



Masterarbeit

**Design und Synthese von 5-Lipoxygenase
PROTAC-Liganden**

angefertigt am Fachbereich 14 Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Goethe-Universität in Frankfurt am Main

Zur Erlangung des akademischen Grades
Master of Science (M. Sc.)

vorgelegt von

Robyn Köhne

geb. am 22.11.1996 in Offenbach

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Masterarbeit mit dem Titel

„Design und Synthese von 5-Lipoxygenase PROTAC Liganden“

selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen verwendet habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken entnommen worden sind, wurden von mir als solche kenntlich gemacht. Zeichnungen oder Abbildungen wurden selbst erstellt oder mit einem entsprechenden Hinweis versehen.

Die vorliegende Arbeit ist in gleicher oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Prüfungsbehörde eingereicht worden.

OF, 27.11.20

Ort, Datum

Rebryn Köhne

Unterschrift

Diese Masterarbeit wurde im Zeitraum vom 07.05.2020 bis zum 26.11.2020 unter der Betreuung von Prof. Dr. Eugen Proschak sowie Dr. Kerstin Hiesinger am Institut für Pharmazeutische Chemie des Fachbereichs 14 der Goethe-Universität Frankfurt angefertigt.

Erstgutachter: Prof. Dr. Eugen Proschak

Zweitgutachter: Prof. Dr. Michael Göbel

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei Prof. Eugen Proschak für die Möglichkeit bedanken, meine Masterarbeit in seinem Arbeitskreis durchzuführen. Die Themenstellung war nicht nur herausfordernd, sondern auch aktuell und interessant.

Ich bedanke mich weiterhin bei Prof. Michael Göbel für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Dr. Kerstin Hiesinger, ob in Fernbetreuung oder vor Ort, deine Ratschläge und Tipps waren immer hilfreich! Besonders im Umgang mit der HPLC oder in biochemischen Fragen konnte ich immer auf dich zählen.

Weiterhin bedanke ich mich bei Felix Lillich als Co-Betreuer in meiner Anfangszeit sowie Julia Schönfeld und Beatrice Marinescu. Die Zeit mit euch im Laborsaal habe ich genossen.

Auch bedanken möchte ich mich bei Dr. Victor Hernandez-Olmos, Felix Zhu und Marco Rotter für die Einführung in die Flash-Chromatographie. Sogar am anderen Ende des Institutes wart ihr stets hilfsbereit.

Allen Mitgliedern des Arbeitskreises Proschak danke ich für die freundliche Aufnahme und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Den Mitgliedern des Arbeitskreises Steinhilber Maximilian Molitor und Hannah Weißer danke ich für die Messung der Aktivität und der Western-Blots meiner Endverbindungen.

Meinen Kommilitonen Janik Weckesser und Felix Nawa aus der Arbeitsgruppe Knapp möchte ich für die spaßige Zeit danken. Den Pizza-Samstag werde ich nicht vergessen.

Nochmals möchte ich bei Dr. Kerstein Hiesinger bedanken sowie Tobias Rath und Ufuk Erdogdu für die zahlreichen Stunden Korrekturlesen meiner Masterarbeit.

Zuletzt danke ich meiner Mama, du hast mich während meines ganzen Studiums hilfsbereit unterstützt.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
2. Theorie	2
2.1 PROTACs allgemein	2
2.2 PROTAC Design	3
2.3 PROTAC Evaluation.....	3
2.4 PROTACs aktuell.....	4
2.5 5-Lipoxygenase.....	5
2.6. 5-Lipoxygenase Inhibitoren	8
3. Zielsetzung.....	10
4. Synthesen und Reaktionsoptimierung	11
4.1 Syntheseplanung.....	11
4.2 Synthese von 3-[(3 <i>R</i>)-3-[Carbamoyl(hydroxy)amin]but-1-ynyl]benzoesäure (Block A).....	13
4.3 Synthese von Thalidomid-Linkern (Block B)	15
4.4 Synthese von VHL-Linkern (Block C).....	16
4.5 Synthese des CJ-13,610-Derivates via Syntheseroute I (Block D)	17
4.6 Synthese des CJ-13,610 Derivates via Syntheseroute II (Block D)	18
4.7 Synthese von PROTACs.....	22
5. Ergebnisse und Diskussion	25
6. Zusammenfassung	28
7. Ausblick	31
8. Experimenteller Teil	33
8.1 Material und Methoden	33
8.1.1 Wasserlöslichkeit.....	33
8.1.2 Aktivitätsmessung	33
8.1.3 Western-Blots	33
8.2.1 Reagenzien und Lösungsmittel	35
8.2.2. Dünnschichtchromatographie.....	35
8.2.3 Flash-Chromatographie	35
8.2.4 Analytische und Präparative Hochleistungsflüssigkeitschromatographie.....	36
8.2.5 Massenspektrometrie.....	36
8.2.6 NMR-Spektroskopie.....	36
8.2.7 IR-Spektroskopie	37

8.2.8 Schmelzpunktmessgerät.....	37
8.3 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV).....	37
8.3.1 AAV1 Synthese von Thalidomid-Linkern mit Boc geschütztem Amin	37
8.3.2 AAV2 Synthese von <i>N</i> -Hydroxyharnstoff-Thalidomid-PROTACS mit <i>in situ</i> Entschützung...37	
8.3.3.1 AAV3a Synthese von CJ-13,610-Thalidomid-PROTACS mit <i>in situ</i> Entschützung	37
8.3.3.2 AAV3b Synthese von CJ-13,610-Thalidomid-PROTACS mit <i>in situ</i> Verseifung und Entschützung	38
8.3.4 AAV4 Synthese von VHL-Linkern mit Boc-geschützten Amin	38
8.3.5 AAV5 Synthese von <i>N</i> -Hydroxyharnstoff-VHL-PROTACS mit <i>in situ</i> Entschützung	38
8.3.6.1 AAV6a Synthese von CJ-13,610-VHL-PROTACS mit <i>in situ</i> Entschützung	38
8.3.6.2 AAV6b Synthese von CJ-13,610-VHL-PROTACS mit <i>in situ</i> Verseifung und Entschützung.39	
8.4 Synthesen	40
8.4.1 Phenyl(phenoxy-carbonyl)oxycarbamat (24, RK2)	40
8.4.2 [[[1 <i>R</i>]-1-Methylprop-2-ynyl]-phenoxy-carbonyl-amin]-phenylcarbonat (26, RK3)	41
8.4.3 1-Hydroxy-1-[[1 <i>R</i>]-1-methylprop-2-ynyl]-harnstoff (27, RK4)	42
8.4.4 3-[(3 <i>R</i>)-3-[Carbamoyl(hydroxy)amin]but-1-ynyl]benzoesäure (12, RK17)	43
8.4.5 2-(2,6-Dioxo-3-piperidyl)-4-fluor-isoindolin-1,3-dion (14, RK12)	44
8.4.6 <i>t</i> -Butyl <i>N</i> -[2-[2-[[2-(2,6-dioxo-3-piperidyl)-1,3-dioxo-isoindolin-4-yl]amin]ethoxy]-ethyl]carbamat (30a, RK31)	45
8.4.7 <i>t</i> -Butyl <i>N</i> -[2-[2-[2-[[2-(2,6-dioxo-3-piperidyl)-1,3-dioxo-isoindolin-4-yl]amin]ethoxy]-ethoxy]ethyl]carbamat (30b, RK21)	46
8.5.8 <i>t</i> -Butyl <i>N</i> -[2-[2-[2-[2-[[2-(2,6-dioxo-3-piperidyl)-1,3-dioxo-isoindolin-4-yl]amin]ethoxy]-ethoxy]ethoxy]ethyl]carbamat (30c, RK28).....	47
8.5.9 <i>t</i> -Butyl <i>N</i> -[2-[2-[2-[2-[2-[[2-(2,6-dioxo-3-piperidyl)-1,3-dioxo-isoindolin-4-yl]amin]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethyl]carbamat (30d, RK22)	48
8.5.10 <i>t</i> -Butyl <i>N</i> -[3-[2-[2-[3-[[2-(2,6-dioxo-3-piperidyl)-1,3-dioxo-isoindolin-4-yl]amin]propoxy]ethoxy]ethoxy]propyl]carbamat (55, RK20)	49
8.5.11 3-[(3 <i>R</i>)-3-[Carbamoyl(hydroxy)amin]but-1-ynyl]- <i>N</i> -[2-[2-[[2-(2,6-dioxo-3-piperidyl)-1,3-dioxo-isoindolin-4-yl]amino]ethoxy]ethyl]benzamid (18a, RK32)	50
8.5.12 3-[(3 <i>R</i>)-3-[Carbamoyl(hydroxy)amin]but-1-ynyl]- <i>N</i> -[2-[2-[2-[[2-(2,6-dioxo-3-piperidyl)-1,3-dioxo-isoindolin-4-yl]amino]ethoxy]ethoxy]ethyl]benzamid (18b, RK23)	52
8.5.13 3-[(3 <i>R</i>)-3-[Carbamoyl(hydroxy)amino]but-1-ynyl]- <i>N</i> -[2-[2-[2-[2-[[2-(2,6-dioxo-3-piperidyl)-1,3-dioxo-isoindolin-4-yl]amin]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethyl]benzamid (17c, RK34)	53
8.5.14 3-[(3 <i>R</i>)-3-[Carbamoyl(hydroxy)amino]but-1-ynyl]- <i>N</i> -[2-[2-[2-[2-[2-[[2-(2,6-dioxo-3-piperidyl)-1,3-dioxo-isoindolin-4-yl]amin]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethyl]benzamid (18d, RK26)	54

8.5.15 3-[(3 <i>R</i>)-3-[Carbamoyl(hydroxy)amino]but-1-ynyl]- <i>N</i> -[3-[2-[2-[3-[[2-(2,6-dioxo-3-piperidyl)-1,3-dioxo-isoindolin-4-yl]amin]propoxy]ethoxy]ethoxy]propyl]benzamid (74, RK19)	55
8.5.16 Methyl-2-(3-iodphenyl)acetat (31, RK36)	56
8.5.17 Methyl-4-(3-iodphenyl)tetrahydropyran-4-carboxylat (34, RK104)	57
8.5.18 4-(3-Bromphenyl)tetrahydropyran-4-carbonitril (42, RK48).....	58
8.5.19 4-(3-Triisopropylsilylsulfanylphenyl)tetrahydropyran-4-carbonitril (43, RK70).....	59
8.5.20 1-(4-Iodphenyl)-2-methyl-imidazol (39, RK53).....	60
8.5.21 4-[3-[4-(2-Methylimidazol-1-yl)phenyl]sulfanylphenyl]tetrahydropyran-4-carbonitril (44, RK75)	61
8.5.22 4-[3-[4-(2-Methylimidazol-1-yl)phenyl]sulfanylphenyl]tetrahydropyran-4-carbonsäure (18, RK81)	62
8.5.23 <i>N</i> -[2-[2-[2-[[2-(2,6-Dioxo-3-piperidyl)-1,3-dioxo-isoindolin-4-yl]amino]ethoxy]ethoxy]ethyl]-4-[3-[4-(2-methylimidazol-1-yl)phenyl]sulfanylphenyl]tetrahydropyran-4-carboxamid (20b, RK83)	63
8.5.24 <i>N</i> -[2-[2-[2-[2-[[2-(2,6-dioxo-3-piperidyl)-1,3-dioxo-isoindolin-4-yl]amin]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethyl]-4-[3-[4-(2-methylimidazol-1-yl)phenyl]sulfanylphenyl]tetrahydropyran-4-carboxamid (20c, RK90).....	64
8.5.25 <i>N</i> -[2-[2-[2-[2-[3-[[2-(2,6-Dioxo-3-piperidyl)-1,3-dioxo-isoindolin-4-yl]amin]propoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethyl]-4-[3-[4-(2-methylimidazol-1-yl)phenyl]sulfanylphenyl]-tetrahydropyran-4-carboxamid (20d, RK100)	65
8.5.26 <i>t</i> -Butyl <i>N</i> -[2-[3-[[[(1 <i>S</i>)-1-[(2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-hydroxy-2-[4-(4-methylthiazol-5-yl)benzyl-carbamoyl]pyrrolidin-1-carbonyl]-2,2-dimethyl-propyl]amin]-3-oxo-propoxy]ethyl]carbammat (31a, RK62).....	66
8.5.27 <i>t</i> -Butyl <i>N</i> -[2-[2-[3-[[[(1 <i>S</i>)-1-[(2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-hydroxy-2-[4-(4-methylthiazol-5-yl)benzyl-carbamoyl]pyrrolidin-1-carbonyl]-2,2-dimethyl-propyl]amin]-3-oxo-propoxy]ethoxy]ethyl]-carbammat (31b, RK69).....	67
8.5.28 <i>t</i> -Butyl <i>N</i> -[2-[2-[2-[3-[[[(1 <i>S</i>)-1-[(2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-hydroxy-2-[4-(4-methylthiazol-5-yl)benzylcarbamoyl]pyrrolidin-1-carbonyl]-2,2-dimethyl-propyl]amin]-3-oxo-propoxy]-ethoxy]ethoxy]ethyl]carbammat (31c, RK80).....	68
8.5.29 <i>t</i> -Butyl <i>N</i> -[2-[2-[2-[2-[3-[[[(1 <i>S</i>)-1-[(2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-hydroxy-2-[[4-(4-methylthiazol-5-yl)phenyl]methylcarbamoyl]pyrrolidin-1-carbonyl]-2,2-dimethyl-propyl]amin]-3-oxo-propoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethyl]carbammat (31d, RK68).....	69
8.5.30 <i>t</i> -Butyl <i>N</i> -[[4-[2-[[[(1 <i>S</i>)-1-[(2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-hydroxy-2-[4-(4-methylthiazol-5-yl)benzyl-carbamoyl]pyrrolidin-1-carbonyl]-2,2-dimethyl-propyl]amin]-2-oxo-ethyl]phenyl]-methyl]carbammat (57, RK95).....	70
8.5.31 (2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-1-[(2 <i>S</i>)-2-[3-[2-[3-[(3 <i>R</i>)-3-[carbamoyl(hydroxy)amino]but-1-ynyl]benzamid]-ethoxy]propanoylamin]-3,3-dimethyl-butanoyl]-4-hydroxy- <i>N</i> -[4-(4-methylthiazol-5-yl)benzyl]-pyrrolidin-2-carboxamid (19a, RK65)	71

8.5.32 (2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-1-[(2 <i>S</i>)-2-[3-[2-[2-[3-[(3 <i>R</i>)-3-[carbamoyl(hydroxy)amino]but-1-ynyl]benzamind]-ethoxy]ethoxy]propanoylamin]-3,3-dimethyl-butanoyl]-4-hydroxy- <i>N</i> -[4-(4-methylthiazol-5-yl)benzyl]pyrrolidin-2-carboxamid (19b, RK91)	72
8.5.33 (2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-1-[(2 <i>S</i>)-2-[3-[2-[2-[2-[3-[(3 <i>R</i>)-3-[carbamoyl(hydroxy)amino]but-1-ynyl]benzamind]ethoxy]ethoxy]ethoxy]propanoylamin]-3,3-dimethyl-butanoyl]-4-hydroxy- <i>N</i> -[4-(4-methylthiazol-5-yl)benzyl]pyrrolidin-2-carboxamid (19c, RK85)	73
8.5.34 (2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-1-[(2 <i>S</i>)-2-[3-[2-[2-[2-[2-[3-[(3 <i>R</i>)-3-[carbamoyl(hydroxy)amino]but-1-ynyl]benzamind]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]propanoylamin]-3,3-dimethyl-butanoyl]-4-hydroxy- <i>N</i> -[4-(4-methylthiazol-5-yl)benzyl]pyrrolidin-2-carboxamid (19d, RK71)	74
8.5.35 (2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-1-[(2 <i>S</i>)-2-[[2-[4-[[[3-[(3 <i>R</i>)-3-[carbamoyl(hydroxy)amin]but-1-ynyl]benzamid]-methyl]phenyl]acetyl]amin]-3,3-dimethyl-butanoyl]-4-hydroxy- <i>N</i> -[[4-(4-methylthiazol-5-yl)phenyl]methyl]pyrrolidin-2-carboxamid (75, RK99)	75
8.5.36 (2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-1-[(2 <i>S</i>)-3,3-Dimethyl-2-[3-[2-[[4-[3-[4-(2-methylimidazol-1-yl)phenyl]sulfanylphenyl]tetrahydropyran-4-carbonyl]amin]ethoxy]propanoylamin]butanoyl]-4-hydroxy- <i>N</i> -[4-(4-methylthiazol-5-yl)benzyl]pyrrolidin-2-carboxamid (21a, RK92).....	76
8.5.37 (2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-1-[(2 <i>S</i>)-3,3-Dimethyl-2-[3-[2-[2-[[4-[3-[4-(2-methylimidazol-1-yl)phenyl]-sulfanylphenyl]tetrahydropyran-4-carbonyl]amin]ethoxy]ethoxy]propanoylamin-butanoyl]-4-hydroxy- <i>N</i> -[4-(4-methylthiazol-5-yl)benzyl]pyrrolidin-2-carboxamid (21b, RK94).....	77
8.5.38 (2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-1-[(2 <i>S</i>)-3,3-Dimethyl-2-[3-[2-[2-[2-[2-[[4-[3-[4-(2-methylimidazol-1-yl)phenyl]-sulfanylphenyl]tetrahydropyran-4-carbonyl]amin]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]-propanoylamin]butanoyl]-4-hydroxy- <i>N</i> -[(4-methylthiazol-5-yl)benzyl]pyrrolidine-2-carboxamid (21d, RK82)	78
8.5.39 (2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-1-[(2 <i>S</i>)-3,3-Dimethyl-2-[[2-[4-[[[4-[3-[4-(2-methylimidazol-1-yl)phenyl]sulfanylphenyl]tetrahydropyran-4-carbonyl]amin]methyl]phenyl]acetyl]amin]butanoyl]-4-hydroxy- <i>N</i> -[4-(4-methylthiazol-5-yl)benzyl]pyrrolidin-2-carboxamid (76, RK97)	80
9. Literaturverzeichnis.....	82
10. Abbildungsverzeichnis	87
11. Schemenverzeichnis.....	89
12. Tabellenverzeichnis.....	91
13. Anhang	92

Abkürzungsverzeichnis

5-HETE	5-(S)-Hydroxy-8,11,14-cis-6-trans-eicosatetraensäure
5-HPETE	Arachidonsäure-5-hydroperoxid
5-LO	5-Lipoxygenase
α	Kooperativitäts-Faktor
A	Ampere
AA	Arachidonsäure
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschriften
ACN	Acetonitril
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintri-phosphat
BRET	Biolumineszenz-Resonanzenergietransfer-Spektroskopie
Bz	Benzyl
COSY	engl. correlated Spectroscopy
COX	Cyclooxygenasen
cPLA ₂	cytosolische Phospholipase A _{2α}
CRBN	Cereblon
CYP	Cytochrom
Cys	Cystein
DC	Dünnschichtchromatographie
DC ₅₀	engl. Degradation Capacity
DCM	Dichlormethan
DDB1	Box-Domain-Protein
DIAD	Azodicarbonsäurediisopropylester
DIPA	Diisopropylamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EE	Essigsäureethylester
ELOB	ElongB
ELOC	ElongC
ERK	engl. extracellular-signal regulated kinases
ESI-MS	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie
FLAP	5-LO aktivierendes Protein
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRMS	Präzisionsmassenspektrometrie
HSQC	engl. Heteronuclear Single Quantum Coherence
Hz	Hertz
IC ₅₀	inhibierende Konzentration
IR	Infrarot
ITC	isotherme Titrationskalorimetrie
K _D	Dissoziationskonstante
LO	Lipoxygenasen
LT A ₄	Leukotrien A ₄
LTA ₄ H	Leukotrien A ₄ Hydrolase
LTB ₄	Leukotrien B ₄

<i>LTC</i> ₄	Leukotrien C ₄
<i>LTC</i> ₄ <i>S</i>	<i>LTC</i> ₄ -Synthase
<i>LTD</i> ₄	Leukotrien D ₄
<i>LTE</i> ₄	Leukotrien E ₄
<i>LXA</i> ₄	Lipoxin A ₄
<i>MK-2/3</i>	engl. kinase-activated protein kinase 2/3
<i>MW</i>	Mikrowellenofen
<i>n-Hex</i>	<i>n</i> -Hexan
<i>NMP</i>	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
<i>NMR</i>	Kernmagnetische Resonanz
<i>Pd(dppf)Cl</i> ₂ · <i>CH</i> ₂ <i>Cl</i> ₂	[1,1'-Bis-(diphenylphosphin)-ferrocen]-dichloropalladium(II) Dichlormethan
<i>Pd(Ph</i> ₃) ₄	Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0)
<i>PEG</i>	Polyethylenglykol
<i>PG</i>	Prostaglandin
<i>PGH</i> ₂	Prostaglandin H ₂
<i>Ph</i>	Phenyl
<i>PKA</i>	Proteinkinase A
<i>PN</i>	Prostanoide
<i>PPh</i> ₃	Triphenylphosphin
<i>ppm</i>	engl. parts per million
<i>Pro</i>	Prolin
<i>PROTAC</i>	engl. proteolysis-targeting chimeras
<i>PyBOP</i>	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
<i>RT</i>	Raumtemperatur
<i>SDS-Page</i>	Sodium-Dodecyl-Sulfat Polyacrylamidgelelektrophorese
<i>S</i> _N	nukleophiler Substitution
<i>S</i> _N <i>Ar</i>	aromatischer Substitution
<i>SPR</i>	Oberflächenplasmonenresonanz
<i>TEMED</i>	<i>N,N,N'</i> -Tetramethylethylenediamin
<i>TFA</i>	Trifluoressigsäure, Trifluoressigsäure
<i>THF</i>	Tetrahydrofuran
<i>THP</i>	Tetrahydropyran
<i>T</i> _m	Schmelzpunkt
<i>t</i> _r	Retentionszeit
<i>Tris</i>	<i>Tris</i> (hydroxymethyl)aminomethan
<i>ÜN</i>	über Nacht
<i>UV</i>	Ultraviolett
<i>V</i>	Volt
<i>VHL</i>	Von-Hippel-Lindau
<i>WNT</i>	engl. wingless Int 1
<i>δ</i>	Chemische Verschiebung

1. Einleitung

Das Grundprinzip des Wirkstoffdesigns ist es, ein Zielprotein zu identifizieren und mit einem kleinen, hoch selektiven Molekül zu modulieren. Damit sind aber nur ca. 25% des menschlichen Proteoms adressierbar.¹ Transkriptionsfaktoren, Gerüstproteine und nicht-enzymatische Proteine bleiben hierbei oft unberührt. Eine Möglichkeit, auch solche Proteine anzugreifen, bieten *engl. proteolysis-targeting chimeras* kurz PROTACs.¹ Hierbei handelt es sich um zwei Liganden, die über einen Linker miteinander verbunden sind. Einer der Liganden adressiert hierbei das Zielprotein, während der andere an die E3-Ligase bindet. Nach Bildung des PROTAC-Protein-Komplexes erfolgt die Ubiquitinierung und anschließende Degradation des Zielproteins durch das Proteasom. Die Funktionsweise ist in **Abbildung 1** illustriert.

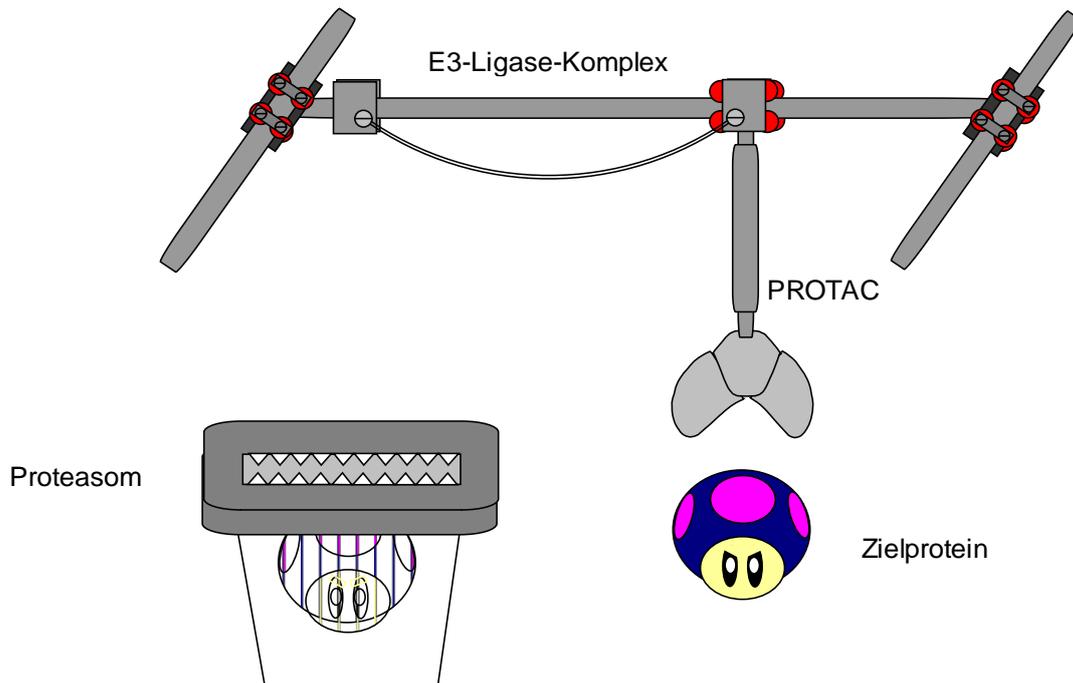


Abbildung 1: Funktionsweise eines PROTACs

Die PROTAC-Technologie ist Teil der nächsten Generation von pharmazeutischen Wirkstoffen und bietet einen komplett neuen Ansatz, um mit kleinen Molekülen in biochemische Signalwege einzugreifen.² Insbesondere in der Behandlung unterschiedlichen Krebsarten rückt die PROTAC-Technologie ins Rampenlicht. Mit jährlich einer halben Million Krebserkrankten und 230.000 Toten ist Krebs die zweithäufigste Todesursache in Deutschland.³ Als Krebs wird das unkontrollierte Wachstum von Körperzellen bezeichnet, welches keine organspezifische Funktion mehr ausübt, dabei meistens das umliegende Gewebe beschädigt und letztendlich zu bösartigen Tumoren führt. Grund hierfür ist eine Störung des Gleichgewichtes zwischen Zellwachstum, Zellteilung und Zelltod. Mit PROTACs kann in dieses Gleichgewicht eingegriffen werden und die Degradation von Krebszellen bewirkt werden.⁴

2.Theorie

2.1 PROTACs allgemein

PROTACs bestehen im Allgemeinen aus einem selektiven Inhibitor, einem Linker und einem E3-Ligase-Ligand. Sie induzieren durch Bildung eines ternären Komplexes räumliche Nähe zwischen dem Zielprotein und einer E3-Ligase und lösen somit die Ubiquitinierung am Zielprotein aus (**Abbildung 2**). Zunächst wird die E1-Ligase mit Ubiquitin unter Verbrauch von Adenosintriphosphat (ATP) beladen, anschließend wird Ubiquitin von der E1-Ligase auf die E2-Ligase transferiert. Daraufhin bildet sich ein Multiproteinkomplex, bestehend aus der mit Ubiquitin beladenen E2-Ligase, der E3-Ligase und dem Zielprotein. In dieser Arbeit ist die 5-Lipoxygenase (5-LO) das Zielprotein, welches in diesem Multiproteinkomplex mehrfach ubiquitiniert und anschließend vom Proteasom degradiert wird. Der PROTAC fungiert in diesem Zyklus katalytisch und kann somit das Zielprotein mehrfach degradieren.

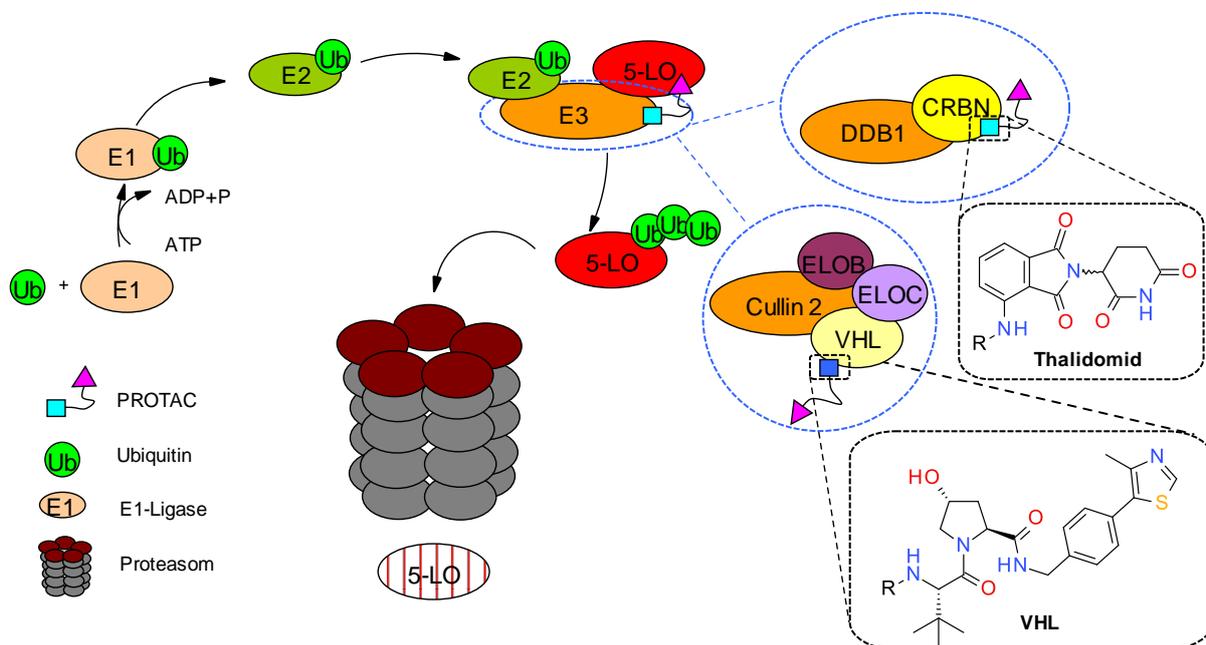


Abbildung 2: PROTAC Mechanismus^{5,6}

Als E3-Ligase werden unterschiedliche Proteinkomplexe bezeichnet. Für PROTACs mit Thalidomid-Derivaten als E3-Ligand besteht der E3-Ligase-Komplex aus dem Box-Domain-Protein (DDB1) und Cereblon⁵ (CRBN) und für VHL-basierte PROTACs aus den Proteinen Cullin 2, ElongB (ELOB), ElongC (ELOC) und dem Von-Hippel-Lindau-Protein (VHL-Protein).⁶ Thalidomid bindet hierbei an CRBN, welches die Substrat-bindende Untereinheit des E3-Ligase-Komplexes ist, VHL-Liganden binden am VHL-Protein. Das VHL-Protein wiederum ist der Substrat-Adapter des Cullin 2 E3-Ligase-Komplexes.⁷

Eine der Voraussetzungen für PROTACs ist, dass zwischen dem Zielprotein und CRBN oder dem VHL-Protein keine Repulsion oder sterische Überfrachtung entsteht. Deshalb fungiert ein Linker als Abstandhalter. Gängige Linker sind Polyethylenglykol-Ketten (PEG) oder langkettige Alkylketten. Hierbei gibt es zwei bedeutende Parameter, die beeinflussbar sind. Mit der Anzahl an PEG-Einheiten kann die Wasserlöslichkeit erhöht werden, welche nicht zu verachten ist, da frühe PROTACs das Problem einer geringen Wasserlöslichkeit hatten.⁸ Der zweite Parameter ist die Länge des Linkers. Während zu kurze Ketten dafür sorgen, dass keine Inhibition an beiden Zielen stattfinden kann, da eine

Repulsion zwischen beiden Proteinen auftritt, sorgt wiederum ein zu langer Linker, dass der PROTAC entropiebedingt in sich zusammenfällt. Eine weitere Hürde, die PROTACs zu überwinden haben, ist die Membrangängigkeit, da PROTACs in der Regel eine höhere Masse als 500 g/mol aufweisen und ein hohes Molekulargewicht mit einer schlechten Membrangängigkeit korreliert.⁹ Eine weitere Grundvoraussetzung für den PROTAC ist, dass der Linker an einer Stelle am Zielmolekül angebracht wird, die die Aktivität möglichst nicht beeinflusst. Das kann zum einen über Struktur-Wirkungs-Beziehungen bestimmt werden oder zum anderen durch Modelling prognostiziert werden.

2.2 PROTAC Design

Ein kürzlich veröffentlichtes Tool ermöglicht die Vorhersage, ob ein PROTAC potenziell geeignet ist.¹⁰ Hierfür wird die Kristallstruktur der E3-Ligase, die Kristallstruktur des Zielproteins mit dem entsprechenden Inhibitor und der gewünschte Linker benötigt. Mit dem Tool können derzeit grobe Annahmen getroffen werden, ob ein PROTAC funktionstüchtig ist und welche Linker geeignet sein könnten.

Ein weiteres online Tool, welches zum Abschätzen der Funktionstüchtigkeit eines PROTACs helfen kann, ist die PROTAC Datenbank.¹¹ In dieser sind berechnete und gemessene Daten zu veröffentlichen PROTACs enthalten, sowie die Assay-Systeme in dem sie analysiert wurden. Mit der wachsenden Anzahl an PROTACs wird es zukünftig möglich sein, Linker für PROTACs durch Modelling zu designen. Hierbei kann durch Homologie von etablierten PROTACs mit dem Zielprotein via Überlagerung eine Annahme über zielspezifische energetisch bevorzugte Bereiche, sogenannte *engl. Hot-Spots*¹², zwischen Zielprotein und E3-Ligase getroffen werden, um Protein-Protein-Bindestelle zu identifizieren, und somit, eine Wahl über den E3-Ligase-Liganden, sowie ein potenzielles Design für den Linker zu treffen.

Ein weiterer Ansatz, mit dem dies auch erreicht werden kann, ist durch Überlagerung, der mit dem Zielprotein wechselwirkenden Kinasen und dem E3-Ligase-Komplex, um *Hot-Spots* zu identifizieren, welche in das Linker-Design einfließen können. Voraussetzung hierfür sind neben den entsprechenden Kristallstrukturen, dass am Zielprotein bekannt sein muss, welche Kinase die jeweilige Aminosäure im Zielprotein phosphoryliert.

2.3 PROTAC Evaluation

Zur Evaluation des PROTACs ist zum einen die inhibierende Konzentration IC_{50} und zum anderen die *engl. Degradation Capacity* DC_{50} eine wichtige Kenngröße. Der IC_{50} des PROTACs muss nicht zwingend so gut sein wie der des Inhibitors ohne Linker und E3-Ligand, da ein PROTAC katalytisch funktioniert, jedoch muss dieser dennoch aktiv sein. Der DC_{50} gibt die Konzentration des PROTACs an, bei der 50% des Zielproteins abgebaut wird, welcher mittels Western-Blots bestimmt wird. Weitere analytische Methoden mit denen die Kinetik und Thermodynamik von PROTACs aufgeklärt werden kann, sind Massenspektrometrie¹³, zeitaufgelöste Förster-Resonanzenergietransfer-Spektroskopie (FRET)¹⁴ bzw. Biolumineszenz-Resonanzenergietransfer-Spektroskopie (BRET)¹⁵, welches eine Spezifizierung von FRET ist, isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)¹⁶ und Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (SPR).¹⁷

Die kinetische Wechselwirkung der PROTACs mit seinen Zielstrukturen ist komplex (**Abbildung 3**). Zwei wichtige Parameter sind hierbei die Dissoziationskonstante K_D bifunktionell (K_D^{bi}) und trifunktionell (K_D^{tri}). Aus ihnen lässt sich der Kooperativitäts-Faktor a berechnen, welcher größer 1 betragen muss. Das bedeutet für den PROTAC, dass die Bindung des E3-Ligase-Liganden stärker sein muss als die des Inhibitors zum Zielprotein.

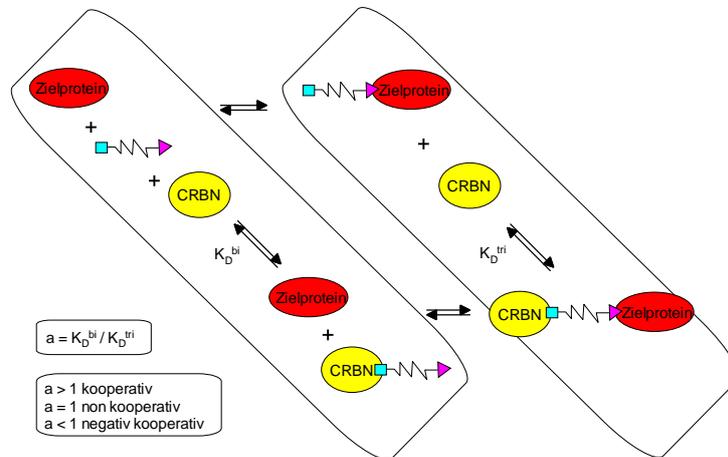


Abbildung 3: Kinetische Betrachtung von PROTACs

2.4 PROTACs aktuell

ARV-100¹⁸ und CC-92480¹⁹ sind die ersten beiden PROTACs, die sich in der klinischen Phase I befinden (Stand 2020). ARV-100 soll hierbei gegen Prostatakrebs und CC-92480 gegen rezidiviertem und refraktärem multiplem Myelom eingesetzt werden.¹⁸ ARV-100 basiert auf einem Thalidomid-Ligand, CC-92480 auf einem VHL-Ligand, wodurch ersichtlich ist, dass beide Liganden in PROTACs erfolgreich sein können. Anhand von CC-92480 wird auch gezeigt, dass unübliche Linker, welche einen Aromaten besitzen, eine Möglichkeit zur Konstruktion von PROTACs sind (**Abbildung 4**).

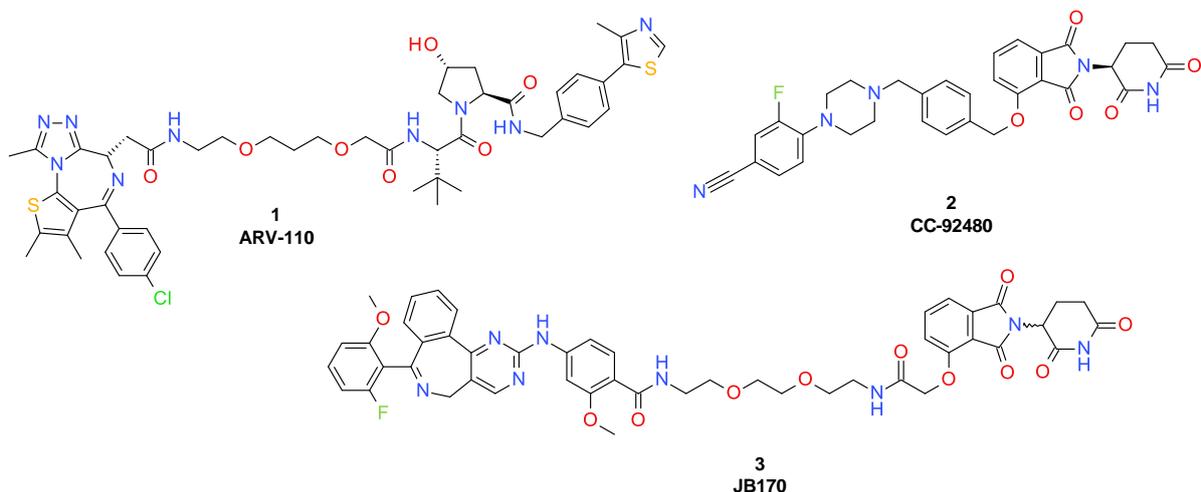


Abbildung 4: Etablierte PROTACs.

Adhikari *et al.* entwickelten den PROTAC JB170, der die Zielstruktur AURORA-A, eine Proteinkinase, gezielt abbaut.⁴ Hierbei haben sie ihren Kinasen-Inhibitor an einen PEG-2-Linker mit Thalidomid gekoppelt, welcher das Zielprotein AURORA-A angreift und vom Proteasom abgebaut wird. Der Abbau von AURORA-A induzierte Apoptose in Krebs-Zelllinien.

Die 5-LO selbst wandelt zusammen mit dem Co-Enzym 5-LO aktivierendes Protein (FLAP) und der cytosolischen Phospholipase A_{2α} (cPLA₂), welche AA aus der Membran löst, AA zu Leukotrien A₄ (LTA₄) um und ist damit Teil der Arachidonsäure-Kaskade. Enzyme der Kaskade sind Cyclooxygenasen (COX), Lipoxygenasen (LO) und Cytochrom-Enzyme (CYP), welche die AA metabolisieren (**Abbildung 7**).

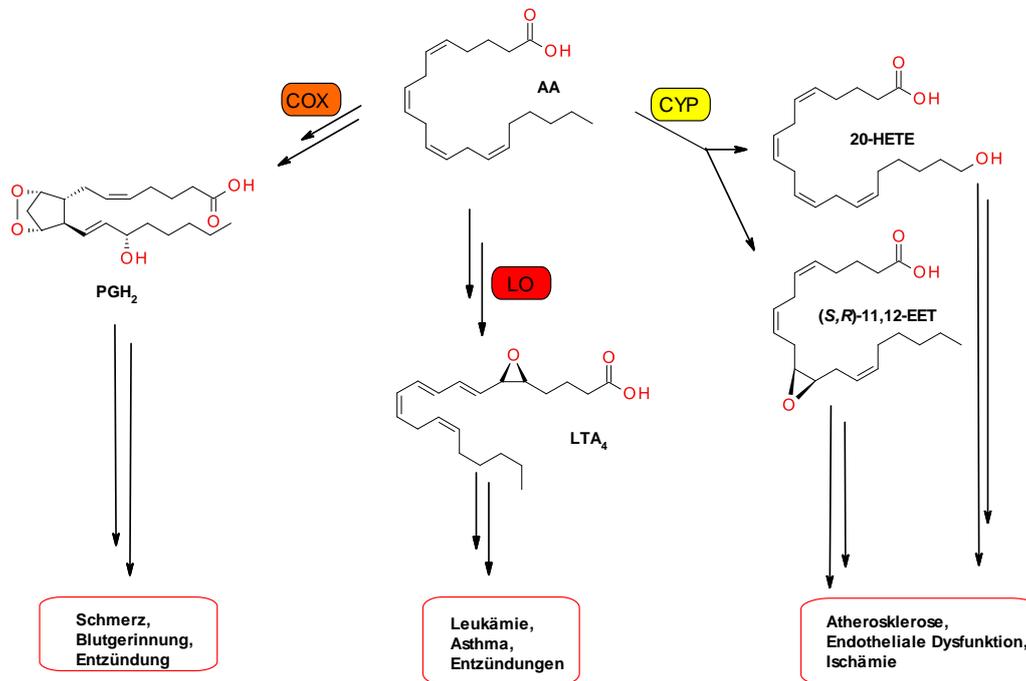


Abbildung 7: Kurze Übersicht über die Metabolisierungswege der AA mit typischen Krankheitsbilder bei Fehlfunktion des jeweiligen Signalweges. AA wird über COX zu PNs, über LO zu LTs und über CYP zu HETEs und zu EETs metabolisiert. PGH₂, LTA₄, 20-HETE und (S,R)-11,12-EET sind hierbei jeweils ein Vertreter der jeweiligen Signalwege.

Über die COXs wird die AA zu Prostanoiden (PN) metabolisiert, welche unter anderen Entzündungsmediatoren sind und Schmerzsignale erzeugen können.²⁵ Einer der bekanntesten Arzneistoffe, der in diesen Signalweg eingreift, ist Ibuprofen®, welcher schmerzstillend, entzündungshemmend und fiebersenkend wirkt. Durch die LO entstehen Leukotriene, welche ebenfalls Entzündungsmediatoren sind und darüber hinaus auch im Zusammenhang mit allergischen Reaktionen stehen.²⁶ Ein 5-LO Inhibitor ist Zileuton®, welches bei Asthma in den USA eingesetzt wird.²⁷ In Europa hat dieser keine Zulassung erhalten. Der dritte Signalweg in der Arachidonsäure-Kaskade sind die CYP-Enzyme, in der 20-HETE und EETs entstehen. CYP-Enzyme kommen vorwiegend in der Leber und im Darm vor und spielen für den First-Pass-Metabolismus eine wichtige Rolle.²⁸ Da viele Wirkstoffe durch verschiedene CYP-Enzyme metabolisiert werden und somit inaktiviert werden, ist eine Hemmung dieser Enzyme in der Regel unerwünscht. Ausnahmen sind z.B. Prodrugs,²⁹ die erst durch CYP-Enzyme aktiviert werden oder auch HIV-Inhibitoren.³⁰ Ein Beispiel hierfür ist Ritonavir®.³¹

Die Biosynthese von Leukotrienen im Zusammenhang mit der 5-LO ist in **Abbildung 8** zusammengefasst.^{22,32} In ruhenden Zellen befindet sich die 5-LO im Cytosol oder im Nukleus. Durch einen Stimulus wird cPLA₂ aktiviert, wodurch AA aus den Phospholipiden der Membran freigesetzt wird. Im nächsten Schritt wird AA durch die 5-LO peroxidiert. Die Umwandlung des instabilen Intermediates Arachidonsäure-5-hydroperoxid (5-HPETE) wird entweder ein zweites Mal durch die 5-LO katalysiert, wodurch LTA₄ gebildet wird, oder über die Gluthationperoxidase zu 5-(S)-Hydroxy-8,11,14-cis-6-trans-eicosatetraensäure (5-HETE) umgewandelt. In ruhenden Zellen kommt FLAP als

Co-Enzym hinzu. Die 5-LO gelangt über die Membran des Zellkerns zu FLAP, dieses wiederum transferiert AA zur 5-LO. Das ermöglicht eine höhere Konversionsrate, im Vergleich zum Prozess ohne FLAP.³³ Nach Bildung von LTA_4 gibt es drei Signalwege, durch die es weiter umgesetzt werden kann. LTA_4 kann zum einen über die 12-LO und 15-LO hydrolysiert werden, wodurch Lipoxin A_4 (LXA_4) entsteht. Als zweiten Signalweg wird LTA_4 über die Leukotrien A_4 Hydrolase (LTA_4H) zu Leukotrien B_4 (LTB_4) umgesetzt und über einen dritten Signalweg wird LTA_4 über die Leukotrien C_4 -Synthase (LTC_4S), welche Glutathion transferiert, zu Leukotrien C_4 (LTC_4) umgewandelt. Glutathion selbst besteht aus den Aminosäuren Glu-Cys-Gly. Durch Abspalten von Glu wird Leukotrien D_4 (LTD_4) und von Glu und Gly Leukotrien E_4 (LTE_4) erzeugt. Diese unterschiedlichen Lipoxine und Leukotriene binden an die entsprechenden Lipoxin und Leukotrien-Rezeptoren und lösen weitere Signal-Kaskaden aus. Der LXA_4 -Rezeptor steht im Zusammenhang mit Wundheilung und Zellwachstum.³⁴ Die LTB_1 - und LTB_2 -Rezeptoren mit Wundheilung, Asthma sowie der Aufrechterhaltung der Hautbarriere³⁵ und die $CysLT_1$ - und $CysLT_2$ -Rezeptoren mit Muskelkontraktion, Gefäßerweiterung und Heuschnupfen.³⁶

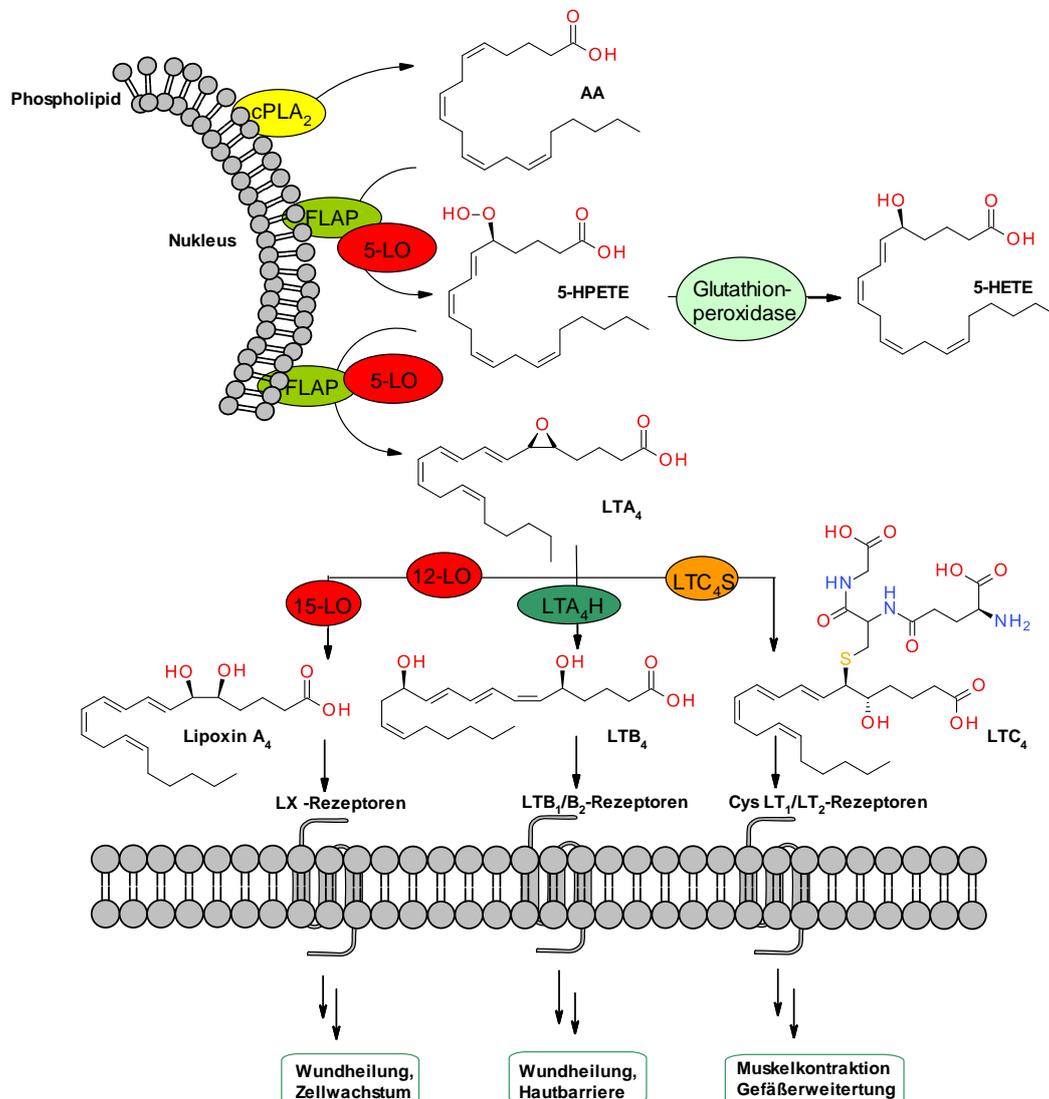


Abbildung 8: Metabolischer Signalweg der AA. Über die 5-LO wird AA, unterstützt durch FLAP, zu 5-HPETE und anschließend zu LTA_4 metabolisiert. LTA_4 kann wiederum selbst in drei unterschiedlichen Signalwegen metabolisiert werden. Die Metabolite, die dabei entstehen, lösen über die LX- und LT Rezeptoren weitere Kaskaden aus, die im Zusammenhang mit Wundheilung, Muskelkontraktion und Gefäßerweiterung stehen.^{22,32,37}

Ein Weg, um in die Kaskade einzugreifen, ist die Inhibition der 5-LO. Die Inhibitoren können hierbei in unterschiedliche Klassen unterteilt werden, je nachdem ob sie dabei das Eisenion chelatisieren, reduzieren oder oxidieren, allosterisch wirken oder kompetitiv mit AA um das aktive Zentrum konkurrieren. Ebenfalls ist es möglich, FLAP zu inhibieren, um einen ähnlichen Effekt zu erzielen.³³ Trotz der verschiedenen Möglichkeiten, die 5-LO zu inhibieren, ist Zileuton® bisher der einzige 5-LO Inhibitor, welcher zu therapeutischen Behandlung von Asthma eingesetzt wird (Stand 2020).³⁸

2.6. 5-Lipoxygenase Inhibitoren

Eine Weiterentwicklung von Zileuton® ist Atreleuton®, welches die 5-LO mit einem $IC_{50} = 0,15 \mu M$ inhibiert, indem dieser mittels des Hydroxyharnstoffs als funktionelle Gruppe das Eisenion chelatisiert.³⁹ An den Hydroxyharnstoff knüpft eine Methylgruppe an, welche vermutlich mit einer hydrophoben Tasche der 5-LO wechselwirkt. Für das stereogenes Zentrum der Methylgruppe hat sich anstelle des Racemats *R* besser als *S* herausgestellt. Verknüpft wird diese mit einem Alkin zu einem Thiophen mit benzylischem Rest. Mit Atreleuton® als Leitstruktur wurde im AK Proschak HK330⁴⁰ entwickelt, welches den Hydroxyharnstoff, die Methylgruppe und das Alkin von Atreleuton® beinhaltet, jedoch aus einem anderen Grundgerüst aufgebaut ist. Dieses besteht bei HK330 aus einem Phenylring, welcher über eine Amid-Bindung durch einen Ethyl-Linker mit einem Benzhydryl-Motif verbunden ist. (Abbildung 9).

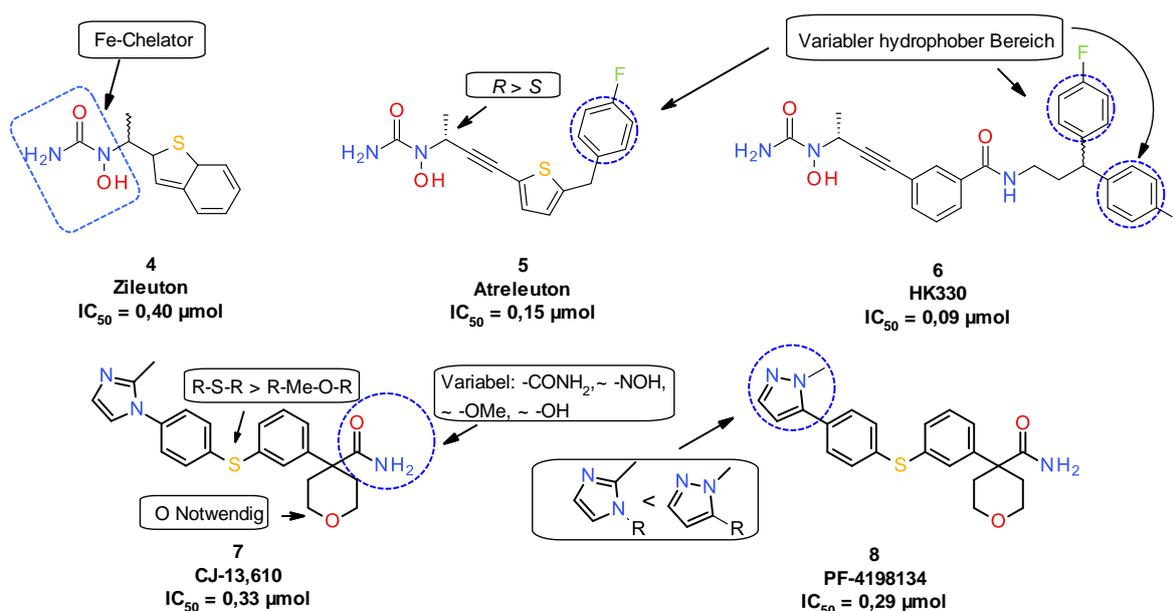


Abbildung 9: Literaturbekannte Inhibitoren der 5-LO Zileuton®, Atreleuton®, HK330, CJ13,610 und PF-4191834.

Daneben gibt es auch die allosterisch hemmenden Inhibitoren wie CJ-13,610. Dieser besteht aus einem Imidazolring, einem Thioarylether, einem Tetrahydropyranring (THP) und einem Amid, welches als funktionelle Gruppe variabel ist, ohne an Potenz zu verlieren. In verschiedenen präklinischen Studien zeigte CJ-13,610 eine Wirksamkeit im Carageenan-Schmerzmodell und seine antientzündliche Wirkung wurde durch einen reduzierten Leukotrien-Spiegel verknüpft. Des Weiteren wurde die Wirksamkeit gegen Atherosklerose in einem Rattenmodell gezeigt.⁴¹ Ein weiterer Vorteil ist, dass die Inhibition der 5-LO von CJ-13,610, nicht vom Grad der Phosphorylierung der 5-LO abhängt.⁴² Da mehrere Krankheiten, wie Asthma, Atherosklerose und bestimmte Typen von Krebs, wie chronische Leukämie, mit einem Anstieg der Phosphorylierung der 5-LO assoziiert sind, kann CJ-13,610 hier vorteilhaft

eingesetzt werden. Ein Nachteil von CJ-13,610 ist, dass einer der Metabolite **11** eine kovalente Bindung mit anderen Proteinen eingehen kann (**Abbildung 10**).^{42,43}

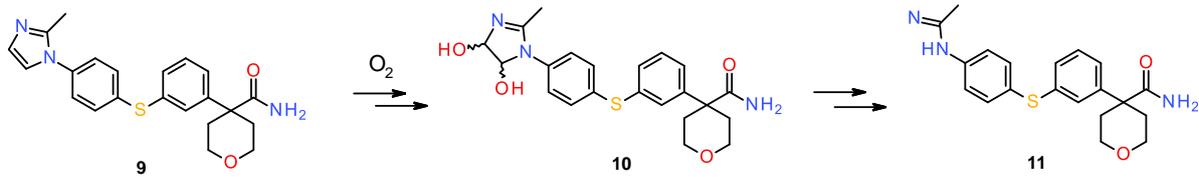


Abbildung 10: Einer der metabolischen Wege von CJ-13,610.

Eine Weiterentwicklung von CJ-13,610 stellt PF-4191834⁴⁴ mit einem $IC_{50} = 0,29 \mu\text{mol}$ dar, welcher statt des Imidazolrings einen Pyrazolring beinhaltet. PF-4191834 befand sich in der klinischen Phase II und sollte gegen Knie-Osteoporose und Asthma eingesetzt werden. Aufgrund von Nebenwirkungen (Stand 2014), die aber nicht auf den Wirkstoff zurückgeführt werden konnten, wurde die klinische Studie gegen Knie-Osteoporose abgebrochen.²⁴ Derzeit befindet sich PF-4191834 weiter in der klinischen Phase II als Wirkstoff gegen Asthma (Stand 2020).⁴⁵

Neben der Inhibition der 5-LO und der AA-Kaskade durch 5-LO Inhibitoren wurde auch weiterhin untersucht, welche Auswirkung, die 5-LO als inaktives Enzym hat.²² Hierbei wurde eine Verbindung zum WNT β -Catenin-Signalweg ermittelt, indem in Krebszelllinien ein Knock-Out und eine Inhibition der 5-LO mit Inhibitoren durchgeführt wurde. Es wurde hierbei herausgefunden, dass in Leukämiezellen eine Fehlregulierung der 5-LO mit einer Fehlregulierung des WNT β -Catenin-Signalweges einhergeht. Sowohl Zileuton[®] als auch CJ-13,610 konnten hierbei zeigen, dass durch die Inhibition der 5-LO, chronische Leukämie eingedämmt werden kann. Die katalytisch-inaktive 5-LO verhindert hierbei eine Translokation von β -Catenin, welches somit in der Zellmembran verbleibt.^{46,47} Da dieser Effekt allerdings zeitlich begrenzt ist, soll nun als neue Möglichkeit die PROTAC-Technologie zum Einsatz kommen, um durch Degradation der Überexpression der 5-LO entgegenzuwirken.

3. Zielsetzung

In der aktuellen Krebsforschung wurde eine Verbindung zwischen Leukämie und der 5-Lipoxygenase hergestellt.²² Bekannte Inhibitoren wie Zileuton® und CJ-13,610 konnten hierbei Einfluss zeigen, jedoch den Krebs an sich zu besiegen, vermögen sie nicht. An dieser Stelle sollen PROTACs ansetzen, die im Gegensatz zu gewöhnlichen Inhibitoren das Zielprotein nicht nur inhibieren, sondern auch zur Degradation dieser führen.

Das Ziel der Masterarbeit ist es, 5-LO-PROTACs zu designen, zu synthetisieren, und in Kooperation mit AK Steinhilber diese biochemisch zu evaluieren. Hierfür soll als 5-LO Inhibitor eine verkürzte Version des Eisen-chelatisierenden Inhibitors HK330 **12** synthetisiert und verwendet werden. Sowie der allosterisch hemmende Inhibitor CJ-13,610, dessen pharmakologisches Profil im AK Steinhilber gut untersucht ist.^{22,24,42} Anstelle des Amids in CJ-13,610 soll dieser mit einer Carbonsäure **13** hergestellt werden. Als Linker sollen bifunktionelle Polyethylenglykol-Linker **16-17** mit Kettenlängen von $n = 1-4$ und als E3-Ligand sowohl Thalidomid **14** als auch VHL **15** verwendet werden (**Abbildung 11**).

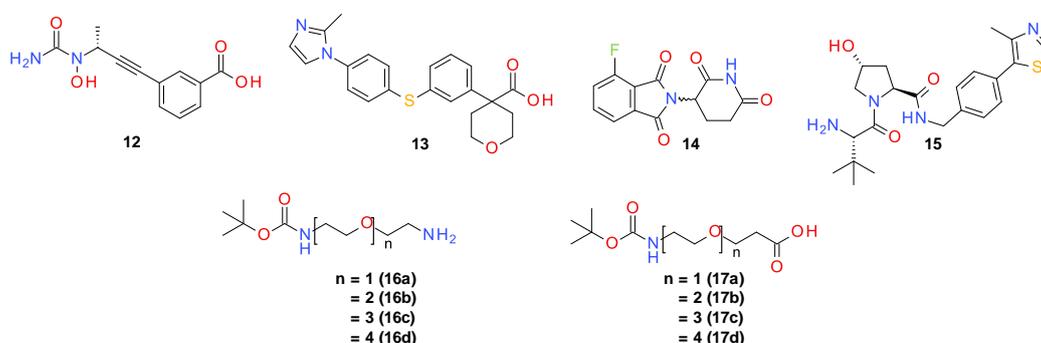


Abbildung 11: Bausteine zur Synthese von PROTACs.

Mit diesen Bausteinen ergeben sich bei gleichbleibenden Linker vier unterschiedliche Kombinationen **18-21**. Die Zielverbindungen sollen anschließend auf ihre Inhibition und Degradation untersucht werden (**Abbildung 12**).

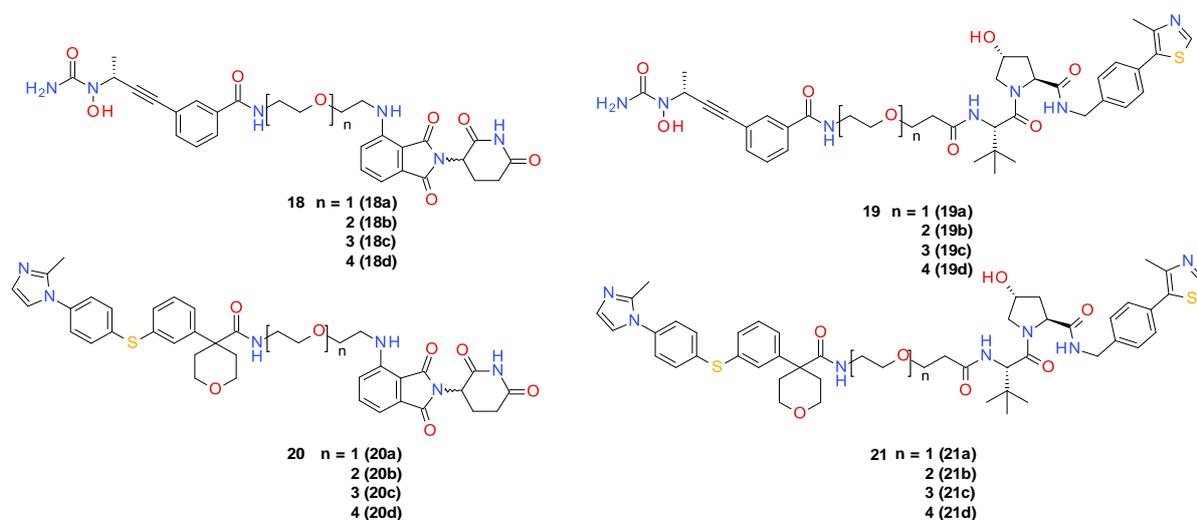


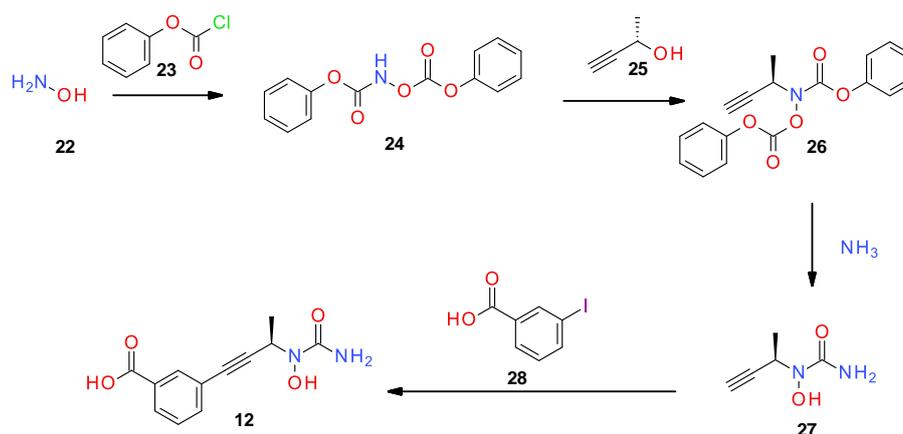
Abbildung 12: Strukturen der potenziellen PROTACs, welche in dieser Arbeit synthetisiert werden.

4. Synthesen und Reaktionsoptimierung

4.1 Syntheseplanung

Die Synthese der PROTACs sollte in vier parallelen Blöcken erfolgen, welche im letzten Schritt via Amid-Kupplung verknüpft werden. Als erstes soll die Synthese der verkürzten Version von HK330 (Block A), als zweites die Synthese von Thalidomid mit PEG-Linkern (Block B), gefolgt von der Synthese der VHL-Linker ausgehend vom VHL-Ligand (Block C) und zuletzt der Synthese des CJ-13,610 Derivates (Block D) erfolgen. Für Block D sollten zwei unterschiedliche Syntheserouten parallel durchgeführt werden.

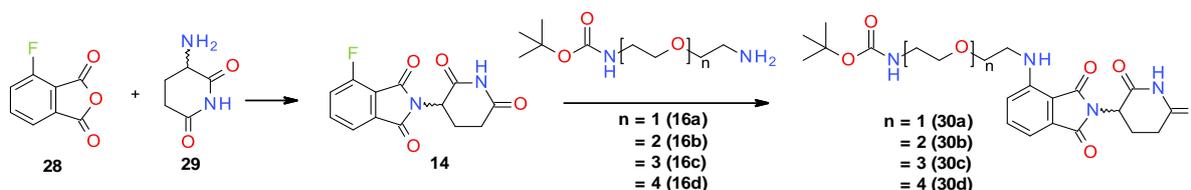
Die Reaktion des verkürzten HK330 Derivates beginnt beim Hydroxylamin-Hydrochlorid Salz. Der Syntheseweg wurde nach der Vorschrift von Hiesinger *et al.*⁴⁰ durchgeführt (**Schema 1**).



Schema 1: Synthese zur Darstellung des Inhibitor-Bausteins des PROTACs.

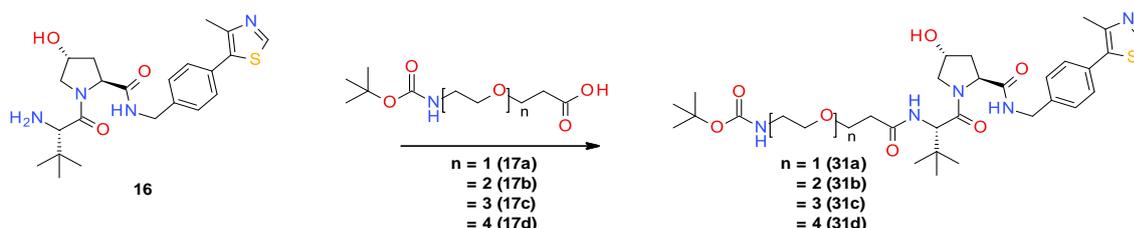
Die vierstufige Synthese erfolgt hierbei über eine Additionsreaktion, einer Mitsunobu-Reaktion, gefolgt von einer Ammonolyse und einer Sonogashira-Kupplung.

Die Synthese der Thalidomid-PEG-Linker erfolgt in zwei Stufen via nukleophiler Substitution (S_N) und nukleophiler aromatischer Substitution (S_NAr) (**Schema 2**).



Schema 2: Synthese des E3-Ligase-Liganden Thalidomid mit PEG-Linker.

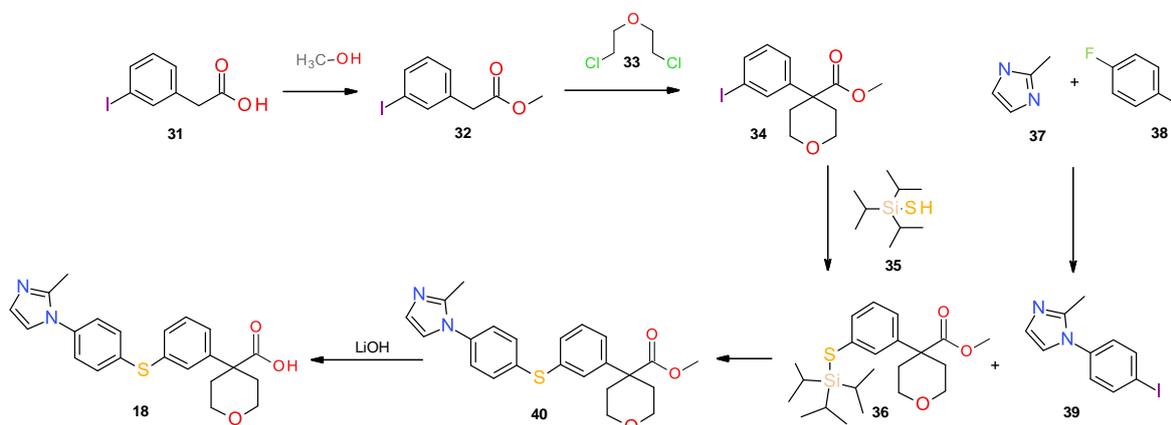
Für die VHL-PEG-Linker soll (*S,R,S*)-AHPC-Hydrochlorid, auch bekannt als VHL-Ligand, als Edukt genutzt werden. Die Synthese der Linker erfolgt hierbei über eine Amid-Kupplung (**Schema 3**).



Schema 3: Synthese des E3-Ligase-Liganden VHL mit PEG-Linker.

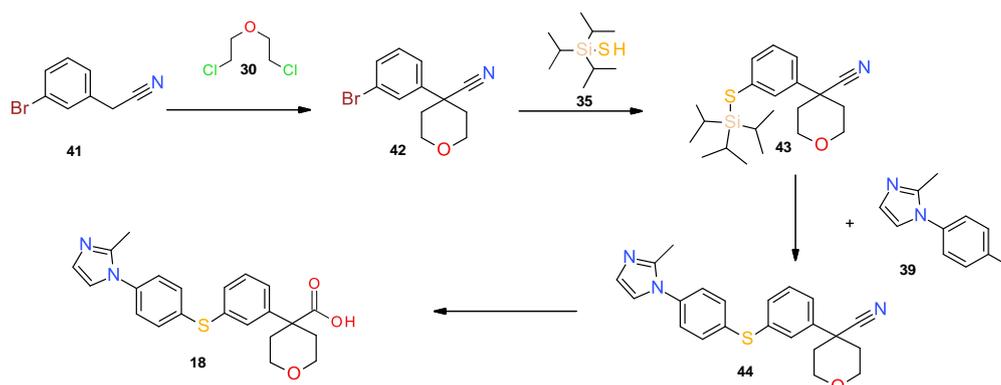
4. Synthesen und Reaktionsoptimierung

Für die Synthese des CJ-13,610 Derivates sollten zwei unterschiedliche Syntheserouten durchgeführt werden, welche auf den Synthesewegen von Mano *et al.*^{48,49} basieren (**Schema 4** und **Schema 5**). Für die Syntheseroute I diene die freie Carbonsäure **31** als Ausgangsmaterial, welche anschließend verestert werden soll. An den α -aziden Ester **32** soll nachfolgend der THP-Ring angebracht werden, um den ersten Baustein **34** für die zweifache Migita-Kupplung zu erhalten. Der zweite Baustein **39** wird aus Methylimidazol **37** und 1-Fluor-4-iodbenzol **38** via einer S_NAr gebildet. Für die zweifache Migita-Kupplung⁵⁰ soll zunächst **34** mit Triisopropylsilylthiol zu **36** gekuppelt werden. In der zweiten Migita-Kupplung wird anschließend, mit vorheriger *in situ* Freisetzung des Thiols, der erste Baustein **36** mit dem zweiten Baustein **39** gekuppelt. Zuletzt soll der Ester verseift werden, um die freie Carbonsäure zu regenerieren **18** (**Schema 5**).



Schema 4: Synthese des CJ-13,610 Derivates via Route I.

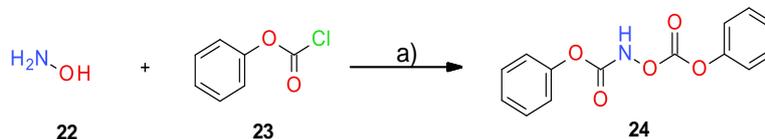
In der Syntheseroute II soll als Ausgangsmaterial 3-Bromacetonitrill **41** genutzt werden, welches Brom als kostengünstigere Alternative zu Iod enthält. Die Reaktionsschritte erfolgen analog zur Syntheseroute I. Im letzten Schritt wird jedoch hierbei das Nitril **44** zur Carbonsäure **18** verseift, um den Kupplungsbaustein D für die PROTACs zu erhalten (**Schema 5**).



Schema 5: Synthese des CJ-13,610 Derivates via Route II.

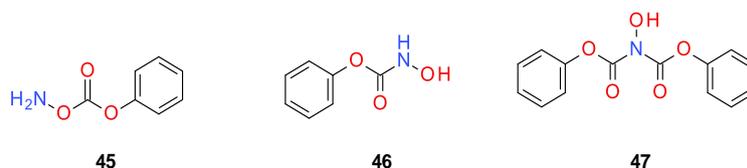
4.2 Synthese von 3-[(3R)-3-[Carbamoyl(hydroxy)amin]but-1-ynyl]benzoesäure (Block A)

Das Produkt in Block A besteht aus dem *N*-Hydroxylharnstoff, einer Benzoesäure und einem Alkin, welches die beiden Strukturelemente verknüpft. Ausgehend von Hydroxylamin-Hydrochlorid wurde *N*-Hydroxyharnstoff aufgebaut, gemäß der Syntheseroute von Hiesinger *et al.*⁴⁰ Hierzu wurde Hydroxylamin-Hydrochlorid **22** mit Phenylchlorformiat **23** umgesetzt (**Schema 6**)



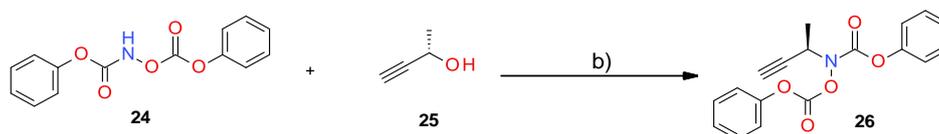
Schema 6: Nukleophile Addition a) (I) NaHCO₃, H₂O, 0 °C, 30 min, (II) NaHCO₃, H₂O, RT, 2 h, 42%.

Das Produkt **24** konnte durch Umkristallisation aus Ether und *n*-Hexan über Nacht erhalten werden. Es wurde festgestellt, dass die Mutterlösung hierbei noch Produkt enthält, welches mittels Flash-Chromatographie daraufhin aufgereinigt wurde. Zu den 2,4 g die durch Umkristallisation erhalten wurden, kamen 0,9 g hinzu. Das Produkt wurde insgesamt nur mit einer Ausbeute von 42% erhalten. Ein Grund für die geringe Ausbeute könnte sein, dass folgende Nebenprodukte entstanden sind (**Schema 7**). Es wurden zwar mittels DC vier Spots identifiziert, jedoch nur das Produkt isoliert.



