

**Liganden-basiertes Wirkstoffdesign zur
Targetaufklärung und Entwicklung neuartiger
Transkriptionsmodulatoren**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie der
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Lukas Dempwolf, M. Sc.

aus Hannover

Marburg/Lahn 2019

Erstgutachter: Prof. Dr. Wibke Diederich

Zweitgutachter: PD Dr. Till Adhikary

Eingereicht am: 03.01.2019

Disputation am: 11.02.2019

Hochschulkennziffer: 1180

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

**„Liganden-basiertes Wirkstoffdesign zur Targetaufklärung und Entwicklung
neuartiger Transkriptionsmodulatoren“**

selbstständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe. Alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate sind als solche gekennzeichnet.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 03.01.2019

Lukas Dempwolf

Danksagung

Zunächst möchte ich **Fr. Prof. Dr. Wibke Diederich** für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, die Zuteilung der spannenden Projekte und die Betreuung während meiner Promotion danken.

Des weiteren möchte ich **Hr. PD Dr. Till Adhikary** für die Kooperation bei den PPAR-Projekten sowie für die Übernahme der Zweitprüferschaft danken.

Hr. Prof. Dr. Gerhard Klebe sowie **Hr. Prof. Dr. Carsten Culmsee** danke ich für die Übernahme der Dritt- bzw. Viertprüferschaft.

Hr. Dr. Christof Wegscheid-Gerlach danke ich für die Übernahme der Protokollführung.

Für die tolle Kooperation bezüglich des Hedgehog-Projektes danke ich **Hr. Prof. Dr. Matthias Lauth**.

Ferner gilt mein Dank allen **ehemaligen und aktuellen Mitgliedern des AK Diederich** für die schöne Zeit, speziell Folgenden: Michael Daude, Lukas Eberhart, Claudia Heerklotz, Lukas Heyder, Magdalena Lauer, Kerstin Mark, Iris Nee, Mike Pohl, William Scanlan, Andreas Schmidt, Markus Schwark.

Ebenfalls bin ich für die tatkräftige und kompetente Unterstützung der Serviceabteilungen sowie Fr. Lydia Hartleben dankbar.

Zuletzt danke ich meiner Familie sowie meiner Freundin Alexandra für den moralischen Beistand.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Rationalen der Wirkstoffentwicklung	3
1.2	Struktur-basiertes Wirkstoffdesign (SBDD)	5
1.2.1	<i>Hit</i> -Erzeugung und -Optimierung	6
2	Theoretischer Hintergrund	9
2.1	Liganden-basiertes Wirkstoffdesign (LBDD)	9
2.1.1	Primäre SAR	9
2.1.1.1	Reduktion der Komplexizität	11
2.1.1.2	Erhaltung der Komplexizität	12
2.1.1.3	Erhöhung der Komplexizität	13
2.1.2	Computergestützte Methoden (CADD)	14
2.1.2.1	Molekulare Ähnlichkeit	14
2.1.2.2	Pharmakophormodellierung	17
2.1.2.3	Quantitative SAR (QSAR)	20
2.2	Targetaufklärung	22
2.2.1	Affinitätschromatographie	22
2.2.1.1	Sondendesign	22
2.2.1.2	Beispielhafte Durchführung	24
2.2.2	Photoaffinitätsmarkierung (PAL)	26
2.2.2.1	Grundvoraussetzungen	27
2.2.2.2	Reaktive Gruppen	28
2.3	Die Kernrezeptoren der PPAR-Familie	31
2.3.1	Aufbau der Kernrezeptoren	31
2.3.2	Allgemeiner Wirkmechanismus der PPARs	33
2.3.3	PPAR α	34
2.3.4	PPAR γ	35

2.3.5	PPAR β/δ	36
2.3.5.1	Struktur	36
2.3.5.2	Vorkommen und Funktionen	37
2.3.5.3	Liganden	38
2.3.6	Vorherige Arbeiten im Arbeitskreis	41
2.3.6.1	Die Entwicklung der 1. Serie („ST-/PT-S-Verbindungen“)	41
2.3.6.2	Die Entwicklung der 2. Serie („DG-Verbindungen“)	44
3	Aufgabenstellungen	46
3.1	Photoaffinitätsmarkierung von PPAR β/δ -Liganden	46
3.2	<i>Off-Target</i> -Aufklärung von DG172	48
3.3	SAR und Targetaufklärung von ISX-9	49
4	Ergebnisse und Diskussion	51
4.1	Photoaffinitätsmarkierung von PPAR β/δ -Liganden	51
4.1.1	Analyse der „DG-Serie“	51
4.1.2	Analyse der „ST-Serie“	55
4.1.3	Synthese eines Derivates von ST247	56
4.1.4	Synthese eines neuen <i>N</i> -methylierten PPAR β/δ -Liganden	61
4.2	<i>Off-Target</i> -Aufklärung von DG172	64
4.2.1	Strukturanalyse	64
4.2.2	Synthese eines neuen <i>Off-Target</i> -Liganden	66
4.2.3	Synthese des Biotinlinkers	69
4.2.4	Synthese der Affinitätssonde	70
4.2.5	<i>Pull-down</i> -Experiment	72
4.3	SAR und Targetaufklärung von ISX-9	73
4.3.1	Strukturanalyse und Synthese	73
4.3.2	Serie 1: Bestimmung der Kernstruktur	74
4.3.2.1	Strukturelle Reduktion	74
4.3.2.2	Bioisosterie	75

4.3.2.3	Amid-Analyse	77
4.3.2.4	Überlegungen zum zentralen Kern	78
4.3.2.5	Formulierung des Kernmotivs	79
4.3.3	Serie 2: Amidvariationen	79
4.3.3.1	Nicht-zyklische Amide	79
4.3.3.2	Zyklische Amide	80
4.3.4	Serie 3: Arylvariationen	82
4.3.5	Serie 4: Biotinylierung und Fluoreszenzmarkierung	83
5	Nebenprojekt: Synthese von AW9	87
5.1	Aufgabenstellung	87
5.2	Ergebnisse und Diskussion	89
5.2.1	Überblick	89
5.2.2	Synthese 1: Pd-katalysierte Arylierung	89
5.2.3	Synthese 2: Einstufige Imidazoleinführung	92
5.2.4	Synthese 3: Imidazolaaufbau + <i>late-stage</i> Bromierung	93
5.2.5	Synthese 4: Imidazolaaufbau + frühe Triazoleinführung	96
5.2.6	<i>Up-scaling</i> der vierten Synthese	99
5.3	Zusammenfassung	101
6	Zusammenfassung	103
6.1	Photoaffinitätsmarkierung von PPAR β/δ -Liganden	103
6.2	Off-Target Aufklärung von DG172	105
6.3	SAR und Targetaufklärung von ISX-9	107
7	Experimenteller Teil	110
7.1	Allgemein	110
7.1.1	Anmerkung	110
7.1.2	Allgemeine Arbeitsweise	110
7.1.3	Mikrowellenreaktionen	110
7.1.4	Kugelrohrdestillation	110

7.1.5	Hochvakuum	111
7.2	Analytik	111
7.2.1	Flüssigkeitschromatographie	111
7.2.2	Kernmagnetresonanzspektroskopie (NMR)	111
7.2.3	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie + Massenspektroskopie (HPLC-MS)	112
7.2.4	Hochauflösende Massenspektroskopie (HRMS)	112
7.2.5	Elementaranalytik (EA)	112
7.2.6	Schmelzpunktbestimmung (MP)	112
7.3	Photoaffinitätsmarkierung von PPAR β/δ -Liganden	113
7.3.1	Synthese des ST247-Derivats für die PA-Markierung	113
7.3.2	Synthese eines neuen <i>N</i> -methylierten PPAR β/δ -Liganden	116
7.3.3	Ausgewählte NMR-Spektren	119
7.4	<i>Off-Target</i> Aufklärung von DG172	122
7.4.1	Synthese von LD222	122
7.4.2	Synthese von LD253	127
7.4.3	Ausgewählte NMR-Spektren	129
7.5	SAR und Targetaufklärung von ISX-9	134
7.5.1	Allgemeine Vorschrift 1: Synthese der Säurechloride	134
7.5.2	Allgemeine Vorschrift 2: Synthese der Carboxamide	134
7.5.3	Allgemeine Vorschrift 3: Synthese der 2-Hydroxy-4-oxo-but-2-enoate	134
7.5.4	Allgemeine Vorschrift 4: Synthese der Isoxazole	135
7.5.5	Allgemeine Vorschrift 5: Synthese der Carboxamide	135
7.5.6	Serie 1: Bestimmung der Kernstruktur	136
7.5.7	Serie 2: Amidvariationen	143
7.5.8	Serie 3: Arylvariationen	154
7.5.9	Serie 4: Biotinylierung und Fluoreszenzmarkierung	169
7.5.10	Ausgewählte NMR-Spektren	174

7.6	Nebenprojekt: Synthese von AW9	181
7.6.1	Anmerkung	181
7.6.2	Synthese 3: Imidazol Aufbau + <i>late-stage</i> Bromierung	181
7.6.3	Synthese 4: Imidazol Aufbau + frühe Triazoleinführung	184
7.6.4	Ausgewählte NMR-Spektren	189
8	Strukturverzeichnis	192
8.1	Photoaffinitätsmarkierung von PPAR β/δ -Liganden	192
8.1.1	Synthese des ST247-Derivats für die PA-Markierung	192
8.1.2	Synthese eines neuen <i>N</i> -methylierten PPAR β/δ -Liganden	192
8.2	Off-Target Aufklärung von DG172	193
8.2.1	Synthese von LD222	193
8.2.2	Synthese von LD253	194
8.3	SAR und Targetaufklärung von ISX-9	194
8.3.1	Serie 1: Bestimmung der Kernstruktur	194
8.3.2	Serie 2: Amidvariationen	195
8.3.3	Serie 3: Arylvariationen	196
8.3.4	Serie 4: Biotinylierung und Fluoreszenzmarkierung	197
8.4	Nebenprojekt: Synthese von AW9	198
8.4.1	Synthese 3: Imidazol Aufbau + <i>late-stage</i> Bromierung	198
8.4.2	Synthese 4: Imidazol Aufbau + frühe Triazoleinführung	199
9	Referenzen	200
10	Anhang	210
10.1	Lebenslauf	210
10.2	Summary	211

Abkürzungsverzeichnis

clogD	Verteilungskoeffizient
clogP	Partitionskoeffizient
cHex	Cyclohexan
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC₅₀	Mittlere effektive Konzentration
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EM	Elektronenmikroskopie
FBS	Fetales Kälberserum
GLI2	Gliom-assoziiertes Onkogen 2
HBA	Wasserstoffbrückenakzeptor
HBD	Wasserstoffbrückendonator
HOBt	Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IC₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
IL	Interleukin
LBD	Ligandenbindungsdomäne
MPLC	<i>Medium performance liquid chromatography</i>
MTBE	2-Methoxy-2-methylpropan
MW	Molmasse
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NMR	Kernmagnetresonanzspektroskopie
o2s	Über zwei Stufen

PEG	Polyethylenglykol
RNA	Ribonukleinsäure
SAR	Struktur-Aktivitäts/Wirkungs-Beziehung
S_N2	Bimolekulare, nukleophile Substitution
TBS	<i>Tert</i> -Butylsilylchlorid
UV	Ultraviolette Strahlung

1 Einleitung

Die Geschichte der Arzneimittelforschung und -anwendung reicht bis ins 3. Jahrtausend vor Christus zurück und zeugt von einem stetigen Wandel. Bevor die Pharmazie als wissenschaftliche Disziplin begriffen wurde, basierte der Fortschritt vor allem auf empirischen Entdeckungen und war somit glücklichen Zufällen geschuldet. Darüber hinaus fand die Applikation pharmazeutischen Wissens zumeist in Verbindung mit religiösen oder spirituellen Handlungen statt. Erst im Laufe der Zeit entwickelte sie sich evolutionär weiter und alte Ansichten sowie Praktiken wurden durch neu aufkommende Technologien und Dogmen ersetzt.¹

Paracelsus (eigentlich Theophrastus Bombast von Hohenheim, 1493/4 – 1541) gilt als Vordenker der wissenschaftlichen Betrachtung des *bis dato* volksmedizinisch eingesetzten Wissens. Durch Verlagerung des Fokus auf die Inhaltsstoffe der Heilpflanzen und damit einhergehend der Ablehnung der spirituellen Lehren Galens (eigentlich Galenos von Pergamon, 129/130 – 205/215) gilt er als Mitbegründer der modernen medizinischen Chemie.²

Der nächste Meilenstein erfolgte erst Anfang des 19. Jahrhunderts als es Forschern gelang, einzelne Naturstoffe gezielt aus den entsprechenden Pflanzen zu isolieren und zu charakterisieren (**Abbildung 1**). Die Isolierung von Morphin **1** aus Opium durch Friedrich Wilhelm Adam Sertürner im Jahr 1806 wird dabei als Meilenstein angesehen. Darüber hinaus seien neben zahlreichen weiteren Beispielen Chinin **2** aus den Chinarindensäulen (1820, durch Joseph Pelletier und Joseph Bienaimé Caventou) sowie Kokain **3** aus dem Cocastrauch (1860, durch Albert Niemann) genannt.^{3,4}

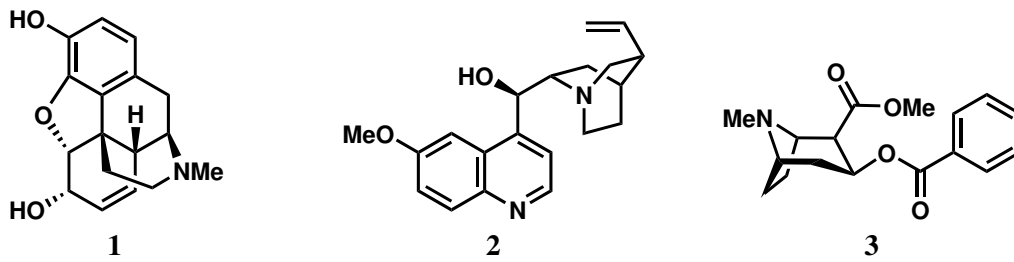


Abbildung 1: Morphin **1** (1806), Chinin **2** (1820) und Kokain **3** (1860) als Beispiele für gezielte Isolierungen von Naturstoffen, die erstmals im 19. Jahrhundert erfolgten.

Damit einhergehend wurden zudem die ersten synthetischen Präparate hergestellt, wobei das bei Bayer 1897 entwickelte Aspirin[®] (ASS, Acetylsalicylsäure) als wohl berühmtestes Beispiel gilt. Ein weiterer Höhepunkt dieses „goldenen Zeitalters“ war die Entdeckung des Penicillins durch Alexander Fleming 1928.^{5,6}

Bis heute fand ein revolutionärer Wandel statt. Zunächst wurden die präparativen Techniken und Möglichkeiten der synthetischen Chemie enorm verbessert und ausgeweitet, wodurch nun eine große Zahl an Natur- und Wirkstoffen zugänglich ist. Durch den Einsatz von Computern konnten nicht nur immer größere Mengen an Daten ausgewertet werden, sondern in Verbindung mit modernsten Strukturaufklärungsmethoden mittlerweile auch Wirkstoffkandidaten virtuell generiert und in Bindungstaschen eingepasst werden (*Docking*). Weitere bisher ungeahnte Optionen bieten Fortschritte in der Gentechnik, wodurch neue Therapieansätze und Testungsmodelle zur Verfügung stehen.

Im Folgenden sollen theoretische Überlegungen sowie die Entwicklung eines Wirkstoffs mit Hilfe modernster Methoden beleuchtet werden.

1.1 Rationalen der Wirkstoffentwicklung

Bevor heutzutage ein neuartiger Arzneistoff entwickelt und zugelassen wird, müssen zahlreiche Fragestellungen hinreichend beantwortet und geklärt werden. An vorderster Stelle stehen leider häufig die wirtschaftlichen Interessen des Pharmakonzerns, welcher entscheiden muss, ob für die betreffenden Symptome oder die entsprechende Krankheit neue Therapieansätze medizinisch notwendig sind und damit einhergehend auch ein wirtschaftlicher Nutzen generiert werden kann. Darauffolgend schließt sich eine wissenschaftliche Analyse an, welche die Basis für alle weiteren Prozessschritte darstellt.⁷

Durch Sichtung des aktuellen Forschungsstandes über den medizinischen Befund kann zumeist ein detailliertes Bild der involvierten Gene und Proteine des Menschen und/oder des Erregers erstellt werden. Bei komplexen Krankheiten wie Krebs, wo eine Vielzahl von Faktoren involviert sind, ist dies jedoch bis heute nicht trivial. Auf dieser Basis müssen die vielversprechendsten Ansatzpunkte für die geplante Therapie ausgemacht werden, aus denen letztendlich nach abschließender Einschätzung ein oder mehrere *Targets* hervorgehen.⁸

Eine zentrale Rolle bei der Einordnung dieses Wissens spielt die *druggability*, welche eine Erfolgswahrscheinlichkeit für die Regulierung des *Targets* mit Hilfe des zu entwickelnden Liganden angibt. Die Möglichkeiten sind nicht grenzenlos, da vermutet wird, dass nur lediglich 5% des menschlichen Genoms für krankheitsrelevante und therapierbare *Targets* codieren. Durch Vergleich mit bereits bekannten und verwandten Proteinen oder Proteinklassen (*Targets* können z.B. auch RNAs sein) kann eine erste Abschätzung erfolgen.⁹

Der geplante Wirkmechanismus am Zielprotein muss genau formuliert und im Laufe der Entwicklung stets validiert werden. Oftmals wird versucht, endogene Liganden mit weitaus affineren Substanzen in Konkurrenz treten zu lassen. Je nach Klassifizierung kann darauffolgend das Protein blockiert werden (Antagonist) oder eine modulierte Funktion erfolgen, die wiederum entweder verstärkt (Agonist) oder abgeschwächt (inverser Agonist) ist.

Des Weiteren können jedoch auch in einigen Fällen Inhibitoren zum Einsatz kommen, die eine Protein-Protein-Interaktion durch Blockierung der Kontaktstelle unterbinden. Unabhängig von der Wirkung muss das Repertoire an biologischen Testungsmethoden (z.B. Assays) ausreichend groß und präzise sein, um eine gute Charakterisierung der generierten Kandidaten zu gewährleisten.¹⁰⁻¹²

1.2 Struktur-basiertes Wirkstoffdesign (SBDD)

Wie durch den Namen vorgegeben, stützt sich die Struktur-basierte Wirkstoffentwicklung oder *structure-based drug design* (SBDD) auf eine im Vorfeld aufgeklärte Struktur des *Targets*. Konträr dazu ist das Liganden-basierte Wirkstoffdesign (LBDD, s. 2.1), bei dem die Optimierung der Liganden ohne strukturelle Informationen zum Zielprotein erfolgen muss. Beide sind jedoch iterative Prozesse, die durch Rückkopplungen (*feedback loops*) ständig eine Optimierung der aktuell besten Liganden erzielen sollen.¹¹

Nachdem eine erfolgreiche Herstellung sowie Aufreinigung des entsprechenden Proteins etabliert wurde, kann die Aufklärung der Targetstruktur im Wesentlichen auf drei verschiedene Arten erfolgen, die sich nicht zwingend ausschließen müssen. Entweder mittels direkter Verfahren mit unterschiedlicher Genauigkeit (Kristallisation, Kryo-EM, NMR) oder durch Anwendung eines indirekten Vergleichs verwandter Strukturen.

Zumeist wird ein Kristallisationsscreen angestrebt, wobei durch Roboter zahlreiche Bedingungen mit initialen Liganden (etablierte, endogene, etc.), verschiedenen pH-Werten (Pufferlösungen), Temperaturen und unterschiedlichen Additiven (Salze, Präzipitanten, weitere Optionale) getestet werden, die danach im Labor manuell zu reproduzieren sind. Proteinkristalle lassen sich anschließend mittels Röntgenstrahlung (zumeist an einem Synchrotron) vermessen und per IT-Methoden zu einem dreidimensionalen Modell des Bindungsmodus verfeinern. Vorteile dieser Methode sind nebst der hohen Auflösung von teilweise $< 2 \text{ \AA}$, unter anderem sichtbare und für den Bindungsmodus entscheidende Wassermoleküle. Es muss jedoch bedacht werden, dass Proteindynamiken durch diese Methode nicht abbildbar sind. Bindungsmodi können tatsächlich beträchtlich von der Modellierung abweichen, wenn z.B. der neue, synthetische Ligand eine geometrische Veränderung ganzer Regionen durch seine Interaktion hervorruft. NMR-Techniken können diese Dynamiken auflösen, da sich hier das Protein im gelösten Zustand befindet, jedoch ist die Genauigkeit dieser Methode der Kristallisation unterlegen.¹³

Wenn beide genannten Ansätze nicht zum Erfolg führen, können über die Homologie, also den Vergleich zu verwandten Proteinen, ebenfalls wertvolle Informationen resultieren. Hierbei werden die Sequenzen analysiert und dadurch konservierte Bereiche ausgemacht, die mit höherer Wahrscheinlichkeit eine ähnliche Faltung aufweisen. Darauffolgend muss die Bindetasche am Zielprotein identifiziert und klassifiziert werden. Je nach Fall kann es sich entweder um ein aktives Zentrum oder z.B. eine allosterische Bindung handeln. Heutzutage sind solche Voraussagen unter Zuhilfenahme von Software möglich, dennoch zuletzt stets vom Erfahrungsschatz der Forscher abhängig.¹⁴

1.2.1 *Hit*-Erzeugung und -Optimierung

Bekannte Liganden können den Ausgangspunkt bilden, um eine Anfangsstruktur (*Hit*) zu erzeugen, dabei ist vor allem an die endogenen Substrate des Proteins zu denken. Des Weiteren ist es gängige Praxis, bereits veröffentlichte, aktive oder in klinischen Studien gescheiterte Substanzen als Startpunkt für neue Optimierungen zu benutzen. Es kommt auch vor, dass bereits vermarktete Wirkstoffe (oftmals *first-in-class*) als Vorbild für sehr ähnliche, neue aktive Substanzen (*follow-on* oder *me-too*) dienen, welche den selben Wirkmechanismus haben, jedoch auch Verbesserungen hinsichtlich ihrer Effizienz oder Therapiebreite bieten können.¹⁵

Das sogenannte *high-throughput screening* (HTS) ist ein Verfahren, welches sehr große Moleküldatenbanken (bis zu Millionen) mit relativ hohen Molmassen (300-500 g/mol, **Abbildung 2**) erfordert. Hierbei wird sich hauptsächlich der sogenannten *small molecules* bedient, welche nicht komplex sind aber aufgrund ihrer Vielfalt in den meisten Fällen zu spezifischer Adressierung der Bindungstasche oder gewisser Untereinheiten führen können. Bei möglichst guter Erfüllung der *Lipinski rule of five* werden sie oftmals auch ferner als *drug-like* eingestuft. Ein Nachteil dieses Verfahrens besteht in der logistischen Organisation, da die Testung eines solchen Umfangs nur automatisiert stattfinden kann und sämtliche Moleküle vorrätig sein müssen.^{Rees2004, 16,17}

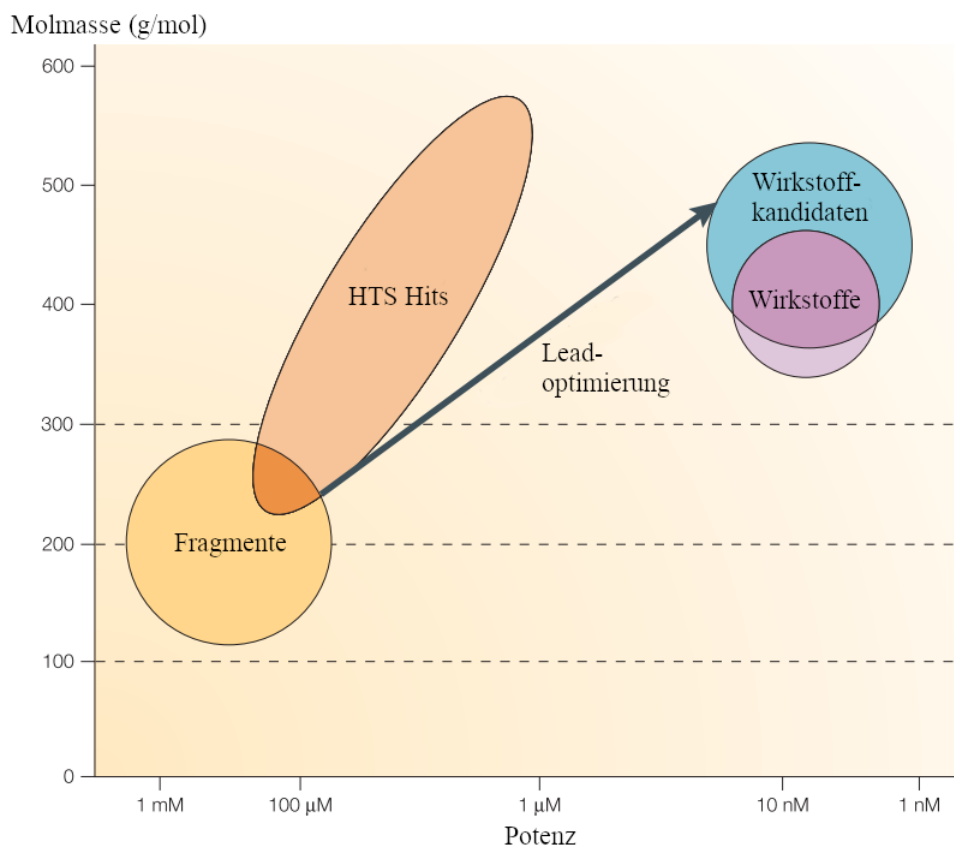


Abbildung 2: Auftragung der Molmassen gegen die Potenz von Fragmenten und HTS *Hits* mit Entwicklung beider über die Leadoptimierung zu neuen Wirkstoffkandidaten und finalen Wirkstoffen. Nach: Rees, Congreve, Murray und Carr.^{Rees2004}

Heutzutage wird auch verstärkt auf Computer-gestützte Methoden zurückgegriffen, um kleinere und vor allem virtuelle Datenbanken in die ausgemachte Bindetasche einzupassen. Bei diesem Verfahren kommen oft *small fragments* zum Einsatz, welche rudimentäre „Bruchstücke“ darstellen, der *rule of three* folgen und Molmassen um die 200 Da haben. Dieser Ansatz stellt höhere Anforderungen an die synthetische Chemie, da die Vorgabe des Hits hier abstrakter ist als im Vergleich zum HTS mit spezifischeren Molekülen. Ferner besteht jedoch auch die Möglichkeit der Nutzung von *small molecules* oder *drug-likes*. Darüber hinaus können in der *de novo*-Erzeugung auch mehrere kleine Fragmente genutzt werden, um einzelne Untereinheiten einer Bindetasche zu adressieren und durch geschicktes Verbinden einen neuen *Hit* zu erzeugen.^{11,18}

Schlussendlich muss anhand der besten *Hits* entschieden werden, welche Moleküle für eine *lead*-Serie geeignet sind. Hierbei gilt es im Sinne der Risikominimierung als sinnvoll, nicht nur auf eine Serie zu setzen, da ein späteres Scheitern stets möglich ist. Die Statistik zeigt auf, dass heutzutage ca. 40% aller *Hits* schon bekannte Vorbilder haben und des Weiteren ca. 30% auf HTS zurückzuführen sind.¹⁰

Der wichtigste Parameter bei der *hit-to-lead*-Optimierung ist neben der Potenz (IC_{50} , EC_{50}) die Lipophilie und damit verbunden der Verteilungs- bzw. Distributionskoeffizient ($clog P$, $clog D$). Oftmals werden Optimierungen dieser Parameter hauptsächlich schon durch vier verschiedene Transformationen erzielt. Diese können entweder die Einführung von aromatischen Stickstoffen nebst eventueller Methylierung sowie Fluorierung von Aromaten oder der Einbau weiterer Hydroxylgruppen sein.¹⁹

Allgemeiner werden also die pharmakokinetischen ADMET Parameter sowie die metabolische Stabilität optimiert und ferner auch Dosis-Wirkungs-Beziehungen charakterisiert (Pharmakodynamik). Abschließend wird so durch fortschreitende Evolution des *leads* ein *clinical candidate* generiert.

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Liganden-basiertes Wirkstoffdesign (LBDD)

In den folgenden zwei Kapiteln soll die Optimierung eines *Hits* aus phänotypischen Screeningexperimenten ohne jegliche Kenntnisse über das *Target* erläutert werden. Dieses sogenannte Liganden-basierte Wirkstoffdesign stützt sich auf verschiedene Ansätze zur Erstellung einer Struktur-Aktivitätsbeziehung (SAR) (2.1.1, 2.1.2), sowie Aufklärungsmethoden hinsichtlich des *Targets* und dem entsprechenden Bindungsmodus (2.2). Derartige Ansätze besitzen auch noch heutzutage, in Zeiten modernster IT-Methoden und vollständiger Entschlüsselung des menschlichen Genoms (und die damit verbundene Identifizierung von zahlreichen Zielgenen und -proteinen), ihre Gültigkeit. Dies manifestiert sich z.B. in dem Fakt, dass immer noch 37% aller *first-in-class* NMEs (*new molecular entities*) aus phänotypischen Screens stammen, bei denen das *Target* zumindest am Anfang der Forschung nicht bekannt war. Außerdem konnte bei 7% aller auf dem Markt vorhandenen Wirkstoffe insgesamt bis heute kein Zielprotein zugeordnet werden (z.B. Paracetamol). Es ist also sinnvoll, auch die Möglichkeiten der Ligandenoptimierung ohne strukturelle und mechanistische Informationen aufzuzeigen.^{3,20}

2.1.1 Primäre SAR

Ein (Liganden-basiertes) SAR-Projekt lässt sich prinzipiell in zwei aufeinanderfolgende Handlungsbereiche aufteilen. Zunächst werden auf Basis des ausgewählten *Hits* theoretische Überlegungen zur systematischen Heransgehensweise bezüglich der Erkundung des chemischen Raumes getätigt, die den weiteren Verlauf der Darstellung von Derivaten im Wesentlichen bestimmen. Dies kann entweder z.B. ohne Präferenz für bestimmte Regionen des Moleküls erfolgen (globale Erkundung) oder sich auf einzelne Substrukturen des Moleküls fokussieren und andere zunächst außer Acht lassen (topologische Erkundung). Durch diese grundlegende Vorgehensweise lässt sich auch ohne Informationen zum *Target*, die beim SBDD schon früh in den Designzyklus einfließen, eine minder zielgerichtete aber dennoch stringente Optimierung des entsprechenden Liganden erzielen.

Erst nach Abschluss aller Planungsschritte und Selektion der gewünschten Moleküle beginnt die eigentliche Synthese sowie weitergehend die Testung und Auswertung der erhaltenen Ergebnisse. Diese können auch mit Hilfe von IT-Methoden näher klassifiziert und informatongewinnend eingesetzt werden. Nachfolgend wird zunächst auf die theoretischen Überlegungen der Herangehensweise an eine SAR eingegangen, als Grundlage dient dabei Wermuth's *The Practice of Medicinal Chemistry*.²¹

Die topologische Erkundung zielt darauf ab, einzelne Bereiche des Moleküls chemisch zu erkunden und soweit wie möglich zu optimieren. Erst in nachfolgenden Schritten wird der Erkenntnisgewinn aus struktureller Variation und Identifizierung essentieller Funktionen durch Zusammenführung zu einem neuen Gesamtkandidaten finalisiert. Die Deskriptoren der einzelnen Teilsereien bedienen sich dabei oft geografischer Termini, wie z.B. Nordteil, Südfragment etc. Die Unterteilung findet dabei nicht willkürlich statt, sondern anhand ausgemachter Struktur motive und Funktionen sowie synthetischen Gesichtspunkten.

Ein selbstgewähltes Beispiel für eine solche Aufteilung wird im Falle des Cholesterinspiegel senkers Atorvastatin **4** (*Lipitor*[®], *Pfizer*) nachfolgend beschrieben (**Abbildung 3**). Dabei soll außer Acht gelassen werden, dass es sich hierbei um einen optimierten Wirkstoff handelt und *Screeninghits* meistens von geringer Komplexizität sind.

Der zentrale Teil wird von einem fünffach-substituiertem Pyrrol gebildet. *N*-substituiert wird der Ostteil durch eine (*R,R*)-3,5-Dihydroxyheptansäure gebildet. Im Uhrzeigersinn folgen im Südosten ein 4-Fluorophenyl-, bzw. ein nicht weiter substituierter Phenylring (Südwesten), anschließend ein Phenylcarbamoyl- im Westen und schlussendlich ein Isopropylrest im Norden.

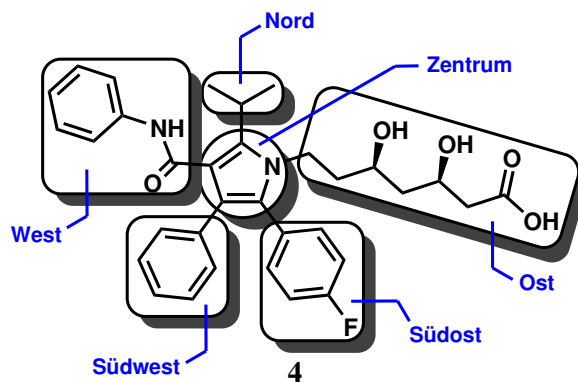


Abbildung 3: Eigenes Beispiel der topografischen Aufteilung eines Moleküls anhand von Atorvastatin zur Erkundung des chemischen Raums innerhalb einer SAR.

Nachfolgend können diese Regionen anhand von drei Prinzipien modifiziert werden, welche die Molekülkomplexizität auf unterschiedliche Weise beeinflussen. Eine Derivatisierung sollte hierbei in möglichst kleinen Schritten bzw. durch nicht zu große Änderungen der Molekülstruktur erfolgen. Nur so lässt sich ein direkter Einfluss der jeweils eingebrachten Modifizierung mit Assayergebnissen korrelieren. Ausschlaggebend sind hierbei die verfügbaren Syntheserouten, die die Flexibilität und den Handlungsspielraum entscheidend beeinflussen. Der medizinische Chemiker muss also stets zwischen potentielltem Informationsgewinn, genereller Realisierbarkeit sowie Zeit- und Kostenaufwand abwägen.

2.1.1.1 Reduktion der Komplexizität

Durch gezieltes, schrittweises Entfernen funktioneller Gruppen resultiert eine reduzierte Form der entsprechenden Einheit (**Abbildung 4**). Ziel ist es, alle für die Aktivität unnötigen Substitutionen in einem frühen Stadium auszumachen, da diese den weiteren Verlauf der SAR andernfalls stören könnten. Ferner ist es ratsam, etwaige Stereo-zentren durch ihre racemischen Analoga zu ersetzen, was die Synthese häufig sehr vereinfacht. Hierbei gilt der Grundsatz, dass bei einem gänzlich unwirksamen Racemat auch die jeweiligen Enantiomere nicht aktiv sind. Im Allgemeinen ist es einfacher, die richtige Konfiguration der Stereozentren nach abgeschlossener Klärung der Grundstruktur zu identifizieren. Es darf nicht außer Acht gelassen werden, dass andernfalls die Anzahl der Stereozentren (n) die Summe potentiell zu untersuchender Derivate um den Faktor 2^n beeinflusst!

