



**BERGISCHE
UNIVERSITÄT
WUPPERTAL**

**Fragmentevolution von Bisphenol-Liganden für
die Suche nach Inhibitoren von *K-RAS4B***

DISSERTATION

Fachgruppe Bioorganische Chemie

Prof. Dr. J. Scherkenbeck

Vorgelegt von

STEPHAN JEUKEN

Wuppertal im April 2021

Die Dissertation kann wie folgt zitiert werden:

urn:nbn:de:hbz:468-20210713-120811-7

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn%3Anbn%3Ade%3A468-20210713-120811-7>]

DOI: 10.25926/d0ee-sa17

[<https://doi.org/10.25926/d0ee-sa17>]

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

Zweitgutachter: 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. J. Scherkenbeck ohne unzulässige fremde Hilfe und unter Beachtung der Grundsätze zur Sicherung der guten wissenschaftlichen Praxis verfasst. Alle direkt oder indirekt aus fremden Quellen übernommenen Gedanken sind entsprechend gekennzeichnet. Diese Arbeit wurde außerdem an keiner anderen Stelle eingereicht.

Hilden, den

Stephan Jeuken

Diese Arbeit widme ich meinem neugeborenen Sohn Elias Jeuken.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Jürgen Scherkenbeck für die Möglichkeit bedanken, meine experimentellen Arbeiten zum Zwecke meiner Promotion in seinem Arbeitskreis durchführen zu können. Auch für die interessante Themenstellung und den regen fachlichen Austausch, sowie für die Korrektur meiner Dissertation möchte ich ihm danken.

Bei Prof. Dr. Fabian Mohr bedanke ich mich für die Übernahme der Zweitkorrektur.

Weiterhin möchte ich den anderen Projektmitgliedern aus dem Kooperationsprojekt „RIST“ (RAS in soliden Tumoren) für konstruktive Zusammenarbeit und die vielen interessanten Konversationen danken. Ohne die zahlreichen biochemischen Daten von der Ruhr-Universität Bochum, der Lead Discovery Center GmbH in Dortmund und dem Universitätsklinikum in Essen wäre ein systematisches Vorgehen bei der Ligandenevolution nicht so schnell möglich gewesen. Welche biochemischen Tests durch welchen Projektpartner durchgeführt wurden, wird in Kapitel 3.3 erwähnt. Der Dank geht an: Prof. Dr. Raphael Stoll (RUB), Oleksandr Shkura (RUB), PD Dr. Iris Helfrich (UKE), Britta Mörchen (UKE), Dr. Uwe Koch (LDC), Anne-Kathrin Klebl (LDC) und Carsten Degenhart (LDC). Den EFRE-Geldgebern (Europäische Fonds für regionale Entwicklung) möchte ich für die Finanzierung dieses Projektes danken.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Kollegen an der Bergischen Universität Wuppertal, durch die die Promotionszeit erst so wurde, wie sie war. Die enge Zusammenarbeit und die konstruktiven, aber auch die außerfachlichen Unterredungen waren immer eine Bereicherung. Ich danke außerdem meinem direkten Labornachbarn Marc Röger für die Bereitstellung einiger synthetisierter Substanzen für die Arbeit am PROTAC-Thema.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie danken! Meinen Eltern danke ich, dass sie mich immer auf dem Weg bis zu diesem Zeitpunkt unterstützt haben. Hervorheben möchte ich zudem ganz besonders meine Frau Hannah, die mich bereits lange Zeit auf diesem Weg begleitet und mich in jeder Situation bestärkt hat. Ohne sie wäre diese Promotion so nicht möglich gewesen!

Zuletzt möchte ich allen anderen Personen danken, die mir in dieser Zeit Mut zugesprochen und mir Verständnis entgegengebracht haben!

Inhaltsverzeichnis

1	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	DIE BEDEUTUNG VON KREBS UND DIE ROLLE DES RAS-ONKOGENS BEI DIESER KRANKHEIT ...	1
1.1.1	<i>Krebs in der Moderne</i>	1
1.1.2	<i>Diagnose und Therapie von Krebs</i>	2
1.1.3	<i>Die Bedeutung von K-RAS als therapeutisches Target für die Krebstherapie</i>	5
1.2	RAS-PROTEINE ALS BINÄRE SCHALTER.....	7
1.2.1	<i>Posttranslationale Prozessierung von RAS-Proteinen</i>	7
1.2.2	<i>RAS-regulierte Signaltransduktion</i>	9
1.3	STRATEGIEN ZUR INHIBIERUNG DER RAS-SIGNALWEGE	12
1.3.1	<i>Inhibition von RAS-Wechselwirkungspartnern, die für die Membran-einbettung verantwortlich sind</i>	13
1.3.2	<i>Inhibition von Upstream-Effektoren von membranverankertem RAS</i>	15
1.3.3	<i>Inhibition von Downstream-Effektoren von RAS-Proteinen</i>	20
2	<u>ALLGEMEINER TEIL</u>	24
2.1	DIE SCHALTFUNKTION VON K-RAS AUF STRUKTURELLER EBENE	24
2.1.1	<i>K-RAS-Struktur</i>	24
2.1.2	<i>Funktion verschiedener RAS-Konformationen</i>	26
2.1.3	<i>Folge von Punktmutationen der RAS-Gene</i>	29
2.2	FORTSCHRITTE BEI DER SUCHE NACH K-RAS-INHIBITOREN	30
2.2.1	<i>Zerstörung von PPIs durch Antikörper, Antikörperfragmente und Antikörpermimetika</i>	33
2.2.2	<i>RAS-Adressierung mit kleineren peptidischen Strukturen</i>	34
2.2.3	<i>Inhibition der Farnesylierung durch C-terminales Capping von RAS</i>	37
2.2.4	<i>Großflächige Wechselwirkungen im Bereich der Switch-Regionen</i>	38
2.2.5	<i>Kovalente RAS-Inhibitoren zur Blockierung der Nukleotid-Bindestelle</i>	39
2.2.6	<i>Adressierung der S-IIP-Bindestelle</i>	41
2.2.7	<i>Niedermolekulare Inhibitoren der SI/II-Bindetasche</i>	47
2.3	VORARBEITEN DER ARBEITSGRUPPE SCHERKENBECK.....	54
2.4	RATIONALES WIRKSTOFFDESIGN.....	56
3	<u>METHODEN FÜR DIE SUCHE NACH K-RAS-INHIBITOREN</u>	58
3.1	METHODEN DES <i>IN SILICO</i> WIRKSTOFFDESIGNS	58
3.1.1	<i>Schrödinger-Software-Paket</i>	58

3.1.2	<i>Knime zur Unterstützung des Docking-Prozesses</i>	62
3.1.3	<i>Haddock</i>	64
3.2	BIOPHYSIKALISCHE HINTERGRÜNDE DER ASSOZIATION VON LIGANDEN	66
3.2.1	<i>Kenngrößen für die Assoziation von Proteinliganden</i>	66
3.2.2	<i>Einflüsse auf die Bindungsenthalpie einer Protein-Ligand-Bindung</i>	67
3.3	BIOCHEMISCHE UND BIOLOGISCHE TESTS DER LIGANDEN	68
3.3.1	<i>¹H-¹⁵N-HSQC-Experimente</i>	68
3.3.2	<i>MST-Experimente</i>	70
3.3.3	<i>Biochemischer RAS-SOS-Austauschassay</i>	71
3.3.4	<i>Zellassays</i>	72
4	ZIELSETZUNG	74
5	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	75
5.1	DERIVATISIERUNG DES SCHWEFELVERBRÜCKTEN BISPHENOL-DERIVATS BPS	75
5.1.1	<i>Synthese des Sulfoximins 109</i>	78
5.1.2	<i>Synthese der Benchmark-Verbindung 91</i>	80
5.1.3	<i>Betrachtung der berechneten Bindungsmodi der schwefelverbrückten Bisarylverbindungen</i>	81
5.2	AUSTAUSCH DER HYDROXYGRUPPEN BEI KOHLENSTOFFVERBRÜCKTEN BISPHENOLDERIVATEN	88
5.2.1	<i>Betrachtung der berechneten Bindungsmodi der kohlenstoffverbrückten Diarylverbindungen</i>	89
5.3	HYDRAZONDERIVATE VON DHBP ALS K-RAS-LIGANDEN	92
5.3.1	<i>Synthesen und erste biochemische Daten</i>	92
5.3.2	<i>Versuche zur Reduktion der Hydrazone</i>	94
5.3.3	<i>Nähere biochemische Betrachtung einiger Hydrazone von DHBP</i>	96
5.3.4	<i>Diskussion des Fluorophenylhydrazon 122 als K-RAS-Ligand</i>	98
5.4	SULFONYLHYDRAZONE AUS DHBP ALS K-RAS-LIGANDEN	100
5.4.1	<i>Synthese und biochemische Daten</i>	100
5.4.2	<i>Diskussion der Haddock-Rechnungen zu den Sulfonylhydrazonen von DHBP</i>	104
5.5	WEITERE KONDENSATIONSPRODUKTE VON DHBP, DIE AN K-RAS BINDEN	106
5.5.1	<i>Diskussion der biochemischen Daten</i>	107
5.5.2	<i>Diskussion der Haddock-Ergebnisse der Verbindungen 140 und 142</i>	109
5.6	ENTDECKUNG EINES NEUEN K-RAS-LIGANDEN DURCH SAR-BASIERTES DOCKING	112
5.6.1	<i>Der computergestützte Entwicklungsprozess der Verbindung 144</i>	112
5.6.2	<i>Synthesepanung der in silico erhaltenen Verbindung</i>	114
5.6.3	<i>Synthese der heteroarylichen Bisphenolverbindung 144</i>	115

5.6.4	<i>Darstellung und Diskussion der biochemischen Daten zu Verbindung 144</i>	119
5.6.5	<i>Derivatisierung der Verbindung 144 zu einem Oxim-Derivat</i>	122
5.6.6	<i>Darstellung und Diskussion der biochemischen Daten zu Oxim 163</i>	124
5.7	FRAGMENTERWEITERUNG FÜR BPNH₂	126
5.7.1	<i>In Silico Suche nach geeigneten Liganden</i>	126
5.7.2	<i>Test-Alkylierungen und -Acylierungen von BPNH₂</i>	131
5.7.3	<i>Retrosynthetische Betrachtung des durch Docking erhaltenen Second-Site-Liganden 166</i>	137
5.7.4	<i>Erster Versuch der Synthese von Verbindung 166 über reduktive Aminierung des Pyridin-Bausteins</i>	138
5.7.5	<i>Versuche zur Verknüpfung mit dem Imidazol-Baustein über Substitutionsreaktionen am Pyridin-Baustein</i>	140
5.7.6	<i>Weitere Versuche zur Verknüpfung der Bausteine über reduktive Aminierung</i>	144
5.7.7	<i>Konkretisierung der Syntheseplanung</i>	145
5.7.8	<i>Erste Synthesen nach der neuen Route scheitern</i>	147
5.7.9	<i>Erfolgreiche Synthese von Verbindung 166</i>	152
5.7.10	<i>Diskussion der biochemischen Daten</i>	155
5.8	SYNTHESE VON INTERMOLEKULAREN SECOND-SITE-LIGANDEN	160
5.8.1	<i>Die Idee hinter PROTACs</i>	160
5.8.2	<i>Auswahl der Liganden für den PROTAC-Ansatz</i>	162
5.8.3	<i>Entwicklung eines PROTACs, der von der FESIK-Verbindung 86 abgeleitet wurde</i>	164
5.8.4	<i>Entwicklung von PROTACs, die von der GORFE-Verbindung 98 abgeleitet wurden</i>	177
5.9	STRUKTURBASIERTE LIGANDENSUCHE ÜBER KNIME	190
5.9.1	<i>Identifizierung der Liganden</i>	190
5.9.2	<i>Studien zur Synthese der Verbindung 307</i>	200
5.9.3	<i>Diskussion der biochemischen Daten</i>	205
6	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	210
7	EXPERIMENTALTEIL	216
7.1	ALLGEMEINE ANGABEN ZUR LABORPRAXIS	216
7.1.1	<i>Chemikalien, Lösungsmittel und Glasgeräte</i>	216
7.1.2	<i>Reaktionskontrollen</i>	217
7.1.3	<i>Aufbereitung der Produkte</i>	217
7.1.4	<i>Analytik der sauberen Produkte</i>	218
7.2	SYNTHESEVORSCHRIFTEN	220
7.2.1	<i>Synthese des Dapson analogen Sulfoximins 109</i>	220

7.2.2	Synthese der Referenzverbindung 115	224
7.2.3	Synthese von Hydrazonderivaten des 4,4'-Dihydroxybenzophenons.....	226
7.2.4	Synthese von Arylsulfonylhydraziden	232
7.2.5	Synthese von Sulfonylhydrazonderivaten des 4,4'-Dihydroxybenzophenons	235
7.2.6	Synthese weiterer Kondensationsprodukte des 4,4'-Dihydroxybenzophenons.....	243
7.2.7	Synthese der Bisheteroarylverbindung 144	245
7.2.8	Synthesen im Umfeld des Second-Site-Liganden 166	255
7.2.9	Synthese des FESIK-PROTACs.....	287
7.2.10	Synthese der GORFE-PROTACs.....	313
7.2.11	Studien zur Synthese der Knime-Verbindung 307	335

8	<u>ANHANG</u>	345
----------	----------------------	------------

9	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	356
----------	------------------------------------	------------

Abstract

Deutsche Version

Im Zuge der hier vorgestellten Arbeiten wurden ausgehend von Bisphenolen mit Hilfe verschiedener Konzepte der medizinischen Chemie neue Liganden für die SI/II-Bindestelle von *K-RAS4B* entwickelt. Neben der Bestimmung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen kamen die Fragmenterweiterung und das PROTAC-Design als weitere Konzepte zum Einsatz. Computergestützte Methoden wie Docking-Studien und E-Learning-Algorithmen wurden genutzt, um aktive Verbindungen zu identifizieren. Die größtenteils eigens synthetisierten Verbindungen wurden anschließend durch die Projektpartner hinsichtlich ihrer Bindung an *K-RAS4B*, ihrer Einflüsse auf zugrundeliegende biochemische Reaktionen und auf zelluläre Effekte untersucht.

Englische Version

In the course of the work presented here, new ligands for the SI/II binding site of *K-RAS4B* were developed starting from bisphenols using various medicinal chemistry concepts. In addition to the determination of structure-activity-relationships (SARs), fragment expansion and PROTAC-design were used as further concepts. Computational calculations were used for the identification of active compounds via docking studies and e-learning algorithms. The compounds, most of which were synthesized, were subsequently investigated by the project partners with respect to their binding to *K-RAS4B*, their influences on underlying biochemical reactions and on cellular effects.

Abkürzungsverzeichnis

<i>Abkürzung</i>	<i>Erläuterung</i>		
		Cbz	Benzyloxycarbonyl
ADP	Adenosindiphosphat		
Ac	Acetyl	Cdc25	Phosphatase des Zellzyklus („cdc“ von engl. cell division cycle)
AC ₅₀	halbmaximale aktivierende Konzentration	cGMP	zyklisches GMP (engl. cyclic GMP)
Akt	Name einer Serin-/Threonin-Protein-Kinase	CH	Cyclohexan
Arl2	ADP-Ribosylierungsfaktor-ähnliches Protein 2 (engl. ADP-ribosylation factor-like protein 2)	Cnksr1	Konnektor-Enhancer des Kinase-Suppressors von RAS 1 (engl. connector enhancer of kinase suppressor of RAS1)
arom.	Aromatisch	COSY	correlated spectroscopy
AS	Aminosäure(n)	CRBN	Cereblon (Protein)
ATP	Adenosintriphosphat	CTG	Cell titer Glo (Assayname)
APCI	chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (engl. atmospheric pressure chemical ionization)	d	Dublett
Äq.	Äquivalente	dba	Dibenzylidenaceton
ber.	berechnet	DC	Dünnschichtchromatographie
BINAP	2,2'-Bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl	DCE	1,2-Dichlorethan
Bn	Benzyl	DCVC	dry column vacuum chromatography
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl	DHBP	4,4'-Dihydroxybenzophenon
Bu	Butyl	DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
bzw.	beziehungsweise	DMA	<i>N,N</i> -Dimethylanilin
CAN	Cer(IV)ammoniumnitrat	4-DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
		DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid

DMSO	Dimethylsulfoxid	GDP	Guanosindiphosphat
DNA	Desoxiribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)	GEF	GTP-Austauschfaktor (engl. GTP exchange factor)
DTBAD	Di- <i>tert</i> -butylazo-dicarboxylat	ges.	gesättigt
δ	chemische Verschiebung in ppm	GMP	Guanosinmonophosphat
ee	Enantiomerenüberschuss (engl. enantiomeric excess)	GSP	5'-Guanosindiphosphat-monothiophosphat
EFRE	Europäische Fonds für regionale Entwicklung	GTP	Guanosintriphosphat
ERK	engl. extracellular signal-regulated kinase	GTPase	GTP-Hydrolase
EDCI	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid	h	Stunden
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (engl. epidermal growth factor)	HATU	[<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorphosphat]
EGFR	EGF-Rezeptor	HBTU	(2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat)
engl.	im Englischen bezeichnet als	HER2	Humaner epidermaler Wachstumsfaktor 2
ESI	Elektronenspray-Ionisation	HMDS	Hexamethyldisilazan
Et	Ethyl	HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie (engl. High performance liquid chromatography)
Et ₂ O	Diethylether	HRMS	Hochauflösende Massenspektrometrie (engl. high resolution mass spectrometry)
EtOAc	Ethylacetat	HSP90	Hitze-Schock-Protein 90
FKBP	FK506-Bindungsprotein (FK506 ist ein Makrolidlacton)	HSQC	heteronukleare Einzelquantenkorrelation (engl. heteronuclear single quantum coherence)
FTI	Farnesyltransferaseinhibitor	HTVS	virtuelles Hochdurchsatz-Screening (engl.
GAP	GTPase-aktivierendes Protein		

	high throughput virtual screening)	MET	Name einer Rezeptor Tyrosin Kinase
HVR	Hypervariable Region	mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
IC ₅₀	halbmaximale inhibitorische Konzentration	Ms/Mesyl	Methansulfonyl
ICMT	Isoprenylcystein Carboxylmethyltransferase	MS	Massenspektrometrie
		MST	MicroScale Thermophorese
IR	Infrarot (-Spektroskopie)	MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether
ITC	Isothermale Titrationskalorimetrie (engl. isothermal titration calorimetry)	mTOR	Ziel des Rapamycins im Säugetier (engl. mammalian target of Rapamycin)
<i>J</i>	Kopplungskonstante	m/z	Masse pro Ladung
K _A	Assoziationskonstante	NaH	Natriumhydrid
K _D	Dissoziationskonstante	NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
konz.	Konzentriert	NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
LDC	Lead Discovery Center	NMR	Kernmagnetresonanz (engl. nuclear magnetic resonance)
LCMS	Kopplung von Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie (engl. liquid chromatography/mass spectrometry)	NOESY	Kern-Overhauser Anreicherungsspektroskopie (engl. nuclear overhauser enhancement spectroscopy)
m	Multipllett	Pd/C	Palladium auf Aktivkohle
MAP	Mitogen aktiviertes Protein	PDB	Protein Datenbank (verwendet vor dem Code des Datenbankeintrags)
<i>m</i> CPBA	<i>meta</i> -Chlorperbenzoesäure		
Me	Methyl	PDEδ	cGMP-Phosphodiesterase Delta-Untereinheit
MeCN	Acetonitril		
MEK	Name der MAP-Kinase		
MEM	2-Methoxyethoxymethyl	Pd(PEPPSI) ^t Pr	Dichloro[1,3-bis(2,6-diisopropylphenyl)imidazol-2-yliden)](3-chloropyridyl)palladium

Ph	Phenyl	Rheb	im Gehirn angereicher- tes RAS-Homolog (engl. RAS homolog enriched in brain)
PH-Domäne	Pleckstrin-Homologie- Domäne		
PI3K	Phosphoinositid-3- Kinase	RIST	RAS-Inhibition in soliden Tumoren (Projekttitel)
PIP ₂	Phosphatidylinositol- 4,5-bisphosphate		
PIP ₃	Phosphatidylinositol- 3,4,5-triphosphate	RMSD	quadratische Mittel- wertabweichung (engl. root mean square deviation)
PLC ϵ	1-Phosphatidylinositol- 4,5-bisphosphatphos- phodiesterase epsilon-1	RNA	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
PMB	<i>para</i> -Methoxybenzyl	RRAS2	RAS-verwandtes Protein 2 (engl. RAS related protein 2)
PNPCOCL	<i>para</i> -Nitrophenylchloro- format		
POI	Protein von Interesse (engl. Protein of interest)	RT	Raumtemperatur
		RVE	restraints violation energy
PPI	Protein-Protein- Wechselwirkung (engl protein-protein inter- action)	SOS	engl. Son of Sevenless (GEF-Protein)
		SP	standard-präzises Docking
ppm	Teile pro Million (engl. parts per million)	STD	Sättigungstransfer- Differenz
Pr	Propyl	SWI/II	SwitchI/II
PTEN	Phosphatase- und Tensin-Homolog	t	Triplett
quant.	quantitativ	TBAF	Tetrabutylammonium- fluorid
Raf	engl. rat fibrosarcoma (Familie von Protein- kinasen)	TBS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
		<i>tert</i>	tertiär
RAL-GDS	Ral-Guanin-Nukleotid- Dissoziationsstimulator	TFA	Trifluoressigsäure
		THF	Tetrahydrofuran
RBD	RAS-bindende Domäne	TIAM1	T-Zell-Lymphom- Invasion und Metastasen indu- zierendes Protein 1 (engl. T-lymphoma
RCE1	RAS-Umwandlungs- enzym 1 (engl. RAS covering enzyme 1)		

	invasion and metastasis inducing protein 1)
TMS	Trimethylsilyl
T _R	Retentionszeit
Tsc	Tuberöse Sklerose Komplex (engl. tuberous sclerosis complex)
Ts/Tosyl	<i>p</i> -Toluolsulfonyl
UV	Ultraviolett
vgl.	Vergleiche
VHL	Van-Hippel-Lindau
$\tilde{\nu}$	Wellenzahl
WT	Wildtyp
XP	extrapräzises Docking
XPhos	2-Dicyclohexylphosphino-2',4',6'-triisopropylbiphenyl

1 Einleitung

1.1 Die Bedeutung von Krebs und die Rolle des RAS-Onkogens bei dieser Krankheit

1.1.1 Krebs in der Moderne

Obwohl Krebs seit Entstehung der Menschheit existiert, ist diese Krankheit erst durch Fortschritte in anderen Bereichen der Medizin zur größten Barriere für eine höhere Lebenserwartung der Menschen im einundzwanzigsten Jahrhundert geworden. 2018 entwickelte jeder achte Mann und jede zehnte Frau die Krankheit im Laufe ihres Lebens. Dabei endete bei Männern Lungenkrebs und bei Frauen Brustkrebs am häufigsten tödlich. Infektionskrankheiten, Schlaganfälle und die Grunderkrankung von Herzinfarkten (koronare Herzerkrankung) treten als Todesursachen aufgrund der Verbesserung der Therapiemöglichkeiten hingegen immer mehr zurück.^{1,2}

Auch das Profil der Krebserkrankungen und Krebstode verändert sich durch die ökonomische Entwicklung und entfernt sich von infektions- und armutsbezogenen Krebsarten. Dieses Profil hängt stark mit den Faktoren des sozialen Lebens und dem Lebensstil zusammen.² Infektionsbedingt können beispielsweise Magenkrebs durch *Helicobacter pylori* und Leberkrebs durch den Hepatitis B Virus ausgelöst werden.³ Zu den armutsbezogenen Krebsarten gehören das Kaposi-Sarkom (ausgelöst durch Herpesvirus HHV-8 nach einer Immunsuppression), Kehlkopf-, Gebärmutterhals-, Penis- und Leberkrebs.⁴

Geschätzt wird, dass ein Drittel bis zwei Fünftel der neuen Krebserkrankungen durch Vermeidung einer Aussetzung gegenüber bekannten Risikofaktoren des modernen Lebens verhindert werden könnten. Risikofaktoren sind beispielsweise eine exogene

Hormoneinnahme und die Ernährung (z.B. Alkoholkonsum und Gewichtszunahme). Die Verschiebung des Krankheitsbildes ist besonders in Schwellenländern zu beobachten, wobei im Allgemeinen die Größenordnung der Krebserkrankungen als Todesursache steigt, je weiter die jeweilige Nation entwickelt ist.²

Unter den Krebserkrankungen mit sehr hohen Inzidenzraten für Europa und andere ökonomisch weit entwickelte Länder sind Lungen-, Dickdarm- und Bauchspeicheldrüsenkrebs.^{1,2}

1.1.2 Diagnose und Therapie von Krebs

Die klassische Diagnose von Krebserkrankungen über bildgebenden Verfahren wie die Computer- und Kernspintomographie führt zu Beginn der Therapie in den meisten Fällen zur chirurgischen oder strahlenbasierten Entfernung des Tumorgewebes. Bei der Strahlentherapie wird die Unfähigkeit von Krebszellen zum Abbruch ihres Zellzyklus ausgenutzt. Dadurch entstehen bei der Bestrahlung mit Röntgenstrahlung von Zellzyklus zu Zellzyklus immer schwerwiegendere DNA-Schäden, die schlussendlich zur Apoptose, also dem programmierten Zelltod führen. Sind die Tumorzellen jedoch in der Lage die Apoptose zu unterdrücken, so greift diese Therapie nicht.

Neben der operativen Entfernung und der Bestrahlung sind Zytostatika bedeutend für die Krebstherapie. Wirkstoffe aus der Gruppe der Zytostatika machen sich ebenfalls die schnelle Proliferation der Krebszellen zu Nutzen. Sie beeinträchtigen dabei über unterschiedliche Mechanismen die Zellteilung und lassen sich je nach Mechanismus in Antimetabolite, Topoisomeraseinhibitoren, Mitosehemmer und Alkylantien unterteilen.¹

Antimetabolite blockieren dabei auf unterschiedliche Weise die Biosynthese von Nucleotiden als Bausteine der DNA. Inhibitoren der Dihydrofolat-Reduktase (z.B. Methotrexat (**1**)) verhindern die Bildung einer wichtigen Zwischenstufe bei der Bildung von Purinnucleotiden.¹ Direkte Purin-Antagonisten wie Mercaptopurin (**2**) oder

5-Fluorouracil (**3**) ersetzen die natürlichen Nucleobasen bei der DNA-Synthese und führen dadurch zu Fehlern oder inhibieren andere Enzyme der Nucleotidsynthesekaskade.⁵ Auf analoge Weise verhindern Pyrimidin-Antagonisten wie Cytarabin (**4**) den korrekten Aufbau der DNA.⁶ Ähnlich wie die Inhibition der Dihydrofolat-Reduktase bewirkt die Hemmung der Ribonucleotid-Reduktase durch Hydroxycarbamid (**5**) eine Blockierung eines Zwischenschritts der Nucleotid-Biosynthese.⁷

Die Klasse der Topoisomerasehemmer hemmen die Fähigkeit der Topoisomerasen I und II zur korrekten Entwindung der DNA als wichtigen Teilschritt der DNA-Replikation und -Transkription. Dies geschieht bei den Anthrazyklinen (z.B. Daunorubicin (**6**)) durch Interkalieren in den Doppelstrang der DNA, wobei es sich dabei um einen Mechanismusvorschlag handelt.⁸ Andere Topoisomeraseinhibitoren wie Etoposid (**7**) führen nach der temporären Spaltung der Stränge durch die Topoisomerase II zu irregulären Strangbrüchen der DNA.^{1,9}

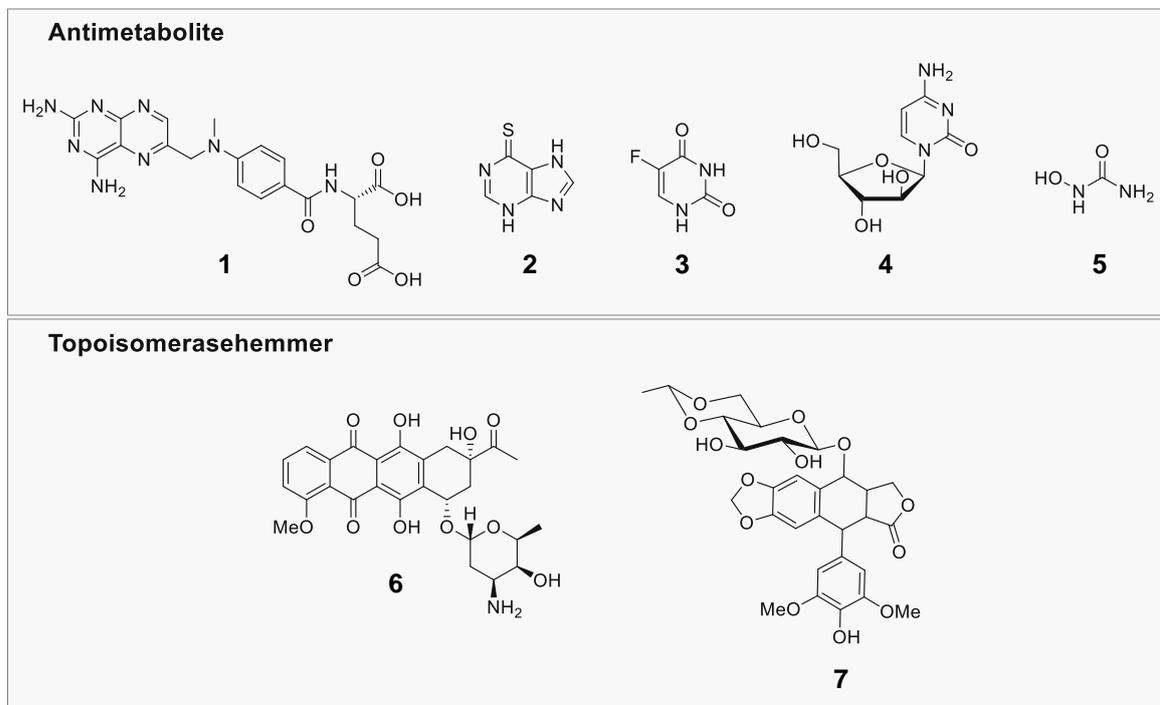


Abbildung 1: Darstellung von Zytostatika aus den Gruppen der Antimetabolite (oben: Methotrexat (**1**), Mercaptopurin (**2**), 5-Fluorouracil (**3**), Cytarabin (**4**) und Hydroxycarbamid (**5**)) und Topoisomerasehemmer (unten: Daunorubicin (**6**) und Etoposid (**7**)).

Zu den Mitosehemmern zählen die Vinca-Alkaloide (**8**) und Taxane (**9**), welche die normale Funktion von Mikrotubuli stören. Da Mikrotubuli als Strukturproteine wichtig für die Zellkernteilung (Mitose) sind, stört dieser Vorgang die gesamte Zellteilung.¹⁰

Als letzte Gruppe von Zytostatika sind die Alkylantien bekannt. Darunter fallen zum Beispiel Platin-Verbindungen wie *cis*-Platin (**10**), welches zwischen die Nukleobasen des DNA-Doppelstrangs interkaliert und eine kovalente Quervernetzung der Stränge bewirkt.^{1,11} Auch *N*-Lost-Derivate wie Melphalan (**11**) und davon abgeleitete und in Form einer Prodrug wie Cyclophosphamid (**12**) verabreichte Phosphoramid-Derivate sind zur kovalenten Modifikation der DNA befähigt.^{12,13}

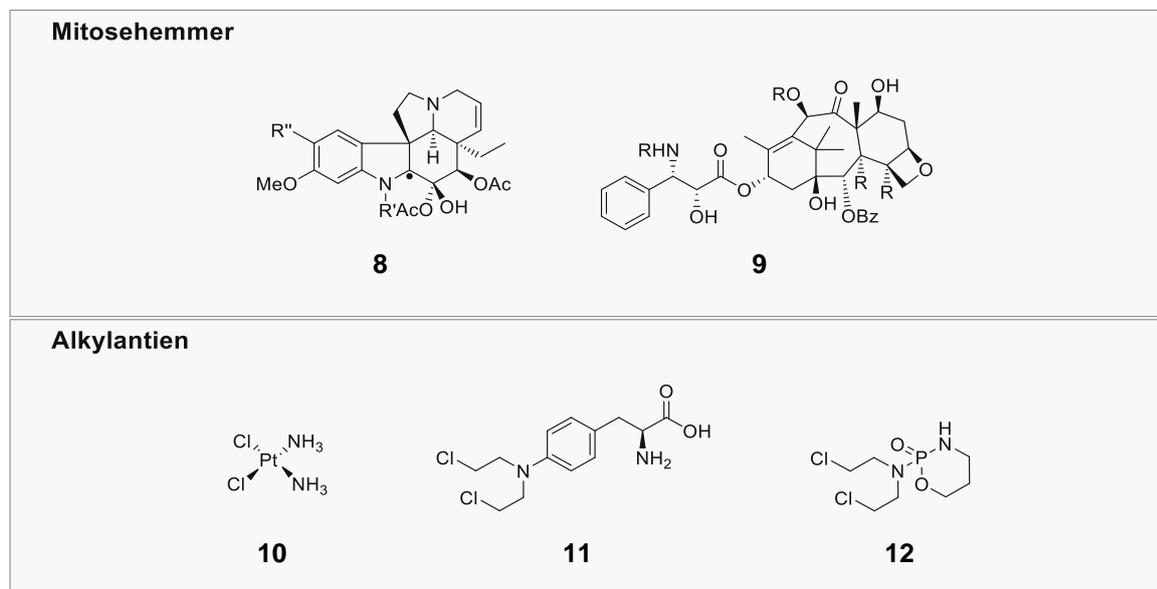


Abbildung 2: Darstellung von Mitosehemmstoffklassen (oben: Vinca-Alkaloide (**8**) und Taxane (**9**), wobei „R“ variabel ist und im Falle der Taxane die verallgemeinerte Struktur von Docetaxel und Taxol dargestellt ist) und Vertretern der Alkylantien (unten: *cis*-Platin (**10**), Melphalan (**11**) und Cyclophosphamid (**12**)).

Die genannten Mechanismen bewirken eine Unterdrückung des ungehemmten Zellwachstum und wirken insbesondere bei schnell proliferierenden Zellen, zu denen die Krebszellen gehören. Aber auch bestimmte normale Zellen unterliegen einer schnellen Proliferation und können somit von der Wirkung der Zytostatika betroffen sein, wodurch Nebenwirkungen entstehen können. Beispiele für betroffene Zellen sind Blutzellen,

Spermazellen, Drüsengewebezellen des Magen-Darm-Trakts und keratinbildende Zellen, die für das Haarwachstum entscheidend sind.

Aufgrund dieser häufig drastischen Nebenwirkungen wird nach neuen Möglichkeiten der Krebstherapie gesucht. Durch den gezielten Einsatz biochemischer und molekularbiologischer Verfahren können Tumorklassifikationen immer besser durchgeführt werden und es kann eine optimierte Therapiewahl erfolgen. Dabei versucht die zielgerichtete Therapie, Proteine auszuschalten oder wieder zur Funktion zu bringen, die durch ihre Mutation eine existenzielle Rolle bei der Genese von Tumoren einnehmen (z.B.: Kinase-Inhibitoren, vgl. Kapitel 1.3). Die Profile dieser Proteinmutationen variieren von Krebsart zu Krebsart, können aber über Expressionsspiegel der kodierenden Onkogene untersucht werden. Bestimmte Onkogene wie die RAS-Gene können dabei erste Hinweise auf die molekulare Beschaffenheit der Tumorigenese liefern.¹

1.1.3 Die Bedeutung von K-RAS als therapeutisches Target für die Krebstherapie

Die Familie der RAS-Gene kodiert vier stark verwandte Protein-Isoformen, zu denen H-RAS, K-RAS4A, K-RAS4B und N-RAS gehören.¹⁴ Dabei entstehen die beiden K-RAS-Varianten durch alternatives Spleißen des Exons 4 und somit bei der Überführung der durch Transkription der Gene erhaltenen prä-mRNA in die fertige mRNA.^{15,16} K-RAS-Proteine sind wesentliche Treiber bei der Krankheitsentwicklung von Krebs und das codierende Gen ist nicht nur unter den RAS-Isoformen (vgl. **Abbildung 3**), sondern auch im gesamten Genom das häufigst mutierte Onkogen. Es liegt in etwa einem Viertel der menschlichen Krebserkrankungen in mutierter Form vor.¹⁷ Mutationen des Gens liegen in etwa 100% der Pankreas-Duktal-Adenokarzinome, 53% der Kolorektaltumore und zu einem großen Anteil in nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen vor, welche bei etwa 30% der Lungentumore auftreten.^{14,15,18} Diese Krebserkrankungen entsprechen einigen der im einundzwanzigsten Jahrhundert in weit entwickelten Ländern mit hoher Inzidenz auftauchenden Krebsarten.²

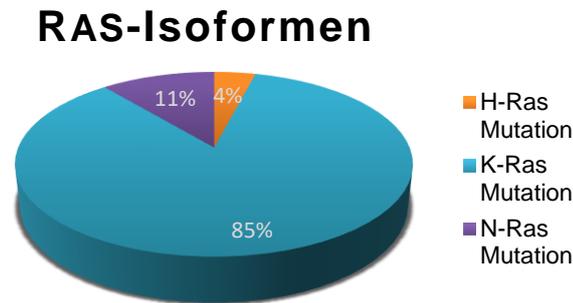


Abbildung 3: Häufigkeit der Mutationen einzelner RAS-Isoformen in menschlichen Tumoren.¹⁹

Die Mehrheit der Mutationen der RAS-Gene taucht in den Codons 12 und 13, gefolgt von Mutationen in Codon 61 auf (vgl. **Abbildung 4**). Die G12C-Mutation des *K*-RAS-Proteins ist zum Beispiel eine der häufigsten RAS-Mutationen bei nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen (NCLCs: non small cell lung cancers).¹⁴

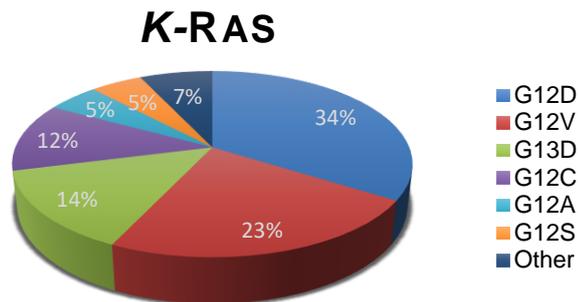


Abbildung 4: Vorkommen spezifischer *K*-RAS-Mutationen in menschlichen Tumoren.¹⁹

Wegen seiner leichten Identifizierung und seiner großen Häufigkeit ist mutiertes *K*-RAS ein ansprechendes Ziel für neue therapeutische Methoden.¹⁴ Dreißig Jahre lang wurden dennoch keine wirksamen Inhibitoren für dieses Protein gefunden. Ursache hierfür ist die schwere Adressierung aufgrund der flachen Oberfläche des RAS-Proteins.^{15,20}

1.2 RAS-Proteine als binäre Schalter

RAS-Proteine sind kleine Guanosintriphosphatasen, welche am Zellüberleben, dem Fortschritt des Zellzyklus, der Zellpolarität und der Zellbewegung beteiligt sind.¹⁴ Sie sind membranverankerte molekulare Schalter, deren Schalteigenschaften durch Konformationsänderungen bei der Hydrolyse von Guanosintriphosphat (GTP) zu Guanosindiphosphat (GDP) und der anschließenden Neubesetzung mit GTP zustandekommen. Dabei ist *K-RAS* ein so essentielles Protein, dass ein Ausschalten des *K-RAS*-Gens bei Mäusen innerhalb von zwölf bis vierzehn Wochen zum Tod führt.²¹

1.2.1 Posttranslationale Prozessierung von RAS-Proteinen

Ras-Proteine besitzen eine C-terminale Tetrapeptidsequenz, die sogenannte CAAX-Box. Diese besteht aus einem invarianten Cystein (C), zwei aliphatischen Aminosäuren (A1 und A2) und einer von mehreren festgelegten Aminosäuren (X).²² Nach der RAS-Synthese im Zytosol wird dieses CAAX-Motiv von der Farnesyltransferase erkannt, welche das Cystein anschließend prenyliert. Daraufhin werden die drei übrigen Aminosäuren (AAX) durch RCE1 (RAS-converting enzyme 1) abgespalten und die Carbonsäurefunktion des farnesylierten Cysteins durch ICMT (Isoprenylcystein-Carboxyl-Methyltransferase) in den Methylester überführt.¹⁴

Der am Cystein angebrachte Farnesylrest ist bei allen RAS-Proteinen ein notwendiges, aber nicht hinreichendes Kriterium für die Einbettung in die Plasmamembran. Während *H-RAS* an zwei weiteren Stellen palmitoyliert wird (C181 und C184), haben *N-RAS* und *K-RAS4A* nur eine einzelne Stelle für die Lipidmodifikation. Bei *K-RAS4B* dient hingegen eine ununterbrochene Polylysinregion als zweite membranadressierende Funktion, da aus den Ladungen der Lysin-Seitenketten elektrostatische Wechselwirkungen mit der Membran resultieren (**Tabelle 1**).

Tabelle 1: Aufführung der C-terminalen Sequenzen der verschiedenen RAS-Isoformen mit ihren CAAX-Motiven (blau) und zusätzlichen Palmitoylierungsstellen (orange).^{23,24}

RAS-Isoform	Sequenz des C-Terminus ab AS 165		
	165	171	181
H-RAS4A	QH KLRK LNPPDESGPG		CMSCCKCVLS
N-RAS	QY RMKK LNSSDDGTQG		CMGLPCVVM
K-RAS4A	QY RLKK ISKEEKTPGC		VKIKKCIIM
K-RAS4B	KH KEKM SKDGKKKKKK		SKTKCVIM

Ohne einen entscheidenden weiteren Schritt käme es jedoch zur Fehllokalisierung von K-RAS4B. Dieser Schritt besteht daraus, dass PDE δ (delta Untereinheit der Phosphodiesterase 6) K-RAS aktiv durch Bindung des methylierten und farnesylierten Cysteins von Endomembranen entfernt. Durch Bindung der kleinen GTPase Arl2 (ADP ribosylation factor like 2) an PDE δ wird das RAS-Protein dann sukzessiv freigegeben, wodurch eine Relokalisierung ermöglicht wird.^{14,22,25}

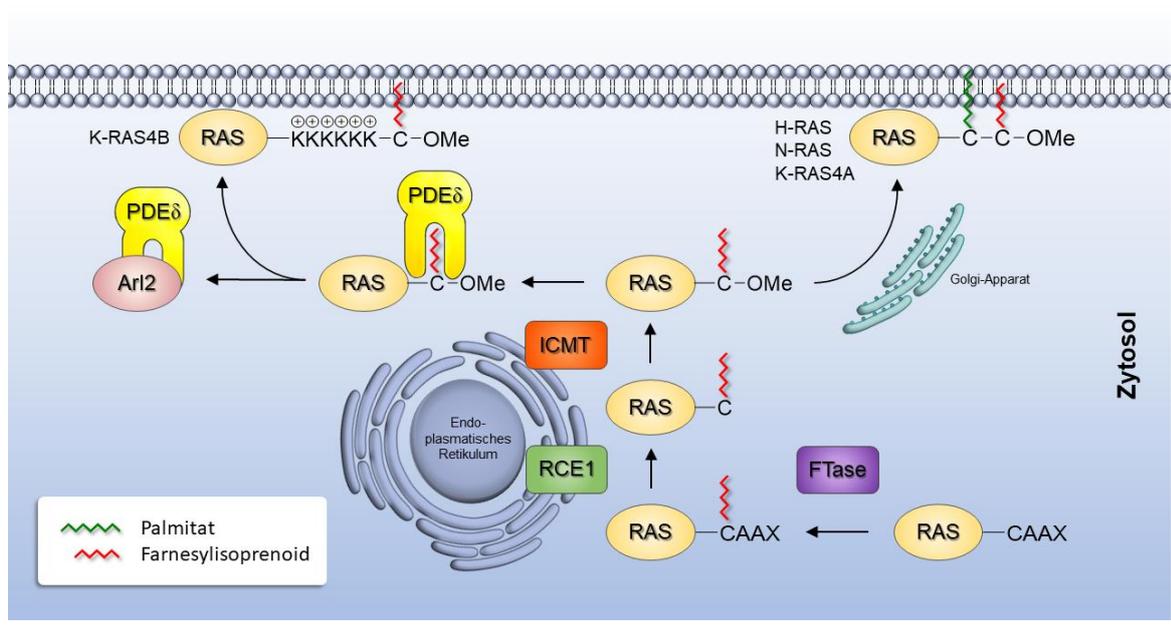


Abbildung 5: Darstellung der Posttranslationalen Modifikation von RAS-Proteinen, welche für die Membranlokalisation entscheidend ist.^{15,19}

Erst nach korrekter Membraneinbettung kann die Aktivierung der RAS-Proteine durch äußere Stimuli, wie zum Beispiel die Bindung des EGFs (epidermal growth factor) an seinen membraneingebetten Rezeptor, erfolgen. Somit ist die Posttranslationale Prozessierung von RAS-Proteinen ein wichtiger regulatorischer Faktor für die Aktivität und Funktion dieser GTPasen.¹⁴

1.2.2 RAS-regulierte Signaltransduktion

Durch Bindung des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) kommt es zur Konformationsänderung der extrazellulären Domäne des EGFRs (epidermal growth factor receptor), wodurch dessen Dimerisierung ermöglicht wird. Durch die hierdurch entstehende Nähe der Kinasedomänen kommt es zu einer Autophosphorylierung, die zur eigentlichen Aktivierung des Rezeptors führt.¹

Der aktivierte EGFR rekrutiert anschließend RAS-spezifische Guaninnukleotidaustauschfaktoren (GEFs: guanine nucleotide exchange factors) mit Hilfe von Adapterproteinen zur Plasmamembran.¹ Diese GEFs sind eine von zwei Klassen RAS-regulierender Proteine und sind für den Austausch von GDP gegen GTP verantwortlich.²⁶ Die bestverstandenen Proteine dieser Klasse sind SOS (son of sevenless) und Cdc25 (cell division cycle gene).²⁷ Sie sind notwendig, um die langsame intrinsische GDP-Dissoziation (10^{-5} s^{-1}) um das zehntausendfache zu erhöhen.¹⁶ Nach Freisetzung der Nukleotidbindestelle kommt es aufgrund der hohen GTP-Konzentration im Zellinneren (etwa 0.47 mM) zum Nukleotidaustausch.²⁸ Das so entstandene GTP-gebundene RAS stellt die aktive Form des Proteins dar, welche mit im Zytosol befindlichen Downstream-Effektoren wechselwirken kann und somit Signale für Zellwachstum, Proliferation und Proteinbiosynthese sendet (**Abbildung 6**).

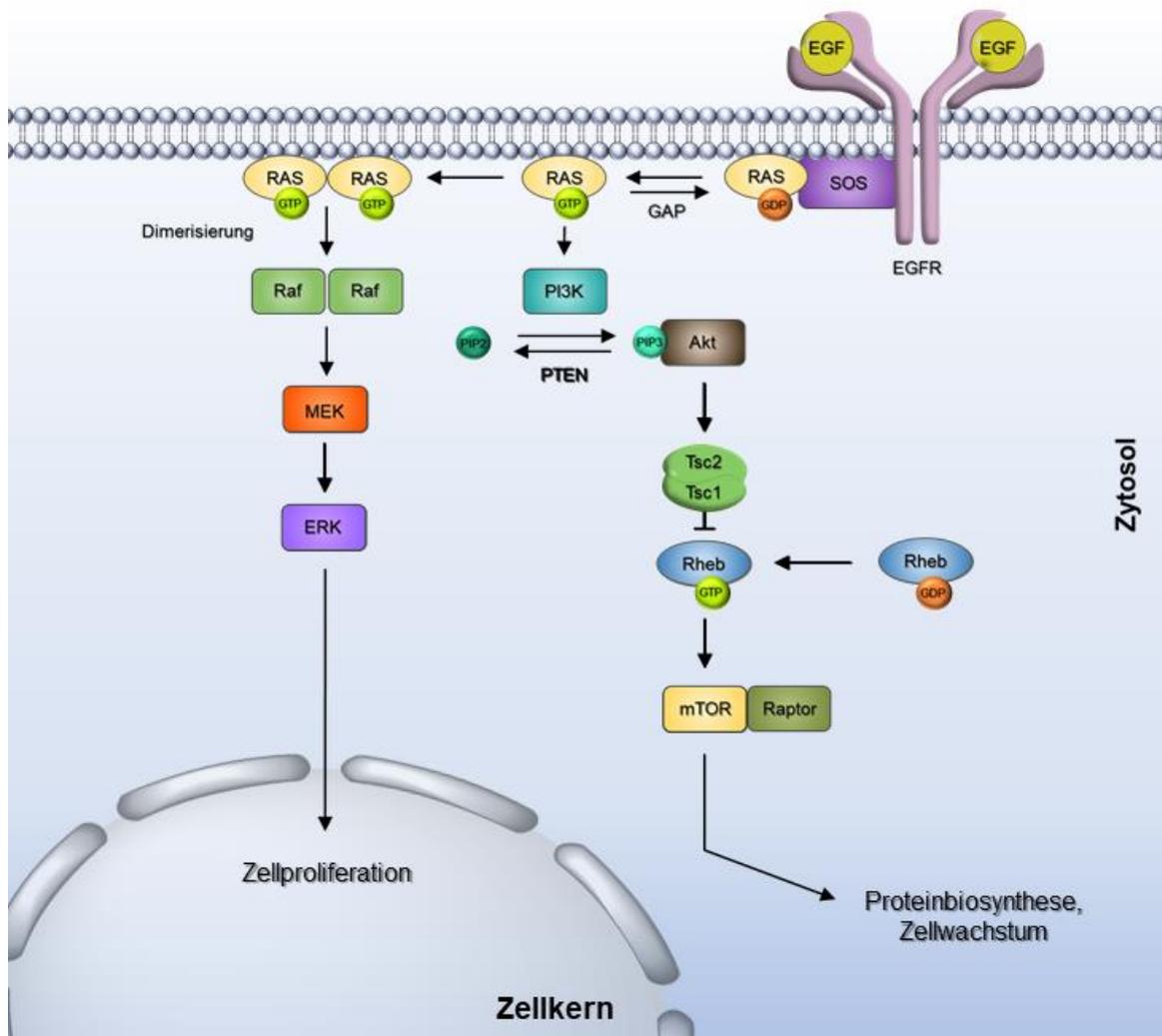


Abbildung 6: Darstellung der bekanntesten RAS-Downstream-Kaskaden.^{1,20}

Für die Terminierung des Signals ist die zweite Klasse RAS-regulierender Proteine zuständig, die sogenannten GTPase aktivierenden Proteine (GAPs). Da die intrinsische GTPase-Aktivität mit einer Hydrolyserate von 10^{-4} s^{-1} äußerst gering ist, ist auch hier eine Wechselwirkung mit einem zweiten Protein nötig, um eine ausreichend schnelle Signalterminierung zu erzielen. Diese wird durch die stimulierte Hydrolyse des GTPs erreicht, da so die inaktive GDP-gebundene Form des RAS-Proteins entsteht.^{16,19,26}

Viele RAS-Mutanten können mit GAP nicht mehr ausreichend wechselwirken, wodurch eine Aktivierung der Downstream-Signalwege dauerhaft bestehen bleibt. Dieser Zustand

führt zu übermäßigem Zellwachstum, erhöhter Proliferation und Überlebensfähigkeit von Tumorzellen. Ohne Stimulation von RAS durch ein Upstream-Signal kommt es durch die intrinsische GTP-Hydrolyse aber dauerhaft zu einem Gleichgewichtszustand, der den GDP-gebundenen Zustand favorisiert. Somit sind die aktivierenden Signale weiterhin notwendig, um onkogenes RAS in seiner aktiven Form zu halten.²⁹

Von den elf bekannten Effektoren, die von aktivem RAS angesteuert werden, spielen Raf, PI3K, TIAM1, PLC ϵ und RAL-GDS eine maßgebliche Rolle bei der Onkogenese. Es ist jedoch nicht vollständig geklärt, welche Effektoren von RAS unter verschiedenen zellulären Bedingungen die Wichtigsten sind.^{19,29} Im Folgenden sollen die beiden bestuntersuchten Effektor-Kaskaden erläutert werden (vgl. **Abbildung 6**).

Der MAP-Kinase-Signalweg beginnt mit einer Dimerisierung von GTP-RAS, wodurch die zytosolische Serin-Threonin-Kinase Raf zur Plasmamembran rekrutiert und dort unter Dimerisierung aktiviert wird. Als nächster Baustein der Signalkaskade wird die Kinase MEK phosphoryliert und somit aktiviert, wodurch diese wiederum in der Lage ist, die MAP-Kinasen, darunter ERK (engl.: extracellular signal-regulated kinases), an je einem Tyrosin- und einem Threoninrest zu phosphorylieren. Diese doppelte Phosphorylierung führt zur vollständigen Aktivierung der MAP-Kinasen. Die aktive Form dieser Kinasen kann nun ebenfalls durch Phosphorylierung viele Substrate aktivieren, wobei sie in der Lage sind, in den Zellkern zu translozieren, um dort beispielsweise Transkriptionsfaktoren zu aktivieren.^{1,20}

Im PI3K-Signalweg wird im ersten Schritt die Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) durch Wechselwirkung mit aktivem RAS an der Plasmamembran lokalisiert, wo sich auch ihr Substrat, das Phospholipid PIP₂ (Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat) befindet. Unter ATP-Verbrauch phosphoryliert PI3K das PIP₂ zum Triphosphat PIP₃, ein Prozess, der durch die plasmamembranassoziierte Lipidphosphatase PTEN (phosphatase and tensin homologue) umgekehrt werden kann. Das PIP₃ dient der Serin-Threoninproteinkinase Akt

als Ankerplatz an der Plasmamembran. Akt gelangt auf diese Weise aus dem Zytosol an die Membran, wo ihre Aktivierung erfolgt. Die aktivierte Form der Kinase ist in der Lage Faktoren zu inhibieren, die ansonsten zur Apoptose, dem programmierten Zelltod, führen würden. Sie ist aber auch entscheidend am mTOR-Signalweg (mTOR: mammalian target of rapamycin) beteiligt, welcher wichtige Prozesse für die Proteinbiosynthese und das Zellwachstum einleitet.^{1,20}

Dabei sorgt Akt für die Phosphorylierung des Tsc-Komplexes aus Tsc1 und Tsc2, welcher durch Inhibierung des Nukleotidaustauschs der GTPase Rheb das Zellwachstum drosselt. Nach der Phosphorylierung durch Akt ist dieser Komplex inhibiert, wodurch GDP-Rheb in die aktive GTP-Rheb-Form überführt werden kann. Als Folge dessen kann Rheb den mTOR-Raptor-Komplex stimulieren, durch den die Prozesse eingeleitet werden, die zur Proteinbiosynthese und zum Zellwachstum führen.¹

1.3 Strategien zur Inhibierung der RAS-Signalwege

Neben der direkten wirkstoffinduzierten Inhibition des RAS-Proteins selbst, gibt es aufgrund der Fortschritte beim molekularen Verständnis der mit RAS gekoppelten zellulären Vorgänge vielerlei Strategien zur Tumorbekämpfung mit verschiedenen Targets in den RAS-Signalwegen. Auch die Inhibition der RAS-Expression war dabei ein möglicher Ansatz zur Regulierung der RAS-stimulierten Zellvorgänge. Die Idee bestand dabei darin, über Oligonukleotide spezifische RNA-Sequenzen zu adressieren und dadurch die Translation in die RAS-Proteine zu unterbinden. Jedoch wurden die Errungenschaften auf diesem Gebiet durch Probleme bei der Bereitstellung und Aufnahme der Oligonukleotide, sowie Veränderungen der Sensitivität gegenüber diesen Wirkstoffen durch Phenotypwandel *K*-RAS-abhängiger Zellen negiert.^{14,30}

1.3.1 Inhibition von RAS-Wechselwirkungspartnern, die für die Membraneinbettung verantwortlich sind

Wie bereits in Kapitel 1.2.1 erläutert, spielt auch die Membraneinbettung und damit verbundene posttranslationale Modifikation eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung von RAS-Proteinen. Dadurch liegt es nahe, dass die Enzyme, die für diese Modifikation zuständig sind, als Targets für Wirkstoffe gegen Krebs untersucht wurden. Somit wurden zunächst **Farnesyltransferase**-Inhibitoren (FTIs) wie zum Beispiel Tipifarnib (**13**) und Lonafarnib (**14**) entwickelt. Diese zeigten jedoch nur geringe Aktivität in klinischen Tests, da es bei Inhibition der Farnesyltransferase zur alternativer Prenylierung durch die Geranylgeranyltransferase kommt.^{30,31} Auch eine duale Inhibition beider Transferasen (Beispiel L-778,123 (**16**))³² und eine zweite Generation von Farnesyltransferaseinhibitoren (Beispiel Salirasib (**15**))¹⁴ erbrachten nicht die gewünschten Ergebnisse. Hier werden weitere alternative Mechanismen vermutet, die zu dieser Resistenz führen.³³

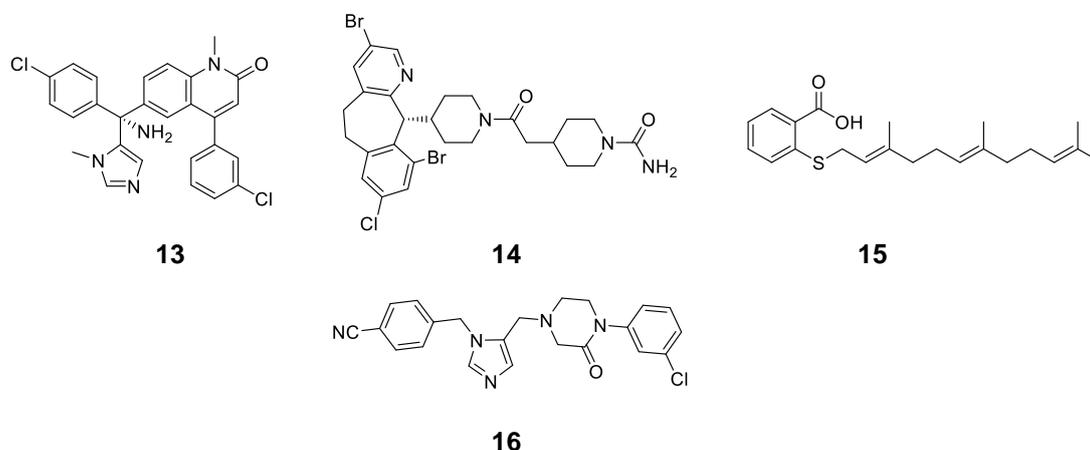


Abbildung 7: Farnesyltransferaseinhibitoren: Tipifarnib (**13**), Lonafarnib (**14**), Salirasib (**15**) und L-778,123 (**16**, dualer Inhibitor mit Geranylgeranyltransferase).

Auch für die Proteine, die zur weiteren Verarbeitung der CAAX-Box von *K*-RAS dienen, wurden Inhibitoren gesucht. Für **RCE1** wurden Inhibitoren im niedrig mikromolaren Bereich gefunden, deren Wirkweise jedoch nicht vollständig geklärt ist.

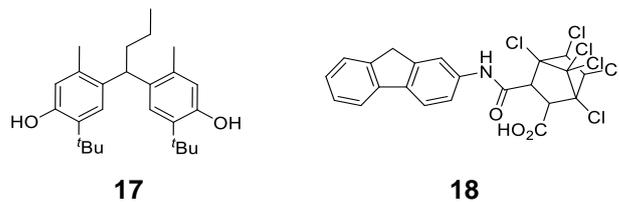


Abbildung 8: Inhibitoren des RCE1 (RAS converting enzyme 1), welches die AAX-Sequenz des CAAX-Motivs von *K*-RAS abspaltet.

Im Fall von Verbindung **17** kommt es schnell zu einer kolloidalen Aggregation und der inhibierende Effekt der Verbindung kann sowohl durch die monomere Form, als auch durch das Aggregat zustande kommen. Die Verbindung **18** hingegen wurde bereits vor dem Befund als RCE1-Inhibitor zu fungieren als chemotherapeutischer Wirkstoff unter Anwendung als DNA-Topoisomerasehemmer eingesetzt.³⁴

Genau wie die RCE1-Inhibitoren zeigen auch **ICMT**-Inhibitoren gute Ergebnisse *in vitro* und in Mausmodellen.^{34,35} Außerdem konnte die Methyltransferase selbst durch die neue Methode Crispr-Cas9 in ihrer Funktion ausgeschaltet werden. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Experimente zeigten, dass die Fähigkeit zur Tumorentstehung durch die meistvertretenen RAS-Isoformen bei fehlender ICMT-Funktion nicht mehr möglich war.³⁶

Selbst bei erfolgreicher Prozessierung der CAAX-Box kommt es zu Fehllokalisationen von *K*-RAS4B im Endomembransystem, wenn das Enzym **PDEδ** nicht zu einer Relokalisation führen kann (vgl. Kapitel 1.2.1). Deltasarin (**19**) verhindert die Assoziation von *K*-RAS an PDEδ durch Blockierung der Farnesylbindestelle. Bei einer effektiven Dosis ist Deltasarin bei Pancreas-Krebszellen aktiv, erweist sich aber auch als zytotoxisch, weshalb Deltazinon 1 (**20**) entwickelt wurde. Dieses ist weniger zytotoxisch und weist eine bessere Selektivität gegenüber *K*-RAS gesteuertem Tumorwachstum auf.¹⁴

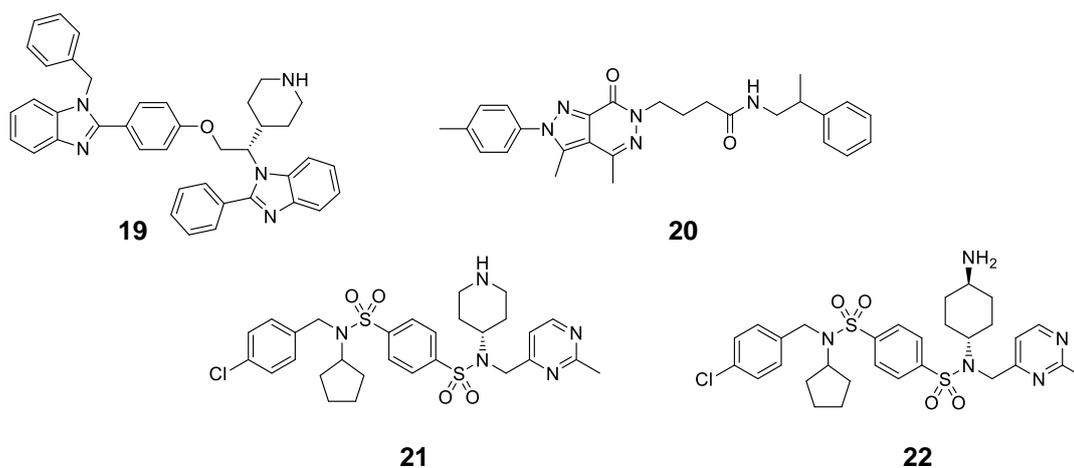


Abbildung 9: Darstellung der verschiedenen PDE δ -Inhibitoren Deltasarin (**19**), Deltazinon 1 (**20**) und Deltasonamid 1 (**21**) bzw. 2 (**22**).

Während die *in vitro* Affinität aber im nanomolaren Bereich liegt, ist es *in vivo* erst bei mikromolaren Konzentrationen aktiv. Es gibt die Vermutung, dass dieser Effekt durch die kompetitive Bindung des PDE δ -Effektors Arl2, welcher somit den Inhibitor verdrängt, entsteht.³⁷

Eine Optimierung von PDE δ -Liganden bis in den picomolaren Bereich wurde anschließend durchgeführt, wobei sich diese neuen Liganden (Deltasonamid 1 (**21**) und 2 (**22**)) nur als unwesentlich effektiver zeigten als Deltazinon 1. Grund hierfür könnten die niedrigen Verteilungskoeffizienten der Verbindungen sein. Da die Verteilung zwischen lipophiler und lipophober Phase für diese Verbindungen gering ist, ist eine schlechte Membrangängigkeit anzunehmen.^{14,37}

1.3.2 Inhibition von Upstream-Effektoren von membranverankertem RAS

Weitere direkte Effektoren von RAS, die erst nach Membraneinbettung der RAS-Proteine zu deren Aktivität führen, sind die GEFs. FESIK *et al.* beschreiben 2014 erstmalig eine Substanzklasse, deren Derivate in einer Region von **SOS** nahe der Interaktionsfläche mit RAS binden (**23**, **24**). Diese Verbindungen erhöhen den SOS-vermittelten Nukleotidaustausch und erhöhen somit den Anteil von GTP-RAS. Jedoch führen die

Verbindungen trotzdem zu verminderter Überlebensfähigkeit von Zellen, aber ohne, dass eine *K-RAS*-Mutation dabei entscheidend war. Die AKT-Phosphorylierung nimmt bei Behandlung mit den Verbindungen ab, während für die ERK-Aktivierung ein biphasisches Verhalten beobachtet wurde. Dabei führen nur hohe Verbindungskonzentrationen zur Inhibition der ERK-Phosphorylierung, während geringe Konzentrationen für eine Steigerung der pERK-Konzentration sorgen. Interessanterweise kommt es nur zu marginalen Unterschieden der SOS-Konformation im Komplex mit RAS, wenn die Verbindungen kokristallisiert werden. Somit könnten sie für eine Stabilisierung der RAS-bindenden SOS-Konformation führen. Bei hohen Konzentrationen könnte diese Verstärkung von Protein-Protein-Wechselwirkungen (PPIs: protein protein interactions) dann zu unproduktiven Proteinkomplexen führen, wodurch der Downstream-Signalweg gehemmt würde.^{37,38}

Anlässlich dieser Ergebnisse suchten FESIK *et al.* in Kooperation mit BOEHRINGER INGELHEIM im Rahmen eines Hochdurchsatzscreenings der Vanderbilt-Substanzsammlung mit einem Nukleotid-Austauschassay nach weiteren SOS-Bindern und fanden Benzimidazol-abgeleitete Strukturen (**25** – **27**). Nach gezielter Optimierung unter Berücksichtigung der Struktur-Wirkungsbeziehungen wurden SOS-Agonisten mit nanomolarer Affinität erhalten (**28**), die wieder das zweiphasige Ansprechverhalten der ERK-Aktivierung zeigten.^{39,40}

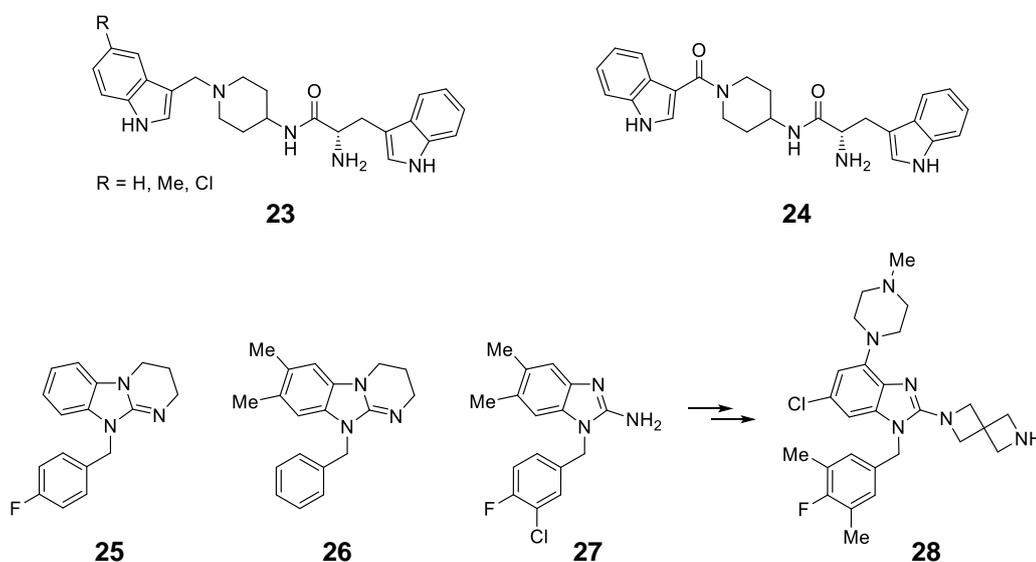


Abbildung 10: Darstellung der von FESIK *et al.* gefundenen SOS-Agonisten; oben: Derivate der ersten gefundenen Substanzklasse (**23** + **24**); unten: Benzimidazol-Verbindungen aus dem Hochdurchsatzscreening (**25** – **27**) und der optimierte SOS-Agonist (**28**).

Kurze Zeit später erschien es eine weitere Publikation zu SOS-affinen Verbindungen. BADER *et al.* (BAYER AG) fanden mit Hilfe eines Hochdurchsatzscreenings und eines Fragmentscreenings Verbindungen, die in benachbarten Bindetaschen an SOS binden. Die gefundenen Fragmente binden dabei an der von FESIK *et al.* für seine Agonisten beschriebenen Stelle über einem induced-Fit-Mechanismus. Sie weisen dabei ein ähnliches Verhalten wie die Liganden von FESIK auf. Durch Verbindung des bindenden Teils eines dieser Fragmente mit dem optimierten Inhibitor (vgl. **Abbildung 11**), der aus dem Hochdurchsatzscreening abgeleitet worden war, verbunden worden war, verstärkte dieser die inhibitorische Wirkung jedoch. Die Serie um die Verbindung BAY-293 bot somit die erste Möglichkeit nanomolare SOS1-Inhibitoren in Zellen zu beobachten. Außer der mangelnden Bioverfügbarkeit hatten die Verbindungen ein weiteres Problem in *in vivo* Tests. Die pERK-Level wurden in Zellen mit *K-RAS*-Mutation nur um etwa 50% gesenkt, während die Reduktion in Zellen mit *K-RAS*^{WT} 100% betrug. Somit scheinen *K-RAS*-Mutanten in Krebszellen auch über alternative Wege aktiviert werden zu können, während dies beim Wildtyp des Proteins nicht der Fall ist.⁴⁰

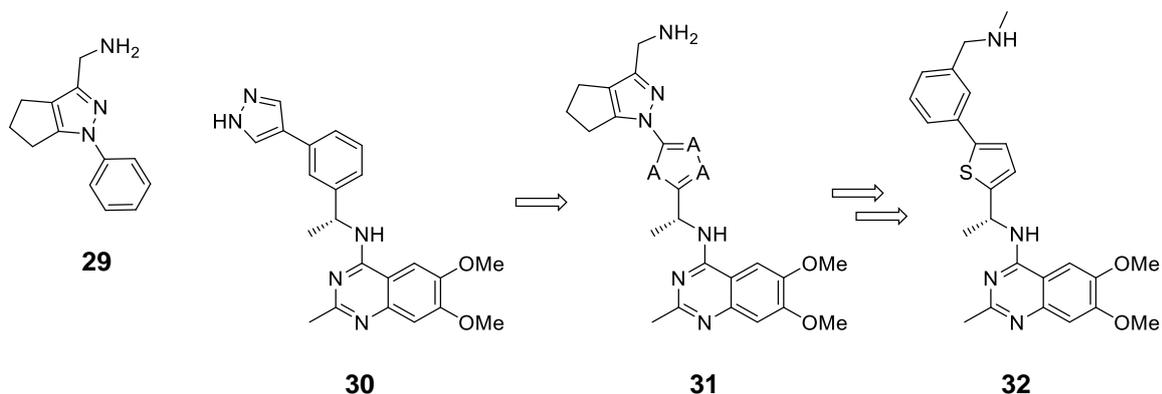


Abbildung 11: Darstellung der Entwicklung des SOS-Inhibitors bei BAYER; von links nach rechts: gefundenes Fragment, das an der von FESIK beschriebenen SOS-Bindestelle bindet (**29**); der optimierte Hochdurchsatzscreening-Hit (**30**); die aus beiden Screeninghits kombinierten SOS-Liganden (**31**); optimierter, nanomolar bindender SOS-Ligand BAY-293 (**32**).

Ein sehr ähnlicher Ligand wurde Mitte 2020 von der Firma BOEHRINGER INGELHEIM veröffentlicht. Zunächst fanden die Mitarbeiter durch ein Hochdurchsatz-Screening ein Fragment (BI-68BS (**33**)), das einem Teil der BAYER-Verbindung (**30**) entspricht. Es wies mit $K_D = 470$ nM eine signifikante Affinität für SOS1 auf, wobei die *K*-RAS-SOS-Wechselwirkung mit einem $IC_{50} = 1.3$ μ M inhibiert wurde. Durch Optimierung war es möglich, den selektiven SOS1-Inhibitor BI-3406 (**34**) zu generieren, der das dreidimensionale verankerungsunabhängige Wachstum von *K*-RAS-mutierten Zellen, aber nicht von Zellen mit *K*-RAS-Wildtyp, mit einem IC_{50} -Wert von 16 – 52 nM unterdrückt.⁴¹ Dieses verankerungsunabhängige Wachstum ist kennzeichnend für Krebszellen und bedeutet, dass die Zellen fähig sind, sich an eine neue Umgebung anzupassen. Die Dreidimensionalität bezeichnet dabei nur das Wachstum in allen drei Raumrichtungen.⁴²

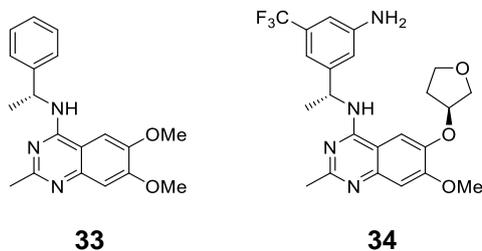


Abbildung 12: Darstellung des BI-Screeninghits BI-68BS (**33**) und des optimierten SOS1-Inhibitors BI-3406 (**34**).

Zudem ist die Verbindung in der Lage das Tumorstadium *K-RAS*-mutierter Zellen in Xenograft-Modellen zu verringern. In vielen Krebsmodellen tritt bei MEK-Inhibition üblicherweise eine Feedbackschleife auf, da eine Phosphorylierung von SOS1 durch pERK normalerweise zu dessen Inaktivierung führt. Der Ligand BI-3406 kann als Copräparat nun aber diese Feedbackschleife unterbinden, da SOS2 nicht von der Phosphorylierung durch ERK abhängt. Erste Tests bezüglich der Kombination des SOS1-Inhibitors mit MEK-Inhibitoren bezeugten das Potenzial dieser Behandlungsstrategie und Studien zur ersten klinischen Phase wurden für den verwandten SOS1-*K-RAS*-Inhibitor BI-1701963 als ersten pan-RAS-Inhibitor eingeleitet.⁴¹

Aber auch damit Nukleotidaustauschfaktoren wie SOS RAS aktivieren können, ist ein weiteres Upstream-Signal für deren Rekrutierung zur Plasmamembran notwendig. Dafür sind aktivierte Wachstumsfaktorrezeptoren wie der **EGFR** zuständig. Die Inhibitoren der Kinase-Domäne des EGF-Rezeptors wie zum Beispiel Erlotinib (**35**), Gefitinib (**36**) und Afatinib (**37**) erwiesen sich aber trotz der wichtigen Rolle des EGFR bei der Tumorigenese in klinischen Studien nicht als effektiv.^{14,21}

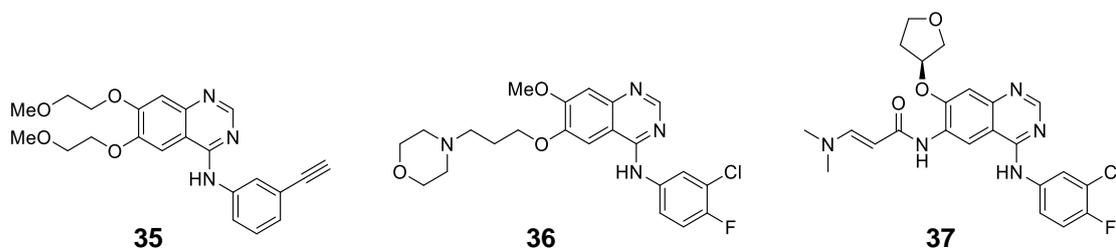


Abbildung 13: Darstellung einiger EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitoren: Erlotinib (**35**), Gefitinib (**36**) und Afatinib (**37**).

Da EGF-ähnliche Peptide Tumorzellen als autokrine Wachstumsfaktoren dienen und diese über verschiedene Rezeptoren erkannt werden, wird vermutet, dass der EGFR zwar für die Transformation aber nicht für die Aufrechterhaltung des Tumors entscheidend ist.^{14,21}

K-RAS-mutierte NSCLCs (non-small lung cancer cells) scheinen auch empfindlich auf die Inhibition des Chaperons **HSP90** (heat shock protein 90) zu reagieren, welches für die

Proteinfaltung hin zum nativen Protein für EGFR, HER2, BRAF und Akt zuständig ist. Die Monotherapie mit HSP90-Inhibitor Ganetespib (**38**) konnte bisher keine Erfolge verbuchen, jedoch werden Kombinationen mit weiteren Medikamenten weiterhin getestet.^{14,43}

Für **MET**, einen weiteren Wachstumsfaktorrezeptor, der vor allem bei EGFR-Inhibition übermäßig aktiv ist und ebenfalls die *K-RAS*-Signalwege einleitet, wurden zwei Inhibitoren bis in die klinische Phase III gebracht, welche dann aber gestoppt wurde. Neben einem monoklonalen Antikörper (Onartuzumab) wurde dabei der niedermolekulare Inhibitor Tivantinib (**39**) in Kombination mit dem EGFR-Inhibitor Erlotinib (**35**) getestet.¹⁴

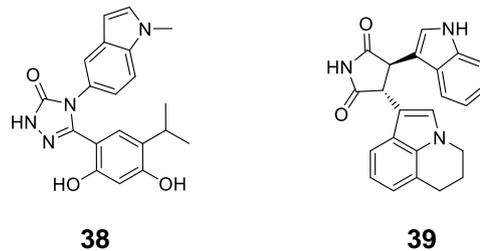


Abbildung 14: Darstellung von Ganetespib (**38**) als Inhibitor des Chaperons HSP90 und von Tivantinib (**39**) als Inhibitor des Wachstumsfaktorrezeptors MET.

1.3.3 Inhibition von Downstream-Effektoren von RAS-Proteinen

Während die Inaktivierung von onkogen mutiertem RAS durch **GAP**-Modulation schwierig ist, da das aktive Zentrum von RAS bei den Mutanten gestört ist und die katalytische Teilnahme des GAPs am Übergangszustand der GTP-Hydrolyse verhindert wird (vgl. Kapitel 2.1.3), sind für einige der Downstream-Effektoren von RAS Inhibitoren gesucht worden.

In der ersten Effektorkaskade zeigten **PI3K**-Inhibitoren wie Idealisib (**40**) und Buparlisib (**41**) vielversprechende Wirkung in Phase I-Untersuchungen. Aufgrund der

alternativen Downstream-Signalwege und deren Crosstalk konnten sich diese Substanzen in Monotherapien aber nicht weiter durchsetzen.¹⁴

Bessere Ergebnisse lieferte da das Rapamycin-Analogon Ridaforolimus (**42**), welches selektiv **mTOR** inhibiert. Der Wirkmechanismus besteht wie für das Rapamycin (**43**, auch Sirolimus genannt) darin, dass ein unproduktiver ternärer Komplex aus mTOR, Ridaforolimus und einem weiteren Protein (FKBP) gebildet wird, sodass die mTOR-Raptor-Komplexierung inhibiert wird und die Signalkaskade an dieser Stelle unterbrochen wird.^{21,44} In Phase II konnte der Wirkstoff für wesentlich mehr krankheitsfreie Überlebende und einen Trend zu allgemein höherer Lebenserwartung bei Patienten mit nicht kleinzelligem Lungenkarzinom sorgen.¹⁴

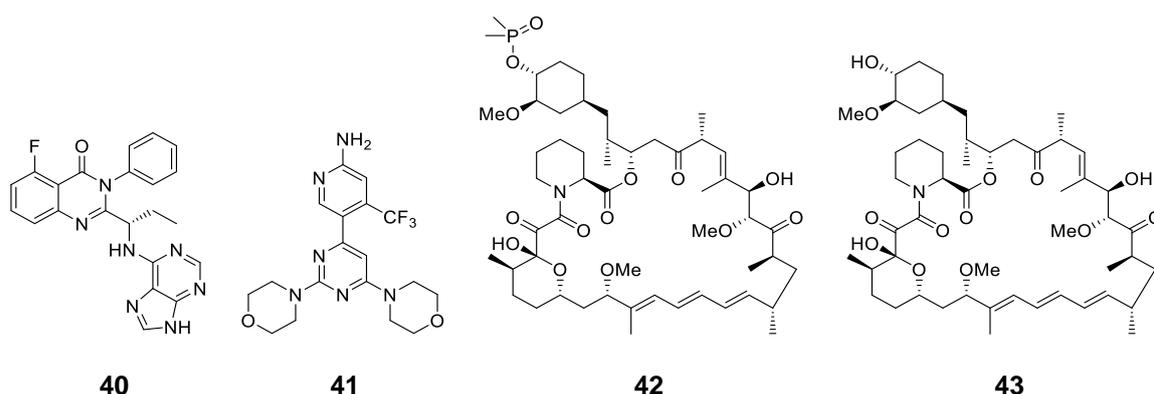


Abbildung 15: Darstellung von Inhibitoren von Effektoren des PI3K-Signalwegs: Idealisib (**40**), Buparlisib (**41**), Ridaforolimus (**42**) und Rapamycin (**43**).

Die Aktivierung der Serin-Threonin-Kinase **BRAF**, als erster Effektor der zweiten Effektorkaskade, ist für die tumorigenetische Transformation unabdingbar.⁴⁵ Selektive Inhibitoren wurden zunächst für die BRAF^{V600E}-Mutante gefunden, wobei diese im Verhältnis zu RAS-Mutationen selten auftritt. Weiterhin war Sorafinib (**44**), ein Multikinaseinhibitor, zwar in der Lage auch BRAF zu inhibieren, konnte in Studien der klinischen Phase III aber keine ausreichend positive Wirkung in Patienten mit nichtkleinzelligem Lungenkrebs erzielen.¹⁴ Ein kompetitiver Hemmer der RAF-RAS-Wechselwirkung, Rigosertib (**45**), führt zur Inhibierung des MAP-Kinase-Wegs. Dieser Inhibitor bindet an den RAS-bindenden Domänen (RBD) von BRAF ($K_D = 0.71$ nM) und

CRAF ($K_D = 0.18 \text{ nM}$). In vielen Krebszelllinien führt eine Behandlung mit Rigosertib zur Apoptose, während normale Zellen unbeeinflusst bleiben. Auch in Phase III-Studien waren bisherige Ergebnisse gut, wobei weitere Studien nötig sind, um den klinischen Nutzen der Verbindung zu optimieren.^{46,47}

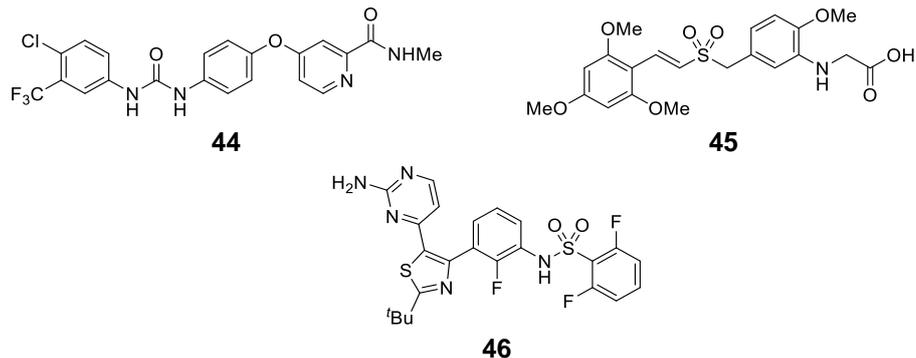


Abbildung 16: Darstellung verschiedener BRAF-Inhibitoren: Sorafenib (**44**), Rigosertib (**45**) und Dabrafenib (**46**).

Als weiteres Target im MAP-Signalweg wurde die Kinase **MEK** adressiert. Der MEK-Inhibitor Selumetinib (**47**) wurde in Kombination mit dem Zytostatikum Docetaxel bis in Phase III getestet, wobei sich aber keine Verbesserung zur reinen Chemotherapie zeigte.¹⁴ Nach Abbruch der Phase III-Tests wurden die Ergebnisse der zweiten klinischen Phase genauer betrachtet, wobei eine deutlich höhere Empfindlichkeit der G12V- und G12C-Mutanten als bei anderen RAS-Mutanten bemerkt wurde.⁴⁸

Trametinib (**48**) als weiterer MEK-Inhibitor verhinderte das Zellwachstum in *K*-RAS-mutierten Zellen und zeigte im direkten Vergleich ähnliche Aktivität wie Docetaxel bei Studien der klinischen Phase II. Kombination dieses Inhibitors mit dem BRAF-Inhibitor Dabrafenib (**46**) führte zu klinisch sinnvoller Antitumoraktivitäten bei Patienten mit zuvor unbehandelten nicht kleinzelligen Lungenkarzinomen mit BRAF^{V600E}-Mutation.^{14,49}

Es wird vermutet, dass eine duale Inhibition der PI3K- und MAP-Signalwege sinnvoll sein könnte, da Rückkopplungsschleifen somit eventuell unterbunden werden könnten. Erste

Tests verschiedener Kombinationen zeigen gute Verträglichkeit und eine Aktivität gegen Krebs.¹⁴

Abgesehen von den hier beschriebenen Zielproteine werden weiterhin Targets für die Therapierung von Krebsarten mit mutiertem *K*-RAS gefunden. 2019 wurde festgestellt, dass mit Hilfe des Wirkstoffs PHT-7.3 (**49**) die PH-Domäne (Pleckstrin Homology) des Cnksr1 (connector enhancer of kinase suppressor of Ras 1) inhibiert werden kann. Dadurch kann die Colokalisation von mutiertem *K*-RAS und Cnksr1 verhindert werden. Da Cnksr1 als Gerüstprotein für eine erhöhte Effizienz des RAS-Signalwegs sorgt, führte seine Inhibition zu einer Verringerung des Zellwachstums *K*-RAS-mutierter Zellen. Die PH-Domäne von Cnksr1 erwies sich somit als ein mögliches neues therapeutisches Target.¹⁷

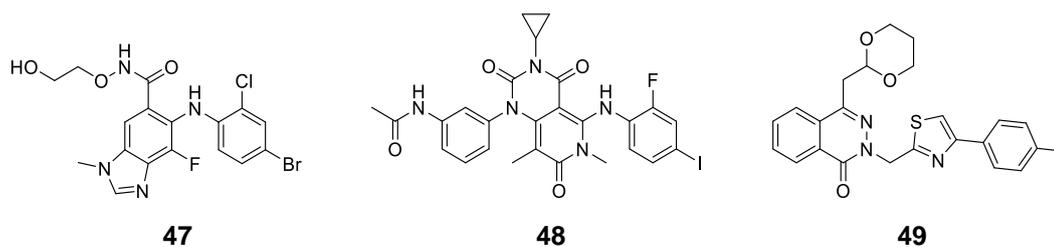


Abbildung 17: Darstellung der MEK-Inhibitoren Selumetinib (**47**) und Trametinib (**48**) sowie des Inhibitors PHT-7.3 (**49**) des Cnksr1.

2 Allgemeiner Teil

2.1 Die Schaltfunktion von *K*-RAS auf struktureller Ebene

2.1.1 *K*-RAS-Struktur

Für eine sinnvolle Einordnung direkter *K*-RAS-Inhibitoren ist eine Erläuterung des strukturellen Aufbaus von *K*-RAS beziehungsweise RAS-Proteinen unabdingbar. Diese Gruppe kleiner GTPasen besteht aus drei funktionellen Domänen, die sich insgesamt aus sechs β -Strängen mit fünf flankierenden α -Helices und zehn Loops zusammensetzen. Die drei Domänen sind in die Effektor-Domäne (AS 1 – 86), den allosterischen Lappen (AS 87 – 166) und die Hypervariable Region (HVR; AS 167 – 188/189) unterteilt (**Abbildung 18**), wobei die Effektor-Domäne für alle RAS-Isoformen die identische Sequenz aufweist.¹⁹

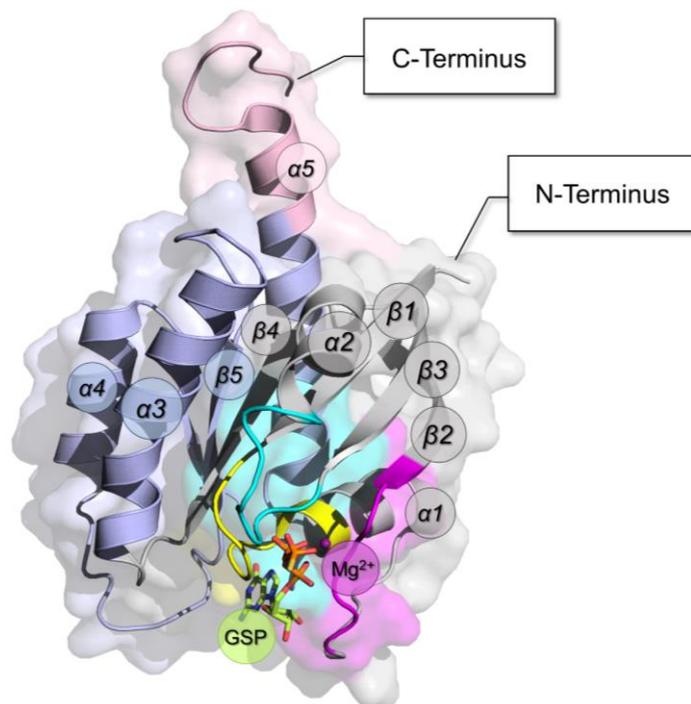


Abbildung 18: Struktureller Aufbau von *K*-RAS (PDB:4DSO): allosterische Domäne (blau); Effektor-Domäne (grau) mit dem dazugehörigen P-Loop (gelb) und den Switch I- (magenta) und Switch II-Regionen (cyan); HVR (rosa und nur ansatzweise dargestellt).

Sie enthält dabei auch die für die Konformationswechsel der RAS-Proteine entscheidenden Regionen: die Switch I- (SWI, AS 32 – 38 bzw. 30 – 40) und Switch II-Region (SWII, AS 59 – 67 bzw. 60 – 76) sowie den P-Loop (AS 10 – 17).^{*} Die Angaben der Aminosäuren dieser Regionen variieren von Quelle zu Quelle.^{21,50}

Der allosterische Lappen ergänzt die Effektor-domäne zum Gesamtkonstrukt der katalytischen G-Domäne (AS 1 – 166), wobei er unter den RAS-Isoformen eine Übereinstimmung von 86% besitzt. Die allosterische Domäne ist bei der RAS-Dimerisierung und bei Membran-Interaktionen involviert. Neuere Strukturstudien weisen darauf hin, dass sich die α 5-Helix über Histidin 166 hinaus bis zu den Aminosäuren 172 – 174 erstreckt, sodass die katalytische Domäne ebenfalls um diesen Bereich erweitert würde (vgl. **Abbildung 18**: rosaner Bereich der α 5-Helix).¹⁹

Die Hypervariable Region als letztes Element der RAS-Proteine enthält das CAAX-Motiv und weist ansonsten eine hohe Diversität zwischen den einzelnen RAS-Isoformen auf. Sie ist in die Membranadressierung eingebunden und steuert zudem die Orientierung der G-Domäne im Bezug zur Membran.¹⁹

^{*} In dieser Arbeit werden einheitlich die kleineren Aminosäuresequenzen für die farbige Kennzeichnung dieser Bereiche in Abbildungen verwendet, wobei auf den immer gleichen Farbcode geachtet wurde. Auch bei der Darstellung der Nukleotide wurde auf eine einheitliche Farbgebung des Kohlenstoffgerüsts geachtet, wobei das Guanosintriphosphat oder seine Analoga in grün und das Diphosphat in orange dargestellt ist.

2.1.2 Funktion verschiedener RAS-Konformationen

Bei allen Protein-Protein-Wechselwirkungen mit den Effektoren sind die Konformationsänderungen der SWI/II-Region entscheidend (**Abbildung 19**).²⁰

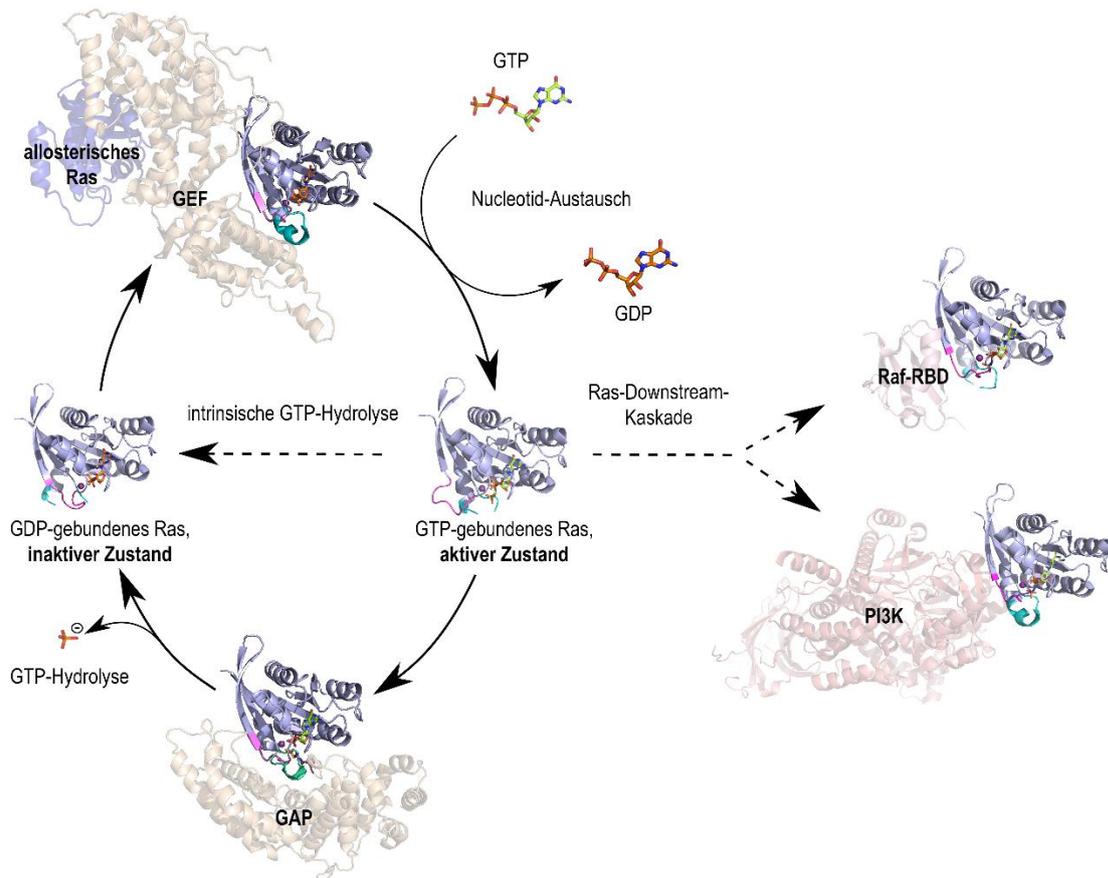


Abbildung 19: Darstellung des Aktivierungszyklus von RAS im Hinblick auf die räumliche Orientierung gegenüber seinen Wechselwirkungspartnern (PDB-Codes: 5UK9 (GDP- und GCP-K-RAS^{WT}), 1WQ1 (*H-RAS*/GAP), 1XD2 (*H-RAS*/SOS), 4G0N (*H-RAS*/Raf-RBD), 1HE8 (*H-RAS*/PI3K)).

Dabei kommen die Konformationswechsel durch die unterschiedliche Nukleotidbeladung zustande. Für Beladung mit GTP ist aufgrund der niedrigen Dissoziationsrate von GDP (vgl. Kapitel 1.2.2) eine Änderung der Konformation durch Wechselwirkung mit einem GEF nötig. Wurde RAS in den GTP-gebundenen Zustand überführt, so liegt eine deutlich geschlossener Form der Nukleotidbindestelle vor. Dabei koordinieren die Aminosäuren Threonin 35 (SWI) und Glycin 60 (SWII) über Wasserstoffbrücken das γ -Phosphat des

Guanosintriphosphats (**Abbildung 20**). Bei der Hydrolyse zu Guanosindiphosphat wird dieses γ -Phosphat aber freigegeben, sodass diese Wechselwirkung nicht mehr möglich ist. Die Switch-Regionen entspannen sich und werden deutlich flexibler. Hierbei kann also von einem „Loaded-Spring-Mechanismus“ gesprochen werden.²⁰

Dass der GTP-Zustand in der Region von Switch I und Switch II tatsächlich deutlich starrer ist, als die GDP-Form von RAS ist im Experiment dadurch zu erkennen, dass in Kristallstrukturen häufig die Elektronendichte der Switch II-Region fehlt. Bei NMR-Untersuchungen ist hingegen die GTP-Form schwerer zu beobachten, da es zu einer Linienverbreiterung kommt.

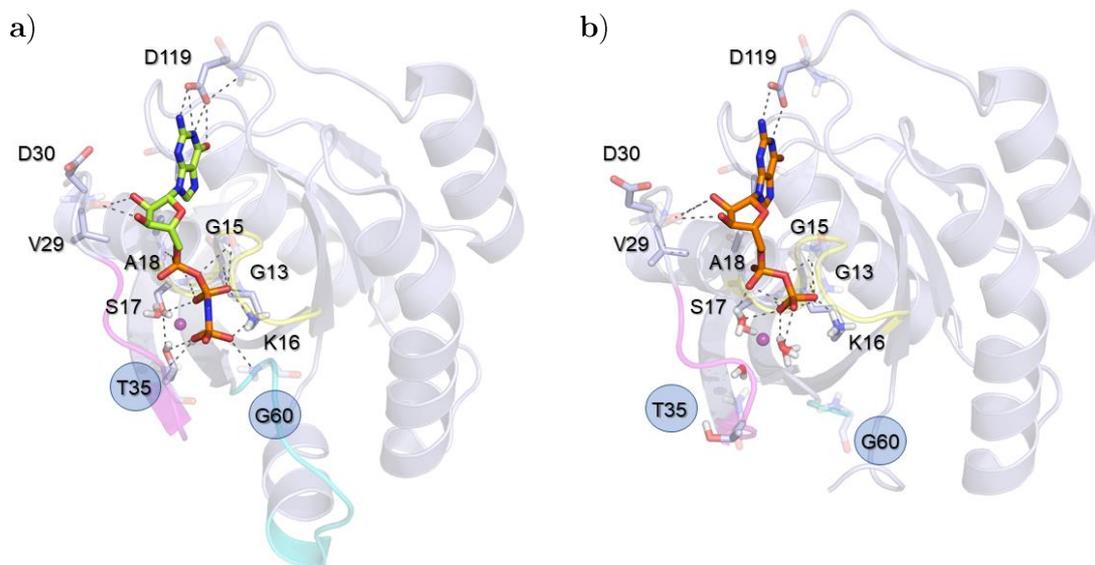


Abbildung 20: Bindungssituation an der Nukleotid-Bindestelle von *K-RAS4B* a) im GTP-gebundenen Zustand (PDB:3GFT) und b) im GDP-gebundenen Zustand (PDB:4LPK).²⁰

Dennoch konnte durch NMR-Experimente die Existenz zweier GTP-gebundener RAS-Stadien nachgewiesen werden. Diese Zustände bestehen aus zwei sich schnell ineinander umwandelnden Konformationen, wobei nur Stadium 2 in der Lage zu sein scheint, Downstream-Effektoren zu binden. Diese Annahme beruht auf Gleichgewichtsverschiebungen zwischen den beiden im NMR-Experiment unterscheidbaren Stadien. So verschiebt sich dieses Gleichgewicht bei Anwesenheit der RAS-bindenden Domäne von RAF

(RAF-RBD) hin zu Stadium 2, während Mutationen, die eine RAS-Effektorwechselwirkung verhindern (T35S/T35A, G60A), zu einer Priorisierung von Stadium 1 führen. Diese Ergebnisse zeigen zudem, dass der GTP-gebundene Zustand in seiner konformativen Stabilität angreifbar zu sein scheint. Gelingt es zum Beispiel die Interaktionen von Glycin 60 und Threonin 35 mit dem γ -Phosphat zu stören, so scheint auch der GTP-Zustand von RAS keine produktiven Wechselwirkungen mehr eingehen zu können.²⁰

Ebenfalls über NMR-Experimente wurde ein weiterer Unterschied der GDP- und GTP-gebundenen Konformationen entdeckt. Aufgrund ihrer Beobachtung, dass die hochvariable Region von *K*-RAS bei der Bindung von GDP die Fähigkeit verliert mit Calmodulin wechselzuwirken, nahmen NUSSINOV *et al.* an, dass die HVR im GDP-gebundenen Zustand mit anderen Teilen des RAS-Proteins wechselwirkt. Verschiedene Experimente, die sie im Zuge der Nachforschungen zu dieser Hypothese anstellten, untermauerten den Rückschluss. Dabei tauchen zum Beispiel beim Vergleich von unterschiedlichen *K*-RAS-Varianten, die sich in ihrer Sequenzlänge (166 und 188 AS) unterscheiden, signifikante Änderungen der chemischen Verschiebung in ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren für die HVR in Abhängigkeit des gebundenen Nukleotids auf. Auch im Bereich der katalytischen Domäne waren solche Unterschiede im Switch I-Bereich, dem β 2-Faltblatt und der α 5-Helix zu beobachten. Bei Mutation zweier Lysine der HVR-Region (K180A und K182A) zeigten sich für die Switch I-Region und die α 1-Helix deutliche Veränderungen. Diese Daten deuten auf eine Wechselwirkung der HVR mit der katalytischen Domäne der GDP-gebundenen Form hin. Für synthetische Peptide, die der Sequenz der HVR entsprechen, wurden Dissoziationskonstanten an die verkürzte *K*-RAS-Variante (AS 1 – 166) gemessen, wobei die Peptide mit 250 nM deutlich stärker an die GDP-Form banden als an die GTP-Form (18.6 μM). Die Abweichungen der chemischen Verschiebungen der RAS-Signale wiesen dabei eine deutliche Ähnlichkeit zu den Unterschieden in den Spektren des RAS-Proteins mit gesamter Sequenzlänge auf.

Bei voller Sequenzlänge ist das *K-RAS4B*-Protein im GDP-Zustand nur zu einer noch schlechteren Bindung von RAF fähig als die verkürzte Variante. Im GTP-Zustand hingegen ist die Variante inklusive HVR zur besseren Wechselwirkung mit RAF in der Lage. Aus diesen Ergebnissen schließen die Autoren auf eine mögliche autoinhibitorische Wirkung der HVR auf den GDP-gebundenen Zustand und somit eine wichtige Funktion der HVR für die korrekte Signaltransduktion durch *K-RAS*.⁵¹

2.1.3 Folge von Punktmutationen der RAS-Gene

Wie bereits in Kapitel 1.1.3 gezeigt, handelt es sich bei den meisten *K-RAS*-Mutationen, die in Krebszellen vorliegen, um Punktmutationen der Aminosäuren der Positionen 12, 13 und 61. Diese Häufigkeit hat ihren Grund in der strukturellen Auswirkung dieser Mutationen auf die Hydrolysefähigkeit von *K-RAS*. Das in der Switch II-Region befindliche Glutamin 61 hat dabei eine direkte Funktion für die GTPase-Aktivität, da es das bei der Hydrolyse am γ -Phosphat angreifende Wassermolekül positioniert und den Übergangszustand stabilisiert (**Abbildung 21**).⁵²

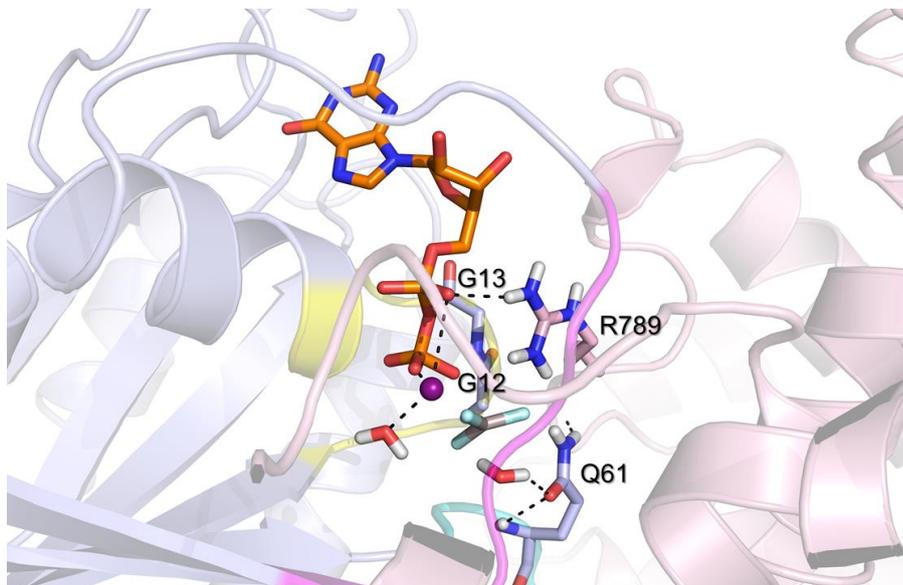


Abbildung 21: Darstellung der Nukleotidbindungsstelle im zu *K-RAS* analogen Komplex von *H-RAS* (blau) und GAP344 (rosa), wobei das dargestellte AIF₃ als Analogon des γ -Phosphates verstanden werden kann (PDB:1WQ1).⁵³

Eine Mutation der beiden Glycine 12 und 13 aus dem P-Loop erzeugt dagegen einen sterischen Konflikt, da der für die katalytische Wirkung des GAPs existenziell wichtige Argininfinger (R789) im Übergangszustand der Hydrolyse eine Position in der Nähe dieser Aminosäurereste einnimmt. Für die Position 12 führt jede Aminosäure außer Glycin und Prolin zum Verlust der Fähigkeit zur GAP-vermittelten GTP-Hydrolyse. Für Glycin 13 sind etwas mehr Variationen ohne Verlust der GAP-katalysierten GTPase-Aktivität erlaubt, da diese Aminosäure im Übergangszustand etwas mehr Abstand zum Argininfinger aufweist. Mutationen aller drei Reste haben aber weitreichende Folgen für die Signalwege downstream von RAS. Ohne die Hydrolyse zu GDP bleibt RAS in seiner aktiven GTP-gebundenen Form (**Abbildung 19**) und sendet somit ununterbrochen Signale für Zellwachstum und -proliferation. Dadurch kommt es zu einem raschen Wachstum der Tumorzellen.⁵²

2.2 Fortschritte bei der Suche nach *K*-RAS-Inhibitoren

Aufgrund seiner Schlüsselrolle bei diesen Prozessen ist *K*-RAS ein wichtiges therapeutisches Target bei der Bekämpfung von Krebs. Die Suche nach RAS-Inhibitoren ist aufgrund der picomolaren Affinität gegenüber seinem Substrat, dem GTP, und das Fehlen zusätzlich klar definierter und tiefer Bindestellen erschwert.⁵⁴ Ein weiteres Problem einer Inhibition des RAS-Proteins ist die Abhängigkeit vieler weiterer Proteine von GTP. Somit könnten bei kompetitiver Hemmung Off-Target-Effekte auftreten.

Die Schwierigkeit der direkten RAS-Adressierung durch sowohl kompetitive als auch allosterische Hemmstoffe wird durch die Abwesenheit klinisch wirksamer Inhibitoren für onkogenes RAS trotz langjähriger Forschung über die letzten drei Jahrzehnte unterstrichen. Jedoch kam es durch die Entdeckung einer neuen Bindestelle durch die Arbeitsgruppen von MAURER *et al.*, FESIK *et al.* und SCHERKENBECK *et al.* zu einer Wiedergeburt dieses Themas, welche zu deutlichen Fortschritten bei der Inhibition von *K*-RAS führte.^{20,55-57}

Die Strategien, die hinter den Erfolgen stehen, sind unterschiedlicher Natur und leiten sich aus der Funktion der RAS-Proteine ab. So sind folgende Wege für die Inhibition von RAS möglich:²¹

- I) Anteil an aktivem RAS senken durch direkte Minimierung der Konzentration an GTP-gebundenem *K*-RAS (z.B. durch Verhinderung einer korrekten Membraneinbettung oder die Inhibition einer RAS-GEF-Wechselwirkung)
- II) Störung der RAS-Effektor-Wechselwirkung durch Inhibition von PPIs oder durch Verschiebung von Stadium 2 zu Stadium 1 des GTP-gebundenen Zustandes
- III) Förderung unproduktiver PPIs

Eine weitere potenzielle Möglichkeit der Verringerung der RAS-Aktivität könnte die Unterbindung der Bildung von RAS-Dimeren oder höheren Multimeren an der Plasmamembran sein. Es gibt Befunde, dass *H*-RAS in dimerer Form deutlich stärker aktivierend auf CRAF wirkt als sein Monomer. Zudem bilden auch die anderen Isoformen Dimere an den Membranen. Bisher ist ungeklärt, welche Interaktionen genau zur Dimerisierung dieser kleinen GTPasen führen. Hier konnten keine aufschlussreichen Kristallstrukturen gewonnen werden, während in Modelling-Studien zwei Möglichkeiten von Wechselwirkungsflächen gefunden wurden.^{19,54}

Da die Unterteilung nach den Strategien vor dem Hintergrund dieser Arbeit nicht so bedeutend ist wie die korrekte Einordnung des Bindungsmodus am *K*-RAS-Protein, werden im Folgenden die einzelnen Bindestellen diskutiert. Die Schwierigkeit bei der gleichzeitigen Sortierung nach Funktion der Inhibitoren kommt durch die ähnliche Lage von GEF- und Effektorbindestellen zustande (vgl. **Abbildung 19**). Dadurch können Binder der gleichen Proteinregion zu deutlich verschiedenen Effekten führen. Die verschiedenen Bindestellen sind in **Abbildung 22** zusammenfassend dargestellt.

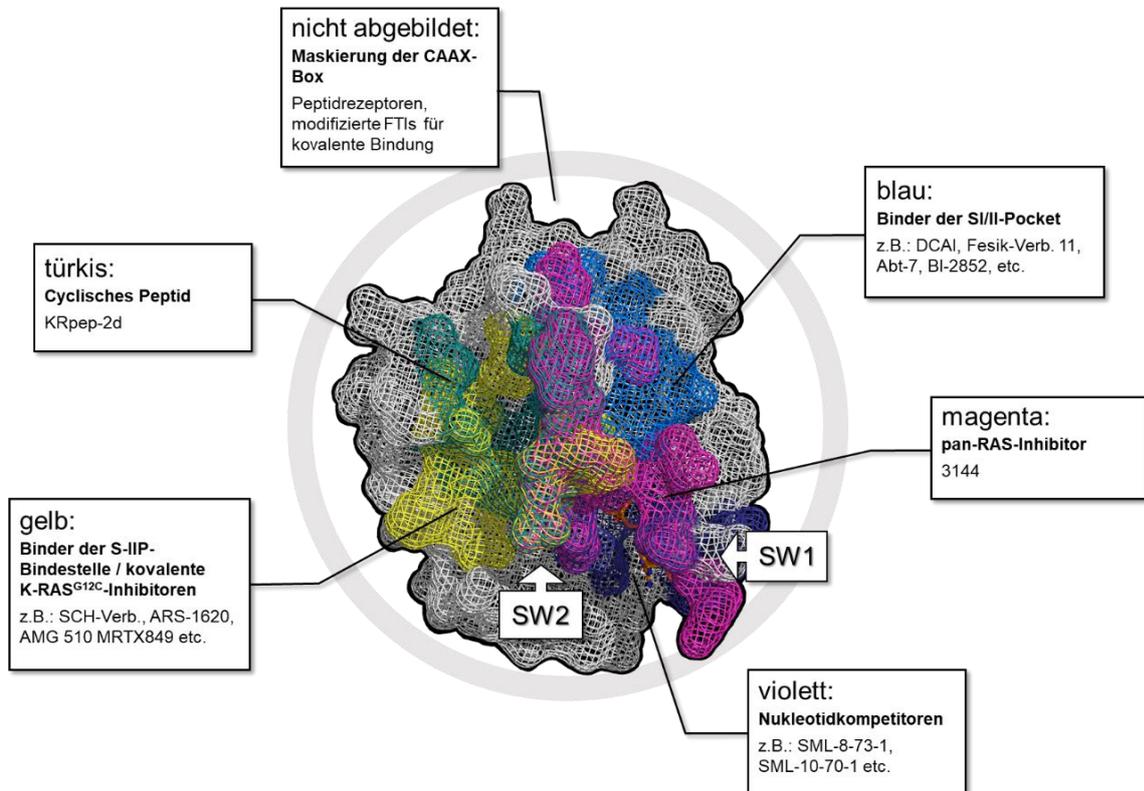


Abbildung 22: Übersicht über die verschiedenen Bindestellen an *K-RAS* (PDB:5XCO) mit Beispielen für Liganden, die an die betreffende Region binden. Die Aminosäuren der Bindestellenoberflächen wurden aus den jeweiligen PDB-Dateien gewonnen (6OIM, 4NMM, 5XCO, 4DST, 6FA4, 6GJ8, 5F2E, PDB-Datei von der gedockten Struktur von 3144).

Eine Ausnahme bei dieser Sortierung bilden die Antikörper und kleinere peptidische Strukturen, die gesondert von den für diese Arbeit relevanteren niedermolekularen Inhibitoren beschrieben werden.

2.2.1 Zerstörung von PPIs durch Antikörper, Antikörperfragmente und Antikörpermimetika

Der Nachweis, dass RAS als therapeutisches Zielprotein von Interesse ist, gelang durch die Adressierung von *H-RAS* mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers im Jahr 1982. Dieser war in der Lage die *H-RAS*-bedingte Proliferation und onkogene Transformation zu blockieren. Jedoch fehlten diesem Antikörper die Resistenz gegen das reduzierende Potenzial des Zellinneren und eine vernünftige Plasmamembranpermeabilität.¹⁹ Mittlerweile ist auch diese Problematik überwunden und es gibt internalisierende Antikörper, die nach systemischer Verabreichung (also über das Blut- bzw. Lymphsystem) Antitumoreffekte in Maus-Xenograft-Modellen zeigen. Dabei bindet der Antikörper in der SWI- und SWII-Region von GTP-gebundenem RAS und interferiert dadurch mit den PPIs und somit der Assoziation zwischen RAS und Effektormolekülen.¹⁸

Zudem wurden bereits vorher Einzeldomänen-Fragmente von Antikörpern entworfen, die im niedrig nanomolaren Bereich an aktiviertes RAS binden. Dieses Antikörperfragment iDab#6 (designated intracellular Domain antibody) von RABBITS *et al.* bindet bei SWI in Bindungsregionen von RAF und PI3K. Dieser „Intrabody“ konnte bei mehreren RAS-Mutationen der drei RAS-Isoformen die Signaltransduktion hemmen und die onkogene Transformation verhindern. Da das Molekül mit etwa 25 kDa sehr groß und membranundurchgängig ist, gibt es hierfür bisher keine therapeutische Anwendbarkeit.^{19,58}

Weiterhin wurde ein chimärer Antikörper entworfen, der aus einem spezifischen Antikörperfragment für aktives RAS und einem permeablen Antikörper zusammengesetzt wurde. Dieser Antikörper RT11 besitzt ebenfalls niedrig nanomolare Affinität für die GTP-gebundene Form von RAS-Proteinen. Unglücklicherweise gilt dies für verschiedene Mutationen aber auch die Wildtyp-Proteine der drei Isoformen. Durch Modifikation des *N*-Terminus mit einem zyklischen Peptid für eine höhere Selektivität entstand die Variation RT11-i. Dieser Antikörper weist günstige Pharmakokinetiken und eine gute

Bioverfügbarkeit auf und konnte nach systemischer Administration eine *in vivo* Inhibition des Tumorwachstums von Zellen mit onkogenen RAS-Mutanten induzieren.¹⁸

2019 berichteten RABBITS *et al.* von einem Antikörpermimetikum, welches den Nukleotidaustausch durch GEFs inhibiert. Dieses kleine Protein (<20 kDa), genannt DARPin K27 (Designed Ankyrin Repeat Protein), besitzt nanomolare Affinität für einen Bereich der allosterischen Domäne ($\alpha 3$ /Loop 7/ $\alpha 4$) von GDP-gebundenem *K*-RAS und *H*-RAS und inhibiert die Bindung an SOS. Die intrazelluläre Expression dieses Proteins reduzierte die Konzentrationen von phosphoryliertem ERK und Akt, ebenso wie das Wachstum von Kolorektalkrebszellen mit *K*-RAS^{G12D}-Mutation. Dieses Ergebnis zeigt, dass auch die Adressierung der allosterischen Domäne erfolgreich für eine Inhibierung der RAS-Funktion genutzt werden kann.⁵⁹

2.2.2 RAS-Adressierung mit kleineren peptidischen Strukturen

Abgesehen von Antikörperfragmenten und -mimetika wurde ein zellpermeables und synthetisches α -Helix-Mimetikum hergestellt. HBS3 (**50**), wie dieses Peptid genannt wurde, beinhaltet dabei die Aminosäuren 929 – 944 von SOS1, wobei die intramolekulare Wasserstoffbrücke durch eine kovalente Bindung ersetzt wurde, um das Helix-Motiv zu konservieren.

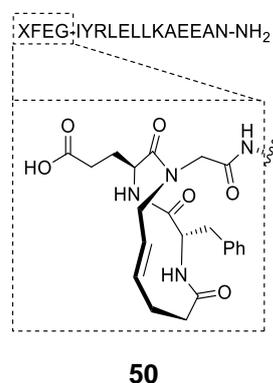


Abbildung 23: Darstellung des α -Helix-Mimetikums HBS3 (**50**), mit der kovalenten Bindung nach vorne gerichtet, welche die intramolekulare Wasserstoffbrücke ersetzt.

Diese synthetische Variante der mit RAS wechselwirkenden α -Helix bindet tatsächlich in der SOS-bindenden Region von *H-RAS* und blockiert die Wechselwirkung mit seinem GEF, wobei in Zellen eine mäßige Reduktion der GTP-RAS- und pERK-Konzentrationen zu beobachten war.⁶⁰ Ein weiteres zellpermeables Protein, SAH-SOS1, reduziert bei mikromolaren Konzentrationen die ERK- und Akt-Phosphorylierung und sorgt für eine reduzierte Überlebensfähigkeit von *K-RAS*^{G12D}-mutierten Zellen, jedoch gibt es keine weiterführenden *in vivo* Ergebnisse.⁶¹

Ein weiterer Ansatz bei der Suche nach peptidischen RAS-Inhibitoren ist die kombinatorische Chemie, mit deren Hilfe große Substanzbibliotheken synthetisiert und am Protein getestet werden können. Auf diese Weise wurde ein erstes zyklisches Peptid (**51**) gefunden, das in der Lage ist, die Interaktion von *K-RAS* mit den RBDs der Effektoren RAFm, TIAM1 und RAL-GDS *in vitro* zu verhindern. Die Idee dieser Arbeit beruhte dabei auf dem „Rapalog-Konzept“ (Rapamycin analog). Genau wie Rapamycin sollten die gefundenen Inhibitoren das Protein FKBP binden, um einen unproduktiven ternären Komplex mit dem Zielprotein, hier *K-RAS*, zu bilden, wodurch die PPIs mit anderen Proteinen verhindert werden. Daher wurden die Sequenzen auf Basis des kleinsten FKBP-bindenden Fragmentes synthetisiert. Es zeigte sich aber, dass der beobachtete inhibitorische Effekt von FKBP unabhängig war. Somit müsste das Peptid in seiner Sequenz an der Stelle optimierbar sein, die zur Bindung des FKBP diene.⁶²

Die zusätzlich zu optimierende Zellaktivität aufgrund fehlender Membranpermeabilität bot Anlass zur Entwicklung des Derivates „Cyclorasin 9A5“ (**52**). Dieses weist einen IC₅₀-Wert von 0.12 μ M auf und ist in der Lage die ERK- und Akt-Aktivierung in RAS-mutierten Zellen zu reduzieren. Ein weiteres Derivat zeigte sich *in vitro* potenter, erwies sich jedoch als weniger membrandurchlässig. Cyclorasin 9A5 reduziert die Proliferation und induziert die Apoptose bei Zellen aus Lungenkarzinomen. Bei Bindungsstudien zeigte sich, dass dieses zyklische Peptid in der Region der SI/II-Bindestelle (vgl. **Abbildung 22**) bindet.

Einen anderen Bindungsmodus weist das zyklische Peptid KRpep-2d (**53**) auf. Diese Bindestelle ist in **Abbildung 22** separat gekennzeichnet und befindet sich im allosterischen Bereich. KRpep-2d ist dabei in der Lage, die GEF-Bindung selektiv für *K*-RAS^{G12D} zu blockieren, wobei Wechselwirkungen mit der Switch II-Region die allosterische Inhibition hervorzurufen scheinen.⁶³ KRpep-2d weist Probleme bei der Membrandurchdringung und bei der Stabilität im Zytosol auf. Da die Zyklisierung des Peptids durch eine Disulfidbrücke erreicht wird, wird die zyklische Struktur unter den reduktiven Bedingungen im Zellinneren aufgelöst. Somit sind hier Optimierungen notwendig.¹⁹ Die hier vorgestellten peptidischen Inhibitoren decken nicht den vollständigen Bereich aller RAS-Binder dieser Substanzklasse ab, stellen aber deren wichtigste Vertreter dar.^{64,65}

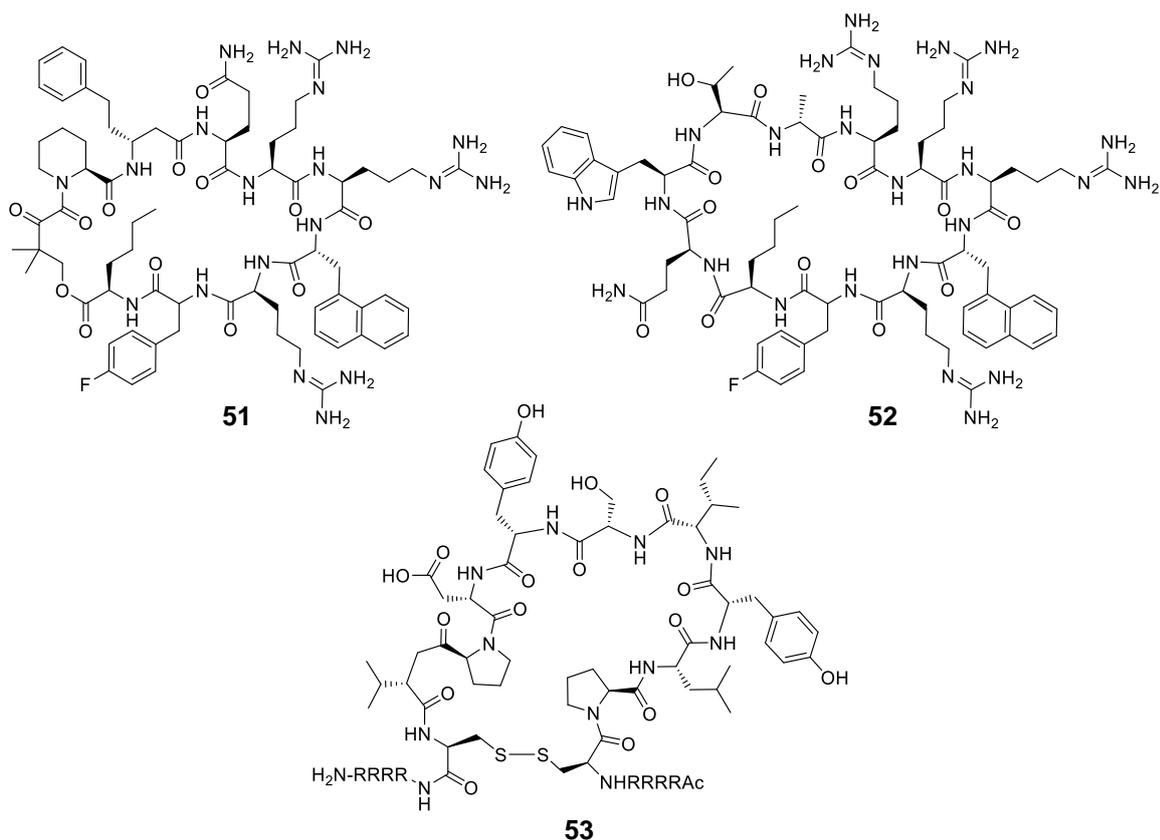


Abbildung 24: Darstellung der zyklischen Peptide **51**, **52** (Cyclorasin 9A5) und **53** (KRpep-2d).

2.2.3 Inhibition der Farnesylierung durch C-terminales Capping von RAS

Ebenfalls peptidische Strukturen wurden 2014 von DÜPPE *et al.* für die sequenzselektive Erkennung der CAAX-Boxen verschiedener GTPasen beschrieben. Durch kombinatorische Chemie wurden peptidische Sequenzen gefunden, deren Assoziation an fluoreszenzmarkierte CAAX-Boxen von *K*-RAS, *H*-RAS und Rheb nachgewiesen werden konnte (**Abbildung 25**). Die Assoziationskonstante des jeweiligen Peptids wurde mit Hilfe von UV-Titrationsen ermittelt und lag im besten Fall bei $K_A = 5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, während STD-NMR-Messungen laut Publikation ebenfalls eine Bindung der Liganden zeigten.⁶⁶ Die Verbindungen waren jedoch nicht potent genug und müssen hinsichtlich ihrer Affinität optimiert werden. Dabei könnte eine zielgerichtete Adressierung der Polylysinsequenz von *K*-RAS4B oder eine kovalente Bindung der weiterhin posttranslational modifizierten Cysteine der anderen Isoformen für einen Affinitätszuwachs genutzt werden. Auch die schlechte Zellpermeabilität peptidischer Strukturen macht eine weitere Optimierung notwendig. Ist diese Optimierung erfolgreich, könnten diese Moleküle selektive Inhibitoren für die posttranslationale Modifikation der CAAX-Boxen darstellen.

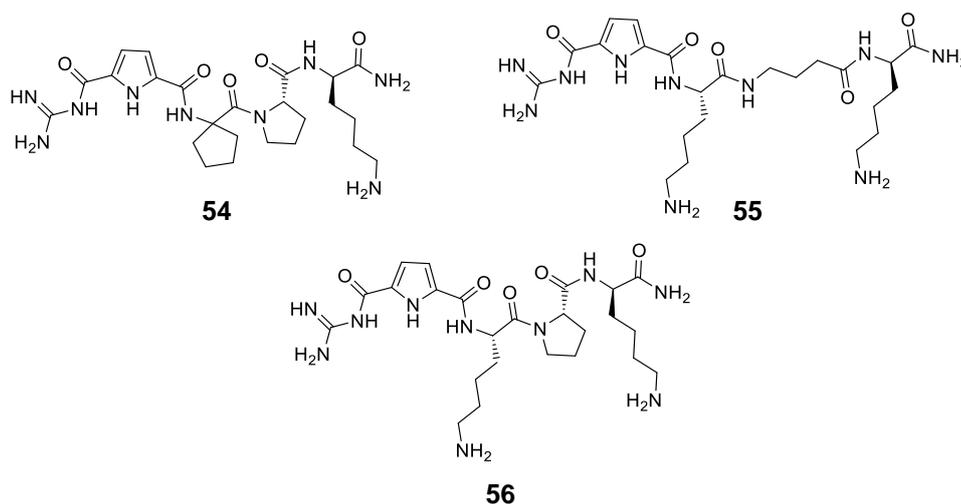


Abbildung 25: Abbildung der sequenzselektiven CAAX-Box-Rezeptoren (**54** – **56**).

Weniger selektiv zu sein scheinen CAAX-Box-Modifikatoren von SHOKAT *et al.*, welche aus modifizierten Farnesyltransferaseinhibitoren (FTIs) bestehen (**Abbildung 26**). Die

integrierte elektrophile Funktion ist in der Lage das CAA_X-Motiv von *K*-RAS in Zellen posttranslational durch kovalente Bindung zu modifizieren. Dadurch wird neben der FTase-Inhibition eine Verhinderung der Prozessierung durch die Geranylgeranyltransferase ermöglicht. Neben einer Fehllokalisierung von *K*-RAS führten diese Inhibitoren aber nur zu geringer Reduzierung der Konzentration phosphorylierten ERKs (pERK). Unter Zusatz von Lovastatin (**59**), welches die Lipidkonzentration an Farnesylpyrophosphat als Substrat der FTase senkt, konnte die Fehllokalisierung dann aber verbessert und das pERK-Level deutlich gesenkt werden.⁶⁷ Die Frage der Selektivität bleibt jedoch bestehen, da viele weitere Proteine durch die FTase modifiziert werden¹⁹ und die kovalente Modifikation keine sequenzerkennende Funktion enthält.

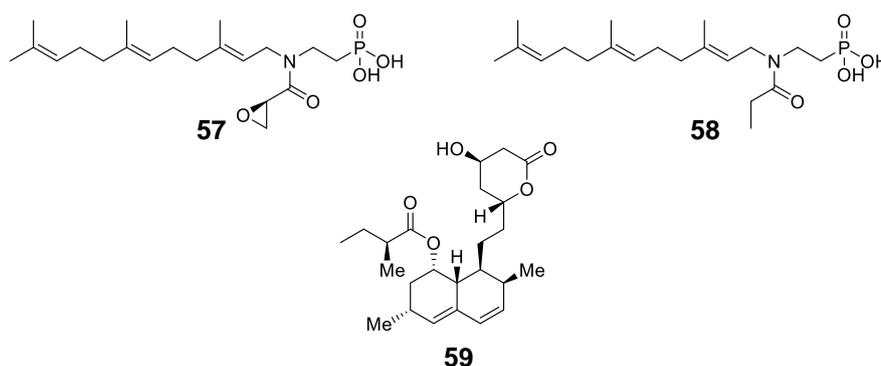


Abbildung 26: Darstellung des kovalent an *K*-RAS bindenden Farnesyltransferasehemmers **57**, der verwendeten Negativkontrolle **58** und des Lovastatins (**59**).

2.2.4 Großflächige Wechselwirkungen im Bereich der Switch-Regionen

STOCKWELL *et al.* beschreiben in einer Publikation von 2017 einen Liganden, der den anderen Bindestellen nicht genau zugeordnet werden kann. Seine Wechselwirkungen mit *K*-RAS decken laut der beschriebenen Modellierungstudien sehr große Bereiche von Switch I und Switch II ab. Dieser sogenannte pan-RAS-Inhibitor 3144 wurde über computergestütztes Docking an der Kristallstruktur 4DSN (GCP-gebundenes *K*-RAS^{G12D}) identifiziert. Für diese Verbindung wurden niedrig mikromolare Affinitäten gegenüber allen RAS-Isoformen sowie RRAS2 beschrieben, während andere GTPasen unbereinträchtigt

blieben. Die Ergebnisse der Zell- und Xenograftexperimente lassen aber großen Interpretationsspielraum. Die IC_{50} -Werte für Zellen mit *K*-RAS-Mutation unterschieden sich nur wenig von Zellen, die nur eine BRAF-Mutation enthielten. Zusätzlich wurden die Xenografts mit Tumorzellen mit *K*-RAS- und BRAF-Mutationen durchgeführt. Die Verbindung hemmte aber das Tumorwachstum und die Aktivierung von ERK und Akt, während sie toxische Wirkung auf Zellen des *K*-RAS-Wildtyps zeigte.⁶⁸ Somit wäre aufgrund der mangelnden Selektivität eine Weiterentwicklung notwendig, welche bereits in Angriff genommen wurde und in einigen Patenten beschrieben ist.⁶⁹⁻⁷¹

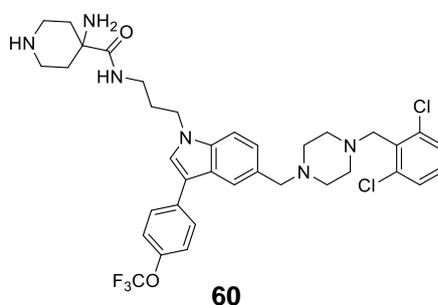


Abbildung 27: Darstellung des pan-RAS-Inhibitors 3144 (**60**).