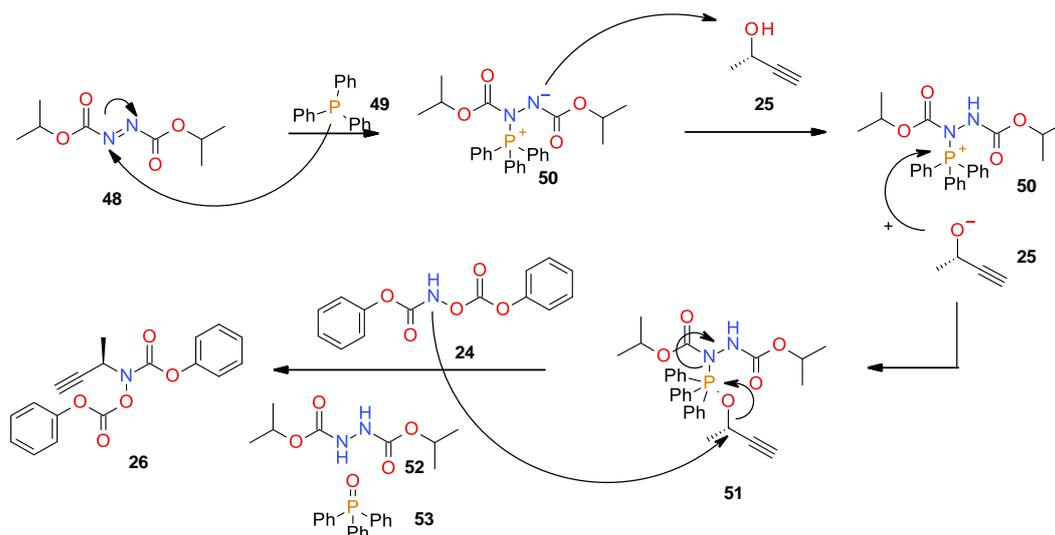
Schema 7: Mögliche Nebenprodukte in der Nukleophilen Addition.

Der nächste Schritt war die Mitsunobu-Reaktion mit Triphenylphosphin (PPh₃) und Azodicarbonsäurediisopropylester (DIAD) als Reagenzien.



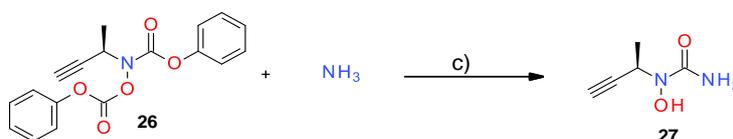
Schema 8: Mitsunobu-Reaktion b) (I) PPh₃, THF 0 °C, (II) DIAD, THF 0 °C → RT, 3 h, 74%.

Ausgangsmaterial war hierbei kommerziell erhältliches (*S*)-3-Butin-2-ol **25**. Bei der zugrunde liegenden Reaktion erfolgt eine Inversion des Stereozentrums. Ein möglicher Mechanismus der Mitsunobu-Reaktion⁵¹ ist im **Schema 9** gezeigt. DIAD wird hierbei zunächst von Triphenylphosphin **49** nucleophil angegriffen. Es entsteht ein quartäres Phosphoniumion **50**. Nach Deprotonierung von **25** durch **50** wird dieses von **25** nucleophil angegriffen, es entsteht hierbei **51**. Anschließend greift das Amin nucleophil **51** an. Unter Inversion des Stereozentrums erfolgt nun, in einem S_N2-Mechanismus, die Bildung des Produktes **26**, in der auch **52** und **53** abgespalten werden.



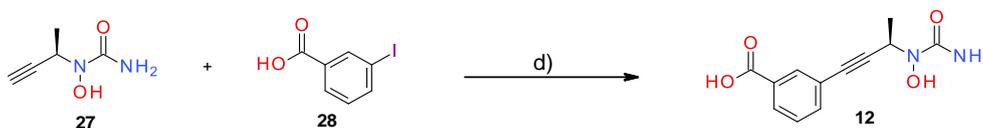
Schema 9: Mitsunobu-Mechanismus.

In der Mitsunobu-Reaktion konnte **26** in einer Ausbeute von 74% erhalten werden. Für den nächsten Schritt wurde **26** in einen Autoklav überführt und gekühlt durch Flüssigstickstoff bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ gasförmiger Ammoniak 5 min lang einkondensiert. Der Reaktionsansatz wurde bei 10 bar über Nacht bei RT gerührt (**Schema 10**). Bei der Reaktion wird durch einen nucleophilen Angriff von Ammoniak am Carbonyl-Kohlenstoff der *N*-Hydroxyharnstoff **27** freigesetzt.



Schema 10: Ammonolyse *c)* NH_3 (g), Isopropanol, $-196\text{ }^{\circ}\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 1 bar \rightarrow 10 bar, ÜN, 81%.

Durch Anfärben mit iodhaltigen Kieselgel, welches sich in Doppel und Dreifachbindungen einlagert, wurde das Produkt **27** auf der DC identifiziert. Nach Säulenchromatographie wurde **27** mit 81% Ausbeute erhalten. In der anschließenden Palladium-katalysierten Sonogashira-Kupplung wurde **27** mit **28** verknüpft (**Schema 11**).



Schema 11: Sonogashira-Kupplung *d)* $\text{Pd(II)(ACN)}_2\text{Cl}_2$, PPh_3 , CuI, DIPA, EE, RT, 16 h, 79%.

Tabelle 1: Reaktionsbedingungen der Sonogashira-Kupplung ^[d].

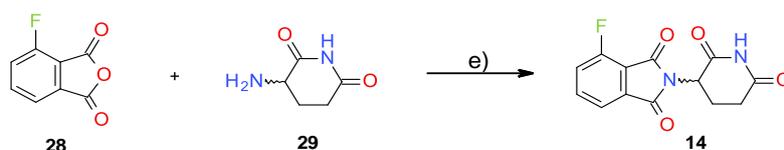
Nr.	18	Base	Zeit	Ausbeute
RK5	50 mg, 0,39 mmol, 1,1 Äq	DIPA	3 d	-
RK8	50 mg, 0,39 mmol, 1,1 Äq	DIPA	16 h	79%
RK17	50 mg, 0,39 mmol, 1,1 Äq	DIPA	16 h	79%,
RK23	50 mg, 0,39 mmol, 1,1 Äq	DIPEA	16 h	17%

[d] 1,0 Äq **28**, 2 mol% $\text{Pd(II)(ACN)}_2\text{Cl}_2$, 4 mol% PPh_3 , 4 mol% CuI, 5,0 Äq DIPA, EE, RT.

Bei der Kupplungsreaktion wurden Base und Reaktionszeit variiert (**Tabelle 1**). Als ideale Bedingungen erwiesen sich eine Reaktionszeit von 16 h und Diisopropylamin (DIPA) als Base. Nach einer halben Stunde fiel bei der Reaktion ein brauner Niederschlag aus, das Produkt konnte hierbei allerdings noch nicht festgestellt werden. Erst nach Rühren über Nacht konnte dies detektiert werden. Das Produkt **12** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung als Baustein A in der Synthese von PROTACs verwendet.

4.3 Synthese von Thalidomid-Linkern (Block B)

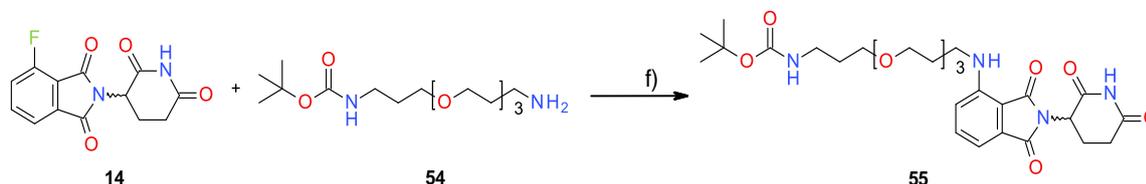
Die Synthesen erfolgte angelehnt an Kehm *et al.*⁵² mit der Darstellung des Thalidomid-Derivates. Hierfür wurde 4-Fluor-isobenzofuran-1,3-dion **28** und 3-Amin-piperidin-2,6-dion **29** (Racemat) kommerziell erworben. Durch eine nucleophile Substitution wurde das Produkt erhalten (**Schema 12**).



Schema 12: S_N Thalidomid-Bildung e) Pyridin, 110 °C, ÜN, 36%.

Pyridin war hierbei das Lösungsmittel und zugleich Base in der Reaktion. Das Produkt wurde nur in moderater Ausbeute erhalten.

Für die Synthese von Thalidomid-Linkern wurden PEG-Einheiten mit $n = 1-4$ und ein PEG-Linker mit Propyleinheiten am Anfang und am Ende verwendet. Die Reaktionsoptimierung fand hierbei bei letzterem Linker statt (**Schema 13**).



Schema 13: S_NAr Linker-Kupplung f) DIPEA, DMF, 115 °C, ÜN, 53%.

Es wurde das Lösungsmittel und die Temperatur variiert. Base und Reaktionszeit wurden hierbei konstant gehalten. Mit DMF als Lösungsmittel und einer Reaktionsführung bei 115 °C konnte eine Ausbeute von 53% erzielt werden. Niedrigere Temperaturen und andere Lösungsmittel waren hierbei schlechter (**Tabelle 2**).

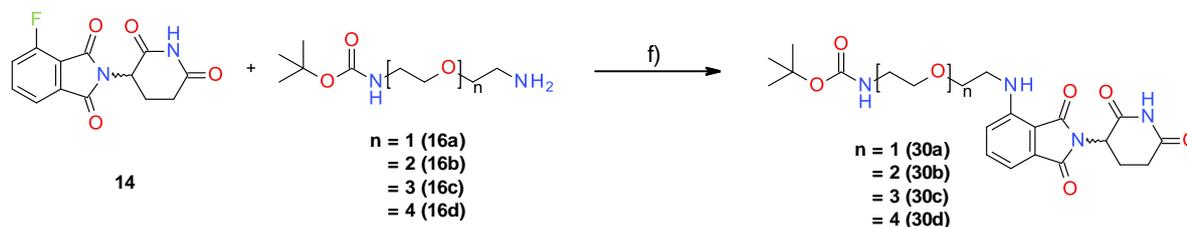
Tabelle 2: Reaktionsbedingungen der S_NAr [f].

Nr.	23	Lösungsmittel	T [°C]	Ausbeute
RK13	50 mg, 0,18 mmol, 1 Äq	NMP	80 °C	29%
RK16	50 mg, 0,18 mmol, 1 Äq	THF	60 °C	17%
RK20	100 mg, 0,36 mmol, 1 Äq	DMF	115 °C	53%

[f] 1 Äq **52**, 2 Äq DIPEA, ÜN.

4. Synthesen und Reaktionsoptimierung

Mit den optimierten Reaktionsbedingungen wurden die restlichen Linker gekuppelt. Zukünftig könnten längere Reaktionszeiten oder DMSO als Lösungsmittel ausprobiert werden, um möglicherweise bessere Ausbeuten zu erzielen.

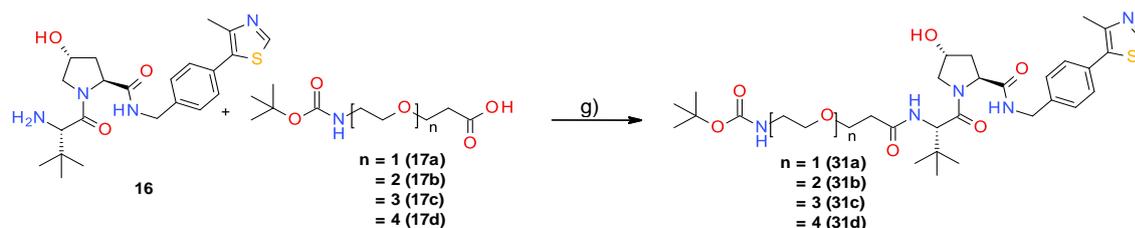


Schema 14: S_NAr f) DIPEA, DMF, 110 °C, ÜN, 51-59%.

Die Ausbeuten für die restlichen Linker waren mit derselben Reaktionsführung konstant mit der schlechtesten Ausbeute von 51% für **30b** und der besten Ausbeute von 59% für **30d** (**Schema 14**).

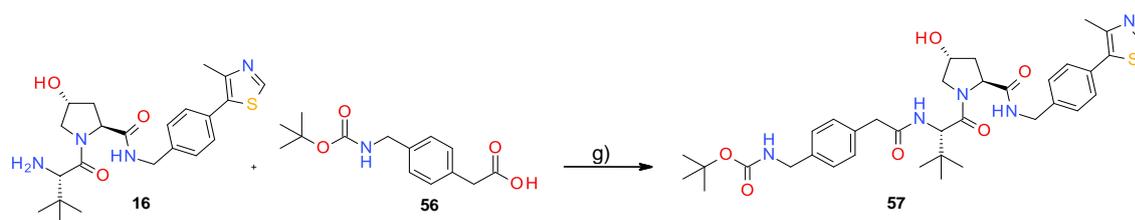
4.4 Synthese von VHL-Linkern (Block C)

Die Synthese von VHL-Linkern erfolgte von (S,R,S)-AHPC-Hydrochlorid (**Schema 15**). Die VHL-Linker wurden hierbei via Amid-Kupplung mittels Kupplungsreagenzien dargestellt, angelehnt an die Synthese von Hiesinger *et al.*⁴⁰



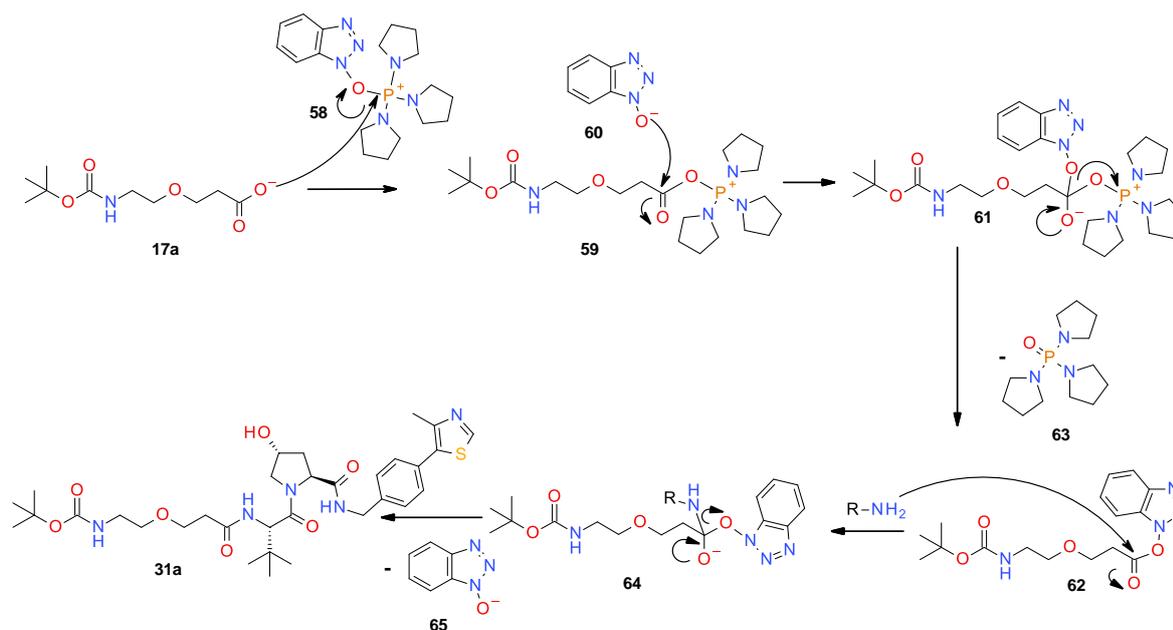
Schema 15: Amid-Kupplung g) PyBOP, HOBT-H₂O, DIPEA, pH > 9, DMF, 0 °C, 10 min, 60 °C MW, 30 min, 43-78%.

Die Amid-Kupplungen erfolgten hierbei in einem Mikrowellenofen (MW), welche die Reaktionszeit von 16 h bei RT auf 30 min bei 60 °C verkürzt hat. Neben den PEG-Linkern wurde noch ein Benzyl-Linker **56** an VHL **16** gekuppelt (**Schema 16**).



Schema 16: Amid-Kupplung PyBOP, HOBT-H₂O, DIPEA, pH > 9, DMF, 0 °C, 10 min, 60 °C MW, 30 min, 68%.

Die Amid-Kupplung lief hierbei vermutlich nach folgendem Mechanismus ab. Die unter basischen Bedingungen deprotonierte Säure **17a** greift nucleophil PyBOP **58** an, wodurch ein aktiver Phosphat-Ester **59** gebildet wird. Anschließend greift HOBT **60** nucleophil das Carbonyl-Kohlenstoff an und bildet einen OBt-Aktiv-Ester **62**. Im letzten Schritt kann nun das Amin nucleophil den Aktiv-Ester unter Bildung des Produktes **31a** angreifen (**Schema 17**).⁵³

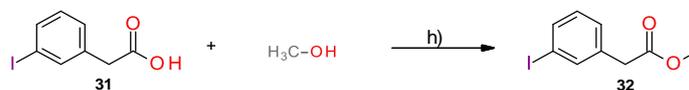


Schema 17: Mechanismus der Amid-Kupplung.

Für die Amid-Kupplungen konnten insgesamt gute Ausbeuten erzielt werden. Die VHL-Linker wurden anschließend als Baustein C zur Synthese von PROTACs verwendet.

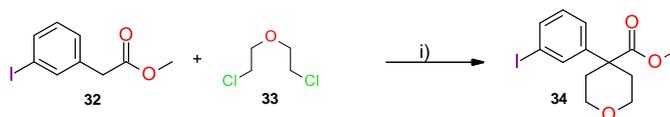
4.5 Synthese des CJ-13,610-Derivates via Syntheseroute I (Block D)

Die Synthese des CJ-13,610-Derivates begann bei der freien Säure **31**, welche im ersten Schritt verestert wurde **32** (Schema 18).



Schema 18: Veresterung h) MeOH, H₂SO₄, 90 °C, 97%.

Nach erfolgreicher Veresterung sollte der THP-Ring mit Bis(2-chlorethyl)ether **33** am α -aziden Kohlenstoff von **32** aufgebaut werden (Schema 19).



Schema 19: S_N THP-Ringbildung i) 60% NaH in Mineralöl, abs. DMSO, 10 °C → RT, 2 h, 37%.

Die ursprünglichen Reaktionsbedingungen, welche eine Reaktionsführung in DMF, Natriumhydrid, Kaliumiodid und 15-Krone-5-Ether vorsahen, konnten nicht reproduziert werden, dementsprechend wurden eine Reaktionsoptimierung durchgeführt (Tabelle 3).

4. Synthesen und Reaktionsoptimierung

Tabelle 3: Reaktionsoptimierung zur Synthese des THP-Rings. [i]

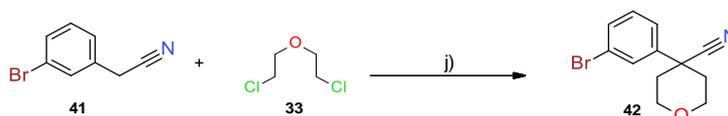
Nr.	29	Base	Lösungsmittel	T [°C]	Zeit	Ausbeute
RK40	185 mg, 0,67 mmol, 1,0 Äq	NaH 2,2 Äq	DMF	RT	2 h	-
RK41	320 mg, 1,16 mmol, 1,0 Äq	NaH 2,2 Äq	DMF	RT	ÜN	-
RK42	270 mg, 0,97 mmol, 1,0 Äq	NaH 2,2 Äq	DMSO	RT	2 h	13%
RK46	249 mg, 0,90 mmol, 1,0 Äq	CsCO ₃ , 3 Äq	DMSO	100 °C	ÜN	-
RK47	170 mg, 0,61 mmol, 1,0 Äq	NaH 2,2 Äq	DMSO	RT	ÜN	-
RK102	475 mg, 1,72 mmol, 1,0 Äq	NaH 2,2 Äq	THF	RT	2 h	-
RK104	630 mg, 2,28 mmol, 1,0 Äq	NaH 2,2 Äq	abs. DMSO	RT	2 h	37%

[i] Bis(2-chlorethyl)ether 1,2 Äq. Bei **RK104** wurde anstelle von 99%, 99,99 % trockenes DMSO verwendet. Bei **RK102** wurde **31** erhalten.

Eine Verlängerung der Reaktionsdauer (siehe **Tabelle 3**, **RK41**) hat keinen Unterschied zum vorangegangenen Ansatz (**RK40**) gezeigt. Aufgrund dessen wurde das Lösungsmittel geändert und die Reaktionsbedingungen des Synthesewegs mit dem Nitril-Analog anstelle des Esters übernommen. Hier konnte das Produkt nur in geringer Ausbeute erhalten werden (**RK42**). Eine Variation der Base und Temperatur (**RK46**) oder eine Verlängerung der (**RK47**) Reaktionsdauer haben keinen Umsatz erzielt. Da zu diesem Zeitpunkt Syntheseroute II weiter fortgeschritten war, wurde dieser Syntheseweg abgebrochen. In späteren Versuchsreihen mit THF (**RK102**) konnte durch Ansäuern der wässrigen Phase bei der Aufarbeitung herausgefunden werden, dass **31** als Hauptprodukt entstanden war und somit der Ester verseift wurde. Mit dieser Erkenntnis wurde mit 99,99% trockenem DMSO die Reaktion erneut durchgeführt, in der schlussendlich 37% der Zielverbindung **34** erhalten werden konnte.

4.6 Synthese des CJ-13,610 Derivates via Syntheseroute II (Block D)

Ausgehend vom Nitril sollte der THP-Ring gebildet werden. Die Reaktion konnte nach Literaturvorschrift dargestellt werden.



Schema 20: Schema 21: S_N THP-Ringbildung j) 60% NaH in Mineralöl, DMSO, 10 °C → RT, 2 h, 73%.

Das Produkt konnte in guter Ausbeute erhalten werden. Als nächstes wurde der zweite Baustein für die zweifache Migita-Kupplung hergestellt, welcher über S_NAr erhalten werden konnte.



Schema 22: S_NAr k) 60% NaH in Mineralöl, DMSO, 30 min RT, 110 °C, 16 h, 66%.

Mit der Literaturvorschrift wurde nur eine Ausbeute von 5% erzielt. Bei der Reaktionsoptimierung wurde die Base und das Lösungsmittel variiert, um Produkt **39** in besseren Ausbeuten zu erhalten (**Tabelle 4**).

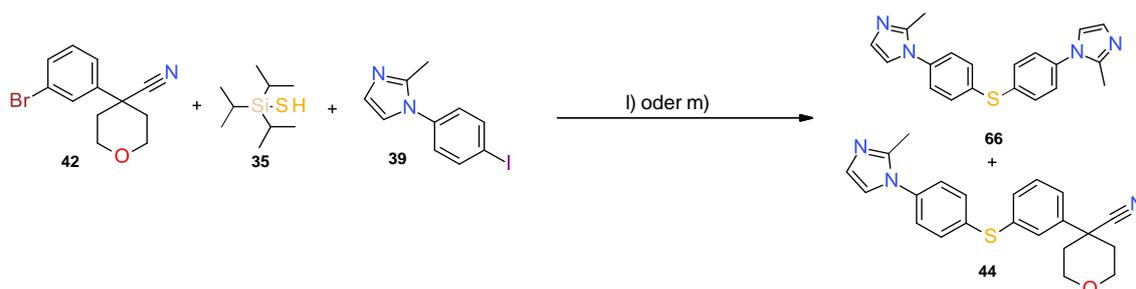
Tabelle 4: Reaktionsoptimierung S_NAr [k]

Nr.	34	Base	Lösungsmittel	Ausbeute
RK33	250 mg, 2,95 mmol, 1,0 Äq	NaH	DMF	5%
RK35	250 mg, 2,95 mmol, 1,0 Äq	DIPEA	DMF	-
RK39	250 mg, 2,95 mmol, 1,0 Äq	NaH	DMSO	53%
RK53	900 mg, 10,6 mmol, 1,0 Äq	NaH	DMSO	66%

[k] 1,0 Äq 1-Fluor-4-iodbenzol. 30 min RT, 16 h, 110 °C. Als Base wurden entweder 1,2 Äq 60% NaH in Mineralöl oder 3 Äq DIPEA verwendet.

Mit einem Austausch der Base durch DIPEA konnte kein Umsatz erzielt werden (**RK35**). Jedoch führte der Austausch des Lösungsmittels zu einer akzeptablen Ausbeute (**RK39**), welche im Zuge eines Up-scaling verbessert werden konnte (**RK53**). Unterschied hierbei war die Konzentration, der gelösten Stoffe, da die Menge des Lösungsmittels konstant mit 5 mL gehalten wurde.

Als nächsten Schritt konnte nun die zweifache Migita-Kupplung zur Darstellung des Thioarylerthers durchgeführt werden. Hierbei wurde in der Synthesevorschrift keine Aufreinigung des Zwischenproduktes vorgenommen und das Zwischenprodukt weiter in der zweiten Migita-Kupplung eingesetzt.

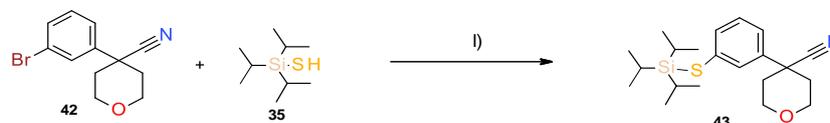


Schema 23: Zweifache Migita-Kupplung l) (I) $Pd(Ph_3)_4$, 60% NaH in Mineralöl, THF/Toluol 1:1, 0 °C, 10 min, 100 °C, 2 h, (II) $Pd(Ph_3)_4$, $KOtBu$, Ethanol, 80 °C, $\bar{U}N$, < 13%; m) (I) $Pd(dppf)Cl_2 \cdot CH_2Cl_2$, 60% NaH in Mineralöl, THF/Toluol 1:1, 0 °C, 10 min, 100 °C, 2 h, (II), $Pd(dppf)Cl_2 \cdot CH_2Cl_2$, $KOtBu$, CsF, 1,4-Dioxan, 100 °C, $\bar{U}N$ < 3 %.

Zunächst wurde der literaturverwendete Katalysator Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) verwendet. Das Zwischenprodukt der ersten Migita-Kupplung wurde hierbei nicht isoliert, sondern nur über Celite® gefiltert und für die zweite Kupplung eingesetzt. Hierbei konnte das Produkt **44** zwar detektiert werden, allerdings nicht sauber isoliert werden. Demgegenüber stand die Reaktionsführung m) angelehnt an Rodriguez *et al.*⁵⁴ und Murata *et al.*⁵⁵, die beide ein Screening der Migita-Reaktion durchgeführt haben, in denen mit bidentalen Liganden Ausbeuten über 90% erzielt werden konnten. Ein Derivat von den verwendeten Liganden ist [1,1'-Bis-(diphenylphosphin)-ferrocen]-dichlorpalladium(II) Dichlormethan, welcher als Katalysator mit Liganden gewählt wurde. Diese Reaktionsführung blieb allerdings zunächst auch ohne Erfolg. Stattdessen konnte in beiden Ansätzen Nebenprodukt **66** mittels NMR-Spektroskope und Massenspektrometrie ermittelt werden. Von diesem Nebenprodukt wurde schon im Zuge eines Up-scalings der Syntheseroute berichtet.^{56,57} Ein weitere Hürde war, dass **39** und **44** ein ähnliches Laufverhalten aufwiesen und somit schwer zu trennen waren.

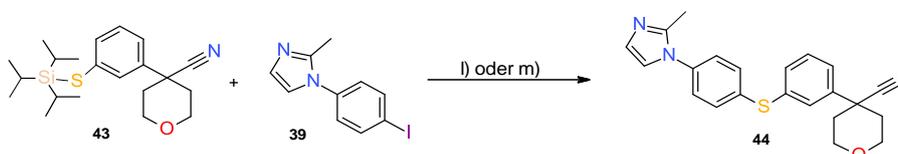
4. Synthesen und Reaktionsoptimierung

Da festgestellt wurde, dass sich das Nebenprodukt **66** gebildet hat, welches entweder durch überschüssiges TIPS-Thiol oder einer folgenden Palladium-katalysierten Reaktion aus **44** entstanden sein könnte, wurde in nachfolgenden Ansatz beschlossen das Zwischenprodukt aufzureinigen (**Schema 24**).



Schema 24: Migita-Kupplung I) (I) $\text{Pd}(\text{Ph}_3)_4$, 60% NaH in Mineralöl, THF/Toluol 1:1, 0 °C, 10 min, 100 °C, 2 h, 52%.

Die Isolierung der Zwischenstufe erfolgte aufgrund der berichteten Instabilität gegenüber Wasser ohne wässrige Aufarbeitung mittels Flash-Chromatographie.⁵⁶ Das Produkt konnte nun für die zweite Migita-Kupplung eingesetzt werden. TIPS wird hierbei unter basischen Bedingungen *in situ* abgespalten. Caesiumfluorid fungiert im Reaktionsansatz m) (II) als additives Entschützungsreagenz (**Schema 25**).



Schema 25: Zweite Migita-Kupplung (I) (II) $\text{Pd}(\text{Ph}_3)_4$, KOtBu, Ethanol, 80 °C, ÜN, 25%; m) (II) $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2 \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$, KOtBu, CsF, 1,4-Dioxan, 100 °C, ÜN, 75%.

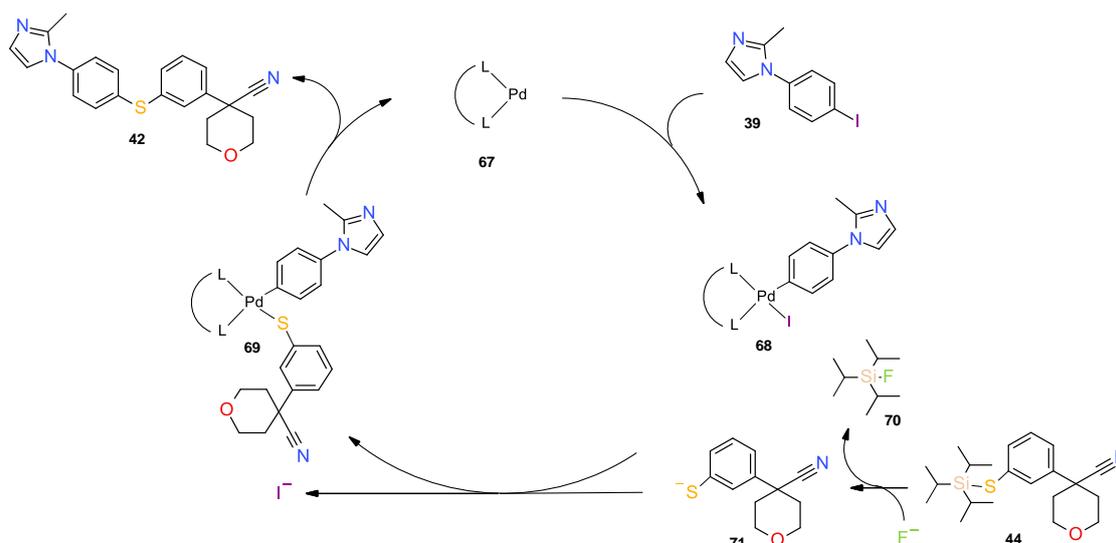
Verbindung **66** ist bei diesen Reaktionsansätzen nicht mehr aufgetreten, was somit auf überschüssiges TIPS-Thiol zurückzuführen war. Das Produkt konnte sauber isoliert werden, indem bei der Flash-Chromatographie eine längere Zeit ein konstantes Verhältnis von *n*-Hex/EE benutzt wurde, bis **39** nicht mehr detektierbar war, anschließend konnte das Laufmittel auf EE/MeOH gewechselt werden, um **44** als Reinfraction zu eluieren.

Tabelle 5: Reaktionsbedingungen der zweiten Migita-Kupplung.^{[I],[m]}

Nr.	34	Katalysator	Base	Lösungsmittel	Ausbeute
RK75	275 mg, 0,73 mmol, 1 Äq	$\text{Pd}(\text{Ph}_3)_4$	KOtBu	Ethanol	25%
RK98	98 mg, 0,26 mmol, 1 Äq	$\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2 \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$	KOtBu, CsF	DMF	75%

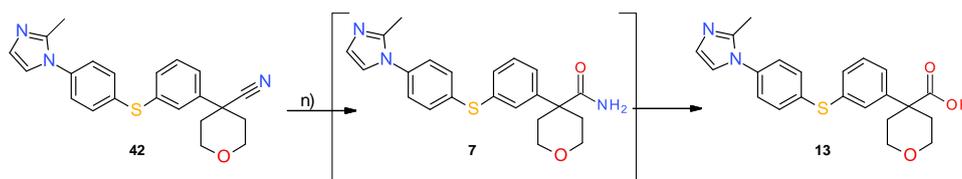
[I],[m] 1 Äq **39**, 3 mol% Katalysator, für **RK75**, 80 °C, ÜN, für **RK98** 100 °C, ÜN.

Im Vergleich zur Syntheseroute aus der Originalpublikation⁴⁸ konnte die Ausbeute von 25% auf 75% erheblich gesteigert werden (**Tabelle 5**). Die Migita-Kupplung verläuft hierbei vermutlich nach folgenden Mechanismus ab.⁵⁷ Zunächst wird **39** durch eine oxidative Addition an den Katalysator addiert. Nachdem **44** durch Fluorid entschützt wurde, erfolgt eine Transmetallierung am Katalysator, wobei Iodid durch das Thiol ersetzt wird. Zuletzt erfolgt eine reduktive Eliminierung, in der das Produkt **42** erhalten und der Katalysator regeneriert wird (**Schema 26**).



Schema 26: Mechanismus der Migita-Kupplung mit $\text{PdL}_2 = \text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2 \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$ als Katalysator.

Letzter Schritt war die Verseifungsreaktion, welche säurekatalysiert oder basenkatalysiert, mit dem Amid **7** (CJ-13,610) als Zwischenstufe ablaufen kann (**Schema 27**).



Schema 27: Verseifung n) 4 molare NaOH, $\text{H}_2\text{O}/\text{Ethanol}$ 1:1, MW, $120\text{ }^\circ\text{C}$, 5 h, 5 bar, 54% - quantitativ.

Zunächst wurde die Originalvorschrift für CJ-13,610 angewendet und das ursprüngliche Lösungsmittel Ethylenglykol durch ein 1:1 Gemisch aus Ethylenglykol und Wasser ersetzt. Nach 2 d Reaktionszeit konnte mittels HPLC jedoch nur ein Reaktionsumsatz von 30% ermittelt werden (**RK77**). Der zweite Ansatz war angelehnt an Poux *et al.*⁵⁸ in der mikrowellenassistierte Verseifungsreaktion von Nitrilen durchgeführt wurden (**Tabelle 6**).

Tabelle 6: Reaktionsbedingungen der Verseifung ^[n]

Nr.	42	Base	Lösungsmittel	Zeit	T	Umsatz
RK77	18 mg, 48 μmol , 1 Äq	KOH	Ethylenglykol/ H_2O	2 d	$120\text{ }^\circ\text{C}$	30%
RK81	55 mg, 146 μmol , 1 Äq	NaOH	Ethanol/ H_2O	5 h	$120\text{ }^\circ\text{C}$	quant.

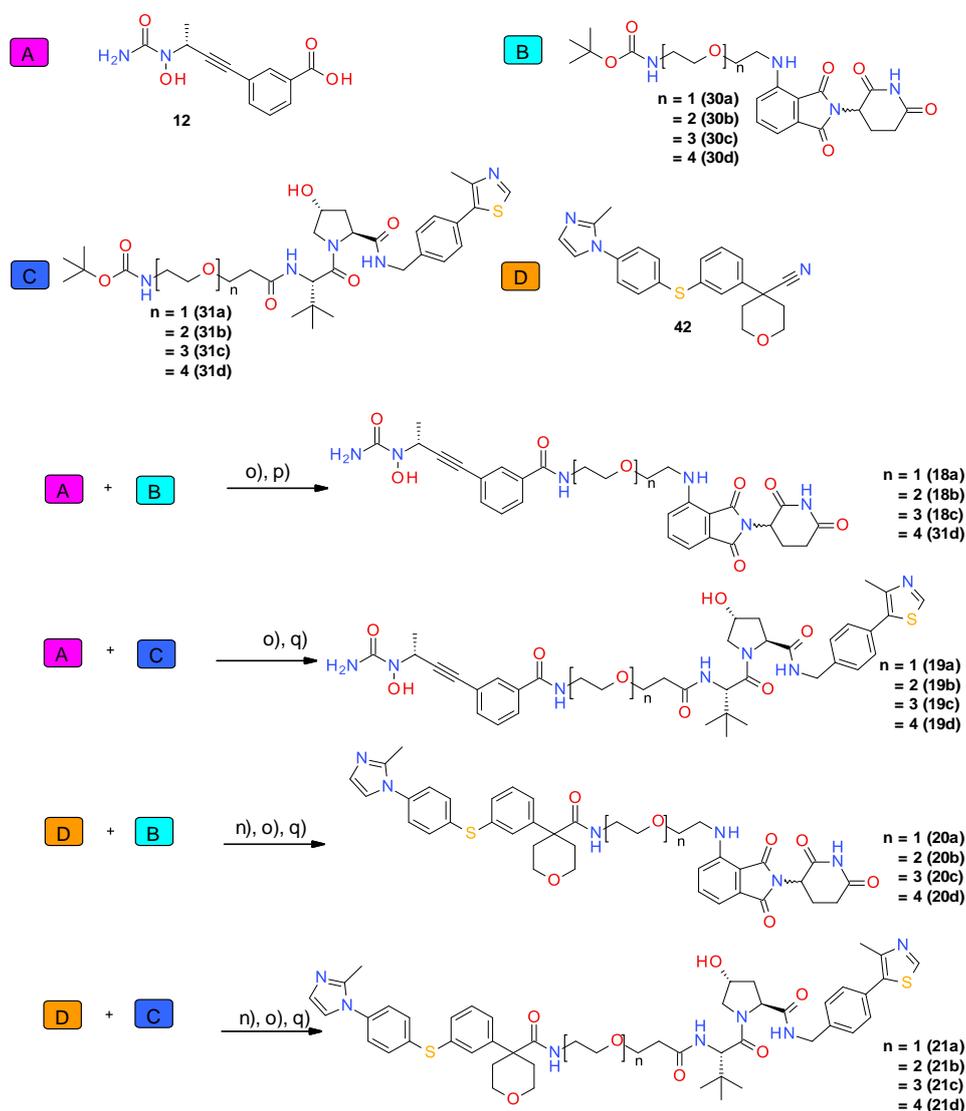
[n] 4 molare KOH/NaOH, für **RK81** mittels MW bei 5 bar.

Beim Reaktionsansatz **RK81** wurde als Lösungsmittel Ethanol zugegeben, da sich das Edukt nicht in Wasser löste und Ethylenglykol, als hochsiedendes Lösungsmittel, welches somit schwer zu entfernen ist, vermieden werden konnte. Nach 1 h wurde eine Reaktionskontrolle mittels HPLC durchgeführt, in der ein 1:1 Gemisch aus den Produkten **7** und **13** festgestellt wurde und nach 5 h der vollständige Umsatz zu **13**. In späteren Ansätzen dieser Reaktion wurde beobachtet, dass sich nach 5 h Stehen bei RT ein weißer Niederschlag absetzte und sich dabei eine orangefarbene organische Phase aus Ethanol bildete. Diese wurde dekantiert und mittels HPLC untersucht. Es zeigte sich, dass sich 99% des Produktes in dieser Phase befand und insofern der weiße Niederschlag aus anorganischen Salzen

bestand. Somit konnte nach Entfernen des Lösungsmittels **13** ohne Aufarbeitung erhalten werden. Mit dem Nitril **42** oder der Säure **13** als Baustein D konnten nun alle vier möglichen Kombinationen an PROTACs geknüpft werden.

4.7 Synthese von PROTACs

Für die Synthese der PROTACs wurden zwei Reaktionsprodukte der Blöcke A, B, C, und D via Amid-Kupplung miteinander verknüpft (**Schema 28**). Die Linker **55** und **57**, wurden ebenfalls als Kupplungsbaustein **B** und **C** verwendet (nicht im **Schema 28** zu sehen). Für die Kupplung wurde eine *in situ* Boc-Entschützung des Thalidomid- und VHL-Linkers vorgenommen und für das CJ-13,610-Derivat eine *in situ* Verseifung. Die Kupplung erfolgte entweder ÜN bei RT oder mikrowellenassistent 1 h bei 60 °C. Für **RK19** und **RK28** wurden Reaktionsbedingungen der Entschützung und der Kupplung variiert, um das Optimum herauszufinden (**Tabelle 7**).



Schema 28: Allgemeines Kupplungsschema $n) 4$ molare NaOH, H₂O/Ethanol 1:1, MW, 120 °C, 5 h, 5 bar, o) TFA, DCM 0 °C → RT, 1-4 h, p) PyBOP, HOBT·H₂O, DIPEA, pH > 9, DMF, 0 °C, 10 min, RT, ÜN, q) PyBOP, HOBT·H₂O, DIPEA, pH > 9, DMF, 0 °C, 10 min, RT, 1 h, MW, 60 °C, 11-75%.

Tabelle 7: Reaktionsoptimierung der PROTAC-Amid-Kupplung [p]

Nr.	17d	Entschützung	Kupplung	Ausbeute
RK24	35 mg, 58 μmol , 1,2 Äq	TFA/DCM	THF	6%
RK26	5 mg, 8, μmol , 1,2 Äq	TFA/DCM	DMF	21%
RK29	29 mg, 45 μmol , 1,2 Äq	HCl/1,4-Dioxan	DMF	12%
	55	Entschützung	Kupplungsreagenz	Ausbeute
RK11	25 mg, 40 μmol , 1,2 Äq	TFA/DCM	HATU	-
RK19	18 mg, 31 μmol , 1,2 Äq	TFA/DCM	PyBOP, HOBt·H ₂ O	27%

[p] für 17d (RK24, RK26, RK29) wurde das Lösungsmittel für die Amid-Kupplung und für 55 (RK11, RK19) das Kupplungsreagenz variiert.

Ein Wechsel des Lösungsmittels von THF (RK24) zu DMF (RK26) hat hierbei die Ausbeute leicht erhöht. Um auszuschließen, dass das Triflatsalz aus der Entschützung die Amid-Kupplung beeinträchtigt, wurde mit HCl/1,4-Dioxan eine Entschützung durchgeführt (RK29), in der jedoch eine geringere Ausbeute nach der Amid-Kupplung erzielt wurde. Ob sowohl das Triflatsalz als auch die Chloridionen einen Einfluss haben, konnte somit nicht herausgefunden werden. Eine Aufarbeitung der entschützten Linker wurde nicht durchgeführt, da diese bei der Extraktion in der wässrigen Phase verblieben wären. Ein Wechsel des Kupplungsreagenz-Systems von PyBOP, HOBt zu HATU führte zu einem Umsatzverlust (RK11). In späteren Ansätzen wurde das Reaktionssystem anstelle von Rühren ÜN bei RT auf 1 h bei 60 °C mittels Mikrowellenstrahlung ersetzt. Eine Steigerung der Ausbeute konnte zwar nicht beobachtet werden, dafür wurde die Reaktionszeit verkürzt. Für die Reaktionen des CJ-13,610-Derivates konnte die Verseifungsreaktion *in situ* ohne Ausbeuteverlust integriert werden. Überreste von Natronlauge haben bei dieser Reaktion nicht gestört. Die Aufreinigung aller Endverbindungen erfolgte über die präparative HPLC. Es wurden hierbei folgende Endverbindungen erhalten (Abbildung 13). Die Reaktionsbedingungen und Ausbeuten sind hierbei in Tabelle 8 zusammengefasst.

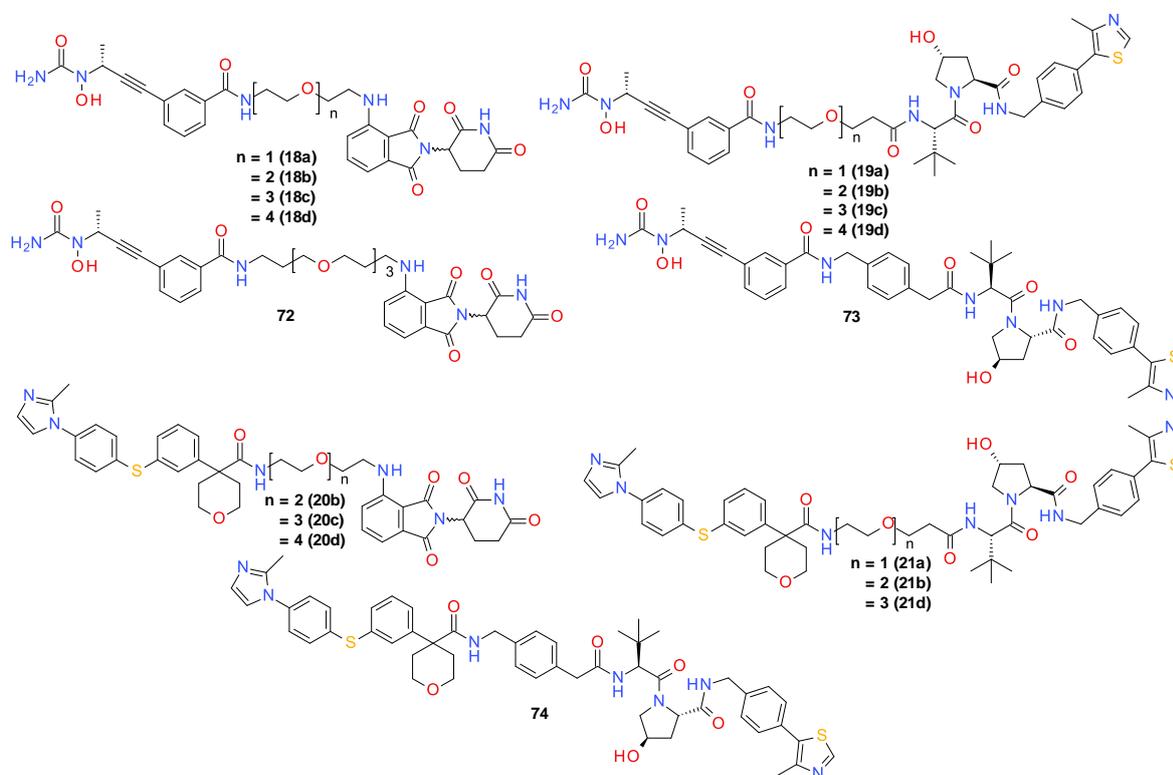


Abbildung 13: Synthetisierte Endverbindungen.

4. Synthesen und Reaktionsoptimierung

Tabelle 8: Übersicht der Endverbindungen, und den Reaktionsbedingungen für die Amid-Kupplung HK330_{verkürzt} steht hierbei für Baustein A, CJ-13,610-Derivat für D, T für B und VHL für D [n, o, p, q]

	Bedingung	HK330 _{verkürzt}	Bedingung	CJ-13,610-Derivat
-PEG-1-T	o, p	18a RK32 39%	n, o, -	RK89 n. i.
-PEG-2-T	o, p	18b RK23 17%	o, q	20b RK83 75%
-PEG-3-T	o, p	18c RK34 27%	n, o, q	20c RK90 35%
-PEG-4-T	o, p	18d RK26 39%	n, o, q	20d RK100 35%
-(CH ₂) ₃ -PEG-3-CH ₂ -T	o, p	72 RK19 27%	n, o, -	RK84 n. i.
-PEG-1-VHL	o, q	19a RK65 42%	n, o, q	21a RK92 19%
-PEG-2-VHL	o, q	19b RK91 25%	n, o, q	21b RK94 31%
-PEG-3-VHL	o, q	19c RK85 26%	n, o, -	RK93 n. i.
-PEG-4-VHL	o, q	19d RK71 21%	o, q	21d RK82 32%
-Bz-CH ₂ -VHL	o, q	73 RK99 11%	n, o, q	74 RK97 28%

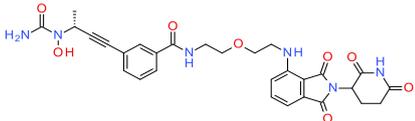
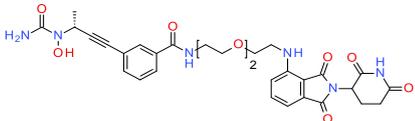
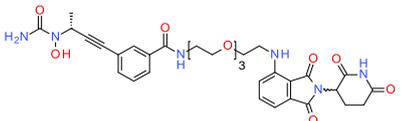
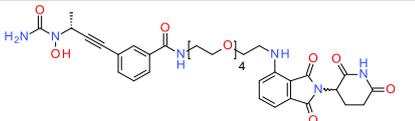
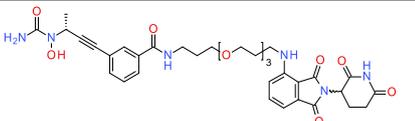
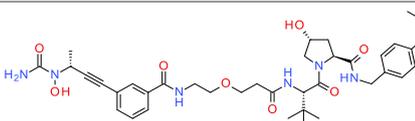
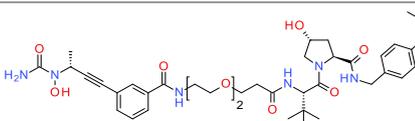
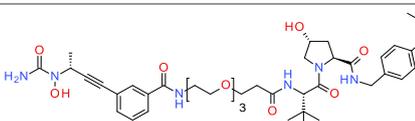
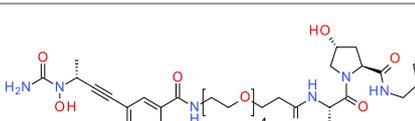
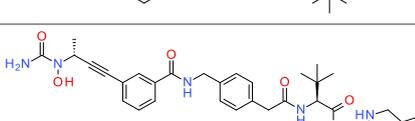
[o] Entschützung mit TFA [p] Reaktion ÜN, [q] Reaktion im Mikrowellenofen [n] Reaktion mit vorheriger Verseifung, n. i. = konnte nicht isoliert werden.

Die Endverbindungen wurden auf Reinheit, Masse und Konnektivität untersucht und anschließend für biologische Untersuchungen verwendet.

5. Ergebnisse und Diskussion

Die 17 synthetisierten Endverbindungen wurden auf ihre Aktivität und Wasserlöslichkeit getestet (Tabelle 9). Die Untersuchungen auf Aktivität und der Funktion als PROTAC wurde hierbei in einer Kooperation mit AK Steinhilber durchgeführt.

Tabelle 9: Aktivität und Wasserlöslichkeit der Endverbindungen.

Nr.	Verbindung	Inhibition [%] bei 1 μ M	Wasser- löslichkeit [μ M]
18a RK32		26	3-10
18b RK23		25	> 10
18c RK34		22	3-10
18d RK26		14	> 10
74 RK19		65	3-10
19a RK65		22	> 10
19b RK91		0	> 10
19c RK85		43	3-10
19d RK71		20	> 10
75 RK99		55	1-3

5. Ergebnisse und Diskussion

20b RK83		17	1-3
20c RK90		12	3-10
20d RK100		9	3-10
21a RK92		13	3-10
21b RK94		8	3-10
21d RK82		18	1-3
76 RK97		9	1-3

Die CJ-13,610 PROTACs **RK83**, **RK90**, **RK100**, **RK92**, **RK94**, **RK82** und **RK97** haben im Vergleich zu den Eisen-chelatisierenden PROTACs **RK32**, **RK23**, **RK34**, **RK26**, **RK19**, **RK65**, **RK91**, **RK85**, **RK71** und **RK91** leider keine Inhibition der 5-LO gezeigt. Hierfür gebe es zwei mögliche Ursachen. Erstens, die Position an dem der Linker angebracht wurde, ist ungünstig und verringert somit die Aktivität. Oder zweitens, die Aktivität wird generell durch das Anbringen des Linkers geringer. Da CJ-13,610 als allosterisch hemmender Inhibitor im Vergleich zu den Eisen-chelatisierenden Inhibitor HK330 schon eine geringere Aktivität aufweist, könnte diese hierbei nochmals verringert worden sein, woraus eine Inaktivität resultiert.

Die Verbindungen, die eine akzeptable inhibitorische Aktivität bei 1 μ M aufwiesen, wurden auf ihre Funktion als PROTAC getestet. **RK19** und **RK99** wiesen die notwendige inhibitorische Aktivität auf, induzierten jedoch keine Degradation der 5-LO (**Abbildung 14**).

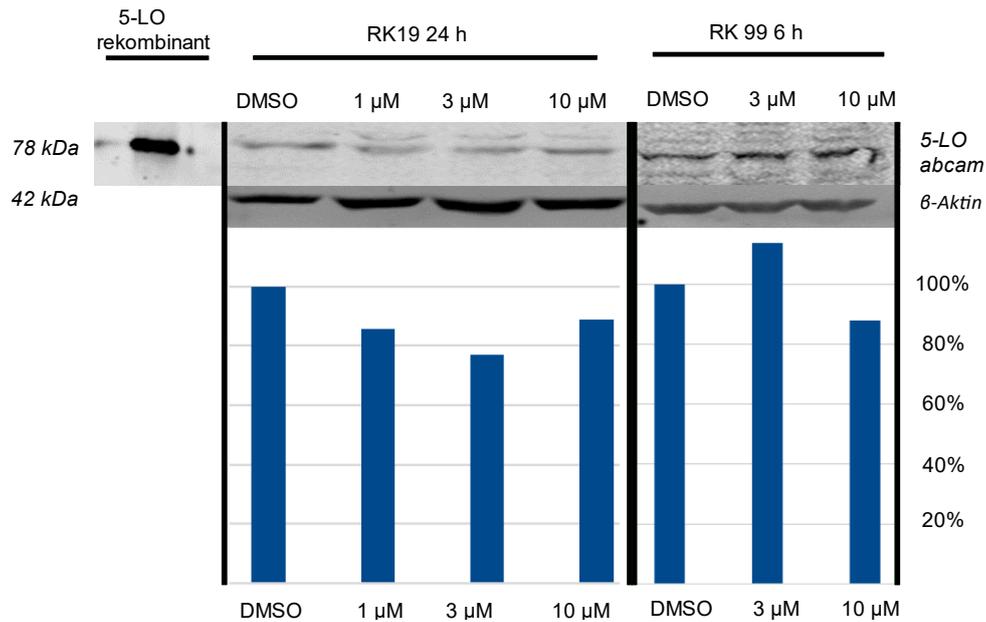


Abbildung 14: Western-Blots der PROTACs und die Quantifizierung der 5-LO, dargestellt im Balkendiagramm ($n=2$, gezeigt $n=1$).

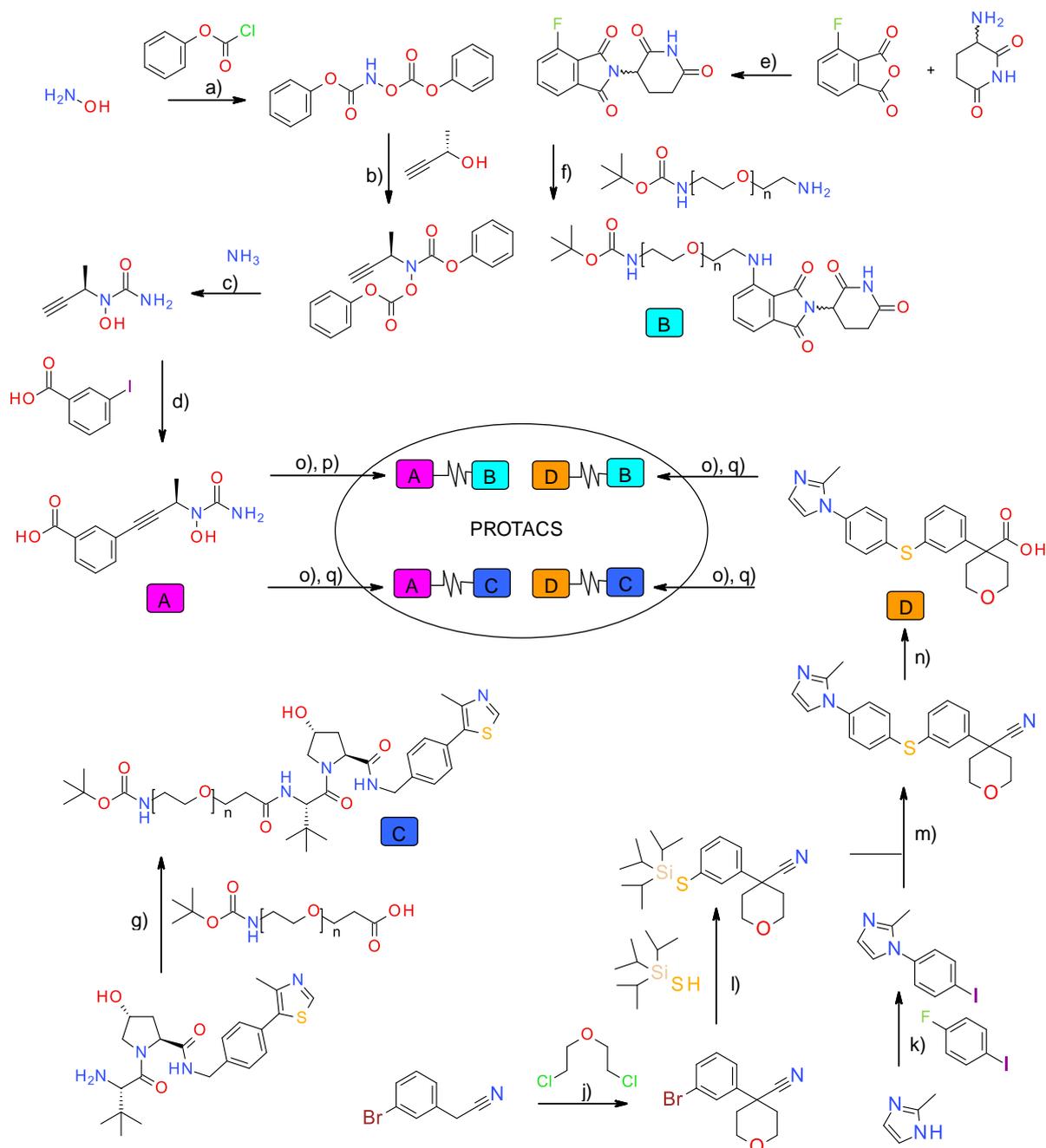
Für die Wasserlöslichkeit hat sich gezeigt, dass die Eisen-chelatisierenden PROTACs in der Regel eine Wasserlöslichkeit im Bereich von 3-10 μ M oder $> 10 \mu$ M haben. Ausnahme hiervon ist **RK99** mit dem Benzyl-Linker, dessen Wasserlöslichkeitsgrenze im Bereich von 1-3 μ M liegt. Die CJ-13,610 PROTACs zeigen ein ähnliches Bild mit einer Wasserlöslichkeit im Bereich von 3-10 μ M auf. Auch in dieser Serie verfügt der PROTAC mit Benzyl-Linker **RK97** über eine geringe Wasserlöslichkeit von 1-3 μ M. Die Liganden Thalidomid oder VHL weisen hierbei zueinander wenige Unterschiede auf. Die Unterschiede bei gleichbleibenden Linker betragen hierbei entweder eine Potenz wie bei **RK82** mit einer Wasserlöslichkeit von 1-3 μ M und **RK100** 3-10 μ M mit PEG-4 als Linker oder keinen Unterschied wie bei **RK34** und **RK85** mit einer Wasserlöslichkeit von 3-10 μ M mit PEG-3 als Linker. Interessanterweise zeigen die PEG-3-Linker der Eisen-chelatisierenden PROTACs insgesamt eine schlechtere Wasserlöslichkeit auf als andere Linker in dieser Gruppe. **RK19** und **RK97** indizieren mit einer schlechteren Wasserlöslichkeit unter den Eisen-chelatisierenden PROTACs, dass eine Steigerung der Lipophilie im Linker mit einer Steigerung der Inhibition korreliert.

6. Zusammenfassung

PROTACs sind ein Teil der nächsten Generation von pharmazeutischen Wirkstoffen und bieten einen komplett neuen Ansatz, um mit kleinen Molekülen in biochemische Signalwege einzugreifen.² PROTACs adressieren hierbei sowohl das Zielprotein als auch den E3-Ligase-Komplex und bewirken die Degradation des Zielproteins. Insbesondere in der Behandlung von bestimmten Krebsarten zeigen PROTACs einen neuen vielversprechenden Ansatz.⁴ Durch Inhibition der 5-LO mit bekannten Inhibitoren wie Zileuton® oder CJ-13,610 konnte der Weiterentwicklung von Leukämie, auch bekannt als Blutkrebs, entgegen gewirkt werden, aber nicht aufgehalten werden.^{46,47} Hier sollen als neue Methode PROTACs eingesetzt werden, um der Überexpression der 5-LO in Leukämiezellen durch Degradation entgegenzuwirken.

Mit HK330 und CJ-13,610 als Leitstruktur wurden 17 PROTACs erfolgreich synthetisiert und charakterisiert. Die Synthese erfolgte hierbei in vier Blöcken (**Schema 29**). Insbesondere bei der Synthese des CJ-13,610 Derivates konnte durch Abwandlung der Literaturvorschrift eine akzeptable Ausbeute erreicht werden. Für die zweite Migita-Kupplung hat ein Wechsel des Reaktionssystems durch Austausch des Katalysators und des Lösungsmittels sowie einem Entschützungsadditiv dafür gesorgt, dass die Ausbeute von 25% auf 75% gesteigert werden konnte. Die anschließende Verseifungsreaktion, konnte in quantitativen Ausbeuten erreicht werden und an die Folgereaktion ohne Aufreinigung angeschlossen werden.

Für das Anbringen der Thalidomid- und VHL-Linker konnten Entschützung und die vorherige Verseifung des Nitrils mit der Amid-Kupplung verknüpft werden, ohne die Zwischenprodukte aufzureinigen. Hierbei hat sich PyBOP, HOBT·H₂O als das ideale Kupplungsreagenz herausgestellt. Die Reaktionen konnten sowohl über Nacht bei RT als auch 1 h unter Mikrowellenstrahlung durchgeführt werden.



Schema 29: Zusammenfassung der Synthese von 5-LO-PROTACs a) (I) NaHCO_3 , H_2O , 0°C , 30 min, (II) NaHCO_3 , H_2O , RT, 2 h, 42%; b) (I) PPh_3 , THF 0°C , (II) DIAD, THF $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 3 h, 74%; c) NH_3 (g), Isopropanol, $-196^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 1 bar \rightarrow 10 bar, ÜN, 81%; d) $\text{Pd(II)(ACN)}_2\text{Cl}_2$, PPh_3 , CuI, DIPA, EE, RT, 16 h, 79%; e) Pyridin, 110°C , ÜN, 36%; f) DIPEA, DMF, 110°C , ÜN, 51-59%; g) PyBOP, HOBT- H_2O , DIPEA, $\text{pH} > 9$, DMF, 0°C , 10 min, 60°C MW, 30 min, 43-78%; j) 60% NaH in Mineralöl, DMSO, $10^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 2 h, 73%; k) 60% NaH in Mineralöl, DMSO, 30 min RT, 110°C , 16 h, 66%; l) (I) $\text{Pd(PPh}_3)_4$, 60% NaH in Mineralöl, THF/Toluol 1:1, 0°C , 10 min, 100°C , 2 h, 52%; m) (II) $\text{Pd(dppf)Cl}_2 \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$, KOtBu, CsF, 1,4-Dioxan, 100°C , ÜN 75%; n) 4 molare NaOH, $\text{H}_2\text{O/Ethanol}$ 1:1, MW, 120°C , 5 h, 5 bar, 54% - quantitativ; o) TFA, DCM $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 1-4 h, p) PyBOP, HOBT- H_2O , DIPEA, $\text{pH} > 9$, DMF, 0°C , 10 min, RT, ÜN, q) PyBOP, HOBT- H_2O , DIPEA, $\text{pH} > 9$, DMF, 0°C , 10 min, RT, 1 h, MW, 60°C , 11-75%.

Die Endverbindungen wurden anschließend auf ihre Wasserlöslichkeit, ihr Inhibitionsvermögen und ihrer Funktion als PROTAC untersucht. Unter den hergestellten PROTACs konnten zwei die 5-LO bei 1 μM mit > 50% inhibieren (**Abbildung 15**).

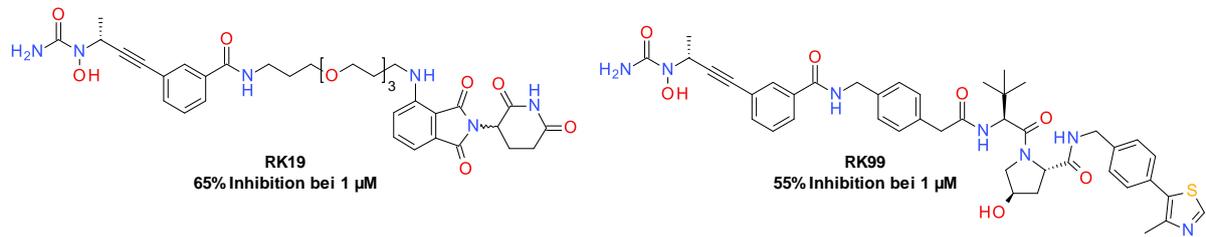


Abbildung 15: PROTACs, die die 5-LO inhibieren.

RK19 hat hierbei Propyl-Enden im PEG-Linker und **RK99** einen Phenylring im Linker ohne PEG-Einheiten. Beide Verbindungen wurden auf ihre Funktion als PROTACs untersucht, konnten aber im gewählten Zeitrahmen und Konzentrationen keine Degradation herbeiführen.

Für die Wasserlöslichkeit hat sich ergeben, dass alle Endverbindungen eine Wasserlöslichkeit im Bereich von 3-10 μM oder darüber aufweisen. Ausnahmen hierbei waren die PROTACs mit einem Benzylring im Linker, welche eine Wasserlöslichkeit im Bereich von 1-3 μM aufwiesen. Da aber auch diese wasserlöslich waren, ergeben sich neue Möglichkeiten zum Designen von PROTACs für die 5-LO durch Verwendung von Linkern mit einem größeren aliphatischen Anteil.

7. Ausblick

Für das zukünftige Design von PROTACs können drei Kernelemente kombiniert werden, um den idealen PROTAC zu designen. Diese bestehen aus einer großen Linkervielfalt, Datenbanken, um Referenzen zu nehmen oder Vorhersagen zu treffen und experimentellen Daten, die den PROTAC validieren (**Abbildung 16**).

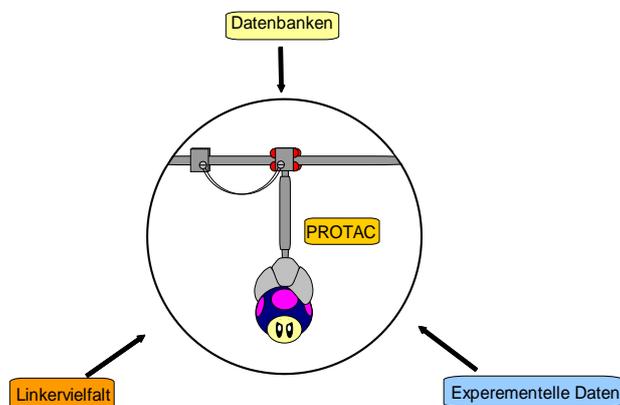
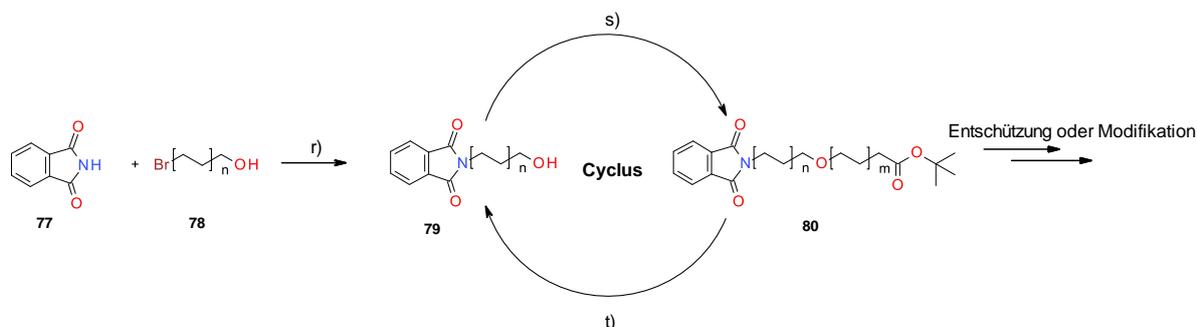


Abbildung 16: Kernelemente zum Design von PROTACs.

Um die ideale Linkerlänge und den Anteil hydrophoben und hydrophilen Wechselwirkungen im Linker des PROTAC bestimmen zu können, wird eine große Anzahl an Linkern benötigt. Da diese jedoch recht teuer sind und auch nicht alle Kombination von PEG-Einheiten kommerziell erhältlich sind, kann angelehnt an Kehm *et al.*⁵² über Gabriel-Synthese gefolgt von periodisch wiederholender Williamson-Ether-Synthese mit Reduktion durch Natriumborhydrid eine Vielfalt von Linkern synthetisiert werden (**Schema 30**). Um zeitlich effektiv zu arbeiten, kann zum Anbringen der Linker an Thalidomid oder VHL die Parallelsynthese hinzugezogen werden.



Schema 30: Gabriel-Synthese r) NEt_3 , CH_2Cl_2 , RT, Williamson-Ether-Synthese s) *t*-Butyl-2-Bromethan oder *t*-Butyl-3-Bromopropan THF, RT; Reduktion t) NaBH_4 , THF, MeOH, reflux, 2 h.

Mit der PROTAC-Datenbank kann die Vielzahl von Linkern eingegrenzt werden und eine Vorauswahl getroffen werden.¹¹ Um die Auswahl noch weiter einzugrenzen, kann ein Tool zur Vorhersage der Konstruktion des Linkers von PROTACs hinzugezogen werden.¹⁰ Hierbei wird jedoch eine Kristallstruktur des Zielproteins mit Inhibitor benötigt. Zuletzt sind experimentelle Daten notwendig, die über die Fähigkeit der Inhibition Auskunft geben und die ideale Linker-Länge ermitteln, bei denen eine Degradation des Zielproteins erfolgt.

Notwendig für PROTACs sind eine gewisse Aktivität auf dem Zielprotein, eine akzeptable Wasserlöslichkeit, die Bildung des ternären Komplexes und ein konzentrationsabhängiger Abbau des Zielproteins durch die Rekrutierung der E3-Ligase mittels des PROTACs. Eine gewisse Aktivität konnte mit den Eisen-chelatisierenden PROTACs mit Benzyl-Linker (**RK99**) oder einem größeren Anteil an Aliphaten im Linker erreicht werden (**RK19**). Die Wasserlöslichkeit war bei allen Linkern gegeben, allerdings vermutlich unter dem Verlust der Aktivität, weshalb zukünftig aliphatische Linker mit geringerem Sauerstoffanteil bevorzugt verwendet werden sollten. Bestätigt wird dies auch, da der PROTAC mit dem Benzyl-Linker eine akzeptable Wasserlöslichkeit aufwies. Um eine maximierte Inhibition der 5-LO zu ermöglichen, werden lipophile Linker präferiert. Mit diesen Erkenntnissen könnten folgende Moleküle **81** und **82** als PROTAC fungieren (**Abbildung 17**), welche voraussichtlich eine höhere Inhibition der 5-LO und immer noch eine akzeptable Wasserlöslichkeit aufweisen. Vielversprechender wären hierbei die Moleküle **83**, **84**, **85** und **86**, welche HK330 komplett als Pharmakophor übernehmen und entweder einen Alkyl-Linker verwenden oder den Linker mit Propyl-Einheiten aus **RK19**, welcher sich bewährt hat.

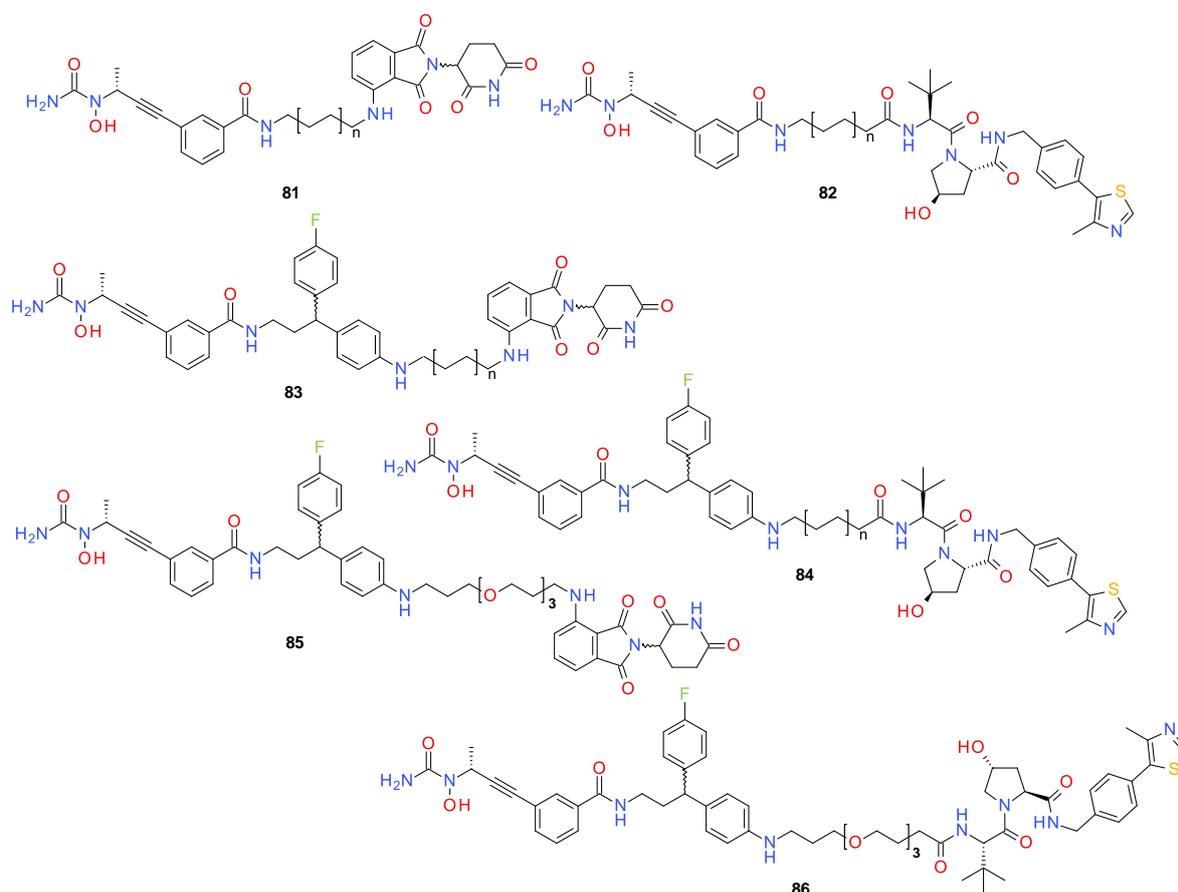


Abbildung 17: Mögliche Serie an PROTACs.

Auf biochemischer Seite können die Inkubationszeit des Zellassays variiert werden. Hierfür sollte auch die Zellgängigkeit des PROTACs bestimmt werden, um zu gewährleisten, dass der PROTAC am Zielprotein ankommt. Eine Evaluationsmöglichkeit wäre die Bildung des essentiellen ternären PROTAC-Protein-Komplexes, welcher durch Massenspektrometrie¹³ oder ITC¹⁶ ermittelt werden kann. Andere Methoden wie BRET¹⁵, welche die Bildung des Protein-E3-Ligase-Komplexes bestimmen, können auch verwendet werden, um auf den ternären Komplex zurück zu schließen.

8. Experimenteller Teil

8.1 Material und Methoden

Die nachfolgenden Chemikalien, Methoden und Messgeräte wurden verwendet, um die Verbindungen zu synthetisieren und charakterisieren.

8.1.1 Wasserlöslichkeit

Die Bestimmung der Wasserlöslichkeit erfolgte am Infinite M200 Pro Plattenlesers der Firma Tecan bei einer Absorption von 650 nm. Hierfür wurde eine transparente Mikrotitrier-Platte im 96-Well Format verwendet. Zur Messung wurden aus einem 10 mM Stock in DMSO eine Konzentrationsreihe mit jeweils 3, 1, 0,3 und 0,1 mM angesetzt. In Triplikaten wurden 1 μ L der angesetzten Lösung zusammen mit 99 μ L DPBS-Puffer, pH = 7,0-7,3 mit 0,01% Triton X100 auf die Platte gegeben. Für die Referenzprobe wurde anstelle der angesetzten Lösung 1 μ L DMSO verwendet. Die Absorption wurde bei 650 nm bestimmt und mit der Referenz verglichen. Wichen die Absorptionswerte der Probe von den Absorptionswerten der Referenz ab, wurde die Annahme gemacht, dass die Probe präzipitiert und die Grenze der Löslichkeit erreicht ist.