Im Beispiel des (*R,R*)-3,5-Dihydroxyheptansäurerestes **5** sollte zunächst das entsprechende Racemat **6** verwendet werden. Ferner können per struktureller Reduktion im ersten Schritt die 3-Hydroxyheptansäure **7** und 5-Hydroxyheptansäure **8** erhalten werden. Weitergehend resultiert nach einem zusätzlichen Schritt die unmodifizierte Heptansäure **9**.

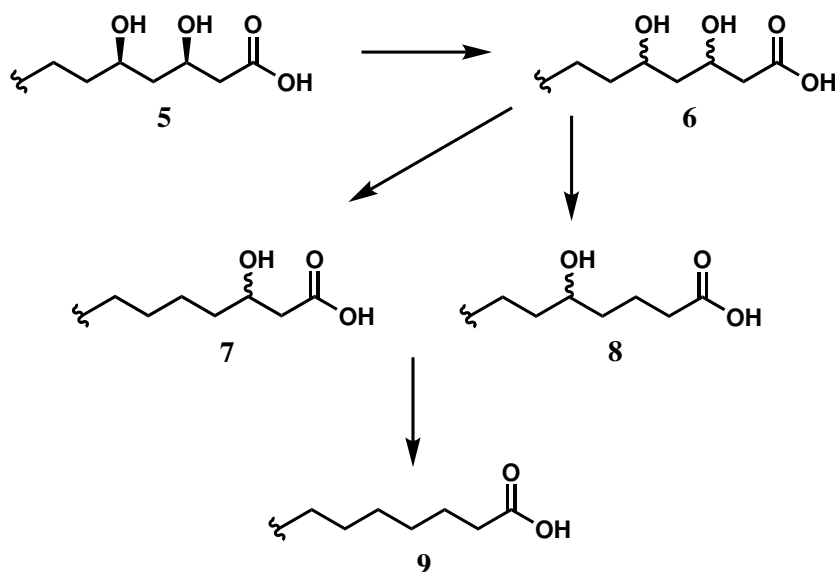


Abbildung 4: Demonstration der Prinzipien der Vereinfachung und strukturellen Reduktion zur Findung des Kernmotivs anhand eines (*R,R*)-3-5-Dihydroxyheptansäurerestes **5**.

2.1.1.2 Erhaltung der Komplexizität

Durch Verwendung von Analoga kann die Komplexizität aufrecht erhalten werden. Insbesondere die Bioisosterie sowie ferner Funktionsinversionen und allgemeiner die Betrachtung von Substitutionsmustern spielen hierbei eine Rolle. Unter Bioisosterie versteht man die Erhaltung der Aktivitäts- bzw. Bindungseffekte durch relativ ähnliche funktionelle Gruppen und Moleküle. Diese Ähnlichkeit ist nach Definition von Burger anhand von Form und Volumen, Elektronenverteilung, sowie physikalischer Eigenschaften charakterisiert.²²

Das Phenyl-Südwestfragment (*grün*) (**Abbildung 5**) könnte z.B. durch Thiophen oder Pyridin mit gleichzeitiger Abbildung der möglichen Substitutionspositionen ausgetauscht werden.

Im Westen böte sich die Umkehr des Phenylcarbamoylrestes (*blau*) in das entsprechende *retro*-Amid an. Ebenfalls ließe sich das Fluorierungsmuster des südöstlichen Teils (*pink*) zunächst von *ortho* auf *meta* und *para* ändern und weitergehend der Austausch mit dem bioisosteren Proton zum Phenylrest durchführen.

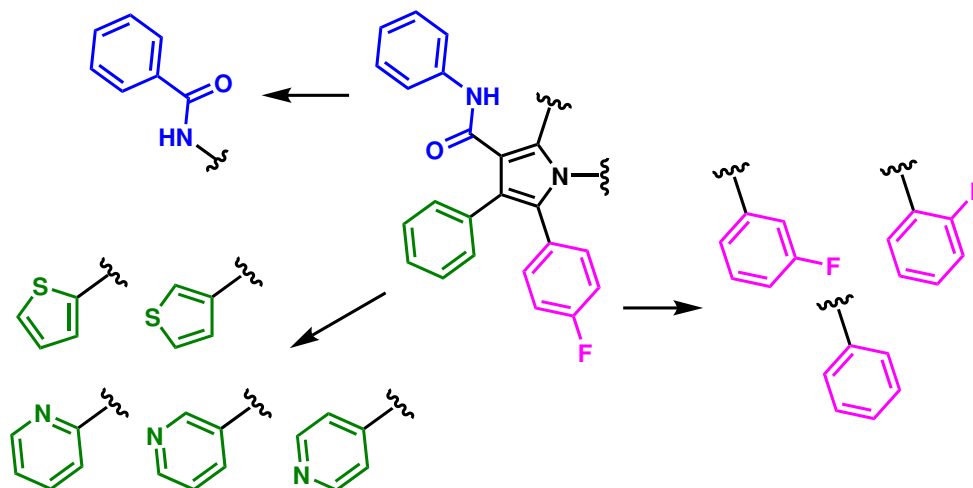


Abbildung 5: Beispiel einiger möglicher Analoga von **4** anhand modifizierter Südost- bzw. Südwest-, sowie Westfragmente unter Beibehaltung der initialen Molekülkomplexität.

2.1.1.3 Erhöhung der Komplexität

Der dritte Ansatz zur Modifizierung eines Liganden innerhalb einer SAR-Studie erhöht die Komplexität durch Vergrößerung oder Wachstum einzelner Komponenten. Hierdurch lassen sich iterativ z.B. erste Abgrenzungen bezüglich der Größe einer potentiellen Bindetasche definieren. Des Weiteren sei hier auch der Einsatz von sogenannten (*non*)-*symmetrical twin drugs* genannt. Unter diesem Konzept versteht man das Zusammenführen zweier Ligandmoleküle zu einem neuen Wirkstoffkandidaten. Logischerweise ermöglicht insbesondere die Zunahme an Komplexität eine schier endlose Vielfalt potentieller Derivate und muss deswegen sinnvoll begrenzt werden.

Vereinfacht dargestellt lässt sich der Nordteil aus dem vorherigen Beispiel **4** (**Abbildung 6**) durch den Einbau von Methylengruppen verlängern und zusätzlich der Verzweigungsgrad beliebig variieren. Ferner kann anstelle des Isopropylrests auch ein Kohlenstoffring, wie z.B. Cyclopentan oder -hexan, zur Erkundung des sterischen Anspruchs eingeführt werden.

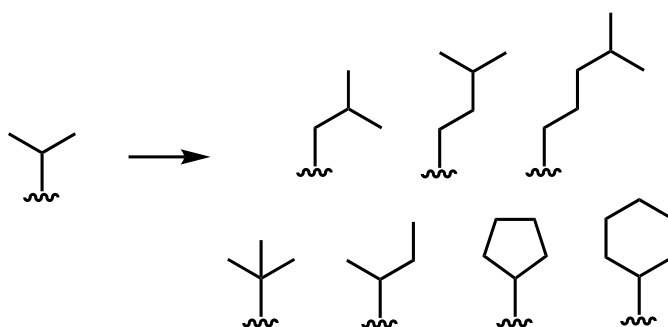


Abbildung 6: Einführung von zusätzlichen Methylengruppen und Erhöhung des Verzweigungsgrades als potentieller Ansatz zur Erhöhung der Komplexizität.

2.1.2 Computergestützte Methoden (CADD)

Wie bereits erwähnt, kann die Liganden-basierte Wirkstoffentwicklung komplementär auch auf computergestützte Methoden zurückgreifen. Dieser Ansatz wird im Allgemeinen dann als *computer-aided drug design/discovery* (CADD) bezeichnet. Das fundamentale Prinzip beruht auf der Annahme, dass strukturell ähnliche Moleküle auch eine ähnliche Funktion hervorrufen. Es wird hierbei also im Gegensatz zu einer experimentellen SAR nicht iterativ erkundet, sondern direkt aus der Ligandenstruktur und bekannter Wirkung die nötige Information abgeleitet und durch mathematische Deskriptoren wiedergegeben. Diese wiederum können als Suchanfrage dienen, um große Moleküldatenbanken mit bis zu mehreren Millionen Einträgen zu durchsuchen und weitere, potentiell aktivere Substanzen zu finden. Je nach Vorgehensweise ergeben sich verschiedene Techniken.²³

2.1.2.1 Molekulare Ähnlichkeit

Zum einen ist es möglich, einen direkten Vergleich nur auf Grund der genannten Ähnlichkeit ausgewählter Molekülstrukturen durchzuführen und hierdurch auf die potentielle Aktivität zu schließen. Bei genauerer Betrachtung erscheint dieses Unterfangen jedoch schwierig bzw. gar unmöglich, sofern keine klar definierten Algorithmen zum Einsatz kommen. Selbst mit der Intuition eines erfahrenen medizinischen Chemikers ist man wohl kaum in der Lage die Ähnlichkeit zweier oder mehrerer Moleküle zu quantifizieren.

Aus diesem Grund hat sich die computergestützte Rechnung etabliert, denn nur so ist man in der Lage, vorurteils- bzw. kontextfrei "nüchterne" Ergebnisse zu erzielen. Jedoch können sogenannte Aktivitätsklippen, also sprunghafte Veränderungen der Aktivität durch minimale Strukturänderung, die Vorhersage an manchen Stellen zu Nichte machen und zeigen daher diesem Ansatz durchaus seine Grenzen auf.²⁴

Zur Illustration dieses Effekts lassen sich zum Beispiel drei verschiedene VEGFR2-Liganden (*vascular endothelial growth factor receptor type 2*) vergleichen (**Abbildung 7**). Während man zwischen den augenscheinlich nicht sehr ähnlichen Verbindungen **10** und **11** eine vergleichbare Aktivität feststellt, lässt sich dieses für das ähnliche Paar von **10** und **12** nicht sagen. Es gibt also nicht immer einen vorhersagbaren, direkten Zusammenhang zwischen horizontaler (ähnliche Wirkung) und vertikaler Beziehung (ähnliche Struktur).²⁵

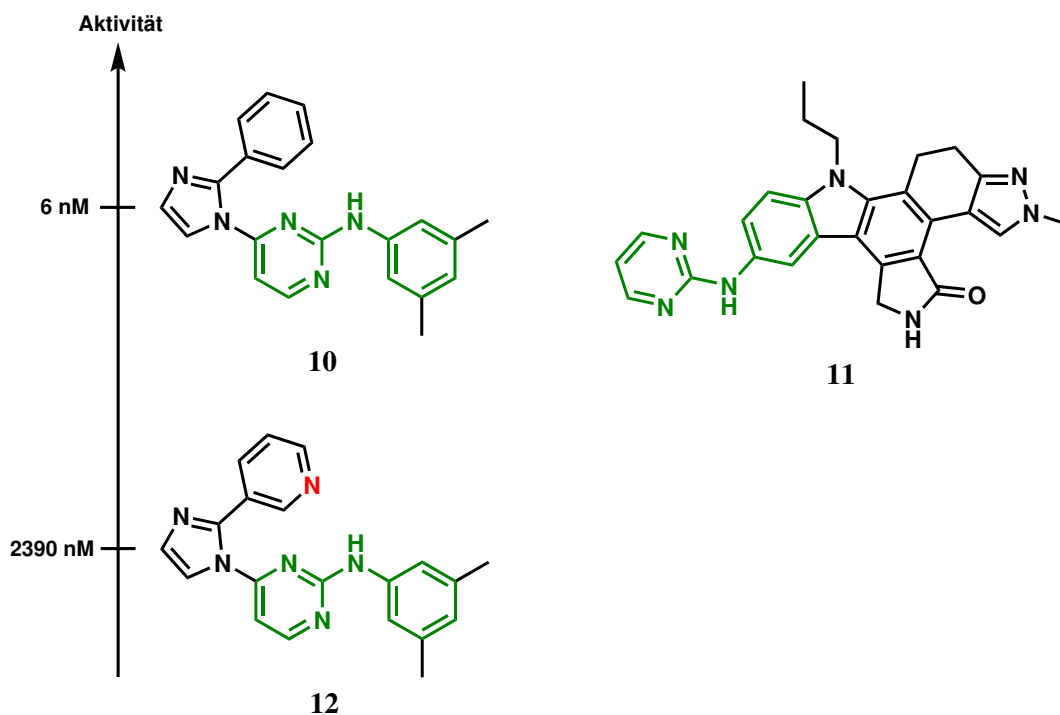


Abbildung 7: Demonstration einer Aktivitätsklippe ausgewählter VEGFR2-Liganden als Grenze der berechenbaren Beziehung von Aktivität und Molekülstruktur. Nach: Stumpfe und Bajorath bzw. Maggiora, Vogt und Stumpfe.^{24,25}

Des Weiteren wird sich hauptsächlich nur auf die zweidimensionale Betrachtung beschränkt, welche einen einfacheren Ausdruck der Moleküle durch Deskriptoren ermöglicht, jedoch zumeist keine Stereoinformation enthält. Ferner muss man beachten, dass im Vergleich zur Pharmakophormodellierung (s.u.) lediglich die Gesamtheit des Moleküls, also die globale Ähnlichkeit und nicht die lokale miteinbezogen wird.

Als Grundlage für die mathematische Berechnung dienen die sogenannten *fingerprints*, Sätze verschiedener Deskriptoren zur Beschreibung der Struktur. Beispiele hierfür sind das *molecular access system* (MACCS), welcher 166 vordefinierte Strukturfragmente besitzt oder der *extended connectivity fingerprint with bond diameter four* (ECFP4), welcher die Konnektivität aller nicht-Wasserstoffatome in der Umgebung betrachtet. Je nach Wahl der Deskriptoren werden für ein bestimmtes Molekül sich in der Anzahl unterscheidende *fingerprint*-Eigenschaften gefunden.²⁵

In Kombination mit der Gewichtung dieser Eigenschaften lässt sich nun letztendlich anhand von klar definierten Formeln die Ähnlichkeit berechnen. Zumeist wird hierbei der Tanimoto-Koeffizient angewandt, welcher wie folgt berechnet wird:

$$Tc(A, B) = \frac{R(a, b, c)}{1 + R(a, b, c)}; \quad R(a, b, c) = \frac{c}{(a - c) + (b - c)}. \quad (1)$$

A und B sind hierbei zwei zu vergleichende Moleküle mit ihren entsprechenden Eigenschaften a und b . Die geteilten Eigenschaften werden durch c ausgedrückt. Der Zahlenwert von 0 bis 1 drückt die Ähnlichkeit aus, wobei Verbindungen mit $Tc = 1$ identisch wären. Ohne Angabe des *fingerprint*-Satzes ließe sich der Tanimoto-Koeffizient jedoch nicht einordnen, wie z.B. im Falle zweier Thrombininhibitoren **13** und **14** (**Abbildung 8**). Diese sehen auf den ersten Blick sehr ähnlich aus, da sie dasselbe Grundgerüst aufweisen (*grün*). Die Schnittmenge an gemeinsamen Eigenschaften c ist mit MACCS wesentlich höher als mit ECFP4 und daher ergibt sich auch ein höherer Koeffizient von $Tc_{\text{MACCS}} = 0,73$ im Vergleich zu $Tc_{\text{ECFP4}} = 0,33$. Die finale Auswahl aufgrund der weiter oben beschriebenen Berechnungen muss stets überprüft und richtig eingeordnet werden. Eine Aufgabe, die nur mit ausreichender Erfahrung gelingen kann.²⁵

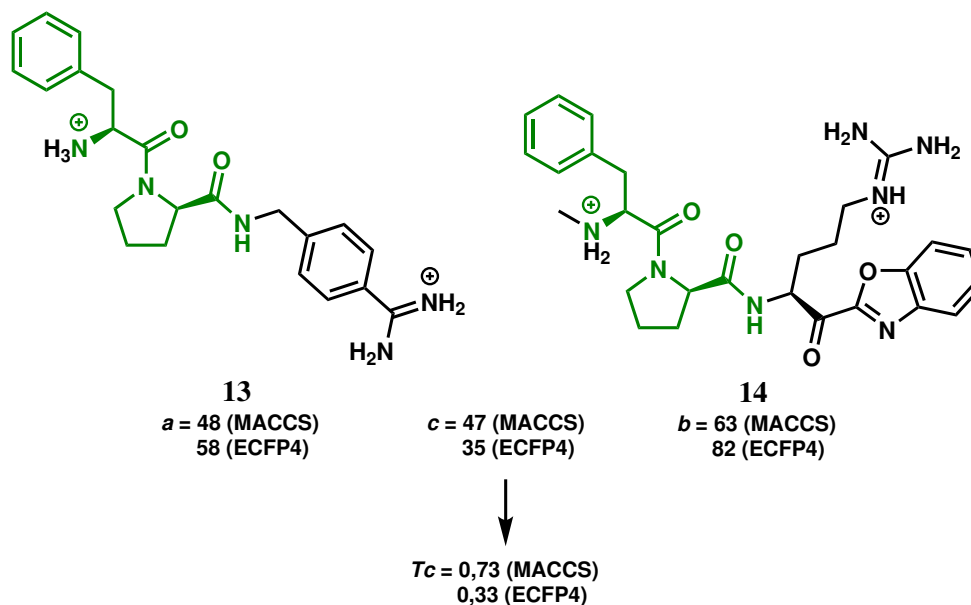


Abbildung 8: Vergleich zweier Thrombininhibitoren **13** und **14** anhand ihrer, mit zwei verschiedenen Deskriptorsätzen berechneten Tanimoto-Koeffizienten. Nach: Maggiora, Vogt und Stumpfe.²⁵

2.1.2.2 Pharmakophormodellierung

Im Gegensatz zu der hauptsächlich zweidimensional betrachteten Molekülähnlichkeit erschließt sich durch die Erweiterung auf drei Dimensionen eine weitere Methode des LBDD. Die sogenannte Liganden-basierte Pharmakophormodellierung betrachtet hierbei lokale, funktionale Ähnlichkeiten und erstellt daraus ein 3D-Deskriptormodell. Der Begriff „Pharmakophor“ ist laut IUPAC als Ensemble sterischer und elektrostatischer Merkmale betrachteter Verbindungen definiert, die für ihre Interaktion mit einem *Target* und ferner der daraus resultierenden biologischen Antwort essentiell sind.²⁶

Diese funktionalen Ähnlichkeiten, welche letztendlich einer chemischen Ähnlichkeit entspringen, können jedoch durch eine Vielzahl unterschiedlicher Struktur motive hervorgerufen werden. Das Modell vereint und vereinfacht also die funktionale Gesamtheit ausgewählter Liganden und ermöglicht so in Kombination mit entsprechenden Datenbanken einen effizienten Zugang zu alternativen und potentiell aktiveren Molekülgerüsten.

Als Beispiel sei Verbindung **15** gegeben (**Abbildung 9**), wobei Toleranzradien für die einzelnen Merkmale als Kugeln ausgedrückt sind. Diese sind unter anderem Wasserstoffbrückenakzeptoren (HBA, *rot*) sowie -donoren (HBD, *grün*), geladene oder ionisierbare Funktionen (*blau*) und hydrophobe Wechselwirkungen (HY, *gelb*). Ferner können auch π - π -Interaktionen aromatischer Ringe, sowie allgemeiner Abstände und Winkel betrachtet werden.

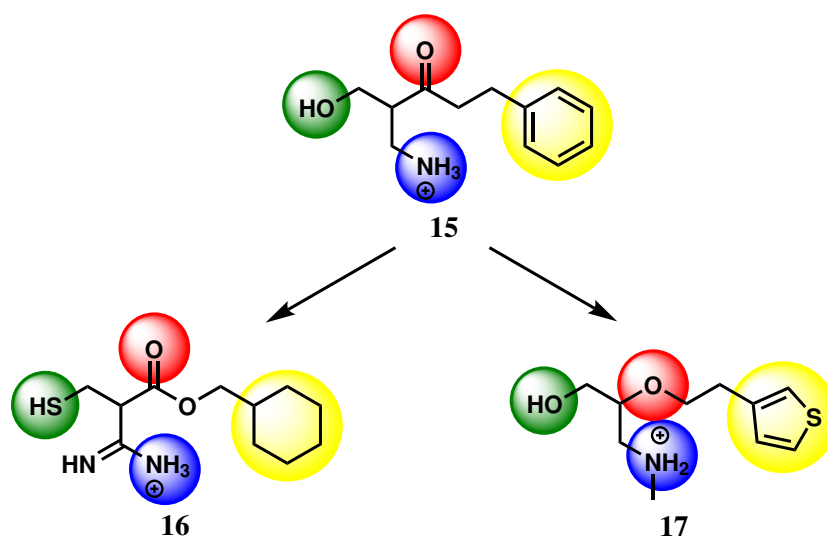


Abbildung 9: Beispielhaftes Pharmakophormodell der Verbindung **15**, sowie potentiell verwandte Moleküle **16** und **17** als Demonstration des Modells. *grün*: HBD, *rot*: HBA, *blau*: geladene Gruppe, *gelb*: HY.

Die Wirkungsweise ist anhand der verwandten Verbindungen **16** und **17** leicht zu erkennen, so können z.B. ein Thiol wie auch eine Hydroxygruppe als Wasserstoffbrückendonoren dienen und werden dementsprechend in **16** gleich kategorisiert. Ebenso wird durch diesen Ansatz die Ethergruppe in **17** als positionsgleicher Wasserstoffbrückenakzeptor angesehen, da sie sich im Vergleich zu **15** noch innerhalb des erlaubten Radius befindet. Neben den erwähnten Funktionsmerkmalen muss zusätzlich die Flexibilität der Moleküle berücksichtigt werden. Dabei wird sich Algorithmen bedient, die eine energieminierte Konformation berechnen und ausgeben. In der Regel stellt jedoch diese Energieminimierung eine gute Annäherung zur bioaktiven Konformation dar. Ferner gestaltet sich die finale Überlagerung der gewonnenen Datenpunkte vor allem bei Sammlungen inhomogener Moleküle als nicht trivial.^{27,28}

Anders als im Beispiel gezeigt, bildet zumeist ein ganzer Satz (**Abbildung 10**) aktiver Moleküle die Grundlage für die Erstellung des Modells. Dieses sogenannte *training set* bestimmt maßgeblich den Erfolg im weiteren Verlauf und kann dabei je nach Auswahl der Verbindungen zu großen Unterschieden im Pharmakophor für ein und dasselbe *Target* führen. Es lässt sich demnach bemerken, dass aufgrund der genannten Limitierungen unter Umständen relative hohe Falsch-Positiv- bzw. -Negativ-Quoten zu erwarten sind. Deshalb sollte nach abgeschlossener Erstellung der Pharmakophorhypothese diese durch ein *test set* validiert werden. In diesem Datensatz befinden sich neben einigen aktiven auch nicht aktive Moleküle, die per Suchlauf nicht als Treffer erscheinen dürfen.^{27,28}

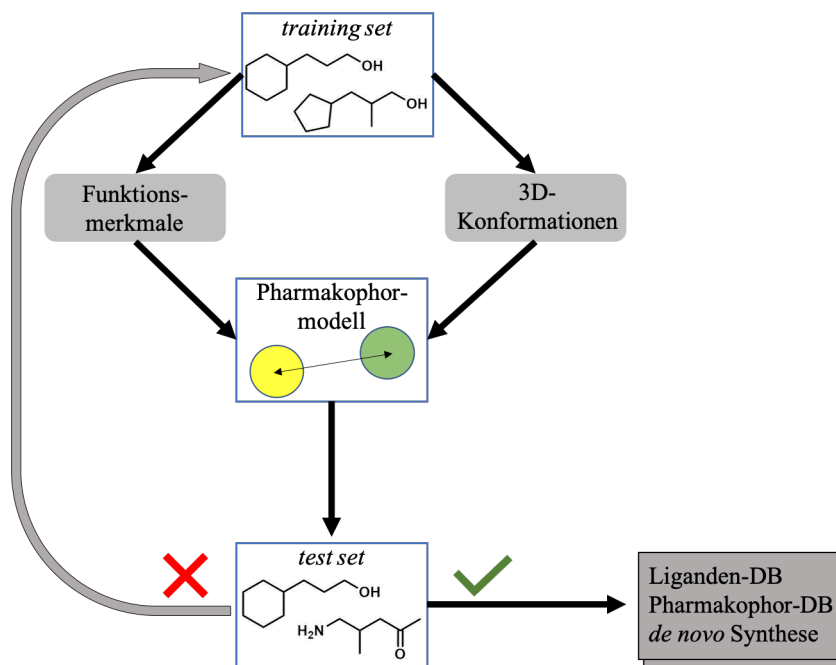


Abbildung 10: Arbeitsablauf der Erstellung, Validerung und Anwendung eines Ligandenbasierten Pharmakophormodells. Nach: Yang.²⁸

Ein derartig optimiertes Modell sollte darauffolgend in der Lage sein, als Grundlage für die Entwicklung neuer Liganden zu dienen. Eine Möglichkeit besteht im Auffinden passender Strukturen, die das Modell erfüllen. Durch diese Datenbanksuche resultieren Moleküle, welche größtenteils kommerziell erhältlich sind oder publizierte Synthesen besitzen, *ergo* schnell getestet werden können.

Vor allem für die industrielle Forschung birgt dieser Ansatz Nachteile, sofern die entsprechenden *Hits* unter Patentschutz stehen. Die *de novo* Synthese nutzt deshalb das abgeleitete Pharmakophormodell, um mittels chemischer Verbrückung der einzelnen Merkmale einen neuartigen Wirkstoff zu erzeugen. Jedoch kann dieser Ansatz an der anschließenden Rationalisierung, sowie Etablierung einer Syntheseroute scheitern. Zuletzt kann durch Vergleich mit Bindungsmodi bekannter *Targets* auch auf direktem Wege ein Zielprotein gefunden werden.

2.1.2.3 Quantitative SAR (QSAR)

Die letzten beiden Methoden betrachteten lediglich die globale Ähnlichkeit oder lokale Funktionen, um durch mathematische Ausdrücke dieser letztendlich neue und aktivere Moleküle zu finden. Durch quantitative Korrelation von Änderungen chemischer Struktur zur respektiven biologischen Aktivität ist QSAR (*quantitative structure-activity relationship*) potentiell in der Lage, noch genauere Vorhersagen zu treffen. Auch hier werden Deskriptoren generiert, die jedoch als mathematische Funktion zur Berechnung der Aktivität dienen. Im Folgenden soll der Ansatz kurz erläutert werden.

Vor allem bei dieser Methode ist eine kritische Auseinandersetzung mit den vorhandenen (Aktivitäts)-Daten nötig. Nach dem, für viele IT-Methoden generell gültigen, Leitsatz *garbage in–garbage out* wird dadurch die Brauchbarkeit eines Ergebnisses schon von vornherein bestimmt. Die Liganden sollten idealerweise möglichst variabel sein und darüber hinaus denselben Wirkmechanismus besitzen. Letzteres ist im LBDD aus Assayergebnissen allerdings nur zu erahnen, sofern weiterhin kein *Target* und dessen Struktur bekannt sind. Ferner wäre es nicht sinnvoll, wenn verschiedene Assaymethoden, -protokolle und Messgrößen genutzt würden.^{29,30}

Der Ablauf einer QSAR (**Abbildung 11**) startet nach Auswahl der Liganden nun ebenfalls mit der Ableitung von Deskriptoren (**1**). Die "klassische" QSAR bedient sich zweidimensionaler Molekülbeschreibungen und kann somit unter anderem Werte zur Konstitution (MW, Anzahl der Atome, Anzahl und Art der Bindungen), Elektrostatik (Netto- und Partialladungen), Topologie (Konnektivität der Atome), Geometrie (Moleküloberfläche und -volumen) abstrahieren oder ferner Substrukturen und *fingerprints* berücksichtigen.

3D-QSAR baut darüber hinausgehend auf berechneten Konformationen der Liganden auf und benötigt diesbezüglich zusätzliche Vorkehrungen zur Überlagerung der Datenpunkte (auf die Betrachtung einzelner 3D-Methodiken wird aus Übersichtsgründen verzichtet). Damit eine passende Auswahl relevanter und sich nicht überschneidender Deskriptoren erhalten wird, werden Filter-Algorithmen zur Optimierung eingesetzt (2). Schlussendlich wird durch (nicht-)lineare Lösungsverfahren die Korrelation der Struktur zur Aktivität hergestellt. Per Regression resultiert eine kontinuierliche Funktion, während durch Klassifizierung in simpleren Fällen eine direkte Aufteilung zwischen „aktiv“ und „nicht aktiv“ erfolgt (3).^{29,30}

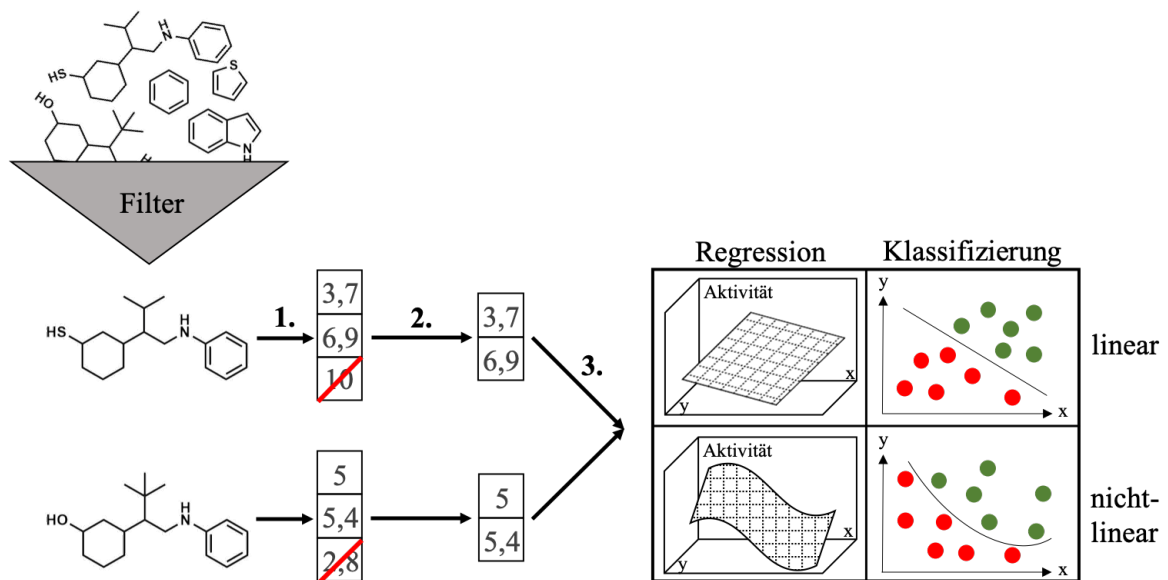


Abbildung 11: Schematischer Ablauf des QSAR-Ansatzes. 1. Deskriptorberechnung, 2. Deskriptorauswahl, 3. Modellierung. Nach Dudek, Arodz und Galvez bzw. Cherkasov, Mouratov, Fourches et al.^{30,31}

2.2 Targetaufklärung

Nach Abschluss mehrerer Optimierungsschritte im LBDD resultiert zumeist ein vielversprechender Ligand, der die gewünschten Effekte innerhalb der Validierungsmodelle zeigt oder auch seltener es aus der Forschung hinzu einer kommerziellen Erprobung geschafft hat. Ein definitives *Target* muss hierbei selbst nach klinischer Erprobung nicht immer zwangsweise identifiziert worden sein (2.1).

Die Klärung dieser Frage muss nicht nur einer akademischen Motivation entspringen, sie kann auch anwendungsbezogene Hintergründe haben, wie z.B. sich einstellende Resistenzen oder neu entdeckte Nebenwirkungen. Durch Identifizierung des Ziels sowie der weitergehenden Aufklärung des damit einhergehenden Wirkmechanismus, könnte eine verbesserte Wirkstoffgeneration am Ende eines weiteren Designzyklus stehen.

2.2.1 Affinitätschromatographie

Eines der am häufigsten eingesetzten Verfahren zur Identifizierung von Proteintargets ist die sogenannte Affinitätschromatographie. Die Nutzung biochemisch-modifizierter Liganden als Sonden zur Aufklärung von Proteinfunktionen macht sie dadurch zu einem Bestandteil der chemischen Proteomik.

Das fundamentale Prinzip beruht hierbei auf der hohen Affinität einiger Proteine zu ihren chemisch-synthetisch zugänglichen Substraten. Diese Substrate können mit aktiven Liganden verknüpft werden und dienen dadurch als eine Art „magnetischer Köder“ der, nach Einbringung in einen geeigneten Proteinmix und damit verbundener Interaktion mit dem *Target*, von der affinen „magnetischen Proteinangel“ selektiv angezogen werden kann. Das eigentliche *Target* wird somit aus der breiten Masse anderer Proteine isoliert und kann darauffolgend näher charakterisiert werden.³²

2.2.1.1 Sondendesign

Bevor jedoch dieses chemisch-biologische „Angeln“ mit den Sonden (**Abbildung 12**) stattfinden kann, müssen in der vorherigen Wirkstoffentwicklung ausreichende Informationen hinsichtlich der SAR des Liganden ermittelt worden sein.

Die essentielle, für die Wirkung ursächliche, Kernstruktur (*gelb*) ist klar von potentiellen Ankerpunkten (*dunkelgrau*) für die Substrate abzugrenzen. Darüber hinaus gilt es zu beachten, dass durch diese Modifizierung die initiale Affinität zum unbekanntem Zielprotein verringert werden könnte. Ein ohnehin unzureichend optimierter Ligand würde in diesem Verfahren aufgrunddessen keine selektiven Ergebnisse hervorrufen.