2.2.5 Kovalente RAS-Inhibitoren zur Blockierung der Nukleotid-Bindestelle

Trotz der picomolaren Affinität von GTP gegenüber RAS wurde mittlerweile ein GDP-Mimetikum entwickelt, das fähig ist, mit GTP zu konkurrieren. Diese von GRAY *et al.* beschriebene Verbindung SML-8-73-1 (**61**, PDB:4NMM) bindet bei millimolaren Konzentrationen an Cystein 12 der G12C-Mutante von *K*-RAS und ist somit mutationsspezifisch. Die fehlende Zellpermeabilität und inhärente Instabilität durch die Anhydridbindung der Phosphate gaben Anlass zur Optimierung der Verbindung.⁷² Zudem wurde von GOODY *et al.* festgestellt, dass die reversible Affinität von SML-8-73-1 (**61**) um einen Faktor von 10^4 geringer ist als für die natürlichen Guaninnukleotide. Aufgrund der daraus resultierenden langen Reaktionszeiten, sei das GDP-Derivat damit für intrazellulären Gebrauch uninteressant, so GOODY *et al.*⁷³ Trotzdem wurden Optimierungen der Verbindung durchgeführt. Zum einen wurde die Prodrug

SML-10-70-1 (**62**) und zum anderen das hydrolysestabilere Derivat **63** entworfen. Verbindung **62** war zellpermeabel und verringerte die Konzentrationen von pERK und pAkt, wobei es aber keine Selektivität gegenüber $K\text{-RAS}^{\text{G12C}}$ vor $K\text{-RAS}^{\text{G12S}}$ gab, was die Frage von möglichen Off-Target-Effekten aufwirft.⁷⁴ Das stabilere Derivat **63**, bei dem die instabile Anhydridbindung durch eine Difluormethylenbrücke ersetzt wurde, ist zwar hinsichtlich der Hydrolyse stabiler dennoch verpasst die gesunkene Affinität diesem Erfolg einen Dämpfer.⁷⁵

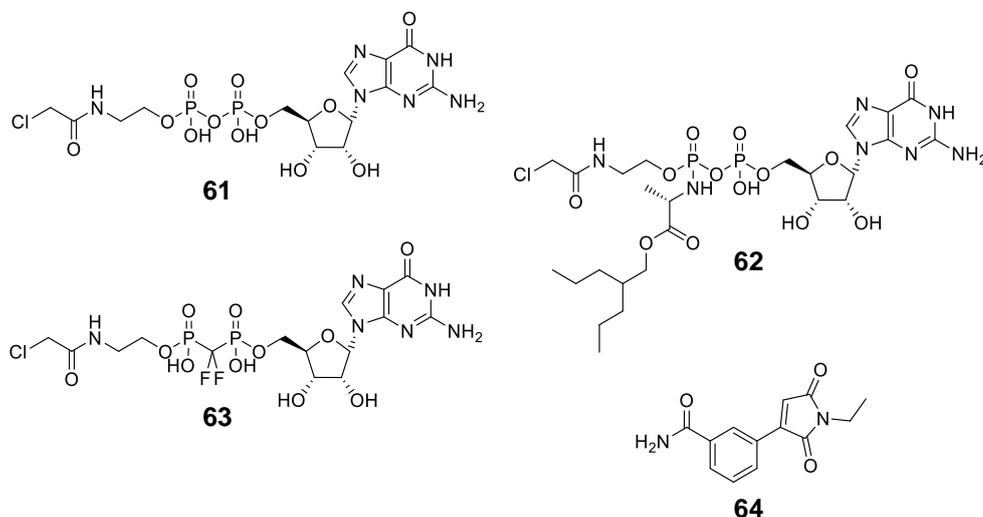


Abbildung 28: Darstellung kovalenter Inhibitoren, die die Nukleotidbindestelle von RAS-Proteinen blockieren. Einen alternativen Mechanismus der Blockierung der Nukleotidbindestelle weist die Verbindung **64** auf. Diese Verbindung enthält ebenfalls eine kovalent bindende Ankergruppe. Das Maleinimid, das diese Funktion übernimmt, modifiziert nicht wie die GDP-Mimetika an Cystein 12, sondern an Cystein 118 von RAS. Diese Aminosäure liegt in Loop 8 von RAS und ist den Bindungsstudien zufolge vermutlich erst nach Bindung von RAS an SOS zugänglich. Da das bindende Fragment von WINTER *et al.* (AstraZeneca) durch ein Fragmentenscreening auf Basis von Kristallstrukturen des $H\text{-RAS-SOS}$ -Komplexes gefunden wurde, kommt dieser Mechanismus in Frage. Zudem wird für dieses Fragment sowie artverwandte Strukturen eine Vorkoordination durch reversible Wechselwirkungen an SOS angenommen, die den elektrophilen Warhead für den nuklephilen Angriff von

Cystein 118 positioniert. Nach Modifikation des Schwefelatoms bedeckt das gebundene Fragment zum Teil die Nukleotidbindetasche, was die Verbindung zu einem interessanten Entwicklungskandidaten macht.⁷⁶ Für biologische Tests waren diese Verbindungen bisher nicht ausreichend potent und auch die sehr hohe Reaktivität des Maleinimids könnte problematisch für eine Weiterentwicklung sein.²¹

2.2.6 Adressierung der S-IIP-Bindestelle

Eine 1997 ursprünglich als Nukleotid-Kompetitoren entwickelte Substanzklasse von Hydroxylaminen (**65** – **67**) offenbarte bei rechnergestützten Bindungsstudien eine weitere Bindungsregion nahe Switch II.^{19,77} Die rechnerbasierte Optimierung dieser Verbindungen brachte eine zweite Gruppe von Liganden hervor. Dabei konnte eine leichte Korrelation der Docking-Ergebnisse mit den bestimmten IC₅₀-Werten gefunden werden. Hierzu wurden für alle vier Stereoisomere der in **Abbildung 29** dargestellten Verbindungen **68** und **69** die besten zwanzig Posen des Docking-Laufs herausgeschrieben. Anschließend wurde die Häufigkeit der Verbindungen in den besten vierzig Posen aus dieser Menge bestimmt. Zumindest ist dabei die häufigst auftauchende Verbindung diejenige, die im Experiment den niedrigsten IC₅₀-Wert aufweist. Der GlideScore, der durch die verwendete Schroedinger-Software ermittelt wurde, zeigt dabei keine nennenswerten Unterschiede für die verschiedenen Verbindungen.⁷⁸

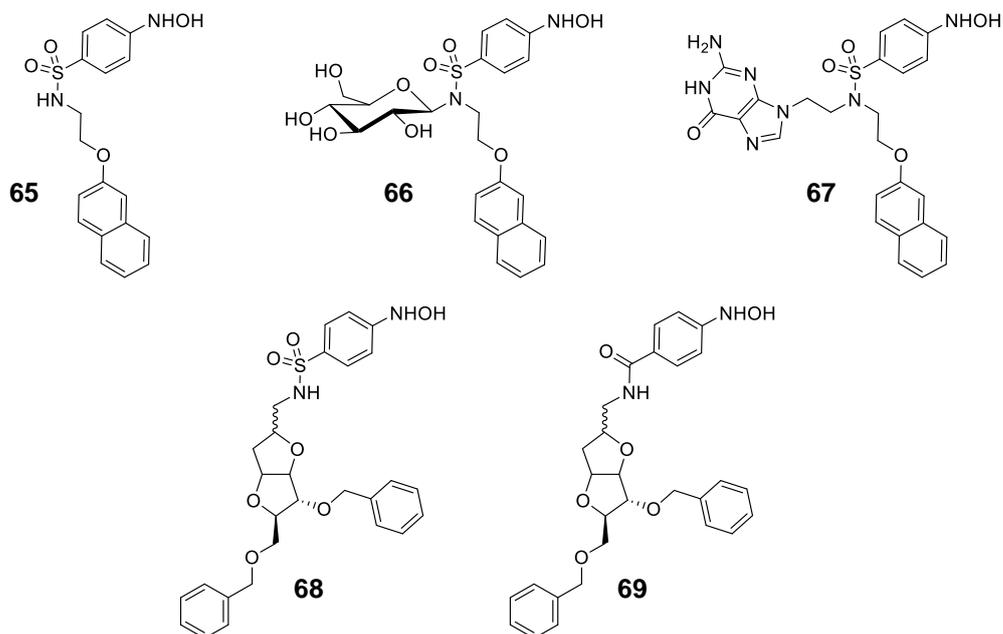


Abbildung 29: *K*-RAS-Liganden mit Hydroxylamin-Struktur: SCH-53870 (65), SCH-54292 (66), SCH-53239 (67) und weiterentwickelte Liganden 68 und 69, wobei je die zwei Diastereomere mit Variation des Stereozentrums mit geschlängelter Bindung verwendet wurden.

Die Verbindungen zeigen dabei eine Inhibierung des Nukleotidaustauschs mit starker Abhängigkeit vom Verhältnis zwischen RAS und seinem GEF.⁷⁹ Die Aktivität der Verbindungen ist recht gering und das cytotoxische Hydroxylamin macht eine Optimierung ebenfalls notwendig.¹⁹ Fehlende Kristallstrukturen machen eine zielgerichtete Modifikation jedoch schwierig.

Vielversprechender sind da kovalente Inhibitoren einer ähnlichen Bindestelle in Nachbarschaft zur Nukleotidbindestelle, deren Weiterentwicklung heute zu ersten erfolgsversprechenden *K*-RAS-Inhibitoren geführt hat. Grundstein für diese Entwicklung legten SHOKAT *et al.* im Jahr 2013. Ähnlich wie die GDP-Mimetika von GRAY *et al.* binden die von SHOKAT *et al.* gefundenen Verbindungen an die G12C-Mutante von *K*-RAS. Durch ein Screening mit Disulfiden gefundene Fragmente (z.B. Verbindung 70) wurden durch gezielten Einsatz von Struktur-Wirkungsbeziehungen weiterentwickelt. Der so erhaltene Ligand 71 enthält einen Acrylamid-Rest als elektrophile Position für den Angriff des

Cysteins 12. Durch den Liganden öffnet sich unterhalb der SWII-Region benachbart zur Nukleotidbindestelle eine neue Bindefurche, die als SIIP-Bindestelle bezeichnet wurde.⁸⁰

In einer weiteren Publikation tauschten LIU *et al.* mit Hilfe von Struktur-Wirkungsstudien funktionelle Gruppen aus und erhielten so ARS-853 (**72**).

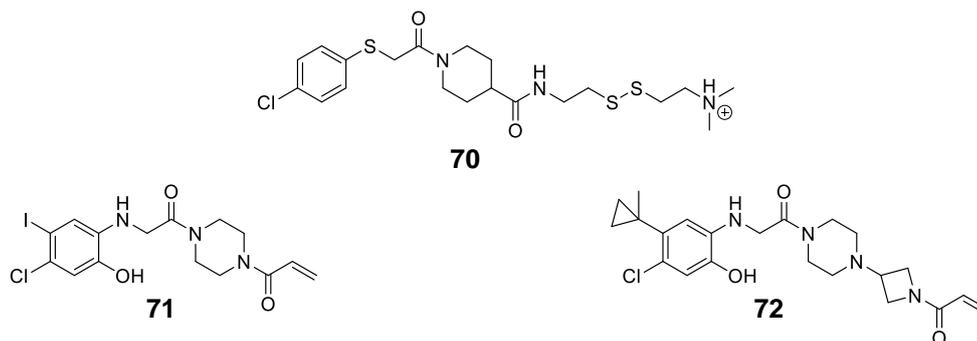


Abbildung 30: Kovalent bindende Liganden der SIIP-Bindestelle: zum einen ein Screening-Hit aus der Fragment-Bibliothek von SHOKAT *et al.* (**70**), der davon abgeleitete Ligand (**71**) und ARS-853 (**72**).

ARS-853 bindet dabei kovalent und selektiv an den GDP-gebundenen Zustand von *K-RAS*^{G12C}. Es inhibiert die RAS-Funktion erst nach mehrstündiger Behandlung. Dies legt nahe, dass der GDP-gebundene Zustand nur in geringer Konzentration vorkommt.⁸¹ Jedoch besitzt die G12C-Mutante im Gegensatz zu den meisten anderen Mutanten nur eine geringfügig verminderte intrinsische Hydrolysefähigkeit im Vergleich zum Wildtyp.⁸² Diese GTPase-Aktivität führt damit zur langsamen Umsetzung des GTP-gebundenen RAS. Anschließend kann der kovalente Ligand an die inaktive Form binden, wodurch eine erneute Aktivierung durch GEFs verhindert wird. Auf diese Weise wird das Gleichgewicht sukzessiv zum inaktiven RAS hin verschoben (**Abbildung 31**).⁸³

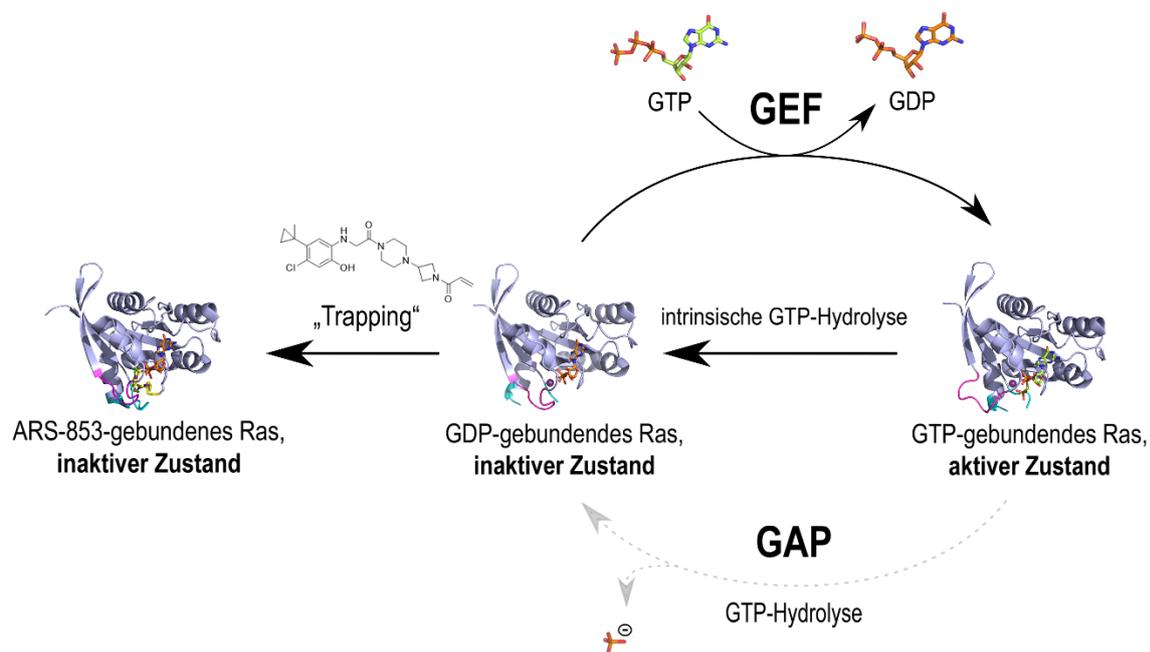


Abbildung 31: Veranschaulichung des Trapping-Mechanismus durch ARS-853, der den GDP-gebundenen Zustand aus dem Gleichgewicht entfernt.

Ein Jahr nach Veröffentlichung über ARS-853 erschien eine Verbindungsklasse von GRAY *et al.*, die einen Chinazolingrundkörper und den mit Acrylamid versehenen Piperazinrest des SHOKAT-Liganden als Strukturelemente aufwies (Verbindungen **73** und **74**). Für die Substanzen wurden submikromolare Konzentrationen für die Inhibition von $K\text{-RAS}^{\text{G12C}}$ -abhängige Signaltransduktion und des entsprechenden Krebszellwachstums berichtet.⁸⁴

Weiterhin beschrieben dann wieder LIU *et al.* in Kooperation mit den Firmen Wellspring Biosciences und Janssen eine Optimierung ihrer Verbindung ARS-853. Dabei wurde für eine bessere metabolische Stabilität die *ortho*-Aminophenolfunktion entfernt und gegen ein ähnliches Chinazolingerüst ausgetauscht, wie es bei GRAYs Verbindungen vorhanden war. Ein Ligand mit axialer Chiralität wurde als besonders potente Verbindung identifiziert (ARS-1620, **75**, PDB:5V9U), wobei sich auch *in vivo* positive Effekte zeigten. Das entsprechende (*R*)-Atropisomer der Verbindung war dabei deutlich weniger potent als

das (*S*)-Isomer (ARS-1620), wobei keine Umwandlung der Atropisomere ineinander möglich war.⁸⁵

Anders war das bei einer ersten Derivatisierung von ARS-1620 durch die Firma Amgen, die eine Hybrid-Verbindung mit einem Indolderivat (PDB:6P8Y) aus eigenem Screening herstellen wollten. Durch die Instabilität der Atropisomere war die Potenz der entsprechenden Hybrids substanz vermindert. Durch Behebung dieses Problems und die Adjustierung der Parameter von Permeabilität, Löslichkeit und oraler Bioverfügbarkeit kam der Wirkstoffkandidat AMG 510 (**76**, PDB:6OIM) zustande. Dieser verbesserte den IC₅₀-Wert für die ERK-Phosphorylierung von 0.831 μ M für ARS-1620 auf 68 nM.^{86,87}

Für diese Verbindung neben den guten präklinischen Ergebnissen auch erste gute klinische Ergebnisse erhalten worden. Nach erfolgreichen Ergebnissen in einer 2018 gestarteten Monotherapie bei Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumoren von nichtkleinzelligem Lungenkrebs in Phase I und II, ist Sotorasib, wie AMG 510 auch genannt wird, nun in die klinische Phase III übergeben worden.⁸⁸

Weitere klinische Kandidaten für eine selektive G12C-Modifikation sind Adagrasib (MRTX849, **77**, PDB:6UT0) und JNJ-74699157 (ARS-3248). Über die Verbindung JNJ-74699157 von Johnson & Johnson und Wellspring ist nur bekannt, dass diese sich seit Juli 2019 in klinischer Testung befindet. Weitere Daten wie die Struktur der Verbindung sind noch unbekannt.⁸⁸

Die Firma Mirati Therapeutics ist mit Adagrasib direkter Konkurrent der Firma Amgen. Dieser auch unter MRTX849 bekannte Wirkstoff ist dabei nicht mehr auf die axiale Chiralität angewiesen und bedient sich einem wesentlich stabileren kovalenten Ankerpunkt. Der verwendete 2-Fluoracrylamid-Warhead verleiht der Verbindung zusätzlich eine wesentlich höhere Vollblutstabilität als unsubstituierte Acrylamide.⁸⁹ Somit hätte Adagrasib Vorteile gegenüber Sotorasib, sofern es sich in klinischen Tests ebenso

erfolgreich zeigt. Mirati Therapeutics bereitet sich dabei gerade auf Phase I der klinischen Testung vor.⁹⁰

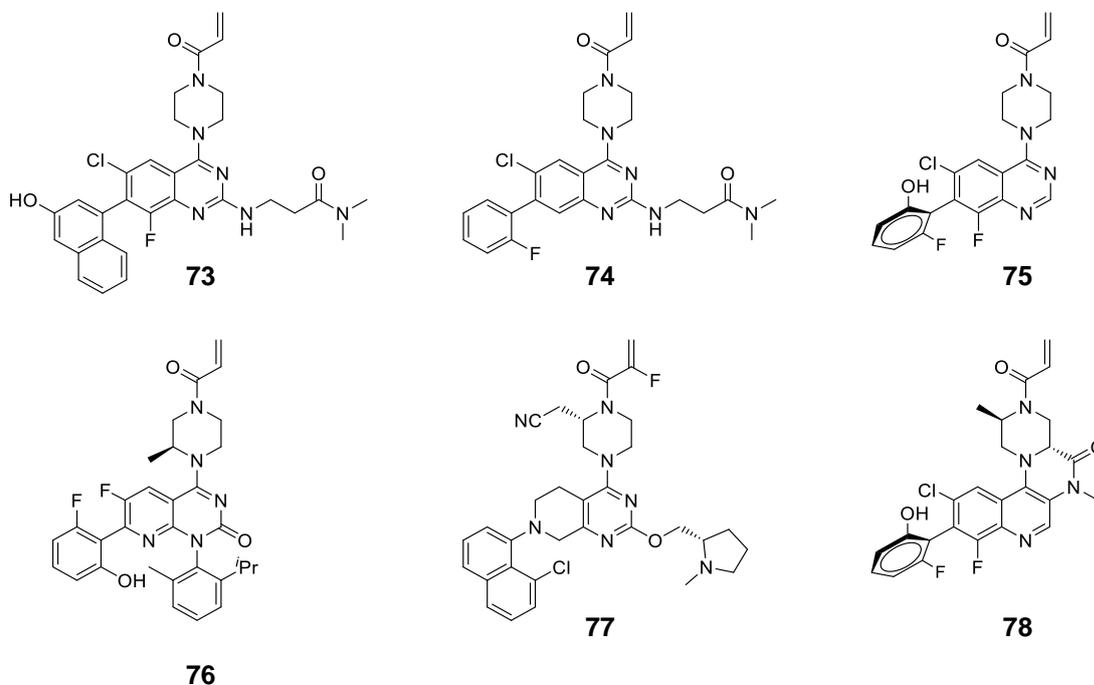


Abbildung 32: Darstellung kovalenter $K\text{-RAS}^{\text{G12C}}$ -Inhibitoren auf Basis Chinazolin-abgeleiteter Grundgerüste: **73** und **74** als erste kovalente Inhibitoren mit Chinazolin-Grundgerüst von GRAY *et al.*; ARS-1620 (**75**), AMG 510 (**76**), MRTX849 (**77**) und die konformativ stabilisierte Verbindung von KETTLE *et al.* (**78**).

Zudem gab die Firma eine Verbindung bekannt, die eine tausendfach höhere Affinität zur $K\text{-RAS}^{\text{G12D}}$ -Mutante als zum Wildtyp aufweist. Diese Verbindung (MTX1133) ist die erste reversibel bindende und trotzdem selektive Verbindung, die für die erste klinische Phase vorbereitet wird. Sie hat Arzneimitteleigenschaften und zeigt in mehreren präklinischen Tumormodellen Antitumoraktivität.⁹¹ Die Struktur und der Bindungsmodus dieser Substanz scheinen bisher jedoch nicht publik zu sein.

Ein weiterer kovalenter Ligand auf Basis von ARS-1620 ist kürzlich von KETTLE *et al.* publiziert worden, wobei hier die Rotation des an dem Chinazolingerüst befindlichen Piperazinrings blockiert wurde. Dabei wurde das Chinazolin gegen Chinolin ausgetauscht und der Piperazinring durch einen zusätzlichen Ringschluss über ein Lactam konformativ arretiert (vgl. **78**, PDB:6T5B).⁹²

Für alle diese kovalenten Rezeptoren der SIIP-Bindestelle ist die rasche Modifikation des Cystein 12 verwunderlich. Schon bei ARS-853 und ARS-1620 ist die reversible Affinität gering. Zusätzlich ist weder die Elektrophilie des Acrylamids, noch die Nukleophilie des Cysteins sehr hoch. Es wurde dabei vorgeschlagen, dass Lysin 16 dirigierend und aktivierend auf das Acrylamid wirkt und die Reaktion dadurch stark beschleunigt wird.^{92,93}

2.2.7 Niedermolekulare Inhibitoren der SI/II-Bindestelle

Die letzte Bindestelle, die auch durch die in dieser Arbeit synthetisierten Liganden adressiert wurde, wurde erstmals von MAURER *et al.* im Zuge eines Fragment-basierten Screenings entdeckt und später von FESIK *et al.* als die SI/II-Bindestelle benannt.^{55,94} Die Fragmente von MAURER *et al.* banden in einer Region zwischen Switch I und II. Das beste Fragment genannt DCAI (**79**) verhinderte die Nukleotidfreisetzung bei *K*-RAS mit einem IC₅₀-Wert von 155 μ M, während es für den Nukleotidaustausch eine mittlere inhibitorische Konzentration von 342 μ M aufweist. Die im NMR-Experiment bestimmte Dissoziationskonstante von 1.1 ± 0.5 mM weist aber auf eine deutlich geringere Affinität hin als für diese inhibitorischen Effekte nötig wäre, wodurch zusätzliche Off-Target-Effekte eine Rolle spielen könnten.⁵⁵

Bei einem *in silico* Screening von KATAOKA *et al.* wurden zwei Verbindungen (**80** und **81**) gefunden, die in der gleichen Region binden. Sie wurden entworfen, um die *H*-RAS-RAF-Wechselwirkung zu stören, unterbanden aber gleichzeitig den SOS-vermittelten Nukleotidaustausch. Sie verringerten das verankerungsunabhängige Wachstum von Zellen mit *H*-, *N*- und *K*-RAS-Mutation und verringerten das Tumorstadium bei *K*-RAS^{G12V}-mutierten Kolorektalkrebszellen in Xenograft-Modellen.⁹⁵

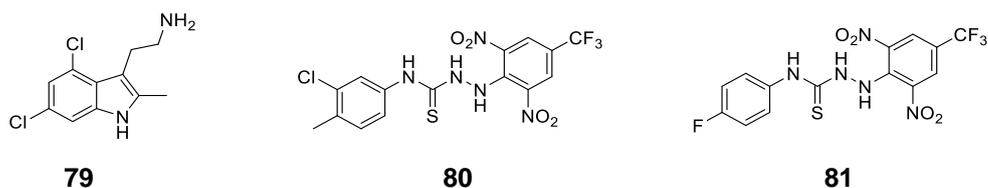


Abbildung 33: Darstellung von *K*-RAS-Liganden der SI/II-Bindestelle DCAI (**79**), Kobe0065 (**80**) und Kobe2602 (**81**).

Ebenfalls in einem NMR-basierten Fragmentscreening fanden FESIK *et al.* noch vor den Arbeiten von KATAOKA *et al.* 140 Fragmente, die mit Affinitäten von 1.3 bis 2 mM an die GDP-Form von *K*-RAS^{G12D} binden. Durch Erweiterung eines Fragmentes um verschiedene Aminosäuren, gelang die Synthese einer Verbindung, die mit einer Dissoziationskonstante von 190 μ M an *K*-RAS bindet. Diese Verbindung **85**, die mit einem Isoleucinrest versehen wurde, konnte im Gegensatz zum entsprechenden Prolin-Derivat (**86**, $K_D = 340 \mu$ M) jedoch nicht kristallisiert werden.⁵⁶

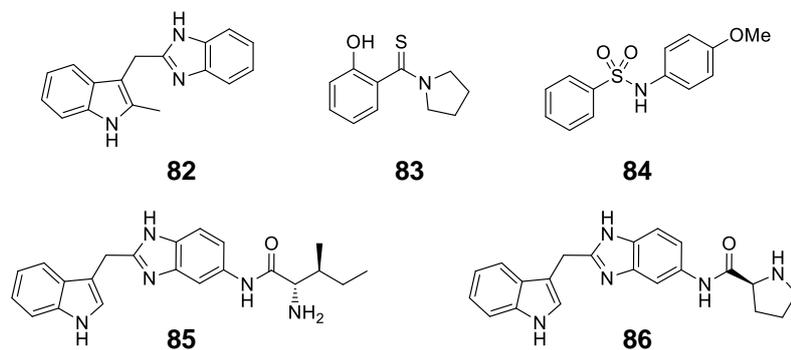


Abbildung 34: Darstellung einiger Fragmentbeispiele aus FESIKs Screening (**82** – **84**) und der erweiterten Verbindungen, wobei das Isoleucin-Derivat (**85**) das aktivste und das Prolin-Derivat (**86**) das aktivste kristallisierte Derivat darstellt.

Die Verbindungen waren in der Lage den SOS-katalysierten Nukleotidaustausch bei einer Konzentration von 1 mM bis zu 78% zu inhibieren. Zelluläre Daten wurden zu diesen Verbindungen nicht veröffentlicht. Die Verbindungen ähneln strukturell den ersten SOS-Agonisten von FESIK *et al.* (vgl. **Abbildung 10**), was die Vermutung nahelegt, dass Optimierungsversuche für diese ersten *K*-RAS-Liganden zu den SOS-Agonisten führten.

Die von FESIK *et al.* in diesem Rahmen aufgenommenen Kristallstrukturen zeigten, dass die SI/II-Bindestelle erst bei Bindung von Liganden entsteht. Dabei wird ein Wasserstoffbrückennetzwerk zwischen Tyrosin 71 in der α 2-Helix der SWII-Region und den Aminosäuren Asparaginsäure 54, Arginin 41 und Serin 39 aufgebrochen, wobei Tyrosin 71, genau wie Methionin 67 aus der Bindestellenregion herausdreht.⁵⁶

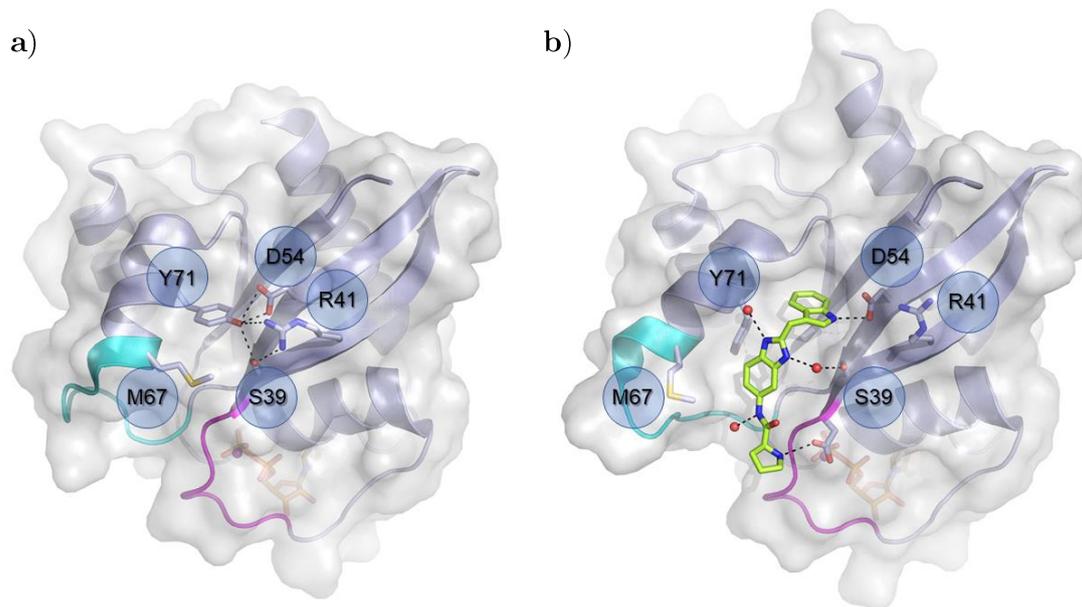


Abbildung 35: Während die SI/II-Bindestelle im ligandenfreien Zustand geschlossen ist (PDB:4EPR, a)), öffnet sie sich bei Bindung des Prolin-Derivates **86** (PDB:4EPY, b)), wobei die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den markierten Aminosäureseitenketten aufgebrochen werden.

Auch GORFE *et al.* schrieben ihren Andrographolid-abgeleiteten Acetalen (**88 – 90**), die sie durch computergestützte Methoden ermittelten, eine Bindung an diese Bindestelle von RAS zu. Dabei wurden Moleküldynamiksimulationen (MD-Simulationen) an der Konformation des Stadium 1 der GTP-gebundenen Form durchgeführt. Bei niedrig-mikromolaren Konzentrationen inhibieren die Verbindungen das Zellwachstum bei *K-RAS*-mutierten Zellen doppelt so stark wie bei normalen Zellen, was die Autoren auf einen Mechanismus über die Inhibierung des GEF-katalysierten Nukleotidaustauschs zurückführten. Dieser Wirkmechanismus wurde genau wie die Bindung an RAS aber nie validiert.^{21,56}

Eine weitere Substanz, deren Bindung an *K*-RAS4B durch *in silico* Screening der Chemdiv-Bibliothek mit 1.36 Millionen Verbindungen vorhergesagt wurde, wurde von XIE *et al.* beschrieben. Dabei wurde der Verbindung **91** ein K_D -Wert von 92 μM für *K*-RAS zugeschrieben, welcher durch Biolayer-Interferometrie bestimmt wurde. Zudem scheint die Verbindung selektiv in denjenigen NCLCs zur Apoptose zu führen, welche eine *K*-RAS-Mutation tragen.⁹⁶

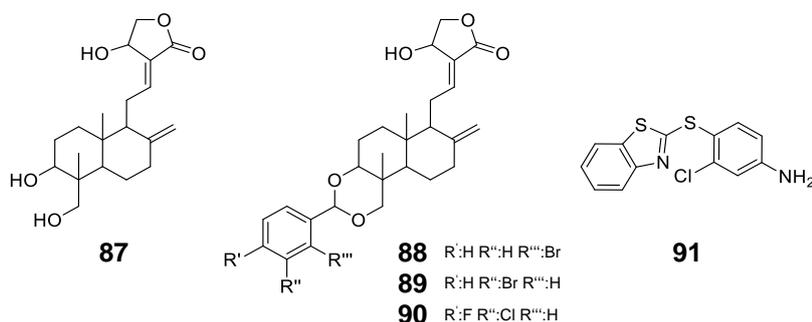


Abbildung 36: Darstellung von Androgapholid (**87**), den daraus von GORFE *et al.* entwickelten Derivaten (**88** – **90**) und des *K*-RAS-Liganden von XIE *et al.* (**91**).

Mit Hilfe der zuvor entwickelten hochaffinen anti-RAS-Antikörperfragmente (vgl. Kapitel 2.2.1) fanden RABBITS *et al.* einen niedermolekularen *K*-RAS-Liganden mit nanomolarer Affinität. Dabei verwendeten sie Oberflächenplamonenresonanzspektroskopie zur Ermittlung von Antagonisten der RAS-Antikörper-Wechselwirkung.

Die dabei gefundenen Fragmente wurden sukzessive und ausgehend von angefertigten Kristallstrukturen optimiert, was zu der Verbindung Abd-7 (**94**, PDB:6FA4) führte (vgl. **Abbildung 37**). Der K_D -Wert dieser Verbindung liegt bei 51 nM, während der IC_{50} -Wert für die ERK- und Akt-Phosphorylierung bei 8 – 10 μM je nach Zelltyp liegt.⁹⁷

In einer zweiten Veröffentlichung wurden 1534 Substanzen, die potenziell PPIs inhibieren können, wieder über Oberflächenplamonenresonanzspektroskopie an *K*-RAS gescreent, wobei die Verbindungen PPIN-1 (**95**) und PPIN-2 (**96**) gefunden wurden. Eine Kreuzung dieser Verbindungen mit Abd-7 ergab Ch-3 (**97**), die sich nur durch den Austausch des Pyridinrings von Abd-7 durch einen ähnlich substituierten Benzolring und den Ersatz des

Dioxanrings durch eine einzelne Methoxygruppe unterscheidet. Der Verbindung zeigte aber bessere Wirkstoffeigenschaften.

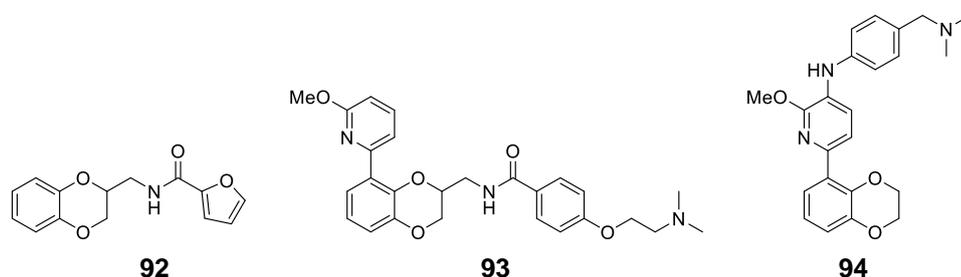


Abbildung 37: Darstellung verschiedener Verbindungen aus den Optimierungsschritten von RABBITS *et al.*: durch den Antikörper-Verdrängungs-Assay gefundenes Fragment **92**; Zwischenstufe der Optimierungsarbeiten (**93**); Abd-7 (**94**) als potentester *K*-RAS-Ligand.

Da die Kristallstrukturen bei Bindung der Liganden nur sehr geringe Konformationsänderungen aufweisen, schließen die Autoren einen allosterischen Effekt aus. Stattdessen nehmen sie eine Störung von PPIs durch die Liganden an. Eine Inhibition von RAS-Effektor-Wechselwirkungen konnte nachgewiesen werden und die Verbindung war in der Lage, die Phosphorylierung von ERK und Akt zu minimieren. Dabei wies sie mit einem IC_{50} -Wert von 4.5 – 5.3 μ M eine höhere Potenz als Abd-7 auf.⁹⁸

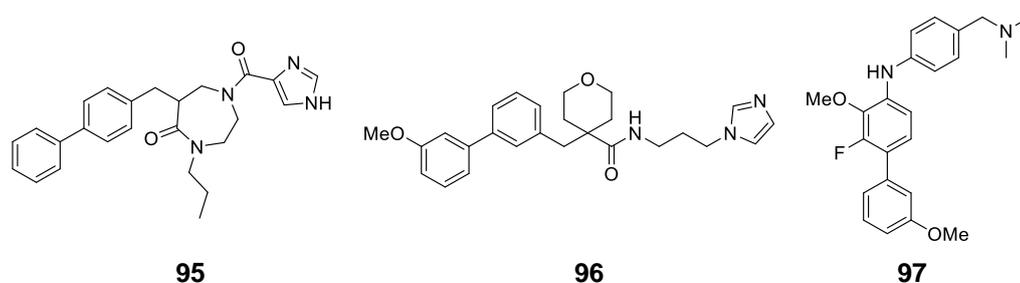


Abbildung 38: Darstellung von PPIN-1 (**95**), PPIN-2 (**96**) und Ch-3 (**97**).

In einer späteren Publikation von FESIK *et al.* wird für diese Verbindungen kritisiert, dass sie keiner Negativkontrolle unterzogen wurden und die Zellaktivität nur an zweidimensional wachsenden Zellkulturen überprüft wurde. Dadurch könne keine Interpretation hinsichtlich einer *K*-RAS-Abhängigkeit erfolgen.⁹⁴

Zu einer ähnlichen Zeit veröffentlichten GORFE *et al.* eine Verbindung, die mit einem maximalen $K_D = 0.28 \mu\text{M}$ an GNP-gebundenes *K-RAS4B* bindet, wobei dieser Wert der Assoziation am Wildtypprotein entspricht. Die Verbindung wurde durch ein Hochdurchsatzscreening der „Drugs Now“ Untergruppe der ZINC-Datenbank nach MD-Simulation des RAS-Proteins gefunden. Dabei wurde die Kristallstruktur 4DSO als Startpunkt für die Simulationen verwendet, die genutzt wurden, um eine Sammlung an Konformationen mit offener Bindetasche zu erhalten. Die RAS-Konformation mit der weitest geöffneten SI/II-Bindestelle wurde anschließend für das Docking der ZINC-Verbindungen verwendet. Die dabei erhaltene Verbindung (**98**) reduzierte dabei die ERK-Phosphorylierung in Zellen mit *K-RAS*^{G12D}-Mutation besser als in Zellen die lediglich *H-RAS* exprimieren. Zudem zeigte sich ein sehr kleiner Effekt auf den GEF-katalysierten Nukleotidaustausch.⁹⁹

Der neueste veröffentlichte Ligand der SI/II-Bindestelle ist die Verbindung BI-2852 (**99**). FESIK *et al.* identifizierten dabei zunächst millimolar im NMR-Experiment bindende Fragmente, die dann ausgehend von Kristallstrukturen optimiert wurden. Nachdem Dissoziationskonstanten unterhalb von $20 \mu\text{M}$ erreicht worden waren, kamen biochemische Assays zum Einsatz, mit denen die PPIs von *K-RAS* geprüft wurden.

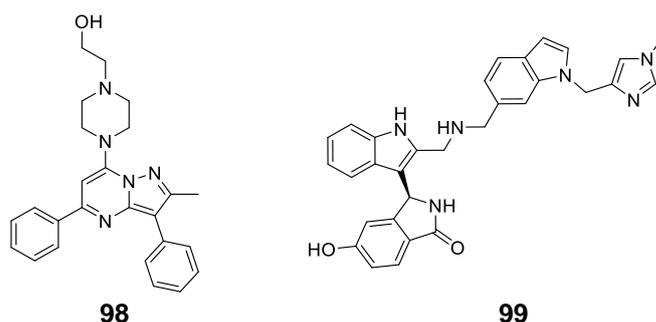


Abbildung 39: Darstellung der neuesten SI/II-Liganden: links GORFES Verbindung (**98**) und rechts BI-2852 (**99**) von BOEHRINGER INGELHEIM.

Dabei zeigte sich, dass BI-2852 die Bindung von GTP-gebundenem *K-RAS*^{G12D} und CRAF mit einer halbmaximalen inhibitorischen Konzentration von 180 nM inhibiert. Die

Verbindung senkt die Konzentration phosphorylierten ERKs und Akts, wobei die *K-RAS*-Abhängigkeit durch dreidimensionales Wachstum nachgewiesen werden konnte. Die Verbindung stört vermutlich die Wechselwirkungen mit Downstream-Effektoren, GEFs und GAPs aufgrund einer Wasserstoffbrücke des phenolischen Sauerstoffatoms zu Glutaminsäure 37 der Switch II-Region. Das Potenzial von BI-2852 sei laut Autoren nicht völlig ausgeschöpft, da Wechselwirkungen mit Threonin 74 zu einer fünf- bis zehnfachen Verbesserung der Wirkstärke führen sollten und diese Aminosäure bisher unadressiert ist. Außerdem enthält der Ligand sieben drehbare Bindungen, deren Fixierung in der affinen Konformation zusätzliche Affinität brächte. Auch Verbesserungen hinsichtlich der Selektivität sind nötig, da die Verbindung bisher bessere Inhibition für *K-RAS*^{WT} aufweist.⁹⁴

BALUS *et al.* betrachteten BI-2852 unter dem Gesichtspunkt, dass die Wirkung dieses Inhibitors durch Bildung nichtfunktionaler Dimere zustande kommen könnte, da ihnen signifikante Wechselwirkungen in der dimeren Kristallstruktur (PDB:6GJ8) aufgefallen waren. Sie konnten durch Größenausschlusschromatographie eine Dimerbildung im ausschließlichen Falle der *K-RAS*-Behandlung mit BI-2852 nachweisen. Durch Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie konnten die Autoren nur eine Affinität von 22 μM nachweisen, wobei die Ansprechrates mehr als doppelt so hoch war, wie für eine theoretisch bestimmte maximale 1:1 Interaktion. Bei Überprüfung der Affinität konnte mittels ITC (engl.: isothermal titration calorimetry) der von FESIK *et al.* angegebene $K_D = 720 \text{ nM}$ reproduziert werden. Dies führten die Autoren auf das Nichtvorhandensein von Dimeren bei der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie zurück, da hier das RAS-Monomer auf der Sensoroberfläche aufgetragen ist.¹⁰⁰

Diese Argumente seien jedoch nicht stichfest, so FESIK *et al.*, da die Dimere bei tausendfach höheren Konzentrationen durch die Größenausschlusschromatographie nachgewiesen wurden als sie für die zellulären Effekte der Verbindung notwendig sind. Zudem gibt es keine zellulären Ergebnisse, die die Dimerbildung als Grund für die Effekte von BI-2852 argumentativ unterstützen. Dennoch wurden 3.8 mM bindende, verknüpfte

Dimere von BI-2852 hergestellt, die jedoch nicht in der Lage waren die Zellmembran zu durchdringen und zelluläre Untersuchungen zu ermöglichen.¹⁰¹

2.3 Vorarbeiten der Arbeitsgruppe SCHERKENBECK

Die Arbeitsgruppen von SCHERKENBECK und STOLL berichten in mehreren Publikationen von Bisphenolen als weitere Liganden der SI/II-Bindestelle von *K*-RAS4B mit Affinitäten im sub-millimolaren bis millimolaren Bereich. Die Bindung der Substanzen wurde stets mittels zweidimensionaler heteronuklearer NMR-Spektroskopie beobachtet. Ausgehend von einer Fragmentbibliothek von etwa 100 Verbindungen wurde Bisphenol A (BPA, **101**), das früher in vielen Polycarbonat-Kunststoffen Einsatz fand, als *K*-RAS-Ligand ($K_D = 0.6 \pm 0.2$ mM) identifiziert. Dieser Befund deutet auf einen bis dahin unbekanntem Wirkmechanismus dieses mit chronischen Krankheiten wie Fettleibigkeit, Asthma und Krebs verbundenen Moleküls hin. Auch für die nach gesetzlicher Regulation des BPA-Einsatzes häufig verwendete Ersatzsubstanz Bisphenol S (BPS, **102**) wurde eine Assoziation an *K*-RAS festgestellt ($K_D = 5.8 \pm 0.7$ mM). Beide Substanzen binden in einem Affinitätsbereich, der es ihnen möglich macht, mit einer Bindung von SOS an die GDP-gebundene Form von RAS zu konkurrieren. Dennoch ist nur für das BPA eine Inhibition des SOS-abhängigen Nuklotidaustausches beschrieben. Um den Bindungsmodus beider Verbindungen zu belegen, wurden die erhaltenen Änderungen der Aminosäureresonanzen aus den NMR-Untersuchungen für Dockingstudien genutzt. Dabei zeigte sich, dass das BPS weniger flexibel in der Orientierung der Phenolringe zu sein scheint und daher nicht in der Lage ist, den weniger tief in der Bindestelle liegenden Ring in Richtung des Glutamins 70 zu orientieren.

Ausgehend von diesen ersten Ergebnissen wurden Verbindungen mit weiteren Variationen der Brücke zwischen den beiden Phenolringen auf ihre Bindung an *K*-RAS untersucht. Die daraus resultierenden Struktur-Wirkungs-Beziehungen zeigen, dass eine Substitution der beiden Methylgruppen des verbrückenden Elementes in der Regel zu einem Verlust an

Affinität führt. Beispielsweise erhöht sich die Dissoziationskonstante, wenn eine oder beide der Methylgruppen durch ein Proton oder andere Alkylreste (z.B. Ethyl oder Cyclohexyl) ersetzt werden. Ein Austausch der Methyl- gegen Trifluormethylgruppen brachte hingegen einen Zugewinn an Affinität. Das fluorierte Derivat **100** (BPAF) konnte um Aminogruppen in *meta*-Position der Phenole erweitert werden, ohne an Affinität gegenüber RAS zu verlieren. Die Dissoziationskonstante beider Verbindungen liegt bei etwa 0.4 mM. Für die fluorierten Verbindungen **103** und **104** wurde eine Konformationsänderung von *K*-RAS4B bei Assoziation der Liganden im NMR-Experiment beobachtet. Die Glycine 10, 13 und 60 sowie Threonin 35 wiesen eine deutliche Linienverbreiterung auf, während eine für den aktiven Zustand typische Linienverbreiterung der Switch-Regionen nicht auftrat. Da die verschobenen Aminosäuren in der nukleotidbindenden Region liegen, stellten die Autoren die Hypothese auf, dass die Bisphenole durch ihre Assoziation an *K*-RAS4B einen konformativen Zustand zwischen aktivem und inaktivem RAS induzieren und somit potenziell agonistisch wirken könnten. Unterstützt wird diese Annahme durch die erhöhten Konzentrationen von phosphoryliertem ERK und Akt die im *in vivo* Experiment beobachtet wurden.^{57,102,103}

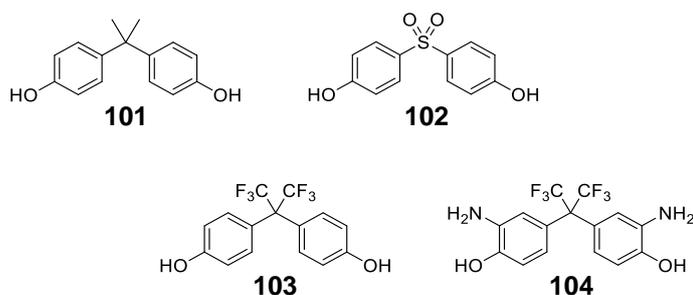


Abbildung 40: Bisphenol A (**101**), BPS (**102**), BPAF (**103**) und BPNH₂ (**104**) als Liganden der SI/II-Bindestelle.

2.4 Rationales Wirkstoffdesign

Der klassische Weg des rationalen Wirkstoffdesigns beginnt meist bei chemischen Leitstrukturen, die aus Pflanzen, Tieren, Mikroorganismen oder der Produktion anderer chemischer Produkte erhalten wurden. Auch die Nachbildung von körpereigenen Liganden wie Hormonen, Enzymsubstraten und Neurotransmittern ist ein bekannter Weg zur zielgerichteten Suche nach Wirkstoffen. Mittlerweile sind auch *in vitro* Systeme verfügbar, die es möglich machen, an extrahierten und aufgereinigten Proteinen große Zahlen chemischer Substanzen zu testen. Jedoch ist dieses Verfahren mit einem erheblichen Kostenaufwand verbunden. Zudem weist diese Methode zwei weitere Probleme auf. Da die getesteten Verbindungen keinen so großen chemischen Raum wie Naturstoffe abdecken und diese meist schon sogenannte wirkstoffähnliche Eigenschaften aufweisen, ist es schwer die Affinität bei anschließender Optimierung zu verbessern, da die Moleküle dafür meist vergrößert werden. Eine solche Vergrößerung geht in der Regel mit einer Verschlechterung der Membranpermeabilität einher. Hier kommt die sogenannte Ligandeneffizienz zum Tragen, die zur Abschätzung des Entwicklungspotenzials von ermittelten Liganden genutzt wird. Diese Größe setzt die Anzahl von Nicht-Wasserstoffatomen zur Wirkstärke in Bezug. Ein weiteres Problem bei *in vitro* Screenings ist die mögliche Aggregation hydrophober Substanzen im wässrigen Medium, wodurch es zur Assoziation des Proteins am Niederschlag kommt und eine Inhibition durch Senkung der effektiven Proteinkonzentration vorgetäuscht wird.

Aufgrund der großen biochemischen Fortschritte bei der gezielten Expression von Genen und der Auflösung von Kristall- und NMR-Strukturen liegen heutzutage von vielen Proteinen dreidimensionale Strukturen vor. Beispielsweise kann über die RCSB-Proteindatenbank Zugriff auf die verschiedensten NMR- und Kristallstrukturen von Proteinen erfolgen. Dadurch wird es möglich, Zielproteine am Computer genau zu untersuchen und über *in silico* Screenings neue Liganden zu suchen. Dabei werden kleine

Moleküle in eine vorgegebene Bindetasche eingepasst (gedockt). Die berechneten Bindungsgeometrien werden durch sogenannte Posen repräsentiert, die hinsichtlich der erwarteten Bindungsaffinität bewertet werden. Aktuell gibt es aber noch einige Probleme bei Verwendung dieser Methode. Eine große Fehlerquelle liegt in der Bewertung der erhaltenen Bindungsgeometrien, wobei vor allem die korrekte Berücksichtigung von Wechselwirkungen von Wasser und das dynamische Verhalten von Proteinen eine große Rolle spielt. Auch die Beschaffenheit der verwendeten Datenbanken ist ein kritischer Punkt. Dabei sollten die Datenbanken mit möglichen Treffern für die Suchanfrage angereichert sein, anstatt nur im Faktor Größe zu punkten. Die *in silico* Suche neuer Liganden bietet den Vorteil, dass man kleine Fragmente suchen kann, die anschließend durch iterative Optimierung zu möglichen Inhibitoren entwickelt werden können. So lassen sich zwei Fragmente, die *in silico* in unterschiedlichen Regionen des Proteins binden, ähnlich wie beim Fragment-Growth-Verfahren verknüpfen. Auch das *de novo* Design von Wirkstoffen wird auf unterschiedlichste Weise durch rechnergestützte Methoden möglich. Insgesamt bietet das rationale Wirkstoffdesign dank computerchemischer Verfahren eine Vielzahl nutzbarer Werkzeuge, die in geeigneter Weise angewandt werden müssen, um gezielt Wirkstoffe zu suchen.¹⁰⁴

3 Methoden für die Suche nach *K*-RAS-Inhibitoren

3.1 Methoden des *in silico* Wirkstoffdesigns

3.1.1 *Schrödinger-Software-Paket*

Ein wichtiger Bestandteil der beschriebenen Forschungsarbeiten waren *in silico* Docking-Experimente mit dem Molecular Modelling Paket der Firma SCHRÖDINGER. Dabei wurden die Softwareversionen Maestro 9.3¹⁰⁵ und Maestro 11.5¹⁰⁶ verwendet. Welche Substanzbibliotheken aus welchen Gründen in den Screenings eingesetzt wurden, wird in den jeweiligen Unterkapiteln der Diskussion beschrieben.

Im Allgemeinen ist der Ablauf eines *in silico* Screenings über das Programm Glide^{107,108} aus dem Schrödinger-Software-Paket immer auf die gleiche Weise durchgeführt worden.

Um korrekte Ausgangsstrukturen des Proteins zu erhalten, muss die zu verwendende PDB-Datei zunächst bearbeitet werden. Häufig fehlen Loops oder Aminosäureseitenketten in den verfügbaren 3D-Strukturen. Für manche Aminosäurereste sind dagegen sogar mehrere alternative Positionen angegeben, da beispielsweise die Elektronendichte der Kristallstruktur hier nicht ausreichend stark war. Auch Wasserstoffatome fehlen dem ganzen Protein und Bindungszustände von Metallen und Schwefelatomen stimmen bei den heruntergeladenen Strukturen nicht, wobei bei den Letzteren die Disulfidbindungen in der PDB-Datei nicht hinterlegt sind. Diese Defizite können über den „Preprocess“-Schritt des Unterprogramms „Protein Preparation Wizard“ ausgeräumt werden. Zusätzlich gibt es die Option, Wassermoleküle in Abhängigkeit ihres Abstandes zu Heteroatomen des Proteins zu entfernen. In der neueren Softwareversion gibt es die zusätzliche Möglichkeit die Protonierungszustände des Proteins mit dem Programm Epik für einen festgelegten pH-Bereich zu berechnen. Dieser pH-Bereich wurde bei den durchgeführten Rechnungen auf $\text{pH} = 6 - 8$ festgelegt. In einem darauffolgenden Optimierungsschritt werden die

Orientierungen von polaren Wasserstoffatomen angeglichen und terminale Amide und Histidine umgekehrt. In diesem Schritt werden in der alten Version die Protonierungszustände angepasst. Für eine letzte Korrektur der Proteinstruktur wird eine Kraftfeldminimierung der Proteingeometrie durchgeführt, wobei in beiden Versionen das Kraftfeld OPLS_2005 verwendet wurde.

Neben der Aufbereitung des Proteins, müssen auch die Liganden für das Docking vorbereitet werden. Die Liganden können dabei zunächst über den programmeigenen 2D-Sketcher gezeichnet werden oder über kompatible Dateitypen wie SMILES- und SD-Dateien eingefügt werden. Eine programminterne automatisierte Generierung aus Bibliotheken von Bausteinen ist wie zum Beispiel mit CombiGlide ebenfalls möglich. Die Liganden werden anschließend in 3D-Strukturen überführt. Unter Verwendung des Unterprogramms LigPrep werden dann Wasserstoffatome hinzugefügt, eventuelle Gegenionen entfernt und Protonierungszustände für einen gewählten pH-Bereich (ebenfalls $\text{pH} = 7 \pm 1$) mit Hilfe von Epik berechnet. Auch das Generieren von Stereoisomeren ist bei Vorhandensein stereogener Zentren möglich, wobei die maximale Anzahl der Stereoisomere festgelegt werden kann.¹⁰⁹

Ein weiterer vor dem Docking durchzuführender Schritt ist die Erstellung eines „Receptor-Grids“, durch welches der Ort für das Einpassen der Liganden festgelegt wird. Dabei werden zwei Boxen in einem Schritt erstellt. Zum einen ist das die „Grid-Box“, welche vom Nutzer der Software selbst festgelegt wird. Dabei können beispielsweise vorhandene Liganden ausgewählt werden, an deren Größe und Position dieses „Grid“ angepasst wird, und welche dann durch das Erstellen des „Grids“ entfernt werden. Alternativ können auch kartesische Koordinaten, Aminosäurereste oder durch das Programm SiteMap gefundene Bindestellen als Ausgangslage dieses „Grids“ verwendet werden. Die zweite erstellte Box, die sogenannte „Ligand center box“, wird errechnet und besteht aus den akzeptablen Positionen für das Ligandenzentrum während der später erklärten „site-point-Suche“.

Nachdem der Raum am Protein festgelegt ist, kann das *in silico* Screening mit Hilfe des Programms Glide (Grid-based Ligand Docking with Energetics) durchgeführt werden. Dabei werden Posen als Kombination aus Position und Orientierung des Liganden im Bezug zum Rezeptor berechnet. Bei der Suche nach Posen mit möglichst guten Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen durchlaufen die erstellten Posen verschiedene hierarchische Filter.

In einem ersten Schritt werden zunächst Konformationen des Grundkörpers und zudem mögliche Kombinationen jedes Rotamerstadiums der rotierbaren Gruppen berechnet. Jede der erhaltenen Konformationen wird dann als einzelnes Objekt gedockt. Dieses Docking findet im ersten Schritt über eine sogenannte „site-point-Suche“ statt. Dabei werden Punkte in der Bindetasche gewählt, welche jeweils 2 Å im dreidimensionalen Raum voneinander entfernt liegen. Dann werden die Abstände dieser Punkte zur Proteinoberfläche mit den Abständen der Mittelpunkte der Liganden zur Ligandenoberfläche verglichen. Wenn diese Daten gut übereinstimmen, folgt daraus, dass der Ligand von seiner Größe gut in die Bindestelle passt. An dieser Stelle ist jedoch nur die Positionierung annähernd geklärt.

Deshalb legt das Programm nun den Ligandenmittelpunkt auf den entsprechenden „site point“ und sucht anschließend nach allen möglichen Orientierungen des Moleküldurchmessers. Dieser Durchmesser entspricht der Linie zwischen den weitest entfernten Atomen des Liganden. Bei sterischen Zusammenstößen mit dem Protein wird die entsprechende Pose aussortiert. Weiterhin wird dann die Rotation um den Diameter des Liganden durchgeführt, wobei nach möglichen Wechselwirkungen mit dem Rezeptor gesucht wird. Diese Wechselwirkungen werden im Anschluss in einem „greedy Scoring“ bewertet. Der Name kommt daher, dass der bestmögliche Scoringwert verwendet wird, der durch die Bewegung des Liganden um 1 Å in den Richtungen eines kartesischen Koordinatensystems erreicht werden kann. Durch diesen Bewertungsvorgang wird die grobmaschige Rasterung von 2 Å bei der „site-point-Suche“ ausgeglichen.

In einem dritten Stadium werden die Posen mit Hilfe des Kraftfelds OPLS_2005 energieminiert. In der Standardeinstellung werden dabei intern Konformationen des Liganden durch Torsion des Grundgerüsts und der rotierbaren Gruppen erstellt. Die energieminierten Posen werden mit Hilfe des „GlideScores“ final bewertet, wobei Boni für günstige Wechselwirkungen und Abzüge zum Beispiel beim Einfrieren rotierbarer Bindungen oder elektrostatischer Abstoßung bestimmter Gruppen erteilt werden. Der nachher betrachtete Docking-Score wird zusätzlich zum GlideScore durch Abzüge für Zustände höherer Energie für Tautomerisierung und Protonierung ergänzt, welche zuvor durch das Unterprogramm Epik generiert wurden. Auch der Glide-Emodel-Wert ist eine nützliche Größe, die in dieser Arbeit immer wieder berücksichtigt wurde. Mit ihr können die erstellten Posen in einer Rangliste sortiert werden. Er kombiniert den GlideScore mit einem Score für die nichtkovalente Wechselwirkungsenergie.

Das Glide-Docking kann in drei verschiedenen Genauigkeitsstufen durchgeführt werden. Dabei besitzt der XP-Modus (engl. extra precision) den strengsten Bewertungsalgorithmus, sodass dieser die genauesten Posen erzeugt. Der SP-Modus (engl. standard precision) lässt hingegen etwas mehr Flexibilität des Proteins zu und ist etwas ungenauer, weshalb die Rechenzeit sinkt und dieser Modus für größere Substanzbibliotheken verwendet werden sollte. Anschließend sollten die besten Posen aber wiederum mit dem XP-Modus verfeinert werden. Bei noch größeren Datenbanken, kann auch der noch gröbere HTVS-Modus (engl. high throughput virtual screening) verwendet werden, um die Rechenzeit weiterhin gering zu halten. Anschließend werden dann iterativ der SP- und dann der XP-Modus angewendet, um die besten Posen weiter zu verfeinern. Nach jeder Rechnung wurde standardgemäß eine Postdocking-Minimierung durchgeführt, wobei die Zahl der zu minimierenden Posen pro Ligand festgelegt werden kann. Bei dieser Minimierung werden noch einmal die Bindungslängen und -winkel optimiert und der skalierte Coulomb-van der Waals-Term wird genau wie der GlideScore und daraus resultierend auch der Dockingscore neu ermittelt. Bei HTVS- und SP-Rechnungen ersetzt die neu berechnete

Pose die Pose des Dockings, während dies beim XP-Modus nur geschieht, wenn diese Pose einen besseren Scoringwert erreicht. Ein möglichst negativer Scoringwert entspricht hierbei einer energetisch günstigeren Pose.¹⁰⁸

3.1.2 *Knime zur Unterstützung des Docking-Prozesses*

Das Programm Knime 4.1¹¹⁰ wurde gegen Ende der Forschungsarbeiten für eine Verfeinerung der für das Docking verfügbaren Daten genutzt. Dabei handelt es sich bei Knime um ein tabellenbasiertes Programm zur Datenverarbeitung. Die einzelnen rechnerischen Schritte können über Bausteine, sogenannte „Nodes“, in einen Gesamtarbeitsablauf (Workflow) eingebaut werden. Jeder dieser Knotenpunkte besitzt mindestens einen Input-Port und einen Output-Port. Die von der Node zu verarbeiteten Daten des Input-Ports können nach der durch diesen Baustein durchgeführten Operation über den Output-Port an weitere Bausteine weitergegeben werden. Mit Hilfe bestimmter Programmiererweiterungen wie dem RD-Kit und dem Schrödinger-Kit können auch chemische Strukturen mit dazugehörigen Daten verarbeitet werden. Dabei können Verbindungen in kompatiblen Formaten wie SMILES oder dem SD-Format eingelesen werden. Für die Verarbeitung der Strukturen gibt es viele Möglichkeiten, wobei in dieser Arbeit vor allem die Verwendung einfacher Machine-Learning-Workflows und der durch die Schrödinger-Implementierung ermöglichten programminternen Docking-Läufe zum Einsatz kamen. Für diese Workflows wurden die vorbehandelten Daten der chemischen Struktur zunächst in sogenannte „Learner“-Noden eingespeist. Zu jedem dieser „Learner“ gibt es einen entsprechenden „Predictor“, der das berechnete Modell anwendet, um eine Vorhersage für neue Daten zu treffen. In dieser Arbeit handelt es sich bei diesen Daten um neue Strukturen aus einer anderen Datenbank.

Die verwendeten „Learner“ betrachten die tabellarischen Daten als Zusammensetzung aus Datensätzen, was den einzelnen Zeilen der Tabelle entspricht, und beschreibenden Attributen, welche dem Satz von Spalten entspricht. Ein solches Attribut kann der

molekulare Fingerabdruck sein, der durch eine vorangegangene „Node“ aus den Strukturdaten in Form von SMILES oder SD-Dateien erstellt wurde. Als weiteres Attribut würde hier die Aussage zählen, ob die eingespeiste Verbindung ein aktiver *K-RAS*-Ligand war oder nicht.

Zwei der verwendeten „Learner“-Bausteine, der „Random Forest Tree Learner“ sowie der „Gradient Boosted Trees Learner“, erstellen einfache Regressionsbäume mit recht schwacher Vorhersagekraft des jeweils ermittelten Modells. Die Aussagekraft kommt erst durch eine Kombination mehrerer dieser schwachen Vorhersagemodelle zustande. Die Entscheidungsbäume entstehen standardmäßig durch Binärsplits für numerische und nominale Attribute, was einer Ja-/Nein-Aussage entspricht. Die beiden „Learner“ unterscheiden sich jedoch in ihren Algorithmen.

Der „Naive Bayes Learner“ berechnet die Anzahl von Zeilen pro Attributwert für nominale Attribute wie die Aussage, ob der Ligand bindet oder nicht. Würden numerische Attribute verwendet, so würde eine Gaußverteilung der Werte berechnet. Dann wird für die jeweiligen Attribute eine Wahrscheinlichkeit bestimmt, mit der ein anderes Attribut gleichzeitig vorhanden ist. So können die Klassenzugehörigkeiten von nicht klassifizierten Daten vorhergesagt werden. Dieser „Learner“ ist für die Verwendung von Bit-Vektor-Spalten ungeeignet, zu denen die molekularen Fingerabdrücke zählen. Er wurde verwendet, um zu testen, ob dennoch eine Aussage bei der darauffolgenden Vorhersage getroffen wird. Möchte man die molekularen Fingerabdrücke jedoch geeignet berücksichtigen, ist die Variante des „Fingerprint Bayesian Learners“ zu verwenden.

Zusammengefasst bedeutet das, dass die „Learner“ versuchen eine Korrelation zwischen der Aussage, ob der Ligand bindet oder nicht, und dem strukturellen Fingerprint zu finden. Damit handelt es sich bei der Ermittlung neuer Liganden über den „Predictor“ um eine ligandenbasierte bzw. strukturbasierte Form der Wirkstoffsuche.¹¹¹

3.1.3 Haddock

Eine weitere für diese Arbeit wichtige Anwendungssoftware ist die Webversion des High Ambiguity Driven Dockings (Haddock 2.4). Diese wurde genutzt, um aus der Beobachtung von Verschiebungen für bestimmte Aminosäuren im NMR-Experiment durch Assoziation des untersuchten Liganden ein Bindungsmodell für eben diesen Liganden zu erstellen.

Im Unterschied zu anderen Rechenmethoden lassen sich bei dieser flexiblen Dockingmethode mehrdeutige Interaktionseinschränkungen (engl. ambiguous interaction restraints) berücksichtigen, wobei identifizierte oder vorhergesagte Schnittstellen zwischen Ligand und Protein verwendet werden. Solche Rahmenbedingungen können auch in der Schrödinger-Software eingestellt werden, jedoch ist dieser Vorgang bei Haddock für den Anwender stark vereinfacht. Durch den flexiblen Ansatz ist Haddock zudem in der Lage, kleine konformelle Änderungen am Protein durch Bindung der Liganden bei der Verfeinerung der Moleküldynamik zu berücksichtigen.

Bei der verwendeten Nutzeroberfläche ist es möglich, zwei PDB-Dateien für die zwei im Docking kombinierten Moleküle, wie zum Beispiel Rezeptor und Ligand, hochzuladen. Zusätzlich werden Sets von aktiven und passiven Resten definiert. Anschließend wird das Docking in drei Schritten durchgeführt. Im ersten Schritt werden zufällige Orientierungen generiert und Minimierungen der Energie für die starren Körper werden durchgeführt. Anschließend wird ein halbstarres „Simulated-Annealing-Schritt“ durchgeführt. „Simulated Annealing“ ist eine Methode, bei der das Protein *in silico* stark aufgeheizt wird, ohne zu denaturieren. Sie wird angewandt, um die Konformationsänderungen zu beschleunigen und Energieminima durch gezieltes und schlagartiges Abkühlen schneller zu erreichen. Die durch dieses Einfrieren erhaltene Konformation wird hinsichtlich ihrer Energie durch Kraftfeldrechnungen bewertet. Im dritten Schritt erfolgt eine Verfeinerung des kartesischen Raums durch Berechnung des expliziten Lösungsmittels.^{112,113} Das Modell

des expliziten Lösungsmittels berücksichtigt das Lösungsmittel als Zusammensetzung definierter Moleküle, während implizite Modelle das Wasser als Kontinuum ansehen.¹¹⁴

Als Ergebnis der Dockings erhält man verschiedene Cluster von Protein-Ligand-Komplexen, wobei sich der Bindungsstelle von Cluster zu Cluster unterscheidet. Die kalkulierte Energie des Protein-Ligand-Komplexes spiegelt sich im dazugehörigen Haddock-Score wider, wobei ein möglichst negativer Wert einem stabileren Komplex entspricht. Ebenfalls wichtig für die Auswertung sind die Anzahl der Posen, die einem einzelnen Cluster zugeordnet werden können, und der sogenannte RMSD-Wert (root-mean-square deviation), welcher die Differenz der Atomlagen übereinandergelegter Proteinstrukturen beschreibt. Dabei entspricht der angegebene RMSD-Wert der Abweichung des energieärmsten Protein-Ligand-Komplexes des jeweiligen Clusters vom Durchschnitt aller anderen Komplexe. Somit spricht ein niedriger RMSD-Wert für eine wahrscheinlichere Konformation des Proteins. Auch die Population an Posen in den jeweiligen Clustern spielt eine Rolle. Ein großer Wert an Clustermitgliedern bedeutet eine hohe Wahrscheinlichkeit der Positionierung des Liganden in dieser Proteinregion, da die Lösung der Einschränkungen durch vorgegebene Interaktionen häufiger zu diesem Ergebnis führt.

Allgemein sind weniger Cluster zu erwarten, je besser der Ligand an das Protein bindet, da die experimentell bedingten Rahmenbedingungen immer spezifischer werden sollten. Aminosäuren, die mit solchen Liganden wechselwirken, sollten stärkere Abweichungen von der ligandenfreien Proteinstruktur aufweisen. Wenn hingegen viele Cluster auftauchen, kann das für eine schwache Bindung am Protein oder im Falle einer bereits bestätigten starken Bindung für eine unspezifische Bindung sprechen.

3.2 Biophysikalische Hintergründe der Assoziation von Liganden

3.2.1 Kenngrößen für die Assoziation von Proteinliganden

Für eine spätere Diskussion der Ergebnisse ist eine Betrachtung der biochemischen Messgrößen und deren Zusammenhang nötig. Die Assoziation des Liganden wird in der Regel über die Dissoziationskonstante K_D bestimmt, die dem Kehrwert der Assoziationskonstante K_A entspricht und die Einheit mol/L besitzt. Sie entspricht dem Verhältnis des Produkts aus Liganden- $[L]$ und Proteinkonzentration $[P]$ zur Konzentration des Ligand-Protein-Komplexes:¹⁰⁴

$$K_D = \frac{[L] \times [P]}{[LP - \text{Komplex}]} \quad (1)$$

Der K_D -Wert kann als Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes über die CHENG-PRUSOFF-Gleichung (2) in die halbmaximale inhibitorische Konzentration den sogenannten IC_{50} -Wert umgerechnet werden:¹¹⁵

$$IC_{50} = \left(1 + \frac{[S]}{K_m}\right) \times K_D \quad (2)$$

Der IC_{50} -Wert ist zudem von der Michaelis-Menten-Konstante K_m und der Konzentration des Enzymsubstrats $[S]$ abhängig. Die hier genannten Formeln sind für das Verständnis der Zusammenhänge von IC_{50} -Wert und Dissoziationskonstante existenziell. Ist der beobachtete inhibitorische Effekt tatsächlich auf das adressierte Zielprotein zurückzuführen, so sollten die beiden Werte eine proportionale Beziehung zeigen. Im anderen Fall deutet eine starke Abweichung der Werte auf zwei mögliche Szenarien hin. Zum einen würde ein deutlich besserer IC_{50} -Wert auf Off-Target-Effekte hindeuten, während ein schlechterer IC_{50} -Wert dafürspricht, dass die erfolgte Assoziation des Liganden nicht den erhofften inhibitorischen Effekt auf die betrachtete Reaktion zeigt.

Die Dissoziationskonstante wird in den experimentellen Methoden als Messgröße für freie Energie der Bindung genutzt, wobei diese beiden Größen über folgenden Zusammenhang ineinander überführt werden können:

$$\Delta G = RT \ln K_D \quad (3)$$

Dabei beschreibt R die ideale Gaskonstante und T die Temperatur in Kelvin. Bei entsprechender Berechnung ergibt sich, dass die Änderung der Dissoziationskonstanten um eine Größenordnung einer Änderung der freien Bindungsenthalpie um 5.9 kJ/mol entspricht.¹⁰⁴

3.2.2 Einflüsse auf die Bindungsenthalpie einer Protein-Ligand-Bindung

Das erste Ziel der Wirkstoffentwicklung ist die Entwicklung eines hochaffinen Liganden für ein bestimmtes Zielprotein. Dabei sind verschiedene Struktureigenschaften und daraus resultierende Wechselwirkungen des Liganden Voraussetzung für seine Bindung am Protein. In der Regel haben diese Wechselwirkungen einen Enthalpiegewinn zur Folge. Jedoch geht aus der GIBBS-HELMHOLTZ-Gleichung (4) hervor, dass auch entropische Beiträge für die freie Bindungsenthalpie (ΔG) entscheidend sind, wobei diese Beiträge mit der Temperatur (T) gewichtet sind. Aus ihr geht der direkte Zusammenhang von freier Enthalpie, der Enthalpieänderung (ΔH) und der Entropieänderung (ΔS) hervor:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (4)$$

Entropisch bevorzugt ist beispielsweise die Freisetzung von Wassermolekülen aus einer Bindungsstelle dadurch, dass diese Wassermoleküle einen großen Zugewinn an Freiheitsgraden erhalten. Es wird vom hydrophoben Effekt gesprochen. Die Fixierung eines sehr flexiblen Liganden in einer Konformation, welche für die Bindung am Protein gebraucht wird, ist hingegen mit einem Verlust an Freiheitsgraden verbunden, weshalb dieser Vorgang entropisch ungünstig ist. Dadurch folgt für die designten Liganden, dass

diejenigen Liganden eine bessere Bindung aufweisen sollten, die bereits in der für die Proteinbindung nötigen Konformation fixiert sind.

Neben dem entropisch günstigen Effekt der Wasserfreisetzung, spielt Wasser bei weiteren für die Energiebilanz wichtigen Vorgängen eine Rolle. Die Entfernung des Wassers aus einer hydrophoben Bindetasche bringt einen Enthalpiegewinn mit sich, während die Entfernung von Wassermolekülen, die über Wasserstoffbrücken mit den Aminosäuren des Proteins koordiniert sind, mit einem Verlust an Enthalpie einhergehen. Auch die Auflösung der Hydrathülle bei der Desolvatisierung im Zuge der Assoziation an das Protein kann zwei Effekte haben. Die Entfernung hydrophober Anteile des Liganden aus der wässrigen Lösung ist entsprechend mit einem Energiegewinn verbunden, während günstige Wechselwirkungen mit der Hydrathülle einen Energieverlust bei Bindung des Liganden bedeuten. Alle diese Beiträge haben im Zusammenspiel aus Enthalpie und Entropie Einfluss auf die schlussendliche Affinität eines Liganden und sind daher bei der Wirkstoffentwicklung zu berücksichtigen.¹⁰⁴

3.3 Biochemische und biologische Tests der Liganden

Im Rahmen des EFRE-Projektes „RIST“ (RAS-Inhibition in soliden Tumoren) wurden die biochemischen und biologischen Einflüsse der synthetisierten Liganden von Kooperationspartnern an der Ruhruniversität Bochum, beim Lead Discovery Center in Dortmund und am Universitätsklinikum in Essen untersucht.

3.3.1 ¹H-¹⁵N-HSQC-Experimente

Standardmäßig wurden die Liganden in zweidimensionalen NMR-Experimenten im Arbeitskreis von Prof. Dr. Stoll in Bochum vermessen. Dabei kann die Bindung eines Liganden an ein ¹⁵N-markiertes K-RAS4B-Protein durch Auftreten von Abweichungen von ¹H- oder ¹⁵N-Amid-Verschiebungen nachgewiesen werden.^{103,116} Dies war vor allem zu

Beginn der Arbeiten nur für die GDP-gebundene Form des Proteins möglich. In dieser Form ist es aber dann sogar möglich, den K_D -Wert für die Bindung des Liganden zu berechnen, wenn man den Liganden zum Protein hinzutitriert (**Abbildung 41**). Bei der GTP-gebundenen Form kommt es, wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben, zur Linienverbreiterung für wichtige Signale. Insgesamt ist das NMR-Experiment auf einen recht hohen Konzentrationsbereich beschränkt, weshalb die Methode nur für schwache Liganden geeignet ist.¹¹⁶

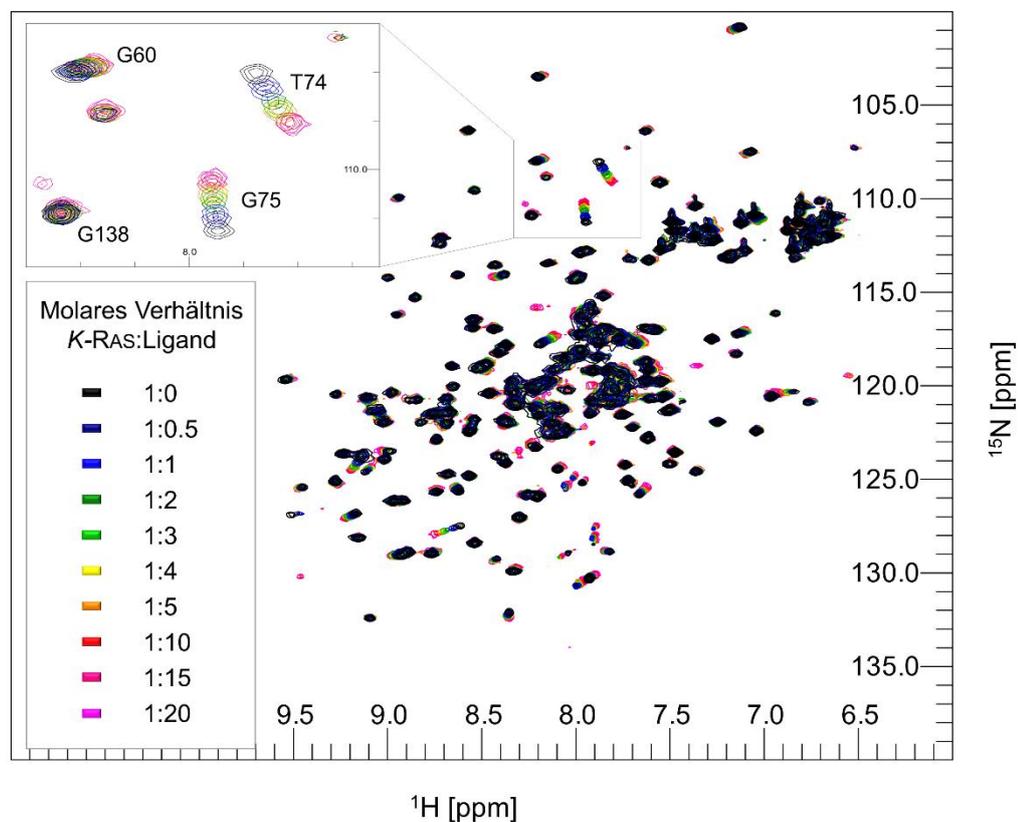


Abbildung 41: Beispielhafte Darstellung der ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren während der Titration mit Hydrazon **122** (vgl. Kapitel 5.3).

Die Unterschiede zwischen ligandengebundener und ligandenfreier Form des Proteins zeigen sich über Verschiebungen der zugeordneten Signale, da diese durch Veränderung der chemischen Umgebung der jeweiligen Aminosäuren entstehen. Dabei können diese Veränderungen sowohl durch direkte als auch durch allosterische Wechselwirkungen

zustande kommen. Qualifiziert werden sie durch die Messung der Differenz der Verschiebungen zwischen freiem Protein und ligandengesättigter Form. Besonders signifikante Veränderungen sind dabei diejenigen, die bei dieser Verschiebungsdifferenz einen Wert oberhalb oder gleich der zweifachen Standardabweichung annehmen. Aus diesem Grund wurden die Aminosäuren, für die diese Bedingung gilt, als Rahmenbedingungen für die Haddock-Rechnungen angegeben.

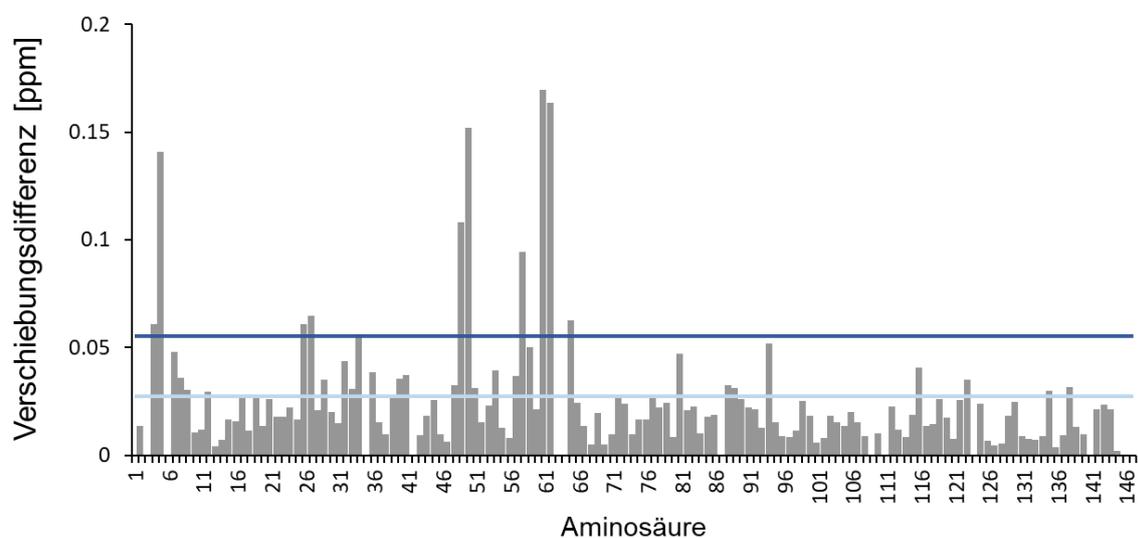


Abbildung 42: Beispielhafte Darstellung der bestimmten Verschiebungsunterschiede zwischen freiem *K*-RAS4B₁₈₈ (GDP) und der mit Hydrazon **122** gesättigten Form bei zwanzigfachem Überschuss des Liganden; dabei kennzeichnet die hellblaue Linie den Wert der einfachen Standardabweichung und die dunkelblaue Linie den Wert der zweifachen Standardabweichung.

3.3.2 *MST-Experimente*

Eine weitere Möglichkeit der K_D -Wert-Bestimmung ist die Verwendung der MicroScale Thermophorese, wobei diese Methode einige Vorteile gegenüber dem NMR-Experiment bietet. Zum einen ist sie unabhängig von der Ausgangskonformation des Proteins und zudem wesentlich empfindlicher. Mit dieser Methode ist die Beobachtung molekularer Wechselwirkungen im pikomolaren Konzentrationsbereich also auch für entsprechend niedrige Dissoziationskonstanten möglich. Die Methode bedient sich der Kombination aus

der Genauigkeit der Fluoreszenzdetektion und der Empfindlichkeit und Variabilität der Thermophorese. Der experimentelle Aufbau besteht aus Glaskapillaren die mit einer Lösung mit fester Konzentration an Protein und einem kovalent gebundenen oder intrinsischen Fluorophor gefüllt sind. Zusätzlich liegen in den Glaskapillaren unterschiedliche Konzentrationen des zu untersuchenden Liganden vor. In jeder der Kapillaren wird mit Hilfe eines Infrarotlasers ein Temperaturgradient zwischen 2 – 6 °C induziert, durch den die Fluorophore angeregt werden. Die daraufhin folgende Thermophorese eines Proteins unterscheidet sich mindestens durch Unterschiede der Solvatationsenergie, wenn nicht sogar durch Größen- und Ladungsunterschieden von der Thermophorese des jeweiligen Protein-Ligand-Komplex. Diese Unterschiede spiegeln sich in der erfassten Emission der Fluorophore wider und das in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration. So kann eine Titrationskurve erstellt und die Dissoziationskonstante bestimmt werden. Jedoch verfügt diese Methode im Gegensatz zum NMR-Experiment über keine Aussage hinsichtlich des Bindungsmodus der untersuchten Liganden.¹¹⁷

3.3.3 Biochemischer RAS-SOS-Austauschassay

Ebenso wie die MST-Experimente wurde der Austauschassay von der kooperierenden Firma LDC aus Dortmund entwickelt. Dabei wird der SOS1-vermittelte Austausch von GDP gegen GTP in der Nucleotidbindestelle von K-RAS über die GDP-Freisetzung gemessen. Über ein GDP-Detektions-Reagenz wird das freie GDP in einer anschließenden Reaktion mit einer Glykosyltransferase in ATP überführt. Eine Luciferase oxidiert unter ATP-Verbrauch anschließend ein Luciferin, was zu einem Lumineszenzsignal führt.

Wird die Reaktion von SOS mit RAS gehemmt, so kommt es zu einem Abfall des Lumineszenzsignals, da weniger GDP freigesetzt wird. Auf diese Weise lassen sich Inhibitoren der RAS-SOS1-Wechselwirkung finden. Zudem kann aus einer erstellten Kurve des Messsignals in Korrelation mit der Ligandenkonzentration die halbmaximale

inhibitorische Konzentration (IC_{50} -Wert) direkt bestimmt werden. Umgekehrt können auch Aktivatoren und der daraus resultierende AC_{50} -Wert bestimmt werden, wenn die GDP-Konzentration durch Zugabe des Liganden im Vergleich zum Referenzexperiment ohne Liganden steigt.¹¹⁸

Da häufig Mehrfachbestimmungen durchgeführt wurden, werden die Daten dieses Assays teilweise zugunsten der Anschaulichkeit mit ihrem Mittelwert angegeben. Diese Werte sind jedoch entsprechend gekennzeichnet. Bei der Berechnung wurden Ausreißerwerte zudem ausgeschlossen.

3.3.4 *Zellassays*

Für Zelltests wurden Assays zur Zellviabilität verwendet, darunter der sogenannte CTG-Assay (engl. CellTiter-Glo[®]) bei LDC. Bei diesem Assay wird ein Reagenz zugegeben, das zunächst zur Zytolyse, der Auflösung oder Schädigung der Zellmembran, führt. Anschließend wird mit Hilfe eines Lumineszenzfarbstoffes die Menge an vorhandenem ATP gemessen. Dabei wird die Lumineszenz des Farbstoffs, ähnlich wie beim RAS-SOS-Austauschassay, durch eine Umsetzung unter ATP-Verbrauch mit Hilfe einer Luciferase induziert. Da die ATP-Menge direkt proportional zur Anzahl der in der Kultur vorhandenen lebensfähigen Zellen ist, kann über eine Quantifizierung eines gemessenen Lumineszenz-Signals die Zellproliferation oder das Absterben von Zellen vor und nach Zugabe einer zu testenden Substanz verglichen werden. So können zum Beispiel, wie bei den Tests der Firma LDC, IC_{50} -Werte für die Proliferation bestimmt werden.

Ein zweiter seltener eingesetzter Assay ist der XTT-Assay, der ebenfalls die Zellviabilität überprüft. Im Unterschied zum CTG-Assay ist dabei keine Zytolyse der Zellen nötig, wodurch die gleichen Zellen zu mehreren Zeitpunkten untersucht werden können. Als Farbstoff werden Tetrazolium-Verbindungen eingesetzt, die zu farbigen Formazanen reduziert werden. Die durch die Reduktion auftretende Farbänderung ist dabei ein Maß

für den Metabolismus lebensfähiger Zellen. Daher können sowohl Effekte auf die Proliferation als auch auf den Metabolismus selbst in diesem Assay-System beobachtet werden.¹¹⁸ Dieser Assay wurde am Universitätsklinikum in Essen durchgeführt.

4 Zielsetzung

Angelehnt an die Vorarbeiten der Arbeitsgruppen SCHERKENBECK und STOLL war es Ziel dieser Arbeit, zunächst weitere Struktur-Wirkungs-Beziehungen für die Familie der Bisphenole als *K-RAS4B*-Liganden zu ermitteln.^{57,102,103} Diese sollten für eine Optimierung genutzt werden, sodass trotz der literaturbeschriebenen Pseudo-Aktivierung des *K-RAS*-Proteins die Funktion der GTP-gebundenen aktiven Form allosterisch inhibiert wird. Ein besonderer Fokus wurde dabei auf die Inhibition des SOS-vermittelten Nukleotidaustauschs gelegt.

Bekannt war, dass die Blockierung der Hydroxygruppe von unsubstituierten Bisphenolen zum Bindungsverlust führt. Auch die zuvor durchgeführten Variationen des verbrückenden Elementes hatten nicht bindende Derivate ergeben. Somit waren für die Erstellung von weiteren Derivaten die Variation des verbrückenden Elementes und der Hydroxygruppen der Phenol-Ringe besonders interessant. Das verbrückende Element sollte ausgehend von 4,4'-Dihydroxybenzophenon (DHBP) variiert werden. Diese Verbindung war in dem ersten NMR-Screening der Bisphenole als Ligand des Rheb-Proteins identifiziert, jedoch nie an *K-RAS* getestet worden. Die Hydroxygruppen der Liganden sollten hingegen durch Aminogruppen ersetzt werden. So hätten die Liganden einen Anknüpfungspunkt für Derivatisierungen durch Erweiterung des Grundkörpers, da auch ein sekundäres Amin weiterhin in der Lage ist, wichtige Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrücken auszubilden.

Weiterhin sollten die Bisphenolfragmente entsprechend zu größeren und potenziell besseren Liganden erweitert werden. Den Ausgangspunkt für diese Strategie sollten Docking-Studien mit den Kristallstrukturen von FESIK *et. al.* darstellen, welche die von dieser Forschungsgruppe beschriebene erweiterte Bindetasche abbilden.⁵⁶

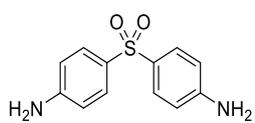
Unter Verwendung von *in silico* Methoden sollten weitere von Bisphenolen ausgehende, aber abgewandelte Liganden identifiziert und für eine biochemische Charakterisierung bezüglich der Wirkung auf *K-RAS* synthetisiert werden.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Derivatisierung des schwefelverbrückten Bisphenol-Derivats BPS

Zu Beginn der Arbeiten wurden zunächst einige einfache Derivate von Bisphenol S (BPS, **102**) getestet, das in den vorangegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe Scherkenbeck (Kapitel 2.3) als *K*-RAS-Ligand identifiziert wurde und mit einer Dissoziationskonstante von 5.4 mM an die GDP-gebundene Form von *K*-RAS4B bindet. Der Austausch der phenolischen Hydroxygruppen durch Amine hin zum Bisamin Dapson (**105**), das als antibiotische und entzündungshemmende Verbindung bekannt ist, führte zu einer höheren Affinität an die GDP-gebundene Form von *K*-RAS.¹¹⁹ Die Dissoziationskonstante verringert sich durch diese Modifikation für den Wildtyp des Onkoproteins um das Fünffache auf einen Wert von 1.1 mM (**Tabelle 2**), während keine herausragende Diskriminierung im Vergleich zu den Mutanten G12V und G12D auftritt. Die Affinität an die Mutanten liegt mit 1.2 mM und 1.3 mM im gleichen Konzentrationsbereich. Im STD-Experiment war zudem eine Bindung des Liganden an die aktive sowie die inaktive Form von *K*-RAS zu erkennen.

Tabelle 2: Über das NMR-bestimmte Dissoziationskonstanten an verschiedene Mutanten von *K*-RAS4B (GDP), sowie Bindungsstudien über STD-Messungen an beiden Nukleotidformen von *K*-RAS^{WT}.

Verbindung	NMR-Daten				
	K _D [mM]			Bindung im STD für <i>K</i> -RAS ^{WT}	
	¹ H- ¹⁵ N-HSQC			GDP	
	WT	G12V	G12C	GDP	GDP
105 	1.1 ± 0.3	1.2 ± 0.2	1.3 ± 0.4	bindet	bindet

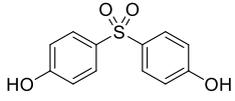
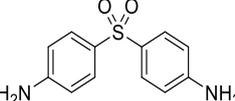
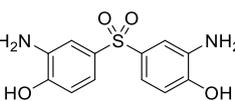
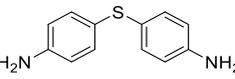
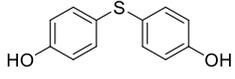
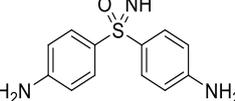
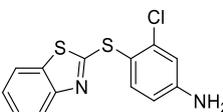
Die Daten des RAS-SOS-Austausch-Assays zeigen, dass das Dapson trotz der höheren Affinität den GEF-vermittelten Nukleotidaustausch weniger stark inhibiert als das Bisphenol S (**Tabelle 3**). Auch im durchgeführten CTG-Assay zeigten sich bei Verabreichung von Dapson keine nennenswerten inhibitorischen Effekte bei den Zelllinien Capan-1 und NCI-H358.

Da die Affinitätssteigerung im Vergleich zum BPS aber ein erster Erfolg war, wurden weitere schwefelverbrückte Derivate getestet. Dabei waren sowohl ein sulfonverbrücktes Analogon zum BPNH₂ (**106**) und sulfidverbrückte Analoga von BPS und Dapson (**107** und **108**) wie das Dapson käuflich erhältlich. Das Sulfon **106**, sowie das Bisphenolsulfid **108** binden im gleichen Konzentrationsbereich. Mit 3.3 mM für Verbindung **106** und 3.5 mM für Verbindung **108** ist die Assoziation an *K*-RAS deutlich schwächer als für das Dapson, weshalb keine weiteren Messungen dieser Derivate durchgeführt wurden. Das Dapson-Analogon, bei dem das Sulfon durch eine Sulfidbrücke substituiert ist (Verbindung **107**), bindet mit einem K_D-Wert von 1.0 mM dagegen ähnlich gut wie Dapson selbst. Daraus lässt sich schließen, dass für die schwefelverbrückten Verbindungen eine Substitution der phenolischen Hydroxygruppen durch Amine zu einer höheren Affinität führen, unabhängig von der Oxidationsstufe des Schwefelatoms.

Als erstes Synthesziel wurde das Sulfoximin **109** gewählt, da es aufgrund seiner isoelektronischen Eigenschaften im Vergleich zum Dapson und hinsichtlich der bisher aufgestellten Struktur-Wirkungsbeziehungen eine ähnlich gute Bindung versprach. Zudem bestand die Hoffnung, dass die Bereitstellung einer Wasserstoffbrückendonorfunktion durch den Imin-Teil des Sulfoximins zu einem Zugewinn an Bindungsenthalpie durch Bildung weiterer Wasserstoffbrücken sorgt. Die Verbindung zeigte nach Fertigstellung in den biochemischen Untersuchungen jedoch mit einem K_D-Wert von 5.0 mM eine deutlich schwächere Bindung an GDP-gebundenes *K*-RAS, während auch die Inhibition des SOS-vermittelten Nukleotidaustauschs nicht verstärkt wurde.

Weiterhin wurde der von XIE *et al.* beschriebene Ligand **91** synthetisiert, der laut Literatur mit einem K_D -Wert von 92 μM an *K*-RAS binden soll.⁹⁶ Diese Verbindung sollte als Benchmark-Verbindung mit ähnlichen strukturellen Eigenschaften, wie die bisher beschriebenen Verbindungen dienen. Unter den Bedingungen des ^1H - ^{15}N -HSQC-Experiments sowie des Nukleotidaustauschassays konnte weder eine Assoziation an RAS noch eine Inhibierung der SOS-vermittelten GDP-Freisetzung festgestellt werden.

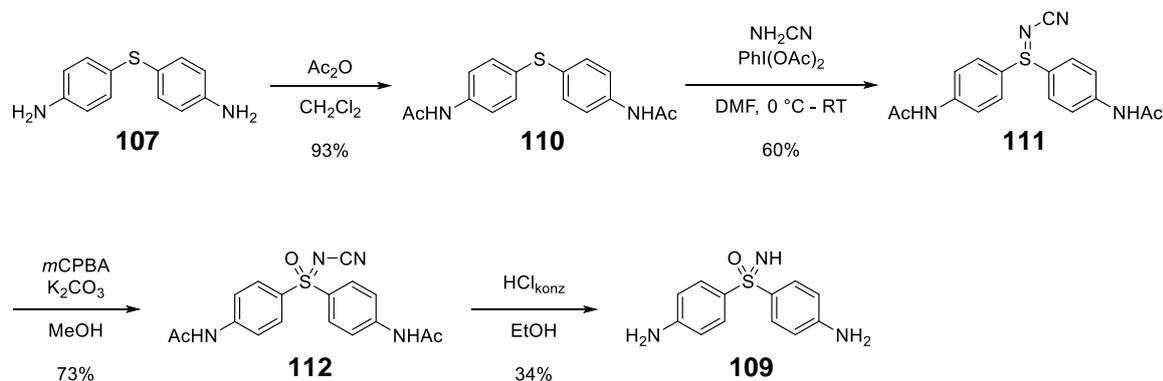
Tabelle 3: Dissoziationskonstanten an *K*-RAS^{WT} (GDP) und halbmaximale inhibitorische Konzentration für den RAS-SOS-Austausch zu den BPS-abgeleiteten Strukturen.

Verbindung	Biochemische Daten					
	K_D [mM] ^1H - ^{15}N - HSQC	IC_{50} [μM] RAS-SOS-Austausch-Assay				
		WT (GDP)	WT \emptyset	WT neu (Jan. 2020)	WT neu (Feb. 2020)	G12D
102 	5.8 ± 0.7	911	2631	-	-	-
105 	1.1 ± 0.3	>2913	>3000	-	-	-
106 	3.3 ± 0.1	-	-	-	-	-
107 	1.0 ± 0.03	>3000	-	-	>3000	>3000
108 	3.5 ± 0.6	-	-	-	-	-
109 	5.0 ± 1.6	>3000	-	-	>3000	>3000
91 	gelöst, keine Bindung	3751	-	-	-	-

5.1.1 *Synthese des Sulfoximins 109*

Die Synthese wurde ausgehend von Bis(4-aminophenyl)sulfid (**107**) ohne größere Probleme analog zu einer Literaturvorschrift von C. BOLM *et al.* durchgeführt (**Schema 1**).¹²⁰

Das 4,4'-Diacetamidodiphenylsulfid (**110**), welches im ersten Schritt hergestellt wurde, fiel unter den in der Literatur beschriebenen Bedingungen der Aufarbeitung aus. Während in der Literatur eine Extraktion mit Dichlormethan angegeben war, ließ sich das Produkt mit diesem Lösungsmittel nur zu sehr geringem Anteil in die flüssige organische Phase überführen. Daher wurde es stattdessen abfiltriert und durch Waschen mit Natriumhydrogencarbonatlösung und anschließende Umkristallisation in einem Ethanol-Wasser-Gemisch gereinigt. So konnte auf die in der Literatur beschriebene säulenchromatographische Trennung verzichtet werden.



Schema 1: Synthese des Sulfoximins **109** als isoelektronisches Analogon zu Dapson (**105**).

In einer ersten Durchführung der Oxidation mit Diacetoxyiodbenzol zum Sulfilimin **111** wurde das nach erfolgloser Säulenchromatographie mit den literaturbeschriebenen Lösungsmitteln erhaltene Gemisch aus Öl und Feststoff durch Waschen mit Acetonitril getrennt und der erhaltene Feststoff als gewünschtes Produkt identifiziert. Dabei wurde mit 45% eine ähnliche Ausbeute wie in der Literatur (47%) erzielt. In einer zweiten Durchführung des Experiments wurde das Rohprodukt nach Extraktion und Trocknung

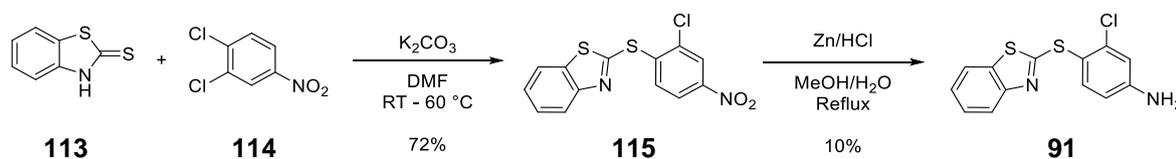
mit Ethylacetat versetzt, wodurch das Produkt ausgefällt und abfiltriert werden konnte. Auf diese Weise wurde sogar eine Ausbeute von 60% erreicht.

Bei der anschließenden Oxidation zum geschützten Sulfoximin **112** war wieder ein Löslichkeitsproblem des Produkts zu beobachten. Bei der Extraktion mit dem in der Literatur verwendeten Dichlormethan blieben große Mengen weißen Feststoffs ungelöst, weshalb dieser abfiltriert wurde. Während durch die Extraktion rund 80 mg Rohprodukt gewonnen werden konnten, wurden 290 mg Feststoff durch Filtration erhalten, welcher sich als das gewünschte Produkt herausstellte. Jedoch waren 14% Verunreinigung durch das Edukt im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zu erkennen, wodurch sich eine Ausbeute von 73% ergibt (Lit.: 78%).

Das saubere Endprodukt (**109**) wurde erst nach zweifacher Chromatographie im Anschluss an die saure Entschützung erhalten. Dadurch kam es zu einer geringen in Ausbeute (34%), während die Literaturstelle eine Ausbeute von 85% beschreibt.

5.1.2 Synthese der Benchmark-Verbindung 91

Die Verbindung wurde ausgehend von 1,2-Dichlornitrobenzol (**114**) durch nukleophile aromatische Substitution mit 2-Mercaptobenzothiazol (**113**) als Nukleophil und anschließende Reduktion der Nitrogruppe hergestellt. Dabei wurden Base und Lösungsmittel für die Substitutionsreaktion einer Veröffentlichung von SAFONOVA *et al.* entnommen,¹²¹ während für die Reduktion klassische Lehrbuchbedingungen verwendet wurden. In Bezug auf die Ausbeute, hätten die Bedingungen weiter optimiert werden müssen. Die Menge des mit 10% Ausbeute erhaltenen Produktes reichte jedoch für die biochemischen Test vollkommen aus, weshalb auf diesen Mehraufwand verzichtet wurde.



Schema 2: Synthese der Benchmark-Verbindung **91**, die als *K*-RAS-Ligand mit einem K_D -Wert von 92 μM beschrieben wurde.

Die Gruppe um XIE beschreibt ihre Ergebnisse zu der von ihnen als „0375-0604“ bezeichneten Verbindung (**91**) ausgehend von Docking-Studien.⁹⁶ Die Assoziation an *K*-RAS wurde mittels Biolayer-Interferometrie ermittelt und ansonsten wurden *in vivo* Tests durchgeführt, um den inhibitorischen Einfluss der Verbindung auf die Proliferation bei *K*-RAS-mutierten Zellen von nicht kleinzelligem Lungenkrebs zu zeigen. Auch beschreiben XIE *et al.* eine Inhibierung der Bildung des *K*-RAS-GTP-Komplexes und der Downstream-Aktivierung von *K*-RAS *in vivo* durch die Verbindung **91**.⁹⁶ Somit sollte davon auszugehen sein, dass die Verbindung **91** an GDP-gebundenes *K*-RAS binden sollte. An der Ruhruniversität Bochum durchgeführte NMR-Untersuchungen widerlegten jedoch eine Assoziation an inaktives *K*-RAS4B (**Tabelle 3**).

In einer weiteren Publikation, die erst nach dieser Nachsynthese Beachtung fand, werden Derivate dieser Verbindung von MILIK *et al.* beschrieben, die bezüglich ihrer Inhibitor-

Eigenschaften gegenüber dem EGF-Rezeptor analysiert wurden.¹²² Da dieser Rezeptor einen Upstream-Effektor des RAS-Proteins darstellt, lässt das die Vermutung zu, dass die *in vivo* Ergebnisse von XIE *et al.* eventuell gar nicht auf einer Inhibierung von *K*-RAS beruhen, sondern auf Off-Target-Effekte zurückzuführen sind.

5.1.3 Betrachtung der berechneten Bindungsmodi der schwefelverbrückten Bisarylverbindungen

Obwohl die untersuchten Verbindungen eine stärkere Assoziation an *K*-RAS ausweisen als das BPS (**102**), inhibieren sie den SOS-vermittelten Nukleotidaustausch schlechter als diese Ausgangsverbindung. Da sich die Verbindungen in ihrer Größe kaum von BPS unterscheiden, ist eine unzureichende Größe für die Inhibition von PPIs als Grund für die geringen Effekte im Austauschassay ausgeschlossen.

Aus diesem Grund wurden die aus Bochum erhaltenen NMR-Verschiebungen verwendet, um Rahmenbedingungen für eine Berechnung möglicher Bindungsmodi mit Hilfe der Haddock-Software zu liefern. Bei den Ergebnissen wird als Kenngröße der Haddock-Score, der eine energetische Bewertung der einzelnen Cluster beinhaltet, neben der Zahl der Clustermitglieder, dem RMSD-Wert (Root-mean-square deviation) und einer Energie (restraints violation energy, RVE) für nicht eingehaltene Rahmenbedingungen angegeben (vgl. Kapitel 3.1.3). Der angegebene RMSD-Wert, ist dabei eine Größe, die die Abweichung der Atompositionen des Proteins im Unterschied zur energieärmsten Proteinstruktur bezeichnet. In den Abbildungen der Haddock-Ergebnisse folgt die Clusterbezeichnung der Zahl der Clustermitglieder, während die Sortierung der Cluster dem Haddock-Score folgt.

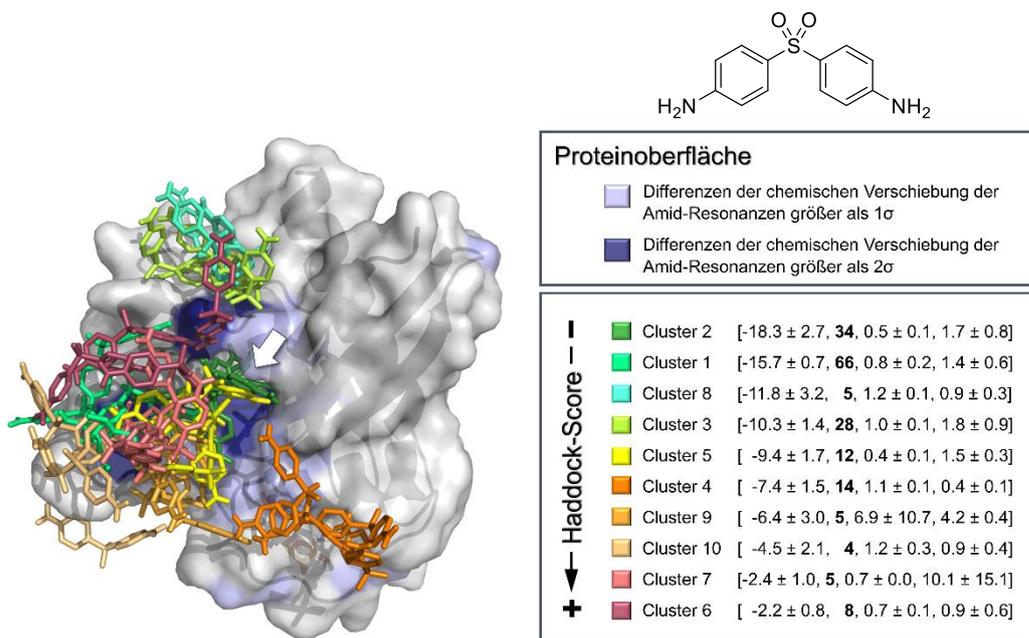


Abbildung 43: Darstellung der durch Haddock 2.4 unter Berücksichtigung der NMR-Restraints berechneten Cluster für die Bindung von Dapson (**105**) an GDP-gebundenes *K*-RAS4B^{WT} (PDB:6MBT); dabei [Haddock-Score, **Zahl der Clustermittglieder**, RMSD-Wert, RVE]; der weiße Pfeil kennzeichnet die Lage der SI/II-Bindestelle.

Für das Dapson (**105**) zeigen die Ergebnisse der Rechnung bereits mehrere mögliche Cluster an verschiedenen Positionen der Proteinoberfläche (**Abbildung 43**). Dabei liegen die beiden energiegünstigsten und gleichzeitig größten Cluster nahe der SI/II-Bindestelle, weshalb angenommen werden kann, dass der Ligand tatsächlich in der adressierten Region gebunden wird. Trotz der ähnlichen Größe und des ähnlichen Bindungsmodus weist BPS (**102**) eine besser erkennbare Inhibition des SOS-abhängigen Nukleotidaustauschs auf. Die Ursache hierfür bleibt ungeklärt, wobei die Vermutung naheliegt, dass durch die Aminogruppen ähnliche Wechselwirkungen mit SOS möglich bleiben wie ohne den Liganden.

Die bessere Bindung des Diarylsulfids **108** in Verbindung mit der nicht zu beobachtenden Inhibition des Nukleotidaustauschs führt bei dieser Erklärung jedoch zunächst zur Verwunderung. Bei Betrachtung der Haddock-Ergebnisse lässt sich aber eine mögliche Erklärung dieses Phänomens finden.

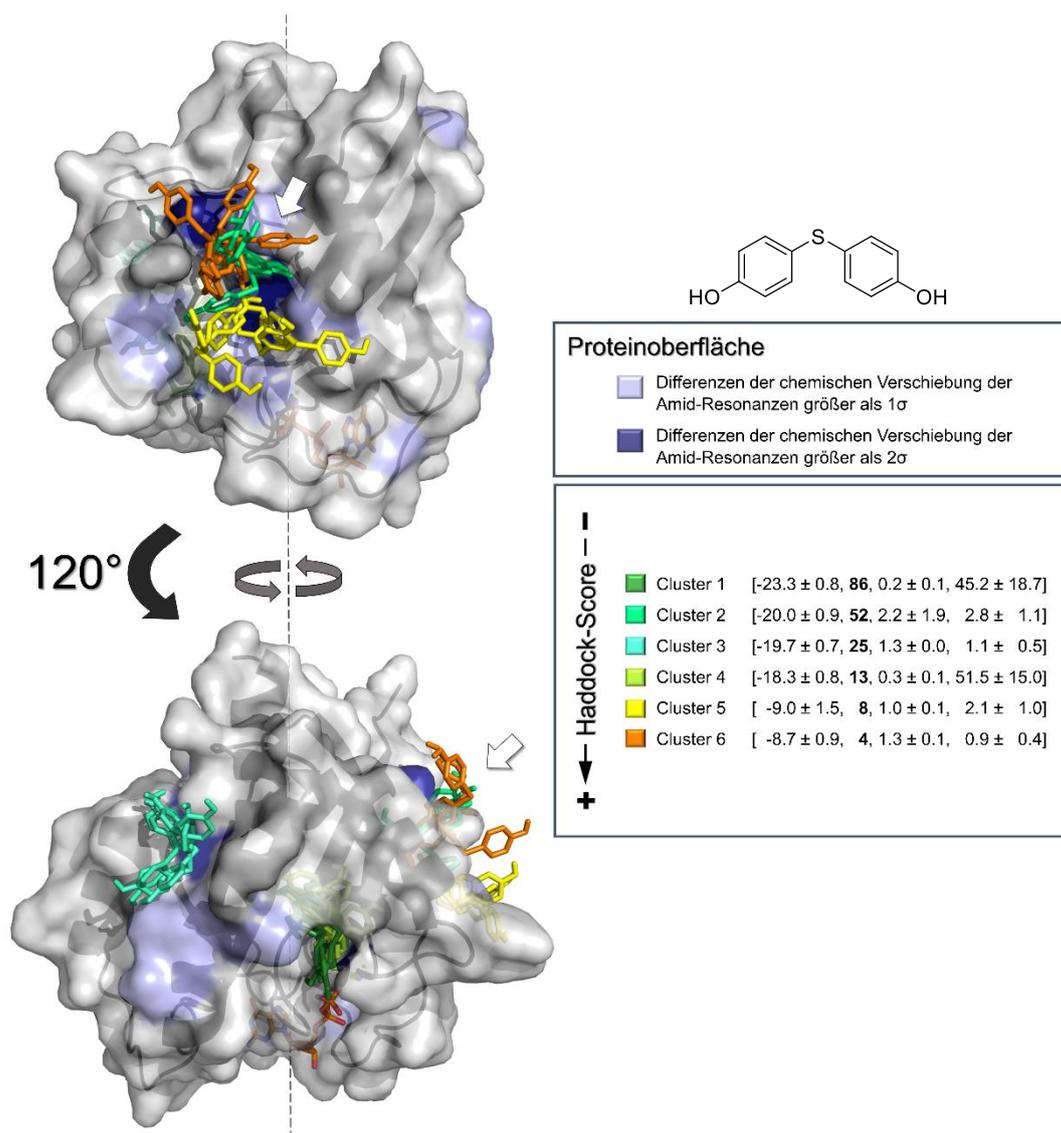


Abbildung 44: Darstellung der durch Haddock 2.4 unter Berücksichtigung der NMR-Restraints berechneten Cluster für die Bindung des Diarylsulfids **108** an GDP-gebundenes *K-RAS4B^{WT}* (PDB:6MBT); dabei [Haddock-Score, **Zahl der Clustermmitglieder**, RMSD-Wert, RVE]; der weiße Pfeil kennzeichnet die Lage der SI/II-Bindestelle.

Bei dieser Berechnung fällt auf, dass der größte und gleichzeitig energiegünstigste Cluster nun eher in der Region der SIIP-Bindestelle liegt. Eventuell führt die Abwesenheit der Sulfon-Sauerstoffatome zu einer leichteren Einpassung in diese Protein-Bindestelle, was die fehlende inhibitorische Wirkung im RAS-SOS-Austauschassay erklären würde. Es darf aber auch nicht vernachlässigt werden, dass der zweitgünstigste und gleichzeitig zweitgrößte

Cluster wieder in der SI/II-Bindungsregion liegt, während die NMR-Verschiebungen besser zu diesem zweiten Cluster passen. Das ist an der deutlich höheren RVE für den ersten Cluster zu erkennen. Die Verschiebungen, die zu einer Berechnung des Cluster 1 geführt haben, könnten auch allosterischer Natur sein und durch eine Bindung in der SI/II-Region induziert werden. Diese Art der Wechselwirkung wird von Haddock nicht entsprechend berücksichtigt. Folglich wäre der Verlust der inhibitorischen Wirkung nur noch durch die elektronische Natur und die Größe der verbrückenden Gruppen zu erklären, da das Sulfon sterisch anspruchsvoller ist und elektronenziehend auf die aromatischen Ringe wirkt.

Die analoge Verbindung **107**, bei der nur die Hydroxy-Gruppen gegen Aminogruppen ausgetauscht wurden, weist eine ähnliche Clusterstruktur auf (**Abbildung 45**). Wieder liegt der energiegünstigste Cluster in der SIIP-Bindungsregion, während der zweitgünstigste Cluster in der adressierten SI/II-Bindestelle liegt. Bei dieser Rechnung liegen die Energien für die Bewertung der Restraint-Verletzungen jedoch sehr dicht beieinander, während Cluster 1 mehr Mitglieder beinhaltet. Zusätzlich ist zu berücksichtigen, dass sehr viele Aminosäuren auf der Proteinoberfläche Differenzen der NMR-Verschiebungen aufwiesen, die größer sind als die zweifache Standardabweichung sind. Dieser Effekt kann auftreten, wenn viele Aminosäuren durch den induzierten allosterischen Effekt der Verbindung eine Änderung der chemischen Umgebung erfahren oder wenn die Verbindung in mehreren verschiedenen Regionen des Proteins bindet. Leider können diese beiden Fälle an dieser Stelle nicht unterschieden werden, weshalb nicht zu klären ist, woher der Verlust der inhibitorischen Wirkung im Vergleich zum BPS (**102**) kommt. Weiterhin können aber sowohl die Gründe, die für das Dapson (**105**) aufgeführt wurden, als auch der Unterschied in sterischer und elektronischer Natur wie bei dem Diphenolsulfid **108** für diesen Effekt verantwortlich sein.

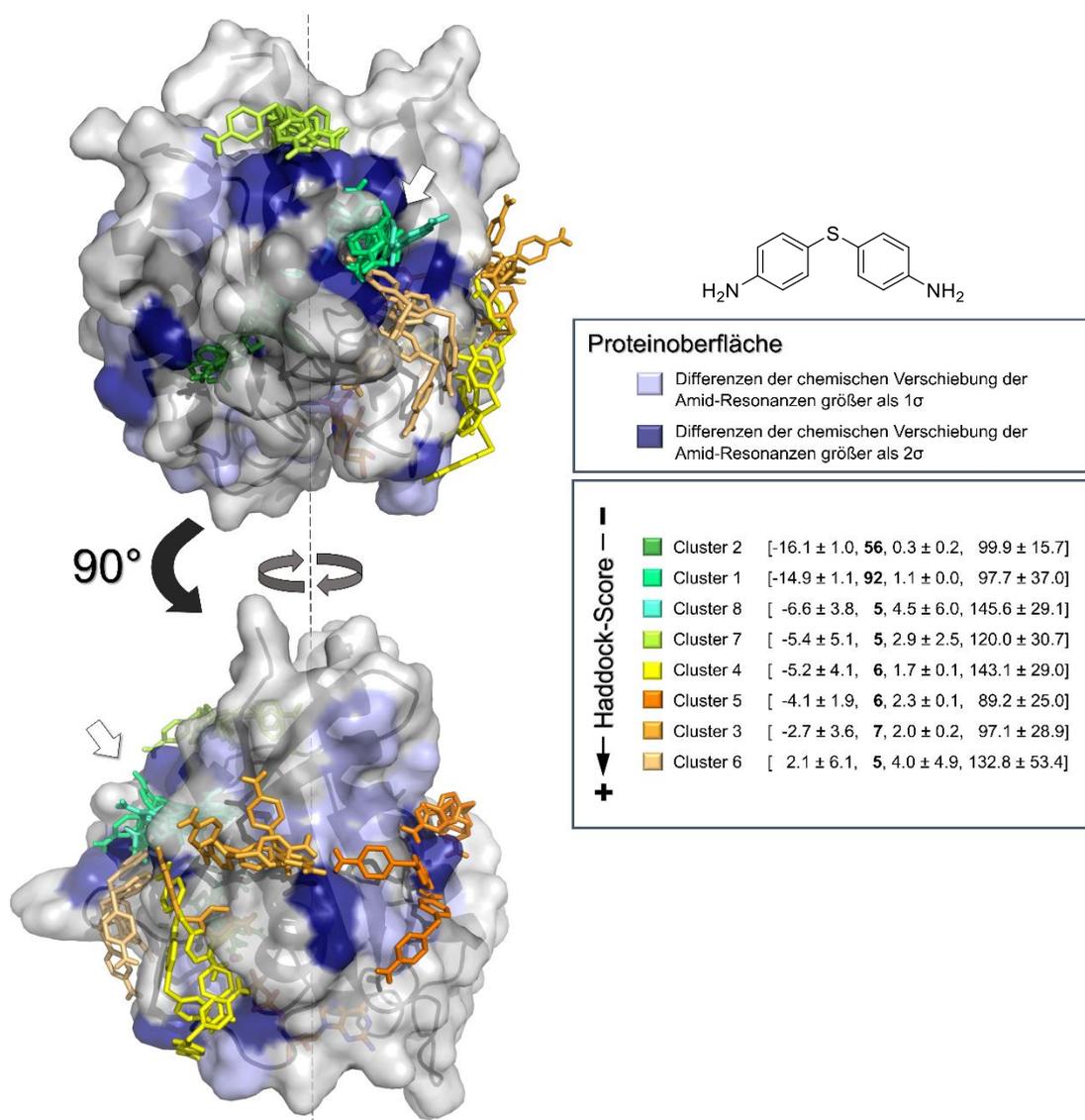


Abbildung 45: Darstellung der durch Haddock 2.4 unter Berücksichtigung der NMR-Restraints berechneten Cluster für die Bindung des Diarylsulfids **107** an GDP-gebundenes *K-RAS4B^{WT}* (PDB:6MBT); dabei [Haddock-Score, **Zahl der Clustermmitglieder**, RMSD-Wert, RVE]; der weiße Pfeil kennzeichnet die Lage der SI/II-Bindestelle.

Am wenigsten zu begründen bleiben die deutlichen Unterschiede der inhibitorischen Wirkung für die beiden Verbindungen **106** und **109**. Für diese Verbindungen weisen die Haddock-Ergebnisse sowie die Verschiebungen der NMR-Signale aus dem ^1H - ^{15}N -HSQC aus Bochum deutlich darauf hin, dass die Verbindungen in der adressierten SI/II-Region binden (Abbildung 46 und Abbildung 47).

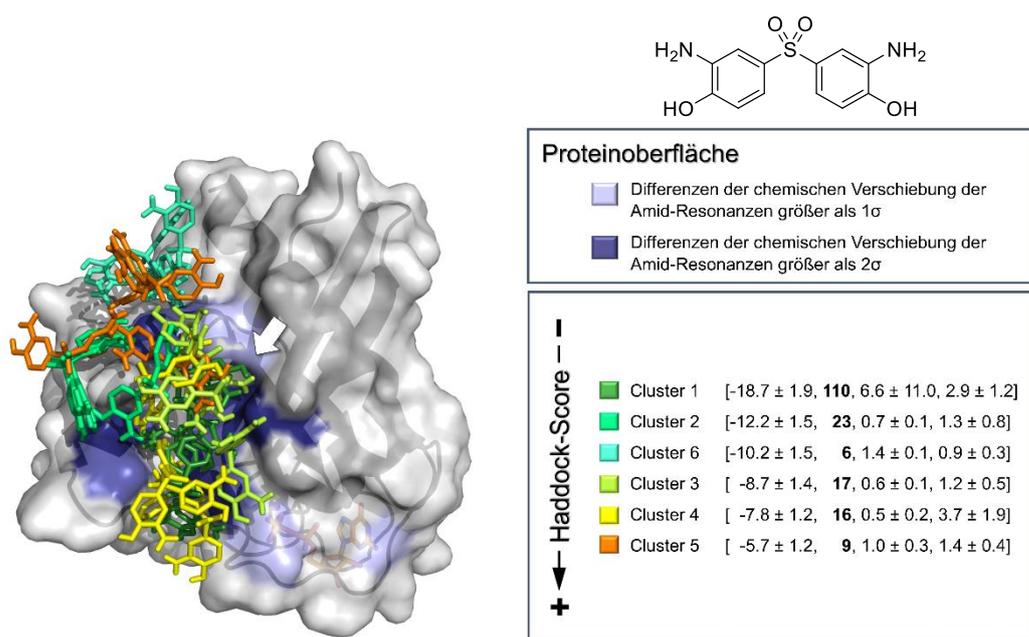


Abbildung 46: Darstellung der durch Haddock 2.4 unter Berücksichtigung der NMR-Restraints berechneten Cluster für die Bindung des Sulfons **106** an GDP-gebundenes *K*-RAS4B^{WT} (PDB:6MBT); dabei [Haddock-Score, **Zahl der Clustermitglieder**, RMSD-Wert, RVE]; der weiße Pfeil kennzeichnet die Lage der SI/II-Bindestelle.

Für das Sulfon **106** liegen die beiden energiegünstigsten und größten Cluster genau in der SI/II-Bindestelle, während sich die schlechter bewerteten Cluster in der direkten Nachbarschaft hierzu befinden. Diese Beobachtung deutet aber trotzdem auf eine Bindung in der SI/II-Bindestelle hin. Obwohl auch für dieses Derivat eine bessere Bindung an GDP-gebundenes *K*-RAS festgestellt wurde als für BPS (**102**), ist diese schwächer als für das Dapson (**105**). Aus diesem Grund wurde die inhibitorische Wirkung von Verbindung **106** nicht im RAS-SOS-Austauschassay untersucht.

Bei dem synthetisierten Sulfoximin **109** als isoelektronisches Derivat von Dapson (**105**) konnte die zusätzliche Imin-Funktion wie beschrieben keine Verbesserung der Affinität herbeiführen. Dabei liegt die Affinität dieser Verbindung im gleichen Bereich wie die des BPS (**102**). Auch weisen die Ergebnisse der NMR-Experimente auf eine Bindung in der SI/II-Bindestelle hin, wie die Haddock-Rechnung zeigt (**Abbildung 47**).

Abgesehen von Cluster 1 kommen die energiegünstigsten Cluster in genau dieser Region zu liegen. Cluster 1 kann aber auf eine allosterische Konformationsänderung der Switch-Regionen zurückgeführt werden, die durch eine Bindung an die SI/II-Bindestelle bedingt sein können. Aus der Analyse der Bindungssituation mit Hilfe der Haddock-Software wird daher keine Begründung für den Affinitätsverlust im Vergleich zum Dapson (**105**) ersichtlich.

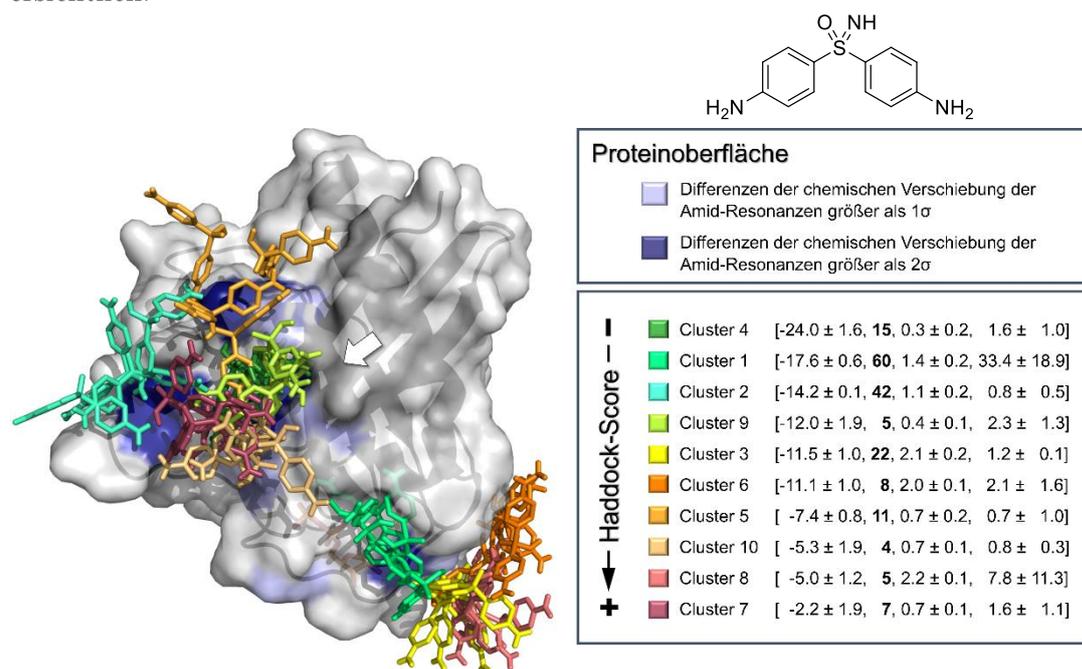


Abbildung 47: Darstellung der durch Haddock 2.4 unter Berücksichtigung der NMR-Restraints berechneten Cluster für die Bindung des Sulfoximins **109** an GDP-gebundenes *K*-RAS4B^{WT} (PDB:6MBT); dabei [Haddock-Score, **Zahl der Clustermmitglieder**, RMSD-Wert, RVE]; der weiße Pfeil kennzeichnet die Lage der SI/II-Bindestelle.

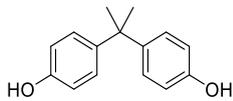
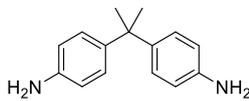
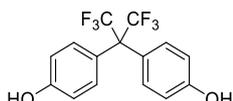
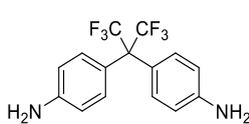
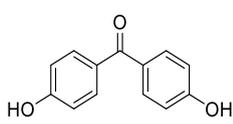
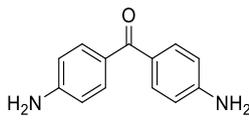
5.2 Austausch der Hydroxygruppen bei kohlenstoffverbrückten Bisphenolderivaten

Da der Austausch der phenolischen Hydroxygruppen für die thioverbrückten Bisaryle zu einer Affinitätssteigerung geführt hatte, wurde diese Variation auch für BPA (**101**) und BPAF (**103**) getestet. Für beide Fälle zeigte sich eine Verschlechterung der Bindungsaffinität an GDP-gebundenes *K*-RAS. Dabei bleibt die Bindung nur für das BPA-Derivat **116** in der gleichen Größenordnung, während für das BPAF-Derivat **117** keine Assoziation mehr festzustellen ist.

Da zudem bekannt war, dass bereits eine einseitige Alkylierung der Bisphenolverbindungen zum Bindungsverlust führt, stand als Option für eine Derivatisierung nur die verknüpfende Position zur Verfügung. Da hierfür vor allem das 4,4'-Dihydroxybenzophenon (DHBP, **118**) ein gutes Edukt darstellt, wurde dieses auch vorab getestet. Ebenso wurde das Amin-Derivat dieser Verbindung (**119**) untersucht, wobei für dieses keine Bindung festzustellen war. Somit beschränkt sich der positive Effekt der Substitution der phenolischen Hydroxygruppen durch Amine auf die schwefelverbrückten Bisarylverbindungen.

Das DHBP (**118**), welches bei weiteren Derivatisierungen als Grundbaustein diente, zeigte allerdings mit einem K_D -Wert von 9.1 mM eine recht geringe Assoziation an *K*-RAS4B.

Tabelle 4: Testergebnisse zu Amin-Derivaten von zuvor gefundenen *K*-RAS-Liganden.

Verbindung	Biochemische Daten					
	K_D [mM] $^1\text{H-}^{15}\text{N}$ -HSQC	IC_{50} [μM] RAS-SOS-Austausch-Assay				
		WT (GDP)	WT \emptyset	WT neu (Jan. 2020)	WT neu (Feb. 2020)	G12D
101 	0.6 ± 0.2	1440	>3000	-	-	1879
116 	1.1 ± 0.4	>3000	-	-	>3000	>3000
103 	0.4 ± 0.1	1272	-	-	>3000	2259
117 	gelöst, keine Bindung	-	-	-	-	-
118 	9.1 ± 3.9	807	2631	-	-	-
119 	gelöst, keine Bindung	-	-	-	-	-

5.2.1 Betrachtung der berechneten Bindungsmodi der kohlenstoffverbrückten Diarylverbindungen

Für die beiden bindenden Derivate **116** und **118** wurden erneut Haddock-Rechnungen anhand der $^1\text{H-}^{15}\text{N}$ -HSQC-Daten durchgeführt. Da die Verbindungen beide zu einer Veränderung der chemischen Verschiebung für viele Aminosäuren von *K*-RAS führten, zeigen die Ergebnisse mehrere Cluster. Dennoch liegen bei beiden Rechnungen die größten

und gleichzeitig energetisch günstigsten Cluster in der SI/II-Bindetasche. Sowohl für das Amin-Analogon von Bisphenol A (**Abbildung 48**), als auch für das DHBP (**Abbildung 49**) liegen in der Switch-Region um die Nukleotidbindestelle Cluster vor. Diese wurden vermutlich aufgrund einer allosterischen Konformationsänderung mit einhergehender Änderung der Aminosäureverschiebung im NMR-Experiment berechnet.

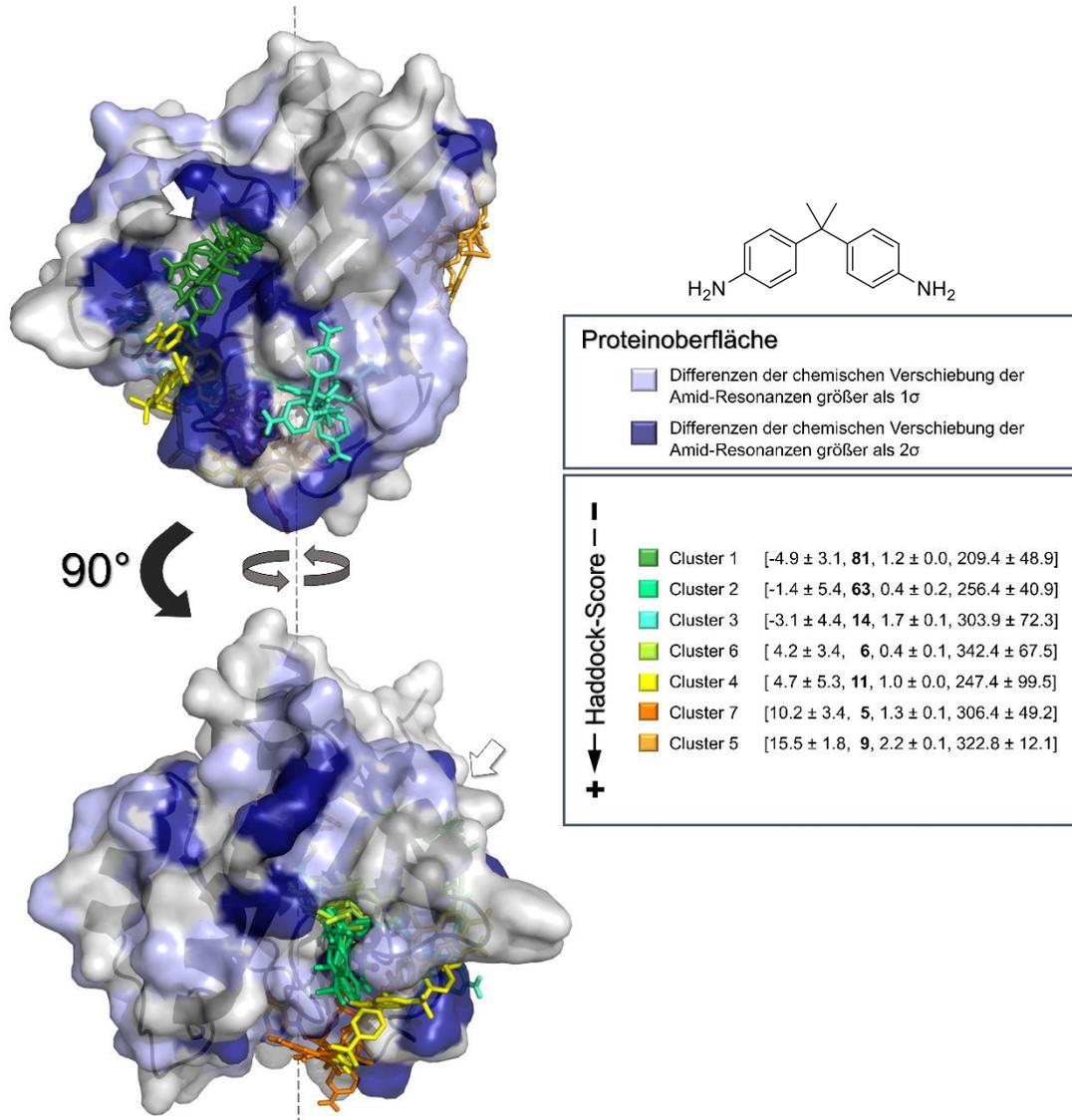


Abbildung 48: Darstellung der durch Haddock 2.4 unter Berücksichtigung der NMR-Restraints berechneten Cluster für die Bindung des BPA-Derivats **116** an GDP-gebundenes *K*-RAS4B^{WT} (PDB:6MBT); dabei [Haddock-Score, Zahl der Clustermmitglieder, RMSD-Wert, RVE]; der weiße Pfeil kennzeichnet die Lage der SI/II-Bindestelle.