8.1.2 Aktivitätsmessung

Der Aktivitätsmessung wurde nach den Protokollen von Hofman *et al.*^{59,60} durchgeführt. Hierfür wurde aus einem Mastermix bestehend 3 μ g 5-LO/mL, 1 mM ATP, 1 mM EDTA in PBS Puffer 1 mL entnommen und zu 10 μ L Zielverbindung der Konzentrationen 0,1 μ M, 0,3 μ M und 1 μ M, gegeben. Die Zielverbindung wurde vorher 15 min auf Eis inkubiert. Zum Start des Assays wurde jede Probe zunächst 20 s im Wasserbad bei 37 °C angewärmt. Die Reaktion begann durch die Zugabe von 2 mM CaCl₂ und 10 μ M Arachidonsäure. Nach 10 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 mL Methanol gestoppt und die 5-LO Metabolite mittels HPLC analysiert.

8.1.3 Western-Blots

5-LO rekombinante U2OS Ziellinien wurden mit der gewählten Verbindung in den Konzentrationen 1 μ M, 3 μ M und 10 μ M und DMSO als Kontrolle im gewählten Zeitfenster inkubiert.

Zur Lyse wurden die Zellen geerntet, das Medium verworfen und mit kaltem PBS gewaschen. Nach dem Überführen in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß wurde erneut mit kaltem PBS gewaschen und die Zellen mit jeweils 200 μ L Lysepuffer lysiert. Der Lysepuffer bestand hierbei aus 1,5 mL 1 M Tris-HCl (pH = 6,8), 3 mL 20% SDS, 3 mL Glycerol und 19,5 mL MilliQ-Wasser. Es wurden jeweils im Verhältnis 1:10 ein Proteaseinhibitormix und im Verhältnis 1:7 Phosphataseinhibitoren frisch hinzugegeben.

Die Zellen wurden in dem Lysepuffer suspendiert, 10-15 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend dreimal für 10 s mit einem Ultraschall-Homogenisator (Sonopuls 200, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, 20% Intensität, stoßweise) geschallt, um störende DNS zu zerkleinern. Anschließend wurde das Lysat zentrifugiert (10 min, 10.000 x g, 4 °C) und der Überstand in neue 1,5-mL-Reaktionsgefäße überführt. Das Lysat wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

8. Experimenteller Teil

Die Proteinkonzentration des Lysats wurde mit Hilfe des BCA-Assays ermittelt. Hierfür wurde das „Pierce™ BCA Protein AssayKit“ von Thermo Fisher Scientific verwendet. Diese Konzentrationsbestimmung basiert auf der Biuret-Reaktion. Hierbei werden Kupferionen in alkalischem Milieu reduziert.

Eine Verdünnungsreihe von Rinderserumalbumin wurde zur Erstellung einer Kalibriergeraden und zur anschließenden Konzentrationsbestimmung verwendet. Jede Probe wurde als 1:10 Verdünnung des Zelllysats eingesetzt und als Duplikat vermessen. In jedes Well einer Mikrotiterplatte wurden 25 µL des verdünnten Lysats und 200 µL „Working Reagent“ gegeben. Danach wurde die Platte für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Detektiert wurde bei einer Wellenlänge von 562 nm mit dem Infinite® 200 PRO Series.

Die denaturierende Natrium-Dodecyl-Sulfat Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) diente der Auftrennung von Proteinen in einem elektrischen Feld entsprechend der apparenten Molekülmasse. Die Lysate wurden mit Probenpuffer bestehend aus 5 mM EDTA, 10% SDS, 50% Glycerol und 0,05% Bromphenolblau versetzt und anschließend zur Denaturierung für 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Für die semiquantitative Proteinanalytik wurden pro Probe 30-50 µg Protein, 2 µl PageRuler™ Prestained Protein Ladder von Thermo Fisher Scientific. Die SDS-Gelelektrophorese wurde mit 10%igen Polyacrylamidgelen in Laufpuffer durchgeführt. Der Laufpuffer bestand aus 200 mM Glycin, 25 mM Tris und 0,1% SDS. Das 10%ige Gel für die SDS-PAGE wurde hierbei in folgender Zusammensetzung hergestellt (**Tabelle 10**). Acrylamide (AA/Bis-AA), Tris-HCl, SDS und Wasser wurden in zwei 50 mL Zentrifugenröhrchen für Trenn- und Sammelgel gemixt. Für das Trenngel wurden anschließend Ammoniumpersulfat (APS) und *N,N,N',N'*-Tetramethylethylenediamin (TEMED) hinzugegeben und nach kurzem Schütteln wurde 6000 µL der Lösung in eine Gel-Kassette überführt. Das Gel wurde mit 300 µL Isopropanol überschichtet, um eine glatte Trenngeloberfläche zu ermöglichen. Nach 20 min war die Polymerisation beendet. Isopropanol wurde anschließend abgegossen. APS und TEMED wurden in das Zentrifugenröhrchen für das Sammelgel gegeben und nach kurzem Schütteln in die Gelkassette überführt.

Tabelle 10: Zusammensetzung des SDS-Pages

Lösung/Reagenzien	Zusammensetzung/Lieferant	Lagerung	Trenngel	Sammelgel
30% AA/Bis-AA (Acrylamide) 37,5:1	Kommerziell erhältlich (e.g. Fa. Applichem)	RT	9334 µL	2134 µL
1,5 M Tris-HCl	36,33g Tris in 200 ml MilliQ H ₂ O pH 8,8 durch HCl konz.	RT	7092 µL	
0,5 M Tris-HCl	12,11g Tris in 200ml MilliQ H ₂ O pH 6,8 durch HCl konz.	RT		4032 µL
10% SDS	gelöst in MilliQ H ₂ O	RT	280 µL	160 µL
10% APS	gelöst MilliQ H ₂ O	-20°C	288 µL	9552 µL
TEMED	Kommerziell erhältlich (e.g. Fa. SIGMA Aldrich)	4°C	32 µL	96 µL
MilliQ H ₂ O		RT	10974 µL	24 µL

Die Lysate wurden bei 80 V für 10 Minuten und anschließend bei 130 V für 80 Minuten aufgetrennt.

Die aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe eines Wet/Tank-Blot-Systems (Biorad) bei 95 V und 225 mA für 80 Minuten elektrophoretisch in Transferpuffer ohne SDS auf eine Nitrozellulosemembran (Porengröße 0,45 µm) transferiert. Die anschließende Inkubation mit Blocking Puffer (Odyssey Blocking buffer® 1:1 mit TBS oder Casein Blocking buffer®) für eine Stunde bei RT bewirkte eine Sättigung der unspezifischen Bindungen.

Der jeweilige primäre Antikörper wurde entsprechend der angegebenen Verdünnung mit Blocking Puffer und 0,1% Tween 20 angesetzt (**Tabelle 11**) und die Membran entweder über Nacht bei 4 °C oder für zwei Stunden bei RT mit der Antikörperlösung inkubiert. Danach wurde die Membran viermal für 5 min mit *engl. Tris-buffered saline Tween 20* (TBS-T)-Puffer gewaschen und unter Lichtausschluss für 1 h mit der Sekundärintikörperlösung inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran dreimal für 5 min mit TBS-T Puffer und vor der Detektion ein weiteres Mal für 5 min mit TBS-Puffer gewaschen. Zur Quantifizierung wurde β-Aktin als Referenz verwendet.

Tabelle 11: Antikörper und dessen Verdünnung.

Primärer Antikörper	Sekundärer Antikörper	Verdünnung
5-LO (ab169755) Abcam, Cambridge, United Kingdom (rabbit)		1:1000
β-Actin (I-19) Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA (goat)		1:5000
	Anti-rabbit 800CW LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, USA	1:15000
	Anti-goat 680LT LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, USA	1:15000

8.2.1 Reagenzien und Lösungsmittel

Die Reagenzien und Lösungsmittel, welche ohne weitere Aufreinigung für die Synthese benutzt wurden, hatten die Stoffreinheit p.a. und werden von folgenden Herstellern vertrieben, Sigma-Aldrich, TCI, Oxchem, Alfa Aesar, Acros organics, Appollo Scientific, Fluorochem und Fischer. Reaktionen, welche Luft- und Feuchtigkeitsempfindlich sind, wurden unter Argon-Atmosphäre durchgeführt.

8.2.2. Dünnschichtchromatographie

Für die analytische Dünnschichtchromatographie (DC) wurden mit Silicagel beschichtete Aluminiumfolien mit Fluoreszenzindikator (0,20 mm silica gel 60; ALUGRAM® Xtra SIL G / UV254) verwendet. Die Detektion erfolgte mit UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm. Die Lösungsmittel (A/B/C) sind mit ihren Verhältnis (X:Y:Z) angegeben. Zum Anfärben der DC-Platte wurde iodhaltiges Kieselgel in einer DC-Kammer und das Färbereagenz Ninhydrin verwendet.

8.2.3 Flash-Chromatographie

Für die präparative Säulenchromatographie wurde die PURIFlash® XS 420 (Interchim) mit vorgepackten 10 g, 25 g, und 50 g Säulen der Firma Biotage verwendet. Zur Auftragung auf die Säule wurde Kieselgel der Firma Macherey-Nagel mit einer Korngröße von 0,040-0,063 nm verwendet. Als mobile Phase wurden Lösungsmittel in technischer Qualität verwendet.

8.2.4 Analytische und Präparative Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die Messung der Reinheit, Masse oder die semipräparative Aufreinigung von Endverbindungen erfolgte an dem HPLC-Gerät SHIMADZU prominence der Firma Shimadzu, an das ein SPD20A UV/Vis-Detektor gekoppelt war. Zur analytischen Bestimmung der Reinheit wurde die Luna 10u C18(2) (250·4,6 nm) mit einer Flussrate von 1 mL/min und zur präparativen Aufreinigung wurde die Luna 10u C18(2) (250·21,20 nm) mit einer Flussrate 21 mL/min der Firma Phenomenex® verwendet. Die mobile Phase bestand aus einem Gemisch aus einer 0,1% Ameisensäure-Lösung in MilliQ-Wasser und Acetonitril (HPLC grade). Die Detektion des UV-Spektrums erfolgte bei den Wellenlängen 254 nm und 280 nm. Die Reinheit der Verbindungen wurde mithilfe der analytischen HPLC bestimmt und bezieht sich auf dessen Anteil im Chromatogramm, welcher bei 254 nm detektiert wurde. Die folgenden Methoden wurden verwendet (**Tabelle 12**).

Tabelle 12: Methoden für die präparative HPLC.

Methode A		Methode B		Methode C	
Zeit t [min]	c(ACN) [%]	Zeit t [min]	c(ACN) [%]	Zeit t [min]	c(ACN) [%]
0	70	0	80	0	95
10	10	10	10	2	95
15	10	15	10	14	10
16	70	16	80	20	10
20	70	20	80	21	95

8.2.5 Massenspektrometrie

Die Aufnahme der Massenspektren erfolgte am LCMS-2020 der Firma Shimadzu oder an der Massenspektrometrie-Serviceeinheit des Instituts für organische Chemie und Biochemie auf einem TLC-MS interface 2 von Camag mittels Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS). Für die Präzisionsmassen (HRMS) wurde ein MALDI LTQ Orbitrap XL verwendet.

8.2.6 NMR-Spektroskopie

Die NMR-Messungen wurden in deuteriertem Chloroform (CDCl_3), Aceton ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) und Dimethylsulfoxid ($\text{DMSO } d_6$) an Spektrometern der Firma Bruker bei 298 K durchgeführt. Die ^1H -NMR, ^{13}C -NMR-, ^1H - ^1H -COSY und die ^1H - ^{13}C -HSQC Messungen erfolgten an den Spektrometern DPX250, AV300, AV400, AV500HD und am DRX600. Die chemische Verschiebung bezieht sich auf die δ -Skala in ppm. Die Kalibrierung dieser Skala erfolgte in ^1H und ^{13}C NMR-Spektren anhand des Restprotonensignals der Lösungsmittel CDCl_3 : 7.26 und 77.2 ppm, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$: 2.05 und 29.8 ppm und DMSO : 2.50 und 39.5 ppm. Die Multiplizitäten der Signale wurden wie folgt abgekürzt: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, quin = Quintett, bs = breites Signal und m = Multiplett. Die Zuordnung der H-Atome bezieht sich auf die IUPAC Nomenklatur des im Namen enthaltenen Bausteins oder ist in der Halbstrukturschreibweise angegeben und kursiv hinterlegt. Im ^1H - ^1H -COSY und ^1H - ^{13}C -HSQC werden jeweils nur die Kreuzsignale in (w_1/w_2) angegeben.

8.2.7 IR-Spektroskopie

Für die IR-Messungen wurde das Messgerät ALPHA-P der Firma Bruker verwendet. Die Intensitäten der Banden wurden mit folgenden Abkürzungen angegeben: s = intensive Banden, m = mittlere Intensität und w = schwache Intensität.

8.2.8 Schmelzpunktmessgerät

Zur Messung der Schmelzpunkte wurde ein Schmelzpunktgerät M-560 der Firma Büchi verwendet.

8.3 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)

8.3.1 AAV1 Synthese von Thalidomid-Linkern mit Boc geschütztem Amin

2-(2,6-Dioxo-3-piperidyl)-4-fluor-isoindolin-1,3-dion (1,1 Äq), der Amin-Peg-Amin-Boc-Linker (1,0 Äq) und DIPEA (3,0 Äq) wurden in DMF gelöst und auf 115 °C ÜN erhitzt. Das Lösungsmittel wurde unter verminderten Druck entfernt und das gelbe Öl in EE und dest. Wasser aufgenommen. Die organische Phase wurde (3x) mit EE extrahiert und mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Rohprodukt wurde mittels Flash-Chromatographie aufgereinigt.

8.3.2 AAV2 Synthese von *N*-Hydroxyharnstoff-Thalidomid-PROTACS mit *in situ* Entschützung

Der Boc-geschützte Thalidomid-Linker (1,2 Äq) wurde in abs. DCM bei 0 °C gelöst. Zu der Lösung wurde Trifluoressigsäure gegeben bis eine 2:1 Lösung entstand. Die Reaktionslösung rührte bei RT und mittels DC-Kontrolle wurde die Entschützung nach 1-4 h festgestellt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das gelbe Öl in DMF aufgenommen. Parallel wurde 3-[(3*R*)-3-[Carbamoyl(hydroxy)amin]but-1-ynyl]benzoesäure (1,0 Äq) bei 0 °C in DMF gelöst und PyBOP (1,1 Äq), HOBt·H₂O (0,5 Äq) sowie der entschützte Thalidomid-Linker hinzugegeben. Anschließend wurde mit DIPEA der pH-Wert auf > 9 eingestellt. Die Reaktionslösung rührte bei RT über Nacht. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Öl in EE und dest. Wasser aufgenommen. Die wässrige Phase wurde (5x) mit EE extrahiert, vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter verminderten Druck entfernt und das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

8.3.3.1 AAV3a Synthese von CJ-13,610-Thalidomid-PROTACS mit *in situ* Entschützung

Der Boc-geschützte Thalidomid-Linker (1,2 Äq) wurde abs. DCM bei 0 °C gelöst. Zu der Lösung wurde Trifluoressigsäure gegeben bis eine 2:1 Lösung entstand. Die Reaktionslösung rührte bei RT und mittels DC-Kontrolle wurde die Entschützung nach 1-4 h festgestellt. Das Lösungsmittel wurde unter verminderten Druck entfernt und das gelbe Öl in DMF aufgenommen. Parallel dazu wurde im Mikrowellenreaktionsgefäß 4-[3-[4-(2-Methylimidazol-1-yl)phenyl]-sulfanylphenyl]tetrahydropyran-4-carbonsäure (1,0 Äq) bei 0 °C in 3 mL DMF gelöst und PyBOP (1,1 Äq), HOBt·H₂O (0,5 Äq) sowie der entschützte Thalidomid-Linker hinzugegeben. Anschließend wurde mit DIPEA der pH auf >9 eingestellt. Die Reaktionslösung rührte 1 h bei 60 °C unter Mikrowellenstrahlung. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Öl in EE und dest. Wasser aufgenommen. Die wässrige Phase wurde (5x) mit EE extrahiert, vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

8.3.3.2 AAV3b Synthese von CJ-13,610-Thalidomid-PROTACS mit *in situ* Verseifung und Entschützung

4-[3-[4-(2-Methylimidazol-1-yl)phenyl]sulfanylphenyl]tetrahydropyran-4-carbonitril (1,0 Äq) wurde im Mikrowellenreaktionsgefäß in 1 mL 4 M NaOH und 1 mL Ethanol gelöst. Die Reaktionslösung rührte 5 h ÜN bei 120 °C und 5 bar unter Mikrowellenstrahlung. Nach Abkühlen auf RT wurde die organische Phase entnommen und das Lösungsmittel unter verminderten Druck entfernt. Währenddessen wurde der Boc-geschützte Thalidomid-Linker (1,2 Äq) in 1 mL abs. DCM gelöst und 0,5 mL Trifluoressigsäure bei 0 °C zugetropft. Die Reaktionslösung rührte bei RT und mittels DC-Kontrolle wurde die Entschützung nach 1-4 h festgestellt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das gelbe Öl in 1 mL DMF aufgenommen. Parallel wurde im Mikrowellenreaktionsgefäß das Verseifungsprodukt bei 0 °C in 3 mL DMF gelöst und PyBOP (1,1 Äq), HOBT·H₂O (0,5 Äq) sowie der entschützte Thalidomid-Linker hinzugegeben. Danach wurde mit DIPEA der pH auf >9 eingestellt. Die Reaktionslösung rührte 1 h bei 60 °C unter Mikrowellenstrahlung. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Öl in EE und dest. Wasser aufgenommen. Die wässrige Phase wurde (5x) mit EE extrahiert, vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

8.3.4 AAV4 Synthese von VHL-Linkern mit Boc-geschützten Amin

Der Boc-Amin-geschützte Linker mit freier Carbonsäure (1,0 Äq) wurde in einem Mikrowellengefäß in 2 mL DMF gelöst. Anschließend wurden bei 0 °C PyBOP (1,1 Äq), HOBT·H₂O (0,5 Äq) und DIPEA dazu gegeben bis der pH > 9 eingestellt war. Nach 10 min Rühren wurde (S, R, S)-AHPC-Hydrochlorid (1,0 Äq) bei 0 °C dazu gegeben. Die Reaktionslösung wurde anschließend unter Mikrowelleneinstrahlung 30 min auf 60 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wurde das Lösungsmittel entfernt und das Öl in dest. Wasser und EE aufgenommen. Die wässrige Phase wurde (3x) mit EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Rohprodukt mittels Flash-Chromatographie aufgereinigt.

8.3.5 AAV5 Synthese von N-Hydroxyharnstoff-VHL-PROTACS mit *in situ* Entschützung

Der Boc-geschützte VHL-Linker (1,2 Äq) wurde in abs. DCM bei 0 °C gelöst. Zu der Lösung wurde Trifluoressigsäure gegeben bis eine 1:1 Lösung entstand. Die Reaktionslösung rührte bei RT und mittels DC-Kontrolle wurde die Entschützung nach 1-4 h festgestellt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Öl in 1 mL DMF aufgenommen. Parallel wurde 3-[(3R)-3-[Carbamoyl(hydroxy)amin]but-1-ynyl]benzoesäure (1,0 Äq) bei 0 °C in 2 mL DMF gelöst und PyBOP (1,1 Äq), HOBT·H₂O (0,5 Äq) sowie der entschützte VHL-Linker hinzugegeben. Anschließend wurde mit DIPEA der pH-Wert auf > 9 eingestellt. Die Reaktionslösung rührte 1 h bei 60 °C unter Mikrowellenstrahlung. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Öl in EE und dest. Wasser aufgenommen. Die wässrige Phase wurde (5x) mit EE extrahiert, vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter verminderten Druck entfernt und das Rohprodukt mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

8.3.6.1 AAV6a Synthese von CJ-13,610-VHL-PROTACS mit *in situ* Entschützung

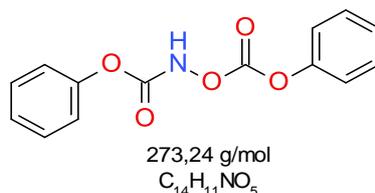
Der Boc-geschützte VHL-Linker (1,2 Äq) wurde in 1 mL abs. DCM bei 0 °C gelöst. Zu der Lösung wurde 1 mL Trifluoressigsäure zugetropft. Die Reaktionslösung rührte bei RT und mittels DC-Kontrolle wurde die Entschützung nach 1-4 h festgestellt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das gelbe Öl in 1 mL DMF aufgenommen. Parallel dazu wurde im Mikrowellenreaktionsgefäß 4-[3-[4-(2-Methylimidazol-1-yl)phenyl]sulfanylphenyl]tetrahydropyran-4-carbonsäure (1,0 Äq) bei 0 °C in 3 mL DMF gelöst und PyBOP (1,1 Äq), HOBT·H₂O (0,5 Äq) sowie der entschützte VHL-Linker hinzugegeben. Anschließend

wurde mit DIPEA der pH auf > 9 eingestellt. Die Reaktionslösung rührte 1 h bei 60 °C unter Mikrowellenstrahlung. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Öl in EE und dest. Wasser aufgenommen. Die wässrige Phase wurde (5x) mit EE extrahiert, vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Rohprodukt mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

8.3.6.2 AAV6b Synthese von CJ-13,610-VHL-PROTACS mit *in situ* Verseifung und Entschützung
4-[3-[4-(2-Methylimidazol-1-yl)phenyl]sulfanylphenyl]tetrahydropyran-4-carbonitril (1,0 Äq) wurde im Mikrowellenreaktionsgefäß in 1 mL 4 M NaOH und 1 mL Ethanol gelöst. Die Reaktionslösung rührte 5 h ÜN bei 120 °C und 5 bar unter Mikrowellenstrahlung. Nach Abkühlen auf RT wurde die organische Phase entnommen und das Lösungsmittel destillativ entfernt. Währenddessen wurde der Boc-geschützte VHL-Linker (1,2 Äq) in 1 mL abs. DCM gelöst und 0,5 mL Trifluoressigsäure bei 0 °C zugetropft. Die Reaktionslösung rührte bei RT und mittels DC-Kontrolle wurde die Entschützung nach 1-4 h festgestellt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das gelbe Öl in 1 mL DMF aufgenommen. Parallel wurde im Mikrowellenreaktionsgefäß das Verseifungsprodukt bei 0 °C in 3 mL DMF gelöst und PyBOP (1,1 Äq), HOBt·H₂O (0,5 Äq) sowie der entschützte VHL-Linker hinzugegeben. Danach wurde mit DIPEA der pH auf > 9 eingestellt. Die Reaktionslösung rührte 1 h bei 60 °C unter Mikrowellenstrahlung. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Öl in EE und dest. Wasser aufgenommen. Die wässrige Phase wurde (5x) mit EE extrahiert, vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Rohprodukt mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

8.4 Synthesen

8.4.1 Phenyl(phenoxyacetyl)oxycarbamat (24, RK2)



Durchführung: In einem Erlenmeyerkolben wurden (4,4 g, 51,8 mmol 1,8 Äq) Natriumhydrogencarbonat gegeben, in 30 mL dest. Wasser gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Anschließend wurde Hydroxylammoniumchlorid (2,0 g, 28,8 mmol, 1,0 Äq) dazu gegeben und 30 min bei 0 °C gerührt. Daraufhin wurde Phenylchlorformiat (13,5 mL, 86,3 mmol, 3,0 Äq), (6,5 g, 77,7 mmol, 2,7 Äq) Natriumhydrogencarbonat und 35 mL dest. Wasser dazu gegeben. Die Reaktionsmischung rührte 2 h bei RT. Der Feststoff wurde filtriert und der Filterkuchen mit dest. Wasser und *n*-Hex gewaschen. Der Rückstand wurde in Diethylether und gesättigter Natriumchlorid-Lösung aufgenommen und (3x) mit Diethylether extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das erhaltene leicht gelbliche Öl in warmen Diethylether aufgenommen und mit *n*-Hexan überschichtet. Über Nacht bei 0 °C bildeten sich weiße Kristalle, welche abfiltriert wurden.

Die Mutterlauge wurde eingeeengt und mittels Flash-Chromatographie aufgereinigt (*n*-Hex/EE 5:1 → 4:1), wodurch Produkt (0,9 g, 3,3 mmol) erhalten wurde. Das Produkt wurde als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 3,3 g (12,1 mmol, 42%)

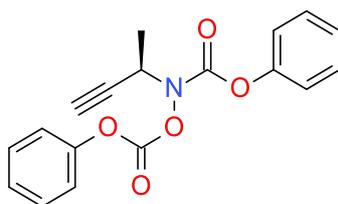
T_m: 81,2 °C

MS: m/z = [M] berechnet: 273,24 gefunden: 272,95

DC: R_f = 0,56 (*n*-Hex/EE 5:1)

¹H-NMR (250 MHz, DMSO): δ = 12.31 (s, 1H, NH), 7.52-7.44 (m, 4H, 4x CH *m*-Ph), 7.38-7.28 (m, 4H, 4x CH *o*-Ph), 7.22-7.18 (m, 2H, 2x CH *p*-Ph) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO): δ = 154.5, 153.2, 150.4, 149.9, 130.0, 129.7, 126.9, 126.1, 121.4, 120.8 ppm.

8.4.2 [[(1*R*)-1-Methylprop-2-ynyl]-phenoxy-carbonyl-amin]-phenylcarbonat (26, RK3)

325,32 g/mol
C₁₈H₁₅NO₅

Durchführung: Unter Argon-Atmosphäre wurden Triphenylphosphin (2,76 g, 10,5 mmol, 1,2 Äq), **RK2** (2,40 g, 8,78 mmol, 1,0 Äq) in 25 mL THF gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Anschließend wurde (S)-3-Butin-2-ol (0,6 mL, 7,90 mmol, 0,9 Äq) dazu gegeben und 30 min bei 0 °C gerührt. Währenddessen wurde Diisopropylazodicarboxylat (2,1 mL, 10,5 mmol, 1,2 Äq) in 5 mL THF gelöst und langsam dazu getropft. Die Reaktionslösung rührte anschließend 3 h bei RT. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das gelbe ölige Rohprodukt wurde mittels Flash-Chromatographie aufgereinigt (*n*-Hex/EE 95:5 → 90:10).

Das Produkt wurde als farbloses Öl erhalten.

Ausbeute: 1,90 g (5,84 mmol, 74%)

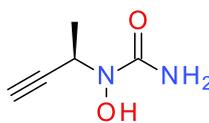
MS: $m/z = [M]$ berechnet: 325,32 gefunden: 324,95

DC: $R_f = 0,30$ (*n*-Hex/EE 9:1)

¹H-NMR (250 MHz, DMSO): $\delta = 7.53-7.39$ (m, 4H, 4x CH *m*-Ph), 7.36-7.21 (m, 4H, 4x CH *o*-Ph), 7.21-7.19 (m, 2H, 2x CH *p*-Ph), 5.35 (qd, ⁵*J* = 6.9 Hz, ⁴*J* = 2.1 Hz, 1H, H1 (1*R*)-1-Methylprop-2-ynyl), 3.61 (d, ⁴*J* = 2.1 Hz, 1H, H3, (1*R*)-1-Methylprop-2-ynyl), 1.56 (d, ⁵*J* = 6.9 Hz, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO): $\delta = 150.4, 150.0, 130.2, 129.8, 129.3, 127.0, 126.5, 121.4, 120.7, 115.2, 75.8, 48.5, 26.3, 18.5$ ppm.

8.4.3 1-Hydroxy-1-[(1*R*)-1-methylprop-2-ynyl]-harnstoff (27, RK4)



128,13 g/mol
C₅H₈N₂O₂

Durchführung: **RK3** (1,85 g, 5,69 mmol, 1 Äq) wurde in einem Autoklaven-Glasgefäß in 15 mL Isopropanol gelöst und in den Autoklaven überführt. Anschließend wurde bei -196 °C gasförmiger Ammoniak 5 min lang einkondensiert. Der Autoklav wurde verschlossen und bei 10 bar über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde unter verminderten Druck eingeeengt und in 15 mL EE aufgenommen, die erhaltenen weißen Nadeln wurden abfiltriert und das Filtrat wurde wieder eingeeengt. Das erhaltene gelbe Öl wurde mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (DCM/MeOH 95:5 → 90:10).

Das Produkt wurde als hellbrauner Feststoff erhalten.

Ausbeute: 588 mg (4,59 mmol, 81%)

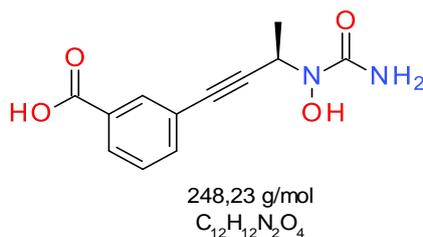
T_m: 125,4 °C

MS: m/z = [M+H]⁺ berechnet: 128,13 gefunden: 129,07

DC: R_f = 0,41 (DCM/MeOH 9:1)

¹H-NMR (250 MHz, DMSO): δ = 9.22 (s, 1H, OH), 6.48 (s, 2H, NH₂), 4.86 (qd, ⁵J = 7.0 Hz, ⁴J = 2.3 Hz, 1H, H1 (1*R*)-1-Methylprop-2-ynyl), 3.03 (d, ⁴J = 2.3 Hz, 1H, H3, (1*R*)-1-Methylprop-2-ynyl), 1.25 (d, ⁵J = 7.0 Hz, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO): δ = 161.5, 83.9, 72.9, 45.1, 18.5 ppm.

8.4.4 3-[(3*R*)-3-[Carbamoyl(hydroxy)amin]but-1-ynyl]benzoesäure (12, RK17)

Durchführung: RK4 (50 mg, 390 μmol, 1,1 Äq), 3-Iodobenzoesäure (98 mg, 360 μmol, 1,0 Äq), Bis(acetonitril)dichlorpalladium(II) (1,8 mg, 7,1 μmol, 0,02 Äq), Kupferiodid (2,8 mg, 14 μmol, 0,04 Äq) und Triphenylphosphin (3,7 mg, 14 μmol, 0,04 Äq) wurden in 6 mL abs. EE gelöst und mit (0,7 mL, 1770 μmol, 5 Äq) Diisopropylamin versetzt. Die Reaktionslösung rührte für 16 h bei RT. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (*n*-Hex/Aceton/Essigsäure 5:5:0,2 → 3:7:0,2).

Das Produkt wurde als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 70,0 mg (0,28 mmol, 79%)

T_m: 155,7 °C

MS: *m/z* = [M] berechnet: 248,23 gefunden: 248,75

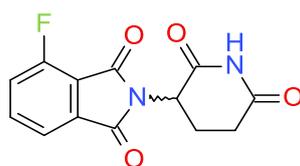
DC: R_f = 0,41 (*n*-Hex/Aceton/Essigsäure 5:5:0,2)

¹H-NMR (250 MHz, (CD₃)₂CO): δ = 8.05 (t, ³*J* = 1.6 Hz, 1H, H2 3-Benzoesäure), 7.99 (td, ⁴*J* = 1.5 Hz, ³*J* = 7.8 Hz, 1H, H4 3-Benzoesäure), 7.64 (td, ⁴*J* = 1.5 Hz, ³*J* = 7.8 Hz, 1H, H6 3-Benzoesäure), 7.50 (td, ⁴*J* = 0.6 Hz, ³*J* = 7.8 Hz, 1H, H5 3-Benzoesäure) 6.21 (s, 2H, NH₂), 5.29 (q, ³*J* = 7.0 Hz, 1H, H3, 3*R*-Butinyl), 1.47 (d, ³*J* = 7.0 Hz, 3H, CH₃) ppm.

Anmerkung: Signale für N-OH und COOH waren nicht sichtbar.

¹³C-NMR (75 MHz, (CD₃)₂CO): δ = 167.1, 162.3, 136.4, 133.4, 131.9, 130.02, 129.6, 124.5, 90.9, 82.0, 47.4, 18.5 ppm.

8.4.5 2-(2,6-Dioxo-3-piperidyl)-4-fluor-isoindolin-1,3-dion (14, RK12)



276,22 g/mol
 $C_{13}H_9FN_2O_4$

Durchführung: 4-Fluor-isobenzofuran-1,3-dion (2,00 g, 12,0 mmol, 1 Äq) und 3-Amin-piperidin-2,6-dion (1,98 g, 12,0 mmol, 1 Äq) wurden in 15 mL Pyridin gelöst und bei 110 °C ÜN erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wurde die Lösung mit Wasser und DCM versetzt. Die organische Phase wurde (3x) mit DCM extrahiert und anschließend (5x) mit EE extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt über Magnesiumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter verminderten Druck entfernt und das schwarze Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (*n*-Hex/EE 3:7 → 1:9).

Das Produkt wurde als hellgrüner Feststoff erhalten.

Ausbeute: 1,20 g (4,34 mmol, 36%)

T_m: 254,5 °C

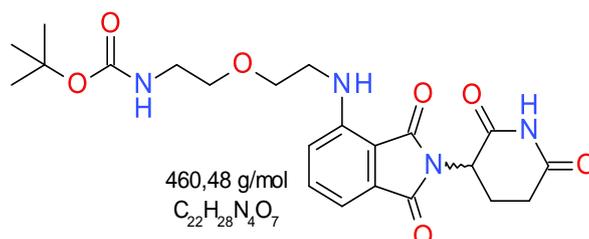
MS: $m/z = [M-H]^-$ berechnet: 276,05 gefunden: 274,80

DC: $R_f = 0,62$ (*n*-Hex/EE 3:7)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO): $\delta = 11.14$ (s, 1H, NH), 7.95 (ddd, $^4J = 4.6$ Hz, $^3J = 7.9$ Hz, 7.9 Hz, 1H, H6 4-F-isoindolin-1,3-dion), 7.79 (d, $^3J = 7.3$ Hz, 1H, H5 4-F-isoindol), 7.73 (td, $^4J = 0.6$ Hz, $^3J = 8.9$ Hz, 1H, H7 4-F-Isoindol), 5.16 (dd, $^3J = 13.0$, 5.5 Hz, 1H, CH 2,6-dioxo-3-piperidyl), 2.90 (ddd, $^3J = 14.0$, 5.5 Hz, $^2J = 17.3$ Hz, 1H, CH-CH₂-CH₂), 2.58 (m, 2H, CH₂-CH₂-CO), 2.07 (m, 1H, CH-CH₂-CH₂) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO): $\delta = 172.7$, 169.7, 166.1, 164.0, 158.5, 138.1, 133.4, 123.1, 120.0, 117.1, 49.1, 31.0, 21.8 ppm.

8.4.6 *t*-Butyl *N*-[2-[2-[[2-(2,6-dioxo-3-piperidyl)-1,3-dioxo-isoindolin-4-yl]amin]ethoxy]ethyl]carbammat (30a, RK31)



Durchführung: **RK12** (144 mg, 0,52 mmol, 1,1 Äq) und *N*-Boc-2,2'-(ethylendioxy)diethylamin (118 mg, 0,48 mmol, 1,0 Äq) wurden in 5 mL DMF gelöst und mit DIPEA (0,2 mL, 0,95 mmol, 2,0 Äq) versetzt und nach **AAV1** durchgeführt.

Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Chromatographie aufgereinigt (*n*-Hex/EE 3:7 → 1:9).

Das Produkt wurde als gelb leuchtendes Öl erhalten.

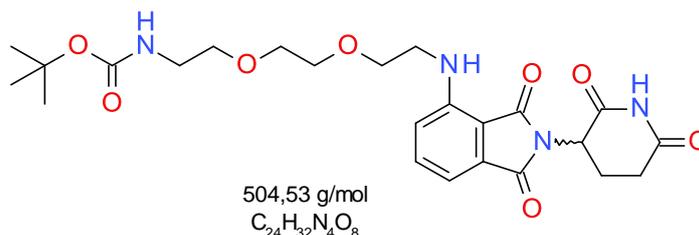
Ausbeute: 121 mg (0,24 mmol, 51%)

MS: $m/z = [M-H]^-$ berechnet: 460,48 gefunden: 459,00

DC: $R_f = 0,46$ (*n*-Hex/EE 3:7)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 8.51$ (s, 1H, NH 2,6-Dioxo-3-piperidyl), 7.47 (dd, $^3J = 8.4, 7.2$ Hz, 1H, H6 1,3-Dioxo-isoindolin-4-yl), 7.08 (d, $^3J = 7.1$ Hz, 1H, H5 1,3-Dioxo-isoindolin-4-yl), 6.90 (d, $^3J = 8.6$ Hz, 1H, H7 1,3-Dioxo-isoindolin-4-yl), 5.00 (bs, 1H, NH-Isoindol), 4.91 (bs, 1H, CH 2,6-Dioxo-3-piperidyl), 3.66 (t, $^3J = 5.2$ Hz, 2H, Carbamat-CH₂-CH₂-O), 3.53 (t, $^3J = 5.1$ Hz, 2H, O-CH₂-CH₂-NH), 3.43 (t, $^3J = 5.4$ Hz, 2H, O-CH₂-CH₂-NH-Isoindol), 3.32-3.29 (m, 2H, Carbamat-CH₂-CH₂-O), 2.87-2.83 (m, 1H, CH-CH₂-CH₂), 2.77-2.70 (m, 2H, CH₂-CH₂-CO), 2.12-2.07 (m, 1H, CH-CH₂-CH₂), 1.40 (s, 9H, *t*-Butyl) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 171.4, 169.5, 168.6, 167.7, 156.1, 146.9, 136.2, 132.6, 116.9, 111.9, 110.5, 79.4, 70.4, 69.4, 49.0, 42.3, 31.5, 29.5, 28.5, 22.8$ ppm.

8.4.7 *t*-Butyl *N*-[2-[2-[2-[[2-(2,6-dioxo-3-piperidyl)-1,3-dioxo-isoindolin-4-yl] amin]ethoxy]-ethoxy]ethyl]carbammat (30b, RK21)

Durchführung: **RK12** (144 mg, 0,52 mmol, 1,1 Äq) und *N*-Boc-2,2'-(ethyldioxy)diethylamin (118 mg, 0,48 mmol, 1,0 Äq) wurden in 5 mL DMF gelöst, mit DIPEA (0,2 mL, 0,95 mmol, 2,0 Äq) versetzt und nach **AAV1** durchgeführt.

Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Chromatographie aufgereinigt (*n*-Hex/EE 3:7 → 1:9)

Das Produkt wurde als gelb leuchtendes Öl erhalten.

Ausbeute: 121 mg (0,24 mmol, 51%)

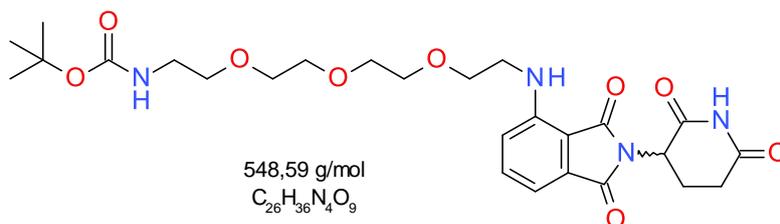
MS: $m/z = [M-H]^-$ berechnet 504,53 gefunden: 503,00

DC: R_f 0,42 (*n*-Hex/EE 1:9)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 8.50$ (s, 1H, NH 2,6-Dioxo-3-piperidyl), 7.48 (dd, $^3J = 8.5, 7.2$ Hz, 1H, H6 1,3-Dioxo-isoindolin-4-yl), 7.09 (d, $^3J = 6.8$ Hz, 1H, H5 1,3-Dioxo-isoindolin-4-yl), 6.90 (d, $^3J = 8.5$ Hz, 1H, H7 1,3-Dioxo-isoindolin-4-yl), 6.51 (bs, 1H, Carbamat), 5.20 (bs, 1H, NH-Isoindol), 5.05 (bs, 1H, CH 2,6-Dioxo-3-piperidyl), 3.71 (t, $^3J = 5.3$ Hz, 2H, Carbamat-CH₂-CH₂-O), 3.64 (t, $^3J = 5.2$ Hz, 4H, O-CH₂-CH₂-O), 3.55 (t, $^3J = 6.3$ Hz, 2H, O-CH₂-CH₂-NH-Isoindol), 3.46 (t, $^3J = 5.3$ Hz, 2H, O-CH₂-CH₂-NH-Isoindol), 3.31 (t, $^3J = 5.3$ Hz, 2H, Carbamat-CH₂-CH₂), 2.86 (t, $^3J = 9.1$ Hz, 1H, CH-CH₂-CH₂), 2.76 (t, $^3J = 11.4$ Hz, 2H, CH₂-CH₂-CO), 2.12-2.08 (m, 1H, CH-CH₂-CH₂), 1.42 (s, 9H, *t*-Butyl) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 171.3, 169.5, 168.6, 167.7, 156.2, 146.9, 136.2, 132.7, 116.9, 111.8, 110.5, 79.5, 70.9, 70.5, 70.3, 69.5, 49.2, 42.5, 31.5, 29.5, 28.5, 23.0$ ppm.

8.5.8 *t*-Butyl *N*-[2-[2-[2-[2-[2-(2,6-dioxo-3-piperidyl)-1,3-dioxo-isoindolin-4-yl]amin]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethyl]carbammat (30c, RK28)



Durchführung: **RK12** (71 mg, 0,26 mmol, 1,6 Äq) und *t*-Butyl-[2-[2-[2-(-aminethoxy)ethoxy]ethoxy]ethyl]carbammat (47 mg, 0,16 mmol, 1,0 Äq) wurden in 3 mL DMF gelöst, mit DIPEA (0,7 mL, 0,32 mmol, 2,0 Äq) versetzt und nach **AAV1** durchgeführt.

Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt. (*n*-Hex/EE 4:6 → 0,5:9,5)

Das Produkt wurde als gelb leuchtendes Öl erhalten.

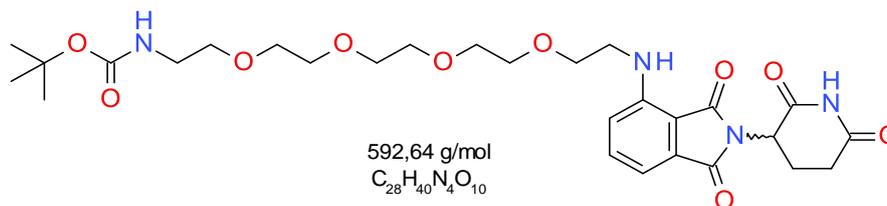
Ausbeute: 49,0 mg (0,09 mmol, 55%)

MS: $m/z = [M+H]^+$ berechnet: 548,59 gefunden: 549,05

DC: $R_f = 0,40$ (*n*-Hex/EE 1:9)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 8.48$ (bs, 1H, NH 2,6-Dioxo-3-piperidyl), 7.47 (dd, $^3J = 8.5, 7.1$ Hz, 1H, H6 1,3-Dioxo-isoindolin-4-yl), 7.08 (d, $^3J = 7.1$ Hz, 1H, H5 1,3-Dioxo-isoindolin-4-yl), 6.91 (d, $^3J = 8.5$ Hz, 1H, H7 1,3-Dioxo-isoindolin-4-yl), 4.90 (dd, $^3J = 12.2, 5.3$ Hz, 1H, CH 2,6-Dioxo-3-piperidyl), 3.71 (t, $^3J = 5.5$ Hz, 2H, Carbamat-CH₂-CH₂-O), 3.68-3.66 (m, 4H, Carbamat-Ethyl-O-CH₂-CH₂-O), 3.64-3.58 (m, 4H, O-CH₂-CH₂-O-Ethyl-NH-Isoindol), 3.51 (t, $^3J = 5.2$ Hz, 2H, -O-CH₂-CH₂-NH-Isoindol), 3.46 (t, $^3J = 5.4$ Hz, 2H, O-CH₂-CH₂-NH-Isoindol), 3.28 (t, $^3J = 5.3$ Hz, 2H, Carbamat-CH₂-CH₂), 2.86-2.84 (m, 1H, CH-CH₂-CH₂), 2.74-2.70 (m, 2H, CH₂-CH₂-CO), 2.10-2.07 (m, 1H, -CH-CH₂-CH₂-), 1.42 (s, 9H, *t*-Butyl) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 171.4, 169.4, 168.7, 167.8, 156.2, 147.0, 136.2, 132.7, 117.0, 111.8, 110.5, 79.5, 70.9, 70.76, 70.75, 70.40, 70.35, 69.7, 49.1, 42.6, 31.6, 29.9, 28.6, 23.0$ ppm.

8.5.9 *t*-Butyl *N*-[2-[2-[2-[2-[2-[(2,6-dioxo-3-piperidyl)-1,3-dioxo-isoindolin-4-yl]amin]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethyl]carbammat (30d, RK22)

Durchführung: **RK12** (90 mg, 0,33 mmol, 1,1 Äq) und *t*-Butyl *N*-[2-[2-[2-[2-(2-aminethoxy)ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethyl]carbammat (100 mg, 0,29, 1,0 Äq) wurden in 5 mL DMF gelöst, mit DIPEA (0,1 mL, 0,59 mmol, 2,0 Äq) versetzt und nach **AAV1** durchgeführt.

Das Rohprodukt wurde Flash-Chromatographie aufgereinigt (*n*-Hex/EE 40:60 → 5:95).

Das Produkt wurde als gelb leuchtendes Öl erhalten.

Ausbeute: 104 mg (0,18 mmol, 59%)

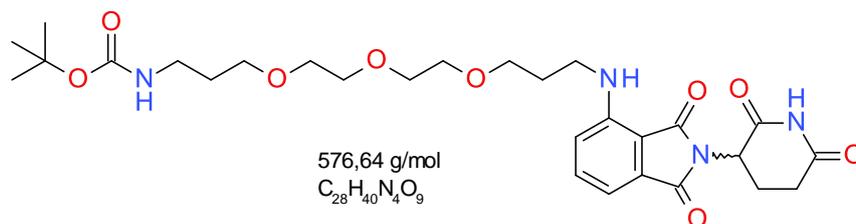
MS: $m/z = [M+H]^+$ berechnet: 592,27 gefunden: 593,10

DC: $R_f = 0,31$ (*n*-Hex/EE 1:9)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 8.41$ (bs, 1H, NH 2,6-Dioxo-3-piperidyl), 7.48 (dd, $^3J = 8.5, 7.2$ Hz, 1H, H6 1,3-Dioxo-isoindolin-4-yl), 7.09 (d, $^3J = 6.8$ Hz, 1H, H5 1,3-Dioxo-isoindolin-4-yl), 6.91 (d, $^3J = 8.5$ Hz, 1H, H7 1,3-Dioxo-isoindolin-4-yl), 6.50 (bs, 1H, NH Carbamat), 5.1 (bs, 1H, NH-Isoindol), 4.90 (dd, $^3J = 12.1, 5.5$ Hz, 1H, CH 2,6-Dioxo-3-piperidyl), 3.71 (t, $^3J = 5.3$ Hz, 2H, Carbamat-CH₂-CH₂-O), 3.66-3.58 (m, 12H, O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O), 3.53 (t, $^3J = 5.1$ Hz, 2H, O-CH₂-CH₂-NH-Isoindol), 3.46 (t, $^3J = 5.4$ Hz, 2H, O-CH₂-CH₂-NH-Isoindol), 3.29 (t, $^3J = 5.3$ Hz, 2H, Carbamat-CH₂-CH₂), 2.88-2.86 (m, 1H, CH-CH₂-CH₂), 2.75-2.71 (m, 2H, CH₂-CH₂-CO), 2.12-2.08 (m, 1H, CH-CH₂-CH₂), 1.43 (s, 9H, *t*-Butyl) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 171.3, 169.4, 168.6, 167.7, 156.2, 147.0, 136.2, 132.7, 116.9, 111.8, 110.5, 79.6, 70.9, 70.8, 70.71, 70.70, 70.6, 70.39, 70.38, 69.6, 49.0, 42.5, 31.5, 29.8, 28.5, 22.9$ ppm.

8.5.10 *t*-Butyl *N*-[3-[2-[2-[3-[[2-(2,6-dioxo-3-piperidyl)-1,3-dioxo-isoindolin-4-yl]amin]propoxy]ethoxy]ethoxy]propyl]carbamate (55, RK20)



Durchführung: **RK12** (100 mg, 0,36 mmol, 1 Äq) und *t*-Butyl *N*-[3-[2-[2-(3-aminpropoxy)ethoxy]ethoxy]propyl]carbamate (116 mg, 0,36 mmol, 1 Äq) wurden in 5 mL DMF gelöst, mit DIPEA (0,1 mL, 0,72 mmol, 2 Äq) versetzt und nach AAV1 durchgeführt.

Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Rohprodukt mittels Flash-Chromatographie aufgereinigt (*n*-Hex/EE 3:7 → 1:9).

Das Produkt wurde als gelb leuchtendes Öl erhalten.

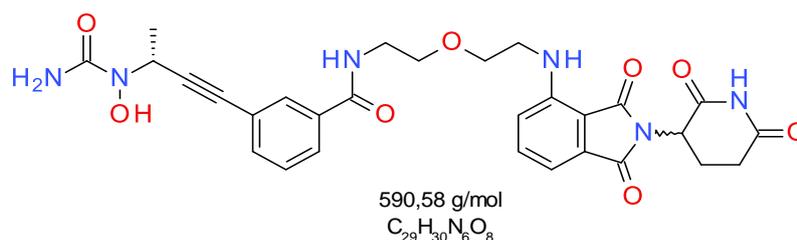
Ausbeute: 111 mg (0,19 mmol, 53%)

MS: $m/z = [M-H]^-$ berechnet: 576,64 gefunden: 575,15

DC: $R_f = 0,54$ (*n*-Hex/EE 1:9)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): $\delta = 8.43$ (bs, 1H, NH 2,6-Dioxo-3-piperidyl), 7.47 (td, ⁴ $J = 0.4$ Hz, ³ $J = 7.8$ Hz, 1H, H6 1,3-dioxo-isoindolin-4-yl), 7.07 (d, ³ $J = 7.1$ Hz, 1H, H5 1,3-dioxo-isoindolin-4-yl), 6.92 (d, ³ $J = 8.6$ Hz, 1H, H7 1,3-dioxo-isoindolin-4-yl), 6.53 (bs, 1H, NH Carbamat), 4.97 (bs, 1H, NH-Isoindol), 4.90 (dd, ³ $J = 11.9, 5.0$ Hz, 1H, CH 2,6-Dioxo-3-piperidyl), 3.68-3.54 (m, 10H, Carbamat-propyl-*O*-CH₂-CH₂-*O*-CH₂-CH₂-*O*-CH₂), 3.51 (t, ³ $J = 6.0$ Hz, 2H, Carbamat-CH₂-CH₂-CH₂-*O*), 3.39 (t, ³ $J = 6.3$ Hz, 2H, CH₂-CH₂-NH-Isoindol), 3.20 (t, ³ $J = 6.1$ Hz, 2H, Carbamat-CH₂-CH₂), 2.80-2.76 (m, 2H, CH₂-CH₂-CO), 2.11-2.09 (m, 1H, CH-CH₂-CH₂), 1.92 (quint, ³ $J = 6.1$ Hz, 2H, Carbamat-CH₂-CH₂-CH₂), 1.73 (quint, ³ $J = 6.3$ Hz, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-NH-Isoindol), 1.42 (s, 9H, *t*-Butyl) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 171.6, 169.4, 168.8, 167.7, 156.1, 147.0, 136.1, 132.5, 116.7, 111.3, 109.9, 79.0, 70.6, 70.5, 70.4, 70.2, 69.5, 68.8, 48.9, 40.1, 38.5, 31.4, 29.7, 29.4, 28.5, 22.8$ ppm.

8.5.11 3-[(3*R*)-3-[Carbamoyl(hydroxy)amin]but-1-ynyl]-*N*-[2-[2-[[2-(2,6-dioxo-3-piperidyl)-1,3-dioxo-isoindolin-4-yl]amino]ethoxy]ethyl]benzamid (18a, RK32)

Durchführung: **RK31** (36 mg, 79 μ mol, 1,3 Äq) wurde in 3 mL abs. DCM und 0,2 mL Trifluoressigsäure bei 0 °C gelöst und 1 h bei RT gerührt und nach **AAV2** durchgeführt. Nach Entschützung wurde **RK17** (15 mg, 60 μ mol, 1,0 Äq), gelöst in 2 mL DMF, PyPOB (35 mg, 66 μ mol, 1,1 Äq), HOBT·H₂O (5 mg, 30 μ mol, 0,5 Äq) und DIPEA zugegeben und weiter nach **AAV2** verfahren. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt (Methode C).

Das Produkt wurde als gelbleuchtender Feststoff erhalten.

Ausbeute: 14 mg (24 μ mol, 39%)

t_r: 6,16 min (Methode A) 98%

T_m: 140,4 °C

MS: m/z = [M] berechnet 590,59 gefunden: 590,95

HRMS: m/z = [M+H]⁺ simuliert: 591,21979, gemessen: 591,21854 Δ m = 2,11 ppm

DC: R_f = 0,42 (DCM/MeOH 95:5)

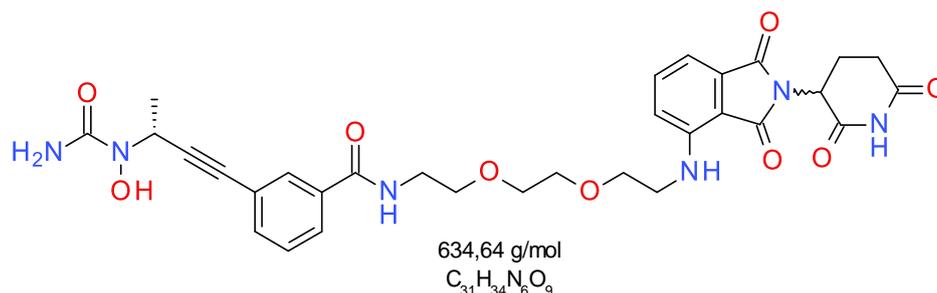
IR: ν = 3370 (w, OH), 1754 (s, C=O), 1111, (s, N-O), 1054 (m, Amid), 814 (m, C-N) cm⁻¹

¹H-NMR (300 MHz, (CD₃)₂CO): δ = 9.94 (s, 1H, NH, 2,6-Dioxo-3-piperidyl), 8.73 (s, 1H, OH), 7.89 (t, 1H, ⁴J = 1.5 Hz, H2 3-Benzamid), 7.86 (bs, 1H, NH Amid), 7.82 (td, ⁴J = 1.5 Hz, ³J = 7.8 Hz, 1H, H6 3-Benzamid), 7.56 (dd, ³J = 8.6, 7.1 Hz, 1H, H6 1,3-Dioxo-isoindolin-4-yl), 7.51 (td, ⁴J = 1.4 Hz, ³J = 7.7 Hz, 1H, H4 Benzamid), 7.40 (t, ³J = 7.7 Hz, 1H, H5 Benzamid), 7.12 (d, ³J = 8.5 Hz, 1H, H5 1,3-Dioxo-isoindolin-4-yl), 7.02 (d, ³J = 7.1 Hz, 1H, H7 1,3-Dioxo-isoindolin-4-yl), 6.61 (bs, 1H, NH-Isoindol), 6.16 (bs, 2H, NH₂), 5.27 (q, ³J = 7.0 Hz, 1H, H3 3*R*-Butinyl), 5.00 (dd, ³J = 12.6, 5.5 Hz, 1H, CH 2,6-Dioxo-3-piperidyl), 3.77 (t, ³J = 5.4 Hz, 2H, O-CH₂-CH₂-NH), 3.71 (t, ³J = 5.4 Hz, 2H, CH₂ Amid-CH₂-CH₂-O-), 3.61 (t, ³J = 5.3 Hz, 2H, CH₂ Amid-CH₂-CH₂-), 3.56-3.53 (m, 2H, CH₂ O-CH₂-CH₂-NH), 2.99-2.96 (m, 1H, CH-CH₂-CH₂), 2.78-2.74 (m, 2H, CH₂-CH₂-CO), 2.21 (tdd, ³J = 12.5 Hz, 4.1, 2.9 Hz, 1H, CH-CH₂-CH₂), 1.45 (d, ³J = 7.2 Hz, 3H, CH₃) ppm.

¹H-¹H-COSY (400 MHz, (CD₃)₂CO): δ = 7.86/3.61, 7.82/7.40, 7.56/7.12, 7.56/7.02, 7.51/7.40, 6.61/3.54, 5.27/1.45, 5.00/2.76, 5.00/2.97, 5.00/2.21, 3.77/3.54, 3.71/3.61, 2.97/2.78, 2.78/2.21 ppm.

¹H-¹³C-HSQC (400 MHz, (CD₃)₂CO): δ = 7.89/131.2, 7.82/127.8, 7.56/136.1, 7.51/133.5, 7.40/127.8, 5.27/47.4, 5.00/50.0, 3.77/70.1, 3.71/70.0, 3.61/40.5, 3.55/43.0, 2.97/23.4, 2.76/32.1, 2.21/23.4, 1.45/18.6 ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, (CD₃)₂CO): δ = 172.8, 170.3, 170.2, 168.3, 166.8, 162.2, 147.8, 136.9, 136.1, 134.8, 133.5, 131.2, 129.4, 127.8, 124.2, 117.9, 111.6, 111.1, 90.6, 82.4, 70.1, 70.0, 50.0, 47.4, 43.0, 40.5, 32.1, 23.4, 18.6 ppm.

8.5.12 3-[(3*R*)-3-[Carbamoyl(hydroxy)amin]but-1-ynyl]-*N*-[2-[2-[2-[[2-(2,6-dioxo-3-piperidyl)-1,3-dioxo-isoindolin-4-yl]amino]ethoxy]ethoxy]ethyl]benzamid (18b, RK23)

Durchführung: **RK21** (56 mg, 110 μ mol, 1,2 Äq) wurde in 3 mL abs. DCM und 1.5 mL Trifluoressigsäure bei 0 °C gelöst und nach **AAV2** verfahren. Nach Entschützung wurde **RK17** (23 mg, 90 μ mol, 1,0 Äq), gelöst in 2 mL DMF, PyBOP (53 mg, 100 μ mol, 1,1 Äq), HOBt-H₂O (7 mg, 50 μ mol, 0,5 Äq) und DIPEA zugegeben und weiter nach **AAV2** verfahren. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt (Methode C).

Das Produkt wurde als gelbleuchtender Schaum erhalten.

Ausbeute: 10 mg (16 μ mol, 17%)

t_r: 6,18 min (Methode A) 95%

T_m: 150,1 °C

MS: m/z = [M] berechnet 634,64 gefunden: 635,00

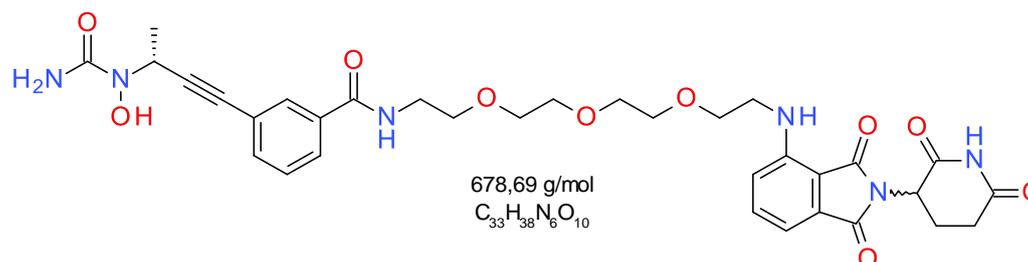
HRMS: m/z = [M+H]⁺ simuliert 635,24600 gemessen: 635,24513 Δ m = 1,37 ppm

DC: R_f = 0,41 (DCM/MeOH 95:5)

¹H-NMR (400 MHz, (CD₃)₂CO): δ = 9.98 (s, 1H, NH, 2,6-Dioxo-3-piperidyl), 8.72 (s, 1H, OH), 7.87 (t, ⁴J = 1.8 Hz, 1H, H2 3-Benzamid), 7.82 (td, ⁴J = 1.5 Hz, ³J = 7.8 Hz, 1H, H6 3-Benzamid), 7.78 (m, 1H, NH Amid), 7.56 (dd, ³J = 8.5, 7.1 Hz, 1H, H6 1,3-Dioxo-isoindolin-4-yl), 7.48 (td, ⁴J = 1.3 Hz, ³J = 7.6 Hz, 1H, H4 Benzamid), 7.38 (t, ³J = 7.1 Hz, 1H, H5 Benzamid), 7.08 (d, ³J = 8.6 Hz, 1H, H5 1,3-Dioxo-isoindolin-4-yl), 7.02 (d, ³J = 8.5 Hz, 1H, H5 1,3-Dioxo-isoindolin-4-yl), 6.59 (bs, 1H, NH-Isoindol), 6.17 (bs, 2H, NH₂), 5.27 (q, ³J = 6.9 Hz, 1H, H3 3*R*-Butinyl), 5.06 (dd, ³J = 12.4, 5.4 Hz, 1H, CH 2,6-Dioxo-3-piperidyl), 3.75 (t, ³J = 5.3 Hz, 2H, O-CH₂-CH₂-NH), 3.67-3.62 (m, 6H, CH₂-O-CH₂-CH₂-O), 3.56 (q, ³J = 6.9 Hz, 2H, Amid-CH₂-CH₂), 3.50 (t, ³J = 5.2 Hz, 2H, O-CH₂-CH₂-NH), 2.99-2.96 (m, 1H, CH-CH₂-CH₂), 2.77-2.74 (m, 2H, CH₂-CH₂-CO), 2.20 (tdd, ³J = 12.8, 5.2, 2.2 Hz, 1H, CH-CH₂-CH₂), 1.45 (d, ³J = 7.0 Hz, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, (CD₃)₂CO): δ = 172.8, 170.4, 170.3, 168.3, 166.7, 162.2, 147.7, 136.9, 136.1, 134.7, 133.5, 131.1, 129.3, 127.8, 124.2, 117.9, 111.5, 111.1, 90.6, 82.4, 71.1, 71.0, 70.2, 70.1, 49.9, 47.6, 43.0, 40.5, 32.0, 23.4, 18.6 ppm.

8.5.13 3-[(3*R*)-3-[Carbamoyl(hydroxy)amino]but-1-ynyl]-*N*-[2-[2-[2-[2-[(2,6-dioxo-3-piperidyl)-1,3-dioxo-isoindolin-4-yl]amin]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethyl]benzamid (17c, RK34)



Durchführung: **RK28** (28 mg, 51 μ mol, 1,2 Äq) wurde in 3 mL abs. DCM und 1,5 mL Trifluoressigsäure bei 0 °C gelöst und nach **AAV2** verfahren. Nach Entschützung wurde **RK17** (10,6 mg, 43 μ mol, 1,0 Äq) gelöst in 2 mL DMF, PyBOP (24,3 mg, 47 μ mol, 1,1 Äq), HOBT·H₂O (3,4 mg, 20 μ mol, 0,5 Äq) und DIPEA zugegeben und weiter nach **AAV2** verfahren. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt (Methode C).

Das Produkt wurde als gelbleuchtender Feststoff erhalten.

Ausbeute: 7,88 mg (11,6 μ mol, 27%)

t_r: 6,29 min (Methode A) 99%

T_m: 150,3 °C

MS: m/z = [M] berechnet: 678,69 gefunden: 679,05

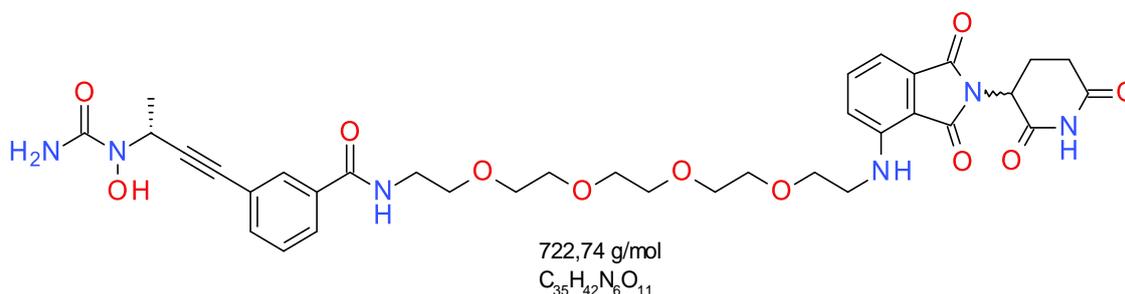
HRMS: m/z = [M+H]⁺ simuliert: 679,27222 gemessen: 679,27191 Δ m = 0,46 ppm

DC: R_f = 0,42 (DCM/MeOH 95:5)

¹H-NMR (300 MHz, (CD₃)₂CO): δ = 10.00 (s, 1H, NH, 2,6-Dioxo-3-piperidyl), 8.83 (bs, 1H, OH), 7.90 (t, ⁴J = 1.8 Hz, 1H, H2 3-Benzamid), 7.89-7.77 (m, 1H, NH Amid), 7.84 (td, ⁴J = 1.5 Hz, ³J = 7.7 Hz, 1H, H6 3-Benzamid), 7.57 (dd, ³J = 8.5, 7.2 Hz, 1H, H6 1,3-Dioxo-isoindolin-4-yl), 7.51 (td, ⁴J = 1.2 Hz, ³J = 7.6 Hz, 1H, H4 Benzamid), 7.41 (t, ³J = 7.7 Hz, 1H, H5 Benzamid), 7.09 (d, ³J = 8.6 Hz, 1H, H5 1,3-Dioxo-isoindolin-4-yl), 7.03 (d, ³J = 7.1 Hz, 1H, H5 1,3-Dioxo-isoindolin-4-yl), 6.58 (t, ³J = 5.5 Hz, 1H, NH-Isoindol), 6.16 (bs, 2H, NH₂), 5.27 (q, ³J = 7.1 Hz, 1H, H3, 3*R*-Butinyl), 5.07 (dd, ³J = 12.4, 5.4 Hz, 1H, CH 2,6-Dioxo-3-piperidyl), 3.71 (t, ³J = 5.4 Hz, 2H, O-CH₂-CH₂-NH), 3.64-3.59 (m, 10H, Amid-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O), 3.55 (t, ³J = 5.1 Hz, 2H, Amid-CH₂-CH₂), 3.50 (q, ³J = 5.4 Hz, 2H, O-CH₂-CH₂-NH), 2.94-2.92 (m, 1H, CH-CH₂-CH₂), 2.77-2.74 (m, 2H, CH₂-CH₂-CO), 2.21 (tdd, ³J = 5.2, 2.3 Hz, ²J = 12.6 Hz, 1H, CH-CH₂-CH₂), 1.45 (d, ³J = 7.0 Hz, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, (CD₃)₂CO): δ = 172.9, 170.3, 170.2, 168.3, 166.7, 162.3, 147.8, 136.9, 136.1, 134.8, 133.6, 131.1, 129.4, 127.9, 124.2, 118.0, 111.5, 111.0, 90.6, 82.4, 71.27, 71.25, 71.21, 70.9, 70.2, 70.1, 50.0, 47.4, 43.0, 40.5, 32.0, 23.4, 18.6 ppm.

8.5.14 3-[(3*R*)-3-[Carbamoyl(hydroxy)amino]but-1-ynyl]-*N*-[2-[2-[2-[2-[2-[(2,6-dioxo-3-piperidyl)-1,3-dioxo-isoindolin-4-yl]amin]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethyl]benzamid (18d, RK26)



Durchführung: RK22 (5,0 mg, 8,4 μ mol, 1,2 Äq) wurde in 1 mL abs. DCM und 0,5 mL Trifluoressigsäure bei 0 °C gelöst und nach **AAV2** verfahren. Nach Entschützung wurde **RK17** (1,8 mg, 7,0 μ mol, 1,0 Äq) gelöst in 2 mL DMF, PyBOP (4,0 mg, 7,7 μ mol, 1,1 Äq), HOBt-H₂O (0,6 mg, 3,5 μ mol, 0,5 Äq) und DIPEA zugegeben und weiter nach **AAV2** verfahren. Das Rohprodukt wurde mittels präparativen HPLC aufgereinigt (Methode C).

Das Produkt wurde als gelbleuchtender Feststoff erhalten.

Ausbeute: 2,0 mg (2,77 μ mol, 39%)

T_m: 149,8 °C

t_r: 6,29 min (Methode A) 96%

MS: m/z = [M] berechnet: 722,74 gefunden: 723,05

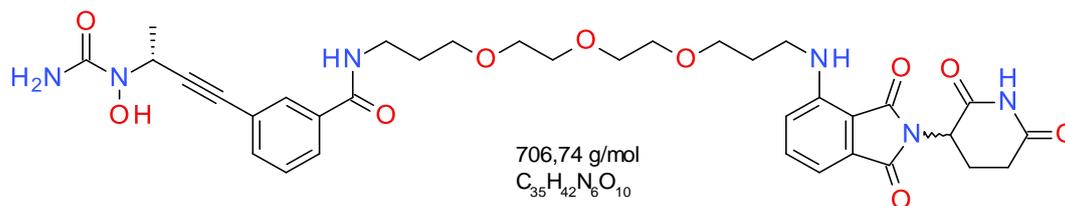
HRMS: m/z = [M+H]⁺ simuliert: 723,29843 gemessen: 723,29801 Δ m = 0,58 ppm

DC: R_f = 0,41 (DCM/MeOH 95:5)

¹H-NMR (500 MHz, (CD₃)₂CO): δ = 9.97 (s, 1H, NH, 2,6-Dioxo-3-piperidyl), 8.74 (s, 1H, OH), 7.91 (t, ⁴J = 1.5 Hz, 1H, H2 3-Benzamid), 7.87 (t, ³J = 5.8 Hz, 1H, NH Amid), 7.85 (td, ⁴J = 1.2 Hz, ³J = 8.3 Hz, 1H, H6 3-Benzamid), 7.58 (dd, ³J = 8.4, 7.2 Hz, 1H, H6 1,3-Dioxo-isoindolin-4-yl), 7.52 (td, ⁴J = 1.4, ³J = 7.9 Hz, 1H, H4 Benzamid), 7.42 (t, ³J = 7.7 Hz, 1H, H5 Benzamid), 7.11 (d, ³J = 8.6 Hz, 1H, H5 1,3-Dioxo-isoindolin-4-yl), 7.04 (d, ³J = 7.1 Hz, 1H, H5 1,3-Dioxo-isoindolin-4-yl), 6.59 (t, ³J = 5.5 Hz, 1H, NH-Isoindol), 6.15 (bs, 2H, NH₂), 5.27 (q, ³J = 7.1 Hz, 1H, H3 3*R*-Butinyl), 5.06 (dd, ³J = 12.6, 5.5 Hz, 1H, CH 2,6-Dioxo-3-piperidyl), 3.72 (t, ³J = 5.4 Hz, 2H, O-CH₂-CH₂-NH), 3.64-3.57 (m, 14H, CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O), 3.56 (t, 2H, CH₂, Amid-CH₂-CH₂), 3.51 (q, 2H, O-CH₂-CH₂-NH-Isoindol), 2.98-2.95 (m, 1H, CH-CH₂-CH₂), 2.75-2.74 (m, 2H, CH₂-CH₂-CO), 2.21 (tdd, ³J = 12.8, 5.3, 2.2 Hz, 1H, CH-CH₂-CH₂), 1.45 (d, ³J = 7.0 Hz, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, (CD₃)₂CO): δ = 172.8, 170.3, 170.3, 168.3, 166.7, 162.2, 147.8, 136.9, 136.1, 134.7, 133.6, 131.2, 129.4, 127.9, 124.2, 118.0, 111.5, 111.1, 90.6, 82.4, 71.3, 71.23, 71.22, 71.21, 71.17, 70.9, 70.19, 70.16, 50.0, 47.4, 43.0, 40.6, 32.0, 23.4, 18.6 ppm.

8.5.15 3-[(3*R*)-3-[Carbamoyl(hydroxy)amino]but-1-ynyl]-*N*-[3-[2-[2-[3-[[2-(2,6-dioxo-3-piperidyl)-1,3-dioxo-isoindolin-4-yl]amin]propoxy]ethoxy]ethoxy]propyl]benzamid (74, RK19)



Durchführung: **RK20** (18,0 mg, 31 μ mol, 1,2 Äq) wurde in 2 mL abs. DCM und 1 mL Trifluoressigsäure bei 0 °C gelöst und nach **AAV2** verfahren. Nach Entschützung wurde **RK17** (6,8 mg, 25 μ mol, 1,0 Äq) gelöst in 2 mL DMF, PyBOP (15,0 mg, 28 μ mol, 1,1 Äq), HOBT·H₂O (2,1 mg, 13 μ mol, 0,5 Äq) und DIPEA zugegeben und weiter nach **AAV2** verfahren. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt (Methode C).

Das Produkt wurde als gelbleuchtender Feststoff erhalten.

Ausbeute: 5,0 mg (7,1 μ mol, 27%)

t_r: 6,83 min (Methode A) 97%

T_m: 122,4 °C

MS: m/z = [M+H]⁺ berechnet 706,75 gefunden: 707,43

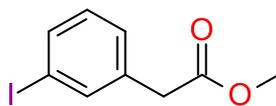
HRMS: m/z = [M+H]⁺ simuliert 707,30352 gemessen: 707,30319 Δ m = 0,47 ppm

DC: R_f = 0,42 (DCM/MeOH 96:4)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.84 (bd, ³J = 17.7 Hz, 1H, NH, 2,6-Dioxo-3-piperidyl), 7.78 (s, 1H, H2 3-Benzamid) 7.75 (d, ³J = 7.9 Hz, 1H, H6 Benzamid), 7.47 (dd, ⁴J = 0.5 Hz, ³J = 7.3 Hz, 1H, H4 3-Benzamid), 7.44 (dd, ⁴J = 1.2 Hz, ³J = 6.6 Hz, 1H, H6 Benzamid), 7.41-7.38 (m, 1H, NH, Amid), 7.30 (td, ⁴J = 1.2 Hz, ³J = 7.7 Hz, 1H, H5 Benzamid), 7.06 (d, ³J = 7.1 Hz, 1H, H5 1,3-Dioxo-isoindolin-4-yl), 6.86 (d, ³J = 8.6 Hz, 1H, H7 1,3-Dioxo-isoindolin-4-yl), 5.35 (q, ³J = 6.8 Hz, 1H, H3, 3*R*-Butinyl), 5.30 (s, 1H, NH-Isoindol), 4.88 (dd, ³J = 11.7, 5.4 Hz, 1H, CH 2,6-Dioxo-3-piperidyl), 3.68-3.63 (m, 8H, O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O), 3.57-3.46 (m, 6H, O-CH₂-CH₂-NH-Isoindol und Amid-Ethyl-CH₂-O), 3.33 (t, ³J = 6.3 Hz, 2H, Amid-CH₂-CH₂), 2.84 (t, ³J = 11.8 Hz, 1H, CH-CH₂-CH₂), 2.73 (t, ³J = 10.8 Hz, 2H, CH₂-CH₂-CO), 2.12-2.08 (m, 1H, CH-CH₂-CH₂), 1.87 (quint, ³J = 5.5 Hz, 2H, Amid-CH₂-CH₂-CH₂), 1.85 (quint, ³J = 5.7 Hz, 2H, CH₂-CH₂-CH₂-NH), 1.48 (dd, ⁴J = 0.6 Hz, ³J = 7.0 Hz, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 171.7, 169.5, 169.0, 167.8, 166.7, 161.2, 147.0, 136.3, 134.8, 134.3, 132.6, 130.4, 128.6, 127.3, 123.2, 116.8, 111.6, 110.0, 89.1, 82.4, 71.0, 70.5, 70.34, 70.30, 69.4, 53.6, 49.0, 47.2, 40.5, 39.4, 31.5, 29.0, 28.7, 23.0, 18.0 ppm.

8.5.16 Methyl-2-(3-iodphenyl)acetat (31, RK36)



276,07 g/mol
C₉H₉IO₂

Durchführung: 2-(3-Iodphenyl)essigsäure (5,0 g, 19,1 mmol, 1 Äq) wurde in 63 mL abs. Methanol gelöst und mit 1 mL konz. Schwefelsäure versetzt. Die Reaktionslösung wurde ÜN zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand in gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und EE aufgenommen. Die wässrige Phase wurde (3x) mit EE extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Produkt als bräunliches Öl erhalten.

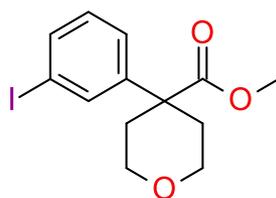
Ausbeute: 5,10 g (18,5 mmol, 97%)

DC: R_f = 0,57 (*n*-Hex/EE 95:5)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.64 (t, ⁴J = 1.8 Hz, 1H, H2 3-Iod-Ph), 7.61 (d, ³J = 7.5 Hz, 1H, H4 3-Iod-Ph), 7.25 (d, ³J = 7.3 Hz, 1H, H6 3-Iod-Ph), 7.06 (t, ³J = 7.8 Hz, 1H, H5 3-Iod-Ph), 3.70 (s, 3H, CH₃), 3.57 (s, 2H, CH₂) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): 171.5, 138.4, 136.4, 136.3, 130.4, 128.7, 94.5, 52.3, 40.7 ppm.

