 3.78 (s, 3H) ppm.

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆): δ = 159.0, 150.4, 148.5, 145.9, 138.5, 126.4, 126.1, 124.2, 121.9, 120.1 (d, *J* = 256.2 Hz), 113.9, 87.3, 55.1 ppm.

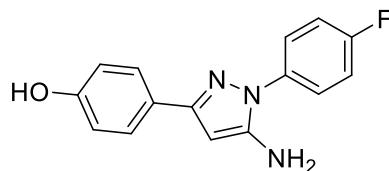
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3303 (w), 1629 (m), 1515 (m), 1302 (m), 1153 (s) cm⁻¹.

LCMS (ESI+): t_R = 11.0 min (Methode I) m/z (% relative Intensität): 350.1 [M+H]⁺ (100)

HR-ESI-MS: (C₁₇H₁₅F₃N₃O₂⁺) ber.: 350.1111 gef.: 350.1107

**4-(5-Amino-1-(4-fluorophenyl)-1*H*-pyrazol-3-yl)phenol
(83, DAG-053)**

In einem ausgeheizten 25 mL Rundkolben wurde Verbindung **80** (50.0 mg, 1 Äq., 0.18 mmol) in DCM (5 mL) gelöst. Anschließend wurde über ein Septum BBr_3 (0.265 mL, 1.5 Äq., 0.26 mmol, 1M in HCl) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde über Nacht für 12 h gerührt. Nach vollständigem Umsatz von **80** wurde das Reaktionsgemisch in einem Scheidetrichter mit H_2O (2x 10 mL) und gesättigter NaCl-Lösung (10 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter verminderter Druck entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde mittels RP-Flash-Chromatographie ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ -Gradient) gereinigt. Es wurde ein blass orangener Feststoff mit einer Ausbeute von 68.6% (32.6 mg, 0.12 mmol) erhalten.



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOH-d₄): δ = 7.65 – 7.51 (m, 4H), 7.30 – 7.21 (m, 2H), 6.86 – 6.74 (m, 2H), 5.86 (s, 1H), 4.51 (s, 2H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, MeOH-d₄): δ = 164.4, 161.9, 158.7, 153.7, 149.5, 136.3, 128.1, 128.0, 127.9, 126.2, 117.6, 117.0, 116.3, 88.1 ppm.

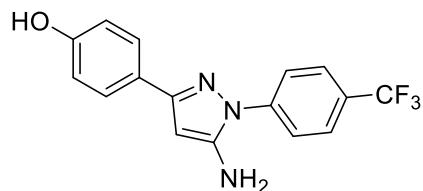
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3304 (w), 3121 (w), 2980 (m), 1613 (m), 1560 (w), 1530 (w), 1511 (s), 1438 (w), 1379 (m), 1219 (s), 1170 (w), 1153 (w), 1091 (w), 1060 (w), 1012 (w), 955 (w), 838 (s), 760 (w), 615 (m), 596 (w), 577 (w), 529 (m), 505 (w) cm^{-1} .

LCMS (ESI+): $t_{\text{R}} = 5.2$ min (Methode I) m/z (% relative Intensität): 270.0 [M+H]⁺ (100)

HR-ESI-MS: (C₁₅H₁₃FN₃O⁺) ber.: 270.1037 gef.: 270.1037

**4-(5-Amino-1-(4-(trifluormethyl)phenyl)-1*H*-pyrazol-3-yl)phenol
(84, DAG-066)**

In einem ausgeheizten 25 mL Rundkolben wurde Verbindung **81** (50.0 mg, 1 Äq., 0.15 mmol) in DCM (5 mL) gelöst. Anschließend wurde über ein Septum BBr₃ (0.45 mL, 3.0 Äq., 0.45 mmol, 1M in HCl) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde über Nacht für 12 h gerührt. Nach vollständigem Umsatz von **81** wurde das Reaktionsgemisch in einem Scheidetrichter mit H₂O (2x 10 mL) und gesättigter NaCl-Lösung (10 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter verminderter Druck entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde mittels RP-Flash-Chromatographie (H₂O/MeOH-Gradient) gereinigt. Es wurde ein blass orangener Feststoff mit einer Ausbeute von 78.9% (37.8 mg, 0.12 mmol) erhalten.



¹H NMR (400 MHz, MeOH-d₄): δ = 7.87 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.81 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.64 – 7.58 (m, 2H), 6.84 – 6.79 (m, 2H), 5.91 (s, 1H) ppm.

¹³C NMR (101 MHz, MeOH-d₄): δ = 158.9, 154.4, 149.9, 143.5, 129.5 (d, *J* = 32.7 Hz), 128.2, 127.5 (q, *J* = 3.8 Hz), 125.9, 125.6 (d, *J* = 272.1 Hz), 124.9, 119.1, 116.3 ppm.

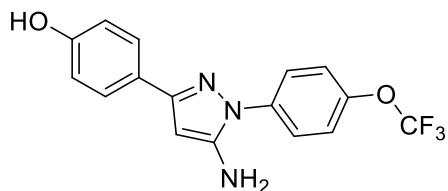
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3337 (w), 1615 (m), 1323 (s) cm⁻¹.

LCMS (ESI+): t_R = 7.5 min (Methode II) m/z (% relative Intensität): 320.0 [M+H]⁺ (100)

HR-ESI-MS: (C₁₆H₁₃F₃N₃O⁺) ber.: 320.1005 gef.: 320.1005

4-(5-Amino-1-(4-(trifluormethoxy)phenyl)-1*H*-pyrazol-3-yl)phenol
(85, DAG-070)

In einem ausgeheizten 25 mL Rundkolben wurde Verbindung **82** (50.4 mg, 1 Äq., 0.14 mmol) in DCM (5 mL) gelöst. Anschließend wurde über ein Septum BBr_3 (0.433 mL, 3.0 Äq., 0.43 mmol, 1M in HCl) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde über Nacht für 12 h gerührt. Nach vollständigem Umsatz von **82** wurde das Reaktionsgemisch in einem Scheidetrichter mit H_2O (2x 10 mL) und gesättigter NaCl-Lösung (10 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter verminderter Druck entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde mittels RP-Flash-Chromatographie ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ -Gradient) gereinigt. Es wurde ein blass orangener Feststoff mit einer Ausbeute von 77.7% (37.6 mg, 0.11 mmol) erhalten.



$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, MeOH-d₄): δ = 7.71 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.59 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.42 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.81 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 5.88 (s, 1H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, MeOH-d₄): δ = 158.8, 154.0, 149.6, 149.1, 139.0, 128.2, 127.0, 126.1, 123.0, 121.9 (d, *J* = 255.9 Hz), 116.3, 88.6 ppm.

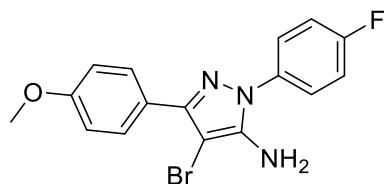
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 1613 (w), 1562 (m), 1511 (s), 1443 (w), 1258 (w), 1153 (s), 949 (w), 835 (m) cm^{-1} .

LCMS (ESI+): t_{R} = 9.0 min (Methode I) m/z (% relative Intensität): 336.1 [M+H]⁺ (100)

HR-ESI-MS: (C₁₆H₁₃F₃N₃O₂⁺) ber.: 336.0954 gef.: 336.0955

**4-Brom-1-(4-fluorphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)-1H-pyrazol-5-amin
(86, DAG-054)**

In einem 25 mL Rundkolben wurde eine Lösung aus **80** (200 mg, 1 Äq., 0.71 mmol) in DMF (5.5 mL) auf 0 °C gekühlt. Sobald die Temperatur erreicht ist, wird eine Lösung aus NBS (138.2 mg, 1.1 Äq., 0.78 mmol) in DMF (5 mL) langsam hinzutropft. Die Reaktionslösung wurde für 3 h bei 0 °C gerührt. Nach vollständigem Umsatz des Edukts wurde das Lösungsmittel unter verminderterem Druck entfernt und der Rückstand in DCM (15 mL) aufgenommen. Die organische Phase wurde mit H₂O (15 mL) und gesättigter NaCl-Lösung (15 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde unter verminderterem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde anschließend mittels Flash-Chromatographie (CH/EtOAc-Gradient) gereinigt. Es wurde ein leicht bräunlicher Feststoff in einer Ausbeute von 63% (159.8 mg, 0.44 mmol) erhalten.



¹H NMR (400 MHz, MeOH-d₄): δ = 7.83 – 7.72 (m, 2H), 7.68 – 7.51 (m, 2H), 7.36 – 7.17 (m, 2H), 7.03 – 6.92 (m, 2H), 3.83 (s, 3H) ppm.

¹³C NMR (101 MHz, MeOH-d₄): δ = 164.6, 162.2, 161.5, 149.9, 147.0, 136.2, 130.0, 127.8, 127.7, 125.9, 117.4, 117.2, 114.7, 76.2, 55.8 ppm.

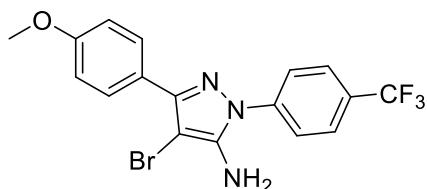
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3649 (w), 3360 (w), 3220 (w), 3073 (w), 2980 (m), 2357 (w), 1614 (m), 1559 (m), 1516 (s), 1455 (m), 1245 (s), 1157 (m), 1022 (m), 965 (m), 832 (s), 811 (w), 780 (w), 732 (m), 710 (w), 698 (w), 662 (w), 646 (w), 634 (w), 628 (w), 614 (w), 593 (s), 512 (m) cm⁻¹.

LCMS (ESI+): t_R = 8.9 min (Methode I) m/z (% relative Intensität): 361.9 [M+H]⁺ (100)

HR-ESI-MS: (C₁₆H₁₄BrFN₃O⁺) ber.: 362.0299 gef.: 362.0297

**4-Brom-3-(4-methoxyphenyl)-1-(4-(trifluormethyl)phenyl)-1*H*-pyrazol-5-amin
(87, DAG-067)**

In einem 25 mL Rundkolben wurde eine Lösung aus **81** (100 mg, 1 Äq., 0.30 mmol) in DMF (5.5 mL) auf 0 °C gekühlt. Sobald die Temperatur erreicht war, wurde eine Lösung aus NBS (58.7 mg, 1.1 Äq., 0.33 mmol) in DMF (5 mL) langsam hinzugeropft. Die Reaktionslösung wurde für 3 h bei 0 °C gerührt. Nach vollständigem Umsatz des Edukts wurde das Lösungsmittel unter verminderem Druck entfernt und der Rückstand in DCM (15 mL) aufgenommen. Die organische Phase wurde mit H₂O (15 mL) und gesättigter NaCl-Lösung (15 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde unter verminderem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde anschließend mittels Flash-Chromatographie (CH/EtOAc-Gradient) gereinigt. Es wurde ein leicht bräunlicher Feststoff in einer Ausbeute von 78.8% (97.4 mg, 0.24 mmol) erhalten.



¹H NMR (400 MHz, MeOH-d₄): δ = 7.93 – 7.75 (m, 6H), 7.05 – 6.94 (m, 2H), 3.84 (s, 3H) ppm.

¹³C NMR (101 MHz, MeOH-d₄): δ = 161.6, 150.6, 147.2, 143.3, 130.1, 130.0 (d, *J* = 32.6 Hz), 127.7 (q, *J* = 3.8 Hz), 125.7, 125.5 (d, *J* = 271.2 Hz), 124.7, 114.7, 77.3, 55.8 ppm.

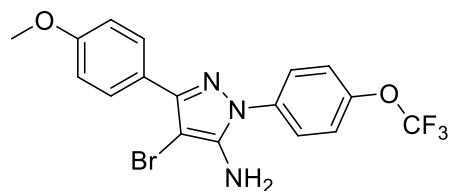
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 1608 (s), 1524 (m), 1320 (s), 1114 (s), 1067 (s) cm⁻¹.

LCMS (ESI+): *t*_R = 10.2 min (Methode II) m/z (% relative Intensität): 413.9 [M+H]⁺ (100)

HR-ESI-MS: (C₁₇H₁₄BrF₃N₃O⁺) ber.: 412.0267 gef.: 412.0266

**4-Brom-3-(4-methoxyphenyl)-1-(4-(trifluormethoxy)phenyl)-1H-pyrazol-5-amin
(88, DAG-071)**

In einem 25 mL Rundkolben wurde eine Lösung aus **82** (268 mg, 1 Äq., 0.77 mmol) in DMF (5.5 mL) auf 0 °C gekühlt. Sobald die Temperatur erreicht war, wurde eine Lösung aus NBS (150.2 mg, 1.1 Äq., 0.84 mmol) in DMF (5 mL) langsam hinzutropft. Die Reaktionslösung wurde für 3 h bei 0 °C gerührt. Nach vollständigem Umsatz des Edukts wurde das Lösungsmittel unter verminderterem Druck entfernt und der Rückstand in DCM (15 mL) aufgenommen. Die organische Phase wurde mit Wasser (15 mL) und gesättigter NaCl-Lösung (15 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde unter verminderterem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde anschließend mittels Flash-Chromatographie (CH/EtOAc-Gradient) gereinigt. Es wurde ein leicht bräunlicher Feststoff in einer Ausbeute von 72.9% (239.4 mg, 0.56 mmol) erhalten.



¹H NMR (400 MHz, MeOH-d₄): δ = 7.82 – 7.76 (m, 2H), 7.75 – 7.70 (m, 2H), 7.48 – 7.42 (m, 2H), 7.01 – 6.95 (m, 2H), 3.83 (s, 3H) ppm.

¹³C NMR (101 MHz, MeOH-d₄): δ = 161.5, 150.2, 149.4, 147.1, 138.9, 130.0, 126.8, 125.8, 123.2, 120.6, 114.7, 76.7, 55.7 ppm.

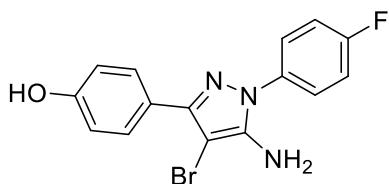
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 1607 (w), 1563 (m), 1515 (s), 1436 (w), 1207 (w), 1145 (s), 1030 (m), 964 (w) cm⁻¹.

LCMS (ESI+): t_R = 12.4 min (Methode I) m/z (% relative Intensität): 430.0 [M+H]⁺ (100)

HR-ESI-MS: (C₁₇H₁₄BrF₃N₃O₂⁺) ber.: 428.0216 gef.: 428.0216

**4-(5-Amino-4-bromo-1-(4-fluorophenyl)-1*H*-pyrazol-3-yl)phenol
(89, DAG-055)**

In einem ausgeheizten 25 mL Rundkolben wurde **86** (25.0 mg, 1 Äq., 0.07 mmol) in DCM (2.5 mL) gelöst. Anschließend wurde über ein Septum BBr₃ (0.104 mL, 1.5 Äq., 0.1 mmol, 1M in HCl) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde über Nacht für 12 h gerührt. Nach vollständigem Umsatz von **86** wurde das Reaktionsgemisch in einem Scheidetrichter mit H₂O (2x 5 mL) und gesättigter NaCl-Lösung (5 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter verminderterem Druck entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde mittels RP-Flash-Chromatographie (H₂O/MeCN-Gradient) gereinigt. Es wurde ein weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 62.0% (14.9 mg, 0.04 mmol) erhalten.



¹H NMR (400 MHz, MeOH-d₄): δ = 7.70 – 7.64 (m, 2H), 7.63 – 7.57 (m, 2H), 7.30 – 7.23 (m, 2H), 6.86 – 6.82 (m, 2H) ppm.

¹³C NMR (101 MHz, MeOH-d₄): δ = 164.6, 162.2, 159.1, 150.2, 146.9, 136.2, 130.1, 127.8, 127.7, 124.7, 117.4, 117.2, 116.1, 76.2 ppm.

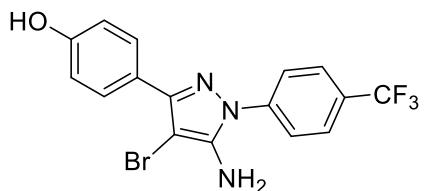
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3649 (w), 3441 (w), 3359 (w), 3073 (w), 2980 (m), 2889 (w), 2808 (w), 2671 (w), 2595 (w), 2458 (w), 2361 (w), 1615 (m), 1516 (s), 1491 (w), 1439 (m), 1232 (w), 1216 (s), 1174 (m), 1152 (m), 1014 (w), 968 (m), 840 (s), 638 (w), 514 (m), 483 (w), 451 (w) cm⁻¹.

LCMS (ESI+): t_R = 7.2 min (Methode I) m/z (% relative Intensität): 347.9 [M+H]⁺ (100)

HR-ESI-MS: (C₁₅H₁₂BrFN₃O⁺) ber.: 348.0142 gef.: 348.0142

**4-(5-Amino-4-bromo-1-(4-(trifluormethyl)phenyl)-1*H*-pyrazol-3-yl)phenol
(90, DAG-069)**

In einem ausgeheizten 25 mL Rundkolben wurde **87** (20.3 mg, 1 Äq., 0.05 mmol) in DCM (5 mL) gelöst. Anschließend wurde über ein Septum BBr₃ (0.15 mL, 3.0 Äq., 0.15 mmol, 1M in HCl) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde über Nacht für 12 h gerührt. Nach vollständigem Umsatz von **87** wurde das Reaktionsgemisch in einem Scheidetrichter mit H₂O (2x 10 mL) und gesättigter NaCl-Lösung (10 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter verminderem Druck entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde mittels RP-Flash-Chromatographie (H₂O/MeCN-Gradient) gereinigt. Es wurde ein blass orangener Feststoff mit einer Ausbeute von 86.7% (17.0 mg, 0.04 mmol) erhalten.



¹H NMR (600 MHz, MeOH-d₄): δ = 7.87 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.83 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.71 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.85 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H) ppm.

¹³C NMR (151 MHz, MeOH-d₄): δ = 159.3, 151.0, 147.1, 143.3, 130.2, 127.7 (d, *J* = 3.8 Hz), 124.7, 124.6, 116.1, 77.3 ppm.

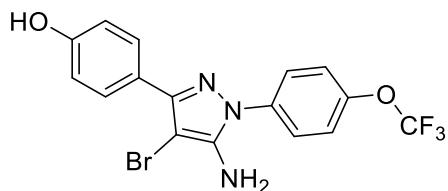
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 1615 (m), 1524 (m), 1323 (s) cm⁻¹.

LCMS (ESI+): t_R = 10.1 min (Methode I) m/z (% relative Intensität): 398.0 [M+H]⁺ (100)

HR-ESI-MS: (C₁₆H₁₂BrF₃N₃O⁺) ber.: 398.0110 gef.: 398.0111

4-(5-Amino-4-brom-1-(4-(trifluormethoxy)phenyl)-1H-pyrazol-3-yl)phenol
(91, DAG-072)

In einem ausgeheizten 25 mL Rundkolben wurde **88** (26.5 mg, 1 Äq., 0.06 mmol) in DCM (5 mL) gelöst. Anschließend wurde über ein Septum BBr₃ (0.186 mL, 3.0 Äq., 0.19 mmol, 1M in HCl) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde über Nacht für 12 h gerührt. Nach vollständigem Umsatz von **88** wurde das Reaktionsgemisch in einem Scheidetrichter mit H₂O (2x 10 mL) und gesättigter NaCl-Lösung (10 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter verminderter Druck entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde mittels RP-Flash-Chromatographie (H₂O/MeCN-Gradient) gereinigt. Es wurde ein blass orangener Feststoff mit einer Ausbeute von 62.4% (16.0 mg, 0.04 mmol) erhalten.



¹H NMR (400 MHz, MeOH-d₄): δ = 7.76 – 7.70 (m, 2H), 7.70 – 7.66 (m, 2H), 7.45 (dd, *J* = 9.1, 0.9 Hz, 2H), 6.88 – 6.81 (m, 2H) ppm.

¹³C NMR (101 MHz, MeOH-d₄): δ = 159.2, 150.6, 149.4, 147.0, 138.9, 130.1, 126.8, 124.6, 123.2, 120.6, 116.1, 76.7 ppm.

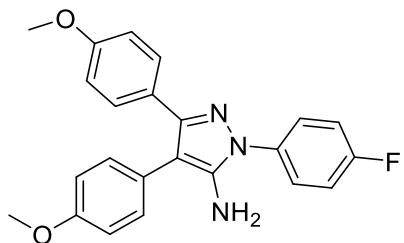
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3310 (w), 1609 (m), 1558 (w), 1533 (w), 1515 (s), 1452 (m), 1435 (w), 1252 (s), 1229 (w), 1209 (w), 1178 (w), 1164 (w), 1103 (w), 1055 (w), 1014 (w), 967 (m), 923 (w), 841 (s), 818 (w), 732 (w), 701 (w), 664 (w), 622 (w), 605 (w), 556 (w), 521 (w), 511 (m) cm⁻¹.

LCMS (ESI+): t_R = 10.2 min (Methode I) m/z (% relative Intensität): 414.0 [M+H]⁺ (100)

HR-ESI-MS: (C₁₆H₁₂BrF₃N₃O₂⁺) ber.: 414.0059 gef.: 414.0059

**1-(4-Fluorphenyl)-3,4-bis(4-methoxyphenyl)-1*H*-pyrazol-5-amin
(92, DAG-056)**

Zu einem 25 mL Schlenkkolben wurden **86** (50.0 mg, 1.0 Äq., 0.14 mmol), 4-Methoxyphenylboronsäure (62.9 mg, 3 Äq., 0.41 mmol), $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (10 mg, 0.1 Äq., 13.8 μmol , 98%) und Cs_2CO_3 (134.9 mg, 3 Äq., 0.41 mmol) gegeben. Die Apparatur wurde mehrfach evakuiert und mit Argon begast. Anschließend wurde Toluol (5 mL) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch wurde unter Rühren für 24 h bei 70 °C erhitzt. Nach vollständigem Umsatz von **86** wurde das Reaktionsgemisch mit DCM (25 mL) versetzt. Die organische Phase wurde mit H_2O (2x 10 mL) gewaschen und anschließend über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter verminderter Druck entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde mittels Flash-Chromatographie (CH/EtOAc-Gradient) aufgereinigt. Es wurde ein bräunlicher Feststoff mit einer Ausbeute von 41.1% (22.1 mg, 0.06 mmol) erhalten.



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.72 – 7.67 (m, 2H), 7.51 – 7.45 (m, 2H), 7.24 – 7.17 (m, 4H), 6.97 – 6.93 (m, 2H), 6.84 – 6.79 (m, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.79 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ = 163.3, 160.8, 159.8, 158.8, 149.0, 143.7, 133.8, 131.2, 129.5, 126.43, 126.3, 124.9, 116.8, 116.7, 114.8, 113.9, 103.8, 55.4, 55.4 ppm.

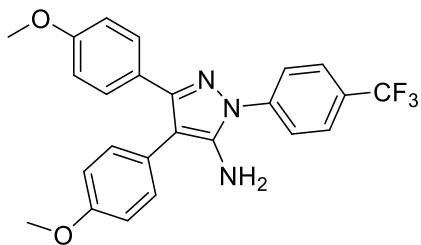
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3325 (w), 2998 (w), 2934 (w), 2835 (w), 1714 (w), 1610 (w), 1581 (w), 1562 (w), 1510 (s), 1453 (w), 1437 (w), 1409 (w), 1382 (w), 1321 (w), 1287 (w), 1243 (s), 1219 (w), 1174 (m), 1107 (w), 1093 (w), 1026 (m), 966 (m), 834 (s), 585 (m), 533 (m), 517 (w) cm^{-1} .

LCMS (ESI+): $t_{\text{R}} = 9.2$ min (Methode I) m/z (% relative Intensität): 390.0 [$\text{M}+\text{H}$]⁺ (100)

HR-ESI-MS: ($\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{FN}_3\text{O}_2^+$) ber.: 390.1612 gef.: 390.1612

**3,4-Bis(4-methoxyphenyl)-1-(4-(trifluormethyl)phenyl)-1*H*-pyrazol-5-amin
(93, DAG-074)**

Zu einem 50 mL Schlenkkolben wurden **87** (90.0 mg, 1.0 Äq., 0.22 mmol), 4-Methoxyphenylboronsäure (132.7 mg, 4.0 Äq., 0.87 mmol), $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (15.3 mg, 0.1 Äq., 22 μmol , 98%) und CS_2CO_3 (213.4 mg, 3.0 Äq., 0.7 mmol) gegeben. Die Apparatur wurde mehrfach evakuiert und mit Argon begast. Anschließend wurde Toluol (10 mL) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch wurde unter Röhren für 24 h bei 70 °C erhitzt. Nach vollständigem Umsatz von DAG-067 wurde das Reaktionsgemisch mit DCM (20 mL) versetzt. Die organische Phase wurde mit H_2O (2x 10 mL) gewaschen und anschließend über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter verminderter Druck entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde mittels Flash-Chromatographie (CH/EtOAc-Gradient) aufgereinigt. Es wurde ein bräunlicher Feststoff mit einer Ausbeute von 15.7% (15.1 mg, 0.03 mmol) erhalten.



$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ = 7.92 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.76 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.48 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.22 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 6.95 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 6.82 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.79 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ = 159.4, 158.6, 149.7, 147.8, 143.1, 137.5, 131.1, 129.2, 125.8, 125.3, 125.0, 122.1, 120.6 (d, J = 256.3 Hz), 114.6, 113.7, 104.3, 55.3, 55.2 ppm.

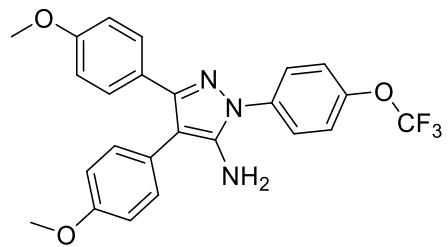
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2935 (w), 1614 (m), 1581 (w), 1564 (w), 1511 (m), 1324 (s), 1248 (m) cm^{-1} .

LCMS (ESI+): $t_{\text{R}} = 12.8$ min (Methode I) m/z (% relative Intensität): 440.2 [$\text{M}+\text{H}^+$] (100)

HR-ESI-MS: ($\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_2^+$) ber.: 440.1580 gef.: 440.1579

**3,4-Bis(4-methoxyphenyl)-1-(4-(trifluormethoxy)phenyl)-1*H*-pyrazol-5-amin
(94, DAG-075)**

Zu einem 50 mL Schlenkkolben wurden **88** (185.8 mg, 1.0 Äq., 0.43 mmol), 4-Methoxyphenylboronsäure (263.7 mg, 3.0 Äq., 1.74 mmol), $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (30.5 mg, 0.1 Äq., 43 μmol , 98%) und Cs_2CO_3 (424 mg, 3.0 Äq., 1.3 mmol) gegeben. Die Apparatur wurde mehrfach evakuiert und mit Argon begast. Anschließend wurde Toluol (15 mL) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch wurde unter Röhren für 24 h bei 70 °C erhitzt. Nach vollständigem Umsatz von DAG-071 wurde das Reaktionsgemisch mit DCM (25 mL) versetzt. Die organische Phase wurde mit H_2O (2x 10 mL) gewaschen und anschließend über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter verminderter Druck entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde mittels Flash-Chromatographie (CH/EtOAc-Gradient) aufgereinigt. Es wurde ein bräunlicher Feststoff mit einer Ausbeute von 58.4% (115.4 mg, 0.25 mmol) erhalten.



$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ = 7.76 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.46 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.33 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.21 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 6.94 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 6.81 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.77 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ = 159.4, 158.6, 149.7, 147.8, 143.1, 137.5, 131.1, 129.2, 125.8, 125.3, 125.0, 122.1, 120.6 (d, J = 256.3 Hz), 114.6, 113.7, 104.3, 55.3, 55.2 ppm.

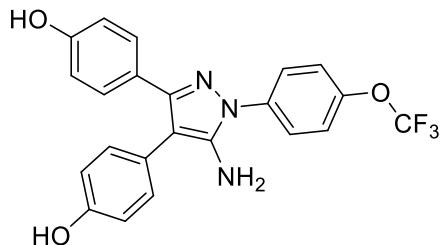
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3310 (w), 2957 (w), 1611 (w), 1582 (w), 1563 (w), 1513 (s), 1454 (w), 1439 (w), 1382 (w), 1247 (s), 1222 (w), 1208 (w), 1174 (w), 1035 (w), 967 (w), 836 (w) cm^{-1} .

LCMS (ESI+): t_{R} = 12.7 min (Methode II) m/z (% relative Intensität): 456.1 [$\text{M}+\text{H}$]⁺ (100)

HR-ESI-MS: ($\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_3^+$) ber.: 456.1530 gef.: 456.1533

**4,4'-(5-Amino-1-(4-(trifluormethoxy)phenyl)-1*H*-pyrazol-3,4-diyl)diphenol
(97, DAG-084)**

In einem ausgeheizten 25 mL Rundkolben wurde **94** (30.0 mg, 1.0 Äq., 0.07 mmol) in DCM (2 mL) gelöst. Anschließend wurde über ein Septum BBr₃ (198 µl, 3.0 Äq., 197.6 µmol, 1M in HCl) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde über das Wochenende gerührt. Nach vollständigem Umsatz von **94** wurde das Reaktionsgemisch in einem Scheidetrichter mit H₂O (2x 5 mL) und gesättigter NaCl-Lösung (5 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter verminderterem Druck entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde mittels RP-Flash-Chromatographie (H₂O/MeCN-Gradient) gereinigt. Es wurde ein bräunlicher Feststoff mit einer Ausbeute von 24.7% (7.0 mg, 0.02 mmol) erhalten.



¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ = 7.84 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.51 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.24 – 7.18 (m, 3H), 7.11 (s, 1H), 7.04 – 6.98 (m, 3H), 6.77 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.65 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H) ppm.

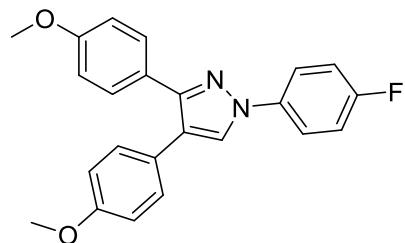
¹³C NMR (151 MHz, DMSO-d₆): δ = 156.9, 155.9, 148.8, 146.1, 144.5, 138.2, 131.0, 129.0, 124.5, 124.3, 123.3, 121.8, 115.6, 114.8, 103.5, 40.1, 39.9, 39.8, 39.7, 39.5, 39.4, 39.2, 39.1 ppm.

LCMS (ESI+): *t*_R = 8.2 min (Methode II) *m/z* (% relative Intensität): 428.0 [M+H]⁺ (100)

HR-ESI-MS: (C₂₂H₁₇F₃N₃O₃)⁺ ber.: 428.1217 gef.: 428.1218

1-(4-Fluorphenyl)-3,4-bis(4-methoxyphenyl)-1*H*-pyrazol
(98, DAG-077)

In einem 25 mL Rundkolben wurde eine TBN-Lösung (0.5 mL, 96.1 Äq., 4.22 mmol) in THF (10 mL) für 30 min bei 65 °C unter Rückfluss erhitzt. Zu dieser Lösung wurde **92** (33.9 mg, 1.0 Äq., 0.09 mmol) hinzugegeben. Die Lösung wurde bei 65 °C für 3 h unter Rückfluss erhitzt. Nach vollständigem Umsatz von **92** wurde das Lösungsmittel unter verminderterem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in DCM (10 mL) aufgenommen und im Scheidetrichter mit H₂O (10 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit DCM (3x 5 mL) extrahiert. Die vereinigte organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und konzentriert. Das Rohprodukt wurde mittels NP-Flash-Chromatographie (CH/EtOAc-Gradient) säulenchromatographisch aufgereinigt. Es wurde ein leicht bräunlicher Feststoff mit einer Ausbeute von 55% (18.0 mg, 0.05 mmol) erhalten.



¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 7.88 (s, 1H), 7.74 (dd, *J* = 8.9, 4.6 Hz, 2H), 7.52 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.26 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.16 (t, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.88 (t, *J* = 8.1 Hz, 4H), 3.83 (s, 3H), 3.82 (s, 3H) ppm.

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃): δ = 161.2 (d, *J* = 245.6 Hz), 159.6, 158.9, 150.4, 136.6, 130.0, 129.7, 126.5, 125.8, 125.4, 122.5, 120.7 (d, *J* = 8.3 Hz), 116.4 (d, *J* = 22.9 Hz), 114.2, 113.9, 55.4, 55.4 ppm.

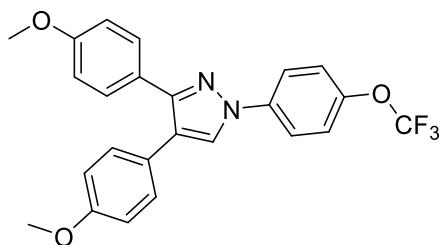
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2927 (w), 2838 (w), 1613 (w), 1579 (w), 1556 (w), 1515 (s), 1247 (s) cm⁻¹.

LCMS (ESI+): t_R = 13.6 min (Methode I) m/z (% relative Intensität): 375.1 [M+H]⁺ (100)

HR-ESI-MS: (C₂₃H₂₀FN₂O₂⁺) ber.: 375.1503 gef.: 375.1502

**3,4-Bis(4-methoxyphenyl)-1-(4-(trifluormethoxy)phenyl)-1*H*-pyrazol
(100, DAG-076)**

In einem 25 mL Rundkolben wurde eine TBN-Lösung (0.5 mL, 96.1 Äq., 4.22 mmol) in THF (10 mL) für 30 min bei 65 °C unter Rückfluss erhitzt. Zu dieser Lösung wurde **94** (20.0 mg, 1.0 Äq., 0.04 mmol) hinzugegeben. Die Lösung wurde bei 65 °C für 3 h unter Rückfluss erhitzt. Nach vollständigem Umsatz von DAG-075 wurde das Lösungsmittel unter verminderter Druck entfernt. Der Rückstand wurde in DCM (10 mL) aufgenommen und im Scheidetrichter mit H₂O (10 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit DCM (3x 5 mL) extrahiert. Die vereinigte organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und konzentriert. Das Rohprodukt wurde mittels NP-Flash-Chromatographie (CH/EtOAc-Gradient) säulenchromatographisch aufgereinigt. Es wurde ein leicht bräunlicher Feststoff mit einer Ausbeute von 91% (17.6 mg, 0.04 mmol) erhalten.



¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 7.92 (s, 1H), 7.80 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.52 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.32 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.26 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.88 (t, *J* = 8.4 Hz, 4H), 3.84 (s, 3H), 3.83 (s, 3H) ppm.