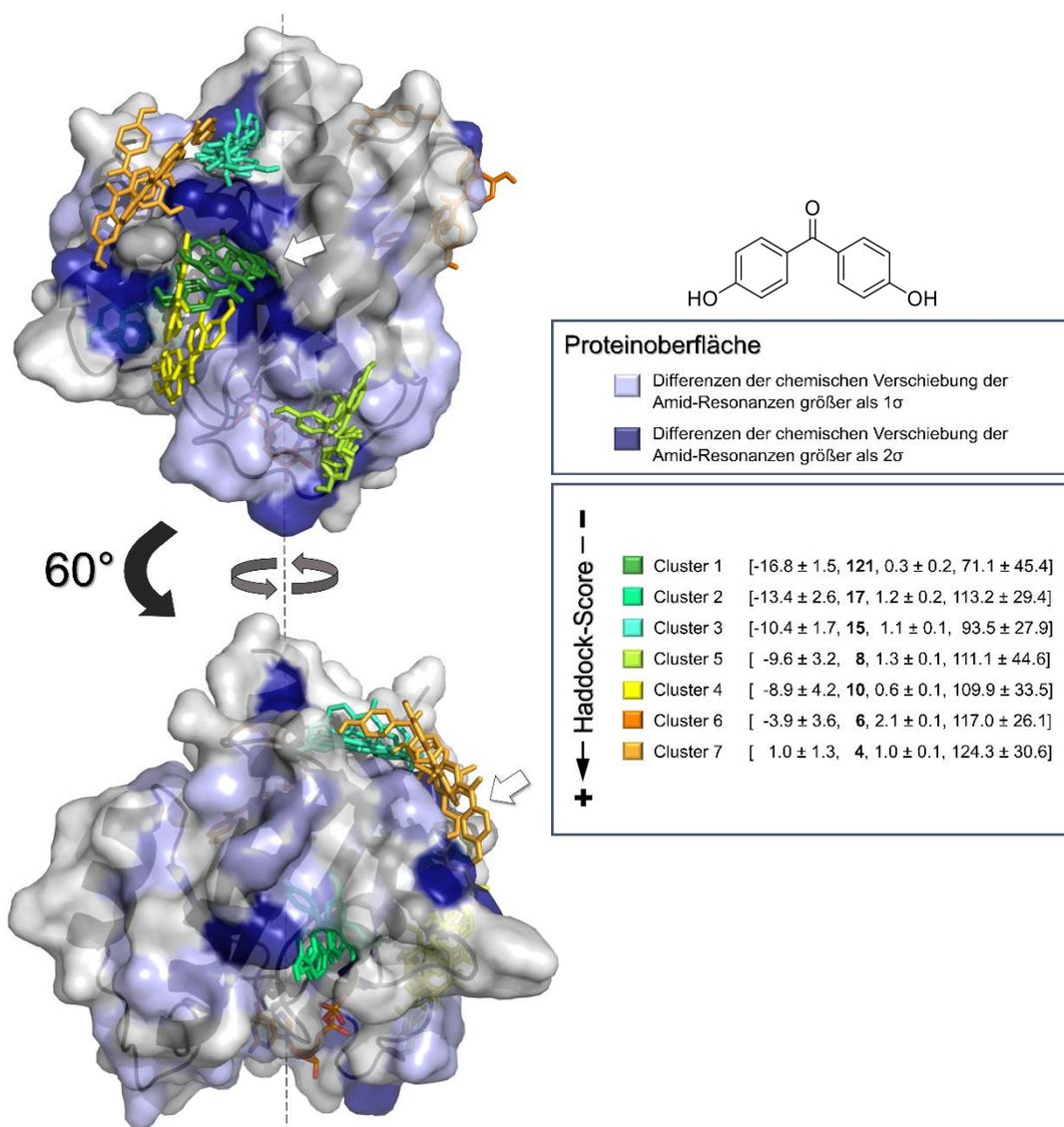


Abbildung 49: Darstellung der durch Haddock 2.4 unter Berücksichtigung der NMR-Restraints berechneten Cluster für die Bindung des DHBPs (**118**) an GDP-gebundenes *K-RAS4B^{WT}* (PDB:6MBT); dabei [Haddock-Score, **Zahl der Clustermitglieder**, RMSD-Wert, RVE]; der weiße Pfeil kennzeichnet die Lage der SI/II-Bindestelle.

Für beide Verbindungen ist anhand der NMR-Verschiebungen kein Unterschied im Bindungsmodus im Vergleich zum Bisphenol A (**101**) festzustellen. Somit bleibt für die Amin-Verbindung **116** nur der Unterschied in der elektronischen Struktur, während bei Verbindung **118** auch der Winkel zwischen den beiden Aromaten verändert vorliegt. Der Winkel von 109.5° am tetraedrischen Kohlenstoff des BPA (**101**) scheint dabei günstiger

zu sein als der 120°-Winkel des DHBPs (**118**). Jedoch könnte auch der elektronenziehende Effekt der Carbonylgruppe seinen Teil zum Verlust an Affinität gegenüber dem *K*-RAS-Protein beitragen.

5.3 Hydrazonderivate von DHP als *K*-RAS-Liganden

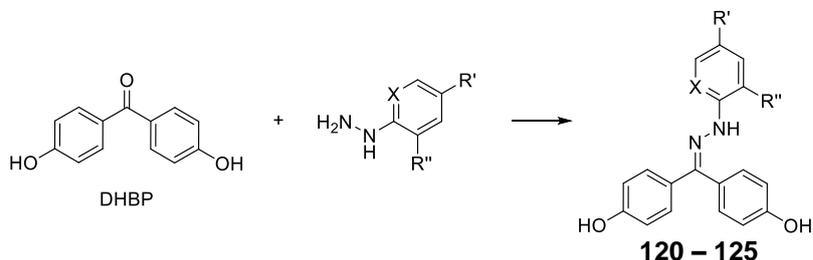
5.3.1 Synthesen und erste biochemische Daten

Bei der Derivatisierung des DHBPs zeigte sich, dass durch Kondensation mit aromatischen Hydrazinderivaten zu den entsprechenden Hydrazonen eine Steigerung der Affinität im Vergleich zum DHP zu erreichen war. Die Idee hinter dieser Derivatisierung kam durch eine Veröffentlichung zur anticancerogenen Wirkung des Dinitrophenylhydrazons **125** zustande. Dabei wurde dieses Hydrazon in Phase I der klinischen Testung als Antikrebsmedikament getestet, ohne dass ein Wirkmechanismus beschrieben wurde.¹²³

Da die ursprünglich von MORGAN *et al.* wegen seiner Isosterie zu Tamoxifen® als Antioestrogen entwickelte Verbindung das Bisphenol-Motiv aufwies,¹²³ bestand die Vermutung, dass es sich bei der beschriebenen Verbindung eventuell um einen Liganden von *K*-Ras4B handeln könnte. Im NMR-Experiment der Bochumer Arbeitsgruppe wurde eine Assoziation des Dinitrophenylhydrazons **125** an GDP-RAS aber widerlegt.

Parallel wurden aber bereits weitere Derivate der Verbindung durch Kondensation von Arylhydrazinen oder deren Hydrochloridsalzen mit DHP unter sauren Bedingungen hergestellt. Dabei diente entweder Essigsäure oder Schwefelsäure als Katalysator.^{123,124} Im Gegensatz zu den Angaben in der Publikation von MORGAN *et al.* konnten die Hydrazone nicht allein durch Umkristallisation in sauberer Form erhalten werden, da auch nach den Aufreinigungsversuchen immer Spuren des DHBPs vorhanden waren.

Tabelle 5: Darstellung der synthetischen Methoden und Ausbeuten der DHBP-Hydrazonderivate sowie erster zugehöriger K_D - und IC_{50} -Werte. Dabei sind die Derivate von oben nach unten mit abnehmender Elektronendichte im Aromaten sortiert.



Chemische Daten		Biochemische Daten						
		K_D [mM] ¹ H- ¹⁵ N-HSQC	IC_{50} [μ M]					
Verbindung	Ausbeute		RAS-SOS-Austausch-Assay					
		WT (GDP)	WT \emptyset	WT neu (Jan. 2020)	WT neu (Feb. 2020)	G12D	G12V	
120	R' : -H R'' : -H X : CH	79% ^(a)	1.3 \pm 0.1	1697	>3000	-	2150	1214
121	R' : -Cl R'' : -H X : CH	46% ^(b)	1.6 \pm 0.3	1578	1806	932	1667	1929
122	R' : -F R'' : -H X : CH	36% ^(b)	1.0 \pm 0.1	1466	>3000	-	2542	2325
123	R' : -CF ₃ R'' : -H X : CH	98% ^(a)	gelöst, keine Bindung	988	1266	-	-	-
124	R' : -H R'' : -H X : N	47% ^(a)	gelöst, keine Bindung	2383	-	-	-	-
125	R' : -NO ₂ R'' : -NO ₂ X : CH	51% ^(c)	keine Bindung	keine Kurve*	2050, 361*	242 (falsch positiv)*	-	-

(a) 0.7 Äq. DHBP, 2 – 3 Äq. AcOH, MeOH, 50 °C; (b) ArNHNH₂·HCl, 2 – 3 Äq. AcOH, MeOH, 50 °C; (c) ArNHNH₂·HCl, 0.7 Äq. DHBP, 3.6 Äq. H₂SO₄, MeOH, 50 °C.

* auffällig im GDP-Glo-Kontroll-Assay

Selbst durch säulenchromatographische Trennung ließ sich das DHBP bei einigen Derivaten nur sehr schwer abtrennen, da diese Produkte sehr ähnliche Retentionszeiten aufwiesen, wie diese Edukt. Die Ausbeute an reinen Hydrazonen wurde daher häufig durch den Erhalt von Mischfraktionen verringert.

Die Hälfte der Verbindungen zeigte eine Affinität gegenüber der inaktiven Form von *K-RAS4B*, wie die Ergebnisse der ^1H - ^{15}N -HSQC-Experimente zeigen. Somit scheint der zusätzliche aromatische Rest eine Affinitätssteigerung zu bewirken. Dennoch konnte die Variation des elektronischen Charakters dieses aromatischen Restes keine klaren Aufschlüsse über eine Struktur-Wirkungsbeziehung an dieser Position liefern, da die bestimmten Werte in der gleichen Größenordnung liegen. Für das Dinitroderivat **125** ist anzumerken, dass diese Verbindung farbintensiver war als die anderen Hydrazone und daher mit der Farbindikation des Austauschassays interferierte. Dadurch kam es vermutlich zu einem falsch-positiven Ergebnis.

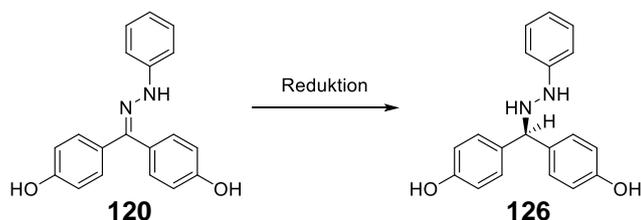
5.3.2 Versuche zur Reduktion der Hydrazone

Da die Möglichkeit besteht, dass das DHBP (**118**) durch seine sp^2 -Hybridisierung des verbrückenden Kohlenstoffatoms schwächer bindet als das sp^2 -verbrückte BPA (101), wurden einige erfolglose Versuche unternommen, die bindenden Hydrazone zu den entsprechenden Hydrazinen zu reduzieren. Um die Gefahr möglicher Nebenreaktionen zu verringern, wurden diese Reaktionen zunächst für das phenylsubstituierte Hydrazon **120** durchgeführt (**Tabelle 6**).

Der einzig vielversprechende Versuch war dabei die Reduktion mit Hilfe von Palladium auf Kohle unter Wasserstoffatmosphäre mit Toluol als Lösungsmittel. Bei dieser Methode war bei einem ersten Versuch eine polarere Verbindung entstanden, die jedoch aufgrund der geringen Ansatzgröße für die Durchführung von NMR-Experimenten nicht in

ausreichender Menge gewonnen werden konnte. Aus diesem Grund wurde der Ansatz in größerem Maßstab wiederholt, wobei zunächst lange keine andere Verbindung entstand.

Tabelle 6: Getestete Reduktionsmethoden für die Hydrazone.



Methode	Ansatzgröße/Beobachtung
a) 5 Äq. Magnesium, MeOH ¹²⁵	150 mg Ansatz: nach Verbrauch des Magnesiums war die Produktmasse nicht nachzuweisen
b) 1.5 Äq. LiAlH ₄ , THF ¹²⁶	150 mg Ansatz: Produktmasse nicht in LCMS nachzuweisen 30 mg Ansatz: polares Produkt in HPLC nachzuweisen aber weiterhin Edukt vorhanden, Produktmasse in LCMS nicht vorhanden
c) 3 Äq. LiAlH ₄ , THF ¹²⁶	30 mg Ansatz: keine Veränderung des HPLC-Chromatogramms über mehrere Tage
d) H ₂ , Pd/C, Toluol	30 mg Ansatz: polares Signal, kaum Eduktsignal (HPLC und DC), NMR wegen zu geringer Menge nicht möglich 300 mg Ansatz: zunächst lange gleichbleibend, dann unpolare Spots auf der DC-Platte; über NMR als Anilin und Bis(4-hydroxyphenyl)methanol identifiziert
e) 3 Äq. NaBH ₄ , 3 Äq. LiCl, Dowex 50WX2 (H ⁺), THF ¹²⁷	30 mg Ansatz: nur Edukt-Signal im HPLC-Chromatogramm/auf der DC, während zwei verschiedene NaBH ₄ -Chargen ausprobiert wurden
f) 5 Äq. NaBH(OAc) ₃ , 3 Äq. AcOH, MeOH, 0 °C – RT ¹²⁸	30 mg Ansatz: nur Eduktsignal im HPLC-Chromatogramm/auf der DC
g) 5 Äq. NaCNBH ₃ , 3 Äq. AcOH, MeOH, 0 °C – RT ¹²⁸	30 mg Ansatz: nur Eduktsignal im HPLC-Chromatogramm/auf der DC

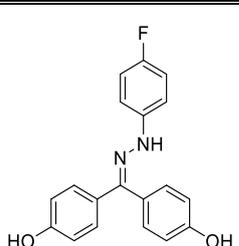
Nach längerer Zeit wurden über Dünnschichtchromatographie zwei unpolare Verbindungen ausgemacht, welche säulenchromatographisch gereinigt und über NMR-

Experimente charakterisiert wurden. Dabei sind sowohl Anilin als auch das Reduktionsprodukt von DHBP, Bis(4-hydroxyphenyl)methanol, als die zwei Produkte identifiziert worden. Somit scheint zunächst das Hydrazon zerfallen zu sein, wobei anschließend das Arylhydrazin und das Benzophenon reduziert worden sind.

5.3.3 Nähere biochemische Betrachtung einiger Hydrazone von DHBP

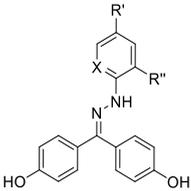
Zwei der Hydrazone, die Verbindungen **121** und **122**, wurden für eine Prüfung im weniger durchsatzstarken MST-Assay in Dortmund ausgewählt. Dabei wies das Chlorphenyl-Derivat **121** eine schwache Bindung im MST auf, während das Fluorphenylhydrazon **122** niedrige Dissoziationskonstanten beim Wildtyp-Protein sowie der G12D-Mutante aufwies. Sowohl für die inaktive GDP-Form als auch für die GTP-Form, welche unter Verwendung des hydrolysestabilen GTP-Derivats GppNHp nachgestellt wurde, wies die Verbindung **122** im MST Affinitäten im mikromolaren Bereich auf (**Tabelle 7**). In Zellassays beim Lead Discovery Center zeigte die Verbindung ebenfalls eine beträchtliche Wirkung.

Tabelle 7: Daten des MST- und Cell-Titer-Glo-Assays für das Fluorphenylhydrazon **122**.

Verbindung	K_D [μ M]				IC_{50} [μ M]			
	MST		Cell-Titer-Glo-Assay		Cell-Titer-Glo-Assay		Cell-Titer-Glo-Assay	
	WT GDP	WT GppNHp	G12D GDP	G12D GppNHp	HCT15 (G13D)	H358 (G12C)	NCI- H441 (G12V)	SNU-1 (G12D)
 <p>122</p>	1.4	2.9	1.1 0.84	1.3 0.51	17.6	33.7	24.7	23.7

Auch in weiteren CTG-Ergebnissen zeigt sich die Verbindung wieder als eine der inhibitorisch wirksamsten aus ihrer Substanzklasse, wobei sich die Größenordnung mit den bereits zuvor angegebenen Werten einiger dieser Zelllinien bestätigt. Auch die Trifluormethyl-Verbindung **123** zeigt gute Ergebnisse, jedoch war diese Verbindung in bisherigen Bindungsstudien an *K*-RAS nicht als *K*-RAS-Ligand identifiziert worden, weshalb der zelluläre Effekt vermutlich andere Ursachen hat.

Tabelle 8: Weitere CTG-Daten für die Substanzklasse der Hydrazone von DHBP.

Verbindung		IC₅₀ [µM]								
		Cell-Titer-Glo-Assay								
		A549 (G12S)	Capan-1 (G12V)	DLD1 (G12D)	HCT15 (G13D)	K562 (WT)	MOLM-13 (WT)	H358 (G12C)	NCI-H441 (G12V)	SNU-1 (G12D)
120	R' : -H R'' : -H X : CH	35.5	80.7	34.7	22.5	5.01	15.6	37.6	27.7	24.4
121	R' : -Cl R'' : -H X : CH	35.0	74.1	29.1	60.6	28.0	54.8	40.2	69.3	74.8
122	R' : -F R'' : -H X : CH	28.4	49.4	29.0	14.1	3.2	9.4	33.7	23.9	21.0
123	R' : -CF ₃ R'' : -H X : CH	11.9	32.9	12.5	12.4	10.4	15.8	15.1	13.2	16.6
125	R' : -NO ₂ R'' : -NO ₂ X : CH	17.1	40.6	22.9	18.9	14.6	23.4	20.9	22.0	16.9

Die Dinitroverbindung **125** zeigt ebenfalls gute Werte in den CTG-Assays, wobei auch hier bisher keine Bindung an *K*-RAS nachgewiesen werden konnte und die Verbindung zu farblich war, um im Austauschassay relevante Ergebnisse zu liefern. Auch im MST-Assay ist diese

Verbindung vermutlich nicht auf eine Assoziation an RAS zu prüfen, da auch hier eine fluoreszenzbasierte Messung erfolgt.

Neben einer zweistellig mikromolaren Inhibition in den Zellassays war die Verbindung **122** zusätzlich in der Lage die ERK-Phosphorylierung zu senken. Die EC_{50} -Werte für verschiedene Zelllinien mit *K*-RAS-Mutation lagen zwischen 146.0 und 303.5 μ M, wobei die *K*-RAS-Abhängigkeit dieser Zellen aber nicht vollständig geklärt ist. Die Suche rein *K*-RAS-abhängiger Zellen ist daher Gegenstand weiterer Forschungsarbeiten. Dennoch verspricht diese Verbindung ein gewisses Potenzial als Leitstruktur für weitere SAR-basierte Ansätze.

5.3.4 Diskussion des Fluorophenylhydrazon **122** als *K*-RAS-Ligand

An dieser Stelle soll nun nur die Haddock-Rechnung für das herausstechendste Hydrazonderivat des DHBPs diskutiert werden. Für die zwei weiteren Hydrazone **120** und **121**, die ebenfalls im ^1H - ^{15}N -HSQC-Eperiment eine Affinität zu GDP-RAS aufweisen, sind die Haddock-Rechnungen im Anhang dargestellt.

Die in **Abbildung 99** dargestellten Cluster der gedockten Posen für das Fluorphenylhydrazon **122** liegen sowohl in der Region der SI/II-Bindestelle als auch in Regionen der Schleifen, die an der Nukleotidbindung beteiligt sind. Da der Cluster 1, welcher die SI/II-Bindestelle exakt abdeckt, den größten und energieärmsten Cluster darstellt und zudem einen geringen Wert der Strafenergie für Restraintverletzungen aufweist, liegt nahe, dass die Verbindung auch wirklich in dieser Region bindet. Die Veränderungen der chemischen Umgebung der Aminosäuren im Bereich der Nukleotidbindestelle sind dabei eventuell auf Konformationsänderungen der katalytischen Domäne bei Assoziation des Liganden zurückzuführen. Dies würde auch die Zelleffekte und die Regulierung der ERK-Phosphorylierung erklären, da durch den Konformationswechsel Interaktionen mit Downstream-Effektoren gestört sein könnten.

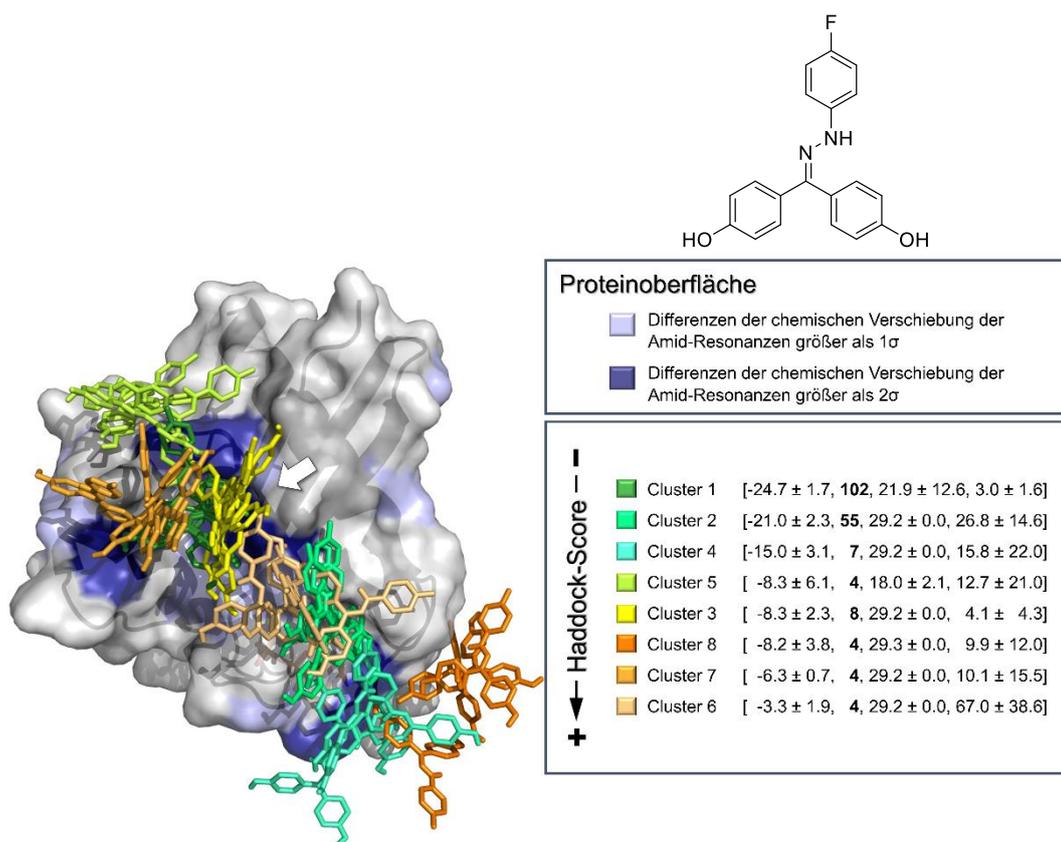


Abbildung 50: Darstellung der durch Haddock 2.4 unter Berücksichtigung der NMR-Restraints berechneten Cluster für die Bindung des Hydrazons **122** an GDP-gebundenes *K*-RAS4B^{WT} (PDB:6MBT); dabei [Haddock-Score, Zahl der Clustermittglieder, RMSD-Wert, RVE]; der weiße Pfeil kennzeichnet die Lage der SI/II-Bindestelle.

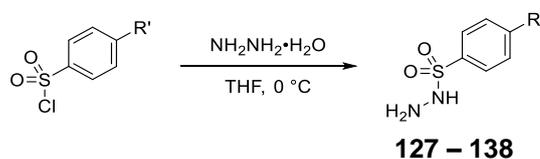
Der zelluläre Effekt scheint dabei nicht durch die Inhibierung der Wechselwirkung von RAS mit dem Upstream-Effektor SOS hervorgerufen zu werden, da die zelluläre Wirkung deutlich stärker ist, als die halbmaximalen inhibitorischen Konzentrationen des RAS-SOS-Austauschassays nahelegen. Weiterhin bleibt zu überprüfen, ob die zelluläre Wirksamkeit auf der Bindung an *K*-RAS beruht, da die im MST-Assay und im ¹H-¹⁵N-HSQC-Experiment bestimmten Affinitäten sich in ihrer Größenordnung stark unterscheiden und nur die MST-Daten von ihrer Größenordnung mit den Zelldaten übereinzubringen sind. Außerdem müsste der Ligand hinsichtlich seiner Selektivität gegenüber einzelnen *K*-RAS-Mutanten oder wenigstens im Vergleich zum WT-Protein verbessert werden. Die aktuelle leichte Selektivität gegenüber dem WT-Protein, welche in den Zellassays sichtbar ist, müsste umgekehrt und verstärkt werden.

5.4 Sulfonylhydrazone aus DHPB als *K*-RAS-Liganden

5.4.1 *Synthese und biochemische Daten*

Da die Variation der verbrückenden Einheit der zwei Phenolringe über eine Kondensation des DHPBs mit Arylhydrazinen bereits verhältnismäßig gute Liganden von *K*-RAS ergeben hatten, wurden weitere solcher Variationen angestrebt. Aus diesem Grund wurden diverse Sulfonylhydrazide mit dem DHPB kondensiert. Hierzu mussten einige der Sulfonylhydrazide zunächst durch Umsetzung des entsprechenden Sulfonsäurechlorids mit Hydrazin-Monohydrat analog zu einer Vorschrift von LIU *et al.* hergestellt werden.¹²⁹ Dabei wurden die Sulfonylhydrazide nach Abfiltrieren und Waschen in reiner Form erhalten (**Tabelle 9**).

Tabelle 9: Synthese der notwendigen Sulfonylhydrazide.

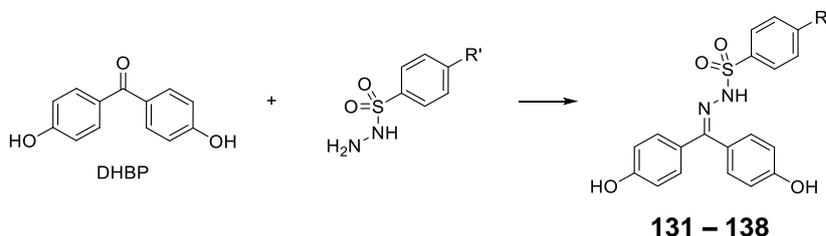


Chemische Daten

Verbindung	Ausbeute
127 R' : -Cl	95%
128 R' : -OCF ₃	98%
129 R' : -CN	85%
130 R' : -NO ₂	92%

Die Synthese der Sulfonylhydrazone **131 – 138** erfolgte anschließend durch Kondensation der Sulfonylhydrazide mit dem DHPB unter Säurekatalyse durch *p*-Toluolsulfonsäure. Diese Experimente wurden analog zu einer Vorschrift von XIA *et al.* durchgeführt (**Tabelle 10**).¹³⁰

Tabelle 10: Darstellung der synthetischen Methoden und Ausbeuten der DHBP-Sulfonylhydrazonderivate sowie erster zugehöriger K_D - und IC_{50} -Werte. Dabei sind die Derivate von oben nach unten mit abnehmender Elektronendichte im Aromaten sortiert.



Chemische Daten			Biochemische Daten					
			K_D [mM] ¹ H- ¹⁵ N-HSQC	IC_{50} [μM] RAS-SOS-Austausch-Assay				
Verbindung	Ausbeute	WT (GDP)		WT ∅	WT neu (Jan. 2020)	WT neu (Feb. 2020)	G12D	G12V
131	R' : -OMe	19% ^(a)	gelöst, keine Bindung	1232	1626	-	-	-
132	R' : -Me	25% ^(b)	gelöst, keine Bindung	1273	-	1197	1076	878
133	R' : -H	69% ^(a)	2.0 ± 0.7	1359	1327	-	2427	1793
134	R' : -Br	10% ^(b)	1.5 ± 0.5**	993	2122	-	1515	1031
135	R' : -Cl	10% ^(a)	1.4 ± 0.7	940	1295	837	427	949
136	R' : -OCF ₃	34% ^(a)	1.4 ± 0.5*	1303	1574	-	2427	2064
137	R' : -CN	66% ^(a)	1.0 ± 0.5 [#]	1443	-	1229	1919	1629
138	R' : -NO ₂	78% ^(a)	3.5 ± 1.6	832	232	153 688	352	339 208

(a) 1 Äq. DHBP, 1mol% *p*-TsOH·H₂O, EtOH, 85 °C; (b) Synthese des Sulfonylhydrazins *in situ*: 2.5 Äq. NH₂NH₂·H₂O, 1 Äq. Sulfonsäurechlorid, THF, 0 °C; anschließend Methode (a).

* STD zeigt Bindung an GDP-Form, für GTP-Form unklar

** STD für GDP- und GTP-Form unklar

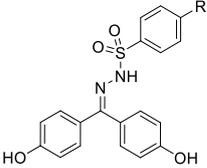
bindet im STD an GDP- und GTP-Form

Der Literatur folgend, wurden die Reaktanden äquimolar eingesetzt, was jedoch zu teilweise unvollständigen Umsätzen führte. Zudem gestaltete sich die Aufreinigung der Produkte schwierig, da auch hier die Produkte eine ähnliche Polarität aufwiesen wie das

DHBP. Nach säulenchromatographischer Trennung waren häufig mehrfache Umkristallisationen notwendig, wodurch die Ausbeuten stark reduziert wurden.

Der Großteil der so erhaltenen Sulfonylhydrazone zeigt im NMR-Experiment eine Assoziation an GDP-gebundenes *K*-RAS in der gleichen Größenordnung wie die Hydrazone. In den Daten des Nukleotid-Austauschassays zeigen vor allem das Chlorphenyl-Derivat **135** und das Nitrophenyl-Derivat **138** eine inhibitorische Wirkung auf die Interaktion von RAS und SOS. Die halbmaximalen inhibitorischen Konzentrationen liegen dabei etwas niedriger als bei den Hydrazonen. Im Gegensatz dazu ist in den Ergebnissen der Zellassays im Vergleich zu den Hydrazonen eine Verschlechterung zu beobachten (**Tabelle 11**).

Tabelle 11: CTG-Assay-Daten für die Sulfonylhydrazone des DHBPs.

Verbindung		IC ₅₀ [µM]								
		Cell-Titer-Glo-Assay								
		A549 (G12S)	Capan-1 (G12V)	DLD1 (G12D)	HCT15 (G13D)	K562 (WT)	MOLM -13 (WT)	H358 (G12C)	NCI- H441 (G12V)	SNU-1 (G12D)
131	R' : -OMe	177.0	272.0	178.0	215.0	107.0	109.0	161.0	227.0	134.0
133	R' : -H	105.0	130.0	112.0	112.0	84.8	73.3	109.0	122.0	88.7
134	R' : -Br	96.4	122.0	98.5	95.5	47.3	67.0	82.3	99.7	76.0
135	R' : -Cl	75.1	114.0	72.7	84.5	46.9	51.7	69.8	90.3	55.6
136	R' : -OCF ₃	117.0	179.0	109.0	112.0	76.2	88.0	104.0	146.0	100.0
137	R' : -CN	>29.9	>29.9	>29.9	>29.9	>27.8	>29.9	>29.9	>29.9	>29.9
138	R' : -NO ₂	49.8	76.9	51.0	92.2	35.7	32.3	49.2	58.0	46.8

Der Trend des inhibitorischen Effekts im Austauschassay spiegelt sich dennoch in der Wirksamkeit im CTG-Assay wider. Auch hier haben sowohl das Nitro- als auch das Chlor-substituierte Derivat die besten inhibitorischen Eigenschaften. Dieser Effekt ist hingegen

in den ^1H - ^{15}N -HSQC-Ergebnissen nicht wiederzuerkennen. Laut diesen Daten ist die Nitroverbindung **138** der schwächste Ligand für das GDP-gebundene *K*-RAS. Da die Verbindung auch im MST-Assay nur eine schwache Bindung aufweist, spricht dies für einen alternativen Wirkmechanismus. Die Möglichkeit, dass es sich bei Verbindung **138** um einen Liganden einer anderen RAS-Konformation handelt, ist nicht ausgeschlossen. Da der Nukleotidaustausch durch die Verbindung inhibiert wurde und die GTP-Form erst nach dem Nukleotidaustausch auftritt, kann es sich dabei nicht um die GTP-Form von RAS handeln. Diese Annahme wird auch durch das MST-Experiment mit GppNHp-gebundenem *K*-RAS unterstützt. Beispielsweise könnte die Verbindung aber an den RAS-SOS-Komplex binden und einen unproduktiven ternären Komplex mit den beiden Proteinen bilden.

Auch wenn das Chlor-substituierte Derivat **135** einen etwas besseren K_D -Wert im NMR-Experiment aufweist und zudem in der Lage ist die ERK-Phosphorylierung in SNU-1- und RKO-Zellen zu vermindern, liegen die Dissoziationskonstanten aus den HSQC-Untersuchungen und die IC_{50} -Werte aus dem Austausch-Assay in einem höheren Konzentrationsbereich als die Zell-Daten. Dies ist für alle Sulfonylhydrazone der Fall. Daher muss diese Substanzklasse über einen alternativen Mechanismus auf die Zellen wirken. Die Möglichkeit eines unproduktiven ternären Komplexes wurde dafür bereits diskutiert. Durch eine derartige Komplexbildung würde auch die Wechselwirkung mit Downstream-Effektoren verhindert, da diese in der gleichen Region von RAS binden wie SOS. Die Regulierung der pERK-Konzentration durch das Sulfonylhydrazon **135** könnte auf diese Weise erklärt werden. Dennoch werden weitere Studien benötigt, um den Mechanismus für die Wirkung dieser Substanzklasse aufzuklären.

5.4.2 Diskussion der Haddock-Rechnungen zu den Sulfonylhydrazonen von DHBP

Da die Substanzklasse der Sulfonylhydrazone mit sechs im NMR-Experiment bindenden Liganden sehr viele Haddock-Rechnungen bedingte, diese sich jedoch in Hinsicht auf die Clusterverteilung ähneln, werden lediglich die zwei bereits näher diskutierten Verbindungen in Bezug zu den anderen Rechnungen erörtert. Die Abbildungen zu allen weiteren Rechnungen sind im Anhang zu finden, da sie den Umfang des Kapitels sprengen würden.

In den wenigsten Rechnungen zu den Sulfonylhydrazonen kommt es dazu, dass der energiegunstigste Cluster in der SI/II-Bindestelle liegt. Wie in **Abbildung 51** für die Chlor-substituierte Verbindung **135** zu erkennen, wurden die Signale eines erheblichen Anteils der Aminosäuren auf der Proteinoberfläche signifikant verschoben.

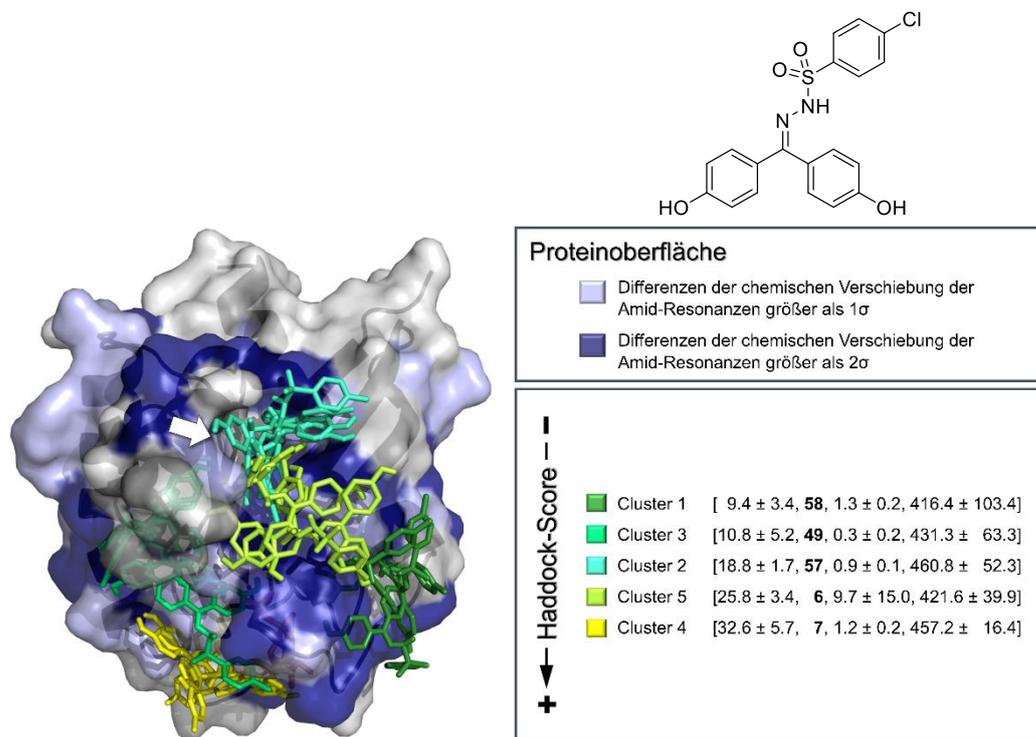


Abbildung 51: Darstellung der durch Haddock 2.4 unter Berücksichtigung der NMR-Restraints berechneten Cluster für die Bindung des Sulfonylhydrazons **135** an GDP-gebundenes *K*-RAS4B^{WT} (PDB:6MBT); dabei [Haddock-Score, Zahl der Clustermitglieder, RMSD-Wert, RVE]; der weiße Pfeil kennzeichnet die Lage der SI/II-Bindestelle.

Dieser Sachverhalt war für alle Sulfonylhydrazone zu beobachten. Dieses Phänomen kann mehrere Ursachen haben. Zum einen können die Änderungen durch allosterische Effekte und damit einhergehenden Konformationsänderungen zusammenhängen, andererseits könnten diese Daten auf eine unspezifische Bindung an der Proteinoberfläche hindeuten.

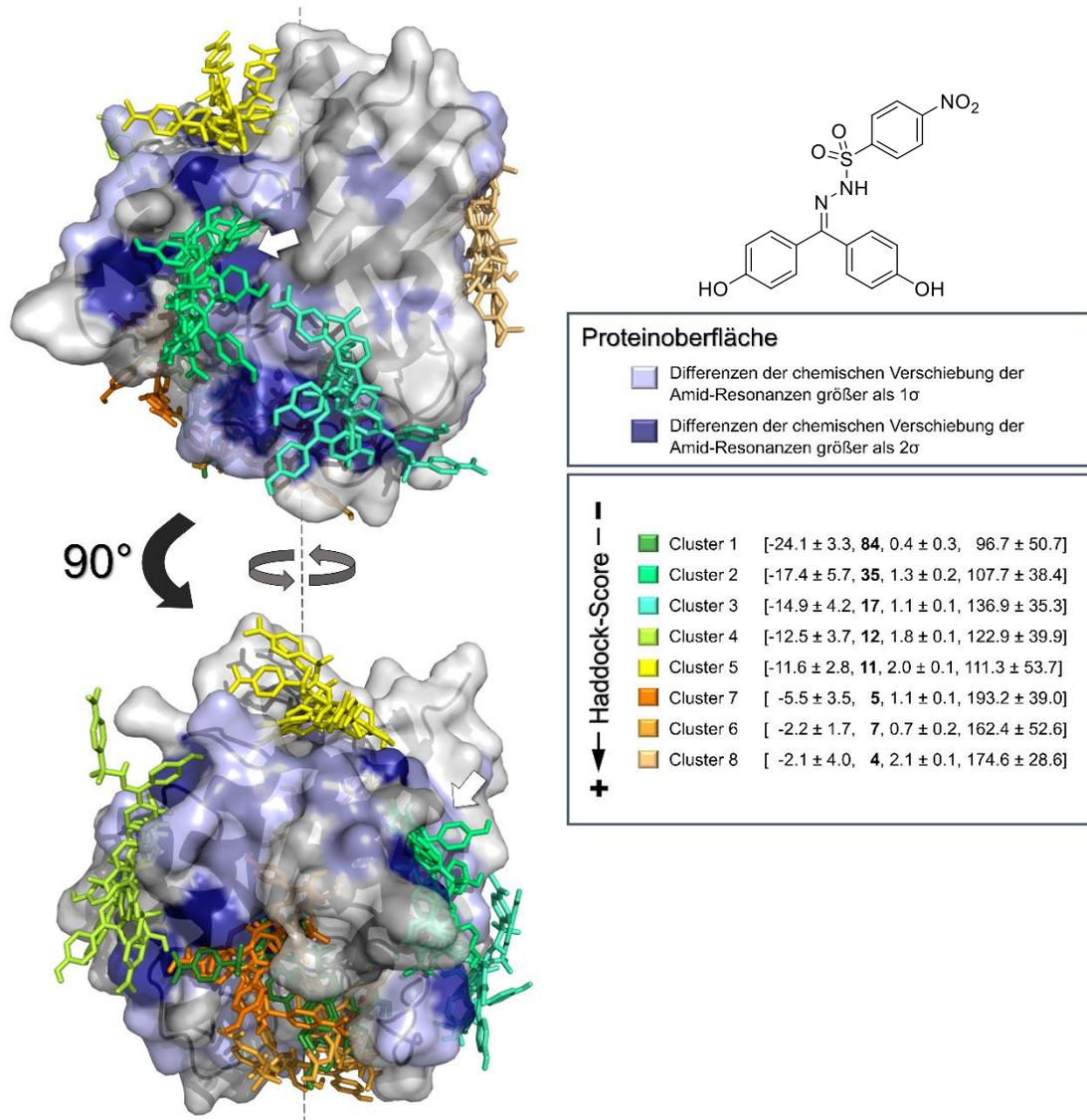


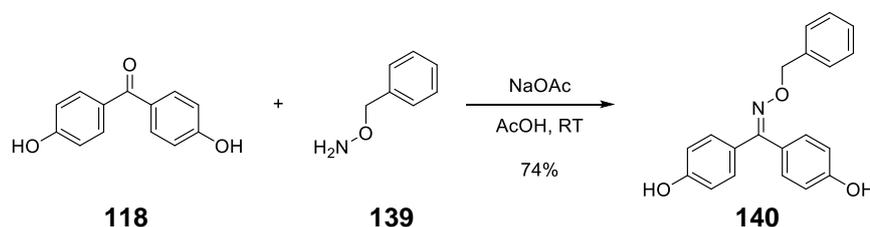
Abbildung 52: Darstellung der durch Haddock 2.4 unter Berücksichtigung der NMR-Restraints berechneten Cluster für die Bindung des Sulfonylhydrazons **138** an GDP-gebundenes *K-RAS4B^{WT}* (PDB:6MBT); dabei [Haddock-Score, Zahl der Clustermittglieder, RMSD-Wert, RVE]; der weiße Pfeil kennzeichnet die Lage der SI/II-Bindestelle.

Diese Erklärung würde die Abweichungen zwischen Bindungsstärke und zellulärer Wirkung erklären. Andererseits könnte beispielsweise die Bildung des bereits vorher vorgeschlagenen ternären Komplexes eine Erklärung für die Differenz der Werte sein, während die Anzahl der Aminosäuren, deren Änderung der chemischen Verschiebung größer oder gleich der zweifachen Standardabweichung ist, durch die schwache Bindung zustande kommt. Verschieben sich viele Aminosäuren durch eine konformative Änderung und ist die Assoziation der Verbindung dagegen schwach, sind die an die Verbindung bindenden Aminosäuren im Verhältnis zu anderen Aminosäuren des Proteins weniger signifikant verschoben.

Ob der zelluläre Effekt aber tatsächlich einem alternativen Mechanismus geschuldet ist, der eine Assoziation an RAS beinhaltet, oder ob es sich um Off-Target-Effekte handelt, bleibt näher zu untersuchen.

5.5 Weitere Kondensationsprodukte von DHBP, die an K-RAS binden

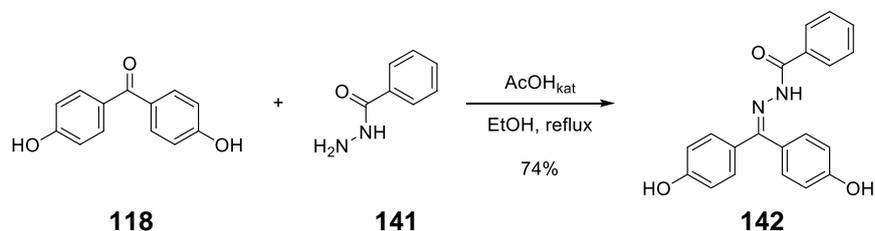
Aufgrund der bisherigen Erfolge der Derivatisierung der Carbonylfunktion des DHBPs wurde als weiteres Derivat ausgehend von *O*-Benzylhydroxylamin (**139**) das entsprechende Oxim **140** nach Vorschrift von TOSCANO *et al.* hergestellt.¹³¹



Schema 3: Synthese des Oxims **140** aus *O*-Benzylhydroxylamin (**139**) und DHBP (**118**).

Ebenfalls wurde das *N*-Benzoylhadrazon **142** für die biochemische Testung bereitgestellt, wobei dieses nach einer Vorschrift von LI *et al.* synthetisiert wurde (**Schema 4**).¹³² Bereits nach einfachem Waschen des kristallisierten Produkts mit kaltem Ethanol konnte dabei

die saubere Verbindung gewonnen werden. Vermutlich kam es hier aufgrund einer gewissen Restlöslichkeit des Produktes zu Ausbeuteverlusten.

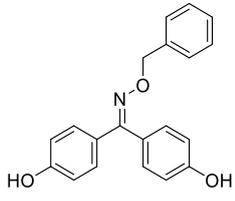
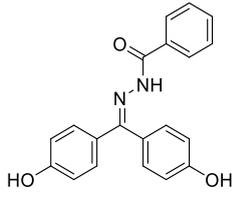


Schema 4: Synthese des *N*-Benzoylhydrazons **142** aus Benzhydrazid (**141**) und DHBP (**118**).

5.5.1 *Diskussion der biochemischen Daten*

Beide Verbindungen zeigen eine deutliche Affinität gegenüber GDP-gebundenem *K*-RAS4B, während nur das Oxim **140** den SOS-katalysierten Nukleotidaustausch inhibiert.

Tabelle 12: Auflistung der biochemischen Daten aus den ^1H - ^{15}N -HSQC-Experimenten und dem RAS-SOS-Austauschassay für die DHBP-Derivate **140** und **142**.

Verbindung	Biochemische Daten				
	K_D [mM] ^1H - ^{15}N -HSQC	IC_{50} [μM] RAS-SOS-Austausch-Assay			
		WT (GDP)	WT \emptyset	WT neu (Jan. 2020)	WT neu (Feb. 2020)
140 	0.4 ± 0.1	1079 (min: 792)	1489	-	1899 1772
142 	$0.9 \pm 0.1^*$	>3000	-	-	- -

*im STD nur Bindung an GDP-Form

Das Oxim **140** zeigt im NMR-Experiment die höchste Affinität der bisher in dieser Arbeit untersuchten Bisphenol-Derivate. Durch die Modifikation der Carbonylgruppe mit dem alkylierten Hydroxylamin erreicht die Verbindung eine Affinität, die dem BPAF aus Voruntersuchungen nahekommt, ist aber eine wesentlich einfacher auf andere Verbindungen zu übertragene Modifikation des verbrückenden Kohlenstoffatoms.

Gemäß den ersten guten Ergebnissen wurden weitere Studien zur Bindung und Wirksamkeit des Oxims **140** durchgeführt. Dabei scheint die Verbindung, abgeleitet von den Dissoziationskonstanten aus den MST-Messungen, mit einer gewissen Selektivität an die GDP-gebundene Form von *K-RAS4B* zu binden. Zudem scheint sie an der G12D-Mutante selektiver zu binden als am Wildtyp-Protein.

Tabelle 13: MST-Daten zum Oxim **140**.

Verbindung	K_D [μ M]			
	MST			
	WT (GDP)	WT (GppNHp)	G12D (GDP)	G12D (GppNHp)
Oxim 140	148.0	>1000	89.2	>1000

Die Verbindung **140** konnte auch in den Ganzzellassays ihre Wirksamkeit unter Beweis stellen, wobei die IC_{50} -Werte etwas niedriger liegen als bei den Sulfonylhydrazonen, aber höher sind als bei dem Fluorphenylhydrazon **122**. Zudem ist in den Zelldaten keine signifikante Diskriminierung des Wildtyp-Proteins gegenüber den Mutanten zu erkennen.

Tabelle 14: Ergebnisse der CTG-Assays von Oxim **140**.

Verbindung	IC_{50} [μ M]								
	Cell-Titer-Glo-Assay								
	A549 (G12S)	Capan-1 (G12V)	DLD1 (G12D)	HCT15 (G13D)	K562 (WT)	MOLM -13 (WT)	H358 (G12C)	NCI- H441 (G12V)	SNU-1 (G12D)
Oxim 140	56.1	111.0	50.9	43.9	54.0	48.3	58.6	59.9	41.7

Lediglich die G12V-mutierten Zellen sind gegenüber dem Oxim **140** etwas unempfindlicher.

5.5.2 Diskussion der Haddock-Ergebnisse der Verbindungen **140** und **142**

Für die Verbindung **140** liegen die Aminosäuren mit signifikant veränderten Verschiebungen im Bereich um die SI/II-Bindestelle. Jedoch gibt es auch hier weitere verschobene Bereiche, die im Falle einer Bindung an dieser Stelle auf allosterische Konformationsänderungen zurückzuführen wären.

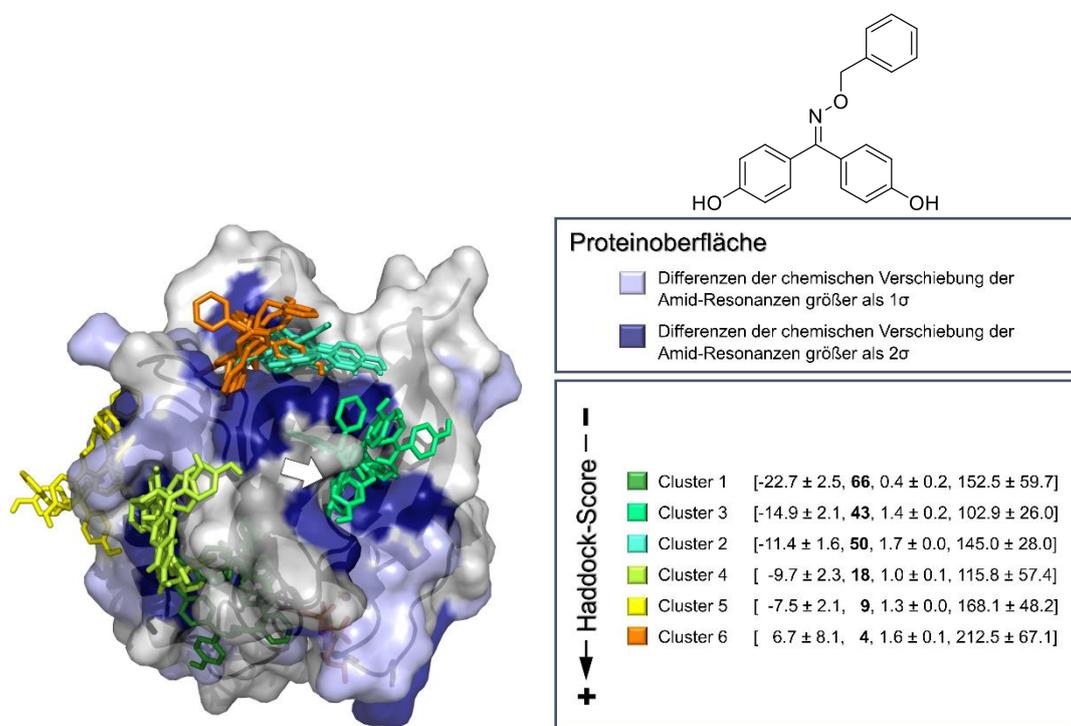


Abbildung 53: Darstellung der durch Haddock 2.4 unter Berücksichtigung der NMR-Restraints berechneten Cluster für die Bindung des Oxims **140** an GDP-gebundenes *K-RAS4B*^{WT} (PDB:6MBT); dabei [Haddock-Score, Zahl der Clustermitglieder, RMSD-Wert, RVE]; der weiße Pfeil kennzeichnet die Lage der SI/II-Bindestelle.

Zu berücksichtigen ist für die Bindungssituation zudem, dass weder der in seiner Mitgliederzahl größte Cluster noch der Cluster mit dem besten Haddock-Score in dieser Bindefurche zu liegen kommt. Der Cluster, der diese beiden Größen vereint, liegt in der

SIIP-Bindestelle, welche vor allem in der GDP-gebundenen Form vorhanden ist. Erst durch die fehlende Koordination der Aminosäuren Threonin 35 und Glycin 60 durch das γ -Phosphat wird der Bereich dieser Bindetasche flexibel genug für die Assoziation eines Liganden. Aus diesem Grund konnten Cluster an der SIIP-Bindestelle in Haddock-Rechnungen mit der GSP-gebundenen Struktur der 4DSO-Kristallstruktur nicht beobachtet werden, obwohl eine Bindung der Liganden in diesem Bereich im NMR-Experiment mit GDP-RAS durchaus denkbar ist. Zwar ist der Cluster, welcher in der SI/II-Bindestelle liegt der zweitgünstigste und einer der drei Größten Cluster, während er die Restraints am wenigsten verletzt, dennoch ist diese Rechnung Grund genug für eine Überlegung, ob die Verbindung **140** nicht eher in der SIIP-Region binden könnte. Dafür würde auch die Beobachtung sprechen, dass im MST-Assay bessere Affinitäten für die GDP-Form des Proteins gefunden wurden. Vollständig geklärt kann diese Fragestellung vermutlich nur durch den Erhalt einer Kristallstruktur des zugehörigen Protein-Ligand-Komplexes.

Die Haddock-Rechnung zum *N*-Benzoylhydrazon **142** (**Abbildung 54**) ist dagegen noch uneindeutiger. Diesmal liegen die Aminosäuren, die durch Hinzufügen des Liganden starke Veränderungen der chemischen Umgebung erfahren, auf der entsprechenden Gegenseite des Proteins in Bezug zur SI/II-Bindestelle. Somit ist die Beobachtung, dass der SOS-katalysierte Nukleotidaustausch durch die Verbindung nicht inhibiert wird nicht verwunderlich, da die SOS-Interaktionsfläche von RAS nicht beeinträchtigt ist. Da aber die Aminosäuren um die SIIP-Bindestelle eine deutliche Veränderung der chemischen Umgebung erfahren, wie es durch das ^1H - ^{15}N -HSQC-Experiment belegt ist, könnte es auch hier sein, dass die Verbindung **142** stattdessen an dieser Stelle bindet. Allerdings sind die Haddock-Scores und die hohen Energien für die Restraint-Verletzungen im Allgemeinen sehr schlecht und legen eine gewisse Unwahrscheinlichkeit der berechneten Bindungsmodi nahe. In diesem Fall ist keineswegs ersichtlich, woher die starke Affinität im NMR-

Experiment kommt, wenn die schlechten Scoring-Werte des Dockings mit Hilfe der Haddock-Software berücksichtigt werden.

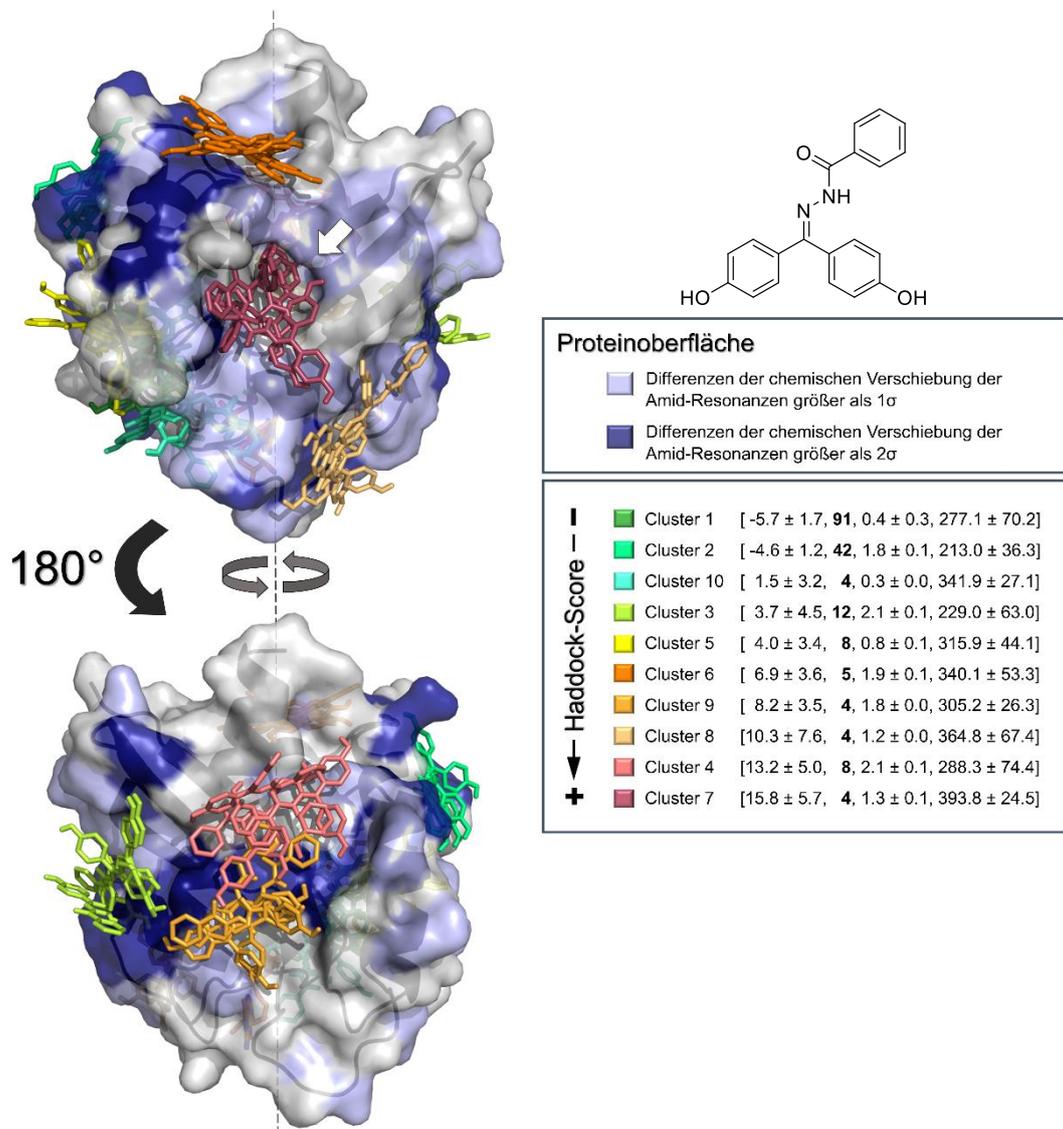


Abbildung 54: Darstellung der durch Haddock 2.4 unter Berücksichtigung der NMR-Restraints berechneten Cluster für die Bindung des *N*-Benzoylhydrazons **142** an GDP-gebundenes *K*-RAS4B^{WT} (PDB:6MBT); dabei [Haddock-Score, **Zahl der Clustermittglieder**, RMSD-Wert, RVE]; der weiße Pfeil kennzeichnet die Lage der SI/II-Bindestelle.

5.6 Entdeckung eines neuen K-RAS-Liganden durch SAR-basiertes Docking

5.6.1 Der computergestützte Entwicklungsprozess der Verbindung 144

Da aus den vorangegangenen Ergebnissen eine Vielzahl an Möglichkeiten für die Verbrückung zweier Arylfragmente hervorgeht und dabei sowohl Bisaniline als auch Bisphenole Wirkung gezeigt hatten, wurde eine Substanzbibliothek entsprechend dieser Kenntnisse aufgebaut. Da die literaturbekannten Verbindungen zudem häufig Benzimidazol- und Indol-Motive aufweisen, wurden auch Heterozyklen als Arylsubstituenten berücksichtigt, die dann mit Amino- und Hydroxygruppen versehen wurden. Durch die Kombination von Fragmenten, wie sie in **Abbildung 55** dargestellt sind, wurde mit Hilfe der Software CombiGlide aus dem Schrödinger-Paket eine virtuelle Bibliothek mit 360.000 Verbindungen erstellt.

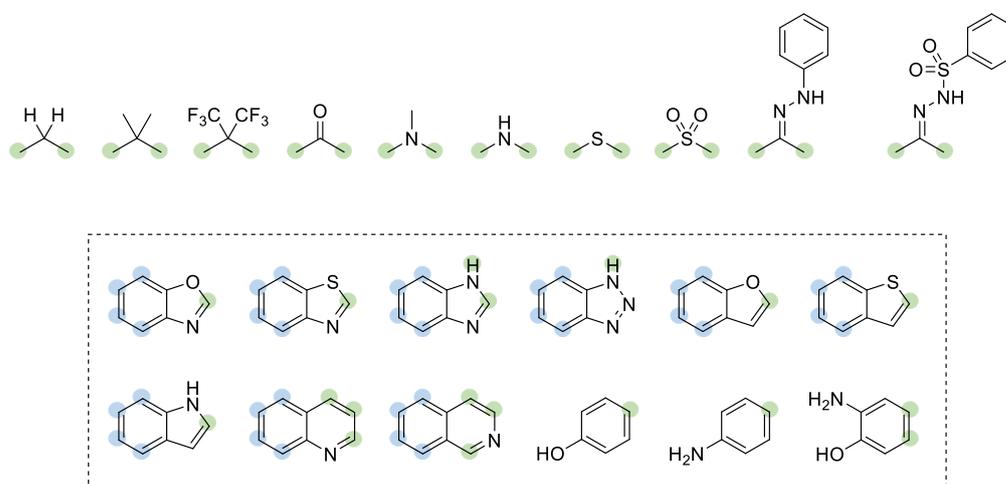


Abbildung 55: Combi-Glide Fragmente; oben: verbrückendes Element mit Anknüpfungspunkten in grün; unten: Arylsubstituenten mit Anknüpfungspunkten in grün; blau gekennzeichnet sind die Positionen, an denen entweder eine Hydroxy- oder eine Aminogruppe angeknüpft wurde.

Die so erhaltenen Strukturen wurden an die 4DSO-Kristallstruktur gedockt, wobei die Wassermoleküle zuvor aus der Bindestelle entfernt wurden. Dies ist nötig, da der in der

PDB-Datei vorhandene Ligand sehr klein ist und somit große Teile der Bindetasche mit Wasser ausgefüllt sind. Ohne diesen Schritt hätten gedockte Liganden keinen Platz in der Bindestelle. Für den Docking-Prozess wurden die Verbindungen zunächst in vier gleich große *in silico* Hochdurchsatz-Screenings aufgeteilt. Die besten 2.500 Posen aus jedem der vier Durchläufe und somit insgesamt 10.000 Posen wurden zusammen in einem Docking-Lauf des Standardpräzisionsmodus gedockt. Zur endgültigen Bewertung wurden die besten 1000 der erhaltenen Posen über den extra präzisen Modus von Schrödinger neu gedockt. Aus der erhaltenen Sammlung an Posen wurden zwei Verbindungen ausgewählt, die synthetisch zugängliche Strukturen aufwiesen und dadurch aus den anderen Verbindungen hervorstachen (**Abbildung 56**).

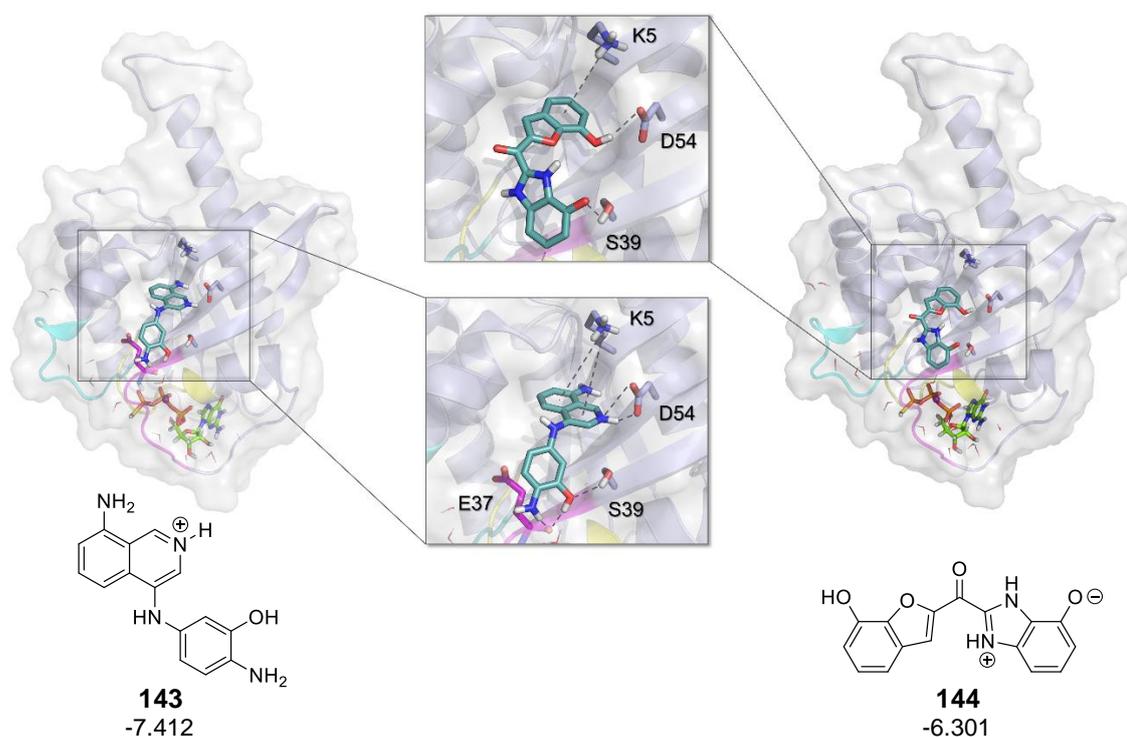


Abbildung 56: Darstellung der beiden ausgewählten Hits der CombiGlide-Bibliothek, wobei die Liganden mit den zugehörigen Docking-Scores unter den Protein-Ligand-Komplexen der besten erhaltenen Posen des jeweiligen Liganden an GSP-gebundenem *K*-RAS (PDB:4DSO) dargestellt sind.

Des Weiteren wurden für diese beiden Strukturen Ähnlichkeitssuchen in den Datenbanken von REYMOND *et al.* durchgeführt. Sowohl die 970 Millionen Verbindungen große

Datenbank GDB-13 als auch die 166 Milliarden Verbindungen große Datenbank GDB-17 wurden nach verwandten Strukturen für die zuvor ausgewählten Verbindungen durchsucht.^{133,134} Die 24.000 Verbindungen, die die Ähnlichkeitssuche ergab, wurden zusammen mit den initialen Hits erneut einem Docking-Zyklus unterzogen. Bei der Bewertung des Docking-Laufes lagen die Posen der initialen Hits unter den besten insgesamt (Docking-Score der Carbonylverbindung **144** bei -6.945 und für die Aminverbrückte Verbindung **143** -6.707). Durch ihre virtuelle Konstruktion haben viele der Strukturen aus den REYMOND-Datenbanken schwer zugängliche Oxidationszustände, während zudem Chiralitätszentren einen hohen Aufwand bei der Synthese versprechen (**Abbildung 57**). Daher hoben sich die beiden initialen Verbindungen erneut durch ihre synthetisch leichtere Zugänglichkeit ab.

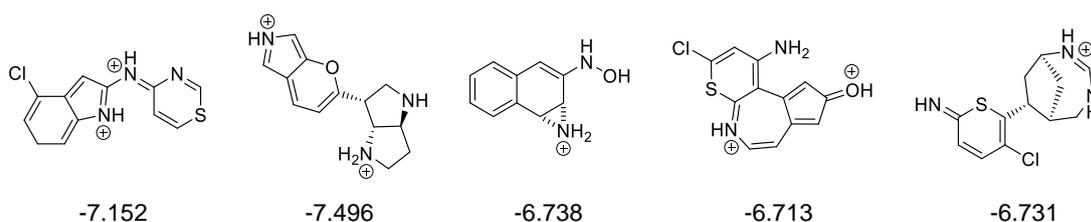


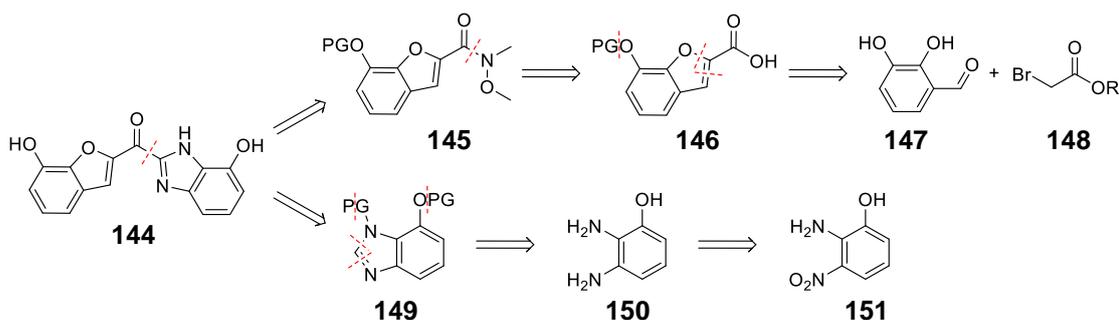
Abbildung 57: Verbindungen der REYMOND-Datenbanken zu den besten Posen des XP-Docking-Laufes an K-RAS (PDB:4DSO) mit den Docking-Scores der besten zugehörigen Posen.

Letzten Endes wurde die Carbonylverbindung als zu synthetisierende Verbindung ausgewählt, da die Struktur der anderen Verbindungen ein elektronenreiches Isochinolin sowie ein *ortho*-Aminophenol aufweist. Diese beiden Struktur motive sind leicht zu oxidieren und daher vermutlich unzureichend stabil.

5.6.2 Synthesep lanung der in silico erhaltenen Verbindung

Bei retrosynthetischer Betrachtung der Carbonyl-Verbindung **144** ist zunächst ein Schnitt an der Carbonylgruppe hin zum Benzimidazolrest zu setzen. Die 2-Position des Benzimidazols **149** lässt sich nach entsprechender Schützung der anderen protischen Positionen leicht mit Butyllithium in die entsprechende lithiierte Verbindung überführen.

Es wird somit ein Anionenäquivalent generiert. Dieses Anion kann dann nukleophil an einem Carbonsäurederivat angreifen. Um eine Überalkylierung zu vermeiden, sollte dabei auf der Seite des Benzofurans das Weinreb-Amid **145** eingesetzt werden, da so das Keton zugänglich ist. Dieses Weinreb-Amid kann aus der entsprechenden Säure **146** durch Umsetzung mit *N,O*-Dimethylhydroxylamin hergestellt werden. Die Säure wird durch Reaktion des in 3-Position geschützten 2,3-Dihydroxybenzaldehyds (**147**) mit einem α -Bromessigsäureester (**148**) unter basischen Bedingungen und anschließende Verseifung synthetisiert. Da das Benzimidazol-Derivat nicht käuflich zu erhalten ist, wird dieses durch Reduktion und anschließende Kondensation mit einem Formaldehydäquivalent aus 2-Amino-3-nitrophenol (**151**) gewonnen.

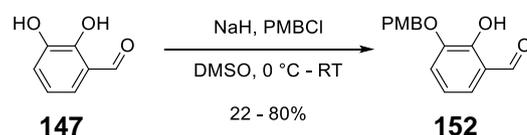


Schema 5: Retrosynthetische Zerlegung des *in silico* ermittelten K-RAS-Liganden **144**.

5.6.3 Synthese der heteroarylischen Bisphenolverbindung **144**

Für die Umsetzung der retrosynthetisch geplanten Synthese musste zunächst die Phenolfunktion in 3-Position des 2,3-Dihydroxybenzaldehyds (**147**) in eine geschützte Form überführt werden. Die *para*-Methoxybenzyl-Schutzgruppe (PMB) wurde ausgewählt, da sie sowohl unter basischen als auch unter den meisten sauren Reaktionsbedingungen stabil ist. Die reduktive Entfernung einer Benzylschutzgruppe gelingt nur unter reduktiven Bedingungen, die möglicherweise zur Zerstörung der Carbonylfunktion führen. Grund für diese Befürchtung ist die stark positive Partiaalladung dieser Carbonylgruppe im Wunschprodukt **144**.

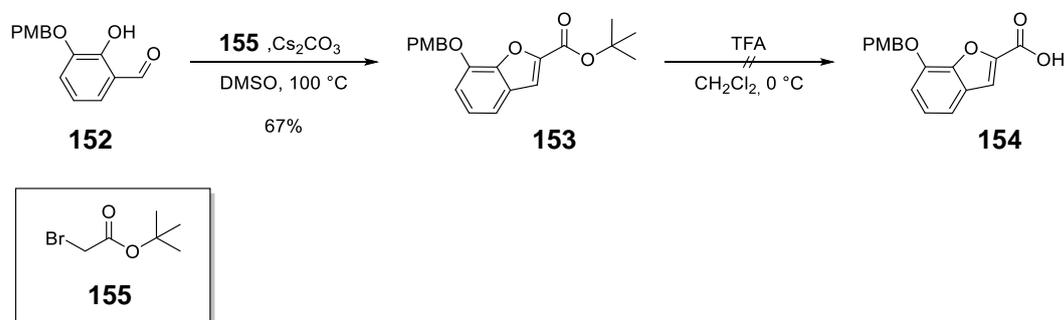
Die selektive Monoalkylierung des Dihydroxybenzaldehyds gelang durch die vollständige Deprotonierung der beiden phenolischen Hydroxygruppen mit zwei Äquivalenten Natriumhydrid. Langsames Zutropfen eines Äquivalents des Alkylierungsreagenzes *para*-Methoxybenzylchlorid führte zur selektiven PMB-Schätzung des nukleophileren Phenolats in der *meta*-Position in Bezug zur Aldehydfunktion. Der nukleophilere Charakter kommt dadurch zustande, dass die negative Ladung des Phenolats nicht wie in 2-Position über den Aldehyd mesomeriestabilisiert ist. Bei nur einem Äquivalent Natriumhydrid würde dies zur Alkylierung an der Phenolgruppe in 2-Position erfolgen, da dieser Effekt zu einer höheren Azidität des entsprechenden Protons führt.



Schema 6: Schätzung des 2,3-Dihydroxybenzaldehyds durch selektive Monoalkylierung in 2-Position.

Die Durchführung des Experiments wurde den Vorschriften von CHEN *et al.* und CARREIRA *et al.* nachempfunden.^{135,136} Nachdem die Aufarbeitung optimiert worden war, wurde der geschützte Aldehyd **152** so in guten Ausbeuten erhalten.

Nun wurde dieser Aldehyd zunächst nach Vorschrift von MAGGI *et al.* mit dem *tert*-Butylester der α -Bromessigsäure (**155**) in einer RAP-STOERMER-Reaktion zum entsprechenden Benzofuran-Derivat **153** umgesetzt.¹³⁷

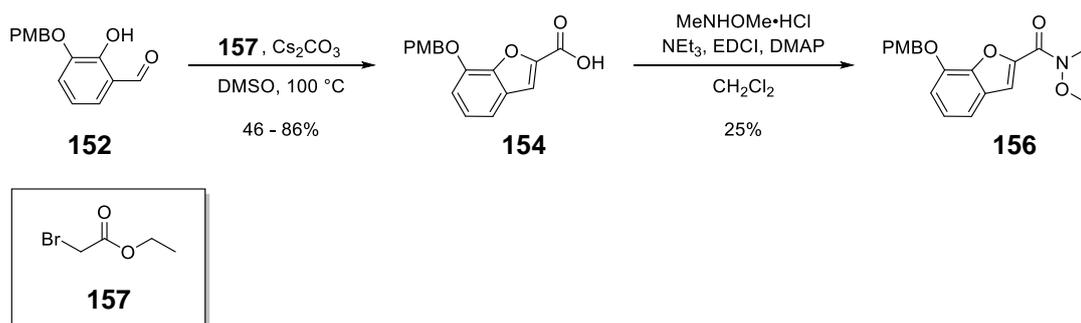


Schema 7: Erster Versuch der Synthese der Benzofurancarbonsäure **154**.

Beim Versuch diese Verbindung mit Hilfe von TFA sauer zu verseifen, entstand jedoch ein Produktgemisch aus einigen Zersetzungsprodukten. Aus diesem Gemisch ließ sich die Carbonsäure **154** nicht isolieren und es zeigte sich, dass unter den gewählten Bedingungen die PMB-Schutzgruppe abgespalten wird, bevor die *tert*-Butylgruppe sauer verseift werden kann.

Aus diesem Grund wurde der Aldehyd **152** unter den Bedingungen der zuvor durchgeführten RAP-STOERMER-Reaktion alternativ mit α -Bromessigsäureethylester umgesetzt. Der auf diese Weise eigentlich erwartete Ethylester sollte dann im Folgeschritt unter stärker basischen Bedingungen verseift werden. Es stellte sich jedoch heraus, dass bereits die von MAGGI *et al.* beschriebenen Reaktionsbedingungen ausreichend basisch waren, um den Ester *in situ* zu spalten, sodass auf direktem Wege die Carbonsäure **154** zugänglich war.

Die erhaltene Benzofurancarbonsäure **154** wurde im Folgeschritt mit Hilfe einer STEGLICH-analogen Amid-Kupplung unter EDCI/DMAP-Katalyse nach einer Vorschrift von MEGGERS *et al.* mit *N,O*-Dimethylhydroxylamin-Hydrochlorid umgesetzt.¹³⁸ So wurde das gewünschte Weinreb-Amid **156** nach säulenchromatographischer Trennung erhalten.

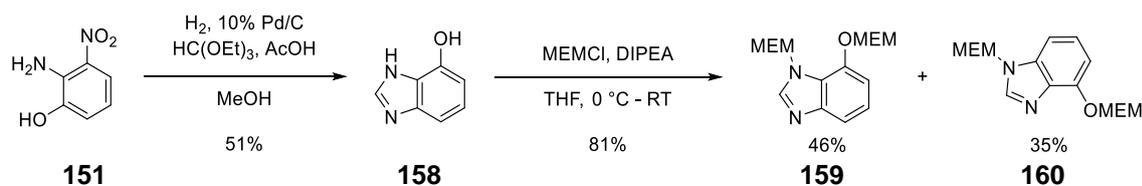


Schema 8: Synthese des für die Herstellung der Carbonylverbindung **144** benötigten Weinreb-Amids **156**.

Die Ausbeute ließe sich eventuell durch alternative synthetische Methoden verbessern. Zum Beispiel könnte das Säurechlorid (SCHOTTEN-BAUMANN-Methode) oder das gemischte Anhydrid der Pivalinsäure für eine Kupplung mit dem *N,O*-Dimethylhydroxylamin-

Hydrochlorid verwendet werden, wobei der Weg über das Pivaloylanhydrid die deutlich mildere Methode darstellt. Auch denkbar wäre eine Kupplungsreaktion mit anderen Reagenzien wie HATU oder HBTU.

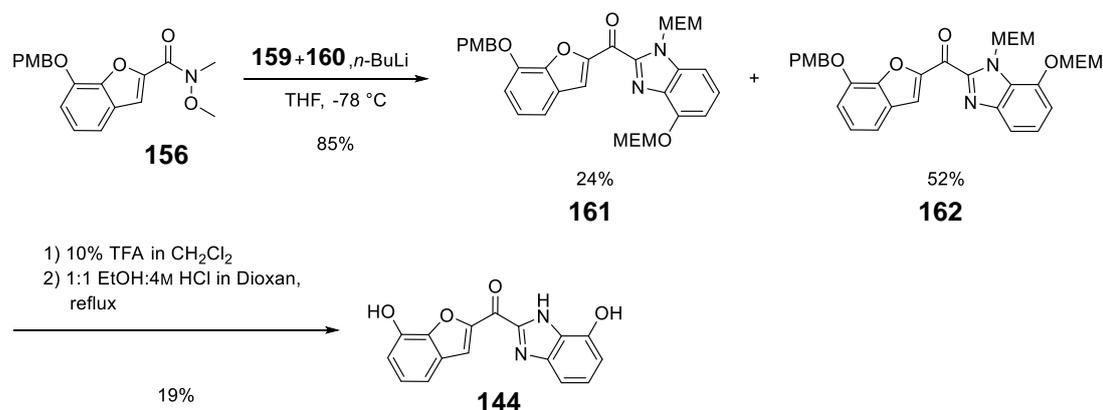
Nach der erfolgreichen Synthese des Weinreb-Amids (**156**), wurde der zweite Baustein, der dem Benzimidazol-Derivat entspricht, synthetisiert. Wie retrosynthetisch geplant (vgl. **Schema 5**), wurde dabei 2-Amino-3-nitrophenol (**151**) als Edukt verwendet. Laut einer Publikation von SHEN *et al.* lässt sich das entsprechende Produkt der Nitroreduktion von Verbindung **151** nach Isolierung nicht mehr zum gewünschten Benzimidazol **158** umsetzen.¹³⁹ Aus diesem Grund wurde die von den Autoren beschriebene reduktive Zyklisierung durchgeführt. Als Formaldehydäquivalent wird bei dieser Vorschrift Triethylorthoformiat unter essigsaurer Katalyse direkt mit dem unter palladiumkatalysierter Hydrogenolyse umgesetzten 2-Amino-3-nitrophenol (**151**) kondensiert. Eine anschließende MEM-Schützung der protischen Positionen lieferte aufgrund der Tautomerie des Benzimidazols ein Regioisomerengemisch aus den Isomeren **159** und **160**, welche mit dem Weinreb-Amid **156** zur geschützten Form des Zielproduktes **144** umgesetzt wurden.



Schema 9: Reduktive Zyklisierung zum Benzimidazol **158** und anschließende MEM-Schützung zu den Isomeren **159** und **160**.

Das entstandene Isomerengemisch wurde dazu zunächst in einer Metallierungsreaktion mit *n*-Buthyllithium umgesetzt. Zu den entstandenen Lithiumorganen wurde dann eine Lösung des Weinreb-Amids **156** getropft. In dieser Reaktion nach einer Vorschrift von MEGGERS *et al.* wurden erneut zwei Isomere (**161** + **162**) mit einer Gesamtausbeute von 85% erhalten.¹³⁸

Diese Isomere wurden jedoch in der folgenden Entschützung wieder in Tautomere überführt. Für diesen letzten Schritt war nun geplant, mit TFA alle Schutzgruppen gleichzeitig abzuspalten. Die Durchführung wurde analog zu einer Vorschrift von YAN *et al.* durchgeführt,¹⁴⁰ wobei sich nach kurzer Reaktionszeit ein deutlicher Produktpot bildete. Allerdings zeigte sich nach massenspektrometrischer Analyse des chromatographierten Produkts, dass nur die PMB-Schutzgruppe entfernt worden war. Die erhaltene Substanz wurde somit ohne nähere Charakterisierung weiter umgesetzt, wobei die MEM-Schutzgruppen mit Chlorwasserstoff in einer Lösung aus Ethanol und Dioxan unter Rückfluss entfernt wurden. Nach einer normalen säulenchromatographischen Trennung und einer präparativen HPLC wurde die Carbonylverbindung **144** sauber erhalten. Die geringe Ausbeute ist an dieser Stelle durch die mehrmaligen Aufarbeitungs- und Aufreinigungsprozesse zu erklären.



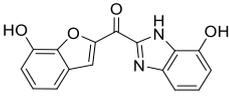
Schema 10: Verknüpfung des Weinreb-Amids **156** mit den beiden Benzimidazol-Derivaten **159** und **160** mit anschließender Entschützung zum Zielprodukt **144**.

5.6.4 Darstellung und Diskussion der biochemischen Daten zu Verbindung **144**

Die Bisheteroarylverbindung **144** stellt eine Alternative zum DHBP dar, wobei sie im NMR-Experiment wesentlich besser an die inaktive Form von *K*-RAS bindet. Mit einer Dissoziationskonstante von 0.5 ± 0.1 mM weist sie sogar eine bessere Affinität auf als das Bisphenol A mit 0.6 ± 0.2 mM. Dabei scheint diese Verbindung ebenfalls an die GTP-

Form von RAS zu binden, wie die ähnlichen Dissoziationskonstanten aus den MST-Experimenten für die inaktive und aktive Form zeigen. Diese Annahme wird auch durch ein weiteres ^1H - ^{15}N -HSQC-Experiment untermauert, bei der eine Veränderung von Aminosäureverschiebungen bei GTP-gebundenem *K*-RAS beobachtet werden konnte, wenn der Ligand **144** zugegeben wurde. Jedoch reichten die daraus erhaltenen Daten nicht aus, um eine Dissoziationskonstante für diesen Fall zu bestimmen.

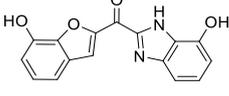
Tabelle 15: Über NMR- und MST-Experimente bestimmte Dissoziationskonstanten für die Verbindung **144**.

	^1H - ^{15}N -HSQC [mM]	MST [μM]	
	WT (GDP)	WT (GDP)	WT (GppNHp)
K_D	$0.5 \pm 0.1^*$	59.1	34.4

*im ^1H - ^{15}N -HSQC der GTP-Form waren ebenfalls Verschiebungen zu erkennen, die auf eine Bindung hinweisen

Die Inhibition des SOS-katalysierten Nukleotidaustauschs durch diesen Liganden ist hingegen ähnlich gering wie für viele bisher betrachtete Verbindungen auch.

Tabelle 16: IC₅₀-Werte für die inhibitorische Wirkung von Verbindung **144** auf den SOS-vermittelten Nukleotidaustausch.

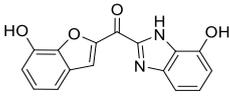
	RAS-SOS-Austausch-Assay				
	WT Ø	WT neu (Jan. 2020)	WT neu (Feb. 2020)	G12D	G12V
IC₅₀ [μM]	1341.3 (min: 560)	1360	-	2620	2100

Dennoch deuten die Werte darauf hin, dass die Bindung des Liganden an der Interaktionsfläche zu SOS erfolgt.

Da die halbmaximalen inhibitorischen Konzentrationen in den Ganzzellassays jedoch in der Größenordnung deutlich niedriger liegen, ist zu vermuten, dass nicht die Inhibition der RAS-Aktivierung durch SOS den zellulären Effekt bedingt. Trotzdem scheint es sich nicht

um direkte Off-Target-Effekte zu handeln, da die IC_{50} -Werte der CTG-Assays in der gleichen Größenordnung liegen, wie die Dissoziationskonstanten der MST-Tests. Diese unterscheiden sich aber um eine Größenordnung vom Ergebnis des NMR-Experiments.

Tabelle 17: IC_{50} -Werte für die inhibitorische Wirkung von Verbindung **144** auf verschiedene Ganzzelltypen mit unterschiedlicher *K*-RAS-Mutation.

	Cell-Titer-Glo-Assay								
	A549 (G12S)	Capan-1 (G12V)	DLD1 (G12D)	HCT15 (G13D)	K562 (WT)	MOLM -13 (WT)	H358 (G12C)	NCI- H441 (G12V)	SNU-1 (G12D)
IC_{50} [μ M]	45.2	53.3	46.3	37.7	29.2	16.5	37.7	47.3	34.5

Dennoch weisen alle Daten bisher auf eine *K*-RAS bedingte Inhibition im Zellassay hin. Auch die Eigenschaft der Verbindung, die ERK-Phosphorylierung zu vermindern legt dies nahe, da es sich bei ERK um einen Downstream-Effektor von RAS handelt.

Bei näherer Betrachtung der Daten aus dem 1H - ^{15}N -HSQC-Experiment lassen sich deutliche Veränderungen im Bereich der SI/II-Bindestelle, sowie um die Nukleotidbindestelle herum, erkennen. In einer Haddock-Rechnung kommt der energiegünstigste Cluster in der adressierten Bindestelle zwischen Switch I und Switch II zu liegen (**Abbildung 58**). Dennoch berechnet die Software die meisten Posen für eine Position auf der Proteinoberfläche neben der Nukleotidbindestelle. Zu beachten ist aber, dass es nicht zu einer Clusterbildung in der SIIP-Bindestelle kommt. Da eine stärkere Wechselwirkung mit der SI/II-Bindestelle wahrscheinlicher ist, wie auch der Haddock-Score besagt, wird der Bindungsmodus der von Schrödinger kalkulierten Pose (**Abbildung 56**) der Realität vermutlich am nächsten kommen. Die dabei augenscheinlich wechselwirkenden Aminosäuren oder deren benachbarte Aminosäure sind im NMR-Experiment ebenfalls verschoben, wodurch dieser Bindungsmodus als relevant betrachtet werden kann. Die Aminosäureverschiebungen, aus denen die weiteren Cluster der Haddock-Rechnung resultieren, sind vermutlich einer Konformationsänderung des

Proteins zuzuschreiben. Die oben erörterten Daten deuten darauf hin, dass durch eine solche Änderung der Ligand eine Konformation erzwingt, aus der heraus einer deutlich schlechtere Wechselwirkung mit den Downstream-Effektoren des MEK-Signalwegs resultiert. Trotz dieser zunächst vielversprechenden Ergebnisse bleiben Optimierungen nötig, da die Verbindung bisher auch an das Wildtyp-Protein bindet, das nicht inhibiert werden soll. Und auch die Stärke der Assoziation muss für einen potenten Inhibitor weiter verbessert werden.

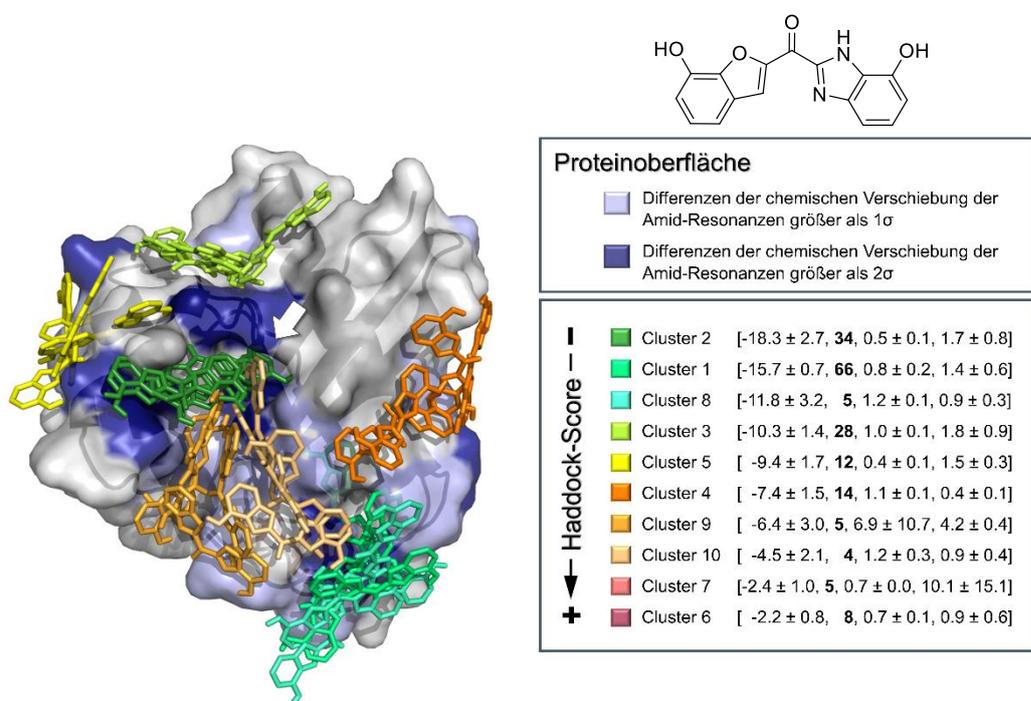


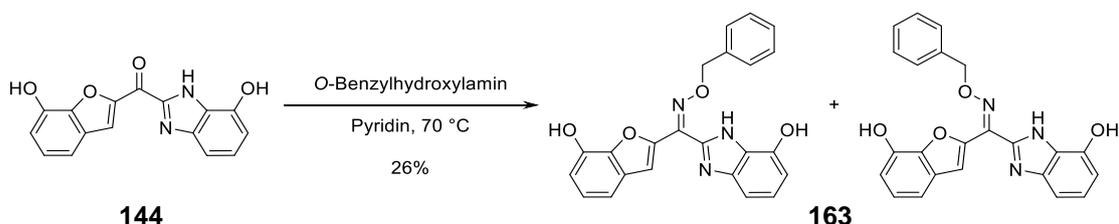
Abbildung 58: Darstellung der durch Haddock 2.4 unter Berücksichtigung der NMR-Restraints berechneten Cluster für die Bindung der Carbonylverbindung **144** an GDP-gebundenes *K-RAS4B^{WT}* (PDB:6MBT); dabei [Haddock-Score, Zahl der Clustermitglieder, RMSD-Wert, RVE]; der weiße Pfeil kennzeichnet die Lage der SI/II-Bindestelle.

5.6.5 Derivatisierung der Verbindung 144 zu einem Oxim-Derivat

Da sowohl das Benzyloxim **140** als auch die Verbindung **144** zu den besten *K-RAS*-Bindern in den ^1H - ^{15}N -HSQC-Experimenten zählen, lag es nahe, eine Hybrid-Verbindung der beiden

Strukturen herzustellen. Die Kondensation von *O*-Benzylhydroxylamin mit der Carbonylfunktion von Verbindung **144** bietet dafür eine gute Möglichkeit.

Die zwei Abspaltungsschritte ausgehend vom Isomerengemisch von **161** und **162** für die PMB- und MEM-Schutzgruppen verliefen mit einer Gesamtausbeute von 50% über beide Schritte besser als zuvor. Da Verbindung **140** nicht ausreichend in Essigsäure löslich war, mussten neue Bedingungen für die Oximbildung gewählt werden. Daher wurde eine Reaktion in Pyridin mit drei Äquivalenten des *O*-Benzylhydroxylamins durchgeführt, was nach präparativer HPLC 12 mg Gesamtmenge lieferte. Dabei wurden, wie erwartet, zwei Isomere erhalten. Leider war diese Menge für die erforderliche Vollanalytik zu gering, da bereits mit maximaler Messzeit nicht alle Kohlenstoffatome im NMR-Spektrum sichtbar wurden. Somit war eine vollständige Zuordnung nicht möglich. Dennoch konnten in den ¹H-Spektren sowohl fünf zusätzliche Protonen im aromatischen Bereich, sowie zwei Protonen im typischen Bereich für die benzyliche Methylenbrücke gefunden werden. Da zudem beiden Signalen der LCMS-Spektren die Produktmasse zugeordnet werden konnte, wurde das Isomerengemisch für biochemische Untersuchungen nach Dortmund gegeben.

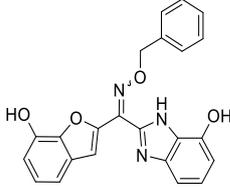


Schema 11: Synthese des Benzylloxims **163** zu Verbindung **144**, wobei zwei Isomere entstehen.

5.6.6 *Darstellung und Diskussion der biochemischen Daten zu Oxim 163*

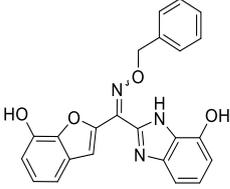
Die Bindung der Bisheteroarylverbindung **144** konnte durch die Derivatisierung leicht verbessert werden, wie die MST-Experimente des LDCs zeigen (**Tabelle 18**).

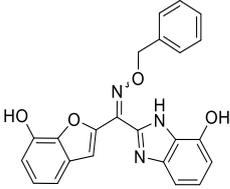
Tabelle 18: Über MST-Experimente bestimmte Dissoziationskonstanten für das Isomerengemisch von Oxim **163**.

	MST	
	WT (GDP)	G12D (GDP)
K_D [μ M]	23.3/289.0	26.1

Auch die Werte der inhibitorischen Wirkung, sowohl in Bezug auf den SOS-katalysierten Nukleotidaustausch als auch auf die ganzen Zellen, die im CTG-Assay untersucht wurden, sind für das Gemisch der beiden Oximisomere im Vergleich zur Ausgangsverbindung insgesamt etwas verbessert.

Tabelle 19: IC₅₀-Werte für die inhibitorische Wirkung des Isomerengemischs von Oxim **163** auf den SOS-vermittelten Nukleotidaustausch und verschiedene Ganzzelltypen mit unterschiedlicher *K-RAS*-Mutation.

	RAS-SOS-Austausch-Assay				
	WT	WT neu (Jan. 2020)	WT neu (Feb. 2020)	G12D	G12V
IC₅₀ [μ M]	958	1234	823	-	-

	Cell-Titer-Glo-Assay								
	A549 (G12S)	Capan-1 (G12V)	DLD1 (G12D)	HCT15 (G13D)	K562 (WT)	MOLM -13 (WT)	H358 (G12C)	NCI- H441 (G12V)	SNU-1 (G12D)
IC₅₀ [μ M]	31.9	38.8	26.6	25.3	22.0	31.2	31.3	41.6	30.5

Dabei passen die CTG-Werte in ihrer Größenordnung zu den Dissoziationskonstanten aus dem MST-Assay, sodass eine *K*-RAS abhängige Inhibition angenommen werden kann. Dabei ist aber wieder ein alternativer Mechanismus zur Verhinderung einer GTP-Beladung durch Inhibition der Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen RAS und SOS anzunehmen. Für diese Verbindung zeigte sich kein Effekt auf die Konzentration von phosphoryliertem ERK. Unklar bleibt, ob die Verbindung stattdessen einen Einfluss auf andere Signalwege von *K*-RAS haben könnte.

Insgesamt war aus den vorherigen Daten ein größerer Anstieg der Affinität und Erhalt der Wirkung auf die ERK-Phosphorylierung erwartet worden. Der eventuell unterschiedliche Bindungsmodus der beiden zu diesem Hybridmolekül verschmolzenen Struktur könnte dabei die Ursache sein, warum diese Erwartungen nicht erfüllt wurden. Falls das Oxim des DHBPs (**140**) tatsächlich in der SIIP-Bindestelle binden sollte, läge diese Vermutung nahe. Außerdem weist die Carbonylgruppe der Bisheteroarylverbindung **144** in die SI/II-Bindestasche hinein (**Abbildung 56**), sodass eine Erweiterung der Verbindung in dieser Richtung zu Überlagerungen mit der Proteinoberfläche und eventuell ungünstigen Kontakten führen könnte. Eine dadurch nötige Änderung der Lage des Liganden könnte mit einer Verhinderung positiver Wechselwirkungen einhergehen. Insgesamt könnten positive Bindungsbeiträge, durch die Erweiterung mit dem bindenden Oxim-Baustein, und negative Bindungsbeiträge, durch die ungünstigen Kontakte oder wegfallende Wechselwirkungen, so zu einer insgesamt nur unwesentlichen Änderung der Assoziationsenthalpie geführt haben.

5.7 Fragmenterweiterung für BPNH₂

FESIK *et al.* beschrieben in ihrer Publikation von 2012 bereits Liganden, bei deren Bindung in der bereits vorher von MAURER *et al.* beschriebenen Bindestelle eine erweiterte Binfurche entsteht, da sich das Tyrosin 71 der α 2-Helix der SWII-Region aus der Bindestellenregion herausdreht.^{55,56} Aus diesem Grund wurde versucht, eben diese erweiterte Furche mit größeren Liganden auszufüllen.

5.7.1 *In Silico* Suche nach geeigneten Liganden

Bereits in Vorarbeiten wurden basische Fragmente aus der ZINC-Datenbank an die 4EPY-Kristallstruktur von *K*-RAS gedockt, welche von FESIK *et al.* publiziert wurde und die erweiterte Binfurche aufweist (vgl. **Abbildung 35**). Dabei wurde das Grid im Bereich neben der bisher verwendeten kleinen Binfurche aus der MAURER-Kristallstruktur (PDB:4DSO) festgelegt. Die aus diesem Docking stammenden basischen Fragmente wurden hinsichtlich ihrer Ausrichtung in der Bindetasche betrachtet (**Abbildung 59**).

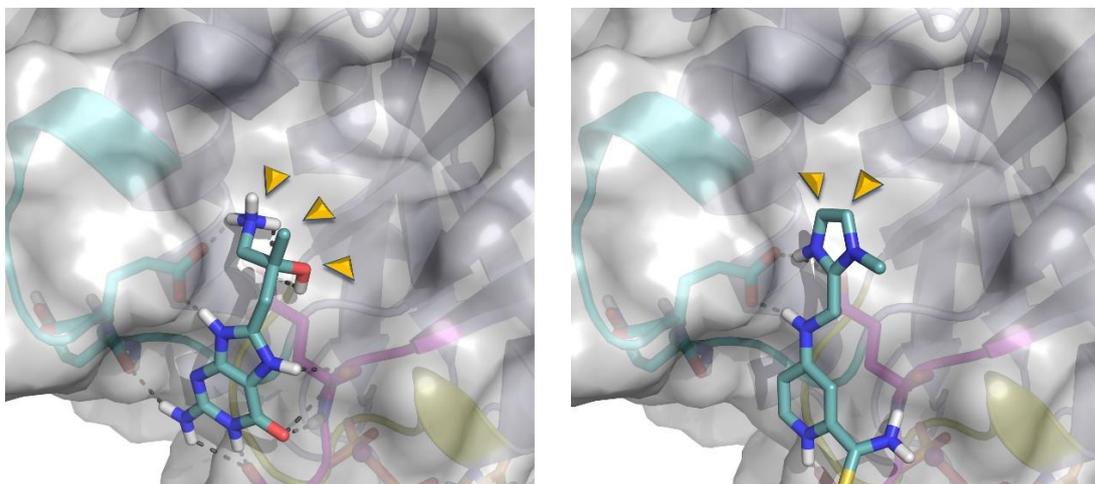


Abbildung 59: Beispielhafte Darstellung zweier Basenfragmente mit möglichen Anknüpfungspunkten (gelbe Pfeile), gedockt an der FESIK-Kristallstruktur (PDB:4EPY).

Entsprechend ihrer Ausrichtung gegenüber der verkleinerten SI/II-Bindetasche wurden Anknüpfungspunkte für Linker zum bis dahin besten eigenen *K*-RAS-Liganden, dem BPNH₂ (**104**), gesetzt.

Anschließend wurden diese Fragmente mit Hilfe von CombiGlide über unterschiedlich lange Methylenlinker mit einer der Aminfunktionen des BPNH₂ verbrückt. Die Kettenlänge reichte dabei von einer bis hin zu sieben Methyleneinheiten. Dieses initiale Docking entspricht einer *in silico* angewandten Fragment-Merging-Methode. Dabei war das Screening ursprünglich nur als eine Methode gedacht, die ungefähr benötigten Linkerlängen abzuschätzen und ein leicht anzubauendes Fragment auszuwählen.

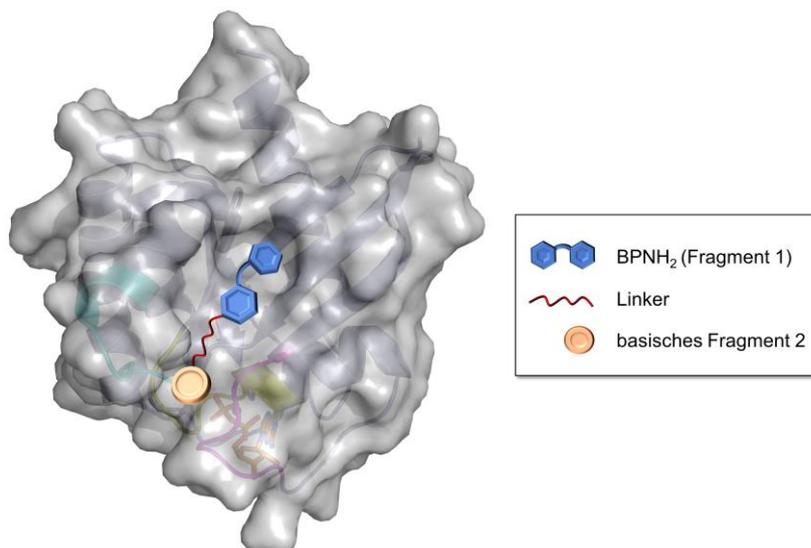
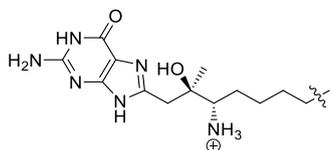
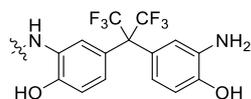
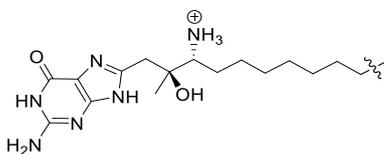


Abbildung 60: Prinzip des umgesetzten Fragment-Merging-Ansatzes für die erweiterte SI/II-Bindestelle von *K*-RAS4B (PDB:4EPY).

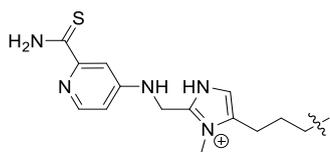
Da die resultierenden Verbindungen aber sehr hohe Docking-Scores aufwiesen (vgl. **Abbildung 61**), wurde hier entschieden eine der Verbindungen erst einmal zu synthetisieren. Dabei fiel die Wahl auf die Verbindung **164**, die aufgrund verschiedener Parameter zwischen den anderen Verbindungen herausstach. Da die Freiheitsgrade des Liganden durch frei bewegliche Elemente, wie die Alkyllinker, stark erhöht sind und eine Bindung an ein Protein mit einem Verlust an Freiheitsgraden einhergeht, sind kurze Linker aus entropischer Sicht günstiger (vgl. Kapitel 3.2.2).



-10.336 (-98.405) bis **-6.536** (-94.619)

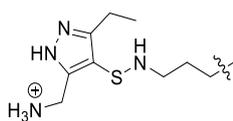


-9.553 (-67.520) bis **-3.673** (-67.942)

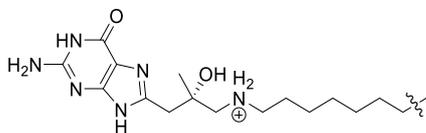


164

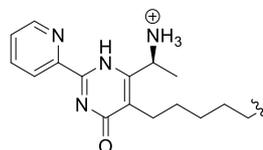
-9.533 (-121.470) bis **-7.303** (-117.997)



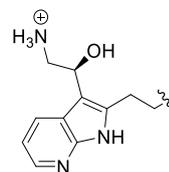
-9.201 (-103.072) bis **-5.585** (-89.583)



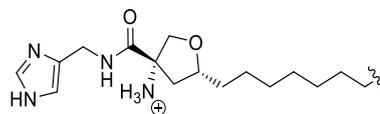
-9.191 (-81.381) bis **-6.030** (-72.582)



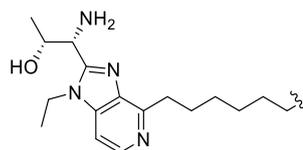
-9.186 (-93.422) bis **-2.552** (-67.326)



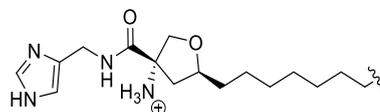
-9.134 (-89.147) bis **-7.317** (-80.413)



-9.061 (-88.201) bis **-5.206** (-96.938)



-9.034 (-77.472) bis **-2.742** (-79.927)



-8.346 (-91.606) bis **-2.916** (-85.950)

Abbildung 61: Verbindungen der besten Zehn Posen aus dem initialen *in silico* Screening zu den Second-Site-Liganden mit sowohl den besten (negativsten), als auch den schlechtesten (positivsten) Docking-Scores; weiterhin sind die zu der entsprechenden Pose gehörigen Glide-Emodel-Werte (in Klammern) angegeben.

Der gewählte Ligand zeichnet sich dabei durch eine im direkten Vergleich zu den anderen Verbindungen kurze Alkylkette aus. Weiterhin wurde die Differenz zwischen maximalem und minimalem Docking-Score betrachtet, wobei für Verbindung **164** eine der kleinsten Spannweiten der Werte festzustellen war.

Zudem weisen die Posen der Verbindung **164** sehr negative Glide-Emodel-Werte auf. Dieser Wert beschreibt die innere Energie des Protein-Ligand-Komplexes für die jeweilige Pose. Die Werte sprechen somit ebenso wie eine fehlende Abweichung von Docking- und Glide-Score für eine realistische Pose des Liganden. Bei anderen Verbindungen unterschieden sich die beiden Scoring-Werte, wobei dieser Unterschied durch im Docking-Score berücksichtigte Strafen für unrealistische Ladungszustände entsteht. Das bedeutet im Umkehrschluss, dass Verbindung **164** in den berechneten Posen einen realistischen Ladungszustand annimmt.

Bevor die Synthese dieses größeren Liganden gestartet wurde, wurden Variationen *in silico* gescreent, um eventuell eine weitere Optimierung zu erzielen. Hierfür wurde das 2,4-substituierte Methylimidazol, welches in dem ausgewählten Liganden **164** die verbrückende Einheit darstellt, durch verschiedenste fünfgliedrige Heteroaromaten (darunter Oxazole, Tetrazole, Triazole, Thiazole, Imidazole, Pyrrole etc.) mit jeweils allen möglichen Anknüpfungspunkten ersetzt. Die so entstandene Bibliothek wurde an den beiden Kristallstrukturen 4EPY und 4EPX gescreent. Die beiden besten Verbindungen, die in beiden dieser Läufe ähnlich hervortraten, stellten die 2,5-substituierte Thiazolverbindung und die 1,4-substituierte Imidazolverbindung dar.

Um eventuell synthetisch leichter zugängliche Derivate zu erhalten, wurden nun die Methylenlinker variiert, indem Carbonylgruppen auf der Seite des BPNH₂ eingebaut wurden oder die Position des sekundären Amins auf der Seite des Pyridylthioamids verändert wurde (**Abbildung 62**).

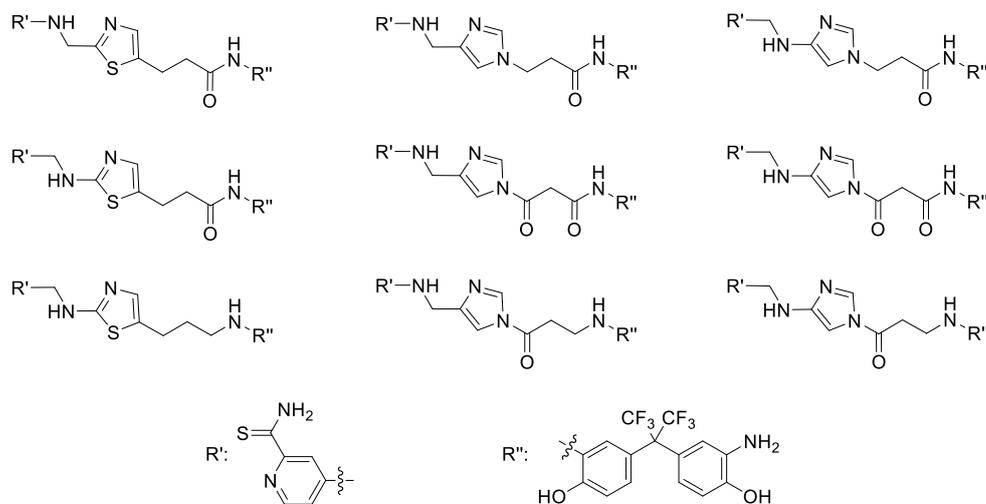


Abbildung 62: Im zweiten *in silico* Optimierungs-Screening verwendete Linker-Fragmente für die Verbrückung des BPNH₂ und des Pyridylthioamidbausteins.

Auch diese Strukturen wurden an die beiden zuvor verwendeten Kristallstrukturen gedockt, wobei die vorher ausgewählten, nicht optimierten Verbindungen ebenfalls berücksichtigt wurden. Für diese kleineren Screenings konnte dann eine grafische Auswertung der Ergebnisse erfolgen, da viele Posen für die Liganden ausgeschrieben wurden.

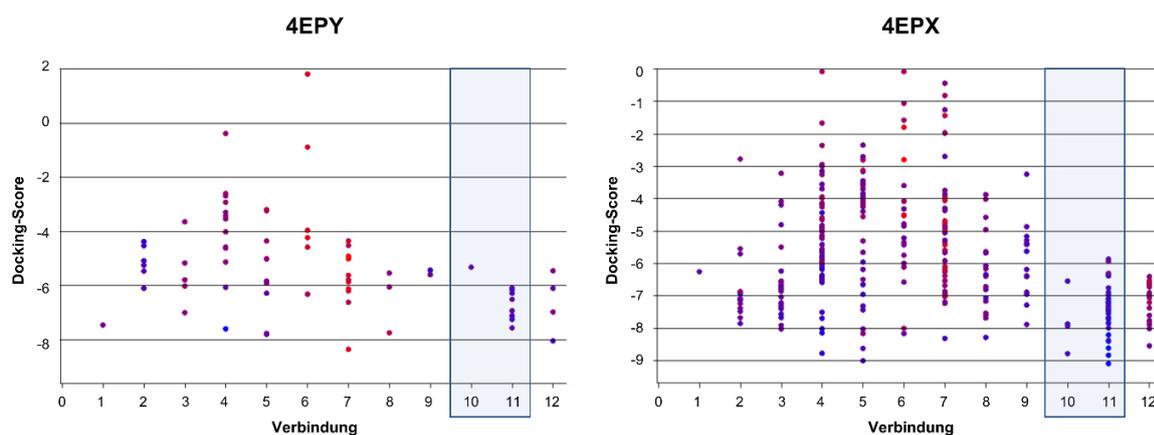


Abbildung 63: Auftragung der im zweiten Optimierung-Schritt erhaltenen Docking-Werte der jeweiligen Posen, aufgetragen gegen die Nummerierung der Verbindungen. Der Farbgradient repräsentiert die Glide-Emodel-Werte, wobei rot markierte Posen die positivsten Glide-Emodel-Werte annehmen und die blauen Posen die negativen Werte.

Für die Verbindungen 10 und 11 aus **Abbildung 63** war dabei zu erkennen, dass ihre Posen in beiden Kristallstrukturen nur in einem sehr günstigen Docking-Score-Bereich streuen. Zudem nehmen die Glide-Emodel-Werte negative Werte an. Diese Kriterien führten zur Auswahl der beiden Verbindungen, wobei die Verbindung 10 der Verbindung **164** aus dem initialen Screening entsprach. Bei der zweiten Verbindung, die mehr Posen mit guten Docking-Scores aufwies, handelte es sich hingegen um das über ein 1,4-substituiertes Imidazol verbrückte Konstrukt **165**. Aufgrund der schlechten Kompatibilität des Thioamids mit allgemeinen Wirkstoffeigenschaften wurde die Synthese für das entsprechende Amid **166** entworfen.

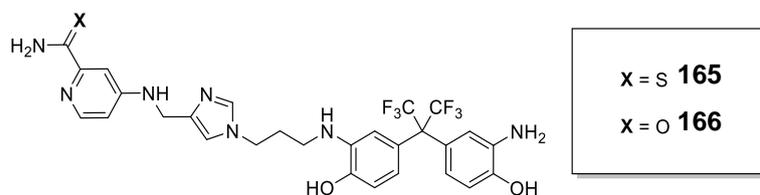


Abbildung 64: Darstellung des aus dem zweiten Optimierungsschritt resultierenden Liganden **165** und dessen Amid-Analogen **166**, welches letztlich synthetisiert wurde.

5.7.2 Test-Alkylierungen und -Acylierungen von BPNH₂

Vor der retrosynthetischen Zerlegung dieser Verbindung, soll aber auf kleine Testversuche zur Auswirkung der Alkylierung oder Acylierung der Anilin-Gruppen des BPNH₂ auf die Assoziation an RAS beschrieben werden, da diese im Zuge der *in silico* Optimierung des Liganden durchgeführt wurden. Die Synthese des eigentlichen Liganden (**166**) wird dann ab Kapitel 5.7.3 beschrieben.

Die Derivatisierungen des BPNH₂ wurden durchgeführt, weil bisher nur bekannt war, dass eine Substitution an den Phenol-Gruppen von BPA die Assoziation an *K*-RAS verhindert. Somit hätte auch eine einseitige Substitution der Aniline des BPNH₂ zu einem vollständigen Verlust der Bindungseigenschaften führen können, selbst wenn es die *in silico* Ergebnisse anders nahelegen. Bei den Optimierungsschritten der Screenings

wurden die Aniline sowohl in Amide als auch sekundäre Amine als verbrückende Einheit überführt. Deshalb wurden auch für die Testverbindungen beide Stoffgruppen hergestellt. Als sich dann abzeichnete, dass das alkylierte Produkt hergestellt werden sollte, wurde zudem das BPNH₂-Derivat **170** hergestellt, das einen Alkylrest mit der Länge des Linkers von Verbindung **166** trägt, um auch den Einfluss weiterer Methylengruppen einschätzen zu können. Die Durchführung dieses Experiments lehnte sich an eine Vorschrift von GONCALVES *et al.* an.¹⁴¹

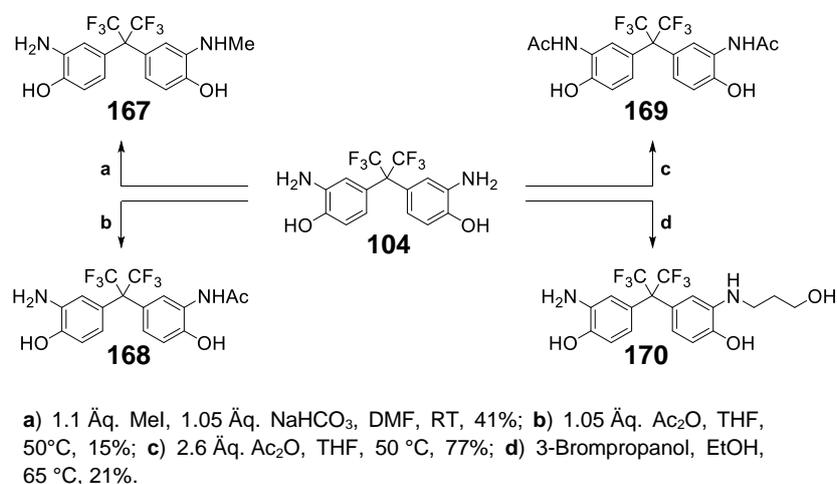


Abbildung 65: Synthesen von alkylierten und acylierten BPNH₂-Analoga.

Die Alkylierung mit Methyljodid zum monomethylierten BPNH₂-Derivat **167** wurde den Bedingungen einer Alkylierungsreaktion von KOUROUNAKIS *et al.* nachempfunden,¹⁴² wobei neben dem gewünschten Produkt auch mehrfach alkylierte Produkte anfielen, genau wie es für das Derivat **166** der Fall war. Dadurch sind die Ausbeuten für beide Derivate verringert. Für die Monoalkylierung mit 3-Brompropanol kommt zudem die Bildung von Nebenprodukten durch die Alkylierung der aliphatischen Hydroxygruppe in Frage. Bei der Monoacylierung, die an eine Vorschrift von COOK *et al.* angelehnt war,¹⁴³ wurde ebenso eine Reaktion beider Anilingruppen beobachtet. Dabei wurde in der ersten Reaktion aber nur das monoacylierte Produkt **168** isoliert, während das zweifach acylierte Produkt **169** in einer zweiten Reaktion mit mehr Äquivalenten des Essigsäureanhydrids hergestellt wurde. Die geringe Ausbeute der Monoacylierung ist auf die überwiegende

Doppelacylierung zurückzuführen, während das Edukt ebenfalls in großen Anteilen wiedergewonnen werden konnte.

Bei den Messungen zur Affinität der Verbindungen im ^1H - ^{15}N -HSQC-Esperiment zeigte sich, dass eine Monomethylierung, wie bei Derivat **167**, weitgehend toleriert wird, während sowohl die Monoacylierung als auch die zweifache Acylierung zu einem deutlichen Verlust an Bindungsenthalpie einhergeht. Zwar verschlechtert sich die inhibitorische Wirkung auf den GEF-katalysierten Nukleotidaustausch, wie die IC_{50} -Werte aus **Tabelle 20** zeigen, aber sie bleibt erhalten. Die zu beobachtende Verschlechterung der Affinität durch den längeren Alkylrest von Verbindung **170** ist nachvollziehbar, da dieser ohne weiteren angefügten Rest kaum zu weiteren Wechselwirkungen führen sollte.

Tabelle 20: Im NMR-Experiment bestimmte Dissoziationskonstanten und IC_{50} -Werte des RAS-SOS-Austauschassays für die einfachen BPNH₂-Derivate.

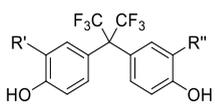
Verbindung		Biochemische Daten					
		K_D [mM] ^1H - ^{15}N - HSQC	IC_{50} [μM] RAS-SOS-Austausch-Assay				
			WT (GDP)	WT \emptyset	WT neu (Jan. 2020)	WT neu (Feb. 2020)	G12D
104	R': -NH ₂ R'': -NH ₂	0.4 ± 0.1	316	-	-	488	286
167	R': -NH ₂ R'': -NHMe	0.5 ± 0.2	1464	-	-	1498	929
168	R': -NH ₂ R'': -NHAc	3.8 ± 1.7	1647	-	-	2495	1858
169	R': -NHAc R'': -NHAc	unlöslich	>3000	>3000	-	-	-
170	R' : -NH ₂ R'': -NH(CH ₂) ₃ OH	> 2.0	919	-	-	>3000	>3000

Dadurch kommen nur die bereits beschriebenen entropisch ungünstigen Beiträge dieses Restes zu tragen. Bei dem angestrebten Liganden ist dies nicht zu erwarten, da das

Basenfragment, das über den Alkyl linker angefügt werden soll, weitere günstige Wechselwirkungen verspricht.

Neben den Bindungsdaten wurden auch Stabilitätsdaten für die einfachen BPNH₂-Derivate erhoben. Dabei war festzustellen, dass die alkylierten Derivate abseits des sauren Milieus relativ schnelle Zersetzungsreaktionen einzugehen scheinen. Eine zu hohe Stabilität von Wirkstoffen im Körper ist jedoch ebenfalls nicht erwünscht. Aus diesem Grund wurde die Synthese des Liganden **166** fortgesetzt.

Tabelle 21: Ergebnisse der Stabilitätsmessungen der monoalkylierten und -acylierten Derivate, wobei der Restgehalt an Zielverbindung nach 24 Stunden bei drei verschiedenen pH-Werten angegeben ist.

Verbindung		pH = 1	pH = 7.4	pH = 9
				
167	R': -NH ₂ R'': -NHMe	98%	15%	2%
168	R': -NH ₂ R'': -NHAc	88%	61%	47%
170	R' : -NH ₂ R'': -NH(CH ₂) ₃ OH	100%	46%	6%

Die Haddock-Rechnungen, die zu diesen Verbindungen gemacht wurden, sprechen dabei nicht eindeutig für einen bestimmten Bindungsmodus. Ein Cluster, der sich in der Region der SI/II-Bindestelle befindet, taucht bei allen drei Strukturen, die mit Hilfe von Haddock an GDP-RAS gedockt wurden, unter den drei bestbewerteten Clustern auf. Der bestbewerteteste Cluster liegt jedoch bei den Verbindungen **167**, **168** und **170** nie in dieser Region.

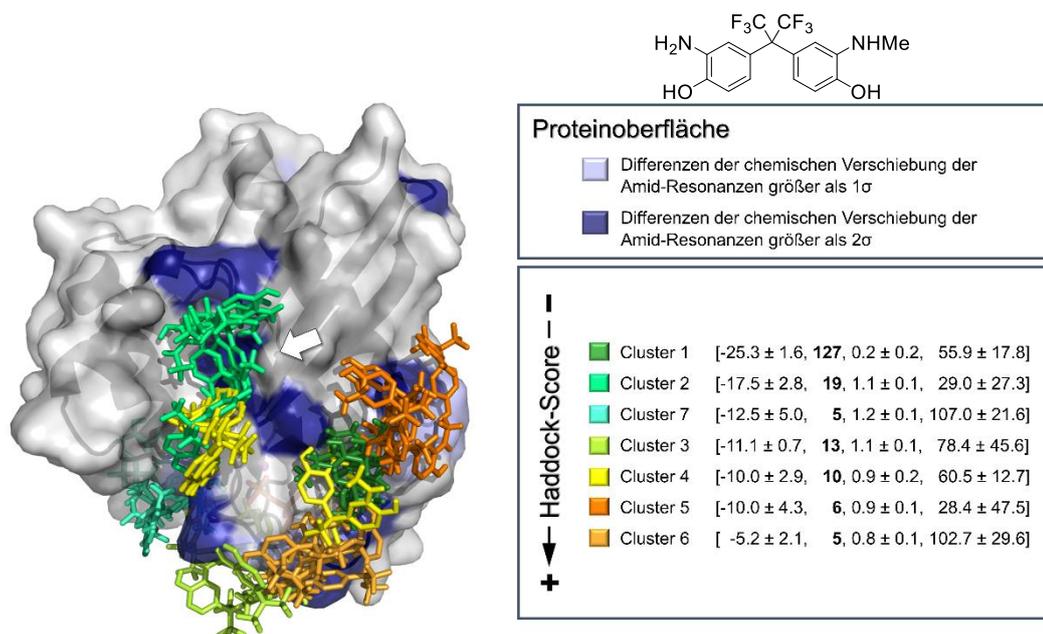


Abbildung 66: Darstellung der durch Haddock 2.4 unter Berücksichtigung der NMR-Restraints berechneten Cluster für die Bindung des monomethylierten BPNH₂-Derivats **167** an GDP-gebundenes *K-RAS4B*^{WT} (PDB:6MBT); dabei [Haddock-Score, **Zahl der Clustermmitglieder**, RMSD-Wert, Verletzungsenergie für Restraints]; der weiße Pfeil kennzeichnet die Lage der SI/II-Bindestelle.

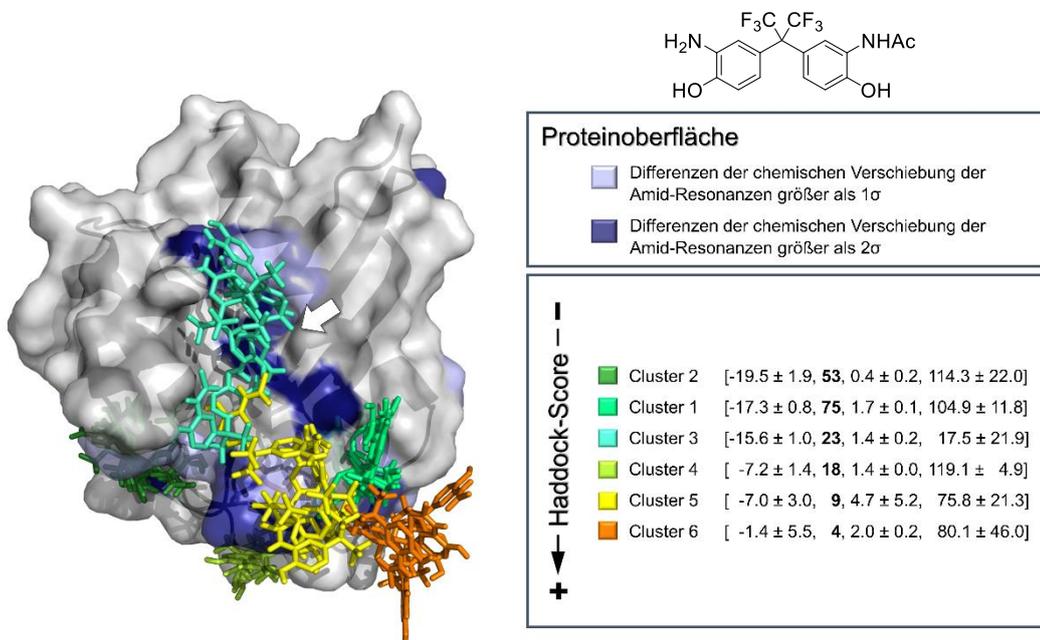


Abbildung 67: Darstellung der durch Haddock 2.4 unter Berücksichtigung der NMR-Restraints berechneten Cluster für die Bindung des monoacylierten BPNH₂-Derivats **168** an GDP-gebundenes *K-RAS4B*^{WT} (PDB:6MBT); dabei [Haddock-Score, **Zahl der Clustermmitglieder**, RMSD-Wert, Verletzungsenergie für Restraints]; der weiße Pfeil kennzeichnet die Lage der SI/II-Bindestelle.

Stattdessen liegen bei zwei der Verbindungen die Cluster mit dem höchsten Haddock-Score in der SIIP-Bindestelle (**Abbildung 67** und **Abbildung 68**), während er für das dritte Derivat an der Proteinoberfläche auf der anderen Seite der Nukleotidbindestelle liegt (**Abbildung 66**). Der Cluster, der in der SI/II-Bindestelle liegt, weist für das Derivat **168** zumindest die niedrigsten Strafenergien für die Verletzung der Rahmenbedingungen auf, die aufgrund der experimentellen Daten aus den NMR-Spektren gewählt wurden. Für die beiden anderen Strukturen sprechen Clustergröße, Haddock-Score und diese Strafenergien eher für eine Assoziation an einer alternativen Stelle. Ob die Veränderungen der Aminosäureverschiebungen, die bei dieser Rechnung berücksichtigt wurden, durch eine allosterische Konformationsänderung zu erklären ist, kann nicht geklärt werden. Hierfür müsste man den Ligand-Protein-Komplex kristallographisch untersuchen.

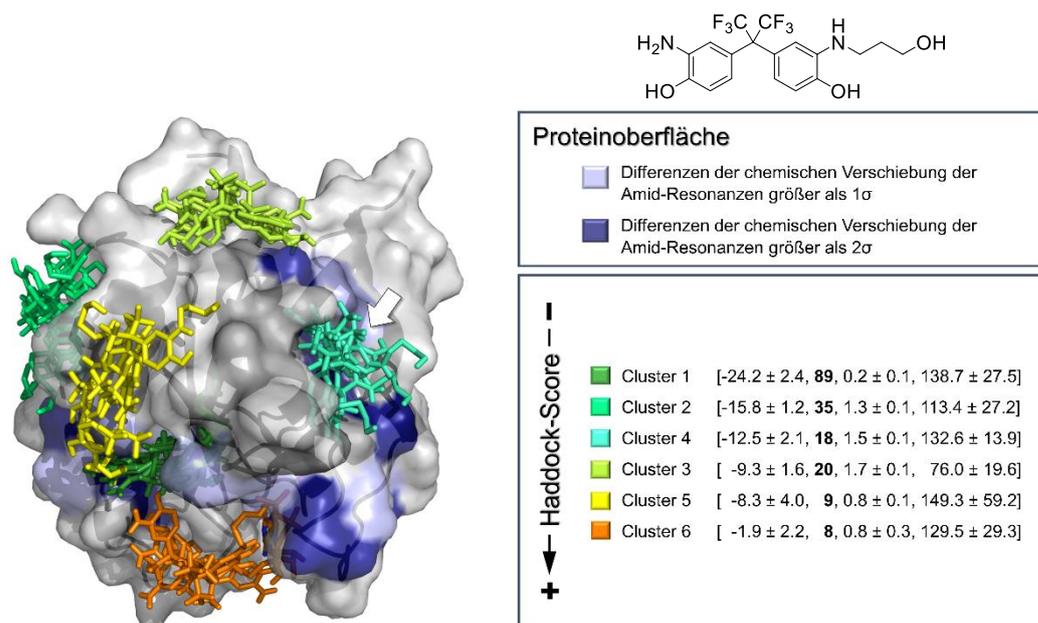


Abbildung 68: Darstellung der durch Haddock 2.4 unter Berücksichtigung der NMR-Restraints berechneten Cluster für die Bindung des alkylierten BPNH₂-Derivats **170** an GDP-gebundenes *K*-RAS4B^{WT} (PDB:6MBT); dabei [Haddock-Score, **Zahl der Clustermitglieder**, RMSD-Wert, Verletzungsenergie für Restraints]; der weiße Pfeil kennzeichnet die Lage der SI/II-Bindestelle.

5.7.3 Retrosynthetische Betrachtung des durch Docking erhaltenen Second-Site-Liganden 166

Bei Betrachtung von Verbindung **166** unter einem retrosynthetischen Gesichtspunkt lassen sich drei wesentliche Bausteine erkennen. Am deutlichsten ist der BPNH₂-Baustein (**Abbildung 69**: grau), welcher über eine seiner Anilin-Funktionen mit dem verbrückenden Imidazol-Baustein (**Abbildung 69**: blau) verbunden ist. Das BPNH₂ ist schwer aufzubauen und daher als fertiger Baustein vorgegeben. Die Verknüpfung mit dem Alkylanker am blau dargestellten Imidazol-Baustein kann dabei über eine Monoalkylierung oder eine reduktive Aminierung erfolgen, wenn der Alkohol des Imidazol-Bausteins vorher in einen Aldehyd überführt wird. Der dritte Baustein ist ein Pyridincarboxamid (**Abbildung 69**: orange), welches mit dem Imidazol-Baustein verbunden werden muss. Dabei bestehen zwei Möglichkeiten für einen retrosynthetischen Schnitt.

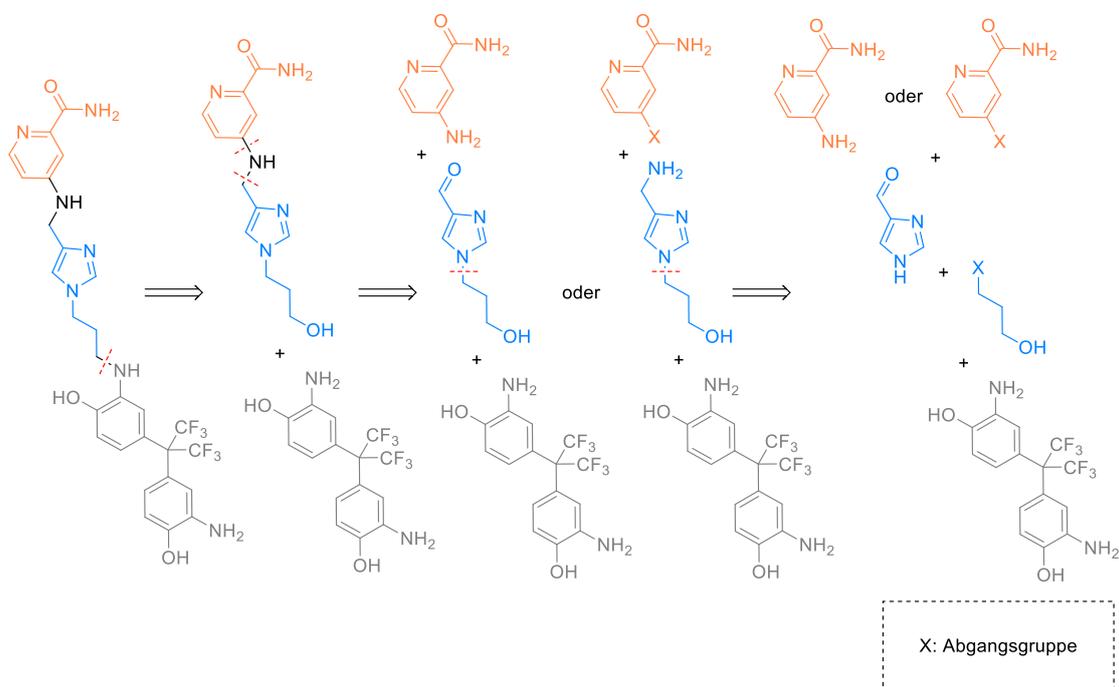
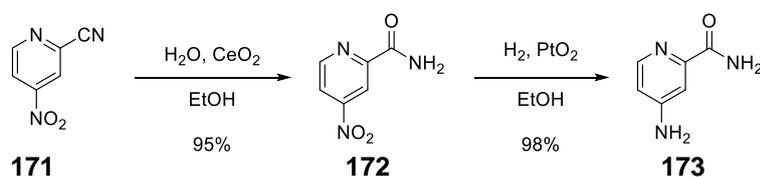


Abbildung 69: Retrosynthetische Zerlegung des Liganden **166** in drei wesentliche Bausteine.