8.5.17 Methyl-4-(3-iodphenyl)tetrahydropyran-4-carboxylat (34, RK104)



346,16 g/mol
C₁₃H₁₅IO₃

Durchführung: Zu einer Lösung aus **RK36** (630 mg, 2,28 mmol, 1,0 Äq) in 5 mL abs. DMSO wurde bei 10 °C 60% Natriumhydrid in Mineralöl (201 mg, 5,02 mmol, 2,2 Äq) in Portionen dazu gegeben. Nach 10 min Rühren bei dieser Temperatur wurde Bis(2-chlorethyl)ether (0,3 mL, 2,74 mmol, 1,2 Äq) dazu gegeben und 2 h bei RT gerührt. Zu der Lösung wurden EE und dest. Wasser gegeben, anschließend wurde die wässrige Phase (3x) mit EE extrahiert und mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde entfernt und die gelbe Lösung mittels Flash-Chromatographie aufgereinigt (*n*-Hex/EE 93:7 → 85:15).

Das Produkt wurde als farbloses Öl erhalten.

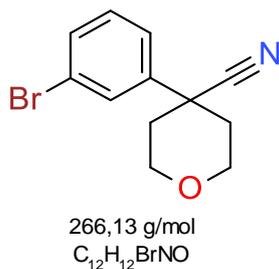
Ausbeute: 293 mg (0,85 mmol, 37%)

DC: R_f = 0,29 (*n*-Hex/EE 95:5)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.57 (t, ⁴J = 1.5 Hz, 1H, H2 3-Iod-Ph), 7.51 (dd, ⁴J = 1.0 Hz, ³J = 7.8 Hz, 1H, H4 3-Iod-Ph), 7.19 (dd, ⁴J = 1.1 Hz, ³J = 7.3 Hz, 1H, H6 3-Iod-Ph), 6.96 (t, ³J = 7.8 Hz, 1H, H5 3-Iod-Ph), 3.69-3.66 (m, 2H, CH₂ H2 und H6 THP), 3.70 (s, 3H, CH₃), 3.52-3.50 (m, 2H, CH₂ H2 und H6 THP), 3.40-3.34 (m, 1H, CH₂ H3 THP), 3.27-3.20 (m, 1H, CH₂ H5 THP), 2.28 (ddd, ³J = 13.9, 5.4, 2.6 Hz, 1H, CH₂ H3 THP), 1.87 (ddd, ³J = 13.9, 5.4, 2.6 Hz, 1H, CH₂ H5 THP) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 174.2, 145.0, 136.5, 134.9, 130.5, 125.2, 95.0, 65.6, 52.6, 48.6, 34.4 ppm.

8.5.18 4-(3-Bromphenyl)tetrahydropyran-4-carbonitril (42, RK48)



Durchführung: Zu einer Lösung aus 3-Bromphenylacetonitril (500 mg, 2,55 mmol, 1,0 Äq) in 5 mL DMSO wurde bei RT 60% Natriumhydrid in Mineralöl (224 mg, 5,61 mmol, 2,2 Äq) in Portionen dazu gegeben. Nach 10 min wurden Bis(2-chlorethyl)ether (0,4 mL, 3,1 mmol, 1,2 Äq) dazu gegeben und 1 h bei RT gerührt. Zu der Lösung wurde dest. Wasser und EE gegeben und die wässrige Phase (3x) mit EE extrahiert und mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde entfernt und die gelbe Lösung mittels Flash-Chromatographie aufgereinigt. (*n*-Hex/EE 90:10 → 80:20)

Das Produkt wurde als gelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 492 mg (1,85 mmol, 73%)

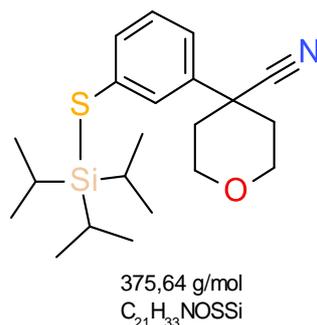
T_m: 88,7 °C

DC: R_f = 0,63 (*n*-Hex/EE 8:2)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.62 (t, ⁴J = 1.9 Hz, 1H, H2 3-Br-Ph), 7.49 (dd, ⁴J = 1.1 Hz, ³J = 7.8 Hz, 1H, H4 3-Br-Ph), 7.43 (ddd, ⁴J = 1.1, 1.9 Hz, ³J = 7.9 Hz, 1H, H6 3-Br-Ph), 7.29 (t, ³J = 8.9 Hz, 1H, H5 3-Br-Ph), 4.08 (dd, ³J = 12.4, 3.8 Hz, 2H, CH₂ H2_{ax} und H6_{ax} THP), 3.88 (td, ³J = 11.6, 3.2 Hz, 2H, CH₂ H2_{eq} und H_{eq} THP), 2.18-1.98 (m, 4H, CH₂ H3_{ax/eq} und H5_{ax/eq} THP) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 142.0, 131.6, 130.7, 128.8, 124.3, 123.3, 121.2, 64.9, 41.7, 36.6 ppm.

8.5.19 4-(3-Triisopropylsilylsulfanylphenyl)tetrahydropyran-4-carbonitril (43, RK70)



Durchführung: Zu einer Lösung aus 60% Natriumhydrid in Mineralöl (239 mg, 5,98 mmol, 1,2 Äq), in 3 mL THF wurde bei 0 °C Triisopropylsilylthiol (1,2 mL, 5,48 mmol, 1,1 Äq) dazu getropft. Nach 30 min Rühren bei RT wurde die Lösung zu einer Lösung, bestehend aus **RK48** (1320 mg, 4,98 mmol, 1,0 Äq), Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) (345 mg, 0,30 mmol, 0,06 Äq) und 3 mL Toluol, gegeben. Die Reaktionslösung wurde für 2 h zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand mittels Flash-Chromatographie aufgereinigt (*n*-Hex/EE 95:5 → 80:20).

Das Produkt wurde als hellgelbes Öl erhalten, welches bei 0 °C kristallisierte.

Ausbeute: 963 mg (2,56 mmol, 52%)

T_m: 51,2 °C

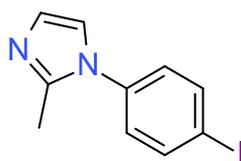
MS: $m/z = [M+H]^+$ berechnet: 375,65 gefunden: 376,19

DC: $R_f = 0,76$ (*n*-Hex/EE 8:2)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.62$ (t, $^4J = 1.8$ Hz, 1H, H2 3-S-Ph), 7.47 (td, $^4J = 1.5$ Hz, $^3J = 7.4$ Hz, 1H, H4 3-S-Ph), 7.34 (td, $^4J = 1.7$ Hz, $^3J = 7.9$ Hz, 1H, H6 3-S-Ph), 7.26 (t, $^3J = 7.6$ Hz, 1H, H5 3-S-Ph), 4.09 (dd, $^3J = 12.4$, 4.2 Hz, 2H, CH₂ H_{2ax} und H_{6ax} THP), 3.90 (td, $^3J = 11.7$, 3.0 Hz, 2H, CH₂ H_{2eq} und H_{6eq} THP), 2.16-1.99 (m, 4H, CH₂ H_{3ax/eq} und H_{5ax/eq} THP), 1.30-1.17 (m, 3H, 3x CH TIPS), 1.08 (d, $^3J = 6.9$ Hz, 18H, 6x CH₃ TIPS) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 140.4$, 135.4, 132.7, 129.4, 124.1, 123.6, 121.6, 65.1, 41.8, 36.7, 18.6, 13.2 ppm.

8.5.20 1-(4-Iodphenyl)-2-methylimidazol (39, RK53)



284,10 g/mol
 $C_{10}H_9IN_2$

Durchführung: 2-Methylimidazol (900 mg, 10,6 mmol, 1,0 Äq) wurde in 10 mL DMSO gelöst und auf 10 °C abgekühlt. Anschließend wurde 60% Natriumhydrid in Mineralöl (468 mg, 11,7 mmol, 1,1 Äq) in Portionen dazu gegeben. Die Reaktionslösung rührte 30 min bei RT, anschließend wurde 4-Fluoriodbenzol (1,2 mL, 10,6 mmol, 1,0 Äq) dazu gegeben. Die Reaktionslösung wurde auf 110 °C für 16 h erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wurde zu der Lösung dest. Wasser und EE gegeben. Die wässrige Phase wurde (5x) mit EE extrahiert, mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen über Magnesiumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Rohprodukt mittels Flash-Chromatographie aufgereinigt (DCM/MeOH 97:3 → 93:7).

Ausbeute: 1,98 g (6,96 mmol, 66%)

T_m: 136,2 °C

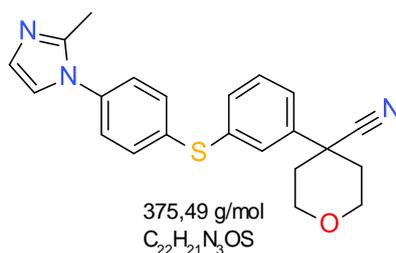
MS: m/z = [M] berechnet: 284,10 gefunden: 284,69

DC: R_f = 0,43 (DCM/MeOH 95:5)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 7.82 (dd, ⁴J = 2.0 Hz, ³J = 6.6 Hz, 2H, H3 und H5 4-Iod-Ph), 7.05 (dd, ⁴J = 2.1 Hz, ³J = 6.5 Hz, 2H, H2 und H6 4-Iod-Ph) 7.04 (d, ³J = 1.5 Hz, 1H, H5 2-Methylimidazol), 6.97 (d, ³J = 1.4 Hz, 1H, H4 2-Methylimidazol), 2.37 (s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 144.7, 138.9, 137.7, 127.8, 127.4, 120.6, 93.5, 13.8 ppm.

8.5.21 4-[3-[4-(2-Methylimidazol-1-yl)phenyl]sulfanylphenyl]tetrahydropyran-4-carbonitril
(44, RK75)



Durchführung: **RK70** (98 mg, 261 μ mol, 1,0 Äq), **RK39** (74 mg, 261 μ mol, 1,0 Äq), Dichlor[1,1'-bis(diphenylphosphin)ferrocen]palladium(II)dichlormethan (7 mg, 8 μ mol, 0,03 Äq), Kaliumtertbutanolat (35 mg, 313 μ mol, 1,2 Äq) und Caesiumfluorid (159 mg, 1044 μ mol, 4,0 Äq) wurden in 3 mL 1,4-Dioxan gelöst. Die Reaktionslösung rührte 12 h bei 100 °C. Nach Abkühlen auf RT wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand in dest. Wasser, gesättigter Natriumchlorid-Lösung und DCM aufgenommen. Die wässrige Phase wurde (3x) mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Rohprodukt mittels Flash-Chromatographie aufgereinigt (*n*-Hex/EE/MeOH 20:80:0 \rightarrow 0:100:0 \rightarrow 0:92:8).

Das Produkt wurde als braunes Öl erhalten.

Ausbeute: 74 mg (197 μ mol, 76%)

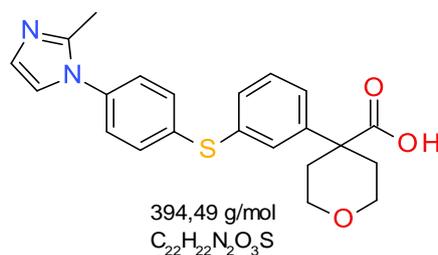
MS: $m/z = [M]$ berechnet: 375,49 gefunden: 375,80

DC: $R_f = 0,21$ (*n*-Hex/EE 2:8)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.54$ (s, 1H, H2 3-S-Ph), 7.42-7.37 (m, 5H, H5, 3-S-Ph und H2, H3, H5, H6 Ph), 7.24-7.21 (m, 2H, H4 und H6 3-S-Ph), 7.01 (s, 1H, H5 2-Methylimidazol), 6.98 (s, 1H, H4 2-Methylimidazol), 4.07 (dd, ³*J* = 12.2, 2.4 Hz, 2H, CH₂ H_{2ax} und H6_{ax} THP), 3.87 (td, ³*J* = 11.6, 2.1 Hz, 2H, CH₂ H_{2eq} und H6_{eq} THP), 2.36 (s, 3H, CH₃, 2-Methylimidazol), 2.15-2.02 (m, 4H, CH₂ H_{3ax/eq} und H5_{ax/eq} THP) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 144.7, 141.4, 137.0, 136.1, 136.1, 131.5, 131.4, 130.3, 128.7, 128.0, 126.4, 125.0, 121.4, 120.6, 65.0, 41.9, 36.7, 13.9$ ppm.

8.5.22 4-[3-[4-(2-Methylimidazol-1-yl)phenyl]sulfanylphenyl]tetrahydropyran-4-carbonsäure (18, RK81)



Durchführung: RK75 (55 mg, 146 μ mol, 1 Äq) wurde in einem Mikrowellenreaktionsgefäß in 1 mL 4 M NaOH und 1 mL Ethanol gelöst. Die Reaktionslösung rührte 3 h bei 120 °C und 5 bar unter Mikrowellenstrahlung. Die Reaktionslösung wurde eingeeengt und in dest. Wasser und DCM aufgenommen. Die wässrige Phase wurde (3x) mit DCM extrahiert, vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Produkt mit der Flash-Chromatographie aufgereinigt (DCM/MeOH/Essigsäure 94:6:0,1 \rightarrow 90:10:0,1)

Das Produkt wurde als orangebrauner Feststoff erhalten.

Ausbeute: 31 mg (78,6 μ mol, 54%)

T_m: 227,3 °C

MS: m/z = [M] berechnet: 394,49 gefunden: 393,95

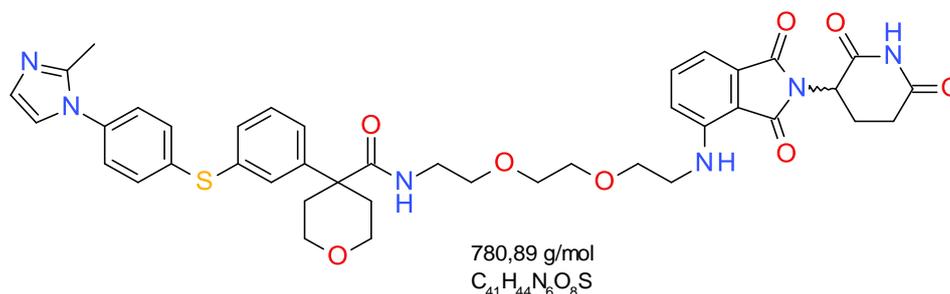
DC: R_f = 0,29 (DCM/MeOH/Essigsäure 94:6:0,1)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.45-7.39 (m, 7H, H2, H4, H5 3-S-Phenyl und H2, H3, H5, H6 Ph), 7.32 (td, ⁴J = 1.6 Hz, ³J = 7.1 Hz, 1H, H6 3-S-Ph), 7.29 (d, ⁴J = 1.2 Hz, 1H, H5 2-Methylimidazol), 6.92 (d, ⁴J = 1.2 Hz, 1H, H4 2-Methylimidazol), 3.79 (td, ³J = 12.0, 3.6 Hz, 2H, CH₂ H_{2ax} und H_{6ax} THP), 3.44 (td, ³J = 11.4, 1.7 Hz, 2H, CH₂ H_{2eq} und H_{6eq} THP), 2.33 (d, ³J = 12.7 Hz, 2H, CH₂ H_{3ax} und H_{5ax}, THP), 2.28 (s, 3H, CH₃, 2-Methylimidazol), 1.81 (td, ³J = 12.3, 4.1 Hz, 2H, CH₂ H_{3eq} und H_{5eq}) ppm.

Anmerkung: COOH Signal war nicht sichtbar.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 174.9, 144.7, 143.6, 136.4, 135.0, 133.9, 130.7, 130.1, 130.0, 128.8, 127.1, 126.2, 125.5, 120.8, 64.8, 47.9, 33.9, 13.5 ppm.

8.5.23 *N*-[2-[2-[2-[[2-(2,6-Dioxo-3-piperidyl)-1,3-dioxo-isoindolin-4-yl]amino]ethoxy]ethoxy]ethyl]-4-[3-[4-(2-methylimidazol-1-yl)phenyl]sulfonylphenyl]tetrahydropyran-4-carboxamid (20b, RK83)



Durchführung: **RK21** (20,0 mg, 39,5 μ mol, 1,2 Äq) wurden nach **AAV3a** entschützt. Das entschützte Amin wurde zu einer Lösung aus **RK81** (13,0 mg, 33,0 μ mol, 1,0 Äq), PyBOP (18,9 mg, 36,2 μ mol, 1,1 Äq), HOBT·H₂O (2,6 mg, 16,5 μ mol, 0,5 Äq) und DIPEA gegeben und weiter nach **AAV3a** verfahren. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt (Methode C). Das Produkt wurde als gelb leuchtendes Öl erhalten.

Ausbeute: 19,3 mg (24,7 μ mol, 75%)

t_r: min: 10,31 (Methode C) 95%

MS: m/z = [M] berechnet: 780,89 gefunden: 781,05

HRMS: m/z = [M+H]⁺ simuliert: 781,30141 gemessen: 781,30100 Δ m = 0,52 ppm

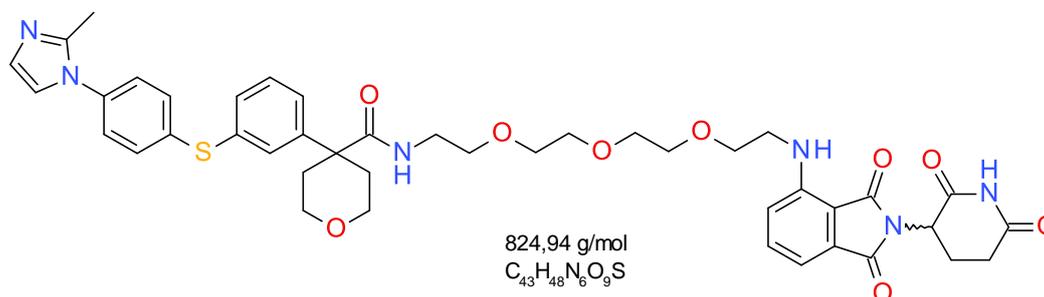
DC: R_f = 0,52 (DCM/MeOH 9:1)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ = 11.11 (s, 1H, NH 2,6-Dioxo-3-piperidyl), 7.76 (t, ³J = 5.6 Hz, 1H, NH Amid), 7.59 (dd, ³J = 8.3, 7.3 Hz, 1H, H6 1,3-Dioxo-isoindolin-4-yl), 7.45-7.35 (m, 7H, H2, H4, H5 3-S-Ph und H2, H3, H5, H6 Ph), 7.30-7.26 (m, 2H, H6 3-S-Ph und H5 2-Methylimidazol), 7.14 (d, ³J = 8.6 Hz, 1H, H5 1,3-Dioxo-isoindolin-4-yl), 7.05 (d, ³J = 7.0 Hz, 1H, H7 1,3-Dioxo-isoindolin-4-yl), 6.92 (d, ⁴J = 1.0 Hz, 1H, H4 2-Methylimidazol), 6.60 (t, ³J = 5.8 Hz, 1H, NH-Isoindol), 5.07 (dd, ³J = 12.9, 5.4 Hz, 1H, CH 2,6-Dioxo-3-piperidyl), 3.73 (td, ³J = 11.7, 2.7 Hz, 2H, CH₂ H_{2ax} und H_{6ax} THP), 3.59 (t, ³J = 5.4 Hz, 2H, O-CH₂-CH₂-NH), 3.51-3.41 (m, 8H, CH₂ H_{2eq} und H_{6eq} THP und O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-NH), 3.37 (t, ³J = 6.0 Hz, 2H, Amid-CH₂-CH₂-O), 3.19 (q, ³J = 5.7 Hz, 2H, Amid-CH₂-CH₂), 2.90 und 2.86 (dd, ³J = 14.0, 5.2 Hz, 2H, CH₂-CH₂-CO), 2.62-2.55 (m, 1H, CH-CH₂-CH₂), 2.43 (bd, ³J = 13,3 Hz, 2H, CH₂ H_{3ax} und H_{5ax} THP), 2.29 (s, 3H, CH₃, 2-Methylimidazol), 2.06-1.99 (m, 1H, CH-CH₂-CH₂), 1.81 (td, ³J = 12.2, 3.8 Hz, 2H, CH₂ H_{3eq} und H_{5eq}, THP) ppm.

¹H-¹H-COSY (400 MHz, DMSO): δ = 7.76/3.19 7.59/7.14, 7.59/7.05 7.36/7.29, 7.27/6.92, 6.60/3.44, 5.07/2.57, 5.06/2.02, 3.73/3.42, 3.73/2.43 3.73/1.81, 3.59/3.46, 3.37/3.19, 2.88/2.58 2.88/2.03, 2.43/1.81 ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO): δ = 172.8, 172.3, 170.1, 168.8, 167.3, 163.2, 146.4, 146.1, 143.6, 136.3, 136.2, 135.3, 132.2, 133.4, 132.1, 130.4, 129.9, 129.8, 129.1, 127.7, 126.1, 125.5, 120.7, 117.4, 110.6, 109.3 69.7, 69.5, 68.8, 68.7, 64.5, 48.5, 47.9, 41.7, 34.1, 31.0, 22.1, 13.5 ppm.

8.5.24 *N*-[2-[2-[2-[2-[2-[(2,6-dioxo-3-piperidyl)-1,3-dioxo-isoindolin-4-yl]amin]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethyl]-4-[3-[4-(2-methylimidazol-1-yl)phenyl]sulfonylphenyl]tetrahydropyran-4-carboxamid (20c, RK90)



Durchführung: **RK75** (12,0 mg, 32,0 μ mol, 1,0 Äq) und **RK20** (21,0 mg, 38,3 μ mol, 1,2 Äq) wurden nach **AAV3b** verseift und entschützt. Zum Verseifungsprodukt wurde PyBOP (18,3 mg, 35,2 μ mol, 1,1 Äq), HOBT·H₂O (2,5 mg, 16,0 μ mol, 0,5 Äq) und DIPEA zugegeben und weiter nach **AAV3b** verfahren. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt (Methode C). Das Produkt wurde als gelb leuchtendes Öl erhalten.

Ausbeute: 9,32 mg (11,3 μ mol, 35%)

t_r: 6,14 min (Methode A) 99%

MS: m/z = [M] berechnet: 824,94 gefunden: 824,95

HRMS: m/z = [M+H]⁺ simuliert: 825,32762 gemessen: 825,32733 Δ m = 0,35 ppm

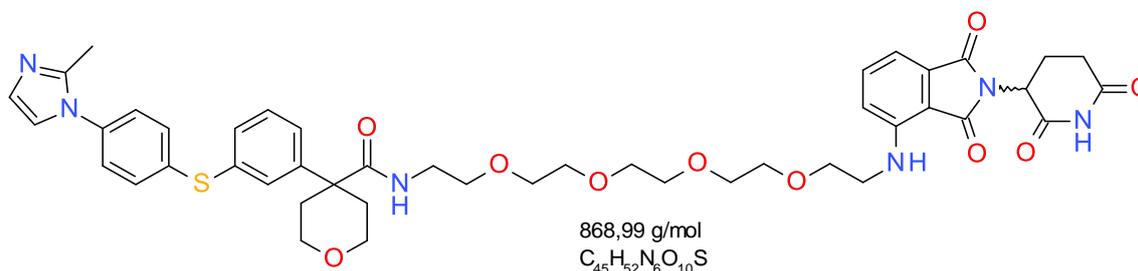
DC: R_f = 0,52 (DCM/MeOH 9:1)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ = 11.08 (s, 1H, NH, 2,6-Dioxo-3-piperidyl), 7.74 (t, ³J = 5.5 Hz, 1H, NH Amid), 7.57 (dd, ³J = 8.2, 7.4 Hz, 1H, H6 1,3-Dioxo-isoindolin-4-yl), 7.40-7.32 (m, 7H, H2, H4, H5 3-S-Ph und H2, H3, H5, H6 Ph), 7.29-7.27 (m, 1H, H6 3-S-Ph), 7.27 (d, ⁴J = 1.2 Hz, 1H, H5 2-Methylimidazol), 7.13 (d, ³J = 8.6 Hz, 1H, H5 1,3-Dioxo-isoindolin-4-yl), 7.03 (d, ³J = 8.6 Hz, 1H, H7 1,3-Dioxo-isoindolin-4-yl), 6.91 (d, ⁴J = 1.2 Hz, 1H, H4 2-Methylimidazol), 6.59 (t, ³J = 8.6 Hz, 1H, NH-Isoindol), 5.04 (dd, ³J = 12.9, 5.4 Hz, 1H, CH 2,6-Dioxo-3-piperidyl), 3.73-3.16 (m, 14H, CH₂ H_{2ax/eq} und H_{6ax/eq} THP und CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-NH), 3.16 (q, ³J = 6.0 Hz, 2H, Amid-CH₂-CH₂), 2.87-2.83 (m, 2H, CH₂-CH₂-CO), 2.61-2.55 (m, 1H, CH-CH₂-CH₂), 2.40 (bd, ³J = 13.3 Hz, 2H, CH₂ H_{3ax} und H_{5ax}, THP), 2.27 (s, CH₃, 2-Methylimidazol), 2.04-1.97 (m, 1H, CH-CH₂-CH₂), 1.78 (td, ³J = 12.2, 3.8 Hz, 2H, CH₂ H_{3eq} und H_{5eq}, THP) ppm.

¹H-¹H-COSY (400 MHz, DMSO): δ = 7.74/3.16, 7.57/7.13, 7.57/7.03, 7.32/7.28, 7.27/6.91, 6.59/3.46, 5.07/2.56, 5.06/2.02, 3.73/3.44, 3.73/2.40, 3.73/1.78, 3.59/3.49, 3.37/3.19, 2.85/2.58, 2.85/2.02, 2.40/1.78 ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO): δ = 172.8, 172.5, 170.1, 169.0, 167.3, 163.1, 146.4, 146.1, 143.7, 136.3, 135.4, 133.4, 132.1, 130.4, 130.0, 130.0, 129.8, 129.2, 127.2, 126.1, 125.6, 120.8, 117.5, 110.7, 109.3, 69.79, 69.78, 69.75, 69.5, 68.9, 68.7, 64.6, 48.6, 48.0, 41.7, 40.2, 34.1, 31.0, 22.2, 13.5 ppm.

8.5.25 *N*-[2-[2-[2-[2-[3-[[2-(2,6-Dioxo-3-piperidyl)-1,3-dioxo-isoindolin-4-yl]amin]propoxy]ethoxy]ethoxy]ethyl]-4-[3-[4-(2-methylimidazol-1-yl)phenyl]sulfonylphenyl]-tetrahydrofuran-4-carboxamid (20d, RK100)



Durchführung: **RK75** (8,0 mg, 21,3 μ mol, 1,0 Äq) und **RK22** (15,2 mg, 25,6 μ mol, 1,2 Äq) wurden nach **AAV3b** verseift und entschützt. Zum Verseifungsprodukt wurde PyBOP (12,2 mg, 23,4 μ mol, 1,1 Äq), HOBT·H₂O (1,7 mg, 10,7 μ mol, 0,5 Äq) und DIPEA zugegeben und weiter nach **AAV3b** verfahren. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt (Methode C). Das Produkt wurde als gelb leuchtendes Öl erhalten.

Ausbeute: 6,66 (7,54 μ mol, 35%)

t_r: 6,36 min (Methode A) 99%

MS: m/z = [M] berechnet: 868,99 gefunden: 868,95

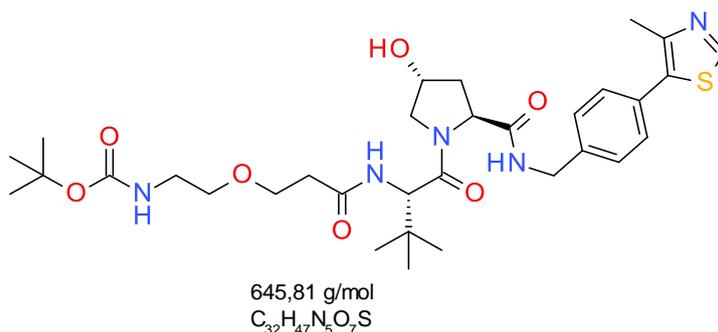
HRMS: m/z = [M+H]⁺ simuliert: 869,35384 gemessen: 869,35349 Δ m = 0,40 ppm

DC: R_f = 0,42 (DCM/MeOH 95:5)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ = 11.09 (s, 1H, NH 2,6-Dioxo-3-piperidyl), 7.75 (t, ³J = 5.5 Hz, 1H, NH Amid), 7.57 (dd, ³J = 8.6, 7.3 Hz, 1H, H6 1,3-Dioxo-isoindolin-4-yl), 7.41-7.33 (m, 7H, H2, H4, H5 3-S-Ph und H2, H3, H5, H6 Ph), 7.29-7.27 (m, 1H, H6 3-S-Ph), 7.26 (d, ⁴J = 1.4 Hz, 1H, H5 2-Methylimidazol), 7.13 (d, ³J = 8.6 Hz, 1H, H5 1,3-Dioxo-isoindolin-4-yl), 7.03 (d, ³J = 7.0 Hz, 1H, H7 1,3-Dioxo-isoindolin-4-yl), 6.90 (d, ⁴J = 1.2 Hz, 1H, H4 2-Methylimidazol), 6.59 (t, ³J = 5.7 Hz, 1H, NH-Isoindol), 5.05 (dd, ³J = 12.8, 5.5 Hz, 1H, CH 2,6-Dioxo-3-piperidyl), 3.75-3.31 (m, 22H, 2x CH₂ H_{2ax/eq} und H_{6ax/eq} THP und CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-NH), 3.16 (q, ³J = 6.0 Hz, 2H, Amid-CH₂-CH₂), 2.90 und 2.85 (2x dd, ³J = 13.9, 5.0 Hz, 2H, CH₂-CH₂-CO), 2.62-2.56 (m, 1H, CH-CH₂-CH₂), 2.40 (bd, ³J = 13,3 Hz, 2H, CH₂ H_{3ax} und H_{5ax}, THP), 2.27 (s, 3H, CH₃, 2-Methylimidazol), 2.06-1.98 (m, 1H, CH-CH₂-CH₂), 1.78 (td, ³J = 12.2, 3.8 Hz, 2H, CH₂ H_{3eq} und H_{5eq}, THP) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO): δ = 172.8, 172.5, 170.1, 168.8, 167.3, 163.1, 146.4, 146.1, 136.3, 136.2, 135.3, 133.4, 132.1, 130.4, 130.0, 129.8, 129.1, 127.3, 126.1, 125.5, 120.7, 117.4, 110.7, 109.3, 69.8, 69.78, 69.76, 69.75, 69.70, 69.5, 68.9, 68.7, 64.6, 48.6, 48.0, 41.7, 40.2, 34.1, 31.0, 22.2, 13.6 ppm.

8.5.26 *t*-Butyl *N*-[2-[3-[[[(1*S*)-1-[(2*S*,4*R*)-4-hydroxy-2-[4-(4-methylthiazol-5-yl)benzyl-carbamoyl]pyrrolidin-1-carbonyl]-2,2-dimethyl-propyl]amin]-3-oxo-propoxy]ethyl]carbamate (31a, RK62)



Durchführung: 3-[2-(*t*-Butoxycarbonylamin)ethoxy]propansäure (30 mg, 128 μmol, 1,0 Äq), PyBOP, (74 mg, 141 μmol, 1,1 Äq), HOBt·H₂O (10 mg, 64 μmol, 0,5 Äq) und DIPEA wurden in 2 mL DMF gelöst. Nach 10 min Rühren wurde (*S*, *R*, *S*)-AHPc-Hydrochlorid (60 mg, 128 μmol, 1,0 Äq) bei 0 °C dazu gegeben und nach **AAV4** verfahren. Das Rohprodukt wurde mittel Flash-Chromatographie aufgereinigt DCM/MeOH (97:3 → 90:10).

Das Produkt wurde als hellgelbes Öl erhalten.

Ausbeute: 50 mg (77,4 μmol, 61%)

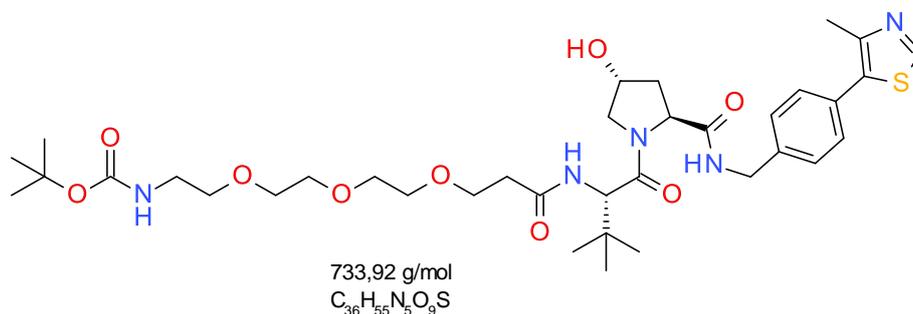
MS: $m/z = [M+H]^+$ berechnet: 645,82 gefunden: 646,05

DC: $R_f = 0,39$ (DCM/MeOH 95:5)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.67 (s, 1H, H₃ 4-Methylthiazol-5-yl), 8.43 (bs, 1H, Pro-NH), 7.37-7.29 (m, 4H, H₂, H₃, H₅ und H₆ Bz), 6.49 (bs, 1H, NH Propanoylamid), 5.67 (bs, 1H, NH Carbamat), 5.20 (s, 1H, OH), 4.73-4.70 (m, 1H, H₂ Pro), 4.62-4.50 (m, 3H, H_a CH₂ Bz, H₂ 3,3-Dimethylbutanoyl und H₂ Pro), 4.31-4.20 (m, 1H, H_b CH₂ Bz), 4.03-3.93 (m, 1H, H_{5b} Pro), 3.65-3.63 (m, 2H, O-CH₂-CH₂-CO-NH), 3.60-3.00 (m, 5H, H_{5a} Pro und NH-CH₂-CH₂-O-CH₂), 2.49 (s, 3H, CH₃ 4-Methylpyrazol-5-yl), 2.43-2.32 (m, 2H, O-CH₂-CH₂-CO-NH), 2.19-2.08 (m, 1H, H_{3b} Pro), 2.03-2.01 (m, 1H, H_{3a} Pro), 1.36 (s, 9H, Carbamat), 0.93 (s, 9H, *t*-Butyl) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 174.24, 172.1, 171.9, 171.1, 156.2, 150.5, 148.2, 138.9, 138.2, 129.23, 128.2, 79.5, 70.8, 70.1, 66.8, 58.9, 57.9, 57.0, 43.3, 40.6, 36.8, 36.2, 35.6, 28.5, 26.5, 16.0 ppm.

8.5.28 *t*-Butyl *N*-[2-[2-[2-[3-[[[(1*S*)-1-[(2*S*,4*R*)-4-hydroxy-2-[4-(4-methylthiazol-5-yl)benzylcarbamoyl]pyrrolidin-1-carbonyl]-2,2-dimethyl-propyl]amin]-3-oxo-propoxy]-ethoxy]ethoxy]ethyl]carbamate (31c, RK80)



Durchführung: 3-[2-[2-(*t*-Butoxycarbonylamin)ethoxy]ethoxy]ethoxy]propansäure (95 mg, 296 μ mol, 1,0 Äq), PyBOP (169 mg, 325 μ mol, 1,1 Äq), HOBT·H₂O (23 mg, 148 μ mol, 0,5 Äq) und DIPEA wurden in 2 mL DMF gelöst. Nach 10 min Rühren wurde (*S*, *R*, *S*)-AHPC-Hydrochlorid (139 mg, 296 μ mol, 1,0 Äq) bei 0 °C dazu gegeben und nach **AAV4** verfahren. Das Rohprodukt wurde mittel Flash-Chromatographie aufgereinigt DCM/MeOH (97:3→90:10).

Das Produkt wurde als hellgelbes Öl erhalten.

Ausbeute: 170 mg (232 μ mol, 78%)

MS: $m/z = [M-H^+]$ berechnet: 733,92 gefunden: 732,55

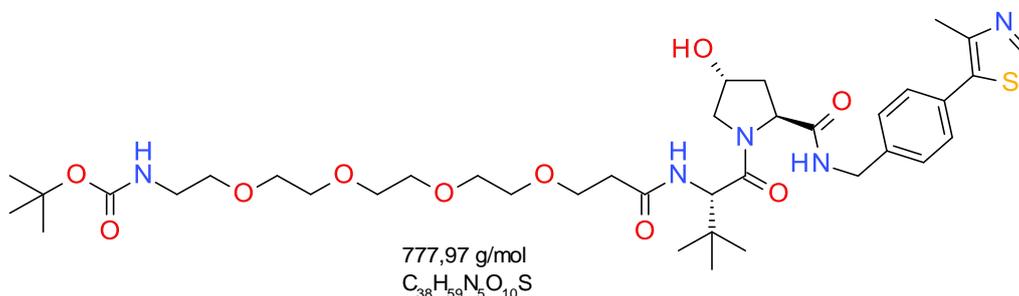
DC: $R_f = 0,48$ (DCM/MeOH 94:6)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 8.64$ (s, 1H, H3 4-Methylthiazol-5-yl), 7.51 (t, ³ $J = 6.9$ Hz, 1H, Pro-NH), 7.34-7.28 (m, 4H, H2, H3, H5 und H6 Bz), 7.04 (bd, ³ $J = 7.0$ Hz, 1H, NH Propanoylamid), 5.16 (bs, 1H, NH Carbamat), 4.64 (t, ³ $J = 7.9$ Hz, 1H, H2 Pro), 4.49 (t, ³ $J = 3.1$ Hz, 1H, H_a CH₂ Bz), 4.46 (d, ³ $J = 5.8, 3.2$ Hz, 1H, H2 3,3-dimethylbutanoyl), 4.45 (bs, 1H, H4 Pro), 4.29 (dd, ³ $J = 15,1, 5.4$ Hz, 1H, H_b CH₂ Bz), 3.97 (d, ³ $J = 11.5$ Hz, 1H, H5_b Pro), 3.65 (t, ³ $J = 5.7$ Hz, 2H, O-CH₂-CH₂-CO-NH), 3.60 (dd, ³ $J = 12.1, 4.36$ Hz, 1H, H5_a Pro), 3.57-3.52 (m, 8H, O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O), 3.47 (t, ³ $J = 5.1$ Hz, 2H, NH-CH₂-CH₂-O), 3.27-3.18 (m, 2H, NH-CH₂-CH₂-O), 2.44 (s, 3H, CH₃ 4-Methylpyrazol-5-yl), 2.42 (q, ³ $J = 5.3$ Hz, 2H, O-CH₂-CH₂-CO-NH), 2.44-2.38 (m, 1H, H3_b Pro), 2.14-2.10 (m, 1H, H3_a Pro), 1.37 (s, 9H, Carbamat), 0.91 (s, 9H, *t*-Butyl) ppm.

¹H-¹H-COSY (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.51/4.49, 7.51/4.29, 7.04/4.46, 5.16/2.40, 5.16/2.12, 4.64/2.40, 4.64/2.12, 4.49/4.29, 4.45/3.97, 4.45/2.40, 4.45/3.60, 3.97/3.60, 3.65/2.42, 3.47/3.26, 2.42/2.14$ ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 171.9, 171.5, 151.5, 149.4, 138.4, 131.7, 130.7, 130.2, 128.8, 128.6, 127.2, 79.2, 71.8, 70.4, 70.2, 70.1, 69.0, 68.7, 67.2, 59.5, 58.1, 56.7, 43.1, 40.3, 37.9, 36.6, 35.2, 27.0, 25.8, 16.6$ ppm.

8.5.29 *t*-Butyl *N*-[2-[2-[2-[2-[3-[[[(1*S*)-1-[(2*S*,4*R*)-4-hydroxy-2-[[4-(4-methylthiazol-5-yl)phenyl]methylcarbamoyl]pyrrolidin-1-carbonyl]-2,2-dimethyl-propyl]amin]-3-oxo-propoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethyl]carbamate (31d, RK68)



Durchführung: 3-[2-[2-(*t*-Butoxycarbonylamin)ethoxy]ethoxy]ethoxy]propansäure (60,0 mg, 164 μmol, 1,0 Äq), PyBOP (94 mg, 181 μmol, 1,1 Äq), HOBt·H₂O (13,0 mg, 82,1 μmol, 0,5 Äq) und DIPEA wurden in 2 mL DMF gelöst. Nach 10 min Rühren wurde (*S*, *R*, *S*)-AHPC-Hydrochlorid (77,5 mg, 128 μmol, 1,0 Äq) bei 0 °C dazu gegeben und nach **AAV4** verfahren. Das Rohprodukt wurde mittel Flash-Chromatographie aufgereinigt DCM/MeOH (97:3 → 90:10).

Das Produkt wurde als hellgelbes Öl erhalten.

Ausbeute: 97 mg (125 μmol, 76%)

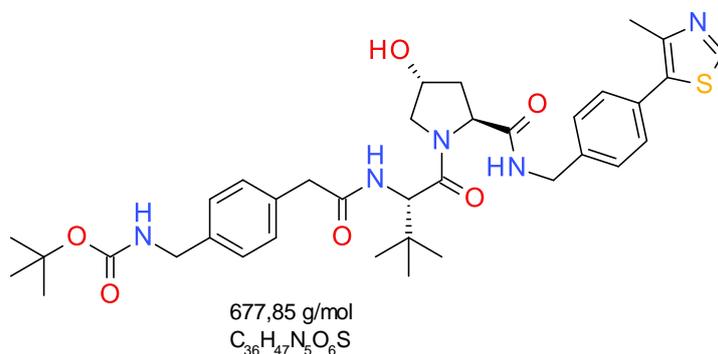
MS: m/z = [M] berechnet: 777,97 gefunden: 778,05

DC: R_f = 0,48 (DCM/MeOH 92:8)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.61 (s, 1H, H3 4-Methylthiazol-5-yl), 7.40 (bs, 1H, Pro-NH), 7.28-7.26 (m, 4H, H2, H3, H5 und H6 Bz), 7.02 (bs, 1H, NH Propanoylamid), 5.23 (s, 1H, OH), 5.20 (bs, 1H, NH Carbamat), 4.60 (t, ³J = 8.0 Hz, 1H, H2 Pro), 4.68-4.39 (m, 3H, H_a CH₂ Bz, H2 3,3-dimethylbutanoyl, H4 Pro), 4.28 (dd, ³J = 15.1, 5.6 Hz, 1H, H_b CH₂ Bz), 3.91 (d, ³J = 11.2 Hz, 1H, H5_b Pro), 3.63-3.61 (m, 1H, H5_a Pro), 3.61-3.48 (m, 16H, CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂), 3.25-3.21 (m, 2H, NH-CH₂-CH₂-O), 2.44 (t, ³J = 5.3 Hz, 2H, O-CH₂-CH₂-CO-NH), 2.41 (s, 3H, CH₃ 4-Methylpyrazol-5-yl), 2.41 (ddd, ³J = 4.8, 8.5 Hz, ²J = 13.2 Hz, 1H, H3_b Pro), 2.10 (dd, ³J = 7.8 Hz, ²J = 13.4 Hz, 1H, H3_a Pro), 1.35 (s, 9H, Carbamat), 0.88 (s, 9H, *t*-Butyl) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 172.6, 171.4, 171.4, 150.6, 148.3, 138.5, 131.9, 130.7, 129.5, 128.1, 79.6, 71.1, 70.3, 70.2, 70.15, 70.13, 70.12, 70.09, 70.03, 69.97, 67.2, 59.0, 58.0, 56.8, 43.2, 40.3, 36.7, 36.4, 35.3, 28.5, 26.5, 16.0 ppm.

8.5.30 *t*-Butyl *N*-[[4-[2-[[[(1*S*)-1-[(2*S*,4*R*)-4-hydroxy-2-[4-(4-methylthiazol-5-yl)benzyl-carbamoyl]pyrrolidin-1-carbonyl]-2,2-dimethyl-propyl]amin]-2-oxo-ethyl]phenyl]-methyl]carbamate (57, RK95)



Durchführung: 3-[2-[2-(*t*-Butoxycarbonylamin)ethoxy]ethoxy]ethoxy]propansäure (38 mg, 143 μ mol, 1,0 Äq), PyBOP (82 mg, 158 μ mol, 1,1 Äq), HOBT-H₂O (11 mg, 72 μ mol, 0,5 Äq) und DIPEA wurden in 2 mL DMF gelöst. Nach 10 min Rühren wurde (*S*, *R*, *S*)-AHPH-Hydrochlorid (68 mg, 143 μ mol, 1,0 Äq) bei 0 °C dazu gegeben und nach **AAV4** verfahren. Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Chromatographie aufgereinigt DCM/MeOH (98:2 \rightarrow 95:5).

Das Produkt wurde als hellgelbes Öl erhalten.

Ausbeute: 60 mg (89 μ mol, 62%)

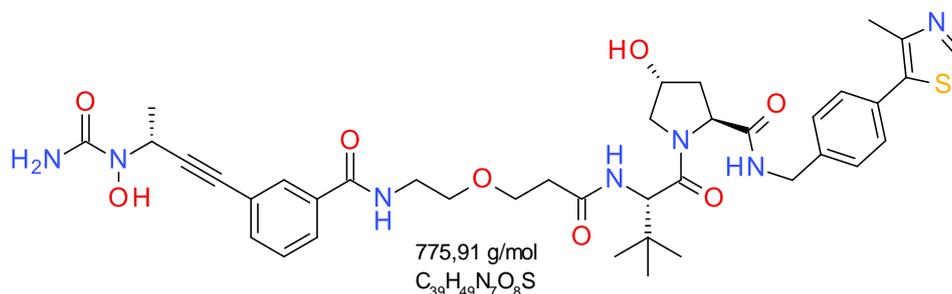
MS: $m/z = [M]$ berechnet: 677,85 gefunden: 678,10

DC: $R_f = 0,41$ (DCM/MeOH 95:5)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 8.63$ (s, 1H, H3 4-Methylthiazol-5-yl), 7.43 (t, ³ $J = 5.8$ Hz, 1H, Pro-NH), 7.32-7.26 (m, 4H, H2, H3, H5 und H6 Bz), 7.17 (d, ³ $J = 6.6$ Hz, 2H, H2 und H6 CH₂-Ph-CH₂), 7.12 (d, ³ $J = 7.3$ Hz, 2H, H3 und H5 CH₂-Ph-CH₂), 6.38 (bd, ³ $J = 6.8$ Hz, 1H, NH Propanoylamid), 5.16 (s, 1H, OH), 5.09 (bs, 1H, NH Carbamat), 4.58 (t, ³ $J = 6.9$ Hz, 1H, H_a, CH₂ Bz), 4.48 (d, ³ $J = 8.5$ Hz, 1H, H2 3,3-dimethylbutanoyl), 4.42-4.39 (m, 2H, H2 Pro und H4 Pro), 4.22 (dd, ³ $J = 5.6$ Hz, ² $J = 15.1$ Hz, 1H, H_b CH₂ Bz), 4.22 (d, ³ $J = 5.0$ Hz, 2H, CH₂, Carbamat-CH₂-Ph), 3.92 (d, ² $J = 11.0$ Hz, 1H, H5_b Pro), 3.57 (dd, ³ $J = 3.4$ Hz, ² $J = 10.8$ Hz, 1H, H5_a Pro), 3.44 (s, 2H, Ph-CH₂-CO-NH), 2.45 (s, 3H, CH₃ 4-Methylpyrazol-5-yl), 2.06-2.23 (m, 1H, H3_b Pro), 2.05-1.97 (m, 1H, H3_a Pro), 1.40 (s, 9H, *t*-Butyl Carbamat), 0.82 (s, 9H, *t*-Butyl) ppm.

¹³C-NMR (78 MHz, CDCl₃): $\delta = 171.4, 171.3, 171.2, 156.1, 150.4, 148.6, 138.4, 138.3, 133.6, 131.7, 130.9, 129.5, 128.1, 128.0, 126.3, 79.7, 70.0, 59.0, 57.7, 56.8, 53.6, 44.3, 43.2, 43.0, 36.5, 35.5, 28.5, 16.1$ ppm.

8.5.31 (2*S*,4*R*)-1-[(2*S*)-2-[3-[2-[3-[(3*R*)-3-[carbamoyl(hydroxy)amino]but-1-ynyl]benzamind]-ethoxy]propanoylamino]-3,3-dimethyl-butanoyl]-4-hydroxy-*N*-[4-(4-methylthiazol-5-yl)benzyl]-pyrrolidin-2-carboxamid (19a, RK65)



Durchführung: RK62 (25 mg, 38 μ mol, 1,2 Äq) wurde in 1 mL abs. DCM und 1 mL Trifluoressigsäure bei 0 °C gelöst und nach AAV5 verfahren. Nach Entschützung wurde RK17 (8,0 mg, 32 μ mol, 1,0 Äq), gelöst in 2 mL DMF, PyBOP (19 mg, 35 μ mol, 1,1 Äq), HOBt-H₂O (2,6 mg, 16 μ mol, 0,5 Äq) und DIPEA zugegeben und weiter nach AAV5 verfahren. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt (Methode C). Das Produkt wurde als farbloses Öl erhalten.

Ausbeute: 10,4 mg (13,5 μ mol, 42%)

t_r: 7,01 min (Methode B) 99%

MS: m/z = [M] berechnet: 775,91 gefunden: 776,05

HRMS: m/z = [M+Na]⁺ simuliert: 798,32555 gemessen: 798,32531 Δ m = 0,30 ppm

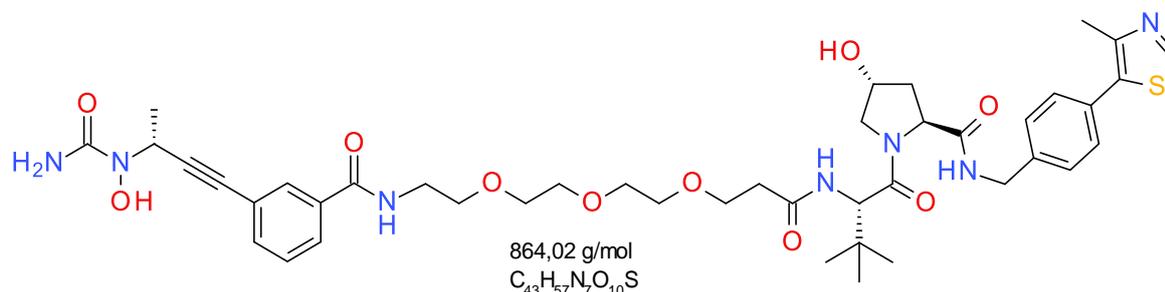
DC: R_f = 0,45 (DCM/MeOH 9:1)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ = 9.36 (s, 1H, OH), 8.97 (s, 1H, H3 4-Methylthiazol-5-yl), 8.58 (t, ³J = 4.6 Hz, 1H, NH 3-Benzamid), 8.55 (t, ³J = 5.8 Hz, 1H, Pro-NH), 7.93 (d, ³J = 9.4 Hz, 1H, NH Propanoylamid), 7.87 (s, 1H, H2 3-Benzamid), 7.82 (d, ³J = 7.8 Hz, 1H, H6 3-Benzamid), 7.52 (d, ³J = 7.6 Hz, 1H, H4 3-Benzamid), 7.44 (t, ³J = 7.6 Hz, 1H, H5 3-Benzamid), 7.41 (d, ³J = 7.8 Hz, 2H, H3 und H5 Bz), 7.38 (d, ³J = 8.2 Hz, 2H, H2 und H6 Bz), 6.54 (bs, 2H, NH₂), 5.15 (q, ³J = 7.0 Hz, 1H, H3 3*R*-Butinyl), 5.12 (bs, 1H, OH), 4.55 (d, ³J = 9.4 Hz, 1H, H2 3,3-dimethylbutanoyl), 4.42-4.39 (m, 2H, H_a CH₂ Bz und H4 Pro), 4.35 (bs, 1H, H2 Pro), 4.22 (dd, ³J = 5.4 Hz, ²J = 15.8 Hz, 1H, H_b CH₂ Bz), 3.67 (dd, ³J = 4.2 Hz, ²J = 11.1 Hz, 1H, H5_b Pro), 3.64-3.63 (m, 1H, H5_a Pro), 3.62-3.58 (m, 2H, NH-CH₂-CH₂-O), 3.52-3.47 (m, 2H, CH₂-O-CH₂-CH₂), 3.38 (q, ³J = 6.0 Hz, 2H, NH-CH₂-CH₂-O), 2.58-2.54 (m, 1H, O-CH₂-CH₂-CO-NH), 2.44 (s, 3H, CH₃ 4-Methylpyrazol-5-yl), 2.38 (td, ³J = 6.8 Hz, ²J = 13.6 Hz, 1H, O-CH₂-CH₂-CO-NH), 2.05-2.01 (m, 1H, H3_b Pro), 1.90 (ddd, ³J = 8.5, 4.4 Hz, ²J = 12.8 Hz, 1H, H3_a Pro), 1.38 (d, ³J = 7.0 Hz, 3H, CH₃ 3*R*-Butinyl), 0.92 (s, 9H, *t*-Butyl) ppm.

¹H-¹H-COSY (500 MHz, DMSO): δ = 8.58/3.39, 8.55/4.42, 7.93/4.55, 7.82/7.44, 7.52/7.44, 7.41/7.38, 5.15/1.37, 4.42/4.23, 4.35/3.66, 4.35/1.90, 3.62/2.57, 3.49/3.39, 2.02/1.90 ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO): δ = 171.9, 170.0, 169.6, 165.4, 161.5, 151.5, 147.42, 139.5, 134.7, 133.8, 131.2, 130.1, 129.7, 128.7, 128.6, 127.4, 127.2, 122.5, 90.5, 81.2, 68.8, 68.4, 66.7, 58.7, 56.7, 56.4, 56.3, 45.9, 41.6, 40.1, 37.9, 35.6, 35.3, 26.3, 18.5, 15.9 ppm.

8.5.33 (2S,4R)-1-[(2S)-2-[3-[2-[2-[2-[3-[(3R)-3-[carbamoyl(hydroxy)amino]but-1-ynyl]benzamid]ethoxy]ethoxy]ethoxy]propanoylamid]-3,3-dimethyl-butanoyl]-4-hydroxy-N-[4-(4-methylthiazol-5-yl)benzyl]pyrrolidin-2-carboxamid (19c, RK85)



Durchführung: RK80 (53 mg, 72 μ mol, 1,2 Äq) wurde in 1 mL abs. DCM und 1 mL Trifluoressigsäure bei 0 °C gelöst und nach **AAV5** verfahren. Nach Entschützung wurde **RK17** (15 mg, 60 μ mol, 1,0 Äq), gelöst in 2 mL DMF, PyBOP (35 mg, 67 μ mol, 1,1 Äq), HOBt-H₂O (4,7 mg, 30 μ mol, 0,5 Äq) und DIPEA zugegeben und weiter nach **AAV5** verfahren. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt (Methode C). Das Produkt wurde als farbloses Öl erhalten.

Ausbeute: 13,4 mg (15,6 μ mol, 26%)

t_r: 7,07 min (Methode B) 99%

MS: m/z = [M] berechnet: 864,02 gefunden: 864,10

HRMS: m/z = [M+H]⁺ simuliert: 864,39604 gemessen: 864,39538 Δ m = 0,76 ppm

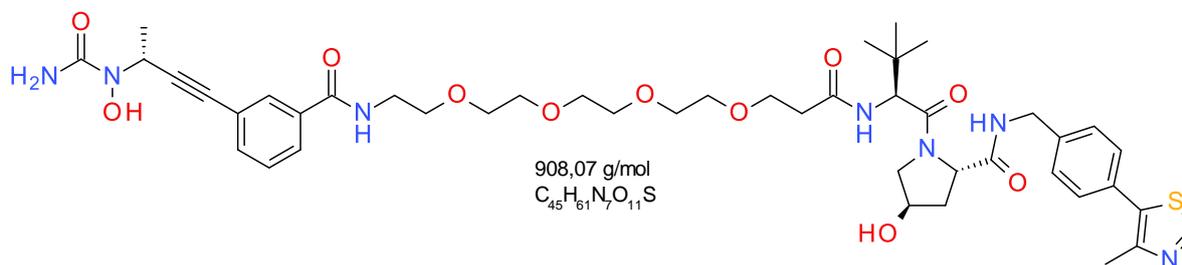
DC: R_f = 0,43 (DCM/MeOH 9:1)

¹H-NMR (DMSO): δ = 9.36 (s, 1H, OH), 8.97 (s, 1H, H3 4-Methylthiazol-5-yl), 8.60 (t, ³J = 4.9 Hz, 1H, NH 3-Benzamid), 8.55 (t, ³J = 5.8 Hz, 1H, Pro-NH), 7.90 (bd, ³J = 8.8 Hz, 1H, NH Propanoylamid), 7.87 (s, 1H, H2 3-Benzamid), 7.81 (d, ³J = 7.6 Hz, 1H, H6 3-Benzamid), 7.52 (d, ³J = 8.0 Hz, 1H, H4 3-Benzamid), 7.45 (d, ³J = 7.9 Hz, 1H, H5 3-Benzamid), 7.42 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H, H3 und H5 Bz), 7.38 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H, H2 und H6 Bz), 7.04 (bd, ³J = 7.0 Hz, 1H, NH Propanoylamid), 6.54 (bs, 2H, NH₂), 5.15 (q, ³J = 6.4 Hz, 1H, H3 3R-Butinyl), 5.14 (s, 1H, OH), 4.54 (d, ³J = 9.4 Hz, 1H, H2 3,3-dimethylbutanoyl), 4.44-4.34 (m, 2H, H_a CH₂ Bz und H2 Pro), 4.35 (bs, 1H, H4 Pro), 4.21 (dd, ³J = 5.3 Hz, ²J = 15.8 Hz, 1H, H_b CH₂ Bz), 3.67 (dd, ³J = 3.9 Hz, ²J = 10.5 Hz, 1H, H5_b Pro), 3.61 (bd, ³J = 10.2 Hz, 1H, H5_a Pro), 3.60-3.50 (m, ³J = 2H, NH-CH₂-CH₂-O), 3.53-3.43 (m, 10H, O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂), 3.39 (q, ³J = 5.8 Hz, 2H, NH-CH₂-CH₂-O), 2.54-2.53 (m, 1H, O-CH₂-CH₂-CO-NH), 2.44 (s, 3H, CH₃ 4-Methylpyrazol-5-yl), 2.42 (td, ³J = 6.7 Hz, ²J = 13.4 Hz, 1H, O-CH₂-CH₂-CO-NH), 2.06-2.00 (m, 1H, H3_b Pro), 1.94 (ddd, ³J = 8.4, 4.6 Hz, ²J = 12.8 Hz, 1H, H3_a Pro), 1.37 (d, ³J = 6.7 Hz, 3H, CH₃ 3R-Butinyl), 0.92 (s, 9H, t-Butyl) ppm.

¹H-¹H-COSY (400 MHz, DMSO): δ = 8.60/3.39, 8.55/4.43, 8.55/4.21, 7.90/4.54, 7.81/7.52, 7.81/7.45, 7.42/7.38, 5.15/1.37, 4.42/4.21, 4.35/3.67, 4.35/1.94, 3.61/2.54, 3.49/3.39, 2.54/2.42 2.02/1.94 ppm.

¹³C-NMR (78 MHz, DMSO): δ = 171.9, 170.0, 169.5, 165.4, 161.4, 157.5, 151.4, 147.7, 139.5, 134.7, 133.8, 131.2, 130.0, 129.6, 128.6, 127.4, 127.2, 122.5, 90.5, 81.1, 69.70, 69.69, 69.57, 69.5, 68.9, 68.7, 66.9, 58.7, 56.3, 45.8, 41.7, 40.4, 37.9, 35.6, 35.3, 26.3, 22.6, 18.5, 15.9 ppm.

8.5.34 (2*S*,4*R*)-1-[(2*S*)-2-[3-[2-[2-[2-[2-[3-[(3*R*)-3-[carbamoyl(hydroxy)amino]but-1-ynyl]benzamid]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]propanoylamino]-3,3-dimethylbutanoyl]-4-hydroxy-*N*-[4-(4-methylthiazol-5-yl)benzyl]pyrrolidin-2-carboxamid (19d, RK71)



Durchführung: **RK68** (40 mg, 51 μ mol, 1,2 Äq) wurde in 1 mL abs. DCM und 1 mL Trifluoressigsäure bei 0 °C gelöst und nach **AAV5** verfahren. Nach Entschützung wurde **RK17** (11 mg, 43 μ mol, 1,0 Äq), gelöst in 2 mL DMF, PyBOP (25 mg, 47 μ mol, 1,1 Äq), HOBt·H₂O (3,4 mg, 21 μ mol, 0,5 Äq) und DIPEA zugegeben und weiter nach **AAV5** verfahren. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt (Methode C). Das Produkt wurde als farbloses Öl erhalten.

Ausbeute: 8,05 mg (8,6 μ mol, 21%)

t_r: 5,93 min (Methode A) 99%

MS: m/z = [M] berechnet: 908,07 gefunden: 908,05

HRMS: m/z = [M+Na]⁺ simuliert: 930,4042 gemessen: 930,4042 Δ m = 1,28 ppm

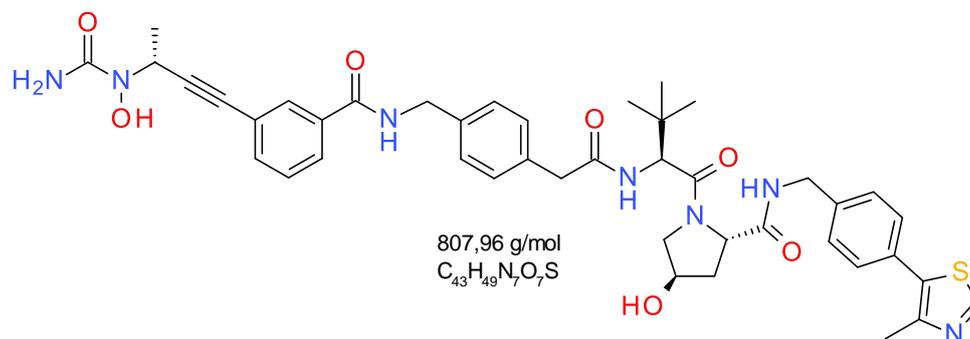
DC: R_f = 0,43 (DCM/MeOH 9:1)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ = 9.36 (s, 1H, OH), 8.98 (s, 1H, H3 4-Methylthiazol-5-yl), 8.60 (t, ³J = 5.4 Hz, 1H, NH 3-Benzamid), 8.55 (t, ³J = 6.0 Hz, 1H, Pro-NH), 7.90 (d, ³J = 8.4 Hz, 1H, NH Propanoylamid), 7.87 (s, 1H, H2 3-Benzamid), 7.81 (td, ⁴J = 1.3 Hz, ³J = 7.6 Hz, 1H, H6 3-Benzamid), 7.52 (td, ⁴J = 1,1 Hz, ³J = 8.0 Hz, 1H, H4 3-Benzamid), 7.45 (d ³J = 7.7 Hz, 1H, H5 3-Benzamid), 7.42 (d, ³J = 7.8 Hz, 2H, H3 und H5 Bz), 7.38 (d, ³J = 7.8 Hz, 2H, H2 und H6 Bz), 6.54 (bs, 2H, NH₂), 5.15 (q, ³J = 7.0 Hz, 1H, H3 3*R*-Butinyl), 4.55 (d, ³J = 9.4 Hz, H2 3,3-dimethylbutanoyl), 4.44-4.39 (m, 2H, H_a CH₂ Bz und H4 Pro), 4.35 (bs, 1H, H2 Pro), 4.21 (dd, ³J = 5.4 Hz, ²J = 15.8 Hz, 1H, H_b CH₂ Bz), 3.67 (dd, ³J = 3.9 Hz, ²J = 10.6 Hz, 1H, H5_b Pro), 3.64-3.57 (m, 3H, NH-CH₂-CH₂-O und H5_a Pro), 3.53-3.46 (m, 12H, O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂), 3.40 (q, ³J = 5.8 Hz, 2H, NH-CH₂-CH₂-O), 2.56-2.53 (m, 1H, O-CH₂-CH₂-CO-NH), 2.44 (s, 3H, CH₃ 4-Methylpyrazol-5-yl), 2.42 (td, ³J = 6.3 Hz, ²J = 14.3 Hz, 1H, O-CH₂-CH₂-CO-NH), 2.07-2.01 (m, 1H, H3_b Pro), 1.94 (ddd, ³J = 8.4, 4.5 Hz, ²J = 12.8 Hz, 1H, H3_a Pro), 1.38 (d, ³J = 6.9 Hz, 3H, CH₃ 3*R*-Butinyl), 0.93 (s, 9H, *t*-Butyl) ppm.

¹H-¹H-COSY (400 MHz, DMSO): δ = 8.60/3.40, 8.55/4.44, 8.55/4.21, 7.90/4.55, 7.81/7.52 7.81/7.45, 7.42/7.38, 5.15/1.37, 4.42/4.21, 4.35/3.67, 4.35/1.94, 3.62/2.57, 3.49/3.40, 2.02/1.94 ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO): δ = 171.9, 169.9, 169.5, 165.4, 161.4, 151.4, 147.7, 139.5, 134.7, 133.8, 131.1, 130.1, 129.6, 128.7, 128.6, 127.4, 127.2, 122.5, 90.5, 81.1, 69.74, 69.73, 69.72, 69.68, 69.67, 69.66, 69.5, 69.4, 68.3, 68.7, 66.9, 62.8, 58.7, 56.3, 56.3, 45.8, 41.6, 37.9, 35.6, 35.3, 26.3, 18.5, 15.9 ppm.

8.5.35 (2*S*,4*R*)-1-[(2*S*)-2-[[2-[4-[[[3-[(3*R*)-3-[carbamoyl(hydroxy)amin]but-1-ynyl]benzamid]-methyl]phenyl]acetyl]amin]-3,3-dimethyl-butanoyl]-4-hydroxy-*N*-[[4-(4-methylthiazol-5-yl)phenyl]methyl]pyrrolidin-2-carboxamid (75, RK99)



Durchführung: **RK95** (36 mg, 53 μ mol, 1,2 Äq) wurde in 1 mL abs. DCM und 1 mL Trifluoressigsäure bei 0 °C gelöst und nach **AAV5** verfahren. Nach Entschützung wurde **RK17** (11 mg, 44 μ mol, 1,0 Äq) gelöst in 2 mL DMF, PyBOP (35 mg, 9 μ mol, 1,1 Äq), HOBt·H₂O (3,4 mg, 22 μ mol, 0,5 Äq) und DIPEA zugegeben und weiter nach **AAV5** verfahren. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt (Methode C). Das Produkt wurde als orangefarbenes Öl erhalten.

Ausbeute: 3,8 mg (4,75 μ mol, 11%)

t_r: 7,77 min (Methode B) 97%

MS: m/z = [M] berechnet: 807,96 gefunden: 808,00

HRMS: m/z = [M+Na]⁺ simuliert: 830,33064 gemessen: 830,33049 Δ m = 0,18 ppm

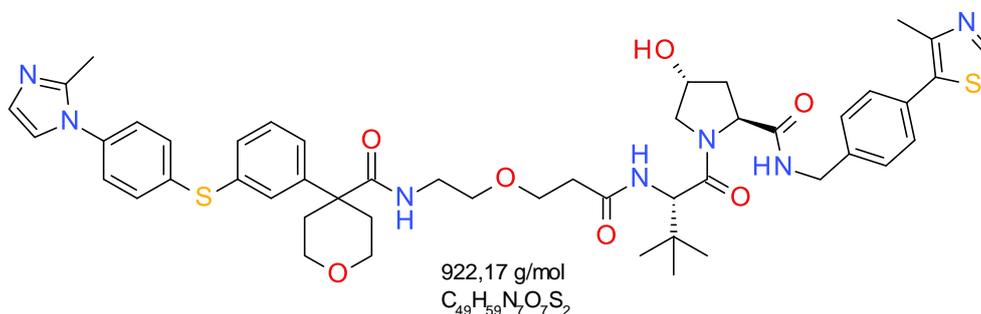
DC: R_f = 0,34 (DCM/MeOH 92:8)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO): δ = 9.37 (s, 1H, OH), 9.11 (t, ³J = 6.0 Hz, 1H, NH 3-Benzamid), 8.98 (s, 1H, H3 4-Methylthiazol-5-yl), 8.56 (t, ³J = 6.0 Hz, 1H, Pro-NH), 8.20 (s, 1H, OH), 8.08 (d, ³J = 9.5 Hz, 1H, NH Propanoylamid), 7.91 (t, ⁴J = 1.6 Hz, 1H, H2 3-Benzamid), 7.85 (td, ⁴J = 1.4 Hz, ³J = 7.8 Hz, 1H, H6 3-Benzamid), 7.53 (td, ⁴J = 1.4 Hz, ³J = 7.8 Hz, 1H, H4 3-Benzamid), 7.46 (t, ³J = 7.8 Hz, 1H, H5 3-Benzamid), 7.42 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H, H3 und H5 Bz), 7.38 (d, ³J = 8.4 Hz, 2H, H2 und H6 Bz), 7.24-7.20 (m, 4H, CH₂-Ph-CH₂), 6.54 (bs, 2H, NH₂), 5.15 (q, ³J = 7.3 Hz, 1H, H3 3*R*-Butinyl), 4.51 (d, ³J = 9.4 Hz, H2 3,3-dimethylbutanoyl), 4.45-4.39 (m, 4H, H2 Pro, H_a CH₂ Bz und Amid-CH₂-Ph), 4.33 (bs, 1H, H4 Pro), 4.22 (dd, ³J = 5.4 Hz, ²J = 15.9 Hz, 1H, H_b CH₂ Bz), 3.65 (dd, ³J = 3.9 Hz, ²J = 10.5 Hz, 1H, H5_b Pro), 3.63-3.60 (m, 1H, H5_a Pro) 3.60-3.58 (m, 1H, Ph-CH₂-CO-NH), 3.46-3.43 (m, 1H, Ph-CH₂-CO-NH), 2.44 (s, 3H, CH₃ 4-Methylpyrazol-5-yl), 2.04-1.98 (m, 1H, H3_b Pro), 1.89 (ddd, ³J = 8.4, 4.7 Hz, ²J = 12.8 Hz, 1H, H3_a Pro), 1.37 (d, ³J = 7.0 Hz, 3H, CH₃ 3*R*-Butinyl), 0.91 (s, 9H, *t*-Butyl) ppm.

¹H-¹H-COSY (400 MHz, DMSO): δ = 9.11/4.44, 8.56/4.43, 8.56/4.22, 8.08/4.51, 7.85/7.46, 7.53/7.46, 7.42/7.38, 5.15/1.37, 4.42/4.22, 4.40/2.00, 4.40/1.89, 4.35/3.65, 3.65/3.61 3.60/3.45, 2.02/1.89 ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 172.0, 170.0, 169.6, 165.3, 163.6, 161.5, 151.5, 147.7, 139.5, 137.4, 135.1, 134.7, 133.9, 131.2, 130.1, 129.7, 129.0, 128.8, 128.7, 127.4, 127.1, 122.6, 90.6, 81.2, 68.9, 58.7, 56.5, 56.4, 45.9, 42.5, 41.7, 41.4, 37.9, 35.4, 26.4, 18.5, 16.0 ppm.

8.5.36 (2*S*,4*R*)-1-[(2*S*)-3,3-Dimethyl-2-[3-[2-[[4-[3-[4-(2-methylimidazol-1-yl)phenyl]sulfonylphenyl]tetrahydropyran-4-carbonyl]amin]ethoxy]propanoylamid]butanoyl]-4-hydroxy-*N*-[4-(4-methylthiazol-5-yl)benzyl]pyrrolidin-2-carboxamid (21a, RK92)



Durchführung: **RK75** (12 mg, 32 μ mol, 1,0 Äq) und **RK62** (25 mg, 38 μ mol, 1,2 Äq) wurden nach **AAV6b** verseift und entschützt. Zum Verseifungsprodukt wurde PyBOP (18 mg, 35 μ mol, 1,1 Äq), HOBT·H₂O (2,5 mg, 16 μ mol, 0,5 Äq) und DIPEA zugegeben und weiter nach **AAV6b** verfahren. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt (Methode C). Das Produkt wurde als gelbes Öl erhalten.

Ausbeute: 5,51 (5,97 μ mol, 19%)

t_r: 6,07 min (Methode B) 99%

MS: m/z = [M] berechnet: 922,17 gefunden: 922,00

HRMS: m/z = [M+Na]⁺ simuliert: 944,38096 gemessen: 944,38011 Δ m = 0,90 ppm

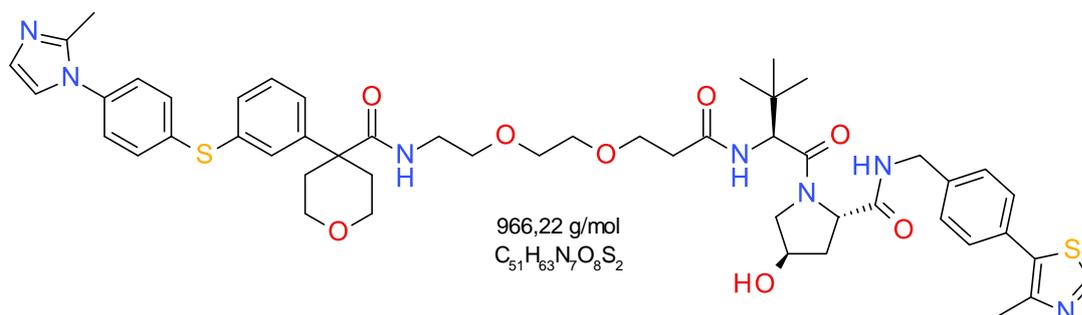
DC: R_f = 0,62 (DCM/MeOH 9:1)

¹H-NMR (600 MHz, DMSO): δ = 8.98 (s, 1H, H3 4-Methylthiazol-5-yl), 8.58 (t, ³J = 6.1 Hz, 1H, Pro-NH), 8.14 (s, 1H, OH), 7.92 (d, ³J = 9.4 Hz, 1H, NH Propanoylamid), 7.77 (t, ³J = 5.6 Hz, 1H, THP-CO-NH), 7.43-7.38 (m, 11H, H2, H4, H5 3-S-Ph, H2, H3, H5, H6 Ph und H2, H3, H5, H6 Bz), 7.29-7.27 (m, 1H, H6 3-S-Ph), 7.27 (d, ⁴J = 1.3 Hz, 1H, H5 2-Methylimidazol), 6.90 (d, ⁴J = 1.2 Hz, 1H, H4 2-Methylimidazol), 4.54 (d, ³J = 9.4 Hz, 1H, H2 3,3-dimethylbutanoyl), 4.42-4.38 (m, 2H, H_a CH₂ Bz und H2 Pro), 4.35 (bs, 1H, H4 Pro), 4.21 (dd, ³J = 5.5 Hz, ²J = 15.8 Hz, 1H, H_b CH₂ Bz), 3.72 (d, ³J = 11.8 Hz, 2H, CH₂ H_{2ax} und H_{6ax} THP), 3.66 (dd, ³J = 4.1 Hz, ²J = 10.5 Hz, 1H, H_{5b} Pro), 3.63-3.59 (m, 1H, H_{5a} Pro), 3.51-3.46 (m, 2H, O-CH₂-CH₂-CO-NH), 3.45-3.40 (m, 2H, H_{2eq} und H_{6eq} THP), 3.31-2.27 (m, 2H, CH₂-CH₂-O), 3.17-3.13 (m, 2H, NH-CH₂-CH₂-O), 2.46-2.44 (m, 1H, O-CH₂-CH₂-CO-NH), 2.43 (s, 3H, CH₃ 4-Methylpyrazol-5-yl), 2.41 (bd, ³J = 12.8 Hz, 2H, CH₂ H_{3ax}, H_{5ax}, THP), 2.31-2.29 (m, 1H, O-CH₂-CH₂-CO-NH), 2.27 (s, 3H, CH₃, 2-Methylimidazol), 2.05-2.01 (m, 1H, CH₂ H_{3b} Pro), 1.89 (ddd, ³J = 8.2, 4.7 Hz, ²J = 13.0 Hz, 1H, H_{3a} Pro), 1.81-1.76 (m, 2H, CH₂ H_{3eq} und H_{5eq} THP), 0.91 (s, 9H, *t*-Butyl) ppm.

¹H-¹H-COSY (400 MHz, DMSO): δ = 8.58/4.42, 8.58/4.21, 7.92/4.54, 7.77/3.15, 7.39/7.28, 7.27/6.90, 4.43/1.89, 4.42/4.21, 4.35/3.66, 4.35/1.89, 3.72/3.44, 3.72/2.41, 3.72/1.78, 3.66/3.61, 3.51/2.46, 3.51/2.31, 3.43/2.41, 3.43/1.78, 3.31/3.17, 2.53/2.34, 2.41/1.79, 2.03/1.89 ppm.