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃): δ = 159.7, 159.0, 150.8, 147.2, 138.7, 130.0, 129.7, 126.3, 125.7, 125.2, 122.9, 122.3, 120.7 (d, *J* = 257.4 Hz), 120.0, 114.2, 114.0, 55.4, 55.4 ppm.

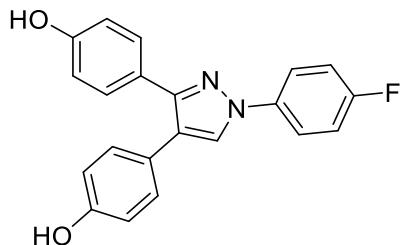
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 1613 (w), 1580 (w), 1556 (w), 1515 (m), 1503 (w), 1453 (w), 1437 (w), 1414 (w), 1343 (w), 1290 (w), 1249 (s) cm⁻¹.

LCMS (ESI+): t_R = 14.7 min (Methode I) m/z (% relative Intensität): 441.1 [M+H]⁺ (100)

HR-ESI-MS: (C₂₄H₂₀F₃N₂O₃⁺) ber.: 441.1421 gef.: 441.1421

**4,4'-(1-(4-Fluorphenyl)-1*H*-pyrazol-3,4-diyil)diphenol
(59, DAG-080)**

In einem ausgeheizten 25 mL Rundkolben wurde **98** (18.0 mg, 1 Äq., 0.05 mmol) in DCM (5 mL) gelöst. Anschließend wurde über ein Septum BBr₃ (106 µL, 2.2 Äq., 0.11 mmol, 1M in HCl) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde über Nacht für 12 h gerührt. Nach vollständigem Umsatz von **98** wurde das Reaktionsgemisch in einem Scheidetrichter mit H₂O (2x 10 mL) und gesättigter NaCl-Lösung (10 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter verminderter Druck entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde mittels RP-Flash-Chromatographie (H₂O/MeCN-Gradient) gereinigt. Es wurde ein blass orangener Feststoff mit einer Ausbeute von 37.4% (6.2 mg, 0.02 mmol) erhalten.



¹H NMR (600 MHz, MeOH-d₄): δ = 8.19 (s, 1H), 7.83 (dd, *J* = 9.0, 4.6 Hz, 2H), 7.35 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.24 (t, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.15 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.76 (dd, *J* = 8.5, 5.6 Hz, 4H) ppm.

¹³C NMR (151 MHz, MeOH-d₄): δ = 162.5 (d, *J* = 244.1 Hz), 158.7, 157.8, 152.1, 137.8, 131.0, 130.9, 128.4, 125.7, 125.2, 124.0, 122.0 (d, *J* = 8.3 Hz), 117.2 (d, *J* = 23.3 Hz), 116.3, 116.1 ppm.

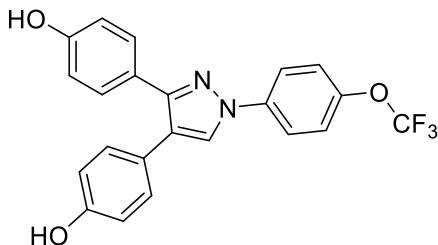
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2955 (w), 2921 (w), 2360 (s), 2339 (w), 1612 (w), 1566 (w), 1551 (w), 1515 (m), 1502 (w), 1481 (w), 1465 (w), 1444 (w), 1406 (w), 1380 (w), 1350 (w), 1330 (w) cm⁻¹.

LCMS (ESI+): *t*_R = 8.4 min (Methode II) *m/z* (% relative Intensität): 347.0 [M+H]⁺ (100)

HR-ESI-MS: (C₂₁H₁₆FN₂O₂⁺) ber.: 347.1190 gef.: 347.1187

4,4'-(1-(4-(Trifluormethoxy)phenyl)-1*H*-pyrazol-3,4-diyl)diphenol
(78, DAG-079)

In einem ausgeheizten 25 mL Rundkolben wurde **100** (17.6 mg, 1 Äq., 0.04 mmol) in DCM (5 mL) gelöst. Anschließend wurde über ein Septum BBr_3 (88 μL , 2.2 Äq., 0.09 mmol, 1M in HCl) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde über Nacht für 12 h gerührt. Nach vollständigem Umsatz von **100** wurde das Reaktionsgemisch in einem Scheidetrichter mit H_2O (2x 10 mL) und gesättigter NaCl-Lösung (10 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter verminderter Druck entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde mittels RP-Flash-Chromatographie ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ -Gradient) gereinigt. Es wurde ein blass orangener Feststoff mit einer Ausbeute von 64.2% (10.6 mg, 0.03 mmol) erhalten.



$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, MeOH-d₄): δ = 8.26 (s, 1H), 7.94 – 7.88 (m, 2H), 7.41 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.36 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.16 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 6.76 (dd, J = 8.6, 3.1 Hz, 4H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, MeOH-d₄): δ = 158.8, 157.8, 152.5, 148.3, 140.2, 131.0, 130.9, 128.3, 125.6, 125.1, 124.4, 123.3, 121.2, 116.3, 116.1 ppm.

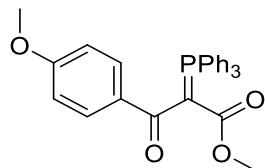
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2360 (s), 2340 (w), 2160 (w), 1263 (w), 1222 (w), 1207 (w), 1171 (w), 839 (w), 668 (w) cm^{-1} .

LCMS (ESI+): $t_{\text{R}} = 9.7$ min (Methode II) m/z (% relative Intensität): 413.0 [M+H]⁺ (100)

HR-ESI-MS: (C₂₂H₁₆F₃N₂O₃⁺) ber.: 413.1108 gef.: 413.1108

**3-(4-Methoxyphenyl)-3-oxo-2-(triphenyl- λ^5 -phosphaneylidene)-propansäuremethylester
(103, DAG-065)**

In einem 25 mL Rundkolben wurde Methyl(triphenylphosphoranylideneacetat (200.0 mg, 1.0 Äq., 0.59 mmol, 98%) in DCM (5 mL) gelöst. Anschließend wurde der Lösung 4-Methoxybenzoylchlorid (123.7 mg, 1.2 Äq., 0.70 mmol, 97%) und 2,6-Lutidin (90 μ L, 1.4 Äq., 0.82 mmol, 98%) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abschluss der Reaktion wurde der Lösung H_2O (5 mL) hinzugegeben. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase wurde mit DCM (3x 10 mL) gewaschen. Die vereinte organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und unter Vakuum konzentriert. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels NP-Flash-Chromatographie (CH/EtOAc-Gradient) aufgereinigt. Es wurde ein gelblicher Feststoff mit einer Ausbeute von 70.5% (193.7 mg, 0.41 mmol) erhalten.



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOH-d₄): δ = 7.82 – 7.74 (m, 6H), 7.65 – 7.51 (m, 11H), 6.96 – 6.81 (m, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.11 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, MeOH-d₄): δ = 194.7 (d, J = 4.9 Hz), 170.2 (d, J = 14.1 Hz), 162.9, 136.0 (d, J = 8.6 Hz), 134.5 (d, J = 9.8 Hz), 133.4 (d, J = 3.0 Hz), 131.4, 129.9 (d, J = 12.6 Hz), 127.5, 126.6, 113.8, 55.8, 50.5 ppm.

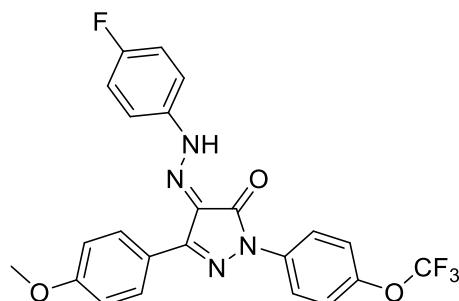
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2965 (w, Aromat), 1603 (s, -C=O), 1584 (w) cm^{-1} .

LCMS (ESI+): t_{R} = 8.8 min (Methode II) m/z (% relative Intensität): 469.0 [M+H]⁺ (100)

HR-ESI-MS: (C₂₉H₂₆O₄P⁺) ber.: 469.1563 gef.: 469.1566

4-(2-(4-Fluorphenyl)hydrazineyliden)-5-(4-methoxyphenyl)-2-(4-(trifluormethoxy)-phenyl)-2,4-dihydro-3H-pyrazol-3-on
(108, DAG-083)

In einem 50 mL Rundkolben wurde Oxone® (3.04 g, 8 Äq., 4.95 mmol) mit H₂O (1 mL) angefeuchtet. Hierzu wurde anschließend DCM (20 mL) und **103** (290 mg, 1.0 Äq., 0.62 mmol) gegeben. Nach 24 h wurde das Reaktionsgemisch filtriert und das Lösungsmittel wurde unter verminderter Druck entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt (104.0 mg, 0.43 mmol, 70% Ausbeute) wurde in EtOH (15 mL) gelöst und mit 4-Fluorphenylhydrazin-Hydrochlorid (84.5 mg, 1.2 Äq., 0.52 mmol) und HCl (1% in Reaktionslösung) versetzt. Die Reaktionslösung wurde anschließend für 16 h bei 85 °C gerührt. Nach vollständigem Umsatz des eingesetzten Rohprodukts wurde (4-(Trifluoromethoxy)phenyl)hydrazin-Hydrochlorid (121.4 mg, 1.2 Äq., 0.52 mmol, 97%) hinzugegeben. Nach weiteren 16 h bei 85 °C wurde das Lösungsmittel unter verminderter Druck entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde mittels NP-Flash-Chromatographie (CH/EtOAc-Gradient) aufgereinigt. Es wurde ein rotbrauner Feststoff mit einer Ausbeute von 78% (160.4 mg, 0.34 mmol) erhalten.



¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 13.98 (s, 1H), 8.16 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 8.11 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.42 (dd, *J* = 8.8, 4.5 Hz, 2H), 7.29 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.15 (t, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.02 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 3.88 (s, 3H) ppm.

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃): δ = 161.3, 160.9 (d, *J* = 246.9 Hz), 158.2, 146.8, 146.3 (d, *J* = 2.0 Hz), 137.6 (d, *J* = 2.6 Hz), 136.8, 129.1, 127.4, 122.9, 121.7, 120.0, 117.7 (d, *J* = 8.1 Hz), 116.9 (d, *J* = 23.4 Hz), 114.3, 55.5 ppm.

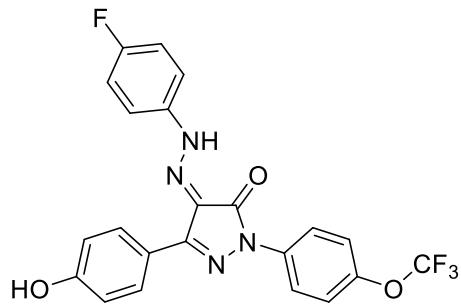
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2917 (w), 1655 (w), 1606 (m), 1550 (m), 1503 (s), 1441 (w), 1416 (w), 1343 (w), 1302 (w), 1251 (w), 1202 (w), 1162 (s), 904 (w), 828 (s), 509 (s), cm⁻¹.

LCMS (ESI+): t_R = 16.2 min (Methode I) m/z (% relative Intensität): 473.1 [M+H]⁺ (100)

HR-ESI-MS: (C₂₃H₁₆F₄N₄NaO₃⁺) ber.: 495.1051 gef.: 495.1051

4-(2-(4-Fluorphenyl)hydrazineyliden)-5-(4-hydroxyphenyl)-2-(4-(trifluormethoxy)-phenyl)-2,4-dihydro-3H-pyrazol-3-on
(109, DAG-087)

In einem ausgeheizten 25 mL Rundkolben wurde **108** (51.5 mg, 1 Äq., 0.11 mmol) in DCM (5 mL) gelöst. Anschließend wurde über ein Septum BBr_3 (164 μL , 1.5 Äq., 0.16 mmol, 1M in HCl) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde über Nacht für 12 h gerührt. Nach vollständigem Umsatz von **108** wurde das Reaktionsgemisch in einem Scheidetrichter mit H_2O (2x 10 mL) und gesättigter NaCl-Lösung (10 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter verminderter Druck entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde mittels RP-Flash-Chromatographie ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ -Gradient) gereinigt. Es wurde ein roter Feststoff mit einer Ausbeute von 73.4% (36.7 mg, 0.08 mmol) erhalten.



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): δ = 9.98 (s, 1H), 8.12 – 8.03 (m, 2H), 8.00 – 7.94 (m, 2H), 7.65 – 7.55 (m, 2H), 7.44 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.33 – 7.24 (m, 2H), 6.94 – 6.85 (m, 2H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO-d_6): δ = 160.0 (d J = 243.2 Hz), 159.3, 156.9, 146.5, 144.9 (d, J = 1.8 Hz), 137.9 (d, J = 2.4 Hz), 136.9, 128.9, 126.4, 121.8, 120.7, 120.2 (d, J = 256.1 Hz), 119.3, 118.3 (d, J = 8.3 Hz), 116.5 (d, J = 23.2 Hz), 115.6 ppm.

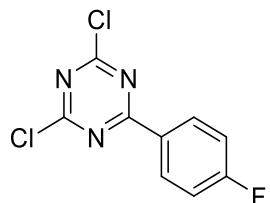
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3410 (w), 2979 (w), 1640 (w), 1607 (m), 1592 (w), 1548 (m), 1491 (s), 1428 (w), 1404 (w), 1348 (w), 1264 (w), 1201 (s), 1151 (m), 1113 (w), 1082 (w), 1014 (w), 831 (s) cm^{-1} .

LCMS (ESI+): $t_{\text{R}} = 11.9$ min (Methode II) m/z (% relative Intensität): 457.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100)

HR-ESI-MS: ($\text{C}_{22}\text{H}_{13}\text{F}_4\text{N}_4\text{O}_3^-$) ber.: 457.0929 gef.: 457.0927

2,4-Dichlor-6-(4-fluorphenyl)-1,3,5-triazin
(111, DAG-050)

Zu einem 10 mL Schlenkkolben wurden Trichlor-S-triazin (185.3 mg, 1.5 Äq., 1.00 mmol), 4-Fluorophenylboronsäure (93.7 mg, 1 Äq., 0.67 mmol), $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (2.4 mg, 0.01 Äq., 3.35 μmol , 98%) und K_2CO_3 (372.3 mg, 4 Äq., 2.68 mmol) gegeben. Die Apparatur wurde mehrfach evakuiert und mit Argon begast. Anschließend wurde Toluol (4 mL) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch wurde unter Röhren für 12 h bei 60 °C erhitzt. Nach vollständigem Umsatz der Boronsäure wurde das Reaktionsgemisch mit DCM (15 mL) versetzt. Die organische Phase wurde mit H_2O (2x 10 mL) gewaschen und anschließend über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde anschließend unter verminderter Druck entfernt und das so erhaltene Rohprodukt mittels Flash-Chromatographie (CH/EtOAc-Gradient) aufgereinigt. Es wurde ein weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 92.0% (150.5 mg, 0.62 mmol) erhalten.



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 8.57 – 8.50 (m, 2H), 7.24 – 7.16 (m, 2H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ = 173.8, 172.2, 168.5, 165.9, 132.8, 132.7, 129.1, 129.0, 116.6, 116.4 ppm.

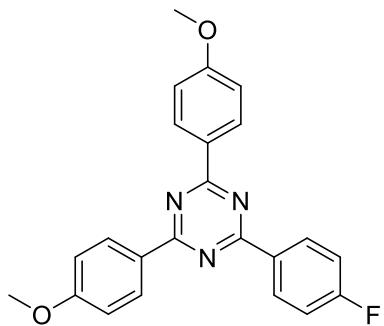
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3079 (w), 2980 (w), 1696 (w), 1596 (m), 1519 (s), 1480 (m), 1403 (w), 1385 (m), 1332 (w), 1315 (m), 1255 (w), 1240 (w), 1226 (s), 1151 (m), 1107 (m), 1041 (w), 1009 (w), 977 (w), 907 (w), 848 (m), 824 (w), 801 (s), 733 (w), 665 (w), 634 (w), 583 (s), 551 (w), 506 (m), 470 (w), 412 (w) cm^{-1} .

LC: $t_{\text{R}} = 9.5$ min (Methode I)

HR-APCI-MS: $(\text{C}_9\text{H}_5\text{Cl}_2\text{FN}_3)^+$ ber.: 243.9839 gef.: 243.9837

**2-(4-Fluorphenyl)-4,6-bis(4-methoxyphenyl)-1,3,5-triazin
(112, DAG-052)**

Zu einem 10 mL Schlenkkolben wurden **111** (10.0 mg, 1.0 Äq., 0.04 mmol), 4-Methoxyphenylboronsäure (18.7 mg, 3 Äq., 0.12 mmol), $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (0.2 mg, 0.01 Äq., 0.2 μmol , 98%) und K_2CO_3 (22.8 mg, 4 Äq., 0.16 mmol) gegeben. Die Apparatur wurde mehrfach evakuiert und mit Argon begast. Anschließend wurde Toluol (2 mL) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch wurde unter Rühren für 12 h bei 60 °C erhitzt. Nach vollständigem Umsatz von **111** wurde das Reaktionsgemisch mit DCM (15 mL) versetzt. Die organische Phase wurde mit H_2O (2x 10 mL) gewaschen und anschließend über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde anschließend unter verminderter Druck entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde im Anschluss in MeCN umkristallisiert. Es wurde ein weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 45.4% (7.2 mg, 18.6 μmol) erhalten.



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 8.78 – 8.73 (m, 2H), 8.73 – 8.68 (m, 2H), 7.55 – 7.39 (m, 2H), 7.27 – 7.17 (m, 2H), 7.11 – 7.01 (m, 2H), 7.00 – 6.87 (m, 2H), 3.93 (s, 3H), 3.84 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ = 171.1, 170.4, 165.8 (d, J = 252.4 Hz), 163.5, 158.9, 133.7, 133.0 (d, J = 2.8 Hz), 131.3 (d, J = 8.9 Hz), 131.0, 129.0, 127.9, 115.7 (d, J = 21.7 Hz), 114.4, 114.1, 55.6, 55.5 ppm.

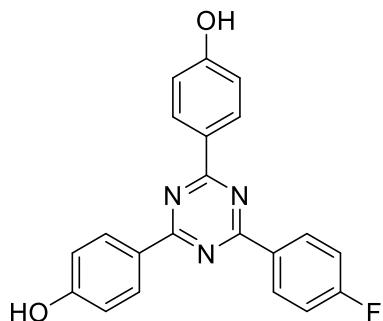
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2980 (m), 2933 (w), 2837 (w), 1600 (m), 1584 (w), 1505 (s), 1457 (w), 1412 (m), 1372 (m), 1305 (w), 1250 (s), 1216 (w), 1172 (m), 1143 (m), 1113 (w), 1094 (w), 1057 (w), 1027 (m), 857 (m), 808 (s), 778 (w), 770 (w), 636 (m), 588 (w), 581 (s), 519 (s) cm^{-1} .

LCMS (ESI+): t_{R} = 13.0 min (Methode I) m/z (% relative Intensität): 388.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100)

HR-ESI-MS: $(\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{FN}_3\text{O}_2^+)$ ber.: 388.1456 gef.: 388.1456

4,4'-(6-(4-Fluorphenyl)-1,3,5-triazin-2,4-diyyl)diphenol
(57, DAG-058)

In einem ausgeheizten 25 mL Rundkolben wurde **112** (48.6 mg, 1.0 Äq., 0.13 mmol) in DCM (5 mL) gelöst. Anschließend wurde über ein Septum BBr_3 in DCM (0.5 mL, 4.0 Äq., 0.50 mmol, 1 mol/L) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde über Nacht für 12 h gerührt. Nach vollständigem Umsatz von **112** wurde das Reaktionsgemisch in einem Scheidetrichter mit H_2O (2x 10 mL) und gesättigter NaCl -Lösung (10 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter verminderter Druck entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde mittels RP-Flash-Chromatographie ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ -Gradient) gereinigt.



$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO-d_6): δ = 10.32 (s, 2H), 8.74 (dd, J = 8.5, 5.8 Hz, 2H), 8.57 (d, J = 8.6 Hz, 4H), 7.44 (t, J = 8.7 Hz, 2H), 6.99 (d, J = 8.6 Hz, 4H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, DMSO-d_6): δ = 170.4, 169.3, 165.0 (d, J = 251.4 Hz), 162.0, 132.4, 131.1 (d, J = 9.2 Hz), 130.8, 126.2, 115.8 (d, J = 21.6 Hz), 115.7 ppm.

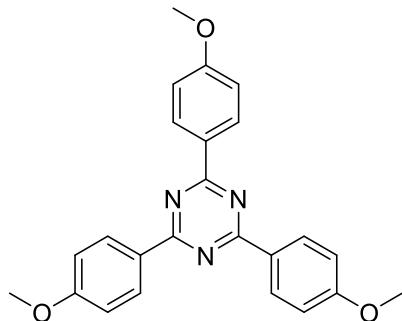
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3065 (w), 1494 (s), 1433 (w) cm^{-1} .

LCMS (ESI+): $t_{\text{R}} = 11.5$ min (Methode I) m/z (% relative Intensität): 360.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100)

HR-ESI-MS: $(\text{C}_{21}\text{H}_{15}\text{FN}_3\text{O}_2^+)$ ber.: 360.1143 gef.: 360.1143

**2,4,6-Tris(4-methoxyphenyl)-1,3,5-triazin
(113, DAG-057)**

Zu einem 25 mL Schlenkkolben wurden Trichlor-S-triazin (50.0 mg, 1 Äq., 0.27 mmol), 4-Methoxyphenylboronsäure (203.9 mg, 5 Äq., 1.34 mmol), $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (9.6 mg, 0.05 Äq., 0.01 mmol, 98%) und K_2CO_3 (149.1 mg, 4 Äq., 1.07 mmol) gegeben. Die Apparatur wurde mehrfach evakuiert und mit Argon begast. Anschließend wurde Toluol (5 mL) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch wurde unter Rühren für 12 h bei 60 °C erhitzt. Nach vollständigem Umsatz der Startmaterialien wurde das Reaktionsgemisch mit DCM (25 mL) versetzt. Die organische Phase wurde mit H_2O (2x 10 mL) gewaschen und anschließend über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde anschließend unter verminderter Druck entfernt und das so erhaltene Rohprodukt mittels Flash-Chromatographie (CH/EtOAc-Gradient) aufgereinigt. Es wurde ein weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 52.3% (56.1 mg, 0.14 mmol) erhalten.



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 8.76 – 8.65 (m, 6H), 7.11 – 7.01 (m, 6H), 3.92 (s, 9H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ = 170.9, 163.3, 130.9, 129.4, 114.0, 55.6 ppm.

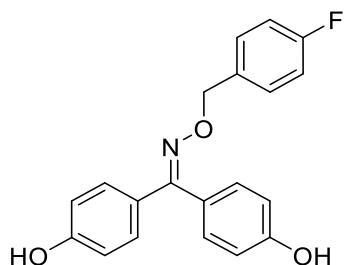
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2958 (w), 2931 (w), 2836 (w), 1603 (w), 1583 (m), 1504 (s), 1461 (w), 1417 (m), 1366 (m), 1305 (w), 1248 (s), 1170 (w), 1144 (m), 1106 (w), 1080 (w), 1024 (m), 907 (w), 854 (m), 802 (s), 771 (w), 730 (m), 637 (w), 600 (w), 585 (s), 518 (m) cm^{-1} .

LCMS (ESI+): t_{R} = 12.7 min (Methode I) m/z (% relative Intensität): 400.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100)

HR-ESI-MS: $(\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_3^+)$ ber.: 400.1656 gef.: 400.1656

Bis(4-hydroxyphenyl)methanon-*O*-(4-fluorbenzyl)oxim
(115, DAG-090)

In einem 10 mL Rundkolben wurde 4,4'-DHBP (150 mg, 1.0 Äq., 0.70 mmol) in DCM (2 mL) gelöst. Zu dieser Lösung wurde *O*-(4-Fluorobenzyl)hydroxylamine-Hydrochlorid (186.9 mg, 1.5 Äq., 1.05 mmol, 99.8%) und Pyridin (1.13 mL, 20 Äq., 14.0 mmol) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem Umsatz wurde die Lösung mit 5%iger HCl-Lösung (3x 5 mL) und gesättigter NaCl-Lösung (3x 5 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck konzentriert. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels RP-Flash-Chromatographie (H₂O/MeCN-Gradient) aufgereinigt. Es wurde ein weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 88.1% (201.7 mg, 0.60 mmol) erhalten.



¹H NMR (400 MHz, MeOH-d₄): δ = 7.32 – 7.27 (m, 2H), 7.27 – 7.22 (m, 2H), 7.20 – 7.15 (m, 2H), 7.04 – 6.94 (m, 2H), 6.83 – 6.77 (m, 2H), 6.77 – 6.71 (m, 2H), 5.07 (s, 2H) ppm.

¹³C NMR (101 MHz, MeOH-d₄): δ = 163.6 (d, *J* = 244.3 Hz), 159.8, 159.0, 159.0, 135.5 (d, *J* = 3.1 Hz), 132.3), 131.0 (d, *J* = 8.1 Hz), 130.8, 129.4, 125.7, 115.9, 115.8 (d, *J* = 21.5 Hz), 115.6, 76.1 ppm.

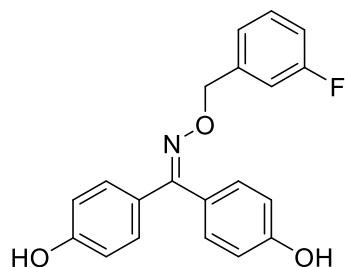
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3491 (m), 3417 (w), 2980 (m), 2884 (w), 2584 (m), 2531 (w), 1602 (s), 1508 (s), 1471 (w), 1438 (w), 1360 (m), 1324 (m), 1313 (w), 1276 (w), 1252 (w), 1232 (m), 1183 (w), 1170 (w), 1161 (s), 1118 (w), 969 (s), 934 (m), 903 (s), 818 (s) cm⁻¹.

LCMS (ESI+): t_R = 9.6 min (Methode I) m/z (% relative Intensität): 338.1 [M+H]⁺ (100)

HR-ESI-MS: (C₂₀H₁₇FNO₃)⁺ ber.: 338.1187 gef.: 338.1191

Bis(4-hydroxyphenyl)methanon-*O*-(3-fluorobenzyl)oxim
(116, DAG-092)

In einem 10 mL Rundkolben wurde 4,4'-DHBP (100 mg, 1.0 Äq., 0.47 mmol) in DCM (2 mL) gelöst. Zu dieser Lösung wurde *O*-(3-Fluorobenzyl)hydroxylamin-Hydrochlorid (124.4 mg, 1.5 Äq., 0.70 mmol) und Pyridin (752 µL, 20 Äq., 9.3 mmol) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem Umsatz wurde die Lösung mit 5%iger HCl-Lösung (3x 5 mL) und gesättigter NaCl-Lösung (3x 5 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und unter verminderterem Druck konzentriert. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels RP-Flash-Chromatographie (H₂O/MeCN-Gradient) aufgereinigt. Es wurde ein weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 71.1% (112.0 mg, 0.33 mmol) erhalten.



¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ = 9.65 (s, 2H), 7.40 (dd, *J* = 14.1, 7.7 Hz, 1H), 7.15 (ddd, *J* = 17.6, 11.8, 3.5 Hz, 7H), 6.82 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.74 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 5.12 (s, 2H) ppm.

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-d₆): δ = 162.1 (d, *J* = 243.4 Hz), 158.7, 157.8, 156.7, 141.4 (d, *J* = 7.1 Hz), 130.6, 130.3, 129.1, 127.0, 123.5 (d, *J* = 2.6 Hz), 123.5, 115.1, 114.2 (d, *J* = 20.9 Hz), 114.2 (d, *J* = 20.2 Hz), 74.3 ppm.

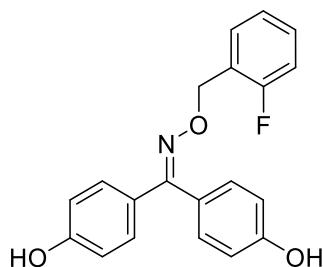
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3662 (w), 3493 (w), 3377 (w), 2980 (s), 2885 (w), 2359 (w), 2338 (w), 1595 (m), 1565 (w), 1509 (m), 1488 (w), 1474 (w), 1437 (w), 1382 (w), 1364 (m), 1322 (m), 1275 (w), 1260 (w), 1219 (w), 1199 (w), 1161 (s), 967 (s) cm⁻¹.

LCMS (ESI+): t_R = 9.5 min (Methode I) m/z (% relative Intensität): 338.1 [M+H]⁺ (100)

HR-ESI-MS: (C₂₀H₁₇FNO₃) ber.: 338.1187 gef.: 338.1187

Bis(4-hydroxyphenyl)methanon-*O*-(2-fluorbenzyl)oxim
(117, DAG-088)

In einem 10 mL Rundkolben wurde 4,4'-DHBP (150 mg, 1.0 Äq., 0.70 mmol) in DCM (2 mL) gelöst. Zu dieser Lösung wurde *O*-(2-Fluorobenzyl)hydroxylamin-Hydrochlorid (190.4 mg, 1.5 Äq., 1.05 mmol, 98%) und Pyridin (1.13 mL, 20 Äq., 14.0 mmol) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem Umsatz wurde die Lösung mit 5%iger HCl-Lösung (3x 5 mL) und gesättigter NaCl-Lösung (3x 5 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck konzentriert. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels RP-Flash-Chromatographie (H₂O/MeCN-Gradient) aufgereinigt. Es wurde ein weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 88.1% (208.1 mg, 0.62 mmol) erhalten.



¹H NMR (600 MHz, MeOH-d₄): δ = 7.35 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.28 – 7.20 (m, 3H), 7.18 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.07 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.04 – 6.99 (m, 1H), 6.81 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.74 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 5.18 (s, 2H) ppm.

¹³C NMR (151 MHz, MeOH-d₄): δ = 162.1 (d, *J* = 246.1 Hz), 159.8, 159.1, 159.0, 132.3, 131.6 (d, *J* = 4.3 Hz), 130.8, 130.6 (d, *J* = 8.2 Hz), 129.4, 126.4 (d, *J* = 14.7 Hz), 125.7, 125.0 (d, *J* = 3.5 Hz), 116.0 (d, *J* = 21.6 Hz), 115.9, 115.6, 70.4 (d, *J* = 3.6 Hz) ppm.

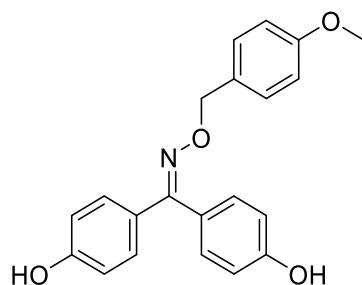
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3177 (w), 2977 (w), 2914 (s), 2849 (w), 1461 (m), 1379 (w), 1145 (s) cm⁻¹.

LCMS (ESI+): t_R = 9.5 min (Methode I) m/z (% relative Intensität): 338.1 [M+H]⁺ (100)

HR-ESI-MS: (C₂₀H₁₇FNO₃)⁺ ber.: 338.1187 gef.: 338.1187

Bis(4-hydroxyphenyl)methanon-*O*-(4-methoxybenzyl)oxim
(118, DAG-091)

In einem 25 mL Rundkolben wurde 4,4'-DHBP (300 mg, 1.0 Äq., 1.40 mmol) in DCM (4 mL) gelöst. Zu dieser Lösung wurde 4-Methoxybenzylhydroxylamin-Hydrochlorid (398.4 mg, 1.5 Äq., 2.1 mmol) und Pyridin (2.26 mL, 20 Äq., 28.0 mmol) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem Umsatz wurde die Lösung mit 5%iger HCl-Lösung (3x 10 mL) und gesättigter NaCl-Lösung (3x 10 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und unter verminderterem Druck konzentriert. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels RP-Flash-Chromatographie ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ -Gradient) aufgereinigt. Es wurde ein weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 84.4% (412.7 mg, 1.18 mmol) erhalten.



$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO-d_6): δ = 9.71 (s, 2H), 7.28 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.19 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.11 (d, J = 8.5 Hz), 6.90 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 6.79 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 6.74 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 5.02 (s, 2H), 3.74 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, DMSO-d_6): δ = 158.8, 158.5, 157.7, 156.0, 130.6, 130.0, 129.6, 129.1, 127.3, 123.6, 115.1, 114.7, 113.7, 75.0, 55.0 ppm.

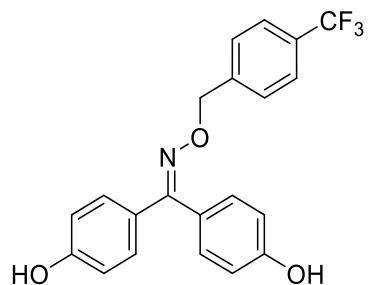
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2980 (s), 2885 (w), 1609 (m), 1592 (w), 1509 (s), 1380 (w), 1364 (m), 1324 (w), 1252 (s), 1215 (w), 1164 (s), 1039 (w), 992 (m), 971 (s), 934 (m), 903 (m), 833 (s) cm^{-1} .

LCMS (ESI+): t_{R} = 9.3 min (Methode I) m/z (% relative Intensität): 350.1 [$\text{M}+\text{H}$]⁺ (100)

HR-ESI-MS: ($\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{NNaO}_4^+$) ber.: 372.1206 gef.: 372.1202

Bis(4-hydroxyphenyl)methanon-O-(4-(trifluormethyl)benzyl)oxim
(119, DAG-093)

In einem 10 mL Rundkolben wurde 4,4'-Dihydroxybenzophenon (150 mg, 1.0 Äq., 0.70 mmol) in DCM (2 mL) gelöst. Zu dieser Lösung wurde O-(4-Trifluoromethylbenzyl)hydroxylamine hydrochlorid (239.1 mg, 1.5 Äq., 1.05 mmol) und Pyridin (1.13 mL, 20 Äq., 14.0 mmol) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem Umsatz wurde die Lösung mit 5%iger HCl-Lösung (3x 5 mL) und gesättigter Natriumchlorid-Lösung (3x 5 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und unter verminderter Druck konzentriert. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels RP-Flash-Chromatographie (Wasser/Acetonitril-Gradient) aufgereinigt. Es wurde ein gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 74.9% (203.2 mg, 0.52 mmol) erhalten.



$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO-d_6): δ = 9.74 (s, 2H), 7.72 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.55 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.17 (dd, J = 10.7, 8.6 Hz, 4H), 6.83 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 6.73 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 5.20 (s, 2H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, DMSO-d_6): δ = 158.7, 157.8, 156.9, 143.3, 130.6, 129.2, 128.1, 127.0, 125.2 (d, J = 3.9 Hz), 123.5, 115.1, 114.8, 74.3 ppm.