Entweder wird eine entsprechende Amin-Verbindung auf Seiten des Carboxamids durch eine reduktive Aminierung mit dem Aldehyd des Imidazol-Bausteins verknüpft oder ein Amin-Analogon des Imidazol-Bausteins wird zum Beispiel durch nukleophile aromatische Substitution an ein Derivat des Pyridincarboxamid-Bausteins gekuppelt, welches eine Abgangsgruppe in der 4-Position trägt. In beiden Fällen kann der Imidazol-Baustein durch Alkylierung von 1*H*-Imidazol-4-carbaldehyd hergestellt werden, da die Aldehyd-Funktion theoretisch leicht in ein Amin zu überführen ist.

5.7.4 Erster Versuch der Synthese von Verbindung 166 über reduktive Aminierung des Pyridin-Bausteins

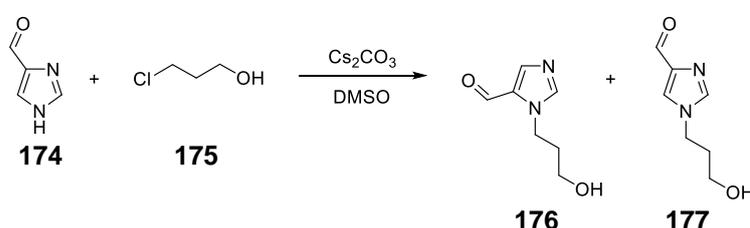
Für einen ersten Syntheseversuch wurde der Weg über die reduktive Aminierung des substituierten Imidazol-4-carbaldehyds gewählt, da hierfür die Substrate am schnellsten zugänglich waren. Die Synthese des Pyridin-Bausteins verlief dabei in zwei Schritten problemlos. Sowohl bei der Cer(IV)oxid-vermittelten Hydrolyse des 4-Nitropicolinonitrils (**171**) nach Vorschrift von TAMURA *et al.*¹⁴⁴ als auch bei der darauffolgenden Nitroreduktion mit Platin(IV)oxid-Katalyse nach einem Patent von LOVERING *et al.*¹⁴⁵ fand ein quantitativer Umsatz statt, wodurch es ausreichend war, die festen Katalysatoren über Celite abzufiltrieren.



Schema 12: Darstellung der Synthese von 4-Aminopicolinamid (**173**) ausgehend von 4-Nitropicolinonitril (**171**).

Da für die reduktive Aminierung keine Schützung des Alkohols am Imidazolderivat nötig war, wurde der 1*H*-Imidazol-4-carbaldehyd zunächst mit 3-Chlorpropanol alkyliert, wobei die Entstehung zweier Substanzen mit der erwarteten Produktmasse zu beobachten war.

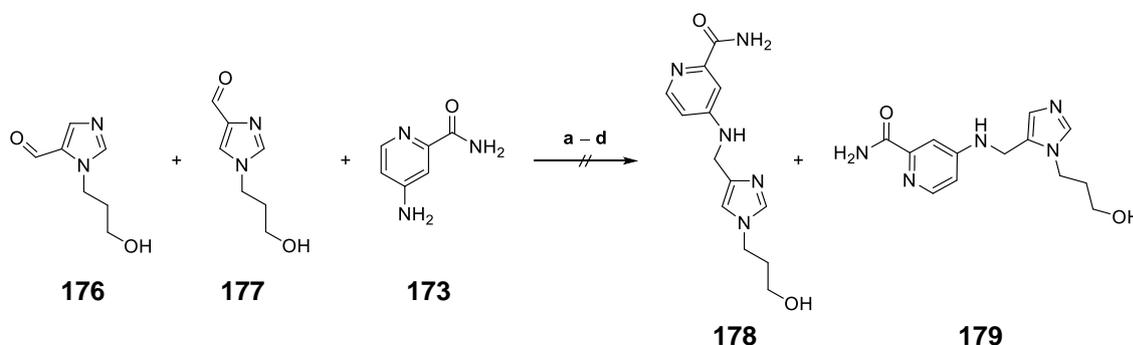
Diese zwei Verbindungen sollten den beiden dabei zu erwartenden Isomeren entsprechen, welche durch die Alkylierung der Tautomere des Imidazols entstehen. Nach anfänglichen Aufarbeitungsschwierigkeiten aufgrund der hohen Wasserlöslichkeit, konnte das Isomerengemisch durch Abfiltrieren des als Base eingesetzten Caesiumcarbonats und Evaporieren des DMSO gewonnen werden. Jedoch wurde das Produktgemisch nie vollständig charakterisiert, da eine Trennung der Isomere zu diesem Zeitpunkt nicht gelang.



Schema 13: Alkylierung von 1H-Imidazole-4-carbaldehyd (174) mit 3-Chlorpropanol (175) führt vermeintlich zu den beiden Isomeren 176 und 177.

Trotzdem wurde das Isomerengemisch in Testreaktionen mit dem Pyridinderivat **173** umgesetzt. Dabei wurden der substituierte Imidazol-4-carbaldehyd und das 4-Aminopicolinamid (**173**) zunächst unter Standard-Bedingungen der reduktiven Aminierung umgesetzt (**Schema 14**). Die literaturbekannten Methoden mit Natriumtriacetoxyborhydrid und Natriumcyanoborhydrid wurden als Erstes getestet. Dabei zeigte sich aber in beiden Fällen kein Umsatz, weshalb eine Aminierung mit Natriumtriacetoxyborhydrid noch einmal ohne die Anwesenheit von Essigsäure durchgeführt wurde. Jedoch konnte auch hier kein Umsatz beobachtet werden, vermutlich aufgrund einer zu geringen Löslichkeit des Pyridin-Derivates. In Löslichkeitsexperimenten für das Picolinamid **173** zeigte sich, dass die deutlichste Löslichkeit in Pyridin zu erkennen war. Dementsprechend wurde eine Vorschrift für eine reduktive Aminierung in Pyridin gesucht. Eine Methode von BOMANN *et al.*¹⁴⁶ mit Pyridin-Boran-Komplex in THF wurde dahingehend abgewandelt, dass der vorhandene Boran-THF-Komplex verwendet wurde, während frisch getrocknetes und destilliertes Pyridin als Lösungsmittel diente. Aber auch

bei diesen Bedingungen war keine Reaktion zu erkennen, da sich das Picolinamid **173** weiterhin als zu unlöslich erwies.

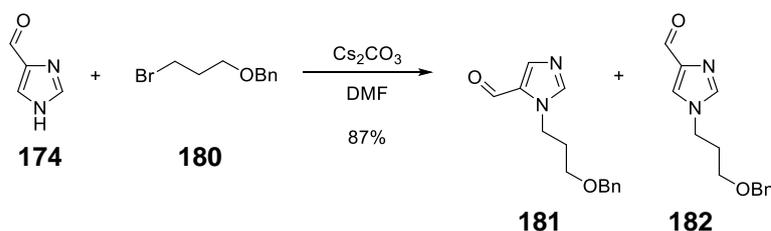


a) $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, DCE, AcOH; b) NaCNBH_3 , PrOH , AcOH, Molsieb; c) $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, DCE; d) $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$, Pyridin.

Schema 14: Versuche zur reduktiven Aminierung zur Verknüpfung von Picolinamid **173** mit den regioisomeren Imidazol-Derivaten **176** und **177**.

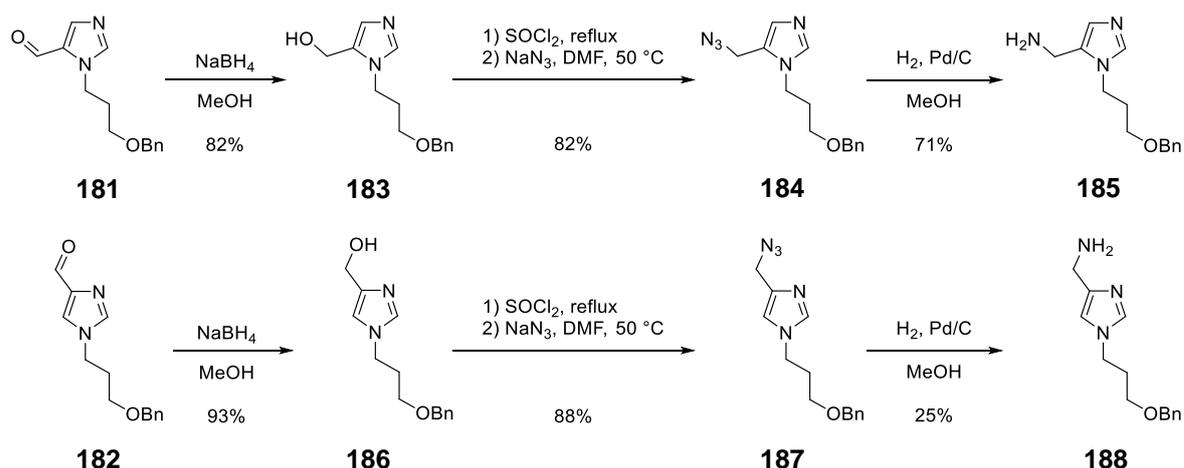
5.7.5 Versuche zur Verknüpfung mit dem Imidazol-Baustein über Substitutionsreaktionen am Pyridin-Baustein

Aus dem Grund der schlechten Löslichkeit des Picolinamids **173** musste nach Alternativen für die Synthese gesucht werden. Dabei wurde nun der alternative Ansatz gewählt, für den das Amin des Imidazolbausteins benötigt wird. Aus diesem Grund wurde der *1H*-Imidazol-4-carbaldehyd (**174**) mit dem käuflichen Benzyl-3-brompropanol angelehnt an einer Vorschrift von L. A. REITER alkyliert.¹⁴⁷ Nachdem auch hier zunächst keine Trennung der Regioisomere gelang, wurde letztendlich mit einer geeigneten flüssigen Phase eine Trennung erreicht. Dieses Laufmittelgemisch setzte sich aus Ethylacetat, *n*-Butanol, Wasser und Essigsäure zusammen. Durch den Wasseranteil war keine standardmäßige Säulenchromatographie als Trennmethode geeignet, weshalb auf die Methode der DCVC (Dry column vacuum chromatography) zurückgegriffen wurde.



Schema 15: Alkylierung von 1*H*-Imidazol-4-carbaldehyd (**174**) mit Benzyl-3-bromopropanol (**180**) führt zu den zwei Regioisomeren **181** und **182**.

Aufgrund der erfolgreichen Trennung der Isomere, wurden die folgenden Synthesen zunächst ausgehend vom 1,5-substituierten Isomer **181** getestet, da dieses nicht für den angestrebten Liganden verwendet wird. Somit wäre ein Substanzverlust durch einen Fehlschlag der Synthese nicht so gravierend gewesen, wie für das gewünschte Derivat.

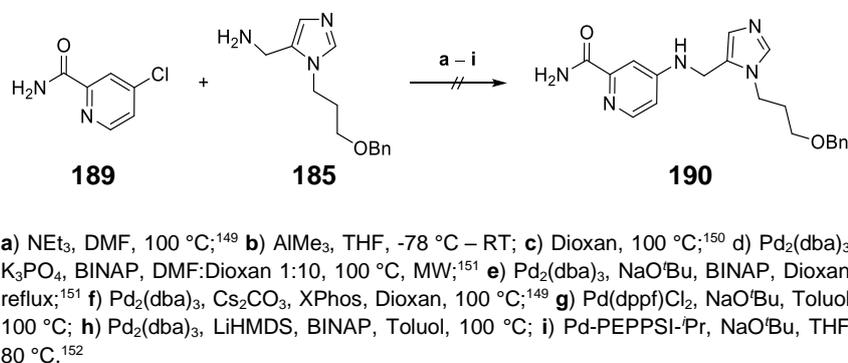


Schema 16: Getrennte Synthese der isomeren Amine **185** und **188** aus den Regioisomeren des substituierten Imidazolcarbaldehyds.

Die Syntheseroute wurde einer Vorschrift aus einem Patent von D. DE ROULET und R. DEVITA nachempfunden.¹⁴⁸ Die Reduktion der Aldehyde **181** und **182** erfolgte standardgemäß mit Natriumborhydrid. Bei beiden Regioisomeren wurden die entsprechenden Alkohole nach der Extraktion in sauberer Form erhalten. Mit Hilfe von Thionylchlorid wurden die Alkohole **183** und **186** anschließend in die jeweiligen Chloride überführt. Nach vollständigem Entfernen des Thionylchlorids durch Destillation und Evaporieren im Hochvakuum, wurden die erhaltenen Öle in DMF aufgenommen und das Chlorid durch Azid substituiert. Im abschließenden Schritt wurden die Azide

hydrogenolytisch unter Pd-Katalyse reduziert. Dabei wurde das Azid **184** wesentlich schneller umgesetzt als das entsprechende Regioisomer **187**, obwohl beide Verbindungen in reiner Form unter gleichen Bedingungen umgesetzt wurden. Augenscheinlich wurde der Pd-Katalysator durch die Verbindung **187** bzw. das entsprechende Amin **188** vergiftet, da nach einiger Zeit kein erkennbarer Umsatz mehr stattfand. Erstaunlicherweise blieben die Benzyl-Schutzgruppen beider Regioisomere auch während der längeren Reaktionsführung der Hydrogenolyse vollständig erhalten.

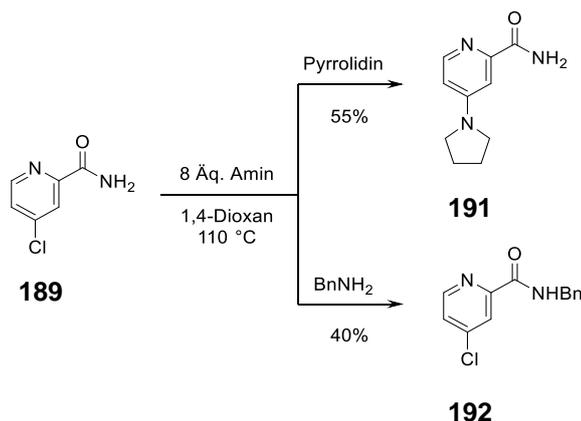
Mit den beiden erhaltenen Aminen wurden Experimente zur Verknüpfung des Amins **185** mit 4-Chlorpicolinamid (**189**) durchgeführt. Dabei wurde zunächst versucht, das Chlorid in einer nukleophilen aromatischen Substitution auszutauschen. Jedoch konnte bei den drei verwendeten Methoden die Produktmasse nicht über LCMS nachgewiesen werden. Nach diesen ersten Misserfolgen wurden zahlreiche Bedingungen für eine BUCHWALD-HARTWIG-Aminierung des Pyridylchlorids **189** getestet, jede davon ohne nachweisbaren Umsatz zum gewünschten Produkt (**Schema 17**).



Schema 17: Versuche zur Substitution des Chlorids am Picolinamid-Derivat durch das Amin, wobei sowohl nukleophile aromatische Substitutionen (Methoden **a – c**), als auch BUCHWALD-HARTWIG-Aminierungen getestet wurden (Methoden **d – i**).

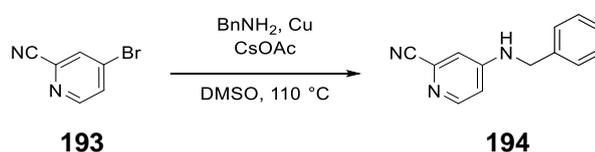
Nachdem diese Versuche allesamt gescheitert waren, wurde ein Literaturexperiment der nukleophilen aromatischen Substitution des Chlorids von 4-Chlorpicolinamid (**189**) durch Pyrrolidin zur Kontrolle nachgestellt. Bei dieser Synthese nach der Vorschrift von GOBIS *et al.* bildete sich aber das gewünschte Produkt **191**.¹⁵⁰ Nun wurde zunächst

Benzylamin als Modellverbindung für das Imidazolderivat umgesetzt. Statt jedoch das Chlorid zu substituieren, bildete sich das benzylierte Amid-Derivat **192**. Sowohl die Produktmasse und die signifikante Isotopenverteilung des Chlors, sowie die Verringerung der Integration vorhandener Amid-Signale sprachen dabei für das Produkt **192**. Die nachfolgende NMR-Untersuchung bestätigte diese Annahme.



Schema 18: Test des Literaturreaktion und Übertragung auf Benzylamin als Modellverbindung.

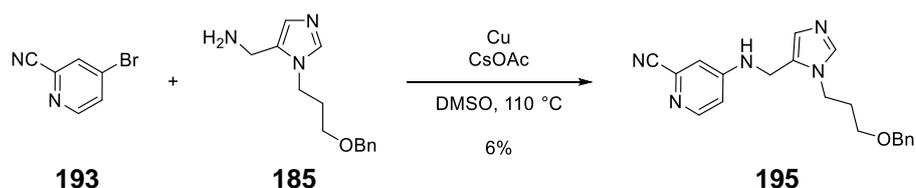
Um diese ungewünschte Reaktion zu unterdrücken, die massenspektroskopisch auch in einem Experiment mit Dibenzylamin als analoges sekundäres Amin nachgewiesen werden konnte, wurde nun der Pyridin-Reaktand gewechselt. Anstelle des Picolinamids wurde das entsprechende Picolinonitril gewählt, wobei das bromierte Derivat **193** käuflich erhältlich war. In der Literatur wurde eine ligandenfreie kupferkatalysierte Aminierung von Heteroarylhaliden gefunden.¹⁵³ Diese Vorschrift von BOLM *et al.* wurde zunächst wieder mit Benzylamin als Modellverbindung getestet.



Schema 19: Vermutete Produktbildung bei der kupferkatalysierten Aminierung des 4-Brompicolinonitrils (**193**).

Die LCMS-Ergebnisse zeigten diesmal die Entstehung der gewünschten Produktmasse, während auch das Isotopenmuster des Chlors nicht mehr zu beobachten war. Nach

säulenchromatographischer Trennung wurden die erwarteten Signale im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum nachgewiesen, wobei die Substanz noch verunreinigt war. Aufgrund eines experimentellen Fehlers bei der darauffolgenden präparativen HPLC-Trennung konnte das Produkt nicht in reiner Form erhalten werden. Stattdessen wurden die Reaktionsbedingungen für das Amin **185** getestet (**Schema 20**).



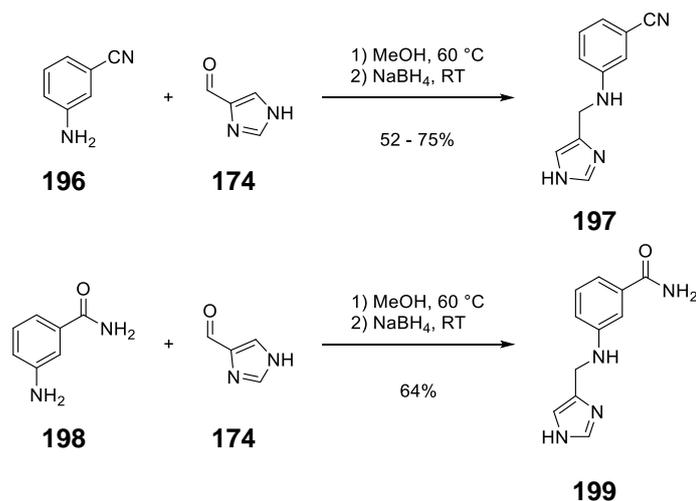
Schema 20: Erste erfolgreiche Verknüpfung eines Imidazol-Bausteins mit einem Picolinsäure-Derivat durch kupferkatalysierte Aminierung.

Das gewünschte Produkt **195** wurde isoliert, jedoch wurde die Ausbeute durch die vielen entstandenen Nebenprodukte stark limitiert. Aus diesem Grund sollten entsprechend größere Mengen desamins **188** hergestellt werden, das dem anderen Regioisomer und somit dem für die Synthese des eigentlichen Liganden nötigen Baustein entspricht. Bei dieser Nachsynthese konnte jedoch noch weniger Azid zum Amin reduziert werden, als in der ersten Durchführung. Außerdem brachte auch eine STAUDINGER-Reduktion mit Triphenylphosphin keinen größeren Erfolg, da hier die Abtrennung des Triphenylphosphinoxids misslang. Aus diesem Grund wurde die Synthesestrategie ein weiteres Mal geändert.

5.7.6 Weitere Versuche zur Verknüpfung der Bausteine über reduktive Aminierung

Unter der Prämisse, wenigstens ein Derivat der angestrebten Verbindung **166** herzustellen, das anstelle des Pyridinrings einen Benzolring trägt, wurden noch einmal literaturbekannte Bedingungen einer reduktiven Aminierung des 1*H*-Imidazol-4-carbaldehyds (**174**) getestet. Bei der von STALDER *et al.* in einem Patent beschriebenen Reaktion wurde

3-Aminobenzonitril (**196**) als Amin-Komponente verwendet und nach Bildung des Imins mit dem 1*H*-Imidazol-4-carbaldehyd (**174**) mit Natriumborhydrid reduziert.¹⁵⁴ Diese Reaktion konnte ohne Probleme reproduziert werden und zudem auf das 3-Aminobenzamid (**198**) übertragen werden.

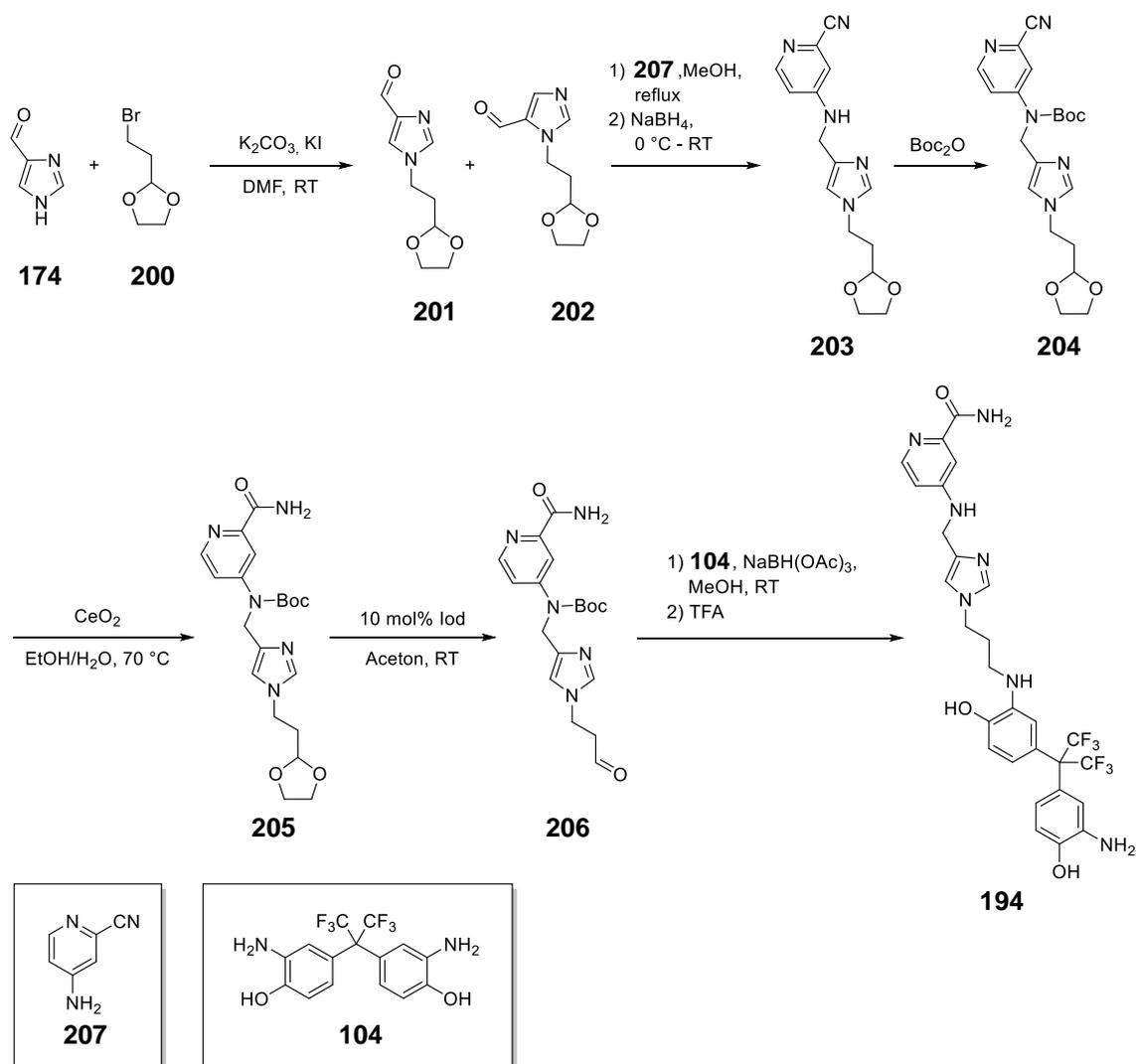


Schema 21: Reproduktion der literaturbekannten Aminierungsreaktion zwischen 3-Aminobenzonitril (**196**) und dem Imidazolcarbaldehyd **174** und deren Übertragung auf das 3-Aminobenzamid (**198**).

5.7.7 *Konkretisierung der Synthesepaltung*

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine erneute Recherche zur Synthese des Second-Site-Liganden **194** durchgeführt. In der resultierenden neuen Synthesepaltung sollte die Verknüpfung des Imidazol-Bausteins mit dem BPNH₂ über eine reduktive Aminierung erfolgen (**Schema 22**), da diese effizienter sein sollte als eine Monoalkylierung einer der BPNH₂-Anilinfunktionen. Daher wurde der 1*H*-Imidazol-4-carbaldehyd (**174**) mit einer Alkylkette versehen, die in der entsprechenden Position ein Acetal trug, das nach Entschützung den gewünschten Aldehyd freigeben würde. Für die Anwendbarkeit dieses Derivates musste eine Methode gefunden werden, das Nitril unter entsprechend schutzgruppenfreundlichen Bedingungen zum Carboxamid zu hydrolysieren. Klassische Methoden verwenden saure Bedingungen für diese Hydrolyse, wobei vor allem HCl, H₂SO₄ und andere anorganische Säuren gebräuchlich sind. Zusätzlich zu der sauren

Acetalspaltung kann bei diesen Reaktionen schnell eine Überhydrolyse zur Carbonsäure stattfinden. Daher wurde diese Option ausgeschlossen. Auch homogene Metallkomplex-Katalyse wird eingesetzt, um Nitrilverbindungen zu Carbonsäureamiden zu hydrolysieren. Die Katalysatoren sind aber schwer abzutrennen und können durch koordinierende Gruppen (wie Pyridine und Imidazole) leicht vergiftet werden.^{155,156}



Scheme 22: Synthesepanung für Verbindung **194** nach erneuter Recherche, wobei von der Verknüpfung von Imidazol- und Pyridin-Baustein über eine reduktive Aminierung ausgegangen wurde.

Für die Hydrolyse von 4-Aminopicolinonitril (**207**) und verwandten Strukturen sind laut Literatur Reaktionen bekannt, bei denen Wasserstoffperoxid in Kombination mit einer

Base eingesetzt wird.^{157,158} Dies ist für Benzonitrile eine sehr milde und recht selektive Methode der Nitrilhydrolyse, sollte bei Pyridinen jedoch zur Bildung von *N*-Oxiden führen.¹⁵⁹ Dies würde mit einer entsprechend erforderlichen Reduktion des *N*-Oxids einen weiteren Syntheseschritt bedeuten.

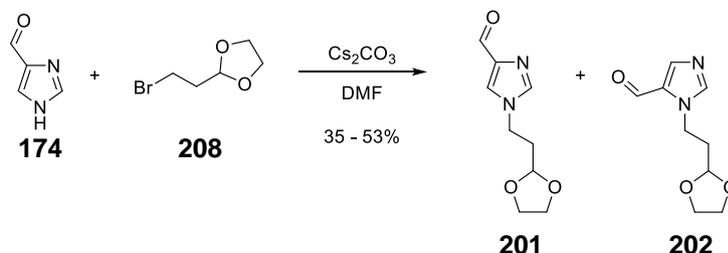
Weiterhin werden Metalloxide für eine heterogene Katalyse dieser Reaktionen eingesetzt. Zu finden ist dabei auch die bereits eigens für die Synthese des 4-Nitropyridincarboxamids (**172**) angewandte Methode der Hydrolyse über CeO₂-Katalyse.¹⁵⁶ Diese hat eine deutliche Selektivität gegenüber Heterozyklen mit Nitrilsubstituenten in 2-Position zum Heteroatom, da das Heteroatom für eine Vorkoordination an der Oberfläche des heterogenen Katalysators benötigt wird und das formal übertragene Wasser laut Mechanismusvorschlag im anschließenden Schritt von der Oberfläche aus übertragen wird.

Für die spätere Spaltung des Dioxolans des geschützten Aldehyds **205**, wurde eine sehr milde Methode gewählt. Bei dieser Methode ist die Acetalspaltung mit elementarem Iod möglich, das eine Transferreaktion mit dem als Lösungsmittel verwendeten Aceton katalysiert.¹⁶⁰ Für die Entschützung ist alternativ auch eine Methode mit TES-Triflat und 2,6-Lutidin oder auch Collidin anwendbar. Diese ist so selektiv, dass Acetale sogar trotz der sonst schwierigen Diskriminierung vor Ketalen gespalten werden.¹⁶¹

5.7.8 Erste Synthesen nach der neuen Route scheitern

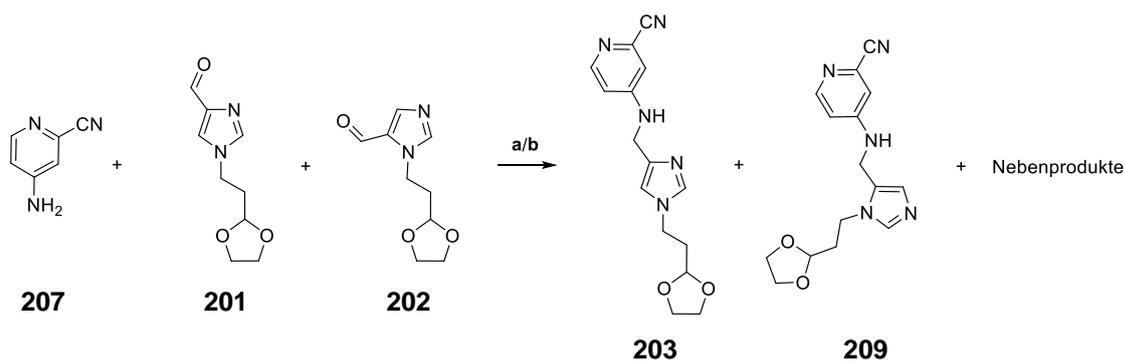
Die bei der erneuten Alkylierung des 1*H*-Imidazol-4-carbaldehyds (**174**) erhaltenen Regioisomere konnten nur sehr schwer voneinander getrennt werden, da das für die benzylgeschützten Derivate **181/182** verwendete Lösungsmittel aufgrund der wässrigen Essigsäure im Gemisch nicht verwendet werden konnte. Stattdessen bewährte sich für eine Antrennung der Isomere ein Lösungsmittelgemisch, dem wässrige Ammoniak-Lösung zugesetzt wurde. Das üblicherweise als Basenzusatz verwendete Triethylamin eignete sich

in diesem Fall nicht. Die erhaltene Menge der reinen Isomere war zu gering für eine synthetische Anwendbarkeit dieser Trennmethode, machte es aber möglich, dass beide Verbindungen vollumfänglich charakterisiert werden konnten.



Schema 23: Alkylierung des 1*H*-Imidazol-4-carbaldehyds (**174**) mit 2-(2-Bromoethyl)-1,3-dioxolan (**208**).

In den Testreaktionen zur reduktiven Aminierung wurde somit das Gemisch der Regioisomere eingesetzt. Die reduktive Aminierung wurde zunächst nach der Methode von STALDER *et al.*¹⁵⁴ durchgeführt, die vor Planung der Syntheseroute bereits für verwandte Derivate getestet worden war. Im Anschluss wurde als weniger reaktives Reduktionsmittel Natriumcyanoborhydrid anstelle des Natriumborhydrids eingesetzt. Dennoch wurde in beiden Fällen die Bildung eines komplexen Produktgemisches beobachtet (**Schema 24**). Dabei wurden sowohl die gewünschte Produktmasse als auch die korrespondierenden Alkohole und das 4-Aminopicolinonitril (**207**) im Reaktionsgemisch nachgewiesen.



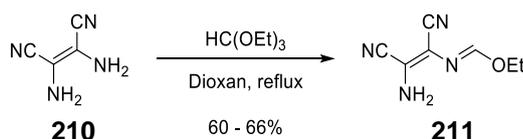
a) 1) MeOH, 60 °C 2) NaBH₄; b) Na(CN)BH₃, MeOH, reflux.

Schema 24: Erste Versuche zur reduktiven Aminierung des acetalgeschützten Imidazol-Bausteins und 4-Aminopicolinonitril unter Entstehung nicht abtrennbarer Nebenprodukte.

Da die Verbindungen sich in ihrem Retentionsverhalten in verschiedensten Laufmittelgemischen kaum unterschieden, war eine Trennung nicht möglich.

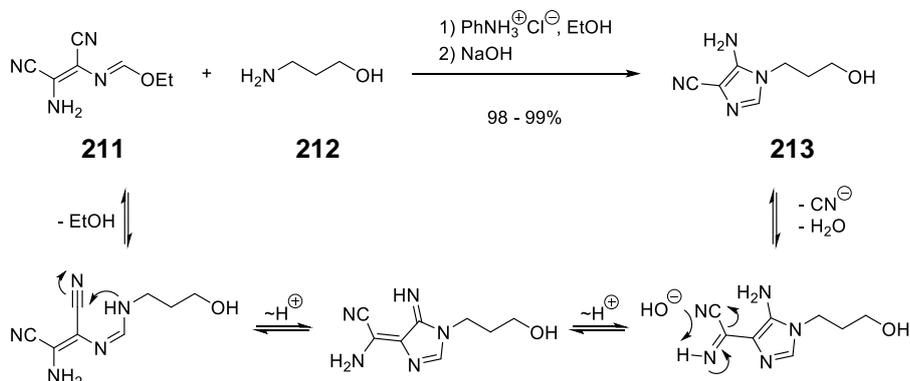
In einem nächsten Schritt wurde nun versucht, den 1,4-substituierten Imidazolcarbaldehyd **201** regioselektiv herzustellen, mit dem Ziel, die Nebenprodukte des ungewünschten Regioisomers zu vermeiden und auf diese Weise das Trennproblem zu vereinfachen. Hierfür wurde eine ringaufbauende Imidazolsynthese gewählt, die von Diaminomalonitril und einem entsprechenden Amin ausgeht und zum entsprechenden 5-Aminoimidazol-4-carbonitril führt. Durch eine anschließende reduktive Deaminierung mit Isoamylnitrit wird dann das entsprechende Nitril-Derivat von Verbindung **201** erhalten.

Nach einer Vorschrift von SUN *et al.* wurde zunächst das Formimidat **211** aus Diaminomalonitril (**210**) durch Kondensation mit Triethylorthoformiat hergestellt.¹⁶²



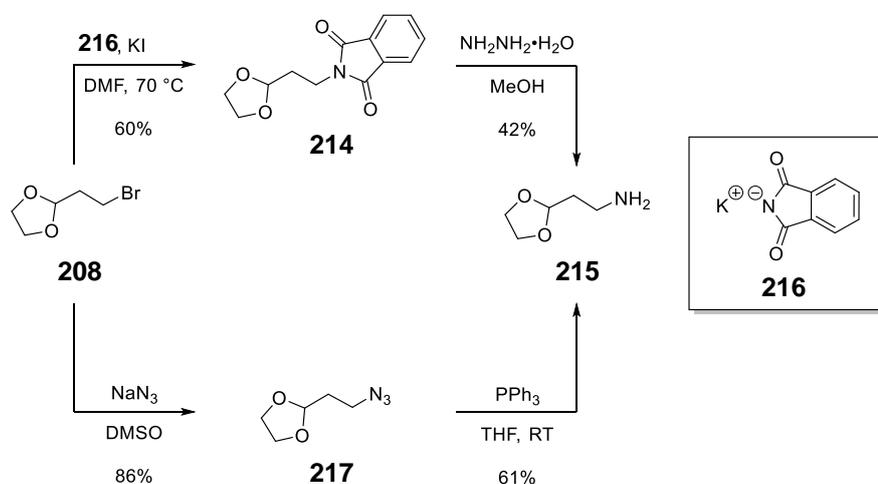
Schema 25: Synthese des Formimidats **211** als Baustein für die regioselektive Synthese des Imidazol-Bausteins.

Der anschließende Ringschluss mit 3-Aminopropanol (**212**) zum Imidazolcarbonitril **213** wurde ebenfalls gemäß der Veröffentlichung von SUN *et al.* durchgeführt, wobei der zugrundeliegende Mechanismus in **Schema 26** dargestellt ist.¹⁶²



Schema 26: Darstellung der Synthese von Carbonitril **213** und des zugrundeliegenden Mechanismus des Ringschlusses.

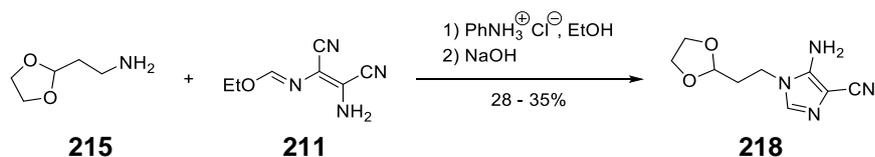
Da diese Umsetzung problemlos durchzuführen war, wurde das Amin **215** hergestellt, um ein Derivat des Imidazolcarbonitrils **213** zu erhalten, welches statt der Hydroxygruppe das Acetal trägt und somit leicht in einen Aldehyd überführt werden kann. Die Synthese von Amin **215** wurde über zwei Wege durchgeführt, wobei die GABRIEL-Synthese im ersten Versuch deutlich weniger erfolgreich verlief als die Synthese über eine STAUDINGER-Reduktion nach einer Vorschrift von GRIBBLE *et al.*¹⁶³ Vor allem die Hydrazinolyse des Phthalimids **214** nach einer Vorschrift von BOSCH *et al.* führte zu Ausbeuteverlusten.¹⁶⁴



Schema 27: Synthese des Amins **215** über die GABRIEL-Synthese (oben) und eine STAUDINGER-Reaktion (unten).

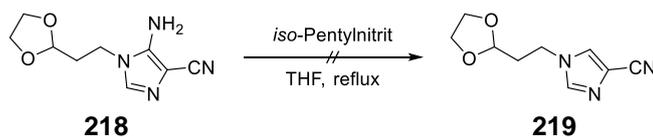
Das für die STAUDINGER-Reaktion benötigte Azid **217** konnte weder über ESI oder APCI ionisiert werden. Sowohl die NMR-Spektren als auch das IR-Spektrum stimmen jedoch mit der Literatur überein.¹⁶³ Da in der STAUDINGER-Reaktion das gewünschte Amin entstand, kann davon ausgegangen werden, dass das richtige Azid gebildet worden war.

Der anschließende Ringschluss konnte ohne Probleme durchgeführt werden, wobei jedoch eine Säulenchromatographie nötig wurde, die zu Ausbeuteverlusten aufgrund der starken Wechselwirkung der Imidazole mit dem Kieselgel führte.



Schema 28: Synthese des Imidazolcarbonitrils **218** als Zwischenstufe für das gewünschte Imidazol-Derivat.

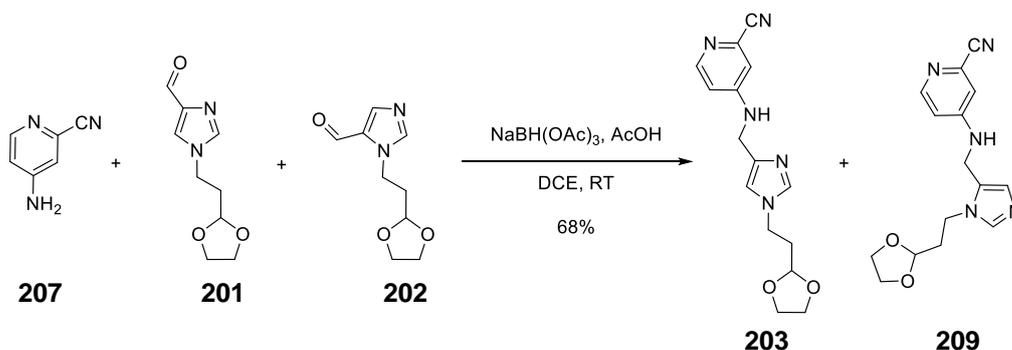
Obwohl auf strikten Feuchtigkeitsausschluss geachtet wurde, konnte bei der Durchführung der reduktiven Hydrodeaminierung nach Vorschrift von CRISTALLI *et al.*¹⁶⁵ das gewünschte Produkt nicht nachgewiesen werden. Stattdessen wurde die Molekülmasse und im ¹H-NMR-Spektrum passende Signale des entsprechenden Carboxamids nachgewiesen. Das Produkt wurde aufgrund weiterer im Folgenden beschriebenen Ergebnisse nicht weiter aufgereinigt.



Schema 29: Versuch der reduktiven Deaminierung von Imidazolderivat **218**.

5.7.9 Erfolgreiche Synthese von Verbindung 166

Da parallel zu den späteren Versuchen der regioselektiven Imidazolsynthese ein weiteres Experiment zur reduktiven Aminierung des Regioisomerengemisches des acetalgeschützten Imidazolbausteins durchgeführt wurde und erfolgreich war, wurden weitere Experimente zur reduktiven Deaminierung nicht mehr durchgeführt. Beim Einsatz eines Überschusses an Natriumtriacetoxyborhydrid und Essigsäure nach der allgemeinen Vorschrift von ABDEL-MAGID *et al.* erfolgte nun nicht mehr die Reduktion der Aldehyde **201** und **202**.¹⁶⁶ Stattdessen war das Natriumtriacetoxaborhydrid tatsächlich in der Lage selektiv nur das gebildete Imin zu reduzieren.

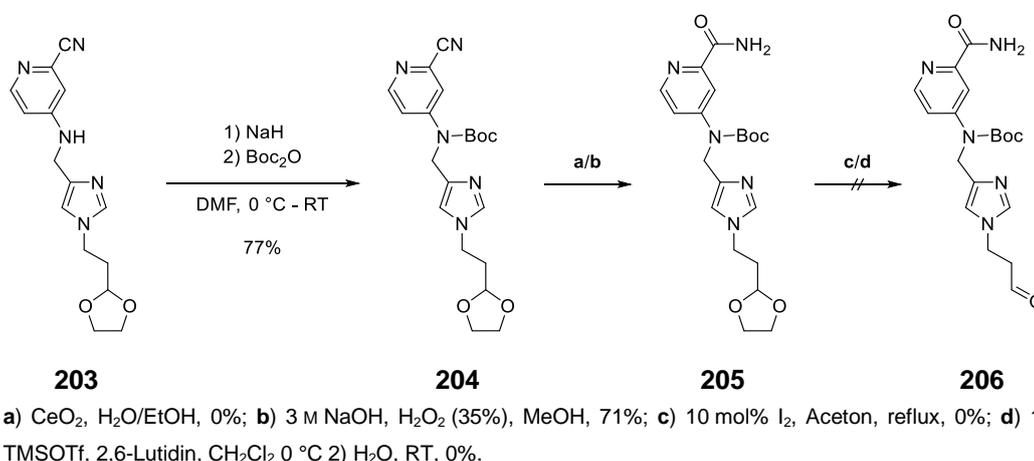


Schema 30: Erfolgreicher Versuch zur reduktiven Aminierung des acetalgeschützten Imidazol-Bausteins und 4-Aminopicolinonitril (**207**) unter Entstehung nicht abtrennbarer Nebenprodukte.

Die in **Schema 30** angegebene Ausbeute bezieht sich dabei nur auf das gewünschte Derivat **203**, da nur dieses einen deutlich differenzierten Retentionsfaktor aufwies, als die Edukte und somit gut abzutrennen war. Das erhaltene Produkt wurde dem Syntheseplan entsprechend mit Hilfe von Natriumhydrid als Base nach einer Vorschrift von PAWAR *et al.* mit der Boc-Schutzgruppe versehen.¹⁶⁷ Die darauffolgende Hydrolyse des daraus entstandenen Carbonitrils **204** sollte zunächst plangemäß über die Cer(IV)oxid-katalysierte Methode nach TAMURA *et al.* erfolgen, wobei jedoch kein Umsatz des Eduktes festzustellen war.¹⁴⁴ Daher wurde der riskante Weg einer Hydrolyse mit Wasserstoffperoxid gewählt. Mit Hilfe von Dünnschichtchromatographien und einem Massenspektrometer wurde der Umsatz des Eduktes in einer Testreaktion verfolgt. So wurde festgestellt, dass

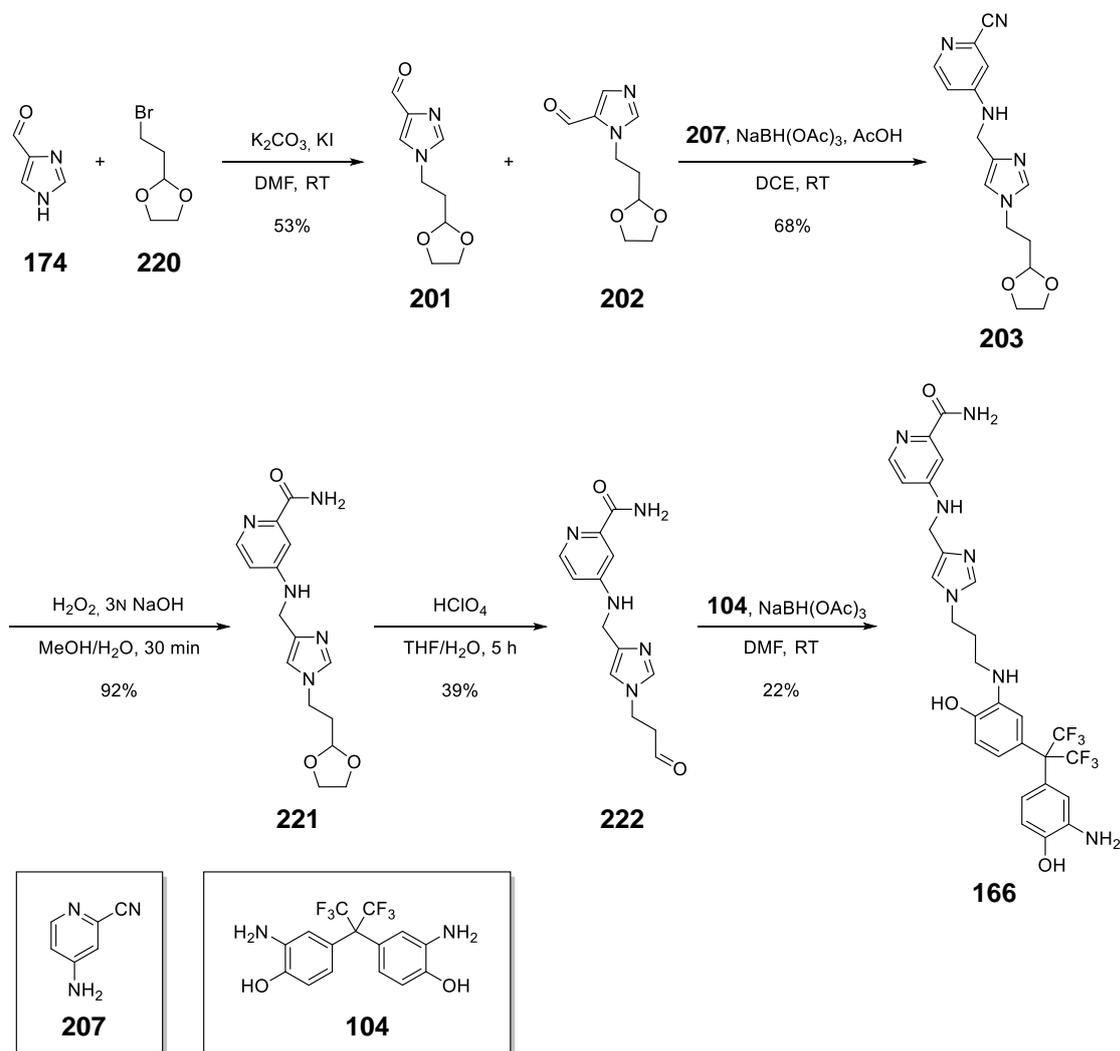
sich bei einer Rührzeit über 30 Minuten ein Peroxid der hydrolysierten Verbindung bildete. Wurde die Reaktion rechtzeitig gestoppt, wurde das Carboxamid **205** mit ausreichenden Ausbeuten erhalten.

Der nächste Schritt, die Acetalspaltung, wurde mit den zwei recherchierten Methoden getestet. Sowohl die Iod-katalysierte Transferacetalisierung nach einer Vorschrift von HU *et al.* als auch die Spaltung mit Lutidin und einem Trialkylsilyltriflat nach der Vorschrift von FUJIOKA *et al.* führten jedoch nie zur Entschützung des Acetals.^{160,161} Stattdessen wurden Gemische anderer Produkte erhalten.



Schema 31: Versuch der Synthese des Aldehyd-Bausteins, der nach reduktiver Aminierung mit BPNH₂ und darauffolgender Entschützung die Verbindung **166** geben sollte.

Da die nächste Methode, die für die Acetalspaltung getestet werden sollte, säurekatalysiert war, wurde die Nitrilhydrolyse des Carbonitrils **203** ohne vorherige Boc-Schützung getestet. Auch hier war die Hydrolyse vor einem Entstehen des entsprechenden Peroxids möglich. Für die Spaltung des Acetals wurde eine Methode von ZDERIC und LIMON gewählt.¹⁶⁸ Als Säurekatalysator diente dabei 70%ige Perchlorsäure. Diesmal konnte der Aldehyd **222** massenspektrometrisch nachgewiesen und auch säulenchromatographisch gereinigt werden.



Schema 32: Finale Synthese des Second-Site-Liganden **194**.

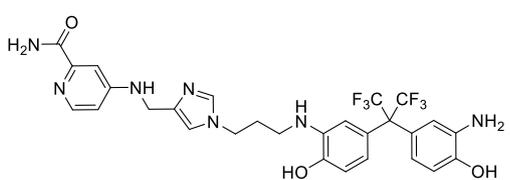
Leider wurde jedoch im NMR-Spektrum ein Zerfall deutlich, weshalb der Aldehyd nach einer zweiten Umsetzung sofort nach der Chromatographie mit dem BPNH₂ umgesetzt wurde. Diese reduktive Aminierung musste aufgrund der Löslichkeiten in DMF durchgeführt werden, nachdem ein erster Versuch mit DCE als Lösungsmittel gescheitert war. Dennoch konnte die Zielverbindung **166** letztendlich isoliert werden (**Schema 32**). Das ¹H-NMR-Spektrum der Verbindung weist sehr breite Signale auf, was am verwendeten protischen Lösungsmittel MeOH liegt. Dieses war das einzige NMR-Lösungsmittel, in dem sich die Substanz löste und das gut zu evaporieren ist. Bei einer Nachsynthese müsste

dieses NMR-Spektrum noch einmal unter Verwendung von DMSO-*d*₆ aufgenommen werden.

5.7.10 *Diskussion der biochemischen Daten*

Die durch die sehr negativen Docking-Scores suggerierte starke Bindung von Verbindung **166** an *K*-RAS blieb aus. Sowohl in der NMR-Untersuchung, als auch im RAS-SOS-Austauschassay setzt sie stattdessen die Reihe der alkylierten BPNH₂-Derivate fort, indem die Werte durch den noch größeren Substituenten weiter verschlechtert werden (**Tabelle 22**).

Tabelle 22: Darstellung der bisher erhobenen biochemischen Messdaten für Verbindung **166** aus dem NMR-Experiment und dem RAS-SOS-Austauschassay.

 166	Biochemische Daten		
	K_D [mM] ¹ H- ¹⁵ N- HSQC	IC₅₀ [μM] RAS-SOS-Austausch- Assay	
		WT (GDP)	WT
	2.6 ± 0.2	1323	563

Im ¹H-¹⁵N-HSQC-Spektrum erreicht die Verbindung erst bei einem fünfzehnfachen Überschuss in Bezug auf die Proteinkonzentration eine Sättigung für die Verschiebung der Aminosäureresonanzen, während für das freie BPNH₂ ein fünffacher Überschuss ausreichend ist. Die durch Zugabe der Verbindung **166** entstehenden Veränderungen im Spektrum ähneln denen, die bei der Titration von BPNH₂ zu beobachten sind (vgl. **Abbildung 70**). Diese Änderungen sind aber für Verbindung **166** deutlich kleiner. Insgesamt resultiert ein deutlich höherer *K_D*-Wert für den erweiterten Liganden im Vergleich zum BPNH₂ (*K_D* = 0.4 mM).

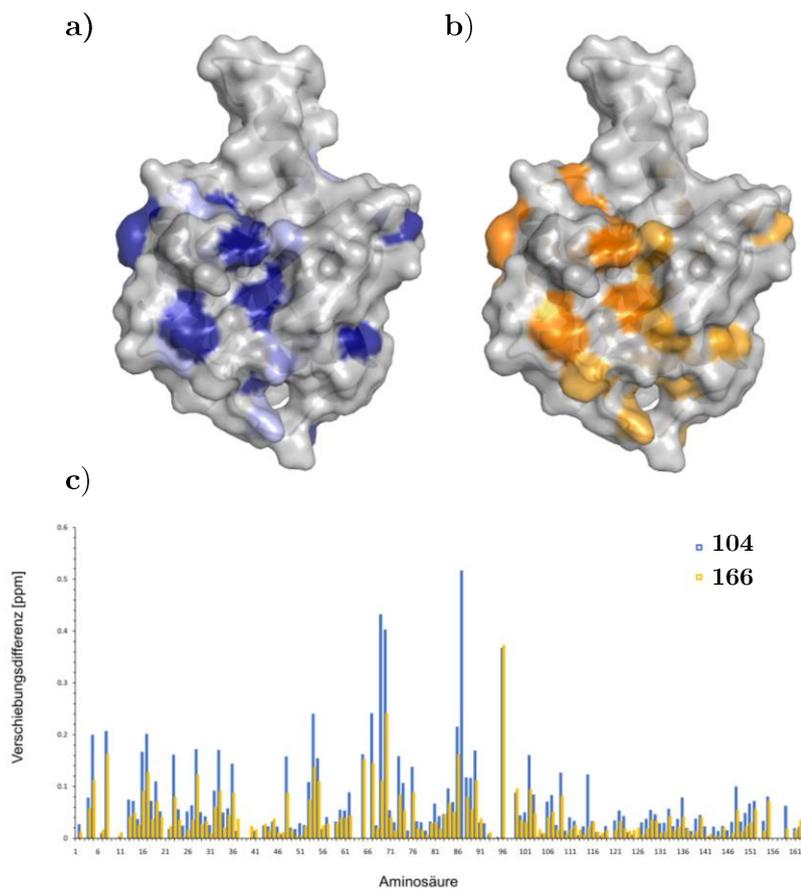


Abbildung 70: Vergleich der Verschiebungen von Aminosäureresonanzen von *K*-RAS bei Assoziation von a) BPNH₂ (**104**) und b) Verbindung **166** (an PDB:4DSO) und die dazugehörigen Balkendiagramme der im NMR-Experiment ermittelten Resonanzverschiebungen (c).

Auch für diese Verbindung wurde mit Hilfe der Aminosäureverschiebungen und der Software Haddock 2.4 Modelle für die Bindung dieses Liganden an GDP-gebundenes *K*-RAS4B erstellt. Erhalten wurden dabei verschiedenste Cluster, wobei auch der energiegünstigste Cluster eine andere Bindungssituation vorgibt, als beim Docking mit der Schrödinger-Software ermittelt wurde. Zwar liegt ein Teil der Verbindung für diesen Cluster in der SI/II-Bindestelle, jedoch entspricht dieser Teil nicht dem BPNH₂-Baustein. Eine Aussage zum tatsächlichen Bindungsmodus kann mit Hilfe der Haddock-Rechnung kaum getroffen werden. Hierfür existieren zu viele unterschiedliche Cluster, deren zugehörige Parameter (wie die Zahl der Clustermittglieder oder die Höhe der RVE) auch keine Hinweise auf den wahrscheinlichsten Protein-Ligand-Komplex bieten.

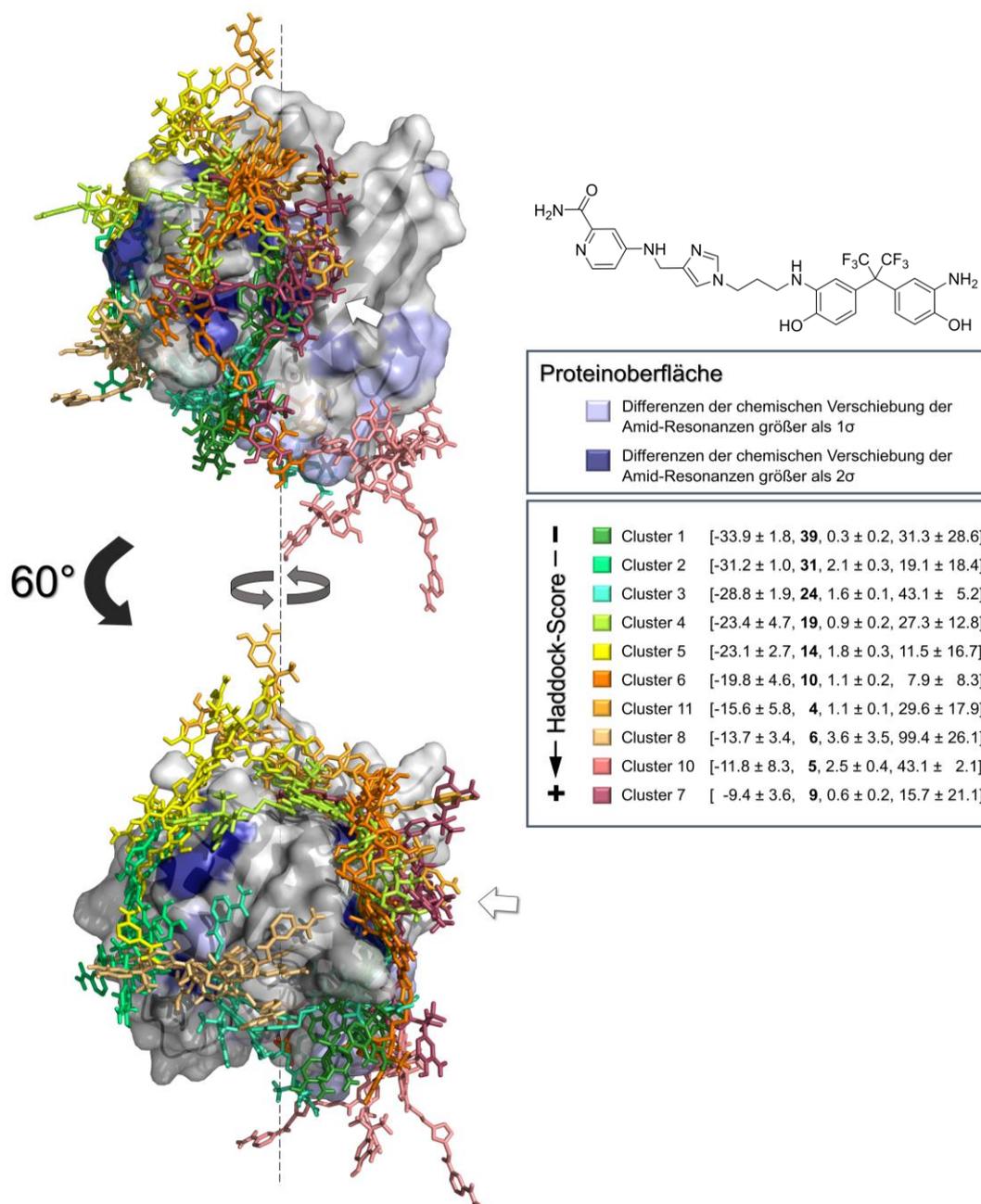


Abbildung 71: Darstellung der durch Haddock 2.4 unter Berücksichtigung der NMR-Restraints berechneten Cluster für die Bindung der Carbonylverbindung **166** an GDP-gebundenes *K*-RAS4B^{WT} (PDB:6MBT); dabei [Haddock-Score, **Zahl der Clustermitglieder**, RMSD-Wert, RVE]; der weiße Pfeil kennzeichnet die Lage der SI/II-Bindestelle.

Vergleicht man die Strukturen der *in silico* erzeugten Verbindungen (**Abbildung 72**) mit verschiedenen Rechnungen für das BPNH₂ (**Abbildung 73**), so erkennt man eine gute Übereinstimmung der Lage des BPNH₂-Bausteins für die beiden ersten Liganden-

Generationen (**Abbildung 72**, links und mittig) mit der Pose, die für die erweiterte Bindestelle der 4EPY-Kristallstruktur berechnet wurde.

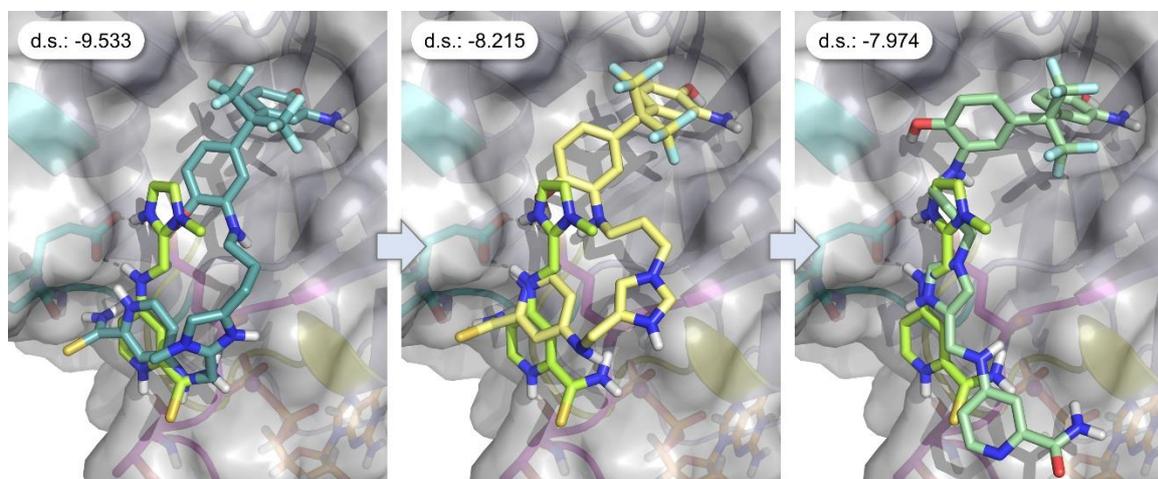


Abbildung 72: Darstellung der günstigsten Posen für drei Stufen der *in silico* Suche; von links nach rechts: Verbindungen **164**, **165** und **166** jeweils zusammen mit dem zugrundeliegenden Basenfragment.

Diese Pose unterscheidet sich jedoch von der Pose, die von Mitarbeitern des Arbeitskreises STOLL über Haddock bestimmt wurde. Diese Haddock-Rechnungen wurden mit der Kristallstruktur 4DSO durchgeführt, in der ein GTP-Derivat gebunden ist, während die zugrundeliegende NMR-Untersuchung an GDP-gebundenem *K*-RAS durchgeführt wurde. Die 4EPY-Kristallstruktur liegt hingegen in der inaktiven Form vor und sollte daher geeigneter sein, den Bindungsmodus vorherzusagen, der dem NMR-Experiment entspricht.

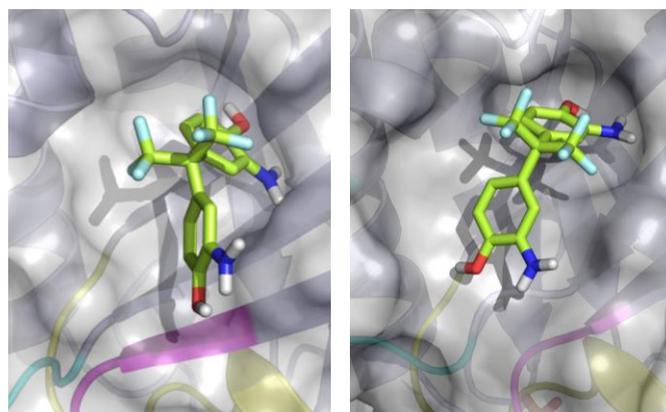


Abbildung 73: Vergleich zwischen Haddock-Struktur (PDB:4DSO) (links) und der durch Docking mit der Schrödinger-Software erhaltenen Pose für die erweiterte Bindestelle (PDB:4EPY) (rechts).

Für die dritte und final synthetisierte Liganden-Generation weicht die über Schrödinger berechnete Pose des BPNH₂-Bausteins aber deutlich von beiden Posen des BPNH₂ ab. Zusammen mit der Tatsache, dass der Alkyllinker durch den entropischen Effekt zu einem Verlust von Affinität führt, könnte das die unerwartet schlechte Affinität des Liganden erklären. Allerdings sprechen die NMR-Ergebnisse gegen eine große Variation der BPNH₂-Lage, da die Änderung der Resonanzen für die gleichen Aminosäuren in Erscheinung tritt wie bei freiem BPNH₂ (vgl. **Abbildung 70**). Vielmehr spricht das Fehlen zusätzlicher Veränderungen im Spektrum dafür, dass der angefügte Molekülteil zu keiner weiteren Assoziation beiträgt. Dieses Ergebnis wurde durch Studien an Fragmenten dieses Molekülteils verifiziert. Dabei band keines der Derivate an *K*-RAS4B.

Daraus folgt, dass in diesem Fall vermutlich die Grenzen des Molecular Modelling erreicht wurden. Problematisch könnte dabei die hohe Polarität des Bausteins sein, um den das BPNH₂ erweitert wurde. Solche Moleküle sind in wässriger Umgebung von einer Hydrathülle umgeben, die für eine Bindung am Protein aufgebrochen werden muss. Diese Desolvatation benötigt Energie, die bei Assoziation des Liganden verloren geht. Weiterhin ist die Berücksichtigung von wasservermittelten Bindungen am Protein bei der computergestützten Wirkstoffsuche problematisch. Der ursprüngliche FESIK-Ligand aus der 4EPY-Kristallstruktur bindet über wasservermittelte Wasserstoffbrücken in der erweiterten Bindestelle, während diese Möglichkeit in den *in silico* Rechnungen für den erweiterten BPNH₂-Liganden nicht berücksichtigt wurde. Da Solvatationseffekte und die Rolle von Wasser bei der Bindung an das Protein so schwer zu berechnen sind, stellen sie eine klare Grenze des *in silico* Designs von Wirkstoffen dar.

5.8 Synthese von intermolekularen Second-Site-Liganden

Eine der Zielsetzungen des Projektes war es, die Wirkung von Liganden durch die Adressierung einer zweiten Bindestelle zu verbessern. Neben der Synthese des Second-Site-Liganden **166** mit Erweiterung des BPNH₂, sollte ein neuerer Ansatz der medizinischen Chemie getestet werden. Dabei sollte ein *K*-RAS-Ligand mit einem zweiten Liganden für ein anderes Protein zu einem sogenannten PROTAC (Proteolysis targeting Chimera) verbunden werden.

5.8.1 Die Idee hinter PROTACs

Allgemein wird unter dem Konzept der PROTACs die Verknüpfung eines Liganden des entsprechenden POIs (Protein of interest) mit einem zweiten Liganden über ein Linkerelement verstanden, wobei der zweite Ligand den Abbau des POIs im Proteasom initialisiert. Der Hauptvorteil dieses Konzeptes liegt darin, dass der Ligand für das POI kein kompetitiver Inhibitor sein muss. Stattdessen muss er eine allosterische Wechselwirkung eingehen, die ausreichend selektiv ist, um ausschließlich den proteasomalen Abbau des POIs zu induzieren. An dieser Stelle kommt ein zweiter Vorteil zum Tragen, da durch die Linkerlänge und die Art der Abbauinitiation eine weitere Selektivitätsebene eingeführt wird. Das Ziel des Konzeptes ist es, die Inhibition durch den für den PROTAC verwendeten Wirkstoff über den Abbau des Proteins deutlich zu verstärken. Dadurch eignet es sich gerade für Inhibitoren von PPIs, da diese als Ligand oft geringe Inhibitonseffekte hervorrufen.

Für die Art der Abbauinitiation gibt es verschiedene Strategien und Liganden, die an einen PROTAC angebracht werden können. Dabei kann der Ligand des POI beispielsweise einen Admantlylrest tragen (Bsp. Ligand **223**), der in der Zelle als denaturiertes Element des Proteins erkannt wird. Dies geschieht durch die Chaperon-Proteine, welche dann in der Lage sind, das POI als Substrat der E3-Ligase zu kennzeichnen. Die Aufgabe solcher

Ligasen ist die Ubiquitinierung. Auf diesem Weg werden in der Zelle Proteine markiert, die vom Proteasom abgebaut werden sollen. Die Übertragung der Ubiquitinreste erfolgt, sobald die Ligase in die räumliche Nähe des Substratproteins gelangt. Somit wird das Protein, welches im Komplex mit dem Liganden vorliegt, der mit dem Adamantylrest versehen ist, ubiquitiniert und somit vom Proteasom als abzubauen Protein erkannt.

Die Herbeiführung der Ubiquitinierung ist auch auf direkterem Wege zu erreichen. Beispielsweise kann ein Ligand der VHL-Ligase (Van-Hippel-Lindau-Ligase), die zu den E3-Ligasen gehört, an den Liganden des POIs angeheftet werden (Bsp. Ligand **224**). Somit müssen nicht zunächst Chaperon-Proteine eingreifen, um die Ubiquitinierung einzuleiten. Stattdessen werden die Ubiquitinreste durch die Nähe von Ligase und POI übertragen, wodurch das POI in der Folge vom Proteasom abgebaut wird.

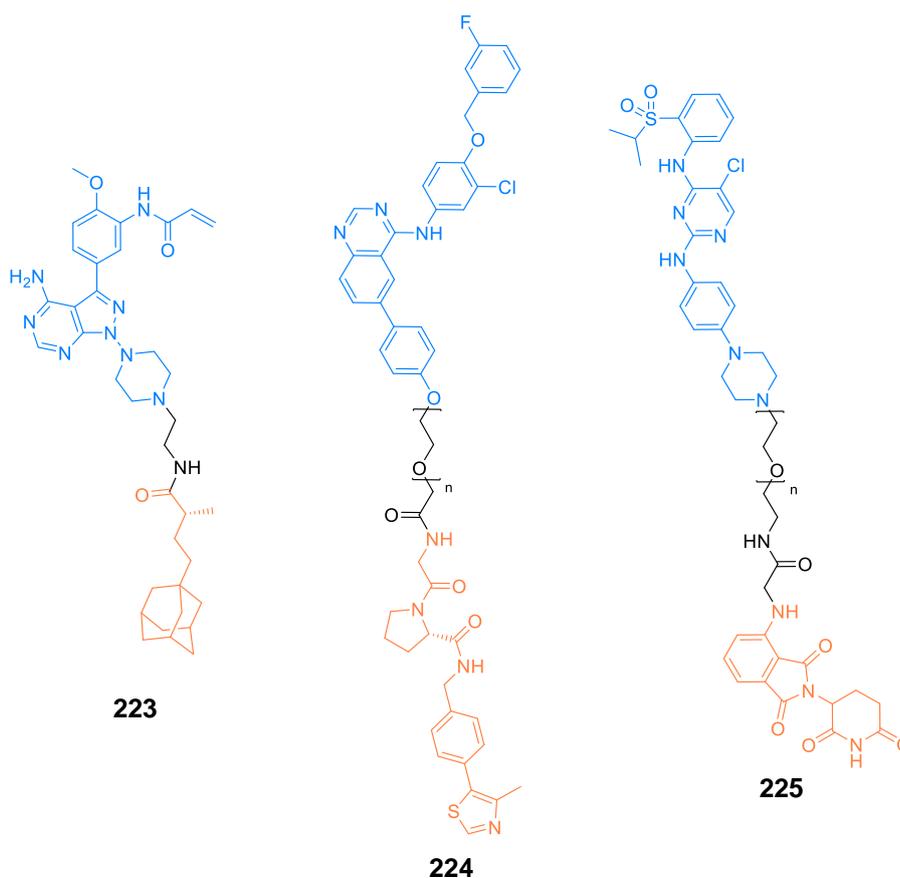


Abbildung 74: Beispielhafte Darstellung einiger PROTAC-Strukturen mit den Liganden von gewissen POIs (blau) und Liganden von Proteinen, die den proteasomalen Abbau herbeiführen können (orange).

Eine wieder etwas indirektere Adressierung einer Ubiquitin-Ligase kann durch Verwendung von Thalidomid-Derivaten als zweiter Ligand erzielt werden (Bsp. Ligand **225**). Diese fungieren als Liganden des Cereblon-Proteins (CRBN), das an die substratbindende Untereinheit einer Ubiquitin-Ligase bindet. Dadurch wird die Ligase wiederum in die räumliche Nähe des POI gebracht. Nach Ubiquitinierung und Erkennung durch das Proteasom folgt somit der Abbau des POI.

Die drei beschriebenen Varianten der PROTACs haben den vollständigen Abbau des Proteins zur Folge, sodass dieses neu exprimiert werden muss. Das birgt in der Theorie einen weiteren Vorteil des PROTAC-Ansatzes. Durch den Abbau des Targetproteins wird der POI-bindende Teil des PROTACs wieder frei und kann in einem nächsten Zyklus zur Proteolyse eines weiteren POI-Moleküls führen. Somit kann der PROTAC theoretisch in substöchiometrischen Mengen eingesetzt werden, die durch die Lebensdauer und die Affinitäten des PROTAC-Konstruktes bestimmt sind.

Das größte Problem der PROTACs ist, dass es sich um ein weitgehend empirisches Konzept handelt, da nicht feststeht, welcher Modus des Proteinabbaus für das entsprechende POI der Richtige ist und mit welcher Distanz die beiden Proteine die besten Wechselwirkungen eingehen. Somit müssen sowohl die Linkerlänge als auch der Ligand, der für die Proteolyse des POIs zuständig ist, variiert werden.^{169,170}

5.8.2 Auswahl der Liganden für den PROTAC-Ansatz

Da die Affinitäten der bis zum Zeitpunkt des Einstiegs in das Thema getesteten Verbindungen aus eigener Synthese nur im millimolaren Bereich lagen, wurden entsprechend affine Literaturverbindungen ausgewählt, die für erste Experimente zum PROTAC-Design für *K-RAS* geeignet sein sollten. Dabei waren schon zu diesem Zeitpunkt die kovalenten Liganden **72** und **75** der SII-Bindestelle die wirksamsten Verbindungen für die Inhibition von *K-RAS*.

Die wenigen literaturbekannten PROTACs für RAS-Proteine basieren ausschließlich auf diesen kovalenten Inhibitoren.^{171,172} Der Wirksamkeit dieser Liganden liegt jedoch ein Mechanismus zugrunde,⁸³ der die Anwendung auf das PROTAC-Konzept überflüssig macht. Durch die kovalente Modifikation wird das Protein bereits auf Dauer inaktiviert und muss somit nicht mehr abgebaut werden. Außerdem wird der katalytische Effekt der PROTACs durch die kovalente Bindung vollständig negiert.

Da zudem der Fokus des Projektes auf der SI/II-Bindestelle lag, kamen nun noch die Liganden von RABBITS *et al.*, FESIK *et al.* und GORFE *et al.* in Frage. Dabei war der GORFE-Ligand (**98**) gerade erst publiziert, weshalb dieser neben der Verbindung **86** von FESIK als Liganden für den PROTAC-Ansatz ausgewählt wurde. Die PROTACs für die Strukturen von RABBITS wurden hingegen in einer parallel durchgeführten Dissertation bearbeitet.

Für die Verknüpfung der beiden Liganden wurden die gängigen Ethylenglykol-Linker gewählt, die im Gegensatz zu den alternativen Alkyllinker weniger schnell einem hydrophoben Kollaps unterliegen. Die Kettenlänge von jeweils vier Ethylenglykoleinheiten wurde gewählt, da die Wechselwirkung beider Ligandenbausteine mit ihrem Targetprotein gewährleistet und der Linker somit nicht zu kurz sein sollte. Andererseits muss die Ligase trotzdem in eine ausreichende räumliche Nähe gebracht werden, damit der proteasomale Abbau des kleinen RAS-Proteins erfolgen kann.

5.8.3 Entwicklung eines PROTACs, der von der FESIK-Verbindung **86** abgeleitet wurde

Für den PROTAC-Ansatz wurde zunächst der FESIK-Ligand **86** gewählt, obwohl dieser mit einer Dissoziationskonstante von 340 μM schlechter an *K*-RAS bindet als das Isoleucin-Derivat **85** mit einem $K_D = 190 \mu\text{M}$. Vorteil der Struktur ist zum einen die vorhandene Kristallstruktur, in der die möglichen Anknüpfungspunkte für ein entsprechendes Linkerfragment zu erkennen sind, und zum anderen die leichte Modifikation der Aminosäure zur Anbringung des Liganden. In der Kristallstruktur ist zu erkennen, dass die 4-Position des Prolins Raum für eine Anbringung des PROTACs bietet. Dazu passt das gut erhältliche Syntheseäquivalent des Boc-geschützten Hydroxyprolins. Wie in **Abbildung 75** gut zu erkennen ist, wäre ein entsprechendes *cis*-Derivat des Prolins in der PROTAC-Struktur günstiger. Bei einer derartigen Variation wäre der Substituent in Form des PROTAC-Linkers mehr dem Lösungsmittel zugewandt.

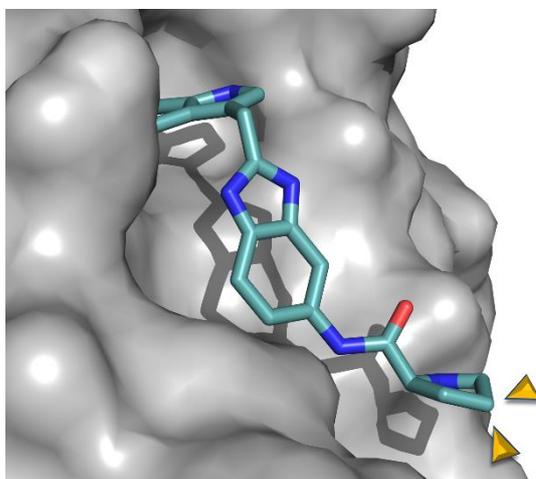
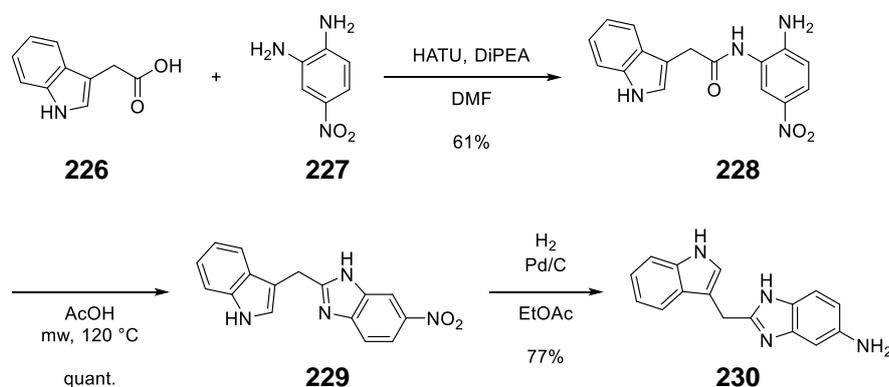


Abbildung 75: Abbildung des Fesik-Liganden **86** in der entsprechenden Kristallstruktur (PDB:4EPY), wobei die für eine Elongation geeignete Position mit gelben Pfeilen markiert ist.

Auch für dieses Molekül sollte aufgrund des hydrophileren Charakters ein Ethylenglykol-Linker mit einer Länge von vier Ethylenglykoleinheiten verwendet werden.

5.8.3.1 Synthese des FESIK-PROTACs

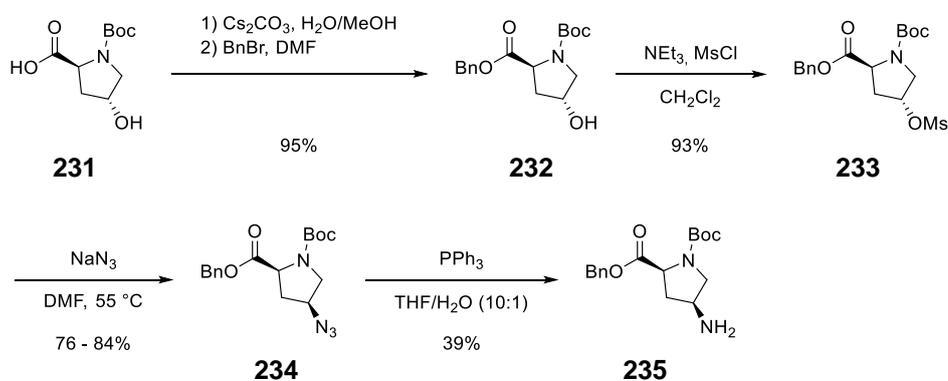
Die Synthese des Benzimidazol-Bausteins des Fesik-Liganden **86** erfolgte analog zu einer im Arbeitskreis bekannten Synthese, wobei im Unterschied zu der von FESIK *et al.* beschriebenen Synthese der Benzimidazolring nicht in einem Schritt aufgebaut wurde. Stattdessen wurde zunächst das Amid über eine klassische Peptidkuppplungsreaktion mit HATU gebildet, gereinigt und anschließend unter Mikrowellenstrahlung in Essigsäure kondensiert. Im Gegensatz zu vorherigen Durchführungen wurde die Aufreinigung des ersten Schrittes durch eine Umkristallisation gegenüber einer chromatographischen Trennung erleichtert. Nach der Kondensationsreaktion in Eisessig musste lediglich die Essigsäure entfernt werden, bevor das Produkt in sauberer Form isoliert wurde. Bei der Reduktion der Nitrogruppe war jedoch nach Entfernen des heterogenen Katalysators eine Säulenchromatographie nötig, da Nebenprodukte entstanden waren.



Schema 33: Synthese des Benzimidazol-Indol-Bausteins **230** für den FESIK-PROTAC.

Der Prolin-Baustein, der den Baustein **230** zum fertigen Derivat von FESIKS Verbindung **86** ergänzt, sollte vor der Amid-Kupplung mit dem Ethylenglykol-Linker versehen werden. Dafür wurde zunächst das Prolin-Derivat **235** synthetisiert, welches anschließend mit dem Ethylenglykol-Linker **238** zum Carbamat umgesetzt wurde (**Schema 36**).

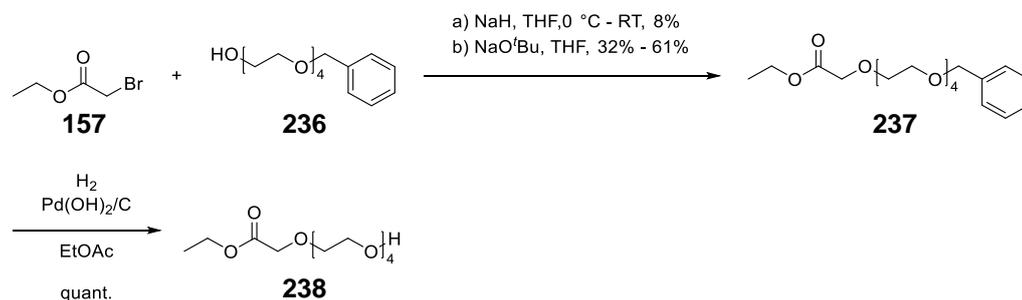
Bei der Synthese des Amins **235** wurde darauf geachtet, dass dieses *trans* zur Carbonsäurefunktion des L-Prolins steht. Die Umsetzung des freien Boc-Hydroxyprolins (**231**) zum entsprechenden Benzylester erfolgte analog zu einer Vorschrift von RAINES *et al.*, wobei als Base für eine vollständige Deprotonierung der Carbonsäure Caesiumcarbonat eingesetzt wurde.¹⁷³ Durch Anlegen eines Vakuums wurde das Gleichgewicht der Reaktion zügig auf die Seite des Caesiumcarboxylats verschoben. Das Carboxylat wurde anschließend in einem zweiten Lösungsmittel mit Benzylbromid alkyliert. Die restliche Synthese wurde einer Publikation von NATCHUS *et al.* nachempfunden.¹⁷⁴ Jedoch wurde statt der in der Veröffentlichung für den Methylester beschriebenen hydrogenolytischen Reduktion des Azids eine STAUDINGER-Reaktion durchgeführt, da unter den Bedingungen der Hydrogenolyse auch der Benzylester gespalten worden wäre. Die Bedingungen für diese STAUDINGER-Reaktion wurden einem Patent von NGUYEN *et al.* entnommen.¹⁷⁵



Schema 34: Synthese eines Amino-substituierten Prolin-Bausteins **235**.

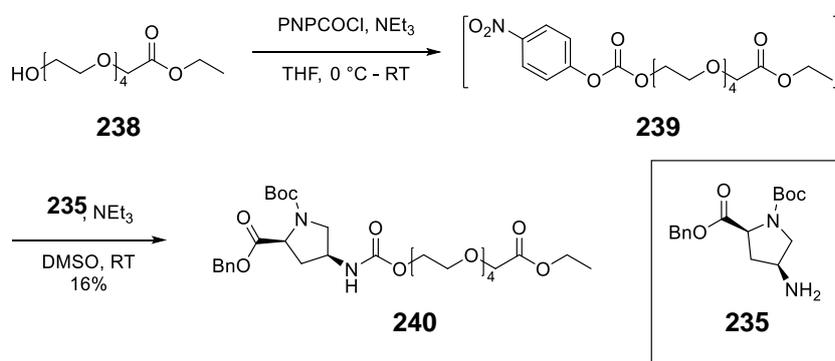
Da eine Alkylierung des Hydroxyprolin-Derivates **232**, die unter verschiedenen Bedingungen mit Tetraethylglykoldichlorid getestet wurde, nicht erfolgreich war, wurde ein einseitig mit einem Carbonsäureester versehenes Derivat des Tetraethylglykols synthetisiert (**Schema 35**). Die Alkylierung des käuflichen Tetraethylglykol-Monobenzylethers (**236**) erfolgte dabei zunächst nach einer Vorschrift von DU *et al.* mit Natriumhydrid in THF.¹⁷⁶ In weiteren Durchführungen wurde jedoch eine Methode nach

CREWS *et al.* angewandt, bei der Kalium-*tert*-Butanolat als Base verwendet wird.¹⁷⁷ In Variation zur Originalvorschrift wurde jedoch das analoge Natriumsalz verwendet. Allgemein war die Ausbeute dieser Alkylierungsreaktion durch die Entstehung des zweifach alkylierten Derivats und die schwere Trennbarkeit der Ethylenglykol-Derivate limitiert. Auch die starke Assoziation der Ethylenglykole gegenüber der stationären Phase verringerte die Ausbeuten der Chromatographien.



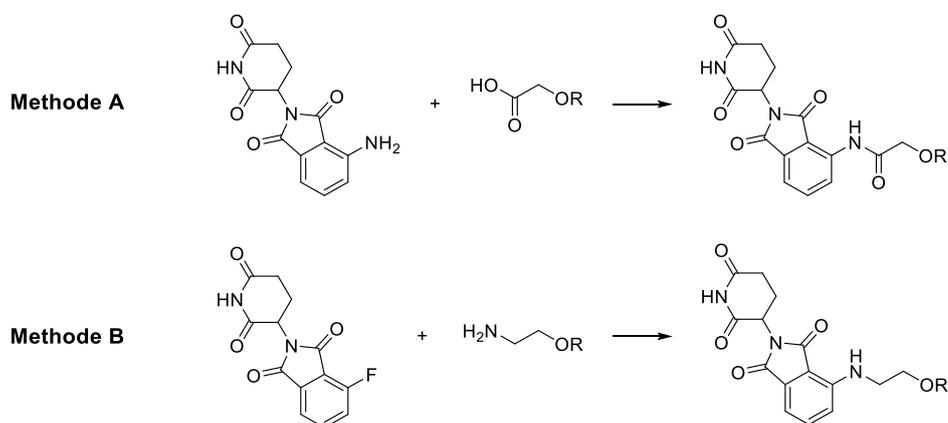
Schema 35: Synthese des Ethylenglykol-Linkers **238** mit einseitiger Carbonsäurefunktionalisierung in Form eines Ethylesters.

Nachdem der Ethylenglykol-Linker **238** zur Verfügung stand, wurde er mit dem Aminoprolin-Derivat **235** zum Carbamat umgesetzt. Hierzu wurde eine Methode von BONILLA *et al.* unter Verwendung von *para*-Nitrophenylchloroformat verwendet.¹⁷⁸ Unter Verwendung dieses Phosgen-Analogons mit dem Ethylenglykol-Derivat **238** entsteht zunächst intermediär das entsprechende aktivierte Nitrophenylcarbonat **239**.



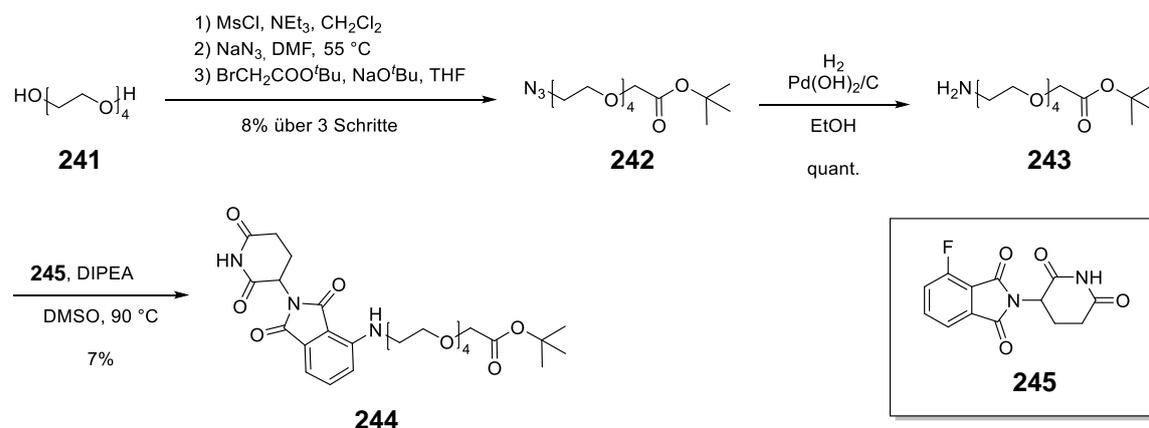
Schema 36: Synthese des Prolin-Derivats **240**, welches über ein Carbamat mit dem Ethylenglykol-Linker verbunden ist.

Nach einer Aufarbeitung dieser Zwischenstufe ohne Charakterisierung, wurde sie mit dem Aminoprolin-Derivat **235** versetzt. Das entstandene Carbamat wurde in nur sehr geringer Ausbeute erhalten. Im Rahmen der Nachsynthese wurde eine bessere Alternative gefunden. Dabei wird der Ethylenglykol-Linker, dessen Synthesen sich als aufwendig und nicht sehr ergiebig erwiesen hatten, erst später in das Molekül eingebaut. Diese Variation geht unter anderem auf den Umstand zurück, dass die Modifikation des Thalidomid-Bausteins sich in den Arbeiten eines Kollegen als leichter erwies, wenn das Fluorothalidomid und ein Amin-Derivat verwendet wurden.



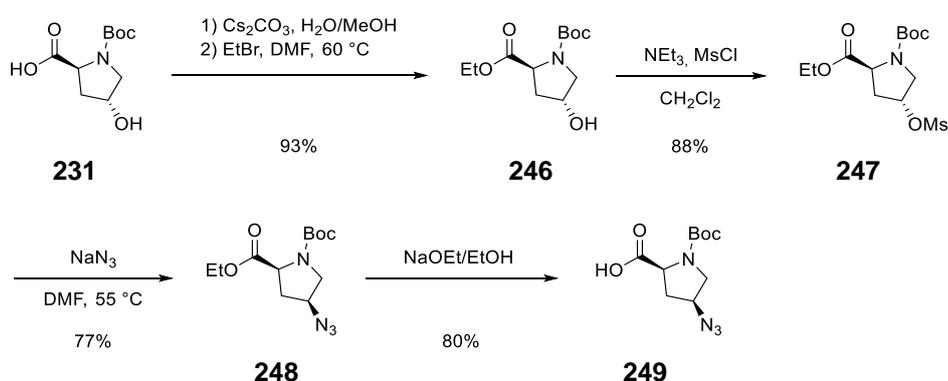
Schema 37: In Parallelarbeiten eines Kollegen getestete Methoden zur Derivatisierung des Thalidomids mit Ethylenglykollinkern, wobei sich Methode B als effektiver erwies.

Entsprechend dieser Erkenntnisse wurde ein Amin-Analogon des Tetraethylglykollinkers hergestellt. Durch die einseitige Substitution der endständigen Hydroxygruppe des Tetraethylglykols konnte ein Azidotetraethylglykol hergestellt werden. Nach einer Alkylierung der verbliebenen freien Hydroxygruppe mit dem *tert*-Butyl-Ester der Bromessigsäure konnte die Reduktion des Azids **242** zum Amin **243** mit Hilfe des PEARLMAN-Katalysators erfolgen. Die folgende nukleophile aromatische Substitution am Fluorothalidomid **245** wurde gemäß einer Publikation von STEINEBACH *et al.* durchgeführt.¹⁷⁹ Dadurch war die Verbindung **244** erhältlich, welche bereits den Liganden enthält, der den proteasomalen Abbau initiieren soll. Außerdem besitzt diese Verbindung eine Carbonsäurefunktion für die Kupplung an ein entsprechendes Amin.



Schema 38: Synthese eines Thalidomid-verknüpften Ethylenglykol-Linkers ausgehend von Tetraethylenglykol und Fluorothalidomid **245**.

Deshalb musste nun ein Amin-Derivat des Prolins oder des FESIK-Liganden hergestellt werden. Da die Synthese des Bausteins **244** den limitierenden Teil der Synthese darstellte, sollte die Kupplung des Prolins an den vorhandenen FESIK-Baustein **230** erfolgen. Auf diese Weise kann eine konvergentere Synthese erreicht werden. Analog zu der Synthese des Prolinazid-Derivates **234** wurde dafür ein Prolin-Derivat hergestellt, welches nach einer Amid-Kupplung mit dem Baustein **230** schnell das entsprechend benötigte Amin **251** liefern konnte. Dabei wurde nun der entsprechende Ethylester des Hydroxyprolins verwendet, da nach Substitution der Hydroxy-Gruppe durch das Azid so eine basische Spaltung des Esters möglich war.



Schema 39: Synthese des Prolin-Bausteins **249**, der mit dem Azid eine geschützte Amin-Funktion für den Folgeschritt zur Verfügung stellt.

Die Synthese verlief in Analogie zu der in **Schema 34** gezeigten Synthese problemlos und die Stereochemie des Produktes konnte durch Vergleich der NOESY-Spektren des Hydroxyprolins **231** und des Azids **249** belegt werden. Wie in **Abbildung 76** gezeigt, koppelt das zur Carboxyfunktion *trans*-ständige Wasserstoffatom ($2'$) nur beim Azid **249** stärker zum Wasserstoff-Atom am Kohlenstoffatom, das den Substituenten trägt. Im Fall des Hydroxyprolins **231** ist hingegen nur eine starke Kopplung zum Wasserstoffatom an der Carboxyfunktion zu erkennen.

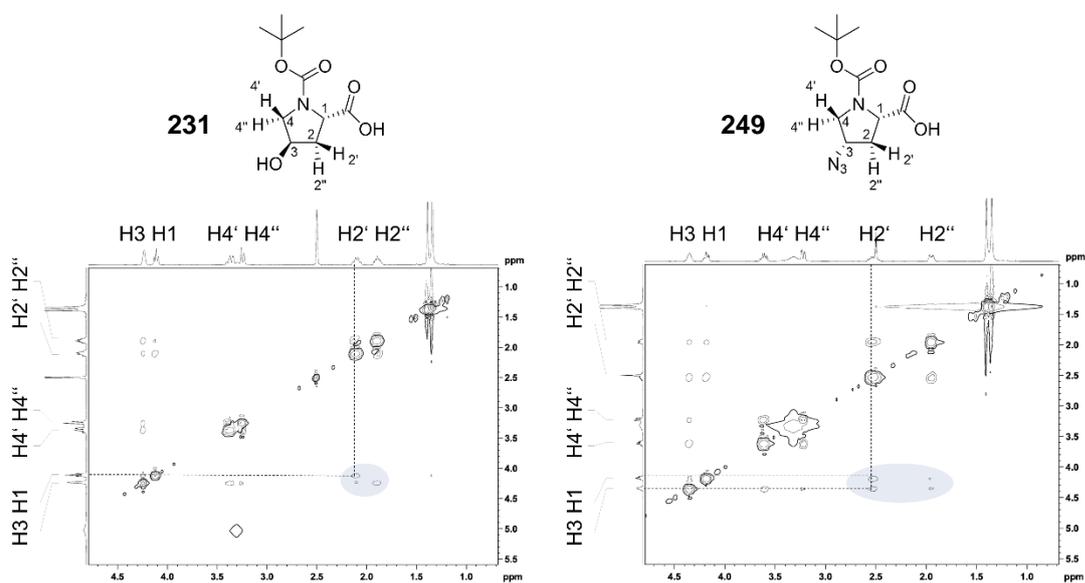
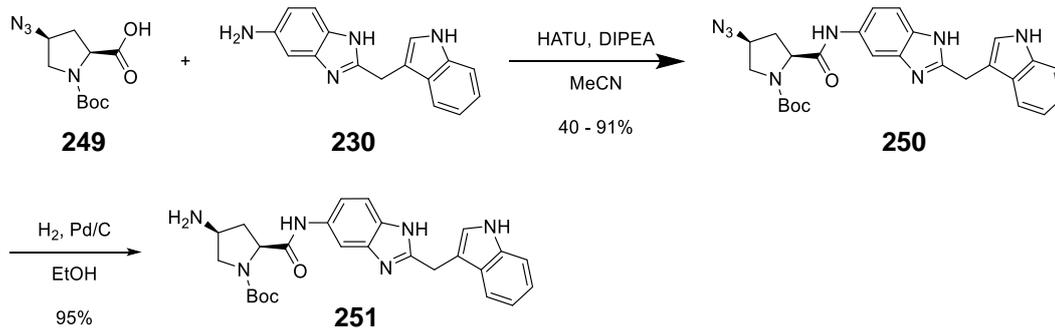


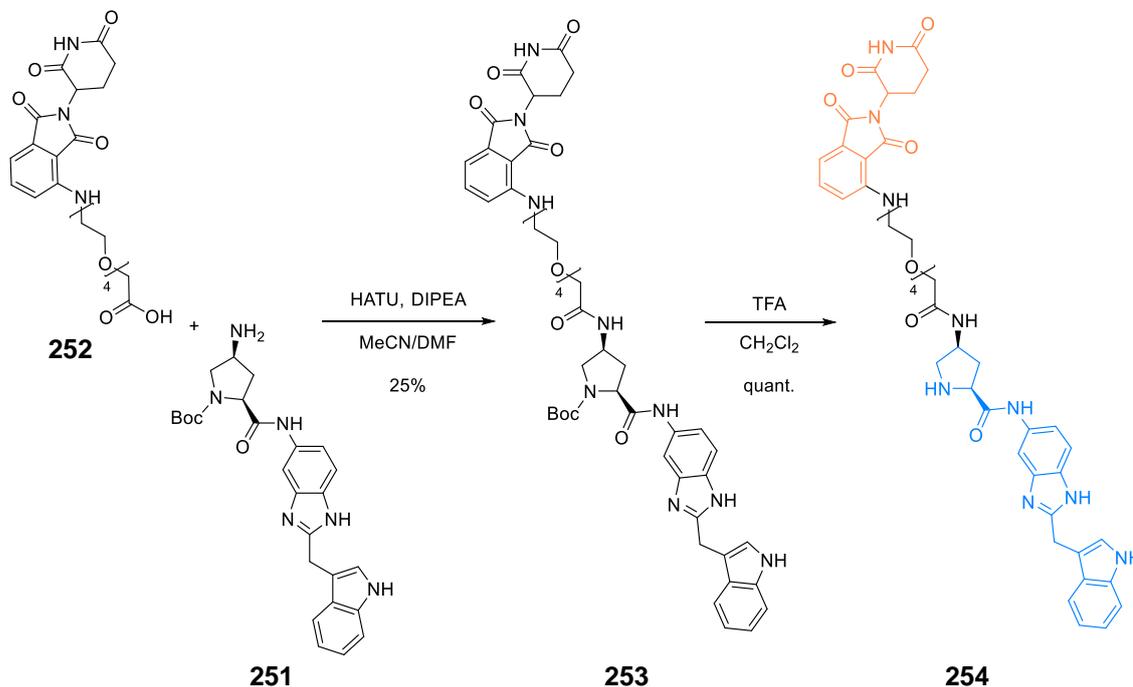
Abbildung 76: NOESY-Spektren zur Bestätigung der Stereochemie des Azids **249**.

Nachdem die Stereochemie erwiesen war, konnte das erhaltene Prolin-Derivat **249** nun mit dem FESIK-Baustein **230** gekuppelt werden. Lediglich ein Austausch des Kupplungsreagenzes gegen HATU unterschied dabei die Kupplung von den Literaturbedingungen nach FESIK *et al.*⁵⁶ Die Azid-Funktion des erhaltenen Produkts (**250**) wurde hydrogenolytisch in das entsprechende Amin überführt.



Schema 40: Synthese der derivatisierten und geschützten FESIK-Verbindung **251**.

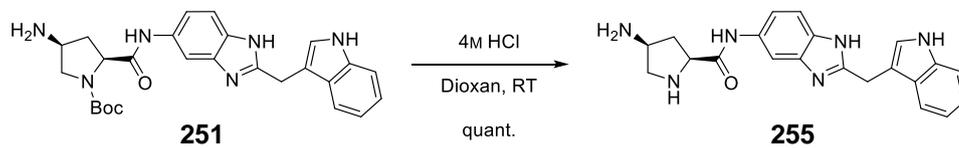
Im Folgenden wurde zunächst der Linker-Baustein **244** *in situ* mit Hilfe von TFA von der tert-Butylgruppe des Esters befreit. Nach Entfernen aller flüchtigen Bestandteile im Vakuum wurde der Rückstand in DMF und Acetonitril gelöst und mit dem FESIK-Derivat **251** zu einem Amid gekuppelt. In einem letzten Schritt wurde nach Abspalten der Boc-Gruppe das fertige PROTAC-Molekül erhalten.



Schema 41: Verknüpfung der beiden hergestellten Bausteine, welche nach Entschützung zum PROTAC führte; dabei verknüpft dieser PROTAC den FESIK-Liganden **86** (blau) mit dem CRBN-Liganden Thalidomid (orange).

Um überprüfen zu können, ob der FESIK-Ligand nach Einführung des Amin-Substituenten noch an *K-RAS* bindet, wurde der Baustein **251** von der Schutzgruppe befreit. Dies

resultierende Verbindung **255** wurde zusammen mit dem PROTAC **254** für die biochemischen Untersuchungen zur Verfügung gestellt.



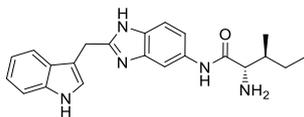
Schema 42: Boc-Entschützung des derivatisierten FESIK-Analogons.

5.8.3.2 Diskussion der zugehörigen biochemischen Daten

Da als Literaturreferenz nur FESIKs Isopropylderivat **85** vermessen wurde, musste dieses für einen Vergleich mit den hergestellten Verbindungen herangezogen werden. FESIK *et al.* beschrieben für dieses Derivat eine Affinität für *K*-RAS von $K_D = 190 \mu\text{M}$ und Inhibition von 78% im RAS-SOS-Austauschassay bei einer Konzentration von 1 mM. Das Prolin-Derivat **86** erreichte laut FESIK *et al.* einen K_D -Wert von 340 μM und eine Inhibition von 58% im Austauschassay.⁵⁶

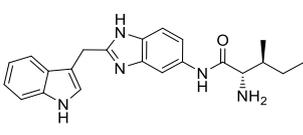
Verbindung **85** wies bei Messungen im ^1H - ^{15}N -HSQC-Experiment in Bochum einen deutlich höheren K_D -Wert auf, als FESIK *et al.* mit derselben Methode ermittelt hatten. Jedoch liegt der Wert, der im MST-Experiment für diese Verbindung beim LDC bestimmt wurde, unterhalb des literaturbekannten K_D -Wertes. Im Gegensatz zu dem im NMR-Experiment ermittelten Wert, erreicht der MST-Wert dabei aber die gleiche Größenordnung wie der Literaturwert.⁵⁶

Tabelle 23: Dissoziationskonstanten der Literaturverbindung **85**.

 85	^1H - ^{15}N -HSQC [mM]	MST [μM]
	WT (GDP)	WT (GDP)
K_D	4.1	83.2

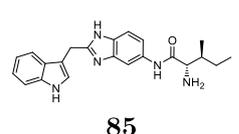
Die Ergebnisse des RAS-SOS-Austausch-Assays (**Tabelle 24**) bezüglich Verbindung **85** sind schwer mit dem Ergebnis von FESIK *et al.* zu vergleichen, da die halbmaximale inhibitorische Konzentration und nicht die relative Inhibition bei einer festen Konzentration gemessen wurde. Die halbmaximale Konzentration liegt aber in einem Bereich, in dem die Literaturdaten realistisch bleiben. Aufgrund dessen können diese Daten als Vergleichswerte für das modifizierte Derivat **255** zu Rate gezogen werden.

Tabelle 24: Darstellung der Messergebnisse im RAS-SOS-Austauschassay zu der Literaturverbindung **85**.

 85	RAS-SOS-Austausch-Assay				
	WT ∅	WT neu (Jan. 2020)	WT neu (Feb. 2020)	G12D	G12V
IC₅₀ [μM]	287/741	721	-	777	678

In den Zellassays, die im Rahmen des Projektes am Universitätsklinikum in Essen durchgeführt wurden, zeigt die Verbindung größtenteils eine um eine Größenordnung stärkere Inhibition als im RAS-SOS-Austausch. Die Werte des XTT-Assays weichen dabei in der Größenordnung nicht so stark von dem im MST-Experiment ermittelten K_D -Wert ab. Die Ergebnisse sprechen deutlich für eine Abnahme der metabolischen Zellaktivität. In Essen wurde für die Verbindung zudem ein biphasischer Einfluss auf die ERK-Phosphorylierung und eine Verringerung des phosphorylierten Akt festgestellt. Diese Beobachtung ähnelt den Beobachtungen von FESIK *et al.* für die Verbindungen **23** und **24**.³⁸

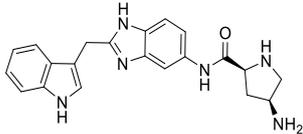
Tabelle 25: Ergebnisse der zellbasierten Assays für die Literaturverbindung **85**.

 85	Cell-Titer-Glo-Assay								
	A549 (G12S)	Capan-1 (G12V)	DLD1 (G12D)	HCT15 (G13D)	K562 (WT)	MOLM -13 (WT)	H358 (G12C)	NCI- H441 (G12V)	SNU-1 (G12D)
IC₅₀ [μM]	16.0	31.6	16.7	14.1	12.5	0.2	20.0	27.3	9.4
	XTT-Assay								
	BxPC3 (WT/Pankreas)		Panc1 (G12D/Pankreas)		RKO (WT/Darm)		HCT116 (G13D/Darm)		
EC₅₀ [μM]	73		120		42		40		

Im Vergleich zur Literaturverbindung **85** liegen für die hergestellten Verbindungen bei Fertigstellung der Dissertation weniger Daten vor. Jedoch ist festzustellen, dass das Amin-Derivat **255** im RAS-SOS-Austauschassay keine inhibierende Wirkung mehr aufweist. Im

Gegenteil wirkt es als Aktivator des Nukleotidaustauschen, genau wie die später von FESIK *et al.* entworfenen Verbindungen **23** und **24**. Die inhibitorische Wirkung auf die Proliferation ist für diese Verbindung geringer als für die ursprünglich getestete FESIK-Verbindung (**Tabelle 26**).

Tabelle 26: Darstellung der erhobenen biochemischen Daten für das für die Synthese des PROTACS **254** genutzten FESIK-Derivats **255**.

 255	Biochemische Daten		
	AC ₅₀ [µM] RAS-SOS- Austausch-Assay	IC ₅₀ [µM] Cell-Titer-Glo-Assay	
		WT	K562 (WT)
	181.8	>150.2	>150.2

Entgegen der erhofften Wirkung trat aber auch durch die Modifikation zur entsprechenden PROTAC-Verbindung **254** keine Verbesserung der Inhibition der Zellproliferation ein. Zwar war ein Einfluss der Verbindung auf das Überleben der Zellen festzustellen, jedoch war dieser noch schwächer als für das substituierte FESIK-Derivat **255**. Die PROTAC-Verbindung **254** zeigte ähnlich wie das Amin **255** eine aktivierende Wirkung auf den Nukleotidaustausch, wobei sie laut MST-Experiment eine stärkere Assoziation gegenüber RAS aufwies, als die Literaturverbindung **85** selbst. Jedoch ist für das PROTAC-Konzept unerheblich, ob der Proteinligand zu einer Inhibition führt. Wesentlich wichtiger ist eine starke Assoziation an das POI, sodass dieses in der Folge durch das Proteasom abgebaut wird.

Der Mangel an zellulärer Wirkung kommt daher vermutlich hauptsächlich durch eine geringe Membrangängigkeit oder eine ungeeignete Linkerlänge zustande. Experimentell wäre es am sinnvollsten, die Linkerlänge, sowie den Liganden, der für die Initiation des proteasomalen Abbaus zuständig ist, zu variieren. Auf diese Weise könnte geprüft werden, ob verbesserte Wirkungen über diesen Ansatz zu erzielen sind.

Tabelle 27: Darstellung der erhobenen biochemischen Daten für die PROTAC-Verbindung **254**.

Verbindung 254	Biochemische Daten			
	K _D [μM] MST	AC ₅₀ [μM] RAS-SOS- Austausch-Assay	IC ₅₀ [μM] Cell-Titer-Glo-Assay	
			K562 (WT)	SNU-1 (G12D)
	46.7	414/983	382.8	347.5

5.8.4 Entwicklung von PROTACs, die von der GORFE-Verbindung **98** abgeleitet wurden

Laut Computerberechnungen von GORFE *et al.* bindet die Verbindung **98**, die ebenfalls für den PROTAC-Ansatz ausgewählt wurde, in der SI/II-Bindestelle zwischen α -Helix und β -Faltblatt, wobei der am Pyrrazolring angebrachte Benzolring mit einer der *ortho*-Positionen aus der Bindestelle herausragt.⁹⁹ Anhand des von GORFE *et al.* prognostizierten Bindungsmodus wurde die *ortho*-Position des Phenylrings für eine Elongation zum potenziellen PROTAC ausgewählt. Da bereits PROTAC-Strukturen literaturbeschrieben sind, für deren Synthese Alkylierungen von Phenolen durchgeführt wurden,¹⁸⁰ wurde ein Phenol für die Erweiterung zum PROTAC in den GORFE-Liganden eingebaut.

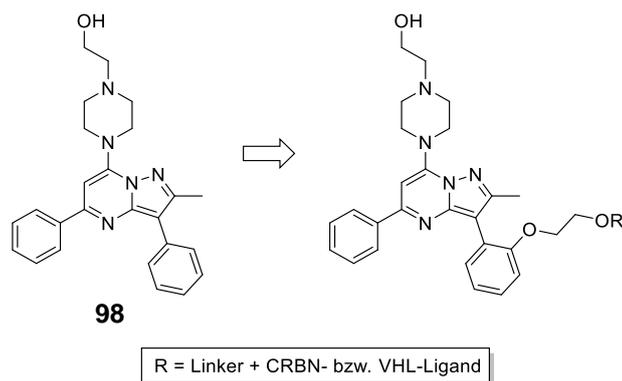
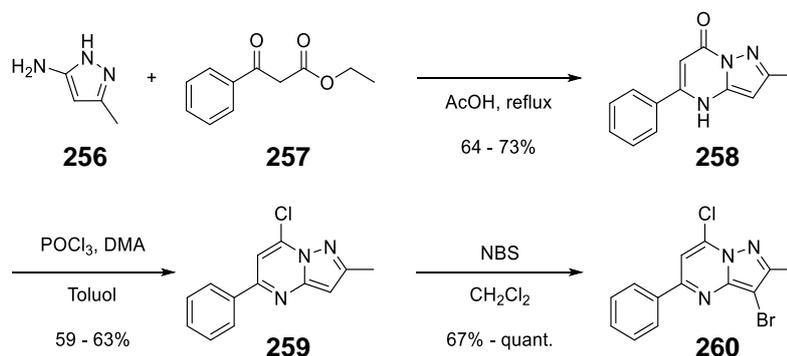


Abbildung 77: Darstellung der Positionierung des Verknüpfungspunktes für auf Verbindung **98** basierende PROTAC-Strukturen.

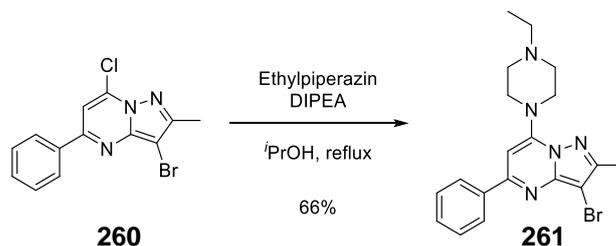
5.8.4.1 *Synthese des GORFE-Bausteins*

Die Synthese der Verbindung wurde hauptsächlich einer Veröffentlichung von CHIBALE *et al.* entnommen.¹⁸¹ Der in der Literatur verwendete β -Ketoester Methyl-3-oxobutanoat wurde gegen Ethyl-3-oxo-3-phenylpropanoat (**257**) ausgetauscht, sodass anstelle einer Methylgruppe der Benzolring zum Substituenten des Pyrimidinrings wurde. Ebenso wie die zwei Folgeschritte verlief diese Reaktion problemlos.



Schema 43: Synthese des Pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-Gerüsts für das auf dem GORFE-Liganden basierenden Bausteins.

Die im Folgeschritt anstehende nukleophile aromatische Substitution wurde ebenfalls nach Vorschrift von CHIBALE *et al.* durchgeführt.¹⁸¹ Bevor das benötigte Piperazin-Derivat hergestellt wurde, wurde diese Reaktion mit Ethylpiperazin getestet. Das erhaltene Derivat (**261**) wurde ebenfalls für biochemische Tests zur Verfügung gestellt.

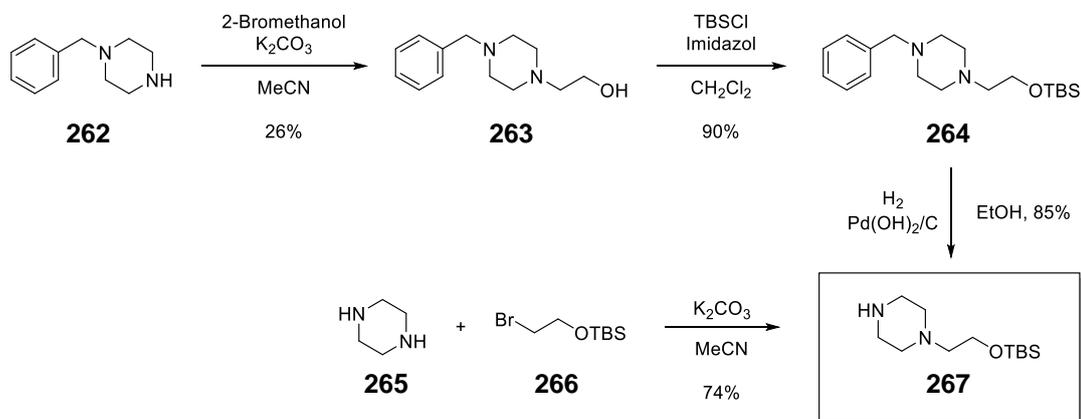


Schema 44: Synthese der durch eine altertümliche Chemikalienbeschriftung hergestellten Verbindung **261**.

Das eigentlich für die Synthese benötigte 2-Piperazinoethanol musste hergestellt werden und wurde bereits vor der nukleophilen aromatischen Substitution des Chlors von Verbindung **260** silylgeschützt. Dieser Baustein (**267**) wurde auf zwei Wegen hergestellt.

Die erste Syntheseroute beginnt mit der Alkylierung von Benzylpiperazin (**262**) mit 2-Bromethanol nach einer Vorschrift von SCHOENTJES *et al.*¹⁸² Einer Publikation von DUAN *et al.* wurden dann die Bedingungen einer standardmäßigen Silylschätzung mit Imidazol als Base entnommen,¹⁸³ wodurch das zweifach alkylierte Piperazin **264** erhalten wurde. Nach hydrogenolytischer Abspaltung des Benzylrestes wurde so der gewünschte Baustein **267** erhalten. In der zweiten Durchführung wurde die gewünschte Verbindung

nach einer Vorschrift von DUTTA *et al.* über die direkte Alkylierung von Piperazin mit dem TBS-geschützten 2-Bromethanol (**266**) deutlich effizienter hergestellt.¹⁸⁴

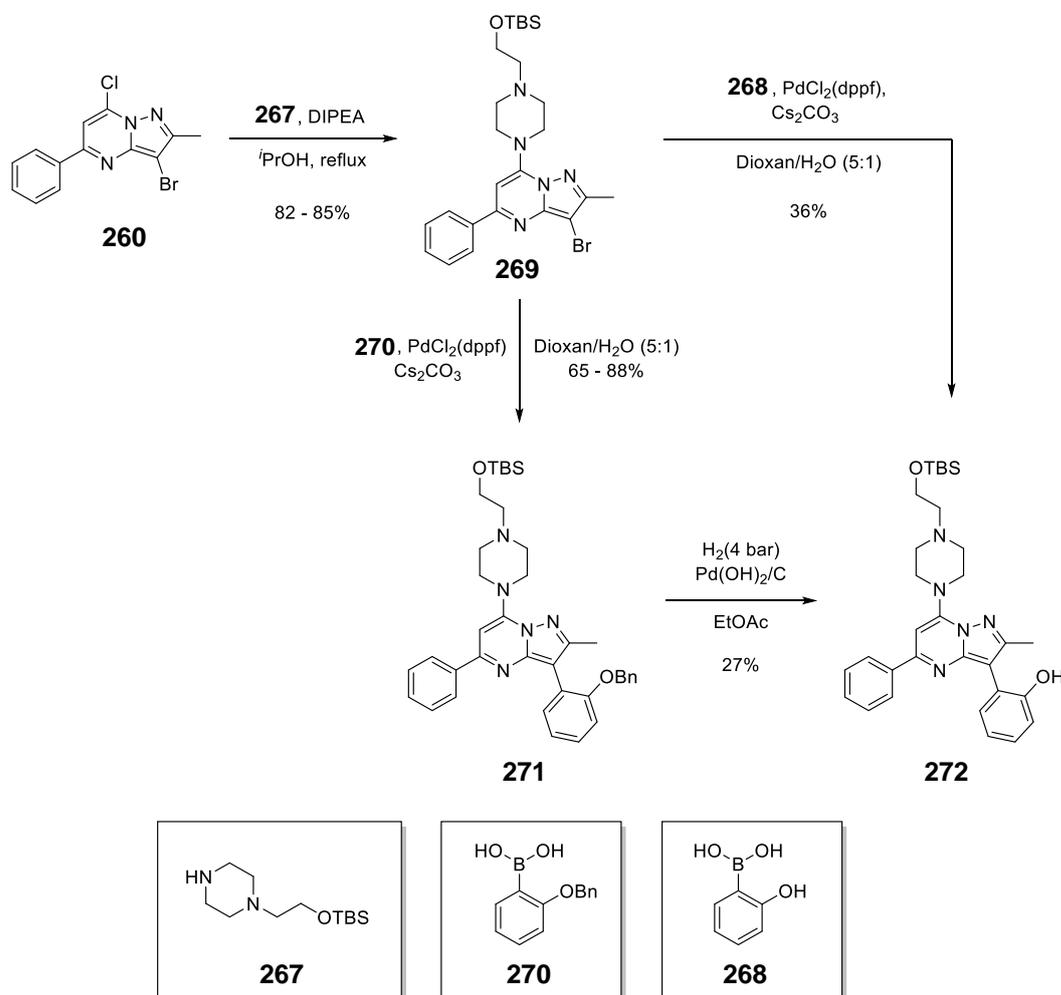


Schema 45: Synthese des zweiten für die Synthese des GORFE-Derivats benötigten Bausteins **267**.

Nachdem ausreichende Mengen des Bausteins **267** vorlagen, wurde dieser in der nucleophilen aromatischen Substitution analog zum Ethylpiperazin mit Verbindung **260** umgesetzt. Das angestrebte GORFE-Derivat **268** wurde dann auf zwei Wegen hergestellt. Zunächst wurde eine SUZUKI-Kupplung mit der benzylgeschützten *ortho*-Hydroxyphenylboronsäure durchgeführt, wobei die Bedingungen erneut der Publikation von CHIBALE *et al.* entnommen wurden.¹⁸¹ Bei entsprechendem Entgasen des Lösungsmittelgemisches mit Schutzgas wurde das Produkt ohne weitere Probleme in guten Ausbeuten erhalten.

Der Folgeschritt, die hydrogenolytische Abspaltung der Benzylschutzgruppe, war hingegen problematischer. Bei Normaldruck wurde immer nur ein geringer Umsatz des Edukts beobachtet. In einem Testansatz von 100 mg von Verbindung **271** wurde dann ein vollständiger Umsatz bei einem Druck von 4 bar Wasserstoffüberdruck erzielt. Unter gleichen Bedingungen ließ sich das Edukt in einem größeren Ansatz dann jedoch wieder nicht entschützen. Selbst bei einem Druck von 20 bar in einem

anderen Autoklaven war die größere Menge nicht vollständig zur Reaktion zu bringen.

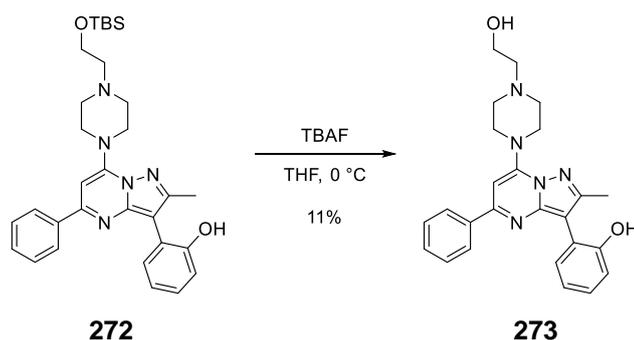


Schema 46: Darstellung der zwei Syntheserouten zum gewünschten GORFE-Derivat **272** ausgehend vom Grundkörper **260**.

In einer alternativen Synthese wurde die SUZUKI-Kupplung bereits mit der freien *ortho*-Hydroxyphenyl-boronsäure (**268**) durchgeführt. Die Äquivalente an Base wurden dabei gemäß einer Vorschrift von SWAIN *et al.* erhöht. Zwar verlief diese Reaktion deutlich schlechter als mit der benzylgeschützten Variante, jedoch war die Ausbeute höher als bei der hydrogenolytischen Entschützung im großen Maßstab (vgl. **Schema 46**). Zudem war die gewünschte Verbindung so durch die Einsparung eines Syntheseschrittes und der langen

Reaktionszeiten der Hydrogenolyse deutlich schneller zugänglich. Mit der Verbindung **272** lag nun ein geeigneter Baustein für die Verknüpfung mit einem Ethylenglykol-Linker und einem entsprechenden zweiten Liganden vor.

Für biologische Tests, bei denen überprüft werden sollte, inwiefern die *ortho*-Substitution in der GORFE-Verbindung Einfluss auf die Bindung des Liganden hat, wurde die TBS-Schutzgruppe der Verbindung **272** nach einer Vorschrift von DUTTA *et al.* entfernt und das vollständig entschützte GORFE-Derivat **273** erhalten.¹⁸⁵ Im Massenspektrum war eine weitere Substanz zu erkennen, die dem Tetrabutylammonium-Kation zugeordnet werden konnte. Aufgrund der Ladung ist die Signalintensität hier sehr hoch. Da die Verunreinigung im ¹H-NMR-Spektrum nicht sichtbar war, wurde die Substanz dennoch ohne eine weitere Aufreinigung für die Testung abgegeben.

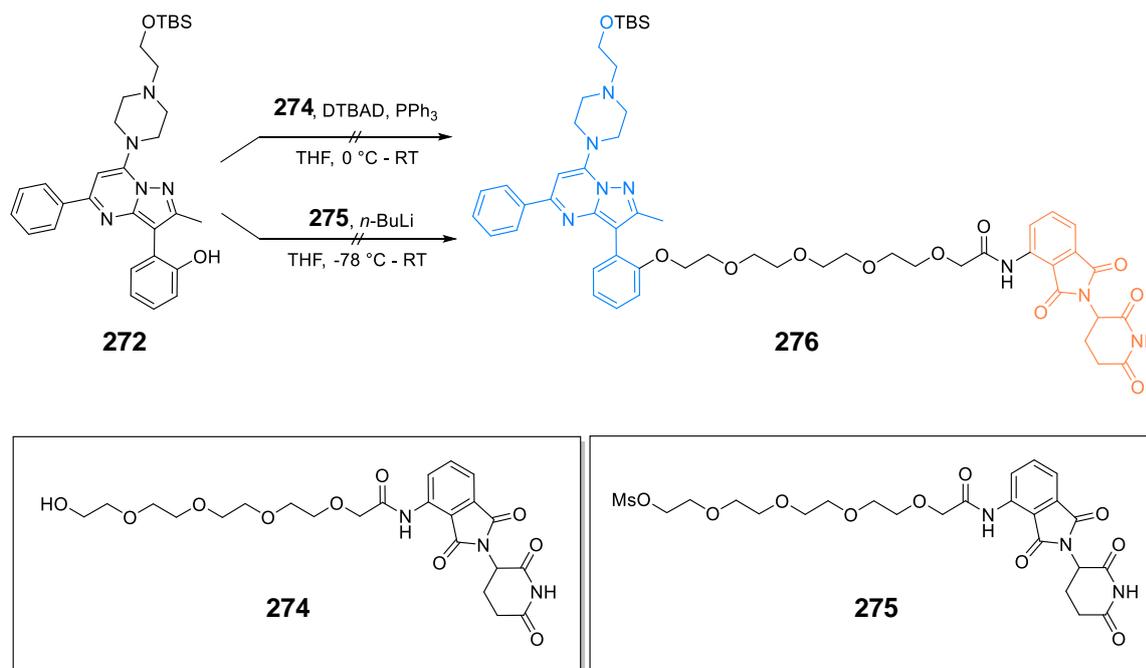


Schema 47: TBAF-Entschützung zum freien Phenol-GORFE-Derivat **273**.

5.8.4.2 Synthese der zwei auf GORFES Verbindung beruhenden PROTAC-Strukturen

Der erste Versuch, den GORFE-Baustein **272** zu einem PROTAC zu verlängern, erfolgte mit einem Ethylenglykol-Pomalidomid-Baustein, der bereits in der Arbeitsgruppe synthetisiert worden war. Dabei wurde zunächst versucht, das Phenol unter MITSONOBU-Bedingungen mit diesem Baustein **274** zu verknüpfen. Die Bedingungen wurden hierfür in Abstimmung mit zwei Literaturstellen gewählt. In den Publikationen von JONES *et al.* und DERKSEN *et al.* wird eine MITSONOBU-Reaktion beschrieben, bei der 4-Hydroxythalidomid mit einem Alkohol verknüpft wird.^{186,187} Aufgrund dessen wurde angenommen, dass das Phenol vor dem Imid des Pomalidomids die MITSONOBU-Reaktion eingehen würde. Jedoch

zeigte sich im Experiment, dass der Alkohol **274** eher eine Dimerisierung oder intramolekulare Reaktion einging, während das GORFE-Derivat nicht reagierte. Die jeweiligen Massen des Dimers und des zyklisierten Produkts konnten über LCMS-Spektren zugeordnet werden.



Schema 48: Erste Versuche zur Synthese eines Pomalidomid-verknüpften PROTACs des GORFE-Liganden.

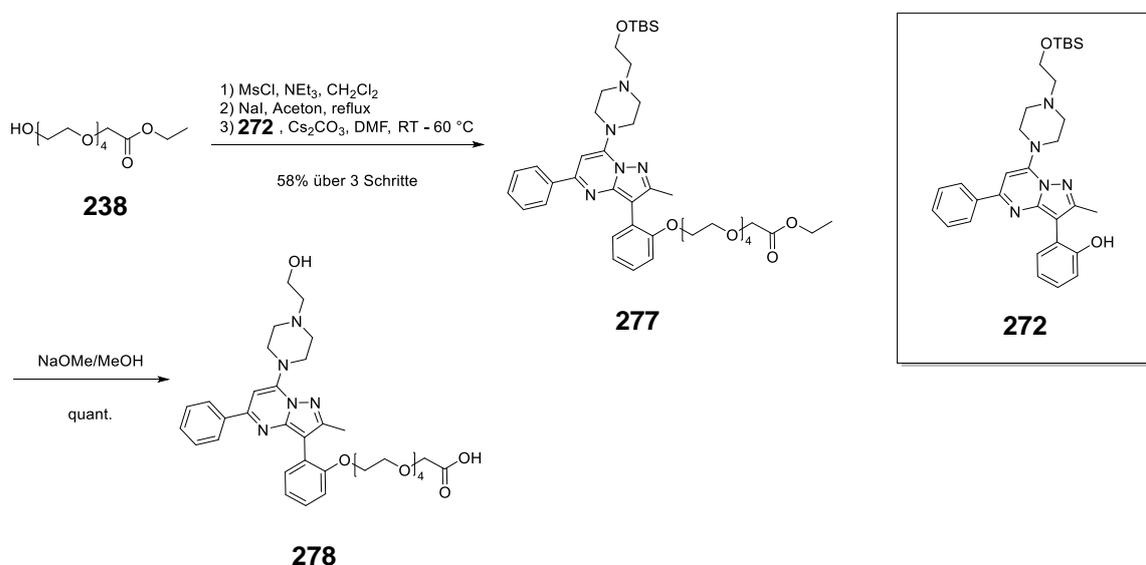
Vermutlich ist dieser Befund der Tatsache geschuldet, dass das phenolische Proton des 4-Hydroxythalidomids durch die ebenfalls am Aromaten liegende Imid-Funktion deutlich azider wird.

Als Alternative wurde dann eine S_N2-Reaktion angestrebt. Hierfür wurde der Baustein **274** zunächst mesyliert und mit dem GORFE-Derivat umgesetzt. Dabei wurde die Verbindung **272** in Lösung vorgelegt und bei tiefen Temperaturen mit *n*-BuLi versetzt, um das Phenol erschöpfend zu deprotonieren. Die resultierende Lösung wurde dann mit Hilfe einer Spritzenpumpe langsam in eine trockeneisgekühlte Lösung des Bausteins **275** überführt. Nach einiger Zeit bei -78 °C wurde das Reaktionsgemisch bei Raumtemperatur

weitergeführt. Auch nach Rühren über Nacht konnte jedoch keine Bildung eines neuen Produktes durch HPLC- oder DC-Analytik beobachtet werden.

In einer alternativen Synthese wurde der GORFE-Ligand nun mit einem Linkerfragment verknüpft, das den Thalidomid-Liganden noch nicht trug. Hierzu wurde der Linker selbst in ein möglichst gutes Alkylierungsreagenz überführt, indem die freie Hydroxyfunktion des bereits synthetisierten Tetraethylglykols **238** mesyliert und durch eine FINKELSTEIN-Reaktion in das entsprechende Iodid überführt wurde.

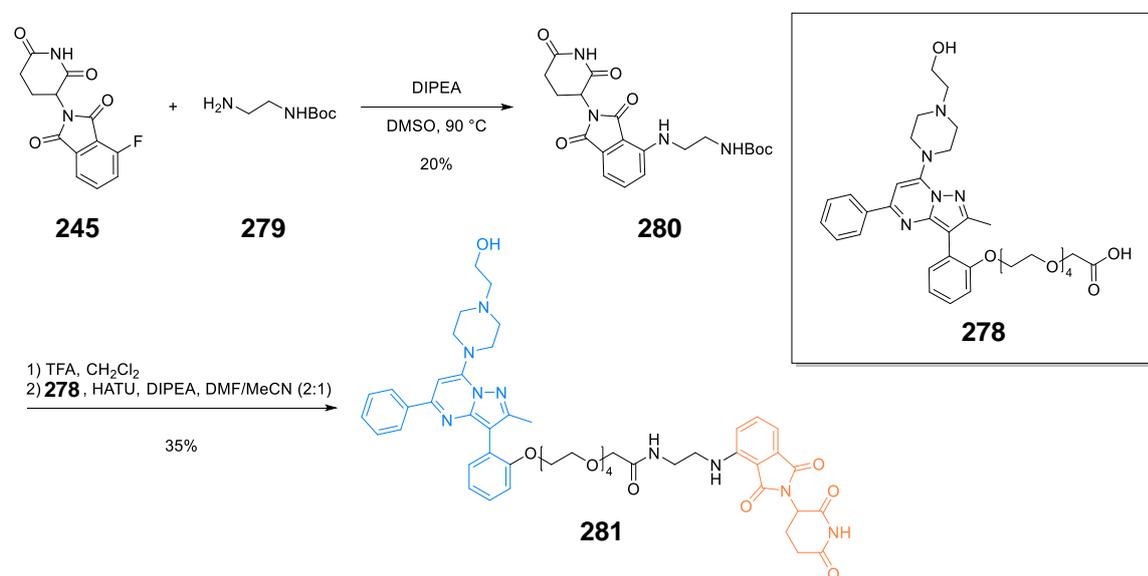
Die Substitution des Mesylats durch Iodid wurde einer Publikation von QIU *et al.* nachempfunden. Die Autoren überführten die Ethylenglykol-Tosylate unter diesen Bedingungen in die jeweiligen Iodide und alkylierten mit diesen Derivate von 4-Aminothalidomid.¹⁸⁸ Die Alkylierung des Phenols **272** mit Caesiumcarbonat als Base wurde nach einer Vorschrift von BOUTIN *et al.* durchgeführt.¹⁸⁹ Als letzter Schritt der Synthese des für die PROTAC-Synthese geeigneten Bausteins **278** wurde eine basische Verseifung des Ethylesters durchgeführt, durch deren Bedingungen zusätzlich die TBS-Schutzgruppe abgespalten wurde.