Die Affinitätseinbuße kann durch räumliche Trennung der aktiven Kernstruktur von dem neu hinzugefügten Substrat (*rot*) minimiert werden. Lineare Alkylketten dienen hierbei als bifunktionalisierte Verbindung zwischen diesen Untereinheiten (*Linker, blau*). Meistens werden Polyethylenglykole (PEG) eingesetzt, die zusätzlich durch ihre polaren Etherfunktionen die Hydrophilie der Sonde erhöhen. Je nach Sondendesign können die Längen weit über 18 Å, z.B. für die häufig eingesetzte (PEG)₃-Kette, reichen.³²

Das System aus Substrat und Affinitätsprotein wird üblicherweise durch Biotin, sowie (Strept-)avidin gebildet. Der sich ausbildende Komplex hat eine sehr niedrige Dissoziationskonstante von $K_d \approx 10^{-15}$ M und ist damit eine der stärksten, nichtkovalenten Bindungen. Biotin, auch Vitamin B₇ genannt, dient im menschlichen Körper als Kofaktor für mehrere Carboxylasen, die im Citratzyklus und Fettsäurestoffwechsel involviert sind. Von Vorteil für den Einsatz in der Affinitätschromatographie ist seine relativ inerte Struktur, da hierdurch unerwünschte Nebenreaktionen mit Ligand und/oder weiteren Proteinen während des Experiments ausgeschlossen werden können. Das tetramere Protein Avidin stammt ursprünglich aus dem Eiweiß von Vogeleiern und kann mit jeder seiner vier Untereinheiten ein Molekül Biotin binden. Eine häufiger verwendete Variation, das Streptavidin, stammt aus *Streptomyces avidinii* und ist im Gegensatz zu Avidin kein Glykoprotein.^{33,34}

Neben difunktionalisierten Sonden besteht ferner die Möglichkeit des Einbaus zusätzlicher Fluorophore zur visuellen Aufklärung des *Targets* in nachfolgenden Auftrennungsverfahren und die damit erleichterte Charakterisierung. Voraussetzung ist jedoch die kovalente Verknüpfung der Sonde mit dem Proteintarget, um den Fluorophor nach der Isolierung nicht zu verlieren. Photoaffinitätsgruppen (2.2.2) am Liganden zur kovalenten Verknüpfung zum *Target* sind hierbei das Mittel der Wahl.³²



Abbildung 12: Schematische Abbildung der Affinitätssonde mit aktivem Ligand (*gelb*) und Ankerpunkt (*dunkelgrau*), verbunden über den *Linker* (*blau*) und weiterem Ankerpunkt (*hellgrau*) mit dem Substrat (*rot*). Diese Sonde weist eine Aktivität gegenüber dem unbekanntem Protein (*grün*) sowie Affinitätsprotein (*orange*) auf.

2.2.1.2 Beispielhafte Durchführung

Im Folgenden soll ein schematischer Überblick zur experimentellen Durchführung des sogenannten *pull-downs* gegeben werden (**Abbildung 13**). Zunächst wird die Sonde mit Hilfe von Streptavidin-modifizierten *beads* immobilisiert (**1.**). Diese Matrix-Kügelchen weisen einen magnetischen Kern auf und lassen sich somit sehr einfach abtrennen. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Nutzung von Chromatographiesäulen mit immobilisiertem Streptavidin.

Anschließend findet die Inkubation mit Zellysats geeigneter Zelllinien statt (**2.**). Lebende Zellen sind zumeist nicht notwendig, jedoch birgt dieser Schritt auch Nachteile:

Membranproteine als potentielle *Targets* können z.B. ihre Funktion in isolierter Form nicht richtig ausüben und liegen eventuell in einer anderen Faltung vor. Eine ausreichende bzw. richtige „Erkennung“ muss demnach nicht gegeben sein. Des Weiteren wird der Ligand für dieses Verfahren lokal hochkonzentriert (im Vergleich zu *in vivo*- bzw. *in vitro*-Bedingungen) hinzugefügt und neigt dadurch nach Absättigung des eigentlichen *Targets* zur Ausbildung unspezifischer Bindungen. Darüber hinaus liegen einige Proteine nur in sehr geringer Konzentration in Zellen vor und können aufgrunddessen im vorher beschriebenen „Signalrauschen“ untergehen und schlussendlich nicht erfasst werden.

Durch Waschen (**3.**) werden nachfolgend alle ungebundenen Proteine sowie sonstige Bestandteile des Lysats entfernt. Meistens ist dieser Schritt in mehrere Teilschritte mit ansteigender Spezifität aufgeteilt. Es muss beachtet werden, dass die Waschbedingungen nicht zu harsch sind, um ein zu frühzeitiges Ablösen von der Matrix zu vermeiden.

Die gezielte Elution des gebundenen Proteins (4.) erfolgt durch den Bruch des Biotin-Straptavidin-Komplexes, aufgrund kurzzeitiger Einwirkung hoher Temperaturen (ca. 70 °C), wobei eine Denaturierung des Zielproteins gleichzeitig vermieden werden muss. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Einbringung des unmodifizierten Liganden, der aufgrund seiner höheren Affinität zum Target die Sonde verdrängen und nach erneuter Waschung das Protein freigegeben kann.

Die Charakterisierung erfolgt anschließend durch drei Schritte:

Zunächst werden alle, durch Elution erhaltenen Proteine mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (genauer: SDS-PAGE, 5.) nach ihrer Ladung aufgetrennt und können in diesem Schritt ebenfalls per Anfärben und/oder Fluoreszenz-Imaging (kovalente Markierung vorausgesetzt, s.o.) weitergehend separiert werden. Die vielversprechendsten Banden werden aus dem Gel entfernt und mittels Verdauung durch die Serinprotease Trypsin in Bruchstücke unterschiedlicher Größe zerlegt (6.). Diese Abbauprodukte weisen definierte Bruchstellen auf, da die Spaltung nur an Lysin- bzw. Argininresten erfolgen kann. Tandem-Massenspektroskopie (MS/MS) liefert die Molmassen, sowie dedizierte Fragmentierungsmuster dieser Teilstücke (7.) und somit kann durch Vergleich mit Proteindatenbanken in den meisten Fällen das Target identifiziert werden.³²

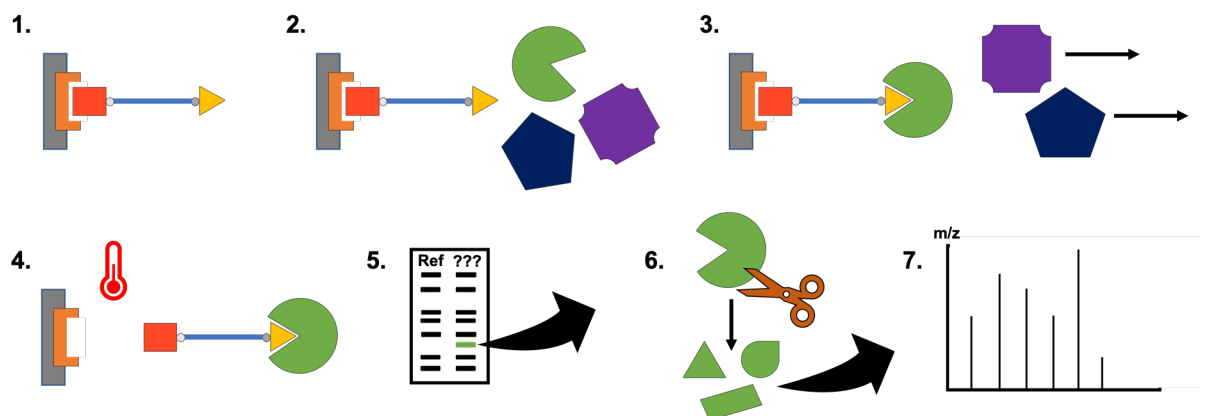


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Durchführung einer Affinitätschromatographie mittels Streptavidin/Biotin-Komplex zur Targetaufklärung. 1. Immobilisierung der Sonde an Streptavidin-Beads, 2. Inkubation mit Zelllysat, 3. Waschen zur Entfernung übriger Proteine und Bestandteile des Lysats, 4. Temperaturinduzierte Auflösung des Komplexes, 5. SDS-PAGE der erfassten Proteine, 6. Trypsinabbau, 7. MS/MS-Analyse der resultierenden Bruchstücke. Nach: Ziegler, Pries, Hedberg und Waldmann.³²

Zur Bestätigung der erzielten Resultate sollten die ursprünglichen phänotypischen Ergebnisse der Assays mit den in einschlägigen Datenbanken verzeichneten Informationen bezüglich der Funktion, sowie involvierter Wirkmechanismen des Treffers abgeglichen werden.

Nicht jedes ermittelte, potentielle Zielprotein kann mit den beobachteten Ergebnissen in einen logischen, funktionalen Zusammenhang gebracht werden und stellt somit einen falschpositiven Treffer dar. Im Idealfall lässt sich die Affinität des Liganden zum identifizierten Target direkt im Assay überprüfen, sowie der Bindungsmodus durch Kristallisation aufklären. Eine ausreichende Menge an aufgereinigtem Protein muss hierfür zur Verfügung stehen und setzt somit das erfolgreiche Etablieren weiterer, nicht-trivialer Arbeitsschritte voraus.

Als weitere Möglichkeiten der Targetaufklärung seien zur Vollständigkeit 2D-Gelelektrophorese, Label-freie Ansätze, Protein-Microarrays und computergestützte Methoden genannt.³²

2.2.2 Photoaffinitätsmarkierung (PAL)

Die Photoaffinitätsmarkierung, auch *photoaffinity labeling* (PAL) genannt, ist eine sehr flexibel einsetzbare Methode der chemischen Proteomik zur Bestimmung von Bindungsmodi und wird als komplementärer Ansatz zur Strukturaufklärung mittels Kristallisation und Röntgendiffraktometrie angesehen. Ferner kann sie unter anderem mit Affinitätssonden kombiniert werden (2.2.1.1), um auf makromolekularer Ebene die Identifizierung unbekannter *Targets* zu ermöglichen. Zum Einsatz kommen Liganden, die mit einer photoreaktiven Gruppe ausgestattet wurden. Sie stehen bei Inkubation mit dem Protein zunächst im Gleichgewicht zwischen den freien Komponenten und dem Protein-Sonden-Komplex (1., **Abbildung 14**). Nach Bestrahlung mit Licht geeigneter Wellenlänge bilden sich hochreaktive Radikale, die durch Rekombination kovalent an die direkte Umgebung binden (2.). Anschließend wird durch enzymatischen Verdau das Protein abgebaut (3.) und final die massenangereicherten Bruchstücke des Proteins per MS/MS, sowie Sequenzierung und Vergleich analysiert (4.).^{35,36}

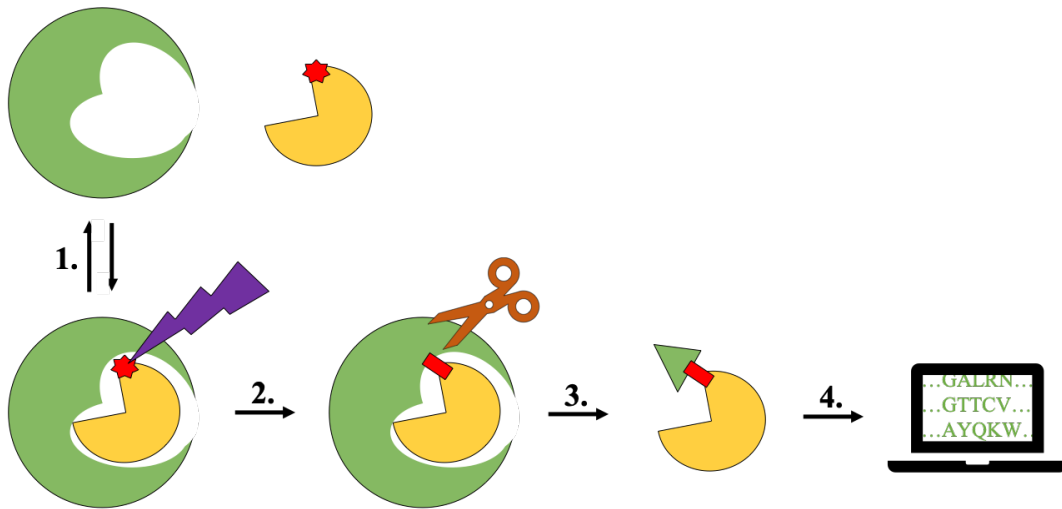


Abbildung 14: Schematischer Ablauf eines PAL-Experiments zur Aufklärung des Bindungsmodus eines bekannten *Targets*. 1. Dissoziationsgleichgewicht zwischen Sonde und Targetprotein, 2. UV-Bestrahlung und Ausbildung einer kovalenten Bindung, 3. Proteolyse durch Trypsinabbau, 4. Identifizierung der Strukturelemente durch MS+Sequenzierung. Nach: Kotzyba-Hibert, Kapfer und Goeldner.³⁷

2.2.2.1 Grundvoraussetzungen

Es müssen einige Bedingungen erfüllt sein, um ein erfolgreiches Experiment zu gewährleisten. Als wichtigstes Kriterium sollte die Affinität des zu markierenden Liganden durch SAR-Studien ausreichend optimiert worden sein, denn es darf nicht außer Acht gelassen werden, dass die Modifizierung mit photoaktiven Gruppen in den meisten Fällen zu einer Herabsenkung derselben führt. Außerdem sollten essentielle Bereiche des Liganden identifiziert und variable, für die Inkorporation geeignete, Stellen in abgeleiteten Analoga durch *in vitro*-Experimente gesichert worden sein (analog zu 2.2.1.1). Darüber hinaus wird die ausgewählte funktionelle Gruppe im Idealfall bei einer Wellenlänge aktiviert, die das Protein nicht schädlich beeinflusst.

Ein unerwünschter Nebeneffekt dieser Methode sind unspezifische Markierungen (**Abbildung 15**), die das Signal-Rausch-Verhältnis erheblich beeinträchtigen können oder gar zum Scheitern des Ansatzes führen. Das durch photochemische Fragmentierung freigesetzte Radikal muss, im Vergleich zur Verweildauer der Sonde in der Tasche, eine kürzere Lebensdauer aufweisen. Andernfalls würde es sonst mit Aminosäuren der Proteinoberfläche oder aber auch anderen, im Assay präsenten Komponenten, reagieren.

Ausreichend hohe Sondenaffinitäten bedeuten im Umkehrschluss auch eine niedrige Dissoziationskonstante und schaffen dieser Problematik somit Abhilfe. Zusätzlich sollte die erfolgte Markierung möglichst nur eine Region betreffen, *ergo* ortsspezifisch sein. Das Gegenteil hiervon ist die sogenannte topografische Markierung, die aus einer zu hohen Reaktivität des Radikals resultiert und einen Rückschluss auf den Bindungsmodus nicht mehr zulässt.^{35,37}

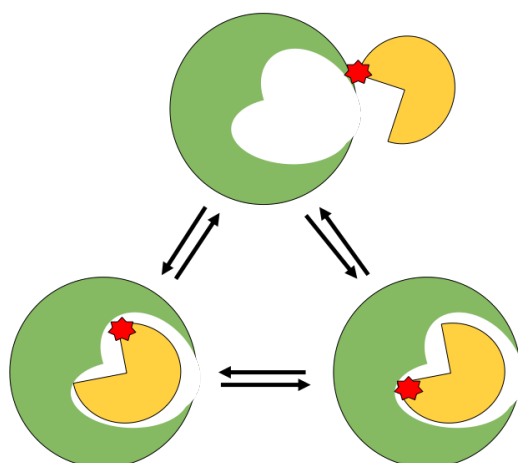


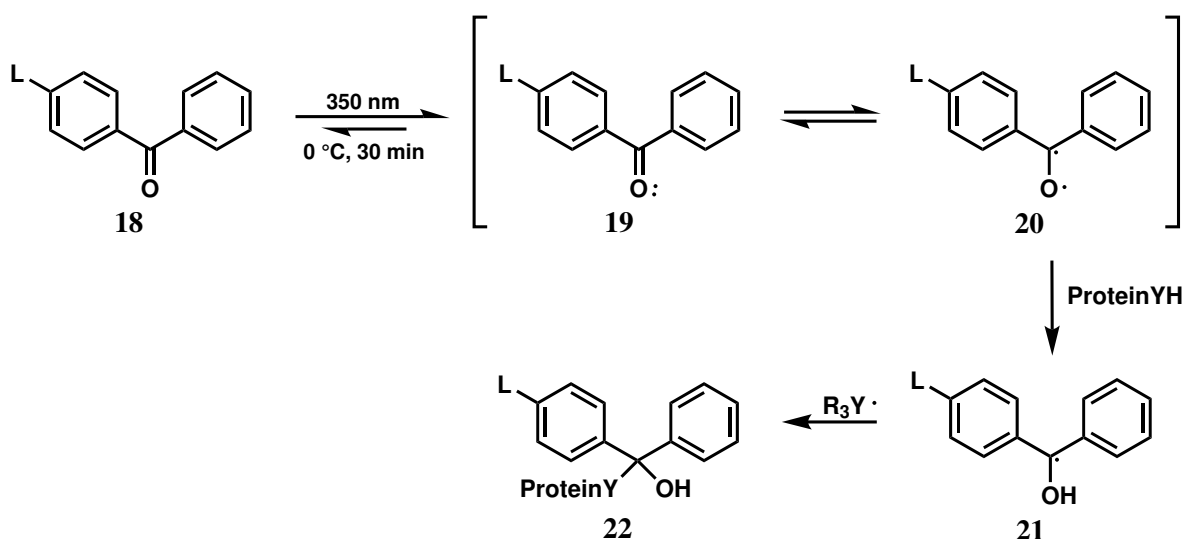
Abbildung 15: Möglichkeiten unspezifischer Markierung durch Reaktion der Sonde außerhalb der Bindetasche (oben) oder topografische Markierung innerhalb (unten) durch nachfolgende UV-Einstrahlung. Nach: Kotzyba-Hibert, Kapfer und Goeldner.³⁷

2.2.2.2 Reaktive Gruppen

Bis heute wurden viele verschiedene photolabile Gruppen untersucht und erprobt, jedoch haben sich vor allem die Benzophenone, Phenylazide und Diazirine (indirekt Diazoverbindungen) durchgesetzt. Eine Klassifizierung lässt sich am einfachsten durch das entstehende Radikal aufstellen, welches außer im Falle der Azide stets ein Carben ist.

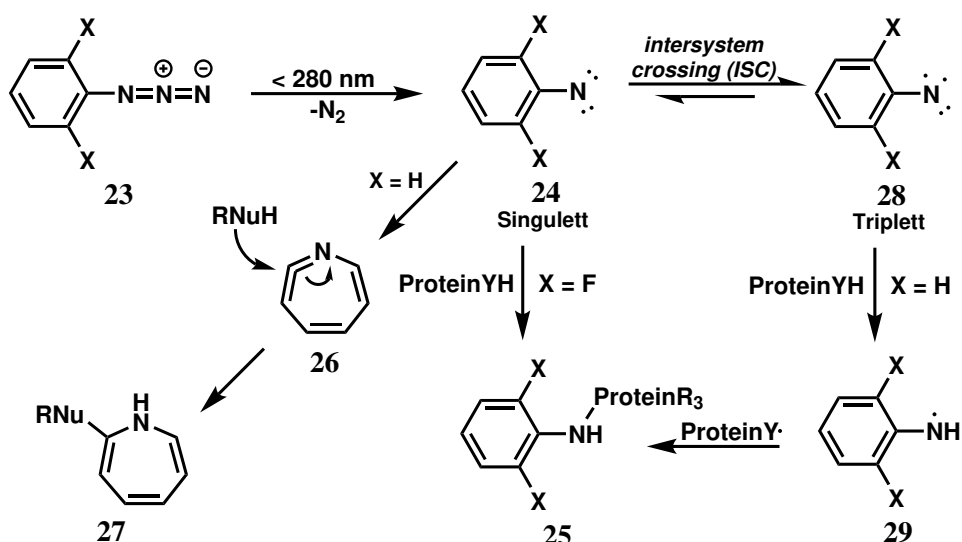
Benzophenone **18** (**Schema 1**) werden bei einer Wellenlänge von $\lambda \approx 350$ nm angeregt und bilden das Singulett- **19** bzw. durch eine reversible, homolytische Spaltung einer der C=O π -Bindungen das Triplettcarben **20**. Dieses reagiert unter Protonabstraktion mit der Umgebung zum entsprechenden radikalischen Diphenylalkohol **21**, welcher wiederum per Rekombination mit dem übrigen Radikal zu **22** abreagiert.

Ein Nachteil ihrer Anwendung liegt in der Größe der funktionellen Gruppe, die nicht in allen Fällen sinnvoll in einen Liganden eingebracht werden kann.³⁷



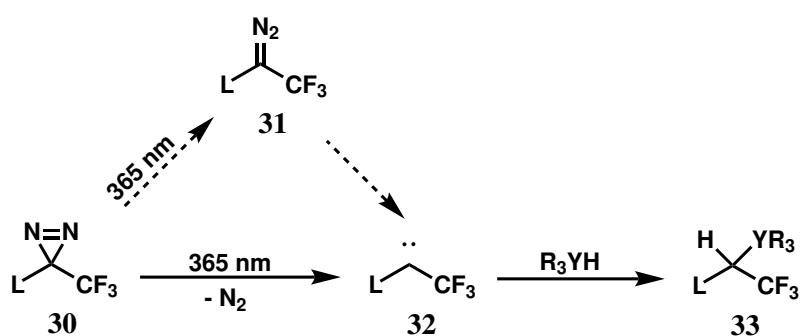
Schema 1: Radikalbildung und weitergehender Reaktionsprozess des Benzophenon **18**.
L = aktiver Ligand, Y = C oder Heteroatom, R = H, Alkyl, Aryl.³⁵

Azide sind nur in Form von Phenylaziden **23** einsetzbar (**Schema 2**), da die respektiven Alkylspezies unter interner Protonabstraktion oder per Umlagerung zu Iminen reagieren und somit für Markierungsexperimente unbrauchbar sind. Zunächst entsteht das Singulettnitren **24** durch Bestrahlung mit $\lambda \approx 280$ nm und Freisetzung von molekularem Stickstoff. Dieses kann per Insertion mit umliegenden funktionellen Gruppen reagieren und führt zu einer direkten Markierung (**25**). Ferner besteht die Möglichkeit einer Umlagerung in das Didehydroazepin **26** im Falle eines nichtsubstituierten Phenyls, welches anschließend durch Reaktion mit einem Nukleophil zum entsprechenden Azepin **27** reagiert. Das Triplettnitren **28** steht durch Intersystemcrossing (ISC) im Gleichgewicht mit **24** und reagiert zunächst lediglich mittels Protonabstraktion zu **29**, auf die danach folgend eine Radikalkupplung zum finalen Markierungsprodukt **25** stattfindet. Die Markierungseffizienz kann durch Fluorierung beider *ortho*-Positionen erhöht werden, da in diesem Fall keine Azepine gebildet werden können. Darüber hinaus konnte einer langsamere Umwandlung von Singulett- zum Triplettzustand beobachtet werden.^{37,38}



Schema 2: Radikalbildung und weitergehender Reaktionsprozess der Phenylazide **23**.
 $\text{X} = \text{H}$ oder F , $\text{Y} = \text{C}$ oder Heteroatom, $\text{R} = \text{H}$, Alkyl, Aryl.^{35,39}

Diazirine **30** können, ähnlich wie Benzophenone, im UVA-Bereich aktiviert werden (**Schema 3**), weisen jedoch einen gänzlich anderen Mechanismus auf. Zum einen kann eine Isomerisierung zur entsprechenden Diazoverbindung **31** stattfinden, welche sich unter Freisetzung von molekularem Stickstoff zum Carben **32** zersetzt. Ferner ist auch der direkte Weg von **30** zu **32** möglich. Die zumeist eingesetzte Trifluormethylgruppe sorgt für eine Stabilisierung des Carbens und ermöglicht dadurch eine gezieltere Markierung, die vom Singulettzustand ausgeht. Wie in den anderen Fällen auch, wird das Produkt **33** mittels Insertion gebildet.⁴⁰



Schema 3: Radikalbildung und weitergehender Reaktionsprozess der Trifluormethyldiazirine **30**.
 $\text{L} = \text{Ligand}$, $\text{Y} = \text{C}$ oder Heteroatom, $\text{R} = \text{H}$, Alkyl, Aryl.⁴⁰

2.3 Die Kernrezeptoren der PPAR-Familie

Das folgende Kapitel soll einen Überblick über die Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPARs) geben. Diese gehören zu der Superfamilie der Transkriptionsfaktoren und spezieller zu den Kernrezeptoren. Ein besonderer Fokus wird später auf den Subtyp PPAR β/δ gelegt (2.3.5).

2.3.1 Aufbau der Kernrezeptoren

Die Kernrezeptoren sind an einer Vielzahl essentieller Funktionen im Organismus, wie z.B. der Embryogenese, Zelldifferenzierung und Homöostase beteiligt. Sie lassen sich zunächst in zwei Kategorien aufteilen, die zum einen aus den *nuclear (non-)hormone receptors* (NHRs) und zum anderen aus Rezeptoren ohne bekannte Liganden, den *orphan nuclear receptors*, bestehen. Ferner sind auf Basis verschiedener Kriterien weitere Einteilungen möglich (s.u.). Alle weisen jedoch den gleichen allgemeinen, aus sechs Domänen bestehenden, Aufbau auf (Abbildung 16).⁴¹

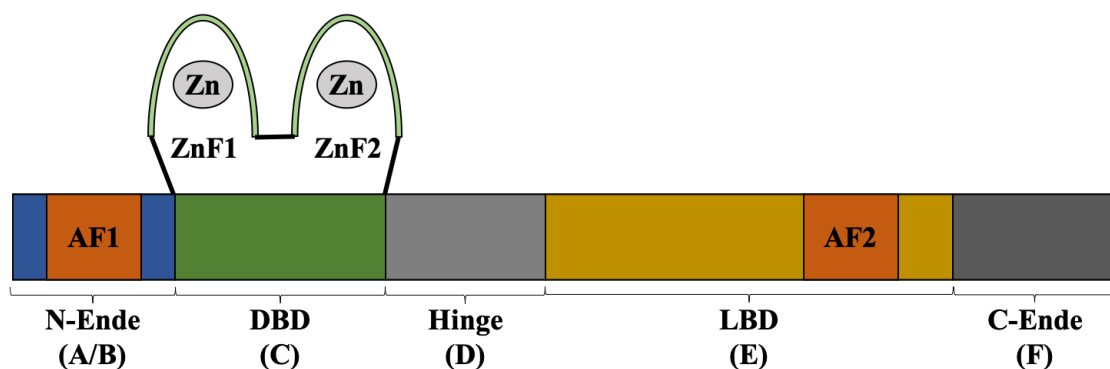


Abbildung 16: Schematischer Aufbau der Kernrezeptoren aus sechs Domänen. AF1/AF2 = Aktivierungsfunktion, DBD = DNA-bindende Domäne, ZnF = Zinkfinger, LBD = Ligandenbindungsdomäne. Nach: Novac und Heinzl.⁴²

Die Regionen A und B gehören zum *N*-Terminus, welcher ebenfalls die Aktivierungsfunktion 1 (AF1) enthält. Diese ist einer der am wenigsten konservierten Abschnitte und dient in Kooperation mit AF2 (in Region E) der Bindung von Coregulatoren. Ihre Erkennung erfolgt über ein sogenanntes LxxLL-Motiv in den AFs.⁴²

Die DNA-bindende Domäne (DBD) ist in der Lage, an hochspezifische DNA-Regionen, den sogenannten *response elements* (REs), zu binden. Diese befinden sich in den Promoterregionen der Zielgene und weisen für PPARs z.B. die Sequenz AGGTCA auf. Dabei dienen die zwei Zinkfinger (ZnF1 und ZnF2) als „Anker“. Das assoziierte Zink wird dabei durch Cysteine sowie Histidine gebunden. Vor allem Variationen des ZnF1 bestimmen die Funktionen einzelner Subfamilien, welche z.B. statt Homodimere, durch Interaktion mit dem Retinoid-X-Rezeptor RXR-Heterodimere bilden können.⁴³

Die Hinge-Region D wurde lange Zeit lediglich als Verbindungsstück zwischen der DBD und LBD angesehen. Es konnte jedoch inzwischen gezeigt werden, dass sich Motive der Liganden-vermittelten Interaktion auch in dieser Region befinden.⁴²

Die anschließende Ligandenbindungsdomäne (LBD) sorgt für die Spezifität des Kernrezeptors hinsichtlich der Modulierung durch endogene, im Zellkern präsente, Moleküle. Dieser Abschnitt weist elf bis zwölf Helices auf, die durch Bindung eines entsprechenden Modulators in ihrer Konformation geändert werden. Agonisten passen hierbei direkt in die LBD, Antagonisten hingegen sorgen für ein Umklappen der Helix-12. Diese veränderte Ausgangsstruktur lässt nun die Rekrutierung von Coaktivatoren nicht zu. Im Fall der Bindung von inversen Agonisten werden Corepressoren rekrutiert. Anschließend an die Genexpression wird der am RE bindende Rezeptor abgebaut. Das C-Ende (Region F) ist nicht in allen Kernrezeptoren anwesend.^{44,45}

2.3.2 Allgemeiner Wirkmechanismus der PPARs

Die PPARs gehören der Subfamilie der Thyroid-Hormonrezeptor-Ähnlichen an und bilden mit RXR ein Heterodimer aus. Heutzutage wird von drei Subtypen ausgegangen (früher von vier), die als Alpha, α , NR1C1 (2.3.3), Beta/Delta, β/δ , NR1C2 (2.3.5) und Gamma, γ , NR1C3 (2.3.4) bezeichnet werden. Vor allem bei α und γ ist der Wirkmechanismus hinreichend gut verstanden. Aus Fettsäuren werden durch verschiedene Enzymkaskaden die endogenen Liganden aller drei Subtypen gebildet. Diese binden an PPAR und aktivieren den Rezeptor, worauf Coaktivatoren wie z.B. die NCoAs rekrutiert werden (Abbildung 17). Nach der Anlagerung an die respektiven REs der DNA (PPARREs) wird im Zusammenspiel mit Histonacetylasen eine Auffaltung der Chromatinstruktur erwirkt und hierdurch die Transkription ermöglicht (Transaktivierung, **A**). Ohne Aktivierung durch Liganden werden Corepressoren rekrutiert, die Histondeacetylasen rekrutieren und ein Ablesen der DNA verhindern (Transrepression, **B**). Bekannte Vertreter sind z.B. NCoR (*nuclear receptor co-repressor 1*) und SMRT (*silencing mediator for retinoid or thyroid-hormone receptors*). Es besteht überdies noch die Möglichkeit einer DNA-unabhängigen Repression durch Unterbinden weiterer Signalwege, wie z.B. von $\text{NF}\kappa\text{B}$, STAT und AP-1.^{42,43,46}

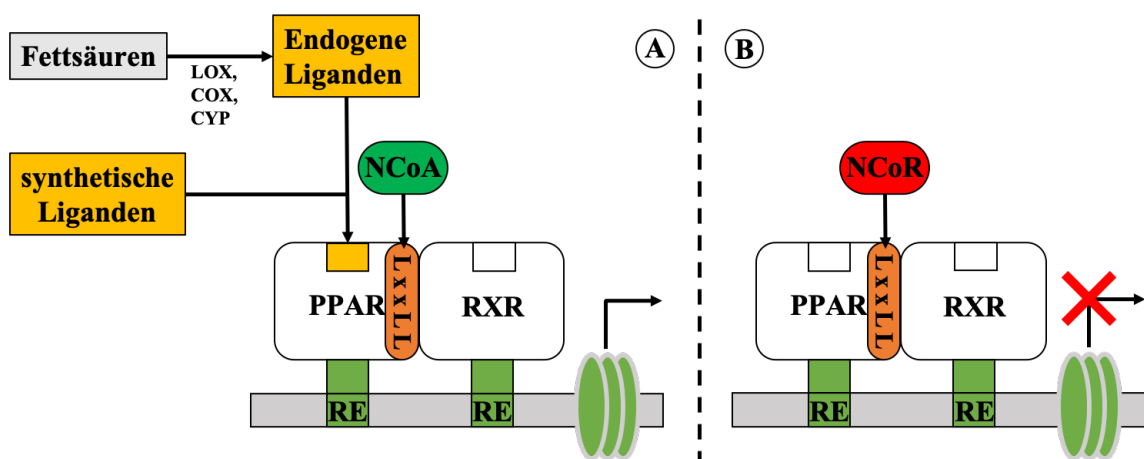


Abbildung 17: Mechanismus der PPAR-vermittelten Transkription von Zielgenen durch Transaktivierung mittels endogener oder synthetischer Liganden (**A**) oder durch Liganden-unabhängige Transrepression (**B**). LOX = Lipoxygenasen, COX = Cyclooxygenasen, CYP = Cytochrome, NCoA = ein Coaktivator, NCoR = ein Corepressor. Nach: Chinetti, Fruchart, Staels und Harmon, Lam, Glass.^{43,46}

2.3.3 PPAR α

PPAR α wurde als erster der PPAR-Subtypen entdeckt und charakterisiert. Dabei wurde herausgefunden, dass dieser durch Peroxisom-Proliferatoren in Nagetieren aktiviert werden kann. Die Bezeichnung gilt heute jedoch als unglücklich gewählt, da die beschriebene Aktivierung nicht auf die anderen beiden Subtypen zutrifft und darüber hinaus bei PPAR α im Menschen nicht stattfindet. Der Rezeptor wird vor allem in Leber-, Nieren-, sowie Herzzellen und vaskulären Wänden exprimiert. Seine Hauptfunktion liegt in der Regulierung des Fettsäurestoffwechsels, weshalb ihm ebenfalls eine Hauptrolle bei Fettleibigkeit zugeschrieben wird. Ferner kommt PPAR α durch Aktivierung von Genen bezüglich der Glukoneogenese eine weitere essentielle Rolle in der Homöostase des Energiestoffwechsels zu. Bekannte endogene Liganden (**Abbildung 18**) sind neben den bereits erwähnten Fettsäuren weitergehend modifizierte Derivate wie z.B. das Leukotrien LTB $_4$ **34** (durch Lipxygenasen) oder verschiedene Hydroxyeicosatetraensäuren (HETEs, durch Cytochrom P450, wie z.B. 20-HETE **35**). Die Fibrate (Motiv in *blau*) bilden die wichtigste Klasse der synthetischen Liganden. Als Cholesterinspiegelsenker sorgen sie bei Hypertriglyceridämie zu einer Erhöhung des HDL-Spiegels (*high-density lipoprotein*) und damit einhergehend zur erwünschten Erniedrigung der LDL-Konzentration (*low-density lipoprotein*, „schlechtes“ Cholesterin). Bekannte Vertreter sind Bezafibrat **36** oder Fenofibrat **37**.⁴⁷⁻⁵⁰

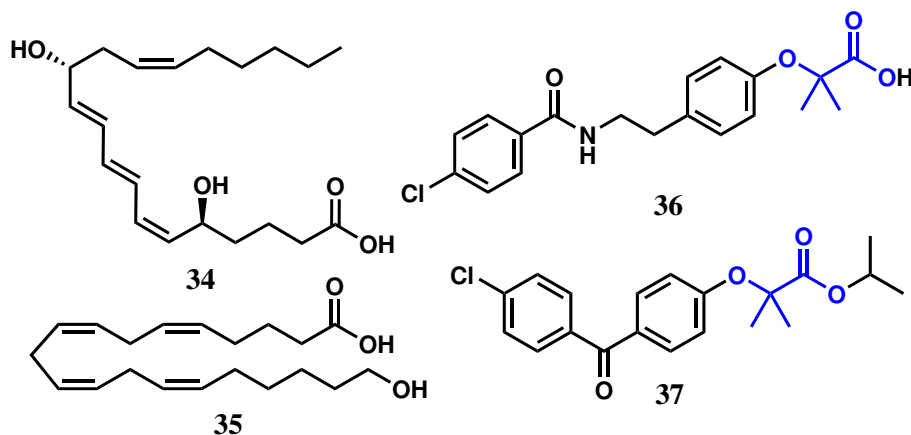


Abbildung 18: Bekannte Modulatoren von PPAR α , das endogene LTB $_4$ **34** sowie 20-HETE **35** und die synthetischen Agonisten **36** und **37**.