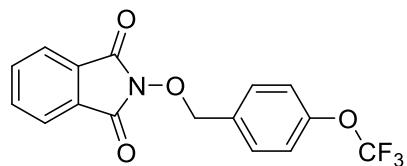
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3331 (w), 2980 (m), 2888 (w), 1607 (m), 1593 (w), 1509 (m), 1433 (w), 1322 (s), 1234 (m), 1160 (s), 1109 (m), 1064 (s), 1013 (w), 970 (m), 834 (s), 601 (m) cm^{-1} .

LCMS (ESI+): t_{R} = 10.5 min (Methode I) m/z (% relative Intensität): 388.1 [$\text{M}+\text{H}^+$] (100)

HR-ESI-MS: ($\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{F}_3\text{NNaO}_3^+$) ber.: 410.0974 gef.: 410.0976

2-((4-(Trifluormethoxy)benzyl)oxy)isoindolin-1,3-dion
(123, DAG-094)

4-(Trifluoromethoxy)benzylbromid (471 μ L, 1.0 Äq., 2.94 mmol), N-Hydroxyphthalimid (489.3 mg, 1.0 Äq., 3.00 mmol) und Et₃N (1.2 mL, 3.0 Äq., 8.8 mmol) wurden in einem 25 mL-Rundkolben in MeCN (5 mL) gelöst. Das Reaktionsgemisch wurde daraufhin für 2.5 h auf 80 °C erhitzt. Nach vollständigem Umsatz wurde das Reaktionsgemisch mit EtOAc verdünnt und nacheinander mit 1M NaOH-Lösung, H₂O und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen (jeweils 5 mL). Die organische Phase wurde anschließend über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde unter verminderterem Druck entfernt. Das so erhaltene Produkt wurde säulenchromatografisch (CH/EtOAc-Gradient) aufgereinigt. Es wurde ein weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 40.3% (400.0 mg, 1.2 mmol) erhalten.



¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ = 7.86 (s, 4H), 7.67 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.40 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 5.21 (s, 2H) ppm.

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-d₆): δ = 163.0, 148.7 (d, *J* = 1.6 Hz), 134.8, 133.8, 131.6, 128.5, 123.3, 120.9, 120.0 (d, *J* = 256.6 Hz), 78.2 ppm.

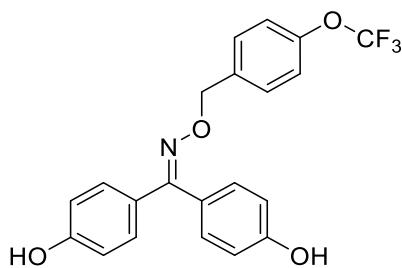
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2980 (s), 2889 (w), 1784 (w), 1725 (s), 1507 (w), 1466 (w), 1390 (m), 1260 (m), 1212 (w), 1165 (s), 1134 (w), 1103 (w), 1080 (w) cm⁻¹.

LCMS (ESI+): t_R = 11.4 min (Methode I) m/z (% relative Intensität): 338.1 [M+H⁺] (23)

HR-ESI-MS: (C₁₆H₁₀F₃NO₄Na⁺) ber.: 360.0454 gef.: 360.0452

**Bis(4-hydroxyphenyl)methanon-*O*-(4-(trifluoromethoxy)benzyl)oxim
(120, DAG-097)**

Zu einer Lösung aus **123** (338.8 mg, 1.0 Äq., 1.0 mmol) in EtOH (5.0 mL) in einem 10 mL-Rundkolben wurde Hydrazin Monohydrat (53 µL, 1.1 Äq., 1.1 mmol) gegeben. Der Rundkolben wurde im Anschluss mittels Septum verschlossen und für 3 Stunden auf 80 °C erhitzt. Nach vollständigem Umsatz von **123** wurde das Lösungsmittel unter verminderter Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Pyridin (1.1 mL) gelöst und zu einer Lösung aus 4,4'-DHBP (150 mg, 1.0 Äq., 0.7 mmol) in DCM (2 mL) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem Umsatz des 4,4'-DHBP wurde die Reaktionslösung mit verdünnter HCl-Lösung (5%, 3x 5 mL) und gesättigter NaCl-Lösung (3x 5 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und unter verminderter Druck konzentriert. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels RP-Flash-Chromatographie (H₂O/MeCN) aufgereinigt. Es wurde ein gelblicher Feststoff mit einer Ausbeute von 54.3% (153.4 mg, 0.4 mmol) erhalten.



¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ = 9.75 (s, 2H), 7.47 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.34 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.18 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.14 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.82 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.74 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 5.13 (s, 2H) ppm.

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-d₆): δ = 158.7, 157.8, 156.7, 147.7 (d, *J* = 1.7 Hz) 137.9, 130.6, 129.5, 129.2, 127.1, 123.5, 120.8, 115.1, 114.8, 74.2 ppm.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3397 (w), 2981 (m), 2887 (w), 1609 (m), 1510 (m), 1438 (w), 1380 (w), 1321 (w), 1257 (s), 1224 (w), 1162 (m), 1021 (w), 1004 (s), 970 (w), 951 (w), 841 (m) cm⁻¹.

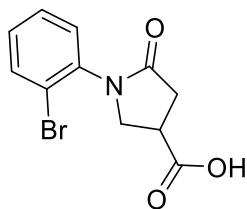
LCMS (ESI+): t_R = 11.4 min (Methode I) m/z (% relative Intensität): 404.1 [M+H⁺] (100)

HR-ESI-MS: (C₂₁H₁₇F₃NO₄)⁺ ber.: 404.1104 gef.: 404.1107

6.2.2 Synthese diverser berechneter Scaffolds

**1-(2-Bromphenyl)-5-oxopyrrolidin-3-carbonsäure
(163, DAG-110)**

In einem 25 mL-Rundkolben wurde Itaconsäure (313 mg, 1.0 Äq., 2.4 mmol) und 2-Bromoanilin (262 μ L, 1.0 Äq., 2.4 mmol) gegeben. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch auf 175 °C erwärmt und bei dieser Temperatur für weitere 30 min gerührt. Nach Abkühlen wurde der erhaltene Feststoff mittels RP-Flash-Chromatographie ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ -Gradient) aufgereinigt. Es wurde ein weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 50.2% (343 mg, 1.21 mmol) erhalten.



$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO-d_6): δ = 12.72 (s, 1H), 7.72 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.46 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.39 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.31 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 3.90 (t, J = 9.0 Hz), 3.83 (dd, J = 9.4, 5.9 Hz, 1H), 3.46 – 3.40 (m, 1H), 2.67 (qd, J = 16.9, 8.2 Hz, 2H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, DMSO-d_6): δ = 174.0, 171.8, 137.5, 133.1, 130.0, 129.8, 128.8, 121.8, 51.3, 36.4, 33.4 ppm.

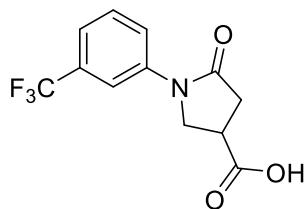
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2980 (m), 2888 (w), 2697 (w), 2503 (w), 1716 (m), 1628 (s), 1583 (w), 1486 (m), 1474 (w), 1436 (w), 1408 (m), 1338 (w), 1303 (m), 1234 (w), 1212 (s), 1122 (w) cm^{-1} .

LCMS (ESI+): t_{R} = 3.8 min (Methode I) m/z (% relative Intensität): 284.0 [$\text{M}-\text{H}^+$] (100)

HR-ESI-MS: ($\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{BrNO}_3\text{Na}^+$) ber.: 305.9736 gef.: 305.9738

**5-Oxo-1-(3-(Trifluoromethyl)phenyl)pyrrolidin-3-carbonsäure
(164, DAG-115)**

In einem 25 mL-Rundkolben wurde Itaconsäure (300 mg, 1.0 Äq., 2.3 mmol) und 3-(Trifluoromethyl)anilin (288 µL, 1.0 Äq., 2.3 mmol) gegeben. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch auf 175 °C erwärmt und bei dieser Temperatur für weitere 30 min gerührt. Nach Abkühlen wurde der erhaltene Feststoff mittels RP-Flash-Chromatographie (H₂O/MeCN-Gradient) aufgereinigt. Es wurde ein gelblicher Feststoff mit einer Ausbeute von 71.1% (447.6 mg, 1.64 mmol) erhalten.



¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 12.68 (s, 1H), 8.17 (s, 1H), 7.87 – 7.76 (m, 1H), 7.59 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.46 (dd, *J* = 7.8, 0.7 Hz, 1H), 4.07 (ddd, *J* = 15.7, 9.8, 7.2 Hz, 2H), 3.45 – 3.31 (m, 1H), 2.79 (qd, *J* = 17.1, 8.2 Hz, 2H) ppm.

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆): δ = 174.2, 172.7, 139.9, 130.0, 129.6 (q, *J* = 31.6 Hz), 124.2 (q, *J* = 274.8 Hz), 122.8, 120.4 (q, *J* = 3.7), 120.1, 115.8 (q, *J* = 4.0 Hz), 49.9, 35.3, 35.2 ppm.

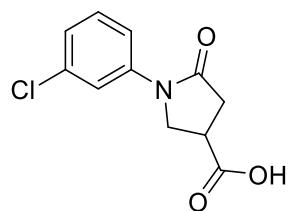
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2980 (m), 2890 (w), 2516 (w), 1699 (s), 1611 (w), 1593 (w), 1496 (w), 1457 (m), 1395 (m), 1330 (m), 1272 (w), 1220 (w), 1164 (w), 1119 (s) cm⁻¹.

LCMS (ESI+): *t*_R = 5.3 min (Methode I) m/z (% relative Intensität): 274.1 [M+H⁺] (100)

HR-ESI-MS: (C₁₂H₁₀F₃NO₃Na⁺) ber.: 296.0505 gef.: 296.0508

1-(3-Chlorphenyl)-5-oxopyrrolidin-3-carbonsäure
(165, DAG-117)

In einem 25 mL-Rundkolben wurde Itaconsäure (300 mg, 1.0 Äq., 2.3 mmol) und 3-Chloroanilin (244 μ L, 1.0 Äq., 2.3 mmol) gegeben. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch auf 175 °C erwärmt und bei dieser Temperatur für weitere 30 min gerührt. Nach Abkühlen wurde der erhaltene Feststoff mittels RP-Flash-Chromatographie ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ -Gradient) aufgereinigt. Es wurde ein gelblicher Feststoff mit einer Ausbeute von 70.6% (390.0 mg, 1.63 mmol) erhalten.



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): δ = 7.84 (t, J = 2.0 Hz, 1H), 7.50 (ddd, J = 8.3, 2.1, 0.8 Hz, 1H), 7.35 (t, J = 8.2 Hz, 1H), 7.15 (ddd, J = 8.0, 2.0, 0.8 Hz, 1H), 4.10 – 3.88 (m, 2H), 3.41 – 3.28 (m, 1H), 2.77 (qd, J = 17.1, 8.2 Hz, 2H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO-d_6): δ = 174.2, 172.4, 140.6, 133.4, 130.4, 123.9, 119.1, 117.6, 50.0, 35.4, 35.2 ppm.

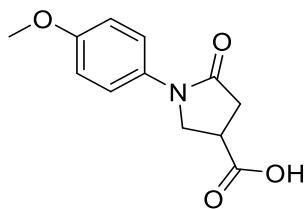
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2980 (w), 2890 (w), 2518 (w), 1696 (s), 1593 (s), 1573 (w), 1481 (s), 1439 (w), 1390 (m), 1313 (w), 1270 (w), 1220 (m), 1129 (w), 1022 (w), 993 (s), 776 (m), 679 (s) cm^{-1} .

LCMS (ESI+): t_{R} = 5.1 min (Methode I) m/z (% relative Intensität): 238.0 [$\text{M}-\text{H}^+$] (100)

HR-ESI-MS: ($\text{C}_{11}\text{H}_9\text{ClNO}_3^-$) ber.: 238.0276 gef.: 238.0276

1-(4-Methoxyphenyl)-5-oxopyrrolidin-3-carbonsäure
(166, DAG-118)

In einem 25 mL-Rundkolben wurde Itaconsäure (300 mg, 1.0 Äq., 2.3 mmol) und *p*-Anisidin (284 mg, 1.0 Äq., 2.3 mmol) gegeben. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch auf 175 °C erwärmt und bei dieser Temperatur für weitere 30 min gerührt. Nach Abkühlen wurde der erhaltene Feststoff mittels RP-Flash-Chromatographie (H₂O/MeCN-Gradient) aufgereinigt. Es wurde ein gelblicher Feststoff mit einer Ausbeute von 46.7% (253.3 mg, 1.08 mmol) erhalten.



¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ = 7.53 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.93 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 4.05 – 3.85 (m, 2H), 3.74 (s, 3H), 3.33 (ddd, *J* = 15.3, 8.9, 6.5 Hz, 1H), 2.71 (ddd, *J* = 23.7, 16.9, 8.2 Hz, 2H) ppm.

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-d₆): δ = 174.3, 171.2, 155.9, 132.3, 121.4, 113.9, 55.2, 50.3, 35.2, 35.0 ppm.

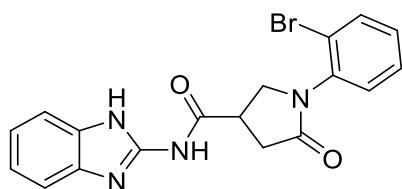
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2980 (m), 2889 (w), 2838 (w), 2735 (w), 2681 (w), 2531 (w), 1719 (s), 1668 (w), 1626 (s), 1541 (w), 1512 (s), 1460 (w), 1433 (w), 1412 (m), 1301 (w), 1283 (m), 1233 (s), 1201 (w), 1179 (w), 1128 (m), 1025 (m), 812 (s), 672 (s) cm⁻¹.

LCMS (ESI+): *t*_R = 4.5 min (Methode I) m/z (% relative Intensität): 236.1 [M+H⁺] (100)

HR-ESI-MS: (C₁₂H₁₃NO₄Na⁺) ber.: 258.0737 gef.: 258.0740

N-(1H-Benzo[d]imidazol-2-yl)-1-(2-bromophenyl)-5-oxopyrrolidin-3-carboxamid
(129, DAG-111)

163 (100.0 mg, 1.0 Äq., 0.35 mmol) wurde in DMF (3 mL) gelöst. Zu dieser Lösung wurde bei 0 °C DIPEA (183 µL, 3.0 Äq., 1.1 mmol) und HATU (147.2 mg, 1.1 Äq., 0.39 mmol) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde bei dieser Temperatur für 30 min gerührt. Anschließend wurde eine Lösung aus 2-Aminobenzimidazol (51.6 mg, 1.1 Äq., 0.39 mmol) in DMF (2 mL) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für eine weitere Stunde bei 0 °C und anschließend für 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter verminderter Druck entfernt und der Rückstand wurde in EtOAc (5 mL) aufgenommen. Die organische Phase wurde mit HCl (10 mL, 1M), H₂O (10 mL) und gesättigter NaCl-Lösung (10 mL) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Die organische Phase wurde filtriert und das Lösungsmittel wurde unter verminderter Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels RP-Flash-Chromatographie (H₂O/MeCN-Gradient) aufgereinigt. Es wurde ein leicht gelblicher Feststoff mit einer Ausbeute von 33.0% (46.4 mg, 0.12 mmol) erhalten.



¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ = 12.01 (s, 2H), 7.73 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.52 – 7.41 (m, 4H), 7.33 (dd, *J* = 10.9, 4.2 Hz, 1H), 7.09 (dd, *J* = 5.8, 3.2 Hz, 2H), 4.03 – 3.88 (m, 2H), 3.74 – 3.64 (m, 1H), 2.79 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H) ppm.

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-d₆): δ = 171.8, 146.5, 137.6, 133.1, 130.1, 129.9, 128.8, 121.8, 121.1, 51.6, 37.5, 33.7 ppm.

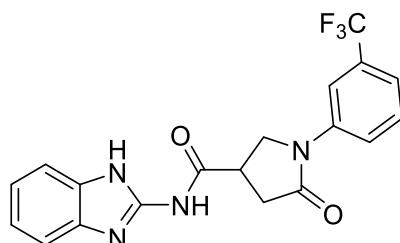
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3326 (w), 2980 (m), 2885 (w), 1688 (s), 1638 (m), 1592 (w), 1578 (m), 1517 (w), 1487 (w), 1458 (w), 1435 (w), 1402 (m), 1372 (w), 1303 (w), 1270 (w), 1243 (m), 1222 (w), 1198 (s), 758 (m), 738 (s) cm⁻¹.

LCMS (ESI+): *t*_R = 8.9 min (Methode I) *m/z* (% relative Intensität): 399.0 [M⁺] (100)

HR-ESI-MS: (C₁₈H₁₅BrN₄NaO₂Na⁺) ber.: 421.0271 gef.: 421.0268

N-(1H-Benzo[d]imidazol-2-yl)-5-oxo-1-(3-(trifluormethyl)phenyl)pyrrolidin-3-carboxamid
(168, DAG-119)

164 (150.0 mg, 1.0 Äq., 0.55 mmol) wurde in DMF (3 mL) gelöst. Zu dieser Lösung wurde bei 0 °C DIPEA (285 µL, 3.0 Äq., 1.65 mmol) und HATU (229.6 mg, 1.1 Äq., 0.60 mmol) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde bei dieser Temperatur für 30 min gerührt. Anschließend wurde eine Lösung aus 2-Aminobenzimidazol (80.4 mg, 1.1 Äq., 0.60 mmol) in DMF (2 mL) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für eine weitere Stunde bei 0 °C und anschließend für 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand wurde in EtOAc (5 mL) aufgenommen. Die organische Phase wurde mit HCl (10 mL, 1M), H₂O (10 mL) und gesättigter NaCl-Lösung (10 mL) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Die organische Phase wurde filtriert und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels RP-Flash-Chromatographie (H₂O/MeCN-Gradient) aufgereinigt. Es wurde ein leicht gelblicher Feststoff mit einer Ausbeute von 84.8% (180.8 mg, 0.47 mmol) erhalten.



¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ = 8.15 (s, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.85 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.68 – 7.60 (m, 1H), 7.52 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.37 (dd, *J* = 5.9, 3.1 Hz, 1H), 4.30 – 4.15 (m, 2H), 3.70 (ddd, *J* = 13.5, 9.1, 4.7 Hz, 1H) ppm.

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-d₆): δ = 172.2, 162.3, 139.7, 130.1, 124.1, 122.9, 115.7, 113.5, 49.9, 38.2, 36.5, 35.7, 35.2, 30.7 ppm.

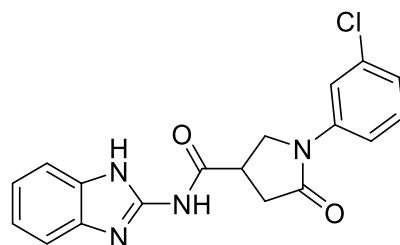
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2934 (w), 1629 (w), 1601 (s), 1498 (w), 1470 (w), 1456 (w), 1410 (w), 1389 (w), 1332 (m), 1299 (w), 1276 (w), 1229 (w), 1123 (m), 1071 (w), 830 (s), 555 (s) cm⁻¹.

LCMS (ESI+): t_R = 9.4 min (Methode I) m/z (% relative Intensität): 389.1 [M+H⁺] (100)

HR-ESI-MS: (C₁₉H₁₆F₃N₄O₂⁺) ber.: 389.1220 gef.: 389.1223

**N-(1H-Benzo[d]imidazol-2-yl)-1-(3-Chlorphenyl)-5-oxopyrrolidin-3-carboxamid
(169, DAG-120)**

165 (131.8 mg, 1.0 Äq., 0.55 mmol) wurde in DMF (3 mL) gelöst. Zu dieser Lösung wurde bei 0 °C DIPEA (285 µL, 3.0 Äq., 1.65 mmol) und HATU (230.0 mg, 1.1 Äq., 0.60 mmol) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde bei dieser Temperatur für 30 min gerührt. Anschließend wurde eine Lösung aus 2-Aminobenzimidazol (80.6 mg, 1.1 Äq., 0.60 mmol) in DMF (2 mL) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für eine weitere Stunde bei 0 °C und anschließend für 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter verminderter Druck entfernt und der Rückstand wurde in EtOAc (5 mL) aufgenommen. Die organische Phase wurde mit HCl (10 mL, 1M), H₂O (10 mL) und gesättigter NaCl-Lösung (10 mL) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Die organische Phase wurde filtriert und das Lösungsmittel wurde unter verminderter Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels RP-Flash-Chromatographie (H₂O/MeCN-Gradient) aufgereinigt. Es wurde ein weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 59.9% (116.9 mg, 0.33 mmol) erhalten.



¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ = 7.85 (s, 1H), 7.63 (dd, *J* = 5.9, 3.2 Hz, 2H), 7.56 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.42 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.38 (dd, *J* = 5.9, 3.1 Hz, 2H), 7.22 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 4.24 – 4.11 (m, 2H), 3.68 (tt, *J* = 9.0, 4.6 Hz, 1H), 2.92 (qd, *J* = 17.1, 7.2 Hz, 2H) ppm.

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-d₆): δ = 172.8, 172.0, 143.55, 140.4, 133.2, 130.4, 130.0, 124.2, 123.9, 119.0, 117.7, 113.4, 111.3, 49.9, 36.5, 35.2 ppm.

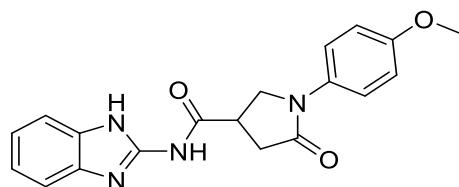
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3355 (w), 2980 (w), 2858 (w), 1684 (s), 1637 (m), 1593 (w), 1577 (m), 1517 (w), 1485 (w), 1459 (w), 1436 (m), 1399 (m), 1313 (w), 1285 (m), 744 (m), 709 (s) cm⁻¹.

LCMS (ESI+): *t*_R = 9.0 min (Methode I) m/z (% relative Intensität): 355.1 [M+H⁺] (100)

HR-ESI-MS: (C₁₈H₁₆ClN₄O₂⁺) ber.: 355.0956 gef.: 355.0954

**N-(1H-Benzo[d]imidazol-2-yl)-1-(4-Methoxyphenyl)-5-oxopyrrolidin-3-carboxamid
(170, DAG-121)**

166 (134.0 mg, 1.0 Äq., 0.57 mmol) wurde in DMF (3 mL) gelöst. Zu dieser Lösung wurde bei 0 °C DIPEA (296 µL, 3.0 Äq., 1.71 mmol) und HATU (238.2 mg, 1.1 Äq., 0.63 mmol) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde bei dieser Temperatur für 30 min gerührt. Anschließend wurde eine Lösung aus 2-Aminobenzimidazol (83.4 mg, 1.1 Äq., 0.63 mmol) in DMF (2 mL) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für eine weitere Stunde bei 0 °C und anschließend für 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand wurde in EtOAc (5 mL) aufgenommen. Die organische Phase wurde mit HCl (10 mL, 1M), H₂O (10 mL) und gesättigter NaCl-Lösung (10 mL) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Die organische Phase wurde filtriert und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels RP-Flash-Chromatographie (H₂O/MeCN-Gradient) aufgereinigt. Es wurde ein bräunlicher Feststoff mit einer Ausbeute von 63.4% (126.5 mg, 0.36 mmol) erhalten.



¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ = 7.64 (dd, *J* = 5.9, 3.2 Hz, 2H), 7.54 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.40 (dd, *J* = 6.0, 3.1 Hz, 2H), 6.96 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 4.19 – 4.03 (m, 2H), 3.75 (s, 3H), 3.67 (ddd, *J* = 13.6, 9.2, 4.7 Hz, 1H), 2.97 – 2.79 (m, 2H) ppm.

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-d₆): δ = 173.0, 170.9, 156.0, 143.4, 132.2, 129.7, 124.4, 121.5, 113.9, 113.4, 55.2, 50.2, 36.6, 34.9 ppm.

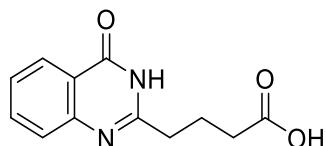
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2935 (w), 1659 (w) 1600 (m), 1512 (m), 1247 (m), 830 (s) 556 (s) cm⁻¹.

LCMS (ESI+): *t*_R = 8.1 min (Methode I) m/z (% relative Intensität): 351.2 [M+H⁺] (100)

HR-ESI-MS: (C₁₉H₁₉N₄O₃) ber.: 351.1452 gef.: 351.1454

4-(4-Oxo-3,4-dihydrochinazolin-2-yl)butansäure
(173, DAG-130)

2-Aminobenzamid (285.9 mg, 2.10 mmol) und Glutarsäureanhydrid (1.198 g, 010.5 mmol, 5 eq) wurden in einem 50 mL Rundkolben in Toluol (10 mL) gelöst. Anschließend wurde die Reaktionslösung für 30 min bei 150 °C unter Mikrowellenbestrahlung gerührt. Das Toluol wurde unter verminderterem Druck entfernt und der Rückstand wurde in 20 mL 2 M NaOH-Lösung gelöst. Die Reaktionslösung wurde für 30 min bei 100 °C unter Mikrowellenbestrahlung gerührt. Nach Abkühlen der Reaktionslösung auf Raumtemperatur wurde die Lösung durch Zugabe von 6 M HCl-Lösung auf einen pH-Wert von pH < 4 eingestellt. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Nach der Trocknung unter Vakuum wurde keine weitere Aufreinigung benötigt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 75.7% (369.3 mg, 1.59 mmol) erhalten.



¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 12.17 (s, 1H), 8.07 (dd, *J* = 7.9, 1.0 Hz, 1H), 7.81 – 7.72 (m, 1H), 7.60 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.45 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 2.63 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 2.31 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 1.96 (p, *J* = 7.4 Hz, 1H) ppm.

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆): δ = 174.1, 161.8, 156.9, 148.9, 134.3, 126.8, 126.0, 125.7, 120.9, 33.5, 32.9, 21.8 ppm.

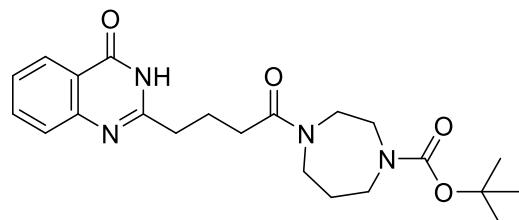
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3181 (w), 3041 (w), 2980 (w), 2889 (w), 1714 (w), 1682 (s), 1611 (m), 1569 (w), 1515 (w), 1474 (m), 1454 (w), 1009 (w), 906 (m), 856 (w), 775 (m), 746 (w), 726 (w), 687 (m), 650 (w), 603 (m), 547 (w), 502 (w), 467 (w) cm⁻¹.

LCMS (ESI+): *t*_R = 3.1 min (Methode I) *m/z* (% relative Intensität): 233.1 [M+H⁺] (100)

HR-ESI-MS: (C₁₂H₁₂N₂NaO₃⁺) ber.: 255.0740 gef.: 255.0740

**tert.-Butyl-4-(4-oxo-3,4-dihydrochinazolin-2-yl)butanoyl)-1,4-diazepan-1-carbonsäureester
(175, DAG-132)**

173 (646.5 mg, 2.78 mmol) wurde in DMF (10 mL) gelöst. Zu dieser Lösung wurde bei 0 °C DIPEA (1.45 mL, 8.35 mmol, 3.0 eq) und HATU (1.16 g, 3.06 mmol, 1.1 eq) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde bei dieser Temperatur für 30 min gerührt. Anschließend wurde eine Lösung aus Boc-1,4-diazepan-1-carboxylat (603 µL, 3.06 mmol, 1.1 eq) in DMF (5 mL) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für eine weitere Stunde bei 0 °C und anschließend für 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt und das Rohprodukt wurde mittels RP-Flash-Chromatographie (H₂O/MeCN-Gradient) aufgereinigt. Das Produkt wurde in einer Ausbeute von 64.7% (746.6 mg, 1.80 mmol) erhalten.



¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 8.07 (dd, *J* = 7.9, 1.2 Hz, 1H), 7.79 – 7.73 (m, 1H), 7.58 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.47 – 7.42 (m, 1H), 3.53 – 3.22 (m, 8H), 2.64 (tt, *J* = 7.2, 3.6 Hz, 2H), 2.37 (dd, *J* = 14.1, 6.9 Hz, 2H), 2.01 – 1.91 (m, 2H), 1.73 – 1.54 (m, 2H), 1.32 (dd, *J* = 18.1, 12.1 Hz, 9H ppm.

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆): δ = 171.1, 161.8, 157.1, 154.3, 148.8, 134.2, 126.8, 125.9, 125.7, 120.9, 78.6, 47.3 – 44.0 (4C), 33.8, 31.4, 27.9, 26.0, 22.3 ppm.

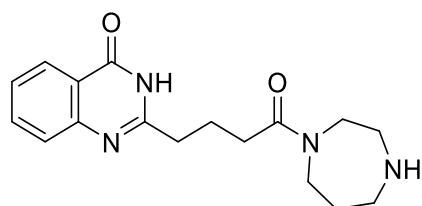
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3418 (w), 3083 (w), 2978 (m), 2929 (w), 1675 (m), 1608 (s), 1468 (m), 1416 (m), 1393 (w), 1366 (m), 1334 (w), 1270 (w), 1247 (m), 1161 (s), 1128 (w), 1093 (w), 1049 (w), 1025 (s), 540 (w), 496 (w), 464 (w), 429 (w) cm⁻¹.

LCMS (ESI+): t_R = 7.5 min (Methode I) m/z (% relative Intensität): 415.2 [M+H⁺] (100)

HR-ESI-MS: (C₂₂H₃₀N₄NaO₄⁺) ber.: 437.2159 gef.: 437.2157

**2-(4-(1,4-Diazepan-1-yl)-4-oxobutyl)quinazolin-4(3*H*)-on
(176, DAG-133)**

In einem 25 mL Rundkolben wurde **175** (746 mg, 1.80 mmol) in MeOH (5 mL) gelöst. Anschließend wurde 0.5 M HCl in MeOH (15 mL) hinzugegeben. Nach vollständigem Umsatz des Edukts wurde das Lösungsmittel unter verminderterem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde anschließend mittels RP-Flash-Chromatographie (H₂O/MeCN-Gradient) aufgereinigt. Das Produkt wurde mit einer Ausbeute von 75.7% (428.1 mg, 1.36 mmol) erhalten.



¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 8.10 – 8.03 (m, 1H), 7.76 (ddd, *J* = 7.3, 1.6, 0.8 Hz, 1H), 7.63 – 7.56 (m, 1H), 7.48 – 7.41 (m, 1H), 3.73 – 3.67 (m, 1H), 3.67 – 3.60 (m, 1H), 3.52 (dt, *J* = 12.0, 6.1 Hz, 2H), 3.17 (dd, *J* = 6.6, 4.0 Hz, 1H), 3.15 – 3.10 (m, 1H), 3.10 – 3.01 (m, 2H), 2.65 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.42 (td, *J* = 7.4, 3.7 Hz, 2H), 2.05 – 1.84 (m, 4H) ppm.

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆): δ = 171.7, 161.9, 157.2, 148.8, 134.3, 126.7, 126.0, 125.7, 120.9, 46.2, 45.6, 45.2, 44.2, 43.8, 43.0, 41.3, 33.7, 31.6, 31.5, 25.3, 24.8, 22.0 ppm.

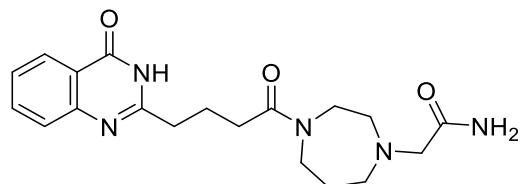
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3419 (w), 2980 (m), 2250 (w), 2124 (w), 1679 (m), 1637 (w), 1607 (s), 1467 (m), 1424 (w), 1379 (w), 1322 (w), 1131 (w), 1050 (w), 1023 (w), 1001 (s), 886 (w), 822 (m), 760 (m), 719 (w), 692 (w), 614 (w), 584 (w), 542 (w), 496 (w), 434 (w) cm⁻¹.

LCMS (ESI+): t_R = 5.1 min (Methode I) m/z (% relative Intensität): 315.2 [M+H⁺] (100)

HR-ESI-MS: (C₁₇H₂₃N₄O₂)⁺ ber.: 315.1816 gef.: 315.1815

**2-(4-(4-oxo-3,4-dihydrochinazolin-2-yl)butanoyl)-1,4-diazepan-1-yl)acetamid
(155, DAG-134, nicht vollständig charakterisiert)**

Eine Lösung aus 2-Chloracetamid (14.9 mg, 0.16 mmol, 1.0 eq) und K_2CO_3 (109.9 mg, 0.80 mmol, 5.0 eq) in 1 mL trockenem MeCN wurde für 10 min auf 100 °C erhitzt. Bei dieser Temperatur wurde anschließend **176** (50.0 mg, 0.16 mmol) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für weitere 5 h unter Reflux erhitzt. Nach vollständigem Umsatz wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in EtOAc aufgenommen und mit H_2O gewaschen (3x 2 mL). Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck konzentriert. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels RP-Flash-Säulenchromatographie (Wasser/Acetonitril-Gradient) aufgereinigt. Das Produkt wurde mit einer Ausbeute von 75.0% (44.3 mg, 0.12 mmol) erhalten.



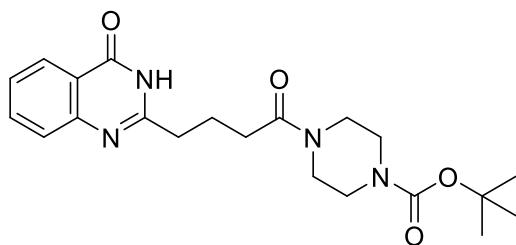
IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3396$ (m), 1666 (s), 1608 (w), 1569 (w), 1470 (w), 1401 (m), 1338 (w), 1299 (w), 1202 (w), 1182 (w), 1133 (w), 1049 (w), 1025 (m), 1005 (w), 777 (m) cm^{-1} .