Schema 49: Elongation des GORFE-Derivats **272** um einen Ethylenglykol-Linker mit Carbonsäurefunktion.

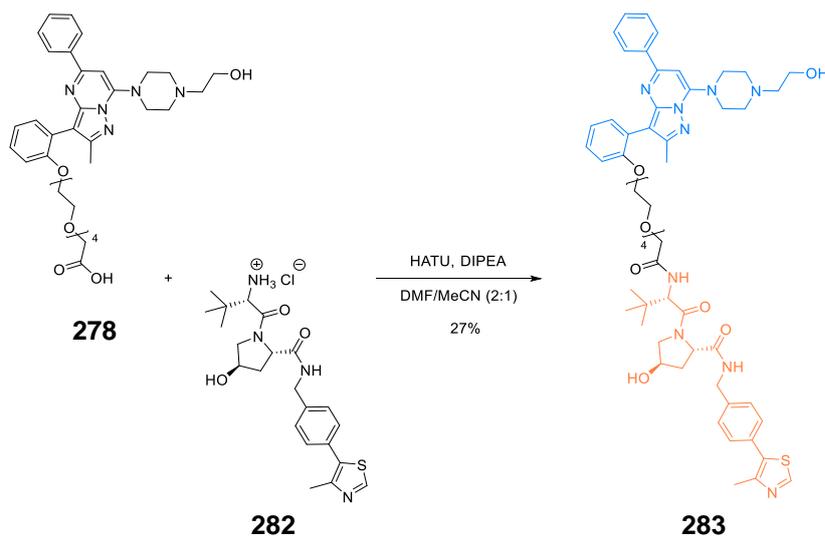
Da unter Amid-Kupplungsbedingungen das entsprechende Amin bevorzugt wird, sollte dies kein Problem für die weitere Synthese darstellen.

Um den fertigen Baustein **278** mit dem Thalidomid-Liganden verknüpfen zu können, musste zunächst ein Amin an diesem Liganden angebracht werden. Da das Pomalidomid in Amid-Kupplungen schlecht zu reagieren schien (vgl. **Schema 37**, Methode A), musste ein anderes Derivat gefunden werden. Analog zum entsprechenden Schritt der Synthese des FESIK-PROTACs wurde das Fluorothalidomid **245** mit einem Amin in der nukleophilen aromatischen Substitution nach STEINEBACH *et al.* umgesetzt.¹⁷⁹ Dabei wurde das einfach Boc-geschützte Diamin **279** eingesetzt. Auf diese Weise wurde das Thalidomid-Derivat **280** erhalten, das im nächsten Schritt zunächst mit Trifluoressigsäure entschützt und dann nach Entfernen der flüchtigen Bestandteile ohne weitere Aufarbeitung mit dem Carbonsäurebaustein **278** umgesetzt wurde. Die Bedingungen dieser Amid-Kupplung wurden analog zur letzten Kupplung des FESIK-PROTACs gewählt. Nach präoperativer HPLC wurde die Verbindung **281** als Acetat-Salz erhalten.



Schema 50: Synthese eines PROTAC-Moleküls, bei dem der CRBN-Ligand (orange) mit dem GORFE-Liganden (blau) verknüpft ist.

Da von dem Baustein **278** genug Substanz für einen zweiten PROTAC zur Verfügung stand, wurde dieser unter den gleichen Kupplungsbedingungen mit dem Hydrochloridsalz des VHL-Liganden **282** verknüpft. Nach einer Trennung von Verunreinigungen durch präparative HPLC, wurde das saubere Produkt **283** erhalten.

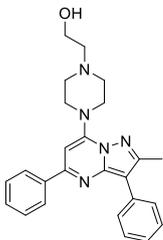


Schema 51: Synthese eines PROTAC-Moleküls, bei dem der VHL-Ligand (orange) mit dem GORFE-Liganden (blau) verknüpft ist.

5.8.4.3 Diskussion der biochemischen Ergebnisse

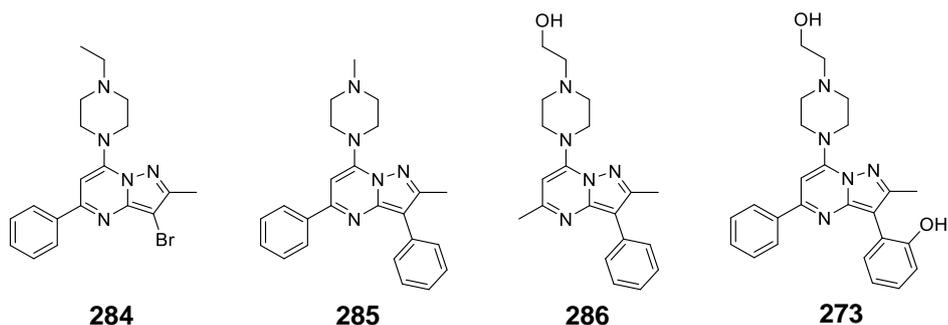
Da die Veröffentlichung von GORFE *et al.* zu Beginn der Synthesen zum PROTAC-Thema neu war, standen im Vorhinein keine eigenen Daten für diese Verbindung zur Verfügung. Erst während der Synthesen wurde die in der Literatur als 0.28 mikromolar-bindender *K*-RAS-Ligand beschriebene Verbindung **98** bezüglich ihrer Wechselwirkungen mit dem RAS-Protein untersucht.⁹⁹ Obwohl auch die von GORFE *et al.* beschriebenen Dissoziationskonstanten mittels MST ermittelt wurden, wurde nur eine sehr schwache Affinität gegenüber *K*-RAS in den MST-Experimenten bei der Firma LDC festgestellt. Auch wenn der von GORFE *et al.* beschriebene Bindungsmodus eine Assoziation dieser Verbindung in der SI/II-Bindestelle annimmt, interferiert der vermeintliche RAS-Ligand nicht mit der RAS-SOS-Wechselwirkung. Das zeigen die Ergebnisse des RAS-SOS-Austauschassays zumindest für die Wildtyp-GTPase. Die Verbindung zeigt dennoch einen starken Einfluss auf die Proliferation von Zellen. Nimmt man die Ergebnisse zusammen, so scheint diese Wirkung jedoch nicht durch eine direkte *K*-RAS-Inhibition zustande zu kommen. GORFE *et al.* beschreiben eine Inhibition der RAS-Raf-Wechselwirkung. Die Annahme der Autoren ist dabei, dass durch die Bindung des Liganden an RAS eine Wechselwirkung mit der RBD von Raf verhindert wird. Es könnte sich bei dem Inhibitor aber auch um einen Raf-Liganden handeln.

Tabelle 28: Testergebnisse zu der von GORFE *et al.* als *K*-RAS-Ligand beschriebenen Verbindung.

 98	Biochemische Daten						
	K_D [μM] MST				IC₅₀ [μM] RAS-SOS- Austausch-Assay	IC₅₀ [μM] Cell-Titer-Glo-Assay	
	WT (GDP)	WT (GNP)	G12D (GDP)	G12D (GNP)	WT	K562 (WT)	SNU-1 (G12D)
> 1000	> 1000	> 1000	950	>3000	10.8	18.7	

Obwohl die ersten biochemischen Ergebnisse wenig vielversprechend für den angestrebten RAS-Abbau waren, wurden aufgrund der Synthesefortschritte weitere Derivate der GORFE-Verbindung (**98**) getestet.

Tabelle 29: Darstellung der Messergebnisse einiger GORFE-Derivate im RAS-SOS-Austausch und CTG-Assay.



	RAS-SOS-Austausch-Assay		Cell-Titer-Glo-Assay								
	WT	G12D	A549 (G12S)	Capan-1 (G12V)	DLD1 (G12D)	HCT15 (G13D)	K562 (WT)	MOLM-13 (WT)	H358 (G12C)	NCL-H441 (G12V)	SNU-1 (G12D)
	Verbindung 284										
IC₅₀ [μM]	750	750	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Verbindung 285										
IC₅₀ [μM]	62	75	3.3	62	75	3.3	62	75	3.3	62	75
	Verbindung 286										
IC₅₀ [μM]	> 3000	-	> 231.5	> 3000	-	> 231.5	> 3000	-	> 231.5	> 3000	-
	Verbindung 273										
IC₅₀ [μM]	24.5	-	-	80.5	-	300	300	300	131.7	65.9	36.7

Unter den getesteten Verbindungen befanden sich die ebenfalls von GORFE *et al.* beschriebenen Verbindungen **285** und **286**,⁹⁹ sowie die hergestellten Derivate **284** und **273** (Tabelle 29). Verbindung **273** liegt dabei den synthetisierten PROTAC-Strukturen zugrunde.

Im Gegensatz zu Verbindung **98** zeigen drei der Verbindungen eine Inhibition im RAS-SOS-Austauschassay, auch wenn aufgrund fehlender MST- und NMR-Daten nicht belegt werden kann, dass diese Interferenz mit dem Nukleotidaustausch durch eine Bindung an *K*-RAS zustande kommt. Verbindung **286** stellt laut GORFE *et al.* einen Liganden der SI/II-Bindestelle dar, der mit einem $K_D = 2.74 \mu\text{M}$ an den Wildtyp des Proteins bindet und außerdem die SOS-abhängige Nukleotidfreisetzung um das Zweieinhalbfache erhöht.⁹⁹ In den Tests des LDC konnte für diese Verbindung jedoch keine nennenswerte Inhibition oder Aktivierung des Nukleotidaustauschs festgestellt werden. Zu Verbindung **285**, die in den Zellassays ähnlich niedrige Werte aufweist, wie Verbindung **98** wird in der Publikation zwar beschrieben, jedoch werden aufgrund eines Löslichkeitsproblems nicht viele Daten genannt. Klar zu erkennen ist in der Publikation jedoch eine Senkung der pERK-Level bei Zugabe der Verbindung **285**.⁹⁹ Verglichen mit den Literaturverbindungen ist das Phenol-GORFE-Derivat **273**, das den hergestellten PROTAC-Strukturen **281** und **283** zugrunde liegt, im CTG-Assay weniger effektiv als die Verbindungen **98** und **285**. Die Inhibition des RAS-SOS-Austauschs ist hingegen die stärkste unter denen der getesteten Derivate. Somit scheint die lediglich als Linker eingefügte Phenolgruppe eine Rolle bei der Inhibition des Nukleotidaustauschs zu haben.

Bei den PROTAC-Strukturen, die von Verbindung **98** abgeleitet wurden, ist diese Phenol-Funktion blockiert. Infolgedessen weisen diese Verbindungen kaum mehr eine Inhibition des Nukleotid-Austauschs auf. Auch eine Aktivierung der Nukleotidfreisetzung ist in den Ergebnissen des RAS-SOS-Austauschassays nicht zu beobachten. Die Verbindungen weisen zudem, wie die Verbindung **98** selbst, keine Affinität gegenüber GDP-gebundenem *K*-RAS auf. Trotz ihrer Größe behalten sie aber eine regulierende Wirkung auf die Proliferation

von Zellen (**Tabelle 30**). Für die PROTAC-Verbindung **283**, bei der der GORFE-Ligand mit dem VHL-Liganden verknüpft ist, liegt die Inhibition dabei aber lediglich in einem ähnlichen Bereich wie für die Ausgangsverbindung. Da dieses Molekül damit die bessere Wirkung von beiden hergestellten Verbindungen hat, ist festzuhalten, dass die Erweiterung zur PROTAC-Struktur keinen Gewinn an Wirkung gebracht hat. Da der Wirkmechanismus von Verbindung **98** in Frage gestellt werden muss, bleibt die Zellaktivität ungeklärt.

Tabelle 30: Darstellung der erhobenen biochemischen Daten zu den beiden PROTAC-Strukturen, die von der GORFE-Verbindung **98** abgeleitet wurden.

Verbindung	Biochemische Daten			
	K_D [μM] MST	AC_{50}/IC_{50} [μM] RAS-SOS-Austausch-Assay	IC_{50} [μM] Cell-Titer-Glo-Assay	
			WT (GDP)	WT
281 (CRBN-Ligand)	> 1000	> 3000	58.9	50.5
283 (VHL-Ligand)	> 1000	> 3000	14.9	20.1

5.9 Strukturbasierte Ligandensuche über Knime

Zum Ende des Projektes standen zahlreiche biologische Daten von *K*-RAS-Liganden zur Verfügung. Mit Hilfe des Programmes Knime wurde daher eine Struktur-Wirkungs-basierte Suche nach neuen Liganden von *K*-RAS durchgeführt. Für diese Suche wurden die von Enamine zur Verfügung gestellten Datenbanken genutzt.

5.9.1 Identifizierung der Liganden

5.9.1.1 *Entwicklung eines Knime-Ablaufs zur Identifizierung K-RAS-Liganden*

Die zur Verfügung stehenden Daten der biochemischen Tests waren häufig nicht so eindeutig, dass klare Favoriten für eine strukturbasierte Suche offensichtlich waren. Um eine solche Suche trotzdem mit einer Auswahl von Liganden durchzuführen, wurden zwei verschiedene Läufe durchgeführt. Die bisher ermittelten Liganden wurden im SMILES-Format mit den zugehörigen Daten in eine Excel-Tabelle eingetragen. Für mehrfach bestimmte Daten wurde der Mittelwert eingetragen, von dessen Berechnung Ausreißer ausgenommen wurden.

Nachdem die Daten auf diese Weise in ein Knime-kompatibles Format überführt worden waren, wurden die Verbindungen zur Bewertung der Daten in Blöcke unterschiedlicher Kriterien eingeteilt:

- 1) K_D für *K*-RAS^{WT} (GDP) aus den ¹H-¹⁵N-HSQC-Spektren soll unter 1.5 mM liegen
- 2) IC_{50} im RAS-SOS-Austauschassay für *K*-RAS^{WT} soll unter 1.5 mM liegen
- 3) IC_{50} im RAS-SOS-Austauschassay für *K*-RAS^{G12D} soll unter 1.0 mM liegen
- 4) IC_{50} im RAS-SOS-Austauschassay für *K*-RAS^{G12V} soll unter 1.0 mM liegen
- 5) Die Verbindung weist einen AC_{50} -Wert im RAS-SOS-Austauschassay für *K*-RAS auf

Die Verbindungen der jeweiligen Kriteriengruppen wurden getrennt in Knime eingelesen und anschließend mit Hilfe eines erstellten Arbeitsablaufs von geeigneten Nodes

abgeglichen. Über „Joiner“ wurden die Schnittmengen der Verbindungen aus jeweils zwei der Kriterien bestimmt. Führt man diese Schnittmengen im Anschluss zusammen, so erhält man die Liganden, die jeweils mindestens zwei der gewählten Kriterien 1 – 5 erfüllen.

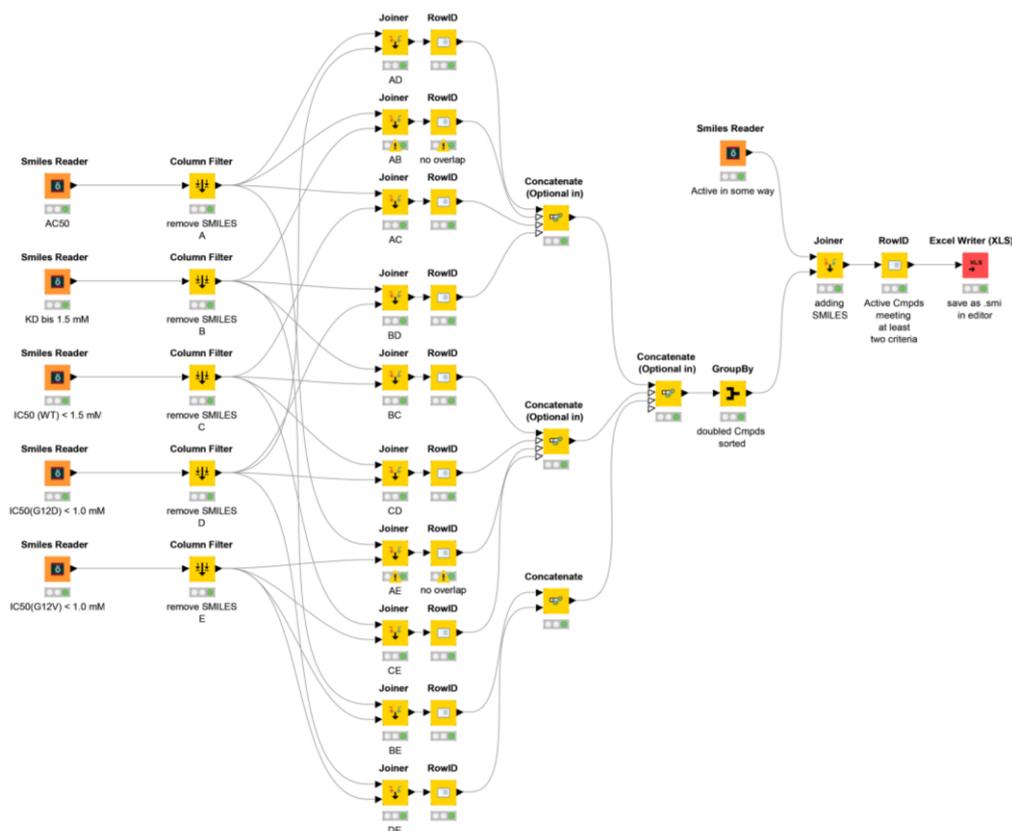


Abbildung 78: Darstellung des ersten Knime-Ablaufs zur Suche nach Liganden, die zwei der gewählten Kriterien 1 – 5 erfüllen.

In einem weiteren Arbeitsablauf (**Abbildung 79**) wurden Verbindungen als inaktiv deklariert, die weniger als zwei der gewählten Kriterien erfüllten, während die Verbindungen als aktiv eingeordnet wurden, die mindestens zwei der Kriterien erfüllten. Zuvor wurden molekulare Fingerabdrücke mit Hilfe des Node-Baukastens „RD-Kit“ erstellt, um die Strukturdaten der Verbindungen verwerten zu können.

Die klassifizierten und handhabbaren Strukturdaten wurden nun mit Hilfe verschiedener Lernalgorithmen („Learner-Nodes“) analysiert und für die Entwicklung entsprechender Vorhersagemodelle genutzt. In der Folge konnte mit den jeweils passenden Vorhersage-

Bausteinen („Predictor-Nodes“) ein entsprechender Satz an Verbindungen unter Berücksichtigung der entworfenen Modelle getestet werden. Vorhersagen, bei denen Verbindungen als „aktiv“ deklariert wurden, wurden zum Teil weiter eingeschränkt, wenn ein Wert für die Wahrscheinlichkeit dieser Vorhersage gegeben war. Dabei wurden Verbindungen mit besonders wahrscheinlichen Vorhersagen weiterverwendet.

Den entworfenen Modellen wurden dabei drei Datensätzen von Enamine zur Verfügung gestellt. Darunter das „Discovery Diversity Set“ mit 10.560 leitstrukturähnlichen Verbindungen. Es enthält repräsentative Verbindungen der Enamine-Screening-Bibliotheken. Ein etwas größeres Verbindungsset mit sehr ähnlichen Eigenschaften ist das ebenfalls verwendete Paket von 50.240 Verbindungen. Der dritte Datensatz besteht aus 300.115 Verbindungen mit berechneter maximaler Diversität. Dabei enthalten alle Datensätze Verbindungen, die mit Regeln der medizinischen Chemie konform sein sollen (z.B. Lipinsky rule of five).

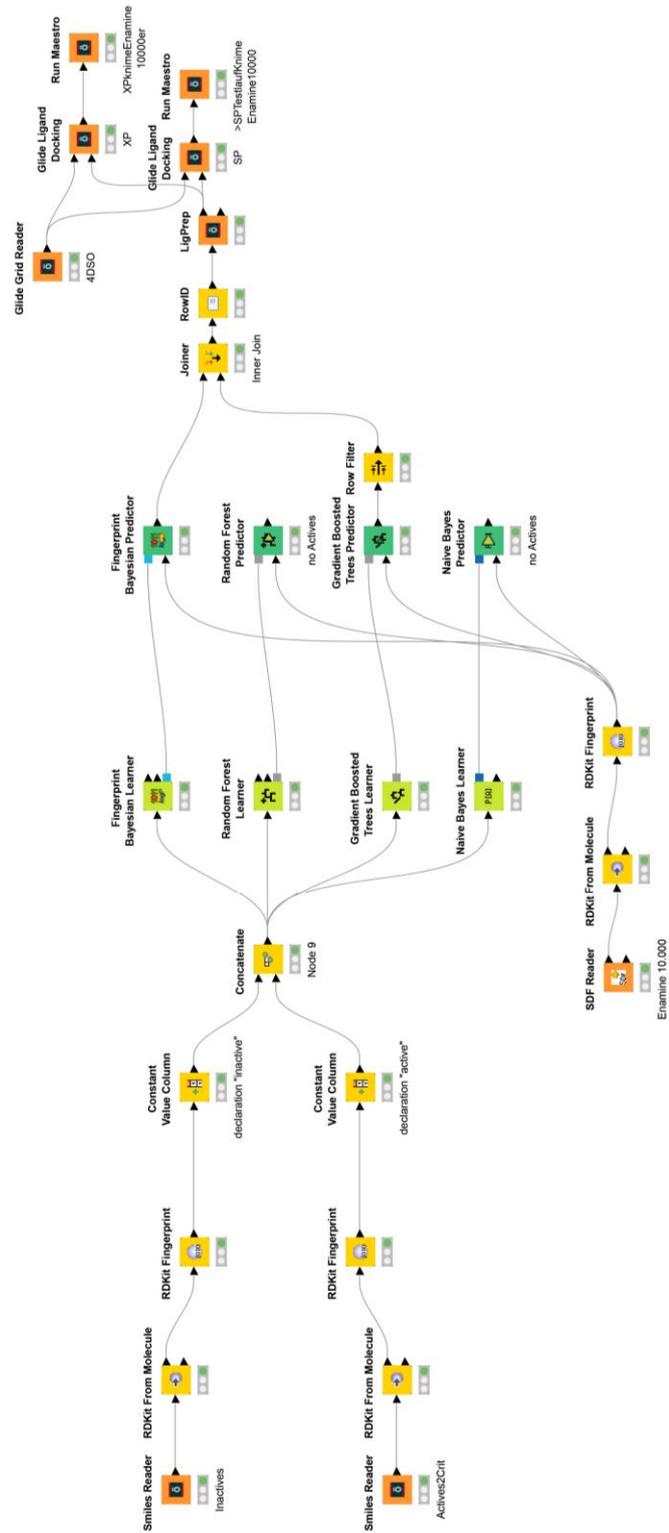


Abbildung 79: Darstellung eines Beispiels für den Knime-Ablauf.

Da die in dem QSAR-Verfahren erhaltenen Hits nicht entsprechend ihrer Potenz als *K*-RAS-Liganden sortiert sind, wurden die aktiven Verbindungen mit Hilfe eines *in-silico*-Screenings sortiert und bewertet. Alle Verbindungen wurden an die 4DSO-Kristallstruktur gedockt, da mit dieser bereits die erfolgreiche *in-silico*-Identifizierung der Carbonylverbindung **144** gelungen war. Die besten fünf Verbindungen dieses Docking-Laufes wurden ausgeschrieben und die ohne Auftragssynthese erhältlichen Verbindungen zugekauft (**Abbildung 80**).

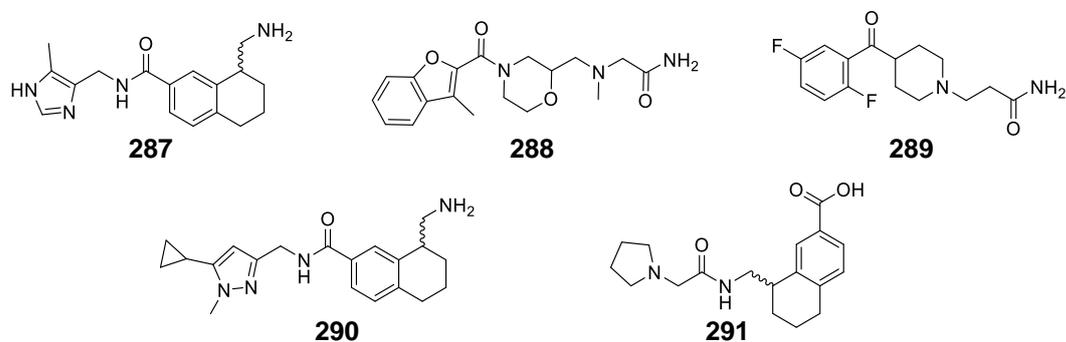


Abbildung 80: Strukturen mit den besten Docking-Scores im XP-Lauf an *K*-RAS (PDB:4DSO) für die Knime-Hits ausgehend von Strukturen, die zwei von den oben beschriebenen Parametern erfüllen.

5.9.1.2 Übertragung des Workflows auf andere Datensätze

Für eine Auswahl weiterer Liganden wurden nur diejenigen Verbindungen als aktiv bewertet, die das Kriterium 5 erfüllen und somit einen AC_{50} -Wert aufzuweisen. Auch in diesem Lauf wurden wieder die fünf Strukturen mit den besten Posen analysiert und bei entsprechender Verfügbarkeit zugekauft (**Abbildung 81**).

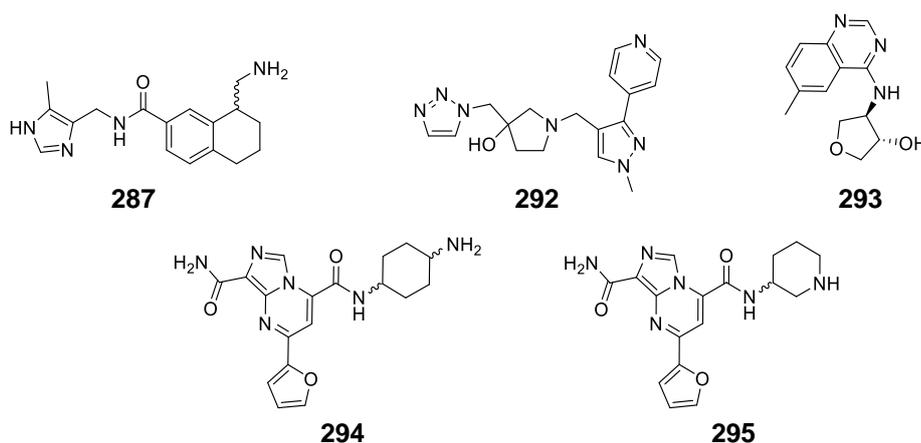


Abbildung 81: Strukturen mit den besten Docking-Scores im XP-Lauf an *K*-RAS (PDB:4DSO) für die Knime-Hits ausgehend von Aktivatoren im RAS-SOS-Austauschassay.

Für eine weitere Auswertung wurde die Schnittmenge der aktiven Verbindungen beider zuvor durchgeführten Knime-Läufe bestimmt. Die resultierenden Substanzen wurden in einem weiteren *in-silico*-Screening an *K*-RAS untersucht. Die zwölf Verbindungen mit den besten Docking-Scores wurden ausgewählt und hinsichtlich ihrer Verfügbarkeit überprüft (**Abbildung 82**). Darunter waren neben der vorher bereits in beiden Läufen identifizierten Verbindung **287** zwei Verbindungen, die mit zwei verschiedenen Derivaten unter diese zwölf Verbindungen fielen. Ihr Potenzial als *K*-RAS-Binder wurde daher als hoch eingestuft. Jeweils eines der Derivate dieser Substanzklassen wurde erworben (Verbindung **299** und **302**).

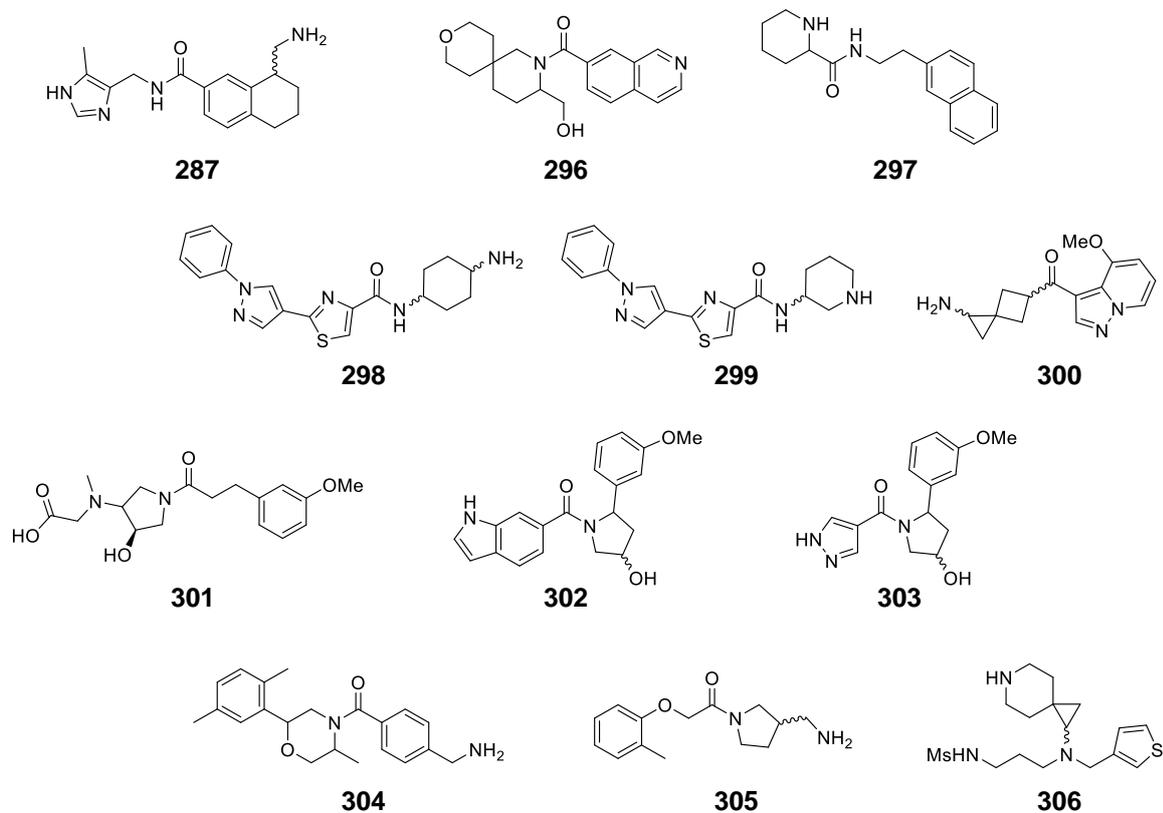


Abbildung 82: Strukturen mit den besten Docking-Scores im XP-Lauf an *K*-RAS (PDB:4DSO) für die Knime-Hits aus der Schnittmenge der zuvor beschriebenen Knime-Läufe.

5.9.1.3 Bestimmung einer zu synthetisierenden Substanz nach Ähnlichkeitssuche

Auf Grundlage der Strukturen, die aus den Knime-Läufen resultierten, wurde für eine Auswahl der Verbindungen eine Ähnlichkeitssuche mit Hilfe des „Real-Space-Navigators“ von BioSolve-IT in einer Datenbank von 15 Milliarden kommerziell erhältlichen Verbindungen durchgeführt.¹⁹⁰ Für jede der ausgewählten Verbindungen wurden 1000 Verbindungen mit maximaler struktureller Ähnlichkeit ermittelt. Die Verbindungen wurden zunächst in zwei getrennten Läufen über Glide an *K*-RAS (PDB:4DSO) gedockt.

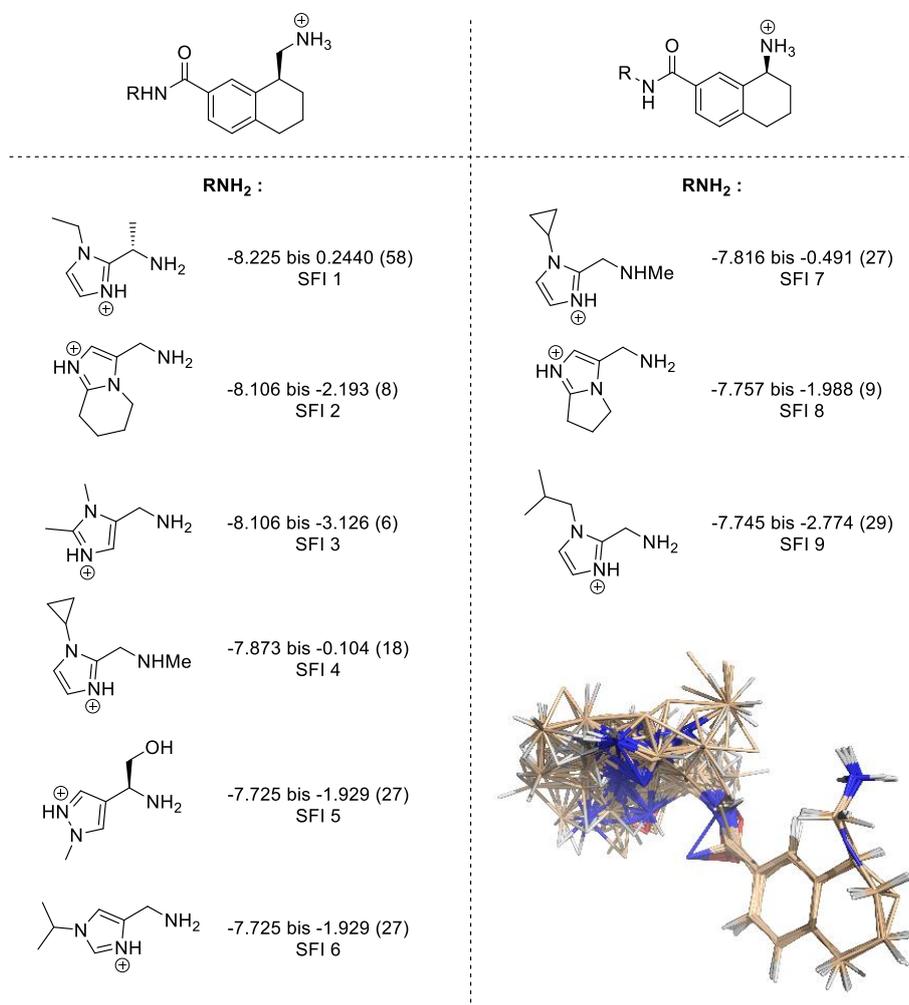


Abbildung 83: Ergebnis des ersten XP-Laufs mit aus der Ähnlichkeitssuche resultierenden Liganden. Gezeigt sind die Stereoisomere mit den besten Posen.

Da die erhaltenen Verbindungen chiral sind und durch die Ligandenvorbereitung alle Stereoisomere gebildet wurden, haben die unterschiedlichen Isomere die gleiche Benennung. Darin liegen auch die stark schwankenden Docking-Scores und die hohe Anzahl an Posen begründet (**Abbildung 83**). Das gleiche Phänomen lässt sich auch in dem zweiten Lauf beobachten (**Abbildung 84**). Da diese Gegebenheiten die endgültige Auswertung der Ergebnisse erschweren, wurde ein weiterer Docking-Durchlauf gestartet.

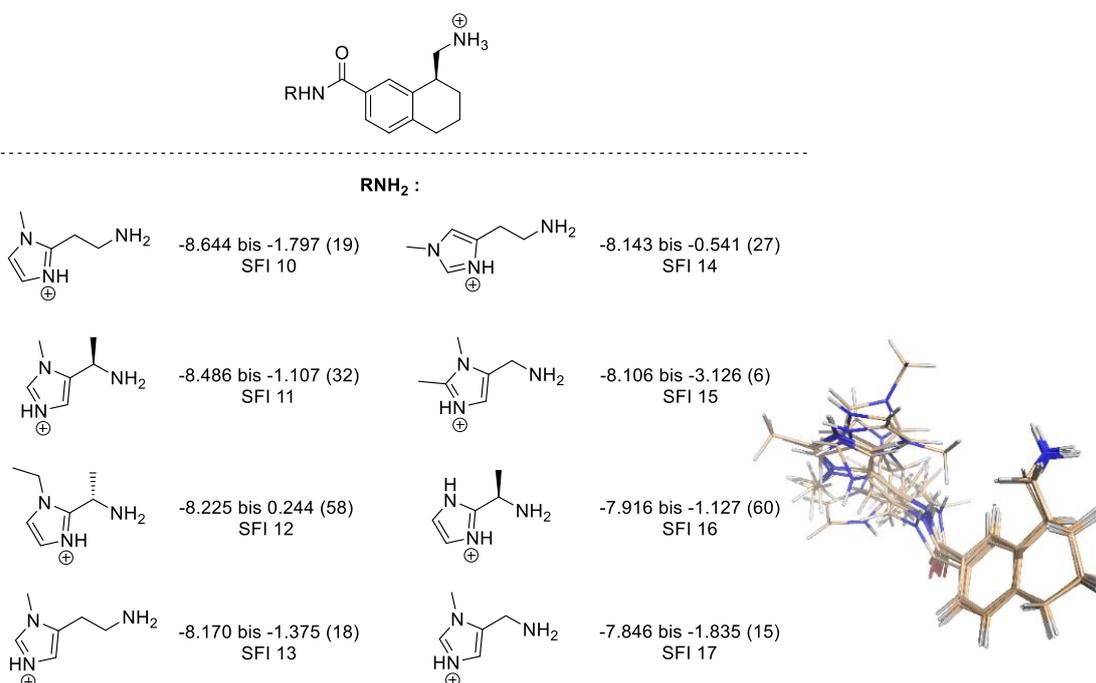


Abbildung 84: Ergebnis des zweiten XP-Laufs mit aus der Ähnlichkeitssuche resultierenden Liganden. Gezeigt sind die Stereoisomere mit den besten Posen.

Bei beiden Durchläufen fällt außerdem bei Betrachtung der überlagerten Liganden auf, dass das Kernmotiv der Strukturen auf immer gleiche Weise in der Bindetasche liegt. Aufgrund der Konservierung dieses Motivs in allen Verbindungen, die unter den besten Posen gefunden wurden, wurden drei weitere Liganden im Folgelauf berücksichtigt (**Abbildung 85**). Die Liganden waren bereits bei den auf Knime-basierenden Docking-Läufen aufgefallen.

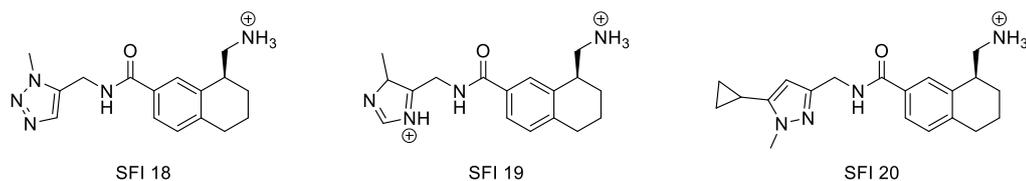


Abbildung 85: Zusätzlich berücksichtigte Verbindungen aus vorherigen Docking-Läufen, mit den jeweiligen Source-File-Idizes, die im Folgelauf verwendet wurden.

Der neue Docking-Durchgang berücksichtigte nur diejenigen Stereoisomere, die in den beiden vorangegangenen Screenings die besten Posen aufwiesen. Zwecks besserer Zuordnung wurden die in **Abbildung 83**, **Abbildung 84** und **Abbildung 85** dargestellten Verbindungen mit dem Source-File-Indizes (SFI) versehen.

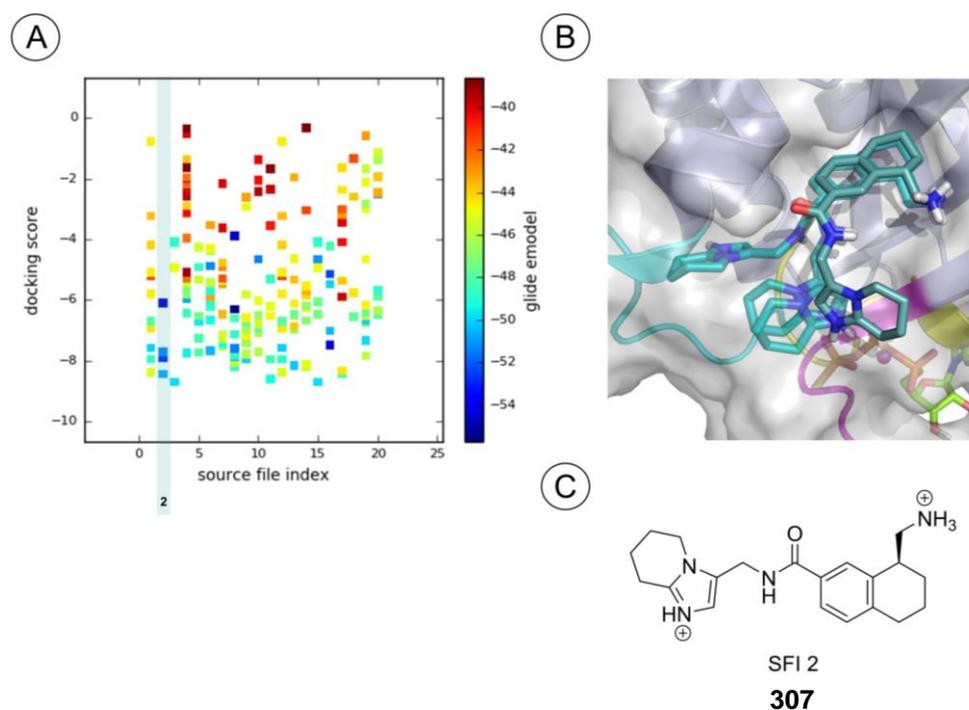


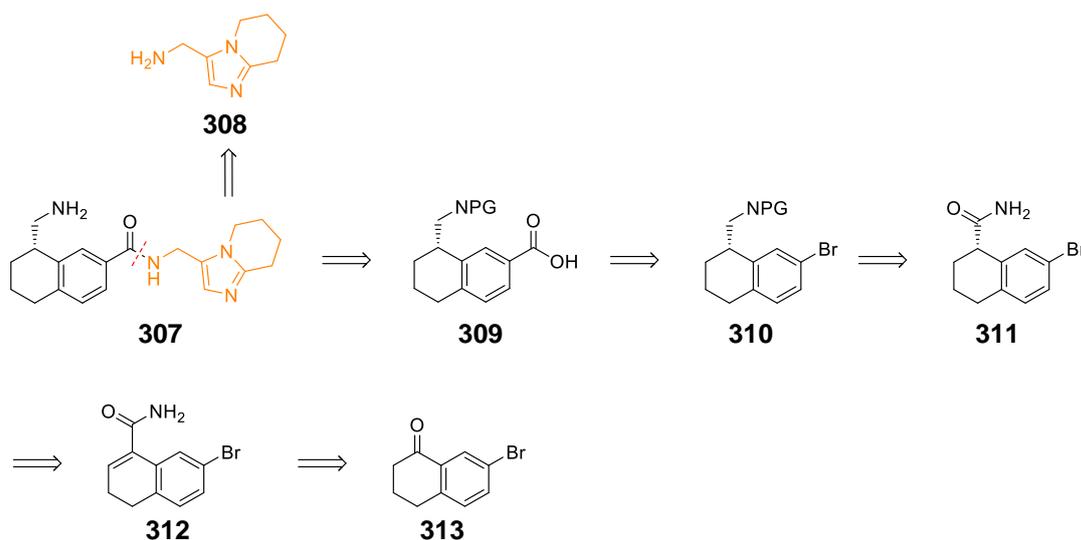
Abbildung 86: Darstellung der Ergebnisse des zusammenfassenden XP-Dockinglaufs (PDB:4DSO); (A) Darstellung der Docking-Scores zu den jeweiligen Verbindungen, gekennzeichnet über den Source-File-Index (SFI); (B) Darstellung der Posen von Verbindung **307** in der SI/II-Bindestelle von *K-RAS* (PDB:4DSO); (C) Chemische Struktur von Verbindung **307**.

Die Docking-Scores der Posen von Verbindung **307** liegen bemerkenswerterweise alle in einem ähnlichen Bereich und reichen von -6.099 bis -8.444. Da auch der Glide-Emodel-

Wert für alle Posen dieser Verbindung im Vergleich zu den anderen berechneten Verbindungen gute Werte aufzeigt, wurde diese Verbindung als Syntheseziel gewählt.

5.9.2 Studien zur Synthese der Verbindung **307**

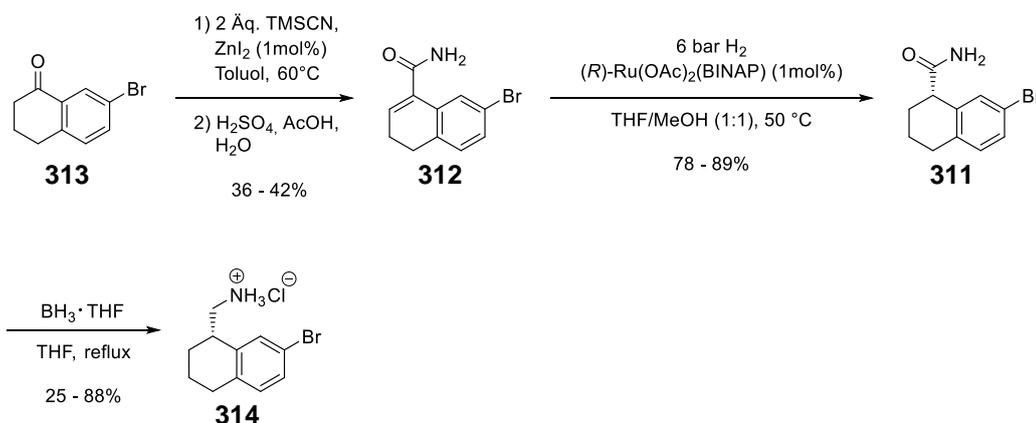
Auf Basis der Modelling-Ergebnisse zu den Strukturen der Ähnlichkeitssuche wurde die Synthese von Verbindung **307** angestrebt. Bei retrosynthetischer Betrachtung wird schnell klar, dass der Schlüsselschritt in der Amid-Kupplung besteht, die den Imidazolamin-Baustein **308** mit der entsprechenden Carbonsäure **309** verknüpft. Der Carbonsäure-Baustein **309** kann aus 7-Bromotetralon (**313**) hergestellt werden.



Schema 52: Retrosynthetische Betrachtung der Verbindung **307**, wobei das orange markierte Imidazol-Fragment **308** aufwendig zu synthetisieren gewesen wäre und somit bestellt wurde.

Für das 6-Bromotetralon war die Reaktionssequenz bis zur Reduktion zum entsprechenden Amin bekannt und wurde einer Publikation von WALLACE *et al.* entnommen.¹⁹¹ Das Tetralon-Derivat **313** wurde mit Trimethylsilylcyanid unter Zinkiodid-Katalyse und über anschließende saure Hydrolyse in das α,β -ungesättigten Carboxamid überführt. Die Doppelbindung des Systems konnte mit der von den Autoren beschriebenen enantioselektiven Hydrierung über Ruthenium-Katalyse quantitativ reduziert werden. Ausbeuteverluste entstanden, als die in der Literatur beschriebene Umkristallisation

durchgeführt wurde, um die Reinheit und den Enantiomerenüberschuss zu verbessern. Dieser lag nach der Umkristallisation passend zur Literatur bei ee = 98%. Anschließend wurde der letzte Schritt der Syntheseroute von WALLACE *et al.* auf die eigene Synthese übertragen.¹⁹¹ Besonders gute Ausbeuten wurden erhalten, nachdem das Amin durch Zugabe von Chlorwasserstoff-gesättigtem Ethylacetat als Hydrochloridsalz aus einer etherischen Lösung ausgefällt und dadurch sauber erhalten wurde.

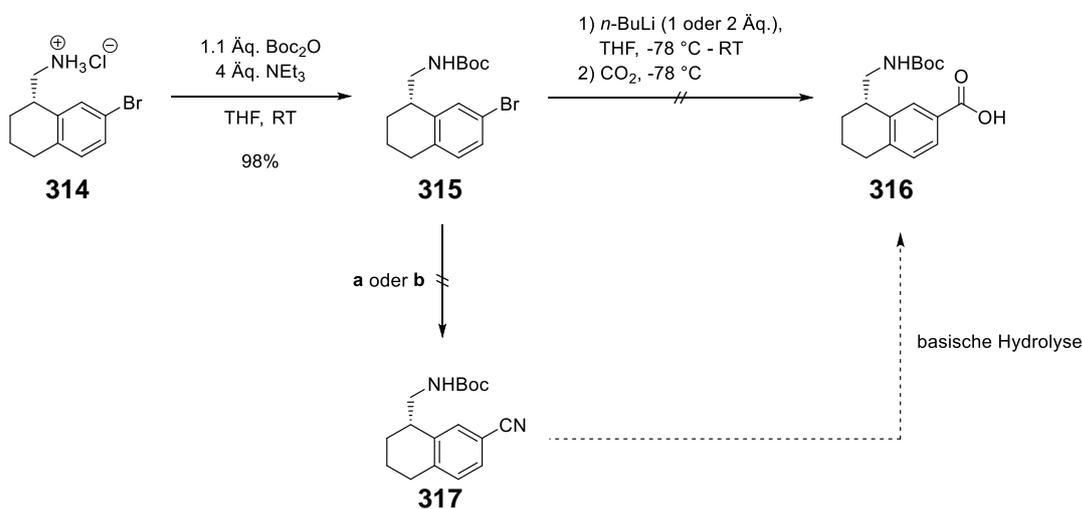


Schema 53: Enantioselektive Synthese desamins **314** als wichtiger Baustein für die Carbonsäure **309**.

Durch Schützen der Aminfunktion von Verbindung **314** sollte nun ein Derivat erhalten werden, bei dem eine Carboxylierung nach Lithium-Bromid-Austausch gelingt.

Zunächst wurde die Boc-Schutzgruppe getestet, da diese bekanntermaßen in Reaktionen mit Organolithium-Reagenzien eingesetzt wird.¹⁹² Jedoch wurde das gewünschte Produkt der Carboxylierung weder mit einem noch mit zwei Äquivalenten Butyllithium erhalten. Die experimentelle Durchführung wurde einer Veröffentlichung von CHEN *et al.* entnommen. Die Autoren carboxylierten das acetalgeschützte 7-Bromotetralon mit Hilfe von Butyllithium und Kohlenstoffdioxid.¹⁹³ Das zweite Äquivalent *n*-BuLi wurde zugegeben, um eine eventuelle Deprotonierung des Carbamats der Boc-Gruppe auszugleichen. Auch eine Cyanierung unter Anwesenheit von Übergangsmetallen war für

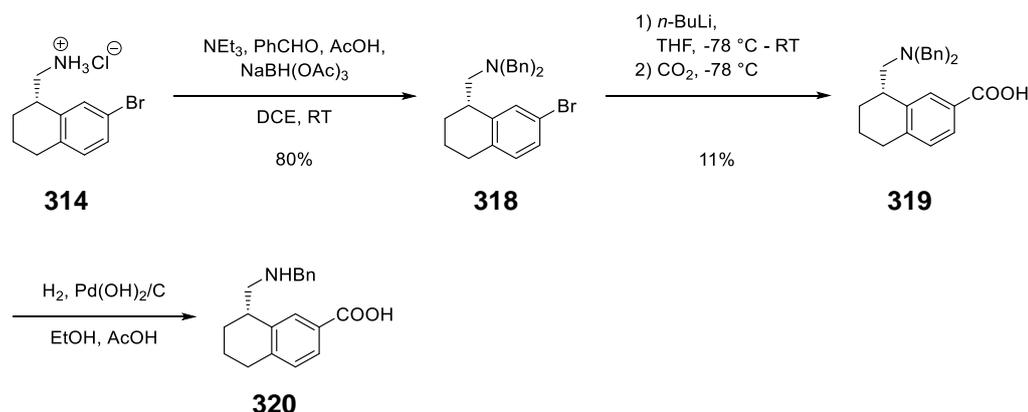
die zwei getesteten Bedingungen ohne Erfolg. Die Vorschriften für diese Cyanierungen wurden Publikationen von ZOU *et al.* und DEMONT *et al.* entnommen.^{194,195}



a) CuCN, NMP, 180 °C; **b)** Zn(CN)₂, Pd(PPh₃)₄, DMF, MW 130 °C.

Schema 54: Synthese des Boc-geschützten Derivates **315** und Versuche zu dessen Carboxylierung.

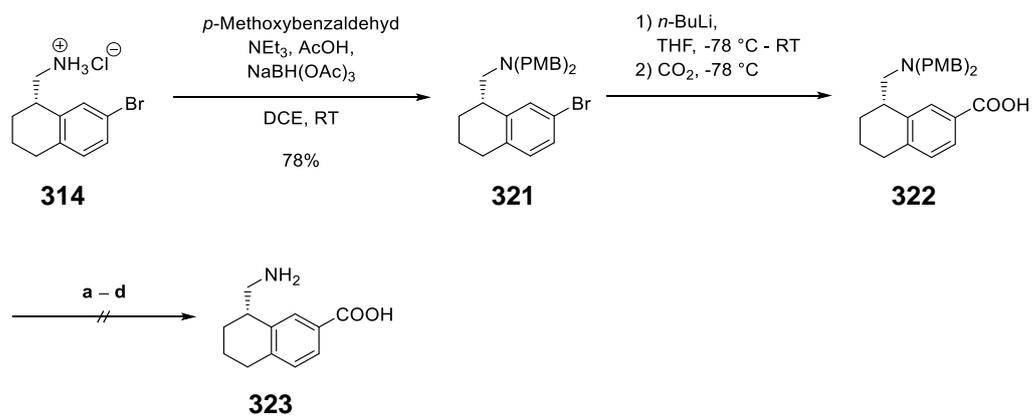
Da das Boc-geschützte Amin **315** nicht zum gewünschten Produkt umgesetzt werden konnte, bot sich eine doppelte Benzylschützung an. Das resultierende sekundäre Amin ist gegenüber Organolithium-Reagenzien auf jeden Fall stabil. Durch reduktive Aminierung des Aminohydrochlorids **314** mit zwei Äquivalenten Benzaldehyd nach einer Vorschrift von BOWEN *et al.* wurde das gewünschte dibenzylierte Produkt erhalten.¹⁹⁶ Auch die Carboxylierung über das Lithiumorganyl funktionierte mit dieser Schutzgruppenstrategie, wenn auch nur mit unvollständigen Umsatz. Das erhaltene Produkt wurde dennoch testweise unter den von BOWEN *et al.* beschriebenen hydrogenolytischen Bedingungen umgesetzt.¹⁹⁶ Bei Untersuchungen über LCMS-Messungen konnte lediglich die Masse des einfach benzylierten Produktes zugeordnet werden. Die Masse des gewünschten primärenamins hingegen wurde nicht gefunden.



Schema 55: Versuche zur Synthese von Verbindung **323**.

In einem weiteren Ansatz wurde diesmal der *para*-Methoxybenzaldehyd bei der doppelten reduktiven Aminierung eingesetzt, da dieser mehr Möglichkeiten der späteren Entschützung bietet. Auch wenn die Schutzgruppen für die spätere Amid-Kupplung nötig sind, muss vor dem Einsatz des teuren Imidazol-Bausteins **308** eine Methode zur Entschützung entwickelt werden.

Die Synthese des Bausteins **321** verlief ohne Probleme. Bei der darauffolgenden Synthese von Verbindung **322** wurde das Produkt über LCMS-Spektren nachgewiesen. Für die Entschützung zur Carbonsäure **323** wurden verschiedene Methoden getestet (**Schema 56**). In keinem Fall wurde die Entstehung des Produktes massenspektrometrisch nachgewiesen. Mit dem Ende der Laborzeit konnten keine weiteren Arbeiten mehr durchgeführt werden. Für zukünftige Arbeiten muss eine Methode zur Abspaltung der PMB-Schutzgruppen gefunden werden, bevor die Carbonsäure mit dem Imidazolbaustein zur fertigen Verbindung **307** verbunden werden kann.



a) HCl, Dioxan/H₂O (3:1); **b)** CAN, MeCN/H₂O (3:1);¹⁹⁷ **c)** TFA, Anisol, DCE, reflux;¹⁹⁸ **d)** H₂, Pd/C, Pd(OH)₂/C, MeOH.

Schema 56: Synthese des zweifach PMB-geschützten Carbonsäurederivats **322**.

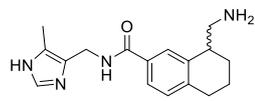
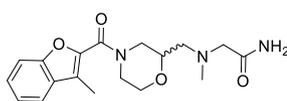
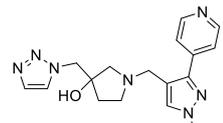
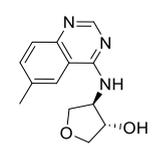
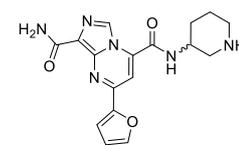
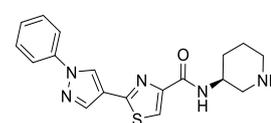
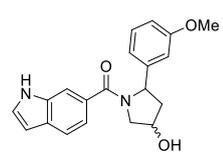
5.9.3 Diskussion der biochemischen Daten

Auch wenn die Synthese von Verbindung **307** nicht zu Ende gebracht werden konnte, so wurden dennoch biochemische Daten zu den bestellten Verbindungen ermittelt (**Tabelle 31**). Es ist zu erkennen, dass die Verbindung **287** als Derivat der Verbindung **307** keine besonders starken Effekte im auf *K-RAS4B* zeigt. Im NMR-Experiment konnte keine Bindung an die GDP-Form von RAS festgestellt werden, während auch der SOS-vermittelte Nukleotidaustausch durch die Verbindung unbeeinflusst bleibt. Lediglich im CTG-Assay zeigt die Verbindung leichte Auswirkungen auf die Zellviabilität. Hinzuzufügen ist jedoch, dass es sich bei der Kaufverbindung um ein Enantiomeregemisch handelte.

Andere Verbindungen, die aus den Lernalgorithmen hervorgegangen sind, zeigten wesentlich bessere Effekte. Während bereits für die Verbindung **288** eine schwache Affinität gegenüber dem GDP-gebundenen *K-RAS* festgestellt wurde, wurde für Verbindung **299** ein K_D -Wert von 4.3 mM ermittelt. Diese Verbindung zeigte zudem eine sehr gute Inhibition der Viabilität bei den getesteten Zelllinien. Jedoch kann die Affinität an *K-RAS* aufgrund der Größenordnungsunterschiede nicht allein für diese Inhibition der Viabilität verantwortlich sein. Üblicherweise ist eine zelluläre Wirkung bei ähnlichen Wirkstoffkonzentrationen zu erwarten, wie benötigt werden, um die Funktion des Proteins zu inhibieren. Gleichzeitig ist zu erwarten, dass die Konzentration für die Inhibition des Proteins im gleichen Konzentrationsbereich liegt wie die Affinität der Verbindung gegenüber diesem Protein.

Den besten *K-RAS*-Liganden unter diesen Substanzen stellt Verbindung **302** dar, die mit einer Dissoziationskonstante von 1.5 mM an das *K-RAS*-Protein bindet. Während dieser Ligand keinen Einfluss auf den SOS-abhängigen Nukleotidaustausch aufweist, inhibiert er als erste Verbindung die Zellproliferation bei einer Zelllinie mit *K-RAS*-Mutation wesentlich besser als bei einer Zelllinie, die den Wildtyp trägt.

Tabelle 31: Darstellung der erhobenen biochemischen Daten der bestellten Enamine-Verbindungen, die durch die Knime-Suche gefunden wurden.

Verbindung	Biochemische Daten			
	K_D [mM] 1H - ^{15}N -HSQC [mM]	IC_{50}/AC_{50} [μ M] RAS-SOS- Austausch-Assay	IC_{50} [μ M] \emptyset Cell-Titer-Glo-Assay	
	WT (GDP)	WT	K562 (WT)	SNU-1 (G12D)
 287	gelöst, keine Bindung	> 3000	268.5	>> 299.1
 288	12.9 \pm 3.5	> 3000	320.5	341.5
 292	gelöst, keine Bindung	> 3000	>> 299.1	>> 299.1
 293	gelöst, keine Bindung	> 3000	392.0	238.0
 295	gelöst, keine Bindung	965.5	>> 150.2	>> 150.2
 299	4.3 \pm 0.8	> 300	12.2	16.2
 302	1.5 \pm 0.4	> 3000	>> 299.1	98.6 (bester 71.1)

Interessant ist auch Verbindung **295**. Obwohl der Wert im RAS-SOS-Austauschassay ($AC_{50} = 965.5 \mu\text{M}$) einer sehr geringen Aktivierung entspricht, ist er dennoch bemerkenswert. Diese Verbindung wurde bei dem Knime-Durchlauf ermittelt, bei dem nur Verbindungen als aktiv deklariert wurden, die eine aktivierende Wirkung auf den Nukleotidaustausch aufwiesen.

Dies zeigt, dass neue Liganden zielgerichtet über Knime gesucht werden können. Auch wenn die Verbindungen nur eine schwache Affinität gegenüber *K*-RAS zeigen, so bringen sie dennoch neue Eigenschaften mit sich. Diese sollten in der Folge näher untersucht werden und könnten eventuell durch eine iterative Optimierung und Kombination mit anderen Liganden zu selektiven Inhibitoren modifiziert werden.

Gerade für die neuen Liganden war interessant, ob sie wie angedacht in der Switch I-Switch II-Region binden. Aus diesem Grund wurden mit den zur Verfügung stehenden Daten aus dem ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren abschließend Haddock-Rechnungen durchgeführt.

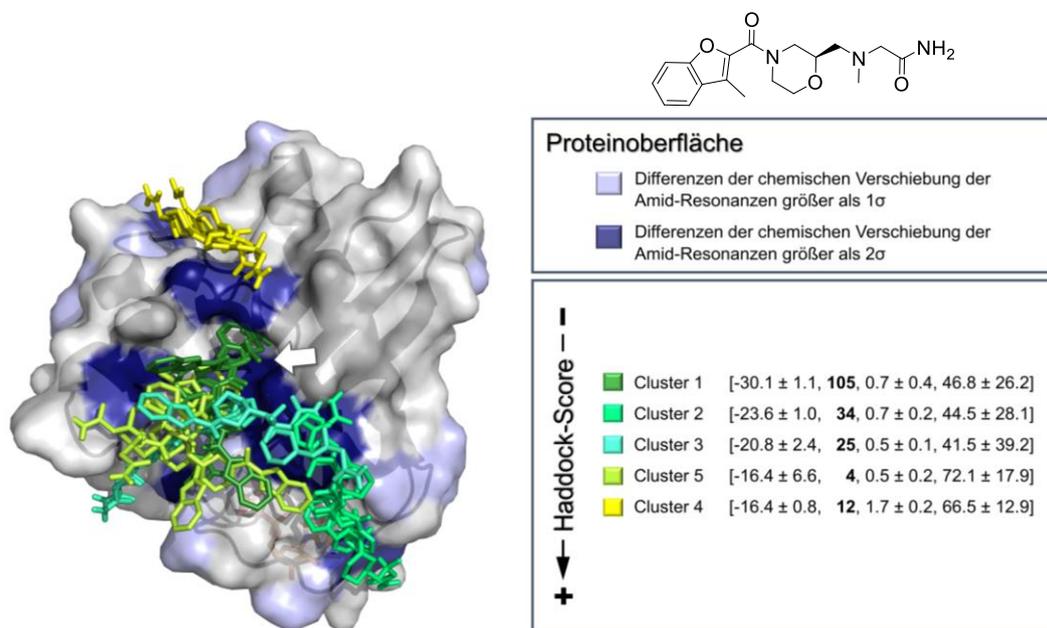


Abbildung 87: Darstellung der durch Haddock 2.4 unter Berücksichtigung der NMR-Restraints berechneten Cluster für die Bindung der Enamin-Verbindung **288** an GDP-gebundenes *K*-RAS4B^{WT} (PDB:6MBT); dabei [Haddock-Score, **Zahl der Clustermittglieder**, RMSD-Wert, Verletzungsenergie für Restraints]; der weiße Pfeil kennzeichnet die Lage der SI/II-Bindestelle.

Aus den Ergebnissen dieser Haddock-Rechnungen wird deutlich, dass die Bindung der drei Liganden in der SI/II-Bindestelle von Haddock deutlich bevorzugt ist. In allen drei Fällen liegt der energetisch am besten bewertete Cluster in dieser Bindefurche zwischen der α 2-Helix und dem β -Faltblatt und weist die größte Population an Posen auf.

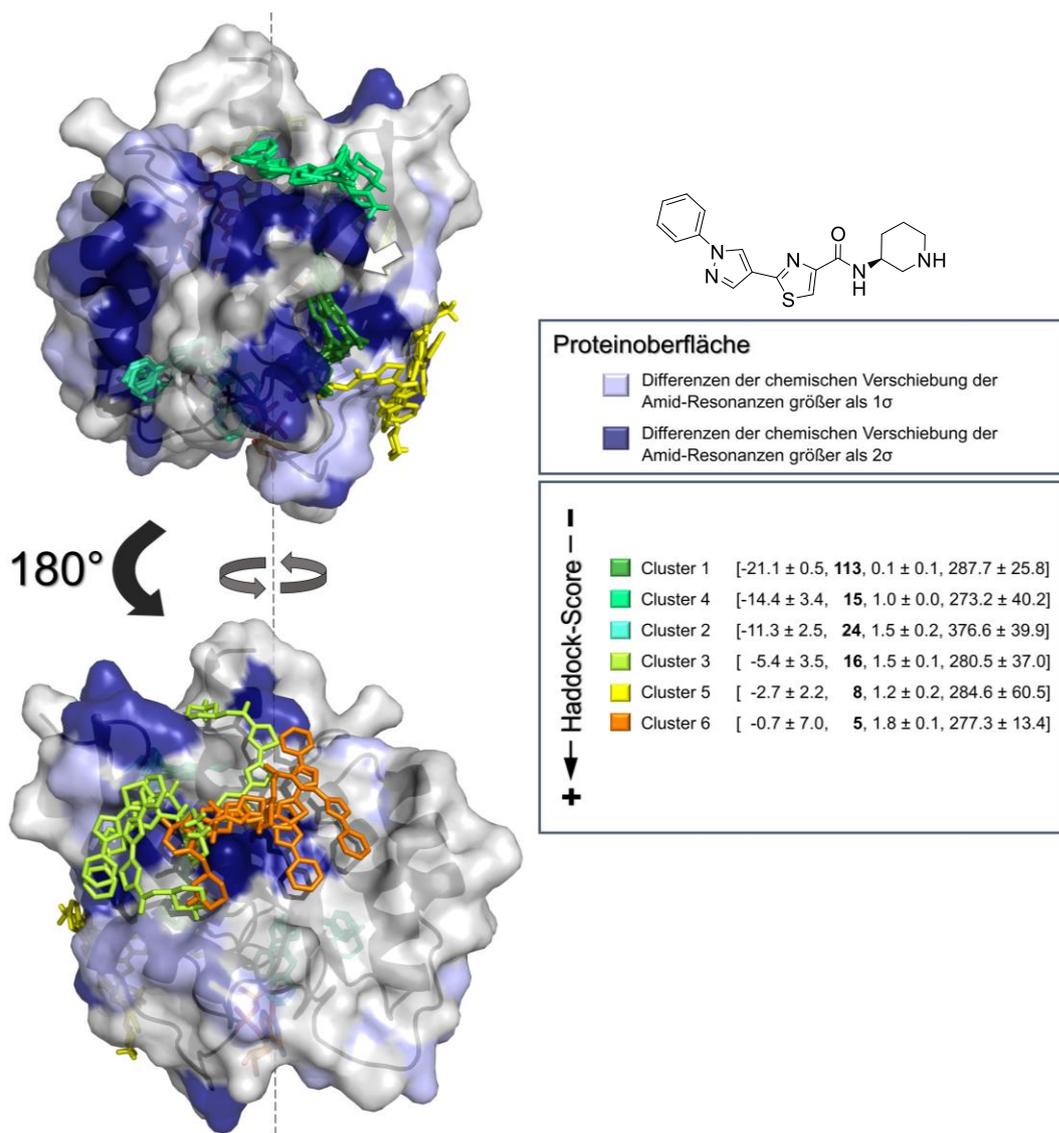


Abbildung 88: Darstellung der durch Haddock 2.4 unter Berücksichtigung der NMR-Restraints berechneten Cluster für die Bindung der Enamin-Verbindung **299** an GDP-gebundenes *K*-RAS4B^{WT} (PDB:6MBT); dabei [Haddock-Score, **Zahl der Clustermittglieder**, RMSD-Wert, Verletzungsenergie für Restraints]; der weiße Pfeil kennzeichnet die Lage der SI/II-Bindestelle.

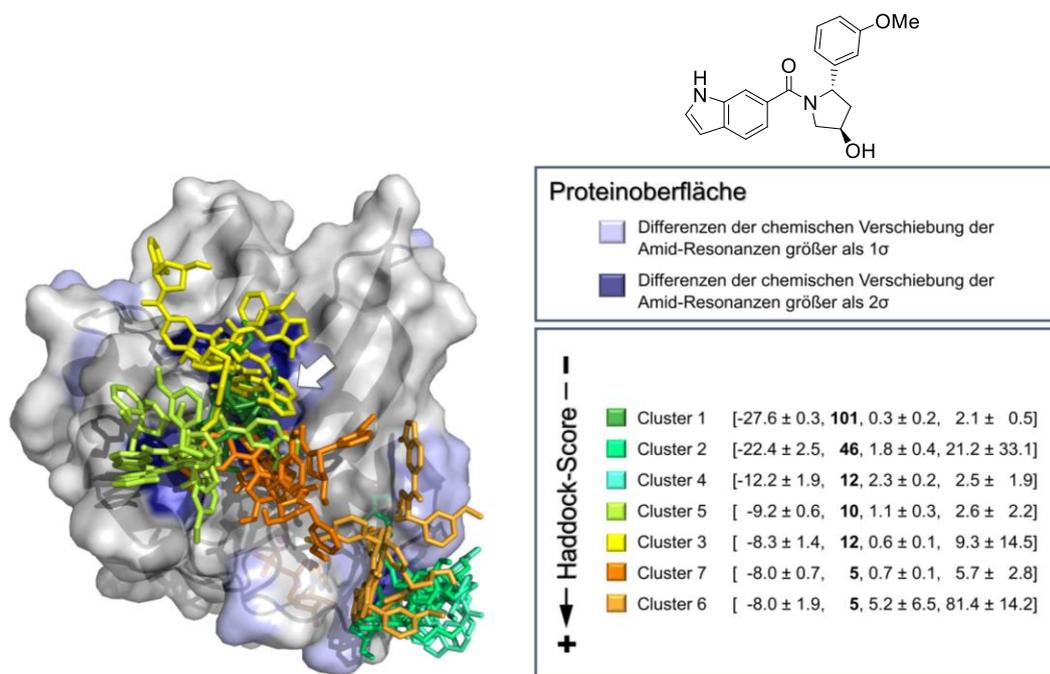


Abbildung 89: Darstellung der durch Haddock 2.4 unter Berücksichtigung der NMR-Restraints berechneten Cluster für die Bindung der Enamin-Verbindung **302** an GDP-gebundenes *K-RAS4B^{WT}* (PDB:6MBT); dabei [Haddock-Score, **Zahl der Clustermittglieder**, RMSD-Wert, Verletzungsenergie für Restraints]; der weiße Pfeil kennzeichnet die Lage der SI/II-Bindestelle.

Zusätzlich ist zu bemerken, dass für alle drei Verbindungen keine hohen Strafen für die Restriktion der gewählten Rahmenbedingungen bezüglich dieser Cluster berechnet wurden. Dies gilt zumindest im direkten Vergleich mit den anderen Clustern des jeweiligen Laufes. Die hohen Werte bei Verbindung **299** in diesem Bereich werden vermutlich durch die hohe Anzahl von veränderten Aminosäureverschiebungen hervorgerufen, die anhand der großflächigen Blaufärbung der Oberfläche des Proteins zu erkennen ist (**Abbildung 88**).

Die Ergebnisse der Haddock-Rechnungen bestätigen also, dass unter Zuhilfenahme einer strukturbasierten Suche mit nachfolgender Auswahl über ein Docking in der gewünschten Bindestelle, neue Liganden gefunden werden können, die genau in dieser Region binden. Setzt man die Bindung der so gefundenen Liganden in den Kontext der RAS-Proteine, stellt dies einen signifikanten Fortschritt dar.

6 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden ausgehend von bekannten Bisphenol-Derivaten, die an *K*-RAS4B binden, sowohl durch klassische Struktur-Wirkungs-Beziehungen als auch durch computergestützte Suche neue RAS-Liganden gefunden.

Eine Variation der phenolischen Hydroxygruppen des Bisphenol S (BPS, **102**) zu Aminen brachte eine Verbesserung der Affinität. Von weiteren Derivatisierungen erzielte lediglich der Austausch des Sulfons gegen einen Bisarylthioether eine ähnliche Wirkung.

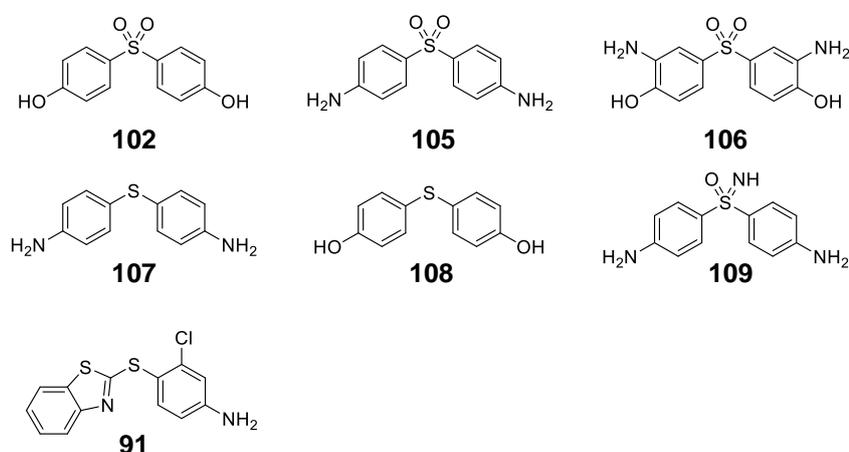


Abbildung 90: Bisphenol S (BPS, **102**) und seine Derivate, deren Bindung an *K*-RAS untersucht wurde.

Die Affinität von Bisphenol A (**101**), Bisphenol AF (**103**) und des 4,4'-Dihydroxybenzophenons (DHBP, **118**) gegenüber *K*-RAS konnte hingegen nicht durch einen Austausch der Hydroxygruppen gegen Amine verbessert werden.

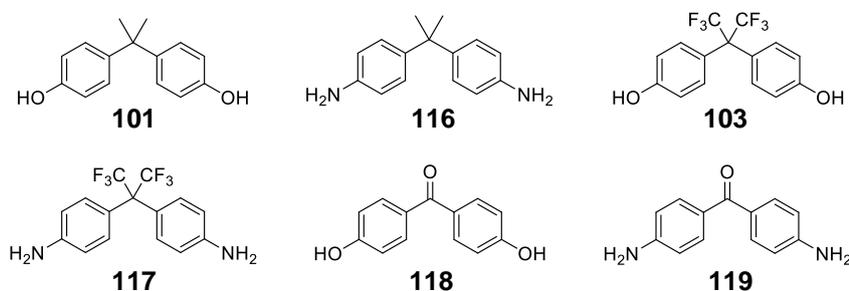


Abbildung 91: Darstellung von Bisphenol A (BPA, **101**), Bisphenol AF (BPAF, **103**) und 4,4'-Dihydroxybenzophenon (DHBP, **118**) und der entsprechenden Aminderivate.

Für das DHBP (118), das zuvor nur als Rheb-Ligand bekannt war, wurde durch die Derivatisierungen der Carbonylgruppe eine Steigerung der Affinität um etwa den Faktor zehn gesteigert. Dabei waren aromatische Hydrazine und Sulfonylhydrazide sowie das *O*-Benzylhydroxylamin Kondensationspartner des DHBPs, die zu zellulär aktiven Verbindungen führten. Jedoch zeichnete sich unter den verschiedenen Derivaten kein klarer Trend ab, welche Substituenten für eine Bindung an RAS günstig sind. Somit war keine zielgerichtete Optimierung der DHBP-Derivate möglich.

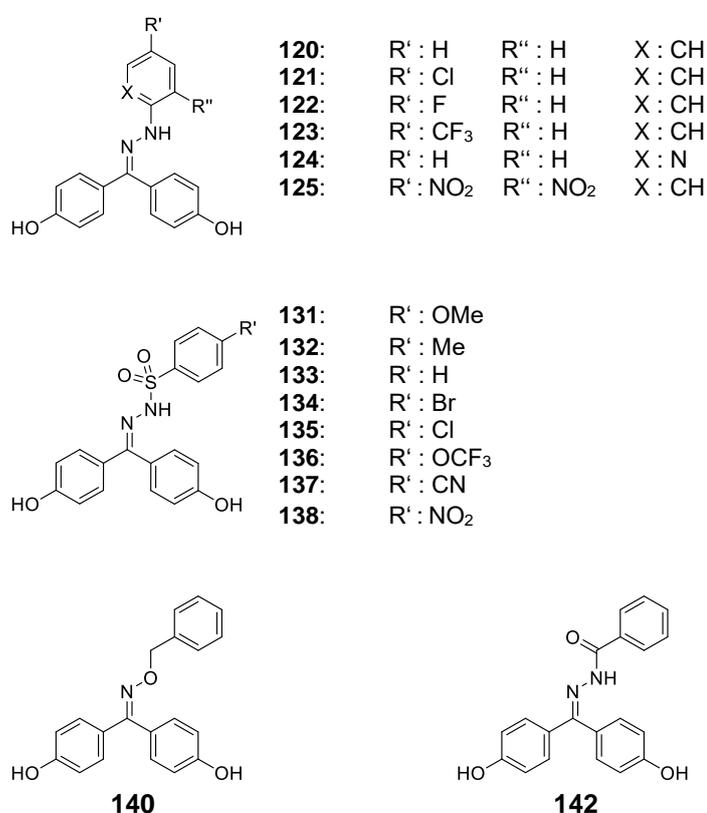


Abbildung 92: Kondensationsprodukte von DHBP, die im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert und von den Projektpartnern getestet wurden.

Stattdessen wurden die gesammelten Daten zu den Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Bisphenole genutzt, um *in silico* eine Substanzbibliothek aufzubauen. Aus dieser Bibliothek von etwa 360.00 Verbindungen wurde nach Untersuchungen mit der Schrödinger-Software ein Ligand ausgewählt und synthetisiert. Diese Verbindung (**144**) erreichte im NMR-Experiment eine Dissoziationskonstante von 500 μ M für *K*-RAS (GDP) und wies im MST-

Experiment sogar einen K_D -Wert von $59 \mu\text{M}$ für GDP-gebundenes und $34 \mu\text{M}$ für GppNHp-gebundenes *K*-RAS auf. Auch in Assays an Zellen mit verschiedenen RAS-Mutationen zeigte die Verbindung beeindruckende, wenn auch nicht selektive Wirkung. Die Derivatisierung dieser Carbonylverbindung mit *O*-Benzylhydroxylamin in Analogie zum DHBP-Derivat zeigte dabei nicht den erhofften synergistischen Effekt und verbesserte die Bindung des Liganden kaum.

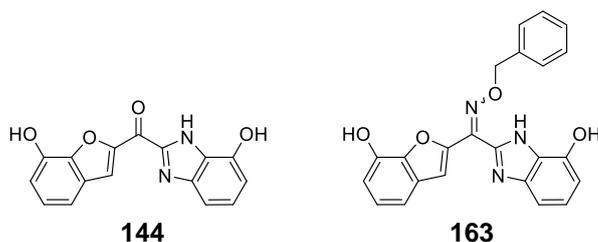


Abbildung 93: Darstellung des über Struktur-Wirkungs-Beziehungen mit der Schrödinger-Software ermittelten *K*-RAS-Liganden und des daraus hergestellten Benzoyloxims.

Ein umfassender Teil der synthetischen Arbeiten befasste sich mit der Synthese eines Liganden, der durch *in silico* Fragment-Merging als potenzieller *K*-RAS-Ligand entdeckt wurde. Dabei war ein basisches Fragment durch ein Screening an einer zweiten Bindestelle, die durch eine Erweiterung der SI/II-Bindestelle offengelegt wird, erhalten worden. Durch Verbrückung über einen kurzen Alkyllinker wurde dieses Fragment mit dem *K*-RAS-Liganden BPNH₂ verbunden. Die erhaltene Verbindung (**166**) zeigte jedoch nach ihrer Fertigstellung eine deutlich schlechtere Affinität gegenüber *K*-RAS als der Ausgangsligand.

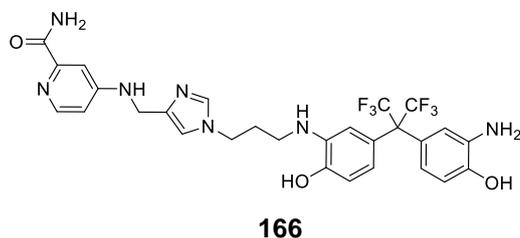


Abbildung 94: Darstellung des um ein basisches Fragment erweiterten BPNH₂-Derivates.

Zu erwarten gewesen wäre eine Verschlechterung der Affinität durch den Entropieeffekt des Alkyllinkers. Durch NMR-Untersuchungen der Bochumer Arbeitsgruppe mit dem zweiten Fragment wurde aber gezeigt, dass dieses nicht an das Protein bindet. Eine

Erklärung hierfür könnte die Rolle des Wassers bei der Assoziation von Liganden sein, die nur mit hohem Aufwand zu berechnen ist und somit nicht ausreichend im Docking-Ergebnis berücksichtigt ist. Beispielsweise könnte die Hydrathülle des polaren Molekülfragmentes für einen Verlust an Bindungsenthalpie sorgen.

Ein weiteres medizinisch-chemisches Konzept, das in dieser Arbeit angewendet wurde, ist der Ansatz der sogenannten PROTACs. Diese großen Moleküle bestehen aus zwei verbrückten Liganden, wobei der eine einen Liganden des Zielproteins und der andere einen Liganden eines an der Proteolyse beteiligten Proteins darstellt. Durch die räumliche Nähe, in die die beiden Proteine durch den PROTAC gelangen, kommt es zum Abbau des adressierten Proteins. In den Forschungsarbeiten konnten drei PROTAC-Strukturen synthetisiert werden, die auf literaturbekannten *K*-RAS-Liganden basieren.

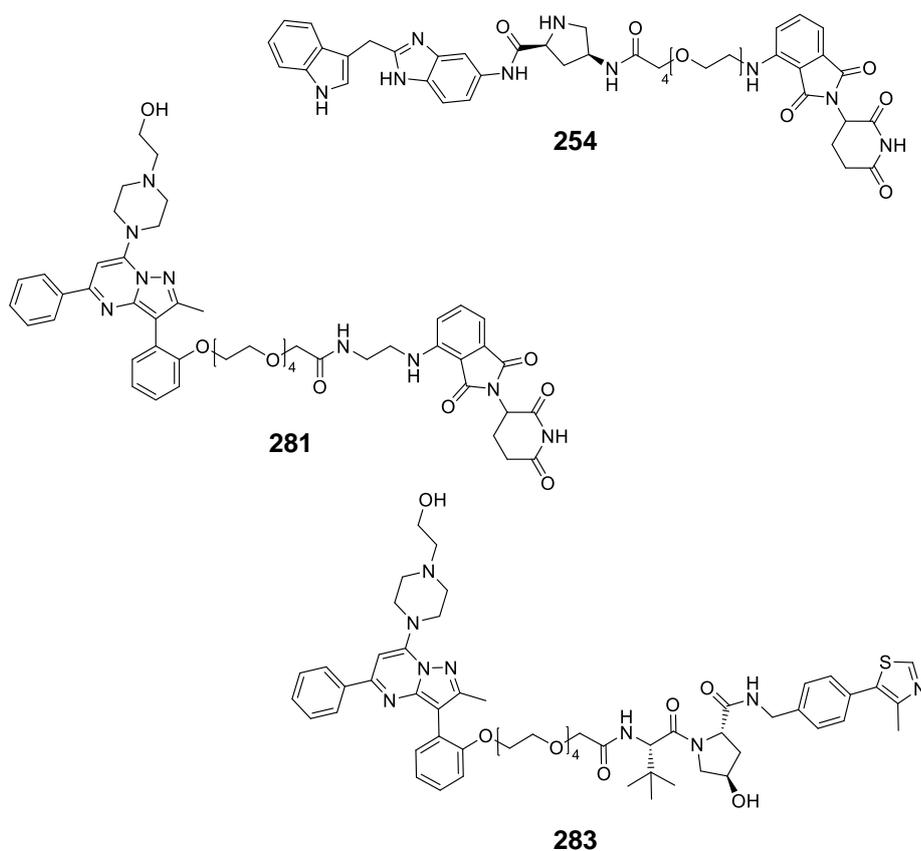


Abbildung 95: Darstellung der drei synthetisierten PROTAC-Strukturen ausgehend von Liganden der Arbeitsgruppen von FESIK und GORFE.

Diese Verbindungen zeigten zwar zelluläre Aktivität, jedoch konnte für zwei der Verbindungen (**281** und **283**) kein Beweis für eine Wirkung durch Assoziation an RAS gefunden werden. Die dritte Verbindung (**254**) wies keine erhöhte zelluläre Wirksamkeit im Vergleich zum zugrundeliegenden *K*-RAS-Liganden auf. Da nicht feststeht welcher Modus des Proteinabbaus für das entsprechende Zielprotein der Richtige ist und mit welcher Distanz die beiden Proteine die besten Wechselwirkungen eingehen, bedingt dieses Konzept die Notwendigkeit eines empirischen Vorgehens. Aus zeitlichen Gründen war es nur möglich, PROTAC-Strukturen mit einer einzigen Linkerlänge zu synthetisieren. Das Konzept bietet somit noch viel Spielraum für die Suche nach Wirkstoffen gegen dauerhaft aktivierte *K*-RAS-Mutanten.

Um dieses Ziel zu erreichen, müssen zunächst selektive Liganden für einzelne *K*-RAS-Mutanten gefunden werden, um eine zielgerichtete Therapie zu ermöglichen. Die SI/II-Bindestelle ist dabei in inaktiver und aktiver Form aller RAS-Isoformen konserviert, was die Herausforderung der Selektivität birgt.⁹⁴ Dies ist möglicherweise ein Grund für die schwachen Selektivitäten, die für die untersuchten Verbindungen festgestellt wurden.

Im letzten Teil der Forschungsarbeiten konnten schwache Liganden gefunden werden, die eine Selektivität gegenüber einzelnen *K*-RAS-Mutanten aufweisen. Die strukturbasierte Suche dieser Liganden wurde über Vorhersagemodelle durchgeführt, die mit dem Programm Knime erstellt wurden. Eine Sortierung der aus einer Bibliothek von etwa 360.000 Substanzen als aktiv bestimmten Verbindungen erfolgte im Anschluss über das Schrödinger-Softwarepaket.

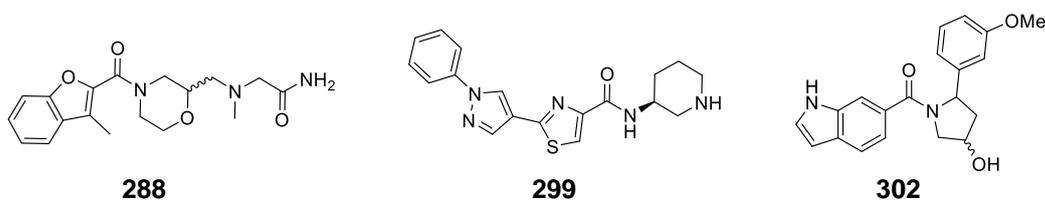


Abbildung 96: Darstellung der drei Liganden, die über Knime identifiziert wurden und nachweislich an *K*-RAS4B binden.

Auch wenn die Synthese eines ausgewählten *in silico* Screening-Hits nicht abgeschlossen werden konnte, zeigen einige der käuflich erworbenen Verbindungen aus diesen Docking-Läufen eine Affinität gegenüber *K*-RAS. Darüber hinaus tritt für die affinste Verbindung (**302**) eine gewisse Selektivität bei der Wirkung in G12D-mutierten Zellen auf, während Zellen des Wildtyps eine geringe Inhibition der Zellviabilität erfahren. Haddock-Rechnungen, die unter Berücksichtigung der NMR-Untersuchungen zur Bindung des Liganden durchgeführt wurden, zeigen, dass die Verbindungen in der SI/II-Bindestelle binden. Somit ist es eventuell doch möglich selektive Liganden für diese in verschiedenen Konformationen und Mutationen konservierten Bindestelle zu finden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Glide als Teil des Schrödinger-Softwarepaketes die Posen der Liganden in einer Bindestelle gut vorhersagen kann und geeignet ist, die Hitrate an aktiven Verbindungen zu verbessern. Angewandt auf die Ergebnisse von Vorhersagemodellen, die mit Knime erzeugt werden, kann diese Ausbeute bei entsprechender Datenlage weiter verbessert und neue Liganden für Zielproteine können gefunden werden. Um noch bessere Ergebnisse zu erhalten, sollten die Vorhersagemodelle iterativ verfeinert werden. Zudem könnte MM-GBSA als Methode für die relative Abschätzung von Bindungsenergien für eine Validierung vielversprechender Liganden verwendet werden, die durch die *in silico* Suche gefunden wurden. Durch die Maximierung der Hitrate mit Hilfe computergestützter Methoden könnte der synthetische Aufwand auf dem Weg zum gewünschten Wirkstoff so deutlich verringert werden.

7 Experimententeil

7.1 Allgemeine Angaben zur Laborpraxis

7.1.1 Chemikalien, Lösungsmittel und Glasgeräte

Bei allen beschriebenen Versuchen wurden die Chemikalien von den Firmen Alfa Aesar, Fischer Scientific, ABCR, Fluorochem, Sigma-Aldrich, TCI, Chempur, VWR oder Enamine bezogen. Reaktive Substanzen wurden umkristallisiert oder destilliert, wenn sie dem internen Chemikalienlager entnommen wurden. Die Lösungsmittel wurden entweder rein erworben oder nach üblichen Methoden gereinigt und getrocknet. Die Lösungsmittel Dichlormethan, Tetrahydrofuran, Acetonitril und Diethylether wurden einer Lösungsmittelanlage (Firma MBraun, MB-SPS-800) entnommen, falls redestilliertes oder HPLC-Grade Lösungsmittel qualitativ nicht ausreichend war. DMF wurde grundsätzlich mit Hilfe von Helium entgast, um Spuren von Dimethylamin zu entfernen. Für den Fall, dass Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt werden musste, wurden Rotationsverdampfer der IKA GmbH & Co. KG und Büchi Labortechnik GmbH oder eine Vakuumpumpe der Firma Vacuubrand verwendet. Eine Lyophile des Modells GOT 2000 der Firma Zirbus wurde genutzt, um wässrige Lösungen gefrierzutrocknen.

Bei Reaktionen, die unter Ausschluss von Wasser geführt werden mussten, wurden die verwendeten Glasgeräte und Rührfische zunächst mehrere Stunden in einem Trockenschrank getrocknet und dann heiß verbaut bevor sie weitere Male unter Vakuum ausgeheizt wurden. Anschließend wurden konventionelle SCHLENK-Techniken zum Arbeiten unter Inertgasatmosphäre angewandt.

7.1.2 Reaktionskontrollen

Zur Überprüfung von Reaktionsfortschritten oder Bestandteilen von Fraktionen bei der Säulenchromatographie wurden Dünnschichtchromatographien mit Aluminium-Fertigfolien fluoreszenzmarkierten Kieselgels (ALUGRAM® Xtra SIL G/UV254 oder ALUGRAM® RP-18W/UV₂₅₄) der Firma Macherey-Nagel verwendet. Verbindungen wurden durch Fluoreszenz-Löschung unter UV-Licht (254 nm) und/oder Anfärbung mit einer Kaliumpermanganatlösung (3.0 g K₂MnO₄, 20 g K₂CO₃, 5 mL 5%ige Natronlauge, 300 mL Wasser) oder Cer-Molybdato-phosphorsäurelösung (5.0 g Molybdato-phosphorsäure, 200 mL Wasser, 16 mL konz. H₂SO₄, 2 g Ce(SO₄)₂) durch Eintauchen und anschließendes Entwickeln mit einem Heißluftföhn detektiert. Amine wurden mit Hilfe einer Ninhydrinlösung (1.5 g, 100 mL *n*-BuOH, 3.0 mL AcOH) angefärbt. Weiterhin wurden bei einigen Reaktionen, deren Reaktionsfortschritt durch Dünnschichtchromatographie nicht ausreichend verfolgt werden konnte, LC-MS-Messungen an einer Shimadzu LC-2030C 3D Plus durchgeführt. Dabei wurden die HPLC-Säulen Shim-pack Giss (2.1 × 50 mm, 1.9 µm C18) der Firma Shimadzu und EC 150/3 Nucleodur C18 Gravity-SB (5 µm) der Firma Macherey-Nagel verwendet.

7.1.3 Aufbereitung der Produkte

Für die säulenchromatographische Trennung von Substanzgemischen wurde Kieselgel 60 der Firma Macherey-Nagel (Partikeldurchmesser 40 – 63 µm, Porendurchmesser 60 Å) und vorgepackte Kieselgelkartuschen der Firma Interchim verwendet (verschiedene Größen von PF-15SIHP oder PF-30SIHP). Die Trennungen wurden in der Regel an Fraktionssammlern (Pharmacia LKB SuperFrac) sowie an einer Flash-Anlage der Firma Interchim durchgeführt (puriFlash® XS 420). Trennungen über Umkehrphase wurden an einem zweiten Interchim-Gerät (puriFlash® 4250) durchgeführt. Dabei kamen präparative HPLC-Kartuschen der Firma Macherey-Nagel (SP 250/21 NUCLEODUR 110-5 C18 ec

oder VP 250/21 NUCLEODUR HILIC, 5 μm) und Flash-Kartuschen der Firma Interchim (verschiedene Größen von PF-15C18AQ) zum Einsatz. Die für die mobile Phase verwendeten Lösungsmittelgemische wurden aus destillierten oder HPLC-Lösungsmitteln hergestellt.

7.1.4 *Analytik der sauberen Produkte*

Zur Messung der ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektren wurden die NMR-Spektrometer Bruker Avance – 400 und Bruker Avance III – 600 (Messfrequenz: ^1H -NMR: 600 MHz, ^{13}C -NMR: 150 MHz, ^{19}F -NMR: 565 MHz) verwendet. Alle Spektren wurden ausschließlich unter Gebrauch von deuterierten Lösungsmitteln aufgenommen, außer jene, die zur Überprüfung der Löslichkeit der Endsubstanzen durchgeführt wurden (50 μL D_2O , 500 μL H_2O , 20 μL einer 100 mM Lösung des Liganden in $\text{DMSO-}d_6$). Für alle NMR-Spektren ist die Kopplungskonstante J in Hz und die Verschiebung δ in ppm angegeben.

Die massenspektroskopischen Daten wurden mit einem micrOTOF-Spektrometer der Firma Bruker und die dazugehörigen ermittelt, wofür die Proben in MeCN und/oder Wasser gelöst wurden. Bei gekoppelten LC-MS-Messungen wurde eine HPLC-Anlage der Agilent 1100 Series verwendet. Alternativ wurde ein Gerät der Firma Shimadzu, die LCMS-2020 mit der HPLC-Anlage Prominence-i LC-2030C, verwendet. Die folgenden Methoden wurden dabei genutzt und sind für die jeweiligen Substanzen angegeben:

- **Methode I:** Bruker micrOTOF + Agilent 1100 Series; HPLC-Säule: Perfect Sil Target ODS-3 HD 5 μm , 100 x 4.6 mm; ESI: Gradient 90% Wasser (5 mM NH_4OAc) bis 90% MeCN; 24 min; 1.5 mL/min; 220 nm oder 254 nm, positiv
- **Methode II:** Bruker micrOTOF + Agilent 1100 Series; HPLC-Säule: Perfect Sil Target ODS-3 HD 5 μm , 100 x 4.6 mm; ESI: Gradient 90% Wasser

(5 mM NH₄OAc) bis 90% MeCN; 24 min; 1.5 mL/min; 220 nm oder 254 nm, negativ

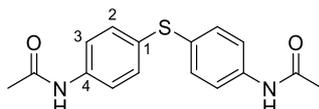
- **Methode III:** Shimadzu LCMS-2020 + Prominence-i LC-2030C; HPLC-Säule: Shim-packGISS 1.9 µm, 50 x 2.1 mm; ESI: Gradient 95% Wasser bis 95% MeCN (0.1% HCOOH); 12 min; 400 µL/min; 220 nm oder 254 nm, positiv
- **Methode IV:** Shimadzu LCMS-2020 + Prominence-i LC-2030C; HPLC-Säule: Shim-packGISS 1.9 µm, 50 x 2.1 mm; ESI: Gradient 95% Wasser bis 95% MeCN (0.1% HCOOH); 12 min; 400 µL/min; 220 nm oder 254 nm, negativ

Ein Bruker-Alpha-Spektrometer wurde zur Messung der IR-Spektren eingesetzt, wobei die Proben als Reinsubstanz oder nach Abdampfen des Lösungsmittels aus einer Lösung vermessen wurden. Feststoffe wurden aufgetragen und mit einem Diamantstempel aufgedrückt, während Flüssigkeiten als dünner Film vermessen wurden.

7.2 Synthesevorschriften

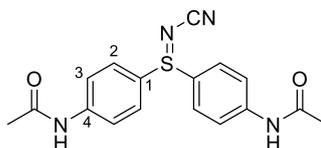
7.2.1 Synthese des Dapson analogen Sulfoximins 109

4,4'-Diacetamidodiphenylsulfid (110, JES-033)



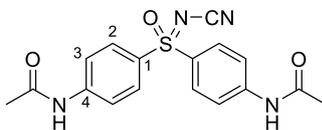
Zu einer Lösung von Bis-(4-aminophenyl)sulfid (**107**) (500 mg, 2.31 mmol) in 3.3 mL trockenem CH_2Cl_2 wurde tropfenweise Essigsäureanhydrid (520 μL , 5.60 mmol) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei RT gerührt und nach Abschluss der Reaktion mit Wasser versetzt. Der entstandene Feststoff wurde abfiltriert, mit Na_2CO_3 -Lösung gewaschen und in siedendem Ethanol gelöst/suspendiert. Nach Zugabe geringer Mengen Wasser fiel das Produkt als pink-weißer Feststoff aus (646 mg, 2.15 mmol, 93%).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10.17 (2H, s, $-\text{CONH}-$), 7.58 (4H, d, $J = 8.68$ Hz, $H3$), 7.23 (4H, d, $J = 8.84$ Hz, $H2$) 2.03 (6H, s, $-\text{CH}_3$). $^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 168.3 ($-\text{CONH}-$), 138.7 ($C1$), 131.3 ($C2$), 128.6 ($C4$), 119.8 ($C3$), 23.9 ($-\text{CH}_3$). **LCMS** (ESI): $t_{\text{R}} = 6.8$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 301.1 $[\text{M}+\text{H}^+]$ (100.0), 601.2 $[2\text{M}+\text{H}^+]$ (30.2). **HRMS** (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2\text{SNa}^+$ $[\text{M}+\text{Na}^+]$ 323.0825; gef. m/z 323.0825. **IR** (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 3292$ (m), 3184 (w), 3111 (w), 1657 (m), 1604 (w), 1588 (m), 1538 (w), 1511 (m), 1490 (w), 1424 (w), 1394 (s), 1364 (w), 1315 (m), 1281 (w), 1257 (w), 1177 (w), 1108 (w), 1082 (w), 1041 (w), 1013 (m), 972 (w), 958 (w), 923 (w), 833 (m), 814 (s), 766 (m), 719 (w), 705 (w), 648 (m), 636 (w), 610 (w), 588 (w), 577 (s), 528 (m), 503 (s), 469 (w), 456 (m), 415 (w).

N-Cyano-4,4'-diacetamidodiphenylsulfimin (111, JES-037)

Bei 0 °C wurden Diacetoxyiodbenzol (472 mg, 1.46 mmol) und Cyanamid (88.4 mg, 2.00 mmol) zu einer Lösung von 4,4'-Diacetamidodiphenylsulfid (**110**) (400 mg, 1.33 mmol) in 6.6 mL DMF gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 30 Minuten bei 0 °C und anschließend bis zum Abschluss der Reaktion bei RT gerührt. Nach Zugabe von Wasser wurde viermal mit CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaHCO₃-Lösung, Wasser und ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Aus dem nach Entfernen des Lösungsmittels erhaltenen öligen Gemisch konnte das Produkt durch Zugabe von EtOAc des Produkts ausgefällt werden (272 mg, 799 μmol, 60%).

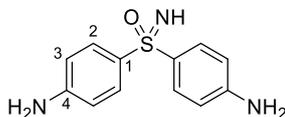
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.36 (2H, s, -CONH-), 7.83 (4H, d, *J* = 8.88 Hz, *H*₃), 7.68 (4H, d, *J* = 8.88 Hz, *H*₂), 2.08 (6H, s, -CH₃). ¹³C NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 169.1 (-CONH-), 143.3 (*C*₁), 128.6 (*C*₄), 128.5 (*C*₂), 120.2 (-NCN), 119.8 (*C*₃), 24.1 (-CH₃). LCMS (ESI): t_R = 4.5 min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 300.1 [M+H⁺] (100.0), 341.1 [M+H⁺+MeCN], 681.2 [2M+H⁺] (30.2). HRMS (ESI): m/z ber. für C₁₇H₁₆N₄O₂SNa⁺ [M+Na⁺] 363.0886; gef. m/z 363.0886. IR (cm⁻¹): ν̄ = 3031 (w), 2982 (w), 2152 (s), 1698 (w), 1677 (m), 1603 (w), 1587 (s), 1537 (s), 1493 (m), 1426 (w), 1396 (w), 1365 (m), 1317 (s), 1260 (m), 1205 (w), 1177 (m), 1119 (w), 1083 (w), 1072 (w), 1011 (w), 840 (w), 827 (s), 759 (w), 727 (w), 715 (w), 699 (w), 630 (w), 596 (s), 583 (w), 528 (m), 511 (s), 491 (w), 466 (w).

***N*-Cyano-4,4'-diacetamidodiphenylsulfoximin (112, JES-039)**

Bei 0 °C wurden K_2CO_3 (401 mg, 2.91 mmol) und *m*CPBA (358 mg, 1.45 mmol) zu einer Lösung von *N*-Cyano-4,4'-diacetamidodiphenylsulfoximin (**111**) (330 mg, 969 μ mol) in 10 mL MeOH gegeben. Das anschließend bei RT gerührte Reaktionsgemisch wurde nach 1.5 h vom Lösungsmittel befreit. Nach Zugabe von 20 mL Wasser wurde ein weißer Feststoff abfiltriert, der als das Produkt identifiziert wurde (292 mg, 701 μ mol, 72%). Trotz leichter Verunreinigungen wurde das Produkt ohne weitere Aufreinigung umgesetzt.

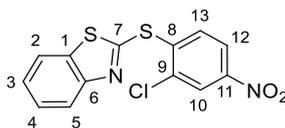
1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 7.98 (4H, d, $J = 9.12$ Hz, H_3), 7.87 (4H, d, $J = 9.06$ Hz, H_2), 2.09 (6, s, $-CH_3$). ^{13}C NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 169.42 ($-CONH-$), 145.22 ($C1$), 129.42 ($C4$), 129.02 ($C2$), 119.36 ($C3$), 24.17 ($-CH_3$). LCMS (ESI): $t_R = 5.8$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 357.1 [$M+H^+$] (100.0), 730.2 [$2M+NH_4^+$] (19.3). HRMS (ESI): m/z ber. für $C_{17}H_{16}N_4O_3SNa^+$ [$M+Na^+$] 379.0835; gef. m/z 379.0835. IR (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 3306$ (w), 3254 (w), 3180 (w), 3106 (w), 3058 (w), 2200 (s), 1706 (w), 1687 (m), 1659 (w), 1608 (w), 1581 (m), 1530 (s), 1496 (w), 1405 (m), 1370 (w), 1311 (s), 1265 (w), 1252 (m), 1200 (w), 1184 (m), 1095 (s), 1033 (w), 1007 (w), 967 (w), 829 (m), 775 (w), 736 (s), 712 (w), 649 (s), 631 (w), 624 (w), 601 (m), 548 (w), 527 (m), 469 (w), 446 (w).

4,4'-Diaminodiphenylsulfoximin (109, JES-046)



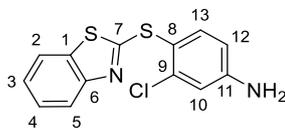
Nach Zugabe von 1.5 mL konz. HCl-Lösung zu einer Lösung von *N*-Cyano-4,4'-diacetamidodiphenylsulfoximin (**112**) (178 mg, 500 μ mol) in 5 mL Ethanol, wurde das entstandene Reaktionsgemisch über Nacht refluxiert. Nach Abschluss der Reaktion wurde der pH-Wert des Gemisches durch Zugabe einer ges. Na₂CO₃-Lösung auf pH = 8 eingestellt. Anschließend wurde mit EtOAc extrahiert (4 \times 7 mL). Die organischen Phasen wurden vereint, mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Produkt wurde nach säulenchromatographischer Trennung rein erhalten (42.5 mg, 172 μ mol, 34%).

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.50 (4H, d, J = 8.40 Hz, *H*₂), 6.55 (4H, d, J = 8.56 Hz, *H*₃), 5.79 (4H, s, -NH₂), 3.83 (1H, bs, -SONH). ¹³C NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 151.9 (*C*₁), 130.7 (*C*₄), 128.9 (*C*₂), 112.7 (*C*₃). LCMS (ESI): t_R = 3.0 min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 248.1 [M+H⁺] (100.0). HRMS (ESI): m/z ber. für C₁₂H₁₄N₃OS⁺ [M+H⁺] 248.0852; gef. m/z . 248.0852. IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3416 (w), 3354 (w), 3241 (w), 3191 (m), 1651 (m), 1636 (w), 1589 (s), 1498 (m), 1436 (w), 1318 (m), 1298 (w), 1202 (m), 1130 (w), 1089 (s), 1044 (w), 1022 (w), 1006 (w), 984 (s), 831 (m), 756 (w), 714 (w), 684 (s), 644 (w), 632 (w), 533 (m), 495 (w), 437 (w).

7.2.2 Synthese der Referenzverbindung 115**2-(2-Chlor-4-nitrophenyl)sulfanyl-1,3-benzothiazol (115, JES-088)**

2-Mercaptobenzothiazol (**113**) (2.00 g, 11.6 mmol) und 1,2-Dichlor-4-nitrobenzol (**114**) (1.85 g, 9.63 mmol) wurden in entgastem DMF (50 mL) gelöst und nach Zugabe von K_2CO_3 (1.60 g, 11.6 mmol) über Nacht gerührt. Im Anschluss wurde das Reaktionsgemisch über einen Zeitraum von 5 h unter ständigem Rühren bei 60 °C erhitzt. Die Reaktion wurde nach Abkühlen durch Zugabe von Wasser abgebrochen, wobei ein gelber Feststoff ausfiel, welcher abfiltriert und mit Wasser gewaschen wurde. Nach säulenchromatographischer Trennung wurde das saubere Produkt erhalten (2.68 g, 8.30 mmol, 72%).

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.50 (1H, d, $J = 2.46$ Hz, $H13$), 8.24 (1H, dd, $J = 8.70$, 2.70 Hz, $H12$), 8.10 (1H, d, $J = 7.68$ Hz, $H2$), 7.99 (1H, d, $J = 7.92$ Hz, $H5$), 7.93 (1H, d, $J = 8.64$ Hz, $H12$), 7.54 – 7.57 (1H, m, $H4$), 7.47 – 7.50 (1H, m, $H3$). $^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 161.1 ($C7$), 152.9 ($C6$), 148.1 ($C8$), 138.6 ($C11$), 136.0 ($C1$), 135.3 ($C9$), 134.3 ($C13$), 126.9 ($C4$), 125.8 ($C3$), 125.0 ($C10$), 123.1 ($C12$), 122.4 ($C5$), 122.2 ($C2$). **LCMS** (ESI): $t_{\text{R}} = 13.0$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 323.0 $[\text{M}+\text{H}^+]$ (100.0). **HRMS** (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{ClN}_2\text{O}_2\text{S}_2^+$ $[\text{M}+\text{H}^+]$ 322.9710; gef. m/z 322.9709. **IR** (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 3087$ (w), 3059 (w), 2588 (w), 1914 (w), 1780 (w), 1590 (w), 1571 (w), 1511 (s), 1457 (w), 1419 (m), 1381 (w), 1338 (s), 1311 (w), 1293 (w), 1255 (w), 1133 (m), 1074 (w), 1029 (w), 1018 (w), 991 (s), 936 (w), 885 (s), 853 (w), 819 (w), 765 (w), 750 (s), 736 (m), 724 (w), 692 (w), 681 (w), 674 (w), 582 (w), 562 (w), 542 (w), 516 (w), 503 (w), 464 (w), 432 (m).

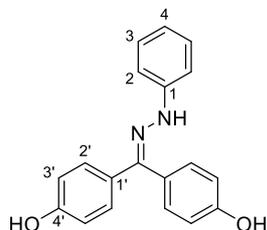
2-(2-Chlor-4-aminophenyl)sulfanyl-1,3-benzothiazol (91, JES-089)

Zu einer Suspension von 2-(2-Chlor-4-nitrophenyl)sulfanyl-1,3-benzothiazol (**115**) (500 mg, 1.55 mmol) in 10 mL MeOH wurde Zink (304 mg, 4.65 mmol) und anschließend tropfenweise bei 0 °C 6 M HCl (6 mL) gegeben. Nach Refluxieren für 1.5 h wurde mit 4 M NaOH-Lösung neutralisiert und 2 mL NH₃-Lösung (25% in Wasser) zugegeben, wobei sich das Reaktionsgemisch orange verfärbte. Bei Zugabe von EtOAc fiel ein Niederschlag aus, welcher abfiltriert und mit EtOAc gewaschen wurde. Die beiden Phasen wurden separiert und die wässrige Phase wurde dreimal mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Produkt wurde durch säulenchromatographischer Trennung gereinigt und nach Entfernen des Lösungsmittels sauber erhalten (190 mg, 0.65 mmol, 42%).

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.88 (1H, dq, $J = 8.00, 0.63$ Hz, *H*₂), 7.80 (1H, dq, $J = 8.12, 0.56$ Hz, *H*₅), 7.52 (1H, d, $J = 8.48$ Hz, *H*₁₃), 7.42 (1H, m, *H*₄), 7.29 (1H, m, *H*₃), 6.88 (1H, d, $J = 2.40$ Hz, *H*₁₀), 6.65 (1H, dd, $J = 8.46, 2.42$ Hz, *H*₁₂), 6.14 (2H, bs, -NH₂). **¹³C NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 171.8 (*C*₇), 153.9 (*C*₆), 153.4 (*C*₈), 139.9 (*C*₉), 139.4 (*C*₁₃), 134.8 (*C*₁), 126.2 (*C*₄), 124.1 (*C*₃), 121.6 (*C*₂), 121.1 (*C*₅), 114.6 (*C*₁₀), 113.7 (*C*₁₂), 109.9 (*C*₁₁). **LCMS** (ESI): $t_R = 10.7$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 293.0 [M+H⁺] (100.0). **HRMS** (ESI): m/z ber. für C₁₃H₁₀ClN₂S₂⁺ [M+H⁺] 292.9968; gef. m/z 292.9967. **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu} = 3462$ (w), 3333 (m), 3212 (w), 3059 (w), 1623 (w), 1592 (s), 1511 (w), 1478 (m), 1455 (m), 1423 (s), 1310 (m), 1275 (w), 1236 (m), 1127 (w), 1082 (w), 1048 (w), 1022 (w), 1007 (s), 938 (w), 902 (w), 850 (w), 817 (w), 756 (s), 727 (w), 702 (w), 673 (w), 649 (w), 595 (w), 523 (w), 458 (w), 422 (w).

7.2.3 Synthese von Hydrazoderivaten des 4,4'-Dihydroxybenzophenons

4,4'-Dihydroxybenzophenonphenylhydrazon (120, JES-029)

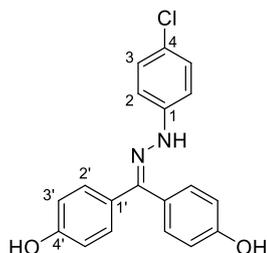


Methode 1: Phenylhydrazin (340 μL , 3.45 mmol) wurde bei 50 °C in einem Gemisch aus 4 mL MeOH und AcOH (400 μL , 6.99 mmol) gelöst. Im Anschluss wurde eine Lösung von 4,4'-Dihydroxybenzophenon (118) (500 mg, 2.33 mmol) in 4 mL MeOH zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde dann bis zum Abschluss der Reaktion bei 50 °C gerührt und anschließend auf ein Viertel des Gesamtvolumens eingengt. Dann wurde der Rückstand in EtOAc und 3%iger NaHCO_3 -Lösung aufgenommen. Die Phasen wurden separiert und die wässrige Phase dreimal mit EtOAc extrahiert. Nach Trocknung der vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 wurde das Lösungsmittel entfernt und das erhaltene Gemisch säulenchromatographisch getrennt. Das Produkt wurde so als orangebrauner Feststoff erhalten (559 mg, 1.84 mmol, 79%).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9.77 (1H, bs, -OH), 9.55 (1H, bs, -OH), 8.42 (1H, s, -NNH-), 7.29 (2H, d, $J = 8.80$ Hz, $H2'$), 7.16 (4H, d, $J = 4.20$ Hz, $H2 + H3$), 7.09 (2H, d, $J = 8.56$ Hz, $H2'$), 6.95 (2H, d, $J = 8.56$ Hz, $H3'$), 6.73 (3H, d, $J = 8.80$ Hz, $H3' + H4$).
 $^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 157.7 ($\text{C}4'$), 157.5 ($\text{C}4'$), 145.7 ($\text{C}1$), 144.1 (-C=NNH-), 132.0 ($\text{C}1'$), 130.3 ($\text{C}2'$), 128.8 ($\text{C}3$), 127.6 ($\text{C}2'$), 123.4 ($\text{C}1'$), 118.6 ($\text{C}4$), 116.2 ($\text{C}3'$), 115.0 ($\text{C}3'$), 112.7 ($\text{C}2$). **LCMS** (ESI): $t_{\text{R}} = 9.5$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 305.1 [$\text{M}+\text{H}^+$] (100.0). **HRMS** (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_2^+$ [$\text{M}+\text{H}^+$] 305.1285; gef. m/z 305.1285. **IR** (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 3364$ (w), 3310 (m), 3006 (w), 2928 (w), 2784 (w), 2664 (w), 2592 (w), 1599 (s), 1497 (s), 1426 (m), 1366 (w), 1331 (m), 1304 (w), 1279 (w), 1263 (w), 1240 (m), 1196 (w), 1165 (s), 1117 (w), 1096 (w), 1069 (w), 1014 (w),

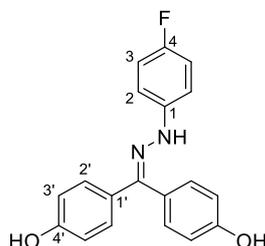
967 (w), 935 (w), 883 (w), 834 (s), 737 (m), 685 (m), 621 (w), 585 (w), 560 (m), 515 (w), 493 (m), 457 (w), 440 (w).

4,4'-Dihydroxybenzophenon-4-chlorphenylhydrazon (**121**, JES-030)



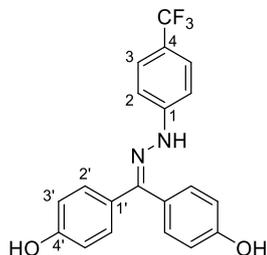
Die Synthese von 4,4'-Dihydroxybenzophenon-4-chlorphenylhydrazon (**121**) erfolgte nach *Methode 1* aus 4-Chlorphenylhydrazin-Hydrochlorid (627 mg, 3.50 mmol) und 4,4'-Dihydroxybenzophenon (**118**) (500 mg, 2.33 mmol). Das Produkt wurde als gelbbrauner Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung erhalten (363 mg, 1.07 mmol, 46%).

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.74 (1H, bs, -OH), 9.54 (1H, bs, -OH), 8.69 (1H, s, -NNH-), 7.28 (2H, d, $J = 8.76$ Hz, $H2'$), 7.18 (4H, m, $H2 + H3$), 7.09 (2H, d, $J = 8.52$ Hz, $H2'$) 6.94 (2H, d, $J = 8.64$ Hz, $H3'$), 6.72 (2H, d, $J = 8.64$ Hz, $H3'$). **¹³C NMR** (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 157.7 ($C4'$), 157.6 ($C4'$), 144.9 (-CNNH-), 144.7 ($C1$), 130.2 ($C2'$), 130.1 ($C1'$), 128.5 ($C2$ oder $C3$), 127.7 ($C2'$), 123.4 ($C1'$), 121.7 ($C4$), 116.1 ($C3'$), 115.0 ($C3'$), 114.1 ($C2$ oder $C3$). **LCMS** (ESI): $t_R = 10.5$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 339.1 [M+H⁺] (100.0). **HRMS** (ESI): m/z ber. für C₁₉H₁₆ClN₂O₂⁺ [M+H⁺] 339,0895; gef. m/z 339.0895. **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu} = 3321$ (m), 1591 (m), 1493 (s), 1429 (w), 1329 (w), 1247 (w), 1214 (s), 1185 (w), 1166 (m), 1120 (w), 1101 (w), 1086 (m), 1013 (w), 839 (m), 813 (s), 658 (w), 590 (w), 519 (w), 498 (m).

4,4'-Dihydroxybenzophenon-4-fluorphenylhydrazon (**122**, JES-042)

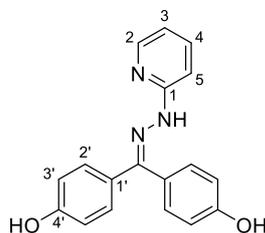
Die Synthese von 4,4'-Dihydroxybenzophenon-4-fluorphenylhydrazon (**122**) erfolgte nach *Methode 1* aus 4-Fluorphenylhydrazin-Hydrochlorid (569 mg, 3.50 mmol) und 4,4'-Dihydroxybenzophenon (**118**) (500 mg, 2.33 mmol). Das Produkt wurde als gelblicher Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung erhalten (268 mg, 831 μ mol, 36%).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.73 (1H, s, -OH), 9.51 (1H, s, -OH), 8.52 (1H, s, -NNH-), 7.28 (2H, d, $J = 8.76$ Hz, $H2'$), 7.17 (2H, m, $H2$), 7.09 (2H, d, $J = 8.56$ Hz, $H2'$), 6.99 (2H, t, $J = 8.90$ Hz, $H3$), 6.94 (2H, d, $J = 8.56$ Hz, $H3'$), 6.72 (2H, $J = 8.80$ Hz, $H3'$). $^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 157.7 ($C4'$), 157.4 ($C4'$), 156.9 ($C4$), 154.6 (-CNNH-), 144.1 ($C1'$), 142.5 ($C1$), 130.2 ($C2'$), 127.6 ($C2'$), 123.5 ($C1'$), 116.1 ($C3'$), 115.3 ($C3$), 115.1 ($C3$), 115.0 ($C3'$), 113.7 ($C2$), 113.6 ($C2$). $^{19}\text{F NMR}$ (DMSO- d_6) δ -126.49 (1F, sept., $J = 4.56$ Hz). **LCMS** (ESI): $t_R = 9.6$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 229.1 (19.2), 323.1 [$M+H^+$] (100.0). **HRMS** (ESI): m/z ber. für $C_{19}H_{16}FN_2O_2^+$ [$M+H^+$] 323.1190; gef. m/z 323.1190. **IR** (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 3348$ (w), 3305 (w), 3037 (w), 2997 (w), 2789 (w), 2669 (w), 2596 (w), 1607 (m), 1592 (w), 1505 (s), 1484 (w), 1443 (w), 1428 (w), 1410 (w), 1369 (w), 1334 (m), 1300 (w), 1279 (w), 1260 (w), 1246 (w), 1226 (s), 1167 (m), 1111 (w), 1083 (m), 1016 (w), 968 (w), 836 (w), 821 (s), 745 (w), 734 (w), 699 (w), 687 (w), 637 (w), 622 (w), 597 (w), 541 (m), 516 (w), 504 (m), 449 (m).

4,4'-Dihydroxybenzophenon-4-fluorphenylhydrazon (**123**, JES-069)

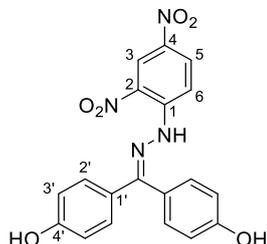
Die Synthese von 4,4'-Dihydroxybenzophenon-4-fluorphenylhydrazon (**123**) erfolgte nach *Methode 1* aus 4-Trifluormethylphenylhydrazin (500 mg, 2.84 mmol) und 4,4'-Dihydroxybenzophenon (**118**) (304 mg, 1.42 mmol). Nach säulenchromatographischer Trennung (Gradient CH:EtOAc) wurde das saubere Produkt erhalten (518 mg, 1.39 mmol, 98%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.76 (1H, s, -OH), 9.59 (1H, s, -OH), 9.06 (1H, s, -NNH), 7.47 (2H, d, $J = 8.72$ Hz, $H3$), 7.30 – 7.33 (4H, m, $H2 + H2'$), 7.10 (2H, d, $J = 8.48$ Hz, $H2'$), 6.94 (2H, d, $J = 8.52$ Hz, $H3'$), 6.74 (2H, d, $J = 8.72$ Hz, $H3'$).
¹³C NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 157.9 (beide $C4'$), 148.7 ($C1$), 146.5 (-CNNH-), 130.3 ($C2'$), 129.9 ($C1'$), 128.0 ($C2'$), 126.0 (q, $J = 3.31$ Hz, $C3$), 123.3 ($C1'$), 116.0 ($C3'$), 115.0 ($C3'$), 112.3 ($C2$).
¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO-*d*₆) δ -59.2 (3F, s, -CF₃).
LCMS (ESI): $t_R = 10.1$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 373.1 [M+H⁺] (100.0).
HRMS (ESI): m/z ber. für C₂₀H₁₆F₃N₂O₂⁺ [M+H⁺] 373.1158; gef. m/z 373.1157.
IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu} = 3335$ (w), 1609 (m), 1528 (w), 1508 (m), 1476 (w), 1431 (w), 1413 (w), 1327 (s), 1252 (w), 1214 (m), 1173 (w), 1154 (m), 1095 (s), 1062 (m), 1014 (w), 969 (w), 941 (w), 822 (s), 763 (w), 637 (w), 586 (m), 503 (m), 448 (w), 428 (w).

4,4'-Dihydroxybenzophenon-2-pyridinylhydrazon (**124**, JES-043)

Die Synthese von 4,4'-Dihydroxybenzophenon-2-pyridinylhydrazon (**124**) erfolgte nach *Methode 1* aus 2-Hydrazinopyridin (153 mg, 1.40 mmol) und 4,4'-Dihydroxybenzophenon (**118**) (200 mg, 934 μ mol). Das Produkt wurde als brauner Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Gradient CH:EtOAc) und Umkristallisation in CH/EtOAc erhalten (134 mg, 439 μ mol, 47%).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.89 (1H, s, -OH), 9.66 (1H, s, -OH), 8.08 (1H, s, -NNH-), 8.01 (1H, ddd, $J = 4.89, 1.85, 0.81$ Hz, $H2$), 7.67 (1H, ddd, $J = 8.42, 7.26, 1.80$ Hz, $H4$), 7.36 (2H, d, $J = 8.76$ Hz, $H2'$), 7.33 (1H, d, $J = 8.40$ Hz, $H3$), 7.14 (2H, d, $J = 8.56$ Hz, $H2'$), 6.99 (2H, d, $J = 8.60$ Hz, $H3'$), 6.76 (3H, m, $H3' + H5$). $^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 158.1 ($C4'$), 158.1 ($C4'$), 156.3 ($C1$), 147.6 ($C3$), 146.9 (-CNNH-), 138.1 ($C5$), 129.9 ($C2'$), 129.1 ($C1'$), 128.0 ($C2'$), 122.4 ($C1'$), 116.3 ($C3'$), 115.3 ($C6$), 115.1 ($C3'$), 106.6 ($C4$). **LCMS** (ESI): $t_R = 7.8$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 306.1 [$M+H^+$] (100.0). **HRMS** (ESI): m/z ber. für $C_{18}H_{16}N_3O_2^+$ [$M+H^+$] 306.1237; gef. m/z 306.1237. **IR** (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 3407$ (w), 3305 (m), 3012 (w), 2786 (w), 2667 (w), 2258 (w), 1602 (m), 1574 (s), 1501 (s), 1440 (s), 1364 (w), 1331 (m), 1301 (w), 1270 (m), 1228 (s), 1183 (w), 1165 (m), 1119 (m), 1105 (w), 1083 (m), 1046 (w), 1021 (w), 999 (s), 957 (w), 861 (w), 828 (s), 764 (s), 727 (w), 709 (w), 666 (w), 628 (w), 584 (w), 562 (w), 511 (m), 461 (w), 440 (w).

4,4'-Dihydroxybenzophenon-2,4-dinitrophenylhydrazon (**125**, JES-028)

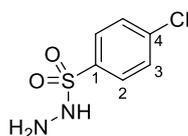
Methode 2: Zu einer Suspension von 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Hydrochlorid (329 mg, 1.40 mmol) in 4 mL MeOH wurde konz. Schwefelsäure (270 μ L, 5.00 mmol) gegeben. Das Gemisch wurde bei 50 °C gerührt bis eine homogene Lösung entstand. Nach Zugabe einer Lösung von 4,4'-Dihydroxybenzophenon (**118**) (200 mg, 934 μ mol) in 4 mL MeOH wurde die Reaktionslösung weitere 30 Minuten bei 50 °C gerührt. Anschließend wurde das Gesamtvolumen durch Evaporieren des Lösungsmittels auf ein Viertel verringert und mit 6.5 mL Wasser verdünnt. Der ausfallende Feststoff wurde abfiltriert und mit 3%iger NaHCO₃-Lösung gewaschen. Nach säulenchromatographischer Trennung wurde das Produkt als roter, kristalliner Feststoff erhalten (187 mg, 474 μ mol, 51%).

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.15 (1H, s, -NNH-), 10.06 (1H, s, -OH), 9.99 (1H, s, -OH), 8.80 (1H, d, $J = 2.64$ Hz, *H*₃), 8.38 (1H, dd, $J = 9.63, 2.55$ Hz, *H*₅), 8.15 (1H, d, $J = 9.60$ Hz, *H*₆), 7.49 (2H, d, $J = 8.70$ Hz, *H*₂'[^]), 7.23 (2H, d, $J = 8.52$ Hz, *H*₂'[^]), 7.02 (2H, d, $J = 8.52$ Hz, *H*₃'[^]), 6.82 (2H, d, $J = 8.76$ Hz, *H*₃'[^]). **¹³C NMR** (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162.3 (*C*₄), 159.7 (*C*₄'[^]), 158.8 (*C*₄'[^]), 155.9 (-CNNH-), 144.0 (*C*₁), 136.8 (*C*₂), 130.0 (*C*₅), 129.9 (*C*₂'[^]), 129.5 (*C*₂'[^]), 127.6 (*C*₁'[^]), 123.0 (*C*₃), 121.7 (*C*₁'[^]), 116.5 (*C*₃'[^]), 116.4 (*C*₆), 115.4 (*C*₃'[^]). **LCMS** (ESI): $t_R = 10.1$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 212.1 (18.3), 395.1 [M+H⁺] (100.0). **HRMS** (ESI): m/z ber. für C₁₉H₁₃N₄O₆⁺ [M+H⁺] 393.0841; gef. m/z 393.0841. **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu} = 3372$ (w), 3277 (w), 1654 (w), 1609 (s), 1586 (w), 1509 (m), 1491 (w), 1420 (w), 1365 (w), 1327 (w), 1306 (w), 1294 (s), 1275 (w), 1223 (w), 1162 (w), 1135 (m), 1107 (w), 1084 (w), 1055 (w), 1013 (w),

968 (w), 921 (w), 840 (m), 742 (m), 702 (w), 646 (w), 597 (w), 555 (w), 531 (w), 503 (w), 431 (w).

7.2.4 Synthese von Arylsulfonylhydraziden

Allgemeine Synthesevorschrift am Beispiel von **4-Chlorbenzolsulfonylhydrazid** (**127**, JES-051)

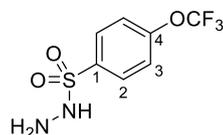


Hydrazin-Monohydrat (560 μ L, 11.5 mmol) wurde bei 0 °C tropfenweise zu einer Lösung von 4-Chlorbenzolsulfonylchlorid (970 mg, 4.60 mmol) in 20 mL THF gegeben. Das Gemisch wurde 30 Minuten bei 0 °C gerührt und anschließend mit 12 mL EtOAc versetzt. Die organische Phase wurde mit ges. NaCl-Lösung (3 x 20 mL) gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und anschließend langsam unter stetigem Rühren in CH (25 mL) gegeben. Der dabei ausfallende Feststoff wurde abfiltriert und von restlichem Lösungsmittel befreit, wodurch das saubere Produkt gewonnen wurde (900 mg, 4.36 mmol, 95%).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.50 (1H, s, $-\text{SO}_2\text{NHNH}_2$), 7.80 (2H, td, $J = 9.12$, 2.26 Hz, H_2), 7.68 (2H, td, $J = 9.20$, 2.26 Hz, H_3), 3.99 (2H, bs, $-\text{NHNH}_2$).

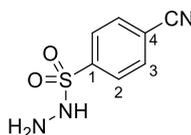
$^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 137.46 (C_1), 137.13 (C_4), 129.54 (C_2), 129.07 (C_3).

LCMS (ESI): $t_R = 5.4$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität): *Ionisierung zu gering*. **HRMS** (ESI): m/z ber. für $\text{C}_6\text{H}_7\text{ClN}_2\text{O}_2\text{SNa}^+$ $[\text{M}+\text{Na}^+]$ 228.9809; gef. m/z 228.9809. **IR** (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 3387$ (w), 3346 (w), 3282 (m), 3202 (w), 3090 (w), 2857 (w), 1613 (w), 1585 (w), 1573 (w), 1474 (m), 1450 (w), 1395 (w), 1326 (s), 1278 (w), 1152 (s), 1084 (s), 1012 (m), 952 (w), 913 (w), 882 (w), 823 (m), 752 (s), 703 (w), 641 (w), 618 (m), 559 (s), 484 (s), 455 (w).

4-Trifluormethoxybenzolsulfonylhydrazid (128, JES-052)

Das Sulfonylhydrazid **128** (500 mg, 1.95 mmol, 98%) wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift zur Herstellung der Arylsulfonylhydrazide aus 4-Trifluormethoxybenzoylchlorid (531 mg, 2.00 mmol) und Hydrazin-Monohydrat (240 μ L, 5.00 mmol) hergestellt.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.98 (2H, d, $J = 8.92$ Hz, *H2*), 7.38 (2H, dd, $J = 8.94$ Hz, *H3*), 3.53 (2H, bs, $-\text{SO}_2\text{NHNH}_2$). $^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 152.99 (C4), 135.03 (C1), 130.61 (C2), 121.20 (C3). $^{19}\text{F NMR}$ (400 MHz, Chloroform-*d*) δ -56.72 (s, $-\text{OCF}_3$). **LCMS** (ESI): $t_{\text{R}} = 7.0$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität): *Ionisierung zu gering*. **HRMS** (ESI): m/z ber. für $\text{C}_7\text{H}_8\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_3\text{S}^+$ $[\text{M}+\text{H}^+]$ 257.0202; gef. m/z 257.0205. **IR** (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 3315$ (m), 3185 (w), 1619 (w), 1588 (w), 1491 (w), 1424 (w), 1330 (w), 1271 (w), 1199 (w), 1146 (s), 1106 (w), 1090 (w), 1017 (w), 923 (w), 879 (w), 840 (m), 811 (w), 738 (w), 699 (w), 683 (w), 569 (s), 500 (w), 463 (w), 407 (w).

4-Cyanobenzoylhydrazid (129, JES-054)

Das Sulfonylhydrazid **129** (437 mg, 2.21 mmol, 92%) wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift zur Herstellung der Arylsulfonylhydrazide aus

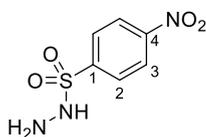
4-Cyanobenzolsulfonylchlorid (485 mg, 2.41 mmol) und Hydrazin-Monohydrat (290 μ L, 6.01 mmol) hergestellt.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.68 (1H, s, $-\text{SO}_2\text{NHNH}_2$), 8.09 (2H, d, $J = 8.72$ Hz, H3), 7.96 (2H, d, $J = 8.72$ Hz, H2), 4.31 (2H, bs, $-\text{SO}_2\text{NHNH}_2$). **$^{13}\text{C NMR}$** (400 MHz, DMSO- d_6) δ 142.71 (-CN), 133.07 (C3), 128.36 (C2), 117.81 (C4), 114.91 (C1).

LCMS (ESI): $t_{\text{R}} = 3.9$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität): *Ionisierung zu gering*. **HRMS** (ESI): m/z ber. für $\text{C}_7\text{H}_8\text{N}_3\text{O}_2\text{S}^+$ [M+H $^+$] 198.0332; gef. m/z . 198.0333.