2.3.4 PPAR γ

PPAR γ kommt auf Grund von alternativem Splicing in zwei Varianten, nämlich γ_1 und γ_2 , vor. Die erste Variante wird vielerorts exprimiert, darunter vor allem im Fettgewebe. Letztere findet sich zumeist nur im braunen Fettgewebe. Als gesicherte Funktionen von PPAR γ gelten die Modulierung des Fettstoffwechsels, sowie die Zellproliferation von Adipozyten und Vermittlung von Entzündungsreaktionen. Darüber hinaus besteht eine Verbindung zu manchen Krebsarten.

Die endogenen Liganden (**Abbildung 19**) sind hauptsächlich die Prostaglandine (A_1 , A_2 und D_2 **38**), oxidiertes LDL, sowie verschiedene Fettsäuren. Als synthetische Liganden konnten z.B. die Glitazone oder auch Thiazolidindione (TZD, Motiv in *blau*) entdeckt und bis zur Marktreife optimiert werden. Aufgrund ihrer insulinsensibilisierenden Wirkung, wurden sie bis vor einigen Jahren bei Diabetes Typ 2 eingesetzt. Pio- (*Actos*[®], *Takeda/Eli Lilly*) und Rosiglitazon (*Avandia*[®], *GlaxoSmithKline*) **39** bzw. **40** zeigten jedoch starke Nebenwirkungen und mussten in der Folge vom Markt genommen werden. Bis heute ist der genaue Wirkmechanismus nicht vollständig aufgeklärt.^{48,49}

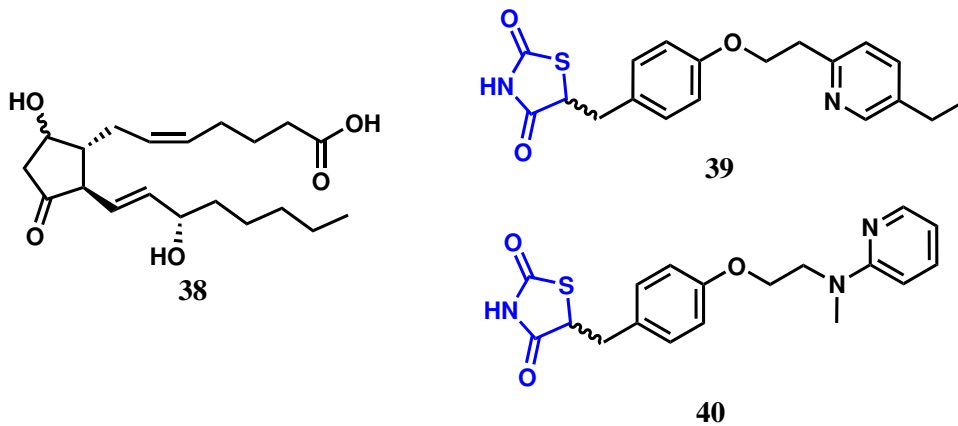


Abbildung 19: Bekannte Modulatoren von PPAR γ , das endogene PGD₂ **38** und die synthetischen Thiazolidindione Pioglitazon **39** und Rosiglitazon **40**.

2.3.5 PPAR β/δ

PPAR β/δ ist der am wenigsten wissenschaftlich untersuchte Subtyp der PPAR-Familie. Sein Name ist insofern verwirrend, da es sich hierbei nicht um zwei Splicingvarianten, wie bei PPAR γ , handelt.

Im Folgenden soll zunächst näher auf die Struktur eingegangen werden (2.3.5.1), bevor das Vorkommen und gesicherte oder weniger spekulative Funktionen erläutert werden (2.3.5.2). Final wird eine Übersicht bekannter Liganden gegeben (2.3.5.3).

2.3.5.1 Struktur

Die DNA-Bindungsdomäne von PPAR β/δ (**Abbildung 20**) ist im Vergleich zu den anderen beiden PPARs mit 77% relativ hoch konserviert (human, zu α ; γ zu α = 83%) und zeugt von der Notwendigkeit einer Erkennung möglichst PPAR-spezifischer *response elements*. Die zwei assoziierten Zinkatome der Zinkfinger werden durch jeweils vier Cysteine (*grau*) pro Finger koordiniert. Darüber hinaus weist die Domäne zwei Helices auf.^{51,52}

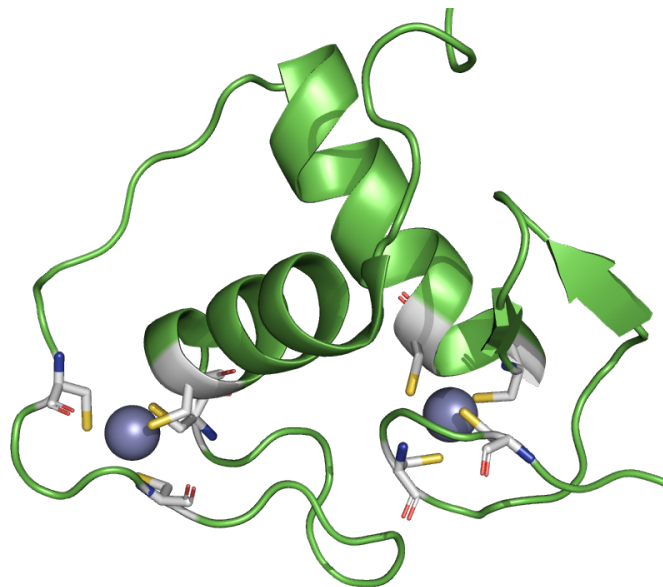


Abbildung 20: Die DNA-Bindungsdomäne von PPAR β/δ als Cartoondarstellung. Aminosäuren die an der Koordination der Zinkionen beteiligt sind, sind hervorgehoben, C: hellgrau, N: blau, O: rot, S: gelb, Zn: dunkelgrau. PDB-Code = 3ENV⁵³, PyMOL 2.0.6.

Die LBD von PPAR β/δ (**Abbildung 21**) bildet eine dreischichtige Helixstruktur mit zwölf einzelnen Helices und vier β -Strängen aus, welche charakteristisch für die Kernrezeptoren ist. Im Vergleich zu den beiden anderen Subtypen lässt sich hierbei die schon erwähnte Spezifität der Ligandenbindungsdomäne deutlich erkennen. Die Konservierung der Sequenz von PPAR β/δ liegt bei 70% (human, zu α ; γ zu α = 63%). Die Ligandenbindungstasche ist mit 1.600 Å³ relativ groß und weist eine Ypsilon-Form auf.^{51,52}

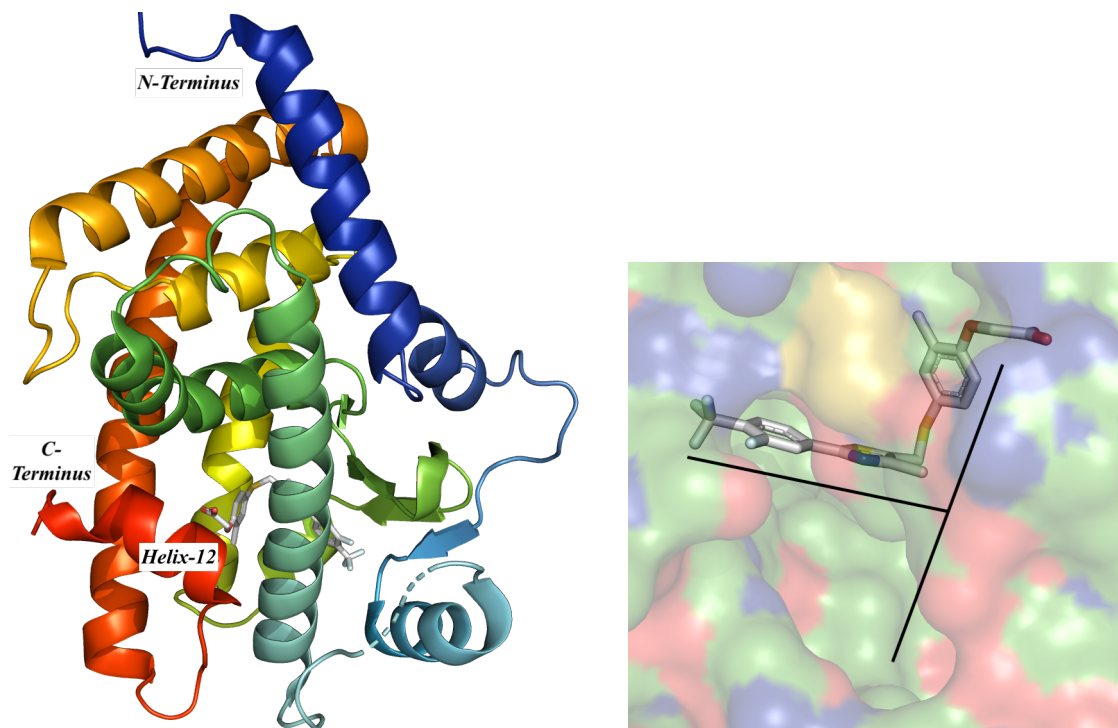


Abbildung 21: Links: Die Ligandenbindungsdomäne von PPAR β/δ als Cartoondarstellung. Rechts: Die ypsilonförmige Ligandenbindungstasche mit GW0742. PDB-Code: 3TKM⁵⁴, PyMOL 2.0.6.

2.3.5.2 Vorkommen und Funktionen

PPAR β/δ wird von einigen Quellen als ubiquitär vorkommend beschrieben, andere hingegen erwähnen ein erhöhtes Vorkommen vor allem in der Leber sowie in Skelettmuskeln und im Herzen. Wie die anderen beiden Subtypen ist er darüber hinaus im Fettgewebe vorzufinden. In Vorläufern der Fettzellen, den Präadipozyten, konnte eine erhöhte Expression entsprechender Zielgene bemerkt werden, die darauf schließen lassen, dass PPAR β/δ bei ihrer Differenzierung zu Adipozyten beteiligt ist.

Grundlegender wird PPAR β/δ als eine Art Schalter aufgefasst, welcher die Fettsäureoxidation, genauer die β -Oxidation, auf Kosten der Glykolyse induzieren kann.

Die Rolle in der Entstehung verschiedener Krebsarten, wie z.B. Brust- und Eierstockkrebs sowie Lungenkarzinomen, wird bis heute kontrovers diskutiert. Es wird nunmehr vermutet, dass die entsprechenden Resultate der onkologischen Testungen durch eine Vielzahl weiterer Faktoren beeinflusst werden und somit daher keine Verallgemeinerung zulassen. Als Beispiele seien die verschiedenen Zelltypen und Liganden genannt. Außerdem sind Mausmodelle niemals gänzlich direkt auf den Menschen zu übertragen, denn auch bei den PPARs unterscheiden sich die genetischen Sequenzen zwischen den Organismen. Nichtsdestotrotz konnten einige interessante Zielgene von PPAR β/δ identifiziert werden, die definitiv eine essentielle Rolle bei der Bildung, sowie dem Metabolismus von Tumoren spielen.

Angiopoietin-like 4 (ANGPTL-4) existiert als zwei, durch Splicing verursachte, N- bzw. C-Fragmente und weist tumorbildende Funktionen auf. Weitergehend wird ANGPTL-4 mit onkogenen Signalwegen und ferner der Inhibierung des programmierten Zelltods assoziiert. *Pyruvate dehydrogenase kinase 4* (PDK4) spielt eine entscheidende Rolle in der Glukoseoxidation, genauer der Umwandlung von Pyruvat zu Acetyl-CoA. Es konnte gezeigt werden, dass beim Umschalten auf anaerobe Oxidation unter Fastenbedingungen eine erhöhte PDK4-Expression als Gegenmaßnahme der Zelle erfolgt. Da viele Tumore metabolisch von dieser Funktion sowie einer Erhöhung der Fettsäureverstoffwechslung abhängig sind, wird PPAR β/δ durch deren Regulation zu einem entscheidenden Akteur der Tumorphomöostase.⁵⁵⁻⁵⁸

2.3.5.3 Liganden

Als gesicherte endogene Liganden gelten die familientypischen Fettsäuren, Triglyceride, Prostacycline und ferner die Retinsäure **41** (**Abbildung 22**). Aus diesen Agonisten lässt sich eine gemeinsame Struktur ableiten, die aus einem polaren Kopf besteht und über einen Linker mit einem hydrophoben Schwanz verbunden ist.⁵¹

Die synthetischen Liganden ahmen diese Grundstruktur zumeist nach, z.B. durch Aufweisen eines Fibrat- oder Fibrat-ähnlichen Strukturmotives der polaren Funktion. Darüber hinaus lässt die große Bindetasche aber viele Variationen zu. Bis heute sind über 1.700 Agonisten, einige wenige Antagonisten und ferner inverse Agonisten (2.3.6) entdeckt worden. Ein bekannter Vertreter der PPAR β/δ -selektiven Agonisten ist GW501516 **42**, welcher von *GSK* entwickelt wurde und erst in Phase II der klinischen Erprobung scheiterte. Nichtsdestotrotz gilt **42** als Modellverbindung für die Testung weiterer Moleküle. In Phase III befindet sich momentan (Stand: Ende 2018) GFT505 **43** von *Genfit*, welches zur Behandlung der nichtalkoholischen Fettleberhepatitis eingesetzt wird.⁵¹

Ferner sind auch sogenannte duale Liganden, die zusätzlich andere PPAR-Subtypen modulieren, bekannt und erforscht. Als Beispiele seien T913659 **44** (*Tularik*) und Verbindung 20a **45** genannt, die neben ihrer agonistischen Wirkung bezüglich PPAR β/δ auch zusätzlich Aktivität in Bezug zu α , respektive γ zeigen.

Bei *GSK* war man überdies in der Lage, aus Screeningexperimenten mehrere Antagonisten zu identifizieren. GSK0660 **46** ist der erste, derartig agierende Ligand. Die antagonistische Wirkung konnte durch Verdrängung bekannter Agonisten in kompetitiven Assays bewiesen werden. Dabei wurde ebenfalls herausgefunden, dass eine Konformationsänderung der Helix-12 (AF2) für diesen Effekt verantwortlich zu sein scheint. Später konnten wir zeigen, dass **46** jedoch als inverser Agonist einzustufen ist. GSK3787 **47** bindet weitergehend kovalent an ein Cystein dieser Region. Der an sich chemisch stabile Ligand wird durch den nukleophilen Schwefel des Cysteins am elektrophilen Pyridinyl-Kohlenstoff in α -Position zur Sulfongruppe angegriffen und der restliche Ligand somit zur Abgangsgruppe.^{51,56,59-62}

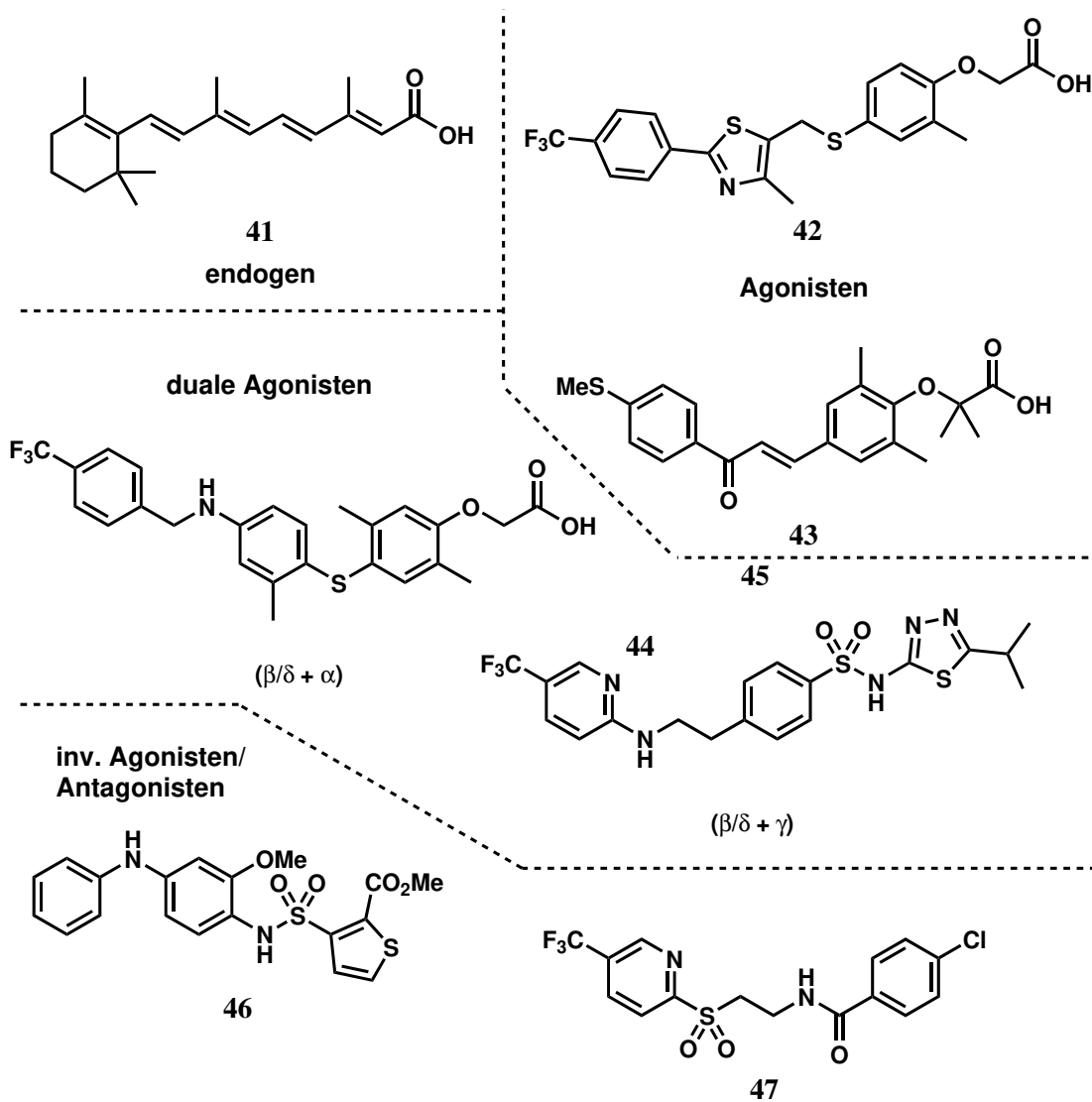


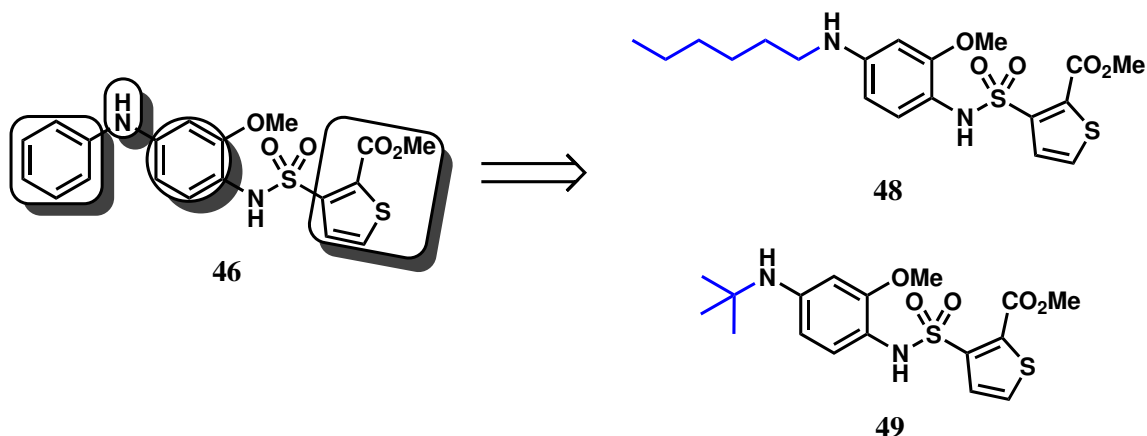
Abbildung 22: Eine Auswahl bekannter Modulatoren für PPAR β/δ : Retinsäure **41** als Beispiel endogener Liganden, die selektiven Agonisten GW501516 **42** und GFT505 **43** in klinischer Forschung (Abbruch in Phase II bzw. noch in Phase III), die dualen PPAR-Agonisten T913659 **44** und Verbindung 20a **45**, sowie den von GSK entwickelten inversen Agonisten GSK0660 **46** bzw. Antagonisten GSK3787 **47**.

2.3.6 Vorherige Arbeiten im Arbeitskreis

Die Entwicklung und funktionale Charakterisierung inverser Agonisten von PPAR β/δ ist ein Forschungsschwerpunkt des Arbeitskreises. In Zusammenarbeit mit mehreren Kooperationspartnern des Zentrums für Tumor- und Immunbiologie (ZTI) konnten erstmals Liganden dieser Klasse beschrieben werden.

2.3.6.1 Die Entwicklung der 1. Serie („ST-/PT-S-Verbindungen“)

Das erste Forschungsprojekt startete ausgehend von den Arbeiten bei GSK (2.3.5.3). GSK0660 **46** war zwar der erste subtyp-spezifische Antagonist für PPAR β/δ , weist jedoch unbefriedigende pharmakokinetische Eigenschaften auf. Darüber hinaus lassen sich die benannten Effekte nur bei relativ hohen Konzentrationen beobachten. Ferner wurde GSK3787 **47** als kovalenter Binder identifiziert. Jedoch sind irreversible Liganden für klinische Anwendungen nicht gewünscht, da eine dauerhafte Modulierung zu unerwünschten Nebeneffekten führen kann. Das Ziel war es, ausgehend von **46** neue Liganden mit verbessertem Wirkprofil und erhöhter Bioverfügbarkeit zu entwickeln. Die SAR-Analyse (**Schema 4**) teilte **46** in vier strukturelle Teilbereiche auf: Den linken Teil mit Variation der Brückenatomsubstitution, das Brückenatom selbst, das Substitutionsmuster am zentralen Benzolring sowie Variation des Thiophens. Es zeigte sich schnell, dass die letzten drei Bereiche wenig Flexibilität, bzw. Optimierungspotenzial aufweisen. Daher wurde der Fokus auf die Substitutionen des sekundären Anilins gelegt. In mehreren SAR-Serien wurden schlussendlich einige, im Vergleich zu GSK0660 **46** beträchtlich aktivere Liganden identifiziert. Vor allem seien hierbei ST247 **48** sowie PT-S58 **49** als erster reiner Antagonist genannt.^{62,63}



Schema 4: SAR-Analyse von GSK0660 **46** und ST247 **48**, sowie PT-S58 **49** als interessante Liganden mit invers agonistischer bzw. antagonistischer Funktion.^{62,63}

Die Einteilung der erhaltenen Liganden erfolgte dabei aufgrund der Ergebnisse zwei aufeinanderfolgender FRET(Förster-Resonanzenergietransfer)-Assays (**Abbildung 23**). Der FRET ist eine, über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen vermittelte, strahlungslose Energieübertragung eines angeregten Fluorophors auf ein Weiteres. Als Grundlage der Assays dient eine über einen GST-Tag Terbium-dotierte PPAR β/δ -LBD. Der erste Assay (**A**) ermittelt die Aktivität zur PPAR β/δ -LBD durch kompetitive Verdrängung des initialen, strukturunbekannten (Herstellergeheimnis), Liganden Pan-PPAR Green (auch Tracer genannt). In der Ausgangssituation wird UV-Strahlung mit einer Wellenlänge von $\lambda = 340$ nm eingestrahlt, worauf ein FRET vom Terbium zum *Tracer* geschieht. Nach Relaxation emittiert der Tracer grünes Licht mit einer Wellenlänge von $\lambda = 520$ nm. Ein hochaffiner Ligand kann jedoch den initialen *Tracer* verdrängen und den beschriebenen FRET unterbinden. Es findet aufgrunddessen lediglich die Fluoreszenz des Terbiums statt, die sich in einer Emission von Licht mit einer Wellenlänge von $\lambda = 495$ nm äußert. Die Aktivität resultiert dann aus dem Quotienten beider Emissionsintensitäten:

$$\text{Aktivität} = \frac{I_{520 \text{ nm}}}{I_{495 \text{ nm}}}. \quad (2)$$

Die Fähigkeit eines Liganden, ein Corepressor zu rekrutieren, also als inverser Agonist zu fungieren, wird in einem darauffolgenden Assay untersucht (**B**).

In diesem Assay wird mit einer „leeren“ LBD gestartet. Durch Binden eines entsprechenden inversen Agonisten wird ein markierter Corepressor rekrutiert, welcher nun anstatt der beschriebenen Terbiumfluoreszenz einen FRET empfängt. Diese wiederum resultiert in Emission grünen Lichts mit $\lambda = 520 \text{ nm}$. Der inverse Quotient aus der vorherigen Gleichung liefert die Aktivität bezüglich der Corepressorrekrutierung.

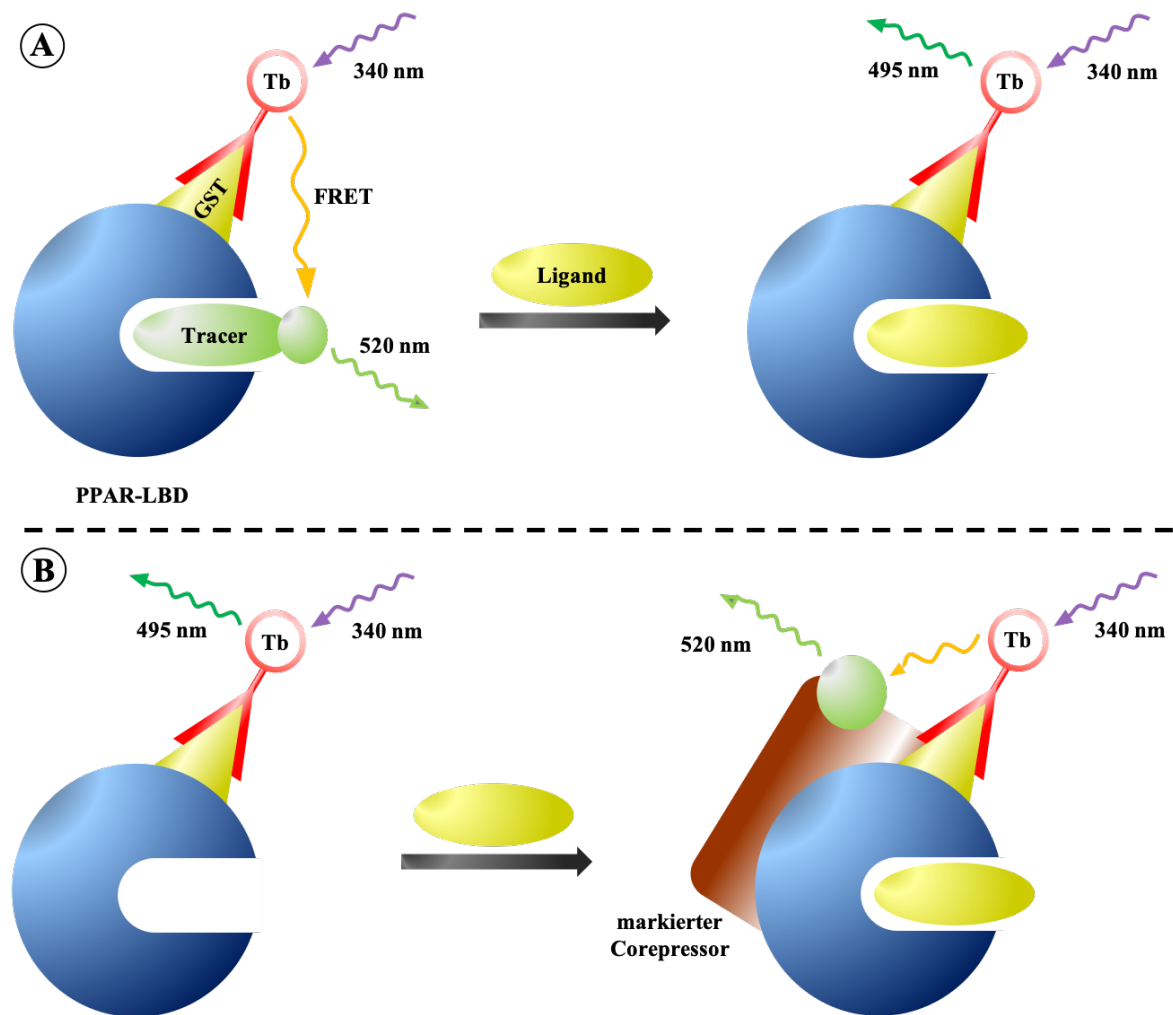
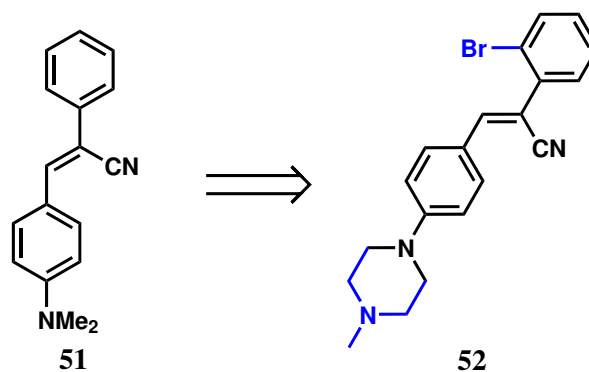


Abbildung 23: Funktionsweise der FRET-Assays. **A:** Bestimmung der Aktivität des Liganden gegenüber PPAR β/δ durch unterbundenen, initialen FRET. **B:** Corepressorassay durch Liganden-induzierte Rekrutierung eines markierten Liganden und darauffolgendes Auftreten des FRETs.⁶²

PT-S58 **49** stellte sich als hochaktiver, PPAR β/δ -selektiver Antagonist heraus, da im zweiten Assay kein Corepressor rekrutiert wurde. ST247 **48** konnte überdies auch effektiv Corepressoren rekrutieren und gilt somit als inverser Agonist, der erste beschriebene für PPAR β/δ überhaupt.



Schema 6: Der *Screeninghit* NSC636948 **51** als Ausgangspunkt für eine SAR zur Entwicklung neuer, PPAR β/δ -selektiver inverser Agonisten mit Acrylonitrilstilben als zentrales Motiv mit der Identifizierung des bioverfügbaren (Mausmodell) und hochaktiven Kandidaten DG172 **52**.⁶⁵

Nachfolgend wurden Studien zur Untersuchung einer möglichen Rolle von PPAR β/δ bei der Differenzierung von Knochenmarkszellen (*bone marrow cells*, BMC) unternommen. Die BMCs wurden aus Mäusen des *wt*, sowie aus Individuen ohne PPAR β/δ (*Ppard null*) entnommen. Dabei zeigte **52** einen synergistischen Effekt mit IL-4 bei der Differenzierung zu dendritischen Zellen (**Abbildung 24**). Dieser wurde ferner auf ein frühes Entwicklungsstadium der BMCs eingegrenzt. Noch bemerkenswerter war jedoch die Tatsache, dass derselbe Effekt auch in den PPAR β/δ -*Knockout* BMCs zu beobachten war. Daher wurde geschlossen, dass DG172 **52** ein *Off-Target* modulieren müsse. In einer anschließenden SAR wurde die *N*-Methylpiperazin-Einheit als funktionelles Motiv erkannt (**4.2**).⁶⁶

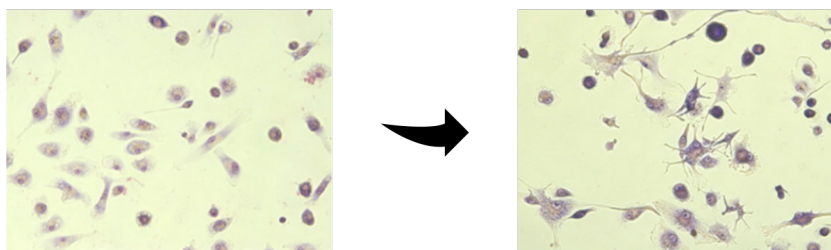


Abbildung 24: *Off-Target*-Effekt von DG172 **52**, welcher die Differenzierung von murinen Knochenmarkszellen zu dendritischen Zellen induziert. Diese verläuft in Synergie mit Interleukin-4. Links: Lösungsmittelkontrolle. Rechts: Zugabe von IL-4 (200 ng) + **52** (1 μ M). Gekürzte Darstellung.⁶⁶

3 Aufgabenstellungen

3.1 Photoaffinitätsmarkierung von PPAR β/δ -Liganden

Wie in 2.3.1 und 2.3.5.3 beschrieben, wird durch die Interaktion von Antagonisten mit PPAR β/δ ein Umklappen der Helix-12 hervorgerufen. Dieses Verhalten wird auch von inversen Agonisten erwartet, da sie bekanntlich die Rekrutierung von Coaktivatoren vollständig unterbinden und sich somit die Helix-12 nicht im Ausgangszustand befinden kann. Jedoch ist *bis dato* keine röntgenkristallografische Charakterisierung dieses Vorgangs publiziert worden und daher der Bindungsmodus gänzlich unbekannt. Darüber hinaus konnte durch Dockingexperimente, aufgrund der großen Bindetasche, kein schlüssiger Modus berechnet werden. Eine derartige Kenntnis würde jedoch einen sinnvollen Ausgangspunkt für die weitere Erforschung und Optimierung von Modulatoren bilden und hierdurch überdies Methoden des SBDDs ermöglichen, da das LBDD nach mehreren Iterationen an seine Grenzen stößt.

Auf klassischem Wege ließe sich nach erfolgreicher Expressierung und Aufreinigung der PPAR β/δ -LBD ein Kristallisationsscreen durchführen. Aufgrund der Komplexität dieser Aufgabe und des nicht zu garantierenden Erfolges, wurde als Ergänzung hierzu die Photoaffinitätsmarkierung von PPAR β/δ -selektiven inversen Agonisten angestrebt.

Das Ziel war zunächst die Identifizierung eines geeigneten Kernmotives aus der „ST-Serie“, stellvertretend ST247 **48**, oder der „DG-Serie“ (**Abbildung 25**). Hierbei musste jedoch darauf geachtet werden, dass das für den *Off-Target*-Effekt von DG172 **52** verantwortliche *N*-Methylpiperazin nicht im photoaffinen Liganden zum Einsatz kommt. Daher waren Verbindungen wie DG138 **53** hierfür als Ausgangspunkt in Betracht zu ziehen.