LCMS (ESI+): $t_{\text{R}} = 4.5$ min (Methode I) m/z (% relative Intensität): 372.2 [$\text{M}+\text{H}^+$] (25)

HR-ESI-MS: ($\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{NaO}_3^+$) ber.: 394.1850 gef.: 394.1850

**tert.-Butyl-4-(4-oxo-3,4-dihydrochinazolin-2-yl)butanoylpiperazin-1-carboxylat
(pre-177, DAG-138)**

173 (242.0 mg, 1.04 mmol) wurde in DMF (3 mL) gelöst. Zu dieser Lösung wurde bei 0 °C DIPEA (544 µL, 3.13 mmol, 3.0 eq) und HATU (435.8 mg, 1.15 mmol, 1.1 eq) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde bei dieser Temperatur für 30 min gerührt. Anschließend wurde eine Lösung aus 1-Boc-Piperazin (213.5 mg, 1.15 mmol, 1.1 eq) in DMF (2 mL) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für eine weitere Stunde bei 0 °C und anschließend für 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt und das Rohprodukt wurde mittels RP-Flash-Chromatographie (H₂O/MeCN-Gradient) aufgereinigt. Das Produkt wurde in einer Ausbeute von 84.1% (351.0 mg, 0.88 mmol) erhalten.



¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 8.09 (dd, *J* = 7.9, 1.2 Hz, 1H), 7.83 – 7.77 (m, 1H), 7.62 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.52 – 7.46 (m, 1H), 3.39 (dd, *J* = 8.8, 4.1 Hz, 4H), 3.33 (d, *J* = 5.2 Hz, 2H), 3.25 (d, *J* = 4.1 Hz, 2H), 2.68 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.43 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.98 (p, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.40 (s, 9H) ppm.

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆): δ = 170.3, 161.5, 157.8, 153.8, 148.4, 134.5, 126.3, 125.8, 125.5, 120.7, 79.1, 44.6, 40.8, 33.4, 31.5, 28.0, 22.0 ppm.

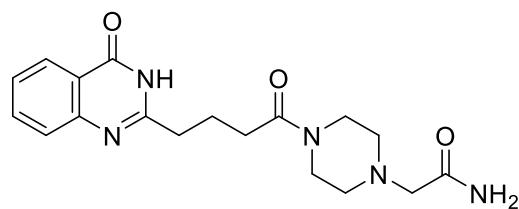
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2980 (s), 2889 (w), 1680 (s), 1648 (w), 1609 (m), 1542 (w), 1507 (w), 1457 (w), 1412 (m), 1365 (w), 1340 (w), 1286 (w), 1250 (w), 1238 (m), 1218 (w), 1163 (s), 1123 (w), 1084 (w), 1026 (w), 997 (m), 967 (w), 888 (w), 862 (w), 770 (s), 541 (w), 495 (w) cm⁻¹.

LCMS (ESI+): *t*_R = 7.1 min (Methode I) *m/z* (% relative Intensität): 401.2 [M+H⁺] (100)

HR-ESI-MS: (C₂₁H₂₉N₄O₄) ber.: 401.2183 gef.: 401.2182

**2-(4-(4-oxo-3,4-dihydrochinazolin-2-yl)butanoyl)piperazin-1-yl)acetamid
(177, DAG-173)**

In einem 25 mL Rundkolben wurde **pre-177** (92.1 mg, 0.23 mmol) in MeOH (5 mL) gelöst. Anschließend wurde 0.5 M HCl in MeOH (15 mL) hinzugegeben. Nach vollständiger Abspaltung der Schutzgruppe wurde das Lösungsmittel unter verminderter Druck entfernt. Eine Lösung aus 2-Chloracetamid (21.8 mg, 0.23 mmol, 1.0 Äq.) und K₂CO₃ (161.1 mg, 1.17 mmol, 5.0 Äq.) in MeCN (1 mL) wurde für 10 min auf 100 °C erhitzt. Bei dieser Temperatur wurde das zuvor erzeugte Rohprodukt hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für weitere 5 h unter Reflux erhitzt. Nach vollständigem Umsatz wurde das Lösungsmittel unter verminderter Druck entfernt. Der Rückstand wurde in EtOAc aufgenommen und mit H₂O (3x 2 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und unter verminderter Druck konzentriert. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels RP-Flash-Chromatographie (H₂O/MeCN-Gradient) aufgereinigt. Das Produkt wurde mit einer Ausbeute von 69% (57.4 mg, 0.16 mmol) erhalten.



¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 8.08 (dd, *J* = 8.0, 1.2 Hz, 1H), 7.80 (ddd, *J* = 10.1, 5.8, 2.2 Hz, 2H), 7.61 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.52 – 7.46 (m, 1H), 7.34 – 7.14 (m, 2H), 4.75 (s, 2H), 3.54 – 3.43 (m, 4H), 2.74 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.44 (dd, *J* = 8.2, 4.2 Hz, 4H), 2.38 – 2.33 (m, 2H), 2.03 – 1.92 (m, 2H) ppm.

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆): δ = 171.5, 170.3, 168.6, 161.3, 157.3, 147.0, 134.4, 126.7, 126.3, 126.2, 119.8, 60.9, 53.0, 52.6, 45.3, 44.8, 41.0, 33.6, 31.5, 21.7 ppm.

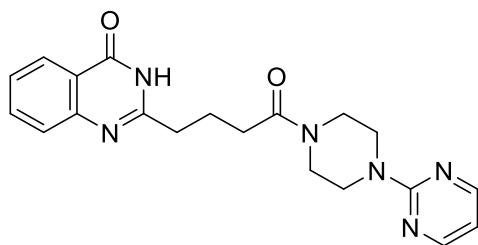
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3348 (w), 3176 (w), 3015 (w), 2978 (w), 2949 (w), 2915 (w), 2860 (w), 1696 (w), 1681 (w), 1634 (s), 1610 (w), 1593 (w), 1416 (m), 1397 (w), 1344 (w), 1245 (m), 1211 (w), 1142 (w), 1111 (w), 1083 (w), 1033 (w), 1006 (m), 771 (m), 697 (m), 588 (m) cm⁻¹

LCMS (ESI+): t_R = 1.7 min (Methode II) m/z (% relative Intensität): 356.1 [M+H⁺] (49.2)

HR-ESI-MS: (C₁₈H₂₄N₅O₃⁺) ber.: 358.1874 gef.: 358.1874

**2-(4-Oxo-4-(4-(Pyrimidin-2-yl)piperazin-1-yl)butyl)chinazolin-4(3H)-on
(178, DAG-136)**

173 (100.0 mg, 0.43 mmol) wurde in DMF (3 mL) gelöst. Zu dieser Lösung wurde bei 0 °C DIPEA (225 µL, 1.29 mmol, 3.0 eq) und HATU (180.1 mg, 0.47 mmol, 1.1 eq) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde bei dieser Temperatur für 30 min gerührt. Anschließend wurde eine Lösung aus 1-(2-Pyrimidyl)piperazin (67 µL, 0.47 mmol, 1.1 eq) in DMF (2 mL) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für eine weitere Stunde bei 0 °C und anschließend für 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt und das Rohprodukt wurde mittels RP-Flash-Chromatographie (H₂O/MeCN-Gradient) aufgereinigt. Das Produkt wurde in einer Ausbeute von 80.9% (131.8 mg, 0.35 mmol) erhalten.



¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 12.17 (s, 1H), 8.38 (d, *J* = 4.7 Hz, 2H), 8.07 (dd, *J* = 7.9, 1.2 Hz, 1H), 7.81 – 7.71 (m, 1H), 7.59 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.45 (ddd, *J* = 8.1, 7.2, 1.1 Hz, 1H), 6.65 (t, *J* = 4.7 Hz, 1H), 3.79 – 3.71 (m, 2H), 3.71 – 3.64 (m, 2H), 3.52 (dd, *J* = 12.2, 7.2 Hz, 4H), 2.66 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.46 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.00 (p, *J* = 7.4 Hz, 2H) ppm.

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆): δ = 170.4, 161.8, 161.1, 158.0, 157.0, 148.9, 134.2, 126.8, 125.9, 125.7, 120.9, 110.4, 44.5, 43.4, 43.1, 40.7, 33.7, 31.6, 22.0 ppm.

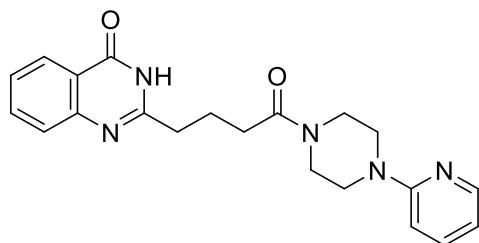
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2980 (s), 2891 (w), 1683 (m), 1656 (m), 1613 (m), 1586 (s), 1551 (m), 1490 (w), 1468 (w), 1434 (m), 1391 (w), 1307 (w), 1249 (m), 1204 (m), 1174 (w), 1160 (w), 1133 (w), 1108 (w), 983 (m), 955 (w), 775 (s), 750 (w), 688 (w), 662 (w), 638 (w), 596 (m) cm⁻¹.

LCMS (ESI+): t_R = 5.8 min (Methode I) m/z (% relative Intensität): 379.2 [M+H⁺] (100)

HR-ESI-MS: (C₂₀H₂₂N₆NaO₂⁺) ber.: 401.1696 gef.: 401.1696

**2-(4-Oxo-4-(4-(Pyridin-2-yl)piperazin-1-yl)butyl)chinazolin-4(3H)-on
(179, DAG-137)**

173 (100.0 mg, 0.43 mmol) wurde in DMF (3 mL) gelöst. Zu dieser Lösung wurde bei 0 °C DIPEA (225 µL, 1.29 mmol, 3.0 eq) und HATU (180.1 mg, 0.47 mmol, 1.1 eq) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde bei dieser Temperatur für 30 min gerührt. Anschließend wurde eine Lösung aus 1-(2-Pyridyl)piperazin (72 µL, 0.47 mmol, 1.1 eq) in DMF (2 mL) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für eine weitere Stunde bei 0 °C und anschließend für 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt und das Rohprodukt wurde mittels RP-Flash-Chromatographie (H₂O/MeCN-Gradient) aufgereinigt. Das Produkt wurde in einer Ausbeute von 60.5% (98.3 mg, 0.26 mmol) erhalten.



¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 8.10 (s, 1H), 8.09 – 8.00 (m, 2H), 7.74 – 7.67 (m, 1H), 7.58 – 7.49 (m, 2H), 7.44 – 7.38 (m, 1H), 6.80 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.63 (dd, *J* = 7.0, 5.1 Hz, 1H), 3.50 (d, *J* = 4.3 Hz, 4H), 3.40 (dd, *J* = 6.2, 3.5 Hz, 2H), 2.62 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.48 – 2.44 (m, 2H), 2.41 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.96 (p, *J* = 7.4 Hz, 2H) ppm.

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆): δ = 170.4, 161.9, 158.5, 157.2, 148.7, 147.1, 137.9, 134.3, 126.7, 126.0, 125.7, 120.9, 113.3, 107.5, 44.8, 44.5, 44.4, 40.6, 33.7, 31.6, 22.0 ppm.

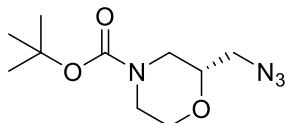
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3357 (w), 3195 (w), 3142 (w), 3085 (w), 2981 (s), 2933 (w), 2896 (w), 1687 (s), 1651 (w), 1596 (s), 1482 (m), 1466 (m), 1439 (s), 1384 (m), 1312 (s), 1280 (m), 1248 (s), 1226 (w), 1167 (m), 1147 (s), 1127 (m), 1054 (w), 1021 (s), 1005 (w), 980 (s), 943 (w), 920 (m), 888 (m), 863 (s), 775 (s), 736 (m), 691 (m), 670 (m), 591 (s), 570 (w), 513 (m), 461 (m) cm⁻¹.

LCMS (ESI+): *t*_R = 6.7 min (Methode I) *m/z* (% relative Intensität): 378.2 [M+H⁺] (100)

HR-ESI-MS: (C₂₁H₂₄N₅O₂⁺) ber.: 378.1925 gef.: 378.1928

tert-Butyl-(R)-2-(azidomethyl)morpholin-4-carbonsäureester
(181, DAG-122)

Zu (R)-2-Hydroxymethyl-morpholin-4-carbonsäure-*tert*-butylester (1.6 g, 7.36 mmol) und Et₃N (1.539 mL, 11.1 mmol, 1.5 eq) in DCM (14.3 mL) bei 0 °C wurde MsCl (684 µL, 8.84 mmol, 1.2 eq) tropfenweise zugegeben, und das Reaktionsgemisch wurde 30 min bei 0 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit DCM (14.3 mL) verdünnt, mit H₂O versetzt (14.3 mL) und 20 min bei Raumtemperatur gerührt. Die organische Schicht wurde abgetrennt, getrocknet, filtriert und unter verminderterem Druck konzentriert. Der Rückstand wurde in DMF (14.3 mL) gelöst und NaN₃ (1.715 g, 26.4 mmol, 3.6 eq) zugegeben. Das entstandene Reaktionsgemisch wurde 16 h lang bei 80 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur abgekühlt, mit Et₂O (85 mL) verdünnt, mit H₂O versetzt und 30 min lang bei Raumtemperatur gerührt. Die organische Schicht wurde abgetrennt, getrocknet, filtriert und unter verminderterem Druck konzentriert. Der Rückstand wurde durch Flash-Chromatographie (CH/EtOAc; 8:2) gereinigt, um **181** mit einer Ausbeute von 95.6% (1.7 g, 7.04 mmol) zu erhalten.



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 3.95 – 3.78 (m, 3H), 3.59 – 3.47 (m, 2H), 3.29 (dd, *J* = 5.2, 1.7 Hz, 2H), 2.99 – 2.87 (m, 1H), 2.70 (t, *J* = 11.7 Hz, 1H), 1.44 (s, 9H) ppm.

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 154.7, 80.4, 74.4, 66.6, 52.8, 45.8, 43.5, 28.4 ppm.

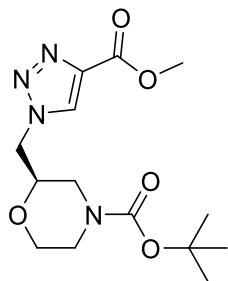
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2974 (w), 2927 (w), 2864 (w), 2131 (w), 2090 (s), 1693 (s), 1455 (w), 1418 (s), 1393 (w), 1363 (m), 1354 (w), 1296 (m), 1284 (w), 1256 (m), 1234 (s), 1204 (w), 1161 (m), 1128 (s), 1110 (w), 1065 (w), 1046 (m), 1032 (w), 978 (m), 942 (w), 906 (w), 858 (m), 837 (w), 817 (w), 767 (w), 759 (m), 657 (w), 596 (s), 555 (w), 478 (m), 443 (w) cm⁻¹.

LCMS (ESI+): t_R = 10.3 min (Methode I) m/z (% relative Intensität): 265.2 [M+Na⁺] (51)

HR-ESI-MS: (C₁₀H₁₈N₄O₃Na⁺) ber.: 265.1271 gef.: 265.1271

**tert-Butyl-(R)-2-((4-(Methoxycarbonyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)morpholin-4-carboxylat
(183, DAG-128)**

181 (200 mg, 0.83 mmol) und Propiolsäuremethylester (70 μ L, 0.83 mmol, 1.0 eq) wurden in MeCN (826 μ L) gelöst. Zu dieser Lösung wurde eine Lösung aus Natriumascorbat (1.6 mg, 0.01 mmol, 0.01 eq) und CuSO₄·5H₂O (2 mg, 0.01 mmol, 0.01 eq) in 165 μ L H₂O gegeben. Die inhomogene Reaktionslösung wurde für 16 h stark gerührt. Nach vollständigem Umsatz wurde die Reaktionslösung filtriert. Das Filtrat wurde anschließend mittels RP-Flash-Chromatographie (H₂O/MeCN-Gradient) aufgereinigt. Das Produkt wurde mit einer Ausbeute von 95.4% (257.1 g, 0.79 mmol) erhalten.



¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = δ 8.72 (s, 1H), 4.57 (ddd, *J* = 22.2, 14.3, 5.8 Hz, 1H), 3.93 – 3.62 (m, 5H), 3.54 – 3.30 (m, 2H), 2.75 (d, *J* = 80.0 Hz, 2H), 1.40 (s, 9H) ppm.

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆): δ = 160.7, 153.9, 138.5, 129.8, 79.3, 79.2, 74.0, 73.0, 65.6, 51.8, 51.4, 28.0 ppm.

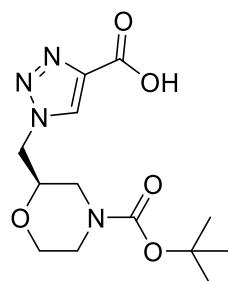
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3379 (w), 3313 (w), 3142 (w), 2981 (w), 2923 (w), 2868 (w), 2093 (m), 1694 (s), 1542 (w), 1472 (w), 1454 (w), 1415 (s), 1365 (m), 1352 (w), 1341 (w), 1311 (w), 1295 (w), 1275 (w), 1250 (w), 1232 (s), 1207 (w), 1165 (m), 1127 (s), 1111 (w), 1074 (w), 1046 (m), 1010 (w), 995 (w), 979 (w), 943 (w), 930 (w), 907 (w), 882 (w), 858 (m), 836 (w), 818 (w), 808 (w), 778 (m), 769 (w), 759 (w), 738 (w), 696 (w), 658 (w), 642 (w), 596 (m), 569 (w), 556 (w), 511 (w), 478 (w) cm⁻¹.

LCMS (ESI+): *t*_R = 8.3 min (Methode I) m/z (% relative Intensität): 327.2 [M+H⁺] (22)

HR-ESI-MS: (C₁₄H₂₂N₄NaO₅⁺) ber.: 349.1482 gef.: 349.1479

(R)-1-((4-(tert-Butoxycarbonyl)morpholin-2-yl)methyl)-1*H*-1,2,3-Triazol-4-carbonsäure (184, DAG-125)

Zu einer Lösung von DAG-128 (957.8 mg, 2.93 mmol) in THF/H₂O (1:1; 35 mL) wurde Lithiumhydroxid (351.4 mg, 14.7 mmol, 5.0 eq) gegeben. Die Reaktionslösung wurde bis zum vollständigen Lösens des Lithiumhydroxids im Ultraschallbad platziert. Anschließend wurde die Reaktionslösung für 23 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem Umsatz wurde 1 M HCl-Lösung (3 mL) hinzugegeben und die Lösung wurde mit Ethylacetat (3x 5 mL) extrahiert. Die vereinte organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und unter verminderterem Druck konzentriert. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels RP-Flash-Chromatographie (Wasser/Acetonitril-Gradient) aufgereinigt. Das Produkt wurde in einer Ausbeute von 99.8% (914.8 mg, 2.93 mmol) erhalten.



¹H NMR (400 MHz, MeOH-d₄): δ = 8.45 (s, 1H), 4.64 (dd, *J* = 14.3, 3.6 Hz, 1H), 4.52 (dd, *J* = 14.3, 7.5 Hz, 1H), 4.00 (d, *J* = 13.0 Hz, 1H), 3.88 (d, *J* = 10.2 Hz, 2H), 3.85 – 3.76 (m, 3H), 3.57 – 3.41 (m, 2H), 1.44 (s, 9H) ppm.

¹³C NMR (101 MHz, MeOH-d₄): δ = 163.4, 156.3, 141.1, 130.7, 81.8, 75.8, 74.7, 67.4, 53.6, 53.2, 28.6 ppm.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3431 (w), 3113 (w), 2979 (w), 2923 (w), 2862 (w), 2560 (w), 2092 (w), 1694 (s), 1556 (w), 1472 (w), 1455 (w), 1417 (m), 1395 (w), 1365 (w), 1313 (w), 1297 (w), 1255 (w), 1234 (m), 1166 (m), 1130 (s), 1113 (w), 1073 (w), 1062 (w), 1047 (m), 1033 (w), 979 (w), 955 (w), 906 (w), 891 (w), 859 (m), 837 (w), 818 (w), 768 (m), 597 (w), 569 (w), 556 (m), 516 (w), 478 (w), 457 (w), 444 (w) cm⁻¹.

LCMS (ESI+): *t*_R = 4.8 min (Methode I) *m/z* (% relative Intensität): 313.2 [M+H⁺] (16)

HR-ESI-MS: (C₁₃H₂₀N₄NaO₅⁺) ber.: 335.1326 gef.: 335.1326

Isochinolin-1-carboxamid**(186, DAG-123)**

Zu Isochinolin-1-carbonsäure (200.0 mg, 1.15 mmol) und CDI (374.5 mg, 2.31 mmol, 2.0 eq), die in einem 25 mL-Rundkolben gerührt wurden, wurden 5 mL THF und Et₃N (321 µL, 2.31 mmol, 2.0 eq) hinzugefügt. Zu dieser Reaktionslösung wurde anschließend NH₄Cl (123.6 mg, 2.31 mmol, 2.0 eq) gegeben. Die Reaktion wurde für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter verminderterem Druck entfernt und der Rückstand wurde mittels RP-Flash-Chromatographie (H₂O/MeCN-Gradient) gereinigt. Das Produkt wurde mit einer Ausbeute von 99.0% (196.9 mg, 1.14 mmol) erhalten.



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 9.57 – 9.51 (m, 1H), 8.48 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H), 8.05 (s, 1H), 7.86 (dd, *J* = 7.5, 2.0 Hz, 1H), 7.82 (dd, *J* = 5.5, 0.5 Hz, 1H), 7.76 – 7.65 (m, 2H), 5.89 (s, 1H) ppm.

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 168.8, 147.8, 140.4, 137.5, 130.7, 128.9, 127.9, 127.2, 127.0, 124.9 ppm.

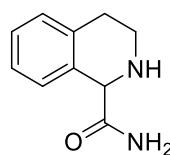
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3424 (m), 3337 (w), 3253 (w), 3105 (w), 3058 (w), 1939 (w), 1679 (s), 1622 (w), 1581 (m), 1549 (w), 1501 (w), 1456 (w), 1427 (w), 1408 (w), 1365 (w), 1312 (m), 1256 (w), 1233 (w), 1187 (w), 1153 (w), 1142 (w), 1090 (w), 1022 (w), 1007 (w), 964 (w), 878 (w), 862 (w), 828 (m), 815 (w), 804 (w), 755 (w), 732 (m), 708 (w), 634 (w), 591 (s), 532 (w), 502 (m), 467 (m) cm⁻¹.

LCMS (ESI+): t_R = 6.0 min (Methode B) m/z (% relative Intensität): 173.1 [M+H⁺] (100)

HR-ESI-MS: (C₁₀H₈N₂NaO⁺) ber.: 195.0529 gef.: 195.0526

1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin-1-carboxamid
(187, DAG-126)

Eine Lösung aus DAG-123 (150.0 mg, 0.87 mmol) in Methanol (14 mL) wurde mit Platindioxid (17.6 mg, 0.08 mmol, 0.09 eq) versetzt. Das Reaktionsgefäß wurde anschließend in einem Autoklaven platziert und bei Raumtemperatur für 16 h bei einem Druck von 4.14 bar unter H₂-Atmosphäre gerührt. Nach vollständigem Umsatz wurde die Reaktionslösung filtriert und das Methanol wurde unter verminderterem Druck entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt benötigte keine weitere Aufarbeitung. Das Produkt wurde in einer Ausbeute von 98.1% (150.7 mg, 0.85 mmol) erhalten.



¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 7.55 – 7.02 (m, 4H), 4.35 (s, 1H), 3.17 – 2.56 (m, 4H) ppm.

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆): δ = 174.7, 135.4, 134.4, 128.9, 126.8, 126.2, 125.3, 59.6, 40.7, 28.9 ppm.

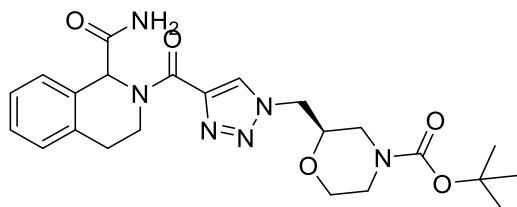
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3380 (w), 3314 (m), 3196 (w), 3019 (w), 2955 (w), 2924 (w), 2811 (w), 2720 (w), 1641 (w), 1622 (s), 1494 (w), 1462 (w), 1412 (m), 1369 (w), 1312 (w), 1292 (w), 1258 (w), 1231 (w), 1207 (w), 1183 (w), 1136 (m), 1119 (w), 1106 (w), 1080 (w), 1058 (w), 1047 (w), 971 (w), 938 (w), 910 (w), 870 (w), 854 (w), 820 (w), 741 (s), 719 (w), 703 (w), 683 (w), 620 (w), 596 (w), 557 (w), 510 (w), 495 (w), 459 (m), 435 (m) cm⁻¹.

LCMS (ESI+): t_R = 0.7 min (Methode II) m/z (% relative Intensität): 177.1 [M+H⁺] (100)

HR-ESI-MS: (C₁₀H₁₂N₂NaO⁺) ber.: 199.0842 gef.: 199.0843

**tert-Butyl-(2*R*)-2-((4-(1-carbamoyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-2-carbonyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)morpholin-4-carboxylat
(188, DAG-127)**

184 (183.5 mg, 0.59 mmol) wurde in DMF (3 mL) gelöst. Zu dieser Lösung wurde bei 0 °C DIPEA (305 µL, 1.76 mmol, 3.0 eq) und HATU (245.7 mg, 0.65 mmol, 1.1 eq) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde bei dieser Temperatur für 30 min gerührt. Anschließend wurde eine Lösung aus **187** (113.9 mg, 0.65 mmol, 1.1 eq) in DMF (2 mL) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für eine weitere Stunde bei 0 °C und anschließend für 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt und das Rohprodukt wurde mittels RP-Flash-Chromatographie (H₂O/MeCN-Gradient) aufgereinigt. Das Produkt wurde in einer Ausbeute von 75.3% (208.2 mg, 0.44 mmol) erhalten.



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.59 (s, 1H), 7.29 – 7.18 (m, 4H), 5.82 (s, 1H), 4.67 (tt, *J* = 6.9, 2.7 Hz, 1H), 4.19 (dd, *J* = 12.5, 2.7 Hz, 1H), 3.96 (dd, *J* = 12.4, 6.9 Hz, 1H), 3.84 (ddt, *J* = 16.6, 11.9, 4.4 Hz, 2H), 3.79 – 3.58 (m, 5H), 3.52 (dd, *J* = 12.4, 2.6 Hz, 1H), 3.00 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H), 1.49 (s, 9H) ppm.

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 170.3, 155.4, 152.5, 135.3, 134.8, 134.0, 129.2, 128.9, 128.2, 126.6, 126.6, 81.0, 72.2, 65.9, 64.9, 50.4, 47.1, 43.0, 40.3, 28.9, 28.4 ppm.

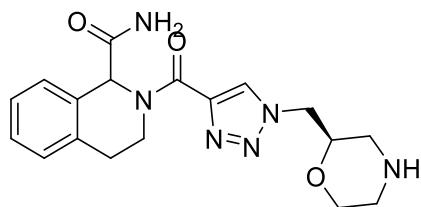
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3402 (w), 2969 (m), 2928 (w), 2868 (w), 1681 (s), 1614 (m), 1541 (w), 1454 (w), 1417 (s), 1366 (w), 1251 (w), 1239 (m), 1163 (s), 1130 (w), 1109 (m), 1046 (w), 950 (m), 887 (w), 862 (w), 843 (m), 816 (w), 759 (m), 698 (w), 612 (m), 546 (w), 494 (w) cm⁻¹.

LCMS (ESI+): t_R = 8.4 min (Methode II) m/z (% relative Intensität): 471.2 [M+H⁺] (100)

HR-ESI-MS: (C₂₃H₃₀N₆NaO₅⁺) ber.: 493.2170 gef.: 493.2166

2-((1-((R)-Morpholin-2-yl)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carbonyl)-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-1-carboxamid
(157. DAG-129)

In einem 25 mL Rundkolben wurde **188** (380 mg, 1.80 mmol) in MeOH (5 mL) gelöst. Anschließend wurde 0.5 M HCl in MeOH (15 mL) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem Umsatz des Edukts wurde das Lösungsmittel unter verminderterem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde anschließend mittels RP-Flash-Chromatographie (H₂O/MeCN-Gradient) aufgereinigt. Das Produkt wurde mit einer Ausbeute von 50.5% (151.0 mg, 0.41 mmol) erhalten.



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.59 (s, 1H), 7.30 – 7.15 (m, 4H), 5.82 (s, 1H), 3.83 (m, 6H), 3.28 (dt, *J* = 12.4, 5.4 Hz, 1H), 2.99 – 2.86 (m, 3H), 2.80 (t, *J* = 5.3 Hz, 2H), 2.69 (dd, *J* = 12.5, 2.5 Hz, 1H) ppm.

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 170.3, 152.5, 135.3, 134.8, 134.0, 129.2, 128.9, 128.2, 126.6, 126.5, 74.9, 65.8, 65.5, 51.3, 50.2, 45.6, 40.3, 28.9 ppm.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3396 (m), 2980 (w), 2255 (w), 2127 (w), 1687 (w), 1618 (m), 1541 (w), 1493 (w), 1418 (w), 1289 (w), 1221 (w), 1113 (w), 1084 (w), 1048 (w), 1023 (s), 1002 (w), 844 (w), 823 (m), 759 (m), 612 (m), 544 (w) cm⁻¹.

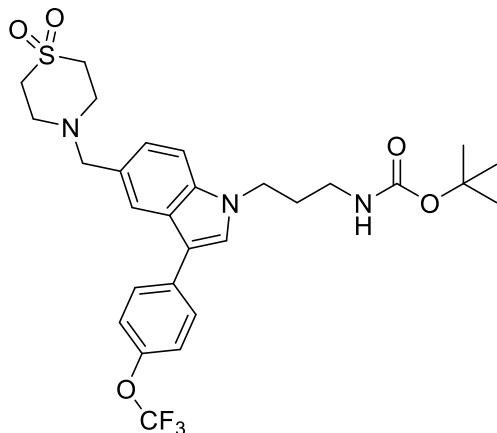
LCMS (ESI+): t_R = 5.5 min (Methode I) m/z (% relative Intensität): 371.2 [M+H⁺] (100)

HR-ESI-MS: (C₁₈H₂₂N₆NaO₃⁺) ber.: 393.1646 gef.: 393.1647

6.2.3 PROTAC-Synthese

tert-Butyl-(3-((1,1-dioxidothiomorpholino)methyl)-3-(4-(trifluormethoxy)phenyl)-1*H*-indol-1-yl)propyl)carbamat
(197, LUM-045)

Zu einer Lösung aus **195** (LUM-022, 300 mg, 1 Äq., 0.65 mmol) und Thiomorpholin-1,1-dioxid (131.5 mg, 1.5 Äq., 0.97 mmol) in trockenem DCM (5 mL) wurde portionsweise STAB (412.5 mg, 3 Äq., 1.95 mmol) hinzugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Reaktionsende wurde zu der Reaktionslösung eine gesättigte NaHCO₃-Lösung (10 mL) gegeben und mit DCM (3x 15 mL) extrahiert. Die vereinigte organische Phase wurde mit einer gesättigten NaCl-Lösung (15 mL) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter verminderter Druck wurde das Rohprodukt (380 mg) mittels RP-Flash-Chromatographie (H₂O/MeCN-Gradient) aufgereinigt. Nach Lyophilisierung wurde **197** als gelblicher Feststoff (312.8 mg, 0.54 mmol, 82.9%) erhalten.



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.75 (s, 1H), 7.65 – 7.61 (m, 2H), 7.35 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.30 (d, *J* = 7.9 Hz, 3H), 7.25 (d, *J* = 9.7 Hz), 4.61 (s, 1H), 4.22 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 3.78 (s, 2H), 3.17 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 3.03 (s, 8H), 2.07 (p, *J* = 6.8 Hz, 2H), 1.44 (s, 9H) ppm.

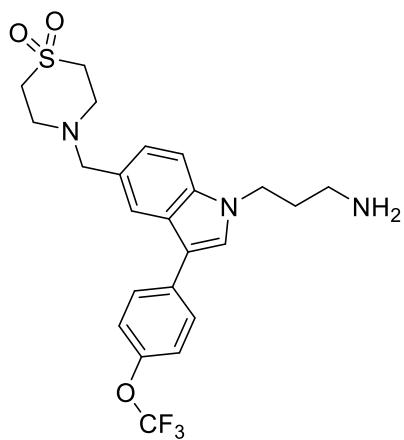
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 156.2, 147.5, 136.5, 134.3, 128.5, 126.5, 126.3, 123.6, 122.0, 121.6, 120.4, 119.5, 115.8, 110.0, 79.7, 62.1, 51.5, 50.6, 44.1, 38.3, 30.7, 28.5 ppm.

LCMS (ESI+): t_R = 12.2 min (Methode I) m/z (% relative Intensität): 582.2 [M+H⁺] (100)

HR-ESI-MS: (C₂₈H₃₅F₃N₃O₅S⁺) ber.: 582.2244 gef.: 582.2241

**4-((1-(3-Aminopropyl)-3-(4-(trifluormethoxy)phenyl)-1*H*-indol-5-yl)methyl)-thiomorpholin-1,1-dioxide
(198, LUM-046)**

197 (130 mg, 1 Äq., 0.22 mmol) wurde in Dioxan (1 mL) gelöst und anschließend mit einer 4 M HCl-Lösung in Dioxan (1 mL) versetzt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem Umsatz des Edukts wurde das Lösungsmittel unter verminderterem Druck entfernt und das so erhaltene Rohprodukt wurde mittels RP-Flash-Chromatographie (H₂O/MeCN-Gradient) aufgereinigt. **198** wurde als gelbliches Öl (102.2 mg, 0.21 mmol, 95%) erhalten.



¹H NMR (400 MHz, MeOH-d₄): δ = 8.04 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 7.78 – 7.73 (m, 2H), 7.66 (s, 1H), 7.63 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.39 (dd, *J* = 8.5, 1.6 Hz, 1H), 7.35 (dd, *J* = 8.8, 0.9 Hz, 2H), 4.44 (s, 2H), 4.40 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.67 – 3.61 (m, 4H), 3.46 – 3.40 (m, 4H), 3.01 – 2.93 (m, 2H), 2.29 – 2.19 (m, 2H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, MeOH-d₄): δ = 148.8, 138.7, 135.6, 129.7, 128.6, 127.8, 125.7, 123.7, 123.3, 122.6, 120.2, 117.5, 111.7, 62.2, 51.6, 49.7, 44.3, 38.4, 29.4 ppm.

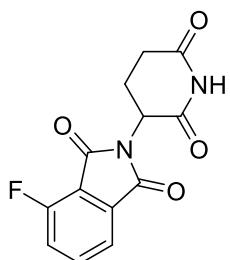
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2932 (w), 2360 (w), 2342 (w), 1669 (m), 1637 (w), 1542 (w), 1521 (w), 1506 (w), 1489 (w), 1473 (w), 1457 (w), 1419 (w), 1396 (w), 1340 (w), 1315 (w), 1256 (w), 1197 (w), 1177 (w), 1128 (s), 1059 (w), 1024 (w), 956 (w), 909 (w), 873 (w), 833 (w), 798 (m), 720 (m), 669 (w), 659 (w), 581 (w), 508 (w), 435 (m) cm⁻¹.