IR (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 3365$ (w), 3215 (w), 3091 (w), 3036 (w), 2981 (w), 2239 (w), 1604 (w), 1397 (w), 1330 (m), 1302 (w), 1277 (w), 1183 (w), 1161 (s), 1138 (w), 1087 (w), 1015 (w), 949 (w), 865 (w), 840 (m), 801 (w), 785 (w), 721 (w), 677 (m), 627 (w), 570 (s), 519 (m), 477 (w), 439 (m).

4-Nitrobenzolsulfonylhydrazid (**130**, JES-053)



Das Sulfonylhydrazid **130** (829 mg, 3.81 mmol, 85%) wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift zur Herstellung der Arylsulfonylhydrazide aus 4-Nitrobenzolsulfonylchlorid (1.00 g, 4.51 mmol) und Hydrazin-Monohydrat (550 μ L, 11.3 mmol) hergestellt.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.74 (1H, s, $-\text{SO}_2\text{NHNH}_2$), 8.42 (2H, d, $J = 8.96$ Hz, H3), 8.05 (2H, d, $J = 8.96$ Hz, H2), 4.35 (2H, bs, $-\text{SO}_2\text{NHNH}_2$). **$^{13}\text{C NMR}$** (400 MHz, DMSO- d_6) δ 149.69 (C4), 144.18 (C1), 129.22 (C2), 124.19 (C3). **LCMS** (ESI):

$t_{\text{R}} = 4.7$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität): *Ionisierung zu gering*.

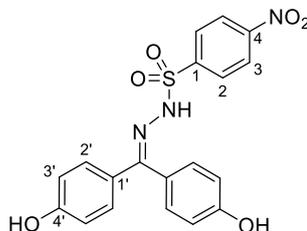
HRMS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_3\text{O}_4\text{S}^+$ [M+H $^+$] 218.0230; gef. m/z . 218.0232. **IR** (cm^{-1}):

$\tilde{\nu} = 3394$ (w), 3363 (w), 3219 (w), 3103 (w), 3077 (w), 2980 (w), 2143 (w), 1956 (w),

1607 (w), 1522 (s), 1478 (w), 1403 (w), 1349 (m), 1329 (w), 1305 (s), 1175 (w), 1155 (s), 1109 (w), 1085 (m), 1009 (w), 955 (w), 856 (m), 829 (w), 741 (s), 702 (w), 682 (m), 658 (w), 600 (m), 554 (s), 529 (w), 489 (w), 466 (s).

7.2.5 Synthese von Sulfonylhydrazonderivaten des 4,4'-Dihydroxybenzophenons

Allgemeine Synthesevorschrift am Beispiel von **4,4'-Dihydroxybenzophenon-4-nitrophenylsulfonylhydrazon (138, JES-057)**



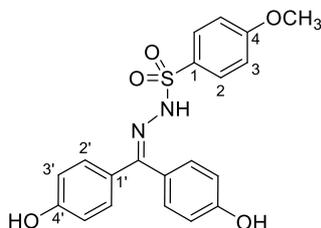
p-Toluolsulfonsäure-Monohydrat (3.8 mg, 20 μ mol) wurde zu einer Lösung von 4,4'-Dihydroxybenzophenon (**118**) (428 mg, 2.00 mmol) und 4-Nitrobenzolsulfonylhydrazid (**130**) (434 mg, 2.00 mmol) in 3.5 mL EtOH gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde bis zum Abschluss der Reaktion bei 85 °C in einem Druckbehältnis erhitzt, anschließend auf RT abgekühlt und vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie und anschließender Umkristallisation in Toluol/*i*PrOH gereinigt. Das Produkt wurde so als gelber Feststoff erhalten (641 mg, 1.55 mmol, 78%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.47 (1H, s, -SO₂NHN-), 9.84 (1H, s, -OH), 9.79 (1H, s, -OH), 8.45 (2H, d, *J* = 8.88 Hz, *H*₃), 8.16 (2H, d, *J* = 8.84 Hz, *H*₂), 7.11 (2H, d, *J* = 8.72 Hz, *H*_{2'}), 7.05 (2H, d, *J* = 8.52 Hz, *H*_{2'}), 6.87 (2H, d, *J* = 8.56 Hz, *H*_{3'}), 6.70 (2H, d, *J* = 8.72 Hz, *H*_{3'}). **¹³C NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 159.10 (*C*_{4'}), 158.31 (-CNNHSO₂), 156.75 (*C*_{4'}), 149.85 (*C*₄), 144.38 (*C*₁), 130.50 (*C*_{2'}), 129.31 (*C*₂), 129.28 (*C*_{2'}), 128.26 (*C*_{1'}), 124.19 (*C*₃), 123.10 (*C*_{1'}), 115.32 (*C*_{3'}), 115.01 (*C*_{3'}). **LCMS** (ESI): *t*_R = 8.3 min (Methode I); *m/z* (% relative Intensität): 414.1 [M+H⁺]

(100.0). **HRMS** (ESI): m/z ber. für $C_{19}H_{16}N_3O_6S^+$ $[M+H^+]$ 414.0754; gef. m/z 414.0754.

IR (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 3438$ (m), 3373 (w), 3231 (w), 3105 (w), 1608 (w), 1599 (m), 1584 (w), 1525 (s), 1509 (w), 1434 (w), 1400 (w), 1381 (m), 1342 (m), 1310 (m), 1278 (w), 1259 (m), 1225 (w), 1203 (w), 1161 (s), 1117 (w), 1103 (w), 1090 (w), 1034 (w), 1009 (w), 982 (m), 939 (w), 888 (w), 853 (w), 837 (s), 810 (w), 738 (s), 693 (m), 680 (w), 618 (m), 594 (w), 542 (s), 513 (w), 503 (w), 461 (w), 453 (m), 427 (w).

4,4'-Dihydroxybenzophenon-4-methoxyphenylsulfonylhydrazon (**131**, JES-060)



Das Produkt wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift zur Herstellung der Sulfonylhydrazone aus 4-Methoxybenzolsulfonylhydrazid (417 mg, 2.00 mmol) und 4,4'-Dihydroxybenzophenon (**118**) (428 mg, 2.00 mmol) hergestellt. Nach mehreren Umkristallisationsversuchen, wurde das Produkt aus CH/EtOAc sauber ausgefällt (152 mg, 382 μ mol, 19%).

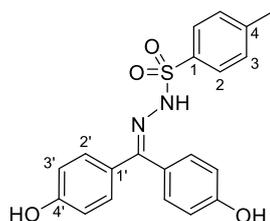
1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.89 (1H, s, -SO₂NHN-), 9.80 (1H, bs, -OH), 9.75 (1H, bs, -OH), 7.83 (2H, d, $J = 8.88$ Hz, H_2), 7.13 (2H, d, $J = 8.96$ Hz, H_3), 7.10 (2H, d, $J = 8.76$ Hz, H_2'), 7.02 (2H, d, $J = 8.52$ Hz, H_2'), 6.86 (2H, d, $J = 8.56$ Hz, H_3'), 6.69 (2H, d, $J = 8.72$ Hz, H_3'), 3.84 (3H, s, -OCH₃). **^{13}C NMR** (400 MHz, DMSO- d_6) δ 162.5 (C_4), 158.9 (C_4'), 158.2 (C_4'), 155.2 (-SO₂NHNC-), 130.7 (C_1), 130.4 (C_2'), 129.9 (C_2), 129.1 (C_2'), 128.6 (C_1'), 123.2 (C_1'), 115.4 (C_3'), 115.0 (C_3'), 114.0 (C_3), 55.6 (-OCH₃).

LCMS (ESI): $t_R = 3.8$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 399.1 $[M+H^+]$ (100.0). **HRMS** (ESI): m/z ber. für $C_{20}H_{19}N_2O_5S^+$ $[M+H^+]$ 399.1009; gef. m/z 399.1011.

IR (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 3137$ (m), 2968 (w), 2940 (w), 1595 (s), 1578 (w), 1509 (w), 1495 (m),

1459 (w), 1437 (w), 1372 (m), 1327 (w), 1310 (m), 1295 (w), 1259 (s), 1233 (w), 1217 (w), 1151 (s), 1110 (w), 1095 (w), 1045 (w), 1021 (m), 962 (s), 934 (w), 880 (m), 830 (s), 799 (w), 771 (w), 730 (w), 716 (w), 688 (m), 658 (w), 602 (m), 547 (s), 515 (w), 488 (w).

4,4'-Dihydroxybenzophenontosylhydrazon (**132**, JES-090)



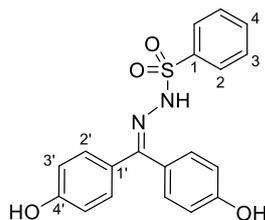
Schritt A: Bei 0 °C wurde Hydrazin-Monohydrat (330 µL, 6.80 mmol) zu einer Lösung von *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (514 mg, 2.70 mmol) in 13 mL trockenem THF gegeben. Nach 30 Minuten Rühren bei dieser Temperatur wurde mit 12 mL EtOAc verdünnt und die organische Phase mit ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und langsam in CH (25 mL) gegeben. Nach kurzem Rühren wurde das Gemisch filtriert und das Produkt in quantitativer Ausbeute erhalten (690 mg, 2.70 mmol, >99%).

Schritt B: Das Produkt aus Schritt A (279 mg, 1.50 mmol) wurde zusammen mit 4,4'-Dihydroxybenzophenon (**118**) (257 mg, 1.20 mmol) entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift zur Herstellung der Sulfonylhydrazone umgesetzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels und säulenchromatographischer Trennung wurde das Produkt sauber erhalten (115 mg, 300 µmol, 25%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.99 (1H, s, -SO₂NHN-), 9.80 (1H, s, -OH), 9.75 (1H, s, -OH), 7.79 (2H, d, *J* = 8.22 Hz, *H*₂), 7.41 (2H, d, *J* = 8.10 Hz, *H*₃), 7.10 (2H, d, *J* = 8.76 Hz, *H*_{2'}), 7.02 (2H, d, *J* = 8.52 Hz, *H*_{2'}), 6.86 (2H, d, *J* = 8.52 Hz, *H*_{3'}), 6.69 (2H, d, *J* = 8.76 Hz, *H*_{3'}), 2.39 (3H, s, -CH₃). ¹³C NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 158.9 (*C*_{4'}), 158.2 (*C*_{4'}), 155.3 (-SO₂NHNC-), 143.1 (*C*₄), 136.2 (*C*₁), 130.4 (*C*_{2'}),

129.3 ($C3$), 129.1 ($C2'$), 128.6 ($C1'$), 127.7 ($C2$), 123.2 ($C1''$), 115.3 ($C3'$), 115.0 ($C3''$), 21.0 ($-CH_3$). **LCMS** (ESI): $t_R = 8.1$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 383.1 [$M+H^+$] (100.0), 765.2 [$2M+H^+$] (25.8). **HRMS** (ESI): m/z ber. für $C_{20}H_{19}N_2O_4S^+$ [$M+H^+$] 383.1060; gef. m/z 383.1053. **IR** (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 3427$ (w), 3338 (w), 3216 (w), 1612 (w), 1593 (m), 1510 (m), 1429 (w), 1375 (w), 1336 (w), 1314 (w), 1276 (w), 1265 (w), 1231 (w), 1209 (w), 1186 (w), 1158 (s), 1105 (w), 1095 (w), 1050 (w), 1012 (w), 981 (w), 889 (w), 838 (m), 810 (m), 739 (w), 704 (w), 693 (w), 661 (m), 602 (w), 553 (s), 542 (w), 507 (w), 484 (w), 452 (w), 419 (w).

4,4'-Dihydroxybenzophenonphenylsulfonylhydrazon (**133**, JES-059)

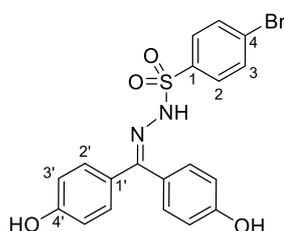


Das Produkt wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift zur Herstellung der Sulfonylhydrazone aus Benzolsulfonylhydrazid (344 mg, 2.00 mmol) und 4,4'-Dihydroxybenzophenon (**118**) (428 mg, 2.00 mmol) hergestellt. Das Produkt wurde nach Säulenchromatographie sauber erhalten (509 mg, 1.38 mmol, 69%).

1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 10.09 (1H, s, $-SO_2NHN-$), 9.81 (1H, s, $-OH$), 9.75 (1H, s, $-OH$), 7.91 (2H, d, $J = 7.00$ Hz, $H3$), 7.63 (3H, m, $H2 + H4$), 7.08 (2H, d, $J = 8.64$ Hz, $H2'$), 7.03 (2H, d, $J = 8.48$ Hz, $H2''$), 6.86 (2H, d, $J = 8.52$ Hz, $H3'$), 6.69 (2H, d, $J = 8.68$ Hz, $H3''$). **^{13}C NMR** (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 161.2 ($-SO_2NHNC-$), 158.9 ($C4'$), 158.3 ($C4''$), 155.5 ($C1'$), 139.0 ($C1$), 132.7 ($C4$), 130.4 ($C2'$), 129.1 ($C2''$), 128.8 ($C2$), 127.7 ($C3$), 115.3 ($C3'$), 115.0 ($C3''$). **LCMS** (ESI): $t_R = 7.7$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 227.1 (2.5), 369.1 [$M+H^+$] (100.0), 590.1 (2.7). **HRMS** (ESI): m/z ber. für $C_{19}H_{17}N_2O_4S^+$ [$M+H^+$] 369.0904; gef. m/z 369.0903. **IR** (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 3384$ (w), 3183 (w),

2981 (w), 1598 (m), 1552 (w), 1509 (m), 1444 (w), 1407 (w), 1372 (w), 1308 (w), 1284 (w), 1256 (w), 1231 (m), 1160 (w), 1149 (s), 1108 (w), 1090 (w), 1040 (w), 980 (m), 944 (w), 885 (w), 835 (m), 821 (w), 809 (w), 761 (w), 744 (w), 730 (m), 722 (w), 692 (m), 682 (w), 622 (w), 599 (w), 576 (m), 549 (s), 503 (w), 477 (w), 452 (w).

4,4'-Dihydroxybenzophenon-4-bromphenylsulfonylhydrazon (**134**, JES-103)



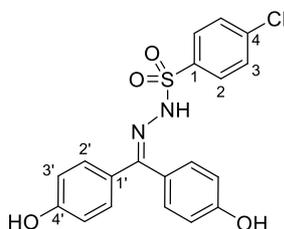
Schritt A: Bei 0 °C wurde Hydrazin-Monohydrat (480 µL, 9.78 mmol) zu einer Lösung von 4-Bromphenylsulfonsäurechlorid (1.00 g, 3.91 mmol) in 7 mL trockenem THF gegeben. Nach 30 Minuten Rühren bei dieser Temperatur wurde das Lösungsmittel und verbliebenes Hydrazinmonohydrat im Vakuum entfernt.

Schritt B: Ohne weitere Aufreinigung wurde das Produkt aus Schritt A (500 mg, 1.99 mmol) zusammen mit 4,4'-Dihydroxybenzophenon (**118**) (354 mg, 1.65 mmol) entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift zur Herstellung der Sulfonylhydrazone umgesetzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das entstandene Gemisch säulenchromatographisch getrennt und so das Produkt sauber erhalten (92.0 mg, 206 µmol, 10%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.18 (1H, s, -SO₂NHN-), 9.81 (1H, s, -OH), 9.77 (1H, s, -OH), 7.81 – 7.86 (4H, m, H₂ + H₃), 7.09 (2H, d, *J* = 8.72 Hz, H₂[⧫]), 7.03 (2H, d, *J* = 8.56 Hz, H₂[⧫]), 6.86 (2H, d, *J* = 8.65 Hz, H₃[⧫]), 6.70 (2H, d, *J* = 8.76 Hz, H₃[⧫]).
¹³C NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 159.0 (C₄[⧫]), 158.2 (C₄[⧫]), 156.0 (-SO₂NHNC-), 138.2 (C₄), 131.9 (C₂ oder C₃), 130.5 (C₂[⧫]), 129.7 (C₂ oder C₃), 129.1 (C₂[⧫]), 128.4 (C₁[⧫]), 126.7 (C₁), 123.1 (C₁[⧫]), 115.3 (C₃[⧫]), 115.0 (C₃[⧫]). LCMS (ESI): t_R = 8.7 min (Methode I);

m/z (% relative Intensität): 449.0 [M+H⁺] (100.0), 895.0 [2M+H⁺] (17.4). **HRMS** (ESI): m/z ber. für C₁₉H₁₆N₂O₄S⁺ [M+H⁺] 447.0009; gef. m/z 447.0019. **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3486 (w), 3353 (w), 3222 (w), 2925 (w), 1703 (w), 1609 (m), 1592 (w), 1573 (w), 1511 (m), 1470 (w), 1435 (w), 1375 (w), 1333 (w), 1314 (m), 1264 (m), 1245 (w), 1206 (w), 1157 (s), 1110 (w), 1091 (w), 1067 (w), 1042 (m), 1009 (w), 978 (m), 951 (w), 886 (m), 837 (s), 823 (w), 735 (m), 702 (m), 690 (w), 674 (w), 609 (m), 593 (w), 568 (w), 552 (s), 501 (w), 457 (w).

4,4'-Dihydroxybenzophenon-4-chlorphenylsulfonylhydrazon (**135**, JES-055)



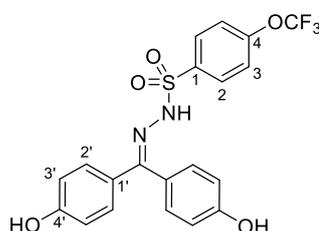
Das Produkt wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift zur Herstellung der Sulfonylhydrazone aus 4-Chlorbenzolsulfonylhydrazid (**127**) (413 mg, 2.00 mmol) und 4,4'-Dihydroxybenzophenon (**118**) (428 mg, 2.00 mmol) hergestellt. Nach mehrmaliger säulenchromatographischer Trennung, wurde das Produkt sauber erhalten (81.3 mg, 202 μ mol, 10%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.19 (1H, s, -SO₂NHN-), 9.84 (1H, s, -OH), 9.80 (1H, s, -OH), 7.91 (2H, d, *J* = 8.56 Hz, *H*3), 7.70 (2H, d, *J* = 8.60 Hz, *H*2), 7.10 (2H, d, *J* = 8.60 Hz, *H*2'), 7.04 (2H, d, *J* = 8.44 Hz, *H*2'), 6.87 (2H, d, *J* = 8.52 Hz, *H*3'), 6.70 (2H, d, *J* = 8.68 Hz, *H*3'). **¹³C NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 159.0 (*C*4'), 158.3 (*C*4'), 156.1 (-SO₂NHNC-), 137.8 (*C*1), 137.8 (*C*4), 130.5 (*C*2'), 129.7 (*C*3), 129.2 (*C*2'), 129.1 (*C*2), 128.5 (*C*1'), 123.2 (*C*1'), 115.4 (*C*3'), 115.0 (*C*3'). **LCMS** (ESI): *t*_R = 8.7 min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 403.0 [M+H⁺] (100.0). **HRMS** (ESI): m/z ber. für C₁₉H₁₆ClN₂O₄S⁺ [M+H⁺] 403.0514; gef. m/z 403.0513. **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3331 (m), 3194 (w), 1607 (w), 1598 (m), 1566 (w), 1508 (m), 1475 (w), 1438 (w), 1410 (w), 1370 (w),

1314 (m), 1284 (w), 1230 (m), 1179 (w), 1155 (s), 1105 (w), 1089 (m), 1046 (w), 1013 (w), 990 (m), 889 (m), 839 (w), 829 (s), 819 (w), 756 (s), 731 (w), 704 (w), 689 (w), 629 (w), 619 (m), 595 (w), 549 (s), 509 (w), 482 (m), 465 (w), 409 (w).

4,4'-Dihydroxybenzophenon-4-trifluormethoxyphenylsulfonylhydrazon

(**136**, JES-056)

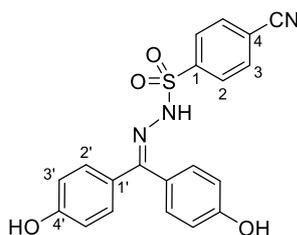


Das Produkt wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift zur Herstellung der Sulfonylhydrazone aus 4-Trifluormethoxybenzolsulfonylhydrazid (**128**) (384 mg, 1.50 mmol) und 4,4'-Dihydroxybenzophenon (**118**) (321.3 mg, 1.50 mmol) hergestellt. Nach säulenchromatographischer Trennung wurde die nicht vollständig reine Substanz in Toluol/ⁱPrOH umkristallisiert, um das Produkt als Reinsubstanz zu erhalten (229 mg, 505 μ mol, 34%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.23 (1H, s, -SO₂NHN-), 9.83 (1H, s, -OH), 9.78 (1H, s, -OH), 8.03 (2H, d, *J* = 8.88 Hz, *H*₂), 7.63 (2H, d, *J* = 8.12 Hz, *H*₃), 7.08 (2H, d, *J* = 8.72 Hz, *H*_{2'}), 7.04 (2H, d, *J* = 8.56 Hz, *H*_{2'}), 6.87 (2H, d, *J* = 8.60 Hz, *H*_{3'}), 6.69 (2H, d, *J* = 8.76 Hz, *H*_{3'}). ¹³C NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 159.0 (*C*_{4'}), 158.3 (*C*_{4'}), 156.2 (-SO₂NHNC-), 151.1 (*C*₄), 137.9 (*C*₁), 132.0 (-OCF₃), 130.5 (*C*_{2'}), 130.4 (*C*₂), 129.2 (*C*₃), 128.4 (*C*_{1'}), 123.1 (*C*_{1'}), 121.1 (*C*_{2'}), 115.3 (*C*_{3'}), 115.0 (*C*_{3'}). ¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO-*d*₆) δ -56.7 (-OCF₃). LCMS (ESI): *t*_R = 9.3 min (Methode I); *m/z* (% relative Intensität): 453.1 [M+H⁺] (100.0), 717.2 (20.7). HRMS (ESI): *m/z* ber. für C₂₀H₁₆F₃N₂O₅S⁺ [M+H⁺] 453.0727; gef. *m/z* 453.0728. IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3137 (m), 2797 (w), 2731 (w), 1608 (w), 1595 (m), 1510 (m), 1492 (w), 1438 (w), 1338 (w), 1315 (w), 1272 (w),

1257 (w), 1222 (m), 1157 (s), 1110 (w), 1047 (w), 1023 (m), 1006 (w), 970 (s), 928 (w), 898 (w), 842 (m), 821 (w), 760 (w), 741 (m), 713 (w), 691 (w), 666 (w), 627 (w), 606 (m), 591 (w), 550 (s), 510 (w), 492 (w).

4,4'-Dihydroxybenzophenon-4-cyanophenylsulfonylhydrazon (**137**, JES-058)



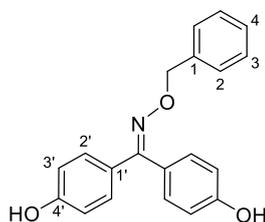
Das Produkt wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift zur Herstellung der Sulfonylhydrazone aus 4-Cyanobenzolsulfonylhydrazid (**129**) (296 mg, 1.50 mmol) und 4,4'-Dihydroxybenzophenon (**118**) (321 mg, 1.50 mmol) hergestellt. Durch säulenchromatographische Trennung wurde das Produkt von Verunreinigungen befreit (392 mg, 1.00 mmol, 66%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.40 (1H, s, -SO₂NHN-), 9.84 (1H, s, -OH), 9.80 (1H, s, -OH), 8.12 (2H, d, *J* = 8.60 Hz, *H*₃), 8.06 (2H, d, *J* = 8.60 Hz, *H*₂), 7.08 (2H, d, *J* = 8.76 Hz, *H*₂[′]), 7.04 (2H, d, *J* = 8.56 Hz, *H*₂[′]), 6.87 (2H, d, *J* = 8.60 Hz, *H*₃[′]), 6.70 (2H, d, *J* = 8.76 Hz, *H*₃[′]). ¹³C NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 159.10 (*C*₄[′]), 158.32 (-SO₂NHNC-), 156.65 (*C*₄[′]), 143.03 (-CN), 133.04 (*C*₃), 130.50 (*C*₂[′]), 129.23 (*C*₂[′]), 128.46 (*C*₂), 128.29 (*C*₁[′]), 123.10 (*C*₁[′]), 117.75 (*C*₄), 115.34 (*C*₃[′]), 115.22 (*C*₁), 115.02 (*C*₃[′]). LCMS (ESI): *t*_R = 7.8 min (Methode I); *m/z* (% relative Intensität): 394.1 [M+H⁺] (100.0), 590.1 (2.7). HRMS (ESI): *m/z* ber. für C₂₀H₁₆N₃O₄S⁺ [M+H⁺] 394.0856; gef. *m/z* 394.0857. IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3329 (w), 3144 (w), 2246 (w), 1608 (w), 1594 (m), 1566 (w), 1512 (w), 1439 (w), 1403 (w), 1344 (w), 1318 (m), 1269 (w), 1248 (w), 1224 ö(m), 1163 (s), 1106 (w), 1089 (w), 1042 (w), 1013 (w), 976 (m), 890 (w), 839 (s),

819 (w), 785 (w), 734 (m), 693 (w), 645 (w), 633 (m), 600 (w), 560 (s), 536 (w), 519 (m), 497 (w), 441 (w).

7.2.6 Synthese weiterer Kondensationsprodukte des 4,4'-Dihydroxybenzophenons

4-[*N*-Benzyloxy-*C*-(4-hydroxyphenyl)carbonimidoyl]phenol (**140**, JES-065)

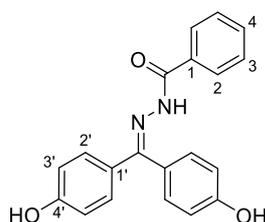


Zu einer Lösung von *O*-Benzylhydroxylamin (**139**) (820 μ L, 7.00 mmol) in 7 mL Essigsäure wurden sukzessive Natriumacetat (330 mg, 4.02 mmol) und 4,4'-Dihydroxybenzophenon (**118**) (500 mg, 2.33 mmol) gegeben. Nach etwa einer Stunde Reaktionszeit bei RT wurde das Reaktionsgemisch auf Wasser gegeben und mit ges. NaHCO_3 -Lösung neutralisiert. Die neutralisierte Lösung wurde mehrfach mit EtOAc extrahiert und die vereinigten organischen Phasen nach Waschen mit ges. NaCl -Lösung über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Evaporieren des Lösungsmittels wurde das Produkt säulenchromatographisch gereinigt und so als weiß-gelblicher Feststoff erhalten (553 g, 1.73 mmol, 74%).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 9.71 (2H, s, -OH), 7.35 (4H, m, $H_2 + H_3$), 7.29 (1H, m, H_4), 7.19 (2H, d, $J = 8.72$ Hz, H_2'), 7.14 (2H, d, $J = 8.60$ Hz, H_2'), 6.81 (2H, d, $J = 8.64$ Hz, H_3'), 6.74 (2H, d, $J = 8.72$ Hz, H_3'), 5.11 (2H, s, $-\text{CH}_2$). $^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 158.6 (C_4'), 157.7 (C_4'), 156.3 ($-\text{CNO}-$), 138.3 (C_1), 130.3 (C_2'), 129.1 (C_2'), 128.2 (C_3), 127.7 (C_2), 127.5 (C_4), 127.2 (C_1'), 123.6 (C_1'), 115.1 (C_3'), 114.7 (C_3'), 75.2 ($-\text{CH}_2-$). **LCMS** (ESI): $t_R = 9.3$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 320.1 [$\text{M}+\text{H}^+$] (100.0). **HRMS** (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{NO}_3^+$ [$\text{M}+\text{H}^+$]

320,1281; gef. m/z 320.1281. **IR** (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 3366$ (w), 2980 (w), 2928 (w), 1608 (m), 1510 (s), 1454 (w), 1435 (w), 1363 (w), 1323 (w), 1272 (w), 1223 (w), 1167 (s), 1105 (w), 1082 (w), 1042 (w), 1015 (w), 969 (m), 917 (w), 894 (w), 837 (m), 815 (w), 751 (w), 740 (w), 697 (m), 617 (w), 592 (w), 523 (w).

2-(4,4'-Dihydroxydiphenylmethyl)benzoesäurehydrazid (**142**, JES-105)



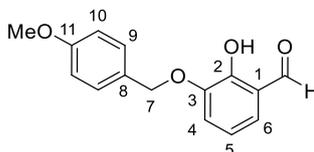
Zu einer heißen Lösung von Benzhydrazid (389 mg, 2.80 mmol) in 4 mL EtOH wurde eine Lösung von 4,4'-Dihydroxybenzophenon (**118**) (500 mg, 2.33 mmol) in 4 mL EtOH gegeben. Das Gemisch wurde über Nacht gerührt und nach Entfernen des Lösungsmittels säulenchromatographisch getrennt, wobei das saubere Produkt erhalten wurde (572 mg, 1.72 mmol, 74%).

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 9.91 (1H, s, -CONHN-), 9.84 (2H, bs, -OH), 7.59 (2H, bs, H_2'), 7.52 (1H, dd, $J = 7.29$ Hz, H_4), 7.43 – 7.46 (2H, m, $2'$), 7.38 (2H, bs, H_3'), 7.19 (2H, d, $J = 8.22$ Hz, H_2), 6.96 (2H, d, $J = 8.40$ Hz, H_3), 6.79 (2H, d, $J = 7.56$ Hz, H_3').

$^{13}\text{C NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 162.5 (-CNNHCO-), 159.2 (C_4'), 158.4 (C_1), 156.5 (-CONHN-), 133.9 (C_1'), 131.4 (C_4), 130.2 (C_2), 129.4 (C_3'), 128.6 (C_2'), 127.0 (C_2'), 122.7 (C_1'), 116.0 (C_3'), 115.1 (C_3').

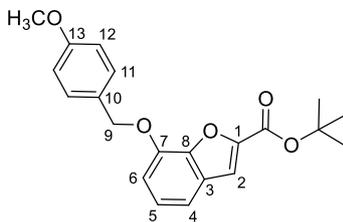
LCMS (ESI): $t_R = 6.7$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 333.1 [$\text{M}+\text{H}^+$] (100.0), 665.2 [$2\text{M}+\text{H}^+$] (31.2).

HRMS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_3^+$ [$\text{M}+\text{H}^+$] 333.1234; gef. m/z 333.1235. **IR** (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 3322$ (m), 1626 (m), 1606 (m), 1501 (s), 1325 (m), 1275 (m), 1216 (s), 1167 (m), 1061 (w), 901 (w), 842 (m), 714 (m), 686 (w), 596 (s), 563 (w), 516 (m), 421 (m).

7.2.7 Synthese der Bisheteroarylverbindung 144**2-Hydroxy-3-(4-methoxybenzyl)benzaldehyd (152, JES-109)**

In trockenem DMSO (4 mL) wurde eine Suspension von NaH (60%ig, 246 mg, 6.15 mmol) erstellt, welche durch tropfenweise Zugabe mit einer Lösung von 2,3-Dihydroxybenzaldehyd (**147**) (340 mg, 2.46 mmol) in 2 mL DMSO versetzt wurde. Dabei wurde mit Eis gekühlt, wenn die Reaktionslösung zu warm wurde. Nach 1.5 h wurde 4-Methoxybenzylchlorid (334 μ L, 2.46 mmol) tropfenweise zugegeben und das entstandene Gemisch bei RT 3 h gerührt. Die Reaktion wurde durch langsame Zugabe wässriger HCl-Lösung abgebrochen. Die schwach saure Lösung wurde mit CH_2Cl_2 extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet. Das nach Evaporieren erhaltene Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie aufgereinigt, wodurch das saubere Produkt erhalten wurde (506 mg, 1.96 mmol, 80%).

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, Chloroform-*d*) δ 11.03 (1H, s, -OH), 9.92 (1H, s, -CHO), 7.37 (2H, d, $J = 8.58$ Hz, *H*9), 7.19 (1H, dd, $J = 1.35, 7.83$ Hz, *H*6), 7.14 (1H, d, $J = 7.92$ Hz, *H*4), 6.90 (3H, m, *H*9+*H*5), 5.12 (2H, s, *H*7), 3.81 (3H, s, -OCH₃). **$^{13}\text{C NMR}$** (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 196.6 (-CHO), 159.7 (*C*11), 152.6 (*C*1), 147.4 (*C*3), 129.3 (*C*9), 128.7 (*C*8), 125.4 (*C*6), 121.4 (*C*4), 119.6 (*C*5), 114.19 (*C*10), 71.5 (*C*7), 55.4 (*C*12). **LCMS** (ESI): $t_{\text{R}} = 8.5$ min (Methode II); m/z (% relative Intensität): 136.0 (40.9), 257.1 [M-H⁺] (100.0). **HRMS** (ESI): m/z ber. für C₁₅H₁₃O₄ [M-H⁺] 257.0819; gef. m/z 257.0815. **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu} = 2930$ (w), 2842 (w), 1650 (m), 1612 (w), 1585 (w), 1512 (m), 1454 (m), 1393 (w), 1378 (w), 1307 (w), 1270 (w), 1244 (s), 1217 (w), 1172 (w), 1112 (w), 1081 (w), 1052 (w), 1026 (m), 967 (w), 953 (m), 933 (w), 864 (m), 843 (w), 818 (m), 780 (w), 740 (w), 721 (m), 648 (w), 579 (w), 538 (w), 511 (w).

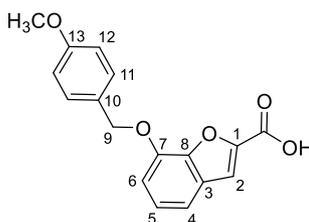
***tert*-Butyl-7-(4-methoxybenzyl)benzofuran-2-carboxylat (153, JES-110)**

Zu einer Lösung von 2-Hydroxy-3-(4-methoxybenzyl)benzaldehyd (**152**) (300 mg, 1.16 mmol) in 2 mL trockenem DMSO wurde Cs_2CO_3 (1.17 g, 3.60 mmol) gegeben. Anschließend wurde Bromessigsäure-*tert*-butylester (**155**) (0.18 mL, 1.2 mmol) bei 100 °C zugetropf, woraufhin bei dieser Temperatur drei Stunden gerührt wurde. Nach Abkühlen des Reaktionsgemisches wurde Wasser hinzugegeben und mit EtOAc extrahiert (für den letzten Extraktionsschritt wurde die wässrige Phase mit NaCl gesättigt). Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Na_2SO_4 getrocknet und von Trocken- und Lösungsmittel befreit. Nach säulenchromatographischer Trennung wurde der *tert*-Butylester (**153**) mit einer Ausbeute von 67% (274 mg, 0.774 mmol) erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.43 (2H, d, $J = 8.72$ Hz, H_{11}), 7.40 (1H, s, H_2), 7.23 (1H, dd, $J = 7.88, 0.96$ Hz, H_6), 7.15 (1H, t, $J = 7.86$ Hz, H_5), 6.95 (1H, dd, $J = 7.86, 0.90$ Hz, H_4), 6.91 (2H, d, $J = 8.72$ Hz, H_{12}), 5.26 (2H, s, H_9), 3.82 (3H, s, $-\text{OCH}_3$), 1.62 (9H, s, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$). $^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 159.7 (C_{13}), 158.8 ($-\text{CO}_2\text{tBu}$), 147.1 (C_1), 145.8 (C_8), 145.1 (C_7), 129.5 (C_{11}), 129.2 (C_3), 129.0 (C_{10}), 124.3 (C_5), 115.1 (C_6), 114.1 (C_{12}), 113.4 (C_2), 111.7 (C_4), 82.7 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 71.3 (C_9), 55.4 ($-\text{OCH}_3$), 28.4 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$). **LCMS** (ESI): $t_R = 13.0$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 372.2 [$\text{M}+\text{NH}_4^+$] (40.4), 726.3 [$2\text{M}+\text{NH}_4^+$] (100.0). **HRMS** (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_5\text{Na}^+$ [$\text{M}+\text{Na}^+$] 377.1359; gef. m/z . 377.1361. **IR** (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 2968$ (w), 2367 (w), 2178 (w), 1720 (w), 1610 (w), 1592 (w), 1566 (w), 1513 (w), 1489 (w), 1471 (w), 1392 (w), 1380 (w), 1369 (w), 1327 (w), 1312 (w), 1274 (w), 1253 (w), 1223 (w), 1197 (w), 1173 (w), 1156 (w), 1111 (w), 1076 (w), 1067 (w), 1024 (w), 964 (w), 945 (w), 934 (w), 866 (w), 837 (w),

824 (w), 785 (w), 765 (w), 747 (w), 734 (w), 708 (w), 689 (w), 668 (w), 634 (w), 621 (w), 612 (w), 580 (w), 556 (w), 548 (w), 541 (w), 528 (w), 511 (w), 490 (w), 477 (w), 462 (w), 449 (w), 434 (w), 427 (w).

7-(4-Methoxybenzyl)benzofuran-2-carbonsäure (**154**, JES-114)



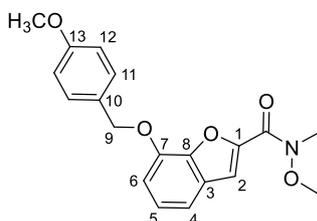
Cs_2CO_3 (11.7 g, 36.0 mmol) wurde zu einer Lösung von 2-Hydroxy-3-(4-methoxybenzyl)benzaldehyd (**152**) (3.00 g, 11.6 mmol) in 19 mL trockenem DMSO gegeben, woraufhin das Gemisch auf 100 °C erhitzt wurde. Dann wurde langsam Bromessigsäureethylester (**157**) (1.35 mL, 12.2 mmol) zugetropft, wobei sich die Lösung von grünbraun zu beige verfärbte. Nach Rühren über Nacht bei 100 °C wurde das Reaktionsgemisch mit 1 M HCl-Lösung angesäuert und mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Na_2SO_4 getrocknet und nach Entfernen von Trocken- und Lösungsmittel säulenchromatographisch von Verunreinigungen befreit. Das Produkt wurde mit einer Ausbeute von 86% (2.97 g, 9.97 mmol) als brauner Feststoff erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.63 (1H, s, *H2*), 7.44 (2H, d, $J = 8.72$ Hz, *H11*), 7.32 (1H, dd, $J = 7.76, 1.08$ Hz, *H6*), 7.24 (1H, t, $J = 7.80$ Hz, *H5*), 7.17 (1H, dd, $J = 7.94, 1.06$ Hz, *H4*), 6.97 (2H, d, $J = 8.72$ Hz, *H12*), 5.21 (2H, s, *H9*), 3.76 (3H, s, $-\text{OCH}_3$). $^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 160.0 ($-\text{COOH}$), 159.2 (*C13*), 146.2 (*C1*), 144.7 (*C8*), 144.4 (*C7*), 129.9 (*C11*), 128.5 (*C3*), 128.3 (*C10*), 124.5 (*C5*), 114.8 (*C6*), 113.9 (*C12*), 113.7 (*C2*), 110.5 (*C4*), 69.9 (*C9*), 55.1 ($-\text{OCH}_3$). **LCMS** (ESI): $t_{\text{R}} = 4.3$ min (Methode II); m/z (% relative Intensität): 297.1 [$\text{M}-\text{H}^+$] (100.0), 595.2 [$2\text{M}-\text{H}^+$] (18.1).

HRMS (ESI): m/z ber. für $C_{17}H_{13}O_5$ $[M-H^+]$ 297.0768; gef. m/z 297.0768. **IR** (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 2932$ (m), 1682 (s), 1585 (m), 1512 (s), 1490 (w), 1301 (w), 1244 (s), 1176 (m), 1076 (m), 1027 (m), 938 (m), 819 (m), 784 (m), 734 (m), 530 (w).

***N*-Methoxy-7-(4-methoxybenzyl)-*N*-methyl-benzofuran-2-carboxamid**

(**156**, JES-117)

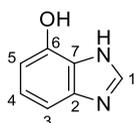


Zu einer Lösung von 7-(4-Methoxybenzyl)benzofuran-2-carbonsäure (**154**) (2.00 g, 6.70 mmol) und *N,O*-Dimethylhydroxylamin-Hydrochlorid (687 mg, 7.04 mmol) in 20 mL trockenem CH_2Cl_2 wurden bei $0\text{ }^\circ C$ NEt_3 (1.87 mL, 13.4 mmol), 4-DMAP (819 mg, 6.70 mmol) und EDCI (1.35 g, 7.04 mmol) hinzugegeben. Das Gemisch wurde über Nacht bei RT gerührt, anschließend mit CH_2Cl_2 verdünnt und mit Wasser versetzt. Die organische Phase wurde abgenommen und die wässrige Phase zwei weitere Male mit CH_2Cl_2 extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser und NaCl-Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Entfernen des Trocken- und Lösungsmittels wurde das Produkt durch Säulenchromatographie gereinigt (576 mg, 1.69 mmol, 25%).

1H NMR (600 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.47 (1H, s, *H2*), 7.41 (2H, d, $J = 8.52$ Hz, *H11*), 7.25 (1H, d, $J = 8.46$ Hz, *H6*), 7.15 (1H, t, $J = 7.86$ Hz, *H5*), 6.94 (1H, d, $J = 7.86$ Hz, *H4*), 6.90 (2H, d, $J = 8.64$ Hz, *H12*), 5.26 (2H, s, *H9*), 3.84 (3H, s, $-NOCH_3$), 3.81 (3H, s, *H14*), 3.41 (3H, s, $-NCH_3$). **^{13}C NMR** (600 MHz, Chloroform-*d*) δ 159.8 ($-CON(CH_3)OCH_3$), 159.5 (*C13*), 147.1 (*C1*), 145.0 (*C8*), 144.9 (*C7*), 129.2 (*C10*), 129.2 (*C11*), 128.9 (*C3*), 124.1 (*C5*), 114.9 (*C6*), 113.9 (*C12*), 113.4 (*C2*), 111.2 (*C4*), 71.0 (*C9*), 61.7 ($-CON(CH_3)OCH_3$), 55.3 ($-OCH_3$), 33.6 ($-CON(CH_3)OCH_3$). **LCMS** (ESI):

$t_R = 9.6$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 342.1 $[M+H^+]$ (65.8), 700.3 $[2M+NH_4^+]$ (100.0). **HRMS** (ESI): m/z ber. für $C_{19}H_{19}NO_5Na^+$ $[M+Na^+]$ 364.1155; gef. m/z 364.1160. **IR** (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 2959$ (w), 2935 (w), 2840 (w), 1640 (s), 1610 (w), 1590 (w), 1552 (m), 1513 (s), 1487 (m), 1469 (w), 1443 (w), 1420 (w), 1381 (m), 1317 (m), 1300 (w), 1274 (m), 1250 (s), 1226 (w), 1200 (w), 1173 (m), 1127 (w), 1111 (w), 1080 (m), 1018 (w), 982 (m), 939 (w), 879 (w), 866 (m), 851 (w), 820 (m), 780 (m), 733 (s), 724 (w), 665 (w), 575 (m), 552 (w), 529 (w), 489 (w), 431 (w).

1*H*-Benzimidazol-7-ol (**158**, JES-112)

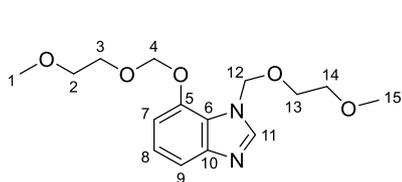
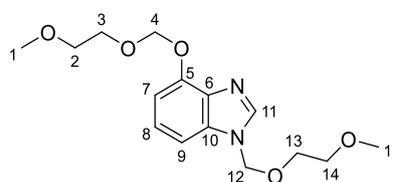


Zu einer Lösung von 2-Amino-3-nitrophenol (**151**) (2.00 g, 13.0 mmol) in 40 mL MeOH wurden Triethylorthoformiat (4.32 mL, 26.0 mmol), ein Tropfen AcOH und Pd/C (10%ig, 200 mg, 0.19 mmol) gegeben. Anschließend wurde die Atmosphäre durch Wasserstoff ersetzt und das Gemisch über 24 Stunden gerührt. Dann wurde der Katalysator über Celite abfiltriert und das Lösungsmittel entfernt. Nach säulenchromatographischer Trennung (DCVC) wurde das reine Produkt mit einer Ausbeute von 51% erhalten (880 mg, 6.56 mmol).

1H NMR (600 MHz, $DMSO-d_6$) δ 12.33 (1H, bs, $-NH-$), 9.78 (1H, bs, $-OH$), 8.06 (1H, s, $H1$), 7.01 (1H, d, $J = 7.84$ Hz, $H5$), 6.96 (1H, dd, $J = 7.72, 7.72$ Hz, $H4$), 6.57 (1H, d, $J = 8.32$ Hz, $H3$). **^{13}C NMR** (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 140.4 ($C1$), 122.5 ($C4$), 106.4 ($C3$). (Alle anderen C-Atome auf durch lange Messung und achtfache Relaxationszeit nicht zu sehen) **LCMS** (ESI): $t_R = 2.5$ min (Methode II); m/z (% relative Intensität): 133.1 $[M-H^+]$ (100.0). **HRMS** (ESI): m/z ber. für $C_7H_5N_2O$ $[M-H^+]$ 133.0407; gef. m/z 133.0408. **IR** (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 3220$ (s), 3111 (w), 2357 (w), 1744 (w), 1635 (w), 1593 (s), 1494 (s),

1431 (w), 1410 (s), 1361 (w), 1293 (s), 1273 (s), 1248 (s), 1163 (w), 1145 (w), 1055 (s), 935 (w), 873 (s), 862 (w), 784 (s), 734 (s), 687 (s), 636 (s), 618 (w), 580 (s), 547 (w), 514 (s), 493 (s).

7-(2-methoxyethoxymethoxy)-1-(2-methoxyethoxymethyl)benzimidazol (159)
und **4-(2-methoxyethoxymethoxy)-1-(2-methoxyethoxymethyl)-benzimidazol (160)** (JES-115)

**159****160**

Eine Lösung von 1*H*-Benzimidazol-7-ol (**158**) (800 mg, 5.96 mmol) in 20 mL THF wurde tropfenweise bei 0 °C zu einer Suspension von NaH (60%ig, 596 mg, 14.9 mmol) in 5 mL THF gegeben. Anschließend wurden 10 mL entgastes DMF hinzugefügt. Nach 20 Minuten wurde langsam MEMCl (1.43 mL, 12.5 mmol) zugetropft und nach weiteren 30 Minuten das Eisbad entfernt und die Reaktion über Nacht gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser abgebrochen. Die wässrige Phase wurde mit NaCl gesättigt, von der organischen Phase separiert und anschließend mit EtOAc zweimal extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Na₂SO₄ getrocknet. Das nach Evaporieren erhaltene Produktgemisch wurde säulenchromatographisch getrennt. Die beiden Produkte konnten mit einer Gesamtausbeute von 81% erhalten werden (1.50 g, 4.83 mmol, **159**: 46%, **160**: 35%).

Verbindung 159:

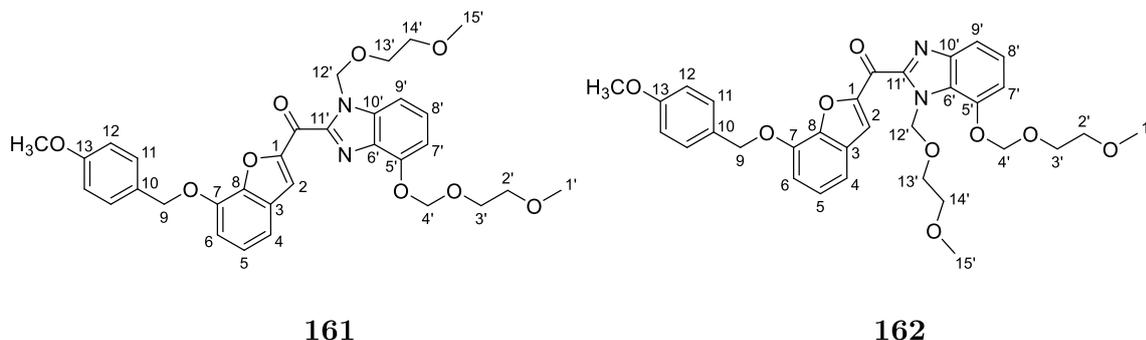
¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.95 (1H, s, *H11*), 7.23 (1H, dd, $J = 7.80, 7.80$ Hz, *H8*), 7.19 (1H, dd, $J = 1.34, 8.14$ Hz, *H9*), 7.04 (1H, dd, $J = 7.44, 1.36$ Hz, *H7*), 5.60 (2H,

s, *H12*), 5.54 (2H, s, *H4*), 3.91 – 3.93 (2H, m, *H3*), 3.54 – 3.57 (4H, m, *H3* + *H2* oder *H3* + *H14*), 3.47 – 3.50 (2H, m, *H2* oder *H14*), 3.35 (3H, s, *H1* oder *H15*), 3.35 (3H, s, *H1* oder *H15*). ¹³C NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 149.1 (*C5*), 142.0 (*C11*), 135.3 (*C10*), 134.5 (*C6*), 124.5 (*C8*), 108.0 (*C7*), 104.2 (*C9*), 94.1 (*C4*), 75.0 (*C12*), 71.7 (*C2* oder *C12*), 71.6 (*C2* oder *C12*), 67.9 (*C3*), 67.8 (*C13*), 59.0 (*C1* oder *C15*), 58.9 (*C1* oder *C15*). **LCMS** (ESI): t_R = 4.8 min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 311.2 [$M+H^+$] (100.0), 621.3 [$2M+H^+$] (2.7). **HRMS** (ESI): m/z ber. für $C_{15}H_{22}N_2O_5Na^+$ [$M+Na^+$] 333.1421; gef. m/z 333.1420. **IR** (cm^{-1}): $\tilde{\nu}$ = 2923 (w), 2880 (w), 2819 (w), 1712 (w), 1620 (w), 1590 (w), 1495 (m), 1455 (w), 1433 (w), 1398 (w), 1367 (w), 1280 (w), 1244 (m), 1212 (w), 1200 (w), 1160 (w), 1086 (w), 1046 (s), 946 (m), 848 (m), 788 (m), 735 (s), 695 (w), 656 (w), 640 (w), 615 (w), 549 (w), 493 (w), 448 (w).

Verbindung 160:

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.00 (1H, s, *H11*), 7.45 (1H, dd, J = 0.62, 8.10 Hz, *H9*), 7.18 (1H, dd, J = 8.06, 8.06 Hz, *H8*), 7.05 (1H, d, J = 7.80 Hz, *H7*), 5.84 (2H, s, *H12*), 5.42 (2H, s, *H4*), 3.86 – 3.88 (2H, m, *H3*), 3.60 – 3.62 (2H, m, *H13*), 3.55 – 3.58 (2H, m, *H2*), 3.46 – 3.48 (2H, m, *H14*), 3.37 (3H, s, *H1* oder *H15*), 3.33 (3H, s, *H1* oder *H15*). ¹³C NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 145.6 (*C10*), 144.5 (*C5*), 143.8 (*C11*), 123.5 (*C6*), 123.2 (*C8*), 114.0 (*C9*), 108.3 (*C7*), 93.9 (*C4*), 76.2 (*C12*), 71.7 (*C14*), 71.6 (*C2*), 68.1 (*C3*), 67.6 (*C13*), 59.0 (*C1* + *C15*). **LCMS** (ESI): t_R = 4.7 min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 311.1 [$M+H^+$] (100.0). **HRMS** (ESI): m/z ber. für $C_{15}H_{22}N_2O_5Na^+$ [$M+H^+$] 333.1421; gef. m/z 333.1425. **IR** (cm^{-1}): $\tilde{\nu}$ = 3092 (w), 2924 (w), 2881 (w), 2819 (w), 1711 (w), 1615 (w), 1590 (w), 1497 (m), 1455 (w), 1399 (w), 1357 (w), 1230 (m), 1192 (w), 1155 (w), 1087 (m), 1017 (s), 942 (m), 847 (m), 787 (m), 741 (s), 690 (w), 659 (w), 614 (w), 543 (w), 449 (w).

[4-(2-Methoxyethoxymethoxy)-1-(2-methoxyethoxymethyl)-benzimidazol-2-yl]-[7-[(4-methoxyphenyl)methoxy]benzofuran-2-yl]methanon (**161**) und [7-(2-Methoxyethoxymethoxy)-1-(2-methoxyethoxymethyl)benzimidazol-2-yl]-[7-[(4-methoxyphenyl)methoxy]benzofuran-2-yl]methanon (**162**) (JES-118)



Das Isomerengemisch aus den Benzimidazol-Derivaten **159** (44%) und **160** (56%) (327 mg, 1.05 mmol) wurde in 6 mL trockenem THF gelöst und langsam bei -78 °C mit frisch titrierter *n*-BuLi-Lösung (2.1 M in *n*-Hexan, 510 µL, 1.06 mmol) versetzt. Das Gemisch wurde 2 h bei dieser Temperatur gerührt. Anschließend wurde eine Lösung von *N*-Methoxy-7-(4-methoxybenzyl)-*N*-methyl-benzofuran-2-carboxamid (**156**) (300 mg, 879 µmol) in 2.5 mL trockenem THF zugegeben. Nach etwa 4 h wurde die Reaktion bei RT langsam mit Wasser versetzt. Die wässrige Phase wurde mehrfach mit EtOAc extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit Wasser und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknung über Na₂SO₄ wurde das Lösungsmittel entfernt und das Produktgemisch säulenchromatographisch getrennt. Die beiden Isomere wurden mit einer Gesamtausbeute von 85% erhalten (**161**: 125 mg, 212 µmol; 24% **162**: 269 mg, 455 µmol, 52%; Rest Mischfraktion).

Verbindung **161**:

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.49 (1H, s, *H2*), 7.59 (1H, dd, *J* = 8.22, 0.74 Hz, *H9*), 7.44 (2H, d, *J* = 8.68 Hz, *H11*), 7.36 (1H, dd, *J* = 7.88, 0.92 Hz, *H6*), 7.29 (1H, dd, *J* = 8.06, 8.06 Hz, *H8*), 7.19 (1H, dd, *J* = 7.90, 7.90 Hz, *H5*), 7.19 (1H, dd, *J* = 8.00, 0.72 Hz, *H7*), 7.02 (1H, dd, *J* = 7.88, 0.88 Hz, *H4*), 6.92 (2H, d, *J* = 8.68 Hz, *H12*), 6.39

(2H, s, H_{12}), 5.47 (2H, s, H_4), 5.30 (2H, s, H_9), 3.91 – 3.93 (2H, m, H_3), 3.82 (3H, s, H_{14}), 3.66 – 3.68 (2H, m, H_{13}), 3.57 – 3.60 (2H, m, H_2), 3.40 – 3.43 (2H, m, H_{14}), 3.39 (3H, s, H_1), 3.25 (3H, s, H_{15}). ^{13}C NMR (400 MHz, Chloroform- d) δ 174.0 (-CO-), 159.7 (C_{13}), 151.7 (C_1), 146.7 (C_8), 146.0 (C_{11}), 145.2 (C_7), 144.0 (C_{10}), 129.6 (C_{11}), 129.5 (C_{10}), 128.8 (C_3), 126.5 (C_6), 124.7 (C_5), 124.6 (C_8), 121.2 (C_2), 116.3 (C_6), 115.6 (C_9), 114.1 (C_{12}), 113.0 (C_4), 111.0 (C_7), 94.1 (C_4), 75.7 (C_{12}), 71.7 (C_2), 71.7 (C_{14}), 71.3 (C_9), 68.3 (C_3), 68.0 (C_{13}), 59.2 (C_1), 59.0 (C_{15}), 55.4 (-OCH₃). LCMS (ESI): t_{R} = 12.8 min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 591.2 [M+H⁺] (100.0). HRMS (ESI): m/z ber. für C₃₂H₃₄N₂O₉Na⁺ [M+Na⁺] 613.2157; gef. m/z 613.2158. IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 2925 (m), 2837 (w), 1647 (m), 1613 (w), 1590 (m), 1552 (m), 1514 (m), 1487 (m), 1424 (w), 1382 (w), 1318 (w), 1300 (w), 1273 (w), 1250 (m), 1215 (w), 1174 (m), 1098 (s), 1081 (w), 1059 (w), 1031 (w), 975 (m), 954 (w), 909 (w), 860 (w), 824 (w), 790 (m), 763 (w), 733 (m), 690 (w), 579 (w), 523 (w).

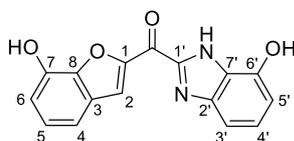
Verbindung 162:

^1H NMR (600 MHz, Chloroform- d) δ 8.56 (1H, s, H_2), 7.44 (2H, d, J = 8.58 Hz, H_{11}), 7.37 (4H, m, $H_{7'}$ – $9'$), 7.20 (1H, dd, J = 7.86, 7.86 Hz, H_5), 7.13 (1H, d, J = 7.86 Hz, H_4), 7.02 (1H, d, J = 7.86 Hz, H_6), 6.91 (2H, J = 8.58 Hz, H_{12}), 6.15 (2H, s, H_{12}), 5.65 (2H, s, H_4), 5.29 (2H, s, H_9), 3.97 – 3.98 (2H, m, H_3), 3.82 (3H, s, -OCH₃), 3.72 – 3.74 (2H, m, H_{13}), 3.59 – 3.60 (2H, m, H_2), 3.47 – 3.48 (2H, m, H_{14}), 3.38 (3H, s, $H_{1'}$ oder H_{15}), 3.31 (3H, s, $H_{1'}$ oder H_{15}). ^{13}C NMR (400 MHz, Chloroform- d) δ 173.8 (-CO-), 159.7 (C_{13}), 151.5 (C_1), 150.6 (C_5), 145.2 (C_7), 144.7 (C_{11}), 138.2 (C_{10}), 133.5 (C_8), 129.6 (C_{11}), 129.5 (C_3), 128.8 (C_{10}), 127.7 (C_8), 124.7 (C_5), 121.4 (C_2), 116.3 (C_9), 114.1 (C_{12}), 112.9 (C_6), 109.2 (C_4), 105.6 (C_7), 94.7 (C_4), 75.0 (C_{12}), 71.8 (C_2), 71.6 (C_{14}), 71.2 (C_9), 68.3 (C_3 + C_{13}), 59.2 ($C_{1'}$ oder C_{15}), 59.1 ($C_{1'}$ oder C_{15}), 55.4 (-OCH₃). LCMS (ESI): t_{R} = 12.2 min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 591.2 [M+H⁺] (100.0). HRMS (ESI): m/z ber. für C₃₂H₃₄N₂O₉Na⁺ [M+Na⁺] 613.2157; gef. m/z 613.2168. IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 2925 (w), 2836 (w), 1644 (m), 1612 (w), 1590 (m), 1551 (m),

1512 (m), 1487 (m), 1471 (w), 1424 (w), 1382 (w), 1348 (w), 1317 (w), 1301 (w), 1271 (w), 1248 (m), 1217 (w), 1200 (w), 1150 (w), 1100 (w), 1082 (s), 1033 (m), 976 (m), 948 (w), 900 (m), 849 (w), 823 (w), 782 (w), 734 (m), 696 (w), 580 (w), 522 (w).

(7-Hydroxy-1*H*-benzimidazol-2-yl)-(7-hydroxybenzofuran-2-yl)methanon

(144, JES-119)



Schritt A: Ein Isomerengemisch der Verbindungen **161** und **162** (150 mg, 254 μmol) wurde in 10 mL trockenem CH_2Cl_2 gelöst und anschließend tropfenweise mit 1.1 mL TFA versetzt. Nach vollständiger Zugabe wurden die flüchtigen Anteile im Vakuum entfernt und das Gemisch chromatographiert.

Schritt B: Das chromatographierte Produkt aus dem ersten Reaktionschritt (85 mg) wurde in 1 mL EtOH gelöst und mit 1 mL 4 M HCl in Dioxan versetzt. Das Gemisch wurde zunächst über Nacht gerührt und aufgrund unvollständigen Umsatzes anschließend für 7 h refluxiert. Nach Abschluss der Reaktion wurde ges. NaHCO_3 -Lösung zugegeben und mit EtOAc extrahiert. Nach säulenchromatographischer Trennung und anschließender präparativer HPLC wurde das Produkt sauber erhalten (14 mg 48 μmol , 19% über zwei Schritte).

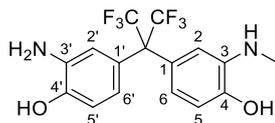
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.95 (1H, s, H_2), 7.39 (1H, dd, $J = 7.84, 0.96$ Hz, H_4), 7.20 (1H, dd, $J = 7.82$ Hz, H_5), 7.19 (1H, dd, $J = 7.94$ Hz, H_4'), 7.06 (1H, d, $J = 7.96$ Hz, H_3'), 7.00 (1H, dd, $J = 7.76, 1.00$ Hz, H_6), 6.70 (1H, dd, $J = 7.72, 0.76$ Hz, H_5').
 $^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 171.7 (-CO-), 150.1 (C_1), 149.9 (C_6'), 145.9 (C_1'), 144.9 (C_8), 143.3 (C_7), 137.6 (C_2'), 132.5 (C_7'), 128.9 (C_3), 126.6 (C_4'), 125.0 (C_5), 120.7 (C_2), 114.3 (C_6), 114.2 (C_4), 107.3 (C_5'), 104.4 (C_3'). **LCMS** (ESI): $t_R = 7.4$ min

(Methode I); m/z (% relative Intensität): 295.1 [M+H⁺] (100.0), 611.1 [2M+H⁺] (1.7).

HRMS (ESI): m/z ber. für C₁₆H₁₁N₂O₄⁺ [M+H⁺] 295.0713; gef. m/z 295.0712. **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3117 (w), 2961 (s), 2800 (w), 1644 (m), 1602 (w), 1565 (s), 1541 (w), 1474 (w), 1442 (w), 1385 (s), 1333 (w), 1290 (w), 1261 (w), 1235 (w), 1210 (w), 1187 (w), 1160 (w), 1063 (w), 1044 (w), 956 (w), 885 (w), 855 (w), 839 (w), 779 (m), 726 (s), 693 (w), 659 (w), 625 (m), 532 (w), 499 (w).

7.2.8 Synthesen im Umfeld des Second-Site-Liganden 166

2-Amino-4-[2,2,2-trifluor-1-[4-hydroxy-3-(methylamino)phenyl]-1-(trifluoromethyl)ethyl]phenol (167, JES-133)



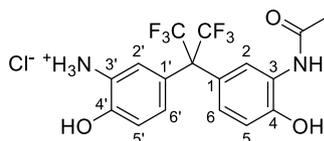
2,2-Bis(3-amino-4-hydroxyphenyl)hexafluoropropan (**104**) (300 mg, 819 μ mol), gelöst in 3 mL entgastem DMF, wurde mit NaHCO₃ (72.3 mg, 860 μ mol) und Methyljodid (56 μ L, 0.90 μ mol) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei RT gerührt und anschließend vom Lösungsmittel befreit. Das Produkt wurde nach säulenchromatographischer Trennung sauber erhalten (128 mg, 336 μ mol, 41%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.59 (1H, bs, -OH), 9.35 (1H, bs, -OH), 6.66 (1H, d, J = 4.36 Hz, *H*₂), 6.64 (1H, d, J = 4.48 Hz, *H*_{2'}), 6.60 (1H, s, *H*₅), 6.41 – 6.45 (2H, m, *H*₆ + *H*_{6'}), 6.29 (1H, s, *H*_{5'}), 4.87 (1H, bs, -NHCH₃), 4.63 (2H, bs, -NH₂), 2.56 (3H, s, -CH₃). **¹³C NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 144.5 (*C*₄), 144.3 (*C*_{4'}), 137.9 (*C*₃), 136.1 (*C*_{3'}), 123.7 (*C*₁ oder *C*_{1'}), 123.5 (*C*₁ oder *C*_{1'}), 123.2 (-CF₃), 117.9 (*C*₆'), 117.3 (*C*₆), 115.8 (*C*_{5'}), 113.4 (*C*₂ oder *C*_{2'}), 112.2 (*C*₂ oder *C*_{2'}), 110.3 (*C*₅), 29.6 (-CH₃). **¹⁹F NMR** (376 MHz, DMSO-*d*₆) δ -62.75 (-CF₃). **LCMS** (ESI): t_R = 8.5 min

(Methode I); m/z (% relative Intensität): 381.2 [M+H⁺] (100.0), 761.3 [2M+H⁺] (14.5).

HRMS (ESI): m/z ber. für C₁₆H₁₅F₆N₂O₂⁺ [M+H⁺] 381.1032; gef. m/z 381.1039. **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3366 (w), 3324 (w), 2979 (w), 2720 (w), 1595 (w), 1521 (m), 1472 (w), 1449 (w), 1415 (w), 1374 (w), 1319 (w), 1297 (w), 1237 (w), 1212 (s), 1153 (m), 1129 (w), 1115 (w), 1095 (w), 1044 (w), 999 (w), 973 (w), 961 (m), 931 (w), 899 (w), 868 (w), 811 (m), 768 (w), 742 (w), 717 (s), 626 (w), 552 (w), 529 (w), 512 (w), 482 (w), 459 (w).

N-[5-[1-(3-Amino-4-hydroxyphenyl)-2,2,2-trifluor-1-(trifluor-methyl)ethyl]-2-hydroxy-phenyl]acetamid (168, JES-134)

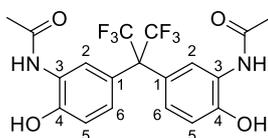


Zu einer Lösung von 2,2-Bis(3-amino-4-hydroxyphenyl)hexafluorpropan (**104**) (300 g, 819 mmol) in 2 mL THF wurde tropfenweise Essigsäureanhydrid (81 μ L, 0.86 mmol) gegeben. Nach einer halben Stunde bei 50 °C wurde das Gemisch auf RT abgekühlt. Durch präparative HPLC wurde das Produkt als TFA-Salz erhalten und wurde durch Lyophilisation mit 0.1 M HCl-Lösung in das HCl-Salz überführt (54.0 mg, 121 μ mol, 15%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.28 (1H, bs, -OH), 10.44 (1H, bs, -OH), 9.39 (1H, s, -NHCOCH₃), 7.94 (1H, bs, *H*₂), 7.39 (1H, bs, *H*₂[']), 7.19 (1H, d, *J* = 8.76 Hz, *H*₆), 7.13 (1H, d, *J* = 8.80 Hz, *H*₅), 6.96 (1H, d, *J* = 8.68 Hz, *H*₅[']), 6.88 (1H, d, *J* = 8.08 Hz, *H*₆), 4.95 (3H, bs, -NH₃⁺), 2.06 (3H, s, -CH₃). **¹³C NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 169.1 (-NHCOCH₃), 151.3 (*C*₄), 148.3 (*C*₄[']), 130.2 (*C*₆), 126.5 (*C*₃), 125.6 (*C*₆[']), 125.1 (*C*₂[']), 123.3 (*C*₂), 123.0 (*C*₃), 122.7 (*C*₁[']), 122.0 (*C*₁), 116.0 (*C*₅), 115.5 (*C*₅[']), 23.6 (-CH₃). **¹⁹F NMR** (376 MHz, DMSO-*d*₆) δ -64.47 (-CF₃). **LCMS** (ESI): *t*_R = 7.7 min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 409.1 [M+H⁺] (100.0), 817.3 [2M+H⁺] (35.4). **HRMS** (ESI): m/z ber. für C₁₇H₁₅F₆N₂O₃⁺ [M+H⁺] 409.0981; gef. m/z 409.0987. **IR** (cm⁻¹):

$\tilde{\nu}$ = 3414 (w), 2881 (w), 2732 (w), 2610 (w), 1659 (m), 1639 (w), 1599 (w), 1543 (w), 1502 (m), 1431 (m), 1407 (w), 1313 (w), 1294 (w), 1241 (m), 1200 (s), 1152 (w), 1126 (m), 1022 (w), 984 (w), 963 (s), 878 (w), 824 (s), 784 (w), 765 (w), 744 (w), 736 (w), 714 (m), 633 (m), 620 (w), 589 (w), 573 (m), 551 (w), 522 (w), 495 (w), 481 (w), 453 (w), 441 (w).

2,2-Bis(3-acetamido-4-hydroxyphenyl)-hexafluorpropan (169, JES-140)

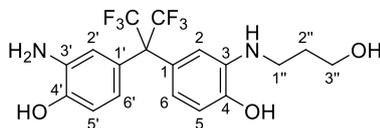


Zu einer Lösung von 2,2-Bis(3-amino-4-hydroxyphenyl)-hexafluorpropan (**104**) (300 mg, 819 μmol) in 2 mL THF wurde tropfenweise Essigsäureanhydrid (200 μL , 2.12 mmol) gegeben. Nach einer halben Stunde Rührzeit bei 50 °C wurde das Gemisch fest. Das verbliebene Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der restliche Kolbeninhalt mit MeCN versetzt. Der nichtlösliche Niederschlag wurde abfiltriert und wurde als das saubere Produkt identifiziert (283 mg, 629 μmol , 77%).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.28 (2H, s, -OH), 9.34 (2H, s, -NHCOCH₃), 7.89 (2H, s, H2), 6.86 – 6.91 (4H, m, H5 + H6), 2.07 (6H, s, -COCH₃). $^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 169.2 (-NHCOCH₃), 148.2 (C4), 126.2 (C6), 125.9 (C3), 123.5 (C2), 122.7 (C1), 115.4 (C5), 23.6 (-COCH₃). $^{19}\text{F NMR}$ (376 MHz, DMSO- d_6) δ -63.33 (-CF₃). **LCMS** (ESI): t_{R} = 6.9 min (Methode II); m/z (% relative Intensität): 449.0 [M-H⁺] (100.0). **HRMS** ESI): m/z ber. für C₁₉H₁₆F₆N₂O₄Na⁺ [M+Na⁺] 473.0906; gef. m/z 473.0901. **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3409 (w), 3091 (w), 2979 (w), 2755 (w), 2632 (w), 1656 (m), 1619 (w), 1601 (w), 1550 (m), 1509 (w), 1432 (m), 1400 (w), 1389 (w), 1329 (w), 1297 (w), 1247 (m), 1200 (s), 1168 (w), 1153 (m), 1131 (m), 1124 (w), 1030 (w), 996 (w), 963 (m), 888 (w), 840 (w), 824 (m), 774 (w), 737 (w), 717 (w), 653 (m), 641 (w), 630 (w), 602 (w), 577 (m), 553 (w), 520 (w), 495 (w), 453 (w).

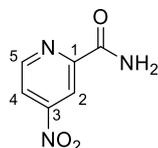
***N*-(3'-Hydroxypropyl)-2,2-bis(3-amino-4-hydroxyphenyl)hexa-fluoropropan**

(170, JES-062)



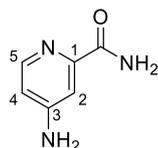
Zu einer Lösung von 2,2-Bis(3-amino-4-hydroxyphenyl)hexafluoropropan (**104**) (2.02 g, 5.51 mmol) in 10 mL EtOH wurde langsam und unter starkem Rühren 3-Brompropanol (625 mL, 6.07 mmol) gegeben. Das resultierende Gemisch wurde bei 65 °C gerührt bis kein weiterer Umsatz des Eduktes mehr zu beobachten war. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Produkt nach säulenchromatographischer Trennung als weißer voluminöser Feststoff erhalten (498 g, 1.17 mmol, 21%).

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.62 (1H, bs, ArOH), 9.34 (1H, bs, ArOH), 6.66 (2H, t, $J = 8.66$ Hz, *arom. H*), 6.60 (1H, s, *arom. H*), 6.43 (2H, t, $J = 8.86$ Hz, *arom. H*), 6.34 (1H, s, *arom. H*), 4.72 (1H, bs, -NH₂), 4.65 (1H, bs, -NH₂), 4.47 (1H, t, $J = 4.80$ Hz, -CH₂NH), 3.45 (2H, q, $J = 5.14$ Hz, H3'), 3.31 (1H, s, -CH₂OH), 2.93 (2H, $J = 6.94$ Hz, H1''), 1.64 (2H, p, $J = 6.37$ Hz, H2''). **¹³C NMR** (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 144.5 (C4'), 144.3 (C4), 136.8 (*arom. C*), 126.0 (*arom. C*), 123.7 (*arom. C*), 123.5 (*arom. C*), 123.2 (*arom. C*), 117.9 (*arom. C*), 117.4 (*arom. C*), 115.8 (*arom. C*), 113.4 (*arom. C*), 112.4 (*arom. C*), 111.0 (-CF₃), 58.8 (C3'), 40.2 (C1'), 31.3 (C2'). **¹⁹F NMR** (377 MHz, DMSO-*d*₆) δ -62.78 (-CF₃). **LCMS** (ESI): $t_R = 7.5$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 425.1 [M+H⁺] (100.0). **HRMS** (ESI): m/z ber. für C₁₈H₁₉F₆N₂O₃⁺ [M+H⁺] 425.1294; gef. m/z 425.1299. **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu} = 3158$ (w), 2951 (w), 1607 (w), 1522 (m), 1480 (w), 1428 (w), 1378 (w), 1324 (w), 1236 (s), 1196 (w), 1146 (m), 1065 (w), 991 (w), 959 (m), 862 (w), 807 (m), 778 (w), 732 (w), 717 (m), 628 (w), 543 (w), 527 (w), 454 (w).

4-Nitropicolinamid (172, JES-050)

Cer(IV)oxid (123 mg, 716 μmol) wurde zu einem Gemisch aus 4-Nitropicolinonitril (**171**) (971 mg, 6.51 mmol) in Wasser/EtOH (6.0 mL/7.5 mL) gegeben und bei 70 °C mehrere Tage gerührt. Nach Abschluss der Reaktion wurde das Gemisch filtriert und viermal mit CH_2Cl_2 extrahiert. Nach Trocknung über Na_2SO_4 und Entfernen des Lösungsmittels wurde das Produkt ohne weitere Aufreinigung sauber erhalten (1.03 g, 6.18 mmol, 95%).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 9.01 (1H, dd, $J = 5.30, 2.26$ Hz, H_2), 8.54 (1H, dd, $J = 2.26, 0.58$ Hz, H_4), 8.34 (1H, bs, $-\text{CONH}_2$), 8.31 (1H, dd, $J = 5.30, 2.26$ Hz, H_5), 7.96 (1H, bs, $-\text{CONH}_2$). **^{13}C NMR** (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 164.23 ($-\text{CONH}_2$), 154.89 (C_3), 153.12 (C_1), 151.40 (C_2), 118.87 (C_5), 114.47 (C_4). **LCMS** (ESI): $t_{\text{R}} = 3.6$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 168.0 [$\text{M}+\text{H}^+$] (100.0). **HRMS** (ESI): m/z ber. für $\text{C}_6\text{H}_5\text{N}_3\text{O}_3\text{Na}^+$ [$\text{M}+\text{Na}^+$] 190.0223; gef. m/z 190.0223. **IR** (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 3396$ (m), 3283 (w), 3165 (w), 3094 (w), 1667 (m), 1602 (w), 1575 (w), 1527 (s), 1465 (w), 1431 (w), 1352 (s), 1251 (m), 1178 (w), 1094 (w), 1074 (w), 997 (w), 915 (w), 894 (w), 869 (w), 798 (m), 776 (w), 737 (m), 684 (m), 644 (s), 503 (m), 418 (w), 409 (w).

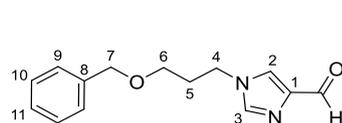
4-Aminopicolinamid (173, JES-061)

Eine Suspension von 4-Nitropyridin-2-carboxamid (**172**) (993 mg, 5.94 mmol) und Platin(IV)oxid (29.8 mg, 131 μmol) in 75 mL EtOH wurde in einer Wasserstoffatmosphäre für 6 h gerührt. Nach Abschluss der Reaktion wurde das Gemisch über Celite abfiltriert

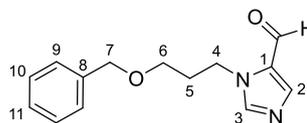
und anschließend vom Lösungsmittel befreit, sodass das Produkt quantitativ gewonnen werden konnte (0.800 g, 5.83 mmol, 98%).

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.00 (1H, d, $J = 5.58$ Hz, *H*5), 7.87 (1H, s, -CONH₂), 7.36 (1H, s, -CONH₂), 7.21 (1H, d, $J = 2.34$ Hz, *H*2), 6.58 (1H, dd, $J = 5.52, 2.40$ Hz, *H*4), 6.26 (2H, s, -NH₂). **¹³C NMR** (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.7 (-CONH₂), 155.4 (*C*3), 150.6 (*C*1), 148.3 (*C*5), 110.3 (*C*4), 106.9 (*C*2). **LCMS** (ESI): $t_R = 1.6$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 138.1 [M+H⁺] (100.0). **HRMS** (ESI): m/z ber. für C₆H₈N₃O⁺ [M+H⁺] 138.0662; gef. m/z 138.0661. **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu} = 3442$ (m), 3393 (w), 3359 (w), 3207 (w), 1669 (w), 1639 (m), 1604 (s), 1558 (w), 1470 (w), 1386 (m), 1301 (w), 1266 (w), 1137 (w), 1106 (w), 992 (m), 936 (w), 874 (w), 840 (w), 792 (w), 754 (w), 650 (w), 548 (w), 510 (w).

1-(3-Benzyloxypropyl)imidazole-4-carbaldehyd (182) und **1-(3-Benzyloxypropyl)imidazole-5-carbaldehyd (181)** (JES-111)



182



181

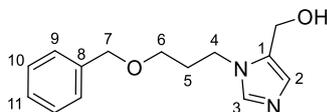
Zu einer Lösung von 1*H*-Imidazolyl-4-carboxaldehyd (**174**) (1.24 g, 12.5 mmol) in 10 mL entgastem DMF wurden Cs₂CO₃ (8.15 g, 25.0 mmol) und nach fünf minütigem Rühren Benzyl-3-brompropanol (2.65 mL, 15 mmol) gegeben. Nach Rühren über Nacht wurde das Cs₂CO₃ über Silica abfiltriert, wobei das Produkt mit EtOAc und CH₂Cl₂:MeOH (9:1; MeOH mit 10% NH₄OH) eluiert wurde. Nach Trocknen über Na₂SO₄ wurde das Lösungsmittel entfernt und die Isomere durch säulenchromatographische Trennung erhalten (**182**:1.51g, 6.18 mmol, 49%; **181**: 1.15 g, 4.71 mmol, 38%; Gesamtausbeute 87%).

Verbindung (182):

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 9.86 (1H, s, -CHO), 7.55 – 7.57 (2H, m, *H2* + *H3*), 7.30 – 7.39 (5H, m, *H9* – *H11*), 4.48 (2H, s, *H7*), 4.15 (2H, t, $J = 6.82$ Hz, *H4*), 3.42 (2H, t, $J = 5.66$ Hz, *H6*), 2.04 – 2.10 (2H, m, *H5*). **¹³C NMR** (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 186.1 (-CHO), 142.4 (*C1*), 139.0 (*C3*), 137.9 (*C8*), 128.7 (*C9* oder *C10*), 128.2 (*C11*), 128.0 (*C9* oder *C10*), 124.6 (*C2*), 73.4 (*C7*), 65.6 (*C6*), 44.6 (*C4*), 31.1 (*C5*). **LCMS** (ESI): $t_R = 5.6$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 245.1 [M+H⁺] (100.0), 489.2 [2M+H⁺] (19.5). **HRMS** (ESI): m/z ber. für C₁₄H₁₇N₂O₂⁺ [M+H⁺] 245.1285; gef. m/z 245.1289. **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu} = 3109$ (w), 3061 (w), 3030 (w), 2928 (w), 2859 (w), 1677 (s), 1537 (s), 1495 (w), 1453 (m), 1399 (w), 1366 (m), 1325 (w), 1234 (w), 1205 (w), 1156 (m), 1088 (s), 1046 (w), 1027 (w), 992 (w), 977 (w), 911 (w), 850 (w), 773 (m), 737 (m), 698 (s), 672 (w), 626 (m), 461 (w).

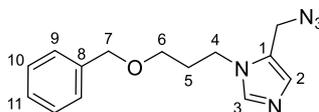
Verbindung (181):

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 9.73 (1H, d, $J = 0.80$ Hz, -CHO), 7.79 (1H, s, *H3*), 7.59 (1H, s, *H2*), 7.29 – 7.39 (5H, m, *H9* – *H11*), 4.47 (s, 2H, *H7*), 4.41 (2H, t, $J = 6.74$ Hz, *H4*), 3.39 (2H, t, $J = 5.70$ Hz, *H6*), 2.03 – 2.09 (2H, m, *H5*). **¹³C NMR** (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 179.0 (-CHO), 144.0 (*C2*), 143.7 (*C3*), 137.9 (*C8*), 131.0 (*C1*), 128.5 (*C9* oder *C10*), 127.9 (*C11*), 127.8 (*C9* oder *C10*), 73.1 (*C7*), 65.9 (*C6*), 44.2 (*C4*), 30.4 (*C5*). **LCMS** (ESI): $t_R = 6.3$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 245.1 [M+H⁺] (100.0). **HRMS** (ESI): m/z ber. für C₁₄H₁₇N₂O₂⁺ [M+H⁺] 245.1285; gef. m/z 245.1287. **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu} = 3108$ (w), 3030 (w), 2929 (w), 2860 (w), 2745 (w), 1667 (s), 1533 (m), 1485 (m), 1453 (w), 1345 (s), 1269 (w), 1207 (m), 1177 (w), 1124 (s), 1105 (w), 1084 (w), 1027 (w), 920 (w), 852 (w), 770 (s), 737 (m), 698 (m), 653 (s), 610 (w), 461 (w).

[3-(3-Benzyloxypropyl)imidazole-4-yl]methanol (183, JES-122)

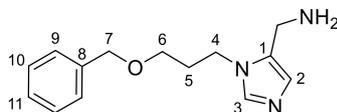
Zu einer eisgekühlten Lösung von 3-(3-Benzyloxypropyl)imidazol-4-carbaldehyd (**181**) (500 mg, 2.05 mmol) in 5 mL MeOH wurde portionsweise NaBH₄ (155 mg, 4.09 mmol) gegeben und das Gemisch für eine halbe Stunde bei dieser Temperatur gerührt. Nach weiteren 2.5 h bei RT wurde das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde in CH₂Cl₂ aufgenommen und mehrfach mit 1 M NaOH-Lösung und etwas wässriger H₂O₂-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und vom Lösungsmittel befreit, wodurch das Produkt als leicht trübes Öl erhalten wurde (413 mg, 1.68 mmol, 82%).

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.41 (1H, s, *H3*), 7.28 – 7.38 (5H, m, *H9 – H11*), 6.90 (1H, s, *H2*), 4.59 (2H, s, -CH₂OH), 4.48 (2H, s, *H7*), 4.13 (2H, t, *J* = 6.94 Hz, *H4*), 3.44 (2H, t, *J* = 5.72 Hz, *H6*), 2.97 (1H, bs, -OH), 2.08 (2H, t, *J* = 6.32 Hz, *H5*).
¹³C NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 138.5 (*C3*), 138.0 (*C8*), 131.3 (*C1*), 128.6 (*C10*), 128.3 (*C2*), 128.0 (*C11*), 128.0 (*C9*), 73.3 (*C7*), 66.3 (*C6*), 54.1 (-CH₂OH), 42.0 (*C4*), 31.0 (*C5*).
 LCMS (ESI): *t*_R = 5.7 min (Methode I); *m/z* (% relative Intensität): 247.1 [M+H⁺] (100.0), 493.3 [2M+H⁺] (2.6).
 HRMS (ESI): *m/z* ber. für C₁₄H₁₉N₂O₂⁺[M+H⁺] 247.1441; gef. *m/z* 247.1440.
 IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3110 (w), 3030 (w), 2925 (w), 2857 (m), 1497 (m), 1453 (m), 1365 (w), 1314 (w), 1272 (w), 1249 (w), 1207 (m), 1163 (w), 1108 (s), 1086 (w), 1020 (m), 932 (m), 820 (m), 736 (m), 697 (s), 661 (m), 609 (w), 460 (w).

5-(Azidomethyl)-1-(3-benzyloxypropyl)imidazol (184, JES-123)

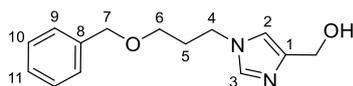
[3-(3-Benzyloxypropyl)imidazol-4-yl]methanol (**183**) (246 g, 1.00 mmol) wurde in frisch destilliertem Thionylchlorid (5.00 mL, 68.9 mmol) refluxiert, bis keine Gasentwicklung mehr zu beobachten war. Anschließend wurde das verbliebene Thionylchlorid im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 5 mL entgastem DMF aufgenommen und mit NaN₃ (346 mg, 5.32 mmol) versetzt. Dieses Gemisch wurde über Nacht bei 50 °C gerührt. Nun wurde der Großteil an DMF im Vakuum entfernt und der Rückstand in CH₂Cl₂ und ges. NaCl-Lösung aufgenommen. Die Phasen wurden separiert und die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Entfernen des restlichen Lösungsmittels wurde verbliebenes DMF mittels Lyophilisierung mit Wasser entfernt, wodurch das ölige Produkt sauber erhalten wurde (221 mg, 815 μmol, 82%).

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.51 (1H, s, *H3*), 7.30 – 7.38 (5H, m, *H9 – H11*), 7.07 (1H, s, *H2*), 4.49 (2H, s, *H7*), 4.30 (2H, s, -CH₂N₃), 4.08 (2H, t, *J* = 6.99 Hz, *H4*), 3.44 (2H, t, *J* = 5.70 Hz, *H6*), 2.05 (2H, tt, *J* = 6.32 Hz, *H5*). ¹³C NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 139.4 (*C3*), 138.0 (*C8*), 130.1 (*C2*), 128.6 (*C10*), 128.0 (*C11*), 127.9 (*C9*), 125.3 (*C1*), 73.3 (*C7*), 66.0 (*C6*), 44.0 (-CH₂N₃), 42.0 (*C4*), 31.1 (*C5*). LCMS (ESI): t_R = 8.4 min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 272.1 [M+H⁺] (100.0), 543.3 [2M+H⁺] (4.3). HRMS (ESI): m/z ber. für C₁₄H₁₈N₃O⁺ [M+H⁺] 272.1506; gef. m/z 272.1502. IR (cm⁻¹): ν̄ = 2930 (w), 2861 (w), 2093 (s), 1496 (m), 1454 (m), 1367 (w), 1233 (m), 1208 (w), 1157 (w), 1111 (s), 1088 (w), 1027 (w), 922 (w), 865 (w), 827 (w), 740 (m), 699 (m), 664 (m).

[3-(3-Benzoyloxypropyl)imidazole-4-yl]methanamin (185, JES-125)

Zu einer Lösung von 5-(Azidomethyl)-1-(3-benzyloxypropyl)imidazole (**184**) (153 mg, 562 μmol) in 4.0 mL EtOH wurde unter Argon-Atmosphäre Pd/C (27.5 mg, 25.8 μmol) gegeben. Das Gemisch wurde nun über Nacht und bei RT unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Als kein Edukt mehr im IR-Spektrum zu erkennen war, wurde das Gemisch über Celite abfiltriert und vom Lösungsmittel befreit. Mittels säulenchromatographischer Trennung wurde das Produkt aus dem erhaltenen Gemisch isoliert (98.4 mg, 401 μmol , 71%).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.37 (1H, s, *H3*), 7.27 – 7.36 (5H, m, *H9 – H11*), 6.88 (1H, s, *H2*), 4.48 (2H, s, *H7*), 4.07 (2H, t, $J = 7.00$ Hz, *H4*), 3.81 (2H, s, $-\text{CH}_2\text{NH}_2$), 3.43 (2H, t, $J = 5.76$ Hz, *H6*), 2.00 – 2.06 (2H, m, *H5*). $^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 137.9 (*C8*), 137.8 (*C3*), 132.4 (*C1*), 128.4 (*C10*), 127.7 (*C11*), 127.6 (*C9*), 126.8 (*C2*), 73.0 (*C7*), 66.1 (*C6*), 41.5 (*C4*), 35.8 ($-\text{CH}_2\text{NH}_2$), 30.9 (*C5*). **HRMS** (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}^+$ [$\text{M}+\text{H}^+$] 246.1601; gef. m/z 246.1602. **IR** (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 3365$ (w), 3291 (w), 3087 (w), 3062 (w), 3030 (w), 2926 (w), 2859 (m), 1603 (w), 1496 (s), 1453 (m), 1365 (m), 1258 (w), 1232 (w), 1206 (w), 1106 (s), 1084 (w), 1026 (w), 925 (w), 815 (m), 737 (s), 698 (s), 662 (s), 609 (w), 461 (w).

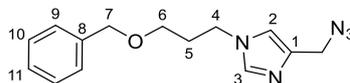
[1-(3-Benzoyloxypropyl)imidazole-4-yl]-methanol (186, JES-127)

Die Durchführung erfolgte analog zur Reduktion des Aldehyds **181**, wobei hier 1-(3-Benzoyloxypropyl)imidazole-4-carbaldehyd (**182**) (1.40 g, 5.73 mmol) eingesetzt wurde. Es

wurden 1.31 g (5.31 mmol, 93%) des gewünschten Produkts als hellgelbes Öl erhalten, das ohne weitere Aufreinigung umgesetzt wurde.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.29 – 7.39 (6H, m, *H3* + *H9* – *H11*), 6.80 (1H, s, *H2*), 4.57 (2H, s, –*CH*₂OH), 4.48 (2H, s, *H7*), 4.03 (2H, t, *J* = 6.82 Hz, *H4*), 3.42 (2H, t, *J* = 5.72 Hz, *H6*), 1.98 – 2.05 (2H, m, *H5*). **¹³C NMR** (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 142.5 (*C1*), 138.1 (*C8*), 137.3 (*C3*), 128.6 (*C10*), 128.0 (*C11*), 128.0 (*C9*), 116.4 (*C2*), 73.3 (*C7*), 66.1 (*C6*), 58.5 (–*CH*₂OH), 44.0 (*C4*), 31.3 (*C5*). **LCMS** (ESI): *t*_R = 5.7 min (Methode I); *m/z* (% relative Intensität): 247.1 [*M*+*H*⁺] (100.0), 493.3 [*2M*+*H*⁺] (1.6). **HRMS** (ESI): *m/z* ber. für C₁₄H₁₉N₂O₂⁺ [*M*+*H*⁺] 247.1441; gef. *m/z*. 247.1446. **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3213 (w), 3109 (w), 3064 (w), 3031 (w), 2927 (w), 2861 (s), 1500 (m), 1454 (m), 1407 (w), 1368 (w), 1206 (w), 1158 (m), 1106 (s), 1090 (w), 1028 (m), 991 (m), 825 (w), 741 (s), 699 (m), 640 (w).

4-(Azidomethyl)-1-(3-benzyloxypropyl)imidazole (187, JES-128)

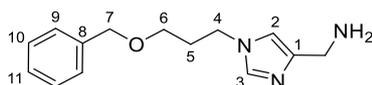


Die Umsetzung des [1-(3-Benzyloxypropyl)imidazole-4-yl]-methanols (**186**) (1.20 g, 4.87 mmol) erfolgte analog zu der des Alkohols **183**, wobei jedoch 6.3 Äq. NaN₃ im zweiten Schritt eingesetzt wurden. Die Aufarbeitung des zweiten Schrittes wurde ebenfalls leicht variiert, wobei der Rückstand nach Entfernen des DMF in ges. NaCl-Lösung aufgenommen wurde und diese wässrige Phase nach Basifizierung mit NaHCO₃-Lösung mit CH₂Cl₂ extrahiert wurde. Das nach Trocknung über Na₂SO₄ und Entfernen des Lösungsmittels erhaltene Produkt (1.16 g, 4.26 mmol, 88%) wurde ohne weitere Aufreinigung umgesetzt.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.48 (1H, s, *H3*), 7.29 – 7.39 (5H, m, *H9* – *H11*), 6.84 (1H, s, *H2*), 4.48 (2H, s, *H7*), 4.29 (2H, s, –*CH*₂N₃), 4.07 (2H, t, *J* = 6.80 Hz, *H4*), 3.42 (2H, t, *J* = 5.72 Hz, *H6*), 2.00 – 2.07 (2H, m, *H5*). **¹³C NMR** (400 MHz, Chloroform-*d*) δ

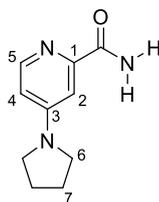
138.0 (*C8*), 137.6 (*C3*), 136.7 (*C1*), 128.6 (*C10*), 128.0 (*C11*), 128.0 (*C9*), 117.7 (*C2*), 73.3 (*C7*), 65.9 (*C6*), 48.2 ($-\text{CH}_2\text{N}_3$), 44.2 (*C4*), 31.2 (*C5*). **LCMS** (ESI): $t_{\text{R}} = 8.1$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 272.2 [$\text{M}+\text{H}^+$] (100.0), 543.3 [$2\text{M}+\text{H}^+$] (2.8). **HRMS** (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_5\text{O}^+$ [$\text{M}+\text{H}^+$] 272.1506; gef. m/z 272.1505. **IR** (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 3088$ (w), 3063 (w), 3030 (w), 2927 (w), 2862 (w), 2092 (s), 1558 (w), 1497 (m), 1453 (m), 1400 (w), 1366 (w), 1311 (w), 1246 (m), 1157 (w), 1104 (s), 1045 (w), 1023 (m), 992 (w), 944 (w), 909 (w), 867 (w), 827 (w), 800 (w), 740 (s), 699 (m), 661 (w), 611 (w).

[1-(3-Benzoyloxypropyl)imidazole-4-yl]methanamin (188, JES-130)



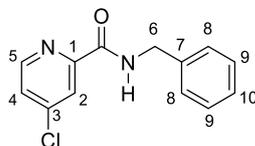
Die Durchführung erfolgte analog zur Umsetzung des Azids **184**. Ausgehend von 4-(Azidomethyl)-1-(3-benzoyloxypropyl)imidazol (**187**) (1.03 g, 3.80 mmol) wurde das gewünschte Produkt nach mehr als einer Woche benötigter Reaktionszeit nach säulenchromatographischer Trennung isoliert (232 mg 0.96 mmol, 25%).

^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.28 – 7.38 (6H, m, $H3 + H9 - H11$), 6.74 (1H, s, $H2$), 4.47 (2H, s, $H7$), 4.00 (2H, t, $J = 6.84$ Hz, $H4$), 3.79 (2H, s, $-\text{CH}_2\text{NH}_2$), 3.41 (2H, t, $J = 5.74$ Hz, $H6$), 2.61 (2H, bs, $-\text{NH}_2$), 1.97 – 2.03 (2H, m, $H5$). **^{13}C NMR** (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 143.6 (*C1*), 138.2 (*C8*), 137.2 (*C3*), 128.6 (*C10*), 128.0 (*C11*), 127.9 (*C9*), 115.42 (*C2*), 73.3 (*C7*), 66.2 (*C6*), 43.9 (*C4*), 39.8 ($-\text{CH}_2\text{NH}_2$), 31.3 (*C5*). **LCMS** (ESI): $t_{\text{R}} = 8.4$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 272.1 [$\text{M}+\text{H}^+$] (100.0), 543.3 [$2\text{M}+\text{H}^+$] (4.3). **HRMS** (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{ONa}^+$ [$\text{M}+\text{Na}^+$] 268.1420; gef. m/z 268.1419. **IR** (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 3366$ (w), 3087 (w), 3061 (w), 3030 (w), 2927 (w), 2859 (m), 1716 (w), 1649 (m), 1547 (w), 1496 (m), 1453 (m), 1366 (w), 1312 (w), 1237 (w), 1158 (m), 1087 (s), 1045 (w), 1026 (w), 822 (w).

4-Pyrrolidin-1-ylpyridin-2-carboxamid (191, JES-142)

Zu einer Suspension von 4-Chlorpyridin-2-carboxamid (**189**) (94.0 mg, 600 μ mol) in 2 mL 1,4-Dioxan wurde unter Argon-Atmosphäre Pyrrolidin (400 μ L, 4.87 mmol) gegeben. Das Gemisch wurde für 3 h bei 110 °C gerührt und nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum säulenchromatographisch getrennt. So wurde das reine Produkt als weißer Feststoff erhalten (63.0 mg, 329 μ mol, 55%).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.12 (1H, d, $J = 5.80$ Hz, H_5), 7.92 (1H, bs, $-\text{CONH}_2$), 7.32 (1H, d, $J = 2.60$ Hz, H_2), 6.43 (1H, dd, $J = 5.78, 2.62$ Hz, H_4), 5.80 (1H, bs, $-\text{CONH}_2$), 3.34 – 3.37 (4H, m, H_6), 1.99 – 2.06 (4H, m, H_7). $^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 168.1 ($-\text{CONH}_2$), 152.8 (C_3), 149.7 (C_1), 148.4 (C_5), 108.8 (C_4), 106.0 (C_2), 47.3 (C_6), 25.4 (C_7). **LCMS** (ESI): $t_R = 5.4$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 192.1 [$\text{M}+\text{H}^+$] (100.0). **HRMS** (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}^+$ [$\text{M}+\text{H}^+$] 192.1131; gef. m/z 192.1132. **IR** (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 3348$ (w), 3119 (w), 2959 (w), 2907 (w), 2851 (w), 1701 (w), 1658 (w), 1634 (w), 1599 (s), 1534 (w), 1504 (w), 1456 (m), 1387 (m), 1339 (w), 1289 (w), 1263 (w), 1248 (w), 1179 (w), 1157 (w), 1058 (w), 1010 (m), 978 (w), 916 (w), 872 (w), 863 (m), 812 (w), 788 (m), 769 (w), 747 (w), 706 (w), 650 (s), 565 (m), 535 (w), 459 (m), 436 (w).

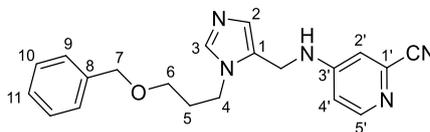
N-Benzyl-4-chlorpyridin-2-carboxamid (192, JES-143)

4-Chlorpyridin-2-carboxamid (94.0 mg, 600 μmol) wurde unter Argon-Atmosphäre in 2 mL 1,4-Dioxan suspendiert und mit Benzylamin (530 μL , 4.87 mmol) versetzt. Da zunächst kein Umsatz zu beobachten war, wurde das Gemisch drei Tage bei 110 °C gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum, wurde das Gemisch säulenchromatographisch getrennt und das Hauptprodukt sauber isoliert (54.1 mg, 238 μmol , 40%).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.41 (1H, d, $J = 5.24$ Hz, H_5), 8.31 (1H, bs, -CONH-), 8.24 (1H, d, $J = 2.04$ Hz, H_2), 7.41 (1H, dd, $J = 5.24, 2.08$ Hz, H_4), 7.25 – 7.35 (5H, m, $H_8 - H_{10}$), 4.66 (2H, d, $J = 6.12$ Hz, H_6). **$^{13}\text{C NMR}$** (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 163.1 (-CONH₂), 151.4 (C_1), 149.0 (C_5), 146.0 (C_3), 138.0 (C_7), 128.8 (C_9), 127.9 (C_8), 127.6 (C_{10}), 126.4 (C_4), 123.1 (C_2), 43.7 (C_6). **LCMS** (ESI): $t_{\text{R}} = 9.4$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 247.1 [$\text{M}+\text{H}^+$] (100.0), 515.1 [$2\text{M}+\text{H}^+$] (2.1). **HRMS** (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{ClN}_2\text{O}^+$ [$\text{M}+\text{H}^+$] 247.0633; gef. m/z 247.0632. **IR** (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 3302$ (w), 3081 (w), 3050 (w), 3024 (w), 2921 (w), 1749 (w), 1658 (s), 1574 (w), 1556 (w), 1519 (s), 1494 (w), 1450 (w), 1420 (w), 1392 (w), 1362 (w), 1293 (m), 1259 (w), 1232 (w), 1202 (w), 1166 (w), 1092 (w), 1076 (w), 1049 (w), 1028 (w), 1009 (w), 991 (w), 912 (w), 844 (w), 831 (m), 795 (w), 749 (w), 715 (s), 686 (m), 618 (w), 606 (w), 529 (w), 513 (m), 454 (m).

4-[[3-(3-Benzoyloxypropyl)imidazol-4-yl]methylanilino)pyridin-2-carbonitril

(195, JES-150)

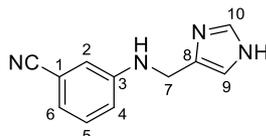


[3-(3-Benzoyloxypropyl)imidazole-4-yl]methanamin (**185**) (159 mg, 648 μmol), Kupfer (3.75 mg, 59.0 μmol) und CsOAc (249 mg, 1.30 mmol; aus AcOH und Cs₂CO₃) vorgelegt, woraufhin die Atmosphäre gegen Argon ausgetauscht wurde und 2.0 mL trockenes DMSO zugegeben wurden. Nachdem die Lösung mit Argon entgast worden war, wurde das Gefäß verschlossen. Bei 110 °C wurde das Gemisch nun 45 min gerührt, bevor 4-Brompyridin-2-carbonitril (**193**) (108 mg, 590 μmol) hinzugegeben wurde. Nach Rühren über Nacht wurde das Gemisch vom Lösungsmittel befreit. Anschließend wurde der Rückstand mit Wasser verdünnt und mit EtOAc extrahiert. Die so erhaltene organische Phase wurde nach Evaporieren des Lösungsmittels durch präparative HPLC getrennt, wobei das Produkt sauber isoliert wurde (12.0 mg, 34.5 μmol , 6%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.12 (1H, d, $J = 5.84$ Hz, $H5'$), 7.60 (1H, bs, $H3$), 7.39 (1H, t, $J = 5.12$ Hz, -NH-), 7.26 – 7.35 (5H, m, $H9 - H11$), 7.12 (1H, d, $J = 2.32$ Hz, $H2'$), 6.89 (1H, bs, $H2$), 6.80 (1H, dd, $J = 5.86, 2.46$ Hz, $H4'$), 4.43 (2H, s, $H7$), 4.33 (2H, d, $J = 5.20$ Hz, -CH₂NH-), 4.00 (2H, t, $J = 7.20$ Hz, $H4$), 3.39 (2H, t, $J = 6.02$ Hz, $H6$), 1.92 – 1.99 (2H, m, $H5$). ¹³C NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 153.6 ($C3'$), 150.6 ($C5'$), 138.3 ($C8$), 132.8 (arom. C), 128.2 (arom. C), 128.0* ($C2$), 127.4 (arom. C), 127.4 ($C11$), 118.2 ($C1'$), 112.3* ($C2'$), 110.0* ($C4'$), 71.9 ($C7$), 66.4 ($C6$), 41.3 ($C4$), 35.5 (-CH₂NH-), 30.5 ($C5$). (*nur aus Korrelationsspektren abgeleitet) LCMS (ESI): $t_R = 7.4$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 348.2 [M+H⁺] (100.0), 695.4 [2M+H⁺] (28.8). HRMS (ESI): m/z ber. für C₂₀H₂₂N₅O⁺ [M+H⁺] 348.1819; gef. m/z 348.1825. IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu} = 3242$ (w), 3130 (w), 2861 (w), 1672 (w), 1597 (s), 1497 (w), 1454 (w), 1365 (w),

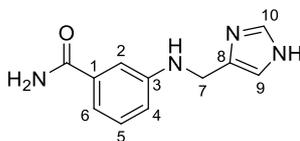
1336 (w), 1202 (w), 1173 (w), 1108 (m), 981 (m), 930 (w), 827 (m), 737 (m), 662 (w), 607 (w), 483 (m).

3-(((1*H*-Imidazol-4-yl)methyl)amino)benzonitril (**197**, JES-220)



1*H*-Imidazol-4-carbaldehyd (**174**) (200 mg, 2.08 mmol) wurde zu einer Lösung von 3-Aminobenzonitril (**196**) (246 mg, 2.08 mmol), in 4 mL MeOH gegeben und das Gemisch wurde über Nacht bei 60 °C gerührt. Nach Zugabe von NaBH₄ (118 mg, 3.12 mmol) wurde für 5 h gerührt bevor die Reaktion durch Zugabe von Wasser abgebrochen wurde. Nach dreimaliger Extraktion mit EtOAc wurden die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Nach säulenchromatographischer Trennung wurde das Produkt als weißer Feststoff erhalten (307 mg, 1.55 mmol, 75%).

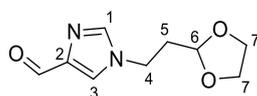
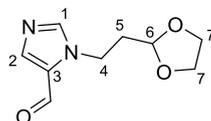
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.62 (1H, d, *J* = 1.12 Hz, *H*10), 7.20 – 7.24 (1H, m, *H*5), 6.94 – 6.98 (3H, m, *H*4 + *H*6 + *H*9), 6.89 (1H, ddd, *J* = 7.46, 7.46, 1.21 Hz, *H*2), 6.41 (1H, t, *J* = 4.76 Hz, -C³NH-), 4.16 (2H, d, *J* = 4.92 Hz, *H*7). ¹³C NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 149.1 (*C*3), 135.7 (*C*8), 135.0 (*C*10), 129.8 (*C*5), 119.6 (-CN), 118.7 (*C*2), 117.1 (*C*4), 116.1 (*C*9), 114.1 (*C*6), 111.5 (*C*1), 39.9 (*C*7). LCMS (ESI): *t*_R = 5.3 min (Methode I); *m/z* (% relative Intensität): 199.1 [M+H⁺] (100.0), 397.1 [2M+H⁺] (4.7). HRMS (ESI): *m/z* ber. für C₁₁H₁₁N₄⁺ [M+H⁺] 199.0978; gef. *m/z* 199.0983. IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3395 (m), 3086 (w), 2978 (w), 2823 (m), 2738 (w), 2667 (w), 2590 (w), 2225 (m), 1605 (s), 1578 (m), 1510 (m), 1491 (s), 1473 (w), 1447 (w), 1409 (w), 1332 (m), 1320 (w), 1273 (w), 1257 (m), 1217 (w), 1164 (w), 1099 (m), 1083 (w), 991 (w), 943 (m), 907 (w), 875 (w), 855 (m), 828 (s), 802 (w), 773 (s), 679 (m), 661 (m), 627 (m), 474 (m), 435 (w).

3-(((1*H*-Imidazol-4-yl)methyl)amino)benzamid (199, JES-224)

Zu einer Lösung von 3-Aminobenzamid (**198**) (262 mg, 1.93 mmol) in 2 mL MeOH wurde 1*H*-Imidazol-4-carbaldehyd (**174**) (185 mg, 1.93 mmol) gegeben. Nach Rühren bei 60 °C über Nacht wurde Natriumborhydrid (109 mg, 2.89 mmol) hinzugegeben. Nach 6.5 h wurde Wasser zugegeben und mit EtOAc extrahiert. Dann wurde einmal mit CHCl₃:PrOH (1:3) und einmal mit *n*-BuOH extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Trocken- und Lösungsmittels wurde das Produkt säulenchromatographisch von Verunreinigungen befreit, wodurch das Produkt als weißgelber Feststoff erhalten wurde (267 mg, 1.23 mmol, 64%).

¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₆) δ 7.61 (1H, d, *J* = 1.12 Hz, *H*10), 7.15 – 7.19 (2H, m, *H*2 + *H*5), 7.10 (1H, dt, *J* = 7.64, 1.30 Hz, *H*6), 6.97 (1H, d, *J* = 0.88 Hz, *H*9), 6.81 – 6.84 (1H, m, *H*4), 4.29 (2H, s, *H*7). ¹³C NMR (400 MHz, Methanol-*d*₆) δ 173.3 (-CONH₂), 150.1 (*C*3), 137.5 (*C*8), 136.3 (*C*10), 135.7 (*C*1), 130.1 (*C*5), 117.7 (*C*9), 117.5 (*C*4), 117.0 (*C*6), 112.8 (*C*2), 41.6 (*C*7). LCMS (ESI): *t*_R = 2.6 min (Methode I); *m/z* (% relative Intensität): 217.1 [M+H⁺] (100.0), 433.2 [2M+H⁺] (6.2). HRMS (ESI): *m/z* ber. für C₁₁H₁₂N₄ONa⁺ [M+Na⁺] 239.0903; gef. *m/z* 239.0902. IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3184 (m), 2858 (w), 2437 (w), 1652 (w), 1601 (w), 1578 (s), 1512 (w), 1487 (w), 1443 (w), 1387 (m), 1335 (w), 1297 (w), 1256 (w), 1209 (w), 1102 (w), 1088 (w), 991 (w), 828 (w), 752 (m), 686 (w), 662 (w), 622 (w).

1-(2-(1,3-Dioxolan-2-yl)ethyl)-1*H*-imidazol-4-carbaldehyd (**201**) und 1-(2-(1,3-Dioxolan-2-yl)ethyl)-1*H*-imidazol-5-carbaldehyd (**202**) (JES-226)

**201****202**

1*H*-Imidazol-4-carbaldehyd (**174**) (5.05 g, 51.0 mmol) wurde zusammen mit K_2CO_3 (14.1 g, 102 mmol) und Kaliumiodid (11.9 g, 71.4 mmol) vorgelegt, woraufhin die Atmosphäre durch Argon ausgetauscht wurde. Nach Zugabe von 60 mL entgastem DMF wurde 5 Minuten gerührt, bis der Aldehyd gelöst war. Nun wurde langsam 2-(2-Bromoethyl)-1,3-dioxolan (**200**) (8.55 mL, 71.4 mmol) zugegeben und das entstandene Gemisch über Nacht bei RT gerührt. Anschließend wurden die Salze abfiltriert und die Lösung eingengt. Der Rückstand wurde mit EtOAc und Wasser aufgenommen und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde drei weitere Male mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden nach Waschen mit 5%iger LiCl-Lösung und ges. NaCl-Lösung über Na_2SO_4 getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Um die entstandenen Regioisomere von Verunreinigungen zu befreien wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch getrennt, wobei das Kieselgel vorher über Nacht in einem Lösungsmittelgemisch aus CH_2Cl_2 :MeOH 9:1 mit 1% NH_4OH desaktiviert wurde. So wurde das Gemisch an Regioisomeren als gelbes Öl erhalten (3.46 g, 17.6 mmol, 35%).

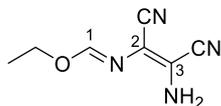
Dieses Regioisomerengemisch konnte durch RP-Säulenchromatographie mit einem C8-Material soweit angetrennt werden, dass das 1,4-substituierte Derivat (weißer Feststoff) sauber charakterisiert werden konnte, während das zweite Regioisomer aus der Mischung heraus charakterisiert wurde.

Verbindung 201:

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.69 (1H, s, -CHO), 8.09 (1H, d, $J = 1.16$ Hz, *H3*), 7.88 (1H, d, $J = 0.92$ Hz, *H1*), 4.82 (1H, t, $J = 4.52$ Hz, *H6*), 4.14 (2H, t, $J = 7.34$ Hz, *H4*), 3.73 – 3.93 (4H, m, *H7*), 2.09 – 2.14 (2H, m, *H5*). **¹³C NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 185.2 (-CHO), 141.5 (*C2*), 139.9 (*C1*), 127.6 (*C3*), 101.3 (*C6*), 64.3 (*C7*), 42.1 (*C4*), 34.1 (*C5*). **LCMS** (ESI): $t_R = 2.6$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 197.1 [M+H⁺] (100.0), 393.2 [2M+H⁺] (6.3). **HRMS** (ESI): m/z ber. für C₉H₁₃N₂O₃⁺ [M+H⁺] 197.0921; gef. m/z 197.0922. **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu} = 3102$ (w), 3060 (w), 2962 (w), 2895 (w), 2848 (w), 2768 (w), 1670 (s), 1542 (m), 1487 (w), 1460 (w), 1446 (w), 1415 (m), 1380 (m), 1358 (w), 1217 (w), 1166 (s), 1133 (m), 1078 (w), 1063 (m), 1048 (w), 1027 (m), 994 (w), 968 (w), 941 (m), 890 (s), 862 (m), 786 (w), 773 (s), 728 (w), 684 (w), 670 (m), 633 (s), 541 (m), 408 (w).

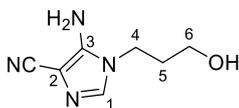
Verbindung 202:

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 9.73 (1H, d, $J = 0.80$ Hz, -CHO), 7.79 (1H, s, *H2*), 7.26 (1H, s, *H3*), 4.81 (1H, t, $J = 4.42$ Hz, *H6*), 4.42 (2H, t, $J = 6.92$ Hz, *H4*), 3.80 – 3.98 (4H, m, *H7*), 2.12 – 2.19 (2H, m, *H5*). **¹³C NMR** (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 179.2 (-CHO), 144.1 (*C1*), 143.7 (*C2*), 131.1 (*C3*), 101.9 (*C6*), 65.3 (*C7*), 42.6 (*C4*), 34.1 (*C5*). **LCMS** (ESI): $t_R = 3.3$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 197.1 [M+H⁺] (100.0). **HRMS** (ESI): m/z ber. für C₉H₁₃N₂O₃⁺ [M+H⁺] 197.0921; gef. m/z 197.0923. (*IR wurde nicht gemessen, da nur als Isomerengemisch*)

Ethyl-*N*-(2-amino-1,2-dicyanovinyl)formimidat (**211**, JES-228)

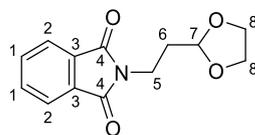
Eine Mischung von Diaminomalonitril (**210**) (20.0 g, 185 mmol) und Triethylorthoformiat (30.0 mL, 185 mmol) in 32 mL 1,4-Dioxan wurde über 4 h refluxiert, wobei über eine Destillationsbrücke kontinuierlich ein Gemisch aus EtOH und Dioxan abdestilliert wurde. Sobald die Kopftemperatur von den vorher durchgängigen 95 °C auf etwa 100 °C stieg, wurde das Heizen gestoppt. Nachdem das Gemisch RT erreicht hatte, wurden 166 mL *n*-Hexan hinzugegeben und das Gemisch auf -15 °C abgekühlt, wobei ein brauner Feststoff ausfiel. Der Feststoff wurde abfiltriert und aus CH₂Cl₂ umkristallisiert. Dabei wurde ein schwarzer Feststoff aus der heißen Lösung abfiltriert. Aus dem Filtrat fiel bei Herabkühlen ein brauner Feststoff aus, der als das saubere Produkt identifiziert wurde (20.2 g, 122 mmol, 66%).

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.01 (1H, s, H1), 4.65 (2H, bs, -NH₂), 4.28 (2H, qd, *J* = 11.87, 0.67 Hz, -CH₂CH₃), 1.39 (3H, t, -CH₃). ¹³C NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 158.2 (*C1*), 121.4 (*C3*), 113.9 (-CN), 113.2 (-CN), 104.2 (*C2*), 64.2 (-CH₂CH₃), 14.1 (-CH₃). LCMS (ESI): t_R = 7.5 min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 165.1 [M+H⁺] (100.0), 137.0 [M-Et+H⁺] (99.5). HRMS (ESI): m/z ber. für C₇H₈N₄ONa⁺ [M+Na⁺] 187.0590; gef. m/z 187.0591. IR (cm⁻¹): ν̄ = 3418 (m), 3307 (s), 3262 (w), 3169 (w), 3106 (w), 2993 (w), 2980 (w), 2244 (m), 2208 (w), 1637 (s), 1607 (w), 1473 (m), 1400 (w), 1378 (m), 1340 (w), 1254 (s), 1231 (w), 1212 (w), 1173 (w), 1150 (w), 1123 (w), 1080 (w), 1009 (w), 940 (w), 808 (m), 632 (m), 600 (w), 545 (m), 503 (s).

5-Amino-1-(3-hydroxypropyl)-1H-imidazol-4-carbonitril (213, JES-230)

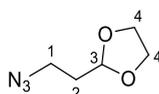
Ethyl-*N*-(2-amino-1,2-dicyanovinyl)formimidat (**211**) (400 mg, 2.44 mmol) und Aniliniumchlorid (5.00 mg, 38.5 μ mol) wurden in 8 mL EtOH gelöst. Nachdem die Lösung auf 10 °C abgekühlt war, wurde bei dieser Temperatur 3-Aminopropanol (**212**) (222 μ L, 2.92 mmol) zugetropft. Dann wurde das Gemisch 3 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Gemisch bei 10 °C zu 5 mL 0.8 M NaOH-Lösung getropft. Nach 1 h Rühren bei RT wurde mit ges. NaCl-Lösung verdünnt und dreimal mit *n*-BuOH extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Der erhaltene Feststoff wurde mit CH₂Cl₂ gewaschen, wodurch nach Trocknung das saubere Produkt gewonnen wurde (401 mg, 2.41 mmol, 99%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.17 (1H, s, *H1*), 6.14 (2H, s, -NH₂), 4.77 (1H, bs, -OH), 3.86 (2H, t, *J* = 7.00 Hz, *H4*), 3.35 – 3.40 (2H, m, *H6*), 1.75 (2H, p, *J* = 6.56 Hz, *H5*). ¹³C NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 147.6 (*C3*), 132.7 (*C1*), 117.5 (-CN), 90.3 (*C2*), 57.3 (*C6*), 40.0 (*C4*), 31.8 (*C5*). LCMS (ESI): *t*_R = 1.4 min (Methode I); *m/z* (% relative Intensität): 167.1 [M+H⁺] (100.0). HRMS (ESI): *m/z* ber. für C₇H₁₁N₄O⁺ [M+H⁺] 167.0927; gef. *m/z* 167.0927. IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3423 (m), 3317 (w), 3123 (m), 2944 (w), 2913 (w), 2886 (w), 2362 (w), 2207 (s), 1683 (w), 1661 (m), 1637 (w), 1587 (s), 1559 (w), 1541 (w), 1526 (w), 1508 (w), 1471 (w), 1457 (w), 1445 (w), 1430 (w), 1403 (w), 1319 (w), 1208 (w), 1063 (m), 1003 (w), 924 (w), 632 (m), 517 (w).

2-(2-(1,3-Dioxolan-2-yl)ethyl)isoindolin-1,3-dion (214, JES-235)

2-(2-Bromoethyl)-1,3-dioxolan (**208**) (2.98 mL, 24.9 mmol) wurde zu einem Gemisch von Kaliumphthalimid (**216**) (5.07 g, 27.3 mmol) und Kaliumiodid (4.13 g, 24.9 mmol) in 50 mL entgastem DMF gegeben. Das Gemisch wurde bei 70 °C über Nacht gerührt bevor 270 mL 5%iger LiCl-Lösung und 150 mL EtOAc zugegeben wurden. Die Phasen wurden getrennt und die organische Phase wurde mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Der ölige Rückstand wurde mit Wasser und etwas NaHCO₃-Lösung verdünnt, woraufhin unter Zugabe von EtOH umkristallisiert wurde. Beim Abkühlen fiel ein hellgelber Feststoff aus, welcher nach Abfiltrieren und Trocknen als das saubere Produkt identifiziert wurde (3.68 g, 14.9 mmol, 60%).

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.80 – 7.85 (2H, m, *H2*), 7.67 – 7.71 (2H, m, *H1*), 4.95 (1H, t, *J* = 4.38 Hz, *H7*), 3.92 – 3.95 (2H, m, *H8*), 3.78 – 3.86 (4H, m, *H5* + *H8*), 2.04 – 2.09 (2H, m, *H6*). ¹³C NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 168.4 (*C4*), 133.9 (*C1*), 132.4 (*C3*), 123.3 (*C2*), 102.8 (*C7*), 65.1 (*C8*), 33.3 (*C5*), 32.4 (*C6*). LCMS (ESI): t_R = 7.1 min (Methode I); *m/z* (% relative Intensität): 248.1 [M+H⁺] (100.0), 517.1 [2M+Na⁺] (1.7). HRMS (ESI): *m/z* ber. für C₁₃H₁₃NO₄Na⁺ [M+Na⁺] 270.0737; gef. *m/z* 270.0741. IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 2948 (w), 2884 (w), 2361 (w), 1765 (w), 1699 (s), 1615 (w), 1558 (w), 1542 (w), 1521 (w), 1467 (w), 1446 (w), 1434 (w), 1393 (s), 1370 (w), 1338 (w), 1248 (w), 1189 (w), 1172 (w), 1123 (m), 1061 (w), 1025 (w), 1011 (m), 992 (w), 944 (w), 911 (w), 889 (s), 848 (w), 793 (w), 726 (w), 713 (s), 669 (w), 620 (w), 566 (w), 529 (m), 495 (m).

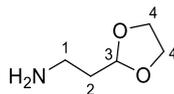
2-(2-Azidoethyl)-1,3-dioxolan (217, JES-238)

Zu einer 0.5 M Lösung von NaN_3 (3.95 g, 60.8 mmol) in trockenem DMSO wurde 2-(2-Bromoethyl)-1,3-dioxolan (**208**) (6.61 mL, 55.2 mmol) getropft und die resultierende Lösung wurde bei RT über Nacht gerührt. Anschließend wurden langsam 270 mL Wasser zugegeben. Nach dreimaliger Extraktion mit jeweils 160 mL Et_2O wurde die organische Phase zweimal mit 270 mL Wasser und einmal mit 270 mL ges. NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknung über Na_2SO_4 und Entfernen des Lösungsmittels (max. 35 °C und 150 mbar) wurde ein gelbes Öl erhalten, das als Produkt identifiziert wurde (6.76 g, 47.2 mmol, 86%).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 4.96 (1H, t, $J = 4.48$ Hz, H_3), 3.96 – 4.02 (2H, m, H_4), 3.83 – 3.91 (2H, m, H_4), 3.43 (2H, t, $J = 6.92$ Hz, H_1), 1.93 – 1.98 (2H, m, H_2).

$^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 102.2 (C_3), 65.1 (C_4), 46.7 (C_1), 33.2 (C_2).

HRMS (ESI): *ionisiert weder bei ESI noch bei APCI in der Routineanalytik, zudem UV-inaktiv (PDA)* **IR** (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 2958$ (w), 2885 (w), 2090 (s), 1457 (w), 1412 (w), 1368 (w), 1349 (w), 1293 (w), 1263 (m), 1136 (s), 1087 (w), 1057 (w), 1028 (m), 980 (w), 944 (m), 906 (w), 791 (w), 640 (w), 557 (w), 484 (w).

2-(1,3-Dioxolan-2-yl)ethan-1-amin (215, JES-233)

Methode 1: Eine Lösung von 2-(2-(1,3-Dioxolan-2-yl)ethyl)isoindolin-1,3-dion (**214**) (3.74 g, 15.1 mmol) und Hydrazinmonohydrat (2.00 mL, 41.2 mmol) in 62 mL MeOH

wurde für 4 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt und 10%ige NaOH-Lösung zugegeben. Nach Rühren für 15 Minuten wurde mehrfach mit CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das durch Entfernen des Lösungsmittels erhaltene Öl wurde ohne weitere Aufreinigung umgesetzt (750 mg, 6.40 mmol, 42%).

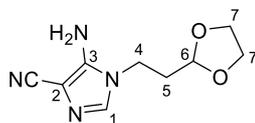
Methode 2: Zu einer Lösung von 2-(2-Azidoethyl)-1,3-dioxolan (**217**) (6.40 g, 44.7 mmol) in 45 mL trockenem THF wurde über 3 h eine Lösung von Triphenylphosphin (11.7 g, 44.7 mmol) in 45 mL trockenem THF getropft. Anschließend wurde die Lösung für 2 h bei RT gerührt und dann mit 1.5 mL Wasser versetzt. Nach einer weiteren Stunde Rührzeit wurde die Lösung konzentriert und 45 mL Et₂O zugegeben. Bei Zugabe von Na₂SO₄ fiel zusätzlicher Feststoff aus. Dieser wurde zusammen mit dem Trockenmittel abfiltriert und mehrfach mit Et₂O gewaschen. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das Produkt durch eine Kugelrohrdestillation gereinigt (75 – 100 °C/0.2 mbar) und als klares Öl erhalten (3.22 g, 27.5 mmol, 62%).

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 4.90 (1H, t, $J = 4.70$ Hz, *H3*), 3.78 – 3.98 (4H, m, *H4*) 2.83 (2H, t, $J = 6.66$ Hz, *H1*), 1.79 (2H, td, $J = 9.97, 4.72$ Hz, *H2*).

¹³C NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 103.8 (*C3*), 64.9 (*C4*), 37.6 (*C1*), 37.4 (*C2*).

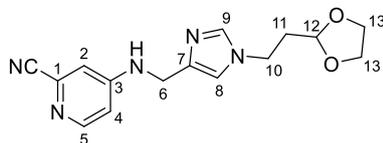
LCMS (ESI): $t_R = 1.4$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 118.1 [M+H⁺] (100.0). **HRMS** (ESI): m/z ber. für C₅H₁₂NO₂⁺ [M+H⁺] 118.0863; gef. m/z 118.0862.

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu} = 3357$ (w), 3264 (w), 2951 (w), 2880 (m), 1603 (w), 1474 (w), 1410 (w), 1362 (w), 1215 (w), 1129 (s), 1022 (m), 944 (w), 878 (w), 805 (w), 731 (w), 710 (w), 543 (w).

1-(2-(1,3-Dioxolan-2-yl)ethyl)-5-amino-1*H*-imidazol-4-carbonitril (**218**, JES-236)

Ethyl-*N*-(2-amino-1,2-dicyanovinyl)formimidat (**211**) (3.53 g, 21.5 mmol) und Aniliniumchlorid (67.2 mg, 519 μmol) wurden in 50 mL EtOH gelöst. Nachdem die Lösung auf 10 °C abgekühlt wurde, wurde bei dieser Temperatur eine Lösung von 2-(1,3-Dioxolan-2-yl)ethan-1-amin (**215**) (3.04 g, 25.9 mmol) zugetropft. Dann wurde das Gemisch über Nacht bei RT gerührt. Anschließend wurde das Gemisch bei 10 °C zu 50 mL 0.8 M NaOH-Lösung getropft. Nach 1.5 h Rühren bei RT wurde mit ges. NaCl-Lösung verdünnt und dreimal mit CH_2Cl_2 extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Das Produkt wurde durch DCVC aus dem Rohgemisch gewonnen (1.91 g, 9.16 mmol, 35%).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 7.17 (1H, s, *H1*), 6.10 (2H, s, $-\text{NH}_2$), 4.81 (1H, t, $J = 4.68$ Hz, *H6*), 3.85 – 3.91 (4H, m, *H4* + *H7*), 3.75 – 3.79 (2H, m, *H7*), 1.93 – 1.98 (2H, m, *H5*). $^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 147.4 (*C3*), 132.7 (*C1*), 117.4 ($-\text{CN}$), 101.3 (*C6*), 90.5 (*C2*), 64.3 (*C7*), 38.6 (*C4*), 32.7 (*C5*). **LCMS** (ESI): $t_{\text{R}} = 2.8$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 209.1 [$\text{M}+\text{H}^+$] (100.0), 417.1 [$2\text{M}+\text{H}^+$] (11.3). **HRMS** (ESI): m/z ber. für $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_2^+$ [$\text{M}+\text{H}^+$] 209.1033; gef. m/z 209.1032. **IR** (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 3362$ (m), 3330 (w), 3129 (m), 2889 (w), 2201 (s), 1661 (s), 1593 (s), 1525 (m), 1471 (w), 1447 (w), 1426 (m), 1215 (m), 1174 (w), 1146 (m), 1101 (m), 1034 (s), 1025 (w), 969 (m), 937 (m), 889 (m), 818 (w), 797 (w), 736 (m), 707 (w), 639 (w), 625 (w), 522 (m), 483 (w), 439 (w).

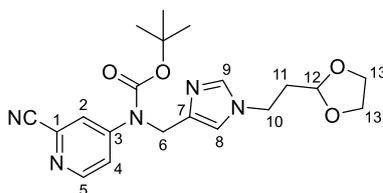
4-(((1-(2-(1,3-Dioxolan-2-yl)ethyl)-1*H*-imidazol-4-yl)methyl)amino)picolinonitril (**203**, JES-227)

4-Aminopyridin-2-carbonitril (100 mg, 839 μmol) wurde in einem Gemisch aus 1.5 mL 1,2-Dichlorethan und AcOH (240 μL , 4.20 mmol) gelöst. Dann wurde eine Lösung der regioisomeren Imidazolcarbaldehyde **201** und **202** (329 mg, 1.68 mmol) in 1 mL 1,2-Dichlorethan zugegeben. Nach Zugabe von $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (480 mg, 2.27 mmol) wurde das Gemisch für 2.5 h bei RT gerührt, bevor 1 M NaOH-Lösung zugegeben wurde. Nach Separation der Phasen wurde die wässrige Phase dreimal mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Nach säulenchromatographischer Trennung wurde das Produkt als milchiges Öl erhalten, das später auskristallisierte (169 mg, 566 μmol , 67%).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.09 (1H, d, $J = 5.88$ Hz, H_5), 7.59 (1H, d, $J = 1.28$ Hz, H_9), 7.40 (1H, t, $J = 5.48$ Hz, $-\text{NH}$), 7.11 – 7.12 (2H, m, $H_2 + H_8$), 6.79 (1H, dd, $J = 5.88, 2.44$ Hz, H_4), 4.76 (1H, t, $J = 4.68$ Hz, H_{12}), 4.16 (2H, d, $J = 5.56$ Hz, H_6), 4.00 (2H, t, $J = 7.40$ Hz, H_{10}), 3.72 – 3.93 (4H, m, H_{13}), 1.99 – 2.04 (2H, m, H_{11}). $^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 153.9 (C_3), 150.4 (C_5), 137.9 (C_7), 137.2 (C_9), 132.7 (C_1), 118.3 ($-\text{CN}$), 116.9 (C_8), 112.3 (C_2), 109.8 (C_4), 101.3 (C_{12}), 64.3 (C_{13}), 41.6 (C_{10}), 39.8 (C_6), 34.7 (C_{11}). **LCMS** (ESI): $t_R = 4.8$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 300.2 [$\text{M}+\text{H}^+$] (100.0), 599.3 [$2\text{M}+\text{H}^+$] (25.0). **HRMS** (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_5\text{O}_2^+$ [$\text{M}+\text{H}^+$] 300.1455; gef. m/z 300.1455. **IR** (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 3225$ (w), 3132 (w), 3078 (w), 3048 (w), 3023 (w), 2962 (w), 2931 (w), 2886 (m), 2233 (w), 1598 (s), 1530 (m), 1503 (w), 1471 (w), 1442 (w), 1419 (w), 1358 (w), 1319 (m), 1281 (m), 1265 (w), 1244 (w), 1215 (w), 1170 (w), 1138 (m), 1076 (w), 1048 (w), 1022 (w), 992 (w), 978 (s), 945 (w).

918 (w), 902 (w), 884 (w), 865 (w), 837 (w), 815 (w), 789 (w), 760 (w), 729 (w), 685 (w), 649 (w), 633 (m), 541 (w), 500 (w), 483 (m).

***tert*-Butyl((1-(2-(1,3-dioxolan-2-yl)ethyl)-1*H*-imidazol-4-yl)methyl(2-cyanopyridin-4-yl)carbamate (204, JES-255)**

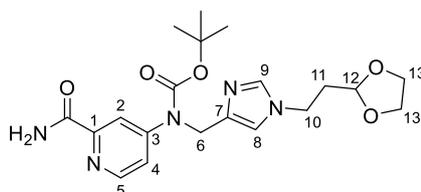


4-(((1-(2-(1,3-Dioxolan-2-yl)ethyl)-1*H*-imidazol-4-yl)methyl)amino)picolinonitril (**203**) (100 mg, 334 μ mol) wurde bei 0 °C in 800 μ L DMF während NaH (60%ig, 20.0 mg, 501 μ mol) portionsweise im Argon-Gegenstrom zugegeben wurde, wobei eine gelbe Lösung entstand. Das Gemisch wurde bei RT 30 Minuten gerührt, woraufhin Boc₂O (87.5 mg, 401 μ mol) zugegeben und das Gemisch über Nacht gerührt wurde. Dann wurden 0.8 mL einer 5%igen LiCl-Lösung zugegeben und dreimal mit 0.8 mL CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 0.8 mL ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Das Produkt wurde nach säulenchromatographischer Trennung als klares Öl erhalten (103 mg, 258 μ mol, 77%).

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.51 (1H, dd, $J = 5.80, 0.36$ Hz, *H2*), 8.03 (1H, dd, $J = 2.28, 0.52$ Hz, *H5*), 7.78 (1H, dd, $J = 5.72, 2.36$ Hz, *H4*), 7.51 (1H, s, *H9*), 6.88 (1H, s, *H8*), 4.80 – 4.82 (3H, m, *H6 + H12*), 4.06 (2H, t, $J = 7.22$ Hz, *H10*), 3.82 – 3.97 (4H, m, *H13*), 2.09 – 2.13 (2H, m, *H11*), 1.50 (9H, s, -C(CH₃)₃). ¹³C NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 152.8 (-NCO-), 151.4 (*C2*), 151.0 (*C3*), 138.1 (*C7*), 136.7 (*C9*), 134.1 (*C1*), 122.9 (*C5*), 120.3 (*C4*), 117.5 (-CN), 117.5 (*C8*), 101.5 (*C12*), 83.2 (-C(CH₃)₃), 65.2 (*C13*), 46.8 (*C6*), 42.3 (*C10*), 34.9 (*C11*), 28.3 (-C(CH₃)₃). LCMS (ESI): $t_R = 8.1$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 400.2 [M+H⁺] (100.0), 799.3

[2M+H⁺] (14.3). **HRMS** (ESI): *m/z* ber. für C₂₀H₂₆N₅O₄⁺ [M+H⁺] 400.1979; gef. *m/z* 400.1978 **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3327 (w), 2981 (w), 2933 (m), 2864 (w), 1677 (s), 1589 (w), 1519 (s), 1481 (w), 1450 (w), 1434 (w), 1402 (w), 1389 (w), 1364 (m), 1327 (w), 1299 (w), 1274 (s), 1253 (w), 1243 (w), 1189 (w), 1163 (s), 1140 (w), 1093 (w), 1076 (w), 1037 (w), 999 (m), 968 (w), 950 (w), 936 (m), 899 (w), 875 (m), 848 (w), 824 (w), 804 (m), 787 (w), 768 (w), 715 (w), 641 (w), 624 (m), 495 (w), 443 (m).