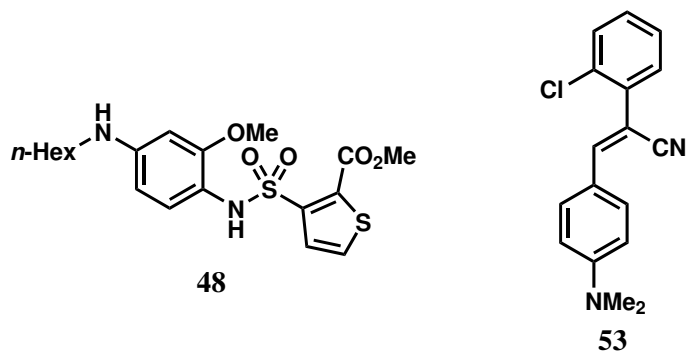


Abbildung 25: Mögliche Kandidaten für den Ausgangspunkt der Synthese von PPAR β/δ -selektiven und photoaffinen inversen Agonisten. ST247 **48** als Stellvertreter der „ST-Serie“ sowie DG138 **53**, ohne das für den *Off-Target*-Effekt verantwortliche *N*-Methylpiperazin.

Nachfolgend sollte die Markierung durch möglichst alle verfügbaren PA-Gruppen erfolgen, um eine große Flexibilität an Modulatoren zu gewährleisten. Hierzu galt es die etablierten Synthesesequenzen, sofern nötig, effizient zu modifizieren.

Ein erfolgreiches Markierungsexperiment würde schlussendlich Informationen über an der Bindung beteiligte Aminosäuren geben und ferner die Postulation eines Bindungsmodus zulassen.

3.2 Off-Target-Aufklärung von DG172

Wie in 2.3.6.2 bereits erwähnt, konnte für DG172 **52** ein PPAR β/δ -unabhängiger Effekt beobachtet werden. In einem frühen Stadium der Differenzierung von murinen Knochenmarkszellen induziert **52** in Synergie mit dem Zytokin IL-4 die Ausbildung von dendritischen Zellen.

Darüber hinaus konnte durch SAR-Studien belegt werden (**Abbildung 26**), dass der „obere“ Teil des Cyanostilbens, nämlich der mit *ortho*-Halogeniden funktionalisierte Phenylrest, für die Modulierung der Affinität zu PPAR β/δ verantwortlich ist. Zusätzlich wurde durch Variation des „unteren“ Molekülteils der *N*-Methylpiperazinylrest (*blau*) dem *Off-Target*-Effekt zugeordnet.⁶⁶

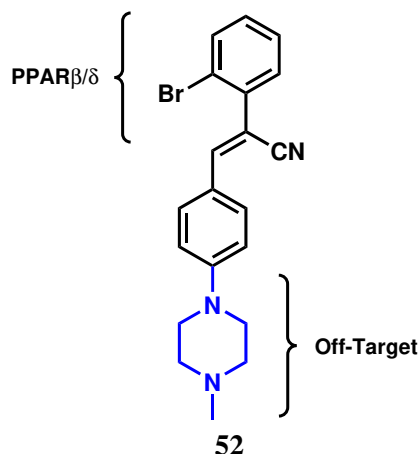


Abbildung 26: Aus SAR-Studien gewonnene Information bezüglich der essentiellen Strukturmerkmale für die Modulierung der Aktivität zu PPAR β/δ sowie des *Off-Target*-Effekts.⁶⁶

Die Aufklärung des unbekannteten Proteintargets sollte mittels Affinitätschromatographie (2.2.1) erfolgen. Zu diesem Zweck wurde die Darstellung eines PPAR β/δ -inaktiven Liganden verfolgt, welcher einen Verknüpfungspunkt für die Einführung einer Biotinfunktion aufweist.

Die Affinität dieses neuen Liganden bezüglich des *Off-Targets* sollte durch Wiederholung des ursprünglichen Experiments überprüft werden. Nach erfolgreichem *pull-down* und Identifizierung des involvierten Zielproteins wäre eine neue SAR-Studie zur weiteren Optimierung des Liganden möglich, sofern dieses Target auch im Menschen vorkommt.

3.3 SAR und Targetaufklärung von ISX-9

Ein Forschungsschwerpunkt der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Matthias Lauth (ZTI) ist der sogenannte Hedgehog-Signalweg (Hh). Dieser Signaltransduktionsweg ist z.B. bei Embryonen an der Entwicklung von Extremitäten beteiligt. Zusätzlich wird ihm aber auch eine zentrale Funktion bei der Proliferation verschiedener Tumorarten zugeschrieben, deren bessere Aufklärung eines der Hauptziele der Arbeitsgruppe darstellt. Als Inspiration zu diesem Projekt dienten Vorarbeiten zu einem *small molecule* mit antiproliferativen Eigenschaften gegenüber verschiedener Hirntumoren.⁶⁷

Hsieh *et al.* konnten zeigen, dass das ein Isoxazol-Grundgerüst aufweisende ISX-9 **54** (**Abbildung 27**) *in-vitro* die Phosphorylierung der Histon-Deacetylase-5 induziert, welche ein bekannter Mediator von Mef2 (*myocyte enhancer factor-2*) ist. Durch diese Deaktivierung von HDAC-5 wurde eine erhöhte Expressierung von Mef2-Zielgenen festgestellt, die letztendlich die Differenzierung neuronaler Stammzellen fördern. Diese können sich z.B. in Astrozyten umwandeln, welche zu den Gliazellen des zentralen Nervengewebes gehören. Ferner werden sie als potentieller Ausgangspunkt verschiedener Hirntumorarten (Astrozytom, Glioblastom) angesehen. Später wurde von der selben Arbeitsgruppe gezeigt, dass ISX-9 **54** *in vitro* darüber hinaus durch eine direkte HDAC-Inhibierung die Aktivierung tumorsuppressiver Gene hervorruft. Es wird vermutet, dass in bösartigen Astrozyten auf diese Weise heruntergeregelte Gene wieder erneut zur Blockierung der Proliferation beitragen können. Dieser Befund konnte außerdem auf *in-vivo*-Mausmodelle übertragen und reproduziert werden (20 mg/kg **54**).⁶⁸⁻⁷³

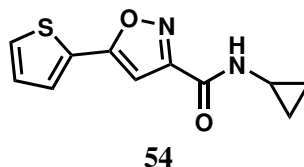


Abbildung 27: ISX-9 **54** als potentieller Modulator der Blockierung des Wachstums von Nervengewebs-ansässigen Tumoren.

Bis heute ist aber der genaue Wirkmechanismus nicht gesichert, wobei ferner die genannten Ergebnisse von Lauth *et al.* nicht reproduziert werden konnten. Aufgrunddessen muss die Beteiligung weiterer Faktoren oder ein gänzlich anderer Wirkmechanismus von **54** in Betracht gezogen werden. In nicht publizierten Vorarbeiten konnten Lauth *et al.* nämlich nachweisen, dass ISX-9 das Transkriptionslevel des GLI2-Gens erhöht. Das Gliom-assoziierte Onkogen 2 codiert den Transkriptionsfaktor Gli2, welcher ein entscheidender Akteur im Hedgehog-Signalweg ist.

Aufgrund der potentiellen Relevanz von ISX-9 **54** sollte eine SAR-Analyse erfolgen, um die für den beschriebenen Effekt verantwortliche Grundstruktur zu identifizieren und die Aktivität der Verbindung durch strukturelle Variation weiter zu optimieren. Anschließend wurde die Darstellung einer Affinitätssonde zur Identifizierung möglicher *Targets* angestrebt, um Aufschluss über die beteiligten Proteine des Hh-Signalweges zu gewinnen.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Photoaffinitätsmarkierung von PPAR β/δ -Liganden

Das Vorliegen zweier etablierter Ligandenklassen stellt eine komfortable Ausgangssituation für eine Modifizierung zur Photoaffinitätsmarkierung dar. Durch unterschiedliche Struktur motive und Synthesesequenzen gekennzeichnet, weisen beide Klassen jedoch beträchtliche Unterschiede auf, die in der Vorbereitung abzuwägen waren.

Im Folgenden werden sowohl die „ST-“, als auch die „DG-Serie“ hinsichtlich ihrer Vor- und Nachteile für die Anwendung einer PA-Markierung beleuchtet.

4.1.1 Analyse der „DG-Serie“

Die Affinität bezüglich PPAR β/δ konnte für die DG-Derivate **55** unter anderem auf den halogenidtragenden Aromaten zurückgeführt werden (**Abbildung 28**). Den größten Effekt zeigte hierbei ein Bromsubstituent in *ortho*-Position, die Substitution in *meta*- oder *para*-Position hatte dagegen einen deutlichen Abfall der Affinität zur PPAR β/δ -LBD zur Folge. Eine Mehrfachsubstitution wurde in den Vorarbeiten nicht näher untersucht, zöge eine weitere SAR-Serie samt Syntheseaufwand mit sich und wurde daher nicht verfolgt. In Verbindung mit der essentiellen Cyanostilbenfunktion ergibt sich hierdurch relativ wenig Handlungsmöglichkeit zur PA-Markierung dieser Region.

Allerdings konnte für den weiteren Aromaten gezeigt werden, dass durch das Einbringen vielfältiger, stickstofftragender Substituenten (*blau*) ein Erhalt oder sogar eine Verbesserung der initialen Aktivität möglich ist. Aufgrund dessen wurde dieser Molekülteil als möglicher Ort der Funktionalisierung ausgewählt.^{65,66}

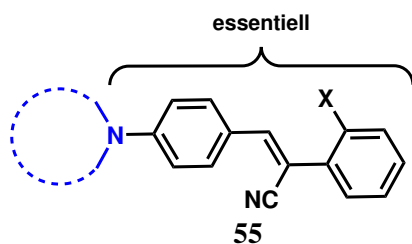
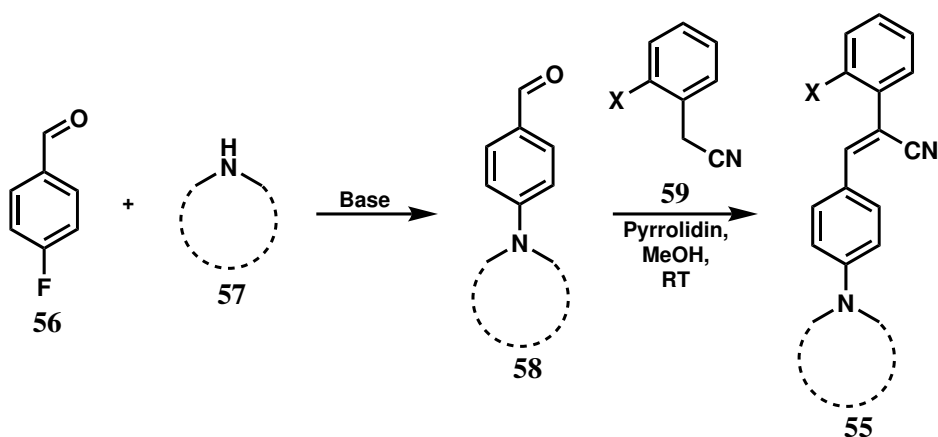


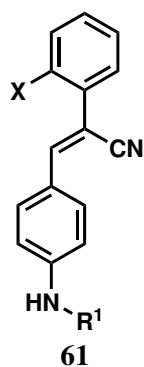
Abbildung 28: Analyse des Strukturmotivs der „DG-Serie“ und Identifizierung des unteren Molekülteils als möglichen Ort zur Einführung von PA-Funktionen. X = Halogenid.

Die ursprüngliche Synthese startet ausgehend von 4-Fluorbenzaldehyd **56** (**Schema 7**) welcher in einer basenvermittelten S_N2 -Reaktion in *para*-Position, mit dem entsprechenden Amin **57** zum modifizierten Benzaldehyd **58** reagiert. Die anschließende Knoevenagel-Kondensation mit 2-Halophenylacetonitril **59** führt zum finalen Liganden **55**.



Schema 7: Synthese der Liganden der „DG-Serie“: S_N2 von **60** mit Aminen **57** zu modifizierten Benzaldehyden **58** und weitergehender Knoevenagel-Kondensation mit substituierten Acetonitrilen **59** zu den finalen Liganden **55**. X = Halogenid.⁶⁵

In Hinblick auf die weitere Modifizierung würde z.B. ein Einsatz von primären Aminen anstelle von **57** eine anzustrebende *late-stage*-Funktionalisierung ermöglichen (**Schema 8**). Die daraus resultierenden sekundären Amine **61** könnten auf diese Weise durch S_N2 -Reaktion mit elektrophilen PA-Funktionen verknüpft werden.

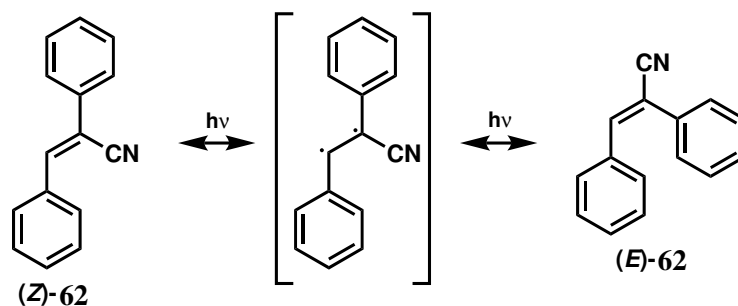


Schema 8: Die sekundären Amine **61** als potentielle Ausgangsverbindung einer *late-stage*-Funktionalisierung zu Photoaffinitätssonden. R¹ = Alkyl, Aryl; X = Halogenid.

Die Endstufen lagen zumeist als entsprechendes (*Z*)-Isomer vor. Zusätzlich konnte bei manchen Derivaten eine Beimischung des (*E*)-Isomers beobachtet werden. Ferner beinhalteten die vorangegangenen Studien aber keine Anstrengungen bezüglich der Trennung dieser Gemische. Aufgrund der großen Bindungstasche (**2.3.5.1**), kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass auch die jeweils isomeren Liganden aktiv sind.

Eine Erzeugung von Isomerengemischen im Verlauf der Synthese, möglicherweise sogar das hauptsächliche Vorliegen von (*E*)-Derivaten, wurde daher zunächst in Kauf genommen.⁷⁴

Als Problem dieser Substanzklasse stellte sich jedoch ihr Verhalten bei der Bestrahlung mit UV-Licht geeigneter Wellenlänge heraus (**Schema 9**). Im Allgemeinen kann durch reversible homolytische Spaltung der Doppelbindung und darauffolgender Rekombination die Isomerisierung eines Cyanostilbens **62** erfolgen. Dieser Prozess kommt bei Erreichen eines sogenannten photogesättigten Zustandes zum Erliegen und resultiert in einem Isomerengemisch konstanter Zusammensetzung.^{75,76}



Schema 9: UV-induzierte (*E*)/(*Z*)-Isomerisierung von Cyanostilben **62**.

Eine UV-Quelle wird allerdings ebenfalls zur Erzeugung der Radikale aus den Photoaffinitätsgruppen (2.2.2) benötigt. Somit würden zwei unterschiedliche Radikalprozesse gleichzeitig verlaufen und ein kontrolliertes Experiment dadurch nicht mehr möglich sein. Dieses Problem lässt sich anschaulich anhand der Betrachtung zeitlich aufgelöster Absorptionsspektren verdeutlichen.

Nach Erhalt der Testverbindung **63**, die sich aus dem entsprechenden Alkohol (s. Dissertation von Scheer)⁷⁴ per Mesylierung und anschließender Azidierung darstellen lässt, wurde ein initiales Absorptionsspektrum (*schwarz*) sowie zwei weitere nach jeweils zehnmütiger Bestrahlung (*blau* bzw. *violett*) mit UV-Licht der Wellenlänge $\lambda = 254$ nm aufgenommen (**Abbildung 29**). Die Erzeugung des Nitrens sollte sich durch ein Abflachen der Absorptionskurve bemerkbar machen.

Ein solches Verhalten konnte tatsächlich beobachtet werden, jedoch stimmt der geänderte Verlauf ebenfalls mit der Literatur bezüglich einer (*E*)/(*Z*)-Isomerisierung, unter Einstellung des photogesättigten Zustandes, überein. Eine Überlagerung des letzteren Effektes konnte demnach nicht ausgeschlossen werden und Verbindungen der „DG-Serie“ wurden deshalb nicht weiter in Betracht gezogen.⁷⁷

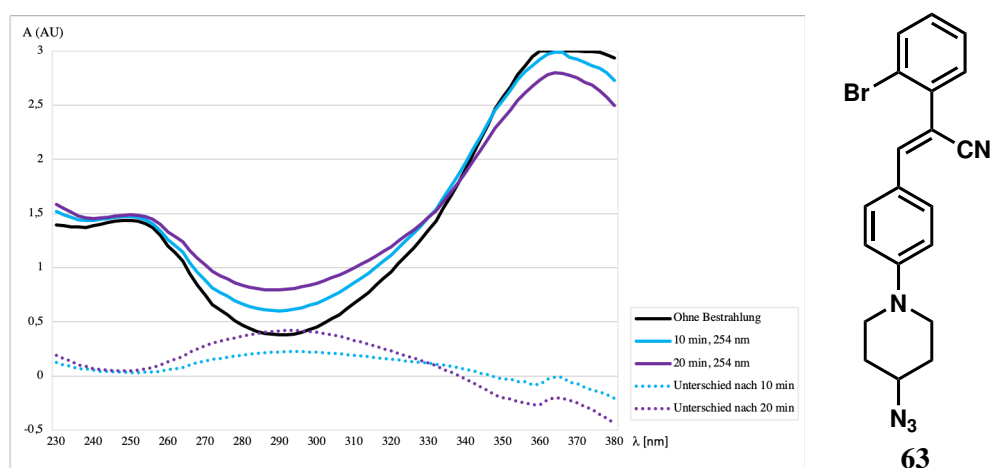


Abbildung 29: Zeitlich aufgelöste Absorptionsspektren von **63** ohne, nach 10 bzw. 20 Minuten Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge $\lambda = 254$ nm. AU = *arbitrary units*.

4.1.2 Analyse der „ST-Serie“

Da die „DG-Serie“ aufgrund ihrer strukturellen Beschaffenheit nicht für die Photoaffinitätsmarkierung in Frage kam, wurde die „ST-Serie“ hinsichtlich ihrer Eignung untersucht. Wie bereits erwähnt (2.3.6.1), konnte durch Vorarbeiten demonstriert werden, dass hierbei eine gewisse Flexibilität bezüglich der Alkylsubstituenten (*blau*) möglich ist. Im Gegensatz dazu wird das Thiophensulfonamid als essentielles Motiv für die Wechselwirkung mit PPAR β/δ angesehen, sodass sich letztlich PA-Derivate des Strukturtyps **64** eignen würden (Abbildung 30).^{63,64}

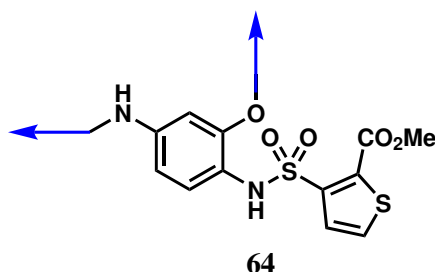
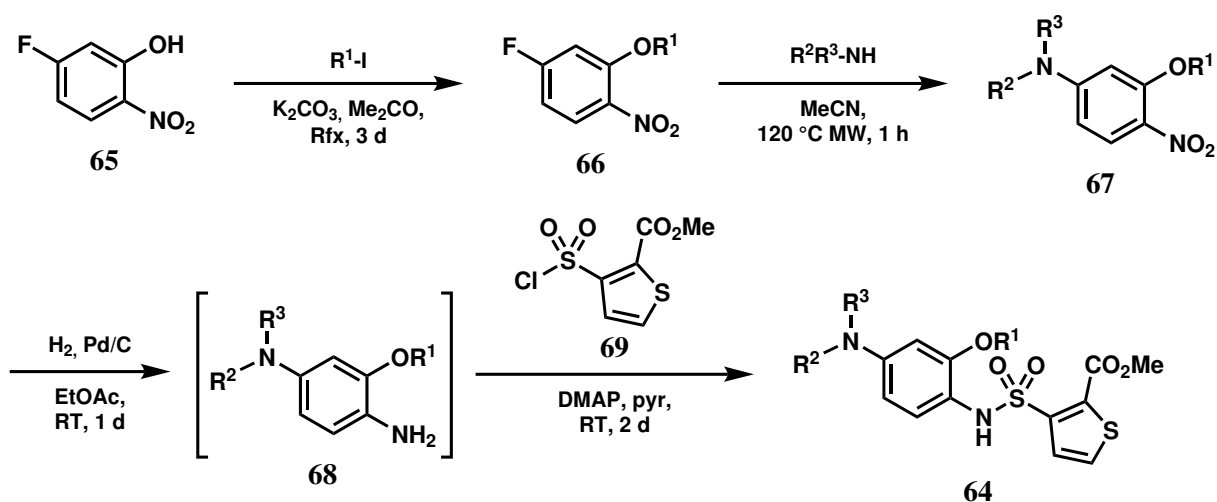


Abbildung 30: Strukturanalyse von Liganden der „ST-Serie“ und Identifizierung der Alkylsubstituenten (*blau*) als potentieller Ort der Einführung von photoaktivierbaren Funktionen.

Die Synthese der Verbindungen der „ST-Serie“ erfolgt ausgehend von 5-Fluor-2-nitrophenol **65** (Schema 10), welches zunächst in den Ether **66** durch basenvermittelte S_N2-Reaktion mit entsprechenden Alkyljodiden überführt wird. Im Falle des Methoxyethers ist das 4-Fluor-2-nitroanisol hingegen kommerziell erhältlich. Darauf folgend wird das sekundäre Anilin **67** durch Mikrowellen-induzierte Reaktion mit Aminen eingeführt. Durch anschließende katalytische Reduktion der Nitrogruppe wird **68** erhalten, welches jedoch instabil ist und sich durch Lichteinwirkung zersetzt bzw. Nebenprodukte bildet. Schlussendlich werden die finalen Liganden **64** durch Reaktion mit dem kommerziell erhältlichen Thiophensulfonylchlorid **69** erhalten. Überdies entsteht hierbei ein abtrennbares Regioisomer (falls R² oder R³ = H).^{63,64,78}



Schema 10: Synthese der Liganden aus der „ST-Serie“ durch Reaktion von **65** mit Alkyljodiden zu **66**, Darstellung der Aniline **67** durch Mikrowellenreaktion, katalytische Reduktion der Nitrogruppe zu **68** und finale S_N2 -Reaktion mit **69** zu den Endstufen **64**.^{63,64,78}

Bei kritischer Auseinandersetzung mit der etablierten Syntheseroute wurde deutlich, dass die Einführung der PA-Funktionen an den als geeignet identifizierten Molekülteilen innerhalb der ersten beiden Syntheseschritte erfolgen muss. In den Vorarbeiten findet sich kein Ansatzpunkt für die spätere Einführung der PA-Funktionen durch alternative Syntheserouten. Aufgrund der Gefahr einer Zersetzung der PA-Funktion durch die darauffolgende Reduktion zu **68**, erschien eine *late-stage* Einführung jedoch am sinnvollsten. Zusätzlich würde hierdurch der Einsatz eines gemeinsamen *Precursors* zur Darstellung verschiedener PA-Liganden ermöglicht.

Um den durch vorherige SAR-Studien erkundeten chemischen Raum nicht zu verlassen, wurde der Fokus auf lineare Substituenten des Anilins gelegt und ferner Benzophenone als reaktive Gruppen ausgeschlossen. Die Etherfunktion sollte zunächst nicht variiert werden, um durch Einsatz des kommerziell erhältlichen 4-Fluor-2-nitroanisols eine Synthesestufe einzusparen.

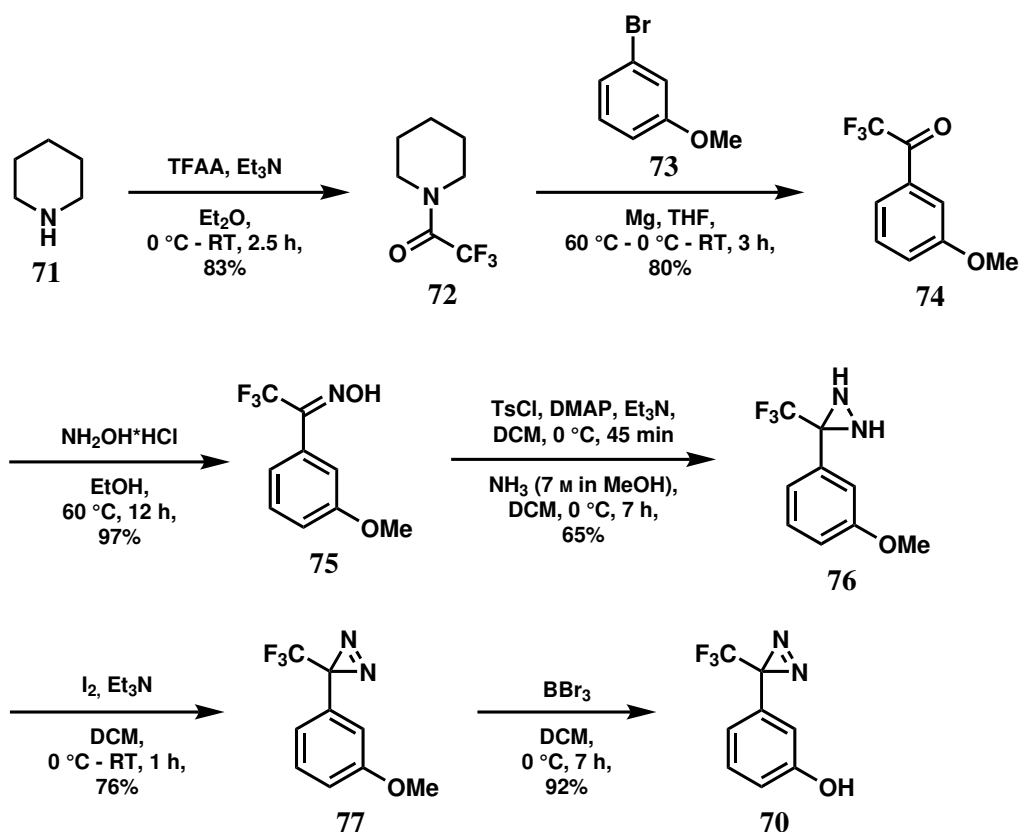
4.1.3 Synthese eines Derivates von ST247

Der Hauptfokus lag zunächst auf der Suche nach einer modifizierten Alkylkette, welche –bei der Anilinsynthese früh eingeführt– eine spätere Funktionalisierung mit photoreaktiven Azid- oder Diazirinfunktionen erlaubt.

Limitierender Faktor für die Auswahl möglicher Photoaffinitätssonden ist hierbei letztendlich die Art der Verknüpfung zwischen PA-Funktion und Ligand. Während die Einführung von Arylaziden eine relativ „simple Chemie“ sowie Reaktionsführung erfordert, stellt die Einführung der effektiveren Trifluormethyldiazirine den Chemiker vor größere Herausforderungen.

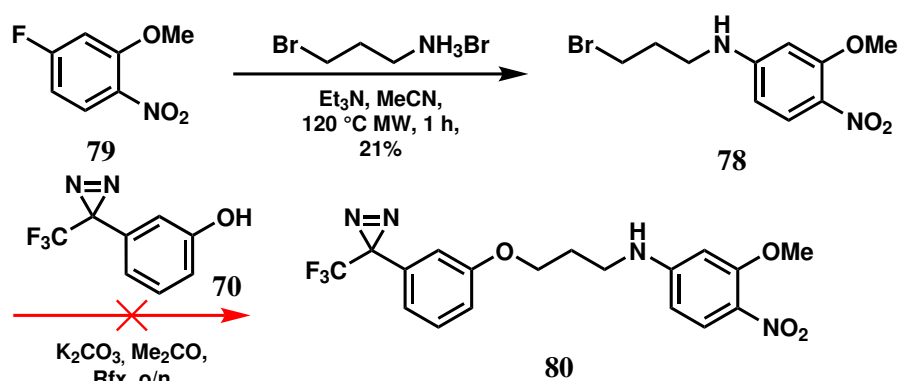
Zuerst wurde daher die Etablierung der literaturbekannten, sechsstufigen Synthese von **70** angestrebt (**Schema 11**). Die Reaktion des Piperidins **71** mit Trifluormethylacetylchlorid führt zu **72**. Durch Grignardreaktion mit **73** wird die Trifluormethylgruppe auf das Phenyl übertragen und es resultiert **74**. Der Aufbau des Diazirins wird mit der Darstellung des Oxims **75** eingeleitet. Anschließend folgt die Einführung eines weiteren Stickstoffs durch Verwendung methanolischen Ammoniaks (7 M) zu **76** nach Aktivierung mittels Tosylchlorid. Der nun folgende Schritt der Oxidation des Diaziridins **76** zum Diazirin **77** verlangt laut Originalliteratur sowie zahlreicher weiterer Veröffentlichungen den Einsatz von *tert*-Butylhypochlorit. Zum damaligen Zeitpunkt (2016) war *Tokyo Chemical Industry* (TCI) der einzig verfügbare Hersteller, welcher *t*BuOCl, jedoch nicht direkt in Europa, anbot. Eine Lieferung aus Japan konnte darüber hinaus nicht erfolgen, da die Chemikalie von der internationalen Luftbehörde (IATA) sowie der EG mit einem Transportverbot belegt ist (s. entsprechende Einträge für UN3255).⁷⁹

Glücklicherweise konnte eine von Sheridan *et al.* publizierte Alternative angewandt werden, welche die Nutzung molekularen Iods vorschlägt.⁸⁰ Der zuletzt anvisierte Schritt einer Demethylierung von **77** zur Freilegung des Phenols **70** gelang ohne Komplikationen.



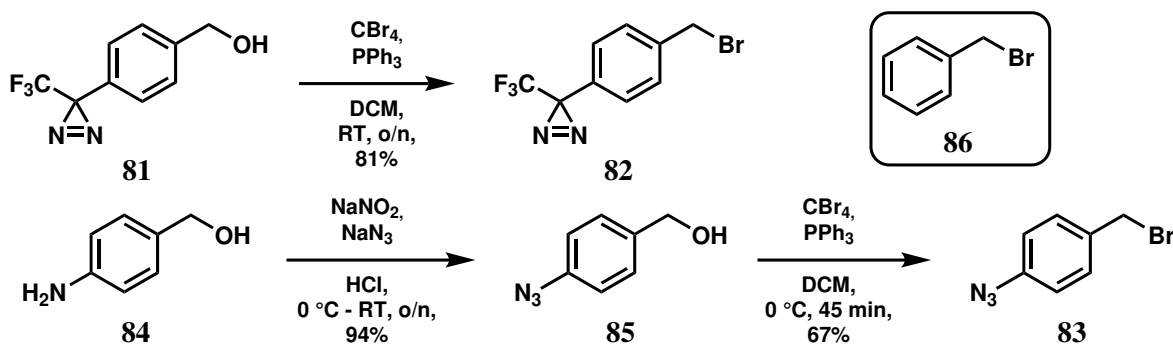
Scheme 11: Übersicht über die Syntheseroute zur Darstellung von **70** für die Markierung von PPAR β/δ -selektiven inversen Agonisten.^{79,80}

Das Phenol **70** sollte nun durch S_N2-Reaktion mit einer Bromidfunktion an den entsprechenden „ST-Liganden“-Liganden angeknüpft werden. Hierzu wurde die Testverbindung **78** ausgehend von **79** in mäßiger Ausbeute von 21% hergestellt (**Scheme 12**). Jedoch scheiterten alle nachfolgenden Versuche der Ethersynthese zur potentiellen Zielverbindung **80**, da lediglich das Startmaterial reisoliert werden konnte.



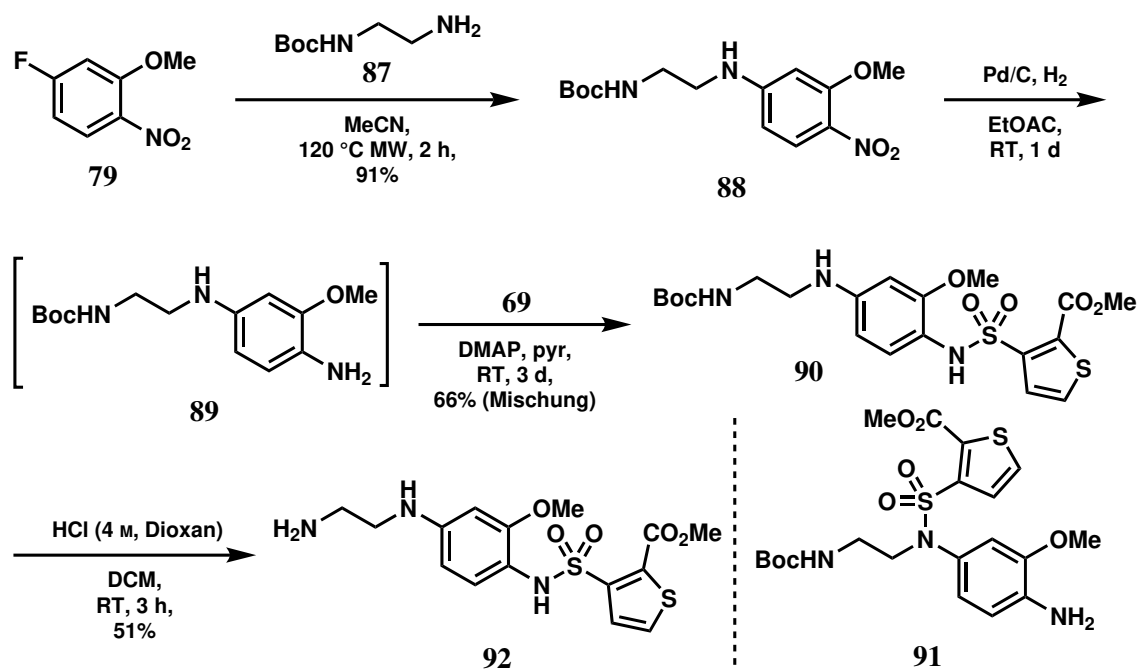
Scheme 12: Synthese der Testverbindung **78** und gescheiterte Ethersynthese mit **70** zur potentiellen Zielverbindung **80**.

Die Suche nach schneller zugänglichen oder kommerziell verfügbaren Alternativen zur Umgehung einer weiteren mehrstufigen Synthese ergab **81** als möglichen Ausgangspunkt für die Darstellung von Photoaffinitätsliganden (**Schema 13**). Aufgrund der gescheiterten Testreaktion mit dem Phenol **70** wurde die Nutzung reaktiver Benzylbromide angestrebt, welche die Einführung der PA-Gruppe als Elektrophil ermöglichen sollten. Durch Appel-Reaktion wurde das Benzylbromid **82** auf direktem Wege dargestellt. Ferner konnte über diese Route das entsprechende Azid **83** in zwei Stufen durch Azidierung von **84** zu **85** mit anschließender Appel-Reaktion, einer publizierten Route folgend, erhalten werden.^{81,82} Darüber hinaus bot sich der Einsatz des unsubstituierten Benzylbromids **86** als Testsubstanz sowie zur Darstellung einer Kontrollsonde an.