¹³C-NMR (78 MHz, DMSO): δ = 172.5, 171.9, 170.0, 169.5, 163.1, 151.5, 147.7, 146.0, 143.6, 139.5, 136.3, 135.3, 133.4, 130.4, 130.0, 129.8, 129.6, 129.2, 128.6, 127.4, 127.3, 126.1, 125.6, 120.8, 68.9, 68.3, 66.6, 64.6, 58.7, 56.4, 48.0, 41.7, 40.1, 38.9, 37.9, 35.5, 35.4, 34.1, 26.3, 15.9, 13.6 ppm.

8.5.37 (2*S*,4*R*)-1-[(2*S*)-3,3-Dimethyl-2-[3-[2-[2-[4-[3-[4-(2-methylimidazol-1-yl)phenyl]-sulfonylphenyl]tetrahydropyran-4-carbonyl]amin]ethoxy]ethoxy]propanoylamino-butanoyl]-4-hydroxy-*N*-[4-(4-methylthiazol-5-yl)benzyl]pyrrolidin-2-carboxamid (21b, RK94)



Durchführung: RK75 (8,0 mg, 21 μ mol, 1,0 Äq) und RK69 (18 mg, 26 μ mol, 1,2 Äq) wurden nach **AAV6b** verseift und entschützt. Zum Verseifungsprodukt wurde PyBOP (12 mg, 23 μ mol, 1,1 Äq), HOBT-H₂O (1,7 mg, 11 μ mol, 0,5 Äq) und DIPEA zugegeben und weiter nach **AAV6b** verfahren. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt (Methode C). Das Produkt wurde als gelbes Öl erhalten.

Ausbeute: 6,29 mg (6,51 μ mol, 31%)

t_r: 6,07 min (Methode B) 99%

MS: m/z = [M] berechnet: 966,22 gefunden: 966,00

HRMS: m/z = [M+Na]⁺ simuliert: 988,40717 gemessen: 988,40653 $\Delta m = 0,65$ ppm

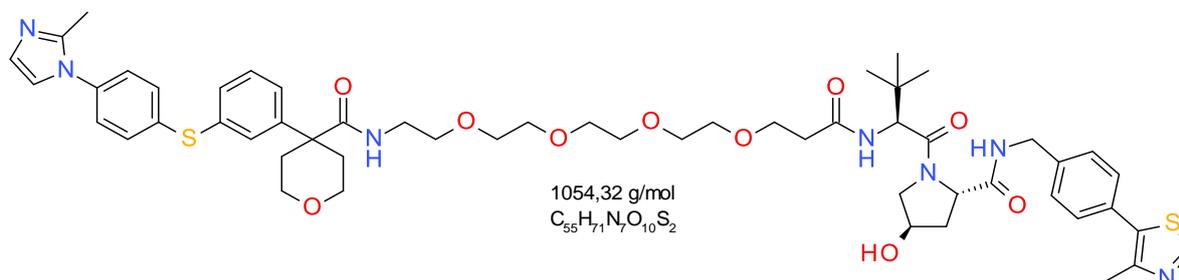
DC: R_f = 0,48 (DCM/MeOH 92:8)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ = 8.97 (s, 1H, H₃ 4-Methylthiazol-5-yl), 8.55 (t, ³J = 5.8 Hz, 1H, Pro-NH), 8.14 (s, 1H, OH), 7.89 (d, ³J = 9.2 Hz, 1H, NH Propanoylamid), 7.77 (t, ³J = 5.3 Hz, 1H, THP-CO-NH), 7.42-7.38 (m, 11H, H₂, H₄, H₅ 3-S-Ph, H₂, H₃, H₅, H₆ Ph und H₂, H₃, H₅, H₆ Bz), 7.29-7.27 (m, 1H, H₆ 3-S-Ph), 7.27 (s, 1H, H₅ 2-Methylimidazol), 6.90 (s, 1H, H₄ 2-Methylimidazol), 4.54 (d, ³J = 9.4 Hz, 1H, H₂ 3,3-dimethylbutanoyl), 4.45-4.39 (m, 2H, H_a CH₂ Bz und H₂ Pro), 4.35 (bs, 1H, H₄ Pro), 4.21 (dd, ³J = 5.0 Hz, ²J = 15.7 Hz, 1H, H_b CH₂ Bz), 3.72 (d, ³J = 11.2 Hz, 2H, CH₂ H_{2ax} und H_{6ax} THP), 3.66-3.62 (m, 1H, H_{5b} Pro), 3.60-3.57 (m, 1H, H_{5a} Pro), 3.57-3.54 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-CO-NH), 3.41-3.36 (m, 6H, -CH₂-O-CH₂-CH₂-O-), 3.35-3.31 (m, 2H, H_{2eq} und H_{6eq} THP), 3.16 (q, ³J = 5.4 Hz, 2H, -NH-CH₂-CH₂-O-), 2.48-2.45 (m, 1H, O-CH₂-CH₂-CO-NH), 2.44 (s, 3H, CH₃ 4-Methylpyrazol-5-yl), 2.41 (bd, ³J = 13.0 Hz, 2H, CH₂ H_{3ax} und H_{5ax} THP), 2.36-2.30 (m, 1H, O-CH₂-CH₂-CO-NH), 2.27 (s, 3H, CH₃, 2-Methylimidazol), 2.07-2.01 (m, 1H, CH₂ H_{3b} Pro), 1.90 (ddd, ³J = 8.7, 4.2 Hz, ²J = 11.9 Hz, 1H, H_{3a} Pro), 1.79 (td, ³J = 11.6, 2.9 Hz, 2H, CH₂ H_{3eq} und H_{5eq} THP), 0.92 (s, 9H, *t*-Butyl) ppm.

¹H-¹H-COSY (400 MHz, DMSO): δ = 8.55/4.42, 8.55/4.21, 7.89/4.54, 7.77/3.16, 7.39/7.28, 7.27/6.90, 4.43/1.90, 4.42/4.21, 4.35/3.67, 4.35/1.90, 3.72/3.35, 3.72/2.41, 3.72/1.79, 3.63/3.58, 3.55/2.46, 3.55/2.32, 3.37/3.16, 3.35/2.41, 3.35/1.79, 2.47/2.34, 2.41/1.79, 2.03/1.90 ppm.

¹³C-NMR (78 MHz, DMSO): δ = 172.5, 171.9, 169.9, 169.5, 163.1, 151.4, 146.1, 143.6, 139.5, 136.3, 135.3, 133.4, 131.2, 130.4, 129.4, 129.8, 129.6, 129.1, 128.6, 127.4, 127.3, 126.1, 125.5, 120.7, 69.41, 69.37, 68.85, 68.71, 67.6, 66.9, 64.5, 58.7, 56.3, 48.0, 41.7, 37.9, 35.6, 35.3, 34.1, 26.3, 15.9, 13.6 ppm.

8.5.38 (2*S*,4*R*)-1-[(2*S*)-3,3-Dimethyl-2-[3-[2-[2-[2-[2-[[4-[3-[4-(2-methylimidazol-1-yl)phenyl]-sulfonylphenyl]tetrahydropyran-4-carbonyl]amin]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]-propanoylamino]butanoyl]-4-hydroxy-*N*-[(4-methylthiazol-5-yl)benzyl]pyrrolidine-2-carboxamid (21d, RK82)



Durchführung: **RK68** (36 mg, 46 μ mol, 1,2 Äq) wurden nach **AAV6a** entschützt. Das entschützte Amin wurde zu einer Lösung aus **RK81** (15 mg, 38 μ mol, 1,0 Äq), PyBOP (22 mg, 42 μ mol, 1,1 Äq), HOBT-H₂O (3,0 mg, 19 μ mol, 0,5 Äq) und DIPEA gegeben und weiter nach **AAV6a** verfahren. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt (Methode C). Das Produkt wurde als gelbes Öl erhalten.

Ausbeute: 13,0 mg (12,7 μ mol, 32%)

t_r: 6,19 min (Methode B) 98%

MS: m/z = [M] berechnet: 1054,32 gefunden: 1054,20

HRMS: m/z = [M+H]⁺ simuliert: 1054,47766 gemessen: 1054,47664 Δ m = 0,97 ppm

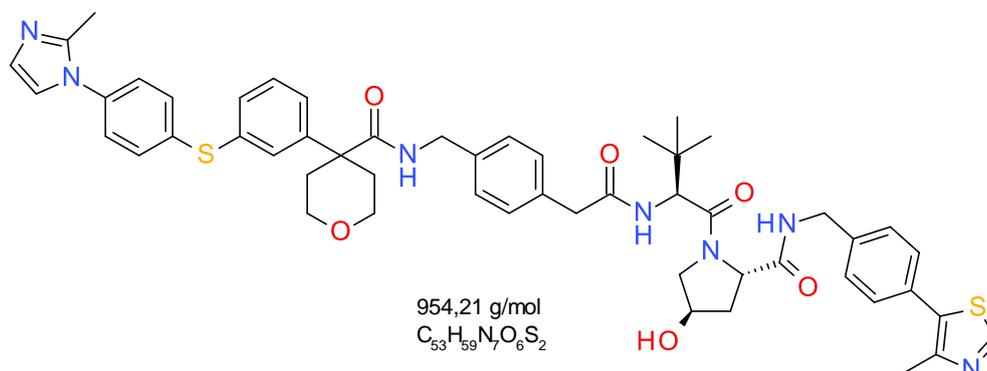
DC: R_f = 0,52 (DCM/MeOH 9:1)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ = 8.97 (s, 1H, H3 4-Methylthiazol-5-yl), 8.57 (t, ³J = 6.2 Hz, 1H, Pro-NH), 7.93 (d, ³J = 9.5 Hz, 1H, NH Propanoylamid), 7.79 (t, ³J = 5.7 Hz, 1H, THP-CO-NH), 7.45-7.39 (m, 11H, H2, H4, H5 3-S-Ph, H2, H3, H5, H6 Ph und H2, H3, H5, H6 Bz), 7.28-7.26 (m, 1H, H6 3-S-Ph), 7.27 (d, ⁴J = 1.2 Hz, 1H, H5 2-Methylimidazol), 6.91 (d, ⁴J = 1.3 Hz, 1H, H4 2-Methylimidazol), 5.14 (s, 1H, OH), 4.55 (d, ³J = 10.2 Hz, 1H, H2 3,3-dimethylbutanoyl), 4.43 (dd, ³J = 7.2 Hz, ²J = 15.6 Hz, 1H, H_a CH₂ Bz), 4.42 (t, ³J = 8.0 Hz, 1H, H2 Pro), 4.35 (bs, 1H, H4 Pro), 4.21 (dd, ³J = 5.5 Hz, ²J = 15.8 Hz, 1H, H_b CH₂ Bz), 3.72 (td, ³J = 11.0, 3.0 Hz, 2H, CH₂ H_{2ax} und H_{6ax} THP), 3.67 (dd, ³J = 4.1 Hz, ²J = 10.9 Hz, 1H, H_{5b} Pro), 3.63-3.60 (m, 1H, H_{5a} Pro), 3.60-3.54 (m, 2H, O-CH₂-CH₂-CO-NH), 3.47-3.37 (m, 16H, CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O, H_{2eq} und H_{6eq} THP), 3.17 (q, ³J = 5.7 Hz, 2H, NH-CH₂-CH₂-O), 2.55-2.52 (m, 1H, O-CH₂-CH₂-CO-NH) 2.43 (s, 3H, CH₃ 4-Methylpyrazol-5-yl), 2.42 (bd, ³J = 13.0 Hz, 2H, CH₂ H_{3ax} und H_{5ax} THP), 2.34 (td, ³J = 6.1 Hz, ²J = 14.6 Hz, 1H, O-CH₂-CH₂-CO-NH), 2.28 (s, 3H, CH₃ 2-Methylimidazol), 2.05-2.01 (m, 1H, H_{3b} Pro), 1.90 (ddd, ³J = 8.4, 4.8 Hz, ²J = 12.8 Hz, 1H, H_{3a} Pro), 1.79 (td, ³J = 11.9, 3.3 Hz, 2H, CH₂ H_{3eq} und H_{5eq} THP), 0.92 (s, 9H, *t*-Butyl) ppm.

¹H-¹H-COSY (400 MHz, DMSO): δ = 8.57/4.42, 8.57/4.21, 7.93/4.55, 7.79/3.17, 7.39/7.28, 7.27/6.91, 5.14/4.35, 4.43/2.34, 4.43/1.90, 4.42/4.21, 4.35/3.67, 4.35/1.90, 3.72/3.47, 3.72/2.42, 3.72/1.79, 3.67/3.62, 3.60/2.53, 3.60/2.43, 3.43/2.42, 3.43/1.78, 3.37/3.17, 2.53/2.34, 2.42/1.79, 2.03/1.90 ppm.

¹³C-NMR (78 MHz, DMSO): δ = 172.5, 171.9, 169.9, 169.5, 151.4, 147.7, 146.1, 143.6, 139.5, 136.3, 135.3, 133.4, 131.1, 130.4, 130.0, 129.8, 129.6, 129.2, 128.6, 127.4, 127.3, 126.1, 125.5, 120.7, 69.75, 69.74, 69.73, 69.70, 69.69, 69.68, 69.47, 69.4, 68.9, 68.7, 66.9, 64.5, 58.7, 56.3, 48.0, 41.6, 37.9, 35.6, 34.1, 26.3, 15.9, 13.6 ppm.

8.5.39 (2*S*,4*R*)-1-[(2*S*)-3,3-Dimethyl-2-[[2-[4-[[[4-3-[4-(2-methylimidazol-1-yl)phenyl]sulfonyl]phenyl]tetrahydropyran-4-carbonyl]amin]methyl]phenyl]acetyl]amin]butanoyl]-4-hydroxy-*N*-[4-(4-methylthiazol-5-yl)benzyl]pyrrolidin-2-carboxamid (76, RK97)



Durchführung: RK75 (8,0 mg, 21 μ mol, 1,0 Äq) und RK95 (17 mg, 26 μ mol, 1,2 Äq) wurden nach **AAV6b** verseift und entschützt. Zum Verseifungsprodukt wurde PyBOP (12 mg, 23 μ mol, 1,1 Äq), HOBt·H₂O (1,7 mg, 11 μ mol, 0,5 Äq) und DIPEA zugegeben und weiter nach **AAV6b** verfahren. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt (Methode C). Das Produkt wurde als farbloses Öl erhalten.

Ausbeute: 5,77 mg (6,05 μ mol, 28%)

t_r: 5,07 min (Methode A) 95%

MS: m/z = [M] berechnet: 954,21 gefunden: 954,00

HRMS: m/z = [M+Na]⁺ simuliert: 976,38605 gemessen: 976,38495 Δ m = 1,13 ppm

DC: R_f = 0,55 (DCM/MeOH 95:5)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ = 8.98 (s, 1H, H3 4-Methylthiazol-5-yl), 8.56 (t, ³J = 5.8 Hz, 1H, Pro-NH), 8.24 (t, ³J = 5.5 Hz, 1H, THP-CO-NH), 8.13 (s, 1H, OH), 7.89 (d, ³J = 9.2 Hz, 1H, NH Propanoylamid), 7.47-7.38 (m, 11H, H2, H4, H5 3-S-Ph, H2, H3, H5, H6 Ph und H2, H3, H5, H6 Bz), 7.30 (d, ³J = 6.8 Hz, 1H, H6 3-S-Ph), 7.27 (s, 1H, H5 2-Methylimidazol), 7.10 (d, ³J = 7.6 Hz, 2H, H2 und H6 CH₂-Ph-CH₂), 6.91 (s, 1H, H4 2-Methylimidazol), 6.90 (d, ³J = 7.6 Hz, 2H, H3 und H5 CH₂-Ph-CH₂), 4.49 (d, ³J = 9.1 Hz, 1H, H2 3,3-dimethylbutanoyl), 4.45-4.39 (m, 2H, H_a CH₂ Bz und H2 Pro), 4.34 (bs, 1H, H4 Pro), 4.23 (d, ³J = 5.2 Hz, 1H, H_b CH₂ Bz), 4.20 (d, ³J = 5.0 Hz, 2H, CH₂ THP-Amid-CH₂-Ph-), 3.72 (d, ³J = 11.5 Hz, 2H, CH₂ H_{2ax} und H_{6ax} THP), 3.64 (dd, ³J = 3.5 Hz, ²J = 10.8 Hz, 1H, H_{5b} Pro), 3.61-3.58 (m, 1H, H_{5a} Pro), 3.58-3.55 (m, 1H, Ph-CH₂-CO-NH), 3.48-3.44 (m, 2H, H_{2eq} und H_{6eq} THP), 3.34-3.32 (m, 1H, Ph-CH₂-CO-NH), 2.49-2.47 (m, 2H, CH₂ H_{3ax} und H_{5ax} THP), 2.44 (s, 3H, CH₃ 4-Methylpyrazol-5-yl), 2.27 (s, 3H, CH₃ 2-Methylimidazol), 2.05-1.99 (m, 1H, CH₂ H_{3b} Pro), 1.92-1.87 (m, 1H, H_{3a} Pro), 1.87-1.80 (m, 2H, CH₂ H_{3eq} und H_{5eq} THP), 0.88 (s, 9H, *t*-Butyl) ppm.

¹H-¹H-COSY (400 MHz, DMSO): δ = 8.56/4.44, 8.55/4.23, 8.24/4.20 7.89/4.49, 7.45/7.30, 7.27/6.91, 7.10/6.90, 4.45/4.23, 4.42/2.03, 4.42/1.90, 4.34/1.90, 3.72/3.46, 3.72/2.48, 3.72/1.85, 3.64/3.60, 3.57/3.33, 3.43/2.48, 3.43/1.83, 2.48/1.83, 2.03/1.90 ppm.

¹³C-NMR (78 MHz, DMSO): δ = 172.6, 170.0, 169.6, 163.1, 151.5, 147.8, 145.9, 139.5, 137.7, 136.2, 135.4, 134.9, 134.3, 130.4, 130.1, 130.0, 129.7, 129.3, 128.8, 128.7, 127.5, 127.2, 126.7, 126.5, 126.2, 126.1, 125.7, 120.8, 68.9, 64.6, 61.9, 58.7, 56.4, 47.9, 42.1, 35.5, 34.8, 34.3, 33.9, 26.3, 16.0, 13.5 ppm.

9. Literaturverzeichnis

- (1) Neklesa, T. K.; Winkler, J. D.; Crews, C. M. Targeted protein degradation by PROTACs. *Pharmacology & therapeutics* **2017**, *174*, 138–144. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2017.02.027.
- (2) Toure, M.; Crews, C. M. Small-Molecule PROTACS: New Approaches to Protein Degradation. *Angewandte Chemie* **2016**, *55* (6), 1966–1973. DOI: 10.1002/anie.201507978.
- (3) Ohlendorf, D. Krebsserkrankungen in Deutschland. *Zbl Arbeitsmed* **2016**, *66* (4), 214–215. DOI: 10.1007/s40664-016-0113-9.
- (4) Adhikari, B.; Bozilovic, J.; Diebold, M.; Schwarz, J. D.; Hofstetter, J.; Schröder, M.; Wanior, M.; Narain, A.; Vogt, M.; Dudvarski Stankovic, N.; Baluapuri, A.; Schönemann, L.; Eing, L.; Bhandare, P.; Kuster, B.; Schlosser, A.; Heinzlmeir, S.; Sottriffer, C.; Knapp, S.; Wolf, E. PROTAC-mediated degradation reveals a non-catalytic function of AURORA-A kinase. *Nature chemical biology* **2020**, *16* (11), 1179–1188. DOI: 10.1038/s41589-020-00652-y.
- (5) Hansen, J. D.; Correa, M.; Nagy, M. A.; Alexander, M.; Plantevin, V.; Grant, V.; Whitefield, B.; Huang, D.; Kercher, T.; Harris, R.; Narla, R. K.; Leisten, J.; Tang, Y.; Moghaddam, M.; Ebinger, K.; Piccotti, J.; Havens, C. G.; Cathers, B.; Carmichael, J.; Daniel, T.; Vessey, R.; Hamann, L. G.; Leftheris, K.; Mendy, D.; Baculi, F.; LeBrun, L. A.; Khambatta, G.; Lopez-Girona, A. Discovery of CRBN E3 Ligase Modulator CC-92480 for the Treatment of Relapsed and Refractory Multiple Myeloma. *Journal of medicinal chemistry* **2020**, *63* (13), 6648–6676. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b01928.
- (6) Wang, Y.; Jiang, X.; Feng, F.; Liu, W.; Sun, H. Degradation of proteins by PROTACs and other strategies. *Acta pharmaceutica Sinica. B* **2020**, *10* (2), 207–238. DOI: 10.1016/j.apsb.2019.08.001.
- (7) Bondeson, D. P.; Smith, B. E.; Burslem, G. M.; Buhimschi, A. D.; Hines, J.; Jaime-Figueroa, S.; Wang, J.; Hamman, B. D.; Ishchenko, A.; Crews, C. M. Lessons in PROTAC Design from Selective Degradation with a Promiscuous Warhead. *Cell chemical biology* **2018**, *25* (1), 78-87.e5. DOI: 10.1016/j.chembiol.2017.09.010.
- (8) Lai, A. C.; Toure, M.; Hellerschmied, D.; Salami, J.; Jaime-Figueroa, S.; Ko, E.; Hines, J.; Crews, C. M. Modular PROTAC Design for the Degradation of Oncogenic BCR-ABL. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2016**, *55* (2), 807–810. DOI: 10.1002/anie.201507634.
- (9) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings 1PII D *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, *46* (1-3), 3–26. DOI: 10.1016/S0169-409X(00)00129-0.
- (10) Zaidman, D.; Prilusky, J.; London, N. PRosettaC: Rosetta Based Modeling of PROTAC Mediated Ternary Complexes. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2020**, *60* (10), 4894–4903. DOI: 10.1021/acs.jcim.0c00589.
- (11) Weng, G.; Shen, C.; Cao, D.; Gao, J.; Dong, X.; He, Q.; Yang, B.; Li, D.; Wu, J.; Hou, T. PROTAC-DB: an online database of PROTACs. *Nucleic acids research* **2020**. DOI: 10.1093/nar/gkaa807.
- (12) Cukuroglu, E.; Engin, H. B.; Gursoy, A.; Keskin, O. Hot spots in protein-protein interfaces: towards drug discovery. *Progress in biophysics and molecular biology* **2014**, *116* (2-3), 165–173. DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2014.06.003.
- (13) Beveridge, R.; Kessler, D.; Rumpel, K.; Etmayer, P.; Meinhart, A.; Clausen, T. Native Mass Spectrometry Can Effectively Predict PROTAC Efficacy. *ACS Central Science* **2020**, *6* (7), 1223–1230. DOI: 10.1021/acscentsci.0c00049.

- (14) Zorba, A.; Nguyen, C.; Xu, Y.; Starr, J.; Borzilleri, K.; Smith, J.; Zhu, H.; Farley, K. A.; Ding, W.; Schiemer, J.; Feng, X.; Chang, J. S.; Uccello, D. P.; Young, J. A.; Garcia-Irrizary, C. N.; Czabaniuk, L.; Schuff, B.; Oliver, R.; Montgomery, J.; Hayward, M. M.; Coe, J.; Chen, J.; Niosi, M.; Luthra, S.; Shah, J. C.; El-Kattan, A.; Qiu, X.; West, G. M.; Noe, M. C.; Shanmugasundaram, V.; Gilbert, A. M.; Brown, M. F.; Calabrese, M. F. Delineating the role of cooperativity in the design of potent PROTACs for BTK. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2018**, *115* (31), E7285-E7292. DOI: 10.1073/pnas.1803662115.
- (15) Burslem, G. M.; Crews, C. M. Proteolysis-Targeting Chimeras as Therapeutics and Tools for Biological Discovery. *Cell* **2020**, *181* (1), 102–114. DOI: 10.1016/j.cell.2019.11.031.
- (16) Gadd, M. S.; Testa, A.; Lucas, X.; Chan, K.-H.; Chen, W.; Lamont, D. J.; Zengerle, M.; Ciulli, A. Structural basis of PROTAC cooperative recognition for selective protein degradation. *Nature chemical biology* **2017**, *13* (5), 514–521. DOI: 10.1038/nchembio.2329.
- (17) Roy, M. J.; Winkler, S.; Hughes, S. J.; Whitworth, C.; Galant, M.; Farnaby, W.; Rumpel, K.; Ciulli, A. SPR-Measured Dissociation Kinetics of PROTAC Ternary Complexes Influence Target Degradation Rate. *ACS chemical biology* **2019**, *14* (3), 361–368. DOI: 10.1021/acscchembio.9b00092.
- (18) Mullard, A. Targeted degraders clear first safety hurdles. *Nature reviews. Drug discovery* **2020**, *19* (7), 435. DOI: 10.1038/d41573-020-00109-w.
- (19) Hansen, J. D.; Correa, M.; Nagy, M. A.; Alexander, M.; Plantevin, V.; Grant, V.; Whitefield, B.; Huang, D.; Kercher, T.; Harris, R.; Narla, R. K.; Leisten, J.; Tang, Y.; Moghaddam, M.; Ebinger, K.; Piccotti, J.; Havens, C. G.; Cathers, B.; Carmichael, J.; Daniel, T.; Vessey, R.; Hamann, L. G.; Leftheris, K.; Mendy, D.; Baculi, F.; LeBrun, L. A.; Khambatta, G.; Lopez-Girona, A. Discovery of CRBN E3 Ligase Modulator CC-92480 for the Treatment of Relapsed and Refractory Multiple Myeloma. *Journal of medicinal chemistry* **2020**, *63* (13), 6648–6676. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b01928.
- (20) Matsumoto, T.; Funk, C. D.; Rådmark, O.; Höög, J. O.; Jörnvall, H.; Samuelsson, B. Molecular cloning and amino acid sequence of human 5-lipoxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1988**, *85* (1), 26–30. DOI: 10.1073/pnas.85.1.26.
- (21) Gilbert, N. C.; Rui, Z.; Neau, D. B.; Waight, M. T.; Bartlett, S. G.; Boeglin, W. E.; Brash, A. R.; Newcomer, M. E. Conversion of human 5-lipoxygenase to a 15-lipoxygenase by a point mutation to mimic phosphorylation at Serine-663. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **2012**, *26* (8), 3222–3229. DOI: 10.1096/fj.12-205286.
- (22) Steinhilber, D.; Fischer, A. S.; Metzner, J.; Steinbrink, S. D.; Roos, J.; Ruthardt, M.; Maier, T. J. 5-lipoxygenase: underappreciated role of a pro-inflammatory enzyme in tumorigenesis. *Frontiers in pharmacology* **2010**, *1*, 143. DOI: 10.3389/fphar.2010.00143.
- (23) Rådmark, O.; Werz, O.; Steinhilber, D.; Samuelsson, B. 5-Lipoxygenase, a key enzyme for leukotriene biosynthesis in health and disease. *Biochimica et biophysica acta* **2015**, *1851* (4), 331–339. DOI: 10.1016/j.bbailip.2014.08.012.
- (24) Steinhilber, D.; Hofmann, B. Recent advances in the search for novel 5-lipoxygenase inhibitors. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* **2014**, *114* (1), 70–77. DOI: 10.1111/bcpt.12114.
- (25) Wisniewska, J. M.; Rödl, C. B.; Kahnt, A. S.; La Buscató, E.; Ulrich, S.; Tanrikulu, Y.; Achenbach, J.; Rörsch, F.; Grösch, S.; Schneider, G.; Cinatl, J.; Proschak, E.; Steinhilber, D.; Hofmann, B. Molecular characterization of EP6--a novel imidazo1,2-apryidine based direct 5-lipoxygenase inhibitor. *Biochemical pharmacology* **2012**, *83* (2), 228–240. DOI: 10.1016/j.bcp.2011.10.012.

- (26) Salmon, J. A.; Higgs, G. A. Prostaglandins and leukotrienes as inflammatory mediators. *British medical bulletin* **1987**, *43* (2), 285–296. DOI: 10.1093/oxfordjournals.bmb.a072183.
- (27) Carter, G. W.; Young, P. R.; Albert, D. H.; Bouska, J.; Dyer, R.; Bell, R. L.; Summers, J. B.; Brooks, D. W. 5-lipoxygenase inhibitory activity of zileuton. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **1991**, *256* (3), 929–937.
- (28) Rowland, M. Influence of route of administration on drug availability. *Journal of pharmaceutical sciences* **1972**, *61* (1), 70–74. DOI: 10.1002/jps.2600610111.
- (29) Rautio, J.; Meanwell, N. A.; Li Di; Hageman, M. J. The expanding role of prodrugs in contemporary drug design and development. *Nature reviews. Drug discovery* **2018**, *17* (8), 559–587. DOI: 10.1038/nrd.2018.46.
- (30) Noble, S.; Faulds, D. Saquinavir. A review of its pharmacology and clinical potential in the management of HIV infection. *Drugs* **1996**, *52* (1), 93–112. DOI: 10.2165/00003495-199652010-00007.
- (31) Gavin, P. J.; Yogev, R. The role of protease inhibitor therapy in children with HIV infection. *Paediatric drugs* **2002**, *4* (9), 581–607. DOI: 10.2165/00128072-200204090-00004.
- (32) Wan, M.; Tang, X.; Stsiapanava, A.; Haeggström, J. Z. Biosynthesis of leukotriene B₄. *Seminars in immunology* **2017**, *33*, 3–15. DOI: 10.1016/j.smim.2017.07.012.
- (33) Fischer, L.; Hornig, M.; Pergola, C.; Meindl, N.; Franke, L.; Tanrikulu, Y.; Dodt, G.; Schneider, G.; Steinhilber, D.; Werz, O. The molecular mechanism of the inhibition by licofelone of the biosynthesis of 5-lipoxygenase products. *British journal of pharmacology* **2007**, *152* (4), 471–480. DOI: 10.1038/sj.bjp.0707416.
- (34) Fu, T.; Mohan, M.; Brennan, E. P.; Woodman, O. L.; Godson, C.; Kantharidis, P.; Ritchie, R. H.; Qin, C. X. Therapeutic Potential of Lipoxin A₄ in Chronic Inflammation: Focus on Cardiometabolic Disease. *ACS pharmacology & translational science* **2020**, *3* (1), 43–55. DOI: 10.1021/acspsci.9b00097.
- (35) Saeki, K.; Yokomizo, T. Identification, signaling, and functions of LTB₄ receptors. *Seminars in immunology* **2017**, *33*, 30–36. DOI: 10.1016/j.smim.2017.07.010.
- (36) Peters-Golden, M.; Gleason, M. M.; Togias, A. Cysteinyl leukotrienes: multi-functional mediators in allergic rhinitis. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* **2006**, *36* (6), 689–703. DOI: 10.1111/j.1365-2222.2006.02498.x.
- (37) Moore, G. Y.; Pidgeon, G. P. Cross-Talk between Cancer Cells and the Tumour Microenvironment: The Role of the 5-Lipoxygenase Pathway. *International journal of molecular sciences* **2017**, *18* (2). DOI: 10.3390/ijms18020236.
- (38) Sinha, S.; Manju, S. L.; Doble, M. Chalcone-Thiazole Hybrids: Rational Design, Synthesis, and Lead Identification against 5-Lipoxygenase. *ACS medicinal chemistry letters* **2019**, *10* (10), 1415–1422. DOI: 10.1021/acsmchemlett.9b00193.
- (39) Bell, R. L.; Harris, R. R.; Malo, P. E.; Bouska, J. B.; Shaughnessy, T. K.; Hulkower, K. I.; Brooks, C. D. W.; Carter, G. W. ABT-761 Attenuates Bronchoconstriction and Pulmonary Inflammation in Rodents. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1997**, *280* (3), 1366.
- (40) Hiesinger, K.; Kramer, J. S.; Beyer, S.; Eckes, T.; Brunst, S.; Flauaus, C.; Wittmann, S. K.; Weizel, L.; Kaiser, A.; Kretschmer, S. B. M.; George, S.; Angioni, C.; Heering, J.; Geisslinger, G.; Schubert-Zsilavec, M.; Schmidtko, A.; Pogoryelov, D.; Pfeilschifter, J.; Hofmann, B.; Steinhilber, D.; Schwalm, S.; Proschak, E. Design, Synthesis, and Structure-Activity Relationship Studies of Dual Inhibitors of

Soluble Epoxide Hydrolase and 5-Lipoxygenase. *Journal of medicinal chemistry* **2020**, *63* (20), 11498–11521. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.0c00561.

(41) Cortes-Burgos, L. A.; Zweifel, B. S.; Settle, S. L.; Pufahl, R. A.; Anderson, G. D.; Hardy, M. M.; Weir, D. E.; Hu, G.; Happa, F. A.; Stewart, Z.; Muthian, S.; Graneto, M. J.; Masferrer, J. L. CJ-13610, an orally active inhibitor of 5-lipoxygenase is efficacious in preclinical models of pain. *European journal of pharmacology* **2009**, *617* (1-3), 59–67. DOI: 10.1016/j.ejphar.2009.06.058.

(42) Fischer, L.; Steinhilber, D.; Werz, O. Molecular pharmacological profile of the nonredox-type 5-lipoxygenase inhibitor CJ-13,610. *British journal of pharmacology* **2004**, *142* (5), 861–868. DOI: 10.1038/sj.bjp.0705860.

(43) Matthew Hutzler, J.; Linder, C. D.; Melton, R. J.; Vincent, J.; Daniels, J. S. In vitro-in vivo correlation and translation to the clinical outcome for CJ-13,610, a novel inhibitor of 5-lipoxygenase. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **2010**, *38* (7), 1113–1121. DOI: 10.1124/dmd.110.032706.

(44) Masferrer, J. L.; Zweifel, B. S.; Hardy, M.; Anderson, G. D.; Dufield, D.; Cortes-Burgos, L.; Pufahl, R. A.; Graneto, M. Pharmacology of PF-4191834, a novel, selective non-redox 5-lipoxygenase inhibitor effective in inflammation and pain. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **2010**, *334* (1), 294–301. DOI: 10.1124/jpet.110.166967.

(45) Orafaie, A.; Mousavian, M.; Orafaie, H.; Sadeghian, H. An overview of lipoxygenase inhibitors with approach of in vivo studies. *Prostaglandins & other lipid mediators* **2020**, *148*, 106411. DOI: 10.1016/j.prostaglandins.2020.106411.

(46) Chen, Y.; Hu, Y.; Zhang, H.; Peng, C.; Li, S. Loss of the Alox5 gene impairs leukemia stem cells and prevents chronic myeloid leukemia. *Nature genetics* **2009**, *41* (7), 783–792. DOI: 10.1038/ng.389.

(47) Roos, J.; Oancea, C.; Heinssmann, M.; Khan, D.; Held, H.; Kahnt, A. S.; Capelo, R.; La Buscató, E.; Proschak, E.; Puccetti, E.; Steinhilber, D.; Fleming, I.; Maier, T. J.; Ruthardt, M. 5-Lipoxygenase is a candidate target for therapeutic management of stem cell-like cells in acute myeloid leukemia. *Cancer research* **2014**, *74* (18), 5244–5255. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-3012.

(48) Mano, T.; Stevens, R. W.; Okumura, Y.; Kawai, M.; Okumura, T.; Sakakibara, M. 5-Lipoxygenase inhibitors: convenient synthesis of 4-(3-(4-heterocyclylphenylthio)phenyl)-3,4,5,6-tetrahydro-2H-pyran-4-carboxamide analogues. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2005**, *15* (10), 2611–2615. DOI: 10.1016/j.bmcl.2005.03.041.

(49) Mano, T.; Stevens, R. W.; Ando, K.; Kawai, M.; Kawamura, K.; Nakao, K.; Okumura, Y.; Okumura, T.; Sakakibara, M.; Miyamoto, K.; Tamura, T. Optimization of imidazole 5-lipoxygenase inhibitors and selection and synthesis of a development candidate. *Chemical & pharmaceutical bulletin* **2005**, *53* (8), 965–973. DOI: 10.1248/cpb.53.965.

(50) Migita, T.; Shimizu, T.; Asami, Y.; Shiobara, J.; Kato, Y.; Kosugi, M. The Palladium Catalyzed Nucleophilic Substitution of Aryl Halides by Thiolate Anions. *BCSJ* **1980**, *53* (5), 1385–1389. DOI: 10.1246/bcsj.53.1385.

(51) Mitsunobu, O.; Yamada, M. Preparation of Esters of Carboxylic and Phosphoric Acid via Quaternary Phosphonium Salts. *BCSJ* **1967**, *40* (10), 2380–2382. DOI: 10.1246/bcsj.40.2380.

(52) Steinebach, C.; Kehm, H.; Lindner, S.; Vu, L. P.; Köpff, S.; López Mármol, Á.; Weiler, C.; Wagner, K. G.; Reichenzeller, M.; Krönke, J.; Gütschow, M. PROTAC-mediated crosstalk between E3 ligases. *Chemical communications* **2019**, *55* (12), 1821–1824. DOI: 10.1039/c8cc09541h.

- (53) Frérot, E.; Coste, J.; Pantaloni, A.; Dufour, M.-N.; Jouin, P. PyBOP® and PyBroP: Two reagents for the difficult coupling of the α,α -dialkyl amino acid, *Aib. Tetrahedron* **1991**, *47* (2), 259–270. DOI: 10.1016/S0040-4020(01)80922-4.
- (54) Fernández-Rodríguez, M. A.; Hartwig, J. F. One-pot synthesis of unsymmetrical diaryl thioethers by palladium-catalyzed coupling of two aryl bromides and a thiol surrogate. *Chemistry* **2010**, *16* (8), 2355–2359. DOI: 10.1002/chem.200902313.
- (55) Murata, M.; Buchwald, S. L. A general and efficient method for the palladium-catalyzed cross-coupling of thiols and secondary phosphines. *Tetrahedron* **2004**, *60* (34), 7397–7403. DOI: 10.1016/j.tet.2004.05.044.
- (56) Koning, P. D. de; Murtagh, L.; Lawson, J. P.; Vonder Embse, R. A.; Kunda, S. A.; Kong, W. Development an Efficient Route to the 5-Lipoxygenase Inhibitor PF-04191834. *Org. Process Res. Dev.* **2011**, *15* (5), 1046–1051. DOI: 10.1021/op200173g.
- (57) Chekal, B.; Damon, D.; LaFrance, D.; Leeman, K.; Mojica, C.; Palm, A.; St. Pierre, M.; Sieser, J.; Sutherland, K.; Vaidyanathan, R.; van Alsten, J.; Vanderplas, B.; Wager, C.; Weisenburger, G.; Withbroe, G.; Yu, S. Development of the Commercial Route for the Manufacture of a 5-Lipoxygenase Inhibitor PF-04191834. *Org. Process Res. Dev.* **2015**, *19* (12), 1944–1953. DOI: 10.1021/op500412a.
- (58) Chemat, F.; Poux, M.; Berlan, J. 'Dry' hydrolysis of nitriles effected by microwave heating. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1994** (12), 2597–2602. DOI: 10.1039/P29940002597.
- (59) Hofmann, B.; Rödl, C. B.; Kahnt, A. S.; Maier, T. J.; Michel, A. A.; Hoffmann, M.; Rau, O.; Awwad, K.; Pellowska, M.; Wurglics, M.; Wacker, M.; Zivković, A.; Fleming, I.; Schubert-Zsilavec, M.; Stark, H.; Schneider, G.; Steinhilber, D. Molecular pharmacological profile of a novel thiazolinone-based direct and selective 5-lipoxygenase inhibitor. *British journal of pharmacology* **2012**, *165* (7), 2304–2313. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2011.01707.x.
- (60) Hofmann, B.; Franke, L.; Proschak, E.; Tanrikulu, Y.; Schneider, P.; Steinhilber, D.; Schneider, G. Scaffold-hopping cascade yields potent inhibitors of 5-lipoxygenase. *ChemMedChem* **2008**, *3* (10), 1535–1538. DOI: 10.1002/cmdc.200800153.

10. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Funktionsweise eines PROTACs.....	1
Abbildung 2: PROTAC Mechanismus ^{5,6}	2
Abbildung 3: Kinetische Betrachtung von PROTACs	4
Abbildung 4: Etablierte PROTACs.....	4
Abbildung 5: 5-LO mit seinem natürlichen Substrat, der Arachidonsäure (PDB-Eintrag 3V99). In Gelb die regulatorische Domäne, in Blau das aktive Zentrum, in Cyan die Arachidonsäure und in orange das Eisenatom.	5
Abbildung 6: Regulierung der 5-LO und der Einfluss auf den Transkriptionsfaktor β -Catenin. ²²	5
Abbildung 7: Kurze Übersicht über die Metabolisierungswege der AA mit typischen Krankheitsbilder bei Fehlfunktion des jeweiligen Signalweges. AA wird über COX zu PNs, über LO zu LTs und über CYP zu HETEs und zu EETs metabolisiert. PGH ₂ , LTA ₄ , 20-HETE und (S,R)-11,12-EET sind hierbei jeweils ein Vertreter der jeweiligen Signalwege.....	6
Abbildung 8: Metabolischer Signalweg der AA. Über die 5-LO wird AA, unterstützt durch FLAP, zu 5-HPETE und anschließend zu LTA ₄ metabolisiert. LTA ₄ kann wiederum selbst in drei unterschiedlichen Signalwegen metabolisiert werden. Die Metabolite, die dabei entstehen, lösen über die LX- und LT Rezeptoren weitere Kaskaden aus, die im Zusammenhang mit Wundheilung, Muskelkontraktion und Gefäßerweiterung stehen. ^{22,32,37}	7
Abbildung 9: Literaturbekannte Inhibitoren der 5-LO Zileuton®, Atreleuton®, HK330, CJ13,610 und PF-4191834.....	8
Abbildung 10: Einer der metabolischen Wege von CJ-13,610	9
Abbildung 11: Bausteine zur Synthese von PROTACs.	10
Abbildung 12: Strukturen der potenziellen PROTACs, welche in dieser Arbeit synthetisiert werden..	10
Abbildung 13: Synthetisierte Endverbindungen.	23
Abbildung 14: Western-Blots der PROTACs und die Quantifizierung der 5-LO, dargestellt im Balkendiagramm (n=2, gezeigt n=1).	27
Abbildung 15: PROTACs, die die 5-LO inhibieren.....	30
Abbildung 16: Kernelemente zum Designen von PROTACs.....	31
Abbildung 17: Mögliche Serie an PROTACs.	32
Abbildung 18: ³ H-NMR Verbindung (18a, RK32).....	94
Abbildung 19: ¹ H- ¹ H-COSY Verbindung (18a, RK32).....	95
Abbildung 20: ¹³ C-NMR Verbindung (18a, RK32).....	95
Abbildung 21: ¹ H- ¹³ C-HSQC Verbindung (18a, RK32)	96
Abbildung 22: IR Spektrum (18a, RK34).....	96
Abbildung 23: HPLC-Lauf (18a, RK32).....	97
Abbildung 24: HRMS (18a, RK32)	97
Abbildung 25: ¹ H-NMR Verbindung (18b, RK23).....	98
Abbildung 26: ¹ H-NMR Verbindung (18b, RK23).....	98
Abbildung 27: HPLC-Lauf (18b, RK23)	99
Abbildung 28: HRMS (18b, RK23).....	99
Abbildung 29: ¹ H-NMR Verbindung (18c, RK34).	100

Abbildung 30: ^{13}C -NMR Verbindung (18c, RK34)	100
Abbildung 31: HPLC-Lauf (18c, RK34)	101
Abbildung 32: HRMS (18c, RK34)	101
Abbildung 33: ^1H -NMR Verbindung (18d, RK26)	102
Abbildung 34: ^{13}C -NMR Verbindung (18c, RK26)	102
Abbildung 35: HPLC-Lauf (18c, RK26)	103
Abbildung 36: HRMS (18c, RK26)	103
Abbildung 37: ^1H -NMR Verbindung (74, RK19)	104
Abbildung 38: ^{13}C -NMR Verbindung (74, RK19)	104
Abbildung 39: HPLC-Lauf (74, RK19)	105
Abbildung 40: HRMS (74, RK19)	105
Abbildung 41: ^1H -NMR Verbindung (19b, RK83)	106
Abbildung 42: ^1H - ^1H -COSY Verbindung (19b, RK83)	106
Abbildung 43: ^{13}C -NMR Verbindung (19b, RK83)	107
Abbildung 44: HPLC-Lauf (19b, RK83)	107
Abbildung 45: HRMS (19b, RK83)	108
Abbildung 46: ^1H -NMR Verbindung (19c, RK90)	108
Abbildung 47: ^1H - ^1H -COSY Verbindung (19c, RK90)	109
Abbildung 48: ^{13}C -NMR Verbindung (19c, RK90)	109
Abbildung 49: HPLC-Lauf (19c, RK90)	110
Abbildung 50: HRMS (19c, RK90)	110
Abbildung 51: ^1H -NMR Verbindung (19d, RK100)	111
Abbildung 52: ^{13}C -NMR Verbindung (19d, RK100)	111
Abbildung 53: HPLC-Lauf (19d, RK100)	112
Abbildung 54: HRMS (10d, RK100)	112
Abbildung 55: ^1H -NMR Verbindung (20a, RK65)	113
Abbildung 56: ^{11}H - ^1H -COSY Verbindung (20a, RK65)	113
Abbildung 57: ^{13}C -NMR Verbindung (20a, RK65)	114
Abbildung 58: HPLC-Lauf (20a, RK65)	114
Abbildung 59: HRMS (20a, RK65)	115
Abbildung 60: ^1H -NMR Verbindung (20b, RK91)	115
Abbildung 61: ^1H - ^1H -COSY Verbindung (20b, RK91)	116
Abbildung 62: ^{13}C -NMR Verbindung (20b, RK91)	116
Abbildung 63: HPLC-Lauf (20b, RK91)	117
Abbildung 64: HRMS (20b, RK91)	117
Abbildung 65: ^1H -NMR Verbindung (20c, RK85)	118
Abbildung 66: ^1H - ^1H -COSY Verbindung (20c, RK85)	118
Abbildung 67: ^{13}C -NMR Verbindung (20c, RK85)	119
Abbildung 68: HPLC-Lauf (20c, RK85)	119
Abbildung 69: HRMS (18c, RK85)	120

Abbildung 70: ^1H -NMR Verbindung (20d, RK71).....	120
Abbildung 71: ^1H - ^1H -COSY Verbindung (20d, RK71).....	121
Abbildung 72: ^{13}C -NMR Verbindung (20d, RK71).....	121
Abbildung 73: HPLC-Lauf (20d, RK71).....	122
Abbildung 74: HRMS (20d, RK71).....	122
Abbildung 75: ^1H -NMR Verbindung (75, RK99).....	123
Abbildung 76: ^1H - ^1H -COSY Verbindung (75, RK99).....	123
Abbildung 77: ^{13}C -NMR Verbindung (75, RK99).....	124
Abbildung 78: HPLC-Lauf (75, RK99).....	124
Abbildung 79: HRMS (75, RK99).....	125
Abbildung 80: ^1H -NMR Verbindung (21a, RK92).....	125
Abbildung 81: ^1H - ^1H -COSY Verbindung (21a, RK92).....	126
Abbildung 82: ^{13}C -NMR Verbindung (21a, RK92).....	126
Abbildung 83: HPLC-Lauf (21a, RK92).....	127
Abbildung 84: HRMS (21a, RK92).....	127
Abbildung 85: ^1H -NMR Verbindung (21b, RK94).....	128
Abbildung 86: ^1H - ^1H -COSY Verbindung (21b, RK94).....	128
Abbildung 87: ^{13}C -NMR Verbindung (21b, RK94).....	129
Abbildung 88: HPLC-Lauf (21b, RK94).....	129
Abbildung 89: HRMS (21b, RK92).....	130
Abbildung 90: ^1H -NMR Verbindung (21d, RK82).....	130
Abbildung 91: ^1H - ^1H -COSY Verbindung (21d, RK82).....	131
Abbildung 92: ^{13}C -NMR Verbindung (21d, RK82).....	131
Abbildung 93: HPLC-Lauf (21d, RK82).....	132
Abbildung 94: HRMS (21d, RK82).....	132
Abbildung 95: ^1H -NMR Verbindung (79, RK97).....	133
Abbildung 96: ^1H - ^1H -COSY Verbindung (76, RK97).....	133
Abbildung 97: ^{13}C -NMR Verbindung (76, RK97).....	134
Abbildung 98: HPLC-Lauf (76, RK97).....	134
Abbildung 99: HRMS (76, RK97).....	135

11. Schemenverzeichnis

Schema 1: Synthese zur Darstellung des Inhibitor-Bausteins des PROTACs.....	11
Schema 2: Synthese des E3-Ligase-Liganden Thalidomid mit PEG-Linker.	11
Schema 3: Synthese des E3-Ligase-Liganden VHL mit PEG-Linker.	11
Schema 4: Synthese des CJ-13,610 Derivates via Route I.....	12
Schema 5: Synthese des CJ-13,610 Derivates via Route II.....	12
Schema 6: Nukleophile Addition a) (I) NaHCO_3 , H_2O , 0°C , 30 min, (II) NaHCO_3 , H_2O , RT, 2 h, 42%.	13
Schema 7: Mögliche Nebenprodukte in der Nukleophilen Addition.....	13

Schema 8: Mitsunobu-Reaktion b) (I) PPh ₃ , THF 0 °C, (II) DIAD, THF 0 °C → RT, 3 h, 74%.	13
Schema 9: Mitsunobu-Mechanismus.	14
Schema 10: Ammonolyse c) NH ₃ (g), Isopropanol, -196 °C → RT, 1 bar → 10 bar, ÜN, 81%.	14
Schema 11: Sonogashira-Kupplung d) Pd(II)(ACN) ₂ Cl ₂ , PPh ₃ , Cul, DIPA, EE, RT, 16 h, 79%.	14
Schema 12: S _N Thalidomid-Bildung e) Pyridin, 110 °C, ÜN, 36%.	15
Schema 13: S _N Ar Linker-Kupplung f) DIPEA, DMF, 115 °C, ÜN, 53%.	15
Schema 14: S _N Ar f) DIPEA, DMF, 110 °C, ÜN, 51-59%.....	16
Schema 15: Amid-Kupplung g) PyBOP, HOBt·H ₂ O, DIPEA, pH > 9, DMF, 0 °C, 10 min, 60 °C MW, 30 min, 43-78%.....	16
Schema 16: Amid-Kupplung PyBOP, HOBt·H ₂ O, DIPEA, pH > 9, DMF, 0 °C, 10 min, 60 °C MW, 30 min, 68%.	16
Schema 17: Mechanismus der Amid-Kupplung.	17
Schema 18: Veresterung h) MeOH, H ₂ SO ₄ , 90 °C, 97%.....	17
Schema 19: S _N THP-Ringbildung i) 60% NaH in Mineralöl, abs. DMSO, 10 °C → RT, 2 h, 37%.	17
Schema 20: Schema 21: S _N THP-Ringbildung j) 60% NaH in Mineralöl, DMSO, 10 °C → RT, 2 h, 73%..	18
Schema 22: S _N Ar k) 60% NaH in Mineralöl, DMSO, 30 min RT, 110 °C, 16 h, 66%.	18
Schema 23: Zweifache Migita-Kupplung l) (I) Pd(Ph ₃) ₄ , 60% NaH in Mineralöl, THF/Toluol 1:1, 0 °C, 10 min, 100 °C, 2 h, (II) Pd(Ph ₃) ₄ , KOtBu, Ethanol, 80 °C, ÜN, < 13%; m) (I) Pd(dppf)Cl ₂ ·CH ₂ Cl ₂ , 60% NaH in Mineralöl, THF/Toluol 1:1, 0 °C, 10 min, 100 °C, 2 h, (II), Pd(dppf)Cl ₂ ·CH ₂ Cl ₂ , KOtBu, CsF, 1,4-Dioxan, 100 °C, ÜN < 3 %.....	19
Schema 24: Migita-Kupplung l) (I) Pd(Ph ₃) ₄ , 60% NaH in Mineralöl, THF/Toluol 1:1, 0 °C, 10 min, 100 °C, 2 h, 52%.....	20
Schema 25: Zweite Migita-Kupplung (I) (II) Pd(Ph ₃) ₄ , KOtBu, Ethanol, 80 °C, ÜN, 25%; m) (II) Pd(dppf)Cl ₂ ·CH ₂ Cl ₂ , KOtBu, CsF, 1,4-Dioxan, 100 °C, ÜN, 75%.	20
Schema 26: Mechanismus der Migita-Kupplung mit PdL ₂ = Pd(dppf)Cl ₂ ·CH ₂ Cl ₂ als Katalysator.....	21
Schema 27: Verseifung n) 4 molare NaOH, H ₂ O/Ethanol 1:1, MW, 120 °C, 5 h, 5 bar, 54% - quantitativ.	21
Schema 28: Allgemeines Kupplungsschema n) 4 molare NaOH, H ₂ O/Ethanol 1:1, MW, 120 °C, 5 h, 5 bar, o) TFA, DCM 0 °C → RT, 1-4 h, p) PyBOP, HOBt·H ₂ O, DIPEA, pH > 9, DMF, 0 °C, 10 min, RT, ÜN, q) PyBOP, HOBt·H ₂ O, DIPEA, pH > 9, DMF, 0 °C, 10 min, RT, 1 h, MW, 60 °C, 11-75%.....	22
Schema 29: Zusammenfassung der Synthese von 5-LO-PROTACs a) (I) NaHCO ₃ , H ₂ O, 0 °C, 30 min, (II) NaHCO ₃ , H ₂ O, RT, 2 h, 42%; b) (I) PPh ₃ , THF 0 °C, (II) DIAD, THF 0 °C → RT, 3 h, 74%; c) NH ₃ (g), Isopropanol, -196 °C → RT, 1 bar → 10 bar, ÜN, 81%; d) Pd(II)(ACN) ₂ Cl ₂ , PPh ₃ , Cul, DIPA, EE, RT, 16 h, 79%; e) Pyridin, 110 °C, ÜN, 36%; f) DIPEA, DMF, 110 °C, ÜN, 51-59%; g) PyBOP, HOBt·H ₂ O, DIPEA, pH > 9, DMF, 0 °C, 10 min, 60 °C MW, 30 min, 43-78; j) 60% NaH in Mineralöl, DMSO, 10 °C → RT, 2 h, 73%; k) 60% NaH in Mineralöl, DMSO, 30 min RT, 110 °C, 16 h, 66%; l) (I) Pd(PPh ₃) ₄ , 60% NaH in Mineralöl, THF/Toluol 1:1, 0 °C, 10 min, 100 °C, 2 h, 52%; m) (II) Pd(dppf)Cl ₂ ·CH ₂ Cl ₂ , KOtBu, CsF, 1,4-Dioxan, 100 °C, ÜN 75%; n) 4 molare NaOH, H ₂ O/Ethanol 1:1, MW, 120 °C, 5 h, 5 bar, 54% - quantitativ; o) TFA, DCM 0 °C → RT, 1-4 h, p) PyBOP, HOBt·H ₂ O, DIPEA, pH > 9, DMF, 0 °C, 10 min, RT, ÜN, q) PyBOP, HOBt·H ₂ O, DIPEA, pH > 9, DMF, 0 °C, 10 min, RT, 1 h, MW, 60 °C, 11-75%.	29
Schema 30: Gabriel-Synthese r) NEt ₃ , CH ₂ Cl ₂ , RT, Williamson-Ether-Synthese s) t-Butyl-2-Bromethan oder t-Butyl-3-Brompropan THF, RT; Reduktion t) NaBH ₄ , THF, MeOH, reflux, 2 h.....	31

12. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Reaktionsbedingungen der Sonogashira-Kupplung ^[d]	14
Tabelle 2: Reaktionsbedingungen der S _N Ar ^[f]	15
Tabelle 3: Reaktionsoptimierung zur Synthese des THP-Rings. ^[i]	18
Tabelle 4: Reaktionsoptimierung S _N Ar ^[k]	19
Tabelle 5: Reaktionsbedingungen der zweiten Migita-Kupplung. ^{[l],[m]}	20
Tabelle 6: Reaktionsbedingungen der Verseifung ^[n]	21
Tabelle 7: Reaktionsoptimierung der PROTAC-Amid-Kupplung ^[p]	23
Tabelle 8: Übersicht der Endverbindungen, und den Reaktionsbedingungen für die Amid-Kupplung HK330 _{verkürzt} steht hierbei für Baustein A, CJ-13,610-Derivat für D, T für B und VHL für D ^[n, o, p, q]	24
Tabelle 9: Aktivität und Wasserlöslichkeit der Endverbindungen.....	25
Tabelle 10: Zusammensetzung des SDS-Pages	34
Tabelle 11: Antikörper und dessen Verdünnung.	35
Tabelle 12: Methoden für die präparative HPLC.....	36
Tabelle 13: Messergebnisse (18a, RK32)	92
Tabelle 14: Messergebnisse (18b, RK23)	92
Tabelle 15: Messergebnisse (18c, RK34).....	92
Tabelle 16: Messergebnisse (18d, RK26)	92
Tabelle 17: Messergebnisse (74, RK19)	92
Tabelle 18: Messergebnisse (19a, RK65)	92
Tabelle 19: Messergebnisse (19b, RK91)	92
Tabelle 20: Messergebnisse (19c, RK85)	93
Tabelle 21: Messergebnisse (19d, RK71)	93
Tabelle 22: Messergebnisse (75, RK99)	93
Tabelle 23: Messergebnisse (20b, RK83)	93
Tabelle 24: Messergebnisse (20c, RK90).....	93
Tabelle 25: Messergebnisse (20d, RK100)	93
Tabelle 26: Messergebnisse (21a, RK92)	93
Tabelle 27: Messergebnisse (21b, RK94)	93
Tabelle 28: Messergebnisse (21d, RK82)	94
Tabelle 29: Messergebnisse (76, RK97)	94

13. Anhang

Nachfolgend sind die Mittelwerte der Messergebnisse der Wasserlöslichkeit aufgelistet.

Tabelle 13: Messergebnisse (18a, RK32)

Konzentration	10 µM	3 µM	1 µM	0,3 µM	0,1 µM	0,03 µM	Blindwert
n=1	0,0378	0,0377	0,0388	0,0377	0,0377	0,0376	0,0381
n=2	0,0377	0,0377	0,0381	0,0376	0,0377	0,0376	0,0384

Tabelle 14: Messergebnisse (18b, RK23)

Konzentration	10 µM	3 µM	1 µM	0,3 µM	0,1 µM	0,03 µM	Blindwert
n=1	0,0383	0,0381	0,0380	0,0378	0,0378	0,0378	0,0381
n=2	0,0380	0,0378	0,0377	0,0380	0,0376	0,0376	0,0384

Tabelle 15: Messergebnisse (18c, RK34)

Konzentration	10 µM	3 µM	1 µM	0,3 µM	0,1 µM	0,03 µM	Blindwert
n=1	0,0383	0,0377	0,0393	0,0381	0,0381	0,0377	0,0381
n=2	0,0388	0,0377	0,0379	0,0380	-	-	0,0384

Tabelle 16: Messergebnisse (18d, RK26)

Konzentration	10 µM	3 µM	1 µM	0,3 µM	0,1 µM	0,03 µM	Blindwert
n=1	0,0377	0,0378	0,0376	0,0379	0,0402	0,0374	0,0381
n=2	0,0378	0,0380	0,0377	0,0373	0,0379	0,0387	0,0384

Tabelle 17: Messergebnisse (74, RK19)

Konzentration	10 µM	3 µM	1 µM	0,3 µM	0,1 µM	0,03 µM	Blindwert
n=1	0,0378	0,0377	0,0388	0,0377	0,0377	0,0376	0,0381
n=2	0,0377	0,0377	0,0381	0,0376	0,0377	0,0376	0,0384

Tabelle 18: Messergebnisse (19a, RK65)

Konzentration	10 µM	3 µM	1 µM	0,3 µM	0,1 µM	0,03 µM	Blindwert
n=1	0,0382	0,0378	0,0381	0,0383	0,0380	0,0379	0,0381
n=2	0,0379	0,0375	0,0376	0,0379	0,0377	0,0376	0,0380

Tabelle 19: Messergebnisse (19b, RK91)

Konzentration	10 µM	3 µM	1 µM	0,3 µM	Blindwert
n=1	0,0375	0,0373	0,0382	0,0375	0,0378
n=2	0,0382	0,0390	0,0379	0,0378	0,0377

Tabelle 20: Messergebnisse (19c, RK85)

Konzentration	10 µM	3 µM	1 µM	0,3 µM	Blindwert
n=1	0,0553	0,0373	0,0372	0,0372	0,0378
n=2	0,0393	0,0378	0,0376	0,0379	0,0377

Tabelle 21: Messergebnisse (19d, RK71)

Konzentration	10 µM	3 µM	1 µM	0,3 µM	0,1 µM	0,03 µM	Blindwert
n=1	0,0381	0,0381	0,0380	0,0388	0,0391	0,0379	0,0381
n=2	0,0379	0,0384	0,0379	0,0377	0,0385	0,0379	0,0380

Tabelle 22: Messergebnisse (75, RK99)

Konzentration	10 µM	3 µM	1 µM	0,3 µM	Blindwert
n=1	0,0452	0,0374	0,0376	0,0379	0,0378
n=2	0,0416	0,0375	0,0372	0,0378	0,0379

Tabelle 23: Messergebnisse (20b, RK83)

Konzentration	10 µM	3 µM	1 µM	0,3 µM	0,1 µM	0,03 µM	Blindwert
n=1	0,0895	0,0489	0,0385	0,0392	0,0410	0,0383	0,0381
n=2	0,0989	0,0501	0,0385	0,0378	0,0382	0,0380	0,0380

Tabelle 24: Messergebnisse (20c, RK90)

Konzentration	10 µM	3 µM	1 µM	0,3 µM	Blindwert
n=1	0,0653	0,0376	0,0372	0,0372	0,0378
n=2	0,0392	0,0379	0,0376	0,0379	0,0377

Tabelle 25: Messergebnisse (20d, RK100)

Konzentration	10 µM	3 µM	1 µM	0,3 µM	Blindwert
n=1	0,0459	0,0370	0,0373	0,0375	0,0378
n=2	0,0383	0,0383	0,0382	0,0389	0,0377

Tabelle 26: Messergebnisse (21a, RK92)

Konzentration	10 µM	3 µM	1 µM	0,3 µM	Blindwert
n=1	0,0452	0,0374	0,0376	0,0379	0,0378
n=2	0,0376	0,0378	0,0374	0,0387	0,0377

Tabelle 27: Messergebnisse (21b, RK94)

Konzentration	10 µM	3 µM	1 µM	0,3 µM	Blindwert
n=1	0,0448	0,0374	0,0373	0,0375	0,0378
n=2	0,0377	0,0378	0,0374	0,0384	0,0377

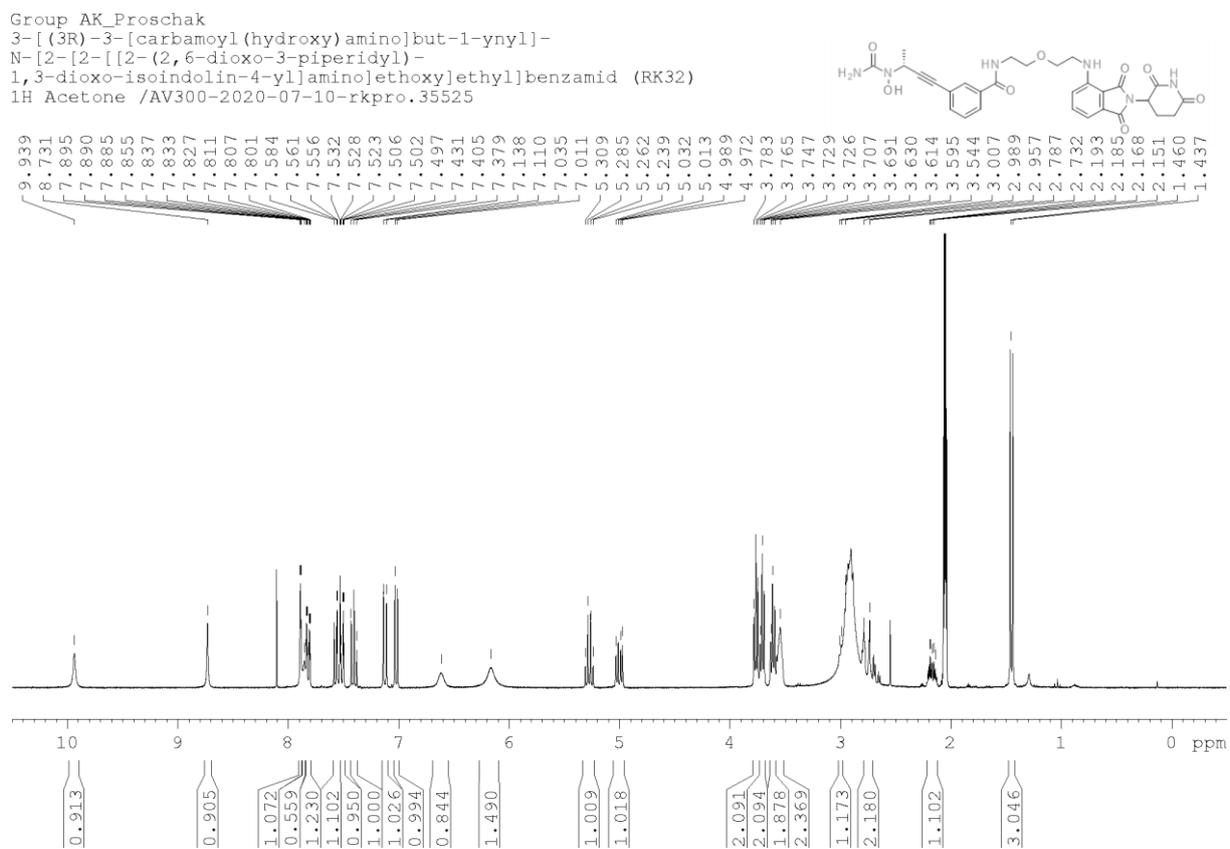
Tabelle 28: Messergebnisse (21d, RK82)

Konzentration	10 μ M	3 μ M	1 μ M	0,3 μ M	0,1 μ M	0,03 μ M	Blindwert
n=1	0,0805	0,0385	0,0378	0,0382	0,0379	0,0381	0,0381
n=2	0,0832	0,0379	0,0377	0,0378	0,0379	0,0377	0,0380

Tabelle 29: Messergebnisse (76, RK97)

Konzentration	10 μ M	3 μ M	1 μ M	0,3 μ M	Blindwert
n=1	0,0736	0,0414	0,0376	0,0378	0,0378
n=2	0,0442	0,0377	0,0378	0,0389	0,0377

Nachfolgend sind die NMR-Spektren, HPLC-Läufe und HRMS-Spektren der synthetisierten Endverbindungen aufgeführt.