***tert*-Butyl-((1-(2-(1,3-dioxolan-2-yl)ethyl)-1*H*-imidazol-4-yl)methyl)(2-carbamoylpyridin-4-yl)carbamate (205, JES-258)**

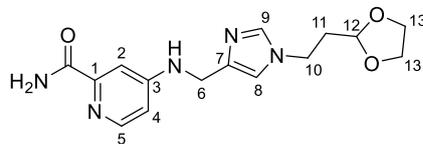


tert-Butyl((1-(2-(1,3-dioxolan-2-yl)ethyl)-1*H*-imidazol-4-yl)methyl(2-cyanopyridin-4-yl)-carbamate (**204**) (536 mg, 1.34 mmol) wurde mit MeOH (928 μ L, 22.9 mmol), 3 M NaOH (1.06 mL, 3.17 mmol) und 35%iger H₂O₂-Lösung (371 μ L, 3.82 mmol) versetzt. Das entstandene Gemisch wurde eine halbe Stunde bei RT gerührt und anschließend mit Wasser verdünnt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt. Das Produkt wurde als weißer, klebriger Feststoff erhalten (396 mg, 949 μ mol, 71%).

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.41 (1H, dd, *J* = 5.56, 0.36 Hz, *H*5), 8.24 (1H, d, *J* = 2.16 Hz, *H*2), 7.81 (1H, d, *J* = 2.76 Hz, *H*), 7.66 (1H, dd, *J* = 5.56, 2.36 Hz, *H*4), 7.49 (1H, d, *J* = 1.12 Hz, *H*9), 6.86 (1H, s, *H*8), 5.83 (1H, d, *J* = 2.72 Hz, *H*), 4.86 (2H, s, *H*6), 4.79 (1H, t, *J* = 4.36 Hz, *H*12), 4.03 (2H, t, *J* = 7.24 Hz, *H*10), 3.81 – 3.87 (4H, m, *H*13),

2.06 – 2.11 (2H, m, *H11*), 1.48 (9H, s, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$). ^{13}C NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 166.8 ($-\text{CONH}_2$), 153.3 ($-\text{NCO}-$), 151.5 (*C3*), 150.2 (*C1*), 148.9 (*C5*), 138.7 (*C7*), 136.6 (*C9*), 120.8 (*C4*), 117.4 (*C2 + C8*), 101.6 (*C12*), 82.4 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 65.1 (*C13*), 46.8 (*C6*), 42.3 (*C10*), 34.9 (*C11*), 28.3 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$). LCMS (ESI): $t_{\text{R}} = 6.5$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 418.2 [$\text{M}+\text{H}^+$] (100.0), 835.4 [$2\text{M}+\text{H}^+$] (40.3). HRMS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{N}_5\text{O}_5^+$ [$\text{M}+\text{H}^+$] 418.2085; gef. m/z 418.2086. IR (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 3449$ (w), 3310 (w), 2976 (w), 2888 (w), 1688 (s), 1594 (m), 1557 (w), 1503 (w), 1476 (w), 1442 (m), 1368 (m), 1309 (w), 1249 (w), 1213 (w), 1151 (s), 1082 (w), 1047 (w), 997 (w), 945 (w), 908 (w), 869 (w), 854 (w), 792 (w), 769 (w), 732 (m), 626 (w), 566 (w).

4-(((1-(2-(1,3-Dioxolan-2-yl)ethyl)-1*H*-imidazol-4-yl)methyl)amino)picolinamid (221, JES-267)



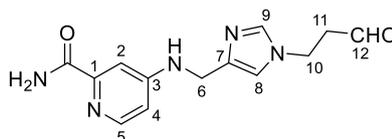
4-(((1-(2-(1,3-Dioxolan-2-yl)ethyl)-1*H*-imidazol-4-yl)methyl)amino)picolinonitril (**203**) (300 mg, 1.00 mmol) wurde mit MeOH (693 μL , 17.1 mmol), 3 M NaOH (790 μL , 3.00 mmol) und 35%iger H_2O_2 -Lösung (644 μL , 6.63 mmol) versetzt. Das entstandene Gemisch wurde eine halbe Stunde bei RT gerührt und anschließend mit Wasser verdünnt. Die wässrige Phase wurde einmal mit EtOAc und anschließend dreimal mit *n*-BuOH extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurden verbliebene Spuren von *n*-BuOH nach Zugabe von MeCN und Wasser durch Gefriertrocknung entfernt. Das entstandene Produkt wurde ohne weitere Aufarbeitung verwendet (272 mg, 856 μmol , 85%).

^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.06 (1H, d, $J = 5.64$ Hz, *H5*), 7.86 (1H, d, $J = 2.64$ Hz, $-\text{CONH}_2$), 7.40 – 7.41 (2H, m, *H2 + H9*), 6.84 (1H, s, *H8*), 6.55 (1H, dd,

$J = 5.66$, 2.50 Hz, $H4$), 6.07 (1H, d, $J = 3.04$ Hz, $-CONH_2$), 5.44 (1H, t, $J = 5.14$ Hz, $-CNHC-$), 4.79 (1H, t, $J = 4.38$ Hz, $H12$), 4.28 (2H, d, $J = 5.32$ Hz, $H6$), 4.01 (2H, t, $J = 7.28$ Hz, $H10$), $3.80 - 3.94$ (4H, m, $H13$), $2.06 - 2.10$ (2H, m, $H11$). ^{13}C NMR (400 MHz, Chloroform- d) δ 167.9 ($-CONH_2$), 154.5 ($C3$), 150.0 ($C1$), 148.5 ($C5$), 138.7 ($C7$), 137.2 ($C9$), 116.5 ($C8$), 109.8 ($C4$), 106.5 ($C2$), 101.5 ($C12$), 65.1 ($C13$), 42.1 ($C10$), 40.7 ($C6$), 34.9 ($C11$). LCMS (ESI): $t_R = 3.8$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 318.1 [$M+H^+$] (100.0), 635.3 [$2M+H^+$] (15.4). HRMS (ESI): m/z ber. für $C_{15}H_{20}N_5O_3^+$ [$M+H^+$] 318.1561 ; gef. m/z 318.1566 . IR (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 3294$ (w), 3140 (w), 2958 (w), 2888 (w), 1707 (w), 1677 (m), 1603 (s), 1567 (w), 1504 (w), 1435 (w), 1364 (m), 1326 (w), 1268 (w), 1244 (w), 1222 (w), 1160 (w), 1137 (m), 1081 (w), 1045 (w), 1026 (w), 986 (s), 944 (w), 904 (w), 829 (w), 791 (w), 731 (s), 700 (w), 625 (m), 566 (w), 530 (w).

4-(((1-(3-Oxopropyl)-1*H*-imidazol-4-yl)methyl)amino)picolinamid

(**222**, JES-269)

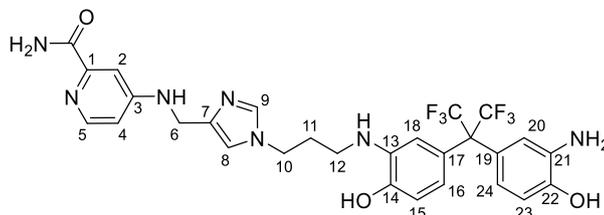


Eine Lösung von 4-(((1-(2-(1,3-Dioxolan-2-yl)ethyl)-1*H*-imidazol-4-yl)methyl)amino)picolinamid (**221**) (130 mg, 410 μ mol) in 3.00 mL THF wurde mit 1.95 mL Wasser verdünnt und anschließend tropfenweise mit Perchlorsäure (70% in Wasser, 650 μ L, 4.54 mmol) versetzt. Nach 5 h Rühren bei RT wurde ges. K_2CO_3 -Lösung zugegeben und der ausfallende Feststoff wurde abfiltriert und anschließend mit EtOAc gewaschen. Nach Trennung der wässrigen und organischen Phase wurde die wässrige Phase dreimal mit *n*-BuOH extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. $Na_2S_2O_3$ -Lösung gewaschen und anschließend über Na_2SO_4 getrocknet. Nach

säulenchromatographischer Trennung wurde das Produkt laut LCMS-Analyse sauber gewonnen (87.8 mg, 321 μmol , 78%), jedoch konnte kein sauberes NMR-Spektrum der Substanz aufgenommen werden.

LCMS (ESI): $t_{\text{R}} = 0.7$ min (Methode III); m/z (% relative Intensität): 274.1 $[\text{M}+\text{H}^+]$ (51.3), 292.1 $[\text{M}+\text{H}^++\text{MeCN}]$ (100). **HRMS** (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_2^+$ $[\text{M}+\text{H}^+]$ 274.1299; gef. m/z 274.1309. **IR** (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 3564$ (w), 3308 (w), 3138 (w), 2953 (w), 2921 (s), 2852 (w), 2531 (w), 2165 (w), 1672 (w), 1633 (w), 1605 (s), 1504 (w), 1459 (w), 1377 (w), 1325 (w), 1257 (m), 1224 (w), 1160 (w), 1090 (w), 1029 (w), 987 (w), 893 (w), 828 (w), 790 (w), 732 (w), 695 (w), 637 (m), 624 (w), 589 (w), 571 (w), 560 (w), 514 (w), 497 (w), 482 (w), 446 (w).

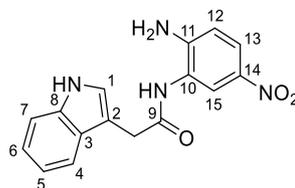
4-(((1-(3-((5-(2-(3-Amino-4-hydroxyphenyl)-1,1,1,3,3,3-hexafluorpropan-2-yl)-2-hydroxyphenyl)amino)propyl)-1*H*-imidazol-4-yl)methyl)amino)picolinamid
(**194**, JES-270)



Zu einer Lösung von 2,2-Bis(3-amino-4-hydroxyphenyl)hexafluoropropan (**104**) (94.9 mg, 259 μmol) in 0.5 mL entgastem DMF wurde tropfenweise eine Lösung von 4-(((1-(3-Oxopropyl)-1*H*-imidazol-4-yl)methyl)amino)picolinamid (**222**) (47.2 mg, 173 μmol) in 0.7 mL entgastem DMF gegeben. Nach 10 min Rühren bei RT wurde $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (43.9 mg, 207 μmol) hinzugegeben und das Gemisch bei RT über Nacht gerührt. Dann wurde ges. NaHCO_3 -Lösung zugegeben und das entstandene Gemisch mit *n*-BuOH dreimal extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl -Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Rohprodukt wurde in MeCN/Wasser aufgenommen und

durch präparative HPLC (HILIC-Phase) von überschüssigem Edukt getrennt. Die Produktfraktionen wurden durch Gefriertrocknung vom Lösungsmittel befreit, sodass das Produkt als weißer Feststoff gewonnen wurde (24.1 mg, 38.7 μmol , 22%).

^1H NMR (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) δ 8.03 (1H, bs, H_5), 7.59 (1H, bs, H_9), 7.35 (1H, bs, H_2), 7.00 (1H, bs, H_8), 6.66 – 6.75 (6H, m, $H_4 + H_{\text{arom}}$), 6.39 (1H, bs, H_{arom}), 4.31 (2H, bs, H_6), 3.98 (2H, bs, H_{10}), 2.93 (2H, bs, H_{12}), 1.93 (2H, bs, H_{11}). **^{13}C NMR** (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) δ 168.7 ($-\text{CONH}_2$), 157.2 (C_3), 149.5 (C_1), 147.9 (C_5), 146.8 (C_{quart}), 146.8 (C_{quart}), 146.4 (C_{quart}), 139.0 (C_7), 138.5 (C_9), 138.0 (C_{13}), 136.0 (C_{quart}), 126.1 (C_{quart}), 122.0 (CH_{arom}), 120.1 (CH_{arom}), 119.4 (CH_{arom}), 118.6 (C_8), 114.5 (CH_{arom}), 114.4 (CH_{arom}), 113.5 (CH_{arom}), 110.2 (C_4), 107.5 (C_2), 46.0 (C_{10}), 41.4 (C_{12}), 41.1 (C_6), 31.2 (C_{11}). **^{19}F NMR** (376 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) δ 64.7 ($-\text{CF}_3$). **LCMS** (ESI): $t_{\text{R}} = 7.4$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 624.2 [$\text{M}+\text{H}^+$] (100.0). **HRMS** (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{F}_6\text{N}_7\text{O}_3^+$ [$\text{M}+\text{H}^+$] 624.2152; gef. m/z 624.2156. **IR** (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 3115$ (w), 2937 (w), 1661 (m), 1604 (s), 1567 (w), 1522 (m), 1435 (w), 1383 (w), 1326 (w), 1235 (m), 1196 (w), 1152 (s), 1099 (w), 988 (m), 958 (m), 807 (w), 789 (w), 734 (w), 717 (m), 661 (w), 627 (w), 578 (w), 542 (w), 526 (w), 453 (w).

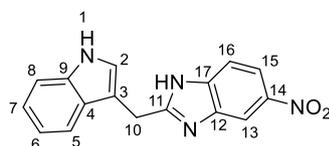
7.2.9 Synthese des FESIK-PROTACs***N*-(2-Amino-5-nitrophenyl)-2-(1*H*-indol-3-yl)acetamid (**228**, DWE-005)**

Indol-3-essigsäure (**226**) (5.00 g, 28.5 mmol) und HATU (11.0 g, 28.9 mmol) wurden unter Argon-Atmosphäre in 67 mL entgastem DMF gelöst. Nach Zugabe von DIPEA (14.2 mL, 83.7 mmol) wurde das Gemisch für 1 h gerührt. Bevor das Reaktionsgemisch bei RT über Nacht gerührt wurde, wurde *p*-Nitrophenylendiamin (**227**) (4.49 g, 29.3 mmol) zugegeben. Die flüchtigen Bestandteile wurden nach Abschluss der Reaktion am Rotationsverdampfer bei 60 °C entfernt. Der Rückstand wurde mit 200 mL EtOAc verdünnt und mit 200 mL Wasser gewaschen. Die wässrige Phase wurde zweimal mit weiterem EtOAc extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden mit Na₂SO₄ getrocknet, bevor das Lösungsmittel entfernt wurde. Nach Umkristallisation aus EtOH wurde eine Produktfraktion durch Abfiltrieren gewonnen. Das Filtrat wurde mit einer kleinen Menge Wasser versetzt, wodurch weiteres Produkt ausfiel und abfiltriert werden konnte. Die so erhaltenen Fraktionen gelb-orangen Feststoffs wurden vereinigt und als das saubere Produkt charakterisiert (5.44 g, 17.5 mmol, 61%).

¹H NMR (400 MHz, Aceton-*d*₆) δ 10.15 (1H, bs, -CNHC-), 8.60 (1H, bs, -CONH-), 8.19 (1H, d, *J* = 2.44 Hz, *H*₁₅), 7.86 (1H, dd, *J* = 8.98, 2.62 Hz, *H*₁₃), 7.69 (1H, d, *J* = 7.80 Hz, *H*₇), 7.39 – 7.42 (2H, m, *H*₄ + *H*₁), 7.11 – 7.15 (1H, m, *H*₅), 7.03 – 7.07 (1H, m, *H*₆), 6.84 (1H, d, *J* = 9.00 Hz, *H*₁₂), 5.68 (2H, bs, -NH₂), 3.91 (2H, s, -CH₂-). ¹³C NMR (400 MHz, Aceton-*d*₆) δ 171.5 (*C*₉), 150.2 (*C*₁₄), 138.4 (*C*₁₁), 137.8 (*C*₈), 128.6 (*C*₃), 125.1 (*C*₁), 123.7 (*C*₁₃), 123.6 (*C*₁₀), 123.2 (*C*₁₅), 122.5 (*C*₆), 120.0 (*C*₅), 119.6 (*C*₇), 115.4 (*C*₁₂), 112.4 (*C*₄), 109.7 (*C*₂), 34.5 (-CH₂-). LCMS (ESI): *t*_R = 7.3 min (Methode I); *m/z* (%)

relative Intensität): 311.1 [M+H⁺] (100.0), 621.2 [2M+H⁺] (66.7). **HRMS** (ESI): m/z ber. für C₁₆H₁₅N₄O₃⁺ [M+H⁺] 311.1139; gef. m/z 311.1144. **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3338 (w), 3262 (m), 3078 (w), 2896 (w), 1651 (m), 1591 (m), 1519 (w), 1505 (w), 1487 (s), 1458 (w), 1434 (w), 1398 (w), 1365 (w), 1328 (w), 1307 (s), 1268 (w), 1241 (w), 1226 (w), 1200 (w), 1155 (w), 1128 (w), 1094 (m), 1067 (w), 976 (w), 899 (m), 836 (m), 826 (w), 779 (w), 759 (w), 738 (s), 641 (m), 616 (w), 596 (w), 546 (w), 525 (w), 465 (m), 425 (m).

2-(1*H*-Indol-3-ylmethyl)-6-nitro-1*H*-benzimidazol (**229**, DWE-006)

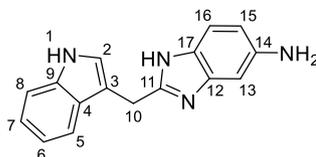


N-(2-Amino-5-nitrophenyl)-2-(1*H*-indol-3-yl)acetamid (**228**) (2.23 g, 7.18 mmol) wurde in 50 mL AcOH suspendiert und wurde für 30 Minuten mit max. 150 W Mikrowellenstrahlung bei 112 °C erhitzt. Anschließend wurde der Großteil an AcOH im Vakuum entfernt, bevor NaHCO₃-Lösung zum Rückstand gegeben wurde. Nach Zugabe von EtOAc wurden die Phasen getrennt und die wässrige Phase wurde zwei weitere Male mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Das Produkt wurde als orange-brauner Feststoff erhalten (2.09 g, 7.14 mmol, quant.).

¹H NMR (400 MHz, Aceton-*d*₆) δ 11.69 (1H, bs, -CNNH-), 10.20 (1H, bs, H1), 8.27 – 8.45 (1H, m, H15 oder H16), 8.06 – 8.09 (1H, m, H13), 7.49 – 7.68 (2H, m, H5 + H15 oder H16), 7.37 – 7.42 (2H, m, H2 + H8), 7.08 – 7.12 (1H, m, H6), 6.95 – 6.99 (1H, m, H7), 4.47 (2H, s, H10). ¹³C NMR (400 MHz, Aceton-*d*₆) δ 161.4* (C11), 144.1 (C17), 137.9 (C9), 128.4 (C4), 125.1 (C2), 122.7 (C6), 120.1 (C7), 119.5 (C5), 118.3 (C13), 112.5 (C8), 110.5 (C3), 26.9 (C10). (*C*_{Benzimidazol} nicht sichtbar, *nur aus Korrelationsspektren abgeleitet) **LCMS** (ESI): t_R = 7.9 min (Methode I); m/z

(% relative Intensität): 293.1 [M+H⁺] (100.0), 585.2 [2M+H⁺] (4.5). **HRMS** (ESI): m/z ber. für C₁₆H₁₃N₄O₂⁺ [M+H⁺] 293.1033; gef. m/z 293.1038. **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3386 (w), 3057 (w), 2902 (w), 1622 (w), 1592 (w), 1506 (m), 1468 (w), 1456 (m), 1444 (w), 1408 (m), 1386 (w), 1336 (s), 1307 (w), 1251 (w), 1224 (w), 1126 (w), 1094 (w), 1064 (m), 1008 (w), 887 (w), 831 (w), 819 (m), 771 (w), 738 (s), 688 (w), 644 (w), 611 (w), 585 (w), 545 (m), 421 (m).

2-((1*H*-Indol-3-yl)methyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-amin (230, DWE-004)



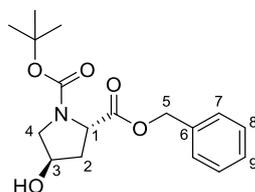
2-((1*H*-Indol-3-yl)methyl)-6-nitro-1*H*-benzimidazol (**229**) (1.00 g, 3.42 mmol) wurde in 75 mL EtOAc gelöst und die Lösung mit Helium entgast. Anschließend wurde Pd/C (10%ig, 282 mg, 267 μ mol) zugegeben und die Atmosphäre durch Wasserstoff ersetzt. Das Gemisch wurde über Nacht bei RT gerührt. Nach Abfiltrieren des Katalysators über Celite wurde das Lösungsmittel entfernt und das so entstandene Rohprodukt säulenchromatographisch getrennt. Das Produkt wurde als gelber Feststoff erhalten (695 mg, 2.65 mmol, 77%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.90 (1H, bs, *H1*), 7.48 (1H, d, *J* = 7.92 Hz, *H5*), 7.35 (1H, d, *J* = 8.12 Hz, *H8*), 7.24 (1H, d, *J* = 2.28 Hz, *H16*), 7.13 (1H, s, *J* = 8.44 Hz, *H2*), 7.03 – 7.07 (1H, m, *H7*), 6.90 – 6.95 (1H, m, *H6*), 6.58 (1H, d, *J* = 1.84 Hz, *H13*), 6.43 (1H, dd, *J* = 8.44, 2.08 Hz, *H15*), 4.16 (2H, s, *H10*). **¹³C NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 151.8 (*C11*), 143.8 (*C14*), 136.2 (*C9*), 127.0 (*C4*), 123.5 (*C2*), 121.0 (*C7*), 118.5 (*C6*), 118.3 (*C5*), 115.9 (*C16*), 111.3 (*C8*), 110.5 (*C15*), 110.3 (*C3*), 96.8 (*C13*), 25.3 (*C10*). (*C12* – *C17* als quart. Benzimidazol-Protonen nicht zu erkennen!) **LCMS** (ESI): t_R = 5.3 min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 263.1 [M+H⁺] (100.0), 525.2

[2M+H⁺] (14.4). **HRMS** (ESI): *m/z* ber. für C₁₆H₁₅N₄⁺ [M+H⁺] 263.1291; gef. *m/z* 263.1290. **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3042 (w), 2920 (w), 1633 (w), 1454 (w), 1434 (w), 1415 (w), 1350 (w), 1339 (w), 1223 (w), 1163 (w), 1009 (w), 807 (w), 740 (w), 617 (w), 423 (w).

2-Benzyl-1-(*tert*-butyl)-(2*S*,4*R*)-4-hydroxypyrrolidin-1,2-dicarboxylat

(**232**, JES-171)

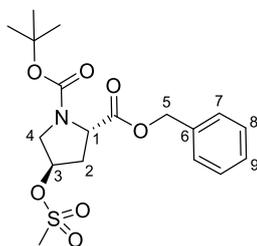


Zu einer Lösung von *trans*-*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-4-hydroxy-*L*-prolin (**231**) (4.63 g, 20.0 mmol) in 82 mL MeOH wurde bei 0 °C eine Lösung von Cs₂CO₃ (3.52 g, 10.8 mmol) in 62 mL Wasser gegeben. Nach Aufwärmen auf RT wurde das Lösungsmittel im Vakuum bei etwa 60 °C entfernt, wobei die Bildung von Gas zu beobachten war. Der entstandene klebrige Schaum wurde in 126 mL entgastem DMF gelöst und im Anschluss unter Eiskühlung tropfenweise mit Benzylbromid (2.54 mL, 21.4 mmol) versetzt. Nach Rühren über Nacht wurde der entstandene weiße Niederschlag abfiltriert und das Filtrat im Vakuum reduziert. Der Rückstand wurde in EtOAc aufgenommen, mit Wasser gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Entfernen von Trocken- und Lösungsmittel konnte das Produkt als klares hochviskoses Öl in Form zweier Rotamere erhalten werden (6.11 g, 19.9 mmol, 95%).

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.28 – 7.39 (5H, m, *H*7 – *H*9), 5.07 – 5.29 (2H, m, *H*5), 4.41 – 4.53 (2H, m, *H*1 + *H*3), 3.65 (0.4H, d, *J* = 4.40 Hz, *H*4*a*), 3.62 (0.6H, d, *J* = 4.40 Hz, *H*4*a*), 3.55 (0.6H, d, *J* = 11.76 Hz, *H*4*b*), 3.44 (0.4H, d, *J* = 11.20 Hz, *H*4*b*), 2.23 – 2.33 (1H, m, *H*2*a*), 2.94 – 2.10 (1H, m, *H*2*a*), 1.89 (1H, s, -OH), 1.45 (3.2H, s, -C(CH₃)₃), 1.34 (5.8H, s, -C(CH₃)₃). **¹³C NMR** (400 MHz, Chloroform-*d*) δ

173.0 (-COO-), 154.1 (-NCOO-), 135.6 (*C6*), 128.8 (arom. C), 128.6 (arom. C), 128.6 (arom. C), 128.5 (arom. C), 128.2 (arom. C), 80.5 (-C(CH₃)₃), 80.4 (-C(CH₃)₃), 70.3 (*C3*), 69.6 (*C3*), 66.9 (*C5*), 58.1 (*C1*), 57.8 (*C1*), 54.8 (*C4*), 39.3 (*C2*), 38.6 (*C2*), 28.5 (-C(CH₃)₃), 28.3 (-C(CH₃)₃). **LCMS** (ESI): $t_R = 8.5$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 266.1 [M-^tBu+H⁺] (100.0), 322.1 [M+H⁺] (13.9), 660.3 [2M+NH₄⁺] (16.4). **HRMS** (ESI): m/z ber. für C₁₇H₂₃NO₅Na⁺ [M+Na⁺] 344.1468; gef. m/z 344.1467. **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu} = 3427$ (w), 2976 (w), 2935 (w), 1745 (w), 1672 (s), 1498 (w), 1477 (w), 1455 (w), 1394 (s), 1366 (w), 1257 (w), 1152 (s), 1126 (w), 1083 (w), 1053 (w), 1004 (w), 979 (w), 888 (w), 855 (w), 772 (w), 738 (m), 697 (m), 573 (w), 552 (w), 493 (w), 462 (w).

2-Benzyl-1-(*tert*-butyl)-(2*S*,4*R*)-4-((methylsulfonyl)oxy)pyrrolidin-1,2-dicarboxylat (233, JES-184)



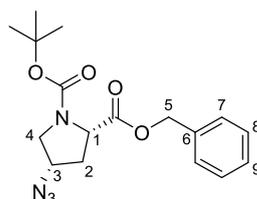
Zu einer Lösung von 2-Benzyl-1-(*tert*-butyl)-(2*S*,4*R*)-4-hydroxypyrrolidin-1,2-dicarboxylat (**232**) (4.12 g, 12.8 mmol) und NEt₃ (3.40 mL, 24.4 mmol) in 40 mL CH₂Cl₂ wurde tropfenweise Methansulfonsäurechlorid (1.70 mL, 22.0 mmol) unter Eiskühlung gegeben. Nach Rühren über Nacht wurde das Gemisch mit EtOAc verdünnt und mit Wasser und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknung mit Na₂SO₄ und Entfernen des Lösungsmittels wurde das erhaltene Öl säulenchromatographisch getrennt. So wurde das Produkt als klares Öl in sauberer Form als Gemisch zweier Rotamere erhalten (4.78 g, 12.0 mmol, 93%).

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.32 – 7.38 (5H, m, *H7* – *H9*), 5.07 – 5.28 (3H, m, *H1* + *H5*), 4.51 – 4.55 (0.4H, t, $J = 7.68$ Hz, *H3*), 4.42 – 4.46 (0.6H, t, $J = 7.94$ Hz, *H3*),

3.85 – 3.88 (0.6H, m, *H4*), 3.72 – 3.77 (1.4H, m, *H4*), 3.03 (3H, s, -OSO₂CH₃), 2.55 – 2.60 (0.4H, m, *H2a*), 2.64 – 2.69 (0.6H, m, *H2b*), 2.20 – 2.29 (1H, m, *H2a* + *H2b*), 1.46 (3.6H, s, -C(CH₃)₃), 1.35 (5.4H, s, -C(CH₃)₃). ¹³C NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 172.1 (-COOC-), 153.5 (-NCOO-), 135.3 (*C6*), 128.8 (arom. C), 128.7 (arom. C), 128.6 (arom. C), 128.3 (arom. C), 81.1 (-C(CH₃)₃), 78.2 (*C1*), 77.9 (*C1*), 67.3 (*C5*), 57.7 (*C3*), 57.4 (*C3*), 52.7 (*C4*), 52.3 (*C4*), 38.9 (-CH₃), 37.7 (*C2*), 36.4 (*C2*), 28.5 (-C(CH₃)₃), 28.3 (-C(CH₃)₃). LCMS (ESI): t_R = 10.3 min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 300.1 [M-Boc+H⁺] (53.0), 344.1 [M-^tBu+H⁺] (100.0), 816.3 [2M+NH₄⁺] (97.3). HRMS (ESI): m/z ber. für C₁₈H₂₅NO₇S⁺ [M+Na⁺] 422.1244; gef. m/z 422.1253. IR (cm⁻¹): ν̄ = 2977 (w), 2937 (w), 1745 (w), 1695 (s), 1478 (w), 1456 (w), 1396 (w), 1356 (m), 1286 (w), 1258 (w), 1168 (w), 1154 (s), 1126 (w), 1052 (w), 1008 (w), 959 (w), 897 (s), 843 (w), 773 (w), 738 (m), 697 (m), 524 (m), 465 (w).

2-Benzyl-1-(*tert*-butyl)-(2*S*,4*S*)-4-azidopyrrolidin-1,2-dicarboxylat

(**234**, JES-185)

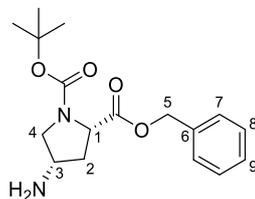


2-Benzyl-1-(*tert*-butyl)-(2*S*,4*R*)-4-((methylsulfonyl)oxy)pyrrolidin-1,2-dicarboxylat (**233**) (4.68 g, 11.7 mmol) wurde in 16 mL entgastem DMF gelöst und mit NaN₃ (3.05 g, 47.0 mmol) versetzt. Nach Rühren über Nacht bei 55 °C wurde das Reaktionsgemisch mit EtOAc verdünnt und mit Wasser und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknen über Na₂SO₄ und Entfernen des Lösungsmittels wurde das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt. Das Produkt wurde als klares Öl erhalten (3.43 g, 9.90 mmol, 84%).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.31 – 7.36 (5H, m, *H7–H9*), 5.09 – 5.29 (2H, m, *H5*), 4.48 – 4.51 (0.4H, m, *H1*), 4.34 – 4.38 (0.6H, m, *H1*), 4.13 – 4.15 (1H, m, *H3*), 3.66 – 3.77 (1H, m, *H3*), 3.42 – 3.53 (1H, m, *H4a*), 2.39 – 2.51 (1H, m, *H4b*), 2.19 – 2.21 (0.5H, m, *H2a*), 2.16 – 2.18 (0.4H, m, *H2b*), 1.46 (3.9H, s, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.34 (5.1H, s, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$). $^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 171.7 ($-\text{COOC}-$), 171.4 ($-\text{COOC}-$), 153.6 ($-\text{NCOO}-$), 135.6 (*C6*), 128.7 (arom. C), 128.6 (arom. C), 128.6 (arom. C), 128.3 (arom. C), 80.7 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 67.2 (*C5*), 59.5 (*C3*), 58.5 (*C3*), 58.0 (*C1*), 57.6 (*C1*), 51.4 (*C4*), 51.0 (*C4*), 36.2 (*C2*), 35.3 (*C2*), 28.5 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 28.3 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$). **LCMS** (ESI): $t_{\text{R}} = 11.3$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 247.1 [$\text{M}-\text{Boc}+\text{H}^+$] (57.0), 263.1 [$\text{M}-\text{N}_2+\text{H}^+$] (100.0), 291.1 [$\text{M}-\text{tBu}+\text{H}^+$] (98.5), 347.2 [$\text{M}+\text{H}^+$] (19.8), 710.4 [$2\text{M}+\text{NH}_4^+$] (20.9). **HRMS** (ESI): m/z ber.für $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_4\text{Na}^+$ [$\text{M}+\text{Na}^+$] 369.1536; gef. m/z 369.1536. **IR** (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 3034$ (w), 2976 (w), 2102 (s), 1750 (w), 1696 (s), 1498 (w), 1477 (w), 1455 (w), 1392 (s), 1365 (w), 1323 (w), 1258 (w), 1212 (w), 1154 (s), 1115 (w), 1052 (w), 1029 (w), 1003 (w), 967 (w), 890 (w), 855 (w), 769 (w), 736 (m), 697 (m), 622 (w), 594 (w), 562 (w), 491 (w), 463 (w), 424 (w).

2-Benzyl-1-(*tert*-butyl)-(2*S*,4*S*)-4-aminopyrrolidin-1,2-dicarboxylat

(**235**, JES-186)



Zu einer Lösung von 2-Benzyl-1-(*tert*-butyl)-(2*S*,4*S*)-4-azidopyrrolidin-1,2-dicarboxylat (**234**) (3.00 g, 8.66 mmol) in 117 mL THF wurden im Argon-Gegenstrom Triphenylphosphin (4.54 g, 17.3 mmol) und 11 mL Wasser gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 5 h unter Rückfluss gerührt und anschließend vom Lösungsmittel befreit. Der bei Zugabe von Et_2O ausfallende Feststoff wurde abfiltriert und das Filtrat mit 0.1 M HCl-

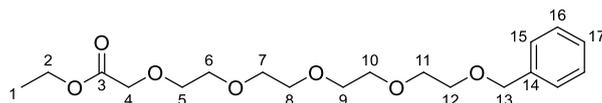
Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde gesammelt und mit 1 M NaOH-Lösung neutralisiert und mit ges. NaHCO₃-Lösung leicht basisch gestellt. Diese wässrige Phase wurde dann dreimal mit Et₂O extrahiert. Die vereinigten etherischen Extrakte der basischen Phase wurden über Na₂SO₄ getrocknet und vom Lösungsmittel befreit, wodurch das Produkt als klares Öl erhalten wurde (2.05 g, 6.39 mmol, 74%).

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.30 – 7.37 (5H, m, *H7* – *H9*), 5.08 – 5.30 (2H, m, *H5*), 4.36 – 4.40 (0.4H, m, *H1*), 4.25 – 4.29 (0.6H, m, *H1*), 3.68 – 3.72 (0.6H, m, *H4a*), 3.62 – 3.66 (0.4H, m, *H4a*), 3.51 – 3.55 (1H, m, *H3*), 3.22 – 3.29 (1H, m, *H4b*), 2.39 – 2.50 (1H, m, *H2a*), 1.78 – 1.86 (1H, m, *H2b*), 1.46 (3.6H, s, -C(CH₃)), 1.34 (5.3H, s, -C(CH₃)).

¹³C NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 173.4 (-COOC-), 173.3 (-COOC-), 154.5 (-NCOO-), 153.8 (-NCOO-), 135.6 (*C6*), 128.8 (arom. C), 128.6 (arom. C), 128.3 (arom. C), 80.4 (-C(CH₃)₃), 67.1 (*C5*), 58.5 (*C1*), 58.2 (*C1*), 55.4 (*C4*), 55.2 (*C4*), 51.3 (*C3*), 50.5 (*C3*), 39.7 (*C2*), 38.9 (*C2*), 28.5 (-C(CH₃)₃), 28.3 (-C(CH₃)₃).

LCMS (ESI): t_R = 11.3 min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 265.1 [M-^tBu +H⁺] (100.0), 321.2 [M+H⁺] (49.1), 641.3 [2M+H⁺] (89.9). HRMS (ESI): m/z ber. für C₁₇H₂₄N₂O₄Na⁺ [M+Na⁺] 343.1628; gef. m/z 343.1620. IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3358 (w), 2976 (w), 2932 (w), 2875 (w), 1743 (w), 1689 (s), 1536 (w), 1497 (w), 1477 (w), 1454 (w), 1390 (s), 1365 (w), 1302 (w), 1255 (w), 1155 (s), 1124 (w), 1023 (w), 970 (w), 888 (w), 770 (w), 736 (m), 697 (s), 594 (w), 577 (w), 542 (w), 461 (w).

Ethyl-1-phenyl-2,5,8,11,14-pentaoxahexadecan-16-oat (**237**, JES-172)

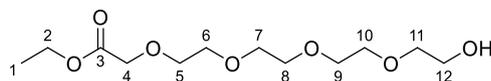


Unter Eiskühlung wurde im Argon-Gegenstrom Natrium-*tert*-butanolat (2.09 g, 21.7 mmol) zu einer Lösung von Tetraethylenglycolmonobenzylether (**236**) (95%ig, 5.00 g, 16.7 mmol) in trockenem THF gegeben. Das entstandene Gemisch wurde für eine Stunde

bei 40 °C gerührt und dann nach Abkühlen auf 0 °C mit Bromessigsäureethylester (**157**) (2.77 mL, 25.1 mmol) versetzt. Das Gemisch wurde langsam auf RT gebracht und über Nacht gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand in EtOAc und Wasser aufgenommen und die beiden Phasen separiert. Die wässrige Phase wurde drei weitere Male mit EtOAc extrahiert und die vereinigten organischen Phasen anschließend über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Entfernen von Trocken- und Lösungsmittel wurde das erhaltene Gemisch mittels DCVC getrennt, wodurch das Produkt als klares Öl erhalten wurde (3.76 g, 10.2 mmol, 61%). Das Produkt wurde ohne Aufreinigung weiter umgesetzt.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.27 – 7.34 (5H, m, *H15 – H17*), 4.56 (2H, s, *H13*), 4.21 (2H, q, *J* = 7.14 Hz, *H2*), 4.13 (2H, s, *H4*), 3.61 – 3.73 (16H, *H5 – H12*), 1.28 (3H, t, *J* = 7.12 Hz, *H1*). ¹³C NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 170.6 (*C3*), 138.5 (*C14*), 128.5 (*C15*), 127.9 (*C16*), 127.7 (*C17*), 73.4 (*C13*), 71.1 (*C5 – C11*), 70.8 (*C5 – C11*), 70.8 (*C5 – C11*), 69.6 (*C12*), 68.9 (*C4*), 60.9 (*C2*), 14.3 (*C1*). LCMS (ESI): t_R = 8.0 min* (Methode I); m/z (% relative Intensität): 420.2 [M+H⁺] (100.0). *Angabe für Produktpeak, Produkt aber nicht sauber! HRMS (ESI): m/z ber. für C₁₉H₃₀O₇Na⁺ [M+Na⁺] 393.1884; gef. m/z 393.1882. IR (cm⁻¹): ν̄ = 2868 (w), 1750 (m), 1453 (w), 1380 (w), 1351 (w), 1277 (w), 1203 (w), 1094 (s), 1027 (w), 942 (w), 850 (w), 740 (w), 699 (m).

Ethyl-14-hydroxy-3,6,9,12-tetraoxatetradecanoat (**238**, JES-176)

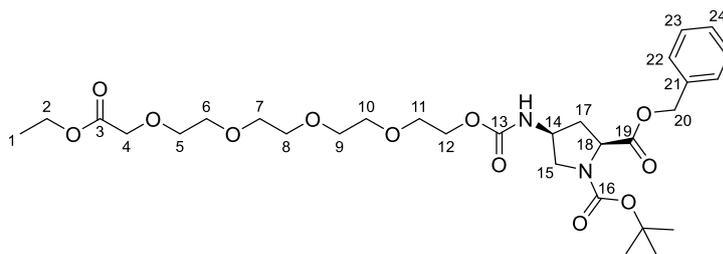


Nachdem eine Lösung von Ethyl-1-phenyl-2,5,8,11,14-pentaoxahexadecan-16-oat (**237**) (833 mg, 2.25 mmol) in 10 mL EtOAc wurde mit Argon für fünf Minuten entgast worden war, wurde Pd(OH)₂/C (20%ig, 789 mg, 1.12 mmol) zugegeben. Die Lösung wurde dann mit Wasserstoff gespült, bis die Atmosphäre vollständig ausgetauscht war. Das

Reaktionsgemisch wurde unter Wasserstoffatmosphäre über Nacht gerührt und am nächsten Tag über Celite filtriert. Dabei wurde THF zur vollständigeren Elution genutzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum, wurde das Produkt als klares, gelbliches Öl erhalten (627 mg, 2.24 mmol, quant.).

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 4.20 (2H, q, $J = 7.14$ Hz, H_2), 4.13 (2H, s, H_4), 3.59 – 3.73 (16H, m, $H_5 - H_{12}$), 2.92 (1H, bs, -OH), 1.27 (3H, t, $J = 7.14$ Hz, H_1). **¹³C NMR** (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 170.6 (-COOEt), 72.6 ($C_6 - C_{11}$), 71.1 (C_5), 70.8 ($C_6 - C_{11}$), 70.7 ($C_6 - C_{11}$), 70.7 ($C_6 - C_{11}$), 70.5 ($C_6 - C_{11}$), 68.9 (C_4), 61.9 (C_{12}), 60.9 (C_2), 14.3 (-CH₃). **LCMS** (ESI): $t_R = 3.9$ min* (Methode I); m/z (% relative Intensität): 298.2 [M+NH₄⁺] (100.0).* *keine UV-Absorption!* **HRMS** (ESI): m/z ber. für C₁₂H₂₄O₇Na⁺ [M+Na⁺] 303.1414; gef. m/z 303.1426. **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu} = 3459$ (w), 2871 (m), 1749 (m), 1453 (w), 1379 (w), 1350 (w), 1281 (w), 1205 (m), 1098 (s), 1030 (w), 938 (w), 884 (w), 850 (w), 578 (w).

2-Benzyl-1-(tert-butyl)-(2*S*,4*S*)-4-((16-oxo-2,5,8,11,14,17-hexaoxonadecanoyl)amino)pyrrolidine-1,2-dicarboxylat (194)



Schritt A: Bei 0 °C wurde im Argon-Gegenstrom tropfenweise eine Lösung von *p*-Nitrophenylchloroformat (*p*NC, 92.2 mg, 457 μ mol,) in 250 μ L trockenem THF zu einer Lösung von Ethyl-14-hydroxy-3,6,9,12-tetraoxatetradecanoat (**238**) (112 mg, 398 μ mol) und NEt₃ (66.5 μ L, 477 μ mol) in 100 μ L trockenem THF gegeben. Nach Rühren über

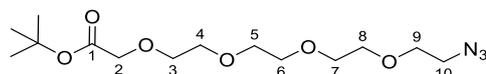
Nacht wurde der ausgefallene Feststoff abfiltriert und das Filtrat im Vakuum vom Lösungsmittel befreit.

Schritt B: Der Rückstand wurde in 300 μL DMSO aufgenommen und mit NEt_3 (83.2 μL , 597 μmol) versetzt. Eine Lösung von 2-Benzyl-1-(*tert*-butyl)-(2*S*,4*S*)-4-amino-pyrrolidin-1,2-dicarboxylat (**235**) (127 mg, 398 μmol) in 300 μL DMSO wurde zugetropft (2 x 100 μL DMSO zusätzlich zur vollständigen Überführung) und das entstandene Gemisch wurde über Nacht bei RT gerührt. Nach Zugabe von Et_2O und CH_2Cl_2 (4:1) wurde die organische Phase mit einem Gemisch aus NH_4Cl - und NaCl -Lösung gewaschen. Die erhaltene wässrige Phase wurde drei weitere Male mit CH_2Cl_2 extrahiert. Nach Vereinigung und Trocknung der organischen Phasen über Na_2SO_4 wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde zunächst über präparative HPLC und dann durch Säulenchromatographie aufgetrennt, wobei das Produkt als farbloses Öl erhalten wurde (Rotamerengemisch, 39.4 mg, 62.9 μmol , 16%).

^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.29 – 7.36 (5H, m, *H22* – *H24*), 5.60 – 5.61 (1H, d, $J = 8.40$ Hz, -*NHCOO*-), 5.09 – 5.28 (2H, m, *H20*), 4.12 – 4.24 (8H, m, *H2* + *H4* + *H14* + *H18* + *H12*), 3.61 – 3.72 (15H, m, *H15a* + *H5* – *H11*), 3.38 – 3.49 (1H, m, *H15b*), 2.40 – 2.52 (1H, m, *H17a*), 1.87 – 1.95 (1H, m, *H17b*), 1.44 (4H, s, - $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.32 (5H, s, - $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.26 (3H, t, $J = 7.12$ Hz, *H1*). **^{13}C NMR** (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 173.6 (*C19*), 170.5 (*C3*), 155.8 (*C13*), 153.5 (*C16*), 135.5 (*C20*), 135.3 (*C20*), 128.8 (*C22* – *C24*), 128.7 (*C22* – *C24*), 128.4 (*C22* – *C24*), 128.3 (*C22* – *C24*), 80.6 (- $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 71.1 (*C5* – *C12*), 71.0 (*C5* – *C12*), 70.7 (*C5* – *C12*), 70.7 (*C5* – *C12*), 70.7 (*C5* – *C12*), 70.7 (*C5* – *C12*), 69.6 (*C5* – *C12*), 68.8 (*C5* – *C12*), 68.4 (*C5* – *C12*), 68.0 (*C5* – *C12*), 67.4 (*C5* – *C12*), 64.2 (*C4*), 60.9 (*C2*), 58.0 (*C18*), 57.9 (*C18*), 53.4 (*C15*), 52.9 (*C15*), 50.6 (*C14*), 49.7 (*C14*), 37.0 (*C17*), 36.0 (*C17*), 28.5 (- $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 28.3 (- $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 14.3 (*C1*). **LCMS** (ESI): $t_{\text{R}} = 10.2$ min* (Methode I); m/z (% relative Intensität): 644.3 [$\text{M}+\text{H}^+$] (100.0). *keine UV-Absorption! **HRMS** (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{O}_{12}\text{Na}^+$ [$\text{M}+\text{Na}^+$] 649.2943; gef. m/z 649.2943. **IR** (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 3330$ (w), 2873 (w),

1748 (w), 1697 (s), 1525 (w), 1477 (w), 1455 (w), 1394 (m), 1366 (w), 1300 (w), 1253 (w), 1185 (w), 1151 (s), 1110 (w), 1053 (w), 966 (w), 922 (w), 853 (w), 773 (w), 750 (w), 699 (m), 576 (w), 496 (w).

***tert*-Butyl-14-azido-3,6,9,12-tetraoxatetradecanoat (242, JES-203SB)**



Schritt A: Triethylenglykol (**241**) (5.0 mL, 29 mmol) wurde zusammen mit NEt₃ (4.04 mL, 29.0 mmol) in 40 mL trockenem CH₂Cl₂ gelöst. Dann wurde diese Lösung auf 0 °C herabgekühlt und Methansulfonsäurechlorid (2.02 mL, 26.1 mmol) zugetropft. Nach Zugabe wurde eine weitere halbe Stunde bei dieser Temperatur und dann 5 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von ges. NaHCO₃-Lösung abgebrochen. Das entstandene Gemisch wurde dreimal mit CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Na₂SO₄ getrocknet und anschließend vom Lösungsmittel befreit.

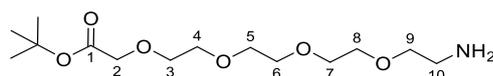
Schritt B: Das so erhaltene Öl wurde in 30 mL entgastem DMF aufgenommen und nach Zugabe von NaN₃ (1.88 g, 28.9 mmol) über Nacht bei 55 °C gerührt. Nach vollständigem Umsatz des mesylierten Eduktes wurde 5%ige LiCl-Lösung zugegeben und anschließend dreimal mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Das erhaltene Rohgemisch wurde mittels DCVC aufgetrennt und das Azid wurde als klares Öl erhalten (1.02 g, 4.67 mmol), welches ohne volle Charakterisierung im nächsten Schritt umgesetzt wurde.

Schritt C: Zu einer Lösung von 2-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethanol (1.00 g, 4.56 mmol) in 45 mL trockenem THF wurde portionsweise bei 0 °C Natrium-*tert*-butanolat (876 mg, 9.12 mmol) gegeben. Anschließend wurde dieses Gemisch bei 40 °C 1 h gerührt, bevor in einer Portion *tert*-Butylbromoacetat (1.38 mL, 9.35 mmol) bei 0 °C zugegeben wurde. Die Reaktionsmischung wurde nun bei RT gerührt bis kein weiterer Umsatz zu

erkennen war und dann mit Wasser und EtOAc verdünnt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase wurde zwei weitere Male mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Durch DCVC wurde das Produkt sauber erhalten (730 mg, 2.19 mmol, 48% im letzten Schritt).

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 4.01 (2H, s, *H2*), 3.38 (2H, t, *J* = 5.12 Hz, *H10*), 3.66 – 3.72 (14H, m *H3* – *H9*), 1.47 (9H, s, -C(CH₃)₃). ¹³C NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 169.8 (-COO-), 81.6 (-C(CH₃)₃), 70.9 (*C3* – *C9*), 70.9 (*C3* – *C9*), 70.8 (*C3* – *C9*), 70.8 (*C3* – *C9*), 70.8 (*C3* – *C9*), 70.8 (*C3* – *C9*), 70.2 (*C3* – *C9*), 69.2 (*C2*), 50.9 (*C10*), 28.3 (-C(CH₃)₃). LCMS (ESI): *t*_R = 8.8 min (Methode I); *m/z* (% relative Intensität): 250.1 (2.8), 351.2 [M+NH₄⁺] (100.0). HRMS (ESI): *m/z* ber. für C₁₄H₂₇N₃O₆⁺ [M+Na⁺] 356.1792; gef. *m/z* 356.1794. IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 2977 (w), 2870 (w), 2100 (m), 1745 (m), 1456 (w), 1393 (w), 1368 (w), 1349 (w), 1299 (w), 1248 (w), 1227 (m), 1116 (s), 940 (w), 843 (m), 732 (w).

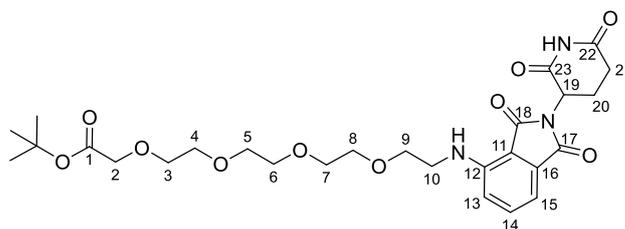
tert-Butyl-14-amino-3,6,9,12-tetraoxatetradecanoat (**243**, JES-203SC)



Eine Lösung von *tert*-Butyl-14-azido-3,6,9,12-tetraoxatetradecanoat (**242**) (700 mg, 2.10 mmol) in 5 mL EtOH wurde zunächst mit Helium entgast und anschließend mit Pd(OH)₂/C (10%ig, 147 mg, 105 μ mol) versetzt. Dann wurde die Atmosphäre durch Wasserstoff ausgetauscht und das Gemisch so lang gerührt, bis durch Reaktionskontrolle über IR-Spektroskopie kein Edukt mehr zu sehen war. Nach Filtration über Celite wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt als klares Öl in erhalten (645 mg, 2.10 mmol, quant.).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 4.01 (2H, s, *H2*), 3.61 – 3.70 (12H, m, *H3* – *H8*), 3.54 (2H, *J* = 5.20 Hz, *H9*), 2.89 (2H, *J* = 5.18 Hz, *H10*), 2.12 (2H, bs, -*NH*₂), 1.46 (9H, s, -*C(CH*₃)₃). $^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 169.9 (-*COO*-), 81.8 (-*C(CH*₃)₃), 73.0 (*C9*), 70.8 (*C3* – *C8*), 70.7 (*C3* – *C8*), 70.7 (*C3* – *C8*), 70.4 (*C3* – *C8*), 69.2 (*C2*), 41.8 (*C10*), 28.3 (-*C(CH*₃)₃). **LCMS** (ESI): *t*_R = 6.4 min* (Methode I); *m/z* (% relative Intensität): 308.2 [*M*+*H*⁺] (100.0). *keine UV-Absorption und in Masse Reinheit fraglich! **HRMS** (ESI): *m/z* ber. für C₁₄H₃₀NO₆⁺ [*M*+*H*⁺] 308.2068; gef. *m/z* 308.2067. **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3371 (w), 2870 (m), 1744 (m), 1663 (w), 1540 (w), 1457 (w), 1393 (w), 1368 (w), 1350 (w), 1299 (w), 1229 (w), 1101 (s), 940 (w), 842 (w), 750 (w).

***tert*-Butyl-14-((2-(2,6-dioxopiperidin-3-yl)-1,3-dioxoisindolin-4-yl)amino)-3,6,9,12-tetra-oxatetradecanoat (244, JES-203SD)**



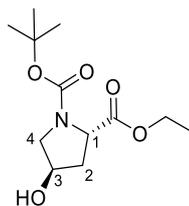
tert-Butyl-14-amino-3,6,9,12-tetraoxatetradecanoat (**243**) (600 mg, 1.95 mmol) wurde in 4 mL trockenem DMSO gelöst und mit DIPEA (660 μL , 3.90 mmol) versetzt. Dann wurde 2-(2,6-Dioxopiperidin-3-yl)-4-fluoroisindoline-1,3-dione (**245**) (539 mg, 1.95 mmol) zugegeben und das Gemisch bei 90 °C über Nacht unter Argon-Atmosphäre gerührt. Anschließend wurden 40 mL Wasser zugegeben und dreimal mit EtOAc extrahiert. Nach Trocknung der vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch getrennt, wodurch das Produkt als gelber Feststoff erhalten wurde (75.6 mg, 134 μmol , 7%).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.60 (1H, bs, -*CONHCO*-), 7.45 (1H, t, *J* = 7.80 Hz, *H14*), 7.08 (1H, d, *J* = 7.08 Hz, *H15*), 6.89 (1H, d, *J* = 8.56 Hz, *H13*), 6.46

(1H, t, $J = 5.82$ Hz, $-C^{12}NHC^{10}$), 4.89 (1H, dd, $J = 11.76, 5.04$ Hz, H_{19}), 3.99 (2H, s, H_2), 3.63 – 3.71 (14H, m, $H_3 - H_9$), 3.42 – 3.46 (2H, m, H_{10}), 2.69 – 2.85 (3H, m, $H_{20} + H_{21}$), 2.07 – 2.10 (1H, m, H_{20}), 1.44 (9H, s, $-C(CH_3)_3$). ^{13}C NMR (400 MHz, Chloroform- d) δ 171.4 (C_{22}), 169.8 (C_1), 169.4 (C_{18}), 168.6 (C_{23}), 167.7 (C_{17}), 146.9 (C_{12}), 136.1 (C_{14}), 132.6 (C_{16}), 116.9 (C_{13}), 111.7 (C_{15}), 110.4 (C_{33}), 81.6 ($-C(CH_3)_3$), 70.8 ($C_3 - C_9$), 70.8 ($C_3 - C_9$), 70.7 ($C_3 - C_9$), 70.6 ($C_3 - C_9$), 69.6 ($C_3 - C_9$), 69.1 (C_2), 49.0 (C_{19}), 42.5 (C_{10}), 31.5 (C_{21}), 28.2 ($-C(CH_3)_3$), 22.9 (C_{20}). **LCMS** (ESI): $t_R = 8.8$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 564.3 $[M+H^+]$ (23), 581.3 $[M+NH_4^+]$ (100.0). **HRMS** (ESI): m/z ber. für $C_{27}H_{37}N_3O_{10}Na^+$ $[M+Na^+]$ 586.2371; gef. m/z 586.2372. **IR** (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 3389$ (w), 3233 (w), 3113 (w), 2870 (w), 1693 (s), 1623 (m), 1509 (w), 1482 (w), 1458 (w), 1406 (w), 1355 (m), 1322 (w), 1301 (w), 1256 (m), 1195 (w), 1170 (w), 1109 (s), 1022 (w), 990 (w), 942 (w), 917 (w), 842 (w), 815 (w), 780 (w), 746 (m), 706 (w), 680 (w), 607 (m), 578 (w), 560 (w), 531 (w), 466 (m), 414 (w).

1-(*tert*-Butyl)-2-ethyl-(2*S*,4*R*)-4-hydroxypyrrolidine-1,2-dicarboxylate

(**246**, JES-206)

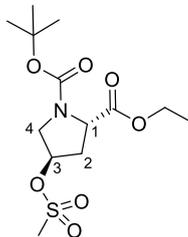


Zu einer wässrigen CS_2CO_3 -Lösung (3.42g, 10.5 mmol, in 60 mL Wasser) wurde bei 0 °C eine Lösung von Boc-(*L*)-Hydroxyprolin (**231**) (4.50 g, 19.5 mmol) gegeben. Die Lösung wurde unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit, während bis zu 60 °C geheizt wurde. Der Kolben wurde mit Argon gefüllt und der klebrige Rückstand in 123 mL entgastem DMF aufgenommen. Nach Zugabe von Ethylbromid (1.59 mL, 21.4 mmol) wurde das Gemisch über Nacht bei RT gerührt. Der entstandene weiße Feststoff wurde

mittels Vakuumfiltration abfiltriert. Das Filtrat wurde konzentriert und der Rückstand in EtOAc gelöst. Die organische Phase wurde dreimal mit 100 mL Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. So wurde das saubere Produkt ohne weitere Reinigung als klares zähflüssiges Öl erhalten (4.70 g, 18.1 mmol, 93%).

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 4.46 – 4.49 (1H, m, *H3*), 4.35 – 4.39 (1H, m, *H1*), 4.14 – 4.23 (2H, m, -CH₂CH₃), 3.63 (1H, dd, *J* = 4.40, 11.64 Hz, *H4*), 3.49 (1H, dd, *J* = 11.60, 44.37 Hz, *H4*), 2.27 – 2.32 (1H, m, *H2*), 2.03 – 2.10 (1H, m, *H2*), 2.00 (1H, s, -OH), 1.45 (3H, s, -C(CH₃)₃), 1.41 (6H, s, -C(CH₃)₃), 1.27 (3H, t, *J* = 7.00 Hz, -CH₂CH₃).
¹³C NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 173.3 (-COO-), 154.2 (-NCOO-), 80.5 (-C(CH₃)₃), 69.6 (*C3*), 61.2 (-CH₂CH₃), 58.1 (*C1*), 54.9 (*C4*), 39.4 (*C2*), 28.4 (-C(CH₃)₃), 14.3 (-CH₂CH₃).
 LCMS (ESI): *t*_R = 11.3 min (Methode I); *m/z* (% relative Intensität): 160.1 [M-Boc+H⁺] (100.0), 204.1 [M-Bu+H⁺] (58.1), 260.1 [M+H⁺] (19.5), 536.3 [2M+NH₄⁺] (17.4).
 HRMS (ESI): *m/z* ber. für C₁₂H₂₁NO₅Na⁺ [M+Na⁺] 282.1312; gef. *m/z* 282.1314.
 IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3436 (w), 2978 (w), 2936 (w), 1743 (w), 1698 (w), 1671 (s), 1477 (w), 1393 (s), 1367 (w), 1257 (w), 1188 (w), 1155 (s), 1124 (w), 1085 (w), 1028 (w), 986 (w), 970 (w), 934 (w), 914 (w), 859 (w), 772 (m), 751 (w), 735 (w), 552 (w).

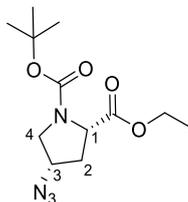
1-(*tert*-Butyl)-2-ethyl-(2*S*,4*R*)-4-((methylsulfonyl)oxy)pyrrolidine-1,2-dicarboxylat (247, JES-207)



Zu einer Lösung von Boc-(*L*)-Hydroxyprolinethylester (**246**) (4.00 g, 15.4 mmol) und NEt₃ (4.10 mL, 29.3 mmol) in 40 mL CH₂Cl₂ wurde bei 0 °C tropfenweise Methansulfonsäurechlorid (2.04 mL, 26.4 mmol) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 2 h

gerührt, bevor nach Wasserzugabe die Phasen getrennt wurden. Die wässrige Phase wurde zwei weitere Male mit CH_2Cl_2 extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden anschließend mit ges. NaCl-Lösung gewaschen und mit Na_2SO_4 getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das Rohgemisch säulenchromatographisch getrennt (DCVC). Dadurch wurde das Produkt als klares Öl erhalten (4.59 g, 13.6 mmol, 88%).

^1H NMR (600 MHz, Chloroform-*d*) δ 5.25 (1H, bs, *H3*), 4.44 (0.4H, t, $J = 7.59$ Hz, *H1a*), 4.38 (0.6H, t, $J = 7.92$ Hz, *H1b*), 4.16 – 4.25 (2H, m, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.84 – 3.86 (0.6H, m, *H4b*), 3.74 – 3.76 (1.4H, m, *H4a*, *H4*), 3.05 (3H, s, $-\text{OSO}_2\text{CH}_3$), 2.64 – 2.68 (0.6H, m, *H2b*), 2.56 – 2.59 (0.4H, m, *H2a*), 2.23 – 2.28 (1H, m, *H2*), 1.46 (3.6H, s, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3(\text{a})$), 1.42 (5.4H, s, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3(\text{b})$), 1.26 – 1.30 (3H, m, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$). **^{13}C NMR** (600 MHz, Chloroform-*d*) δ 172.4 ($-\text{COO}-(\text{b})$), 172.1 ($-\text{COO}-(\text{a})$), 154.1 ($-\text{NCOO}-(\text{a})$), 153.6 ($-\text{NCOO}-(\text{b})$), 81.0 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3(\text{b})$), 81.0 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3(\text{a})$), 78.2 (*C1a*), 78.0 (*C1b*), 61.6 ($-\text{CH}_2\text{CH}_3(\text{a})$), 61.5 ($-\text{CH}_2\text{CH}_3(\text{b})$), 57.7 (*C3b*), 57.4 (*C3a*), 52.6 (*C4a*), 52.3 (*C4b*), 38.9 ($-\text{OSO}_2\text{CH}_3(\text{b})$), 38.8 ($-\text{OSO}_2\text{CH}_3(\text{a})$), 37.7 (*C2b*), 36.4 (*C2a*), 28.5 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3(\text{a})$), 28.4 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3(\text{b})$), 14.3 ($-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 14.2 ($-\text{CH}_2\text{CH}_3$). **LCMS** (ESI): $t_{\text{R}} = 8.5$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 238.1 [$\text{M}-\text{Boc}+\text{H}^+$] (100.0), 282.1 [$\text{M}-t\text{Bu}+\text{H}^+$] (46.2), 692.3 [$2\text{M}+\text{NH}_4^+$] (20.7). **HRMS** (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{NO}_7\text{SNa}^+$ [$\text{M}+\text{H}^+$] 360.1087; gef. m/z 360.1086. **IR** (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 2980$ (w), 2938 (w), 1740 (w), 1697 (s), 1478 (w), 1456 (w), 1395 (w), 1363 (m), 1290 (w), 1255 (w), 1196 (w), 1157 (s), 1126 (w), 1050 (w), 1027 (w), 958 (m), 898 (s), 846 (w), 783 (m), 705 (w), 525 (m), 466 (w), 448 (m).

1-(*tert*-Butyl)-2-ethyl-(2*S*,4*S*)-4-azidopyrrolidin-1,2-dicarboxylat (**248**, JES-208)

Eine Lösung von 1-(*tert*-Butyl)-2-ethyl-(2*S*,4*R*)-4-((methylsulfonyl)oxy)pyrrolidine-1,2-dicarboxylat (**247**) (3.63 g, 10.8 mmol) und NaN₃ (2.81 g, 43.1 mmol) in 10 mL entgastem DMF wurde bei 55 °C über Nacht gerührt. Anschließend wurde mit EtOAc verdünnt und der ausfallende Feststoff abfiltriert. Das Filtrat wurde mit wässriger LiCl-Lösung (5%ig) gewaschen. Diese wässrige Phase wurde dreimal mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Das Produkt wurde nach Reinigung des Rohproduktes durch DCVC in sauberer Form erhalten (2.36 g, 8.29 mmol, 77%).

¹H NMR (600 MHz, Chloroform-*d*) δ 4.41 (0.4H, dd, *J* = 11.3, 3.03 Hz, *H*1(a)), 4.30 (0.6H, dd, *J* = 8.73, 3.93 Hz, *H*1(b)), 4.14 – 4.26 (3H, m, *H*3 + -CH₂CH₃), 3.75 (0.6H, dd, *J* = 11.56, 6.09 Hz, *H*4(b)), 3.69 (0.4H, dd, *J* = 11.34, 6.06 Hz, *H*4(a)), 3.50 (0.6H, dd, *J* = 11.56, 3.63 Hz, *H*4(b)), 3.45 (0.4H, dd, *J* = 11.38, 3.03 Hz, *H*4(a)), 2.42 – 2.50 (1H, m, *H*2), 2.18 (0.6H, t, *J* = 4.11 Hz, *H*2(b)), 2.16 (0.4H, t, *J* = 4.11 Hz, *H*2(a)), 1.47 (3.6H, s, -C(CH₃)₃(a)), 1.42 (5.4H, s, -C(CH₃)₃(b)), 1.26 – 1.30 (3H, m, -CH₂CH₃).

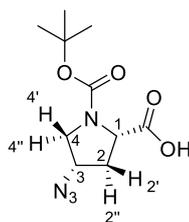
¹³C NMR (600 MHz, Chloroform-*d*) δ 171.9 (-COO-(b)), 171.5 (-COO-(a)), 154.1 (-NCOO-(b)), 153.6 (-NCOO-(a)), 80.6 (-C(CH₃)₃), 61.5 (-CH₂CH₃), 59.3 (*C*3(a)), 58.4 (*C*3(b)), 58.0 (*C*1(b)), 57.6 (*C*1(a)), 51.4 (*C*4(a)), 51.0 (*C*4(b)), 36.2 (*C*2(b)), 35.3 (*C*2(a)), 28.5 (-C(CH₃)₃(a)), 28.4 (-C(CH₃)₃(b)), 14.3 (-CH₂CH₃(b)), 14.2 (-CH₂CH₃(a)).

LCMS (ESI): t_R = 9.6 min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 185.1 [M-Boc+H⁺] (100.0), 229.1 [M-Bu+H⁺] (49.3), 285.1 [M+H⁺] (13.2), 586.3 [2M+NH₄⁺] (8.5). HRMS (ESI): m/z ber. für C₁₂H₂₀N₄O₄Na⁺ [M+Na⁺] 307.1377; gef. m/z 307.1379. IR (cm⁻¹): ν̄ = 2978 (w), 2936 (w), 2102 (s), 1749 (w), 1697 (s), 1477 (w),

1455 (w), 1391 (s), 1366 (w), 1300 (w), 1258 (w), 1189 (w), 1156 (s), 1115 (m), 1052 (m), 1027 (w), 999 (w), 926 (w), 907 (w), 856 (w), 769 (m), 623 (w), 562 (w).

(2*S*,4*S*)-4-Azido-1-(*tert*-butoxycarbonyl)pyrrolidin-2-carbonsäure

(249, JES-209)

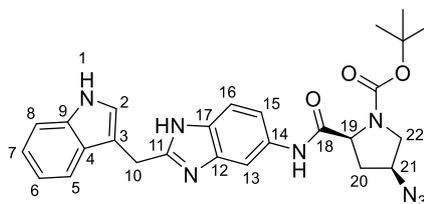


1-(*tert*-Butyl)-2-ethyl-(2*S*,4*S*)-4-azidopyrrolidin-1,2-dicarboxylat **(248)** (1.82 g, 6.40 mmol) wurde in 10 mL EtOH gelöst, woraufhin 5 mL 2 M NaOH-Lösung zugetropft wurden. Anschließend wurde das Gemisch für 4 h bei RT gerührt. Der Großteil des Lösungsmittels wurde unter vermindertem Druck entfernt und der entstandene Rückstand mit Wasser verdünnt und anschließend mit Et₂O extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit 1 M HCl-Lösung neutralisiert und mit NH₄Cl-Lösung schwach sauer gestellt. Die resultierende weiße Suspension wurde dreimal mit Et₂O extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Das resultierende klare Öl kristallisierte über Nacht zu einem weißen Feststoff aus, welcher als das saubere Produkt identifiziert wurde (1.31 g, 5.10 mmol, 80%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.58 (1H, bs, -COOH), 4.32 – 4.35 (1H, m, H₃), 4.16 – 4.21 (1H, m, H₁), 3.58 – 3.65 (1H, m, H₄'), 3.20 – 3.24 (1H, dd, *J* = 11.52, 3.48 Hz, H₄''), 2.46 – 2.58 (1H, m, H₂''), 1.93 – 1.98 (1H, m, H₂''), 1.40 (3.5H, s, -C(CH₃)₃(a)), 1.35 (5.5H, s, -C(CH₃)₃(b)). ¹³C NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 173.0 (-COOH(b)), 172.6 (-COOH(a)), 153.2 (-NCOO-(a)), 152.9 (-NCOO-(b)), 79.1 (-C(CH₃)₃(a)), 79.0 (-C(CH₃)₃(b)), 58.7 (C₃a), 57.8 (C₃b), 57.3 (C₁b), 57.1 (C₁a), 51.0 (C₂a), 50.6 (C₂b), 35.2 (C₄b), 34.4 (C₄a), 28.0 (-C(CH₃)₃(a)), 27.9 (-C(CH₃)₃(b)). LCMS (ESI):

$t_R = 5.3$ min (Methode IV); m/z (% relative Intensität): 255 $[M-H^+]$ (74.0), 273.9 $[M-H^++H_2O]$ (25.1), 301 $[M-H^++HCOOH]$ (49.3), 511.2 $[2M-H^+]$ (100.0). **HRMS** (ESI): m/z ber. für $C_{10}H_{15}N_4O_4^- [M-H^+]$ 255.1099; gef. m/z 255.1100. **IR** (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 3268$ (w), 2975 (w), 2932 (w), 2640 (w), 2117 (w), 2093 (m), 1759 (w), 1720 (w), 1702 (w), 1687 (s), 1621 (m), 1478 (w), 1428 (w), 1409 (s), 1365 (m), 1322 (w), 1284 (w), 1257 (m), 1211 (w), 1159 (s), 1122 (w), 1067 (w), 1049 (w), 1001 (m), 896 (m), 863 (w), 834 (w), 803 (w), 769 (m), 748 (w), 670 (w), 624 (m), 575 (w), 561 (w), 418 (w).

***tert*-Butyl-(2*S*,4*R*)-2-((2-((1*H*-indol-3-yl)methyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-yl)carbo-moyl)-4-azidopyrrolidin-1-carboxylat (250, JES-211)**

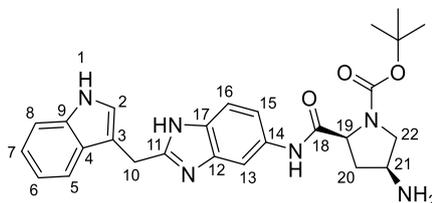


Eine Lösung von (2*S*,4*S*)-4-Azido-1-(*tert*-butoxycarbonyl)pyrrolidin-2-carbonsäure (**249**) (267 mg, 1.05 mmol) in 5 mL trockenem MeCN wurde im Argon-Gegenstrom mit DIPEA (330 μ L, 1.91 mmol) versetzt. Anschließend wurde HATU (399 mg, 1.05 mmol) zugegeben und das Gemisch für 15 Minuten gerührt bevor 2-((1*H*-Indol-3-yl)methyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-amin (**230**) (250 mg, 953 μ mol) zugegeben wurde und bei RT über Nacht gerührt wurde. Nach Abschluss der Reaktion wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand in Wasser und EtOAc aufgenommen. Die wässrige Phase wurde nach Separation zwei weitere Male mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel wurde entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt, wonach das Produkt als hellgelber Feststoff erhalten wurde (437 mg, 874 μ mol, 92%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.98 (1H, s, *H1*), 9.95 (0.6H, s, -CONH-(b)), 9.90 (0.4H, s, -CONH-(a)), 7.92 (1H, s, *H13*), 7.46 – 7.50 (1H, m, *H8*), 7.42 (1H, d, *J* = 8.60 Hz, *H16*), 7.37 (1H, d, *J* = 8.12 Hz, *H5*), 7.30 (1H, d, *J* = 1.88 Hz, *H2*), 7.24 (1H, d, *J* = 8.68 Hz, *H15*), 7.05 – 7.09 (1H, m, *H7*), 6.93 – 6.96 (1H, m, *H6*), 4.26 – 4.34 (4H, m, *H10* + *H19* + *H21*), 3.73 (1H, dd, *J* = 10.86, 6.62 Hz, *H22*), 3.27 (1H, dd, *J* = 10.28, 6.28 Hz, *H22*), 2.58 – 2.67 (1H, m, *H20*), 1.89 – 1.96 (1H, m, *H20*), 1.41 (3H, s, -C(CH₃)₃(a)), 1.28 (6H, s, -C(CH₃)₃(b)). **¹³C NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 169.8 (*C18*), 154.4 (-NCOO-), 152.9 (*C11*), 136.9 (*C12*) 136.2 (*C9*), 135.2 (*C17*), 133.5 (*C14*), 126.9 (*C4*), 123.8 (*C2*), 121.1 (*C7*), 118.5 (*C6*), 118.3 (*C8*), 114.8 (*C15* + *C16*), 111.4 (*C5*), 109.4 (*C3*), 104.8 (*C13*), 79.3 (-C(CH₃)₃(a)), 79.0 (-C(CH₃)₃(b)), 59.3 (*C19*(b)), 59.0 (*C19*(a)), 58.2 (*C21*(a)), 57.3 (*C21*(b)), 51.3 (*C22*(a)), 50.7 (*C22*(b)), 35.7 (*C20*(b)), 34.9 (*C20*(a)), 28.0 (-C(CH₃)₃(a)), 27.9 (-C(CH₃)₃(b)), 25.9 (*C10*).

LCMS (ESI): t_R = 8.1 min (Methode I); *m/z* (% relative Intensität): 501.2 [M+H⁺] (100.0), 1001.5 [2M+H⁺] (29.1). **HRMS** (ESI): *m/z* ber. für C₂₆H₂₉N₈O₃⁺ [M+H⁺] 501.2357; gef. *m/z* 501.2360. **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3272 (w), 2975 (w), 2927 (w), 2101 (s), 1671 (s), 1635 (w), 1603 (w), 1557 (w), 1540 (w), 1522 (w), 1488 (w), 1455 (w), 1410 (w), 1393 (s), 1366 (w), 1320 (w), 1256 (w), 1221 (w), 1160 (s), 1123 (w), 1066 (w), 1010 (w), 968 (w), 850 (w), 807 (w), 775 (w), 741 (s), 668 (w), 647 (w), 621 (w), 556 (w), 473 (w), 458 (w), 425 (m).

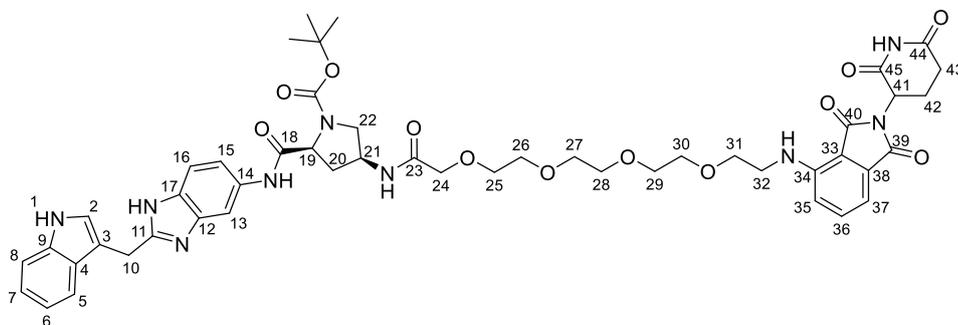
tert-Butyl-(2*S*,4*R*)-2-((2-((1*H*-indol-3-yl)methyl-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-yl)carbomoyl)-4-aminopyrrolidin-1-carboxylat (**251**, JES-212)



Zu einer Lösung von *tert*-Butyl-(2*S*,4*R*)-2-((2-((1*H*-indol-3-yl)methyl-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-yl)carbomoyl)-4-azidopyrrolidin-1-carboxylat (**250**) (311 mg, 621 μ mol) in 5 mL EtOH wurde Pd/C (20%ig, 20.0 mg, 37.6 μ mol) gegeben, woraufhin die Atmosphäre durch Wasserstoff ersetzt wurde. Das Gemisch wurde unter diesen Bedingungen bei RT über Nacht gerührt. Anschließend wurde nach Filtration über Celite das Lösungsmittel entfernt. Das Produkt wurde so ohne weitere Aufreinigung sauber erhalten (279 mg, 587 μ mol, 95%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.95 (1H, s, *H*1), 10.38 (1H, s, -CONH-), 7.88 (1H, s, *H*13), 7.35 – 7.48 (3H, m, *H*5 + *H*8 + *H*16), 7.22 – 7.28 (2H, m, *H*2 + *H*15), 7.06 (1H, t, *J* = 7.26 Hz *H*7), 6.94 (1H, t, *J* = 7.40 Hz, *H*6), 4.31 – 4.34 (1H, m, *H*19), 4.26 (2H, s, *H*10), 3.72 – 3.74 (1H, m, *H*21), 3.57 – 3.61 (1H, m, *H*22), 3.45 – 3.50 (1H, m, *H*22), 2.50 – 2.58 (1H, m, *H*20), 1.91 – 1.99 (1H, m, *H*20), 1.40 (3H, s, -C(CH₃)₃(a)), 1.28 (6H, s, -C(CH₃)₃(b)). ¹³C NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 171.4 (*C*18), 152.9 (-NCOO-), 136.2 (*C*9), 126.9 (*C*4), 123.7 (*C*2), 121.0 (*C*7), 118.4 (*C*6 + *C*8), 111.4 (*C*5), 109.9 (*C*3), 79.2 (-C(CH₃)₃), 59.4 (*C*19), 51.5 (*C*22), 48.9 (*C*21), 35.6 (*C*20), 28.0 (-C(CH₃)₃(a)), 27.8 (-C(CH₃)₃(b)), 25.4 (*C*10) (*C*_{Benzimidazol} nicht sichtbar). LCMS (ESI): *t*_R = 7.5 min (Methode I); *m/z* (% relative Intensität): 210.1 (5.8), 375.2 [M-Boc+H⁺] (7.7), 475.2 [M+H⁺] (100.0), 949.5 [2M+H⁺] (21.6). HRMS (ESI): *m/z* ber. für C₂₆H₃₁N₆O₃⁺ [M+H⁺] 475.2452; gef. *m/z* 475.2453. IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 2975 (w), 2357 (w), 1669 (m), 1557 (w), 1525 (w), 1488 (w), 1455 (w), 1411 (m), 1368 (w), 1230 (w), 1159 (w), 1127 (w), 1054 (w), 1011 (w), 839 (s), 775 (w), 741 (w), 557 (m), 483 (w), 425 (w).

tert-Butyl-(2*S*,4*S*)-2-((2-((1*H*-indol-3-yl)methyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-yl)-carbamoyl)-4-(14-((2-(2,6-dioxopiperidin-3-yl)-1,3-dioxoisindolin-4-yl)amino)-3,6,9,12-tetraoxatetradecanamido)pyrrolidin-1-carboxylat (**253**, JES-213)

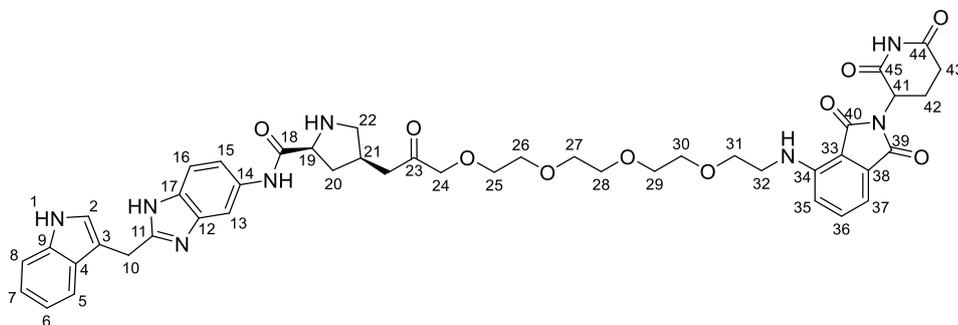


tert-Butyl-14-((2-(2,6-dioxopiperidin-3-yl)-1,3-dioxoisindolin-4-yl)amino)-3,6,9,12-tetraoxatetradecanoat (**244**) (119 mg, 212 μmol) wurde in 4 mL trockenem CH_2Cl_2 gelöst und mit 2 mL TFA versetzt. Nach Rühren über Nacht wurden die flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Nach präparativer HPLC wurde das noch nicht vollständig reine Produkt (**252**) ohne weitere Aufreinigung umgesetzt (105 mg, 124 μmol). Hierzu wurde es zusammen mit HATU (112 mg, 296 μmol) in 2 mL trockenem MeCN gelöst und mit DIPEA (210 μL , 1.21 mmol) versetzt. Nach 15 Minuten wurde *tert*-Butyl-(2*S*,4*R*)-2-((2-((1*H*-indol-3-yl)methyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-yl)carbamoyl)-4-aminopyrrolidin-1-carboxylat (**251**) (96.2 mg, 203 μmol) und 1 mL entgastes DMF hinzugegeben. Nach Rühren über Nacht wurden Wasser und EtOAc hinzugegeben. Nachdem die Phasen getrennt wurden, wurde die wässrige Phase zwei weitere Male mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen und mit Na_2SO_4 getrocknet. Das Produkt wurde durch präparative HPLC gereinigt und als gelbes Öl erhalten (30.2 mg, 31.3 μmol , 25%).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11.09 (1H, s, $-\text{C}^{18}\text{ONH}$), 11.00 (1H, d, $J = 1.48$ Hz, *H1*), 10.16 (1H, s, $-\text{CONHCO}-$), 8.12 – 8.19 (1H, m, *H15*), 7.98 (1H, d, $J = 1.48$ Hz, *H13*), 7.55 (1H, dd, $J = 8.42, 7.22$ Hz, *H36*), 7.45 – 7.50 (2H, m, *H8 + H16*), 7.33 – 7.39 (3H, m, *H2 + H5*), 7.02 – 7.11 (3H, m, *H7 + H35 + H37*), 6.95 (1H, t, $J = 7.42$ Hz, *H6*), 6.58 (1H,

t, $J = 5.70$ Hz, $-C^{32}NH_2^+C^{34}-$), 5.03 – 5.08 (1H, m, *H41*), 4.40 – 4.44 (1H, m, *H21*), 4.35 (2H, s, *H10*), 4.28 (1H, m, *H19*), 3.83 – 3.92 (2H, m, *H24*), 3.37 – 3.70 (18H, m, *H22 + H25 - H32 + -C^{32}NH_2^+C^{34}-*), 3.25 – 3.28 (1H, m, *H22*), 2.85 – 2.91 (1H, m, *H43*), 2.52 – 2.61 (3H, m, *H20 + H42 + H43*), 2.01 – 2.04 (1H, m, *H42*), 1.88 – 1.91 (1H, m, *H20*). ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.7 (*C44*), 171.2 (*C18*), 170.0 (*C40*), 168.9 (*C45*), 168.9 (*C23*), 167.3 (*C39*), 154.4 (*C11*), 153.0 (-OCON-), 146.4 (*C34*), 136.3 (*C36*), 136.1 (*C9*), 133.9 (*C17*), 132.1 (*C38*), 126.8 (*C4*), 124.1 (*C2*), 121.2 (*C7*), 118.6 (*C6*), 118.2 (*C8*), 117.4 (*C35*), 115.2 (*C15*), 114.6 (*C16*), 111.5 (*C5*), 110.6 (*C37*), 109.2 (*C33*), 108.8 (*C3*), 104.6 (*C13*), 78.9 (-C(CH₃)₃), 70.3 (*C25 - C31*), 69.9 (*C25 - C31*), 69.7 (*C25 - C31*), 69.7 (*C25 - C31*), 69.5 (*C25 - C31*), 68.2 (*C25 - C31*), 62.8 (*C25 - C31*), 59.4 (*C19*), 52.1 (*C22*), 48.6 (*C41*), 46.4 (*C21*), 41.7 (*C32*), 35.9 (*C20*), 31.0 (*C43*), 28.0 (-C(CH₃)₃(a)), 27.9 (-C(CH₃)₃(b)), 24.7 (*C10*), 22.1 (*C42*) (*C12 und C14 nicht sichtbar*). LCMS (ESI): $t_R = 7.8$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität) 482.7 [M+2H⁺] (72.5), 964.6 [M+H⁺] (100.0). HRMS (ESI): m/z ber. für C₄₉H₅₇N₉O₁₂Na⁺ [M+Na⁺] 964.4019; gef. m/z 964.4012. IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu} = 3268$ (w), 3076 (w), 2872 (w), 1694 (s), 1623 (w), 1514 (w), 1482 (w), 1456 (w), 1405 (m), 1363 (w), 1293 (m), 1259 (w), 1200 (w), 1150 (s), 1108 (w), 1044 (w), 1023 (m), 1005 (w), 841 (s), 816 (w), 746 (m), 607 (w), 557 (m), 482 (m), 468 (w), 426 (m).

(2*S*,4*S*)-*N*-(2-((1*H*-indol-3-yl)methyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-yl)-4-(14-((2-(2,6-dioxopiperidin-3-yl)-1,3-dioxoisindolin-4-yl)amino)-3,6,9,12-tetraoxatetradecanamido)-pyrrolidine-2-carboxamid (**254**, JES-215)

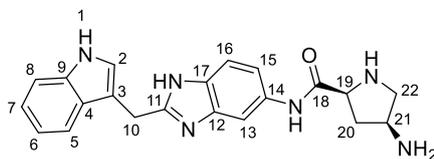


tert-Butyl-(2*S*,4*S*)-2-((2-((1*H*-indol-3-yl)methyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-yl)carbamoyl)-4-(14-((2-(2,6-dioxopiperidin-3-yl)-1,3-dioxoisindolin-4-yl)amino)-3,6,9,12-tetraoxatetradecanamido)pyrrolidin-1-carboxylat (**253**) (14.6 mg, 13.5 μmol) wurde in 3 mL CH_2Cl_2 gelöst und bei 0 °C mit 3 mL TFA versetzt. Nach 1 h bei RT wurde das Gemisch vom Lösungsmittel befreit und mit 0.1 M HCl-Lösung umgesalzen, während das Wasser durch Lyophilisation entfernt wurde. Dadurch wurde das Produkt als sauberes HCl-Salz erhalten (12.1 mg, 13.3 μmol , quant.).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 15.21 (1H, bs, $-\text{C}^{11}\text{NNH-}$), 11.56 (1H, s, $-\text{C}^{18}\text{ONH-}$), 11.30 (1H, d, $J = 1.68$ Hz, $H1$), 11.06 (1H, s, $-\text{CONHCO-}$), 10.41 (1H, bs, $-\text{C}^{19}\text{NH}_2+\text{C}^{22-}$), 8.94 (1H, bs, $-\text{C}^{19}\text{NH}_2+\text{C}^{22-}$), 8.25 (1H, s, $H13$), 8.97 (1H d, $J = 7.36$ Hz, $-\text{C}^{23}\text{ONH-}$), 7.92 (1H, d, $J = 7.92$ Hz, $H8$), 7.71 (2H, s, $H15 + H16$), 7.54 – 7.58 (2H, m, $H2 + H36$), 7.41 (2H, d, $J = 8.08$ Hz, $H5$), 7.08 – 7.12 (2H, m, $H7 + H35$), 6.97 – 7.03 (2H, m, $H6 + H37$), 5.04 (1H, dd, $J = 12.82, 5.38$ Hz, $H41$), 4.65 (2H, s, $H10$), 3.88 (2H, s, $H24$), 3.42 – 3.60 (17H, $H25 - H32 + H22$), 3.21 – 3.25 (1H, m, $H22$), 2.80 – 2.94 (2H, m, $H20 + H43$), 2.46 – 2.60 (2H, m, $H42 + H43$), 1.95 – 2.06 (2H, m, $H20 + H42$). $^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 172.7 ($C44$), 170.0 ($C40$), 169.6 ($C23$), 168.9 ($C45$), 167.2 ($C39$), 166.4 ($C18$), 153.7 ($C11$), 146.4 ($C34$), 136.2 ($C36$), 136.0 ($C9$), 132.0 ($C38$), 131.0 ($C17$), 127.1 ($C14$), 126.4 ($C4$), 125.3 ($C2$), 121.5 ($C7$), 119.0 ($C6$), 118.1 ($C15$), 118.0 ($C8$), 117.4 ($C35$),

114.1 (*C16*), 111.7 (*C5*), 110.6 (*C37*), 109.2 (*C33*), 105.7 (*C3*), 103.8 (*C13*), 70.2 (*C25 - C32*), 69.8 (*C24*), 69.7 (*C25 - C32*), 69.5 (*C25 - C32*), 68.8 (*C25 - C32*), 58.6 (*C19*), 48.9 (*C22*), 48.5 (*C41*), 47.2 (*C21*), 41.7 (*C32*), 34.7 (*C20*), 31.0 (*C43*), 22.5 (*C10*), 22.1 (*C42*). **LCMS** (ESI): $t_R = 7.0$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität) 432.7 [$M+2H^+$] (100.0), 864.5 [$M+H^+$] (79.3). **HRMS** (ESI): m/z ber. für $C_{44}H_{49}N_9O_{10}Na^+$ [$M+Na^+$] 886.3495; gef. m/z 886.3493. **IR** (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 3370$ (m), 3053 (w), 2920 (w), 2254 (w), 2127 (w), 1754 (w), 1694 (s), 1623 (w), 1558 (w), 1510 (w), 1488 (w), 1460 (w), 1408 (w), 1357 (m), 1325 (w), 1290 (w), 1261 (w), 1200 (w), 1149 (m), 1111 (w), 1048 (w), 1022 (s), 998 (w), 820 (m), 762 (w), 748 (m), 607 (w), 574 (w), 482 (w), 467 (w), 425 (w).

(2*S*,4*R*)-*N*-(2-((1*H*-Indol-3-yl)methyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazole-5-yl)-4-aminopyrrolidin-2-carboxamid (255, JES-241)



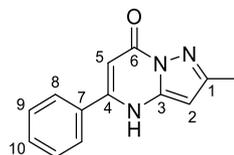
tert-Butyl-(2*S*,4*R*)-2-((2-((1*H*-indol-3-yl)methyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-yl)carbomoyl)-4-aminopyrrolidin-1-carboxylat (**251**) (77.7 mg, 164 μ mol) wurde in 4 M HCl in Dioxan (1.23 mL, 4.91 mmol) suspendiert und bei RT für 1.3 h gerührt. Nach Entfernen der flüchtigen Bestandteile wurde das HCl-Salz des Produkts als oranger Feststoff erhalten (66.9 mg, 163 μ mol, quant.).

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 11.47 (1H, s, -CONH-), 11.25 (1H, d, $J = 1.72$ Hz, *H1*), 8.21 (1H, d, $J = 1.24$ Hz, *H13*), 7.70 (1H, d, $J = 8.80$ Hz, *H16*), 7.65 (1H, dd, $J = 8.86, 1.66$ Hz, *H15*), 7.57 (1H, d, $J = 7.92$ Hz, *H8*), 7.50 (1H, d, $J = 2.32$ Hz, *H2*), 7.41 (1H, d, $J = 8.16$ Hz, *H5*), 7.10 (1H, t, $J = 7.64$ Hz, *H7*), 6.99 (1H, t, $J = 7.58$ Hz, *H6*), 4.61 (2H, s, *H10*), 4.54 (1H, dd, $J = 9.96, 8.16$ Hz, *H19*), 3.92 – 4.00 (1H, m, *H21*),

3.59 – 3.64 (1H, m, *H22*), 3.39 – 3.43 (1H, m, *H22*), 2.99 – 3.06 (1H, m, *H20*), 2.06 – 2.14 (1H, m, *H20*). ^{13}C NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 165.5 (*C18*), 154.0 (*C11*), 136.2 (*C9*), 135.5 (*C14*), 131.8* (*C16*), 128.3* (*C17*), 126.4 (*C4*), 125.2 (*C2*), 121.5 (*C7*), 119.0 (*C6*), 118.0 (*C8*), 117.7 (*C15*), 114.3 (*C5*), 106.0 (*C3*), 104.1 (*C13*), 58.9 (*C19*), 47.9 (*C21*), 47.5 (*C22*), 32.9 (*C20*), 22.9 (*C10*). **LCMS** (ESI): $t_{\text{R}} = 0.7$ min (Methode III); m/z (% relative Intensität): 208.7 (100.0), 263.15 [M–Prolin+H⁺] (21.2), 375.3 [M+H⁺] (61.3). **HRMS** (ESI): m/z ber. für C₂₁H₂₁N₆O⁺ [M+H⁺] 375.1928; gef. m/z 375.1931. **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu} = 2923$ (s), 2852 (w), 2366 (w), 1687 (m), 1632 (w), 1583 (m), 1559 (w), 1514 (w), 1490 (w), 1456 (m), 1405 (w), 1351 (w), 1228 (m), 1177 (w), 1097 (w), 1052 (w), 1009 (w), 968 (w), 847 (w), 816 (w), 743 (s), 496 (m), 482 (w).

7.2.10 Synthese der GORFE-PROTACs

2-Methyl-5-phenyl-4*H*-pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-7-on (**258**, JES-161)

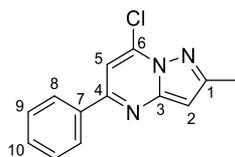


Nach Zutropfen von Ethylbenzoylacetat (**257**) (24.1 mL, 125 mmol) zu einer Lösung von 3-Methyl-1*H*-pyrazol-5-amin (**256**) (11.0 g, 114 mmol) in 100 mL AcOH, wurde dieses Gemisch über Nacht refluxiert. Nach Kühlen auf RT wurde das Reaktionsgemisch in 600 mL eiskalten MTBE gegeben und dort 1 h unter Eiskühlung gerührt. Der Feststoff wurde abfiltriert und mit weiteren 200 mL MTBE gewaschen. Nach Trocknung im Vakuum wurde das Produkt als weiß bis leicht rötlicher Feststoff erhalten (18.6 g, 82.6 mmol, 73%).

^1H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.31 (1H, bs, -NH-), 7.80 – 7.83 (2H, m, *H8*), 7.56 – 7.59 (3H, m, *H9* + *H10*), 6.04 (1H, s, *H2*), 5.99 (1H, s, *H5*), 2.31 (3H, s, -CH₃).

^{13}C NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 156.1 (*C4*), 152.1 (*C1*), 149.2 (*C6*), 142.4 (*C3*), 132.3 (*C7*), 130.9 (*C10*), 129.0 (*C9*), 127.1 (*C8*), 93.6 (*C5*), 89.2 (*C2*), 14.1 (-CH₃).
LCMS (ESI): t_{R} = 5.0 min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 226.1 [M+H⁺] (100.0), 451.2 [2M+H⁺] (13.3). **HRMS** (ESI): m/z ber. für C₁₃H₁₂N₃O⁺ [M+H⁺] 226.0975; gef. m/z 226.0977. **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 2998 (w), 1670 (m), 1611 (s), 1585 (w), 1552 (m), 1519 (w), 1491 (w), 1450 (w), 1425 (w), 1395 (w), 1328 (m), 1244 (w), 1202 (w), 1156 (w), 1135 (w), 1010 (w), 923 (w), 816 (w), 771 (s), 743 (m), 697 (s), 660 (w), 612 (w), 517 (s), 477 (w), 436 (w), 421 (w).

7-Chloro-2-methyl-5-phenylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin (**259**, JES-162)

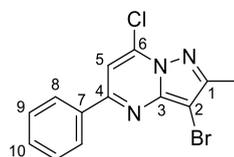


2-Methyl-5-phenyl-4*H*-pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-7-on (**258**) (7.50 g, 33.3 mmol) wurde in 80 mL Toluol suspendiert und unter Rühren tropfenweise mit einem Gemisch aus Phosphorylchlorid (9.34 mL, 99.9 mmol) und frisch destilliertem *N,N*-Dimethylanilin (5.28 mL, 41.6 mmol) versetzt. Anschließend wurde das Gemisch 4.5 h refluxiert bevor es auf einem roten bis schwarzen Rückstand reduziert wurde. Dieser Rückstand wurde zu 200 mL Eis gegeben und die entstandene Lösung mit ges. NaHCO₃-Lösung neutralisiert. Durch dreifache Extraktion mit je 300 mL EtOAc, konnte nach Waschen mit ges. NaCl-Lösung, Trocknen über Na₂SO₄ und Entfernen des Lösungsmittels das Rohprodukt erhalten werden. Nach Umkristallisation in CH mit wenigen Tropfen EtOAc wurde das Produkt als gelber Feststoff erhalten (5.13 g, 21.0 mmol, 63%).

^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.02 – 8.06 (2H, m, *H8*), 7.46 – 7.53 (3H, m, *H9* + *H10*), 7.32 (1H, s, *H5*), 6.59 (1H, s, *H2*), 2.58 (3H, s, -CH₃). ^{13}C NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 156.6 (*C1*), 155.8 (*C4*), 150.6 (*C3*), 138.2 (*C6*), 136.8 (*C7*), 130.7 (*C10*),

129.1 (*C9*), 127.4 (*C8*), 104.9 (*C5*), 98.1 (*C2*), 14.9 ($-\text{CH}_3$). **LCMS** (ESI): $t_R = 10.4$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 244.1 $[\text{M}+\text{H}^+]$ (100.0). **HRMS** (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{ClN}_3^+$ $[\text{M}+\text{H}^+]$ 244.0636; gef. m/z 244.0639. **IR** (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 1607$ (m), 1581 (w), 1538 (w), 1505 (w), 1488 (m), 1400 (w), (w), 1350 (w), 1283 (w), 1268 (w), 1228 (m), 1190 (w), 1153 (w), 1056 (w), 1026 (w), 989 (w), 928 (w), 866 (w), 849 (w), 837 (w), 796 (w), 785 (w), 774 (m), 733 (w), 697 (w), 685 (m), 662 (w), 648 (w), 583 (m), 565 (w).

3-Bromo-7-chloro-2-methyl-5-phenylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin (**260**, JES-164)

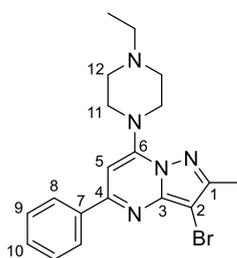


Eine Lösung von 7-Chloro-2-methyl-5-phenyl-pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin (**259**) (4.29 g, 17.6 mmol) in 55 mL CH_2Cl_2 wurde unter Argon auf 0°C gekühlt und portionsweise mit NBS (3.45 g, 19.4 mmol) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde dann bei RT über Nacht gerührt. Nach Zugabe von Wasser wurde die organische Phase separiert und die wässrige Phase mit weiterem CH_2Cl_2 extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Das Produkt wurde so als gelber Feststoff ohne weitere Aufreinigung erhalten (5.68 g, 17.6 mmol, quant.).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.10 – 8.14 (2H, m, *H8*), 7.49 – 7.53 (3H, m, *H9* + *H10*), 7.39 (1H, s, *H5*), 2.57 (3H, s, $-\text{CH}_3$). $^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 156.6 (*C4*), 154.9 (*C1*), 146.9 (*C3*), 138.7 (*C6*), 136.2 (*C7*), 131.1 (*C10*), 129.2 (*C9*), 127.6 (*C8*), 105.6 (*C5*), 86.8 (*C2*), 13.6 ($-\text{CH}_3$). **LCMS** (ESI): $t_R = 12.7$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 324.0 $[\text{M}+\text{H}^+]$ (100.0). **HRMS** (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{BrClN}_3^+$ $[\text{M}+\text{H}^+]$ 321.9741; gef. m/z 321.9747. **IR** (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 3098$ (w), 3065 (w), 1699 (w), 1605 (m), 1594 (w), 1539 (m), 1486 (s), 1397 (w), 1352 (m), 1276 (w), 1236 (w),

1188 (m), 1136 (w), 1071 (m), 1056 (w), 1034 (w), 1016 (w), 991 (w), 925 (w), 868 (w), 849 (w), 818 (m), 794 (w), 773 (m), 735 (m), 725 (w), 689 (s), 654 (w), 643 (w), 611 (m), 566 (w), 551 (w), 526 (w), 487 (w), 422 (w).

**3-Bromo-7-(4-ethylpiperazin-1-yl)-2-methyl-5-phenyl-pyrazolo-
[1,5-*a*]pyrimidine (261, JES-165)**

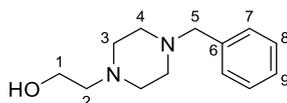


Zu 3-Bromo-7-chloro-2-methyl-5-phenylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin (**260**) (3.00 g, 9.30 mmol) und DIPEA (2.43 mL, 14.0 mmol) in 20 mL Isopropanol wurde 1-Ethylpiperazin (1.37 mL, 10.8 mmol) gegeben. Das entstandene Gemisch wurde über Nacht refluxiert. Der beim Abkühlen ausfallende Feststoff wurde abfiltriert, mit Isopropanol und Wasser gewaschen und anschließend getrocknet. So wurde das Produkt als gelber Feststoff in sauberer Form erhalten (2.82 g, 6.14 mmol, 66%).

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.08 – 8.10 (2H, m, *H8*), 7.43 – 7.50 (3H, m, *H9* + *H10*), 6.52 (1H, s, *H5*), 3.82 – 3.84 (4H, m, *H11*), 2.74 – 2.76 (4H, m, *H12*), 2.55 (2H, q, $J = 7.19$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2.49 (3H, s, $-\text{CH}_3$) 1.16 (3H, t, $J = 7.20$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$). **¹³C NMR** (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 157.6 (*C4*), 152.4 (*C1*), 150.7 (*C6*), 148.0 (*C3*), 138.3 (*C7*), 130.1 (*C10*), 128.8 (*C9*), 127.5 (*C8*), 90.5 (*C5*), 84.3 (*C2*), 52.5 ($-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 52.2 (*C12*), 48.3 (*C11*), 13.7 ($-\text{CH}_3$), 12.0 ($-\text{CH}_2\text{CH}_3$). **LCMS** (ESI): $t_{\text{R}} = 13.2$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 400.1 [$\text{M}+\text{H}^+$] (100.0). **HRMS** (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{BrN}_5^+$ [$\text{M}+\text{H}^+$] 400.1131; gef. m/z 400.1137. **IR** (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 2968$ (w), 2933 (w), 2915 (w), 2871 (w), 2822 (w), 2783 (w), 1604 (m), 1551 (s), 1509 (w), 1486 (w), 1447 (w),

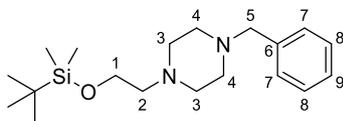
1404 (w), 1382 (w), 1365 (w), 1344 (w), 1325 (w), 1267 (w), 1238 (m), 1202 (w), 1177 (w), 1125 (m), 1092 (w), 1069 (w), 1044 (w), 1023 (w), 1000 (w), 950 (m), 912 (w), 815 (w), 799 (w), 773 (w), 761 (m), 737 (w), 731 (w), 681 (m), 670 (w), 644 (w), 617 (w), 567 (w).

2-(4-Benzylpiperazin-1-yl)ethanol (**263**, JES-167)



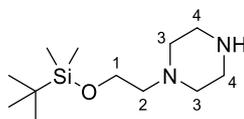
Benzylpiperazin (**262**) (10.0 mL, 57.3 mmol) wurde in 80 mL MeCN gelöst und K_2CO_3 (15.8 g, 114 mmol) wurde zugegeben. Nachdem 2-Bromethanol (4.87 mL, 68.8 mmol) tropfenweise zugegeben worden war, wurde bei RT über Nacht gerührt. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel entfernt und das Produkt durch DCVC gereinigt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das Produkt als leicht braunes Öl erhalten (3.29 g, 14.9 mmol, 26%).

1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.23 – 7.33 (5H, m, *H7* – *H9*), 3.52 – 3.62 (2H, m, *H1*), 3.52 (2H, s, *H5*), 2.50 – 2.56 (11H, m, *H2* – *H4*, -*OH*). ^{13}C NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 138.1 (*C6*), 129.2 (*C7*), 128.2 (*C8*), 127.1 (*C9*), 63.0 (*C5*), 59.2 (*C2*), 57.7 (*C1*), 53.1 (*C3*), 52.9 (*C4*). LCMS (ESI): t_R = 4.8 min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 221.2 [$M+H^+$] (100.0). HRMS (ESI): m/z ber. für $C_{13}H_{21}N_2O^+$ [$M+H^+$] 221.1648; gef. m/z 221.1648. IR (cm^{-1}): $\tilde{\nu}$ = 3358 (w), 3085 (w), 3061 (w), 3027 (w), 2937 (w), 2877 (w), 2809 (m), 2770 (w), 1663 (w), 1494 (w), 1455 (m), 1348 (w), 1297 (m), 1209 (w), 1152 (m), 1136 (w), 1055 (m), 1007 (s), 933 (w), 877 (w), 832 (w), 815 (w), 771 (w), 738 (s), 697 (s), 621 (w), 603 (w), 528 (w), 502 (w), 483 (w), 460 (w).

2-(4-Benzylpiperazin-1-yl)ethoxy-*tert*-butyldimethylsilan (264, JES-168)

Zu einer Lösung von 2-(4-Benzylpiperazin-1-yl)ethanol (**263**) (2.50 g, 11.4 mmol) und 1*H*-Imidazol in 25 mL trockenem CH₂Cl₂ wurde bei 0 °C im Argon-Gegenstrom TBSCl (2.05 g, 13.6 mmol) gegeben. Das Gemisch wurde über Nacht bei RT gerührt. Nach Zugabe von Wasser wurde die organische Phase separiert und die wässrige Phase mit weiterem CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Nach säulenchromatographischer Trennung wurde das Produkt als klares Öl erhalten (3.40 g, 10.2 mmol, 90%).

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.21 – 7.33 (5H, m, *H*8 – *H*9), 3.74 – 3.77 (2H, m, *H*1), 3.50 (2H, s, *H*5), 2.48 – 2.55 (10H, m, *H*2 – *H*4), 0.88 (9H, s, -SiC(CH₃)₃), 0.05 (6H, s, -Si(CH₃)₂-). **¹³C NMR** (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 138.3 (*C*6), 129.3 (*C*8), 128.3 (*C*7), 127.1 (*C*9), 63.2 (*C*5), 61.5 (*C*1), 60.7 (*C*2), 54.0 (*C*3), 53.2 (*C*4), 26.1 (-SiC(CH₃)₃), 18.4 (-Si(CH₃)₂-). **LCMS** (ESI): *t*_R = 14.1 min (Methode I); *m/z* (% relative Intensität): 335.2 [M+H⁺] (100.0), 705.4 (8.8). **HRMS** (ESI): *m/z* ber. für C₁₉H₃₅N₂O₂Si⁺ [M+H⁺] 335.2513; gef. *m/z* 335.2504. **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3028 (w), 2930 (m), 2881 (w), 2856 (w), 2807 (w), 2768 (w), 1684 (w), 1494 (w), 1471 (w), 1456 (w), 1388 (w), 1360 (w), 1349 (w), 1316 (w), 1300 (w), 1282 (w), 1253 (m), 1158 (w), 1139 (w), 1100 (s), 1030 (w), 1011 (m), 937 (w), 914 (w), 830 (s), 774 (m), 735 (m), 697 (m), 664 (w), 604 (w), 518 (w), 459 (w).

***tert*-Butyldimethyl-(2-piperazin-1-ylethoxy)silan (**267**, JES-169)**

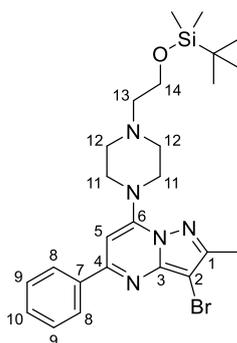
Methode 1: Zu einer entgasten Lösung von 1-Benzyl-4-(2-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-ethyl)piperazine (**264**) (3.34 g, 9.68 mmol) in 80 mL EtOH wurde im Argon-Gegenstrom Pd(OH)₂ (20%ig, 5.44 g, 7.74 mmol) zugegeben. Anschließend wurde die Atmosphäre durch Wasserstoff ausgetauscht und das Gemisch über Nacht bei RT gerührt. Durch Filtration über Celite und Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde das Produkt als klares Öl erhalten (2.01 g, 8.22 mmol, 85%).

Methode 2: Eine Suspension von 2-Bromethoxy-*tert*-butyldimethylsilan (**266**) (8.97 mL, 41.8 mmol), Piperazin (**265**) (9.00 g, 105 mmol) und K₂CO₃ (43.3 g, 314 mmol) in 90 mL MeCN wurde 20 h bei 80 °C unter Argonatmosphäre gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde nach Abschluss der Reaktion filtriert und das Filtrat vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde in Et₂O aufgenommen, mit Wasser gewaschen und mit Na₂SO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das Produkt mittels DCVC aufgereinigt, wobei die Elution mit CH₂Cl₂:MeOH erfolgte (99:1 bis 9:1; dann EtOH für höhere Alkoholgehalte bis 100% EtOH). Als Produkt wurde ein klares Öl erhalten (7.51 g, 30.7 mmol, 74%).

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 3.74 (2H, t, *J* = 6.40 Hz, *H*₁), 2.91 (4H, t, *J* = 4.92 Hz, *H*₄), 2.49 – 2.52 (6H, m, *H*₂ + *H*₃), 0.88 (9H, s, -SiC(CH₃)₃), 0.05 (6H, s, -Si(CH₃)₂-). ¹³C NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 61.3 (*C*₁), 61.2 (*C*₂), 54.8 (*C*₃), 46.0 (*C*₄), 26.1 (-SiC(CH₃)₃), 18.4 (-SiC(CH₃)₃), -5.2 (-Si(CH₃)₂-). LCMS (ESI): *t*_R = 12.3 min (Methode I); *m/z* (% relative Intensität): 245.2 [M+H⁺] (100.0). HRMS (ESI): *m/z* ber. für C₁₂H₂₉N₂Osi⁺ [M+H⁺] 245.2044; gef. *m/z* 245.2048. IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 2929 (m), 2885 (w), 2855 (w), 2819 (w), 1471 (w), 1462 (w), 1388 (w), 1361 (w),

1322 (w), 1305 (w), 1252 (m), 1100 (m), 1061 (w), 1030 (w), 1005 (w), 938 (w), 896 (w), 830 (m), 772 (s), 663 (w), 597 (w), 571 (w).

2-[4-(3-Bromo-2-methyl-5-phenylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-7-yl)piperazin-1-yl]ethoxy-*tert*-butyldimethylsilan (170)

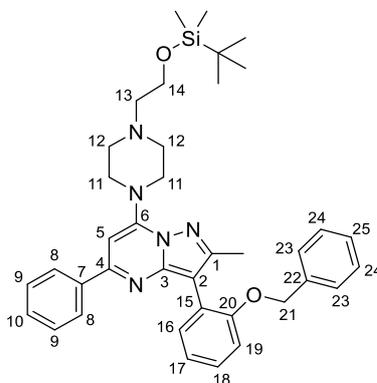


Eine Lösung von 3-Bromo-7-chloro-2-methyl-5-phenylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin (**260**) (2.20 g, 6.82 mmol), *tert*-Butyldimethyl-(2-piperazin-1-ylethoxy)silan (**267**) (1.94 g, 7.92 mmol) und DIPEA (1.78 mL, 10.2 mmol) wurde über Nacht bei 80 °C gerührt. Der nach Ankratzen an der abgekühlten Kolbenwand ausfallende gelbe Feststoff wurde abfiltriert, mit Wasser und Isopropanol gewaschen und im Exsikkator über P₄O₁₀ getrocknet (3.09 g, 5.82 mmol, 85%).

¹H NMR (600 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.07 – 8.10 (2H, m, *H8*), 7.44 – 7.50 (3H, m, *H9* + *H10*), 6.51 (1H, s, *H5*), 3.80 – 3.83 (6H, m, *H11* + *H14*), 2.83 (4H, bs, *H12*), 2.65 (2H, bs, *H13*), 2.49 (3H, s, -CH₃), 0.91 (9H, s, -SiC(CH₃)₃), 0.09 (6H, s, -Si(CH₃)₂).
¹³C NMR (600 MHz, Chloroform-*d*) δ 157.6 (*C4*), 152.4 (*C1*), 150.7 (*C6*), 148.0 (*C3*), 138.3 (*C7*), 130.1 (*C10*), 128.9 (*C9*), 127.5 (*C8*), 90.5 (*C5*), 84.3 (*C2*), 61.5 (*C14*), 60.6 (*C13*), 53.2 (*C12*), 48.4 (*C11*), 26.1 (-SiC(CH₃)₃), 18.5 (-SiC(CH₃)₃), 13.7 (-CH₃), -5.1 (-Si(CH₃)₂). LCMS (ESI): t_R = 19.3 min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 532.2 [M+H⁺] (100.0). HRMS (ESI): m/z ber. für C₂₅H₃₇BrN₅OSi⁺ [M+H⁺] 530.1945; gef. m/z 530.1941. IR (cm⁻¹): ν̄ = 2950 (w), 2927 (w), 2881 (w), 2851 (w),

1606 (w), 1598 (w), 1556 (s), 1507 (w), 1473 (w), 1463 (w), 1444 (w), 1387 (w), 1373 (w), 1358 (w), 1330 (w), 1296 (w), 1253 (w), 1235 (m), 1206 (w), 1155 (m), 1136 (w), 1111 (m), 1079 (w), 1058 (w), 1042 (w), 1021 (m), 1008 (w), 951 (w), 939 (m), 922 (w), 829 (m), 807 (w), 768 (s), 736 (w), 690 (m), 663 (w), 644 (w), 616 (w), 566 (w), 484 (w).

3-(2-(Benzyloxy)phenyl)-7-(4-(2-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)ethyl)-piperazin-1-yl)-2-methyl-5-phenylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin (271, JES-173)

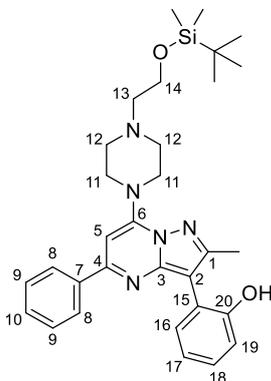


Ein entgastes Gemisch aus 5 mL Dioxan und 1 mL Wasser wurde zu einem durchgemengten Gemisch aus 2-[4-(3-Bromo-2-methyl-5-phenylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-7-yl)piperazin-1-yl]ethoxy-*tert*-butyldimethylsilan (**269**) (1.00 g, 1.88 mmol), 2-Benzyloxyphenylboronsäure (**270**) (516 mg, 2.26 mmol), Cs₂CO₃ (614 mg, 1.88 mmol) und PdCl₂(dppf) (138 mg, 188 μmol) unter Argon gegeben. Diese Suspension wurde über Nacht refluxiert, wobei sich eine dunkle Lösung bildete. Anschließend wurde mit EtOAc verdünnt und zweimal mit Wasser gewaschen. Nach Trocknung über Na₂SO₄, Filtration und Konzentration wurde das erhaltene Gemisch chromatographisch getrennt. Dabei wurde das Produkt als neongelber Feststoff erhalten (771 mg, 1.22 mmol, 65%).

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.01 – 8.04 (2H, m, *H8*), 7.56 (1H, dd, *J* = 7.50, 1.74 Hz, *H16*), 7.40 – 7.44 (3H, m, *H9* + *H10*), 7.20 – 7.33 (6H, m, *H22* – *H25* + *H18*), 7.09 (1H, dt, *J* = 11.20, 1.08 Hz, *H17*), 7.06 (1H, dd, *J* = 8.16, 0.64 Hz, *H19*), 6.53 (1H, s,

H5), 5.07 (2H, s, $-\text{CH}_2-$), 3.84 – 3.87 (6H, m, *H11* + *H14*), 2.67 – 2.89 (6H, m, *H12* + *H13*), 2.44 (3H, s, $-\text{CH}_3$), 0.92 (9H, s, $-\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 0.10 (6H, s, $-\text{Si}(\text{CH}_3)_2$). ^{13}C NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 156.9 (*C20*), 156.3 (*C4*), 153.4 (*C1*), 150.5 (*C3*), 148.9 (*C6*), 138.8 (*C7*), 137.6 (*C22*), 133.2 (*C16*), 129.7 (*C10*), 128.7 (*C9*), 128.4 (*C24*), 128.2 (arom. *C*), 127.6 (*C18*), 127.4 (*C8*), 127.3 (*C23*), 122.5 (arom. *C*), 121.1 (*C17*), 113.3 (*C19*), 106.3 (*C15*), 90.0 (*C5*), 70.8 ($-\text{CH}_2-$), 61.4 (*C14*), 60.7 (*C13*), 53.3 (*C12*), 48.3 (*C11*), 26.1 ($-\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 18.5 ($-\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 14.6 ($-\text{CH}_3$), -5.1 ($-\text{Si}(\text{CH}_3)_2$). **LCMS** (ESI): t_{R} = 21.1 min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 317.7 [$\text{M}+2\text{H}^+$] (7.3), 634.3 [$\text{M}+\text{H}^+$] (100.0). **HRMS** (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{38}\text{H}_{48}\text{N}_5\text{O}_2\text{Si}^+$ [$\text{M}+\text{H}^+$] 634.3572; gef. m/z 634.3571. **IR** (cm^{-1}): $\tilde{\nu}$ = 3061 (w), 3018 (w), 2951 (w), 2923 (w), 2875 (w), 2848 (w), 1596 (w), 1555 (s), 1524 (w), 1499 (w), 1467 (w), 1455 (w), 1438 (m), 1407 (w), 1388 (w), 1378 (w), 1358 (w), 1324 (w), 1298 (w), 1285 (w), 1231 (s), 1205 (w), 1135 (w), 1115 (m), 1073 (w), 1057 (w), 1020 (w), 1011 (w), 1000 (m), 953 (m), 942 (w), 919 (w), 857 (w), 829 (m), 811 (w), 776 (m), 757 (w), 745 (s), 722 (w), 700 (w), 689 (m), 667 (w), 634 (w), 619 (w), 572 (w), 553 (w), 525 (w), 491 (w), 472 (w).

2-(7-(4-(2((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)ethyl)piperazin-1-yl)-2-methyl-5-phenylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)phenol (272, JES-175)



Methode 1: 3-(2-(Benzyloxy)phenyl)-7-(4-(2((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)ethyl)piperazin-1-yl)-2-methyl-5-phenylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin (**271**) (100 mg, 158 μmol)

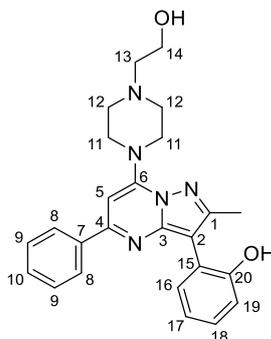
wurden in einer minimalen Menge EtOAc gelöst und mit Pd(OH)₂/C (20%ig, 1.1 mg, 1.6 µmol) versetzt. Anschließend wurde die Atmosphäre durch Wasserstoff ausgetauscht und das Gemisch bei Wasserstoffüberdruck (4 bar) über Nacht gerührt. Nach etwa 17 h wurde die gleiche Menge an Katalysator nachgegeben. Nach weiteren 6 h Rühren unter Wasserstoffüberdruck (4 bar) wurde das Gemisch nach vollständigem Umsatz über Celite filtriert und vom Lösungsmittel befreit. So wurde das Produkt als tiefgelber Feststoff erhalten (84.9 mg, 153 µmol, quant.).

Methode 2: Zu einem Gemenge aus 2-[4-(3-Bromo-2-methyl-5-phenylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-7-yl)piperazin-1-yl]ethoxy-*tert*-butyldimethylsilan (**269**) (1.00 g, 1.88 mmol), 2-Hydroxyphenylboronsäure (**268**) (468 mg, 3.39 mmol), Cs₂CO₃ (1.23 g, 3.77 mmol) und PdCl₂(dppf) (138 mg, 188 µmol) wurde ein entgastes Gemisch aus 5 mL Dioxan und 1 mL Wasser gegeben. Die entstandene Suspension wurde über Nacht unter Sauerstoffausschluss zum Rückfluss erhitzt, wobei sich eine schwarze Lösung bildete. Das Gemisch wurde mit EtOAc verdünnt und filtriert. Dann wurde die organische Phase mit Wasser und ges. NaCl-Lösung gewaschen, bevor sie über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum konzentriert wurde. Nach säulenchromatographischer Trennung, wurde das saubere Produkt als gelber Feststoff erhalten (371 mg, 682 µmol, 36%).

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 10.37 (1H, bs, -OH), 8.00 – 8.02 (2H, m, *H8*), 7.43 – 7.52 (4H, m, *H9* + *H10* + *H16*), 7.23 – 7.28 (1H, m, *H18*), 7.15 (1H, dd, *J* = 8.10, 1.26 Hz, *H19*), 7.00 (1H dt, *J* = 11.07, 1.39 Hz, *H17*), 6.49 (1H, s, *H5*), 3.85 – 3.94 (6H, m, *H11* + *H14*), 2.70 – 2.87 (6H, m, *H12* + *H13*), 2.66 (3H, s, -CH₃), 0.92 (9H, s, -Si(CH₃)₃), 0.10 (6H, s, -Si(CH₃)₂). ¹³C NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 156.02 (*C4*), 154.9 (*C20*), 152.3 (*C1*), 150.6 (*C3*), 146.7 (*C6*), 137.0 (*C7*), 130.4 (*C10*), 129.6 (*C16*), 129.0 (*C9*), 128.7 (arom. C), 127.9 (*C18*), 127.2 (*C8*), 127.1 (arom. C), 120.4 (arom. C), 120.1 (*C17*), 119.5 (*C19*), 106.2 (*C15*), 89.1 (*C5*), 61.3 (*C14*), 60.4 (*C13*), 53.1 (*C12*), 48.4 (*C11*), 25.9 (-Si(CH₃)₃), 18.3 (-Si(CH₃)₃), 15.2 (-CH₃), -5.3 (-Si(CH₃)₂). LCMS (ESI): t_R = 18.7 min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 272.7 (5.1), 544.3 [M+H⁺] (100.0).

HRMS (ESI): m/z ber. für $C_{31}H_{42}N_5O_2Si^+$ $[M+H]^+$ 544.3102; gef. m/z 544.3099. **IR** (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 2953$ (w), 2928 (m), 2883 (w), 2854 (w), 1598 (w), 1562 (s), 1520 (w), 1498 (w), 1470 (w), 1445 (m), 1409 (w), 1388 (w), 1360 (w), 1324 (m), 1283 (w), 1242 (m), 1205 (w), 1098 (m), 1050 (w), 1020 (w), 1005 (m), 953 (m), 831 (m), 811 (w), 773 (w), 759 (s), 750 (w), 724 (w), 687 (m), 662 (w).

2-(7-(4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl)-2-methyl-5-phenylpyrazolo[1,5-*a*]-pyrimidin-3-yl)phenol (272, JES-192)

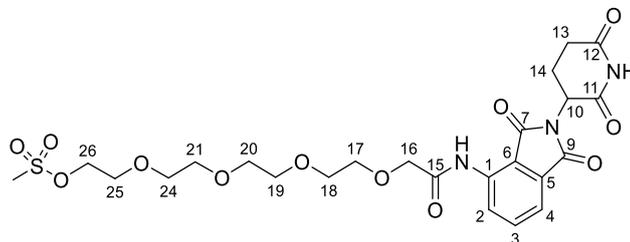


TBAF-Lösung (1 M in THF, 73.6 μ L, 73.6 μ mol) wurde bei 0 °C langsam zu einer Lösung von 2-(7-(4-(2((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)ethyl)piperazin-1-yl)-2-methyl-5-phenylpyrazolo[1,5-*a*]-pyrimidin-3-yl)phenol (**272**) (40.0 mg, 73.6 μ mol) in 500 μ L trockenem THF getropft. Nach 1.5 h wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in CH_2Cl_2 aufgenommen. Die organische Phase wurde mit Wasser gewaschen und die so erhaltene wässrige Phase wurde dreimal mit CH_2Cl_2 extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und nach Filtration vom Lösungsmittel befreit. Das erhaltene Gemisch wurde durch präparative HPLC getrennt, wobei das Produkt als gelber Feststoff erhalten wurde (3.5 mg, 8.2 μ mol, 11%).

1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 10.28 (1H, bs, ArOH), 7.99 – 8.02 (2H, m, *H8*), 7.48 – 7.53 (3H, m, *H9* + *H10*), 7.44 (1H, dd, $J = 7.78, 1.58$ Hz, *H16*), 7.24 – 7.28 (1H, m, *H18*), 7.15 (1H, dd, $J = 8.12, 1.24$ Hz, *H19*), 7.01 (1H, td, $J = 11.14, 1.32$ Hz, *H17*), 6.50

(1H, s, *H5*), 3.97 (4H, bs, *H11*), 3.76 (2H, t, $J = 5.20$ Hz, *H14*), 2.91 (4H, bs, *H12*), 2.75 (2H, t, $J = 5.18$ Hz, *H13*), 2.66 (3H, s, -CH₃). ¹³C NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 156.3 (*C4*), 155.1 (*C20*), 152.6 (*C1*), 150.6 (*C3*), 146.8 (*C6*), 137.1 (*C7*), 130.7 (*C10*), 129.8 (*C16*), 129.2 (*C9*), 128.2 (*C18*), 127.3 (*C8*), 120.5 (*C2*), 120.4 (*C17*), 119.7 (*C19*), 106.5 (*C15*), 89.4 (*C5*), 59.7 (*C13*), 57.9 (*C14*), 52.5 (*C12*), 48.2 (*C11*), 15.3 (-CH₃).
LCMS (ESI): $t_R = 10.2$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 430.2 [M+H⁺] (100.0). **HRMS** (ESI): m/z ber. für C₂₅H₂₈N₅O₂⁺ [M+H⁺] 430.2238; gef. m/z 430.2239.
IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu} = 2923$ (w), 2851 (w), 1598 (w), 1564 (s), 1520 (w), 1496 (w), 1447 (w), 1408 (w), 1323 (w), 1283 (w), 1245 (m), 1203 (w), 1153 (w), 1130 (w), 1100 (w), 1072 (w), 1033 (w), 1006 (w), 950 (w), 760 (m), 685 (w), 656 (w), 474 (w).

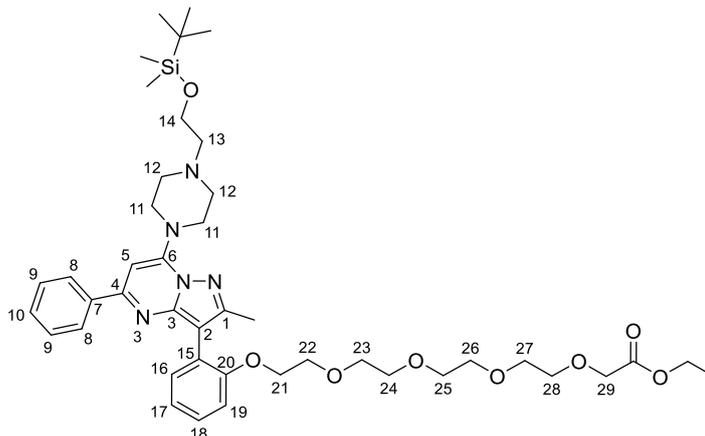
14-((2(2,6-Dioxopiperidin-3-yl)-1,3-dioxoisindolin-4-yl)amino)-14-oxo-3,6,9,12-tetraoxatetradecylmethansulfonat (275, JES-195)



Einer Lösung von *N*-(2-(2,6-Dioxopiperidin-3-yl)-1,3-dioxoisindolin-4-yl)-14-hydroxy-3,6,12-tetraoxatetradecanamid (**274**) (105 mg, 206 μ mol) und NEt₃ (37.3 μ L, 268 μ mol) in 3.5 mL CH₂Cl₂ wurde bei 0 °C tropfenweise eine Lösung von MsCl (28.3 mg, 247 μ mol) in 0.5 mL CH₂Cl₂ zugeführt. Nach 15 Minuten wurde das Eisbad entfernt und das Gemisch für 2.5 h bei RT gerührt. Die Lösung wurde zweimal mit Wasser gewaschen und nach Trocknen über Na₂SO₄ vom Lösungsmittel befreit. Durch chromatographische Trennung wurde das Produkt als neongelber Feststoff erhalten (108 mg, 184 μ mol, 89%).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 10.51 (1H, s, $-(\text{CO})_2\text{NH}$), 8.85 (1H, dd, $J = 8.26$, 7.58 Hz, *H2*), 8.54 (1H, s, $-\text{CONH}-$), 7.72 (1H, dd, $J = 8.26$, 7.58 Hz, *H3*), 7.58 (1H, dd, $J = 7.32$, 0.64 Hz, *H4*), 4.99 (1H, m, *H10*), 4.35 – 4.37 (2H, m, *H17* – *H26*), 4.19 – 4.19 (2H, d, $J = 3.16$ Hz, *H16*), 3.81 (4H, s, *H17* – *H26*), 3.75 – 3.77 (2H, m, *H17* – *H26*), 3.69 – 3.71 (8H, m, *H17* – *H26*), 3.06 (3H, s, $-\text{OSO}_2\text{CH}_3$), 2.75 – 2.90 (3H, m, *H13* + *H14*), 2.14 – 2.19 (1H, m, *H14*). $^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 171.2 (*C12*), 169.4 (*C15*), 168.6 (*C11*), 168.2 (*C7*), 166.9 (*C9*), 136.9 (*C1*), 136.4 (*C3*), 131.6 (*C5*), 125.3 (*C2*), 118.9 (*C4*), 116.3 (*C6*), 71.7 (*C17*), 71.1 (*C16*), 70.8 (*C18* – *C26*), 70.7 (*C18* – *C26*), 70.7 (*C18* – *C26*), 70.6 (*C18* – *C26*), 69.3 (*C18* – *C26*), 69.1 (*C18* – *C26*), 49.4 (*C10*), 37.8 ($-\text{OSO}_2\text{CH}_3$), 31.4 (*C13*), 22.9 (*C14*). **LCMS** (ESI): $t_{\text{R}} = 6.6$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 603.2 [$\text{M} + \text{NH}_4^+$] (100.0). **HRMS** (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_{12}\text{SNa}^+$ [$\text{M} + \text{Na}^+$] 608.1521; gef. m/z 608.1526. **IR** (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 3306$ (w), 3113 (w), 2914 (w), 1769 (w), 1703 (s), 1618 (w), 1527 (m), 1479 (w), 1428 (w), 1397 (m), 1348 (m), 1293 (w), 1260 (w), 1198 (w), 1174 (m), 1117 (w), 1029 (w), 978 (w), 918 (w), 824 (w), 748 (w), 622 (w), 592 (w), 529 (w), 465 (w).

14-(2-(7-(4-(2-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)piperazin-1-yl)-2-methyl-5-phenylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)phenoxy)-3,6,9,12-tetraoxatetra-decansäureethylester (**277**, JES-202)



Ethyl-14-hydroxy-3,6,9,12-tetraoxatetradecanoat (**238**) (1.68 g, 5.99 mmol) wurde in 30 mL trockenem CH_2Cl_2 gelöst und bei 0 °C mit NEt_3 (1.09 mL, 7.79 mmol) versetzt. Dann wurde MsCl (557 μL , 7.19 mmol) zugetropft und das resultierende Gemisch 30 Minuten bei 0 °C gerührt, bevor das Eisbad entfernt und weitere 30 Minuten bei RT gerührt wurde. Bei der folgenden Zugabe von ges. NaHCO_3 -Lösung wurde darauf geachtet, dass der während der Reaktion entstandene Feststoff vollständig gelöst wurde. Dann wurde die wässrige Phase separiert und drei weitere Male mit CH_2Cl_2 extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und vom Lösungsmittel befreit, wobei ein gelbes Öl entstand, das ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt wurde (1.88 g).

Der Rückstand wurde in 30 mL Aceton (HPLC-Reinheitsgrad) gelöst und nach Zugabe von Natriumiodid (1.80 g, 12.0 mmol) 2.5 h refluxiert, wobei ein Feststoff ausfiel, der abfiltriert wurde. Dann wurde das Lösungsmittel entfernt und der entstandene Rückstand in CH_2Cl_2 aufgenommen. Diese Lösung wurde mit Wasser gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde ein rotes Öl erhalten (1.10 g), welches mit 5 mL entgastem DMF aufgenommen wurde und zusammen mit 2-(7-(4-(2-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)ethyl)peperazin-1-yl)-2-methyl-5-phenylpyrazolo[1,5-*a*]pyri-

midin-3-yl)phenol (**272**) (770 mg, 1.42 mmol) und Cs₂CO₃ (3.90 g, 12.0 mmol) bei 50 °C gerührt wurde. Nachdem kein weiterer Umsatz mehr festzustellen war, wurden 50 mL Wasser zugegeben und diese wässrige Phase viermal mit EtOAc extrahiert. Anschließend wurden die vereinigten organischen Phasen mit 5%iger LiCl-Lösung und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknung über Na₂SO₄ und Entfernen des Lösungsmittels wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch getrennt (Tol:PrOH 98:2 zur Elution des verbliebenen Edukts, dann 9:1), wodurch das gewünschte Produkt sauber erhalten wurde (667 mg, 827 µmol, 58%).

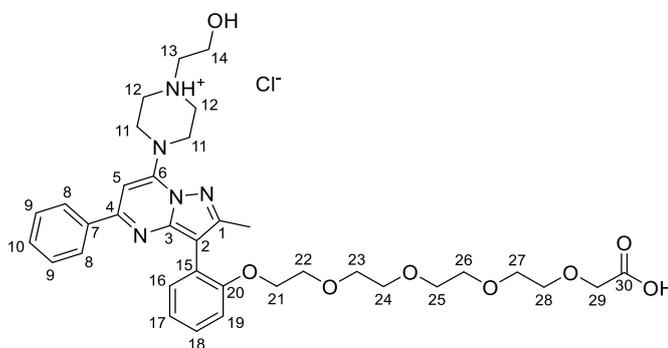
¹H NMR (600 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.02 – 8.03 (2H, m, *H8*), 7.55 (1H, dd, *J* = 7.50, 1.68 Hz, *H16*), 7.37 – 7.43 (3H, m, *H9* + *H10*), 7.30 (1H, td, *J* = 11.66, 1.64 Hz, *H18*), 7.08 (1H, t, *J* = 7.41 Hz, *H17*), 7.02 (1H, d, *J* = 8.28 Hz, *H19*), 6.52 (1H, s, *H5*), 4.19 (2H, q, *J* = 7.14 Hz, -CH₂CH₃), 4.13 (2H, t, *J* = 5.28 Hz, *H21*), 3.83 – 3.85 (6H, m, *H11* + *H14*), 3.68 – 3.73 (4H, m, *H22* – *H29*), 3.64 – 3.66 (2H, m, *H22* – *H29*), 3.56 – 3.60 (4H, m, *H22* – *H29*), 3.51 (4H, s, *H22* – *H29*), 2.86 (4H, bs, *H12*), 2.67 (2H, t, *J* = 5.85 Hz, *H13*), 2.46 (3H, s, -C¹CH₃), 1.26 (3H, t, *J* = 7.14 Hz, -CH₂CH₃), 0.92 (9H, s, -C(CH₃)), 0.10 (6H, s, -Si(CH₃)₂).