LCMS (ESI+): *t*_R = 9.5 min (Methode I) *m/z* (% relative Intensität): 482.2 [M+H⁺] (100)

HR-ESI-MS: (C₂₃H₂₇F₃N₃O₃S⁺) ber.: 482.1720 gef.: 482.1722

2-(2,6-Dioxopiperidin-3-yl)-4-fluorisoindolin-1,3-dion
(201, DAG-010)

3-Fluorophthalanhydrid (2.50 g, 1 Äq., 15.0 mmol), 3-Boc-amino-2,6-dioxopiperidin (2.29 g, 0.67 Äq., 10.0 mmol) und NaAc (0.99 g, 0.80 Äq., 12.0 mmol) wurden in AcOH (15 mL) 8 h unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde unter verminderter Druck entfernt. Der Rückstand wurde mehrmals mit CH und H₂O gewaschen und anschließend unter Vakuum getrocknet. **201** wurde als leicht lilafarbenes Pulver (2.20 g, 9.08 mmol, 90%) erhalten.



¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 11.12 (s, 1H), 7.95 (ddd, *J* = 8.4, 7.4, 4.6 Hz, 1H), 7.79 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.73 (t, *J* = 8.7 Hz, 1H), 5.15 (dd, *J* = 12.8, 5.5 Hz, 1H), 2.89 (ddd, *J* = 17.1, 13.9, 5.5 Hz, 1H), 2.65 – 2.52 (m, 2H), 2.12 – 2.02 (m, 1H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ = 172.6, 169.6, 166.1, 163.9, 156.8, 138.0, 133.4, 122.0, 120.0, 117.0, 49.1 30.9, 21.8 ppm.

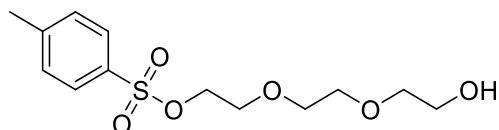
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3274 (w), 3079 (w), 2901 (w), 2360 (w), 2342 (w), 1779 (w), 1699 (s), 1623 (w), 1609 (w), 1541 (w), 1508 (w), 1478 (m), 1443 (w), 1383 (m), 1350 (w), 1327 (w), 1303 (w), 1255 (m), 1198 (s), 1115 (w), 1056 (w), 1040 (w), 1018 (w), 992 (w), 950 (w), 912 (w), 879 (w), 851 (w), 824 (w), 772 (w), 743 (s), 699 (w), 668 (w), 656 (w), 637 (w), 592 (s), 559 (m), 539 (w), 494 (w), 468 (s), 416 (w), 406 (w) cm⁻¹.

LCMS (ESI+): t_R = 4.4 min (Methode II) m/z (% relative Intensität): 274.9 [M+H⁺] (100)

HR-ESI-MS: (C₁₃H₉FN₂O₄Na⁺) ber.: 299.0439 gef.: 299.0435

2-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy)ethyl-4-methylbenzolsulfonat
(204, DAG-006)

Triethylenglykol (17.9 g, 1 Äq., 118 mmol) und *p*-TsCl (11.25 g, 0,5 Äq., 59 mmol) wurden in Pyridin (15 mL) gelöst. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur über Nacht (12 h) gerührt. Anschließend wurde 1 M HCl (30 mL) tropfenweise hinzugegeben. Das sich hierdurch gebildete Salz wurde abfiltriert. Nach der Filtration wurde das Filtrat mit EtOAc (5x 10 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter verminderterem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde über eine RP-Chromatographie (H₂O/MeCN-Gradient) aufgereinigt um **204** (14.0 g, 46.0 mmol, 39%) als gelbliches Öl zu erhalten.



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.77 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.32 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 4.17–4.11 (m, 2H), 3.71–3.65 (m, 4H), 3.58 (s, 4H), 3.56–3.52 (m, 2H), 2.55 (s, 1H), 2.42 (s, 3H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 145.0, 133.1, 129.9, 128.0, 72.6, 70.8, 70.3, 69.3, 68.8, 61.8, 21.7 ppm.

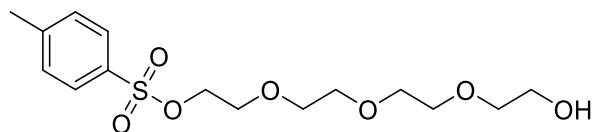
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3396 (w), 3063 (w), 2870 (m), 2361 (w), 1735 (w), 1635 (w), 1598 (w), 1490 (w), 1453 (w), 1352 (m), 1294 (w), 1220 (w), 1188 (w), 1174 (s), 1119 (m), 1066 (w), 1033 (w), 1009 (m), 918 (m), 816 (m), 775 (m), 681 (s), 662 (m), 609 (w), 566 (w), 553 (s), 499 (w) cm⁻¹.

LCMS (ESI+): *t*_R = 6.5 min (Methode I) m/z (% relative Intensität): 305.1 [M+H⁺] (77.4)

HR-ESI-MS: (C₁₃H₂₀O₆Sn⁺) ber.: 327.0873 gef.: 327.0872

2-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy)ethyl-4-methylbenzolsulfonat
(205, DAG-007)

Tetraethylenglykol (22.92 g, 1 Äq., 118 mmol) und *p*-TsCl (11.25 g, 0,5 Äq., 59 mmol) wurden in Pyridin (15 mL) gelöst. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur über Nacht (12 h) gerührt. Anschließend wurde 1 M HCl (30 mL) tropfenweise hinzugegeben. Das sich hierdurch gebildete Salz wurde abfiltriert. Nach der Filtration wurde das Filtrat mit EtOAc (5x 10 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter verminderterem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde über eine RP-Flash-Chromatographie (H₂O/MeCN-Gradient) aufgereinigt um **205** (15.1 g, 46.0 mmol, 36.7%) als gelbliches Öl zu erhalten.



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.75 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.30 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 4.14 – 4.09 (m, 2H), 3.68 – 3.62 (m, 4H), 3.62 – 3.56 (m, 4H), 3.56 – 3.51 (m, 6H), 3.23 (s, 1H), 2.40 (s, 3H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 144.9, 133.0, 129.9, 127.9, 72.5, 70.7, 70.6, 70.4, 70.3, 69.3, 68.7, 61.6, 21.6 ppm.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3403 (w), 3063 (w), 2868 (m), 2363 (w), 1735 (w), 1635 (w), 1598 (w), 1490 (w), 1453 (w), 1352 (m), 1297 (w), 1224 (w), 1188 (w), 1175 (m), 1119 (w), 1097 (s), 1066 (w), 1033 (w), 1010 (w), 920 (m), 817 (m), 776 (w), 681 (s), 663 (m), 566 (w), 554 (s) cm⁻¹.

LCMS (ESI+): *t*_R = 6.6 min (Methode I) m/z (% relative Intensität): 349.2 [M+H⁺] (65.3)

HR-ESI-MS: (C₁₅H₂₄O₇SnA⁺) ber.: 371.1135 gef.: 371.1135

***tert*-Butyl-2-(2-(2-(2-(2,6-dioxopiperidin-3-yl)-1,3-dioxoisoindolin-4-yl)-amino)ethoxy)ethoxy)ethoxy)acetat**
(206, DAG-015)

Schritt A: Nukleophile Substitution

204 (0.213 g, 1 Äq., 0.7 mmol) und NaN_3 (91.0 mg, 2 Äq., 1.40 mmol) wurden in 5 mL DMF gelöst. Das Reaktionsgemisch wurde unter Rühren für 12 h auf 60 °C erhitzt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde das Gemisch mit gesättigter Na_2CO_3 -Lösung (5 mL) versetzt und das Produkt wurde mehrfach durch EtOAc (3x 15 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter verminderter Druck entfernt. Das gelbliche Rohprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt eingesetzt. Aufgrund des Explosionspotentials von Natriumazid wurde Schritt A mehrfach in dieser Ansatzgröße wiederholt.

Schritt B:

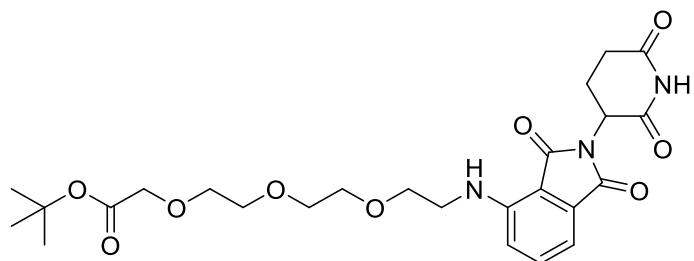
Das Rohprodukt aus Schritt A (0.4 g, 1 Äq., 2.28 mmol) wurden bei 30 °C in 4 mL *t*-BuOH unter inerten Bedingungen gelöst. Nach ca. 5 min wurde der Lösung *t*-BuOK (640.5 mg, 2.5 Äq., 5.71 mmol) hinzugegeben und das Gemisch wurde für 1 h bei 30 °C gerührt. *Tert*-Butylbromoacetat (1.11 g, 2.5 Äq., 5.71 mmol) wurden langsam zum Gemisch hinzugegeben und das Reaktionsgemisch wurde über Nacht (ca. 12 h) bei 50 °C gerührt. Nach vollständigem Umsatz der Ausgangssubstanzen wurde das Lösungsmittel unter verminderter Druck entfernt und der Rückstand wurde in 15 mL DCM aufgenommen. Die organische Phase wurde mit 15 mL H_2O gewaschen und die wässrige Phase wurde mit DCM (3x 5 mL) extrahiert. Die vereinte organische Phase wurde mit gesättigter NaCl -Lösung (3x 5 mL) gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter verminderter Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Aufarbeitung im nächsten Schritt als Edukt eingesetzt.

Schritt C: Azid-Reduktion

Das Rohprodukt aus Schritt B und eine katalytische Menge an $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ wurden in EtOH (20 mL) gelöst und anschließend mehrfach entgast und mit Argon geflutet. Nach Entfernen des Sauerstoffs im Reaktionsgemisch wurde es mehrfach mit Wasserstoff begast. Nach 24 h wurde der überschüssige Wasserstoff im Reaktionsgefäß mittels Vakuum und Argon entfernt. Der Katalysator wurde abfiltriert und das organische Lösungsmittel wurde unter verminderter Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde ohne weitere Aufarbeitung im letzten Schritt eingesetzt.

Schritt D: Nukleophile aromatischen Substitution

Das Rohprodukt aus Schritt C (259 mg, 1 Äq., 0.98 mmol), **201** (272 mg, 1 Äq., 0.98 mmol) und Diisopropylethylamin (254 mg, 2 Äq., 1.97 mmol) wurden in 20 mL DMSO unter Rühren gelöst. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei 90 °C gerührt. Nach vollständigem Umsatz der Edukte wurde das Lösungsmittel unter verminderem Druck bei 80 °C entfernt. Der Rückstand wurde in EtOAc (15 mL) aufgenommen und mit H₂O (3x 10 mL) und LiCl-Lösung (5%ig, 3x 10 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter verminderem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels RP-Flash-Chromatographie (H₂O/MeCN-Gradient) aufgereinigt. **206** wurde als gelber Feststoff (227 mg, 0.44 mmol, 44.5%) erhalten.



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.26 (s, 1H), 7.48 (dd, *J* = 8.5, 7.1 Hz, 1H), 7.10 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 6.93 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 4.91 (dd, *J* = 12.0, 5.4 Hz, 1H), 4.00 (s, 2H), 3.77 – 3.64 (m, 11H), 3.46 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H), 2.94 – 2.66 (m, 3H), 2.12 (ddt, *J* = 9.4, 4.7, 2.2 Hz, 1H), 1.46 (s, 9H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 171.2, 169.9, 169.4, 168.5, 167.7, 146.9, 136.2, 132.7, 117.0, 111.9, 110.6, 81.7, 70.9, 70.9, 70.8, 69.6, 69.2, 49.0, 42.7, 31.5, 28.3, 23.0 ppm.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3390 (w), 3232 (w), 3114 (w), 2977 (w), 2871 (w), 2361 (w), 2252 (w), 1693 (s), 1623 (m), 1509 (w), 1483 (w), 1458 (w), 1357 (m), 1257 (m), 1111 (s), 1054 (w), 1022 (w), 990 (w), 910 (m), 726 (s), 680 (w), 647 (w), 607 (m), 577 (w), 529 (w), 466 (m) cm⁻¹.

LCMS (ESI+): t_R = 8.8 min (Methode I) m/z (% relative Intensität): 520.2 [M+H⁺] (100)

HR-ESI-MS: (C₂₅H₃₃N₃O₉Na⁺) ber.: 542.2109 gef.: 542.2108

tert-Butyl-14-((2-(2,6-dioxopiperidin-3-yl)-1,3-dioxoisooindolin-4-yl)amino)-3,6,9,12-tetraoxatetradecanoat
(207, DAG-016)

Schritt A: Nukleophile Substitution

205 (0.250 g, 1 Äq., 0.72 mmol) und NaN_3 (93.3 mg, 2 Äq., 1.44 mmol) wurden in 5 mL DMF gelöst. Das Reaktionsgemisch wurde unter Rühren für 12 h auf 60 °C erhitzt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde das Gemisch mit gesättigter Na_2CO_3 -Lösung (5 mL) versetzt und das Produkt wurde mehrfach durch EtOAc (3x 15 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter verminderter Druck entfernt. Das gelbliche Rohprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt eingesetzt. Aufgrund des Explosionspotentials von Natriumazid wurde Schritt A mehrfach in dieser Ansatzgröße wiederholt.

Schritt B:

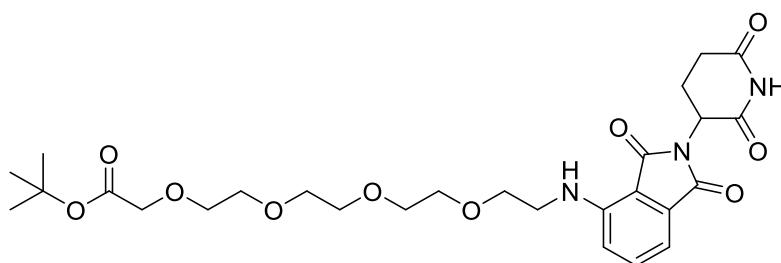
Das Rohprodukt aus Schritt A (0.491 g, 1 Äq., 2.24 mmol) wurde bei 30 °C in 4 mL *t*-BuOH unter inerten Bedingungen gelöst. Nach ca. 5 min wurde der Lösung *t*-BuOK (648 mg, 2.5 Äq., 5.60 mmol) hinzugegeben und das Gemisch wurde für 1 h bei 30 °C gerührt. *Tert*-Butylbromoacetat (0.827 g, 2.5 Äq., 5.60 mmol) wurden langsam zum Gemisch hinzugegeben und das Reaktionsgemisch wurde über Nacht (ca. 12 h) bei 50 °C gerührt. Nach vollständigem Umsatz der Ausgangssubstanzen wurde das Lösungsmittel unter verminderter Druck entfernt und der Rückstand wurde in 15 mL DCM aufgenommen. Die organische Phase wurde mit 15 mL H_2O gewaschen und die wässrige Phase wurde mit DCM (3x 5 mL) extrahiert. Die vereinte organische Phase wurde mit gesättigter NaCl -Lösung (3x 5 mL) gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter verminderter Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Aufarbeitung im nächsten Schritt als Edukt eingesetzt.

Schritt C: Azid-Reduktion

Das Rohprodukt aus Schritt B und eine katalytische Menge an $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ wurden in EtOH (20 mL) gelöst und anschließend mehrfach entgast und mit Argon geflutet. Nach Entfernen des Sauerstoffs im Reaktionsgemisch wurde es mehrfach mit Wasserstoff begast. Nach 24 h wurde der überschüssige Wasserstoff im Reaktionsgefäß mittels Vakuum und Argon entfernt. Der Katalysator wurde abfiltriert und das organische Lösungsmittel wurde unter verminderter Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde ohne weitere Aufarbeitung im letzten Schritt eingesetzt.

Schritt D: Nukleophile aromatischen Substitution

Das Rohprodukt aus Schritt C (368.0 mg, 1 Äq., 1.20 mmol), **201** (330.6 mg, 1 Äq., 1.20 mmol) und Diisopropylethylamin (309.4 mg, 2 Äq., 2.39 mmol) wurden in 20 mL DMSO unter Rühren gelöst. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei 90 °C gerührt. Nach vollständigem Umsatz der Edukte wurde das Lösungsmittel unter verminderterem Druck bei 80 °C entfernt. Der Rückstand wurde in EtOAc (15 mL) aufgenommen und mit H₂O (3x 10 mL) und LiCl-Lösung (5%ig, 3x 10 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter verminderterem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels RP-Flash-Chromatographie (H₂O/MeCN-Gradient) aufgereinigt. **207** wurde als gelber Feststoff (295.3 mg, 0.52 mmol, 43.8%) erhalten.



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.23 (s, 1H), 7.49 (dd, *J* = 8.5, 7.1 Hz, 1H), 7.10 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 6.92 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 4.91 (dd, *J* = 12.1, 5.4 Hz, 1H), 4.01 (s, 2H), 3.75 – 3.62 (m, 19H), 3.47 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H), 2.94 – 2.66 (m, 3H), 2.16 – 2.09 (m, 1H), 1.46 (s, 9H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 171.1, 169.8, 169.4, 168.4, 167.8, 147.0, 136.2, 132.7, 117.0, 111.8, 110.6, 81.7, 70.9, 70.9, 70.8, 70.8, 70.8, 70.7, 69.7, 69.2, 49.1, 42.6, 31.6, 28.3, 23.0 ppm.

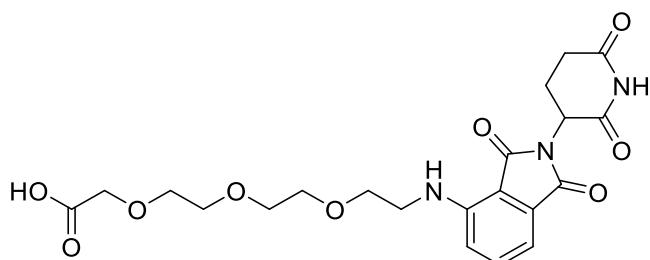
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3392 (w), 3233 (w), 3113 (w), 2972 (w), 2870 (w), 2361 (w), 1694 (s), 1623 (m), 1509 (w), 1457 (w), 1406 (w), 1356 (m), 1322 (w), 1301 (w), 1257 (m), 1196 (w), 1171 (w), 1110 (s), 1038 (w), 1023 (w), 991 (w), 941 (w), 841 (w), 815 (w), 747 (m) cm⁻¹.

LCMS (ESI+): t_R = 7.5 min (Methode II) m/z (% relative Intensität): 564.4 [M+H⁺] (100)

HR-ESI-MS: (C₂₇H₃₇N₃O₁₀Na⁺) ber.: 586.2371 gef.: 586.2372

**2-(2-(2-((2-(2,6-Dioxopiperidin-3-yl)-1,3-dioxoisoindolin-4-yl)-
amino)ethoxy)ethoxy)ethoxy)essigsäure
(208, DAG-017)**

206 (210.8 mg, 1 Äq., 0.41 mmol) wurde unter Rühren in DCM (8 mL) gelöst. Zur Reaktionslösung wurde langsam TFA (2 mL) gegeben. Nach 24 h wurde das Lösungsmittel unter verminderem Druck entfernt und das Rohprodukt wurde mittels RP-Flash-Chromatographie (H₂O/MeCN-Gradient) aufgereinigt um das Produkt als gelben Feststoff (199.9 mg, 0.35 mmol, 85.3%) zu erhalten.



¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 11.06 (s, 1H), 7.58 (dd, *J* = 8.5, 7.1 Hz, 1H), 7.14 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.04 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 5.05 (dd, *J* = 12.9, 5.4 Hz, 1H), 4.00 (s, 2H), 3.63 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H), 3.60 – 3.50 (m, 9H), 3.47 (t, *J* = 5.3 Hz, 2H), 2.88 (ddd, *J* = 17.5, 14.1, 5.4 Hz, 1H), 2.64 – 2.53 (m, 2H), 2.07 – 1.98 (m, 1H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ = 172.70, 171.6, 169.98, 168.9, 167.2, 146.4, 136.2, 132.1, 117.4, 110.6, 109.25, 69.82, 69.75, 69.72, 68.9, 67.6, 48.5, 41.7, 30.9, 22.1 ppm.

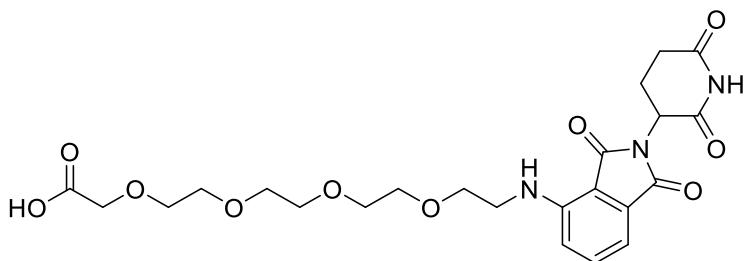
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3392 (w), 2867 (w), 2524 (w), 2360 (w), 2256 (w), 2127 (w), 1754 (w), 1693 (s), 1623 (m), 1601 (w), 1509 (w), 1407 (m), 1356 (m), 1323 (w), 1302 (w), 1112 (m), 1052 (w), 1023 (s), 1005 (w), 882 (w), 817 (w), 747 (m), 608 (m), 466 (m), 412 (w) cm⁻¹.

LCMS (ESI+): t_R = 3.9 min (Methode I) m/z (% relative Intensität): 464.1 [M+H⁺] (100)

HR-ESI-MS: (C₂₁H₂₅N₃O₉Na⁺) ber.: 486.1483 gef.: 486.1482

14-((2-(2,6-Dioxopiperidin-3-yl)-1,3-dioxoisooindolin-4-yl)amino)-3,6,9,12-tetraoxatetradecansäure
(209, DAG-018)

207 (278.1 mg, 1 Äq., 0.49 mmol) wurde unter Rühren in DCM (8 mL) gelöst. Zur Reaktionslösung wurde langsam TFA (2 mL) gegeben. Nach 24 h wurde das Lösungsmittel unter verminderterem Druck entfernt und das Rohprodukt wurde mittels RP-Flash-Chromatographie (H₂O/MeCN-Gradient aufgereinigt um das Produkt als gelben Feststoff (288.3 mg, 0.46 mmol, 94.0%) zu erhalten.



¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 11.06 (s, 1H), 7.58 (dd, *J* = 8.6, 7.1 Hz, 1H), 7.14 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.04 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 5.05 (dd, *J* = 12.9, 5.4 Hz, 1H), 4.00 (s, 2H), 3.63 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H), 3.59 – 3.45 (m, 13H), 2.88 (ddd, *J* = 17.4, 14.0, 5.4 Hz, 1H), 2.64 – 2.53 (m, 2H), 2.08 – 1.98 (m, 1H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ = 172.7, 171.6, 170.0, 168.9, 167.2, 146.4, 136.2, 132.1, 117.4, 110.6, 109.2, 69.8 – 69.7 (6C), 68.9, 67.6, 48.5, 41.7, 30.9, 22.1 ppm.

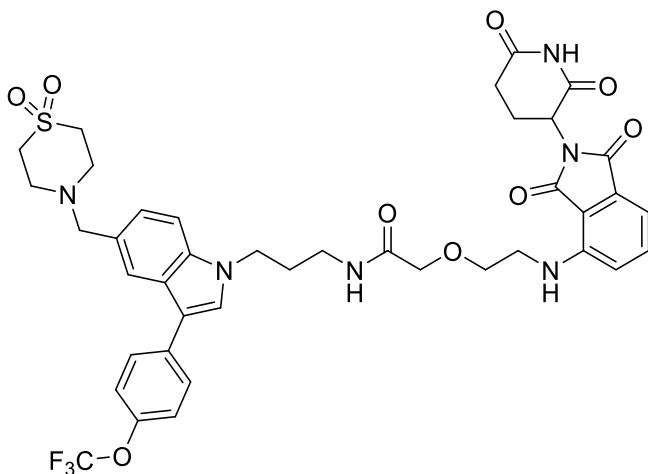
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3392 (w), 2867 (w), 2362 (w), 2255 (w), 2127 (w), 1754 (w), 1693 (s), 1623 (m), 1601 (w), 1509 (w), 1483 (w), 1458 (w), 1407 (w), 1356 (m), 1323 (w), 1111 (m), 1051 (w), 1023 (s), 1005 (w), 882 (w), 817 (w), 747 (m), 608 (m), 577 (w), 558 (w), 466 (m) cm⁻¹.

LCMS (ESI+): t_R = 4.0 min (Methode I) m/z (% relative Intensität): 508.1 [M+H⁺] (100)

HR-ESI-MS: (C₂₃H₂₉N₃O₁₀Na⁺) ber.: 530.1745 gef.: 530.1750

***N*-(3-((1,1-dioxidothiomorpholino)methyl)-3-(4-(trifluoromethoxy)phenyl)-1*H*-indol-1-yl)propyl)-2-((2-(2,6-dioxopiperidin-3-yl)-1,3-dioxoisoindolin-4-yl)amino)ethoxy)acetamide
(210, DAG-021)**

Zu einer Lösung aus PEG-1-Thalidomid-Linker, bereitgestellt von ROEGER, (21.2 mg, 1 Äq., 56.5 µmol) in DMF (2.5 mL) wurde unter Rühren HATU (11.8 mg, 0.55 Äq., 31.1 µmol) und DIPEA (19.5 µL, 2 Äq., 115 µmol) gegeben. Die Lösung wurde anschließend auf 0 °C abgekühlt. Parallel dazu wurde eine Lösung aus **198** (33.6 mg, 1 Äq., 56.5 µmol), HATU (11.8 mg, 0.55 Äq., 31.1 µmol) und DIPEA (19.5 µL, 2 Äq., 115 µmol) in DMF (2.5 mL) hergestellt. Diese Lösung wurde langsam bei 0 °C zur ersten Lösung unter Rühren hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur für 16 h gerührt. Anschließend wurde dem Reaktionsgemisch H₂O (1 mL) hinzugegeben und das Lösungsmittel wurde unter verminderter Druck entfernt. Der Rückstand wurde in H₂O/MeCN aufgenommen und mittels RP-Flash-Chromatographie (H₂O/MeCN-Gradient) gereinigt. Es wurde ein gelbliches Pulver mit einer Ausbeute von 15.0% (7.1 mg, 8.5 µmol) erhalten.



¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 9.06 (s, 1H), 7.85 (s, 1H), 7.63 (s, 2H), 7.61 (d, *J* = 8.4 Hz, 3H), 7.49 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.44 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.36 (dd, *J* = 28.2, 14.1 Hz, 5H), 7.24 (d, *J* = 8.9 Hz, 5H), 7.03 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 6.88 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.71 (s, 1H), 5.84 (s, 2H), 5.21 (d, *J* = 10.1 Hz, 3H), 5.10 (d, *J* = 16.8 Hz, 2H), 4.73 (dd, *J* = 12.2, 4.9 Hz, 1H), 4.46 (s, 4H), 4.21 – 4.16 (m, 3H), 4.13 (s, 2H), 3.95 (s, 2H), 3.72 – 3.67 (m, 4H), 3.43 (d, *J* = 24.8 Hz, 2H), 3.32 (m, 4H), 3.14 (s, 4H), 2.57 (m, 2H), 2.18 (s, 4H) 1.97 (m, 3H) ppm.

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃): δ = 171.5, 169.7, 169.5, 168.9, 167.5, 166.3, 154.4, 151.7, 151.5, 146.8, 139.2, 136.4, 133.8, 132.5, 131.7, 129.3, 128.4, 127.9, 121.6, 119.0, 116.8, 115.9,

112.1, 110.6, 70.4, 69.9, 55.4, 50.3, 49.5, 49.0, 45.6, 44.2, 43.1, 42.0, 36.6, 31.3, 30.0, 22.7 ppm.

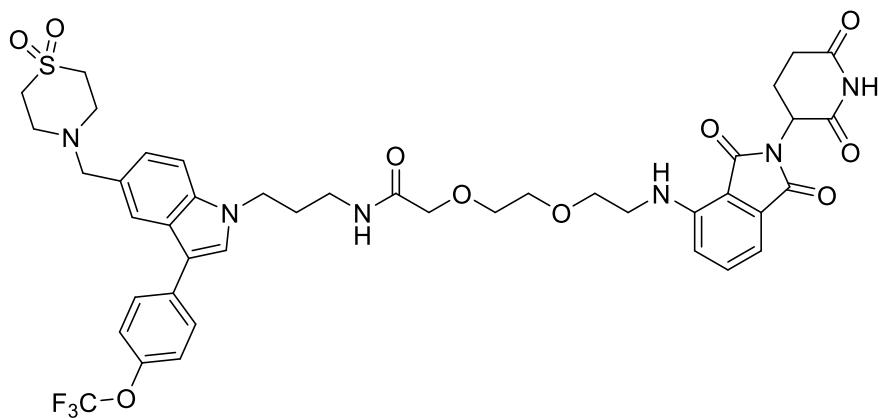
IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3399$ (w), 3065 (w), 2959 (w), 2925 (w), 1670 (s), 1624 (w), 1595 (w), 1580 (w), 1517 (w), 1470 (w), 1396 (w), 1360 (w), 1320 (m), 1258 (m), 1227 (w), 1197 (w), 1173 (w), 1124 (s), 1050 (w), 1025 (w), 934 (w), 830 (w), 798 (m), 747 (w), 719 (m), 607 (w) cm^{-1} .

LCMS (ESI+): $t_R = 10.0$ min (Methode I) m/z (% relative Intensität): 839.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100)

HR-ESI-MS: $(\text{C}_{40}\text{H}_{42}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}_9\text{S}^+)$ ber.: 839.2681 gef.: 839.2694

N-(3-((1,1-Dioxidothiomorpholino)methyl)-3-(4-(trifluormethoxy)phenyl)-1*H*-indol-1-yl)propyl-2-(2-((2-(2,6-dioxopiperidin-3-yl)-1,3-dioxoisooindolin-4-yl)amino)ethoxy)ethoxy)acetamid
(211, DAG-003)

Ein PEG-2-Thalidomid-Linker, bereitgestellt von ROEGER, (31.5 mg, 1 Äq., 0.08 mmol) wurde mit HATU (31.42 mg, 1.1 Äq., 0.08 mmol) und DIPEA (26 μL , 2 Äq., 0.15 mmol) in DMF (2.5 mL) unter Rühren gelöst. Die Reaktionslösung wurde auf 0 °C gekühlt. Eine Lösung aus **198** (44.73 mg, 1 Äq., 0.08 mmol) und DIPEA (26 μL , 2 Äq., 0.15 mmol) in DMF (2.5 mL) wurden bei dieser Temperatur zum Reaktionsansatz hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem Umsatz wurde die Reaktion mit H_2O versetzt. Das Lösungsmittel wurde unter verminderterem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in DCM (5 mL) und H_2O (5 mL) gelöst. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase wurde mit DCM (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinigte organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter verminderterem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels RP-Flash-Chromatographie ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ -Gradient) aufgereinigt um den PROTAC als gelblichen Feststoff (44.3 mg, 0.05 mmol, 66.8%) zu erhalten.



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.52 (s, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.63 (d, *J* = 8.7 Hz, 3H), 7.44 (dd, *J* = 8.5, 7.2 Hz, 2H), 7.31 (dd, *J* = 25.0, 7.5 Hz, 6H), 7.07 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 6.93 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 6.84 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.46 (s, 1H), 4.83 (dd, *J* = 12.0, 5.4 Hz, 1H), 4.18 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 3.99 (s, 4H), 3.68 (dt, *J* = 8.3, 5.2 Hz, 8H), 3.40 (d, *J* = 5.0 Hz, 3H), 3.34 – 3.22 (m, 9H), 2.82 – 2.57 (m, 4H), 2.11 – 1.99 (m, 4H) ppm.

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 171.0, 170.2, 169.4, 168.5, 167.4, 146.6, 136.2, 132.5, 128.4, 126.3, 121.5, 116.6, 112.0, 110.4, 70.8, 70.4, 70.2, 69.4, 62.0, 50.4, 48.9, 44.1, 42.3, 36.4, 31.3, 30.2, 22.7 ppm.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3373 (w), 2926 (w), 1756 (w), 1695 (s), 1623 (w), 1545 (w), 1505 (w), 1485 (w), 1453 (w), 1324 (w), 1297 (w), 1255 (s), 1221 (w), 1180 (w), 1121 (m), 1049 (w), 1019 (w), 948 (w), 920 (w), 852 (w), 746 (m), 722 (w), 510 (m), 467 (w), 435 (m) cm⁻¹.

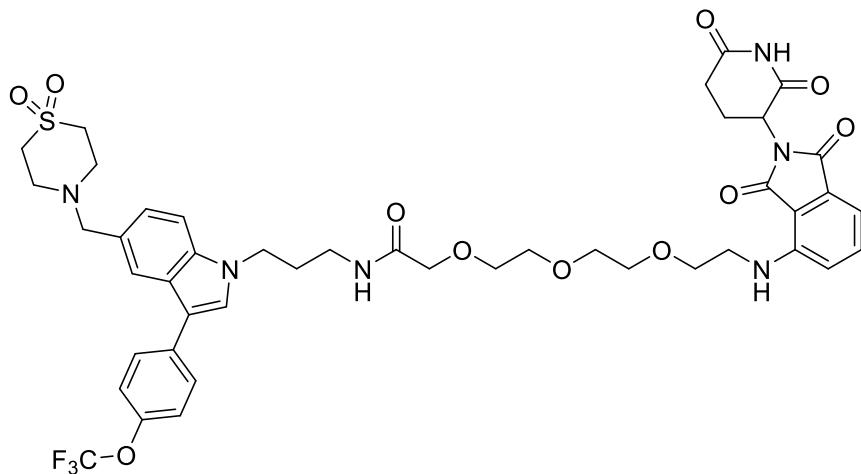
LCMS (ESI+): *t*_R = 8.1 min (Methode II) m/z (% relative Intensität): 883.3 [M+H]⁺ (100)

HR-ESI-MS: (C₄₂H₄₅F₃N₆O₁₀SNa⁺) ber.: 905.2762 gef.: 905.2768

***N*-(3-((1,1-Dioxidothiomorpholino)methyl)-3-(4-(trifluormethoxy)phenyl)-1*H*-indol-1-yl)propyl-2-(2-(2-(2-(2,6-dioxopiperidin-3-yl)-1,3-dioxoisoindolin-4-yl)amino)ethoxyethoxyethoxyacetamid (212, DAG-019)**

208 (77.4 mg, 1 Äq., 0.17 mmol) wurde mit HATU (69.85 mg, 1.1 Äq., 0.18 mmol) und DIPEA (57.8 µL, 2 Äq., 0.33 mmol) in DMF (2.5 mL) unter Rühren gelöst. Die Reaktionslösung wurde auf 0 °C gekühlt. Eine Lösung aus **198** (99.47 mg, 1 Äq., 0.17 mmol) und DIPEA (57.8 µL, 2 Äq., 0.33 mmol) in DMF (2.5 mL) wurden bei dieser Temperatur zum Reaktionsansatz hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem Umsatz wurde die Reaktion mit H₂O versetzt. Das Lösungsmittel

wurde unter verminderter Druck entfernt. Der Rückstand wurde in DCM (5 mL) und H₂O (5 mL) gelöst. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase wurde mit DCM (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinigte organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter verminderter Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels RP-Flash-Chromatographie (H₂O/MeCN-Gradient) aufgereinigt um den PROTAC als gelblichen Feststoff (40.9 mg, 0.04 mmol, 26.4%) zu erhalten.



¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 8.73 (s, 1H), 7.74 (s, 1H), 7.61 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.43 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.36 (s, 1H), 7.33 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.28 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.22 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.12 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 7.06 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 6.82 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.43 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 4.87 (dd, *J* = 12.2, 5.4 Hz, 1H), 4.20 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 3.98 (s, 2H), 3.79 (s, 2H), 3.64 (s, 6H), 3.60 (dd, *J* = 10.0, 4.7 Hz, 4H), 3.38 – 3.29 (m, 4H), 3.04 (s, 6H), 2.80 (d, *J* = 14.9 Hz, 1H), 2.73 – 2.65 (m, 2H), 2.13 – 2.03 (m, 3H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 171.4, 170.7, 169.5, 168.7, 167.6, 146.8, 136.17, 132.63, 128.5, 126.29, 121.6, 116.75, 111.86, 110.47, 71.1, 70.7, 70.47, 70.35, 69.4, 62.1, 50.5, 49.0, 44.2, 42.4, 36.6, 31.5, 30.3, 22.9 ppm.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2930 (w), 2361 (w), 1695 (w), 1666 (s), 1625 (w), 1546 (w), 1506 (w), 1457 (w), 1407 (w), 1257 (m), 1197 (w), 1127 (s), 1024 (w), 912 (w), 832 (w), 814 (w), 799 (m), 733 (w), 720 (s), 678 (w), 647 (w), 608 (w), 578 (w), 530 (w), 509 (w), 467 (w), 436 (w) cm⁻¹.

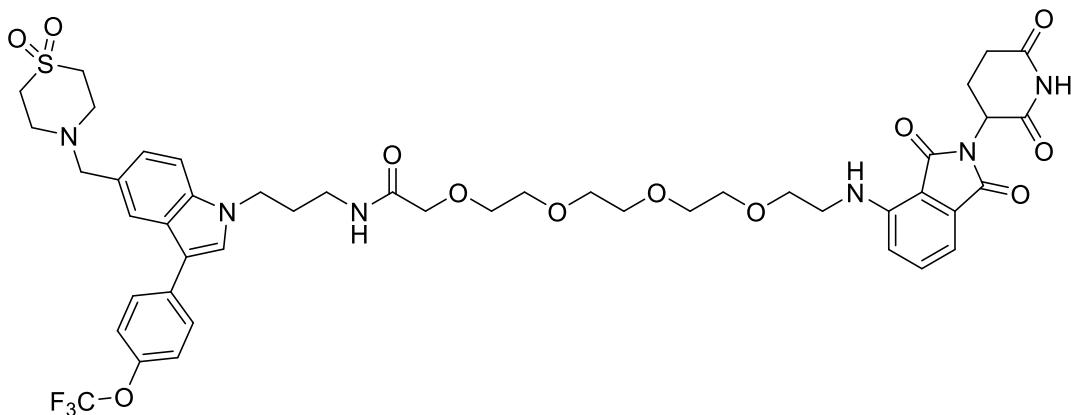
LCMS (ESI+): t_R = 8.2 min (Methode II) m/z (% relative Intensität): 927.3 [M+H]⁺ (100)

HR-ESI-MS: (C₄₄H₄₉F₃N₆O₁₁SNa⁺) ber.: 949.3024 gef.: 949.3025

***N*-(3-((1,1-Dioxidothiomorpholino)methyl)-3-(4-(trifluormethoxy)phenyl)-1*H*-indol-1-yl)propyl)-14-((2-(2,6-dioxopiperidin-3-yl)-1,3-dioxoisoindolin-4-yl)amino)-3,6,9,12-tetraoxatetradecanamid**

(213, DAG-020)

209 (86.0 mg, 1 Äq., 0.17 mmol) wurde mit HATU (70.9 mg, 1.1 Äq., 0.19 mmol) und DIPEA (58.6 µL, 2 Äq., 0.34 mmol) in DMF (2.5 mL) unter Rühren gelöst. Die Reaktionslösung wurde auf 0 °C gekühlt. Eine Lösung aus **198** (100.9 mg, 1 Äq., 0.17 mmol) und DIPEA (58.6 µL, 2 Äq., 0.34 mmol) in DMF (2.5 mL) wurden bei dieser Temperatur zum Reaktionsansatz hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem Umsatz wurde die Reaktion mit H₂O versetzt. Das Lösungsmittel wurde unter verminderterem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in DCM (5 mL) und H₂O (5 mL) gelöst. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase wurde mit DCM (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinigte organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter verminderterem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels RP-Flash-Chromatographie (H₂O/MeCN-Gradient) aufgereinigt um den PROTAC als gelblichen Feststoff (78.7 mg, 0.08 mmol, 47.8%) zu erhalten.



¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 8.64 (s, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.63 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.44 (dd, *J* = 8.4, 7.3 Hz, 1H), 7.40 – 7.34 (m, 1H), 7.28 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.07 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 6.85 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.45 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H), 4.87 (dd, *J* = 12.3, 5.4 Hz, 1H), 4.21 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 3.99 (s, 2H), 3.67 – 3.61 (m, 9H), 3.58 (s, 3H), 3.37 (ddd, *J* = 19.8, 12.0, 6.0 Hz, 4H), 3.15 – 3.11 (m, 5H), 2.85 – 2.78 (m, 1H), 2.76 – 2.63 (m, 2H), 2.14 – 2.04 (m, 3H) ppm.

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃): δ = 171.4, 170.5, 169.5, 167.7, 146.9, 136.2, 132.6, 128.5, 126.3, 121.6, 116.8, 111.8, 110.4, 71.2, 70.9, 70.6, 70.6, 70.5, 70.5, 70.2, 69.5, 62.1, 50.5, 49.0, 44.3, 42.4, 36.6, 31.5, 30.3, 22.9 ppm.

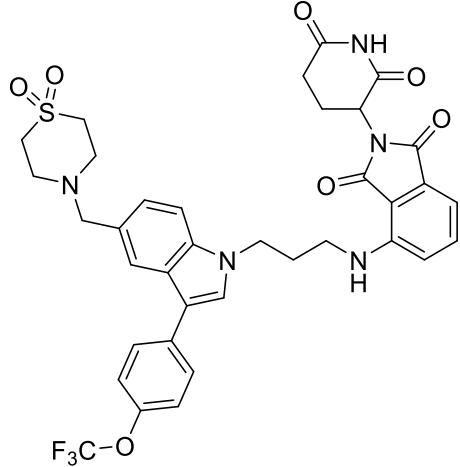
IR (ATR): $\tilde{\nu} = 2926$ (w), 2360 (w), 2342 (w), 1750 (w), 1699 (s), 1671 (w), 1654 (w), 1625 (w), 1558 (w), 1542 (w), 1519 (w), 1507 (w), 1488 (w), 1473 (w), 1457 (w), 1436 (w), 1407 (w), 1361 (w), 1324 (w), 1297 (w), 1260 (s), 1223 (w), 1200 (w), 1125 (w), 1050 (w) cm^{-1} .

LCMS (ESI+): $t_R = 8.1$ min (Methode II) m/z (% relative Intensität): 971.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100)

HR-ESI-MS: $(\text{C}_{46}\text{H}_{53}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}_{12}\text{SNa}^+)$ ber.: 993.3268 gef.: 993.3268

**4-((3-((1,1-Dioxidothiomorpholino)methyl)-3-(4-(trifluormethoxy)phenyl)-1*H*-indol-1-yl)propyl)amino)-2-(2,6-dioxopiperidin-3-yl)isoindolin-1,3-dion
(214, DAG-030)**

In einem geeigneten Rundkolben wurden **198** (36.4 mg, 1 Äq., 75.6 μmol), **201** (23.0 mg, 1 Äq., 83.2 μmol) und DIPEA (26.2 μL , 2 Äq., 151.2 μmol) in DMSO (2 mL) unter Rühren gelöst. Der Reaktionsansatz wurde für 16 h bei 90 °C gerührt. Nach vollständigem Umsatz wurde das Lösungsmittel unter verminderterem Druck entfernt und das Rohprodukt wurde mittels RP-Flash-Chromatographie ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ -Gradient) gereinigt. Es wurde ein gelbliches Pulver mit einer Ausbeute von 24.4% (13.6 mg, 18.4 μmol) gewonnen.



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 11.07$ (s, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.80 (d, $J = 0.7$ Hz, 1H), 7.79 – 7.74 (m, 2H), 7.51 (m, 2H), 7.42 (dd, $J = 8.8, 0.9$ Hz, 2H), 7.20 (dd, $J = 8.5, 1.4$ Hz, 1H), 7.00 (m, 2H), 6.65 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 5.04 (dd, $J = 12.7, 5.4$ Hz, 1H), 4.32 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 3.77 (s, 2H), 3.35 (dd, $J = 13.3, 6.6$ Hz, 2H), 3.08 (d, $J = 5.1$ Hz, 4H), 2.94 – 2.81 (m, 5H), 2.63 – 2.51 (m, 2H), 2.14 (p, $J = 6.9$ Hz, 2H), 2.05 – 1.97 (m, 1H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 172.7, 170.0, 168.7, 167.2, 146.1, 136.1, 136.0, 134.9, 132.2, 129.2, 127.9, 127.5, 125.1, 123.2, 121.5, 119.6, 117.1, 113.7, 110.5, 110.2, 109.4, 60.1, 50.2, 49.9, 48.5, 43.4, 39.4, 30.9, 29.1, 22.1$ ppm.

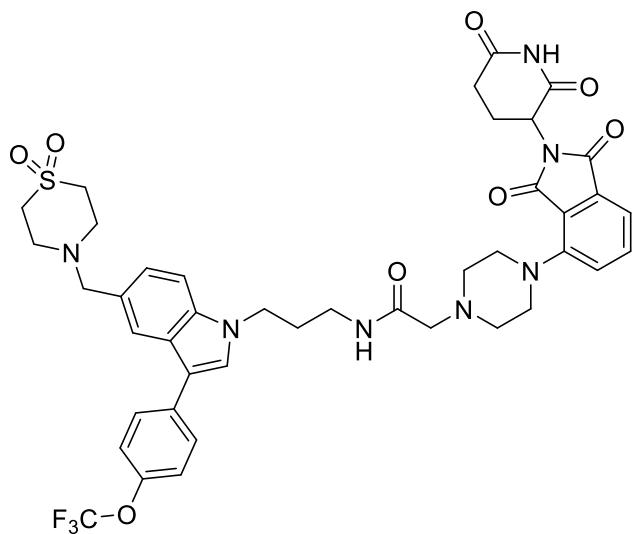
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2932 (w), 2827 (w), 1756 (w), 1695 (s), 1623 (w), 1547 (w), 1505 (w), 1485 (w), 1457 (w), 1407 (w), 1298 (w), 1255 (s), 1166 (m), 1122 (w), 1049 (w), 1024 (w), 852 (w), 803 (w), 779 (w), 746 (m), 722 (w), 678 (w), 607 (w), 510 (w), 468 (w), 435 (m) cm^{-1} .

LCMS (ESI+): $t_{\text{R}} = 11.6$ min (Methode I) m/z (% relative Intensität): 738.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100)

HR-ESI-MS: $(\text{C}_{36}\text{H}_{35}\text{F}_3\text{N}_5\text{O}_7\text{S}^+)$ ber.: 738.2204 gef.: 738.2205

***N*-(3-((1,1-Dioxidothiomorpholino)methyl)-3-(4-(trifluormethoxy)phenyl)-1*H*-indol-1-yl)propyl)-2-(4-(2-(2,6-dioxopiperidin-3-yl)-1,3-dioxoisindolin-4-yl)piperazin-1-yl)-acetamid**
(215, DAG-032)

Zu einer Lösung aus dem entsprechenden Linker-System, bereitgestellt von ROEGER, (17.0 mg, 1 Äq., 42.4 μmol) in DMF (2.5 mL) wurde unter Rühren HATU (8.86 mg, 0.55 Äq., 23.3 μmol) und DIPEA (14.7 μL , 2 Äq., 84.7 μmol) gegeben. Die Lösung wurde anschließend auf 0 °C abgekühlt. Parallel dazu wurde eine Lösung aus **198** (20.4 mg, 1 Äq., 42.4 μmol), HATU (8.86 mg, 0.55 Äq., 23.3 μmol) und DIPEA (14.7 μL , 2 Äq., 84.7 μmol) in DMF (2.5 mL) hergestellt. Diese Lösung wurde langsam bei 0 °C zur ersten Lösung unter Rühren hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur für 16 h gerührt. Anschließend wurde dem Reaktionsgemisch H_2O (1 mL) hinzugegeben und das Lösungsmittel wurde unter verminderter Druck entfernt. Der Rückstand wurde in $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ aufgenommen und mittels RP-Flash-Chromatographie ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ -Gradient) gereinigt. Es wurde ein gelbliches Pulver mit einer Ausbeute von 53.0% (19.4 mg, 22.5 μmol) erhalten.



¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ = 11.07 (s, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.79 – 7.74 (m, 2H), 7.71 – 7.67 (m, 1H), 7.52 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.42 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.36 (d, J = 7.1 Hz, 1H), 7.32 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.22 (dd, J = 8.5, 1.2 Hz, 1H), 5.08 (dd, J = 12.8, 5.5 Hz, 1H), 4.24 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 3.76 (s, 2H), 3.16 (dd, J = 12.9, 6.6 Hz, 2H), 3.07 (d, J = 4.9 Hz, 4H), 2.91 – 2.82 (m, 5H), 2.65 – 2.51 (m, 2H), 2.04 – 1.95 (m, 3H) ppm.

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-d₆): δ = 172.8, 167.0, 167.0, 136.0, 133.7, 128.0, 125.2, 123.7, 123.2, 121.6, 119.7, 114.7 113.5, 110.3, 60.2, 52.7, 50.2, 49.9, 48.8, 43.6, 42.4, 36.2, 30.9, 29.8, 22.0 ppm.

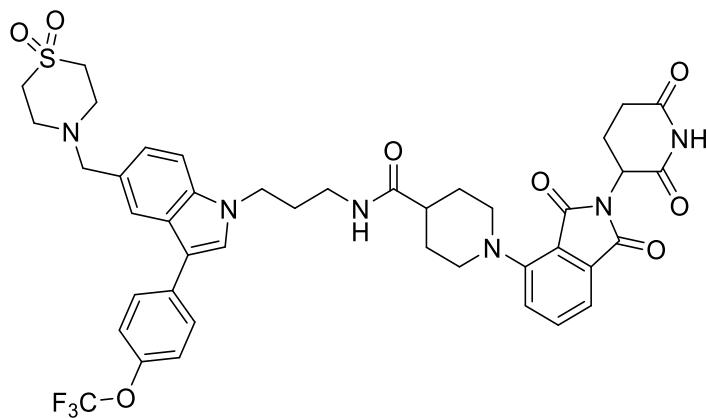
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2933 (w), 2827 (w), 1760 (w), 1702 (s), 1614 (w), 1575 (w), 1545 (w), 1487 (w), 1449 (w), 1396 (m), 1255 (s), 1222 (w), 1185 (w), 1123 (m), 1048 (w), 1012 (w), 966 (w), 853 (w), 819 (w), 802 (w), 780 (w), 749 (m), 720 (w), 578 (w), 510 (w), 436 (m) cm⁻¹.

LCMS (ESI+): t_R = 7.3 min (Methode II) m/z (% relative Intensität): 864.0 [M+H]⁺ (100)

HR-ESI-MS: (C₄₂H₄₅F₃N₇O₈S⁺) ber.: 864.2997 gef.: 864.2999

N-(3-((1,1-Dioxidothiomorpholino)methyl)-3-(4-(trifluormethoxy)phenyl)-1*H*-indol-1-yl)propyl-1-(2-(2,6-dioxopiperidin-3-yl)-1,3-dioxoisindolin-4-yl)piperidin-4-carboxamid
(216, DAG-034)

Zu einer Lösung aus dem entsprechenden Linker-System, bereitgestellt von ROEGER, (20.0 mg, 1 Äq., 51.9 μ mol) in DMF (2.5 mL) wurde unter Röhren HATU (10.9 mg, 0.55 Äq., 28.6 μ mol) und DIPEA (18.0 μ L, 2 Äq., 103.8 μ mol) gegeben. Die Lösung wurde anschließend auf 0 °C abgekühlt. Parallel dazu wurde eine Lösung aus **198** (25.0 mg, 1 Äq., 51.9 μ mol), HATU (10.9 mg, 0.55 Äq., 28.6 μ mol) und DIPEA (18.0 μ L, 2 Äq., 103.8 μ mol) in DMF (2.5 mL) hergestellt. Diese Lösung wurde langsam bei 0 °C zur ersten Lösung unter Röhren hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur für 16 h gerührt. Anschließend wurde dem Reaktionsgemisch H₂O (1 mL) hinzugegeben und das Lösungsmittel wurde unter verminderter Druck entfernt. Der Rückstand wurde in H₂O/MeCN aufgenommen und mittels RP-Flash-Chromatographie (H₂O/MeCN-Gradient) gereinigt. Es wurde ein gelbliches Pulver mit einer Ausbeute von 49.5% (21.8 mg, 25.7 μ mol) gewonnen.



¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ = 11.07 (s, 1H), 7.93 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.80 – 7.75 (m, 2H), 7.68 (dd, *J* = 8.4, 7.2 Hz, 1H), 7.54 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.43 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.37 – 7.31 (m, 2H), 7.24 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.22 – 7.01 (m, 1H), 5.09 (dd, *J* = 12.8, 5.5 Hz, 1H), 4.24 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 3.87 (s, 2H), 3.71 (d, *J* = 12.0 Hz, 2H), 3.20 – 2.81 (m, 14H), 2.63 – 2.51 (m, 2H), 2.36 – 2.27 (m, 1H), 2.06 – 1.99 (m, 1H), 1.99 – 1.92 (m, 2H), 1.80 (s, 4H) ppm.

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-d₆): δ = 174.2, 172.8, 170.0, 167.1, 166.3, 150.0, 146.1, 136.1, 135.7, 134.9, 133.7, 128.0, 125.2, 123.9, 123.4, 121.6, 116.5, 114.5, 113.6, 110.4, 50.5, 49.9, 48.8, 43.5, 41.4, 36.1, 29.7, 28.5, 22.0 ppm.

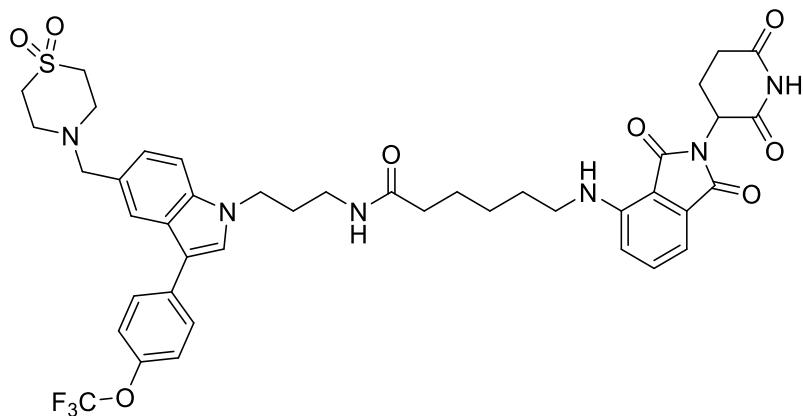
IR (ATR): $\tilde{\nu} = 2931$ (w), 2828 (w), 1759 (w), 1699 (s), 1615 (w), 1545 (w), 1504 (w), 1487 (w), 1256 (s), 1184 (w), 1157 (w), 1122 (m), 1050 (w), 1024 (w), 992 (w), 961 (w), 919 (w), 887 (w), 852 (w), 802 (w), 780 (w), 748 (m), 532 (w), 509 (w), 435 (w), 413 (w) cm^{-1} .

LCMS (ESI+): $t_R = 8.6$ min (Methode II) m/z (% relative Intensität): 849.0 $[M+H]^+$ (66.7)

HR-ESI-MS: (C₄₂H₄₃F₃N₆O₈SnA⁺) ber.: 871.2707 gef.: 871.2728

N-(3-((1,1-Dioxidothiomorpholino)methyl)-3-(4-(trifluormethoxy)phenyl)-1*H*-indol-1-yl)propyl)-6-((2-(2,6-dioxopiperidin-3-yl)-1,3-dioxoisoindolin-4-yl)amino)hexanamid (217, DAG-033)

Zu einer Lösung aus dem entsprechenden Linker-System, bereitgestellt von ROEGER, (12.9 mg, 1 Äq., 33.2 µmol) in DMF (2.5 mL) wurde unter Rühren HATU (6.9 mg, 0.55 Äq., 18.3 µmol) und DIPEA (11.5 µL, 2 Äq., 66.5 µmol) gegeben. Die Lösung wurde anschließend auf 0 °C abgekühlt. Parallel dazu wurde eine Lösung aus **198** (16.0 mg, 1 Äq., 33.2 µmol), HATU (6.9 mg, 0.55 Äq., 18.3 µmol) und DIPEA (11.5 µL, 2 Äq., 66.5 µmol) in DMF (2.5 mL) hergestellt. Diese Lösung wurde langsam bei 0 °C zur ersten Lösung unter Rühren hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur für 16 h gerührt. Anschließend wurde dem Reaktionsgemisch H₂O (1 mL) hinzugegeben und das Lösungsmittel wurde unter verminderterem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in H₂O/MeCN aufgenommen und mittels RP-Flash-Chromatographie (H₂O/MeCN-Gradient) gereinigt. Es wurde ein gelbliches Pulver mit einer Ausbeute von 47.8% (13.5 mg, 15.9 µmol) gewonnen.



¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ = 11.07 (s, 1H), 7.86 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.77 – 7.74 (m, 2H), 7.55 (dd, *J* = 8.4, 7.2 Hz, 1H), 7.50 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.42 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.20 (dd, *J* = 8.5, 1.3 Hz, 1H), 7.07 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.00 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 6.51 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 5.03 (dd, *J* = 12.8, 5.5 Hz, 1H), 4.21 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 3.76 (s, 2H), 3.27 (dd, *J* = 13.1, 6.9 Hz, 2H), 3.11 – 3.03 (m, 6H), 2.92 – 2.82 (m, 5H), 2.62 – 2.52 (m, 2H), 2.09 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.00 (dtd, *J* = 7.7, 5.3, 2.3 Hz, 1H), 1.94 – 1.87 (m, 2H), 1.56 (tt, *J* = 15.2, 7.4 Hz, 4H), 1.38 – 1.29 (m, 2H) ppm.

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-d₆): δ = 172.7, 172.1, 170.0, 168.9, 167.3, 146.4, 146.0, 136.2, 135.9, 134.9, 132.2, 129.2, 127.9, 127.7, 125.1, 123.2, 121.5, 119.6, 117.1, 113.5, 110.4, 110.2, 109.0, 60.1, 50.2, 49.9, 48.5, 43.5, 41.7, 36.0, 35.3, 30.9, 29.7, 28.5, 26.0, 25.0, 22.1 ppm.

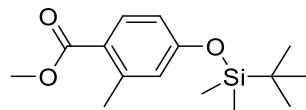
IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3382$ (w), 2933 (w), 1756 (w), 1695 (s), 1623 (w), 1544 (w), 1506 (w), 1486 (w), 1456 (w), 1406 (w), 1254 (s), 1221 (w), 1182 (w), 1159 (m), 1122 (m), 778 (w), 746 (m), 722 (w), 678 (w), 607 (w), 576 (w), 510 (w), 467 (w), 435 (m), 417 (w) cm^{-1} .

LCMS (ESI+): $t_R = 8.8$ min (Methode II) m/z (% relative Intensität): 851.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100)

HR-ESI-MS: $(\text{C}_{42}\text{H}_{46}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}_8\text{S}^+)$ ber.: 851.3044 gef.: 851.3042

**Methyl-4-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-2-methylbenzoat
(220, DAG-002)**

Zu einer rührenden Lösung aus Methyl-4-hydroxy-2-methylbenzoat (2.16 g, 1 Äq., 12.5 mmol, 95.0%) in trockenem DCM (37 mL) wurden bei Raumtemperatur Imidazol (1.70 g, 2 Äq., 25.0 mmol) und TBSCl (2.11 g, 1.1 Äq., 14.0 mmol, 97.0%) hinzugegeben. Nach 18 h wurde gesättigte NaCl-Lösung zum Reaktionsansatz gegeben und die organische Phase wurde mit NaCl-Lösung (3x 10 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter verminderter Druck entfernt und das Rohprodukt wurde mittels RP-Flash-Chromatographie ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ -Gradient) gereinigt um das gewünschte Produkt als leicht bräunliches Öl (3.46 g, 12.3 mmol, 99.8%) zu erhalten.



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.86$ (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 6.69 (s, 1H), 6.66 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 3.85 (s, 3H), 2.56 (s, 3H), 0.98 (s, 9H), 0.22 (s, 6H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 167.77, 159.09, 143.1, 132.9, 123.25, 122.6, 117.3, 51.7, 25.8, 22.2, 18.4, -4.21$ ppm.

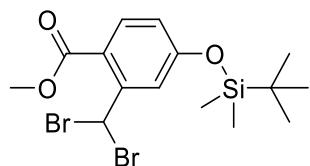
IR (ATR): $\tilde{\nu} = 2953$ (w), 2930 (w), 2887 (w), 2858 (w), 1718 (s), 1600 (m), 1567 (w), 1498 (m), 1472 (w), 1463 (w), 1434 (w), 1402 (w), 1305 (w), 1245 (s), 1188 (w), 1172 (w), 1129 (m), 1084 (m), 1019 (w), 978 (w), 960 (m), 940 (w), 873 (w), 838 (s), 807 (m), 777 (m), 698 (m), 670 (w), 451 (w) cm^{-1} .

LCMS (ESI+): $t_R = 15.4$ min (Methode I) m/z (% relative Intensität): 281.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100)

HR-ESI-MS: $(\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{O}_3\text{Si}^+)$ ber.: 281.1567 gef.: 281.1568

**Methyl-4-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-2-(dibromomethyl)benzoat
(221, DAG-005)**

Zu einer Lösung aus **220** (2.02 g, 1 Äq., 7.22 mmol) in Benzol (50 mL) wurden unter Rühren NBS (4.5 g, 3.5 Äq., 25.3 mmol) und AIBN (1.19 g, 1 Äq., 7.22 mmol) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 30 min bei 15 °C gerührt und danach für 16 h auf 85 °C erwärmt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das organische Lösungsmittel unter verminderter Druck entfernt und der Rückstand wurde in DCM (30 mL) aufgenommen. Die Lösung wurde anschließend filtriert und mit CH (30 mL) versetzt. Nach erneuter Filtration wurde das Lösungsmittel unter verminderter Druck entfernt und das Rohprodukt wurde säulenchromatografisch (Eluent: 100% CH) gereinigt. Es wurde ein leicht gelbliches Öl in einer Ausbeute von 94% (2.97 g, 6.8 mmol) isoliert.



¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ = 7.94 (s, 1H), 7.80 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.47 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 6.99 (dd, *J* = 8.7, 2.5 Hz, 1H), 3.85 (s, 3H), 0.97 (s, 9H), 0.27 (s, 6H) ppm.

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-d₆): δ = 165.6, 159.1, 144.5, 132.3, 121.8, 121.4, 118.0, 52.4, 38.4, 25.4, 18.0, -4.6 ppm.

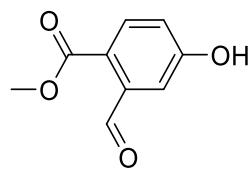
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3338 (s), 3071 (s), 2951 (s), 1704 (m), 1685 (m), 1602 (m), 1574 (m), 1498 (s), 1434 (m), 1283 (w), 1248 (w), 1191 (m), 1167 (s), 1129 (m), 1077 (s), 1045 (s), 1022 (s), 977 (s), 959 (s) cm⁻¹.

LCMS (ESI+): *t*_R = 13.0 min (Methode II) m/z (% relative Intensität): 438.8 [M+H]⁺ (17.6)

HR-ESI-MS: (C₁₅H₂₂Br₂O₃SiNa⁺) ber.: 458.9597 gef.: 458.9597

2-Formyl-4-hydroxybenzoësäuremethylester
(222, DAG-022)

Zu einer Lösung aus **221** (3.10 g, 1 Äq., 7.1 mmol) in Aceton (36 mL) und H₂O (7 mL) wurde AgNO₃ (2.52 g, 2.1 Äq., 14.9 mmol) unter Rühren hinzugegeben. Anschließend wurde die Lösung unter Lichtausschluss für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde filtriert, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in EtOAc (10 mL) aufgenommen. Anschließend wurde die organische Phase mit H₂O (3x 10 mL) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Rohprodukt wurde mittels RP-Flash-Chromatographie (H₂O/MeCN-Gradient) gereinigt, sodass gelbliche Kristalle mit einer Ausbeute von 87% (1.11 g, 6.2 mmol) erhalten wurden.



¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 10.69 (s, 1H), 7.97 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.39 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 7.09 (dd, *J* = 8.5, 2.7 Hz, 1H), 6.20 (s, 1H), 3.95 (s, 3H) ppm.

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃): δ = 192.7, 166.4, 159.6, 139.8, 133.5, 124.2, 119.8, 114.7, 52.7 ppm.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3361 (m), 2957 (w), 2912 (w), 1681 (s), 1605 (m), 1571 (m), 1538 (w), 1494 (w), 1452 (w), 1434 (m), 1275 (s), 1192 (m), 1161 (w), 1129 (m), 1080 (w), 997 (w), 972 (w), 951 (w), 886 (w), 847 (m), 830 (w), 776 (m), 755 (w), 690 (m), 630 (w), 600 (s), 424 (w) cm⁻¹.

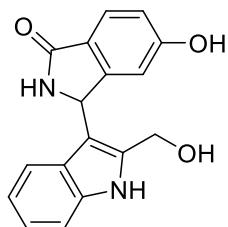
LCMS (ESI+): t_R = 4.6 min (Methode II) m/z (% relative Intensität): 181.1 [M+H]⁺ (100)

HR-ESI-MS: (C₉H₈O₄Na⁺) ber.: 203.0315 gef.: 203.0323

5-Hydroxy-3-(2-(Hydroxymethyl)-1*H*-indol-3-yl)isoindolin-1-on

(223, DAG-023)

222 (141.3 mg, 1 Äq., 0.78 mmol) und (1*H*-Indol-2-yl)methanol (138.5 mg, 1.2 Äq., 0.94 mmol) wurden in einem Mikrowellenröhrchen ($V = 5 \text{ mL}$) mit geeignetem Magnetrührstab in NH_3 (1.1 mL, 7.84 mmol, w = 25%, 10 eq) und H_2O (1.6 mL) gelöst. Das Mikrowellenröhrchen wurde mit einem dafür vorgesehenen Deckel verschlossen und im Mikrowellenreaktor für 2 h unter maximaler Leistung und Druckluftkühlung bei 80 °C erhitzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter verminderter Druck entfernt und das Rohprodukt wurde mittels RP-Flash-Chromatographie ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ -Gradient) gereinigt. Nach der Aufreinigung wurde ein weißer Feststoff in einer Ausbeute von 41% (94.8 mg, 0.32 mmol) gewonnen.



¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ = 11.07 (s, 1H), 9.91 (s, 1H), 8.41 (s, 1H), 7.56 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.31 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.00 – 6.93 (m, 1H), 6.85 (dd, J = 8.3, 2.1 Hz, 1H), 6.74 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 6.67 (s, 1H), 6.61 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 5.92 (s, 1H), 5.31 (t, J = 5.3 Hz, 1H), 4.79 (dd, J = 13.3, 5.3 Hz, 1H), 4.69 (d, J = 9.3 Hz, 1H) ppm.

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-d₆): δ = 169.4, 160.8, 150.9, 137.8, 135.5, 125.7, 124.0, 123.4, 120.8, 118.5, 115.6, 111.3, 109.8, 107.5, 54.7, 52.1 ppm.

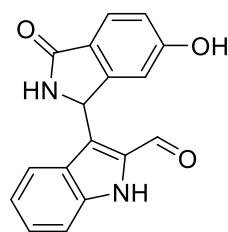
IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3367$ (m), 3283 (w), 3037 (w), 2926 (w), 1640 (m), 1598 (s), 1472 (w), 1455 (w), 1443 (w), 1391 (s), 1347 (w), 1309 (w), 1294 (w), 1253 (m), 1223 (s), 1190 (w), 1161 (w), 1134 (w), 1077 (w), 1035 (w), 1020 (s), 1009 (w) cm^{-1} .

LCMS (ESI+): $t_R = 4.4$ min (Methode II) **m/z (% relative Intensität):** 295.1 [M+H]⁺ (100)

HR-ESI-MS: (C₁₇H₁₄N₂O₃Na⁺) ber.: 317.0897 gef.: 317.0898

**3-(6-Hydroxy-3-oxoisoindolin-1-yl)-1*H*-Indol-2-carbaldehyd
(224, DAG-026)**

Zu einer Lösung aus **223** (115 mg, 1 Äq., 0.39 mmol) in DMF (5 mL) wurde unter Rühren DMP (182.3 mg, 1.1 Äq., 0.43 mmol) gegeben. Der Reaktionsansatz wurde für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter verminderter Druck entfernt und der Rückstand wurde in MeOH (5 mL) aufgenommen. Die Lösung wurde filtriert und das MeOH wurde unter verminderter Druck entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde im Anschluss mittels RP-Flash-Chromatographie (H₂O/MeCN-Gradient) gereinigt. Die leicht bräunliche Substanz wurde mit einer Ausbeute von 86.9% (99.2 mg, 0.34 mmol) gewonnen.



¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ = 11.98 (s, 1H), 10.25 (s, 1H), 10.04 (s, 1H), 8.76 (s, 1H), 7.62 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.43 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.26 (dd, *J* = 10.4, 5.9 Hz, 1H), 6.90 (dd, *J* = 8.3, 2.0 Hz, 3H), 6.60 (s, 1H), 6.49 (s, 1H) ppm.

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-d₆): δ = 182.4, 169.5, 161.1, 150.1, 137.8, 133.3, 126.4, 124.5, 122.9, 121.4, 120.4, 116.1, 113.1, 109.7, 51.1 ppm.

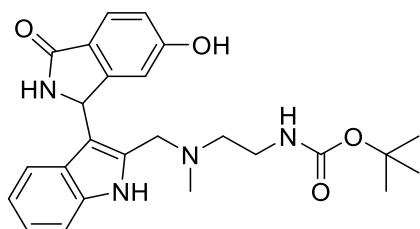
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3397 (w), 3234 (m), 3054 (w), 2850 (w), 2739 (w), 2251 (w), 1661 (s), 1623 (w), 1592 (w), 1570 (w), 1493 (w), 1468 (w), 1456 (w), 1438 (w), 1382 (w), 1365 (w), 1342 (w), 1296 (m), 1225 (m), 1021 (w), 995 (s), 939 (w), 908 (w), 885 (w), 845 (m) cm⁻¹.

LCMS (ESI+): *t*_R = 5.3 min (Methode I) *m/z* (% relative Intensität): 293.1 [M+H]⁺ (100)

HR-ESI-MS: (C₁₇H₁₂N₂O₃Na⁺) ber.: 315.0740 gef.: 315.0736

**tert-Butyl-(2-(((3-(6-hydroxy-3-oxoisooindolin-1-yl)-1*H*-indol-2-yl)-methyl)(methyl)amino)ethyl)carbamate
(225, DAG-024)**

Zu einer Lösung aus **223** (170.0 mg, 1 Äq., 0.58 mmol) in DMF (15 mL) wurde unter Rühren DMP (269.5 mg, 1.1 Äq., 0.64 mmol) hinzugegeben. Mittels Dünnschichtchromatographie wurde der Verlauf der Oxidation zum Aldehyd **224** kontrolliert. Nach ca. 5 h Reaktionszeit wurde N-Boc-2-methylamino-ethylamin (151.0 mg, 1.5 Äq., 0.87 mmol) hinzugegeben. Anschließend wurde über 15 min STAB (612.1 mg, 5 Äq., 2.89 mmol) zudosiert. Das Reaktionsgemisch wurde für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend filtriert und das Lösungsmittel wurde unter verminderterem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde zunächst über eine kurze RP-Filtersäule (H₂O/MeCN-Gradient) vorgereinigt und anschließend mittels präparativer HPLC (MeCN 5% auf 50%, basische Bedingungen) gereinigt. Es wurde ein leicht braunes Pulver in einer Ausbeute von 56.2% (146.2 mg, 0.32 mmol) erhalten.



¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ = 11.35 (s, 1H), 9.96 (s, 1H), 8.46 (s, 1H), 7.63 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.42 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.15 – 7.07 (m, 1H), 6.92 (dd, J = 8.2, 2.1 Hz, 1H), 6.81 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 6.57 – 6.48 (m, 1H), 6.56 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.03 (s, 1H), 4.93 – 4.61 (m, 3H), 3.51 – 3.06 (m, 4H), 2.90 (s, 3H), 1.40 (s, 9H) ppm.

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-d₆): δ = 169.5, 161.0, 158.4, 150.5, 136.5, 132.2, 124.3, 124.3, 123.3, 122.9, 119.4, 119.2, 115.9, 114.5, 111.9, 109.8, 78.6, 52.2, 51.6, 49.8, 39.3, 35.2, 28.1 ppm.

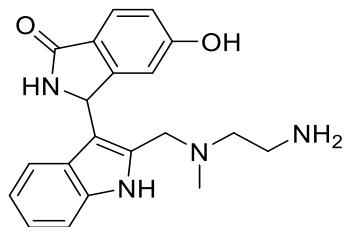
IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3189$ (w), 3063 (w), 2980 (w), 1670 (s), 1610 (w), 1529 (w), 1457 (w), 1413 (w), 1393 (w), 1367 (w), 1298 (w), 1255 (w), 1198 (w), 1172 (w), 1130 (s), 1048 (w), 1023 (s) cm^{-1} .

LCMS (ESI+): $t_R = 5.3$ min (Methode II) m/z (% relative Intensität): 451.2 $[M+H]^+$ (100)

HR-ESI-MS: (C₂₅H₃₀N₄O₄Na⁺) ber.: 473.2159 gef.: 473.2158

**3-((2-Aminoethyl)(methyl)amino)methyl-1*H*-indol-3-yl)-5-hydroxyisoindolin-1-on
(226, DAG-025)**

In einem 25 mL Rundkolben wurde **225** (270 mg, 1 Äq., 0.60 mmol) in MeOH (5 mL) gelöst. Anschließend wird 0.5 M HCl in MeOH (15 mL) hinzugegeben. Nach vollständigem Umsatz des Edukts wurde das Lösungsmittel unter verminderterem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde anschließend mittels RP-Flash-Chromatographie (H₂O/MeCN-Gradient) aufgereinigt. Es wurde ein leicht braunes Pulver mit einer Ausbeute von 83.0% (174.3 mg, 0.50 mmol) erhalten.



¹H NMR (400 MHz, MeOH-d₄): δ = 8.12 (s, 1H), 7.71 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.34 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.05 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.93 (dd, *J* = 8.3, 2.1 Hz, 1H), 6.89 – 6.79 (m, 2H), 6.62 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 6.04 (s, 1H), 3.78 (s, 2H), 3.10 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 2.74 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 2.28 (s, 3H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, MeOH-d₄): δ = 173.4, 165.0, 163.2, 152.9, 137.5, 135.3, 125.7, 124.2, 122.9, 120.3, 119.5, 117.1, 112.1, 110.9, 110.1, 55.1, 54.5, 54.0, 42.1, 38.3 ppm.

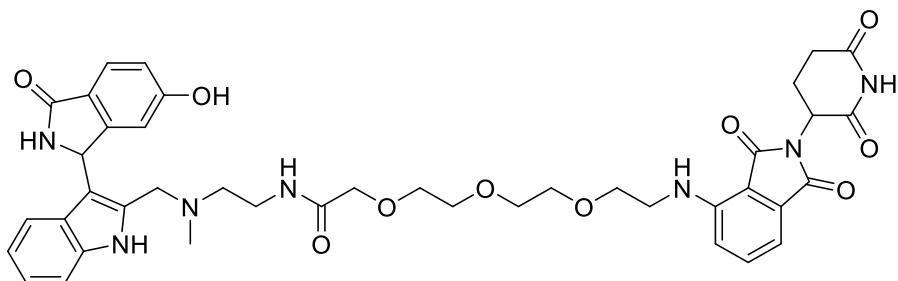
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3031 (w), 2362 (w), 1667 (s), 1608 (w), 1456 (w), 1417 (w), 1298 (w), 1258 (w), 1187 (m), 1127 (s), 1081 (w), 1040 (w), 1015 (w), 982 (w), 943 (w), 837 (m), 797 (m), 771 (w), 745 (w), 721 (s) cm⁻¹.

LCMS (ESI+): *t*_R = 4.9 min (Methode A) m/z (% relative Intensität): 351.2 [M+H]⁺ (100)

HR-ESI-MS: (C₂₀H₂₃N₄O₂⁺) ber.: 351.1816 gef.: 351.1815

2-(2-(2-(2-(2,6-Dioxopiperidin-3-yl)-1,3-dioxoisoindolin-4-yl)-amino)ethoxy)ethoxy)-N-(2-((3-(6-Hydroxy-3-oxoisoindolin-1-yl)-1H-indol-2-yl)methyl)(methyl)amino)ethyl)acetamid
(227, DAG-027)

Zu einer Lösung aus **208** (23.8 mg, 1 Äq., 51.4 µmol) in DMF (2.5 mL) wurde unter Rühren HATU (10.74 mg, 0.55 Äq., 28.3 µmol) und DIPEA (17.8 µL, 2 Äq., 102.7 µmol) gegeben. Die Lösung wurde anschließend auf 0 °C abgekühlt. Parallel dazu wurde eine Lösung aus **226** (18 mg, 1 Äq., 51.4 µmol), HATU (10.74 mg, 0.55 Äq., 28.3 µmol) und DIPEA (17.8 µL, 2 Äq., 102.7 µmol) in DMF (2.5 mL) hergestellt. Diese Lösung wurde langsam bei 0 °C zur ersten Lösung unter Rühren hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur für 16 h gerührt. Anschließend wurde dem Reaktionsgemisch H₂O (1 mL) hinzugegeben und das Lösungsmittel wurde unter verminderter Druck entfernt. Der Rückstand wurde in H₂O/MeCN aufgenommen und mittels RP-Flash-Chromatographie (H₂O/MeCN-Gradient) gereinigt. Es wurde ein gelbliches Pulver mit einer Ausbeute von 51.1% (20.9 mg, 26.3 µmol) erhalten.



¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ = 11.08 (s, 1H), 10.95 (s, 1H), 9.90 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 7.65 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 7.57 (m, 2H), 7.29 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.12 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.03 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 6.95 (dd, *J* = 11.2, 4.0 Hz, 1H), 6.84 (dd, *J* = 8.3, 2.0 Hz, 1H), 6.72 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 6.59 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 6.53 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 5.95 (s, 1H), 5.05 (dd, *J* = 12.9, 5.5 Hz, 1H), 3.83 (s, 2H), 3.59 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H), 3.56 – 3.48 (m, 9H), 3.45 (dd, *J* = 11.2, 5.6 Hz, 2H), 2.88 (ddd, *J* = 17.1, 14.0, 5.5 Hz, 1H), 2.62 – 2.49 (m, 2H), 2.24 (s, 3H), 2.02 (m, 1H) ppm.

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-d₆): δ = 172.8, 170.0, 169.5, 168.9, 167.3, 160.8, 158.5, 151.0, 146.4, 136.2, 135.6, 132.1, 124.1, 123.8, 120.9, 118.5, 118.3, 117.4, 115.5, 111.2, 110.7, 109.6, 109.3, 70.2, 70.0, 69.7, 69.6, 68.9, 56.1, 52.1, 48.6, 41.7, 31.0, 22.1 ppm.

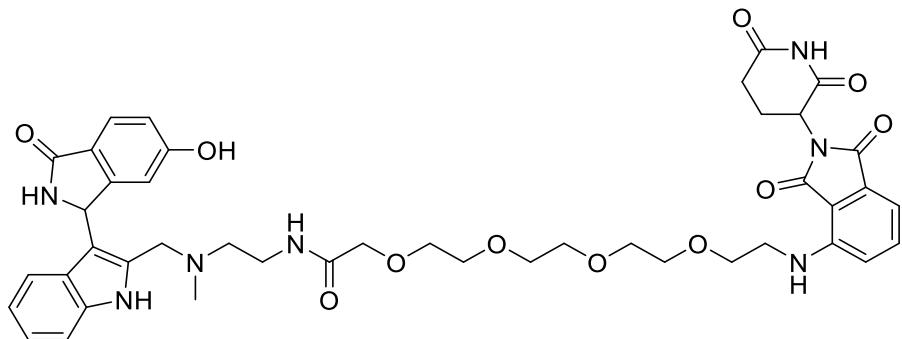
IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3246$ (w), 3064 (w), 2922 (w), 2854 (w), 1693 (s), 1622 (w), 1538 (w), 1510 (w), 1458 (w), 1407 (w), 1357 (m), 1324 (w), 1298 (w), 1259 (m), 1198 (m), 1177 (w), 1112 (m), 1022 (s), 821 (w), 745 (s), 718 (w), 692 (w), 607 (m), 576 (w), 530 (w), 467 (w) cm^{-1} .

LCMS (ESI+): $t_{R\acute{e}}$ = 6.0 min (Methode II) **m/z (% relative Intensität):** 796.1 [M+H]⁺ (100)

HR-ESI-MS: (C₄₁H₄₅N₇O₁₀Na⁺) ber.: 818.3120 gef.: 818.3124

14-((2-(2,6-Dioxopiperidin-3-yl)-1,3-dioxoisooindolin-4-yl)amino)-N-(2-(((3-(6-Hydroxy-3-oxoisooindolin-1-yl)-1H-indol-2-yl)methyl)(methyl)amino)ethyl)-3,6,9,12-tetraoxatetradecanamid (228, DAG-028)

Zu einer Lösung aus **209** (31.4 mg, 1 Äq., 61.9 µmol) in DMF (2.5 mL) wurde unter Rühren HATU (12.95 mg, 0.55 Äq., 34.5 µmol) und DIPEA (21.4 µL, 2 Äq., 123.9 µmol) gegeben. Die Lösung wurde anschließend auf 0 °C abgekühlt. Parallel dazu wurde eine Lösung aus **226** (21.7 mg, 1 Äq., 61.9 µmol), HATU (12.95 mg, 0.55 Äq., 34.5 µmol) und DIPEA (21.4 µL, 2 Äq., 123.9 µmol) in DMF (2.5 mL) hergestellt. Diese Lösung wurde langsam bei 0 °C zur ersten Lösung unter Rühren hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur für 16 h gerührt. Anschließend wurde dem Reaktionsgemisch H₂O (1 mL) hinzugegeben und das Lösungsmittel wurde unter verminderter Druck entfernt. Der Rückstand wurde in H₂O/MeCN aufgenommen und mittels RP-Flash-Chromatographie (H₂O/MeCN-Gradient) gereinigt. Es wurde ein gelbliches Pulver mit einer Ausbeute von 31.7% (16.5 mg, 31.7 µmol) erhalten.



¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ = 11.04 (s, 1H), 10.95 (s, 1H), 9.91 (s, 1H), 8.39 (s, 1H), 7.64 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 7.57 (m, 2H), 7.29 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.13 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.04 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 6.98 – 6.92 (m, 1H), 6.84 (dd, J = 8.3, 2.1 Hz, 1H), 6.72 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 6.59 (t, J = 5.7 Hz, 2H), 6.53 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 5.95 (s, 1H), 5.05 (dd, J = 12.9, 5.5 Hz, 1H),

3.85 – 3.66 (m, 4H), 3.60 (t, J = 5.5 Hz, 2H), 3.56 – 3.42 (m, 16H), 3.30 (m, 2H), 2.88 (ddd, J = 17.1, 13.9, 5.5 Hz, 1H), 2.63 – 2.51 (m, 4H), 2.24 (s, 3H), 2.05 – 1.99 (m, 1H) ppm.

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO-d₆): δ = 172.8, 170.0, 169.4, 169.2, 167.3, 160.8, 151.0, 146.4, 136.2, 135.6, 132.1, 124.1, 123.5, 120.9, 118.5, 118.3, 117.4, 115.5, 111.2, 110.7, 109.6, 109.2, 109.1, 70.1, 69.9, 69.8, 69.7, 69.5, 68.9, 56.1, 52.3, 52.1, 48.6, 42.0, 41.7, 36.1, 31.0, 22.1 ppm.

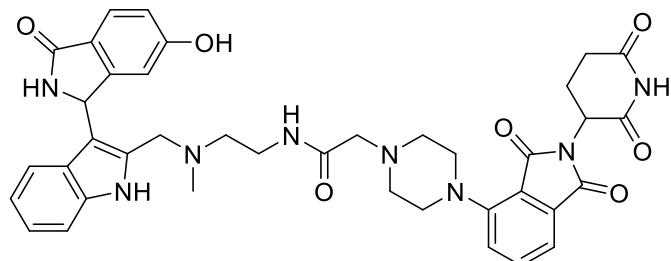
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3247 (m), 3064 (w), 2867 (w), 1693 (s), 1666 (w), 1622 (w), 1541 (w), 1510 (w), 1458 (w), 1407 (w), 1356 (m), 1324 (w), 1297 (w), 1259 (m), 1197 (m), 1178 (w), 1109 (m), 1022 (s), 1004 (w), 745 (s), 691 (w), 607 (m), 576 (w), 558 (w), 530 (w), 467 (w) cm⁻¹.

LCMS (ESI+): t_{R} = 6.2 min (Methode II) m/z (% relative Intensität): 840.3 [M+H]⁺ (72.7)

HR-ESI-MS: (C₄₃H₄₉N₇O₁₁Na⁺) ber.: 862.3382 gef.: 862.3378

2-(4-(2-(2,6-Dioxopiperidin-3-yl)-1,3-dioxoisindolin-4-yl)piperazin-1-yl)-N-(2-((3-(6-hydroxy-3-oxoisindolin-1-yl)-1H-indol-2-yl)methyl)(methyl)aminoethyl)acetamid (229, DAG-031)

Zu einer Lösung aus dem entsprechenden Linker-System, bereitgestellt von ROEGER, (17.4 mg, 1 Äq., 43.4 μmol) in DMF (2.5 mL) wurde unter Rühren HATU (9.07 mg, 0.55 Äq., 23.9 μmol) und DIPEA (15.0 μL , 2 Äq., 86.8 μmol) gegeben. Die Lösung wurde anschließend auf 0 °C abgekühlt. Parallel dazu wurde eine Lösung aus **226** (15.2 mg, 1 Äq., 43.4 μmol), HATU (9.07 mg, 0.55 Äq., 23.9 μmol) und DIPEA (15.0 μL , 2 Äq., 86.8 μmol) in DMF (2.5 mL) hergestellt. Diese Lösung wurde langsam bei 0 °C zur ersten Lösung unter Rühren hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur für 16 h gerührt. Anschließend wurde dem Reaktionsgemisch H₂O (1 mL) hinzugegeben und das Lösungsmittel wurde unter verminderter Druck entfernt. Der Rückstand wurde in H₂O/MeCN aufgenommen und mittels RP-Flash-Chromatographie (H₂O/MeCN-Gradient) gereinigt. Es wurde ein gelbliches Pulver mit einer Ausbeute von 89.4% (28.4 mg, 38.8 μmol) erhalten.



^1H NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ = 11.07 (s, 1H), 10.99 (s, 1H), 9.91 (s, 1H), 8.43 (s, 1H), 7.78 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 7.66 (dd, J = 8.4, 7.2 Hz, 1H), 7.56 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.35 (d, J = 7.1

Hz, 1H), 7.27 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.20 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 6.93 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 6.83 (dd, J = 8.3, 2.1 Hz, 1H), 6.70 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 6.58 (m, 1H), 6.54 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 5.97 (s, 1H), 5.08 (dd, J = 12.8, 5.5 Hz, 1H), 3.76 (dd, J = 85.5, 13.6 Hz, 2H), 3.41 (m, 4H), 3.21 (m, 4H), 2.95 (s, 2H), 2.87 (ddd, J = 17.1, 13.9, 5.5 Hz, 1H), 2.66 – 2.50 (m, 6H), 2.25 (s, 3H), 2.05 – 1.98 (m, 1H) ppm.

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO-d₆): δ = 172.0, 169.9, 169.2, 166.6, 160.8, 151.0, 149.6, 135.7, 135.0, 133.6, 125.7, 124.0, 123.6, 120.7, 118.3, 118.3, 116.5, 115.4, 114.7, 111.0, 109.4, 60.9, 55.9, 52.4, 52.1, 51.9, 50.0, 48.5, 41.7, 36.0, 30.6, 21.7 ppm.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3246 (w), 2980 (w), 2829 (w), 1699 (s), 1612 (w), 1532 (w), 1486 (w), 1457 (w), 1397 (m), 1359 (w), 1336 (w), 1298 (w), 1257 (w), 1195 (m), 1156 (w), 1124 (w), 1080 (w), 1024 (w), 967 (w), 746 (m), 705 (w), 598 (w) cm^{-1} .

LCMS (ESI+): t_{R} = 4.7 min (Methode II) m/z (% relative Intensität): 733.1 [M+H]⁺ (100)

HR-ESI-MS: (C₃₉H₄₁N₈O₇⁺) ber.: 733.3093 gef.: 733.3093

6.3 Informationen zum *Molecular Modeling*

Die molekularen Modellierungsstudien wurden unter Nutzung der Software *Maestro* der Firma *Schrödinger LLC* auf einem Windows 10 PC durchgeführt. Die Proteinstrukturen wurden der RCSB *protein data bank* (PDB) entnommen, wobei folgende spezifische Strukturen für die Evaluierung und Berechnungen verwendet wurden:

- **4DSO** (KRAS^{G12D}; kristallisiert mit GSP und Benzamidin)⁵¹
- **4DST** (KRAS^{G12D}; kristallisiert mit GCP und DCAI (20))⁵¹
- **4EPY** (KRAS^{G12V}; kristallisiert mit GDP und 0QY)⁵²
- **7RPZ** (KRAS^{G12D}; kristallisiert mit GDP und MRTX1133 (34))⁶²

Zur Vorbereitung der Proteinkristallstrukturen wurde der *Protein Preparation Wizard* eingesetzt. Hierbei wurden die Bindungsordnungen kovalenter Bindungen angepasst und Wasserstoffatome ergänzt. Außerdem wurden Disulfidbrücken optimiert und Wassermoleküle entfernt, die mehr als 5 Å von Heteroatomen entfernt waren und weniger als drei Wasserstoffbrückenbindungen zu Nicht-Wasser-Molekülen eingingen. Protonierungszustände von Heteroatomen im pH-Bereich von 7±2 wurden erzeugt, fehlende Seitenketten der Proteinstruktur sowie Proteinschleifen mit *Prime* ergänzt. Das Wasserstoffbrückennetzwerk und die Orientierung der verbliebenen Wassermoleküle wurden unter Verwendung der Standardeinstellungen automatisch optimiert. Abschließend erfolgte eine eingeschränkte Geometrieoptimierung mit dem OPLS3-Kraftfeld, bei der schwere Atome bis zu einem RMSD-Wert von 0.3 Å konvergiert wurden. Durch diese umfassenden Vorbereitungsmaßnahmen wurden die Proteinstrukturen für die in dieser Dissertation beschriebenen Berechnungen optimal aufbereitet.

Die *Receptor Grids* wurden unter Verwendung des Moduls *Receptor Grid Generation* erzeugt. Als zentrale Koordinate des Systems wurde hierbei der co-kristallisierte Ligand der Proteinstruktur verwendet. Die Größe des *Grids* entsprach ebenfalls dem vordefinierten Raum des Originalliganden. Im Unterfeld *Constraints* wurde im Falle der Modeling-Arbeiten an der SII-Bindetasche (7RPZ) eine Interaktion zwischen Ligand und der Seitenkette der Aminosäure Asp12 definiert. In den Arbeiten an der SI/II-Bindestelle kam dieser *Constraint* nicht zum Einsatz. Die freie Rotation aller Hydroxyl- und Thiol-Gruppen innerhalb des *Grids* wurde ebenfalls ermöglicht.

Die Liganden wurden mit dem Maestro 2D-*Sketcher* erstellt oder direkt in Form von SD-Files (bspw. HLL460) integriert. Mittels *LigPrep* wurden die Strukturen optimiert. Für mögliche

Ladungszustände wurde ein pH-Bereich von 7 ± 2 vordefiniert. Als Kraftfeld wurde erneut OPLS3 verwendet. Im Falle von im Vorfeld definierter Stereoisomerie wurden ausschließlich die korrekten Isomere in ihrer 3D-Darstellung erzeugt. Für die Strukturen der verwendeten Bibliotheken wurden alle mögliche Kombinationen, bis zu einer maximalen Anzahl von 32 Strukturen pro Ligand, erzeugt.

Die Berechnung der potenziellen Bindemodi von Liganden und die Bewertung der Protein-Ligand-Interaktion in Form des *docking scores* und anderer Werte erfolgte über *Glide – Ligand Docking*. Im HTVS-, SP- und XP-Modus wurden die Liganden als flexibel definiert, sodass sie mehrere Konformationen durchlaufen und so die optimale Passform und Bindungsaffinität an der Zielstelle gefunden werden sollte. Etwaige energetische Strafen für den *docking score* durch erzwungene Anpassungen der Liganden wurden in den Berechnungen in Form der *Epik state penalty* berücksichtigt.

Je nach Anzahl der zu berechnenden Liganden wurden die erhaltenen Konformationen nach einem individuell definierten *Cut-Off* gefiltert und in dem nächst strengerem Berechnungs-Modi verwendet.

ADME-Werte der so berechneten Verbindungen wurden über *QikProp* ermittelt.

6.4 Informationen zu verwendeten biologischen Assays

Die nachfolgenden Assays wurden von der Lead Discovery Center GmbH in Dortmund durchgeführt.

KRAS4B^{GDP}/SOS-Austauschassay:

Im Rahmen des Austauschassays wird der SOS1-vermittelte Austausch von GDP gegen GTP in der Nukleotidbindestelle von KRAS mittels GDP-Freisetzung quantifiziert. Das freigesetzte GDP wird in durch eine Glykosyltransferase in ATP überführt. Unter ATP-Verbrauch oxidiert anschließend eine Luciferase ein Luciferin. Die Folge ist ein detektierbares Lumineszenzsignal. Wird die Entstehung des KRAS4B/SOS-Komplex durch einen Inhibitor gehemmt wird weniger GDP freigesetzt. Im Vergleich zur Standardmessung nimmt die Fluoreszenz ab. Des Weiteren lässt sich aus einer erstellten Kurve des Messsignals in Korrelation mit der Ligandenkonzentration die halbmaximale inhibitorische Konzentration, auch als IC_{50} -Wert bezeichnet, direkt bestimmen.¹⁵⁶

CTG-Assay:

Der CTG-Assay stellt einen homogenen Zellviabilitätsassay dar. Die Einleitung einer Zytolyse erfolgt durch die Zugabe eines CTG-Reagenzmixes, gefolgt vom Verbrauch des in der Probe vorhandenen ATPs durch Umsetzung eines Luciferins als Lumineszensfarbstoff durch eine Luciferase. Infolgedessen ist das entstehende Lumineszenzsignal proportional zum Lebendzellanteil, da lebende Zellen die ATP-Quelle für die Luciferasereaktion darstellen. Mithilfe der Zugabe einer Probesubstanz können durch den Vergleich der Zellproliferation und Zytolyse vor und nach der Zugabe entsprechende IC₅₀-Werte bestimmt werden, was die Grundlage für die Bewertung der Wirksamkeit des Inhibitors darstellt.¹⁵⁷

HTRF-Assay:

Der HRTF-Assay stellt ein Verfahren zur detaillierteren Untersuchung der Downstream-Effektoren, wie beispielsweise pAkt (phospho-Akt), tAkt (total-Akt), pERK und tERK, dar. Der Assay basiert auf der Einführung zweier markierter Antikörper. Im Rahmen des Assays werden zwei Antikörper verwendet, die an Donor- bzw. Akzeptorfluorophore gekoppelt sind. Die Antikörper-Lösung wird anschließend einer Zelllösung hinzugefügt. Unter Anwesenheit des jeweiligen Zielproteins im Zellextrakt bildet sich ein trimetrischer Komplex zwischen den Antikörpern und dem Zielprotein aus. Aufgrund der räumlichen Nähe kommt es zu einer Wechselwirkung der beiden Fluorophore, was zur Emission eines FRET-Signals führt. Die Intensität dieses Signals ist direkt proportional zur Konzentration des Zielproteins, wodurch eine Bestimmung des sogenannten IC₅₀-Wertes möglich ist.¹⁵⁸⁻¹⁶⁰

SPR-Assay:

Die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR) erlaubt eine markierungsfreie, quantitative Messung der Bindungsaffinitäten und -kinetiken für Liganden gegenüber der Proteinoberfläche. Im Rahmen des SPR-Assays erfolgt die Immobilisierung des Proteins (bzw. spezifischer Sequenzen des Proteins) auf einem Sensorchip, während der zu untersuchende Ligand in Lösung über die Sensoroberfläche fließt. Der Nachweis einer Interaktion zwischen Ligand und Proteinoberfläche erfolgt mittels einer optischen Methode, da eine solche Interaktion den Brechungsindex minimal beeinflusst. Das Verhältnis von Proteinoberfläche und Ligand erlaubt die Bestimmung der maximal möglichen Beladung.^{152, 161}

MST-Assay:

Der MST-Assay wird verwendet, um die biophysikalischen Wechselwirkungen zwischen Biomolekülen zu untersuchen. Dabei wird eine temperaturabhängige Änderung der Fluoreszenz des Proteins KRAS4B in Gegenwart eines nicht fluoreszierenden Liganden gemessen. Diese Fluoreszenzänderung hat zwei Ursachen: Erstens eine temperaturinduzierte Intensitätsänderung (TRIC) der Fluoreszenzsonde, die durch Bindungsereignisse beeinflusst wird. Zweitens durch Thermophorese, eine gerichtete Bewegung von Partikeln in einem mikroskopischen Temperaturgradienten. Jede Veränderung in der chemischen Umgebung der fluoreszierenden Sonde sowie Veränderungen in der Hydrathülle von Biomolekülen führen zu einer entsprechenden Veränderung der Fluoreszenz. Diese Änderungen werden durch einen Temperaturgradienten detektiert und zur Bestimmung von Bindungsaffinitäten verwendet.^{162, 163}

Stabilität im Zellkulturmedium:

Die Stabilität der Liganden im Zellkulturmedium wurde nach 24 Stunden überprüft. Das Medium für die zu testenden Krebszellen besteht aus DMEM mit einem Zusatz von 10 % FCS. Der angegebene Wert bezieht sich auf den Prozentsatz der verbleibenden Ligandenkonzentration.