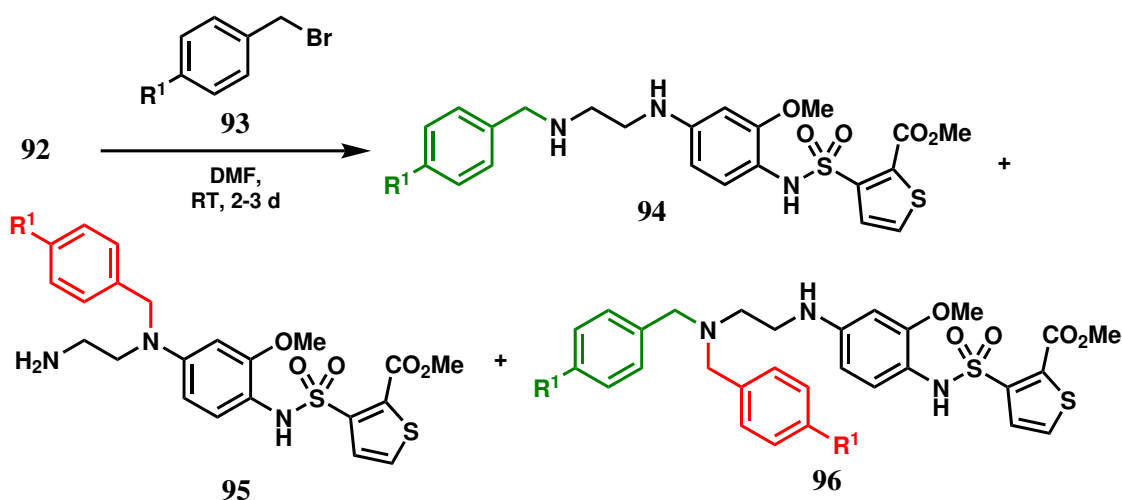
Schema 13: Synthese der Benzylbromide **82**, **83** sowie **86** als photoreaktive Gruppen zur Markierung von Liganden der „ST-Serie“.^{81,82}

Für die folgenden Markierungsversuche wurde als erforderliches „ST-Nukleophil“ ein primäres Amin favorisiert. Die kommerzielle Verfügbarkeit des *mono*-Boc-geschützten Ethylendiamins **87** wurde daher dazu genutzt, den entsprechenden Liganden herzustellen (**Schema 14**). **87** wurde im ersten Schritt mit **79** durch Mikrowellen-gestützte Synthese zu **88** umgesetzt. Nachfolgend wurde, analog zu der vorherigen Ligandensynthese, die Nitrogruppe reduziert und das so erhaltene **89** mit Thiophensulfonylchlorid **69** zum Liganden **90** umgesetzt. Bei der Aufreinigung des Produkts konnte jedoch das Regioisomer **91**, welches durch Reaktion des anderen anilinschen Stickstoffs entsteht, nicht abgetrennt werden. Somit wurde ein Gemisch zur finalen Entschützung des primären Amins eingesetzt und **92** dargestellt.



Schema 14: Synthese von **92** als potentieller PPAR β/δ -Ligand der die Möglichkeit der *late-stage*-Einführung von PA-Funktionen über das primäre Amin erlaubt.

Das Produkt zersetzte sich nach einiger Zeit in deuterierten Lösungsmitteln und wurde daher zeitnah umgesetzt. Es gilt anzumerken, dass das entsprechende Hydrochlorid als stabile und damit lagerfähige Variante für ein Fortschreiten des Projekts in Betracht gezogen wurde. Zunächst wurden jedoch erste Testreaktionen von **92** mit den Benzylbromiden **93** durchgeführt (**Schema 15**). Als Ergebnis konnte das gewünschte Produkt **94** lediglich in einer Mischung mit dem unerwünschten Regioisomer **95** erhalten werden. Ferner reagierte ein beträchtlicher Teil des Edukts zum dibenzylierten Produkt **96**, welches sich mittels MPLC abtrennen ließ.



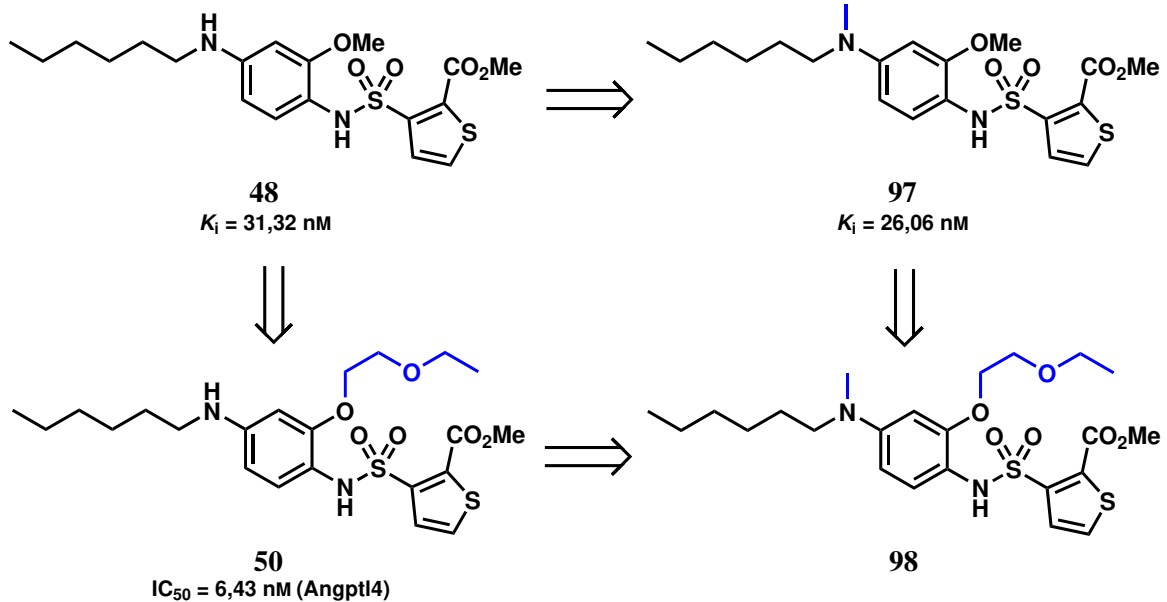
Schema 15: Reaktion von **92** mit Benzylbromiden **93** zum gewünschten Produkt **94**, welches jedoch in einer Mischung mit dem Regioisomer **95** vorlag sowie ferner zur dibenzylierten Spezies **96** führte. $R^1 = H, N_3, \text{Trifluormethyldiaziriny}$.

Um die Bildung von **95** zu verhindern, wurde der Einsatz von Schutzgruppen kritisch hinterfragt, nach eingehender Studie möglicher Kandidaten jedoch ausgeschlossen. Aufgrund der angestrebten Einführung einer Schutzgruppe nach der Mikrowellensynthese muss diese sowohl bezüglich katalytisch reduktiver Bedingungen sowie im stark basischen Milieu (Pyridin als Lösungsmittel im darauffolgenden Schritt) stabil sein. Nur wenige Gruppen wären in der Lage diese Bedingungen zu tolerieren. Ein möglicher Kandidat, die Fmoc-Gruppe, konnte in Testversuchen nicht eingeführt werden (nicht gezeigt). Die vielversprechendere Synthese eines *N*-methylierten ST-Derivates wurde daher der Etablierung einer Auftrennung mittels präparativer HPLC vorgezogen.

4.1.4 Synthese eines neuen *N*-methylierten PPAR β/δ -Liganden

Die *N*-Methylierung sollte die Anilinposition blockieren und somit das Auftreten des unerwünschten Regioisomers verhindern. Durch Vorarbeiten war bereits bekannt, dass die Aktivität hierdurch nicht beeinträchtigt wird (**Schema 16**). Im Vergleich zu **48** weist das entsprechende *N*-Methyl-Derivat PT-S18 **97** sogar einen geringfügig niedrigeren K_i auf. Ferner wurde die Löslichkeit durch Variation der Etherfunktion verbessert, woraus der Ethoxyethylether **50** resultierte (**2.3.6.1**). Für den potentiellen neuen inversen Agonisten wurde daher eine Kombination beider Substitutionsmuster angestrebt.

Schlussendlich sollte sich der Ligand **98** durch eine relative hohe Aktivität, der Möglichkeit einer gezielten Isolierung sowie durch eine verbesserte Löslichkeit auszeichnen.^{63,64}



Schema 16: Vergleich der Aktivität des *N*-methylierten Liganden PT-S18 **97** mit der unmodifizierten Variante ST247 **48**. Verbesserte Löslichkeit durch Einführung des Ethoxyethylethers in **50** und **98** als Kombination der Optimierungen.^{63,64}

Zusätzlich sollte durch die Einführung der Ethoxyethylether-Funktionalität eine Verbesserung des Wirkprofils von **97** erreicht werden, da dieser in Corepressorassays zwar schlechter als GSK0660 **46** abschnitt (**Abbildung 31**, links), jedoch PT-S264 **50** bessere Ergebnisse als die Ausgangsverbindung ST247 **48** zeigte (rechts).^{63,64}

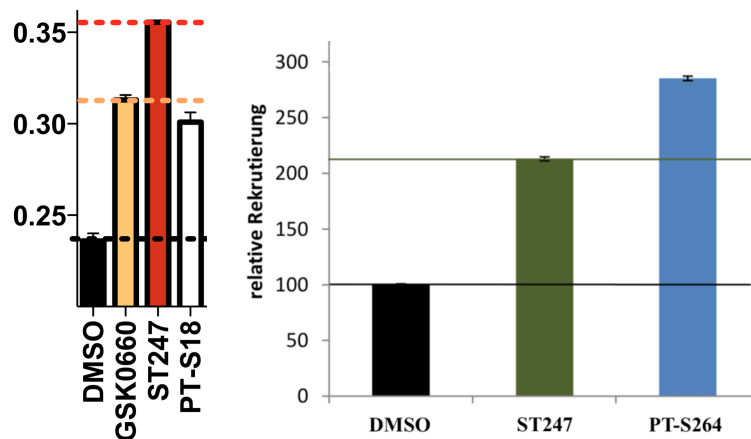
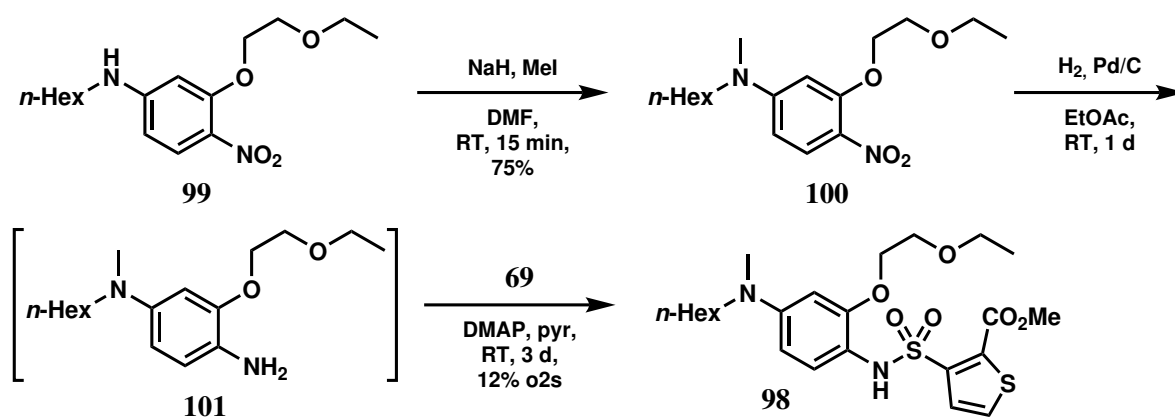


Abbildung 31: SMRT-Corepressorassays: Links: Von GSK0660 **46**, ST247 **48** und PT-S18 **97**. Rechts: Von ST247 **48** und PT-S264 **50**. Gekürzte Darstellungen.⁷⁸

Nach erfolgreicher Darstellung von **98** sollte später der Hexylrest durch die bereits etablierte Ethylendiaminfunktion ausgetauscht werden, um einen problemlosen Zugang zu Photoaffinitätsliganden zu ermöglichen. Die Synthese von **98** (Schema 17) wurde durch Methylierung der Nitroverbindung **99** (Vorstufe der Darstellung von **50**) initiiert. Das *N*-Methyl-Derivat **100** konnte in zufriedenstellender Ausbeute von 75% erhalten werden. Die Reduktion zu **101** und Umsetzung mit Thiophensulfonylchlorid **69** führte zum Liganden **98**.



Schema 17: Die Synthese von **98** ausgehend von einer Vorstufe **99** des bereits etablierten Liganden **50**.

Da durch Kombination bereits vermessener Verbindungen eine Aktivität von **98** bezüglich PPAR β/δ zu erwarten war, wurde nach Darstellung des neuen Liganden direkt ein FRET-Corepressorassay durchgeführt (2.3.6.1). Es stellte sich jedoch heraus, dass **98** trotz Kombination zweier vorteilhafter Strukturelemente eine geringere Aktivität als die verwandten Substanzen **102** und **97** aufwies. Aus diesem Grund konnte Verbindung **98** nicht als potenter inverser Agonist eingestuft werden, sodass auf die Folgesynthese unter Verwendung der Ethylendiaminkette verzichtet wurde.

Mit Blick auf die erläuterten Ergebnisse wurden aufgrund von Zeitmangel keine weiteren Anstrengungen bezüglich des Einsatzes präparativer HPLC-Methoden zur Trennung des Substanzgemisches der Verbindung **94** unternommen. Da zudem noch kein experimentelles Verfahren für die Radikalerzeugung etabliert werden konnte, wurde das Projekt zurückgestellt und der Fokus auf die anderen Teilprojekte gelegt.

4.2 Off-Target-Aufklärung von DG172

4.2.1 Strukturanalyse

Zur besseren Übersicht soll zunächst noch einmal die visuelle Strukturanalyse des *Off-Target*-Effekts von DG172 **52** (analog zu **3.2**) aufgeführt werden (**Abbildung 32**). Während das „obere“ *ortho*-Bromphenol für die Modulierung der Aktivität zu PPAR β/δ ausschlaggebend ist, konnte der, über das essentielle Cyanostilben-Motiv verbundene, „untere“ Teil für den *Off-Target*-Effekt verantwortlich gemacht werden.

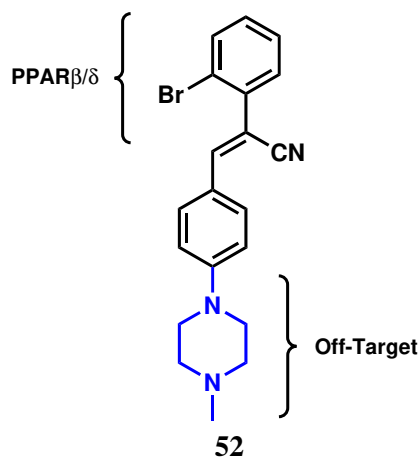


Abbildung 32: Aus SAR-Studien gewonnene Information bezüglich der essentiellen Strukturmodule für die Modulierung der Aktivität zu PPAR β/δ sowie des *Off-Target*-Effekts von DG172 **52**.⁶⁶

Zuerst musste eine geeignete Substitution des „oberen“ Aromaten gefunden werden, die zu einer möglichst großen Verschlechterung oder gänzlichen Ausschaltung der Affinität zu PPAR β/δ führt. Nur so konnte sichergestellt werden, dass das unbekannte Proteintarget möglichst spezifisch adressiert würde. In Vorarbeiten fanden SAR-Studien bezüglich der Chlorsubstitution einer zu DG172 **52** nah verwandten Verbindung **103** statt (**Abbildung 33**). Dabei soll außer Acht gelassen werden, dass diese einen anderen „unteren“ Teil aufweist. Es konnte gezeigt werden, dass eine Verschiebung des Chlorsubstituenten von der *ortho* in die *meta*- oder *para*-Position mit einem starken Affinitätsverlust einherging, wobei das *para*-substituierte Derivat im Vergleich zur DMSO-Kontrolle kaum noch Aktivität zeigte.^{66,74}

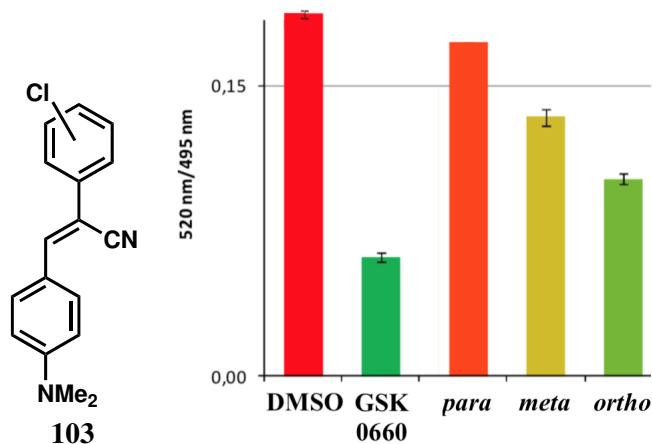
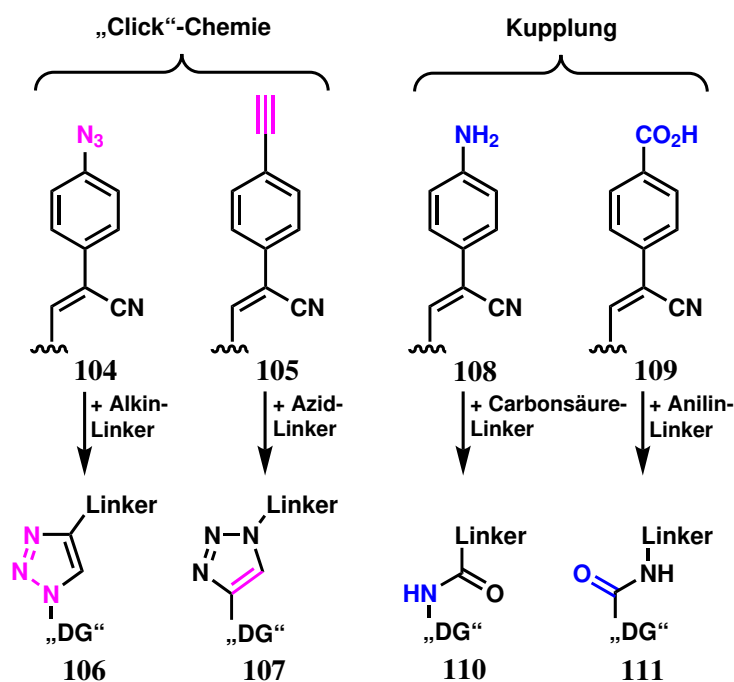


Abbildung 33: Gemessene Affinität der Chlorsubstitutionen in *ortho*-, *meta*- und *para*-Position anhand der Verbindung **103** und im Vergleich zu GSK0060 **46**. Nach 30 min bei 1 μ M. Gekürzte Darstellung.⁷⁴

Dieses Ergebnis wurde zum Anlass genommen, nach neuen *para*-Substitutionen zu suchen, die eine zusätzliche Modifikation mit einer Biotin-*Spacer*-Funktion ermöglichen. Um auf die Erkundung des chemischen Aktivitätsraums verzichten zu können, wurde sich für eine strukturell nur wenig abweichende, direkte Substitution des entsprechenden Phenylteils entschieden und z.B. auf einen weiteren Einschub von Methylengruppen verzichtet.

Die Modifizierung von Liganden zu Affinitätssonden kann prinzipiell durch zwei Methoden geschehen. Zum einen kann man sich der „Click“-Chemie bedienen, wobei Azide mit Alkinen kupferkatalysiert zu Triazolen umgesetzt werden. Allerdings erfordert diese Methode zumeist eine relativ aufwändige Optimierung der Reaktionsbedingungen. Für die Darstellung des gewünschten *Off-Target*-Liganden ergäben sich unter Einsatz der „Click“-Chemie zwei unterschiedliche Reaktionssequenzen bei Verwendung des *para*-Azids **104** oder des entsprechenden Alkins **105** und würden zu **106** bzw. **107** führen (**Schema 18**). Zum anderen können klassische Amidkupplungen eingesetzt werden, wobei Amine mit komplementären Carbonylverbindungen reagieren. Oftmals beschränkt sich die Reaktionsoptimierung dann lediglich auf den Einsatz eines geeigneten Kupplungsreagenzes. Das Anilin **108** sowie Benzoesäure **109** wären mögliche Kandidaten der Stilbene für die Verfolgung eines solchen Ansatzes, welcher **110** bzw. **111** liefern würde.

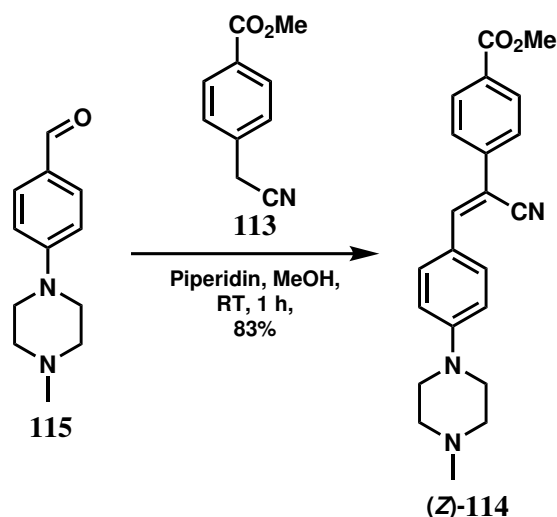


Schema 18: Auswahl an möglichen *Off-Target*-Sonden für die zusätzliche Funktionalisierung zur Affinitätssonde. Möglichkeit der „Click“-Chemie durch **104** und **105** (zu **106** bzw. **107**). Amidkupplung durch **108** oder **109** (zu **110** bzw. **111**).

Aufgrund der simpleren Reaktionsführung wurde sich für Amidkupplungen und ferner für die Synthese von **109** entschieden, da das Anilin **108** im Vergleich zum in der anderen Synthesesequenz verwendeten aliphatischen Amin als aromatisches Amin eine deutlich geringere Nukleophilie und eine damit einhergehende Reaktionsträgheit aufweist.

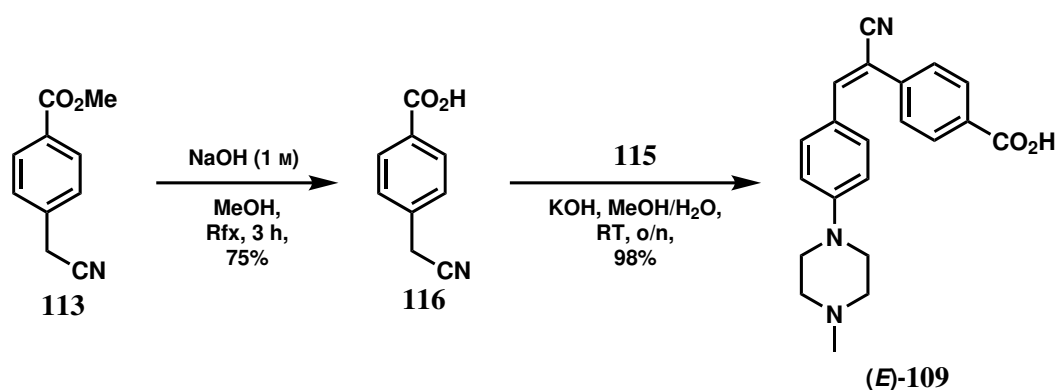
4.2.2 Synthese eines neuen *Off-Target*-Liganden

Wie beschrieben, lassen sich die Cyanostilbene der „DG-Serie“ in einer Stufe aus den jeweiligen Cyanomethylphenylen sowie Benzaldehyden darstellen (**4.1**). Wegen der kommerziellen Verfügbarkeit des Methyl-4-cyanomethylbenzoats **113**, wurde sich für die Synthese einer Methylester-Vorstufe **114** entschieden (**Schema 19**). Nachfolgend sollte mittels Verseifung der Ester gespalten und die entsprechende Säure **109** dargestellt werden. Die geplante Synthese des Methylester-Cyanostilbens **114**, unter Verwendung des Aldehyds **115**, verlief problemlos mit einer guten Ausbeute von 83%. Durch Auswertung des ¹H-NMRs ließ sich überdies ein (*E*)/(*Z*)-Verhältnis von 1:6 bestimmen.



Schema 19: Synthese der Methylestervorstufe **114** von **109**.

Die nachfolgende Esterspaltung mit KOH ermöglichte die Darstellung des gewünschten Produktes **109** jedoch nur in Spuren, da die auftretenden anorganischen Salze nicht zufriedenstellend vom Reaktionsgemisch abgetrennt werden konnten. Deshalb wurde sich für eine Verseifung des entsprechenden Methyl-4-cyanomethylbenzoats **113** zur Säure **116** entschieden (**Schema 20**), welche nachfolgend per Knoevenagelreaktion mit **115** die Verbindung **109** in sehr guter Ausbeute von 98% erzielte. Im Vergleich zur Bildung des Methoxyester-Cyanostilbens **114**, lag das (*E*)-Isomer in dreifachem Überschuss vor. Das Verhältnis verschob sich also beträchtlich.



Schema 20: Verseifung des Esters **113** zur Säure **116** mit anschließender Darstellung von **109** als *Off-Target*-Ligand, welcher hauptsächlich als (*E*)-Isomer vorlag.

Die favorisierte Bildung des kinetischen Produkts lässt sich eventuell durch den Austausch des Piperidins, als sekundäres Amin, gegen KOH als Base sowie aufgrund der Zugabe von Wasser erklären. Vermutlich wird eine Isomerisierung hierbei durch nachfolgende Isomerisierung des thermodynamischen (Z)-Isomers erzielt. Ein ähnlicher Effekt konnte von Itzstein *et al.* bei der Knoevenagelreaktion von Phosphorylacetaten beobachtet werden. Ferner ist bekannt, dass das Isomerenverhältnis durch verschiedene Lösungsmittel unterschiedlich stark beeinflusst werden kann.⁸³

Analog zu den Vorarbeiten wurde durch ein ^{13}C -gated-decoupled-Experiment die *cis/trans*-Konfiguration der beiden Isomere eindeutig zugeordnet (**Abbildung 34**). Dabei sei angemerkt, dass sich die Angabe von „cis“ oder „trans“ auf die Stellung der Kopplungspartner zueinander bezieht. Die Größe der Kopplung des Stilbenprotons zum Nitrilkohlenstoff ist hierbei direkt proportional zum Abstand der beiden Atome. Das (Z)-Isomer weist hierdurch eine ungefähr anderthalbfach so große $^3J_{H,C}$ -Konstante von 15,6 Hz auf, während für das Hauptprodukt ein Wert von 9,6 Hz beobachtet werden konnte.⁷⁴

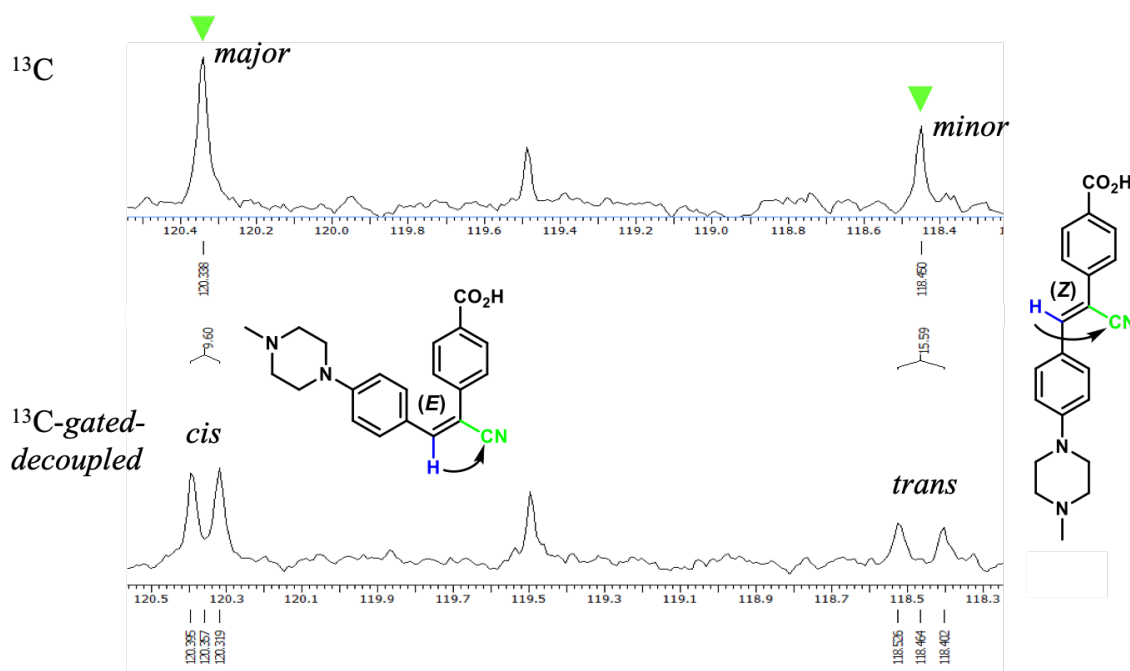


Abbildung 34: ^{13}C -gated-decoupled-Experiment zur Zuordnung der *cis/trans*-Konfiguration der beiden Produktisomere von **109**.

Bevor die Darstellung der Affinitätssonde erfolgen konnte, musste durch einen kompetitiven Assay die Affinität der Verbindung **109** bezüglich PPAR β/δ überprüft werden (**Abbildung 35**). Wie erwähnt, sollte durch die *para*-Substitution des „oberen“ Aromaten jegliche Affinität zur PPAR β/δ -LBD unterbunden werden. Die Auftragung des Verhältnisses der FRET-Intensitäten gegen die logarithmierte Konzentration zeigt deutlich, dass die Aktivität von PPAR β/δ durch diesen Liganden nicht moduliert werden kann. Eine Gerade bedeutet den völligen Verlust von Spezifität, für inverse Agonisten würde z.B. eine absteigende Kurve zu beobachten sein.

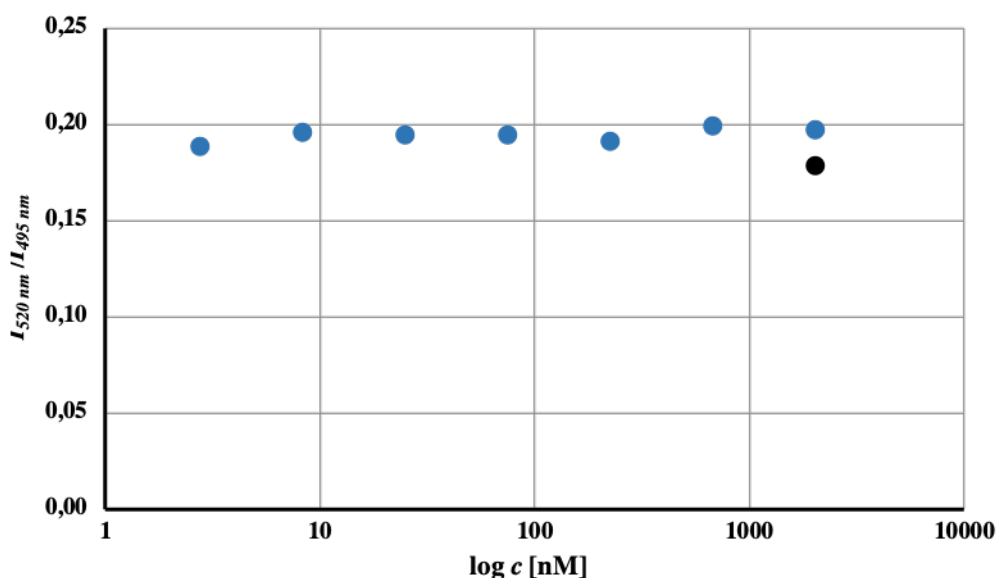
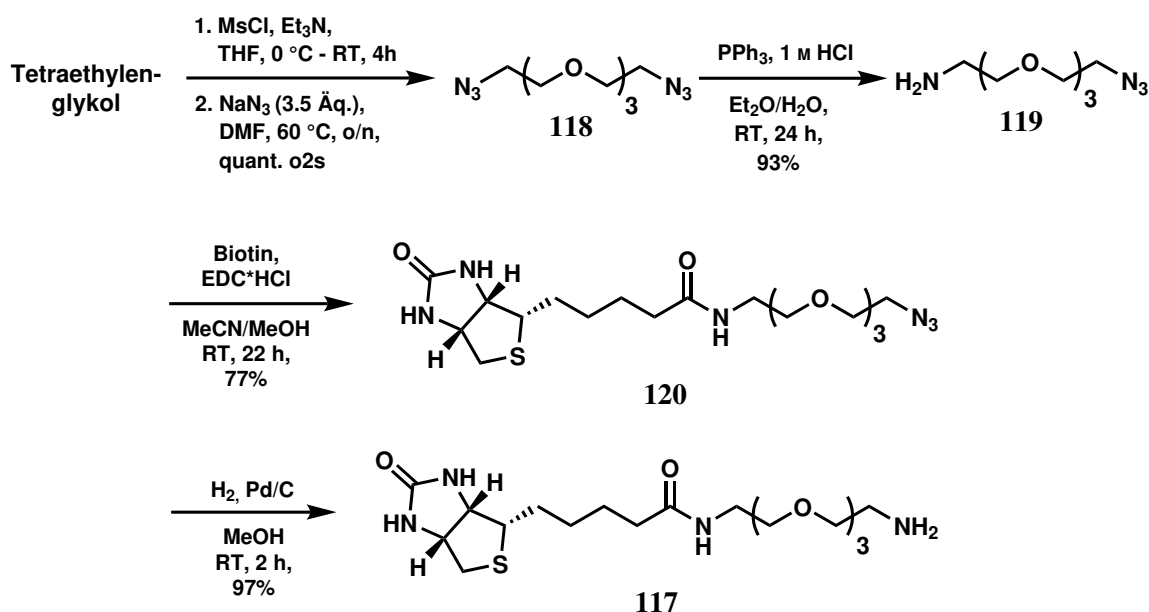


Abbildung 35: Ergebnis des kompetitiven FRET-Assays der Verbindung **109**, welche keine Aktivität zur PPAR β/δ -LBD aufweist. DMSO-Kontrolle in *schwarz*.

4.2.3 Synthese des Biotinlinkers

Durch Synthese von **109** wurde auch die Wahl der Biotin-*Spacer*-Spezies beeinflusst. Das komplementäre Amin sollte sich am Ende der Polyethylenglykolkette befinden, welche zur Modulierung der Hydrophilie oftmals eingesetzt wird. Die Länge dieser Kette kann variiert werden, zumeist wird aber eine PEG₃-Einheit genutzt. Aufgrund des relativ hohen Preises kommerziell verfügbarer Biotin-*Spacer*-Verbindungen, wurde sich für die Synthese von **117** im Gramm-Maßstab entschieden (**Schema 21**).