**Abbildung 18:** ¹H-NMR Verbindung (18a, RK32)

Group AK_Proschak
 3-[(3R)-3-[carbamoyl(hydroxy)amino]but-1-ynyl]-
 N-[2-[2-[2-(2,6-dioxo-3-piperidyl)-1,3-dioxo-
 isoindolin-4-yl]amino]ethoxy]ethyl]benzamid (RK32)
 COSY_n Acetone /AV400-2020-08-12-rkpro.37295

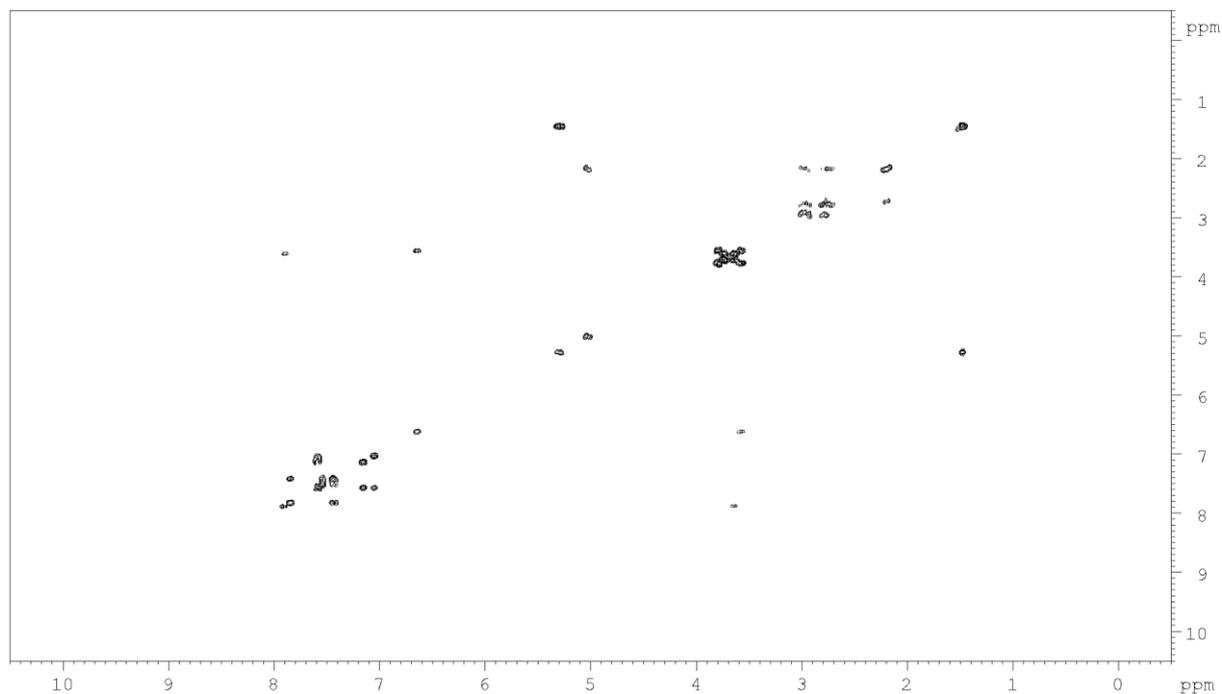
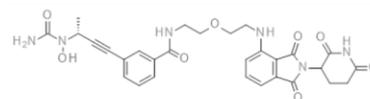


Abbildung 19: ^1H - ^1H -COSY Verbindung (18a, RK32)

Group AK_Proschak 3-[(3R)-3-[carbamoyl(hydroxy)amino]but-1-ynyl]-
 N-[2-[2-[2-(2,6-dioxo-3-piperidyl)-
 1,3-dioxo-isoindolin-4-yl]amino]ethoxy]ethyl]benzamid (RK32)
 $^{13}\text{C}\{1\text{H}\}$ Acetone /AV300-2020-07-10-rkpro.35525

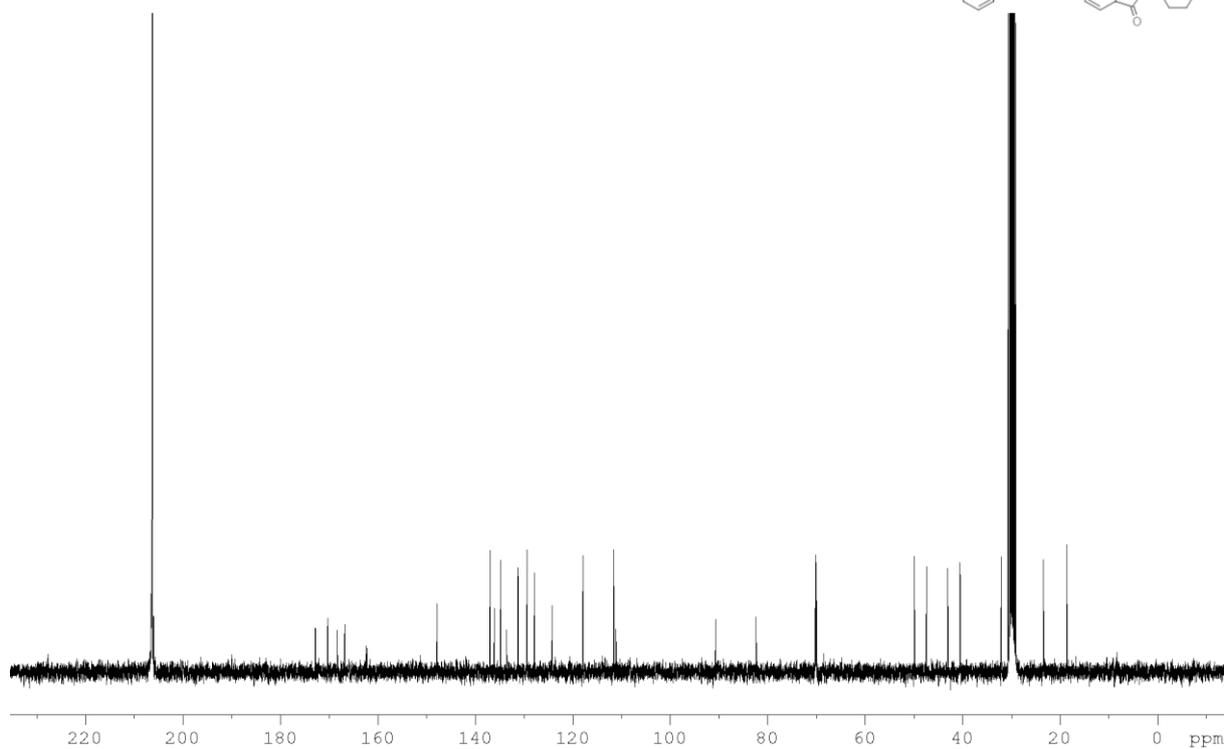
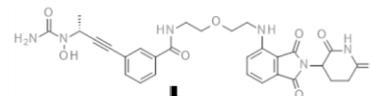


Abbildung 20: ^{13}C -NMR Verbindung (18a, RK32)

13. Anhang

Group AK_Proeschak
 3-[(3R)-3-[carbamoyl(hydroxy)amino]but-1-ynyl]-
 N-[2-[2-[2-(2,6-dioxo-3-piperidyl)-1,3-dioxo-
 isoindolin-4-yl]amino]ethoxy]ethyl]benzamid (RK32)
 HSQC_n Acetone /AV400-2020-08-12-rkpro.37295

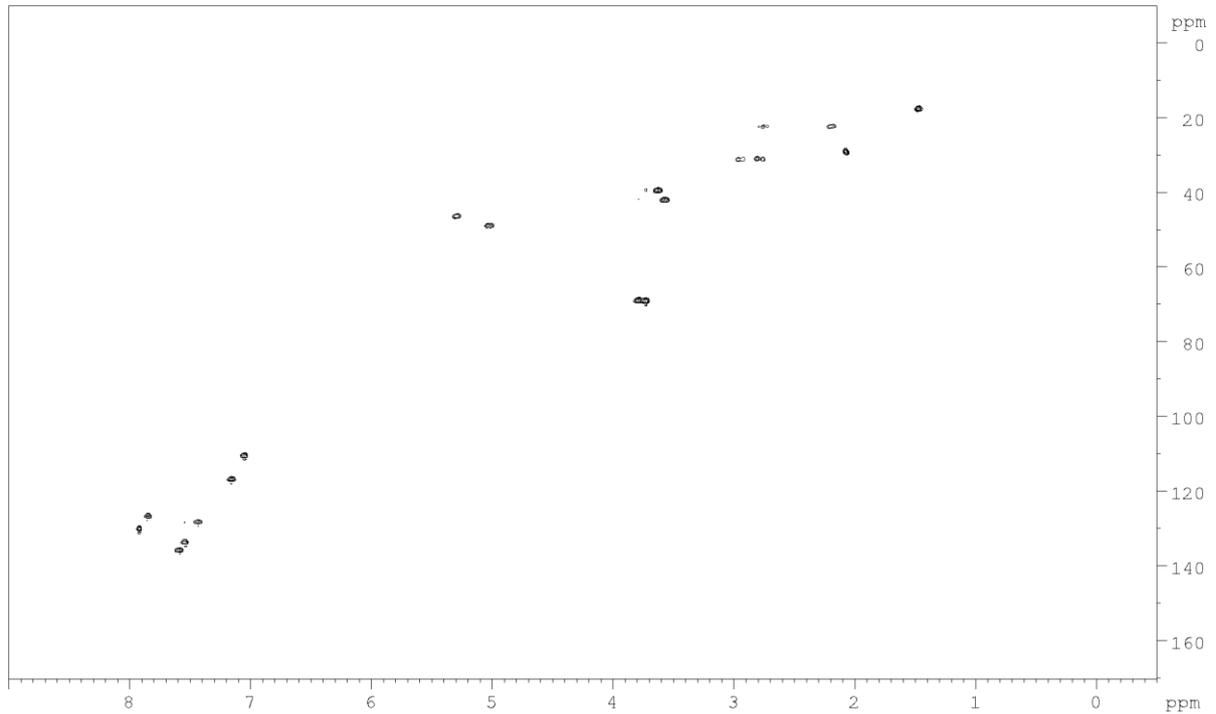
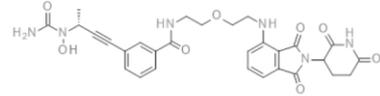


Abbildung 21: ^1H - ^{13}C -HSQC Verbindung (18a, RK32)

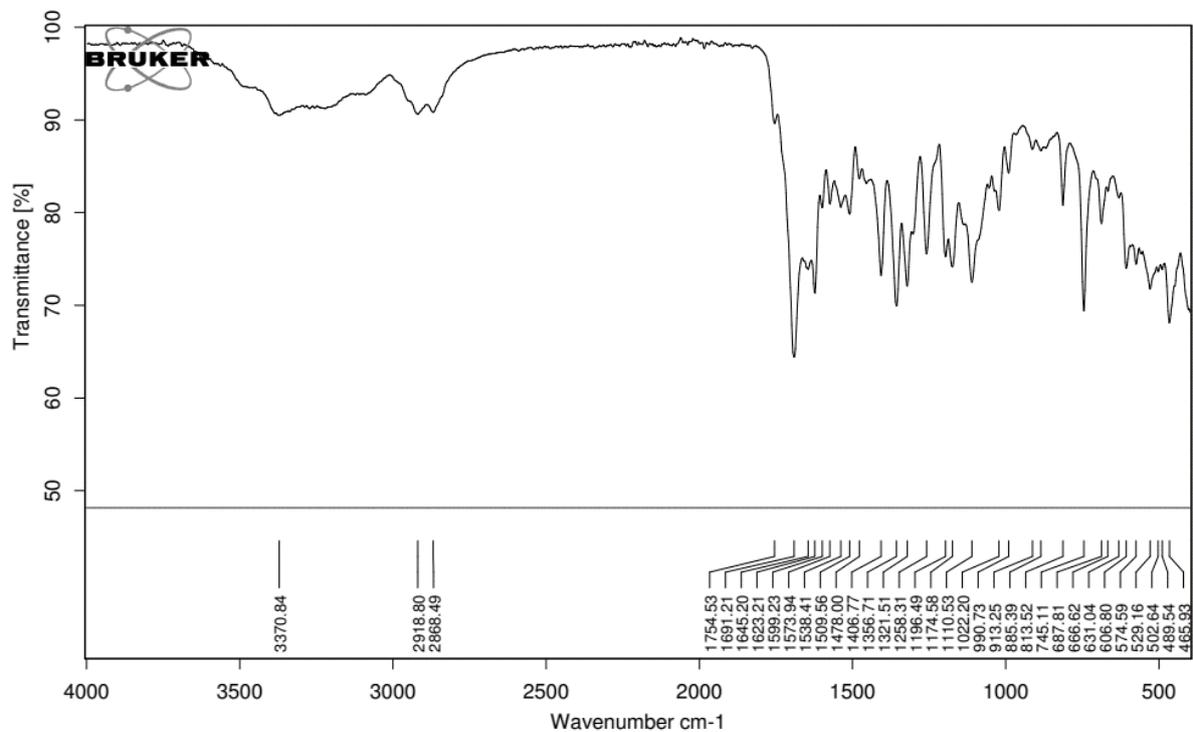
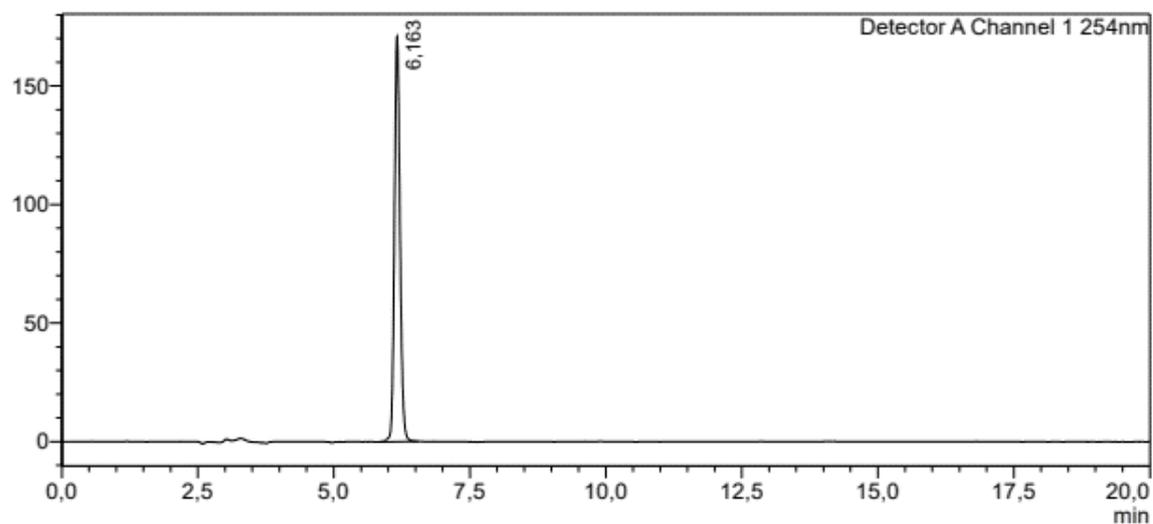


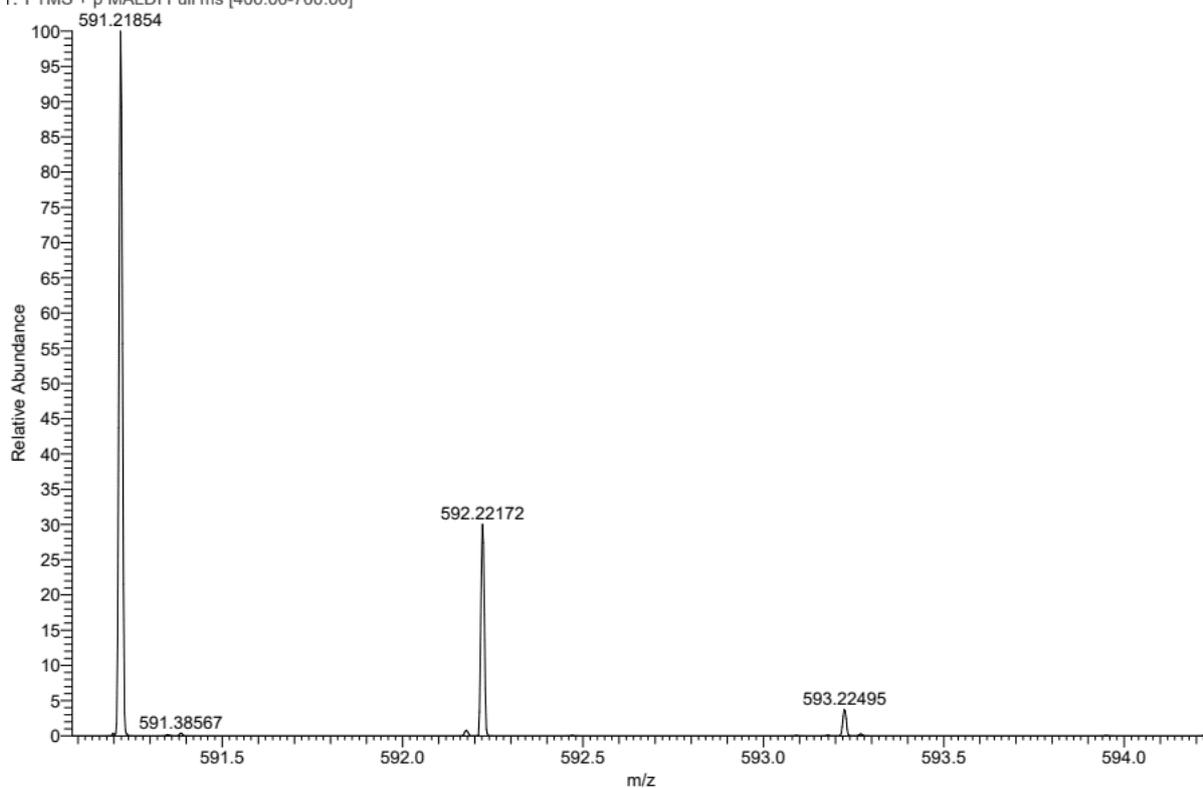
Abbildung 22: IR Spektrum (18a, RK34)

<Chromatogram>

mV

**Abbildung 23:** HPLC-Lauf (18a, RK32)

RK 32 PES 1_A8 #2-14 RT: 0.15-1.78 AV: 13 NL: 1.98E5
Γ: FTMS + p MALDI Full ms [400.00-700.00]

**Abbildung 24:** HRMS (18a, RK32)

13. Anhang

Group AK_Proshak
 3-[(3R)-3-[Carbamoyl(hydroxy)amino]but-1-ynyl]-
 -N-[2-[2-[2-[[2-(2,6-dioxo-3-piperidyl)-1,3-dioxo-
 isoindolin-4-yl]amino]ethoxy]ethoxy]ethyl]benzamid (RK23)
 1H Acetone /AV400-2020-06-24-rkpro.36308

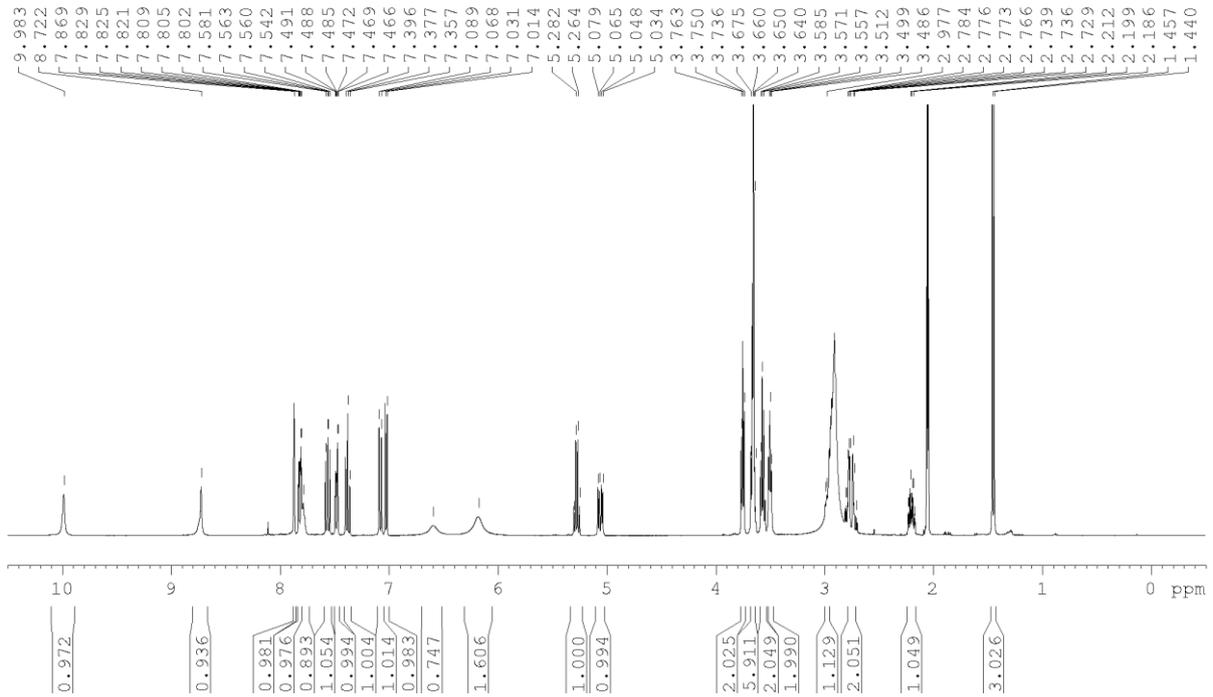
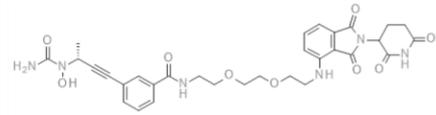


Abbildung 25: ¹H-NMR Verbindung (18b, RK23)

Group AK_Proshak
 3-[(3R)-3-[Carbamoyl(hydroxy)amino]but-1-ynyl]-
 -N-[2-[2-[2-[[2-(2,6-dioxo-3-piperidyl)-
 1,3-dioxo-isoindolin-4-yl]amino]ethoxy]ethoxy]ethyl]
 benzamid (RK23)

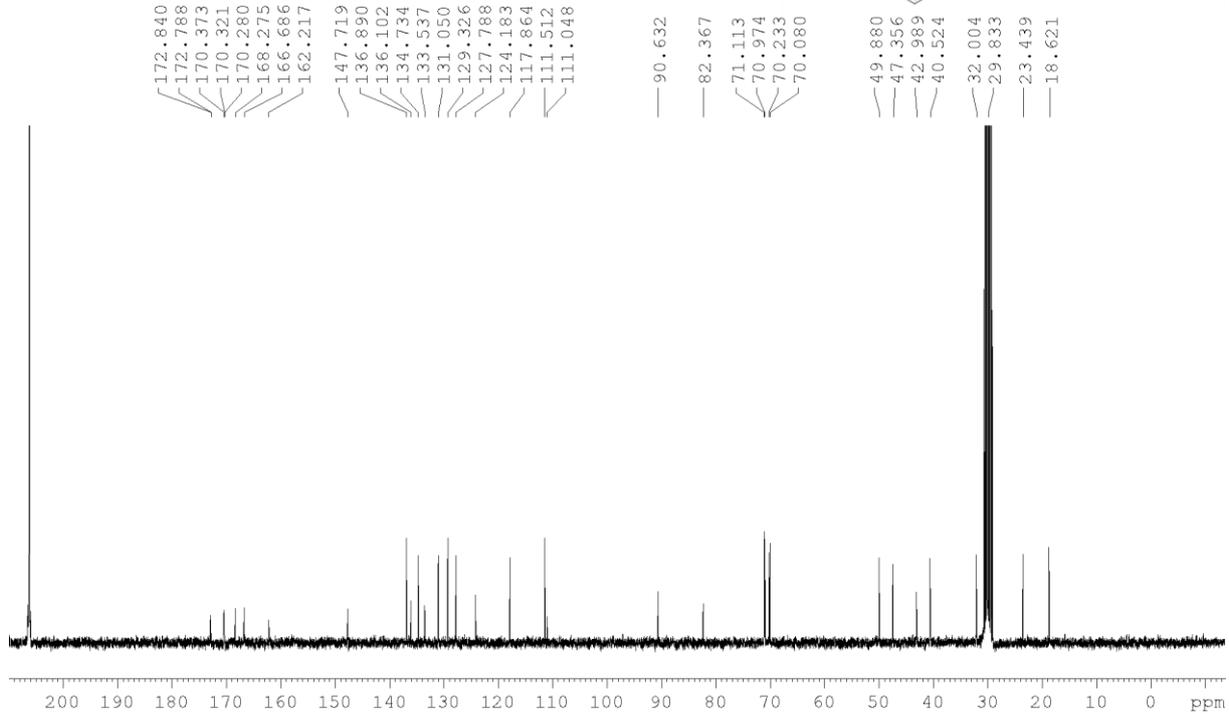
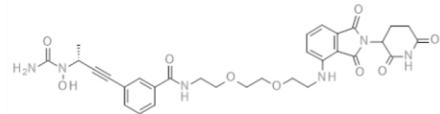
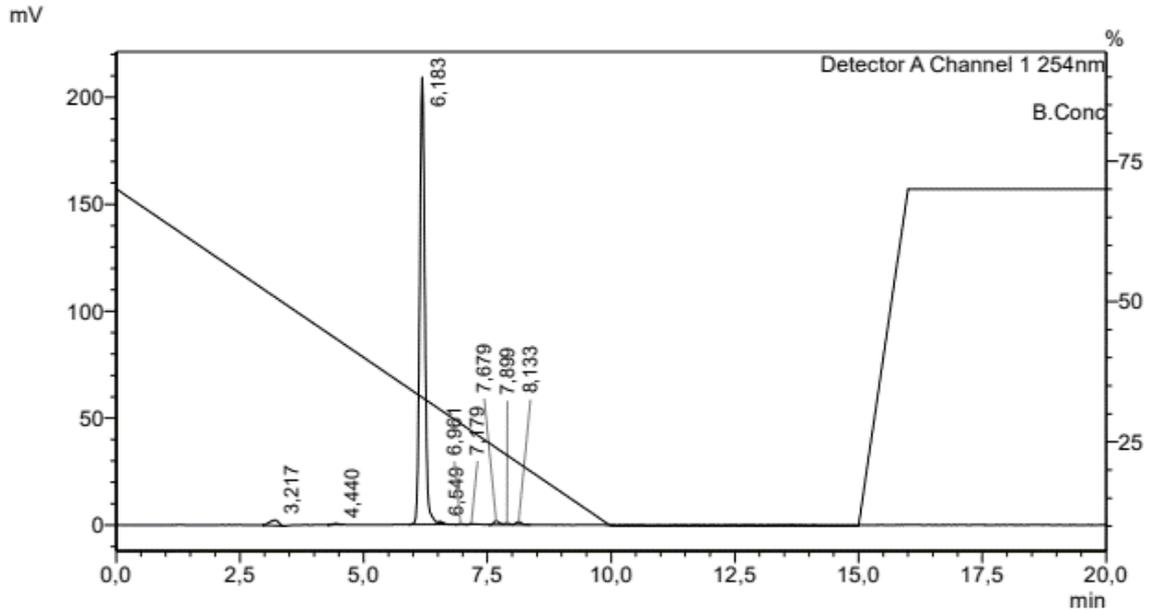
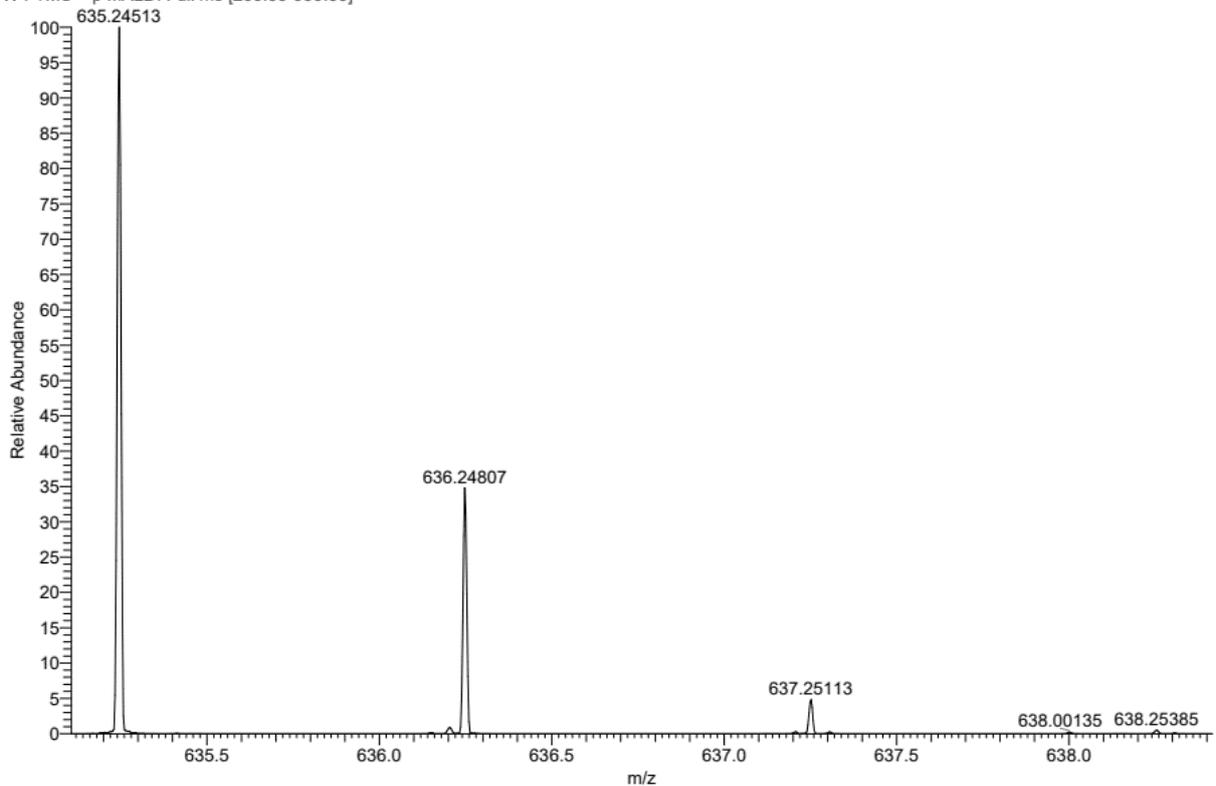


Abbildung 26: ¹³C-NMR Verbindung (18b, RK23)

<Chromatogram>**Abbildung 27: HPLC-Lauf (18b, RK23)**

RK23 A1 #1-7 RT: 0.00-0.43 AV: 7 NL: 2.24E6
T: FTMS + p MALDI Full ms [200.00-900.00]

**Abbildung 28: HRMS (18b, RK23)**

13. Anhang

Group AK_Proschak
 3-[(3R)-3-[carbamoyl(hydroxy)amino]but-1-ynyl]-
 N-[2-[2-[2-[2-[2-(2,6-dioxo-3-piperidyl)-
 1,3-dioxo-isindolin-4-yl]amino]ethoxy]ethoxy]
 ethoxy]ethyl]benzamid (RK34)
 1H Acetone /AV300-2020-08-12-rkpro.36346

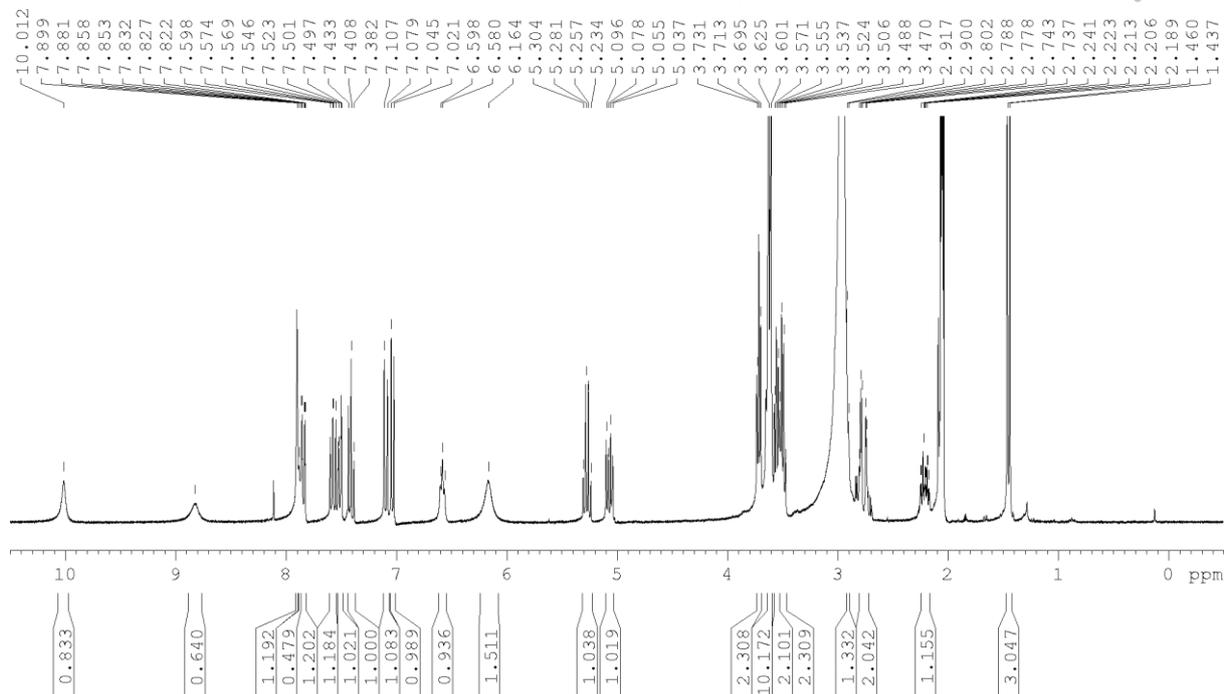
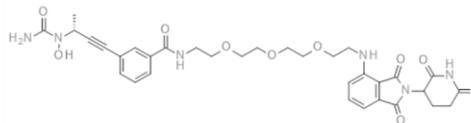


Abbildung 29: ¹H-NMR Verbindung (18c, RK34).

Group AK_Proschak
 3-[(3R)-3-[carbamoyl(hydroxy)amino]but-1-ynyl]-
 N-[2-[2-[2-[2-[2-(2,6-dioxo-3-piperidyl)-
 1,3-dioxo-isindolin-4-yl]amino]ethoxy]ethoxy]
 ethoxy]ethyl]benzamid (RK34)
 13C{1H}n Acetone /AV300-2020-08-12-rkpro.36346

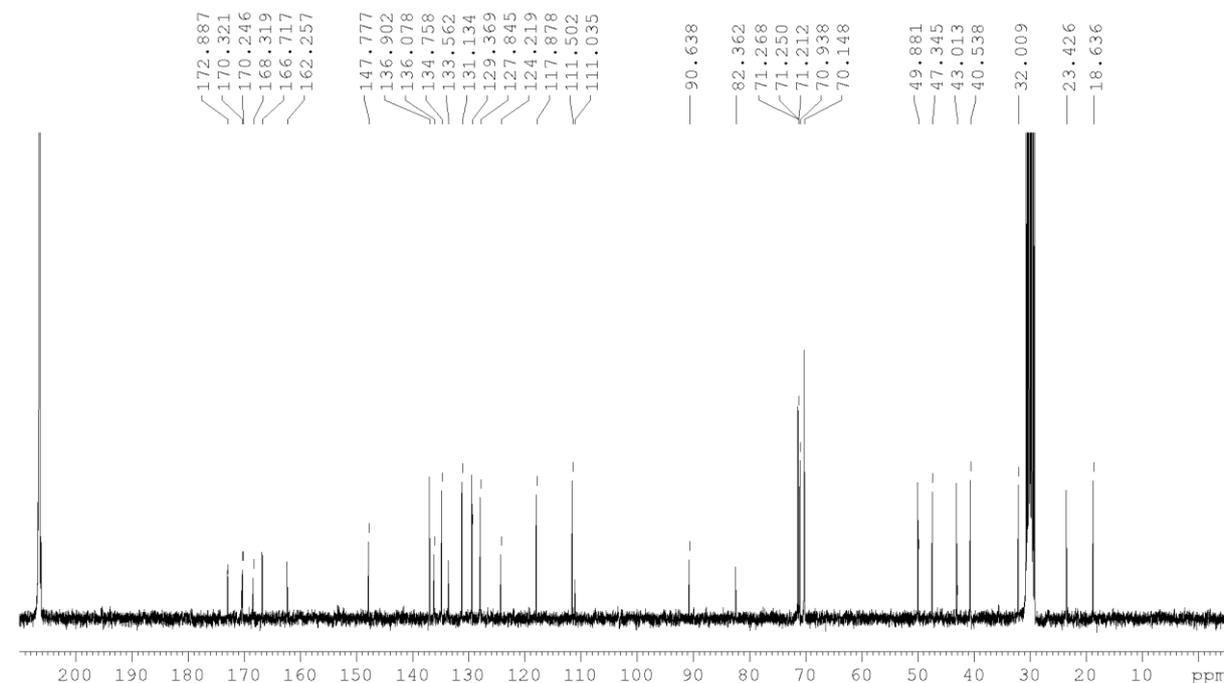
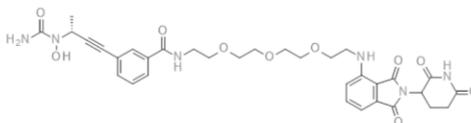


Abbildung 30: ¹³C-NMR Verbindung (18c, RK34)

<Chromatogram>

mV

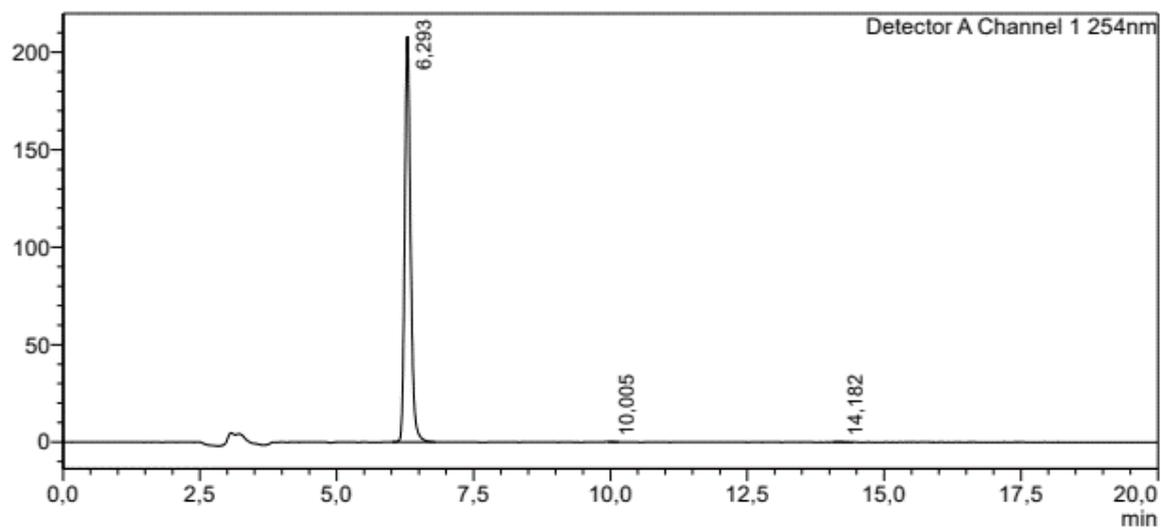


Abbildung 31: HPLC-Lauf (18c, RK34)

RK 34 PES 3 A7 #1-9 RT: 0.00-1.10 AV: 9 NL: 7.75E4
T: FTMS + p MALDI Full ms [400.00-800.00]

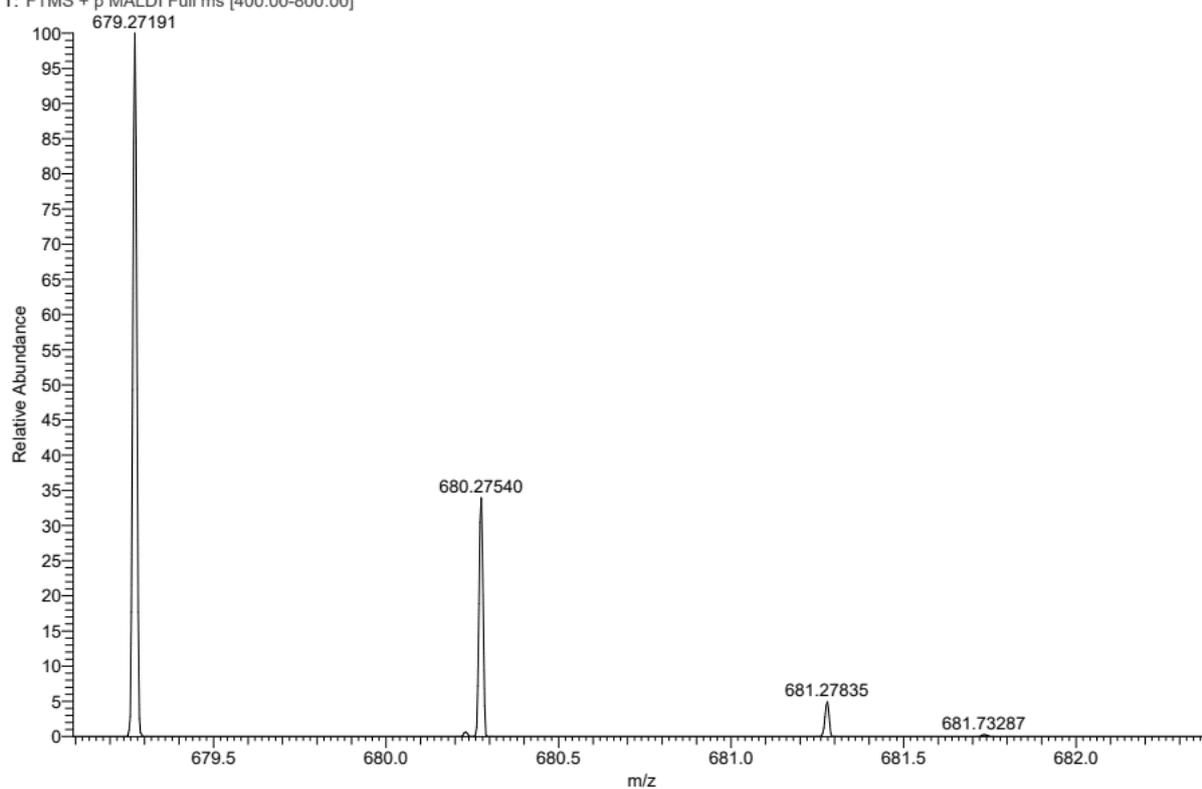


Abbildung 32: HRMS (18c, RK34)

13. Anhang

Group AK_Proσχak

3-[(3R)-3-[Carbamoyl(hydroxy)amino]but-1-ynyl]-N-[2-[2-[2-[2-[2-(2,6-dioxo-3-piperidyl)-1,3-dioxo-isindolin-4-yl]amino]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethylbenzamid (RK26)

¹H Acetone /AV400-2020-07-03-rkpro-36650

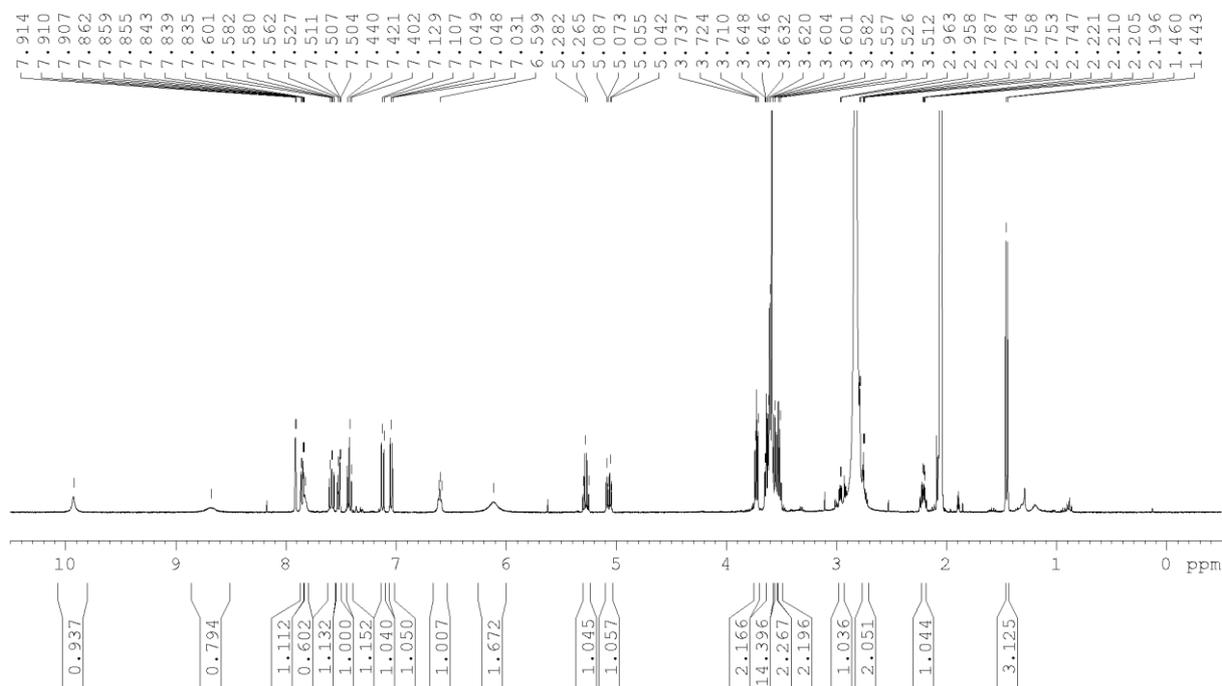
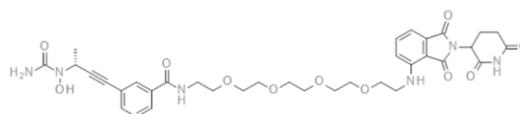


Abbildung 33: ¹H-NMR Verbindung (18d, RK26)

Group AK_Proσχak

3-[(3R)-3-[Carbamoyl(hydroxy)amino]but-1-ynyl]-N-[2-[2-[2-[2-[2-(2,6-dioxo-3-piperidyl)-1,3-dioxo-isindolin-4-yl]amino]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethylbenzamid (RK26)

¹H Acetone /AV500-2020-08-07-rkpro.33658

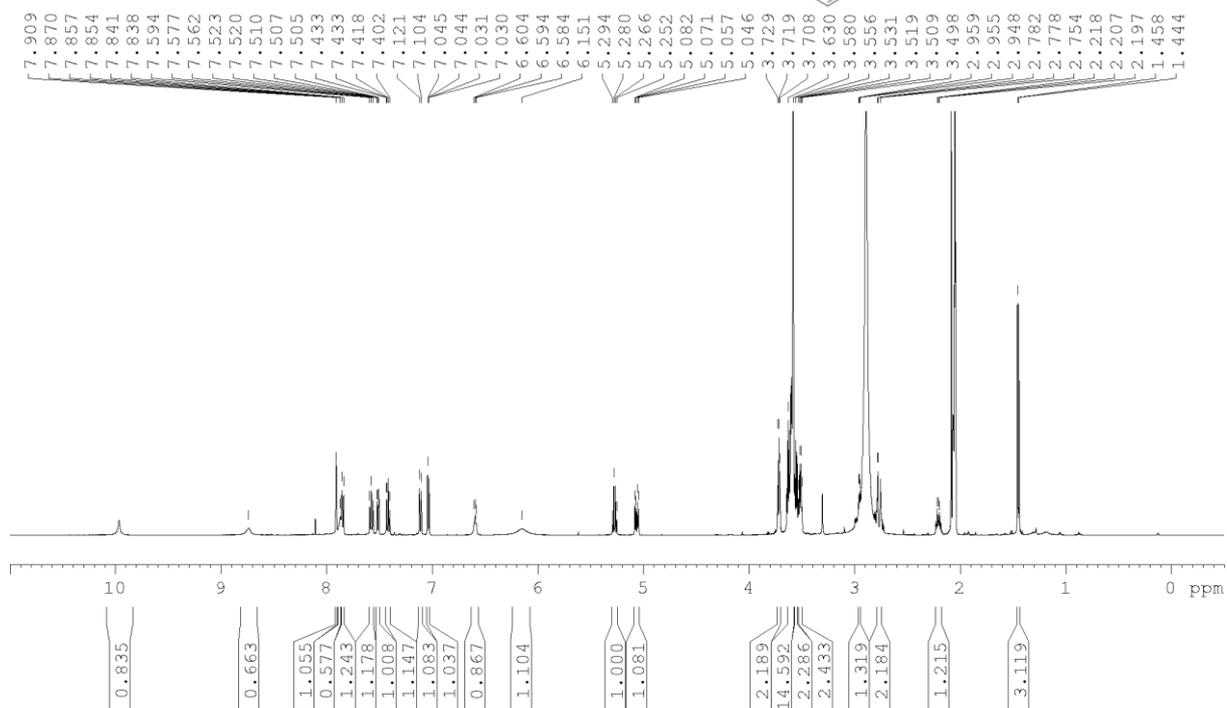
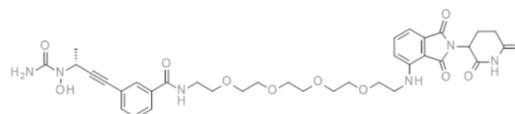


Abbildung 34: ¹³C-NMR Verbindung (18c, RK26)

<Chromatogram>

mV

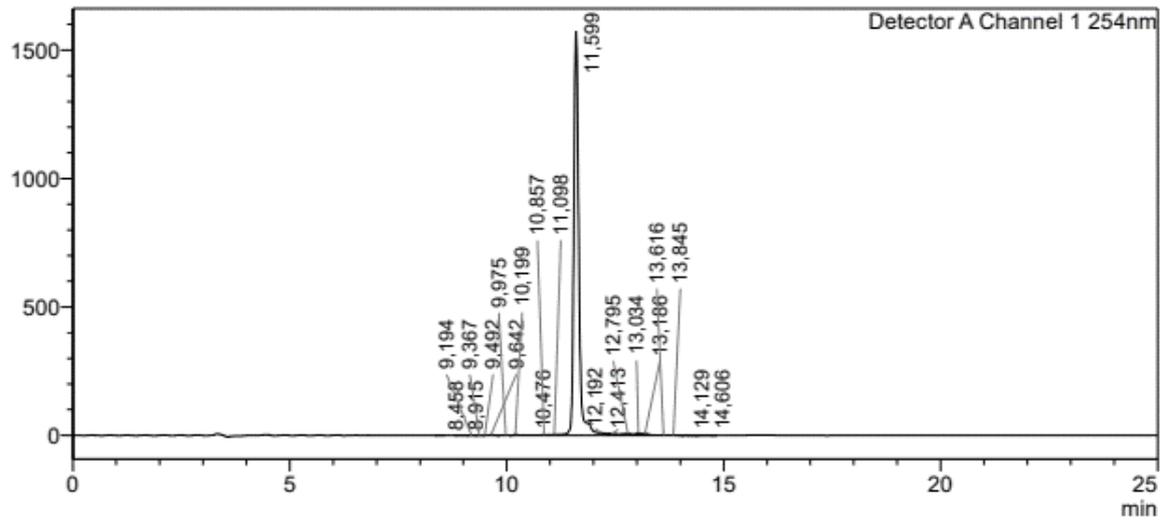


Abbildung 35: HPLC-Lauf (18c, RK26)

RK26-PE54 #1-14 RT: 0.00-1.74 AV: 14 NL: 6.90E4
Γ: FTMS + p MALDI Full ms [600.00-900.00]

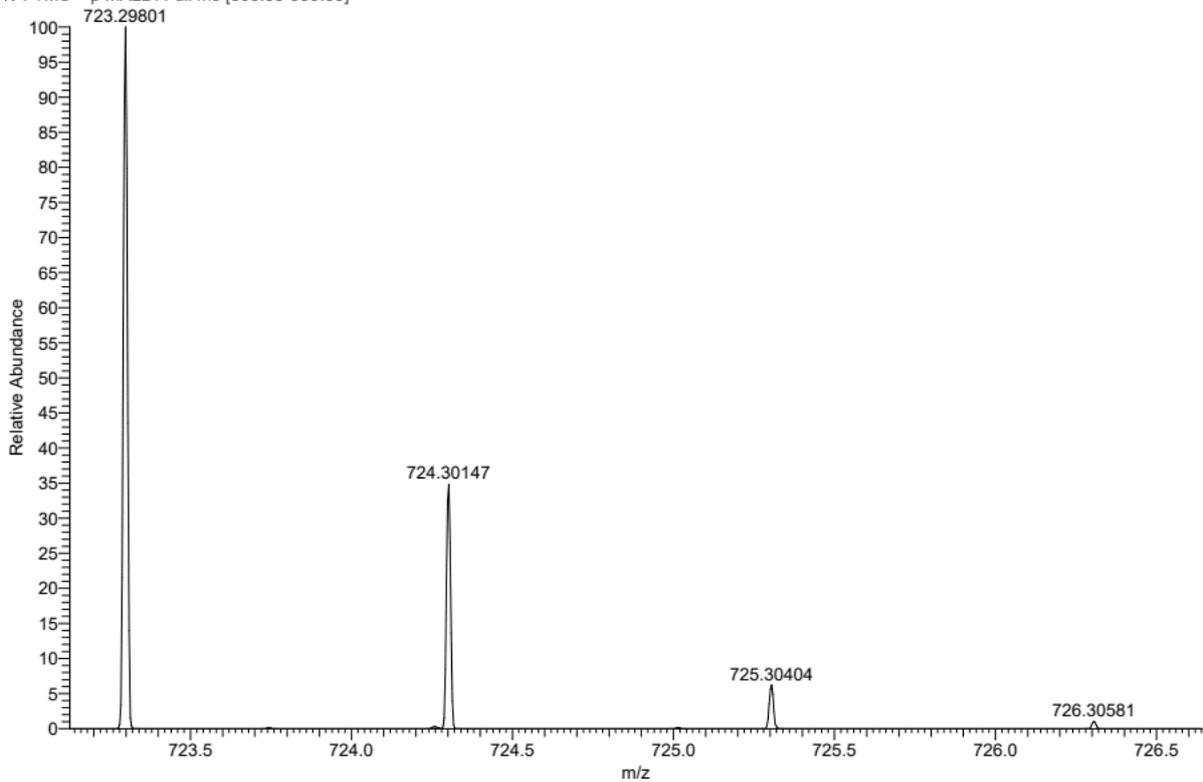


Abbildung 36: HRMS (18c, RK26)

13. Anhang

Group AK_Proshak

3-[(3R)-3-[Carbamoyl(hydroxy)amino]but-1-ynyl]-
N-[3-[2-[2-[3-[2-(2,6-dioxo-3-piperidyl)-
1,3-dioxo-isindolin-4-yl]amino]propoxy]ethoxy]
ethoxy]propyl]benzamid (RK19)

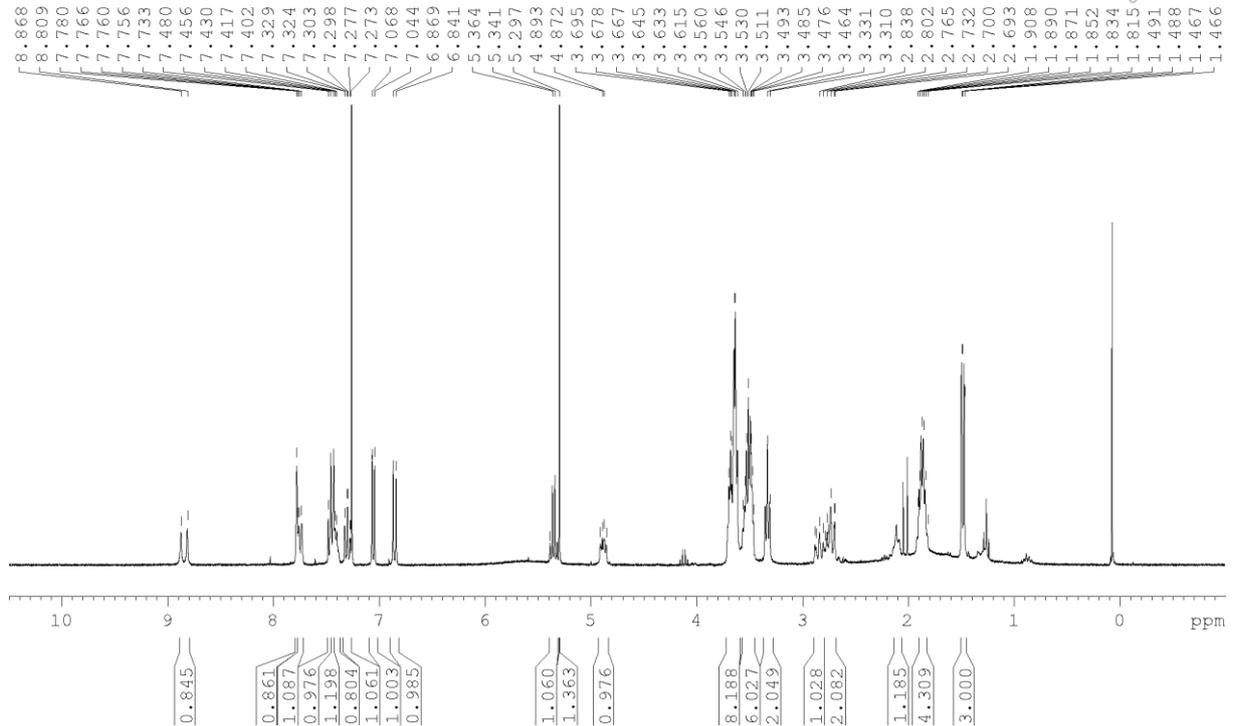
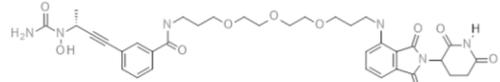
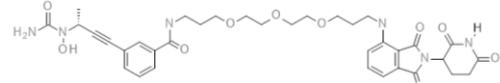


Abbildung 37: ¹H-NMR Verbindung (74, RK19)

Group AK_Proshak

3-[(3R)-3-[Carbamoyl(hydroxy)amino]but-1-ynyl]-
N-[3-[2-[2-[3-[2-(2,6-dioxo-3-piperidyl)-
1,3-dioxo-isindolin-4-yl]amino]propoxy]ethoxy]
ethoxy]propyl]benzamid (RK19)



¹³C{¹H}n CDCl₃ /AV500-2020-06-17-rkpro.33133

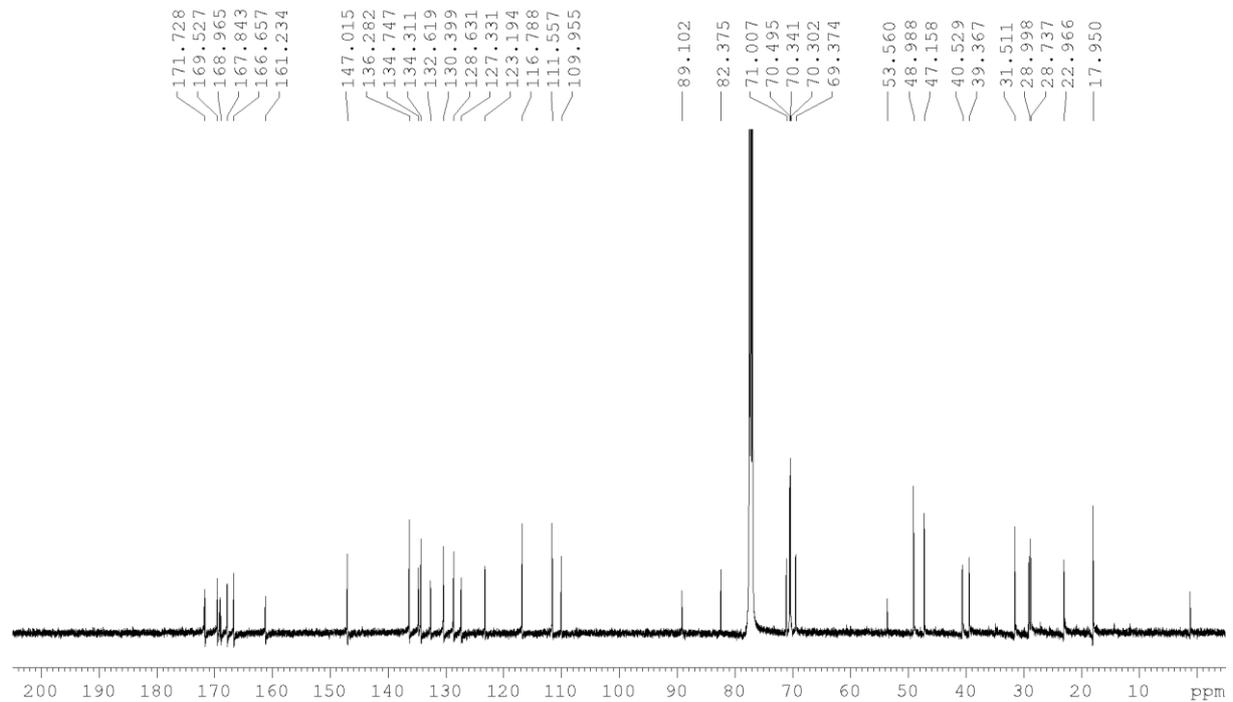


Abbildung 38: ¹³C-NMR Verbindung (74, RK19)

<Chromatogram>

mV

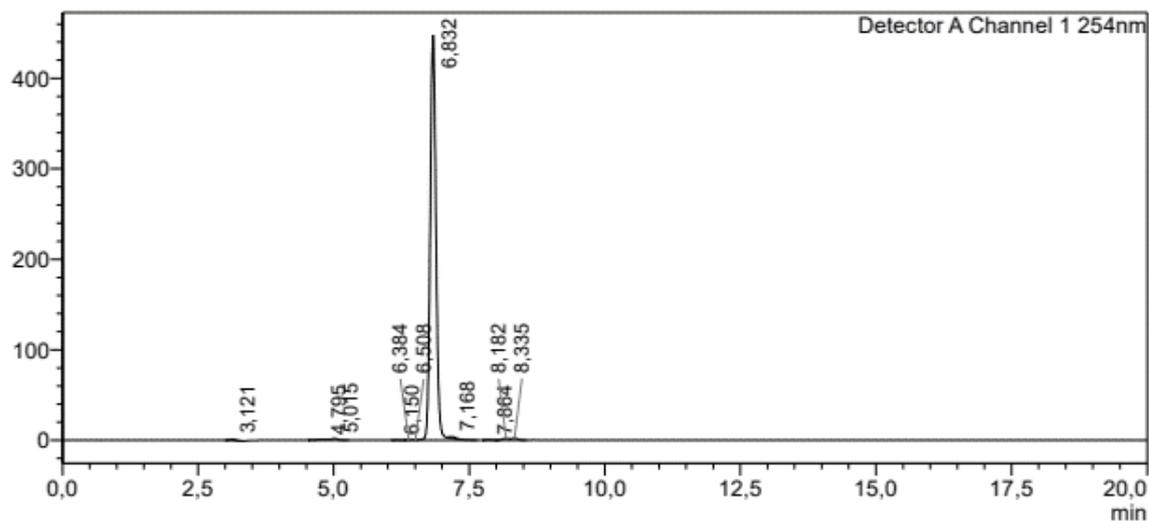


Abbildung 39: HPLC-Lauf (74, RK19)

RK19 C1 #1-9 RT: 0.01-0.47 AV: 9 NL: 2.55E6
T: FTMS + p MALDI Full ms [250.00-800.00]

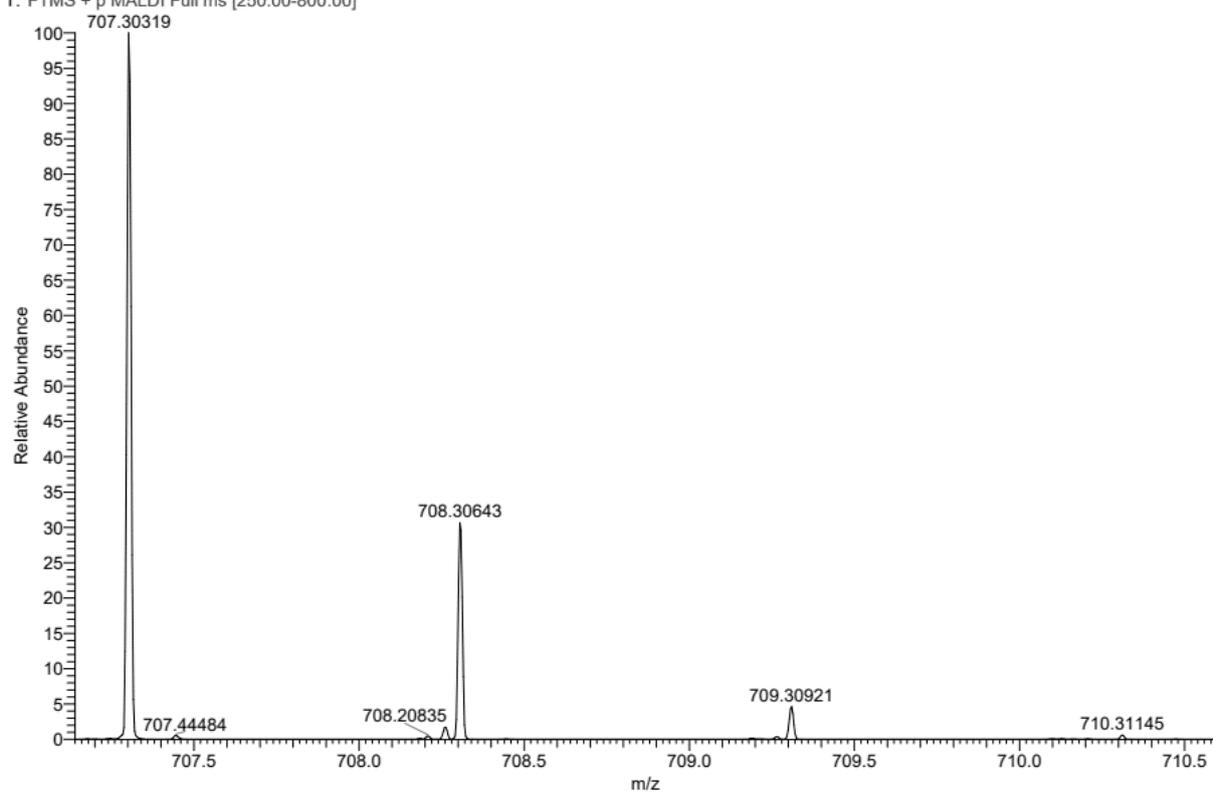


Abbildung 40: HRMS (74, RK19)

13. Anhang

Group AK_Proshak

N-[2-[2-[2-[[2-(2,6-Dioxo-3-piperidyl)-1,3-dioxo-isoindolin-4-yl]amino]ethoxy]ethoxy]ethyl]-4-[3-[4-(2-methylimidazol-1-yl)phenyl]sulfonylphenyl]tetrahydropyran-4-carboxamid (RK83)

¹H DMSO /AV400-2020-09-16-rkpro.37872

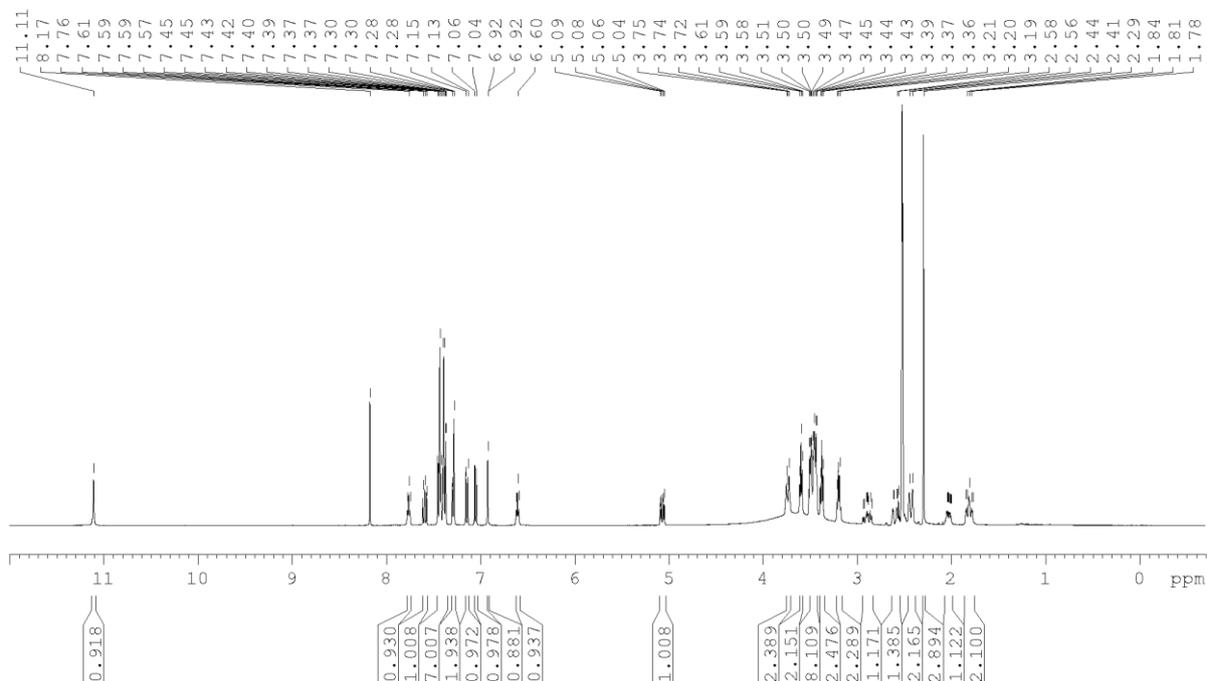
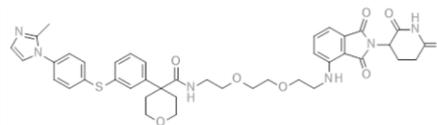


Abbildung 41: ¹H-NMR Verbindung (19b, RK83)

Group AK_Proshak

N-[2-[2-[2-[[2-(2,6-Dioxo-3-piperidyl)-1,3-dioxo-isoindolin-4-yl]amino]ethoxy]ethoxy]ethyl]-4-[3-[4-(2-methylimidazol-1-yl)phenyl]sulfonylphenyl]tetrahydropyran-4-carboxamid (RK83)

COSY_n DMSO /AV400-2020-09-16-rkpro.37872

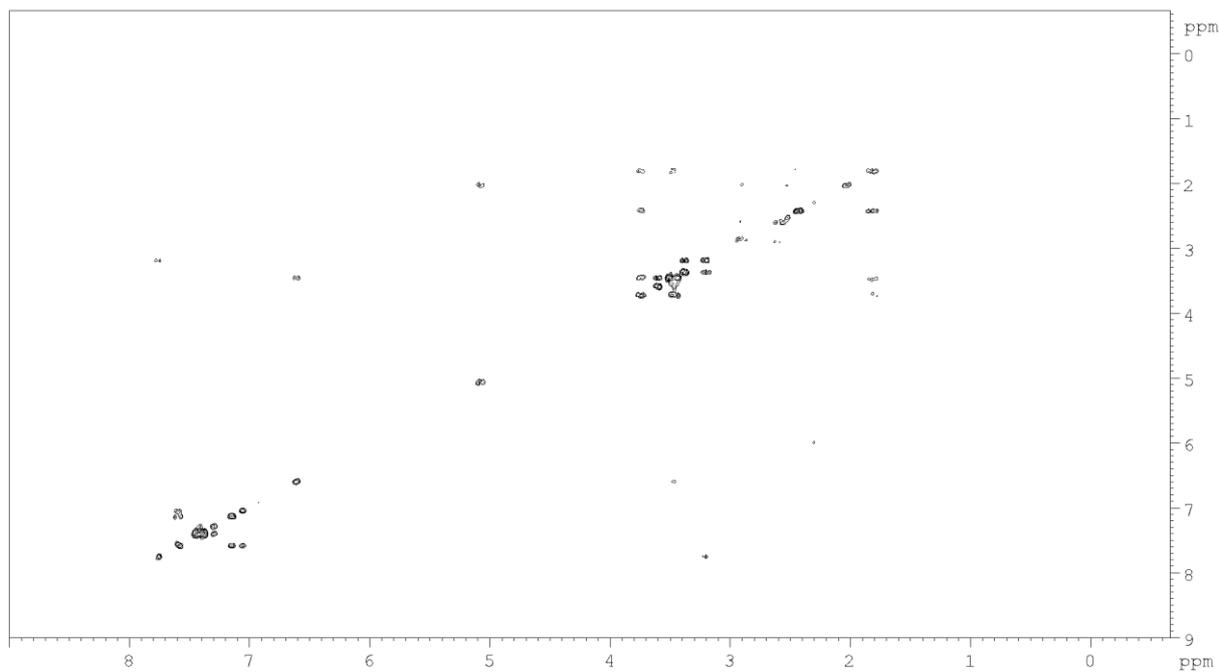
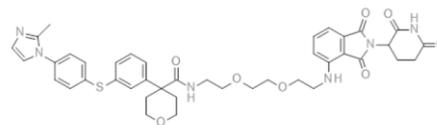


Abbildung 42: ¹H-¹H-COSY Verbindung (19b, RK83)

Group AK_Proshak
 N-[2-[2-[2-[[2-(2,6-Dioxo-3-piperidyl)-1,3-dioxo-
 isoindolin-4-yl]amino]ethoxy]ethoxy]ethyl]-4-
 -[3-[4-(2-methylimidazol-1-yl)phenyl]sulfonylphenyl]
 tetrahydropyran-4-carboxamid (RK83)
 13C{1H}_n DMSO /AV400-2020-09-16-rkpro.37872

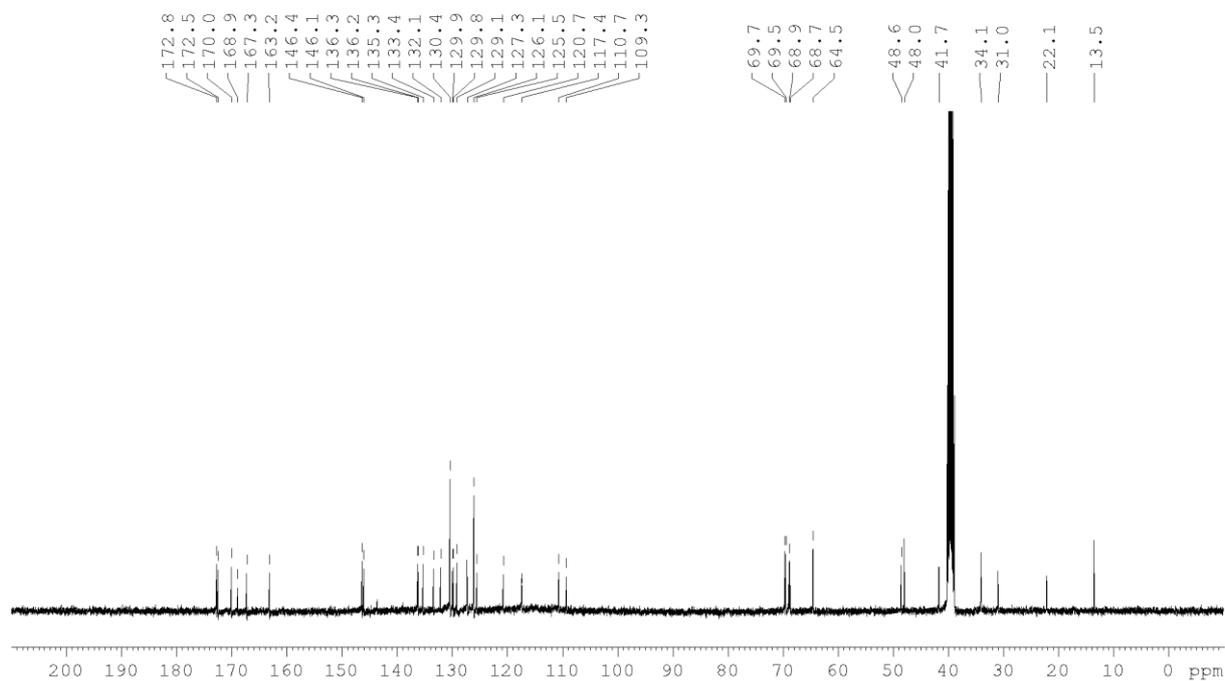
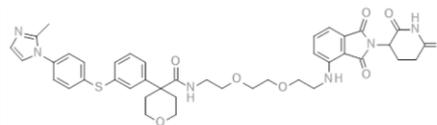


Abbildung 43: ¹³C-NMR Verbindung (19b, RK83)

<Chromatogram>

mV

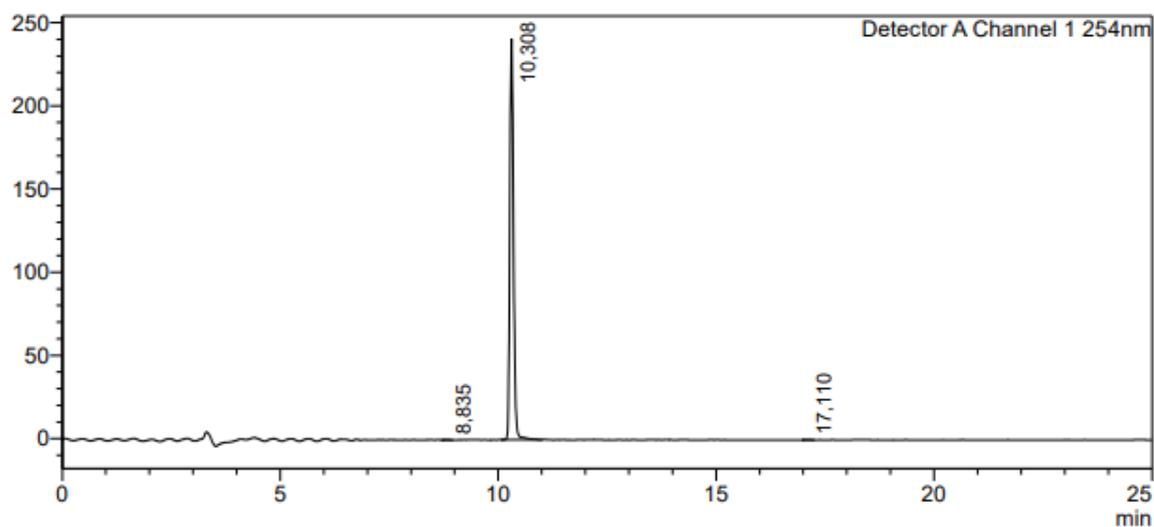


Abbildung 44: HPLC-Lauf (19b, RK83)

RK83_F7 #1-8 RT: 0.01-0.32 AV: 8 NL: 1.82E7
T: FTMS + p MALDI Full ms [700.00-1150.00]

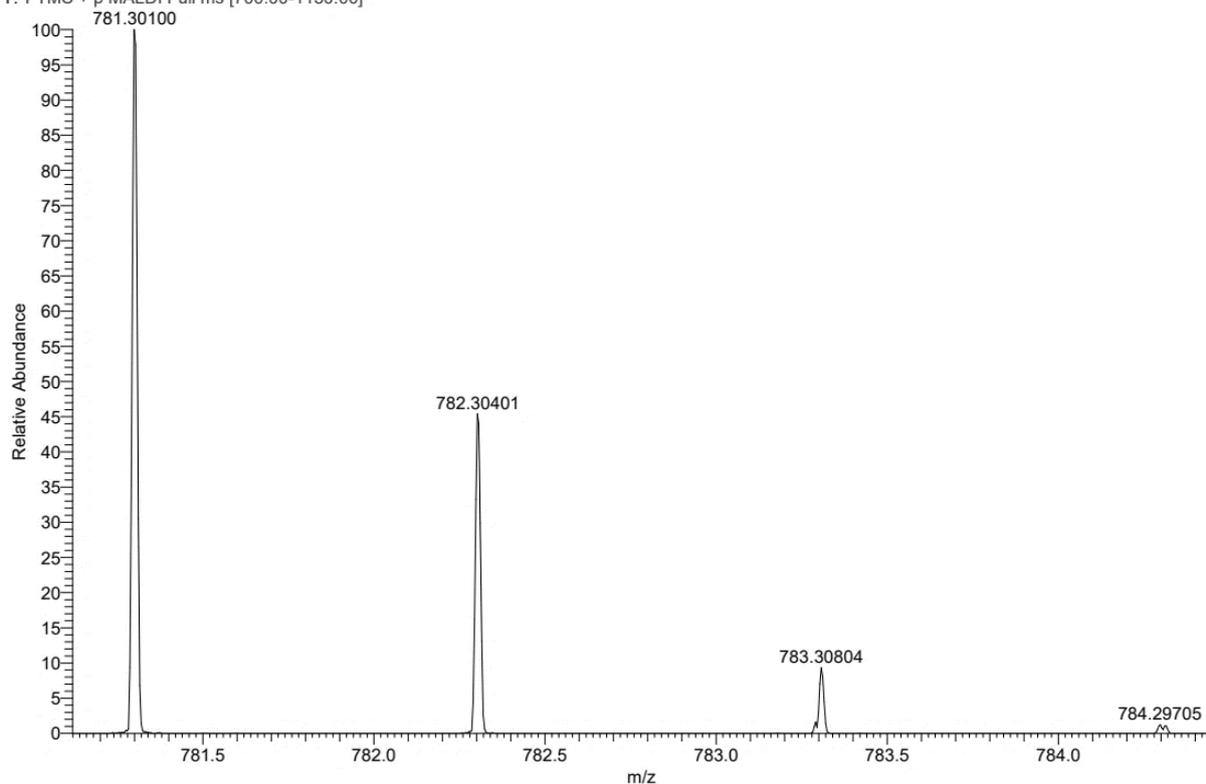


Abbildung 45: HRMS (19b, RK83)

Group AK_Proshak
N-[2-[2-[2-[2-[[2-(2,6-Dioxo-3-piperidyl)-1,3-dioxo-isoindolin-4-yl]amin]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethyl]-4-[3-[4-(2-methylimidazol-1-yl)phenyl]sulfanylphenyl]tetrahydropyran-4-carboxamid (RK90)
1H DMSO /AV400-2020-09-25-rkpro.38033

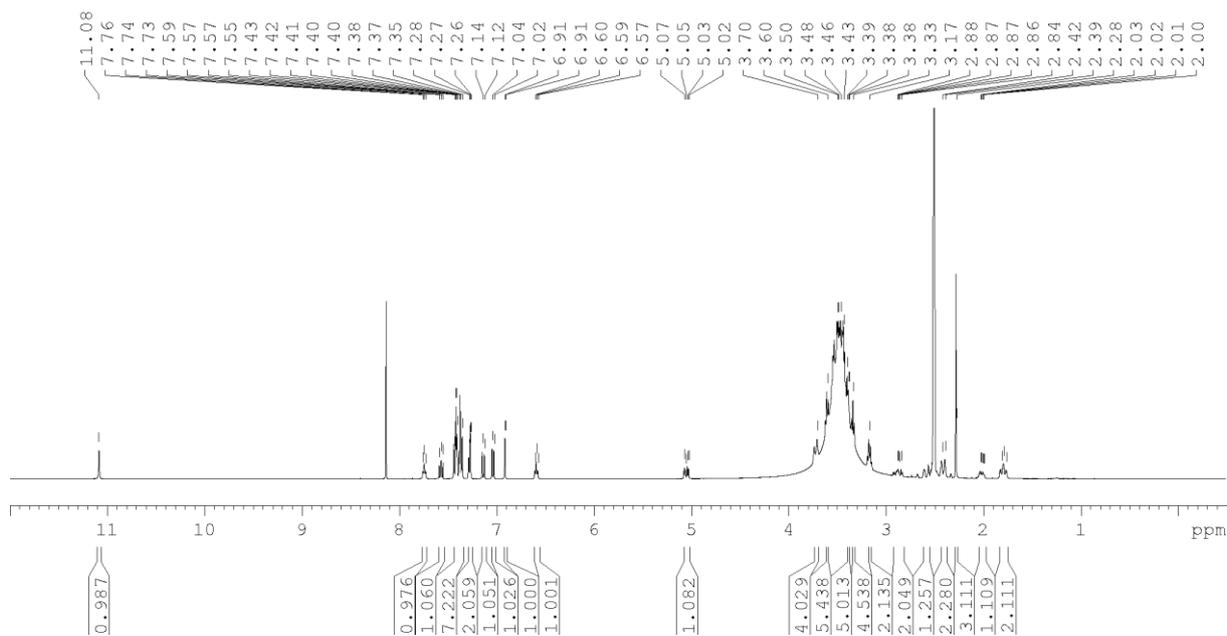
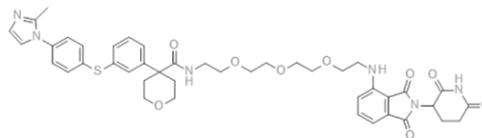
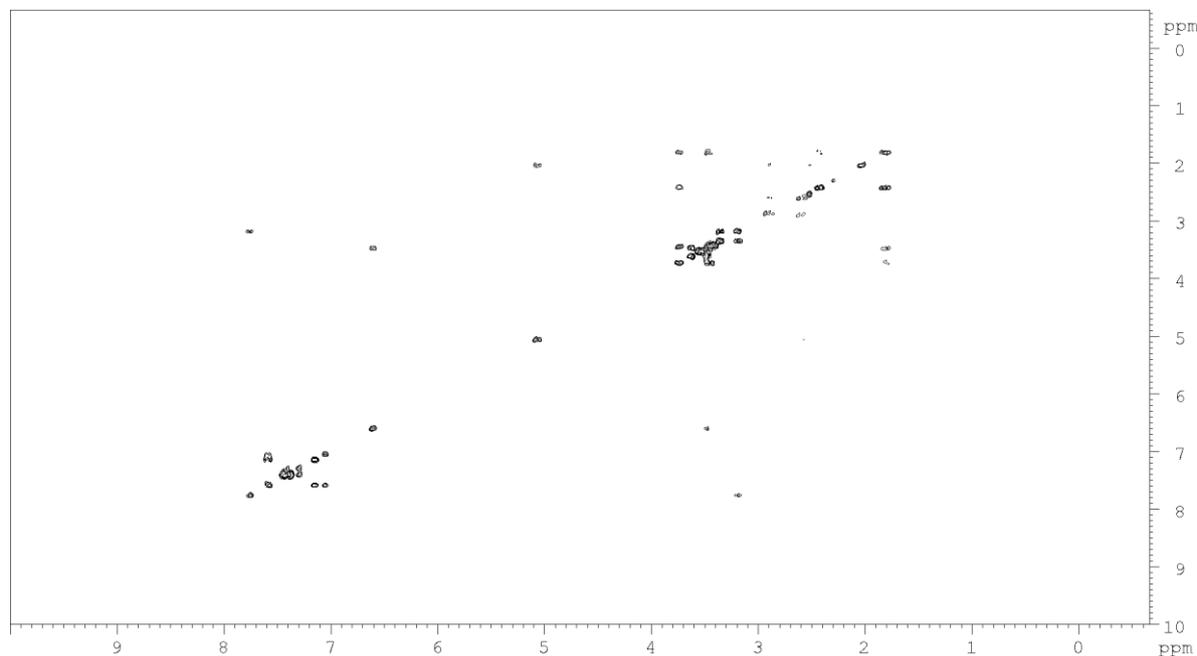
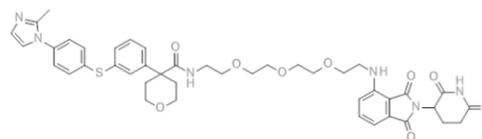