¹³C NMR (600 MHz, Chloroform-*d*) δ 170.5 (-COO-), 156.7 (*C20*), 156.1 (*C4*), 153.4 (*C1*), 150.5 (*C6*), 148.8 (*C3*), 138.7 (*C7*), 133.1 (*C16*), 129.6 (*C10*), 128.6 (*C9*), 128.1 (*C18*), 127.3 (*C8*), 122.2 (*C2*), 120.9 (*C17*), 112.7 (*C19*), 106.1 (*C15*), 89.7 (*C5*), 71.0 (*C21* – *C29*), 71.0 (*C21* – *C29*), 70.7 (*C21* – *C29*), 70.6 (*C21* – *C29*), 69.8 (*C21* – *C29*), 68.8 (*C21* – *C29*), 68.4 (*C21* – *C29*), 67.9 (*C21* – *C29*), 61.6 (*C21* – *C29*), 61.4 (*C14*), 60.8 (-CH₂CH₃), 60.6 (*C13*), 53.2 (*C12*), 48.2 (*C11*), 26.1 (-C(CH₃)), 18.4 (-C(CH₃)), 14.5 (-C¹CH₃), 14.3 (-CH₂CH₃), -5.1 (-Si(CH₃)₂).

LCMS (ESI): t_R = 17.9 min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 403.7 [M+2H⁺] (41.2), 806.5 [M+H⁺] (100.0). (Produkt nicht sauber) HRMS (ESI): m/z ber. für C₄₃H₆₃N₅O₈SiNa⁺ [M+Na⁺] 828.4338; gef. m/z 828.4323. IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 2928 (w), 2856 (w),

1752 (m), 1597 (w), 1557 (s), 1523 (w), 1500 (w), 1443 (w), 1406 (w), 1386 (w), 1370 (w), 1347 (w), 1324 (w), 1276 (w), 1243 (w), 1220 (w), 1206 (m), 1100 (s), 1060 (w), 1005 (w), 950 (w), 910 (m), 832 (m), 812 (w), 774 (w), 759 (w), 749 (w), 728 (s), 693 (w), 664 (w), 646 (w), 618 (w).

14-(2-(7-(4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-yl)-2-methyl-5-phenylpyrazolo[1,5-*a*]-pyrimidin-3-yl)-3,6,9,12-tetraoxatetradecansäure-Hydrochlorid (278, JES-214)

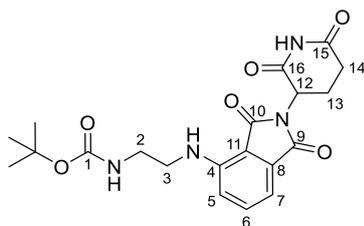


14-(2-(7-(4-(2-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)piperazin-1-yl)-2-methyl-5-phenylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)phenoxy)-3,6,9,12-tetraoxatetradecansäureethylester (**277**) (384 mg, 476 μmol) wurde in einer Mischung aus 3 mL EtOH und 1.5 mL 2 M NaOH gelöst und 4 h bei RT gerührt. Anschließend wurde mit 1 M HCl-Lösung neutralisiert und das EtOH unter vermindertem Druck entfernt. Die restliche Lösung wurde lyophilisiert und dann durch RP-Säulenchromatographie gereinigt (TFA-Zusatz). Die sauberen Fraktionen wurden vereinigt und durch Lyophilisieren vom Lösungsmittel befreit, bevor dieser Vorgang mehrmals unter Zugabe von 0.1 M HCl-Lösung wiederholt wurde, um das Produkt umzusalzen. Das Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung verwendet.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11.43 (1H, bs, $-\text{CO}_2\text{H}$), 8.11 – 8.12 (2H, m, *H8*), 7.46 – 7.49 (3H, m, *H9* + *H10*), 7.40 (1H, dd, $J = 7.51, 1.79$ Hz, *H16*), 7.32 – 7.36 (1H, m, *H18*), 7.12 – 7.15 (1H, m, *H19*), 7.05 (1H, td, $J = 7.42, 0.91$ Hz, *H17*), 6.95 (1H, s, *H5*), 4.77 (2H, m, *H11*), 4.10 – 4.11 (2H, m, *H21*), 3.99 (2H, s, *H29*), 3.87 – 3.90 (2H, m, *H14*),

3.72 – 3.75 (4H, m *H11* + *H12*), 3.61 – 3.62 (2H, m, *H22* – *H28*), 3.51 – 3.53 (2H, m, *H22* – *H28*), 3.43 – 3.48 (2H, m, *H22* – *H28*), 3.38 – 3.43 (10H, m, *H12* + *H22* – *H28*), 3.36 – 3.38 (2H, m, *H13*), 2.35 (3H, s, -CH₃). *Produkt im ¹H-NMR-Spektrum verunreinigt*
¹³C NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 171.6 (C30), 156.2 (C20), 155.4 (C4), 152.5 (C1), 148.6 (C3), 137.5 (C7), 132.5 (C16), 130.0 (C10), 128.6 (C9), 128.4 (C18), 127.2 (C8), 121.0 (C2), 120.4 (C17), 112.3 (C19) 105.4 (C15), 89.9 (C5), 70.6, 69.8, 69.7, 69.7, 68.9, 67.6 (C29), 67.3 (C21), 59.5, 58.0 (C13), 55.2 (C14), 50.9 (C12), 44.6 (C11), 14.0 (-CH₃).
LCMS (ESI): *t*_R = 6.8 min (Methode IV); *m/z* (% relative Intensität): 662.4 [M-H⁺] (100.0). **HRMS** (ESI): *m/z* ber. für C₃₅H₄₆N₅O₈⁺ [M+H⁺] 664.3341; gef. *m/z* 664.3352.
IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3336 (w), 3119 (w), 3035 (w), 2923 (w), 1720 (s), 1655 (s), 1588 (m), 1577 (m), 1553 (w), 1440 (w), 1398 (s), 1351 (w), 1312 (w), 1277 (w), 1238 (s), 1200 (w), 1114 (w), 1096 (w), 1057 (m), 1008 (w), 948 (w), 931 (w), 765 (s).

***tert*-Butyl-(2-((2-(2,6-dioxopiperidin-3-yl)-1,3-dioxoisindolin-4-yl)amino)ethyl)-carbamate (280, JES-217)**



tert-Butyl-*N*-(2-aminoethyl)carbamate (**279**) (174 mg, 1.09 mmol) wurde zu einer Lösung von 2-(2,6-Dioxopiperidin-3-yl)-4-fluoroisindoline-1,3-dione (**245**) (300 mg, 1.09 mmol) und DIPEA (378 μ L, 2.17 mmol) in 4 mL trockenem DMSO gegeben. Das Gemisch wurde bei 90 °C über Nacht gerührt. Anschließend wurden 40 mL Wasser zugegeben und die wässrige Phase viermal mit EtOAc extrahiert. Dann wurden die vereinigten organischen Phasen mit 5%iger LiCl-Lösung gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wurde aus EtOH und etwas EtOAc umkristallisiert. Nach

Waschen des entstandenen Feststoffes mit CH wurde das saubere Produkt als gelber Feststoff erhalten (90.0 mg, 378 μ mol, 20%).

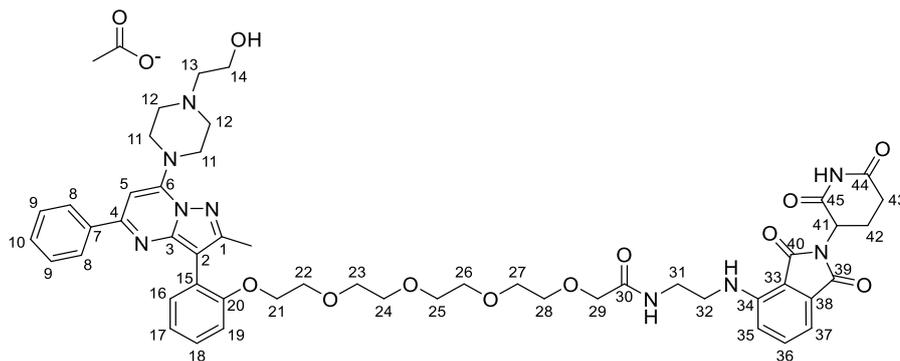
^1H NMR (400 MHz, Aceton- d_6) δ 9.90 (1H, bs, -OCNHCO-), 7.58 (1H, dd, $J = 7.14$, 8.50 Hz, $H6$), 7.17 (1H, d, $J = 8.56$ Hz, $H5$), 7.04 (1H, dd, $J = 7.06$, 0.50 Hz, $H7$), 6.59 (1H, t, $J = 5.78$ Hz, $-\text{C}^3\text{NHC}^4-$), 6.30 (1H, bs, -OCONH-), 5.05 (1H, dd, $J = 12.54$, 5.46 Hz, $H12$), 3.51 (2H, q, $J = 6.26$ Hz, $H3$), 3.35 (2H, q, $J = 6.12$ Hz, $H2$), 2.89 – 3.00 (1H, m, $H14$), 2.70 – 2.81 (2H, m, $H13 + H14$), 2.16 – 2.22 (1H, m, $H13$), 1.40 (9H, s, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

^{13}C NMR (400 MHz, Aceton- d_6) δ 172.8 ($C15$), 170.2 ($C16$), 170.1 ($C10$), 168.3 ($C9$), 157.1 (-OCONH-), 147.9 ($C4$), 136.9 ($C6$), 133.7 ($C8$), 117.7 ($C5$), 111.4 ($C7$), 111.1 ($C11$), 79.0 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 49.9 ($C12$), 43.1 ($C3$), 40.6 ($C2$), 32.0 ($C14$), 28.6 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 23.5 ($C13$). **LCMS** (ESI): $t_{\text{R}} = 8.0$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 361.1 [$\text{M}^{\text{-Bu}} + \text{H}^+$] (100.0), 417.1 [$\text{M} + \text{H}^+$] (27.0), 850.3 [$2\text{M} + \text{Na}^+$] (46.5).

HRMS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_6\text{Na}^+$ [$\text{M} + \text{Na}^+$] 439.1588; gef. m/z 439.1584.

IR (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 3374$ (w), 2974 (w), 2929 (w), 1692 (s), 1623 (w), 1508 (w), 1483 (w), 1457 (w), 1407 (w), 1361 (m), 1324 (w), 1300 (w), 1257 (w), 1197 (w), 1169 (m), 1114 (w), 1022 (w), 990 (w), 815 (w), 747 (m), 608 (w), 468 (w).

4-(3-(2-((17-((2-(2,6-Dioxopiperidin-3-yl)-1,3-dioxoisindolin-4-yl)amino)-14-oxo-3,6,9,12-tetraoxaheptadecyl)oxy)phenyl)-2-methyl-5-phenylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-7-yl)-1-(2-hydroxyethyl)piperazinium-Acetat (**281**, JES-222)

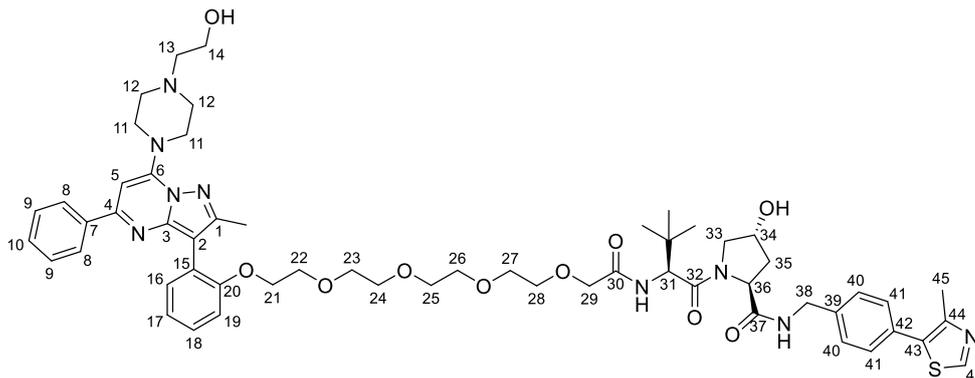


tert-Butyl-(2-((2-(2,6-4-dioxopiperidin-3-yl)-1,3-dioxoisindolin-4-yl)amino)ethyl)carbammat (**280**) wurde in einem Gemisch aus 2 mL TFA und 2 mL CH₂Cl₂ für 2 h gerührt bevor die flüchtigen Bestandteile entfernt wurden. Der Rückstand wurde in 2 mL entgastem DMF aufgenommen und mit 1 mL MeCN verdünnt. Anschließend wurden DIPEA (70 µL, 0.40 mmol), 14-(2-(7-(4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-yl)-2-methyl-5-phenylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-3,6,9,12-tetraoxatetradecansäure-Hydrochlorid (**278**) (39.7 mg, 56.7 µmol) und HATU (33.9 mg, 89.3 µmol) im Argon-Gegenstrom zugegeben und das Gemisch über Nacht bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das Gemisch durch präparative HPLC getrennt und so das saubere Produkt erhalten (21.2 mg, 20.7 µmol, 35%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.08 (1H, bs, -OCNHCO-), 8.08 – 8.11 (2H, m *H*8), 7.90 (1H, t, *J* = 5.68 Hz, -C³⁰ONH-), 7.55 (1H, dd, *J* = 8.40, 7.24 Hz, *H*36), 7.42 – 7.48 (4H, m, *H*9 + *H*10 + *H*16), 7.30 – 7.34 (1H, m, *H*18), 7.11 – 7.17 (2H, m, *H*19 + *H*35), 7.03 – 7.07 (1H, m, *H*17), 7.01 (1H, d, *J* = 6.96 Hz, *H*37), 6.77 (1H, s, *H*5), 6.70 (1H, t, *J* = 5.92 Hz, -C³⁴NH-), 5.04 (1H, dd, *J* = 12.82, 5.42 Hz, *H*41), 4.10 (t, *J* = 4.62 Hz, *H*21), 3.86 (6H, s, *H*11 + *H*29), 3.62 (2H, t, *J* = 5.68 Hz, *H*22 – *H*28), 3.58 (2H, t, *J* = 6.14 Hz,

H14), 3.48 – 3.52 (4H, m, *H22* – *H28*), 3.38 – 3.45 (10H, m, *H32*, *H22* – *H28*), 3.29 – 3.33 (2H, m, *H31*), 2.83 – 2.92 (1H, m, *H43*), 2.68 (4H, bs, *H12*), 2.50 – 2.60 (3H, m, *H13* + *H43* + *H42*), 2.34 (3H, s, $-\text{C}^1\text{CH}_3$), 1.98 – 2.03 (1H, m, *H42*), 1.90 (3H, s, CH_3COO^-). ^{13}C NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 172.7 (C44), 170.0 (C45), 169.8 (C30), 168.7 (C40), 167.3 (C39), 156.2 (C4), 155.2 (C20), 152.0 (C1), 149.7 (C3), 148.1 (C6), 146.3 (C34), 137.8 (C7), 136.1 (C36), 132.5 (C10), 132.2 (C38), 129.7 (C9), 128.5 (C16), 128.1 (C18), 127.0 (C8), 121.3 (C2), 120.3 (C17), 117.1 (C35), 112.2 (C19), 110.5 (C37), 109.3 (C33), 105.0 (C15), 89.2 (C5), 70.2 (C22 – C29), 69.9 (C22 – C29), 69.7 (C22 – C29), 69.7 (C22 – C29), 69.6 (C22 – C29), 69.5 (C22 – C29), 68.9 (C22 – C29), 67.3 (C21), 60.2 (C13), 58.5 (C14), 52.6 (C12), 48.5 (C41), 47.7 (C11), 41.4 (C32), 37.5 (C31), 31.0 (C43), 22.1 (C42), 14.0 ($-\text{C}^1\text{CH}_3$). **LCMS** (ESI): $t_{\text{R}} = 9.6$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 481.7 [$\text{M}+2\text{H}^+$] (34.6), 962.4 [$\text{M}+\text{H}^+$] (100.0). **HRMS** (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{50}\text{H}_{59}\text{N}_9\text{O}_{11}\text{Na}^+$ [$\text{M}+\text{Na}^+$] 984.4226; gef. m/z 984.4230. **IR** (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 3367$ (w), 3058 (w), 2871 (w), 1755 (w), 1696 (s), 1622 (w), 1597 (w), 1556 (m), 1521 (w), 1482 (w), 1440 (w), 1406 (w), 1358 (w), 1323 (w), 1301 (w), 1259 (w), 1241 (w), 1200 (w), 1175 (w), 1111 (w), 1051 (w), 1024 (m), 1003 (w), 948 (w), 817 (w), 748 (m), 695 (w), 664 (w), 606 (w), 467 (w).

(2*S*,2*R*)-1-((*S*)-2(*tert*-Butyl)-17-(2-(7-(4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl)-2-methyl-5-phenylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)phenoxy)-4-oxo-6,9,12,15-tetraoxa-3-azaheptadecanoyl)-4-hydroxy-*N*-(4-(4-methylthiazol-5-yl)benzyl)pyrrolidine-2-carboxamid (**283**, JES-219)



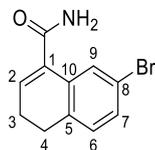
Zu einer Lösung von 14-(2-(7-(4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-yl)-2-methyl-5-phenylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-3,6,9,12-tetraoxatetradecansäure-Hydrochlorid (**278**) (51.2 mg, 73.2 μmol) in 3 mL einer Mischung aus entgastem DMF und MeCN (2:1) wurden im Argon-Gegenstrom DIPEA (90 μL , 0.51 mmol), HATU (43.7 mg, 115 μmol) und AHPC \cdot HCl (**282**) (36.0 mg, 77.1 μmol) gegeben. Nach Rühren über Nacht wurde erneut HATU (29.3 mg, 77.1 μmol) zugegeben. Nach einer weiteren Nacht wurde das Lösungsmittel entfernt und das Gemisch durch präparative HPLC getrennt, wodurch das saubere Produkt erhalten wurde (22.4 mg, 20.8 μmol , 27%).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.94 (1H, s, H_{46}), 8.57 (1H, t, $J = 5.90$ Hz, -CONH-), 8.09 – 8.11 (2H, m, H_8), 7.36 – 7.48 (9H, m, $H_9 + H_{10} + H_{16} + \text{-C}^{30}\text{ONH-} + H_{40} + H_{41}$), 7.30 – 7.40 (1H, m, H_{18}), 7.12 (1H, d, $J = 8.24$ Hz, H_{19}), 7.05 (1H, t, $J = 7.40$ Hz, H_{17}), 6.77 (1H, s, H_5), 5.16 (1H, bs, -OH), 4.57 (1H, d, $J = 9.56$ Hz, H_{31}), 4.22 – 4.48 (4H, m, $H_{34} + H_{36} + H_{38}$), 4.24 (1H, dd, $J = 15.83, 5.58$ Hz, H_{38}), 4.08 – 4.10 (2H, m, H_{21}), 3.94 (2H, s, H_{29}), 3.86 (4H, bs, H_{11}), 3.42 – 3.69 (18H, m, $H_{14}, H_{22} - H_{28} + H_{33}$), 2.71 (4H, bs, H_{12}), 2.54 (2H, t, $J = 5.88$ Hz, H_{13}), 2.43 (3H, s, H_{45}), 2.34 ($\text{-C}^1\text{CH}_3$), 2.04 – 2.09 (1H, m, H_{35}), 1.88 – 1.95 (1H, m, H_{35}). $^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ

171.7 (C37), 169.1 (C32), 168.5 (C30), 156.2 (C4), 155.1 (C20), 152.0 (C1), 151.3 (C46), 149.6 (C3), 148.1 (C6), 147.7 (C44), 139.4 (C39), 137.8 (C7), 132.5 (C10), 131.1 (C43), 129.7 (C9), 128.6 (C41), 128.5 (C16), 128.1 (C18), 128.1 (C42), 127.4 (C40), 127.0 (C8), 121.3 (C2), 120.3 (C17), 112.2 (C19), 105.0 (C15), 89.2 (C5), 70.4 (C21 – C28), 69.7 (C21 – C28), 69.7 (C21 – C28), 69.7 (C21 – C28), 69.6 (C21 – C28), 69.5 (C21 – C28), 68.9 (C21 – C28), 68.8 (C34), 67.2 (C21 – C28), 60.1 (C13), 58.7 (C36), 58.5 (C14), 56.5 (C33), 55.7 (C31), 52.6 (C12), 47.6 (C11), 41.7 (C38), 37.9 (C35), 35.6 (-C(CH₃)₃), 26.1 (-C(CH₃)₃), 15.8 (C45), 13.9 (-C¹CH₃). **LCMS** (ESI): t_R = 10.1 min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 538.7 [M+2H⁺] (32.3), 1076.5 [M+H⁺] (100.0). **HRMS** (ESI): m/z ber. für C₅₇H₇₃N₉O₁₀SNa⁺ [M+Na⁺] 1098.5093; gef. m/z 1098.5094. **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3392 (w), 3064 (w), 2920 (m), 2872 (w), 1671 (w), 1635 (m), 1597 (w), 1556 (s), 1522 (w), 1501 (w), 1481 (w), 1438 (m), 1370 (w), 1323 (w), 1277 (w), 1237 (m), 1109 (m), 1050 (w), 1024 (w), 1003 (s), 949 (w), 849 (w), 820 (w), 759 (m), 695 (m), 662 (w), 639 (w), 617 (w), 572 (w), 551 (w).

7.2.11 Studien zur Synthese der Knime-Verbindung 307

7-Bromo-3,4-dihydronaphthalen-1-carboxamid (312, JES-252)



Ein Gemisch aus 7-Bromo-1-tetralon (5.47 g, 24.3 mmol), Zinkiodid (50.0 mg, 157 μ mol) und Trimethylsilylcyanid (6.08 mL, 48.6 mmol) in 50 mL Toluol wurde bei 60 °C über Nacht gerührt. Anschließend wurden nach Kühlen auf RT 5.6 mL konz. H₂SO₄ zugegeben und 30 Minuten bei RT gerührt. Dann folgte die Zugabe von 34 mL AcOH, 25 mL konz. H₂SO₄ und 4 mL Wasser. Dieses Gemisch wurde nun weitere 3 h refluxiert. Nach Abschluss

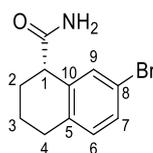
der Reaktion wurde das Reaktionsgemisch in 250 mL Eiswasser gegeben. Der ausfallende Feststoff wurde abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Nach Umkristallisation aus etwa 125 mL MeCN wurde das Produkt als graues Pulver erhalten (2.57 g, 10.2 mmol, 42%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.68 (1H, bs, -CONH₂), 7.64 (1H, d, $J = 2.08$ Hz, *H*9), 7.35 (1H, dd, $J = 8.00, 2.12$ Hz, *H*7), 7.21 (1H, bs, -CONH₂), 7.14 (1H, d, $J = 8.04$ Hz, *H*6), 6.57 (1H, t, $J = 4.66$ Hz, *H*2), 2.67 (2H, t, $J = 8.08$ Hz, *H*4), 2.28 – 2.33 (2H, m, *H*3).

¹³C NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 169.3 (-CONH₂), 134.9 (*C*1), 133.7 (*C*5), 133.6 (*C*10), 132.4 (*C*2), 129.6 (*C*7), 129.5 (*C*6), 127.7 (*C*9), 119.0 (*C*8), 26.1 (*C*4), 22.2 (*C*3).

LCMS (ESI): $t_R = 7.2$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität) 252.0 [M+H⁺] (100.0), 505.0 [2M+H⁺] (22.1). **HRMS** (ESI): m/z ber. für C₁₁H₁₁BrNO⁺ [M+H⁺] 252.0019; gef. m/z 252.0023. **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu} = 3327$ (w), 3148 (m), 2948 (w), 2885 (w), 2833 (w), 2784 (w), 1654 (w), 1632 (m), 1591 (s), 1556 (w), 1477 (w), 1422 (s), 1353 (w), 1318 (m), 1286 (w), 1265 (w), 1215 (m), 1181 (w), 1122 (m), 1083 (w), 1014 (w), 871 (w), 853 (m), 809 (s), 759 (w), 735 (w), 674 (s), 639 (w), 614 (w), 533 (m), 459 (w), 439 (m).

(*S*)-7-Bromo-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-carboxamid (**311**, JES-253)

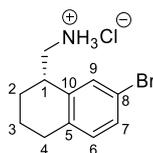


Eine mit Helium entgaste Lösung von 7-Bromo-3,4-dihydronaphthalen-1-carboxamid (**312**) (2.00 g, 7.93 mmol) in 60 mL eines Gemisches aus MeOH und THF (1:1) wurde mit (*R*)-Ru(OAc)₂(BINAP) (33.4 mg, 39.7 μ mol) versetzt und anschließend in einem Autoklaven unter 5 bar Wasserstoffüberdruck über Nacht bei 50 °C gerührt. Nach vollständigem Umsatz des Edukts wurde das Gemisch konzentriert und anschließend in MeCN umkristallisiert, wodurch das Produkt als grauer Feststoff gewonnen wurde (1.58 g, 6.21 mmol, 78%).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.52 (1H, bs, -CONH $_2$), 7.29 (1H, dd, $J = 8.10, 2.18$ Hz, H7), 7.25 (1H, d, $J = 2.12$ Hz, H9), 7.04 (1H, d, $J = 8.16$ Hz, H6), 7.00 (1H, bs, -CONH $_2$), 3.61 (1H, t, $J = 6.62$ Hz, H1), 2.59 – 2.72 (2H, m, H4), 1.84 – 1.99 (3H, m, H2 + H3), 1.54 – 1.64 (1H, m, H2). $^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 175.6 (-CONH $_2$), 138.0 (C10), 136.6 (C5), 131.1 (C6), 130.8 (C9), 128.8 (C7), 118.1 (C8), 44.7 (C1), 28.2 (C4), 26.4 (C2), 20.2 (C3). **LCMS** (ESI): $t_R = 7.4$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität) 256.0 [M+H $^+$] (100.0), 508.9 [2M+H $^+$] (14.4). **HRMS** (ESI): m/z ber. für C $_{11}$ H $_{12}$ BrNONa $^+$ [M+Na $^+$] 275.9994; gef. m/z 275.9998. Chirale HPLC >98% ee, eluiert bei 6.1 min. Säule: Chiralcel IA, Mobile Phase: Heptan:EtOH = 80:20; 1.0 mL/min; λ : 220 nm. **IR** (cm $^{-1}$): $\tilde{\nu} = 3366$ (m), 3174 (w), 2939 (m), 2865 (w), 2840 (w), 1645 (w), 1626 (s), 1588 (w), 1564 (w), 1476 (m), 1459 (w), 1449 (w), 1432 (w), 1393 (m), 1344 (w), 1334 (w), 1310 (w), 1272 (w), 1257 (m), 1194 (w), 1173 (w), 1130 (w), 1100 (m), 1075 (w), 1053 (w), 1000 (m), 869 (m), 810 (s), 723 (m), 702 (w), 662 (w), 631 (w), 615 (s), 530 (m), 498 (w), 438 (m), 425 (w), 419 (w).

(*S*)-(7-Bromo-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-yl)methanamin-Hydrochlorid

(**314**, JES-254)



Zu einer Lösung von (*S*)-7-Bromo-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-carboxamid (**311**) (6.20 g, 24.4 mmol) in 106 mL trockenem THF wurde bei RT $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ (1 M in THF, 97.0 mL, 97.0 mmol) getropft, woraufhin die Lösung über Nacht refluxiert wurde. Nach vollständigem Umsatz wurden 71 mL konz. H_2SO_4 zu der abgekühlten Lösung gegeben und das Gemisch für 3 h gerührt. Die Lösung wurde mit 25%iger wässriger Ammoniaklösung basifiziert. Nach dreimaliger Extraktion mit EtOAc wurden die vereinigten organischen

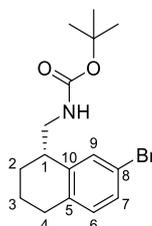
Phasen über Na_2SO_4 getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Das entstandene orangene Öl wurde in Et_2O gelöst und mit HCl in EtOAc (33 mL, 26.7 g/L) versetzt, wobei ein weißer Feststoff ausfiel, der als das Produkt identifiziert werden konnte (5.95 g, 21.5 mmol, 88%).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.24 (3H, bs, $-\text{NH}_3^+$) 7.50 (1H, d, $J = 1.92$ Hz, $H9$), 7.30 (1H, dd, $J = 8.18, 2.06$ Hz, $H7$), 7.05 (1H, d, $J = 8.20$ Hz, $H6$), 3.15 – 3.18 (1H, m, $H1$), 3.07 (1H, dd, $J = 12.74, 3.94$ Hz, $-\text{CH}_2\text{N-}$), 2.90 (1H, dd, $J = 12.72, 10.24$ Hz, $-\text{CH}_2\text{N-}$), 2.57 – 2.72 (2H, m, $H4$), 1.60 – 1.90 (4H, m, $H2 + H3$).

$^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 137.0 ($C10$), 136.6 ($C5$), 131.2 ($C6$), 131.2 ($C9$), 129.2 ($C7$), 118.5 ($C8$), 43.6 ($-\text{CH}_2\text{N-}$), 35.2 ($C1$), 28.2 ($C4$), 24.1 ($C2$), 18.2 ($C3$).

LCMS (ESI): $t_R = 7.6$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität) 223.1 [M-NH_2] (34.4), 240.1 [M+H^+] (100.0). **HRMS** (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{BrN}^+$ [M+H^+] 240.0382; gef. m/z 240.0381. **IR** (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 3010$ (w), 2939 (s), 2628 (w), 1591 (m), 1515 (m), 1482 (s), 1451 (w), 1431 (w), 1402 (w), 1378 (w), 1296 (w), 1269 (w), 1197 (w), 1178 (w), 1165 (w), 1137 (w), 1124 (w), 1110 (w), 1084 (m), 1069 (w), 1037 (w), 1008 (w), 998 (m), 950 (m), 922 (w), 891 (w), 873 (w), 845 (s), 810 (w), 799 (m), 746 (w), 649 (w), 622 (w), 497 (w), 448 (s).

***tert*-Butyl-((*S*)-((7-bromo-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-yl)methyl)carbamate (315, JES-256)**



(*S*)-((7-Bromo-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-yl)methanamin-Hydrochlorid (**314**)

(400 mg, 1.45 mmol) wurde in 7.8 mL trockenem THF suspendiert und anschließend unter

Eiskühlung mit NEt_3 (806 μL , 5.78 mmol) versetzt. Nachdem eine Lösung von Boc_2O (347 mg, 1.59 mmol) in 1.6 mL trockenem THF zugetropft worden war, wurde das Gemisch über Nacht bei RT gerührt. Das Gemisch wurde weitestgehend von flüchtigen Bestandteilen befreit und anschließend in Et_2O und Wasser aufgenommen. Nach dreimaliger Extraktion der wässrigen Phase mit Et_2O wurden die organischen Phasen vereint und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das Produkt als klares Öl erhalten, welches anschließend spontan kristallisierte (480 mg, 1.41 mmol, 98%).

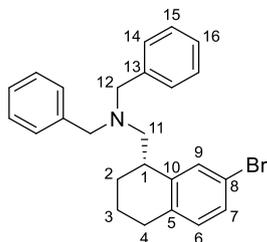
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.34 (1H, bs, *H9*), 7.22 (1H, dd, $J = 8.20, 2.04$ Hz, *H7*), 6.94 (1H, d, $J = 8.20$ Hz, *H6*), 4.63 (1H, bs, - OCONH -), 3.41 (1H, dd, $J = 13.66, 3.06$ Hz, - CH_2N -), 3.24 (1H, dd, $J = 13.72, 8.56$ Hz, - CH_2N -), 2.91 – 2.97 (1H, m, *H1*), 2.62 – 2.75 (2H, m, *H4*), 1.68 – 1.85 (4H, m, *H2 + H3*), 1.46 (9H, s, - $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

$^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 156.2 (- OCONH -), 139.9 (*C10*), 136.8 (*C5*), 131.7 (*C9*), 131.0 (*C6*), 129.3 (*C7*), 119.4 (*C8*), 79.5 (- $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 45.8 (- CH_2NH -), 38.1 (*C1*), 29.3 (*C4*), 28.6 (- $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 25.6 (*C2*), 19.5 (*C3*). **LCMS** (ESI): $t_{\text{R}} = 13.2$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität) 284.0 [$\text{M}^-\text{Bu}+\text{H}^+$] (100), 681.2 [$2\text{M}+\text{H}^+$] (60.9).

HRMS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{BrNO}_2\text{Na}^+$ [$\text{M}+\text{Na}^+$] 362.0726; gef. m/z 362.0723.

IR (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 3327$ (w), 2981 (w), 2933 (m), 2864 (w), 1677 (s), 1589 (w), 1519 (s), 1481 (w), 1450 (w), 1434 (w), 1402 (w), 1389 (w), 1364 (m), 1327 (w), 1299 (w), 1274 (s), 1253 (w), 1243 (w), 1189 (w), 1163 (s), 1140 (w), 1093 (w), 1076 (w), 1037 (w), 999 (m), 968 (w), 950 (w), 936 (m), 899 (w), 875 (m), 848 (w), 824 (w), 804 (m), 787 (w), 768 (w), 715 (w), 641 (w), 624 (m), 495 (w), 443 (m).

(*S*)-*N,N*-Dibenzyl-1-(7-bromo-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-yl)methanamin
(**318**, JES-263)

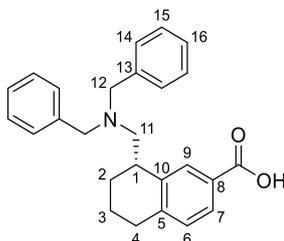


Zu einer Lösung von (*S*)-(7-Bromo-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-yl)methanamin-Hydrochlorid (**314**) (200 mg, 723 μmol) und NEt_3 (220 μL , 1.59 mmol) in 3 mL 1,2-Dichlorethan wurde Benzaldehyd (161 mg, 1.52 mmol) und AcOH (90 μL , 1.6 mmol) gegeben. Das resultierende Gemisch wurde bei RT 10 min gerührt bevor $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (659 mg, 3.11 mmol) zugegeben wurde. Nach 16 h wurde die Reaktionslösung mit ges. Na_2CO_3 -Lösung neutralisiert und die entstandenen Phasen separiert. Die wässrige Phase wurde zwei weitere Male mit CH_2Cl_2 extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden anschließend mit ges. NaCl -Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Entfernen von Trocken- und Lösungsmittel wurde das erhaltene Gemisch säulenchromatographisch getrennt, wodurch das Produkt sauber erhalten wurde (241 mg, 573 μmol , 79%).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.40 – 7.42 (4H, m, *H14*), 7.32 – 7.36 (5H, m, *H6* + *H15*), 7.24 – 7.28 (2H, m, *H16*), 7.20 (1H, dd, $J = 2.08, 8.16$ Hz, *H7*), 6.89 (1H, d, $J = 8.16$ Hz, *H9*), 3.89 (2H, d, $J = 13.5$ Hz, *H12*), 3.42 (2H, d, $J = 13.5$ Hz, *H12*), 2.96 – 3.02 (1H, m, *H1*), 2.46 – 2.63 (4H, m, *H4* + *H11*), 2.03 – 2.10 (1H, m, *H2*), 1.70 – 1.78 (1H, m, *H2*), 1.50 – 1.58 (1H, m, *H3*), 1.27 – 1.38 (1H, m, *H3*).
 $^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 141.7 (*C10*), 139.7 (*C13*), 136.6 (*C5*), 132.1 (*C6*), 130.8 (*C9*), 129.1 (*C14*), 128.7 (*C7*), 128.3 (*C15*), 127.0 (*C16*), 118.9 (*C8*), 59.9 (*C11*), 59.1 (*C12*), 35.8 (*C1*), 29.2 (*C4*), 25.2 (*C2*), 18.6 (*C3*). **LCMS** (ESI): $t_{\text{R}} = 19.1$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 420.1 [$\text{M}+\text{H}^+$] (100.0), 422.1 [$\text{M}+\text{H}^+$] (100).

HRMS (ESI): m/z ber. für $C_{25}H_{27}BrN^+$ $[M+H^+]$ 420.1321; gef. m/z 420.1333. **IR** (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 3062$ (w), 3027 (w), 2930 (w), 2797 (w), 1589 (w), 1494 (w), 1481 (w), 1450 (w), 1401 (w), 1369 (w), 1242 (w), 1191 (w), 1170 (w), 1121 (w), 1075 (w), 1027 (w), 984 (w), 961 (w), 906 (s), 857 (w), 821 (w), 802 (w), 727 (s), 697 (m), 647 (w), 498 (w), 448 (w).

(S)-8-((Dibenzylamino)methyl)-5,6,7,8-tetrahydronaphthalen-2-carbonsäure
(**319**, JES-265)



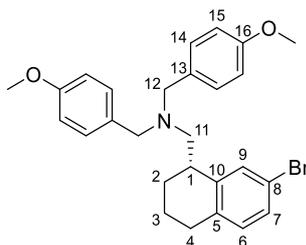
(S)-*N,N*-Dibenzyl-1-(7-bromo-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-yl)methanamin (**318**)

(210 mg, 500 μ mol) wurde in 3 mL THF gelöst und auf -78 °C herabgekühlt. Anschließend wurde *n*-BuLi (2.5 M in *n*-Hexan, 280 μ L, 699 μ mol) zugetropft und 30 min bei dieser Temperatur gerührt. Daraufhin wurde die Lösung auf 0 °C erwärmt und weitere 30 min gerührt, bevor die Lösung wieder auf -78 °C herabgekühlt wurde und CO_2 durch die Lösung geleitet wurde. Nach 1 h wurde die Gaseinleitung unterbrochen und mit 1 M HCl-Lösung leicht sauer gestellt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und von Lösungsmittel befreit. Das Produkt wurde mittels präparativer HPLC von Verunreinigungen befreit und so als klares Öl erhalten (20.6 mg, 53.4 μ mol, 11%).

1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.99 (1H, s, *H9*), 7.82 (1H, dd, $J = 7.94, 1.74$ Hz, *H7*), 7.40 – 7.42 (4H, m, *H14*), 7.30 – 7.34 (4H, m, *H15*), 7.22 – 7.24 (2H, m, *H16*) 7.10 (1H, d, $J = 8.00$ Hz, *H6*), 3.91 (2H, d, $J = 13.44$ Hz, *H12*), 3.41 (2H, d, $J = 13.44$ Hz, *H12*), 3.06 – 3.10 (1H, m, *H1*), 2.50 – 2.70 (4H, m, *H4* + *H11*), 2.10 – 2.15 (1H, m, *H2*), 1.74 – 1.79 (1H, m, *H2*), 1.53 – 1.58 (1H, m, *H3*), 1.30 – 1.35 (1H, m, *H3*).

^{13}C NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 172.3 (-COOH), 144.5 (*C5*), 139.7 (*C13*), 131.5 (*C9*), 129.4 (*C6*), 129.1 (*C14*), 128.3 (*C15*), 127.4 (*C7*), 127.0 (*C16*), 126.6 (*C8*), 59.9 (*C11*), 59.1 (*C12*), 35.7 (*C1*), 30.0 (*C4*), 25.2 (*C2*), 18.4 (*C3*). LCMS (ESI): $t_{\text{R}} = 6.8$ min (Methode IV); m/z (% relative Intensität): 384.1 [$\text{M}-\text{H}^+$] (100.0), 430.1 (40.8), 769.3 [$2\text{M}-\text{H}^+$] (48.7). HRMS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{NO}_2^+$ [$\text{M}+\text{H}^+$] 386.2115; gef. m/z 386.2122. IR (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 3061$ (w), 3027 (w), 2928 (m), 2832 (w), 2798 (w), 1686 (s), 1609 (w), 1573 (w), 1494 (w), 1450 (m), 1423 (w), 1375 (w), 1274 (m), 1231 (w), 1190 (w), 1124 (w), 1064 (w), 1028 (w), 985 (w).

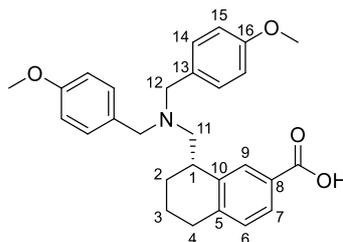
(*S*)-1-(7-Bromo-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-yl)-*N,N*-bis(4-methoxybenzyl)methanamin (**321**, JES-266)



Zu einer Suspension von (*S*)-(7-Bromo-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-yl)methanamin-Hydrochlorid (**314**) (1.50 g, 5.42 mmol) in 17 mL DCE wurde NEt_3 (1.66 mL, 11.9 mmol) gegeben. Anschließend wurden AcOH (675 μL , 11.8 mmol) und *p*-Anisaldehyd (1.38 mL, 11.4 mmol) zugegeben und das Gemisch für 10 min bei RT gerührt. Anschließend wurde Natriumtriacetoxyborhydrid (4.94 g, 23.3 mmol) hinzugegeben. Das entstandene Gemisch wurde für 4.5 h bei RT gerührt, bevor mit ges. Na_2CO_3 -Lösung basisch gestellt und die wässrige Phase nach Phasentrennung dreimal mit CH_2Cl_2 extrahiert wurde. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen und anschließend über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Abfiltrieren des Trockenmittels und Entfernen des Lösungsmittels, wurde das Produkt säulenchromatographisch von Verunreinigungen befreit. Das Produkt wurde als klares Öl erhalten (2.02 g, 4.21 mmol, 78%).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.35 (1H, d, $J = 1.96$ Hz, *H6*), 7.28 – 7.31 (4H, m, *H14*), 7.19 (1H, dd, $J = 2.10, 8.14$ Hz, *H7*), 6.87 – 6.90 (5H, m, *H9 + H15*), 3.83 (6H, s, -OCH₃), 3.79 (2H, d, $J = 13.32$ Hz, *H12*), 3.35 (2H, d, $J = 13.32$ Hz, *H12*), 2.93 – 2.99 (1H, m, *H1*), 2.54 – 2.60 (3H, m, *H4 + H11*), 2.44 (1H, dd, $J = 5.08, 12.88$ Hz, *H11*), 1.99 – 2.05 (1H, m, *H2*), 1.68 – 1.76 (1H, m, *H2*), 1.50 – 1.57 (1H, m, *H3*), 1.29 – 1.40 (1H, m, *H3*). $^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 158.7 (*C16*), 141.9 (*C10*), 136.6 (*C5*), 132.1 (*C6*), 131.8 (*C13*), 130.7 (*C9*), 130.2 (*C14*), 128.7 (*C7*), 118.9 (*C8*), 113.7 (*C15*), 59.7 (*C11*), 58.3 (*C12*), 55.4 (-OCH₃), 35.7 (*C1*), 29.2 (*C4*), 25.3 (*C2*), 18.6 (*C3*). **LCMS** (ESI): $t_{\text{R}} = 17.5$ min (Methode I); m/z (% relative Intensität): 482.1 [M+H⁺] (100.0), 480.1 [M+H⁺] (99.8). **HRMS** (ESI): m/z ber. für C₂₇H₃₁BrNO₂⁺ [M+H⁺] 480.1516; gef. m/z 480.1517. **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu} = 2998$ (w), 2932 (m), 2833 (w), 1611 (m), 1586 (w), 1510 (s), 1481 (w), 1463 (w), 1453 (w), 1402 (w), 1368 (w), 1300 (w), 1247 (s), 1171 (m), 1126 (w), 1103 (w), 1075 (w), 1036 (m), 984 (w), 962 (w), 822 (m), 762 (w), 520 (w).

(*S*)-8-((Bis(4-methoxybenzyl)amino)methyl)-5,6,7,8-tetrahydronaphthalen-2-carbonsäure (322, JES-268)



(*S*)-1-(7-Bromo-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-yl)-*N,N*-bis(4-methoxybenzyl)-methanamin (**321**) (1.97 g, 4.09 mmol) wurde in 24 mL THF gelöst und auf -78 °C herabgekühlt. Anschließend wurde *n*-BuLi (2.5 M in *n*-Hexan, 2.29 mL, 5.73 mmol) zugetropft und das entstandene Gemisch 1.5 h bei -78 °C gerührt. Daraufhin wurde CO₂ durch die Lösung geleitet. Nach 2 h wurde die Gaseinleitung unterbrochen und mit 1 M HCl-Lösung leicht sauer gestellt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten

organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und von Lösungsmittel befreit. Das Produkt wurde über Umkehrphasenchromatographie von Verunreinigungen befreit und anschließend lyophilisiert (1.57 g, 3.52 mmol, 86% (nass)).

^1H NMR (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) δ 7.87 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, H_9), 7.67 (1H, dd, $J = 7.9, 1.7$ Hz, H_6), 7.27 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, H_{14}), 7.03 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H_7), 6.85 (4H, d, $J = 8.6$ Hz, H_{15}), 3.63 – 3.83 (8H, m, $-\text{OCH}_3 + H_{12}$), 3.35 (2H, d, $J = 13.32$ Hz, H_{12}), 2.93 – 2.99 (1H, m, H_1), 2.54 – 2.60 (3H, m, $H_4 + H_{11}$), 3.41 (2H, d, $J = 13.1$ Hz, H_{12}), 2.98 (1H, td, $J = 9.2, 4.9$ Hz, H_1), 2.50 – 2.73 (3H, m, $H_4 + H_{11}$), 2.46 (2H, dd, $J = 13.0, 5.2$ Hz, H_{11}), 1.97 – 2.00 (1H, m, H_2), 1.64 – 1.76 (1H, m, H_2), 1.45 – 1.50 (1H, m, H_3), 1.21 – 1.29 (1H, m, H_3). **^{13}C NMR** (400 MHz, Chloroform- d) δ 170.9 ($-\text{COOH}$), 160.4 (C_{16}), 143.9 (C_5), 140.2 (C_{10}), 132.1 (C_{14}), 130.1 (C_6), 128.0 (C_7), 114.7 (C_{15}), 60.4 (C_{11}), 59.4 (C_{12}), 55.7 ($-\text{OCH}_3$), 36.6 (C_1), 30.5 (C_4), 26.4 (C_2), 19.4 (C_3). **LCMS** (ESI): $t_R = 6.87$ min (Methode IV); m/z (% relative Intensität): 444.1 [$\text{M}-\text{H}^+$] (100.0), 490.15 [$\text{M}+\text{HCOO}^-$] (53.41), 889.45 [$2\text{M}-\text{H}^+$] (91.7).

8 Anhang

K-RAS^{WT}-Sequenzen:

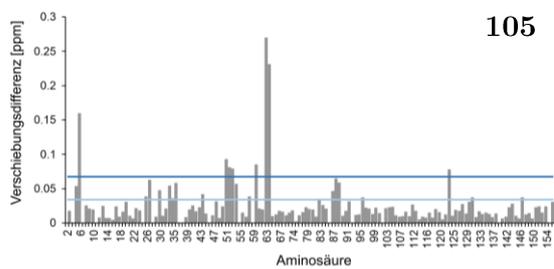
LDC MAHHHHHHSSGLEVLVFGPTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQNHVFDEYDPTIEDSYRK
 RUB --MGHHHHHHAENLYFGHMTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQNHVFDEYDPTIEDSYRK

LDC: QVVIDGETCLLDILDITAGQEEYSAMRDQYMRTGEGFLCVFAINNTKSFEDIHHYREQIKR
 RUB: QVVIDGETCLLDILDITAGQEEYSAMRDQYMRTGEGFLCVFAINNTKSFEDIHHYREQIKR

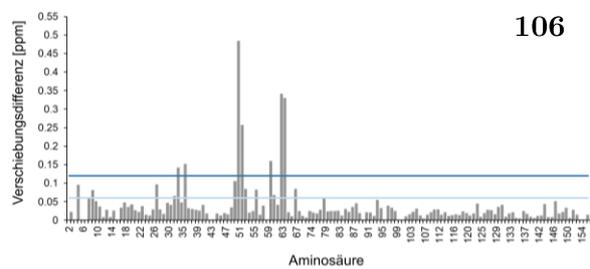
LDC: VKDSEDVPMVLVGNKCDLPSRTVDTKQAQDLARSYGIPFIETSAKTRQGVDDAFYTLVRE
 RUB: VKDSEDVPMVLVGNKCDLPSRTVDTKQAQDLARSYGIPFIETSAKTRQGVDDAFYTLVRE

LDC: IRKHKEK-----
 RUB: IRKHKEKMSKDGKKKKKKSKTKCVIM

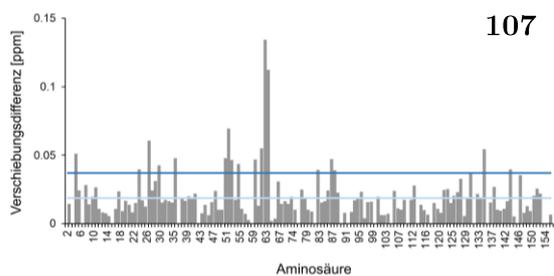
Von den Projektmitarbeitern aus Bochum in den HSQC-Spektren ermittelte verschobene AS in Balkendiagrammen und die Auflistung der AS mit $\geq 1\sigma$ und $\geq 2\sigma$ ($\geq 2\sigma$ als Restraints in eigenen Haddock-Rechnungen verwendet):



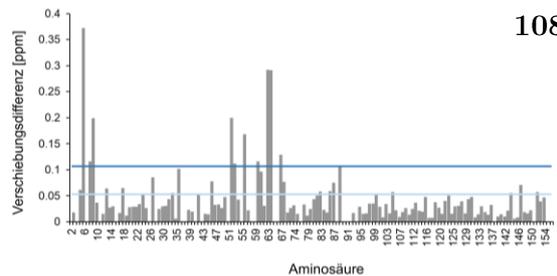
105



106



107



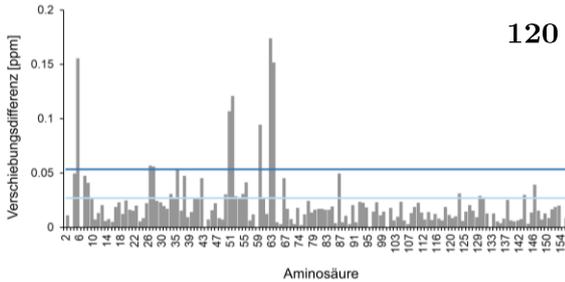
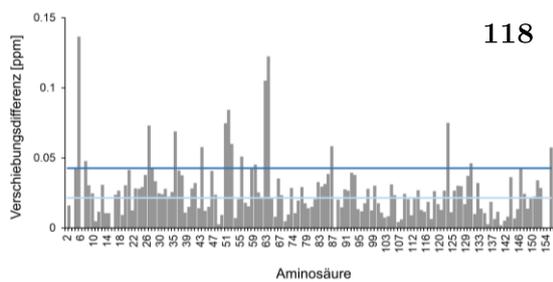
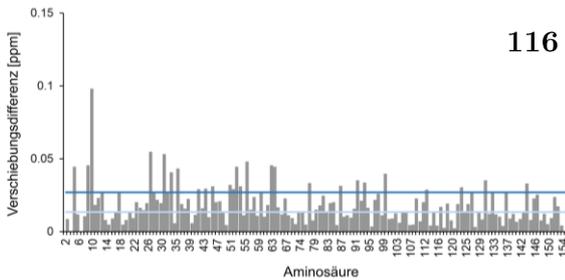
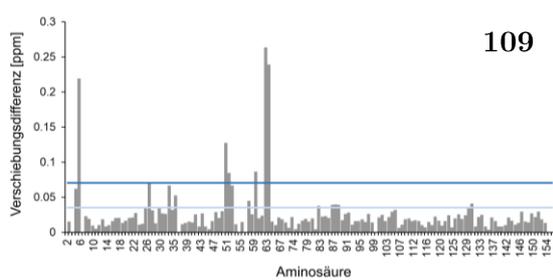
108

105: 1σ : 5, 6, 28, 29, 33, 37, 38, 39, 48, 55, 56, 57, 58, 62, 67, 74, 75, 91, 95, 96, 97, 134, 142, 157 2σ : 6, 55, 56, 57, 67, 74, 75, 134.

106: 1σ : 5, 8, 9, 29, 36, 37, 39, 54, 55, 56, 57, 60, 67, 72, 74, 75, 79, 87 2σ : 37, 39, 55, 56, 67, 74, 75.

107: 1σ : 5, 6, 8, 10, 11, 18, 26, 29, 31, 32, 33, 39, 42, 44, 45, 52, 55, 56, 57, 59, 67, 73, 74, 75, 79, 83, 86, 87, 91, 94, 95, 96, 97, 103, 104, 112, 117, 124, 133, 134, 136, 137, 138, 141, 142, 144, 145, 146, 149, 154, 157, 161, 162, 163 2σ : 5, 26, 29, 33, 39, 55, 56, 57, 67, 73, 74, 75, 91, 95, 96, 142, 146, 154.

108: 1σ : 5, 6, 8, 9, 13, 18, 26, 29, 37, 39, 46, 50, 56, 57, 60, 67, 72, 74, 75, 79, 80, 91, 94, 95, 97, 111, 116, 154, 157, 162 2σ : 6, 8, 9, 56, 57, 60, 74, 75, 79, 97.

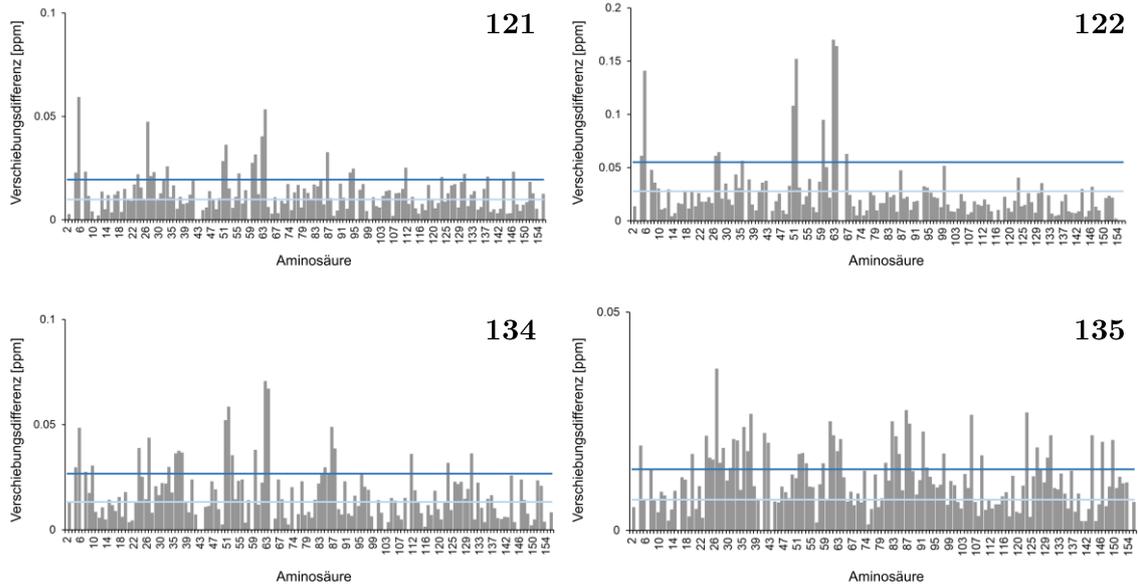


109: 1σ : 5, 6, 28, 29, 33, 37, 39, 55, 56, 57, 62, 67, 74, 75, 91, 95, 96, 97, 141, 142 2σ : 6, 29, 55, 56, 67, 74, 75.

116: 1σ : 5, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 17, 21, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 31, 32, 33, 35, 36, 37, 39, 40, 42, 43, 46, 47, 48, 50, 51, 52, 55, 56, 57, 58, 60, 61, 62, 67, 73, 74, 75, 77, 79, 83, 84, 86, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 95, 99, 100, 101, 102, 103, 105, 106, 111, 116, 117, 120, 123, 124, 126, 128, 130, 133, 134, 135, 136, 137, 142, 144, 148, 154, 156, 157, 162, 163, 166 2σ : 5, 9, 10, 13, 17, 29, 31, 35, 36, 37, 39, 46, 47, 48, 50, 55, 56, 57, 58, 60, 67, 74, 75, 86, 95, 100, 102, 111, 134, 137, 142, 144, 148, 154.

118: 1σ : 5, 6, 8, 9, 10, 13, 17, 18, 20, 21, 25, 26, 27, 28, 29, 31, 32, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 45, 46, 48, 51, 52, 55, 56, 57, 59, 60, 66, 67, 72, 73, 74, 75, 77, 79, 80, 83, 86, 90, 91, 92, 93, 95, 99, 100, 101, 102, 106, 111, 116, 117, 120, 122, 124, 125, 130, 133, 134, 136, 137, 138, 141, 142, 144, 154, 157, 158, 160, 161, 162, 163, 166 2σ : 5, 6, 8, 29, 31, 39, 48, 55, 56, 57, 60, 66, 67, 74, 75, 95, 134, 142, 157, 166.

120: 1σ : 5, 6, 8, 9, 10, 29, 31, 37, 38, 39, 42, 45, 46, 47, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 67, 72, 74, 75, 79, 95, 134, 141, 142, 154, 157 2σ : 6, 29, 31, 39, 55, 56, 67, 74, 75.



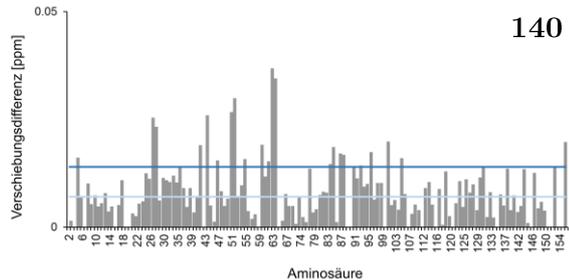
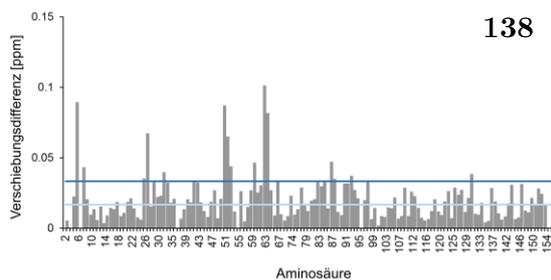
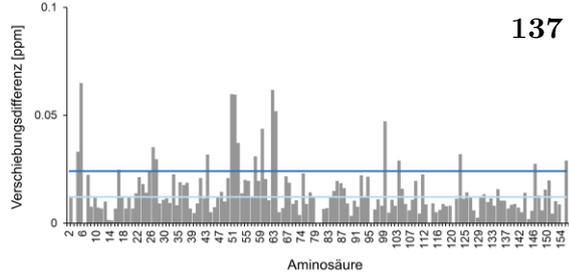
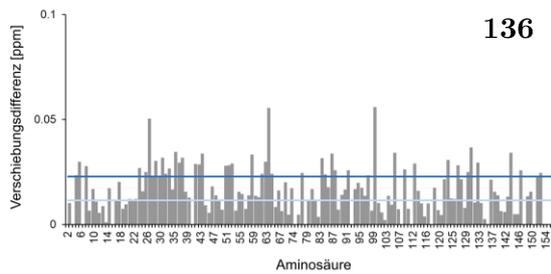
121: **1 σ :** 5, 6, 8, 9, 13, 15, 17, 18, 20, 21, 25, 26, 27, 28, 29, 31, 32, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 45, 46, 51, 52, 54, 55, 56, 57, 59, 60, 62, 67, 72, 73, 74, 75, 79, 83, 85, 86, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 95, 96, 99, 100, 102, 103, 105, 106, 112, 115, 116, 117, 119, 120, 122, 123, 125, 130, 131, 134, 136, 137, 138, 141, 142, 144, 145, 148, 149, 154, 157, 162, 163, 166 **2 σ :** 5, 6, 8, 26, 31, 32, 36, 37, 46, 55, 56, 60, 67, 72, 74, 75, 93, 95, 102, 103, 123, 134, 142, 154, 157.

122: **1 σ :** 5, 6, 8, 9, 10, 13, 18, 20, 29, 31, 33, 37, 38, 39, 42, 45, 46, 47, 54, 55, 56, 57, 60, 66, 67, 72, 74, 75, 79, 86, 91, 95, 102, 103, 111, 134, 142, 154, 157 **2 σ :** 5, 6, 29, 31, 39, 55, 56, 67, 74, 75, 79.

134: **1 σ :** 3, 5, 6, 8, 9, 10, 15, 18, 20, 25, 26, 27, 28, 29, 32, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 43, 45, 51, 52, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 62, 67, 73, 74, 75, 79, 80, 83, 86, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 99, 102, 104, 105, 106, 112, 116, 117, 120, 123, 124, 125, 130, 133, 134, 136, 137, 138, 139, 141, 142, 144, 147, 148, 154, 157, 158, 162, 163 **2 σ :** 5, 6, 8, 10, 26, 29, 37, 39, 40, 42, 55, 56, 57, 67, 74, 75, 92, 93, 94, 95, 96, 123, 134, 142.

135: **1 σ :** 5, 6, 8, 9, 11, 12, 15, 17, 18, 20, 24, 26, 27, 28, 29, 31, 32, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 43, 44, 46, 47, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 62, 66, 67, 72, 73, 74, 75, 77, 79, 81, 83, 86, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 111, 112, 115, 116, 117, 120, 123, 127, 128, 130, 133, 134, 136, 137, 138, 139, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 148, 150, 154, 157, 159, 160, 161, 162, 163, 164 **2 σ :** 5, 8, 20, 26, 27, 28, 29, 31, 32, 35, 36, 37, 39, 40, 42, 46, 47, 56, 57, 58, 66, 72,

73, 74, 75, 83, 89, 91, 92, 93, 95, 96, 100, 101, 106, 117, 120, 134, 137, 138, 141, 142, 148, 154, 157, 160.



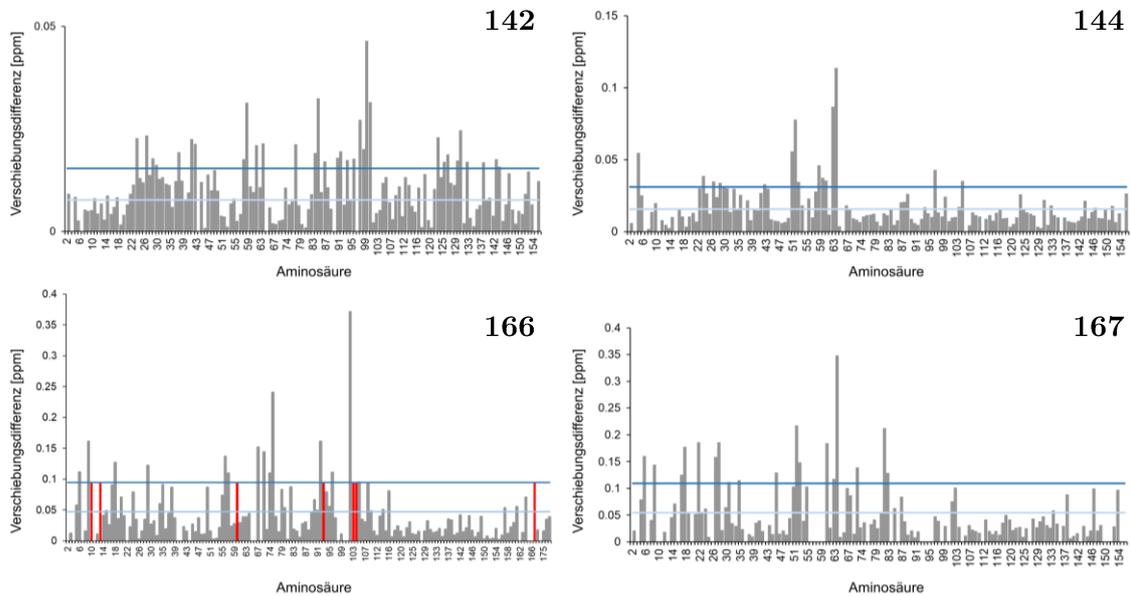
136: 1σ : 5, 6, 8, 10, 11, 15, 17, 18, 21, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 31, 32, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 43, 44, 46, 47, 48, 51, 52, 53, 55, 56, 57, 59, 60, 62, 66, 67, 72, 73, 74, 75, 77, 79, 81, 83, 86, 88, 89, 90, 92, 93, 94, 95, 96, 98, 99, 100, 102, 103, 104, 105, 106, 111, 115, 117, 120, 124, 125, 130, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 141, 142, 144, 148, 149, 150, 153, 154, 157, 159, 160, 162, 164 2σ : 5, 6, 8, 26, 28, 29, 31, 32, 33, 35, 36, 37, 39, 40, 42, 46, 47, 48, 55, 56, 57, 66, 73, 74, 75, 77, 86, 92, 93, 95, 96, 100, 106, 111, 117, 120, 124, 134, 137, 141, 142, 144, 154, 157, 162, 164.

137: 1σ : 3, 5, 6, 8, 10, 17, 18, 20, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 31, 37, 39, 40, 42, 46, 48, 51, 52, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 66, 67, 72, 74, 75, 79, 80, 84, 86, 87, 92, 93, 94, 95, 96, 101, 102, 103, 111, 115, 116, 120, 123, 134, 136, 137, 141, 142, 146, 154, 157, 158, 160, 161, 166 2σ : 5, 6, 17, 28, 29, 31, 48, 55, 56, 57, 62, 67, 74, 75, 134, 157, 166.

138: 1σ : 5, 6, 8, 9, 18, 21, 24, 28, 29, 32, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 44, 45, 46, 47, 48, 51, 52, 54, 55, 56, 57, 60, 66, 67, 72, 73, 74, 75, 77, 79, 83, 86, 87, 89, 90, 91, 92, 93, 95, 96, 99, 100, 101, 102, 103, 105, 106, 117, 120, 123, 124, 130, 133, 134, 136, 137, 138, 141, 142, 145, 148, 149, 153, 154, 157, 160, 161, 162, 163, 164 2σ : 6, 8, 28, 29, 32, 36, 46, 47, 55, 56, 57, 67, 74, 75, 91, 93, 95, 96, 101, 106, 142.

140: 1σ : 5, 6, 8, 10, 13, 18, 27, 28, 29, 31, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 43, 45, 46, 48, 51, 52, 55, 56, 57, 58, 59, 67, 72, 73, 74, 75, 79, 83, 86, 89, 90, 91, 92, 93, 95, 96, 99, 100,

101, 102, 103, 104, 106, 107, 112, 116, 117, 124, 125, 128, 130, 134, 136, 137, 138, 141, 142, 144, 147, 149, 151, 154, 157, 163, 166 2σ : 5, 29, 31, 39, 46, 48, 51, 55, 56, 59, 67, 73, 74, 75, 92, 93, 95, 96, 99, 101, 104, 112, 116, 142, 163, 166.

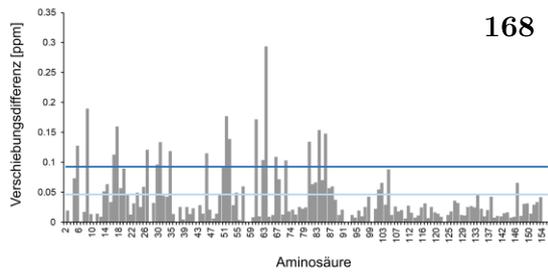


142: 1σ : 3, 5, 11, 15, 18, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 31, 32, 33, 35, 36, 37, 38, 40, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 49, 51, 52, 53, 54, 59, 62, 66, 67, 72, 73, 74, 75, 83, 85, 86, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 99, 100, 102, 103, 104, 106, 107, 111, 112, 116, 117, 120, 122, 124, 125, 128, 130, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 141, 142, 144, 149, 150, 151, 153, 154, 157, 162, 163, 166 2σ : 26, 29, 32, 33, 42, 46, 47, 62, 66, 73, 75, 86, 92, 93, 95, 99, 100, 102, 104, 106, 107, 111, 112, 134, 136, 137, 141, 142, 144, 149, 153, 154.

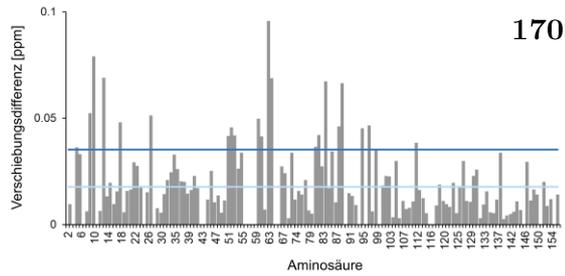
144: 1σ : 5, 6, 10, 17, 25, 26, 27, 29, 31, 32, 33, 35, 37, 38, 39, 42, 44, 46, 47, 48, 55, 56, 57, 58, 60, 62, 66, 67, 72, 74, 75, 79, 95, 96, 97, 102, 105, 111, 115, 116, 128, 134, 135, 142, 144, 157, 160, 162, 166 2σ : 5, 26, 29, 32, 33, 47, 55, 56, 57, 66, 67, 72, 74, 75, 105, 116.

166: 1σ : 5, 6, 9, 15, 17, 18, 21, 24, 30, 33, 36, 39, 50, 55, 56, 57, 67, 72, 74, 75, 80, 81, 82, 89, 90, 91, 92, 93, 95, 97, 102, 106, 109, 111, 114, 117, 157, 161, 165 2σ : 9, 18, 56, 57, 67, 72, 74, 75, 92, 97, 102, 106, 109. (rot markierte AS konnten nicht zugeordnet werden)

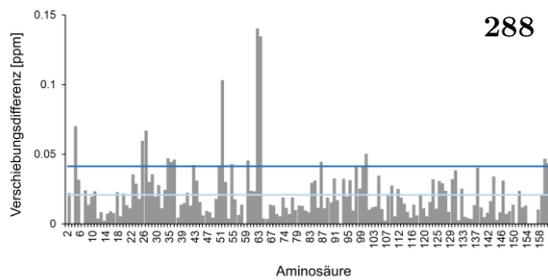
167: 1σ : 5, 6, 9, 15, 17, 18, 19, 21, 24, 25, 26, 29, 31, 33, 35, 38, 50, 55, 56, 57, 59, 72, 74, 75, 79, 80, 82, 89, 90, 91, 93, 95, 113, 114, 145, 149, 157, 164 2σ : 6, 9, 17, 18, 24, 29, 31, 35, 38, 50, 56, 57, 72, 74, 75, 82, 90, 91.



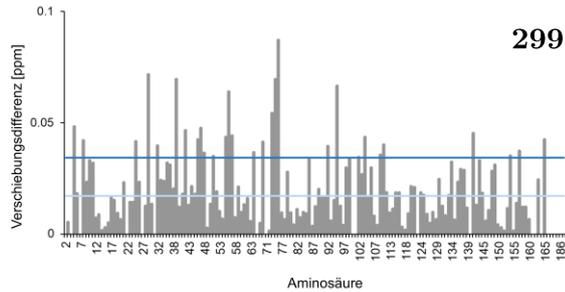
168



170



288



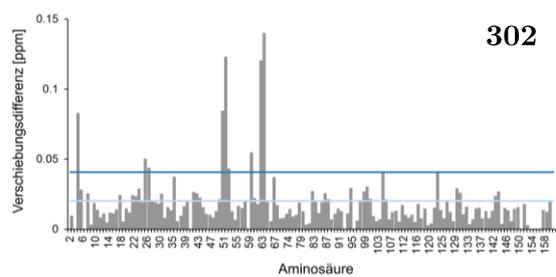
299

168: 1σ : 5, 6, 9, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 26, 28, 29, 33, 35, 36, 38, 50, 54, 55, 56, 57, 59, 61, 72, 74, 75, 79, 80, 82, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 113, 114, 116, 145, 157 2σ : 6, 9, 17, 18, 29, 33, 35, 38, 50, 55, 56, 57, 72, 74, 75, 79, 82, 89, 92, 94.

170: 1σ : 5, 6, 9, 10, 13, 15, 18, 24, 25, 26, 29, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 45, 46, 50, 55, 56, 57, 58, 59, 67, 72, 74, 75, 79, 80, 82, 86, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 96, 97, 103, 105, 107, 112, 113, 114, 116, 123, 130, 134, 136, 137, 141, 142, 149, 157, 162 2σ : 5, 9, 10, 13, 18, 29, 55, 56, 57, 67, 72, 74, 75, 89, 90, 92, 94, 96, 97, 103, 105, 107, 123.

288: 1σ : 5, 6, 8, 11, 18, 20, 25, 26, 28, 29, 31, 32, 35, 37, 38, 39, 40, 45, 47, 55, 56, 57, 59, 67, 72, 73, 74, 75, 92, 93, 95, 99, 102, 104, 106, 107, 111, 112, 116, 119, 120, 123, 130, 134, 136, 137, 138, 141, 142, 144, 149, 154, 157, 162, 169, 186, 187 2σ : 5, 28, 29, 38, 39, 40, 47, 55, 56, 59, 67, 74, 75, 95, 106, 111, 112, 186, 187.

299: 1σ : 5, 6, 8, 9, 10, 11, 17, 21, 25, 26, 29, 32, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 41, 42, 44, 45, 46, 47, 48, 51, 52, 55, 56, 57, 59, 62, 64, 67, 73, 74, 75, 79, 86, 89, 90, 91, 92, 95, 98, 99, 102, 103, 104, 105, 106, 109, 111, 112, 115, 116, 120, 122, 124, 125, 130, 133, 134, 136, 137, 138, 142, 144, 145, 148, 149, 154, 157, 163, 165 2σ : 5, 8, 25, 29, 32, 39, 42, 46, 47, 48, 51, 55, 56, 57, 64, 67, 73, 74, 75, 86, 92, 95, 99, 102, 104, 109, 111, 142, 144, 154, 157, 165.



302: **1 σ :** 5, 6, 8, 18, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 31, 32, 35, 39, 44, 46, 47, 48, 54, 55, 56, 57, 62, 67, 72, 74, 75, 77, 79, 91, 92, 95, 96, 103, 106, 107, 111, 112, 116, 117, 134, 137, 141, 142, 153, 154, 186 **2 σ :** 5, 28, 29, 55, 56, 57, 67, 74, 75, 116, 134.

Nicht näher diskutierte Haddock-Daten:

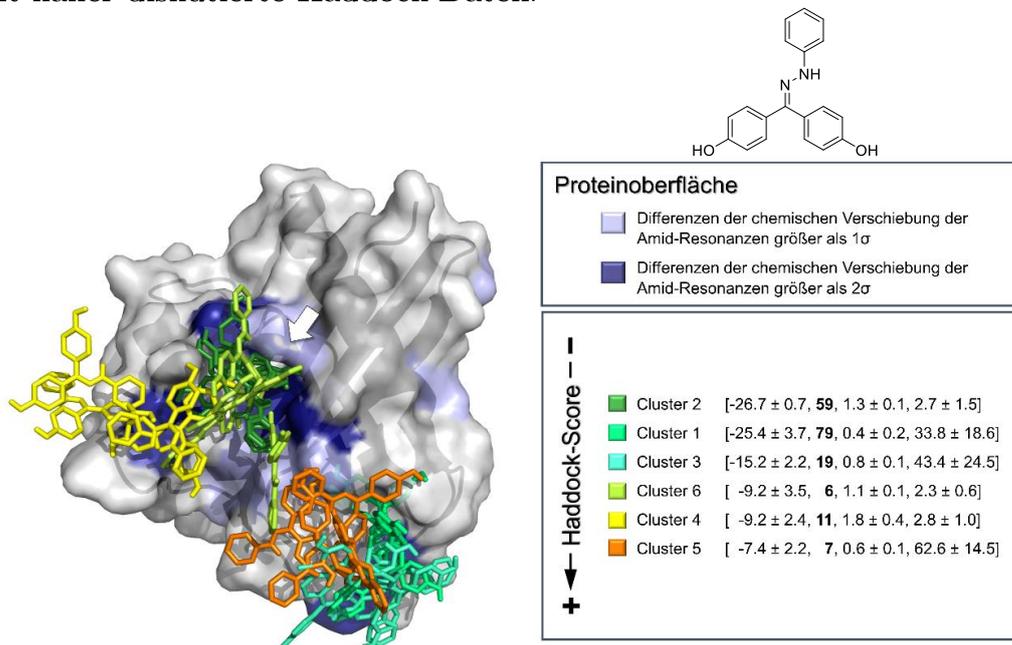


Abbildung 97: Darstellung der durch Haddock 2.4 unter Berücksichtigung der NMR-Restraints berechneten Cluster für die Bindung des Hydrazons **120** an GDP-gebundenes *K*-RAS4B^{WT} (PDB:6MBT); dabei [Haddock-Score, **Zahl der Clustermitglieder**, RMSD-Wert, Verletzungsenergie für Restraints]; der weiße Pfeil kennzeichnet die Lage der SI/II-Bindestelle.

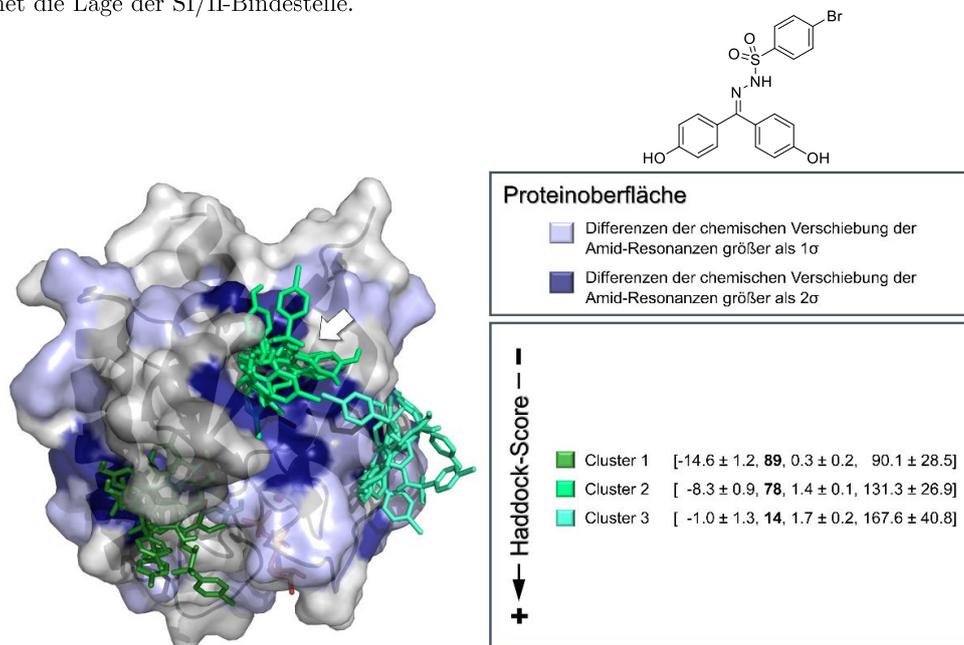


Abbildung 98: Darstellung der durch Haddock 2.4 unter Berücksichtigung der NMR-Restraints berechneten Cluster für die Bindung des Sulfonylhydrazons **134** an GDP-gebundenes *K*-RAS4B^{WT} (PDB:6MBT); dabei [Haddock-Score, **Zahl der Clustermitglieder**, RMSD-Wert, Verletzungsenergie für Restraints]; der weiße Pfeil kennzeichnet die Lage der SI/II-Bindestelle.

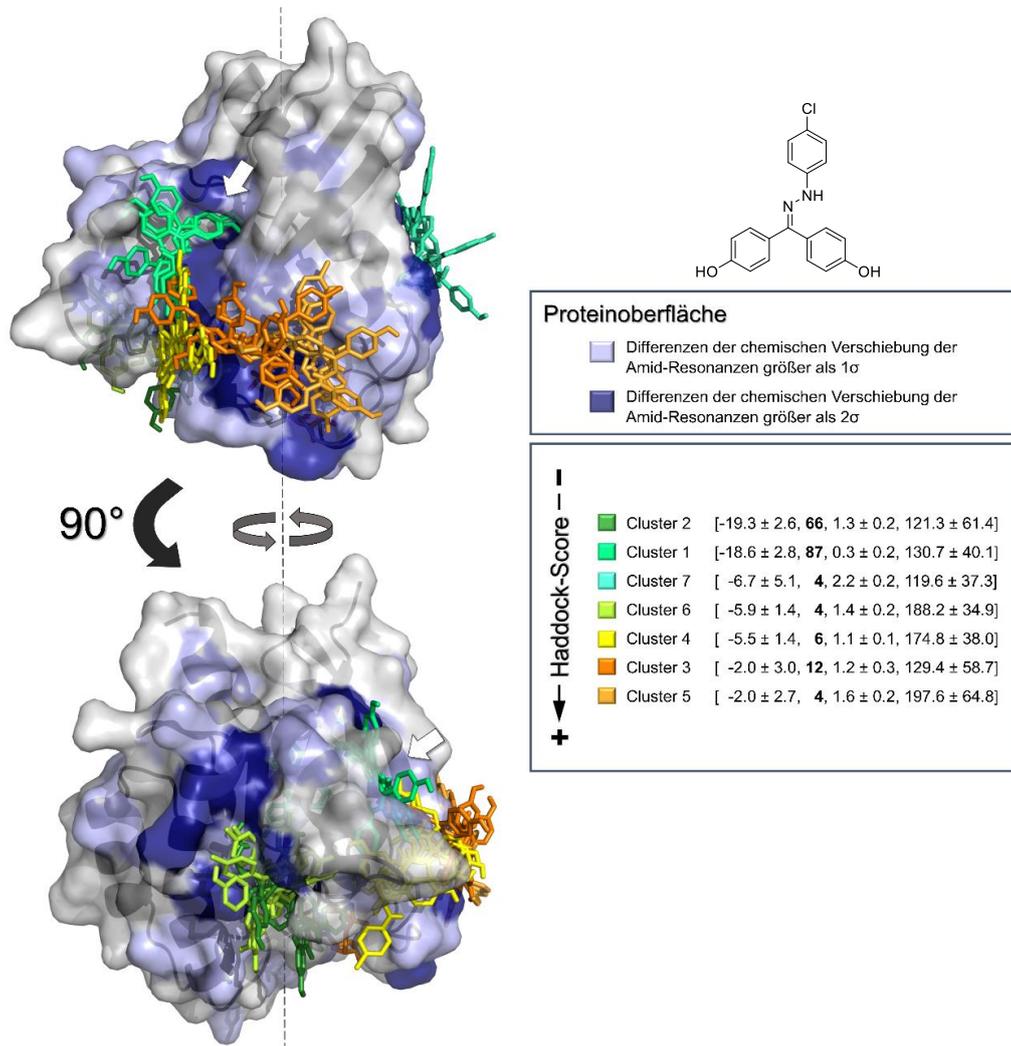


Abbildung 99: Darstellung der durch Haddock 2.4 unter Berücksichtigung der NMR-Restraints berechneten Cluster für die Bindung des Hydrazons **121** an GDP-gebundenes *K*-RAS4B^{WT} (PDB:6MBT); dabei [Haddock-Score, **Zahl der Clustermitglieder**, RMSD-Wert, Verletzungsenergie für Restraints]; der weiße Pfeil kennzeichnet die Lage der SI/II-Bindestelle.

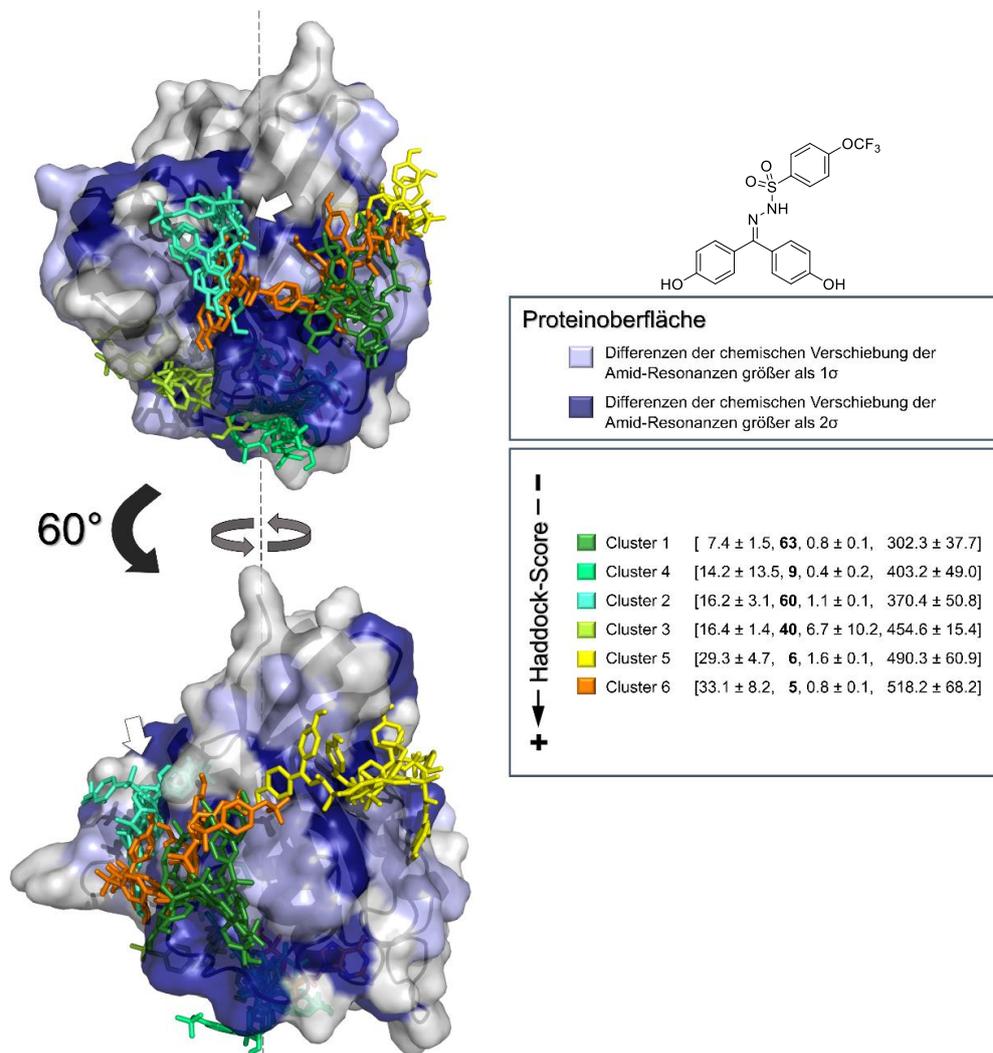


Abbildung 100: Darstellung der durch Haddock 2.4 unter Berücksichtigung der NMR-Restraints berechneten Cluster für die Bindung des Sulfonylhydrazons **136** an GDP-gebundenes *K*-RAS4B^{WT} (PDB:6MBT); dabei [Haddock-Score, **Zahl der Clustermittglieder**, RMSD-Wert, Verletzungsenergie für Restraints]; der weiße Pfeil kennzeichnet die Lage der SI/II-Bindestelle.

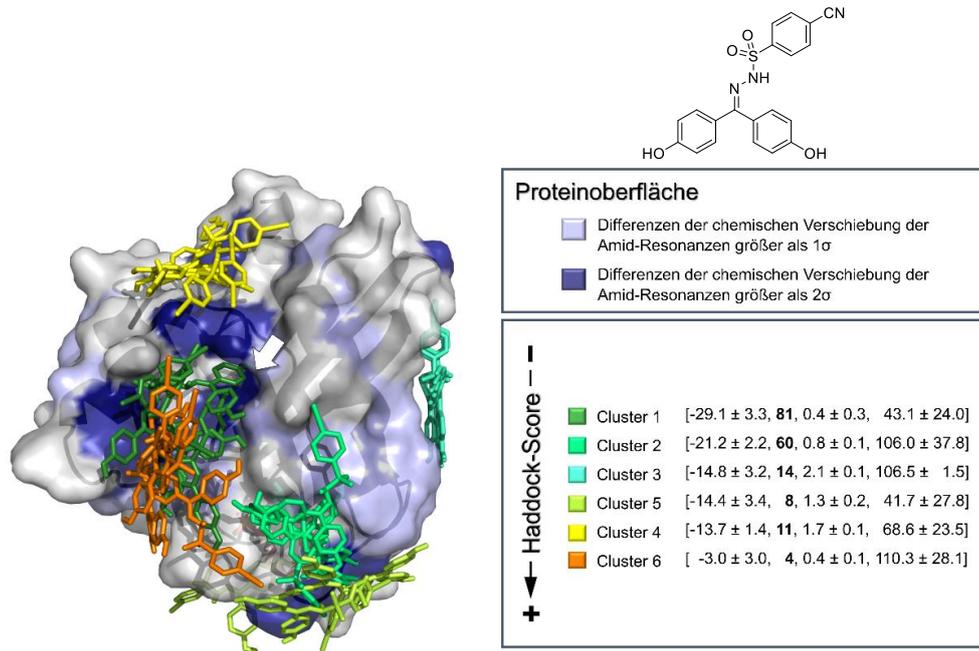


Abbildung 101: Darstellung der durch Haddock 2.4 unter Berücksichtigung der NMR-Restraints berechneten Cluster für die Bindung des Sulfonylhydrazons **137** an GDP-gebundenes *K-RAS4B^{WT}* (PDB:6MBT); dabei [Haddock-Score, **Zahl der Clustermitglieder**, RMSD-Wert, Verletzungsenergie für Restraints]; der weiße Pfeil kennzeichnet die Lage der SI/II-Bindestelle.

9 Literaturverzeichnis

- 1 W. Müller-Esterl, *Biochemie - Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2011**.
- 2 F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, A. Jemal, *CA: Cancer J. Clin.* **2018**, *68*, 394 – 424.
- 3 C. de Martel, D. Georges, F. Bray, J. Ferlay, G. M. Clifford, *Lancet Glob. Health* **2020**, *8*, e180 – e190.
- 4 F. P. Boscoe, C. J. Johnson, R. L. Sherman, D. G. Stinchcomb, G. Lin, K. A. Henry, *Cancer* **2014**, *120*, 2191 – 2198.
- 5 J. A. Nelson, J. W. Carpenter, L. M. Rose, D. J. Adamson, *Cancer Res.* **1975**, *35*, 2872 – 2878.
- 6 A. I. Momovsky, Y. Baburina, M. I. Kaobyakova, R. S. Fadeev, V. S. Akatov, O. V. Krestinina, *Biochem (Mosc) Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol.* **2020**, *14*, 140 – 145.
- 7 J. W. Yarbrow, *Semin. Oncol.* **1992**, *19*, 1 – 10.
- 8 D. A. Gewirtz, *Biochem. Pharmacol.* **1999**, *57*, 727 – 741.
- 9 K. R. Hande, *Eur. J. Cancer* **1998**, *34*, 1514 – 1521.
- 10 P. G. Morris, M. N. Fornier, *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 7167 – 7172.
- 11 G. N. Rudd, J. A. Hartley, R. L. Souhami, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1995**, *35*, 323 – 326.
- 12 G. Sarosy, B. Leyland-Jones, P. Soochan, B. D. Cheson, *J. Clin. Oncol.* **1988**, *6*, 1768 – 1782.
- 13 N. Brock, *Cancer Res.* **1989**, *49*, 1 – 7.
- 14 P. Tomasini, P. Walia, C. Labbe, K. Jao, N. B. Leigh, *Oncologist* **2016**, *21*, 1450 – 1460.
- 15 A. D. Cox, S. W. Fesik, A. C. Kimmelman, J. Luo, C. J. Der, *Nat. Rev. Drug Disc.* **2014**, *13*, 828 – 851.
- 16 B. Mörchen, O. Shkura, R. Stoll, I. Helfrich, *Cancer Drug Resist.* **2019**, *2*, 813 – 826.
- 17 M. Indarte, R. Puentes, M. Maruggi, N. T. Ihle, G. Grandjean, M. Scott, Z. Ahmed, E. J. Meuillet, S. Zhang, R. Lemos, L. Ducuny, F. I. A. L. Layng, R. G. Correa, L. A. Bankston, R. C. Liddington, L. Kirkpatrick, G. Powis, *Cancer Res.* **2019**, *79*, 3100 – 3111.
- 18 S.-M. Shin, D.-K. Choi, K. Jung, J. Bae, J.-s. Kim, S.-w. Park, K.-H. Song, Y.-S. Kim, *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 15090.
- 19 R. Spencer-Smith, J. P. O'Bryan, *Semin. Cancer Biol.* **2019**, *54*, 138 – 148.
- 20 S. Lu, H. Jang, S. Muratcioglu, A. Gursoy, O. Keskin, R. Nussinov, J. Zhang, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 6607 – 6665.
- 21 J. M. L. Ostrem, K. M. Shokat, *Nat. Rev. Drug Disc.* **2016**, *15*, 771 – 785.
- 22 R. K. Krishnankutty, S. S. Kukday, A. J. Castleberry, S. R. Breevoort, W. K. Schmidt, *Yeast* **2009**, *26*, 451 – 463.
- 23 J. F. Hancock, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, *4*, 373 – 385.
- 24 H. Zhao, P. Liu, R. Zhang, M. Wu, D. Li, X. Zhao, C. Zhang, B. Jiao, B. Chen, Z. Chen, R. Ren, *J. Hematol. Oncol.* **2015**, *8*, 132.
- 25 J. F. Hancock, H. Paterson, C. J. Marshall, *Cell* **1990**, *63*, 133 – 139.
- 26 J. L. Bos, H. Rehmann, A. Wittinghofer, *Cell* **2007**, *129*, 865 – 877.
- 27 T.-H. Jia, X.-G. Wang, H. Thang, *Cancer Drug Resist.* **2019**, *2*, 210 – 224.
- 28 T. W. Traut, *Mol. Cell. Biochem.* **1994**, *140*, 1 – 22.

- 29 H. Huang, J. Daniluk, Y. Liu, J. Chu, Z. Li, B. Ji, C. D. Logsdon, *Oncogene* **2014**, *33*, 532 – 535.
- 30 A. Singh, P. Greninger, D. Rhodes, L. Koopman, S. Violette, N. Bardeesy, J. Settleman, *Cancer Cell* **2009**, *15*, 489 – 500.
- 31 E. S. Kim, M. S. Kies, F. V. Fossella, B. S. Glisson, S. Zaknoen, P. Statkevich, R. F. Munden, C. Summey, K. M. W. Pisters, V. Papadimitrakopoulou, M. Tighiouart, A. Rogatko, F. R. Khuri, *Cancer* **2005**, *104*, 561 – 569.
- 32 R. B. Lobell, D. Liu, C. A. Buser, J. P. Davide, E. DePuy, K. Hamilton, K. S. Koblan, Y. Lee, S. Mosser, S. L. Motzel, J. L. Abbruzzese, C. S. Fuchs, E. K. Rowinsky, E. H. Rubin, S. Sharma, P. J. Deutsch, K. E. Mazina, B. W. Morrison, L. Wildonger, S.-L. Yao, N. E. Kohl, *Mol. Cancer Ther.* **2002**, *1*, 747 – 758.
- 33 G. J. Riely, M. L. Johnson, C. Medina, N. A. Rizvi, V. A. Miller, M. G. Kris, M. C. Pietanza, C. G. Azzoli, L. M. Krug, W. Pao, M. S. Ginsberg, *J. Thorac. Oncol.* **2011**, *6*, 1435 – 1437.
- 34 S. P. Manandhar, E. R. Hildebrandt, W. K. Schmidt, *J. Biomol. Screen.* **2007**, *12*, 983 – 993.
- 35 M. O. Bergo, B. J. Gavino, C. Hong, A. P. Beigneux, M. McMahon, P. J. Casey, S. G. Young, *J. Clin. Investig.* **2004**, *113*, 539 – 550.
- 36 H. Y. Lau, J. Tang, P. J. Casey, M. Wang, *Oncogene* **2017**, *36*, 3934 – 3942.
- 37 P. Martín-Gago, E. K. Fansa, C. H. Klein, S. Murarka, P. Janning, M. Schürmann, M. Metz, S. Ismail, C. Schultz-Fademrecht, M. Baumann, P. I. H. Bastiaens, A. Wittinghofer, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2017**, *129*, 2463 – 2468.
- 38 M. C. Burns, Q. Sun, R. N. Daniels, D. Camper, J. P. Kennedy, J. Phan, E. T. Olejniczak, T. Lee, A. G. Waterson, O. W. Rossanese, S. W. Fesik, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2014**, *111*, 3401 – 3406.
- 39 T. R. Hodges, J. R. Abbott, A. J. Little, D. Sarkar, J. M. Salovich, J. E. Howes, D. T. Akan, J. Sai, A. L. Arnold, C. Browning, M. C. Burns, T. Sobolik, Q. Sun, Y. Beesetty, J. A. Coker, D. Scharn, H. Stadtmueller, O. W. Rossanese, J. Phan, A. G. Waterson, D. B. McConnell, S. W. Fesik, *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 8875 – 8894.
- 40 D. T. Akan, J. E. Howes, J. Sai, A. L. Arnold, Y. Beesetty, J. Phan, E. T. Olejniczak, A. G. Waterson, S. W. Fesik, *ACS Chem. Biol.* **2019**, *14*, 325 – 331.
- 41 M. H. Hofmann, M. Gmachl, J. Ramharter, F. Savarese, D. Gerlach, J. R. Marszalek, M. P. Sanderson, D. Kessler, F. Trapani, H. Arnhof, K. Rumpel, D.-A. Botesteanu, P. Ettmayer, T. Gerstberger, C. Kofink, T. Wunberg, A. Zoepfel, S.-C. Fu, J. L. Teh, J. Böttcher, N. Pototschnig, F. Schachinger, K. Schipany, S. Lieb, C. P. Vellano, J. C. O'Connell, R. L. Mendes, J. Moll, M. Petronczki, T. P. Heffernan, M. Pearson, D. B. McConnell, N. Kraut, *Cancer Discov.* **2021**, *11*, 142 – 157.
- 42 M. C. Guadamillas, A. Cerezo, M. A. del Pozo, *J. Cell Sci.* **2011**, *124*, 3189 – 3197.
- 43 K. Jhaveri, S. Modi, *Onco Targets Ther* **2015**, *8*, 1849 – 1858.
- 44 N. Oshiro, K.-i. Yoshino, S. Hidayat, C. Tokunaga, K. Hara, S. Eguchi, J. Avruch, K. Yonezawa, *Genes Cells* **2004**, *9*, 359 – 366.
- 45 R. Khosravi-Far, M. A. White, J. K. Westwick, P. A. Solski, M. Chrzanowska-Wodnicka, L. Van Aelst, M. H. Wigler, C. J. Der, *Mol. Cell. Biol.* **1996**, *16*, 3923 – 3933.
- 46 Sai K. Athuluri-Divakar, R. Vasquez-Del Carpio, K. Dutta, Stacey J. Baker, Stephen C. Cosenza, I. Basu, Yogesh K. Gupta, M. V. R. Reddy, L. Ueno, Jonathan R. Hart, Peter K. Vogt, D. Mulholland, C. Guha, Aneel K. Aggarwal, E. P. Reddy, *Cell* **2016**, *165*, 643 – 655.
- 47 G. Garcia-Manero, P. Fenaux, A. Al-Kali, S. C. Navada, M. R. Baer, A. Raza, P. Greenberg, K.-A. Kreuzer, D. K. Hiwase, G. J. Roboz, V. Santini, U. Platzbecker, M. E.

- Petrone, B. Brownstein, P. S. Zbyszewski, M. Maniar, L. R. Silverman, *Blood* **2016**, *128*, 2011 – 2011.
- 48 P. A. Jänne, I. Smith, G. McWalter, H. Mann, B. Dougherty, J. Walker, M. C. M. Orr, D. R. Hodgson, A. T. Shaw, J. R. Pereira, G. Jeannin, J. Vansteenkiste, C. H. Barrios, F. A. Franke, L. Crinò, P. Smith, *Br. J. Cancer* **2015**, *113*, 199 – 203.
- 49 D. Planchard, E. F. Smit, H. J. M. Groen, J. Mazieres, B. Besse, Å. Helland, V. Giannone, A. M. D'Amelio, P. Zhang, B. Mookerjee, B. E. Johnson, *Lancet Oncol.* **2017**, *18*, 1307 – 1316.
- 50 S. Lu, H. Jang, R. Nussinov, J. Zhang, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 21949.
- 51 T. S. Chavan, H. Jang, L. Khavrutskii, S. J. Abraham, A. Banerjee, B. C. Freed, L. Johannessen, S. G. Tarasov, V. Gaponenko, R. Nussinov, N. I. Tarasova, *Biophys. J.* **2015**, *109*, 2602 – 2613.
- 52 G. Bührman, G. Holzapfel, S. Fetics, C. Mattos, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 4931 – 4936.
- 53 K. Scheffzek, M. R. Ahmadian, W. Kabsch, L. Wiesmüller, A. Lautwein, F. Schmitz, A. Wittinghofer, *Science* **1997**, *277*, 333 – 339.
- 54 S. Muratcioglu, Tanmay S. Chavan, Benjamin C. Freed, H. Jang, L. Khavrutskii, R. N. Freed, Marzena A. Dyba, K. Stefanisko, Sergey G. Tarasov, A. GURSOY, O. Keskin, Nadya I. Tarasova, V. Gaponenko, R. Nussinov, *Structure* **2015**, *23*, 1325 – 1335.
- 55 T. Maurer, L. S. Garrenton, A. Oh, K. Pitts, D. J. Anderson, N. J. Skelton, B. P. Fauber, B. Pan, S. Malek, D. Stokoe, M. J. C. Ludlam, K. K. Bowman, J. Wu, A. M. Giannetti, M. A. Starovasnik, I. Mellman, P. K. Jackson, J. Rudolph, W. Wang, G. Fang, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012**, *109*, 5299 – 5304.
- 56 Q. Sun, J. P. Burke, J. Phan, M. C. Burns, E. T. Olejniczak, A. G. Waterson, T. Lee, O. W. Rossanese, S. W. Fesik, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, *51*, 6140 – 6143.
- 57 M. Schöpel, K. F. G. Jockers, P. M. Düppe, J. Autzen, V. N. Potheraveedu, S. Ince, K. T. Yip, R. Heumann, C. Herrmann, J. Scherkenbeck, R. Stoll, *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 9664 – 9672.
- 58 T. Tanaka, R. L. Williams, T. H. Rabbitts, *EMBO J.* **2007**, *26*, 3250 – 3259.
- 59 N. Bery, S. Legg, J. Debreczeni, J. Breed, K. Embrey, C. Stubbs, P. Kolasinska-Zwierz, N. Barrett, R. Marwood, J. Watson, J. Tart, R. Overman, A. Miller, C. Phillips, R. Minter, T. H. Rabbitts, *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 2607.
- 60 A. Patgiri, K. K. Yadav, P. S. Arora, D. Bar-Sagi, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 585 – 587.
- 61 E. S. Leshchiner, A. Parkhitko, G. H. Bird, J. Luccarelli, J. A. Bellairs, S. Escudero, K. Opoku-Nsiah, M. Godes, N. Perrimon, L. D. Walensky, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2015**, *112*, 1761 – 1766.
- 62 X. Wu, P. Upadhyaya, M. A. Villalona-Calero, R. Briesewitz, D. Pei, *MedChemComm* **2013**, *4*, 378 – 382.
- 63 S. Sogabe, Y. Kamada, M. Miwa, A. Niida, T. Sameshima, M. Kamaura, K. Yonemori, S. Sasaki, J.-i. Sakamoto, K. Sakamoto, *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, *8*, 732 – 736.
- 64 C. A. Hurd, H. R. Mott, D. Owen, *Pept. Sci.* **2020**, *112*, e24165.
- 65 D. Pei, C. Kuangyu, H. Liao, *Cold Spring Harb. Perspect Med.* **2018**, *8*, a031476.
- 66 P. M. Düppe, T. Tran Thi Phuong, J. Autzen, M. Schöpel, K. T. Yip, R. Stoll, J. Scherkenbeck, *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 1755 – 1763.
- 67 C. J. Novotny, G. L. Hamilton, F. McCormick, K. M. Shokat, *ACS Chem. Biol.* **2017**, *12*, 1956 – 1962.
- 68 M. E. Welsch, A. Kaplan, J. M. Chambers, M. E. Stokes, P. H. Bos, A. Zask, Y. Zhang, M. Sanchez-Martin, M. A. Badgley, C. S. Huang, T. H. Tran, H. Akkiraju, L. M.

- Brown, R. Nandakumar, S. Cremers, W. S. Yang, L. Tong, K. P. Olive, A. Ferrando, B. R. Stockwell, *Cell* **2017**, *168*, 878 – 889.
- 69 B. R. Stockwell, M. Welsch, *Multivalent Ras binding compounds*, **2017**, WO2015184349A3.
- 70 B. R. Stockwell, S. B. Thomas, *Small molecule Ras ligands*, **2016**, WO2016176338A1.
- 71 J. Vacca, P., D. Li, *Multivalent Ras binding compounds*, **2017**, WO2017096045.
- 72 J. C. Hunter, D. Gurbani, S. B. Ficarro, M. A. Carrasco, S. M. Lim, H. G. Choi, T. Xie, J. A. Marto, Z. Chen, N. S. Gray, K. D. Westover, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2014**, *111*, 8895 – 8900.
- 73 M. P. Müller, S. Jeganathan, A. Heidrich, J. Campos, R. S. Goody, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 3687.
- 74 S. M. Lim, K. D. Westover, S. B. Ficarro, R. A. Harrison, H. G. Choi, M. E. Pacold, M. Carrasco, J. Hunter, N. D. Kim, T. Xie, T. Sim, P. A. Jänne, M. Meyerson, J. A. Marto, J. R. Engen, N. S. Gray, *Angew. Chem.* **2013**, *126*, 203 – 208.
- 75 Y. Xiong, J. Lu, J. Hunter, L. Li, D. Scott, H. G. Choi, S. M. Lim, A. Manandhar, S. Gondi, T. Sim, K. D. Westover, N. S. Gray, *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, *8*, 61 – 66.
- 76 J. J. G. Winter, M. Anderson, K. Blades, C. Brassington, A. L. Breeze, C. Chresta, K. Embrey, G. Fairley, P. Faulder, M. R. V. Finlay, J. G. Kettle, T. Nowak, R. Overman, S. J. Patel, P. Perkins, L. Spadola, J. Tart, J. A. Tucker, G. Wrigley, *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 2265 – 2274.
- 77 A. G. Taveras, S. W. Remiszewski, R. J. Doll, D. Cesarz, E. C. Huang, P. Kirschmeier, B. N. Pramanik, M. E. Snow, Y. S. Wang, J. D. del Rosario, B. Vibulbhan, B. B. Bauer, J. E. Brown, D. Carr, J. Catino, C. A. Evans, V. Girijavallabhan, L. Heimark, L. James, S. Liberles, C. Nash, L. Perkins, M. M. Senior, A. Tsarbopoulos, A. K. Ganguly, R. Aust, E. Brown, D. Delisle, S. Fuhrman, T. Hendrickson, C. Kissinger, R. Love, W. Sisson, E. Villafranca, S. E. Webber, *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 125 – 133.
- 78 F. Peri, C. Airoidi, S. Colombo, E. Martegani, A. S. van Neuren, M. Stein, C. Marinzi, F. Nicotra, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1839 – 1848.
- 79 A. Palmioli, E. Sacco, C. Airoidi, F. Di Nicolantonio, A. D'Urzo, S. Shirasawa, T. Sasazuki, A. Di Domizio, L. De Gioia, E. Martegani, A. Bardelli, F. Peri, M. Vanoni, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *386*, 593 – 597.
- 80 J. M. Ostrem, U. Peters, M. L. Sos, J. A. Wells, K. M. Shokat, *Nature* **2013**, *503*, 548 – 551.
- 81 M. P. Patricelli, M. R. Janes, L.-S. Li, R. Hansen, U. Peters, L. V. Kessler, Y. Chen, J. M. Kucharski, J. Feng, T. Ely, J. H. Chen, S. J. Firdaus, A. Babbar, P. Ren, Y. Liu, *Cancer Discov.* **2016**, *6*, 316 – 329.
- 82 J. C. Hunter, A. Manandhar, M. A. Carrasco, D. Gurbani, S. Gondi, K. D. Westover, *Mol. Cancer Res.* **2015**, *13*, 1325 – 1335.
- 83 P. Lito, M. Solomon, L.-S. Li, R. Hansen, N. Rosen, *Science* **2016**, *351*, 604 – 608.
- 84 M. Zeng, J. Lu, L. Li, F. Feru, C. Quan, T. W. Gero, S. B. Ficarro, Y. Xiong, C. Ambrogio, R. M. Paranal, M. Catalano, J. Shao, K.-K. Wong, J. A. Marto, E. S. Fischer, P. A. Jänne, D. A. Scott, K. D. Westover, N. S. Gray, *Cell Chem. Biol.* **2017**, *24*, 1005 – 1016.
- 85 M. R. Janes, J. Zhang, L.-S. Li, R. Hansen, U. Peters, X. Guo, Y. Chen, A. Babbar, S. J. Firdaus, L. Darjania, J. Feng, J. H. Chen, S. Li, S. Li, Y. O. Long, C. Thach, Y. Liu, A. Zariw, T. Ely, J. M. Kucharski, L. V. Kessler, T. Wu, K. Yu, Y. Wang, Y. Yao, X. Deng, P. P. Zarrinkar, D. Brehmer, D. Dhanak, M. V. Lorenzi, D. Hu-Lowe, M. P. Patricelli, P. Ren, Y. Liu, *Cell* **2018**, *172*, 578 – 589.

- 86 Y. Shin, J. W. Jeong, R. P. Wurz, P. Achanta, T. Arvedson, M. D. Bartberger, I. D. G. Campuzano, R. Fucini, S. K. Hansen, J. Ingersoll, J. S. Iwig, J. R. Lipford, V. Ma, D. J. Kopecky, J. McCarter, T. San Miguel, C. Mohr, S. Sabet, A. Y. Saiki, A. Sawayama, S. Sethofer, C. M. Tegley, L. P. Volak, K. Yang, B. A. Lanman, D. A. Erlanson, V. J. Cee, *ACS Med. Chem. Lett.* **2019**, *10*, 1302 – 1308.
- 87 B. A. Lanman, J. R. Allen, J. G. Allen, A. K. Amegadzie, K. S. Ashton, S. K. Booker, J. J. Chen, N. Chen, M. J. Frohn, G. Goodman, D. J. Kopecky, L. Liu, P. Lopez, J. D. Low, V. Ma, A. E. Minatti, T. T. Nguyen, N. Nishimura, A. J. Pickrell, A. B. Reed, Y. Shin, A. C. Siegmund, N. A. Tamayo, C. M. Tegley, M. C. Walton, H.-L. Wang, R. P. Wurz, M. Xue, K. C. Yang, P. Achanta, M. D. Bartberger, J. Canon, L. S. Hollis, J. D. McCarter, C. Mohr, K. Rex, A. Y. Saiki, T. San Miguel, L. P. Volak, K. H. Wang, D. A. Whittington, S. G. Zech, J. R. Lipford, V. J. Cee, *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 52 – 65.
- 88 R. Jhonsa, "Amgen's KRAS G12C Inhibitor Impresses in Phase 2 NSCLC Trial", gefunden unter <https://geneonline.news/en/2020/10/09/am-gens-kras-g12c-inhibitor-impresses-in-phase-2-nsclc-trial/> am 09.01.2021.
- 89 J. B. Fell, J. P. Fischer, B. R. Baer, J. F. Blake, K. Bouhana, D. M. Briere, K. D. Brown, L. E. Burgess, A. C. Burns, M. R. Burkard, H. Chiang, M. J. Chicarelli, A. W. Cook, J. J. Gaudino, J. Hallin, L. Hanson, D. P. Hartley, E. J. Hicken, G. P. Hingorani, R. J. Hinklin, M. J. Mejia, P. Olson, J. N. Otten, S. P. Rhodes, M. E. Rodriguez, P. Savechenkov, D. J. Smith, N. Sudhakar, F. X. Sullivan, T. P. Tang, G. P. Vigers, L. Wollenberg, J. G. Christensen, M. A. Marx, *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 6679 – 6693.
- 90 D. Ojeda, "Mirati's Successful Targeting of the "Undruggable" Shapes Up Regulatory Showdown with Amgen", gefunden unter <https://geneonline.news/en/2020/10/28/mirati-successful-targeting-of-the-undruggable-shapes-up-regulatory-showdown-with-amgen/> am 10.01.2021.
- 91 M. Therapeutics, "Mirati Therapeutics Reports Investigational Adagrasib (MRTX849) Preliminary Data Demonstrating Tolerability and Durable Anti-Tumor Activity as well as Initial MRTX1133 Preclinical Data", gefunden unter <https://ir.mirati.com/news-releases/news-details/2020/Mirati-Therapeutics-Reports-Investigational-Adagrasib-MRTX849-Preliminary-Data-Demonstrating-Tolerability-and-Durable-Anti-Tumor-Activity-as-well-as-Initial-MRTX1133-Preclinical-Data/default.aspx> am 09.01.2021.
- 92 J. G. Kettle, S. K. Bagal, S. Bickerton, M. S. Bodnarchuk, J. Breed, R. J. Carbajo, D. J. Cassar, A. Chakraborty, S. Cosulich, I. Cumming, M. Davies, A. Eatherton, L. Evans, L. Feron, S. Fillery, E. S. Gleave, F. W. Goldberg, S. Harlfinger, L. Hanson, M. Howard, R. Howells, A. Jackson, P. Kemmitt, J. K. Kingston, S. Lamont, H. J. Lewis, S. Li, L. Liu, D. Ogg, C. Phillips, R. Polanski, G. Robb, D. Robinson, S. Ross, J. M. Smith, M. Tonge, R. Whiteley, J. Yang, L. Zhang, X. Zhao, *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 4468 – 4483.
- 93 R. Hansen, U. Peters, A. Babbar, Y. Chen, J. Feng, M. R. Janes, L.-S. Li, P. Ren, Y. Liu, P. P. Zarrinkar, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2018**, *25*, 454 – 462.
- 94 D. Kessler, M. Gmachl, A. Mantoulidis, L. J. Martin, A. Zoepfel, M. Mayer, A. Gollner, D. Covini, S. Fischer, T. Gerstberger, T. Gmaschitz, C. Goodwin, P. Greb, D. Häring, W. Hela, J. Hoffmann, J. Karolyi-Oezguer, P. Knesl, S. Kornigg, M. Koegl, R. Kousek, L. Lamarre, F. Moser, S. Munico-Martinez, C. Peinsipp, J. Phan, J. Rinnenthal, J. Sai, C. Salamon, Y. Scherbantin, K. Schipany, R. Schnitzer, A. Schrenk, B. Sharps, G. Siszler, Q. Sun, A. Waterson, B. Wolkerstorfer, M. Zeeb, M. Pearson, S. W. Fesik, D. B. McConnell, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2019**, *116*, 15823 – 15829.

- 95 F. Shima, Y. Yoshikawa, M. Ye, M. Araki, S. Matsumoto, J. Liao, L. Hu, T. Sugimoto, Y. Ijiri, A. Takeda, Y. Nishiyama, C. Sato, S. Muraoka, A. Tamura, T. Osoda, K.-i. Tsuda, T. Miyakawa, H. Fukunishi, J. Shimada, T. Kumasaka, M. Yamamoto, T. Kataoka, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2013**, *110*, 8182 – 8187.
- 96 C. Xie, Y. Li, L.-L. Li, X.-X. Fan, Y.-W. Wanf, C.-L. Wei, L. Liu, E. L.-H. Leung, X.-J. Yao, *Front. Pharmacol.* **2017**, *8*, 823.
- 97 C. E. Quevedo, A. Cruz-Migoni, N. Bery, A. Miller, T. Tanaka, D. Petch, C. J. R. Bataille, L. Y. W. Lee, P. S. Fallon, H. Tulmin, M. T. Ehebauer, N. Fernandez-Fuentes, A. J. Russell, S. B. Carr, S. E. V. Phillips, T. H. Rabbitts, *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 3169.
- 98 A. Cruz-Migoni, P. Canning, C. E. Quevedo, C. J. R. Bataille, N. Bery, A. Miller, A. J. Russell, S. E. V. Phillips, S. B. Carr, T. H. Rabbitts, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2019**, *116*, 2545 – 2550.
- 99 M. J. McCarthy, C. V. Pagba, P. Prakash, A. K. Naji, D. van der Hoeven, H. Liang, A. K. Gupta, Y. Zhou, K.-J. Cho, J. F. Hancock, A. A. Gorfe, *ACS Omega* **2019**, *4*, 2921 – 2930.
- 100 T. H. Tran, P. Alexander, S. Dharmaiyah, C. Agamasu, D. V. Nissley, F. McCormick, D. Esposito, D. K. Simanshu, A. G. Stephen, T. E. Balius, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2020**, *117*, 3363 – 3364.
- 101 D. Kessler, A. Gollner, M. Gmachl, A. Mantoulidis, L. J. Martin, A. Zoephel, M. Mayer, D. Covini, S. Fischer, T. Gerstberger, T. Gmaschitz, C. Goodwin, P. Greb, D. Häring, W. Hela, J. Hoffmann, J. Karolyi-Oezguer, P. Knesl, S. Kornigg, M. Koegl, R. Kousek, L. Lamarre, F. Moser, S. Munico-Martinez, C. Peinsipp, J. Phan, J. Rinnenthal, J. Sai, C. Salamon, Y. Scherbantin, K. Schipany, R. Schnitzer, A. Schrenk, B. Sharps, G. Sizler, Q. Sun, A. Waterson, B. Wolkerstorfer, M. Zeeb, M. Pearson, S. W. Fesik, D. B. McConnell, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2020**, *117*, 3365 – 3367.
- 102 M. Schöpel, C. Herrmann, J. Scherkenbeck, R. Stoll, *FEBS Lett.* **2016**, *590*, 369 – 375.
- 103 M. Schöpel, O. Shkura, J. Seidel, K. Kock, X. Zhong, S. Löffek, I. Helfrich, H. S. Bachmann, J. Scherkenbeck, C. Herrmann, R. Stoll, *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1133.
- 104 G. Klebe, *Wirkstoffdesign - Entwurf und Wirkung von Arzneistoffen*, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2009**.
- 105 Maestro 9.3, Schrödinger, LLC, New York, 2012,
- 106 Maestro 11.5, Schrödinger, LLC, New York, 2018,
- 107 Glide 5.8, LLC, New York, 2012,
- 108 Glide 2018-1, Schrödinger, LLC, New York, 2018,
- 109 LigPrep 2.5, Schrödinger, LLC, New York, 2012,
- 110 Knime 3.5.1, KNIME AG, Zürich, 2017,
- 111 Node description Knime 3.5.1, KNIME AG, Zürich, 2017,
- 112 C. Dominguez, R. Boelens, A. M. J. J. Bonvin, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1731 – 1737.
- 113 G. C. P. van Zundert, J. P. G. L. M. Rodrigues, M. Trellet, C. Schmitz, P. L. Kastiris, E. Karaca, A. S. J. Melquiond, M. van Dijk, S. J. de Vries, A. M. J. J. Bonvin, *J. Mol. Biol.* **2016**, *428*, 720 – 725.
- 114 S. N. Steinmann, P. Sautet, C. Michel, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18*, 31850 – 31861.
- 115 D. A. Craig, *Trends Pharmacol. Sci.* **1993**, *14*, 89 – 91.
- 116 S. B. Shuker, P. J. Hajduk, R. P. Meadows, S. W. Fesik, *Science* **1996**, *274*, 1531 – 1534.
- 117 M. Jerabek-Willemsen, T. André, R. Wanner, H. M. Roth, S. Duhr, P. Baaske, D.

- Breitsprecher, *J. Mol. Struct.* **2014**, *1077*, 101 – 113.
- 118 T. L. Riss, R. A. Moravec, A. L. Niles, S. Duellman, H. A. Benink, T. J. Worzella, L. Minor, in *Assay Guidance Manual*, Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144066/?report=reader>), **2013**.
- 119 V. E. G. Wozel, *Dermatol. Clin.* **2010**, *28*, 599 – 610.
- 120 X. Y. Chen, H. Buschmann, C. Bolm, *Synlett* **2012**, *23*, 2808 – 2810.
- 121 T. V. Safonova, L. V. Fedyanina, S. N. Trusov, T. S. Feoktistova, D. P. Sevbo, F. S. Mikhailitsyn, *Med. Parazit. Parazit. Bolezni* **2003**, 21 – 22.
- 122 S. N. Milik, A. K. Abdel-Aziz, D. S. Lasheen, R. A. T. Serya, S. Minucci, K. A. M. Abouzid, *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *155*, 316 – 336.
- 123 L. R. Morgan, K. Thangaraj, B. LeBlanc, A. Rodgers, L. T. Wolford, C. L. Hooper, D. Fan, B. S. Jursic, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4552 – 4563.
- 124 J. Mokhtari, M. R. Naimi-Jamal, H. Hamzeali, M. G. Dekamin, G. Kaupp, *ChemSusChem* **2009**, *2*, 248 – 254.
- 125 J. M. Khurana, B. M. Kandpal, P. Sharma, M. Gupta, *Monatsh. Chem.* **2015**, *146*, 187 – 190.
- 126 B. Sundahl, A. R. Smith, T. Livinghouse, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, *53*, 14352 – 14356.
- 127 B. Baruah, M. P. Dutta, A. Boruah, D. Prajapati, J. S. Sandhu, *Synlett* **1999**, *1999*, 409 – 410.
- 128 M. He, C. Metz, K. F. Cheng, J. Ling, T. Coleman, S. VanPatten, Y. Al-Abed, *Arch. Pharmacol.* **2014**, *347*, 104 – 107.
- 129 C. Liu, L. Ding, G. Guo, W. Liu, F.-L. Yang, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 2824 – 2827.
- 130 Y. Xia, F. Hu, Y. Xia, Z. Liu, F. Ye, Y. Zhang, J. Wang, *Synthesis* **2017**, *49*, 1073 – 1086.
- 131 W. A. Wasylenko, N. Kebede, B. M. Showalter, N. Matsunaga, A. P. Miceli, Y. Liu, L. R. Ryzhkov, C. M. Hadad, J. P. Toscano, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13142 – 13150.
- 132 Y. Li, Z. Yang, M. Zhou, J. He, X. Wang, Y. Wu, Z. Wang, *J. Mol. Struct.* **2017**, *1130*, 818 – 828.
- 133 L. C. Blum, J.-L. Reymond, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 8732 – 8733.
- 134 L. Ruddigkeit, R. van Deursen, L. C. Blum, J.-L. Reymond, *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52*, 2864 – 2875.
- 135 S. Han, F.-F. Zhang, H.-Y. Qian, L.-L. Chen, J.-B. Pu, X. Xie, J.-Z. Chen, *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *93*, 16 – 32.
- 136 B. Morandi, B. Mariampillai, E. M. Carreira, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 1101 – 1104.
- 137 M. Gensini, M. Altamura, T. Dimoulas, V. Fedi, D. Giannotti, S. Giuliani, A. Guidi, N. J. S. Harmat, S. Meini, R. Nannicini, F. Pasqui, M. Tramontana, A. Triolo, C. A. Maggi, *ChemMedChem* **2010**, *5*, 65 – 78.
- 138 N. Hu, H. Jung, Y. Zheng, J. Lee, L. Zhang, Z. Ullah, X. Xie, K. Harms, M.-H. Baik, E. Meggers, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2018**, *57*, 6242 – 6246.
- 139 Z. Lui, H. Li, Q. Zhao, J. Shen, *Heterocycles* **2008**, *75*, 1907 – 1911.
- 140 L. Yan, D. Kahne, *Synlett* **1995**, *1995*, 523 – 524.
- 141 B. R. Raju, A. M. F. Garcia, A. L. S. Costa, P. J. G. Coutinho, M. S. T. Gonçalves, *Dyes Pigments* **2014**, *110*, 203 – 213.
- 142 A. N. Matralis, M. G. Katselou, A. Nikitakis, A. P. Kourounakis, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 5583 – 5591.
- 143 D. E. Knutson, R. Kodali, B. Divović, M. Treven, M. R. Stephen, N. M. Zahn, V.

- Dobričić, A. T. Huber, M. A. Meirelles, R. S. Verma, L. Wimmer, C. Witzigmann, L. A. Arnold, L.-C. Chiou, M. Ernst, M. D. Mihovilovic, M. M. Savić, W. Sieghart, J. M. Cook, *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 2422 – 2446.
- 144 M. Tamura, H. Wakasugi, K.-i. Shimizu, A. Satsuma, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 11428 – 11431.
- 145 F. E. Lovering, S. J. Kirincich, W. Wang, J.-B. T. Telliez, L. R. Resnick, J. E. Sabalski, A. L. Banker, J. Butera, I. McFadyen, *Squarate kinase inhibitors* **2009**, WO2009012375A2.
- 146 M. D. Bomann, I. C. Guch, M. DiMare, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 5995 – 5996.
- 147 L. A. Reiter, *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 2714 – 2726.
- 148 D. De Roulet, R. Devita, *Compositions and methods using the same for treatment of neurodegenerative and mitochondrial disease* **2015**, WO2015123365A1.
- 149 C. E. Elmquist, J. S. Stover, Z. Wang, C. J. Rizzo, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 11189 – 11201.
- 150 A. Bogdanowicz, H. Foks, K. Gobis, E. Augustynowicz-Kopec, *Heteroat. Chem* **2012**, *23*, 223 – 230.
- 151 C. Ni, B. Shao, L. Tafesse, J. Yao, J. Yu, X. Zhou, *Pyridine compounds and the uses thereof*, **2013**, WO2012035421A2.
- 152 B. Shankar, P. Jalapathi, A. Valeru, A. Kishor Kumar, B. Saikrishna, K. r. Kudle, *Med. Chem. Res.* **2017**, *26*, 1835 – 1846.
- 153 Z.-J. Liu, J.-P. Vors, E. R. F. Gesing, C. Bolm, *Adv. Synth. Catal.* **2010**, *352*, 3158 – 3162.
- 154 G. Galley, A. Goergler, K. Groebke Zbinden, R. Norcross, H. Stalder, *Aminomethyl-4-imidazoles*, **2008**, WO2008046757A1.
- 155 A. R. Katritzky, B. Pilarski, L. Urogdi, *Synthesis* **1989**, *1989*, 949 – 950.
- 156 M. Tamura, A. Satsuma, K.-i. Shimizu, *Catal. Sci. Technol.* **2013**, *3*, 1386 – 1393.
- 157 A. V. Reddy, S. Gogireddy, P. K. Dubey, M. R. B, V. B, *J. Chem. Sci.* **2015**, *127*, 433 – 438.
- 158 B. A. Johns, J. G. Weatherhead, S. H. Allen, J. B. Thompson, E. P. Garvey, S. A. Foster, J. L. Jeffrey, W. H. Miller, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 1807 – 1810.
- 159 G. B. Payne, *J. Org. Chem.* **1960**, *26*, 668 – 670.
- 160 J. Sun, Y. Dong, L. Cao, X. Wang, S. Wang, Y. Hu, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 8932 – 8934.
- 161 H. Fujioka, Y. Sawama, N. Murata, T. Okitsu, O. Kubo, S. Matsuda, Y. Kita, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 11800 – 11801.
- 162 E. M. Dangerfield, C. H. Plunkett, A. L. Win-Mason, B. L. Stocker, M. S. M. Timmer, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 5470 – 5477.
- 163 G. W. Gribble, F. L. Switzer, *Synth. Commun.* **1987**, *17*, 377 – 383.
- 164 J. Bosch, M. Rubiralta, M. Moral, M. Valls, *J. Heterocycl. Chem.* **1983**, *20*, 595 – 605.
- 165 G. Cristalli, A. Eleuteri, P. Franchetti, M. Grifantini, S. Vittori, G. Lupidi, *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1187 – 1192.
- 166 A. F. Abdel-Magid, K. G. Carson, B. D. Harris, C. A. Maryanoff, R. D. Shah, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 3849 – 3862.
- 167 C. D. Pawar, A. P. Sarkate, K. S. Karnik, D. B. Shinde, *J. Heterocycl. Chem.* **2018**, *55*, 1695 – 1701.
- 168 J. A. Zderic, D. C. Limon, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 4570 – 4572.
- 169 A. C. Lai, C. M. Crews, *Nat. Rev. Drug Disc.* **2017**, *16*, 101 – 114.
- 170 L. Tan, N. S. Gray, *Chin. J. Chem.* **2018**, *36*, 971 – 977.
- 171 R. B. Kargbo, *ACS Med. Chem. Lett.* **2020**, *11*, 5 – 6.
- 172 M. J. Bond, L. Chu, D. A. Nalawansha, K. Li, C. M. Crews, *ACS Cent. Sci.* **2020**, *6*, 1367 – 1375.

- 173 M. D. Shoulders, R. T. Raines, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 22905 – 22912.
- 174 M. G. Natchus, R. G. Bookland, B. De, N. G. Almstead, S. Pikul, M. J. Janusz, S. A. Heitmeyer, E. B. Hookfin, L. C. Hsieh, M. E. Dowty, C. R. Dietsch, V. S. Patel, S. M. Garver, F. Gu, M. E. Pokross, G. E. Mieling, T. R. Baker, D. J. Foltz, S. X. Peng, D. M. Bornes, M. J. Strojnowski, Y. O. Taiwo, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4948 – 4963.
- 175 T. Nguyen, A. M. Decker, T. L. Langston, K. M. Mathews, J. N. Siemian, J.-X. Li, D. L. Harris, S. P. Runyon, Y. Zhang, *ACS Chem Neurosci* **2017**, *8*, 2290 – 2308.
- 176 X. Zhang, X. Du, X. Huang, Z. Lv, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 9248 – 9251.
- 177 P. Ottis, M. Toure, P. M. Cromm, E. Ko, J. L. Gustafson, C. M. Crews, *ACS Chem. Biol.* **2017**, *12*, 2570 – 2578.
- 178 M. Álvarez-Paino, R. Juan-Rodríguez, R. Cuervo-Rodríguez, A. Muñoz-Bonilla, M. Fernández-García, *J. Colloid Interface Sci.* **2014**, *417*, 336 – 345.
- 179 C. Steinebach, H. Kehm, S. Lindner, L. P. Vu, S. Köpff, Á. López Mármol, C. Weiler, K. G. Wagner, M. Reichenzeller, J. Krönke, M. Gütschow, *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 1821 – 1824.
- 180 D. P. Bondeson, A. Mares, I. E. D. Smith, E. Ko, S. Campos, A. H. Miah, K. E. Mulholland, N. Routly, D. L. Buckley, J. L. Gustafson, N. Zinn, P. Grandi, S. Shimamura, G. Bergamini, M. Faeltsh-Savitski, M. Bantscheff, C. Cox, D. A. Gordon, R. R. Willard, J. J. Flanagan, L. N. Casillas, B. J. Votta, W. den Besten, K. Famm, L. Kruidenier, P. S. Carter, J. D. Harling, I. Churcher, C. M. Crews, *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 611 – 617.
- 181 C. Soares de Melo, T.-S. Feng, R. van der Westhuyzen, R. K. Gessner, L. J. Street, G. L. Morgans, D. F. Warner, A. Moosa, K. Naran, N. Lawrence, H. I. M. Boshoff, C. E. Barry, C. J. Harris, R. Gordon, K. Chibale, *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 7240 – 7250.
- 182 J. Alcázar, G. Diels, B. Schoentjes, *QSAR Comb. Sci.* **2004**, *23*, 906 – 910.
- 183 B. Zhao, Y. Li, P. Xu, Y. Dai, C. Luo, Y. Sun, J. Ai, M. Geng, W. Duan, *ACS Med. Chem. Lett.* **2016**, *7*, 629 – 634.
- 184 B. Das, S. Vedachalam, D. Luo, T. Antonio, M. E. A. Reith, A. K. Dutta, *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 9179 – 9195.
- 185 G. Modi, T. Antonio, M. Reith, A. Dutta, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 1557 – 1572.
- 186 N. E. A. Chessum, S. Y. Sharp, J. J. Caldwell, A. E. Pasqua, B. Wilding, G. Colombano, I. Collins, B. Ozer, M. Richards, M. Rowlands, M. Stubbs, R. Burke, P. C. McAndrew, P. A. Clarke, P. Workman, M. D. Cheeseman, K. Jones, *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 918 – 933.
- 187 J. W. Papatzimas, E. Gorobets, R. Maity, M. I. Muniyat, J. L. MacCallum, P. Neri, N. J. Bahlis, D. J. Derksen, *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 5522 – 5540.
- 188 X. Qiu, N. Sun, Y. Kong, Y. Li, X. Yang, B. Jiang, *Org. Lett.* **2019**, *21*, 3838 – 3841.
- 189 C. Boutin, A. Stopin, F. Lenda, T. Brotin, J.-P. Dutasta, N. Jamin, A. Sanson, Y. Boulard, F. Leteurtre, G. Huber, A. Bogaert-Buchmann, N. Tassali, H. Desvaux, M. Carrière, P. Berthault, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 4135 – 4143.
- 190 Real Space Navigator - jetzt infiniSee 2.0.1, Sankt Augustin, Germany, 2020, www.biosolveit.de/infiniSee.
- 191 Y. K. Chen, T. Bonaldi, A. Cuomo, J. R. Del Rosario, D. J. Hosfield, T. Kanouni, S.-c. Kao, C. Lai, N. A. Lobo, J. Matuszkiewicz, A. McGeehan, S. M. O'Connell, L. Shi, J. A. Stafford, R. K. Stansfield, J. M. Veal, M. S. Weiss, N. Y. Yuen, M. B. Wallace, *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, *8*, 869 – 874.
- 192 C. Agami, F. Couty, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 2701 – 2724.
- 193 W.-C. Chen, Y.-W. Lee, C.-T. Chen, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 1472 – 1475.

- 194 J. Zou, D. J. Berg, D. Stuart, R. McDonald, B. Twamley, *Organometallics* **2011**, *30*, 4958 – 4967.
- 195 E. H. Demont, S. Arpino, R. A. Bit, C. A. Campbell, N. Deeks, S. Desai, S. J. Dowell, P. Gaskin, J. R. J. Gray, L. A. Harrison, A. Haynes, T. D. Heightman, D. S. Holmes, P. G. Humphreys, U. Kumar, M. A. Morse, G. J. Osborne, T. Panchal, K. L. Philpott, S. Taylor, R. Watson, R. Willis, J. Witherington, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 6724 – 6733.
- 196 M. L. Bowen, N. C. Lim, C. B. Ewart, R. Misri, C. L. Ferreira, U. Häfeli, M. J. Adam, C. Orvig, *Dalton Trans.* **2009**, 9216 – 9227.
- 197 Y. Masanori, S. Tsuneji, H. Hironobu, Y. Juji, O. Thoru, S. Chung-gi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1985**, *58*, 1413 – 1420.
- 198 E. F. De Medeiros, J. M. Herbert, R. J. K. Taylor, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1991**, 2725 – 2730.