7 Literaturverzeichnis

- 1 Faguet, G. B., *Int. J. Cancer* **2015**, 136 (9), 2022-36.
- 2 Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R. L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F., *CA: Cancer J. Clin.* **2021**, 71 (3), 209-249.
- 3 Ferlay, J.; Ervik, M.; Lam, F.; Colombet, M.; Mery, L.; Piñeros, M.; Znaor, A.; Soerjomataram, I.; Bray, F. "Global Cancer Observatory: Cancer Today", gefunden unter <https://gco.iarc.fr/today> am 14.10.2023.
- 4 Cesarman, E.; Damania, B.; Krown, S. E.; Martin, J.; Bower, M.; Whitby, D., *Nat. Rev. Dis. Primers* **2019**, 5 (1), 9.
- 5 Ferlay, J.; Colombet, M.; Soerjomataram, I.; Parkin, D. M.; Piñeros, M.; Znaor, A.; Bray, F., *Int. J. Cancer* **2021**, 149 (4), 778-789.
- 6 Evans, E.; Staffurth, J., *Surgery (Oxf)* **2018**, 36 (3), 111-116.
- 7 Franz, G., *Pharm. Unserer Zeit* **1990**, 19 (6), 257-262.
- 8 Anand, U.; Dey, A.; Chandel, A. K. S.; Sanyal, R.; Mishra, A.; Pandey, D. K.; De Falco, V.; Upadhyay, A.; Kandimalla, R.; Chaudhary, A.; Dhanjal, J. K.; Dewanjee, S.; Vallamkondu, J.; Pérez de la Lastra, J. M., *Genes Dis.* **2023**, 10 (4), 1367-1401.
- 9 Fenn, J. E.; Udelsman, R., *J. Am. Coll. Surg.* **2011**, 212 (3), 413-417.
- 10 DeVita, V. T., Jr.; Chu, E., *Cancer Res.* **2008**, 68 (21), 8643-8653.
- 11 Nygren, P., *Acta Oncol.* **2001**, 40 (2-3), 166-174.
- 12 Kannaiyan, R.; Mahadevan, D., *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2018**, 18 (12), 1249-1270.
- 13 Manning, G.; Whyte, D. B.; Martinez, R.; Hunter, T.; Sudarsanam, S., *Science* **2002**, 298 (5600), 1912-1934.
- 14 Gross, S.; Rahal, R.; Stransky, N.; Lengauer, C.; Hoeflich, K. P., *J. Clin. Investig.* **2015**, 125 (5), 1780-1789.
- 15 Hanahan, D.; Weinberg, Robert A., *Cell* **2011**, 144 (5), 646-674.
- 16 Kantarjian, H.; Sawyers, C.; Hochhaus, A.; Guilhot, F.; Schiffer, C.; Gambacorti-Passerini, C.; Niederwieser, D.; Resta, D.; Capdeville, R.; Zoellner, U.; Talpaz, M.; Druker, B., *N. Engl. J. Med.* **2002**, 346 (9), 645-652.
- 17 Goldman, J. M.; Melo, J. V., *N. Engl. J. Med.* **2001**, 344 (14), 1084-1086.
- 18 Gambacorti-Passerini, C.; Antolini, L.; Mahon, F.-X.; Guilhot, F.; Deininger, M.; Fava, C.; Nagler, A.; Della Casa, C. M.; Morra, E.; Abruzzese, E.; D'Emilio, A.; Stagno, F.; le Coutre, P.; Hurtado-Monroy, R.; Santini, V.; Martino, B.; Pane, F.; Piccin, A.; Giraldo, P.; Assouline, S.; Durosini, M. A.; Leeksma, O.; Pogliani, E. M.; Puttini, M.; Jang, E.; Reiffers, J.; Valsecchi, M. G.; Kim, D.-W., *J. Natl. Cancer Inst.* **2011**, 103 (7), 553-561.
- 19 Schuld, P.; Grzesiek, S.; Schlotte, J.; Habazettl, J. M.; Jahnke, W.; Barys, L.; Cowan-Jacob, S. W.;

- 1 Loo, A.; Wiget, A.; Manley, P. W., *Blood* **2020**, 136 (Supplement 1), 34-35.
- 20 Wedekind, S., *Info Hämatologie + Onkologie* **2021**, 24 (1), 59-59.
- 21 Keating, G. M.; Santoro, A., *Drugs* **2009**, 69 (2), 223-240.
- 22 Chapman, P. B.; Hauschild, A.; Robert, C.; Haanen, J. B.; Ascierto, P.; Larkin, J.; Dummer, R.; Garbe, C.; Testori, A.; Maio, M.; Hogg, D.; Lorigan, P.; Lebbe, C.; Jouary, T.; Schadendorf, D.; Ribas, A.; O'Day, S. J.; Sosman, J. A.; Kirkwood, J. M.; Eggermont, A. M. M.; Dreno, B.; Nolop, K.; Li, J.; Nelson, B.; Hou, J.; Lee, R. J.; Flaherty, K. T.; McArthur, G. A., *N. Engl. J. Med.* **2011**, 364 (26), 2507-2516.
- 23 Teng, M.; Luskin, M. R.; Cowan-Jacob, S. W.; Ding, Q.; Fabbro, D.; Gray, N. S., *J. Med. Chem.* **2022**, 65 (11), 7581-7594.
- 24 Karnoub, A. E.; Weinberg, R. A., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, 9 (7), 517-531.
- 25 Prior, I. A.; Hood, F. E.; Hartley, J. L., *Cancer Res.* **2020**, 80 (14), 2969-2974.
- 26 Liu, P.; Wang, Y.; Li, X., *Acta Pharm. Sin. B* **2019**, 9 (5), 871-879.
- 27 Cox, A. D.; Fesik, S. W.; Kimmelman, A. C.; Luo, J.; Der, C. J., *Nat. Rev. Drug Discovery* **2014**, 13 (11), 828-851.
- 28 Pylayeva-Gupta, Y.; Grabocka, E.; Bar-Sagi, D., *Nat. Rev. Cancer* **2011**, 11 (11), 761-774.
- 29 Singh, H.; Longo, D. L.; Chabner, B. A., *J. Clin. Oncol.* **2015**, 33 (31), 3650-3659.
- 30 Wennerberg, K.; Rossman, K. L.; Der, C. J., *J. Cell Sci.* **2005**, 118 (5), 843-846.
- 31 Xiao, H.; Wang, G.; Zhao, M.; Shuai, W.; Ouyang, L.; Sun, Q., *Eur. J. Med. Chem.* **2023**, 248, 115104.
- 32 Spencer-Smith, R.; O'Bryan, J. P., *Semin. Cancer Biol.* **2019**, 54, 138-148.
- 33 Lu, S.; Jang, H.; Muratcioglu, S.; Gursoy, A.; Keskin, O.; Nussinov, R.; Zhang, J., *Chem. Rev.* **2016**, 116 (11), 6607-6665.
- 34 Rowinsky, E. K.; Windle, J. J.; Von Hoff, D. D., *J. Clin. Oncol.* **1999**, 17 (11), 3631-3652.
- 35 Ostrem, J. M. L.; Shokat, K. M., *Nat. Rev. Drug Discovery* **2016**, 15 (11), 771-785.
- 36 Lenzen, C.; Cool, R. H.; Prinz, H.; Kuhlmann, J.; Wittinghofer, A., *Biochem.* **1998**, 37 (20), 7420-7430.
- 37 Simanshu, D. K.; Nissley, D. V.; McCormick, F., *Cell* **2017**, 170 (1), 17-33.
- 38 Hunter, J. C.; Manandhar, A.; Carrasco, M. A.; Gurbani, D.; Gondi, S.; Westover, K. D., *Mol. Cancer Res.* **2015**, 13 (9), 1325-1335.
- 39 Ahmadian, M. R.; Stege, P.; Scheffzek, K.; Wittinghofer, A., *Nat. Struct. Biol.* **1997**, 4 (9), 686-689.
- 40 Resat, H.; Straatsma, T. P.; Dixon, D. A.; Miller, J. H., *PNAS* **2001**, 98 (11), 6033-6038.
- 41 Rajalingam, K.; Schreck, R.; Rapp, U. R.; Albert, S., *Biochim.*

- Biophys. Acta, Mol. Cell. Res.* **2007**, 1773 (8), 1177-1195.
- 42 Murugan, A. K.; Munirajan, A. K.; Tsuchida, N., *Oral Oncol.* **2012**, 48 (5), 383-392.
- 43 Tate, J. G.; Bamford, S.; Jubb, H. C.; Sondka, Z.; Beare, D. M.; Bindal, N.; Boutselakis, H.; Cole, C. G.; Creatore, C.; Dawson, E.; Fish, P.; Harsha, B.; Hathaway, C.; Jupe, S. C.; Kok, C. Y.; Noble, K.; Ponting, L.; Ramshaw, C. C.; Rye, C. E.; Speedy, H. E.; Stefancsik, R.; Thompson, S. L.; Wang, S.; Ward, S.; Campbell, P. J.; Forbes, S. A., *Nucleic Acids Res.* **2019**, 47 (D1), D941-D947.
- 44 Murugan, A. K.; Grieco, M.; Tsuchida, N., *Semin. Cancer Biol.* **2019**, 59, 23-35.
- 45 Taveras, A. G.; Remiszewski, S. W.; Doll, R. J.; Cesarz, D.; Huang, E. C.; Kirschmeier, P.; Pramanik, B. N.; Snow, M. E.; Wang, Y. S.; del Rosario, J. D.; Vibulbhan, B.; Bauer, B. B.; Brown, J. E.; Carr, D.; Catino, J.; Evans, C. A.; Girijavallabhan, V.; Heimark, L.; James, L.; Liberles, S.; Nash, C.; Perkins, L.; Senior, M. M.; Tsarbopoulos, A.; Ganguly, A. K.; Aust, R.; Brown, E.; Delisle, D.; Fuhrman, S.; Hendrickson, T.; Kissinger, C.; Love, R.; Sisson, W.; Villafranca, E.; Webber, S. E., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, 5 (1), 125-133.
- 46 Ganguly, A. K.; Pramanik, B. N.; Huang, E. C.; Liberles, S.; Heimark, L.; Liu, Y. H.; Tsarbopoulos, A.; Doll, R. J.; Taveras, A. G.; Remiszewski, S.; Snow, M. E.; Wang, Y. S.; Vibulbhan, B.; Cesarz, D.; Brown, J. E.; del Rosario, J.; James, L.; Kirschmeier, P.; Girijavallabhan, V., *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, 5 (5), 817-820.
- 47 Ganguly, A. K.; Wang, Y.-S.; Pramanik, B. N.; Doll, R. J.; Snow, M. E.; Taveras, A. G.; Remiszewski, S.; Cesarz, D.; del Rosario, J.; Vibulbhan, B.; Brown, J. E.; Kirschmeier, P.; Huang, E. C.; Heimark, L.; Tsarbopoulos, A.; Girijavallabhan, V. M.; Aust, R. M.; Brown, E. L.; DeLisle, D. M.; Fuhrman, S. A.; Hendrickson, T. F.; Kissinger, C. R.; Love, R. A.; Sisson, W. A.; Villafranca, J. E.; Webber, S. E., *Biochem.* **1998**, 37 (45), 15631-15637.
- 48 Peri, F.; Aioldi, C.; Colombo, S.; Martegani, E.; van Neuren, A. S.; Stein, M.; Marinzi, C.; Nicotra, F., *ChemBioChem* **2005**, 6 (10), 1839-1848.
- 49 Colombo, S.; Peri, F.; Tisi, R.; Nicotra, F.; Martegani, E., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2004**, 1030 (1), 52-61.
- 50 Patgiri, A.; Yadav, K. K.; Arora, P. S.; Bar-Sagi, D., *Nat. Chem. Biol.* **2011**, 7 (9), 585-587.
- 51 Maurer, T.; Garrenton, L. S.; Oh, A.; Pitts, K.; Anderson, D. J.; Skelton, N. J.; Fauber, B. P.; Pan, B.; Malek, S.; Stokoe, D.; Ludlam, M. J. C.; Bowman, K. K.; Wu, J.; Giannetti, A. M.; Starovasnik, M. A.; Mellman, I.; Jackson, P. K.; Rudolph, J.; Wang, W.; Fang, G., *PNAS* **2012**, 109 (14), 5299-5304.
- 52 Sun, Q.; Burke, J. P.; Phan, J.; Burns, M. C.; Olejniczak, E. T.; Waterson, A. G.; Lee, T.; Rossanese, O. W.; Fesik, S. W., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51 (25), 6140-6143.
- 53 Cruz-Migoni, A.; Canning, P.; Quevedo, C. E.; Bataille, C. J. R.;

- 54 Bery, N.; Miller, A.; Russell, A. J.; Phillips, S. E. V.; Carr, S. B.; Rabbitts, T. H., *PNAS* **2019**, *116* (7), 2545-2550.
- 55 Kessler, D.; Gmachl, M.; Mantoulidis, A.; Martin, L. J.; Zoephel, A.; Mayer, M.; Gollner, A.; Covini, D.; Fischer, S.; Gerstberger, T.; Gmaschitz, T.; Goodwin, C.; Greb, P.; Häring, D.; Hela, W.; Hoffmann, J.; Karolyi-Oezguer, J.; Knesl, P.; Kornigg, S.; Koegl, M.; Kousek, R.; Lamarre, L.; Moser, F.; Munico-Martinez, S.; Peinsipp, C.; Phan, J.; Rinnenthal, J.; Sai, J.; Salamon, C.; Scherbantin, Y.; Schipany, K.; Schnitzer, R.; Schrenk, A.; Sharps, B.; Siszler, G.; Sun, Q.; Waterson, A.; Wolkerstorfer, B.; Zeeb, M.; Pearson, M.; Fesik, S. W.; McConnell, D. B., *PNAS* **2019**, *116* (32), 15823-15829.
- 56 Ostrem, J. M. L.; Peters, U.; Sos, M. L.; Wells, J. A.; Shokat, K. M., *Nature* **2013**, *503* (7477), 548-551.
- 57 Patricelli, M. P.; Janes, M. R.; Li, L.-S.; Hansen, R.; Peters, U.; Kessler, L. V.; Chen, Y.; Kucharski, J. M.; Feng, J.; Ely, T.; Chen, J. H.; Firdaus, S. J.; Babbar, A.; Ren, P.; Liu, Y., *Cancer Discov.* **2016**, *6* (3), 316-329.
- 58 Janes, M. R.; Zhang, J.; Li, L.-S.; Hansen, R.; Peters, U.; Guo, X.; Chen, Y.; Babbar, A.; Firdaus, S. J.; Darjania, L.; Feng, J.; Chen, J. H.; Li, S.; Li, S.; Long, Y. O.; Thach, C.; Liu, Y.; Zarieh, A.; Ely, T.; Kucharski, J. M.; Kessler, L. V.; Wu, T.; Yu, K.; Wang, Y.; Yao, Y.; Deng, X.; Zarrinkar, P. P.; Brehmer, D.; Dhanak, D.; Lorenzi, M. V.; Hu-Lowe, D.; Patricelli, M. P.; Ren, P.; Liu, Y., *Cell* **2018**, *172* (3), 578-589.
- 59 Lanman, B. A.; Allen, J. R.; Allen, J. G.; Amegadzie, A. K.; Ashton, K. S.; Booker, S. K.; Chen, J. J.; Chen, N.; Frohn, M. J.; Goodman, G.; Kopecky, D. J.; Liu, L.; Lopez, P.; Low, J. D.; Ma, V.; Minatti, A. E.; Nguyen, T. T.; Nishimura, N.; Pickrell, A. J.; Reed, A. B.; Shin, Y.; Siegmund, A. C.; Tamayo, N. A.; Tegley, C. M.; Walton, M. C.; Wang, H.-L.; Wurz, R. P.; Xue, M.; Yang, K. C.; Achanta, P.; Bartberger, M. D.; Canon, J.; Hollis, L. S.; McCarter, J. D.; Mohr, C.; Rex, K.; Saiki, A. Y.; San Miguel, T.; Volak, L. P.; Wang, K. H.; Whittington, D. A.; Zech, S. G.; Lipford, J. R.; Cee, V. J., *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (1), 52-65.
- 60 Fell, J. B.; Fischer, J. P.; Baer, B. R.; Ballard, J.; Blake, J. F.; Bouhana, K.; Brandhuber, B. J.; Briere, D. M.; Burgess, L. E.; Burkard, M. R.; Chiang, H.; Chicarelli, M. J.; Davidson, K.; Gaudino, J. J.; Hallin, J.; Hanson, L.; Hee, K.; Hicken, E. J.; Hinklin, R. J.; Marx, M. A.; Mejia, M. J.; Olson, P.; Savechenkov, P.; Sudhakar, N.; Tang, T. P.; Vigers, G. P.; Zecca, H.; Christensen, J. G., *ACS Med. Chem. Lett.* **2018**, *9* (12), 1230-1234.
- 61 Fell, J. B.; Fischer, J. P.; Baer, B. R.; Blake, J. F.; Bouhana, K.; Briere, D. M.; Brown, K. D.; Burgess, L. E.; Burns, A. C.; Burkard, M. R.; Chiang, H.; Chicarelli, M. J.; Cook, A. W.; Gaudino, J. J.; Hallin, J.; Hanson, L.; Hartley, D. P.; Hicken, E. J.; Hingorani, G. P.; Hinklin, R. J.; Mejia, M. J.; Olson, P.; Otten, J. N.; Rhodes, S. P.; Rodriguez, M. E.; Savechenkov, P.; Smith, D. J.; Sudhakar, N.; Sullivan, F. X.; Tang, T. P.; Vigers, G. P.; Wollenberg, L.; Christensen, J. G.;

- 60 Marx, M. A., *J. Med. Chem.* **2020**, 63 (13), 6679-6693.
- 61 Mirati Therapeutics "Pipeline", gefunden unter <https://www.mirati.com/science/pipeline/> am 09.01.2024.
- 62 Wang, X.; Allen, S.; Blake, J. F.; Bowcut, V.; Briere, D. M.; Calinisan, A.; Dahlke, J. R.; Fell, J. B.; Fischer, J. P.; Gunn, R. J.; Hallin, J.; Laguer, J.; Lawson, J. D.; Medwid, J.; Newhouse, B.; Nguyen, P.; O'Leary, J. M.; Olson, P.; Pajk, S.; Rahbaek, L.; Rodriguez, M.; Smith, C. R.; Tang, T. P.; Thomas, N. C.; Vanderpool, D.; Vigers, G. P.; Christensen, J. G.; Marx, M. A., *J. Med. Chem.* **2022**, 65 (4), 3123-3133.
- 63 Marx, M. A.; Christensen, J. G.; Smith, C. R.; Fischer, J. P.; Burns, A. C. *KRAS G12C Inhibitors*, **2020**, WO2020146613A1.
- 64 Sakamoto, K. M.; Kim, K. B.; Kumagai, A.; Mercurio, F.; Crews, C. M.; Deshaies, R. J., *PNAS* **2001**, 98 (15), 8554-8559.
- 65 Li, K.; Crews, C. M., *Chem. Soc. Rev.* **2022**, 51 (12), 5214-5236.
- 66 Sun, X.; Gao, H.; Yang, Y.; He, M.; Wu, Y.; Song, Y.; Tong, Y.; Rao, Y., *Signal Transduction Targeted Ther.* **2019**, 4 (1), 64.
- 67 Qi, S.-M.; Dong, J.; Xu, Z.-Y.; Cheng, X.-D.; Zhang, W.-D.; Qin, J.-J., *Front. Pharmacol.* **2021**, 12.
- 68 Jaeger, M. G.; Winter, G. E., *Cell Chem. Biol.* **2020**, 27 (1), 14-16.
- 69 Nieto-Jiménez, C.; Morafraile, E. C.; Alonso-Moreno, C.; Ocaña, A., *Mol. Cancer* **2022**, 21 (1), 67.
- 70 Khan, S.; He, Y.; Zhang, X.; Yuan, Y.; Pu, S.; Kong, Q.; Zheng, G.; Zhou, D., *Oncogene* **2020**, 39 (26), 4909-4924.
- 71 Li, X.; Pu, W.; Zheng, Q.; Ai, M.; Chen, S.; Peng, Y., *Mol. Cancer* **2022**, 21 (1), 99.
- 72 Ottis, P.; Crews, C. M., *ACS Chem. Biol.* **2017**, 12 (4), 892-898.
- 73 Burslem, G. M.; Crews, C. M., *Cell* **2020**, 181 (1), 102-114.
- 74 Paiva, S.-L.; Crews, C. M., *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2019**, 50, 111-119.
- 75 Livneh, I.; Cohen-Kaplan, V.; Cohen-Rosenzweig, C.; Avni, N.; Ciechanover, A., *Cell Res.* **2016**, 26 (8), 869-885.
- 76 Bondeson, D. P.; Mares, A.; Smith, I. E. D.; Ko, E.; Campos, S.; Miah, A. H.; Mulholland, K. E.; Routly, N.; Buckley, D. L.; Gustafson, J. L.; Zinn, N.; Grandi, P.; Shimamura, S.; Bergamini, G.; Faelth-Savitski, M.; Bantscheff, M.; Cox, C.; Gordon, D. A.; Willard, R. R.; Flanagan, J. J.; Casillas, L. N.; Votta, B. J.; den Besten, W.; Famm, K.; Kruidenier, L.; Carter, P. S.; Harling, J. D.; Churcher, I.; Crews, C. M., *Nat. Chem. Biol.* **2015**, 11 (8), 611-617.
- 77 Lai, A. C.; Toure, M.; Hellerschmied, D.; Salami, J.; Jaime-Figueroa, S.; Ko, E.; Hines, J.; Crews, C. M., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55 (2), 807-810.
- 78 Powell, C. E.; Gao, Y.; Tan, L.; Donovan, K. A.; Nowak, R. P.; Loehr, A.; Bahcall, M.; Fischer, E. S.; Jänne, P. A.; George, R. E.; Gray, N. S., *J. Med. Chem.* **2018**, 61 (9), 4249-4255.

- 79 Demizu, Y.; Shibata, N.; Hattori, T.; Ohoka, N.; Motoi, H.; Misawa, T.; Shoda, T.; Naito, M.; Kurihara, M., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, 26 (20), 4865-4869.
- 80 Hines, J.; Lartigue, S.; Dong, H.; Qian, Y.; Crews, C. M., *Cancer Res.* **2019**, 79 (1), 251-262.
- 81 Sakamoto, K. M.; Kim, K. B.; Verma, R.; Ransick, A.; Stein, B.; Crews, C. M.; Deshaies, R. J., *Mol. Cell. Proteomics* **2003**, 2 (12), 1350-1358.
- 82 Schneekloth, J. S., Jr.; Fonseca, F. N.; Koldobskiy, M.; Mandal, A.; Deshaies, R.; Sakamoto, K.; Crews, C. M., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126 (12), 3748-3754.
- 83 Ito, T.; Ando, H.; Suzuki, T.; Ogura, T.; Hotta, K.; Imamura, Y.; Yamaguchi, Y.; Handa, H., *Science* **2010**, 327 (5971), 1345-1350.
- 84 Buckley, D. L.; Gustafson, J. L.; Van Molle, I.; Roth, A. G.; Tae, H. S.; Gareiss, P. C.; Jorgensen, W. L.; Ciulli, A.; Crews, C. M., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51 (46), 11463-11467.
- 85 Burslem, G. M.; Smith, B. E.; Lai, A. C.; Jaime-Figueroa, S.; McQuaid, D. C.; Bondeson, D. P.; Toure, M.; Dong, H.; Qian, Y.; Wang, J.; Crew, A. P.; Hines, J.; Crews, C. M., *Cell Chem. Biol.* **2018**, 25 (1), 67-77.e3.
- 86 Goracci, L.; Desantis, J.; Valeri, A.; Castellani, B.; Eleuteri, M.; Cruciani, G., *J. Med. Chem.* **2020**, 63 (20), 11615-11638.
- 87 Zeng, M.; Xiong, Y.; Safaee, N.; Nowak, R. P.; Donovan, K. A.; Yuan, C. J.; Nabet, B.; Gero, T. W.; Feru, F.; Li, L.; Gondi, S.; Ombelets, L. J.; Quan, C.; Jänne, P. A.; Kostic, M.; Scott, D. A.; Westover, K. D.; Fischer, E. S.; Gray, N. S., *Cell Chem. Biol.* **2020**, 27 (1), 19-31.e6.
- 88 Bond, M. J.; Chu, L.; Nalawansha, D. A.; Li, K.; Crews, C. M., *ACS Cent. Sci.* **2020**, 6 (8), 1367-1375.
- 89 Zhou, C.; Fan, Z.; Gu, Y.; Ge, Z.; Tao, Z.; Cui, R.; Li, Y.; Zhou, G.; Huo, R.; Gao, M.; Wang, D.; He, W.; Zheng, M.; Zhang, S.; Xu, T., *J. Med. Chem.* **2024**.
- 90 Cox, A. D.; Der, C. J.; Philips, M. R., *Clin Cancer Res.* **2015**, 21 (8), 1819-1827.
- 91 Cox, A. D.; Der, C. J., *Small GTPases* **2010**, 1 (1), 2-27.
- 92 Berndt, N.; Hamilton, A. D.; Sebti, S. M., *Nat. Rev. Cancer* **2011**, 11 (11), 775-791.
- 93 Tamanoi, F.; Lu, J., Chapter Eight - Recent Progress in Developing Small Molecule Inhibitors Designed to Interfere with Ras Membrane Association: Toward Inhibiting K-Ras and N-Ras Functions. In *The Enzymes*, Tamanoi, F.; Der, C. J., Eds. Academic Press: 2013; Vol. 34, pp 181-200.
- 94 Rowell, C. A.; Kowalczyk, J. J.; Lewis, M. D.; Garcia, A. M., *J. Biol. Chem.* **1997**, 272 (22), 14093-14097.
- 95 deSolms, S. J.; Ciccarone, T. M.; MacTough, S. C.; Shaw, A. W.; Buser, C. A.; Ellis-Hutchings, M.; Fernandes, C.; Hamilton, K. A.; Huber, H. E.; Kohl, N. E.; Lobell, R. B.; Robinson, R. G.; Tsou, N. N.; Walsh, E. S.; Graham, S. L.; Beese, L. S.; Taylor, J. S., *J. Med. Chem.* **2003**, 46 (14), 2973-2984.

- 96 Lobell, R. B.; Liu, D.; Buser, C. A.; Davide, J. P.; DePuy, E.; Hamilton, K.; Koblan, K. S.; Lee, Y.; Mosser, S.; Motzel, S. L.; Abbruzzese, J. L.; Fuchs, C. S.; Rowinsky, E. K.; Rubin, E. H.; Sharma, S.; Deutsch, P. J.; Mazina, K. E.; Morrison, B. W.; Wildonger, L.; Yao, S.-L.; Kohl, N. E., *Mol. Cancer Ther.* **2002**, *1* (9), 747-758.
- 97 Lobell, R.; Omer, C.; Abrams, M.; Bhimnathwala, H.; Brucker, M.; Buser, C.; Davide, J.; deSolms, S.; Dinsmore, C.; Ellis-Hutchings, M.; Kral, A.; Liu, D.; Lumma, W.; Machotka, S.; Rands, E.; Williams, T.; Graham, S.; Hartman, G.; Oliff, A.; Kohl, N., *Cancer Res.* **2002**, *61*, 8758-68.
- 98 Robert, S.; David, C.; Gilbert, C.; Trevor C., S.; Elzbieta, I., *Anticancer Res.* **2006**, *26* (6B), 4185.
- 99 Manandhar, S. P.; Hildebrandt, E. R.; Schmidt, W. K., *J. Biomol. Screen.* **2007**, *12* (7), 983-993.
- 100 Winter-Vann, A. M.; Baron, R. A.; Wong, W.; dela Cruz, J.; York, J. D.; Gooden, D. M.; Bergo, M. O.; Young, S. G.; Toone, E. J.; Casey, P. J., *PNAS* **2005**, *102* (12), 4336-4341.
- 101 Lau, H. Y.; Ramanujulu, P. M.; Guo, D.; Yang, T.; Wirawan, M.; Casey, P. J.; Go, M.-L.; Wang, M., *Cancer Biol. Ther.* **2014**, *15* (9), 1280-1291.
- 102 Judd, W. R.; Slattum, P. M.; Hoang, K. C.; Bhoite, L.; Valppu, L.; Alberts, G.; Brown, B.; Roth, B.; Ostanin, K.; Huang, L.; Wettstein, D.; Richards, B.; Willardsen, J. A., *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (14), 5031-5047.
- 103 Dong, D. L.; Liu, R.; Sherlock, R.; Wigler, M. H.; Nestler, H. P., *Chem. Biol.* **1999**, *6* (3), 133-141.
- 104 Schöpel, M.; Jockers, K. F. G.; Düppe, P. M.; Autzen, J.; Potheraveedu, V. N.; Ince, S.; Yip, K. T.; Heumann, R.; Herrmann, C.; Scherkenbeck, J.; Stoll, R., *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (23), 9664-9672.
- 105 Schöpel, M.; Herrmann, C.; Scherkenbeck, J.; Stoll, R., *FEBS Lett.* **2016**, *590* (3), 369-375.
- 106 Schöpel, M.; Shkura, O.; Seidel, J.; Kock, K.; Zhong, X.; Löffek, S.; Helfrich, I.; Bachmann, H. S.; Scherkenbeck, J.; Herrmann, C.; Stoll, R., *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19* (4), 1133.
- 107 Morgan, L. R.; Thangaraj, K.; LeBlanc, B.; Rodgers, A.; Wolford, L. T.; Hooper, C. L.; Fan, D.; Jursic, B. S., *J. Med. Chem.* **2003**, *46* (21), 4552-4563.
- 108 Jeuken, S.; Shkura, O.; Röger, M.; Brickau, V.; Choidas, A.; Degenhart, C.; Gülden, D.; Klebl, B.; Koch, U.; Stoll, R.; Scherkenbeck, J., *ChemMedChem* **2022**, *17* (22), e202200392.
- 109 McCarthy, M. J.; Pagba, C. V.; Prakash, P.; Naji, A. K.; van der Hoeven, D.; Liang, H.; Gupta, A. K.; Zhou, Y.; Cho, K.-J.; Hancock, J. F.; Gorfe, A. A., *ACS Omega* **2019**, *4* (2), 2921-2930.
- 110 Welsch, M. E.; Kaplan, A.; Chambers, J. M.; Stokes, M. E.; Bos, P. H.; Zask, A.; Zhang, Y.; Sanchez-Martin, M.; Badgley, M. A.; Huang, C. S.; Tran, T. H.; Akkiraju, H.; Brown, L. M.; Nandakumar, R.; Cremers, S.; Yang, W. S.; Tong, L.; Olive, K.

- P.; Ferrando, A.; Stockwell, B. R., *Cell* **2017**, *168* (5), 878-889.e29.
- 111 Franz, M.; Mörchen, B.; Degenhart, C.; Gülden, D.; Shkura, O.; Wolters, D.; Koch, U.; Klebl, B.; Stoll, R.; Helfrich, I.; Scherkenbeck, J., *ChemMedChem* **2021**, *16* (16), 2504-2514.
- 112 Düppe, P. M.; Tran Thi Phuong, T.; Autzen, J.; Schöpel, M.; Yip, K. T.; Stoll, R.; Scherkenbeck, J., *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9* (8), 1755-1763.
- 113 Schmuck, C., *Chem. Eur. J.* **2000**, *6* (4), 709-718.
- 114 Schmuck, C.; Geiger, L., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (29), 8898-8899.
- 115 Schmuck, C.; Rupprecht, D.; Junkers, M.; Schrader, T., *Chem. Eur. J.* **2007**, *13* (24), 6864-6873.
- 116 Sun, Q.; Phan, J.; Friberg, A. R.; Camper, D. V.; Olejniczak, E. T.; Fesik, S. W., *J. Biomol. NMR* **2014**, *60* (1), 11-14.
- 117 Pouliot, M.; Jeanmart, S., *Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, *59* (2), 497-503.
- 118 Grosskopf, S.; Eckert, C.; Arkona, C.; Radetzki, S.; Böhm, K.; Heinemann, U.; Wolber, G.; von Kries, J.-P.; Birchmeier, W.; Rademann, J., *ChemMedChem* **2015**, *10* (5), 815-826.
- 119 Halgren, T. A., *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49* (2), 377-389.
- 120 Friesner, R. A.; Banks, J. L.; Murphy, R. B.; Halgren, T. A.; Klicic, J. J.; Mainz, D. T.; Repasky, M. P.; Knoll, E. H.; Shelley, M.; Perry, J. K.; Shaw, D. E.; Francis, P.; Shenkin, P. S., *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (7), 1739-1749.
- 121 Friesner, R. A.; Murphy, R. B.; Repasky, M. P.; Frye, L. L.; Greenwood, J. R.; Halgren, T. A.; Sanschagrin, P. C.; Mainz, D. T., *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (21), 6177-6196.
- 122 Jeuken, S. Fragmentevolution von Bisphenol-Liganden für die Suche nach Inhibitoren von K-RAS4B. Bergische Universität Wuppertal, Universitätsbibliothek Wuppertal, 2021.
- 123 Gandeepan, P.; Hung, C.-H.; Cheng, C.-H., *Chem. Commun.* **2012**, *48* (75), 9379-9381.
- 124 Li, H.; Zhu, R.-Y.; Shi, W.-J.; He, K.-H.; Shi, Z.-J., *Org. Lett.* **2012**, *14* (18), 4850-4853.
- 125 Ames, D. E.; Opalko, A., *Tetrahedron* **1984**, *40* (10), 1919-1925.
- 126 Campo, M. A.; Larock, R. C., *Org. Lett.* **2000**, *2* (23), 3675-3677.
- 127 Wang, C.; Piel, I.; Glorius, F., *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (12), 4194-4195.
- 128 Aggarwal, R.; Kumar, V.; Kumar, R.; Singh, S. P., *Beilstein J. Org. Chem.* **2011**, *7*, 179-197.
- 129 Bagley, M. C.; Davis, T.; Dix, M. C.; Widdowson, C. S.; Kipling, D., *Org. Biobol. Chem.* **2006**, *4* (22), 4158-4164.
- 130 Butler, D. E.; Alexander, S. M., *J. Heterocycl. Chem.* **1982**, *19* (5), 1173-1177.
- 131 Lai, Q.; Wang, Y.; Wang, R.; Lai, W.; Tang, L.; Tao, Y.; Liu, Y.; Zhang, R.; Huang, L.; Xiang, H.; Zeng, S.; Gou, L.; Chen, H.; Yao,

- Y.; Yang, J., *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *156*, 162-179.
- 132 Taber, D. F.; DeMatteo, P. W.; Hassan, R. A.; Wood, J. L.; Enquist Jr., J. A., *Org. Synth.* **2013**, *90*, 350.
- 133 Cheshev, P.; Marra, A.; Dondoni, A., *Carbohydr. Res.* **2006**, *341* (16), 2714-2716.
- 134 Lee, K.; Lee, R. S.; Lee, J. S., *Synth. Commun.* **2020**, *50* (8), 1141-1146.
- 135 Wang, C.; Zhang, J.; Tang, J.; Zou, G., *Adv. Synth. Catal.* **2017**, *359* (14), 2514-2519.
- 136 Grese, T. A.; Pennington, L. D.; Sluka, J. P.; Adrian, M. D.; Cole, H. W.; Fuson, T. R.; Magee, D. E.; Phillips, D. L.; Rowley, E. R.; Shetler, P. K.; Short, L. L.; Venugopalan, M.; Yang, N. N.; Sato, M.; Glasebrook, A. L.; Bryant, H. U., *J. Med. Chem.* **1998**, *41* (8), 1272-1283.
- 137 Node, M.; Nishide, K.; Fuji, K.; Fujita, E., *J. Org. Chem.* **1980**, *45* (22), 4275-4277.
- 138 Magano, J.; Chen, M. H.; Clark, J. D.; Nussbaumer, T., *J. Org. Chem.* **2006**, *71* (18), 7103-7105.
- 139 Gao, C.; He, H.; Qiu, W.; Zheng, Y.; Chen, Y.; Hu, S.; Zhao, X., *Environmental Science & Technology* **2021**, *55* (3), 1953-1963.
- 140 Yang, Z.-Y.; Dong, J.; Yang, Z.-J.; Lu, A.-P.; Hou, T.-J.; Cao, D.-S., *Journal of Chemical Information and Modeling* **2020**, *60* (4), 2031-2043.
- 141 Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J., *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, *46* (1), 3-26.
- 142 Lipinski, C. A., *Drug Discovery Today: Technol.* **2004**, *1* (4), 337-341.
- 143 Enamine "Hit Locator Library - 460", gefunden unter <https://enamine.net/compound-libraries/diversity-libraries/hit-locator-library-460> am 16.12.2023.
- 144 Jorgensen, W. L.; Duffy, E. M., *Adv. Drug Delivery Rev.* **2002**, *54* (3), 355-366.
- 145 InfiniSee "InfiniSee Version 4.2.1", gefunden unter <https://www.biosolveit.de/infinisee> am 17.09.2023.
- 146 Yufang, X.; Zhenjiang, Z.; Weiping, Z.; Zheng, X.; Haojun, Z.; Honglin, L.; Xianwen, C.; Baoju, L.; Yanxia, S.; Xuhong, Q. *N-aryl-substituted pyrrolidone derivative and application thereof*, **2014**.
- 147 Huisgen, R., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1963**, *2* (10), 565-598.
- 148 Hein, J. E.; Fokin, V. V., *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (4), 1302-1315.
- 149 Worrell, B. T.; Malik, J. A.; Fokin, V. V., *Science* **2013**, *340* (6131), 457-460.
- 150 Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41* (14), 2596-2599.
- 151 Langry, K. C., *Org. Prep. Proced. Int.* **1994**, *26* (4), 429-438.
- 152 Patching, S. G., *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2014**, *1838* (1, Part A), 43-55.

- 153 Altintas, Z.; Uludag, Y.; Gurbuz, Y.; Tothill, I., *Anal. Chim. Acta* **2012**, 712, 138-144.
- 154 Hong, X.; Tan, Q.; Liu, B.; Xu, B., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, 56 (14), 3961-3965.
- 155 Zhang, F.; Wu, Z.; Chen, P.; Zhang, J.; Wang, T.; Zhou, J.; Zhang, H., *Bioorg. Med. Chem.* **2020**, 28 (1), 115228.
- 156 Mondal, S.; Hsiao, K.; Goueli, S. A., *ASSAY DRUG DEV TECHN* **2015**, 13 (8), 444-455.
- 157 Hannah, R.; Beck, M.; Moravec, R.; Riss, T., *Promega Cell Notes* **2001**, 2.
- 158 Degorce, F., *Expert Opin. Drug Discovery* **2006**, 1 (7), 753-764.
- 159 Nørskov-Lauritsen, L.; Thomsen, A. R.; Bräuner-Osborne, H., *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, 15 (2), 2554-2572.
- 160 Smith, B. P.; Rigby, M.; Ma, R.; Maciag, A. E., High-Throughput Cell-Based Screening of Small Molecule KRAS Signaling Inhibitors Using a Homogeneous Time-Resolved Fluorescence (HTRF) Assay. In *KRAS: Methods and Protocols*, Stephen, A. G.; Esposito, D., Eds. Springer US: New York, NY, 2024; pp 271-285.
- 161 Guo, X., *J. Biophotonics* **2012**, 5 (7), 483-501.
- 162 Wienken, C. J.; Baaske, P.; Rothbauer, U.; Braun, D.; Duhr, S., *Nat. Commun.* **2010**, 1 (1), 100.
- 163 Duhr, S.; Braun, D., *PNAS* **2006**, 103 (52), 19678-19682.