Abbildung 46: ¹H-NMR Verbindung (19c, RK90)

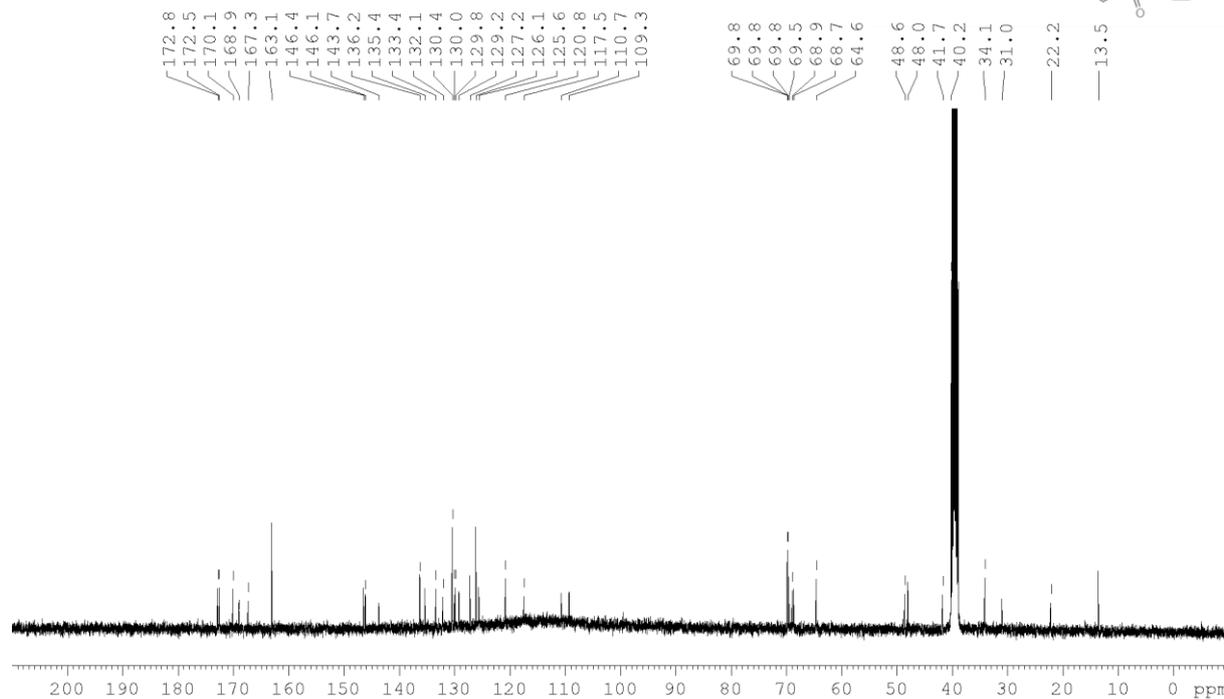
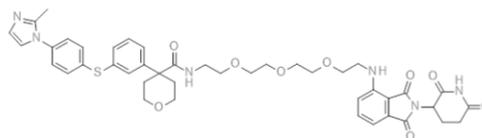
Group AK_Proschak

N-[2-[2-[2-[2-[2-(2,6-dioxo-3-piperidyl)-1,3-dioxo-isoindolin-4-yl]amin]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethyl]-4-[3-[4-(2-methylimidazol-1-yl)phenyl]sulfonylphenyl]tetrahydropyran-4-carboxamid (RK90)

Abbildung 47: ^1H - ^1H -COSY Verbindung (19c, RK90)

Group AK_Proschak

N-[2-[2-[2-[2-[2-(2,6-dioxo-3-piperidyl)-1,3-dioxo-isoindolin-4-yl]amin]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethyl]-4-[3-[4-(2-methylimidazol-1-yl)phenyl]sulfonylphenyl]tetrahydropyran-4-carboxamid

Abbildung 48: ^{13}C -NMR Verbindung (19c, RK90)

<Chromatogram>

mV

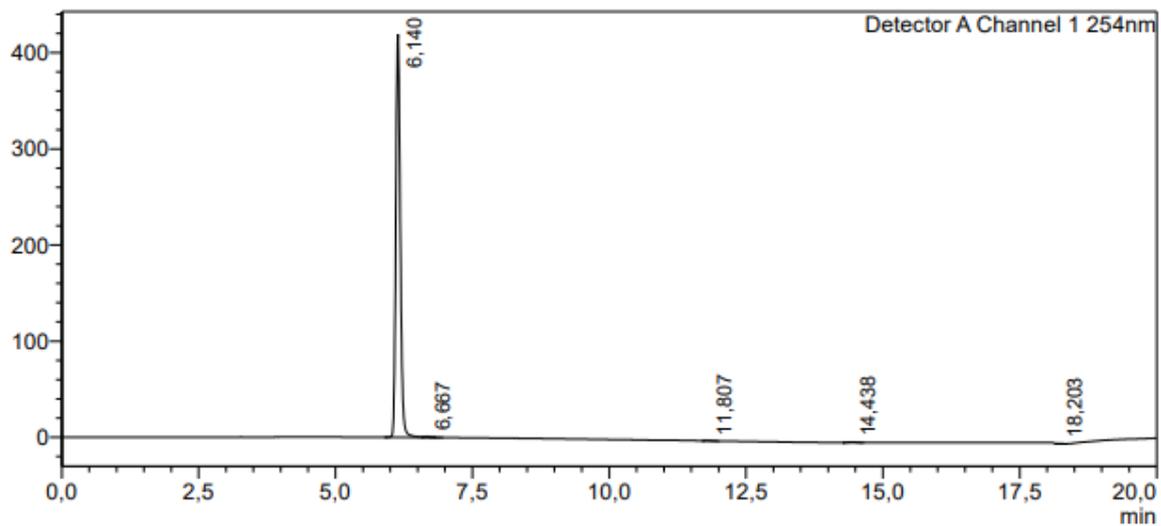


Abbildung 49: HPLC-Lauf (19c, RK90)

RK90_C9 #1-10 RT: 0.01-0.57 AV: 10 NL: 9.64E6
T: FTMS + p MALDI Full ms [700.00-1050.00]

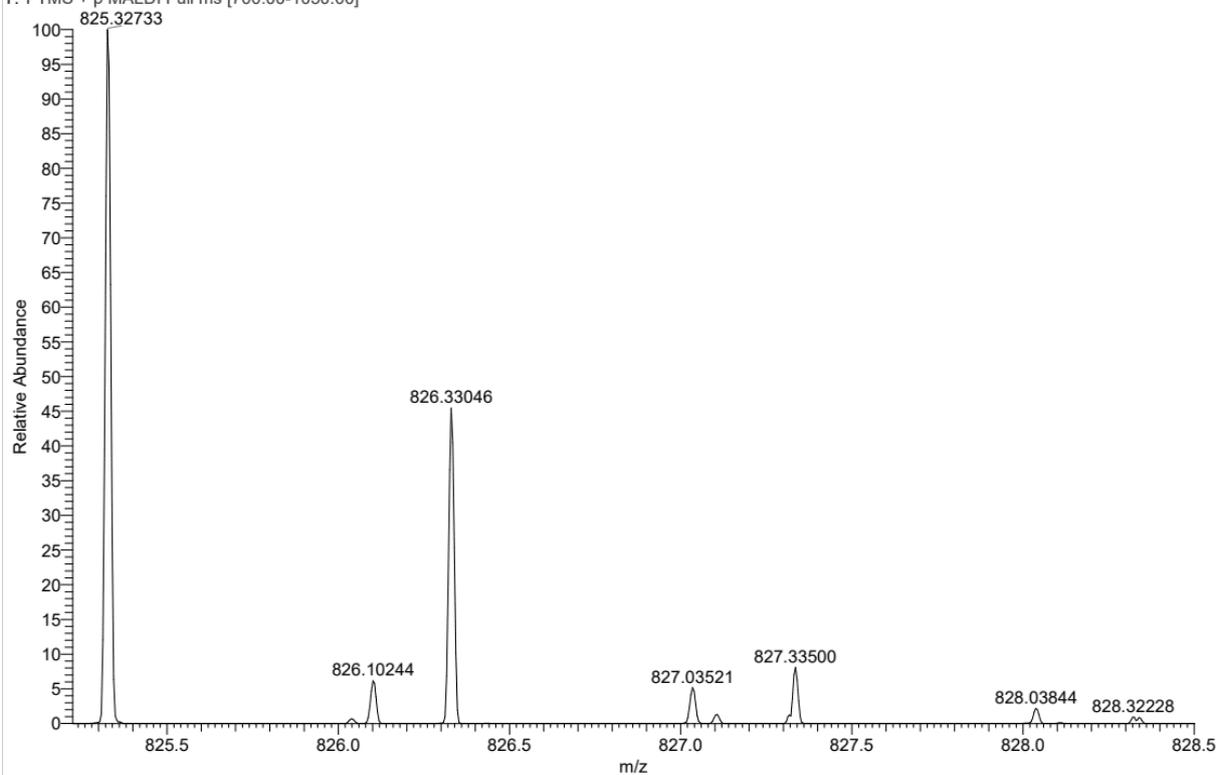
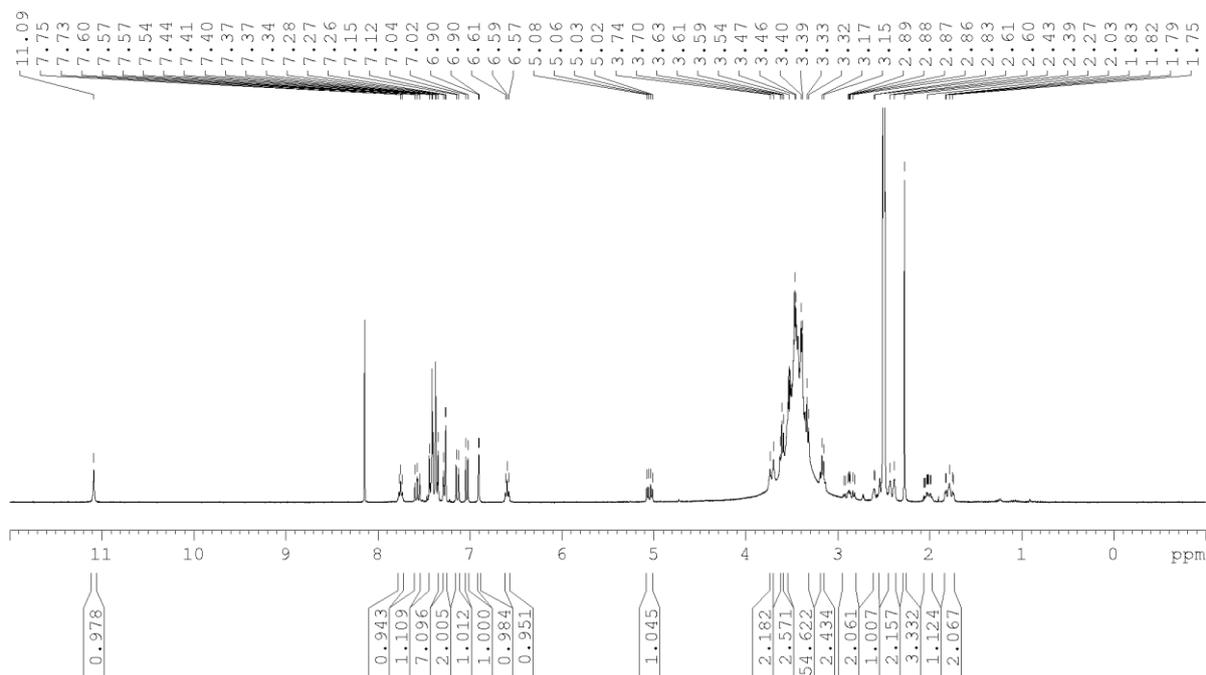
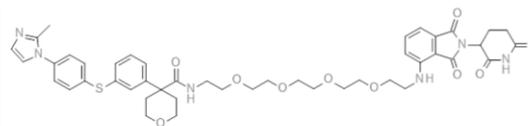


Abbildung 50: HRMS (19c, RK90)

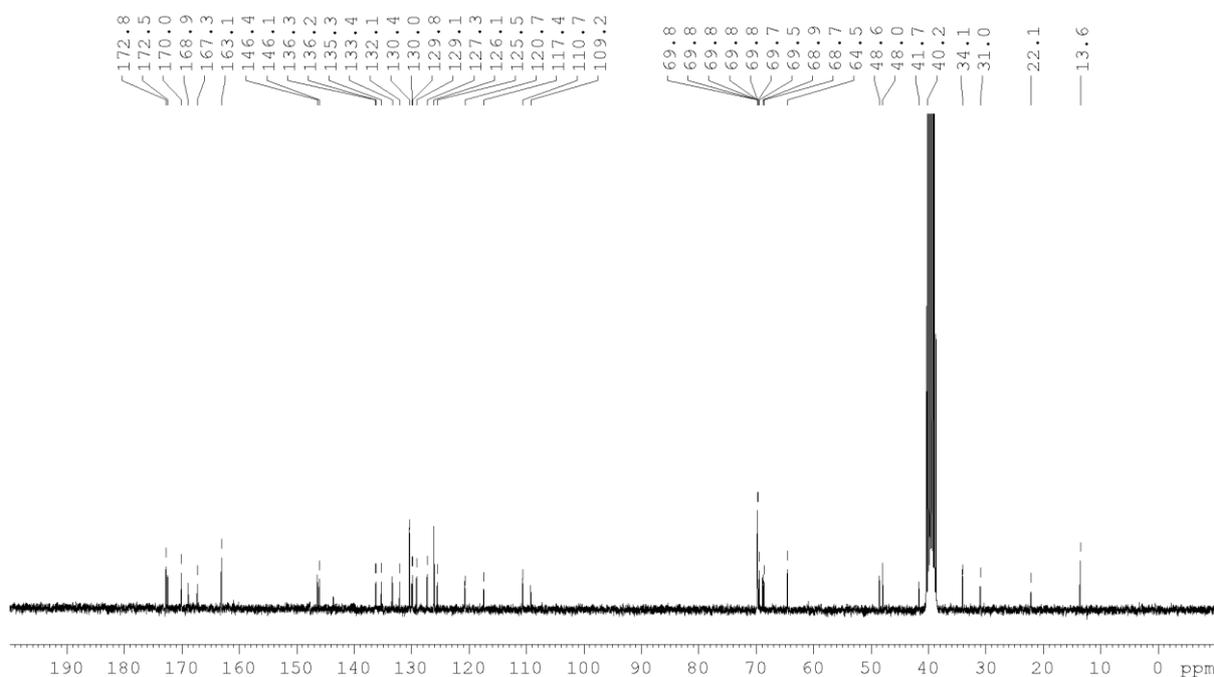
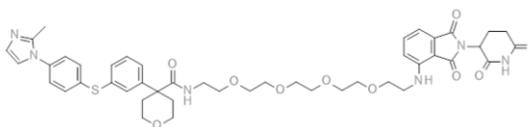
Group AK_Proshak

N-[2-[2-[2-[2-[3-[[2-(2,6-Dioxo-3-piperidyl)-1,3-dioxo-isindolin-4-yl]amin]propoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethyl]-4-[3-[4-(2-methylimidazol-1-yl)phenyl]sulfanylphenyl]tetrahydropyran-4-carboxamid (RK100)
 1H DMSO /AV300-2020-10-19-rkpro.37701

Abbildung 51: ¹H-NMR Verbindung (19d, RK100)

Group AK_Proshak

N-[2-[2-[2-[2-[3-[[2-(2,6-Dioxo-3-piperidyl)-1,3-dioxo-isindolin-4-yl]amin]propoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethyl]-4-[3-[4-(2-methylimidazol-1-yl)phenyl]sulfanylphenyl]tetrahydropyran-4-carboxamid (RK100)
 13C{1H}n DMSO /AV300-2020-10-09-rkpro.37701

Abbildung 52: ¹³C-NMR Verbindung (19d, RK100)

<Chromatogram>

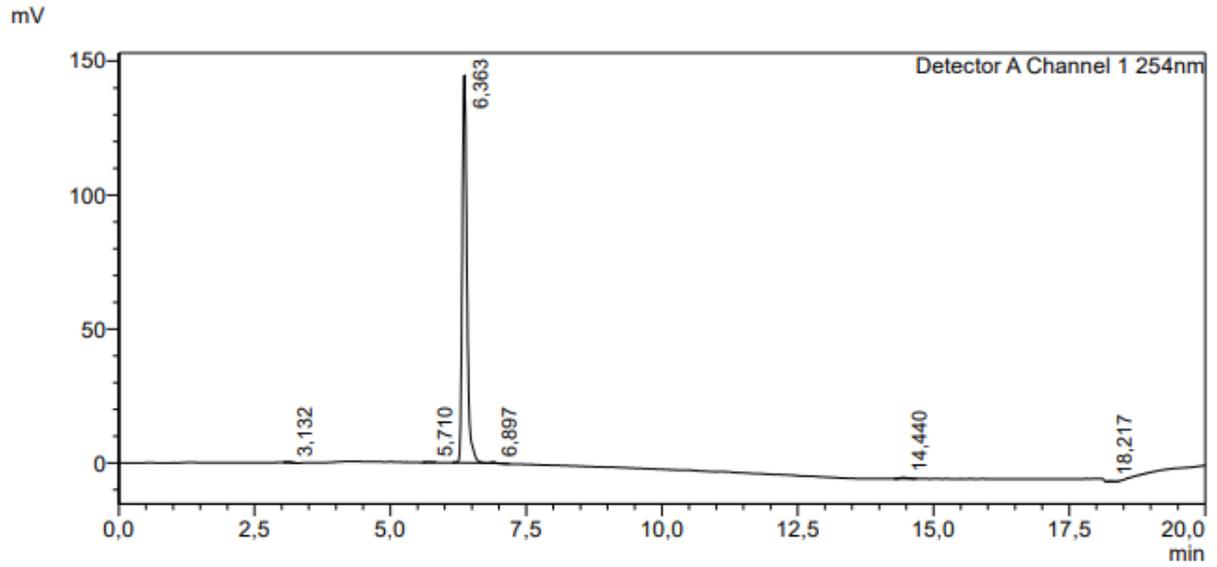


Abbildung 53: HPLC-Lauf (19d, RK100)

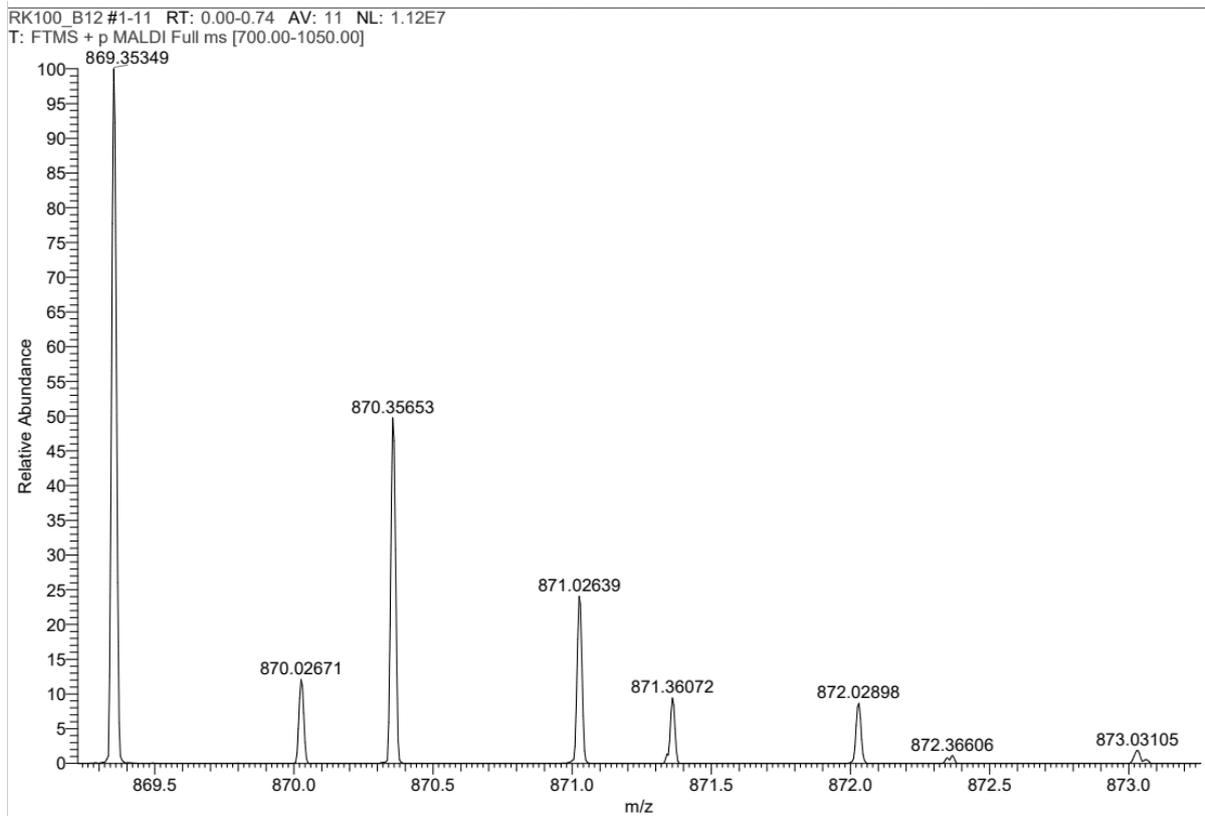


Abbildung 54: HRMS (10d, RK100)

Group AK_Proshak
 (2S,4R)-1-[(2S)-2-[3-[2-[[3-[(3R)-3-[carbamoyl(hydroxy)amin]but-1-ynyl]benzoyl]amin]ethoxy]propanoylamin]-3,3-dimethylbutanoyl]-4-hydroxy-N-[4-(4-methylthiazol-5-yl)benzyl]pyrrolidin-2-carboxamid (RK65)
 1H DMSO /AV400-2020-08-25-rkpro.37508

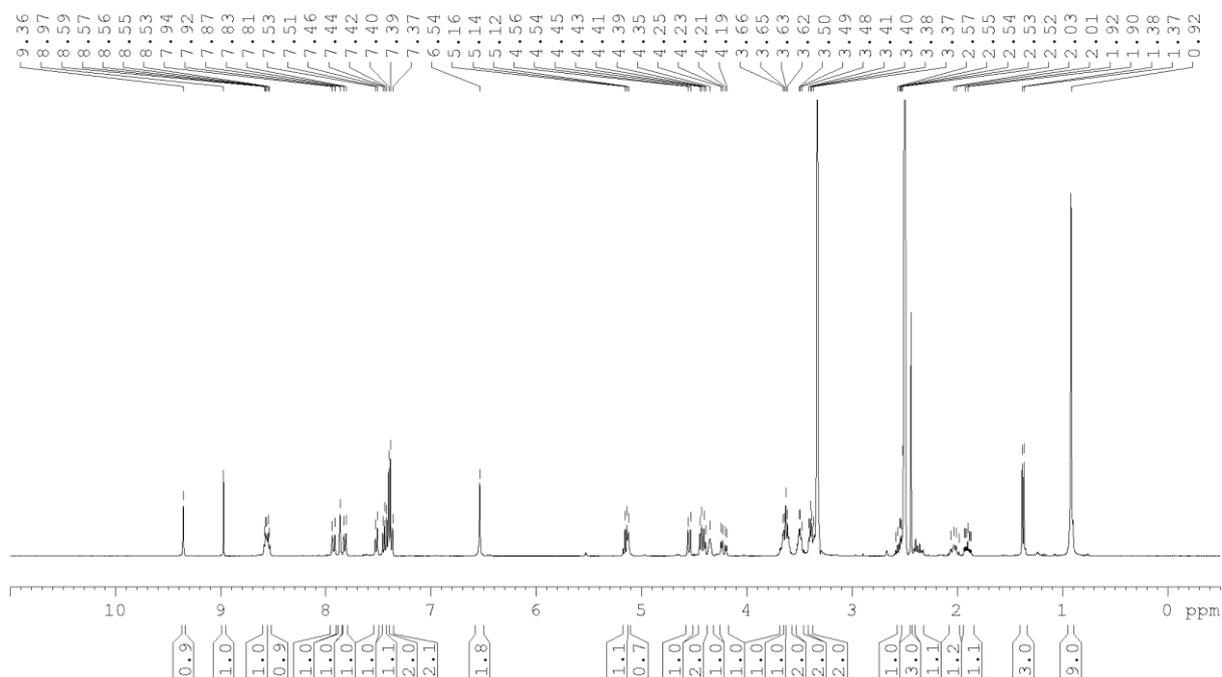
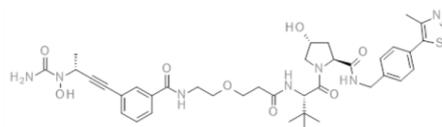


Abbildung 55: ¹H-NMR Verbindung (20a, RK65)

Group AK_Proshak
 (2S,4R)-4-Hydroxy-1-((S)-2-(3-(2-(3-((R)-3-(1-hydroxyureido)but-1-yn-1-yl)benzamid)ethoxy)propanamid)-3,3-dimethylbutanoyl)-N-(4-(4-methylthiazol-5-yl)benzyl)pyrrolidine-2-carboxamid (RK66)

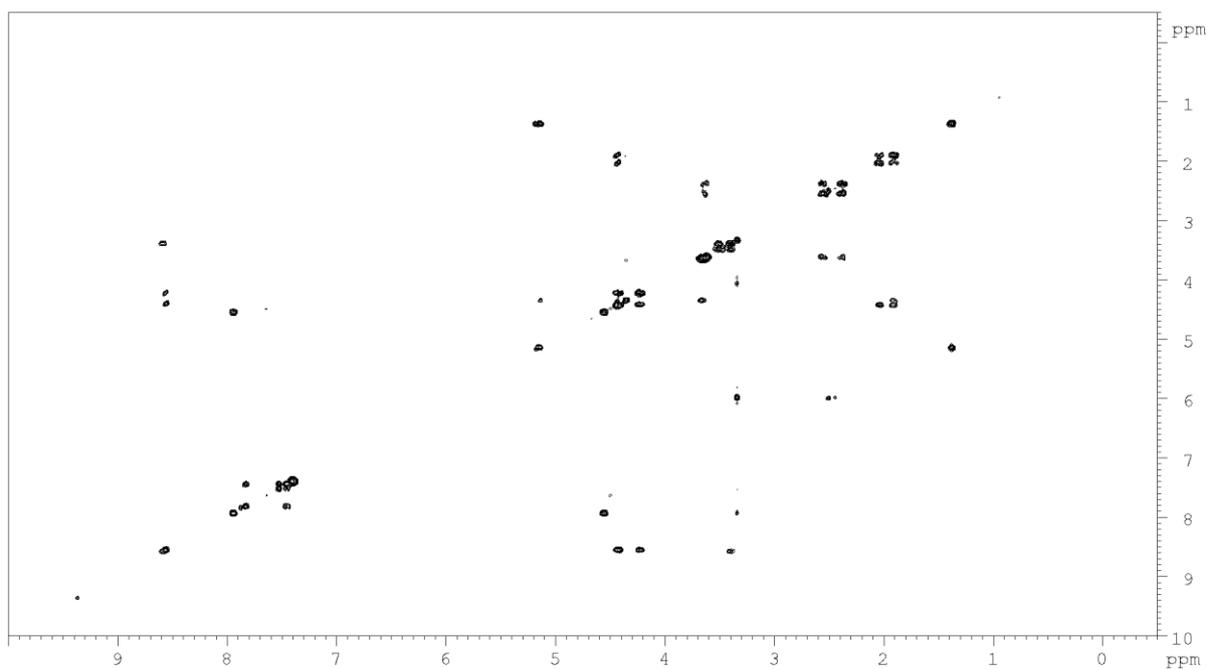
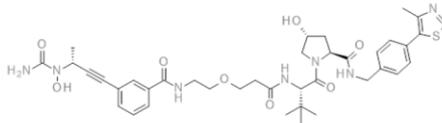


Abbildung 56: ¹¹H-¹H-COSY Verbindung (20a, RK65)

13. Anhang

Group AK_Proshak
 (2S,4R)-1-[(2S)-2-[3-[2-[[3-[(3R)-3-[carbamoyl(hydroxy)amin]but-1-ynyl]benzoyl]amino]ethoxy]propanoylamin]-3,3-dimethyl-butanoyl]-4-hydroxy-N-[4-(4-methylthiazol-5-yl)benzyl]pyrrolidin-2-carboxamid (RK65)
 13C{1H}n DMSO /AV500-2020-08-25-rkpro.33868

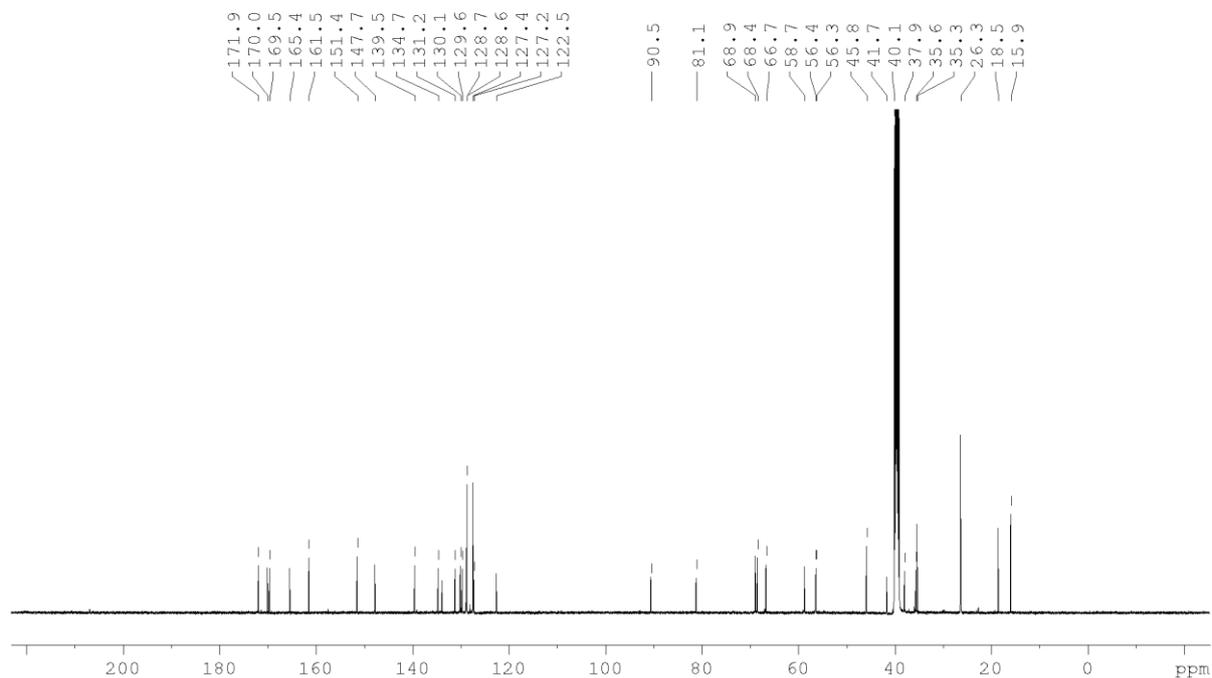
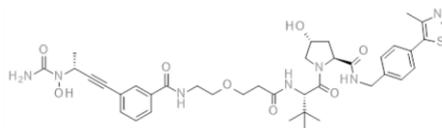


Abbildung 57: ¹³C-NMR Verbindung (20a, RK65)

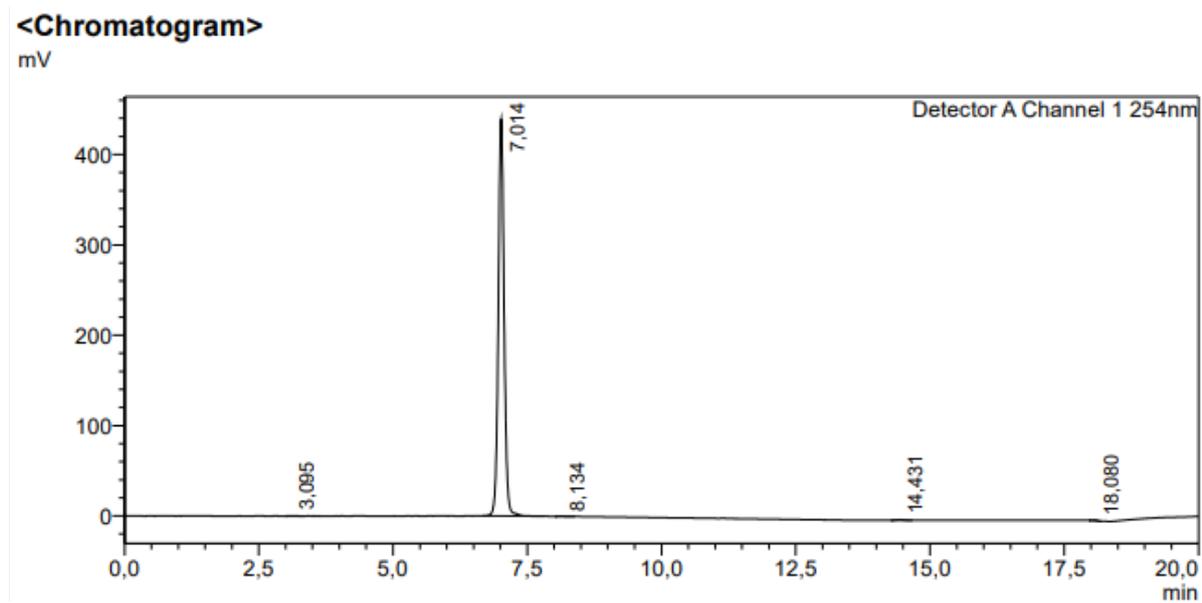


Abbildung 58: HPLC-Lauf (20a, RK65)

RK66 HP1V, C8 #1-20 RT: 0.00-0.85 AV: 20 NL: 1.39E7
T: FTMS + p MALDI Full ms [500.00-1000.00]

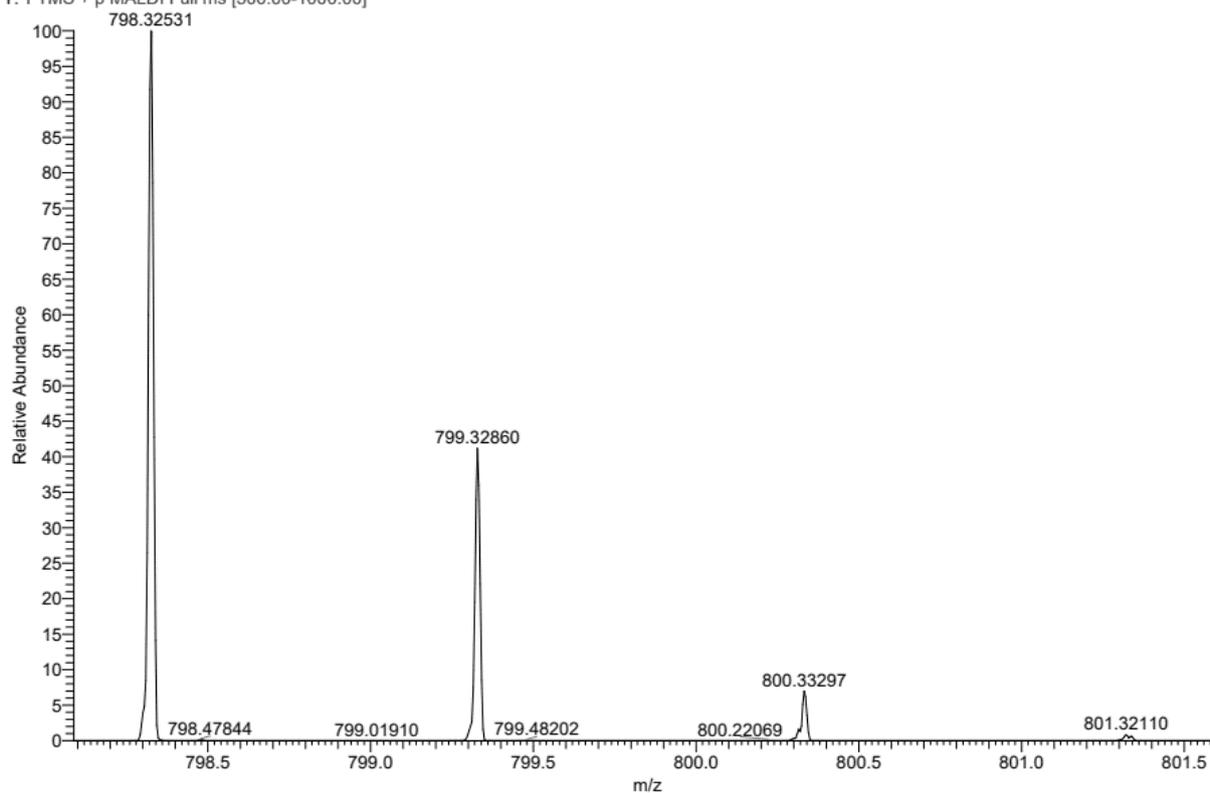


Abbildung 59: HRMS (20a, RK65)

Group AK_Proschak
(2S,4R)-1-[(2S)-2-[3-[2-[[3-[(3R)-3-[carbamoyl(hydroxy)amin]but-1-ynyl]benzamid]ethoxy]ethoxy]propanoylamino]-3,3-dimethylbutanoyl]-4-hydroxy-N-[4-(4-methylthiazol-5-yl)benzyl]pyrrolidin-2-carboxamid (RK91)
1H DMSO /AV400-2020-09-30-rkpro.38108

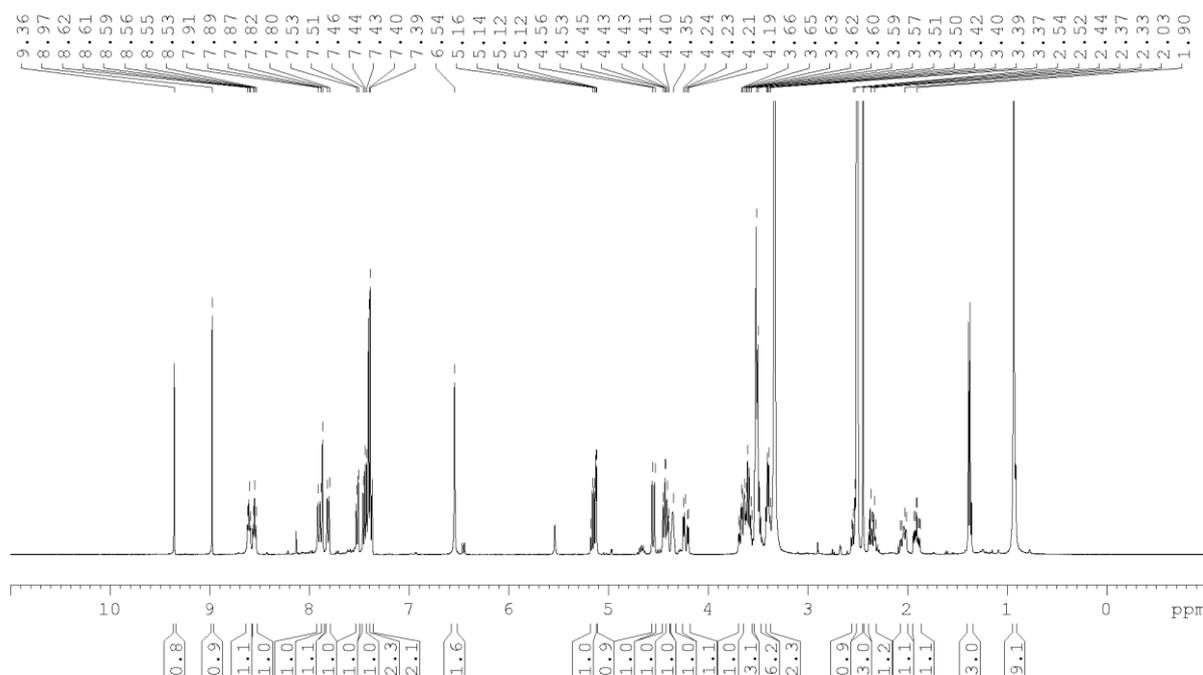
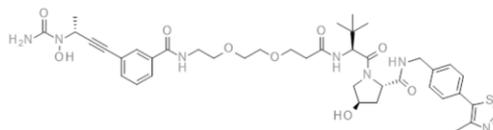


Abbildung 60: ¹H-NMR Verbindung (20b, RK91)

13. Anhang

Group AK_Proschak
 (2S,4R)-1-[(2S)-2-[3-[2-[3-[[(3R)-3-[carbamoyl(hydroxy)amin]but-1-ynyl]benzamid]ethoxy]ethoxy]propanoylamin]-3,3-dimethyl-butanoyl]-4-hydroxy-N-[4-(4-methylthiazol-5-yl)benzyl]pyrrolidin-2-carboxamid (RK91)
 COSY DMSO /AV400-2020-09-30-rkpro.38108

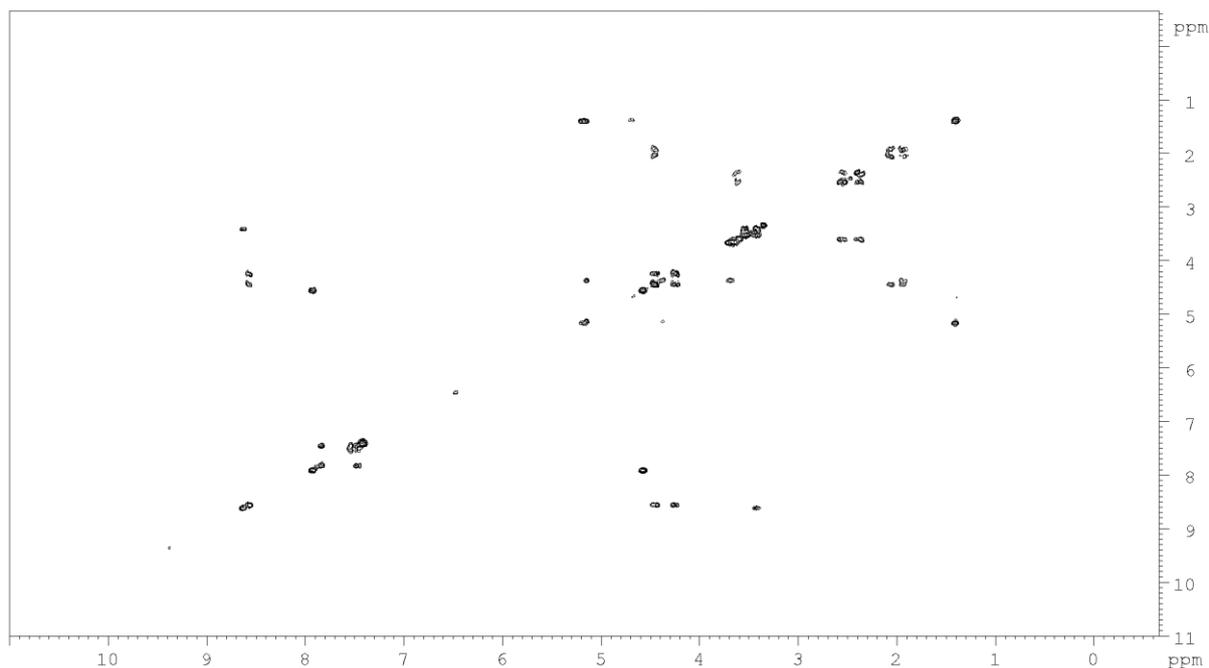
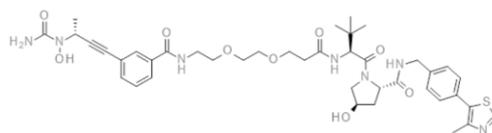


Abbildung 61: ^1H - ^1H -COSY Verbindung (20b, RK91)

Group AK_Proschak
 (2S,4R)-1-[(2S)-2-[3-[2-[3-[[(3R)-3-[carbamoyl(hydroxy)amin]but-1-ynyl]benzamid]ethoxy]ethoxy]propanoylamin]-3,3-dimethyl-butanoyl]-4-hydroxy-N-[4-(4-methylthiazol-5-yl)benzyl]pyrrolidin-2-carboxamid (RK91)
 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}_n$ DMSO /AV400-2020-09-30-rkpro.38108

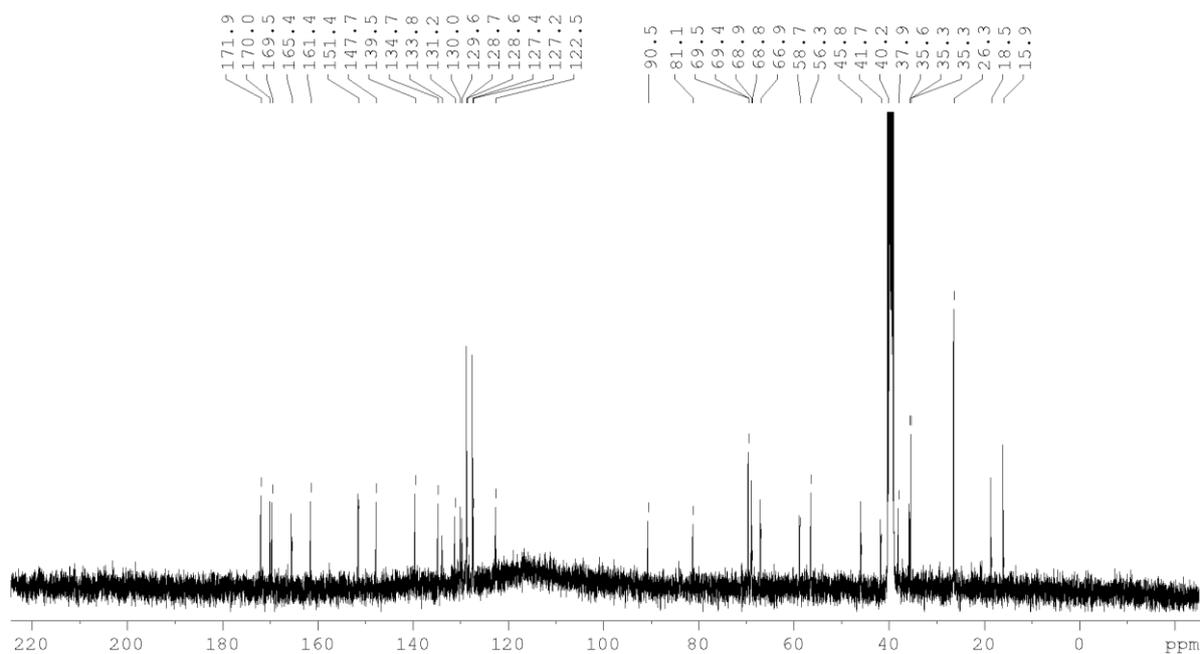
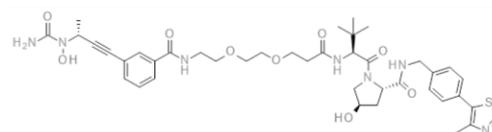


Abbildung 62: ^{13}C -NMR Verbindung (20b, RK91)

<Chromatogram>

mV

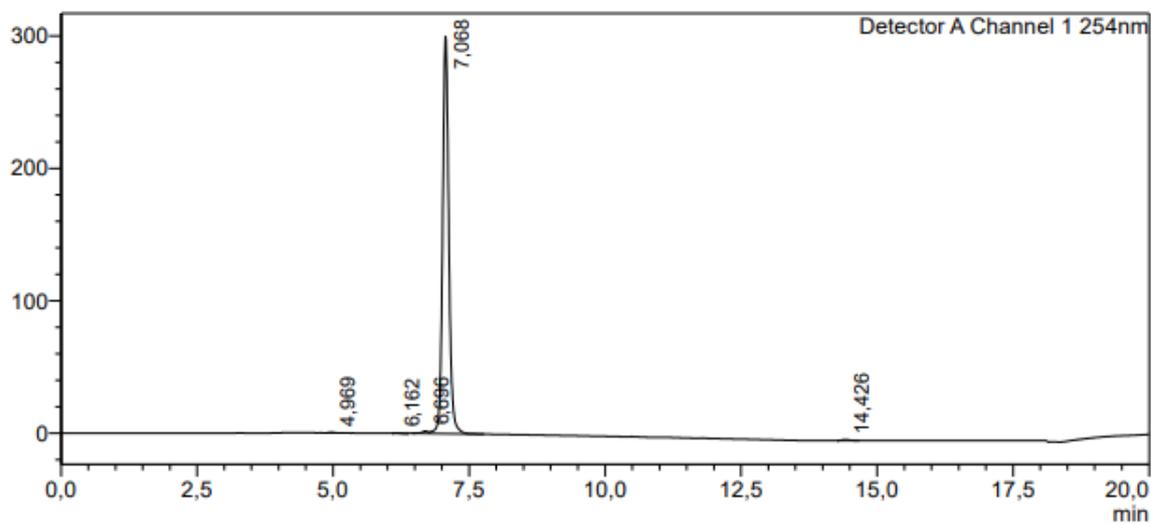


Abbildung 63: HPLC-Lauf (20b, RK91)

RK 91_D10 #1-14 RT: 0.01-1.06 AV: 14 NL: 9.79E6
T: FTMS + p MALDI Full ms [700.00-950.00]

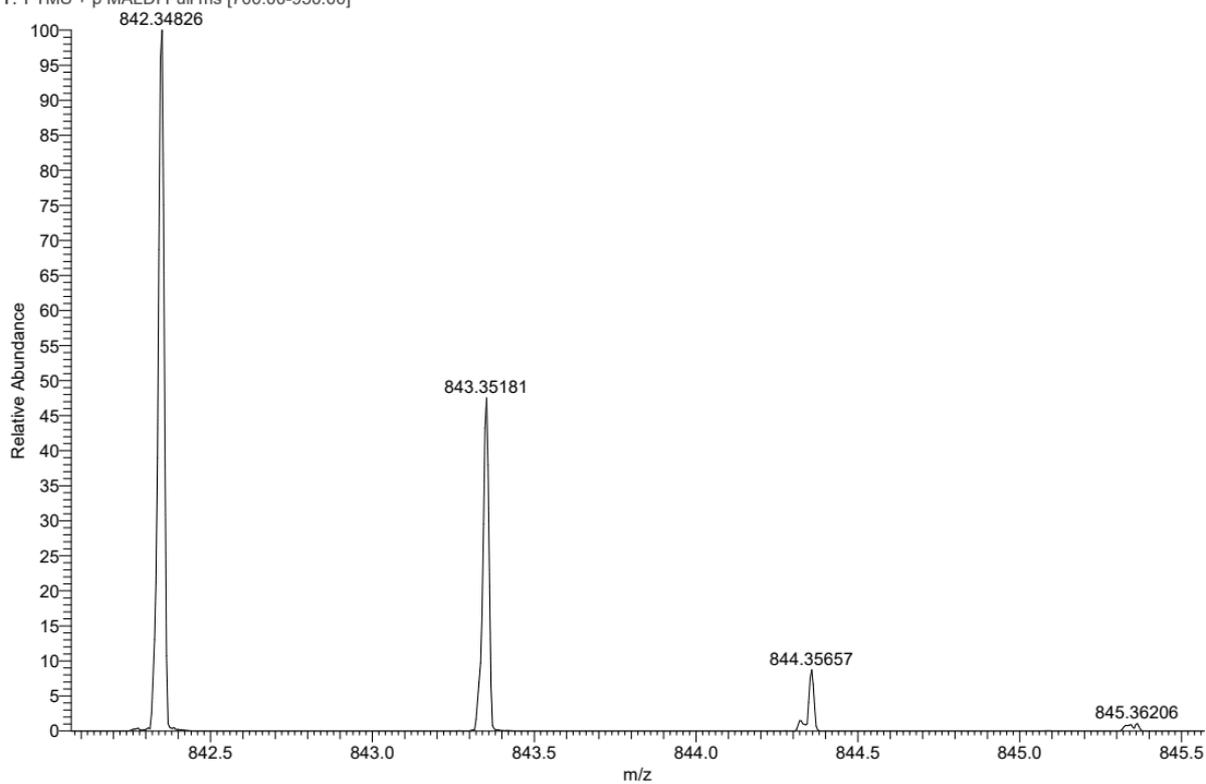


Abbildung 64: HRMS (20b, RK91)

13. Anhang

Group AK_Proσχak
 (2S,4R)-1-[(2S)-2-[3-[2-[2-[[3-[(3R)-3-[carbamoyl
 (hydroxy)amin]but-1-ynyl]benzamid]ethoxy]ethoxy]
 ethoxy]propanoylamin]-3,3-dimethyl-butanoyl]-4-
 hydroxy-N-[[4-(4-methylthiazol-5-yl)benzyl]pyrrolidin-
 2-carboxamid (RK85)
 1H DMSO /AV400-2020-09-22-rkpro.37965

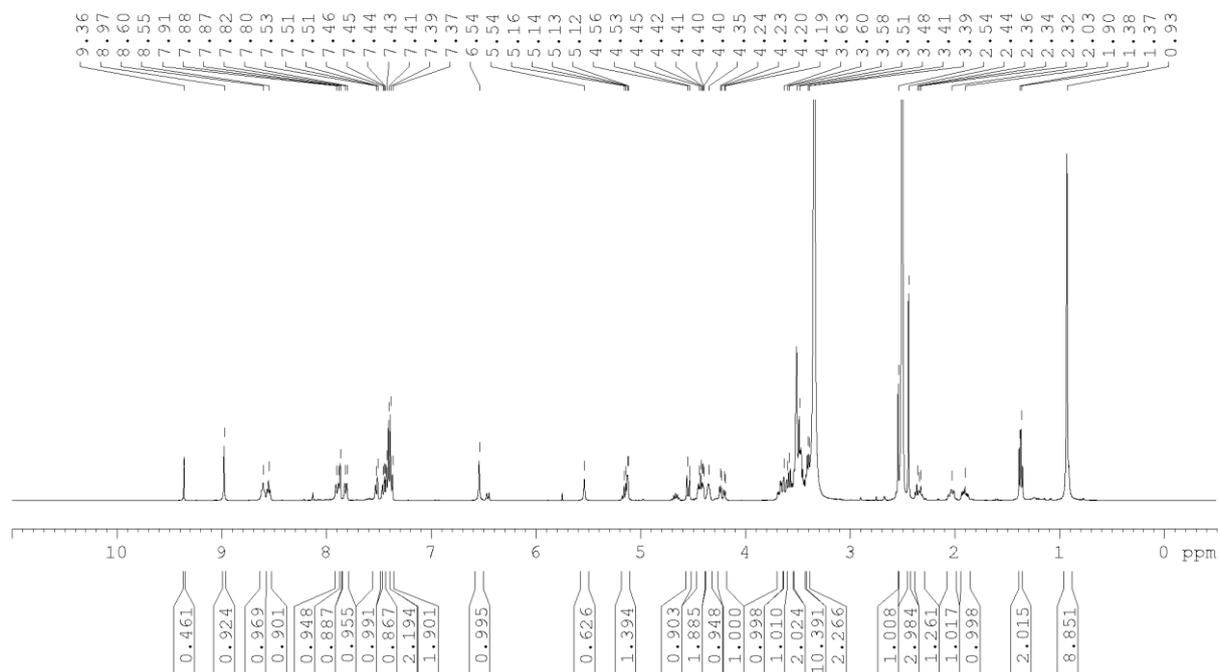
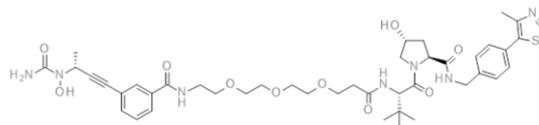


Abbildung 65: ¹H-NMR Verbindung (20c, RK85)

Group AK_Proσχak
 (2S,4R)-1-[(2S)-2-[3-[2-[2-[[3-[(3R)-3-[carbamoyl
 (hydroxy)amin]but-1-ynyl]benzamid]ethoxy]ethoxy]
 ethoxy]propanoylamin]-3,3-dimethyl-butanoyl]-4-
 hydroxy-N-[[4-(4-methylthiazol-5-yl)benzyl]pyrrolidin-
 2-carboxamid (RK85)
 COSY_n DMSO /AV400-2020-09-22-rkpro.37965

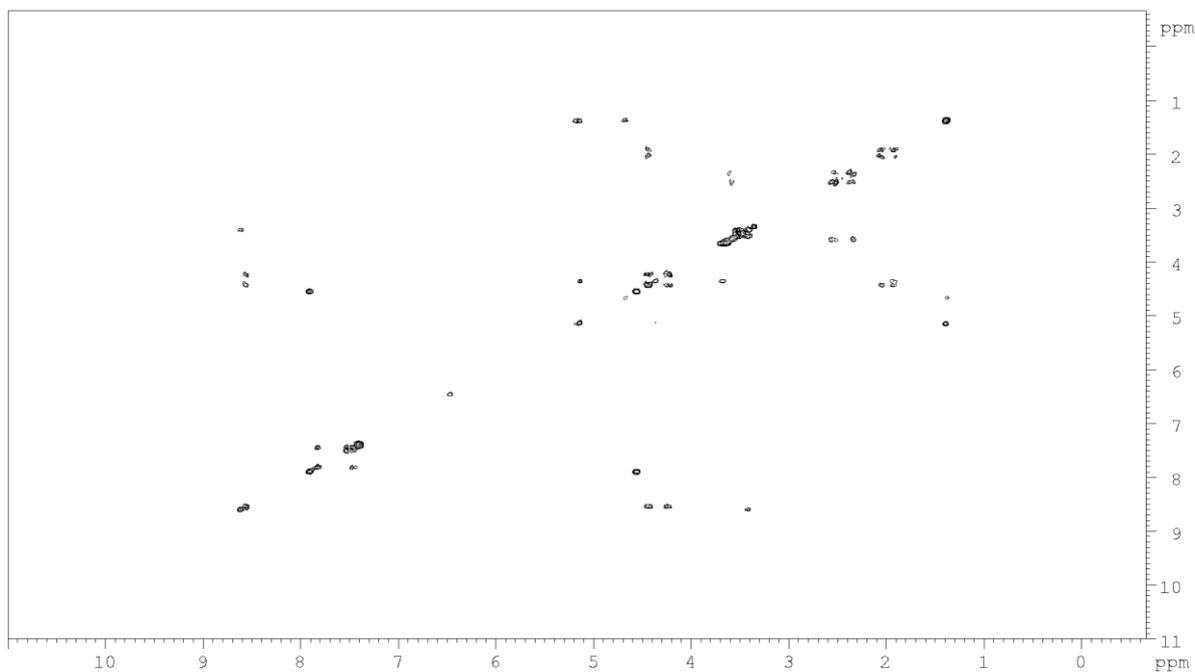
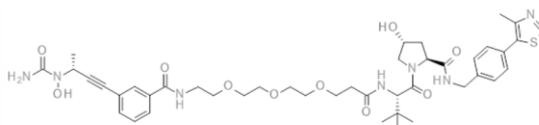


Abbildung 66: ¹H-¹H-COSY Verbindung (20c, RK85)

Group AK_Proshak
 (2S,4R)-1-[(2S)-2-[3-[2-[2-[[3-[(3R)-3-[carbamoyl
 (hydroxy)amin]but-1-ynyl]benzamid]ethoxy]ethoxy]
 ethoxy]propanoylamin]-3,3-dimethyl-butanyl]-4-
 hydroxy-N-[[4-(4-methylthiazol-5-yl)benzyl]pyrrolidin-
 2-carboxamid (RK85)
 13C{1H}_n DMSO /AV400-2020-09-22-rkpro.37965

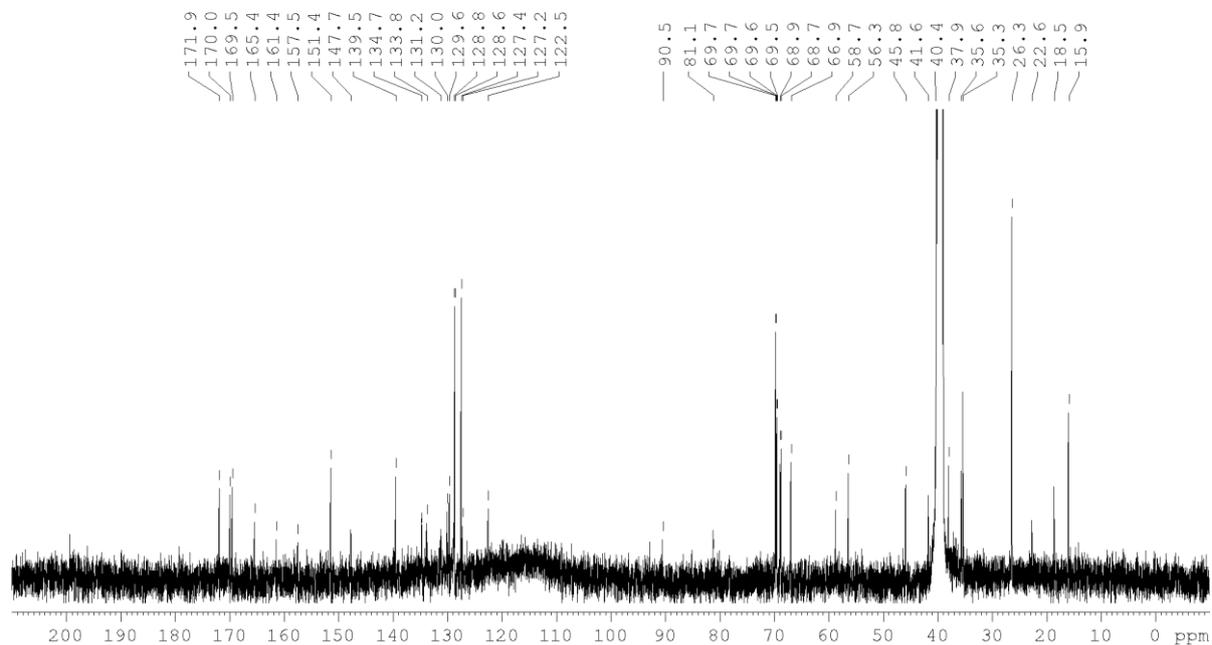
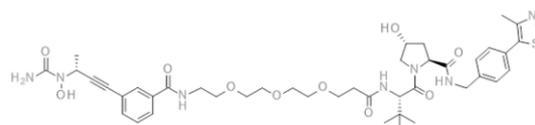


Abbildung 67: ¹³C-NMR Verbindung (20c, RK85)

<Chromatogram>

mV

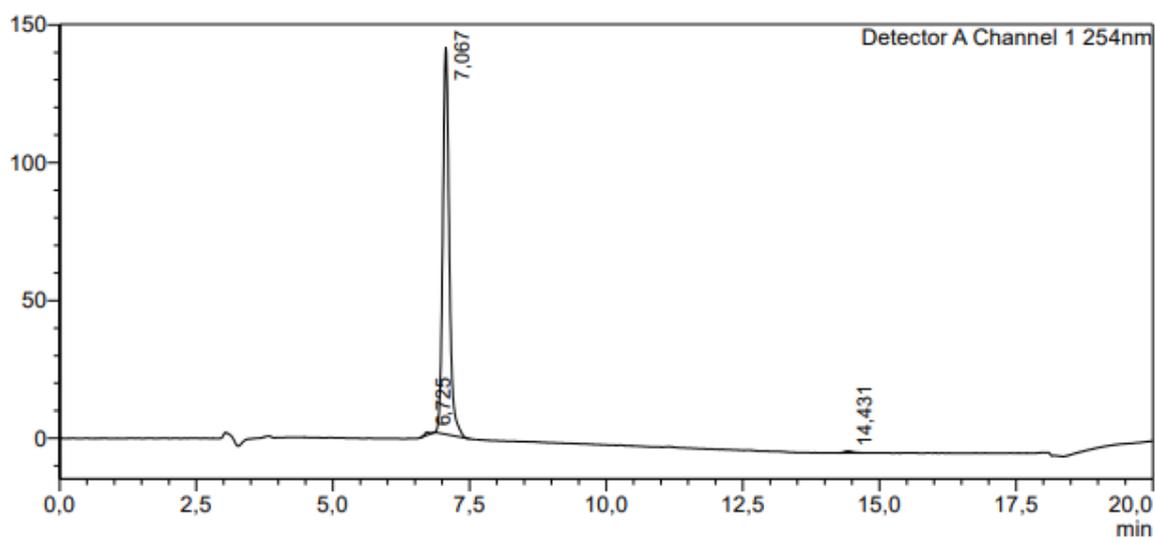


Abbildung 68: HPLC-Lauf (20c, RK85)

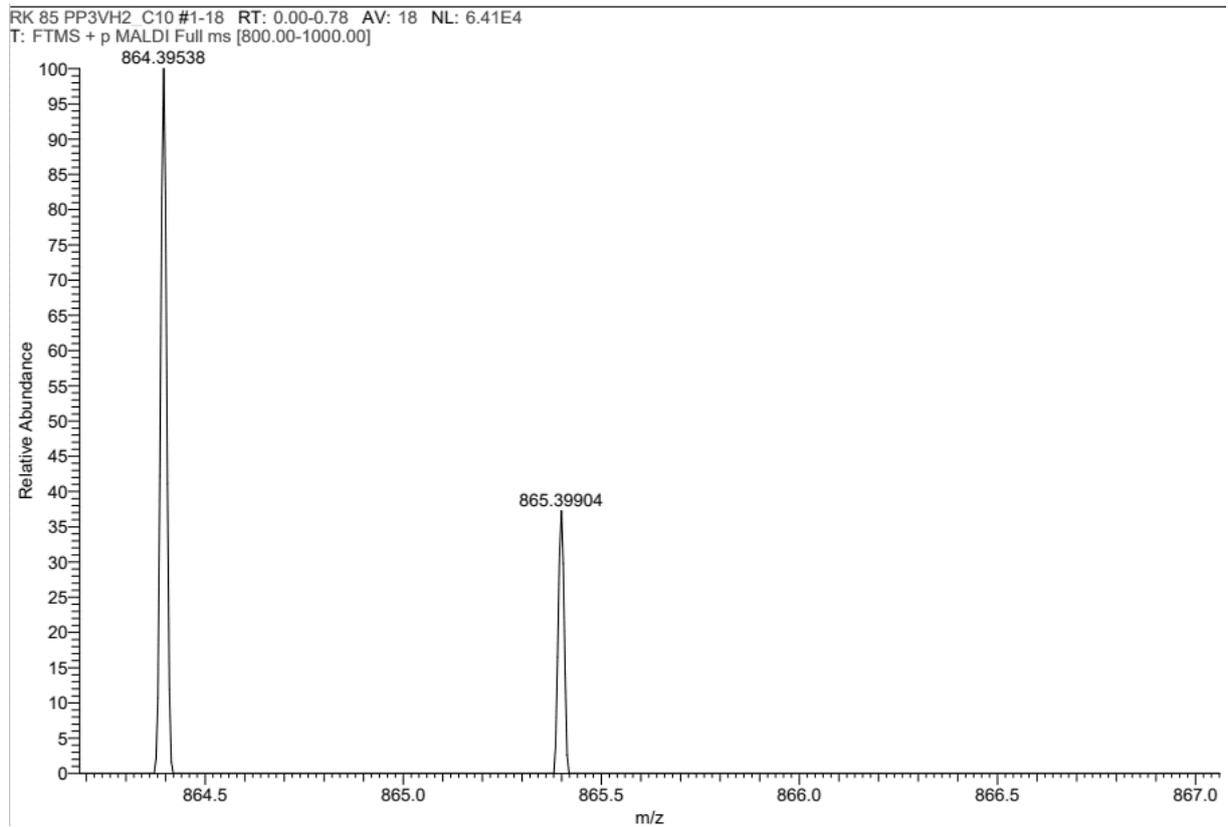
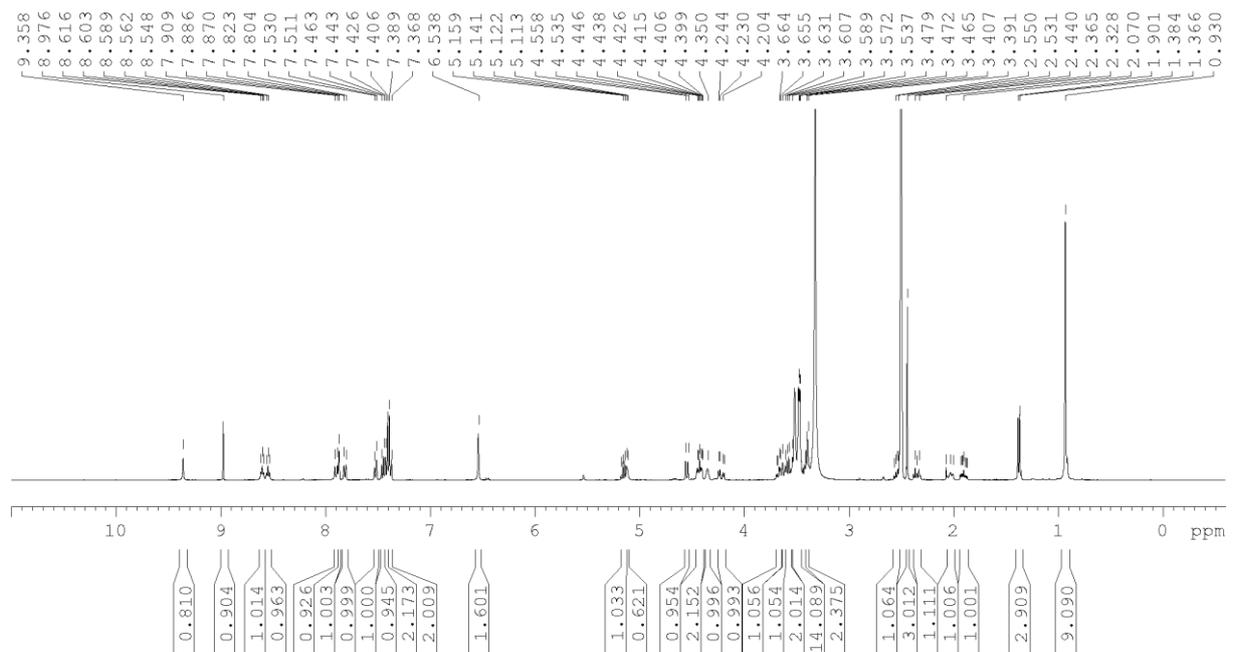
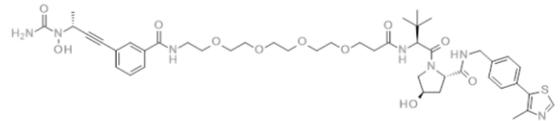


Abbildung 69: HRMS (18c, RK85)

Group AK_Proshak (2S,4R)-1-[(2S)-2-[3-[2-[2-[2-[2-[3-[(3R)-3-[Carbamoyl(hydroxy)amino]but-1-ynyl]benzoyl]amino]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]propanoylamino]-3,3-dimethylbutanoyl]-4-hydroxy-N-[[4-(4-methylthiazol-5-yl)phenyl]methyl]pyrrolidin-2-carboxamid (RK71)
1H DMSO /AV400-2020-08-31-rkpro.37607

Abbildung 70: $^1\text{H-NMR}$ Verbindung (20d, RK71)

Group AK_Proshak
 (2S,4R)-1-[(2S)-2-[3-[2-[2-[2-[2-[[3-[(3R)-3-[Carbamoyl
 (hydroxy)amino]but-1-ynyl]benzoyl]amin]ethoxy]ethoxy]
 ethoxy]ethoxy]propanoylamin]-3,3-dimethyl-butanoyl]-
 4-hydroxy-N-[4-(4-methylthiazol-5-yl)phenyl]methyl]

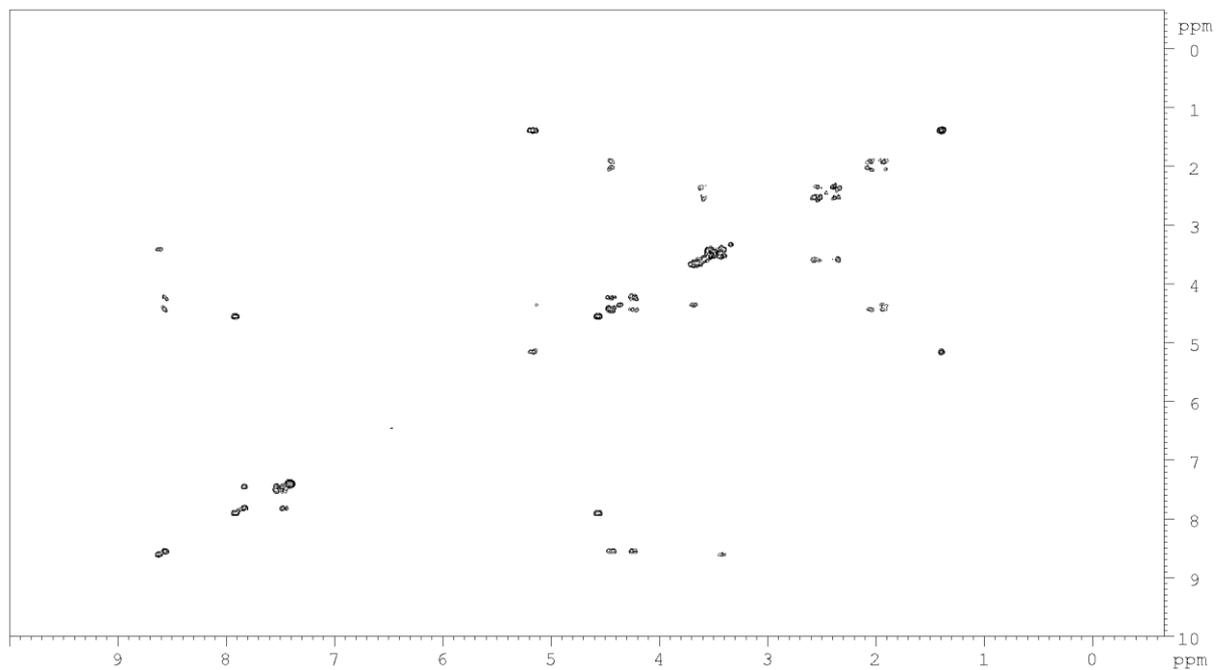
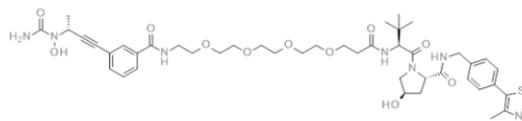


Abbildung 71: ^1H - ^1H -COSY Verbindung (20d, RK71)

Group AK_Proshak
 (2S,4R)-1-[(2S)-2-[3-[2-[2-[2-[2-[[3-[(3R)-3-[Carbamoyl
 (hydroxy)amino]but-1-ynyl]benzoyl]amin]ethoxy]ethoxy]
 ethoxy]ethoxy]propanoylamin]-3,3-dimethyl-butanoyl]-
 4-hydroxy-N-[4-(4-methylthiazol-5-yl)phenyl]methyl]

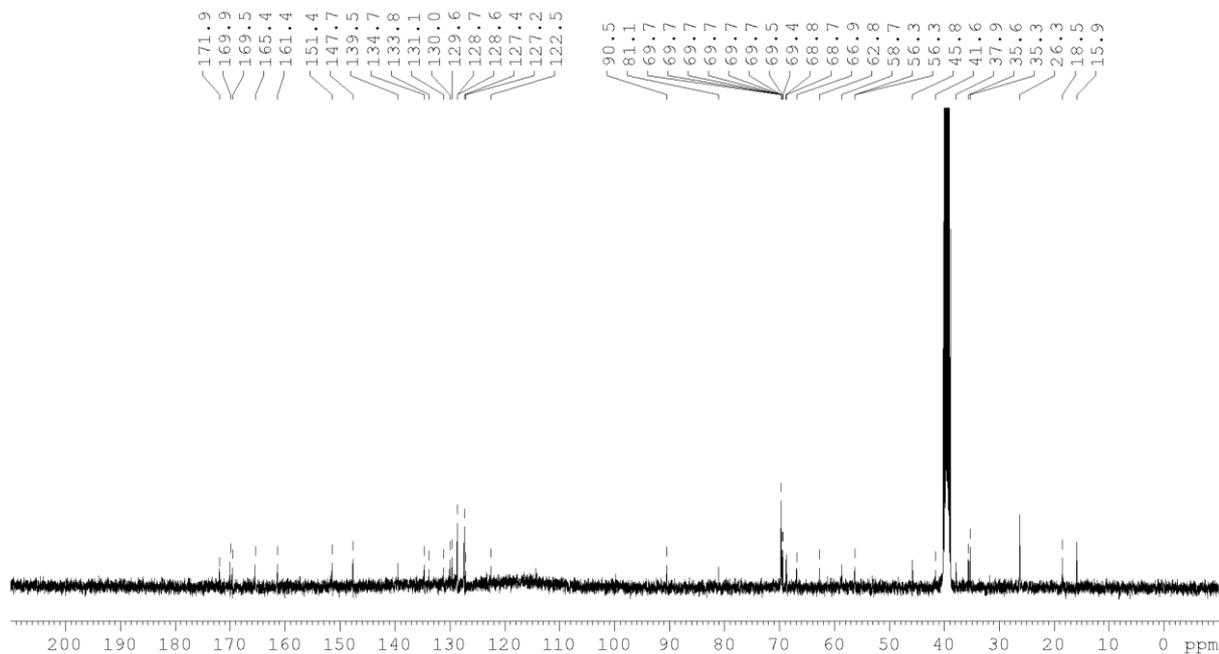
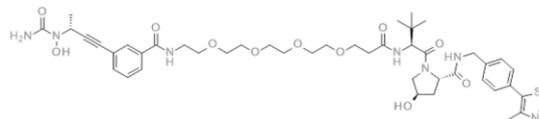