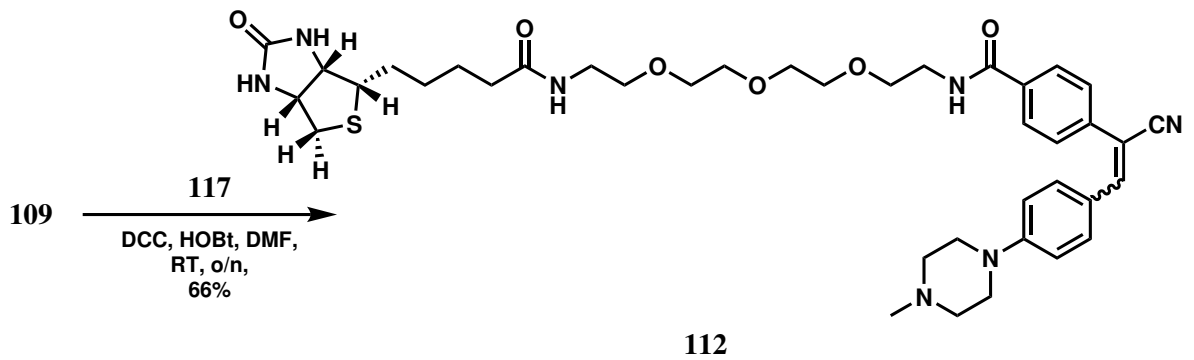
Durch Kombination mehrerer publizierter Teilschritte gestaltete sich die Darstellung des Biotin-PEG₃-Amins problemlos. Ausgehend von Tetraethylenglykol wurden zunächst die terminalen Hydroxygruppen zu **118** azidiert. Durch *mono*-Staudinger-Reduktion fand die Umwandlung eines Azids zum Amin statt (**119**). Dieses wurde darauffolgend unter Verwendung von EDC-Hydrochlorid an die Säurefunktion des Biotins gekuppelt. Das so erhaltene terminale Azid **120** konnte schlussendlich durch katalytische Reduktion zu **117** umgesetzt werden.⁸⁴⁻⁸⁷



Schema 21: Synthese des Biotin-PEG₃-Amins **117** durch Diazidierung von Tetraethylenglykol zu **118** mit anschließender *mono*-Staudinger-Reduktion (**119**) und Kupplung mit Biotin (**120**) sowie finaler katalytischer Reduktion.

4.2.4 Synthese der Affinitätssonde

Die anschließende Verknüpfung des *Off-Target*-Liganden **109** mit der Biotin-*Spacer*-Verbindung **117** zur finalen Affinitätssonde **112** (**Schema 22**) konnte nicht analog zur Darstellung des Biotin-PEG₃-Azids **120** durchgeführt werden, da der aus EDC entstehende Harnstoff zu polar war und nicht vom Produkt separiert werden konnte. Durch Verwendung des apolareren DCCs und HOBT wurde dieses Problem jedoch zufriedenstellend gelöst. Das (*E*)/(*Z*)-Isomerenverhältnis änderte sich wiederum und konnte auf 1:1 bestimmt werden.



Schema 22: Synthese der Affinitätssonde **112** aus **109** und **117** zur Aufklärung des *Off-Target*-Effekts von DG172 **52**.

Analog zum *Off-Target*-Liganden **109** wurde wiederum ein kompetitiver Assay vermessen (**Abbildung 36**), um auch bei der Affinitätssonde sicherzustellen, dass diese keine Affinität bezüglich PPAR β/δ aufweist. Es wurde ein ähnliches Ergebnis wie bei **109** beobachtet und daher konnten anschließend die *pull-down*-Experimente initiiert werden.

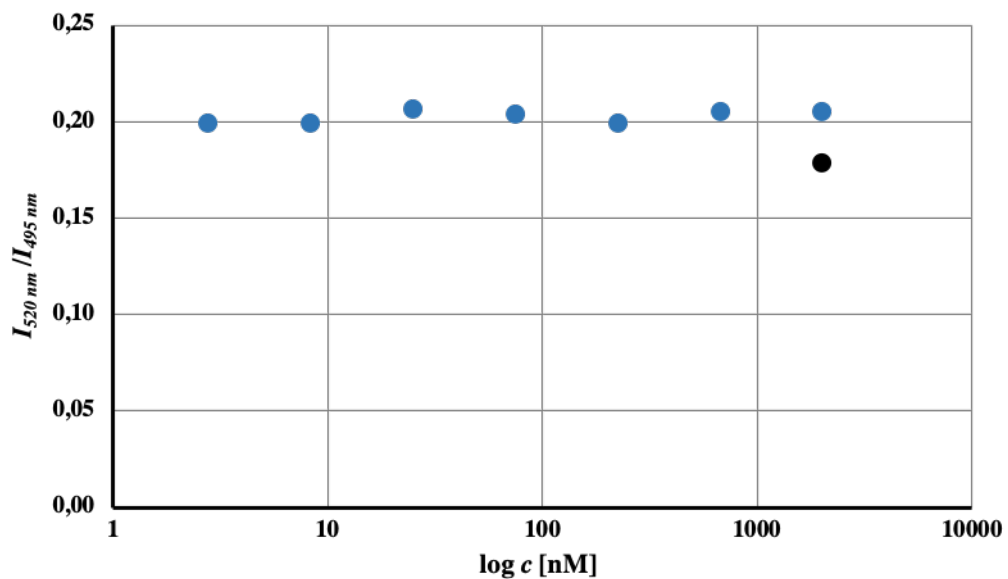


Abbildung 36: Ergebnis des kompetitiven FRET-Assays der Verbindung **112**, welche keine Aktivität zur PPAR β/δ -LBD aufweist. DMSO-Kontrolle in *schwarz*..

4.2.5 *Pull-down-Experiment*

Da zum Zeitpunkt der Niederschrift dieser Dissertation die *pull-down*-Experimente noch nicht abgeschlossen waren, können an dieser Stelle keine Ergebnisse berichtet werden. Diese müssen zu späterer Zeit in entsprechenden Manuskripten oder Veröffentlichungen nachgeschlagen werden.

4.3 SAR und Targetaufklärung von ISX-9

4.3.1 Strukturanalyse und Synthese

Die Verbindung ISX-9, nachfolgend OX-12 genannt, **54** lässt sich in drei Regionen unterteilen (**Abbildung 37**). Im Zentrum befindet sich ein 3,5-disubstituiertes Isoxazol, welches über die 5-Position mit einem Thiophen verknüpft ist (*blau*). Zusätzlich befindet sich an der 3-Position ein Amid (*lila*), welches mit einem Cyclopropylrest modifiziert ist.

Es handelt sich hierbei auf den ersten Blick um ein wenig spezifisches *small molecule*, da weder Stereozentren, noch besonders ungewöhnliche Strukturelemente auftreten. Dennoch musste zunächst durch strukturelle Reduktion untersucht werden, welches Kernmotiv für den beobachteten Effekt der GLI2-Induktion verantwortlich ist.

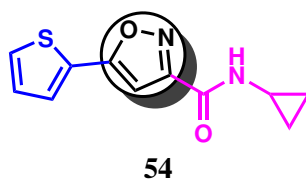


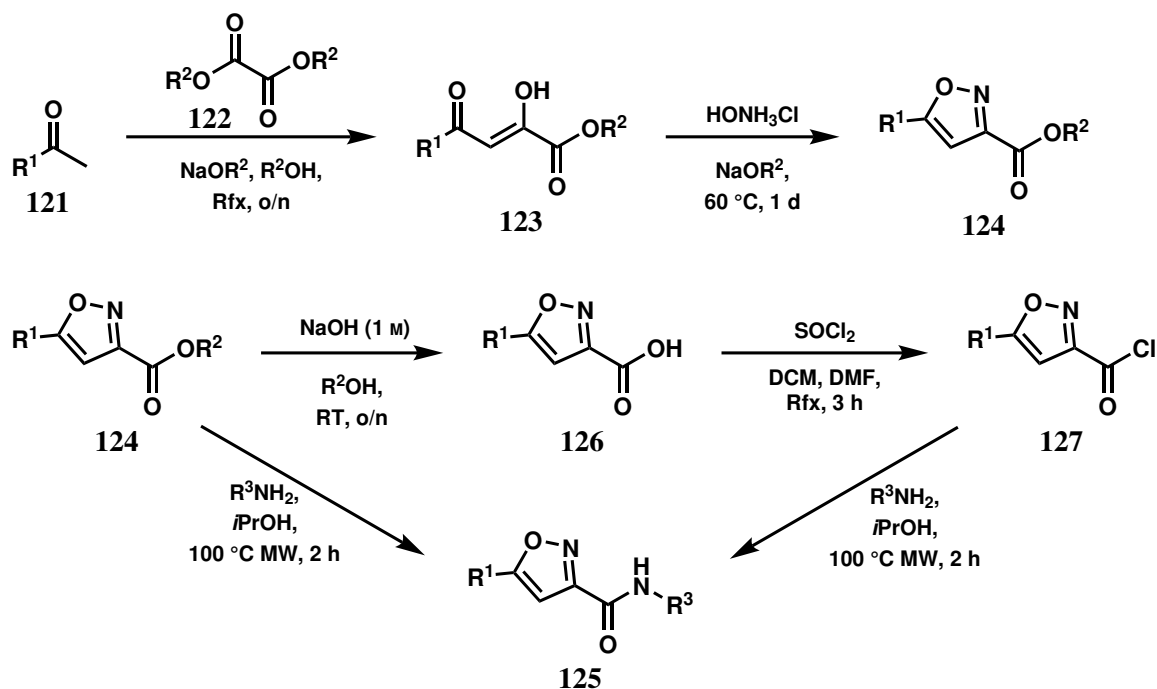
Abbildung 37: Strukturelle Regionen von OX-12 **54**. Ein 3,5-disubstituiertes Isoxazol im Zentrum, welches über die 5-Position mit einem Thiophen *blau* und über die 3-Position mit einem Cyclopropylamid (*lila*) verbunden ist.

Um einen einfacheren Einstieg in die Besprechung der SAR zu geben, wird im Folgenden zunächst die allgemeine Syntheseroute von OX-12 **54** sowie aller weiterer Derivate erläutert (**Schema 23**).

Ausgehend von den Ketonen **121** werden unter Vermittlung von Natriumalkoholat und mit dem entsprechenden Alkyloxalat **122** die 2-Hydroxy-4-oxo-but-2-enoate **123** dargestellt. Anschließend findet die Zyklisierung zu den Isoxazolen **124** mittels Hydroxylaminhydrochlorid statt. Nachfolgend teilt die Synthese sich in zwei mögliche Routen auf:

Zum einen ist eine direkte Amidkupplung der Esterfunktion in **124** mit entsprechenden Aminen mittels Mikrowellen-vermittelter Reaktion zu den finalen Liganden **125** möglich (Esteroute). Zum anderen müssen sterisch anspruchsvollere Amine auf klassischem Wege mit aus den Verseifungsprodukten **126** gewonnenen Säurechloriden **127** umgesetzt werden (Säurechloridroute).

OX-12 **54** ist zwar kommerziell erhältlich, konnte aber auch durch Nutzung der Esterroute in 33% Ausbeute über drei Stufen, ausgehend von 2-Acetylthiophen, erhalten werden.



Schema 23: Synthese der finalen Isoxazole **125** ausgehend von den Ketonen **121** über Ester **124** oder über die Säurechloride **127**. R^1 = Methyl, Aryl, Heteroaryl; R^2 = Methyl, Ethyl; R^3 = Alkyl, Cycloalkyl, Aryl.

4.3.2 Serie 1: Bestimmung der Kernstruktur

4.3.2.1 Strukturelle Reduktion

Zur Ermittlung des Kernmotivs wurde das Prinzip der Komplexizitätsreduktion (2.1.1.1) angewandt. Das zentrale Isoxazol bildete die Konstante und wurde zunächst nicht verändert (**Abbildung 38**). Da den beiden äußeren Regionen eine gewisse Funktion zugeschrieben wurde, konnten sie nicht gänzlich weggelassen werden. Um das 3,5-Substitutionsmuster am Zentrum nachzuempfinden, wurde das Amid durch den Ester ersetzt und das Thiophen durch ein Methyl repräsentiert. Die kommerziell erhältliche, und im Vergleich zu OX-12 **54**, rudimentäre Verbindung **128** zeigte jedoch keine Aktivität. Also konnte davon ausgegangen werden, dass die Funktion durch eine oder beide ausgelassenen Region(en) moduliert wird.

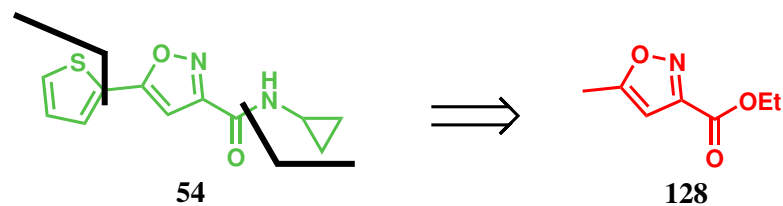


Abbildung 38: Die durch Reduktion der Molekülkomplexizität von OX-12 **54** erhaltene, inaktive Verbindung **128** zur Identifizierung des Kernmotivs. Grün = aktiv, rot = inaktiv.

Daraufhin wurden die beiden Regionen getrennt voneinander untersucht (**Abbildung 39**). Die fehlende Aktivität des kommerziell erhältlichen Ethylesters **129** ließ auf eine vermutlich essentielle Funktion des Amidstickstoffs als Wasserstoffbrückendonator (HBD) schließen. Da die 5-Methyl-Verbindung **130** ebenfalls inaktiv ist konnte daraufhin bilanziert werden, dass sowohl die Arylregion als auch ein Amid zur Modulation der Funktion essentiell sind.

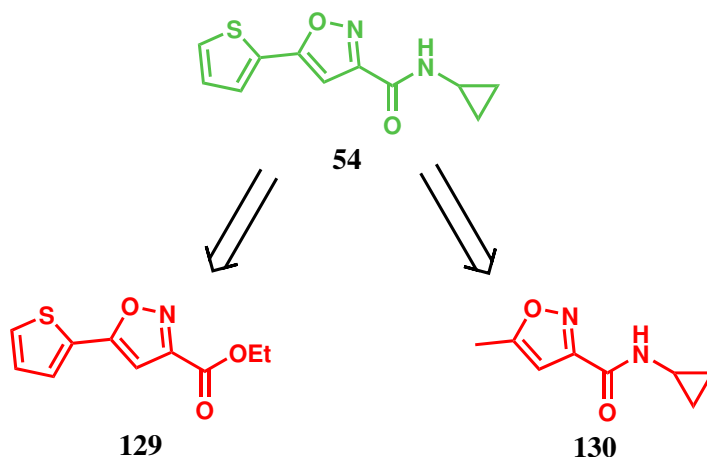


Abbildung 39: Durch Entfernen jeweils der OX-12-Regionen erhaltene Verbindungen **129** sowie **130**, welche keine Aktivität aufweisen. Grün = aktiv, rot = inaktiv.

4.3.2.2 Bioisosterie

Anschließend sollte herausgefunden werden, ob für die Arylregion ein bioisosterer Austausch in Frage käme. Die Verbindung OX-02 **131** (**Abbildung 40**) konnte hierfür aus der kommerziell erhältlichen 5-Phenylisoxazol-carbonsäure **132**, durch Nutzung der Säurechloridroute, in 56% Ausbeute über zwei Stufen dargestellt werden. Darüber hinaus wurde der entsprechende Ethylester **133** erworben, um die Relevanz der Amidregion weiterführend zu analysieren.

Interessanterweise sorgt die Einführung eines Phenylrings für einen Anstieg der Aktivität um 36%. Für die Notwendigkeit eines Aryls lassen sich zwei Hypothesen formulieren. Entweder spielt die hydrophobe Wechselwirkung der Aromaten oder deren π - π -Interaktionen eine entscheidende Rolle für den Bindungsmodus. Die entsprechende Vorstufe **132** sowie der Ester **133** stellten sich als inaktiv heraus und validierten damit die Übertragbarkeit des Ergebnisses, dass die Amidfunktionalität essentiell ist, unabhängig der biosiosteren Arylmodifikation.

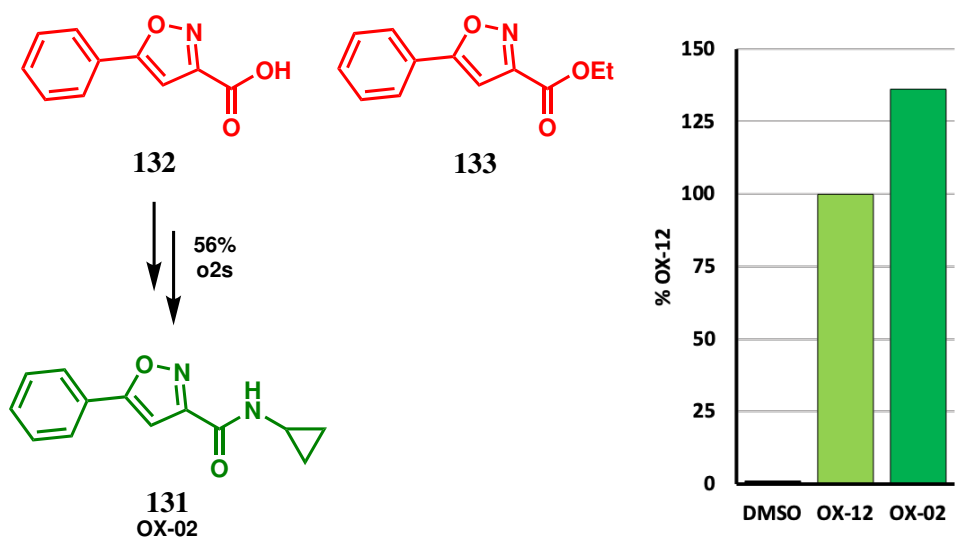
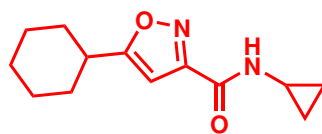


Abbildung 40: Links: Synthese von OX-02 aus der kommerziell erhältlichen Säure **132** sowie der kommerziell erhältliche Ester **133** zur Validierung der Hypothese eines möglichen biosiosteren Austauschs. Grün = aktiv, rot = inaktiv. Rechts: Assaydaten der Referenz OX-12 **54** sowie des aktiveren OX-02 **131**. Erhöhung der hGLI2-Expression bei PA-TU-8988T-Zellen mit 0,5% FBS nach 48 h und einer Ligandenkonzentration von 20 μ M.

Die Rolle der Arylfunktion am Bindungsmodus sollte durch das Cyclohexyl-Derivat **134** weitergehend überprüft werden (**Abbildung 41**). Durch das Fehlen des aromatischen Systems lässt sich testen, ob hydrophobe Wechselwirkungen möglicherweise ausreichend sind und eine Interaktion mit π -Elektronen daher nicht notwendig ist. Außerdem wird hierdurch der sterische Anspruch erhöht, da ein Cyclohexylring im Vergleich zu einem Phenyl nicht flach vorliegt, sondern eine Sessel- bzw. Wannenkongfiguration (sowie Zwischenstufen) einnehmen kann. Dies führte wahrscheinlich auch zur völligen Ausschaltung der Aktivität von **134**.



134

Abbildung 41: Das inaktive Cyclohexylderivat **134** zur Untersuchung der hydrophoben und sterischen Wechselwirkungen der Arylregion. Rot = inaktiv.

4.3.2.3 Amid-Analyse

Um die Wichtigkeit des Amid-Carbonyls als potentiellen HBA zu untersuchen, wurde die Synthese einer reduzierten Variante angestrebt (**Abbildung 42**). Ausgehend von dem Methyl ester **135** konnte durch Reduktion zum Alkohol, anschließender Mesylierung sowie Nutzung der bereits beschriebenen Amidverknüpfung, das gewünschte, jedoch inaktive Methylenamin **136** dargestellt werden. Durch diesen Befund wurde das Carbonyl in die Kernstruktur aufgenommen. Ferner sollte abschließend die Flexibilität bezüglich der Lage des Amids durch Darstellung des Retroamids **137** überprüft werden. Allerdings konnte ausgehend vom Amin **138** per S_N2 -Reaktion mit dem Carbonylchlorid **139** nur das disubstituierte Produkt **140** erhalten werden, welches nicht weiter untersucht wurde.

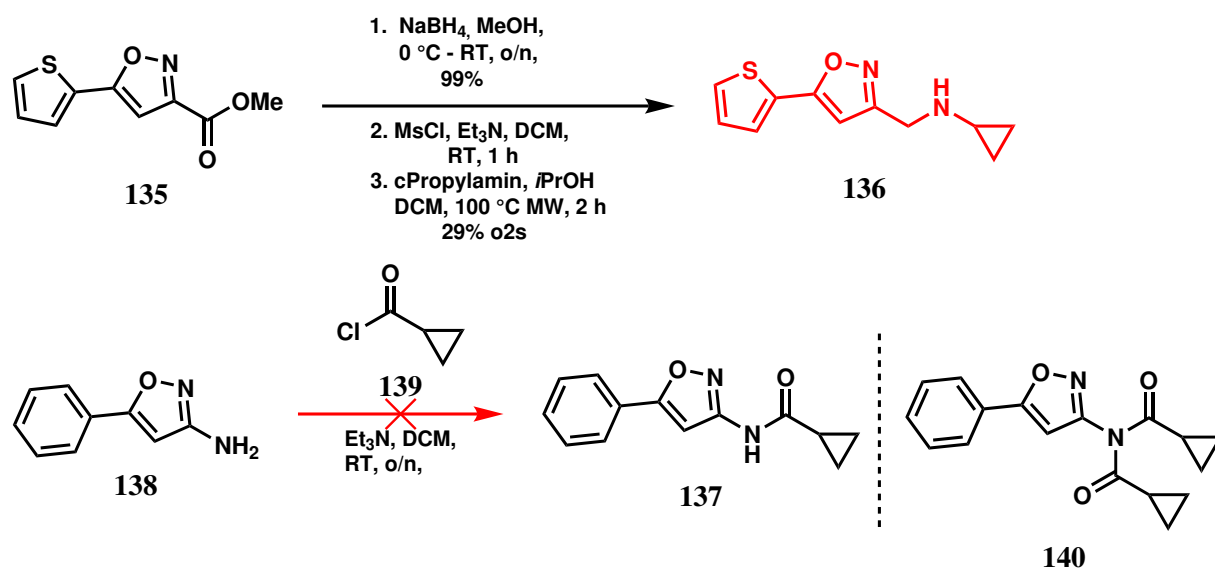


Abbildung 42: Synthese von OX-24 **136** ausgehend von dem Ester **135** über drei Stufen, zur Überprüfung der Wichtigkeit des Carbonyls als HBA. Misslungener Versuch der Synthese des Retroamids **137**. Rot = inaktiv.

4.3.2.4 Überlegungen zum zentralen Kern

Variationen des zentralen heterozyklischen Kerns wurden in Erwägung gezogen, aber nach eingehender Studie möglicher Derivate sowie deren teilweise komplexen Synthesen zunächst nicht weiter verfolgt, um der Erkundung des Aktivitätsraums der Isoxazolverbindungen mit einer 3-Amid-5-Aryl-Substitution **141** mehr Fokus zu geben.

Generell bestünde die Möglichkeit der Nutzung aller denkbaren Kombinationen von Heteroatomen in aromatischen Fünfringen, der Einfachheit halber zunächst ohne Betrachtung von Schwefelderivaten (**Abbildung 43**). Darüber hinaus ließen sich theoretisch beide Regionen jeweils an einer der zwei Substitutionspositionen einführen. Auf diese Weise würden z.B. unter anderem die 2,5- und 2,4-disubstituierten Oxazole (**142** und **143**) sowie durch weiteren Einbau eines Stickstoffs 1,2,4- und 1,3,4-Oxadiazole (**144** und **145**) in Frage kommen.

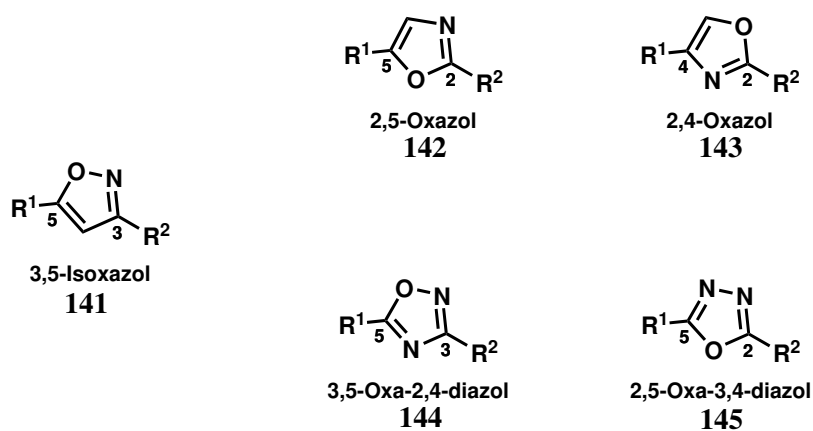


Abbildung 43: Mögliche Stickstoff- und sauerstoffaufweisende Heteroaromaten mit zusätzlichem Vertausch der beiden Regionen. R¹ = Phenyl, Thiophen oder Cyclopropylamid; R² = Cyclopropylamid oder Phenyl, Thiophen.

4.3.2.5 Formulierung des Kernmotivs

Zusammenfassend ließ sich zu diesem Zeitpunkt bemerken, dass für die Aktivität folgende Strukturelemente präsent sein müssen: Vorerst ein sich im Zentrum befindendes Isoxazol in Verbindung zu einem Aromaten über die 5-Position. Vorzugsweise handelt es sich hierbei um ein Thiophen oder Phenyl, um die Vergleichbarkeit der Assayergebnisse zu gewährleisten. Ferner bedarf es eines Amides, welches über die 3-Position substituiert ist. OX-12 **54** stellte damit also bereits das Kernmotiv dar. Der Aktivitätsraum möglicher Amidsubstituenten wurde nun in der folgenden Serie untersucht.

4.3.3 Serie 2: Amidvariationen

4.3.3.1 Nicht-zyklische Amide

Zunächst wurde die Darstellung und Vermessung einiger nicht-zyklischer Amide durchgeführt (**Abbildung 44**). Dem Ethylderivat OX-22 **146** wurde eine, der Referenz OX-12 **54** entsprechende oder möglicherweise leicht verbesserte Aktivität vorausgesagt, da es sterisch weniger anspruchsvoll ist. Es konnte aber festgestellt werden, dass die schiere Größe nicht der alleinige bestimmende Aktivitätsfaktor sein kann, da **146** nur 74% der Referenzaktivität aufweist. Ob hierfür z.B. eine entropische „Strafe“ durch Verkleinerung der hydrophoben Oberfläche verantwortlich ist, war zum damaligen Zeitpunkt nicht überprüfbar. Die Aktivität wurde durch Einbau mehrerer Methylengruppen zum Hexyl OX-03 **147** noch deutlicher herabgesenkt. Die Verzweigung der Ethylverbindung lieferte das *iso*-Propylderivat OX-15 **148** sowie die *tert*-Butylverbindung OX-16 **149**, welche keinen Effekt zeigen. Zusätzlich wurde durch *N*-Methylierung von **146**, die bereits in **4.3.2.1** vermutete Notwendigkeit des Amidstickstoffs als Wasserstoffbrückendonator bewiesen, da OX-27 **150** ebenfalls inaktiv ist.

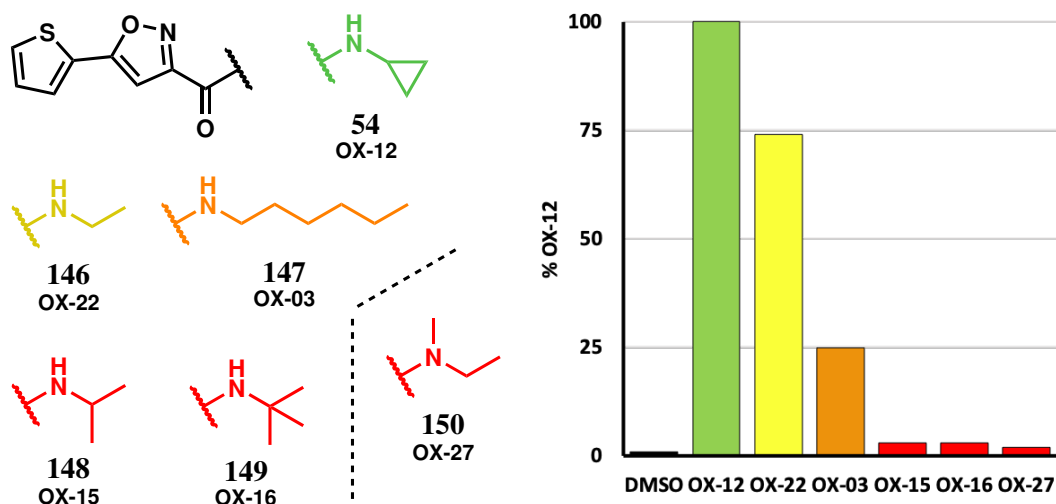


Abbildung 44: Verringerung der Aktivität durch Verlängerung oder Variation des Verzweigungsgrades der Alkylkette. Erhöhung der hGLI2-Expression bei PA-TU-8988T-Zellen mit 0,5% FBS nach 48 h und einer Ligandenkonzentration von 20 μ M.

Vor allem aufgrund des Vergleichs zwischen **54** und **148** wurde eine neue Hypothese aufgestellt. Ein Cyclopropylrest lässt sich zunächst als gestauchter *iso*-Propylrest begreifen, deshalb wurde eine gewisse Aktivität für OX-15 **148** vorausgesagt. Der einzige Faktor, welcher diese beiden Reste grundlegend unterscheidet, ist der C-C-C-Bindungswinkel. Zur Überprüfung dieses Zusammenhangs, wurden darauffolgend zyklische Derivate dargestellt und analysiert.

4.3.3.2 Zyklische Amide

Als erstes wurde die Auswirkung einer Ringvergrößerung des zyklischen Amids auf die Aktivität untersucht (**Abbildung 45**). Das Cyclopentylderivat OX-11 **151** sowie zusätzlich das Sechsringamid OX-18 **152** bestätigten die Vermutung einer Aktivitätsklippe durch Zunahme sterischer Effekte bzw. der Molekülgröße. Während **151** und die bioisostere Verbindung **153** schon Aktivitätseinbußen von mehr als 25% aufzeigen, kann für **152** kein biologischer Effekt mehr beobachtet werden. Anschließend wurde überprüft, ob durch Einbau einer Methylengruppe und der damit erhöhten Flexibilität eine Optimierung resultiert. Die entsprechende Substanz **154** und das Benzyl **155** sind jedoch ebenfalls inaktiv und untermauern hierdurch die erwähnte Limiterung. Außerdem zeigte das Morpholinderivat **156** als tertiäres Amid keine Aktivität (vgl. Daten von **150**).

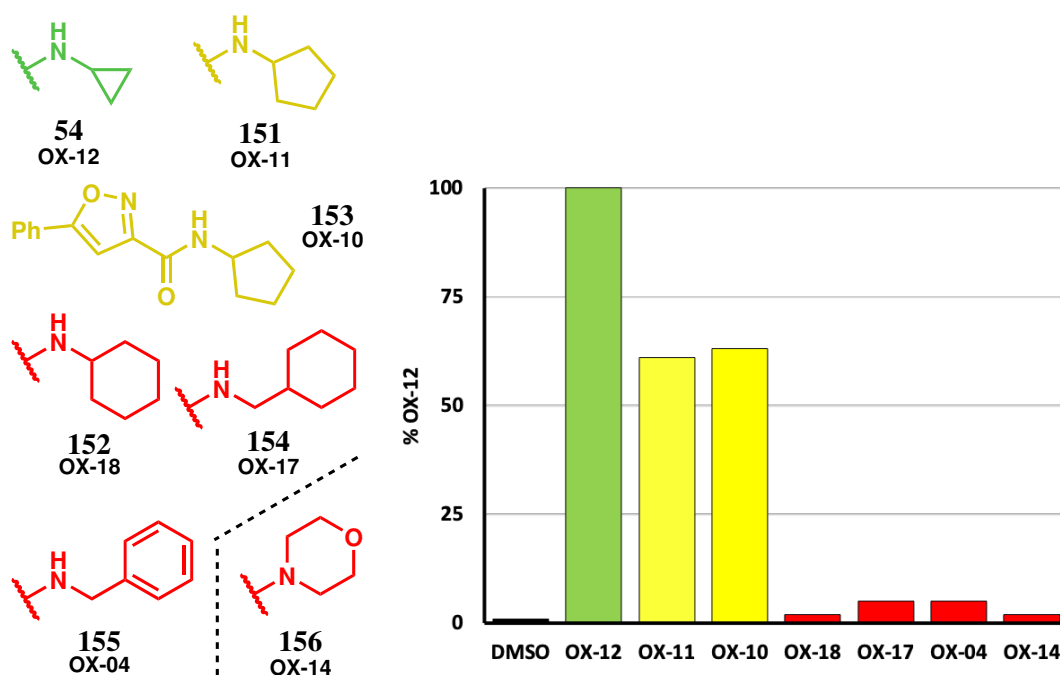


Abbildung 45: Verringerung der Affinität durch Ringvergrößerung der zyklischen Amide sowie ausbleibende Optimierung durch Ermöglichung von Flexibilität. Ferner fehlende Aktivität von zyklischen, tertiären Amiden. Erhöhung der hGLI2-Expression bei PA-TU-8988T-Zellen mit 0,5% FBS nach 48 h und einer Ligandenkonzentration von 20 μM .

Abschließend lässt sich die aufgestellte Hypothese des Zusammenhangs zwischen Aktivität und C-C-C-Bindungswinkel bestätigen (**Tabelle 1**). Als Grenze kann der Übergang von Cyclopentan zu Cyclohexan festgelegt werden. Genauer gesagt vergrößert sich hierbei der noch mögliche Bindungswinkel von 104° um lediglich 7° auf 111° . Ferner ist es nun möglich, diesem Trend folgend potentielle Derivate einem erwarteten Aktivitätsbereich zuzuordnen. Eine potentielle Cyclobutylverbindung mit einem Winkel von 88° ließe sich zwischen der Referenz sowie dem Cyclopentylderivat einordnen.

Tabelle 1: Bindungswinkel ausgewählter Verbindungen.⁸⁸

Verbindung	$\alpha[^\circ]$	Verbindung	$\alpha[^\circ]$
Cyclopropan	60	Cyclohexan	111
Cyclobutan	88	Isopropan	115
Cyclopentan	104	Benzol	120

4.3.4 Serie 3: Arylvariationen

Nachdem der Aktivitätsraum bezüglich der Amidvariationen eingehend untersucht war, konnte sich möglichen Funktionalisierungen der Arylregion zugewandt werden. Phenyl-derivate wurden entsprechenden Thiophenen vorgezogen, da die als Startmaterial nötigen Ketone in einer höheren Vielfalt darstellbar bzw. kommerziell erhältlich sind.