Abbildung 72: ^{13}C -NMR Verbindung (20d, RK71)

<Chromatogram>

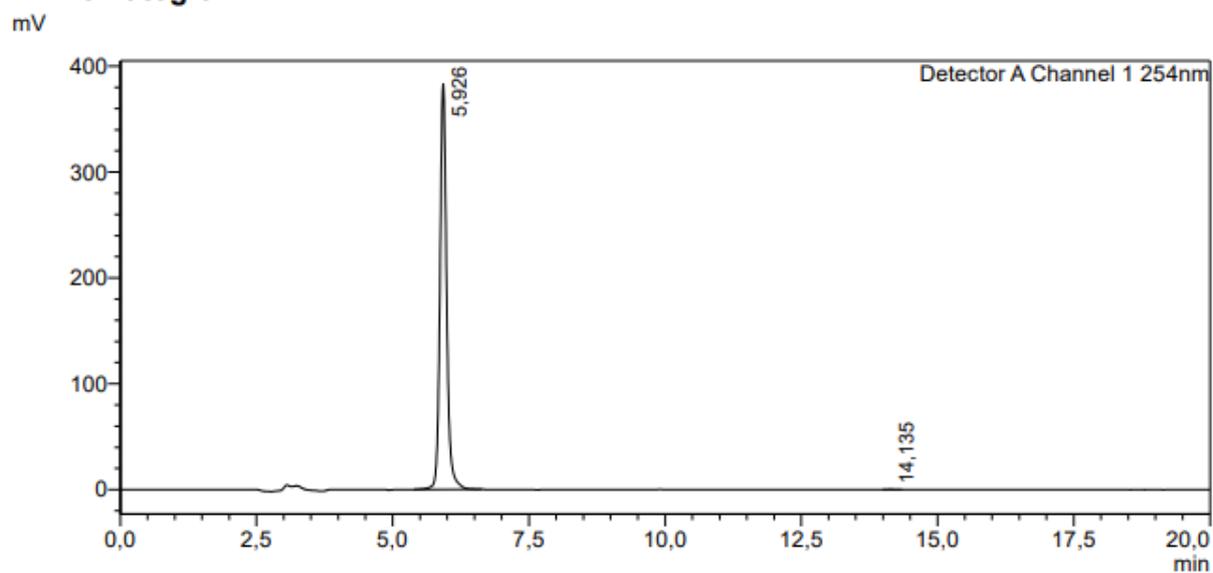


Abbildung 73: HPLC-Lauf (20d, RK71)

RK71 C7 #1-20 RT: 0.00-0.88 AV: 20 NL: 3.83E6
Γ: FTMS + p MALDI Full ms [500.00-1000.00]

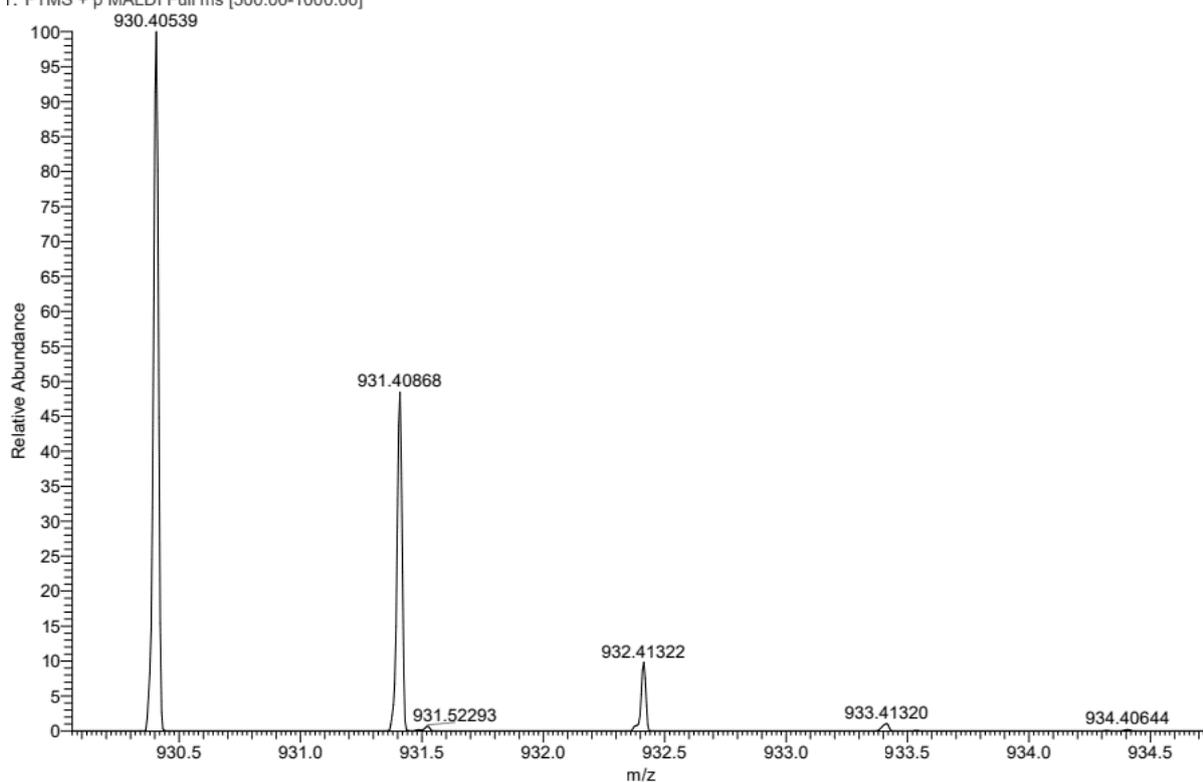


Abbildung 74: HRMS (20d, RK71)

13. Anhang

Group AK_Proshak
 (2S,4R)-1-[(2S)-2-[[2-[4-[[[3-[(3R)-3-[carbamoyl(hydroxy)amin]but-1-ynyl]benzamid]methyl]phenyl]acetyl]amin]-3,3-dimethyl-butanoyl]-4-hydroxy-N-[[4-(4-methylthiazol-5-yl)phenyl]methyl]pyrrolidin-2-carboxamid (RK99)
 13C{1H}n DMSO /AV500-2020-10-09-rkpro.34378

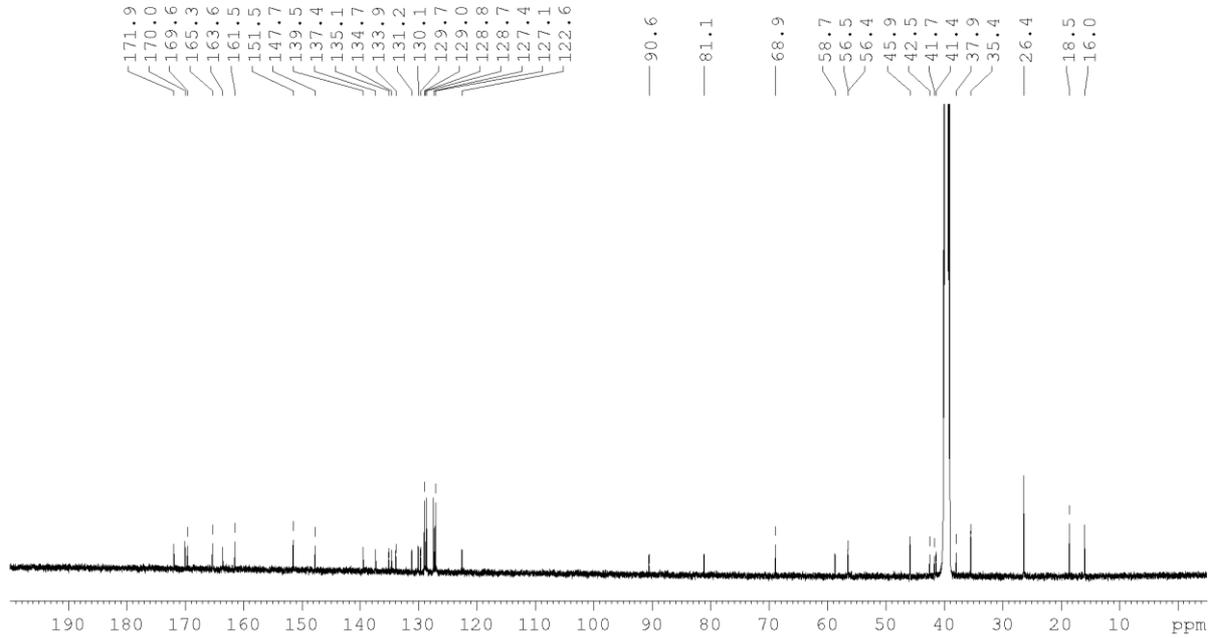
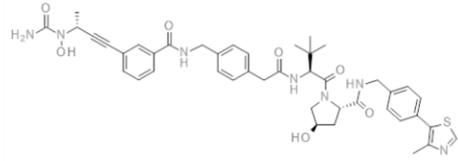


Abbildung 77: ^{13}C -NMR Verbindung (75, RK99)

<Chromatogram>

mV

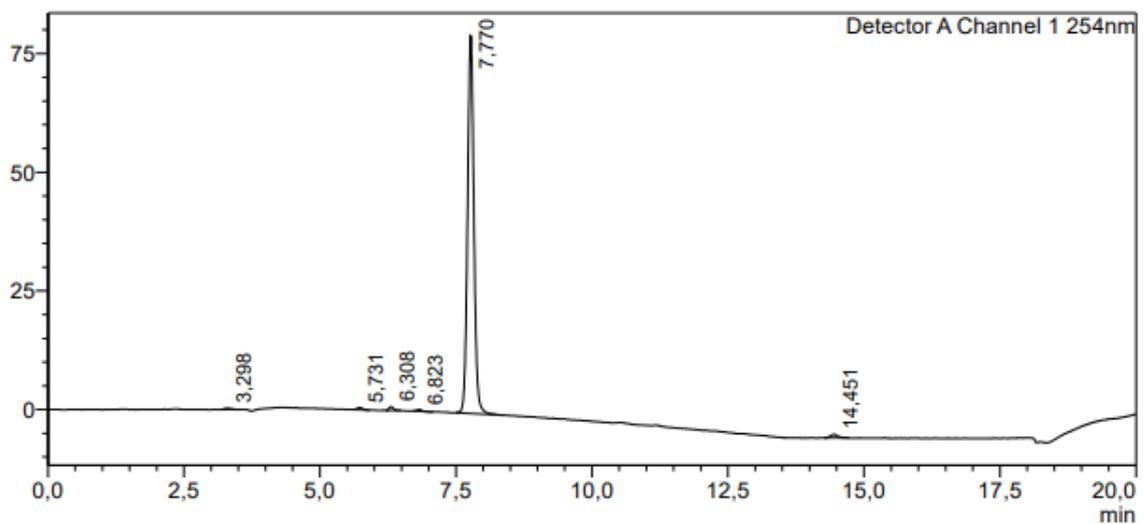


Abbildung 78: HPLC-Lauf (75, RK99)

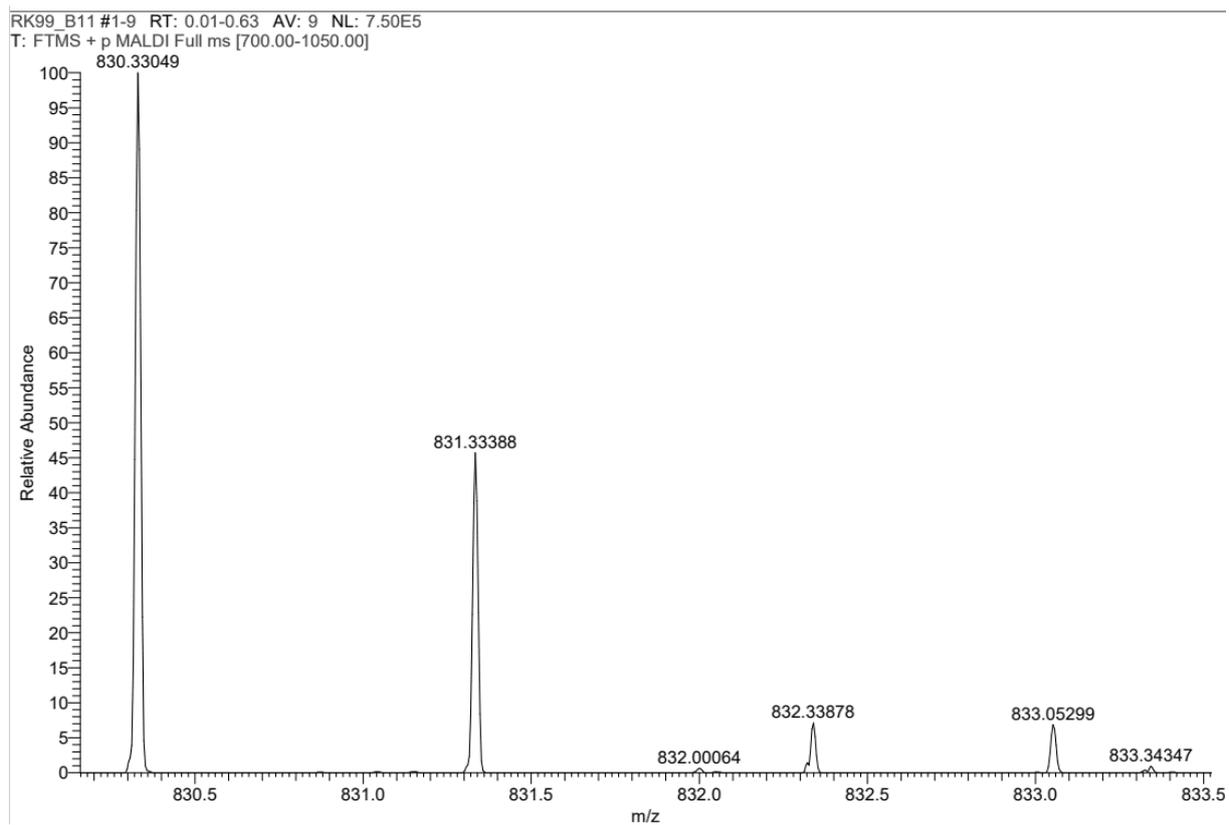
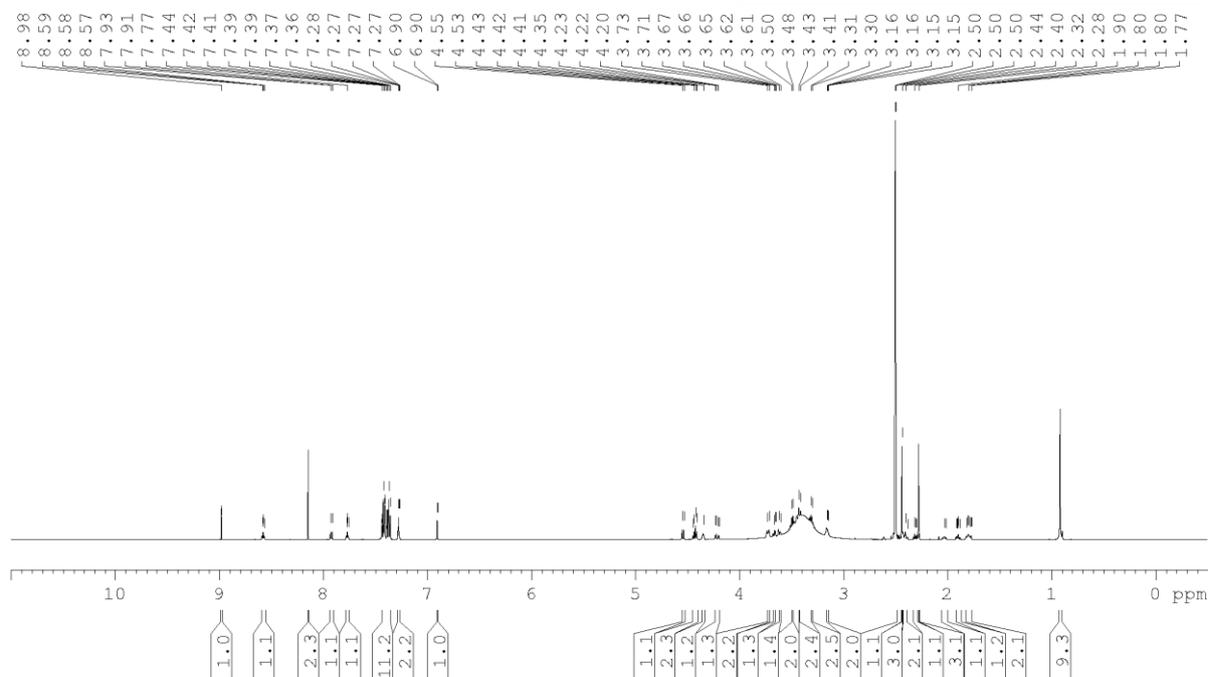
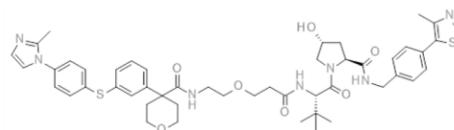


Abbildung 79: HRMS (75, RK99)

Group AK_Proshak
(2S,4R)-1-[(2S)-3,3-Dimethyl-2-[3-[2-[[4-[3-[4-(2-methylimidazol-1-yl)phenyl]sulfonylphenyl]tetrahydropyran-4-carbonyl]amino]ethoxy]propanoylamino]butanoyl]-4-hydroxy-N-[4-(4-methylthiazol-5-yl)benzyl]pyrrolidin-

Abbildung 80: $^1\text{H-NMR}$ Verbindung (21a, RK92)

13. Anhang

Group AK_Proshak
 (2S,4R)-1-[(2S)-3,3-Dimethyl-2-[3-[2-[[4-[3-[4-(2-methylimidazol-1-yl)phenyl]sulfonylphenyl]tetrahydropyran-4-carbonyl]amino]ethoxy]propanoylamino]butanoyl]-4-hydroxy-N-[4-(4-methylthiazol-5-yl)benzyl]pyrrolidin-

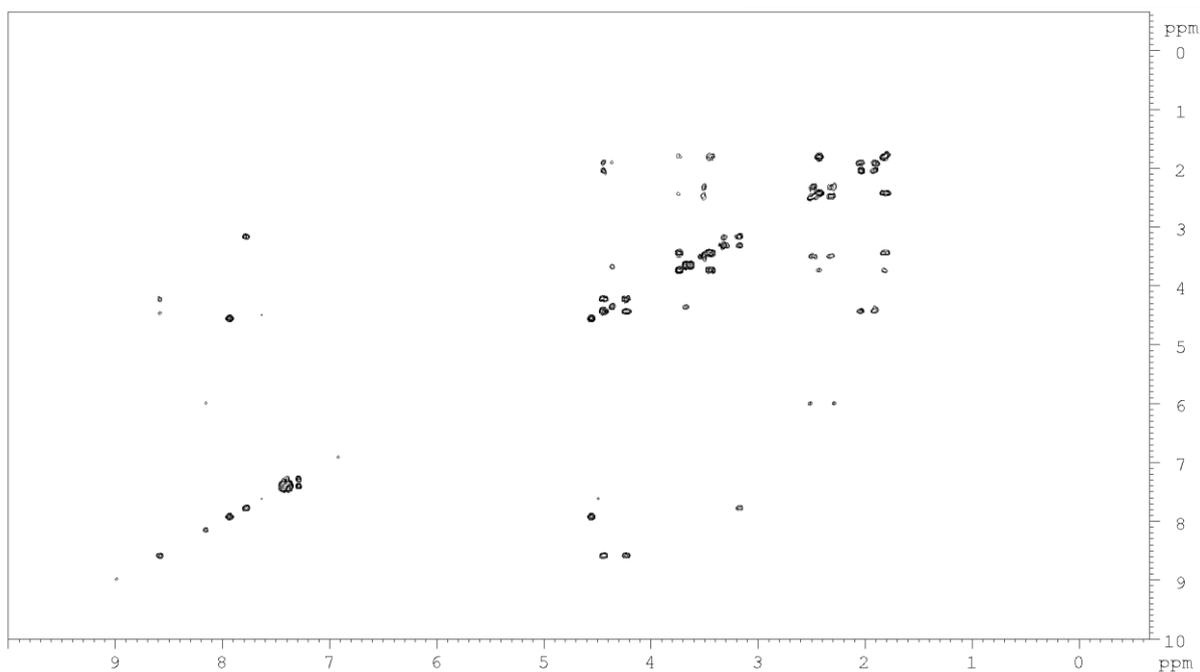
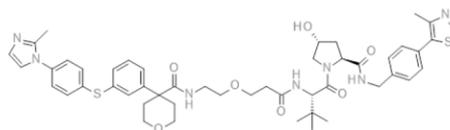


Abbildung 81: ^1H - ^1H -COSY Verbindung (21a, RK92)

Group AK_Proshak
 (2S,4R)-1-[(2S)-3,3-Dimethyl-2-[3-[2-[[4-[3-[4-(2-methylimidazol-1-yl)phenyl]sulfonylphenyl]tetrahydropyran-4-carbonyl]amino]ethoxy]propanoylamino]butanoyl]-4-hydroxy-N-[4-(4-methylthiazol-5-yl)benzyl]pyrrolidin-2-carboxamid (RK92)
 DRX600-2020-09-30-rkpro.5278

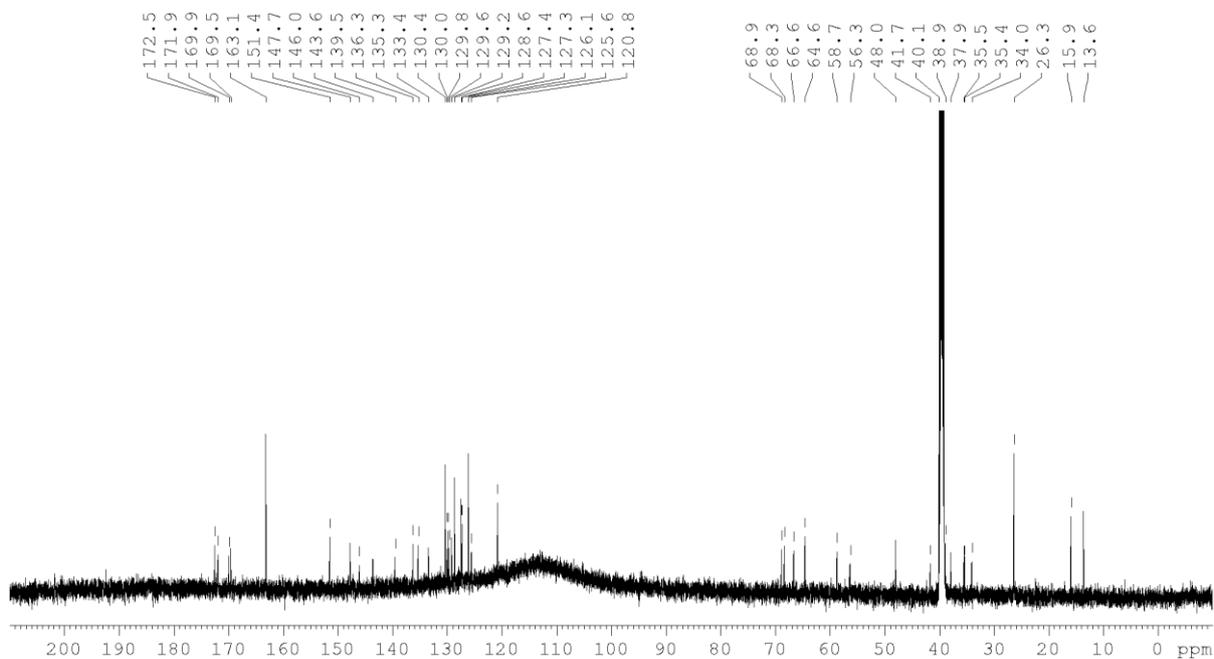
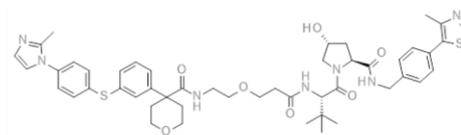


Abbildung 82: ^{13}C -NMR Verbindung (21a, RK92)

<Chromatogram>

mV

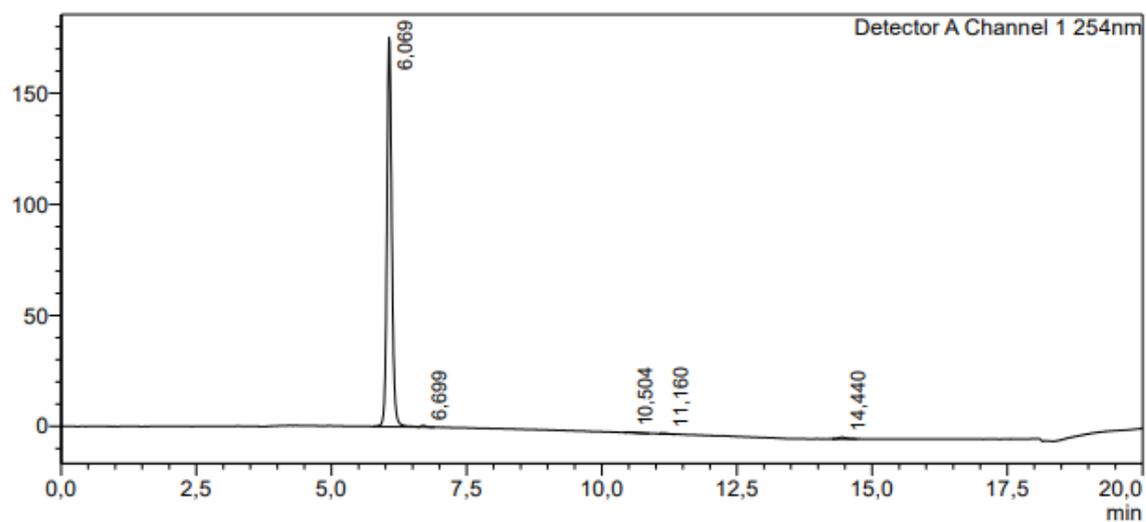


Abbildung 83: HPLC-Lauf (21a, RK92)

RK92_C12 #1-13 RT: 0.00-0.56 AV: 13 NL: 2.14E7
T: FTMS + p MALDI Full ms [700.00-1050.00]

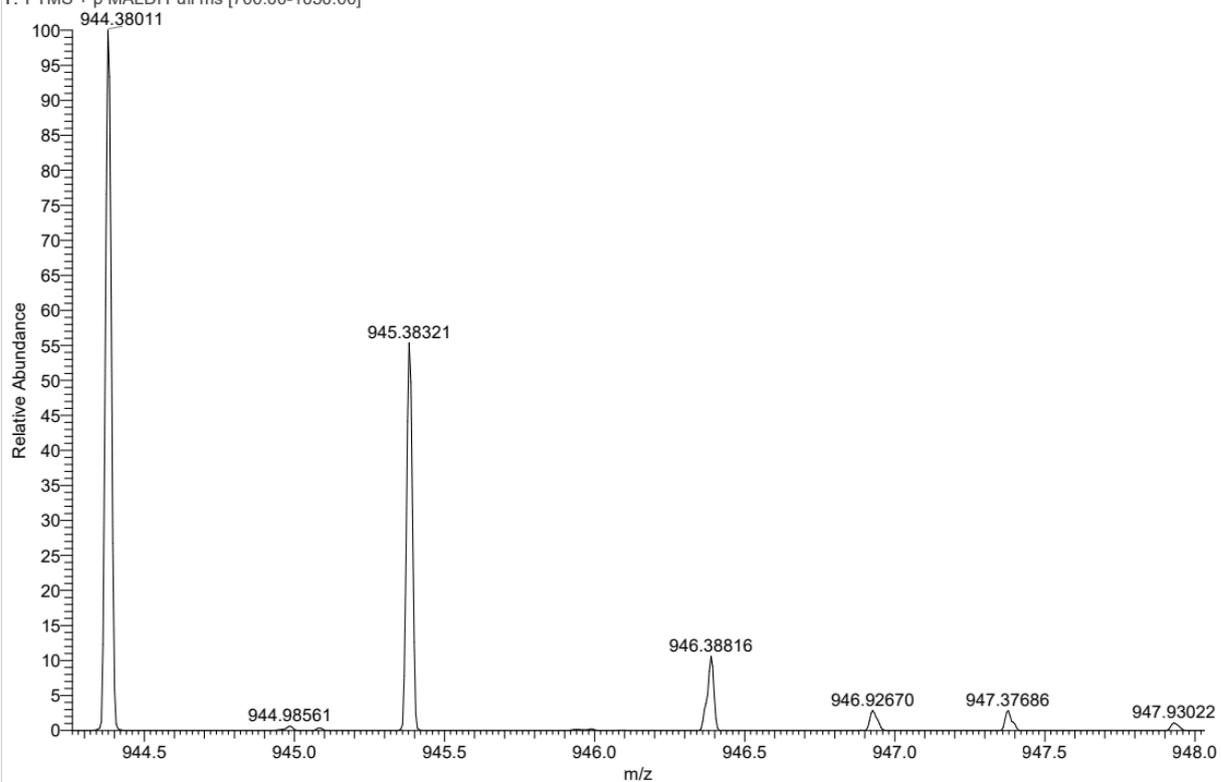


Abbildung 84: HRMS (21a, RK92)

13. Anhang

Group AK_Proshak
 (2S,4R)-1-[(2S)-3,3-Dimethyl-2-[3-[2-[2-[[4-[3-[4-(2-methylimidazol-1-yl)phenyl]sulfonylphenyl]tetrahydropyran-4-carbonyl]amin]ethoxy]ethoxy]propanoylamin]butanoyl]-4-hydroxy-N-[4-(4-methylthiazol-5-yl)benzyl]pyrrolidin-2-carboxamid (RK94)

¹H DMSO /AV400-2020-10-02-rkpro.38157

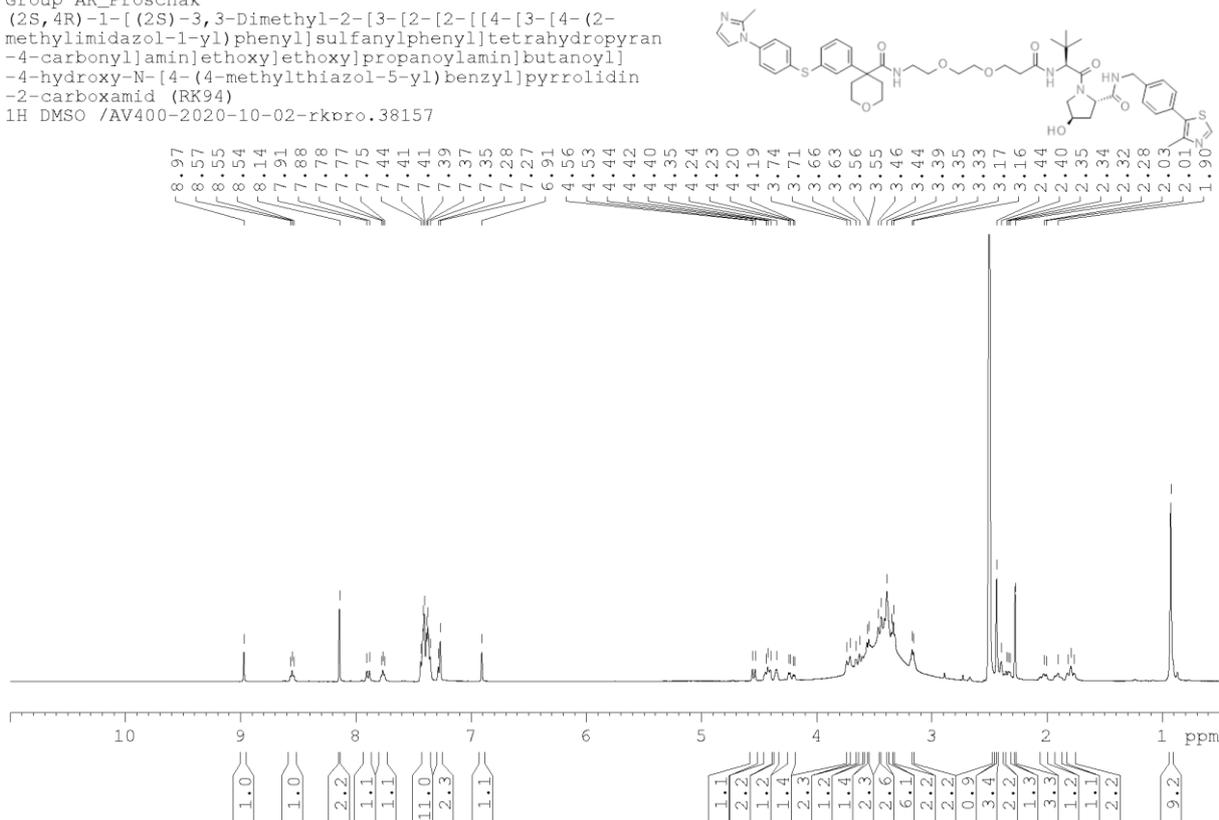


Abbildung 85: ¹H-NMR Verbindung (21b, RK94)

Group AK_Proshak
 (2S,4R)-1-[(2S)-3,3-Dimethyl-2-[3-[2-[2-[[4-[3-[4-(2-methylimidazol-1-yl)phenyl]sulfonylphenyl]tetrahydropyran-4-carbonyl]amin]ethoxy]ethoxy]propanoylamin]butanoyl]-4-hydroxy-N-[4-(4-methylthiazol-5-yl)benzyl]pyrrolidin-2-carboxamid (RK94)

COSY DMSO /AV400-2020-10-02-rkpro.38157

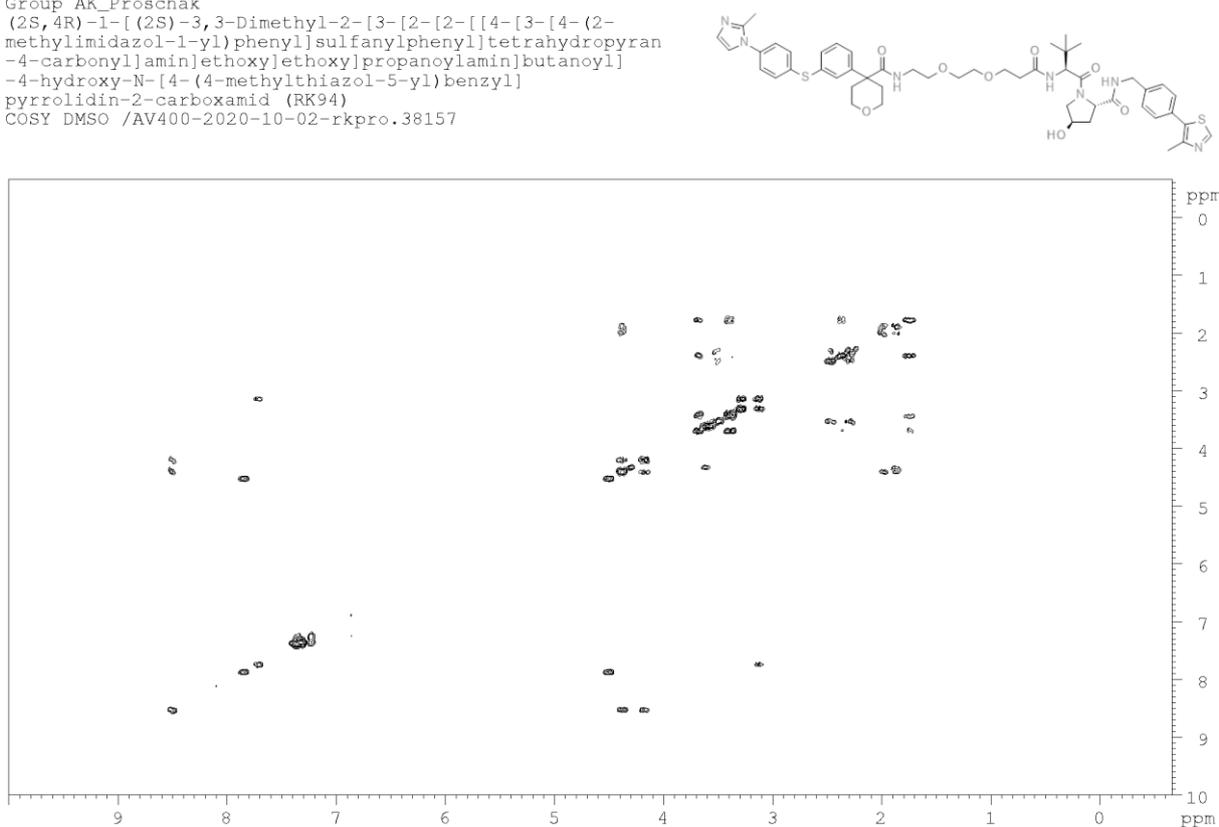


Abbildung 86: ¹H-¹H-COSY Verbindung (21b, RK94)

Group AK_Proshak
 (2S,4R)-1-[(2S)-3,3-Dimethyl-2-[3-[2-[2-[[4-[3-[4-(2-methylimidazol-1-yl)phenyl]sulfonylphenyl]tetrahydropyran-4-carbonyl]amino]ethoxy]ethoxy]propanoyl]amin]butanoyl]-4-hydroxy-N-[4-(4-methylthiazol-5-yl)benzyl]pyrrolidin-2-carboxamid (RK94)
 13C{1H}_n DMSO /AV400-2020-10-02-rkpro.38157

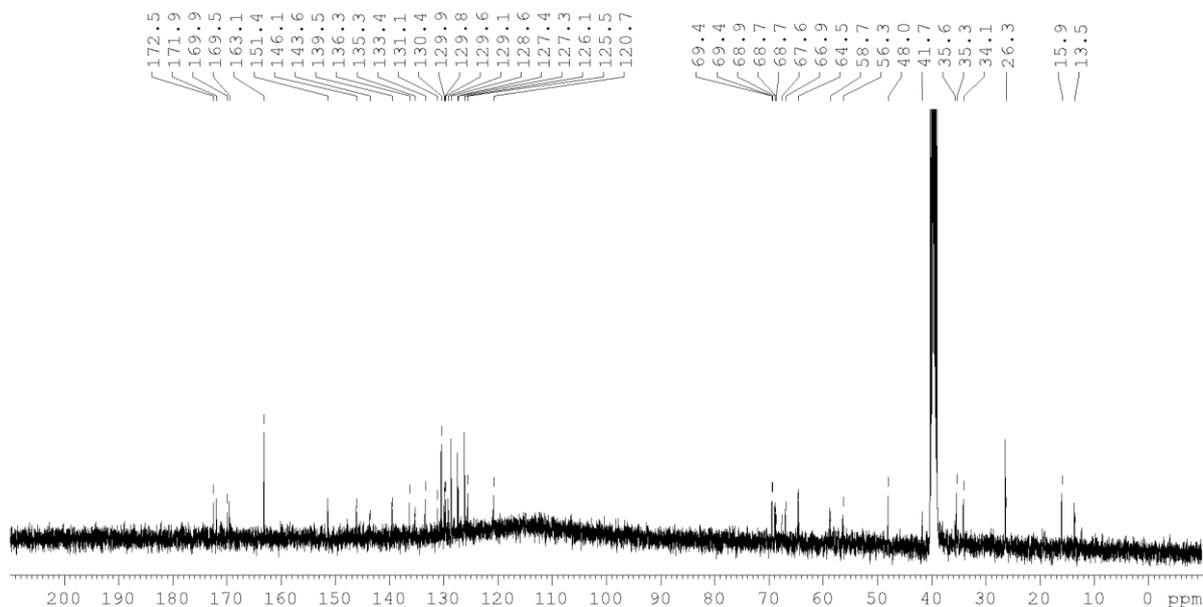
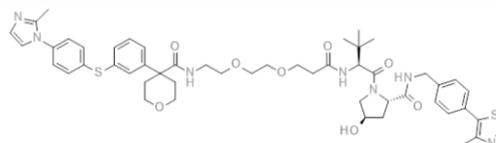


Abbildung 87: ^{13}C -NMR Verbindung (21b, RK94)

<Chromatogram>

mV

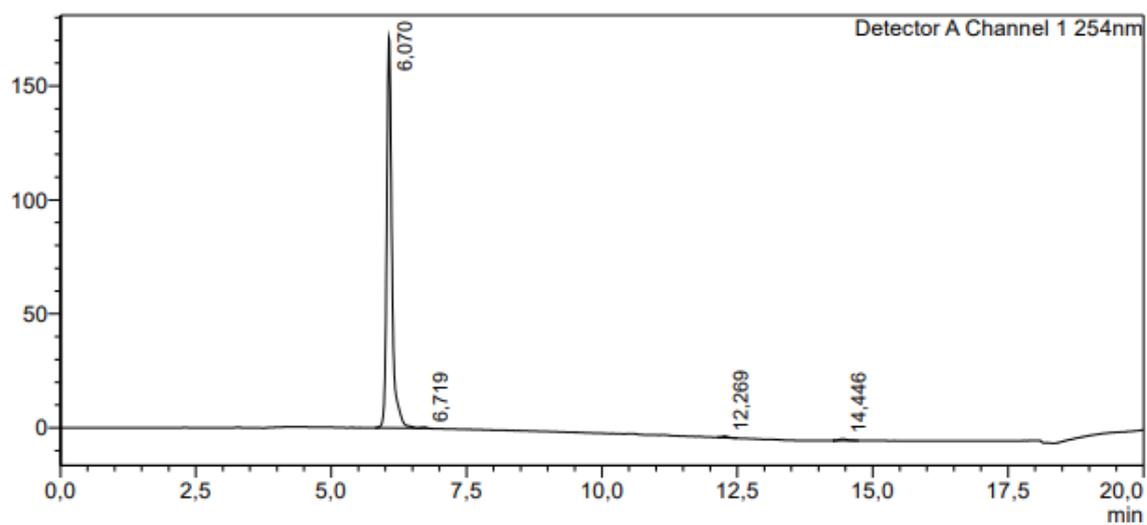


Abbildung 88: HPLC-Lauf (21b, RK94)

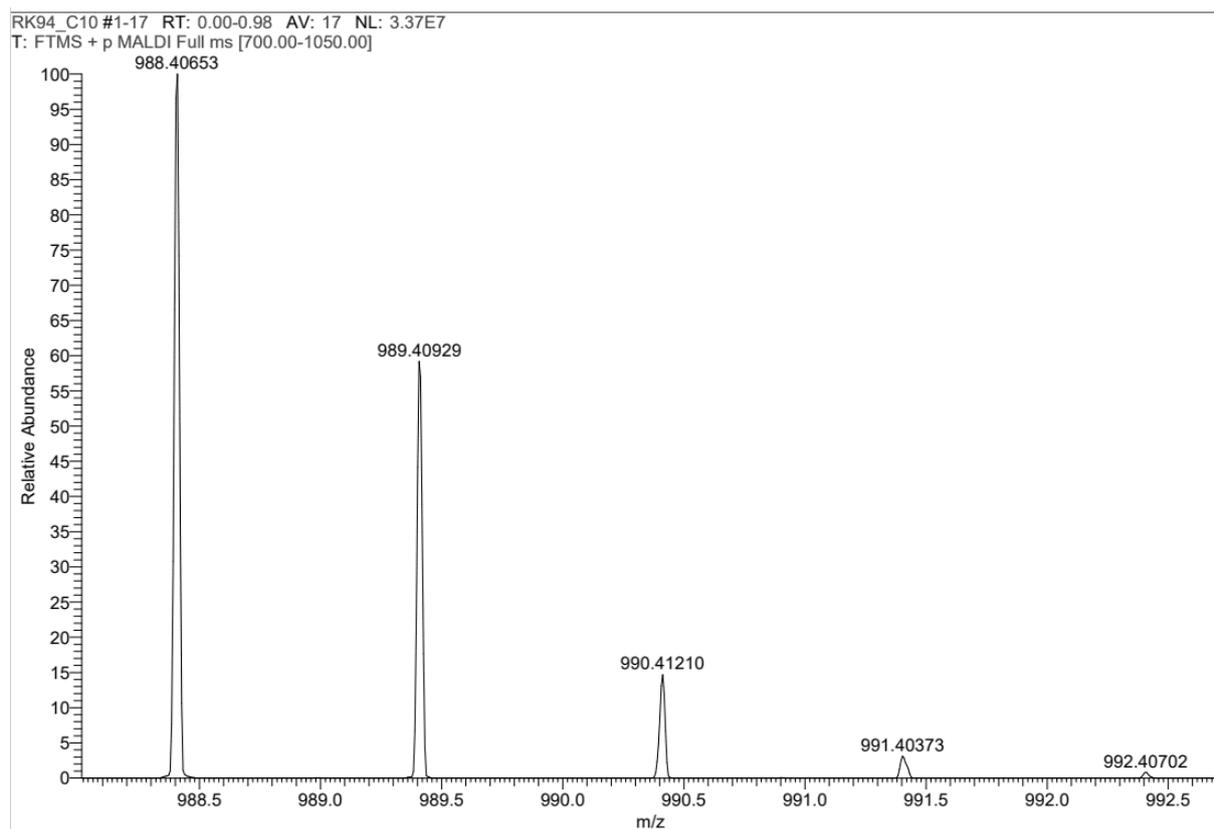
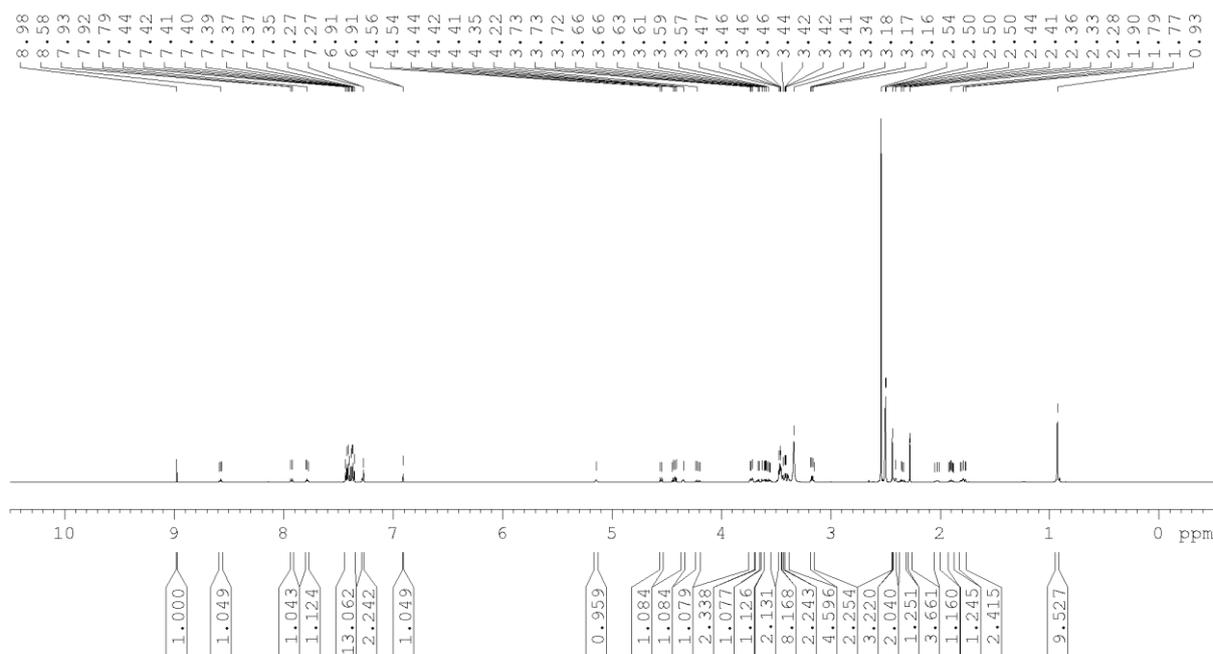
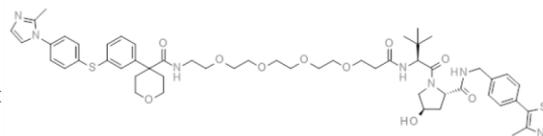


Abbildung 89: HRMS (21b, RK92)

Group AK_Proschak
(2S,4R)-1-[(2S)-3,3-Dimethyl-2-[3-[2-[2-[2-[2-[[4-[3-[4-(2-methylimidazol-1-yl)phenyl]sulfanylphenyl]tetrahydropyran-4-carbonyl]amin]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]propanoylamin]butanoyl]-4-hydroxy-N-[(4-methylthiazol-5-yl)benzyl]pyrrolidine-2-carboxamid (RK)
DRX600-2020-09-12-rkpro.5228

Abbildung 90: $^1\text{H-NMR}$ Verbindung (21d, RK82)

Group AK_Proshak
 (2S,4R)-1-[(2S)-3,3-Dimethyl-2-[3-[2-[2-[2-[2-[4-[3-[4-(2-methylimidazol-1-yl)phenyl]sulfanyl]phenyl]tetrahydropyran-4-carbonyl]amin]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]propanoylamin]butanoyl]-4-hydroxy-N-[(4-methylthiazol-5-yl)benzyl]pyrrolidine-2-carboxamid
 (RK82) DRX600-2020-09-12-rkpro.5228

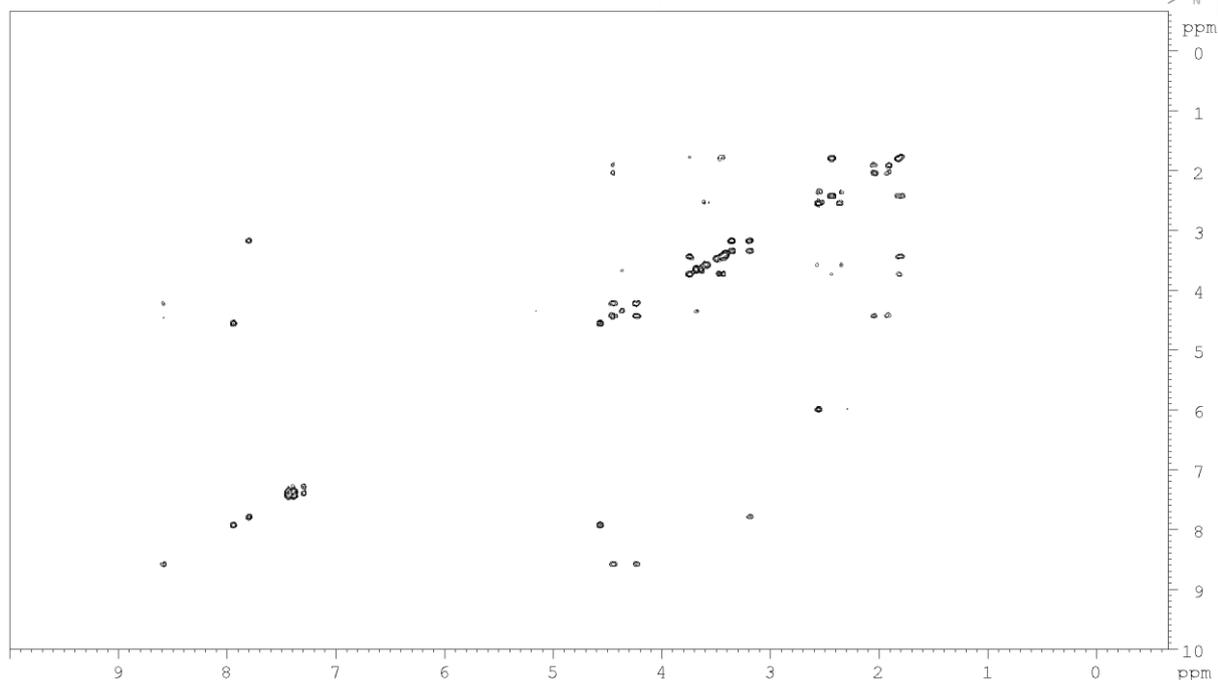
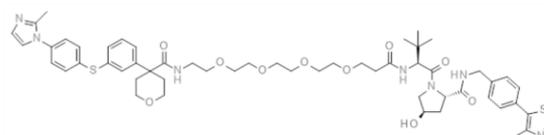


Abbildung 91: ^1H - ^1H -COSY Verbindung (21d, RK82)

Group AK_Proshak
 (2S,4R)-1-[(2S)-3,3-Dimethyl-2-[3-[2-[2-[2-[2-[4-[3-[4-(2-methylimidazol-1-yl)phenyl]sulfanyl]phenyl]tetrahydropyran-4-carbonyl]amin]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]propanoylamin]butanoyl]-4-hydroxy-N-[(4-methylthiazol-5-yl)benzyl]pyrrolidine-2-carboxamid
 (RK82) DRX600-2020-09-12-rkpro.5228

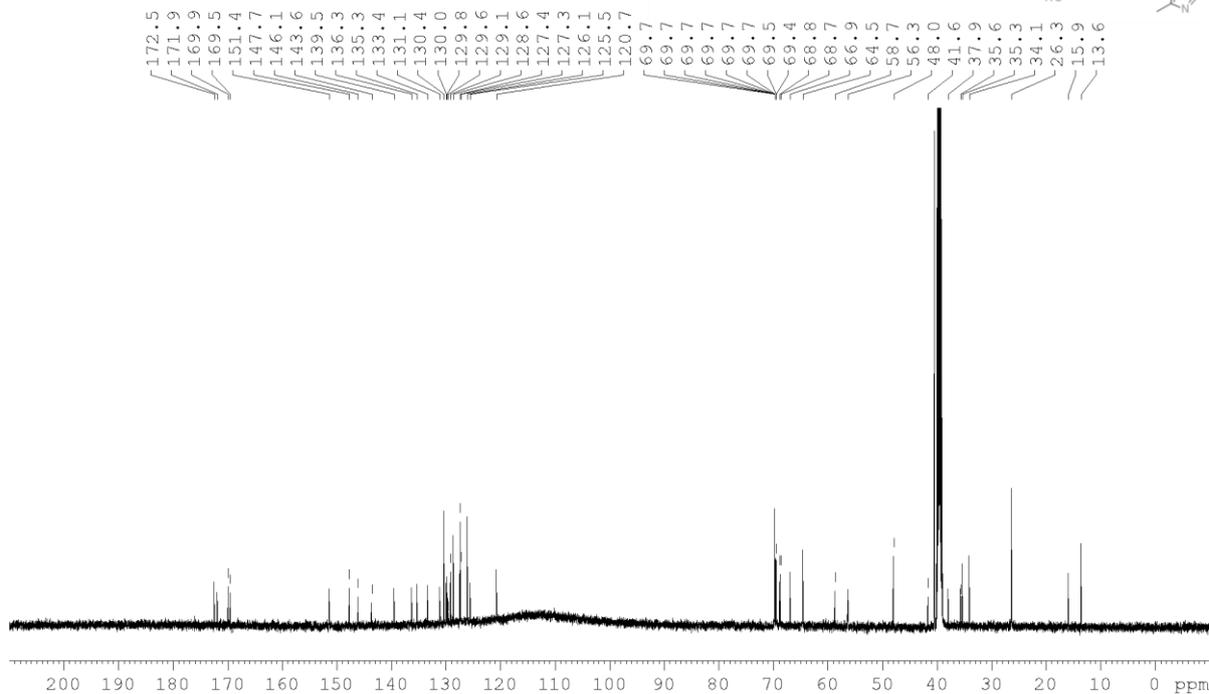
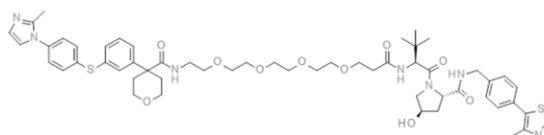


Abbildung 92: ^{13}C -NMR Verbindung (21d, RK82)

<Chromatogram>

mV

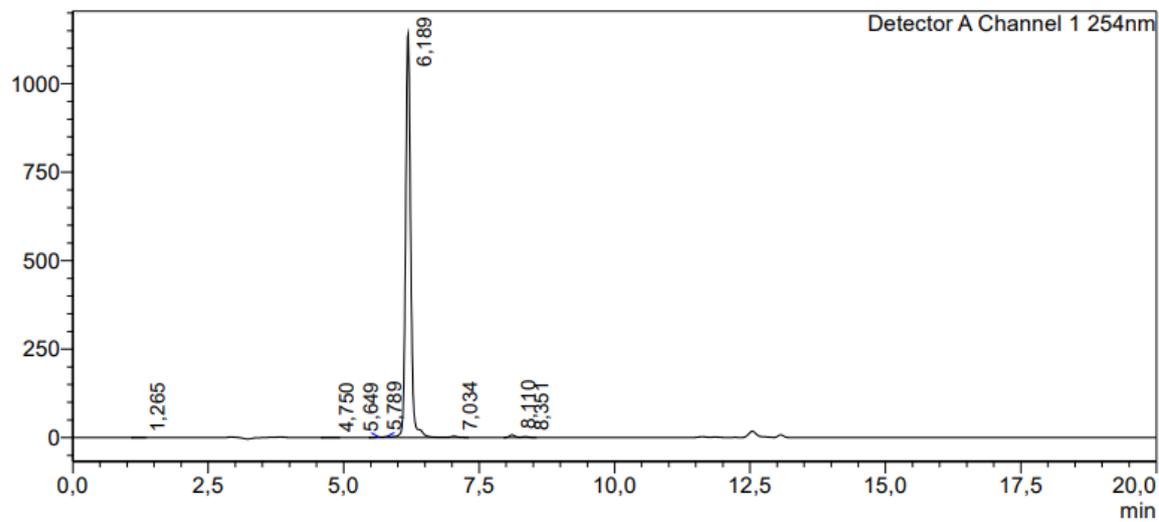


Abbildung 93: HPLC-Lauf (21d, RK82)

RK82 F6 #1-13 RT: 0.01-0.53 AV: 13 NL: 2.79E7
T: FTMS + p MALDI Full ms [700.00-1150.00]

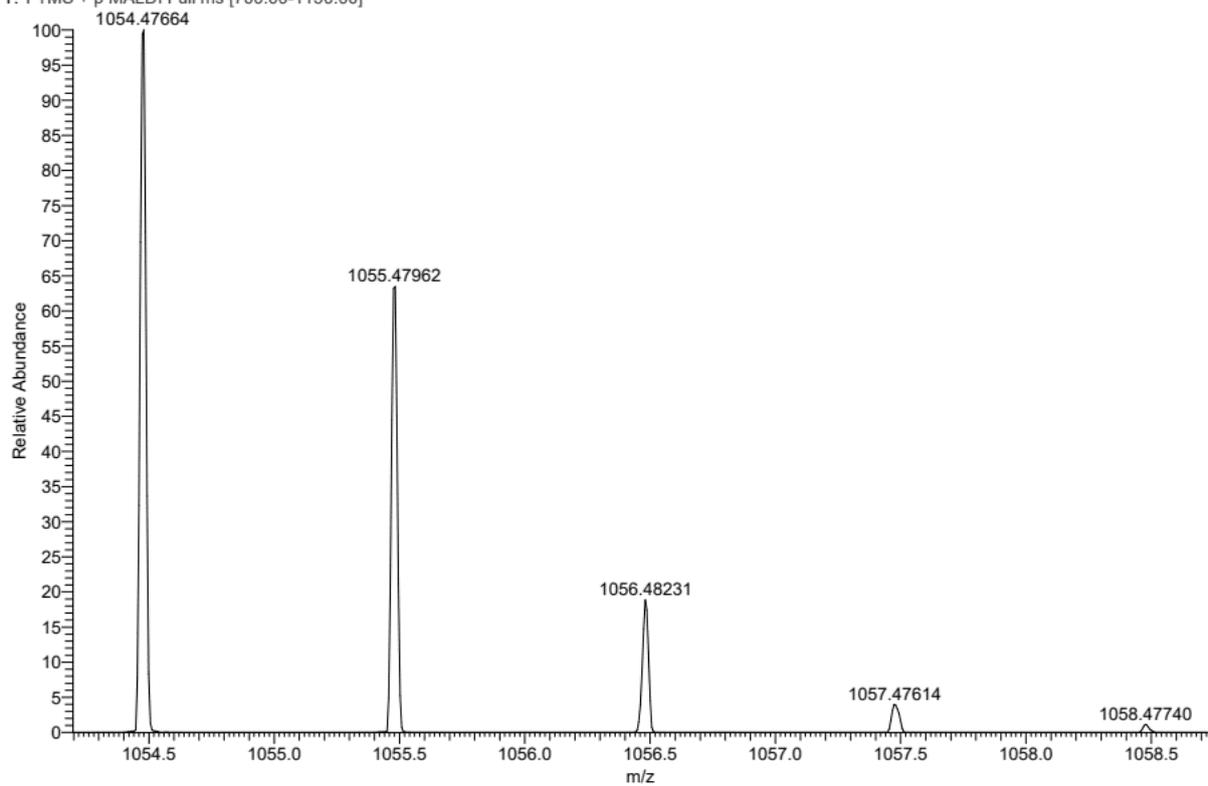


Abbildung 94: HRMS (21d, RK82)

Group AK_Proshak
 (2S,4R)-1-[(2S)-3,3-Dimethyl-2-[[2-[4-[[[4-[3-[4-(2-methylimidazol-1-yl)phenyl]sulfonylphenyl]tetrahydropyran-4-carbonyl]amin]methyl]phenyl]acetyl]amin]butanoyl]-4-hydroxy-N-[4-(4-methylthiazol-5-yl)benzyl]pyrrolidin-2-carboxamid (RK97)

¹H DMSO /AV400-2020-10-07-rkpro.38222

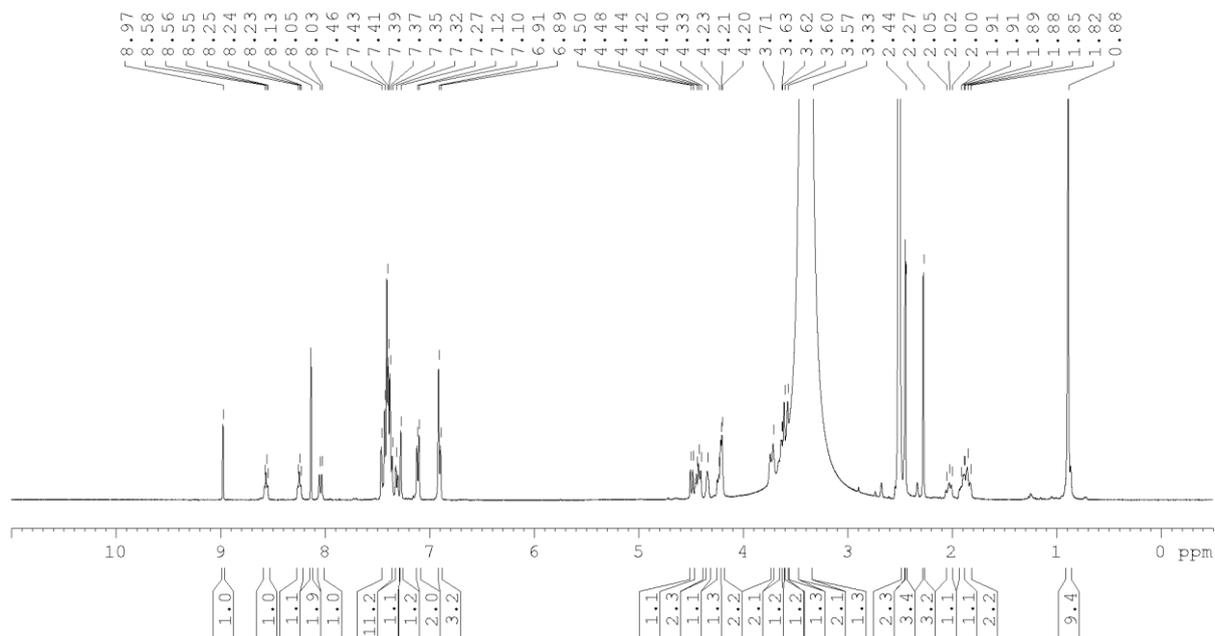
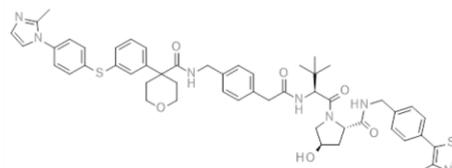


Abbildung 95: ¹H-NMR Verbindung (79, RK97)

Group AK_Proshak
 (2S,4R)-1-[(2S)-3,3-Dimethyl-2-[[2-[4-[[[4-[3-[4-(2-methylimidazol-1-yl)phenyl]sulfonylphenyl]tetrahydropyran-4-carbonyl]amin]methyl]phenyl]acetyl]amin]butanoyl]-4-hydroxy-N-[4-(4-methylthiazol-5-yl)benzyl]pyrrolidin-2-carboxamid (RK97)

COSY DMSO /AV400-2020-10-07-rkpro.38222

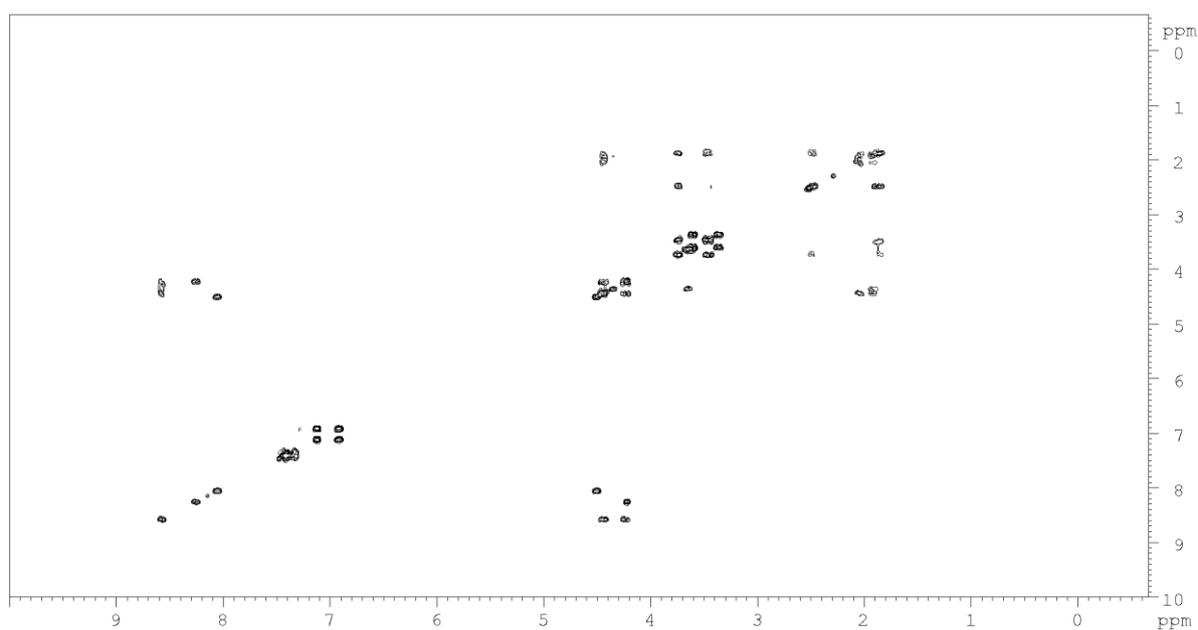
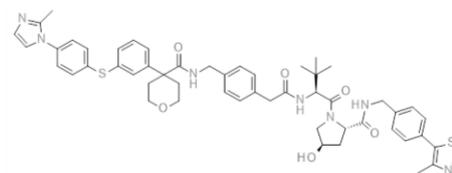


Abbildung 96: ¹H-¹H-COSY Verbindung (76, RK97)

13. Anhang

Group AK_Proshak
 (2S,4R)-1-[(2S)-3,3-Dimethyl-2-[[2-[4-[[[4-[3-[4-(2-methylimidazol-1-yl)phenyl]sulfonylphenyl]tetrahydropyran-4-carbonyl]amin]methyl]phenyl]acetyl]amin]butanoyl]-4-hydroxy-N-[4-(4-methylthiazol-5-yl)benzyl]pyrrolidin-2-carboxamid (RK97)
 13C{1H}_n DMSO /AV400-2020-10-07-rkpro.38222

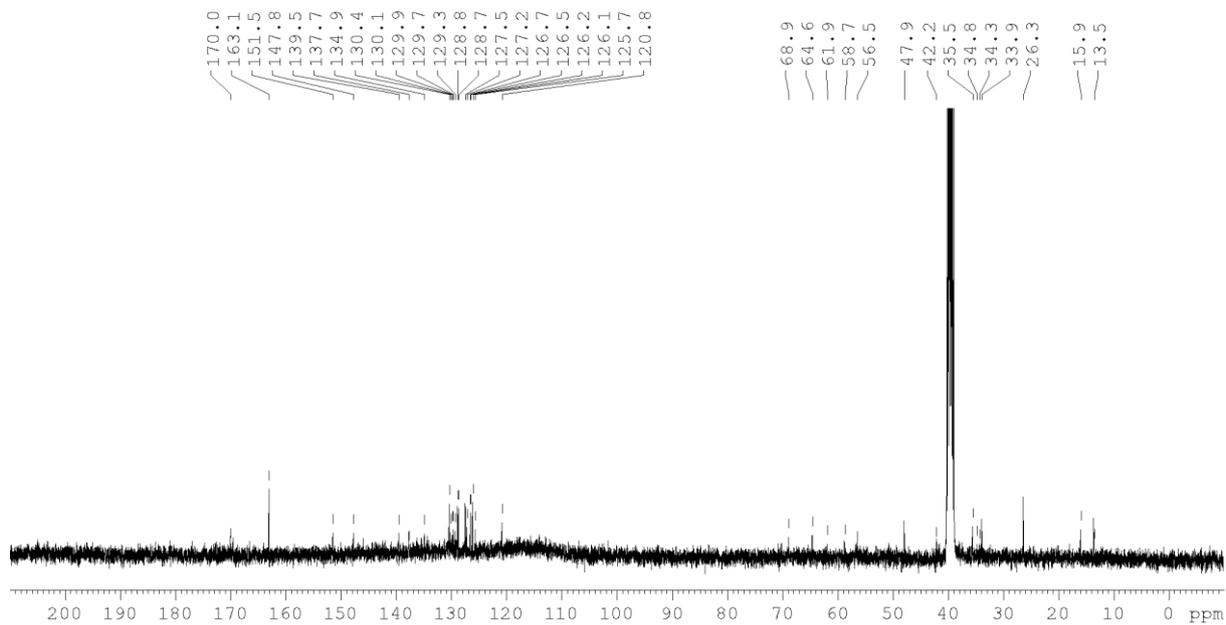
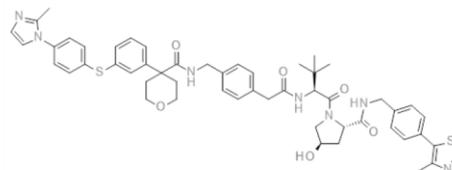


Abbildung 97: ^{13}C -NMR Verbindung (76, RK97)

<Chromatogram>

mV

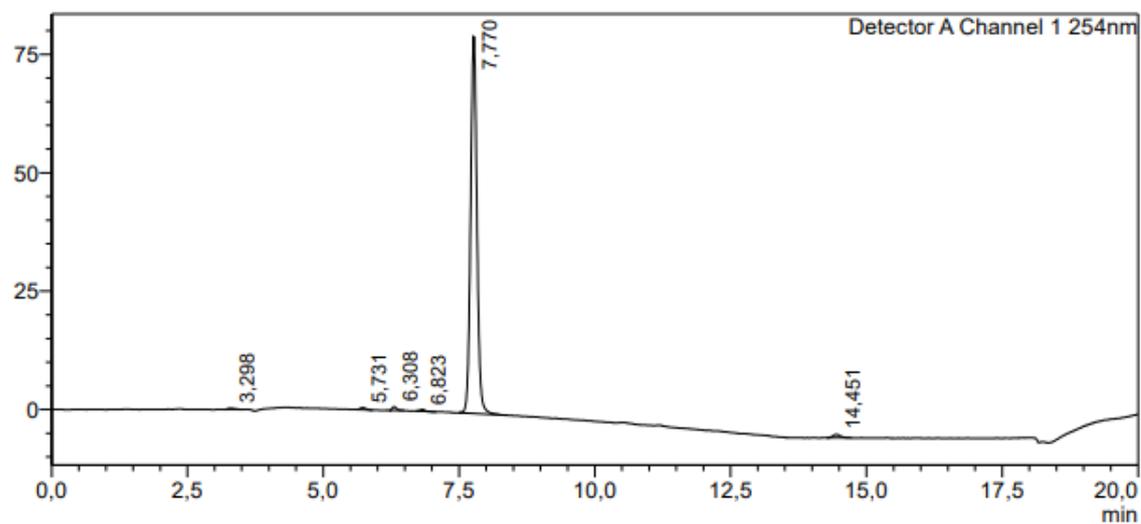


Abbildung 98: HPLC-Lauf (76, RK97)

RK97_C11 #20 RT: 0.89 AV: 1 NL: 4.58E6
T: FTMS + p MALDI Full ms [700.00-1050.00]

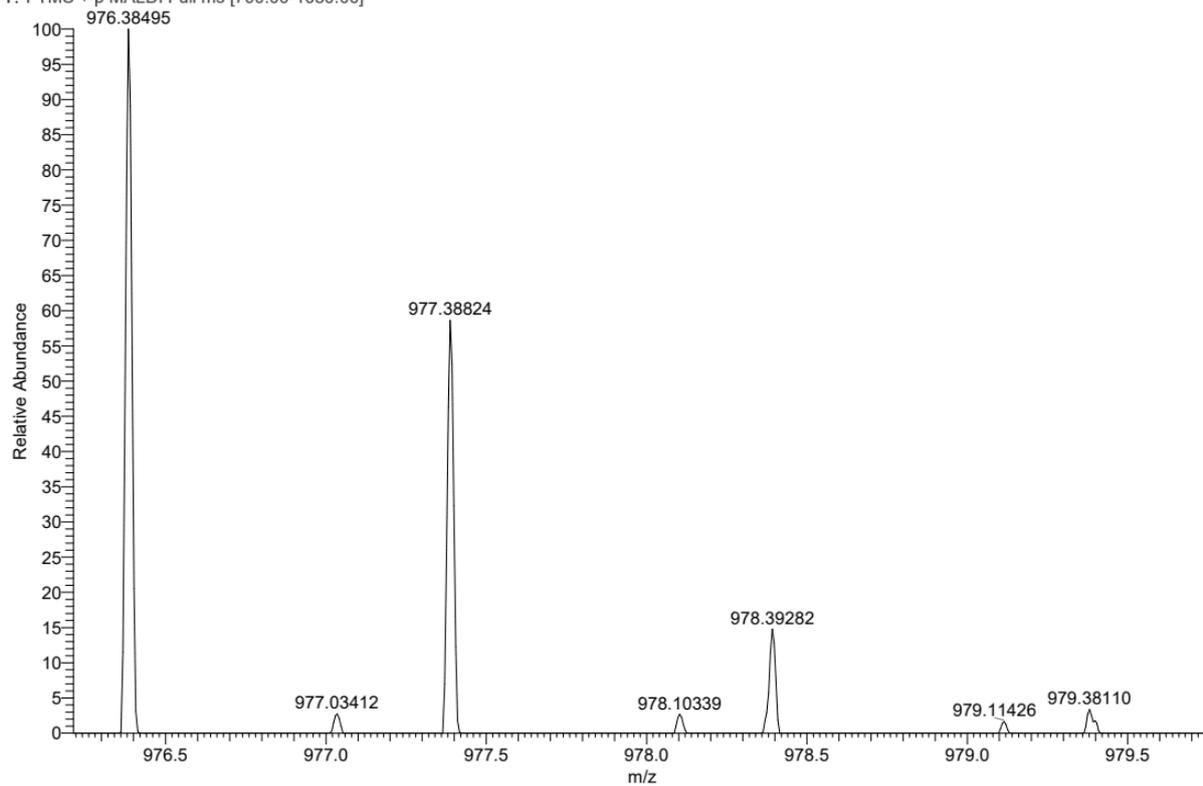


Abbildung 99: HRMS (76, RK97)