Es wurden zunächst *para*-funktionalisierte Derivate untersucht (**Abbildung 46**), da sie bei vorhandener Aktivität ein Umgehen des von Hsieh *et al.* eingereichten Patents ermöglichen würden.⁶⁹ Auf Grund dessen wurden vier Verbindungen synthetisiert und vermessen. Leider zeigten weder das Toluylderivat **157**, noch das Phenol **158** oder der Phenylbenzyl-ether **159** eine Aktivität. Dies gilt ebenfalls für das Naphthalin **160**.

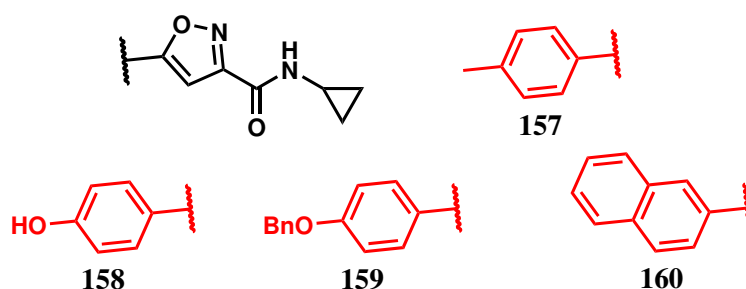


Abbildung 46: Synthetisierte, nicht aktive Verbindungen der dritten Serie zur Überprüfung einer möglichen Arylfunktionalisierung sowie der Umgehung des Patents von Hsieh *et al.* Rot = inaktiv.

Auf Basis der Ergebnisse wurde nun unabhängig vom Patentschutz versucht, aktive Substanzen durch Modifizierung des Phenyls zu erhalten (**Abbildung 47**). Da selbst eine Methylgruppe in *para*-Position bei Verbindung **157** sowie die Nutzung des in *para*- und *meta*-Position verlängerten Naphthalins **160** zum vollständigen Aktivitätsverlust führte, wurde sich für eine weitere Untersuchung des Substitutionsmusters entschieden.

Die entsprechenden Toluyl-derivate (**161** bzw. **162**) sollten über die allgemeine Möglichkeit eines Wachstums in diese Richtungen Aufschluss geben. Durch Einbau einer Methylengruppe in das inaktive Phenol **159** war ferner gewünscht mit dem resultierenden Benzylalkohol **163** zu überprüfen, ob durch Erhöhung der Flexibilität eine Aktivität gewährleistet werden kann. Leider stellten sich auch diese Verbindungen allesamt als inaktiv heraus. Somit wurde die dritte Serie zur Überprüfung von Arylmodifikationen eingestellt.

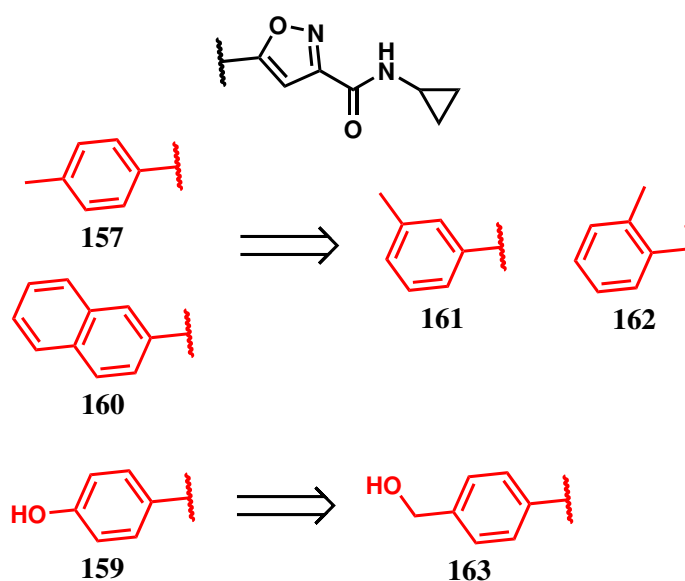


Abbildung 47: Weitere Verbindungen der dritten Serie zur abschließenden Untersuchung möglicher Funktionalisierungen der Arylregion. Rot = inaktiv.

4.3.5 Serie 4: Biotinylierung und Fluoreszenzmarkierung

Die vierte Serie wurde schlussendlich für die Darstellung der Affinitätssonden zur Identifizierung des noch unbekanntes *Targets* genutzt. In Anbetracht der vorherigen Ergebnisse, konnte die Modifizierung nur in der Amidregion stattfinden (**Abbildung 48**). Wie bereits beschrieben wurde durch Verlängerung der Amidsubstitution im Fall des Hexylderivats OX-03 **147** die Aktivität deutlich verschlechtert. Um den weiterführenden Einbau einer noch längeren PEG-Kette zu analysieren, sollte daher zunächst das PEG₃-Azid OX-19 **164** getestet werden.

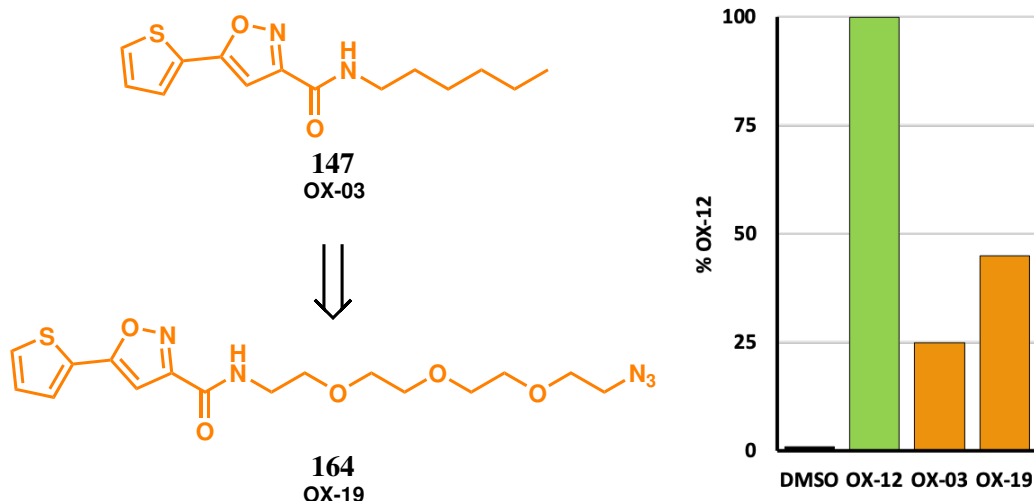


Abbildung 48: Verbesserung der Aktivität der Testsubstanz **164** zur Überprüfung der gewünschten Darstellung von Affinitätssonden.

Glücklicherweise erzielte **164** eine nahezu verdoppelte Aktivität im Vergleich zu OX-03 **147** und war daher vorraussichtlich zur Darstellung einer Biotin-Sonde geeignet. Dennoch stellt sich die Frage nach dem Grund einer positiven Beeinflussung der Aktivität trotz längerer Kette. Es wäre möglich, dass zusätzliche Wasserstoffbrücken ausgebildet werden können, und somit zu einem besseren Bindungsmodus führen. Andererseits stünde dem ein erheblicher Desolvatationsaufwand entgegen.

Nachfolgend wurde nun die Synthese von zwei Affinitätssonden verfolgt (**Abbildung 49**). Zum einen wurde aufgrund der bereits getesteten Vorstufe OX-19 **164**, die entsprechende PEG₃-Sonde OX-23 **165** dargestellt. Aufgrund einer möglichen Beeinträchtigung der Aktivität durch die gewählte Linkerlänge, wurde zum anderen die PEG₅-Sonde OX-35 **166** bereitgestellt. Im Falle eines Scheiterns der *pull-down*-Experimente stünde somit eine Substanz mit einem deutlich längeren *Linker* bereit.

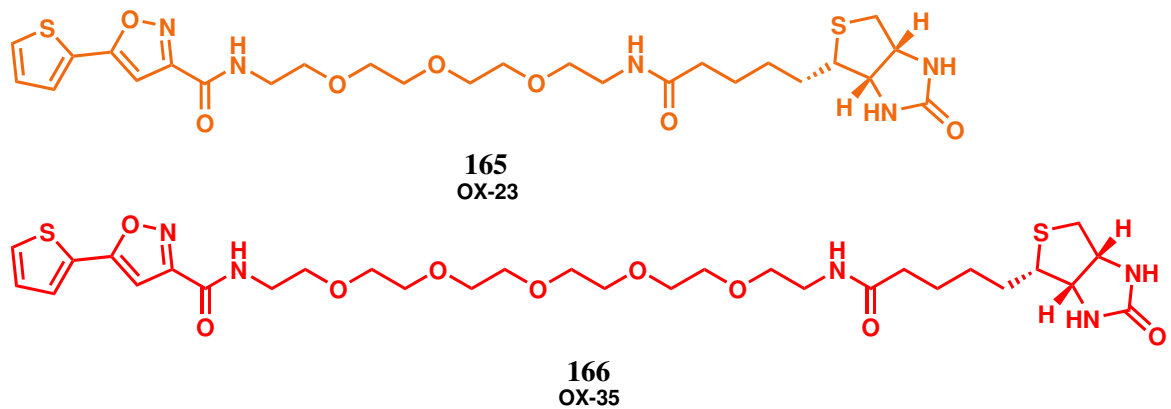


Abbildung 49: Die Affinitätssonden zur Aufklärung des *Targets* von OX-12 **54** mit einer PEG₃-**165** sowie einer PEG₅-Kette **166**. Orange = schwach aktiv, rot = inaktiv.

Den Erwartungen entsprechend, konnte für OX-23 **165** eine weitere Verringerung des Effekts im Gegensatz zu OX-19 **164** beobachtet werden (**Abbildung 50**). Dies ist durch die Einführung des relativ großen Biotins zu erklären. Die weitere Sonde OX-35 **166** ist aufgrund des noch längeren *Spacers* inaktiv.

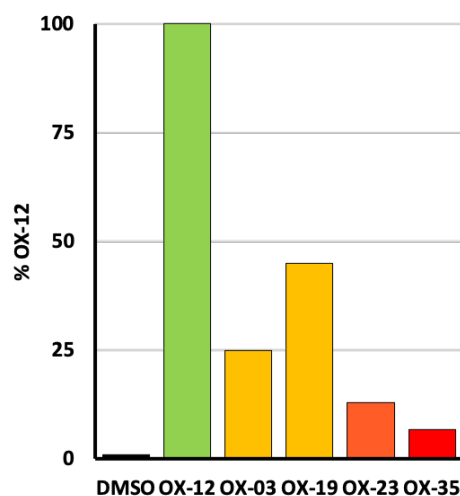


Abbildung 50: Ergebnisse der vierten Serie mit einer Erhöhung der Aktivität durch Einbau von PEG-Ketten bei OX-19 **164** sowie ferner die schwach aktive Affinitätssonde OX-23 **165**. Erhöhung der hGLI2-Expression bei PA-TU-8988T-Zellen mit 0,5% FBS nach 48 h und einer Ligandenkonzentration von 20 μ M.

5 Nebenprojekt: Synthese von AW9

5.1 Aufgabenstellung

Ein Interessenschwerpunkt der Arbeitsgruppe Kolb ist das computergestützte Design von Liganden unter Zuhilfenahme initialer Dockingstudien mit *in-silico* generierten *Hits* (s. Literatur zu „SCUBIDOO“).⁹⁰

Unter Anderem liegt hierbei der Fokus auf G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs), spezieller den muskarinischen Acetylcholinrezeptoren (mAChRs). Bislang binden nahezu alle verfügbaren Liganden in der orthosterischen Bindetasche, die auch von den endogenen Liganden adressiert wird. Ein Problem dabei ist die strukturelle Ähnlichkeit dieser Bindetaschen in der GPCR-Familie und die damit verbundene Beeinträchtigung der Selektivität. Durch Erforschung neuer, alternativer Taschen auf extra- oder intrazellulärer Seite soll diese Problematik umgangen werden.

Dem mAChR vom Subtyp M₂ wird vor allem eine Schlüsselrolle in der Regulierung der Herzfunktion attestiert, was ihn zu einem interessanten *Target* macht. Es galt einen intrazellulären, allosterischen und für diesen Subtyp spezifischen Liganden zu entwickeln. Als Ausgangspunkt für das *Docking* wurde die Kristallstruktur 4MQS verwendet, bei der AW9 **168** als vielversprechender *Hit* resultierte (**Abbildung 52**).⁹¹

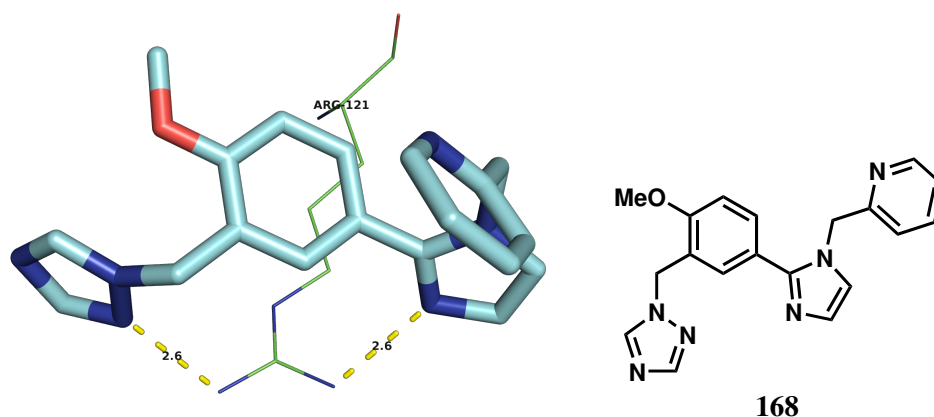


Abbildung 52: Dockinglösung von AW9 **168** für den muskarinischen Acetylcholinrezeptor Subtyp M₂ mit zentraler Wechselwirkung der Triazol- bzw. Imidazolstickstoffe zu Arg121 (weitere Aminosäuren wurden ausgeblendet). PDB-Code: 4MQS⁹¹.

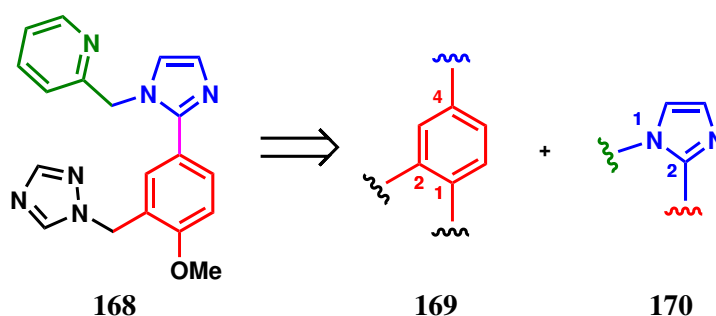
Die zentrale Wechselwirkung wird durch Arginin 121 (*grün*) hervorgerufen, wobei der Stickstoff in 2-Position des 1,2,4-Triazols sowie der Stickstoff in 3-Position des Imidazols (*dunkelblau*) Salzbrücken mit einem Abstand von 2,6 Å ausbilden.

Das Ziel war die Synthese des kommerziell erhältlichen (jedoch relativ teuren), aber nicht in der Literatur dokumentierten *Hits 168* mit anschließendem *scale-up* sowie einer erste Etablierung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen.

5.2 Ergebnisse und Diskussion

5.2.1 Überblick

Der potentielle M_2 Ligand AW9 **168** (**Schema 24**) besteht aus einem zentralen 1,2,4-substituierten Benzol (**169**, *rot*) welches über seine 4-Position mit der 2-Position eines 1,2-substituierten Imidazols (**170**, *blau*) verbunden ist. Durch dieses relativ ungewöhnliche Verknüpfungsmuster gestaltet sich eine direkte, konvergente Synthese anspruchsvoll.

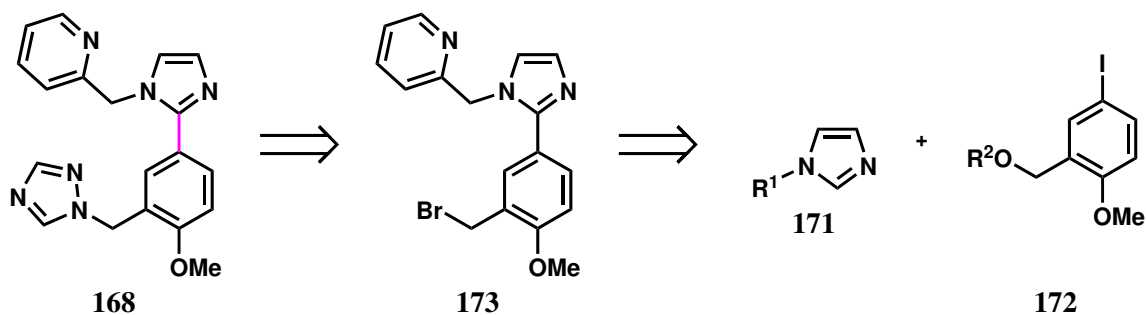


Schema 24: Strukturanalyse von AW9 **168**.

Darüber hinaus wurde durch Dockingstudien herausgefunden (s. **5.1**), dass die Methoxygruppe sowie das 1-Methylen-1*H*-1,2,4-triazol (*schwarz*) essentiell für den Bindungsmodus sind und hierdurch als konstant gelten. Der Fokus für die Derivatisierung wurde demnach auf den *N*-Substituenten (*grün*) gelegt.

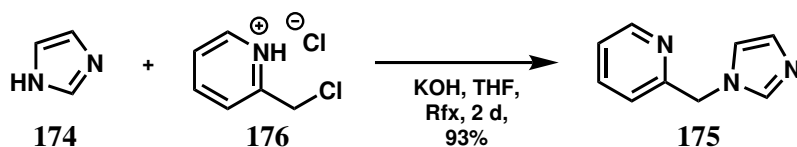
5.2.2 Synthese 1: Pd-katalysierte Arylierung

Eine Pd-katalysierte Arylierung von Imidazolen und die daraus resultierende Verknüpfung (*lila*) wurde als Schlüsselschritt für die erste Synthese ausgewählt (**Schema 25**). Dieser Ansatz erlaubt zwar keine Funktionalisierung im finalen Schritt, ermöglicht aber die Synthese der entsprechenden Liganden in zu erwartenden drei bis maximal fünf Schritten. Ausgehend von den derivatisierten Imidazolen **171** wird in Reaktion mit einem konstanten Aryliodid **172** das Intermediat **173** (nach weiteren Zwischenschritten) aufgebaut, welches im finalen Schritt mit 1,2,4-Triazol zu **168** umgesetzt wird.



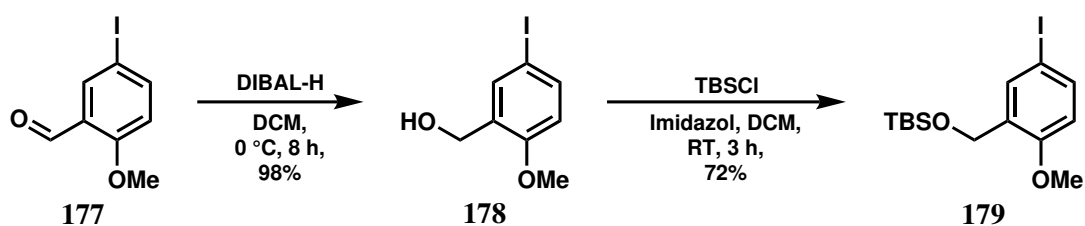
Schema 25: Erste Retrosynthese von **168** mittels Pd-katalysierter Arylierung von Imidazolen **171** mit anschließender S_N2 an der benzylichen Position (nach vorheriger Bromierung). $R^1 = H$ oder 2-Methylenpyridin; $R^2 = H$ oder TBS.

Der Ausgang Pd-katalysierter Arylierungen ist stark von den Eigenschaften der eingesetzten Edukte abhängig und kann im ungünstigsten Fall ohne Bildung des gewünschten Produktes ablaufen. Aus diesem Grund wurden zunächst das unsubstituierte Imidazol **174** sowie das entsprechende funktionalisierte Derivat **175** für die Testreaktionen ausgewählt. Letzteres lässt sich aus **174** mit 2-Chlormethylpyridinhydrochlorid **176** durch eine Basenvermittelte Reaktion in 93% Ausbeute darstellen (**Schema 26**).⁹²



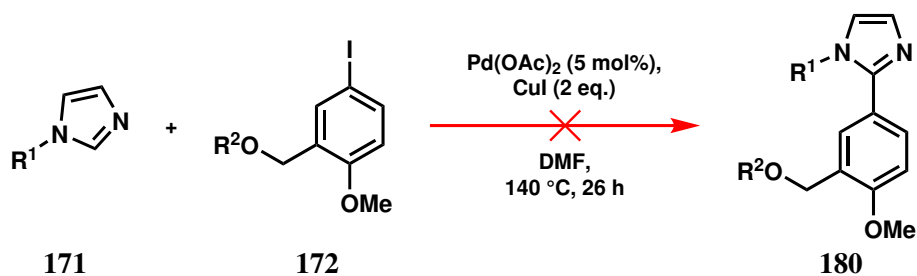
Schema 26: Synthese von **175** mittels Basen-vermittelter Reaktion von **176** mit **174**.

Die Verwendung von Aryliodiden stellte sich sogleich als Nachteil dieses Ansatzes heraus, da nach kürzester Zeit Reaktionslösungen und NMR-Proben eine lila Verfärbung aufwiesen, was auf eine lichtinduzierte Spaltung der Kohlenstoff-Iod-Bindung hindeutete. Dementsprechend sind derartige Verbindungen nur bedingt lagerfähig und wurden vorzugsweise frisch hergestellt (**Schema 27**). Nichtsdestotrotz konnte ausgehend von 5-Iodo-2-methoxybenzaldehyd **177** per DIBAL-Reduktion der entsprechende Benzylalkohol **178** und nach optionaler TBS-Schätzung (**179**) das benötigte Aryliodid synthetisiert werden.⁹³



Schema 27: Synthese von **179** per DIBAL-Reduktion von **177** und anschließender Alkoholschützung von **178**.

Die darauffolgende Verknüpfung der Iodide **178** und **179** mit den entsprechenden Imidazolen **174** und **175** mittels einer Ullmann-ähnlichen Reaktion lieferte in jeglicher Kombination nicht das entsprechende, erwünschte Produkt **180** (**Schema 28**). Vermutlich wirkt eine zusätzliche, sauerstoffaufweisende Gruppe nachteilig auf den Reaktionsausgang (nicht durch Originalliteratur abgedeckt).⁹⁴



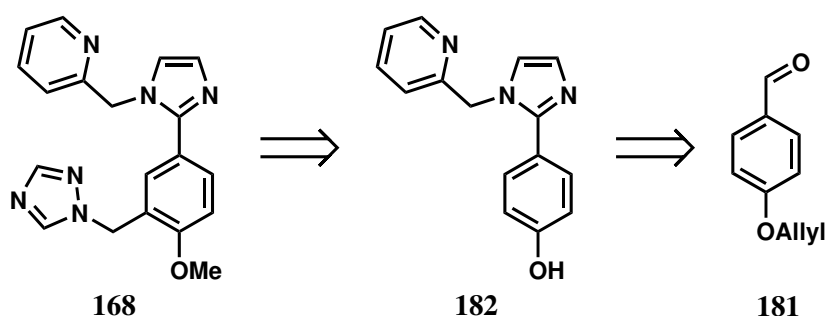
Schema 28: Vorgeschlagene, nicht erfolgreiche Verknüpfung von Imidazolen **171** und 2,3-funktionalisierten Aryliodiden **172** per Pd-Katalyse. $R^1 = \text{H}$ oder 2-Methylenpyridin; $R^2 = \text{H}$ oder TBS.

Interessanterweise konnte im Fall des TBS-geschützten Alkohols **179** eine Umwandlung zum entsprechenden Startmaterial, dem Aldehyd **177**, beobachtet werden. Es wird vermutet, dass es sich hierbei um eine Saegusa-ähnliche Oxidation handeln könnte. Aufgrund der genannten Beobachtungen wurde auf ein weitergehendes Screening von Reaktionsbedingungen verzichtet und katalysefreie Methoden untersucht.

5.2.3 Synthese 2: Einstufige Imidazoleinführung

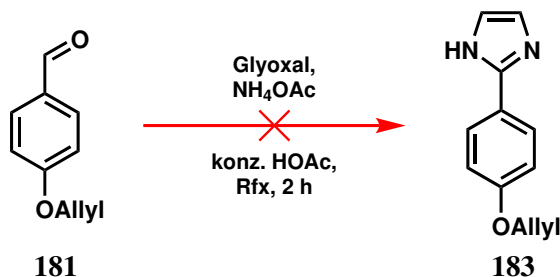
Eine einstufige Synthese der Imidazolkomponente wurde für den zweiten Ansatz favorisiert, um katalytische Methoden und somit den Einsatz relativ instabiler Aryliodide zu umgehen (**Schema 29**). Im Allgemeinen gibt es eine Vielzahl möglicher Methoden für die einstufige Synthese von Imidazolen, jedoch wird in den meisten Fällen eine dehydrierende Zyklisierung von Aldehyden mit Gloyal sowie NH_4OAc , als Stickstoffquelle, angewandt.⁹⁵

Im Fall der Synthese von AW9 **168** sollte diese Strategie mit Hilfe von 4-(Allyloxy)benzaldehyd **181** als Startmaterial implementiert werden. Nach der sukzessiven Derivatisierung des Imidazols wurde eine elektrophile aromatische Substitution ($\text{S}_{\text{E}}\text{Ar}$) angedacht, um *N*-Methyltriaazol als entsprechenden Alkohol in *ortho*-Position zur Phenolgruppe im Zwischenprodukt **182** zu verknüpfen. Der letzte Schritt sollte dann durch Methylierung des Phenols zum Methoxyether erfolgen.⁹⁶



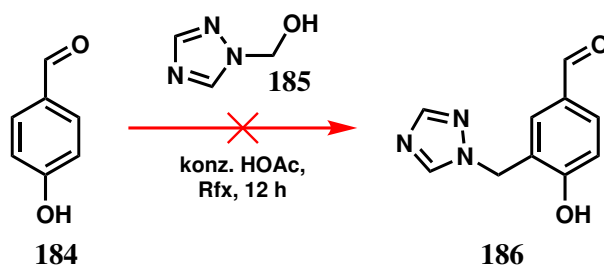
Schema 29: Zweite Retrosynthese von **168** mittels Imidazolbildung mit Glyoxal ausgehend von **181**, nachfolgender $\text{S}_{\text{E}}\text{Ar}$ sowie Methylierung.

Unglücklicherweise konnte der erste, literaturbekannte, Schritt dieser Synthesestrategie nicht reproduziert werden, da die Herstellung von **183** aus **181** fehlschlug (**Schema 30**). Eine Schützung der phenolischen Funktion wurde angedacht, um wasserlösliche Phenolate zu verhindern, die durch nachfolgende Reaktionen potentiell hervorgerufen werden könnten. Im Gegensatz dazu behandelt die Quelle jedoch nur ungeschützte Phenole.⁹⁷



Schema 30: Misslungener Versuch einer einstufigen Imidazolsynthese ausgehend von **181**.

Darüber hinaus gelang die *ortho*-Funktionalisierung von 4-Hydroxybenzaldehyd **184** mit **185** per S_EAr nicht, um **186** zu generieren (**Schema 31**).



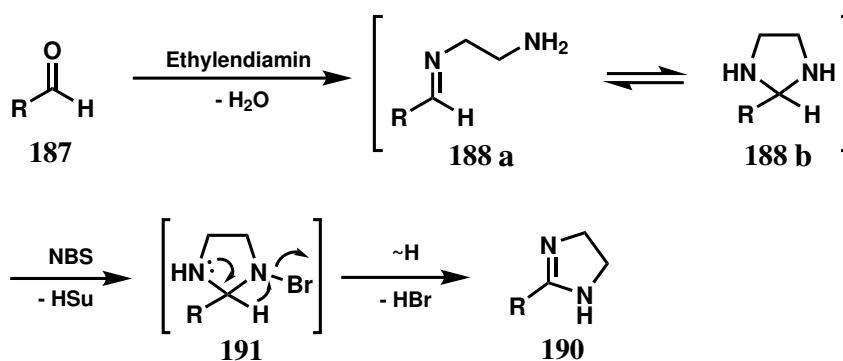
Schema 31: Gescheiterte Verknüpfung von **185** mit dem Phenol **184**.

Für die nächste Revision des Syntheseansatzes wurde daher neben einem einstufigen Aufbau des Imidazols auch auf ein spätes Einbringen des *N*-Methylentriazols verzichtet.

5.2.4 Synthese 3: Imidazolaufbau + *late-stage* Bromierung

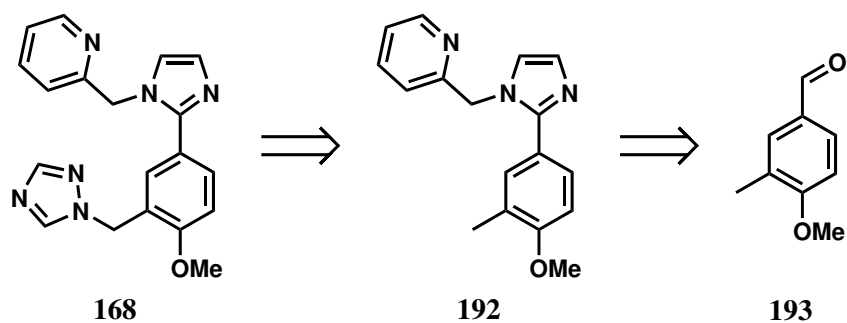
Mehrstufige Imidazolsynthesen generieren üblicherweise, ebenfalls aus Aldehyden, die entsprechenden, reduzierten Imidazoline als Zwischenprodukte. In den meisten Fällen werden Ethylendiamin und NBS sowie PIDA ((Diacetoxyiodo)benzol), für die nachfolgende Oxidation verwendet. Durch die gute Verfügbarkeit dieser gängigen Reagenzien wurde diese Strategie als potentiell vielversprechende, allerdings längere Synthesesequenz untersucht.

Der vorgeschlagene Mechanismus (**Schema 32**) basiert auf einer ähnlichen Umwandlung von Li *et al.* und beginnt mit dem Aldehyd **187**, der durch Reaktion mit Ethylendiamin das γ -Aminoimin **188 a** bildet, welches im Gleichgewicht mit der entsprechenden zyklischen Form des Imidazolidins **188 b** steht. Nachfolgend wird durch radikalische NBS-Bromierung (detaillierte Schritte ausgelassen) ein *N*-Bromid **189** erzeugt, das durch Eliminierung von HBr in Zusammenspiel mit einem Hydridshift das gewünschte Imidazolin **190** hervorbringt.⁹⁸



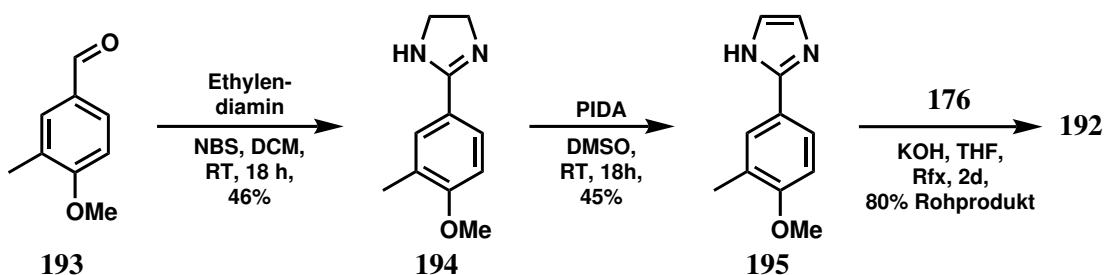
Schema 32: Vorgeschlagener Mechanismus der Imidazolingenerierung ausgehend von Aldehyden **187** über die entsprechenden *N*-Bromide **191**.⁹⁸

Zusätzlich sind radikalische Bromierungen gut erforschte Methoden zur Funktionalisierung von Toluol-Derivaten durch sukzessive Reaktion der entstehenden Bromide. In diesem Fall wurde eine *late-stage*-Bromierung von **192** angedacht, welche die Möglichkeit der Verknüpfung mit *N*-Methylentriazol im letzten Schritt ermöglichen sollte (**Schema 33**). Als Startmaterial wurde demnach der kommerziell erhältliche 4-Methoxy-3-methylbenzaldehyd **193** ausgewählt.



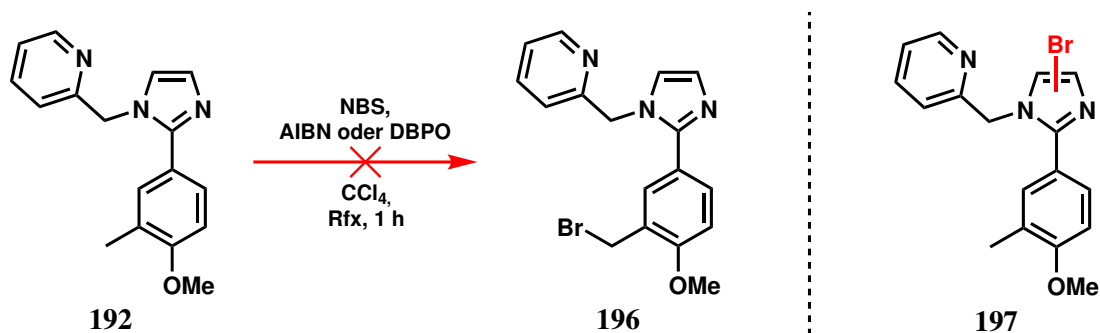
Schema 33: Dritte Retrosynthese von **168** durch mehrstufige Imidazolbildung an **193** und *late-stage*-Bromierung von **192** sowie finaler S_N2 -Reaktion.

Das Intermediat **192** wurde in einer dreistufigen Sequenz ausgehend von **193** dargestellt (**Schema 34**). Die relativ moderaten Ausbeuten der Imidazolinsynthese zu **194** und der darauffolgenden Oxidation zu **195** sind in Übereinstimmung mit der Literatur.⁹⁹ Die darauf folgende nukleophile aromatische Substitution (5.2.2, **Schema 26**) konnte mit einer akzeptablen Ausbeute von 80% durchgeführt werden.



Schema 34: Synthese des Intermediats **192** per Imidazolinbildung mit anschließender Oxidation und S_N2 -Reaktion.

Die sukzessive radikalische Bromierung der benzylicischen Position in **192** lieferte nicht das gewünschte Bromid **196**, welches im letzten Schritt mittels einer S_N2 -Reaktion die gewünschte Endstufe **168** ermöglicht hätte (**Schema 35**). Stattdessen wurde an der 4- oder 5-Position des Imidazols bromiert und **197** erhalten, was letztendlich die Einstellung dieses Ansatzes zur Folge hatte.



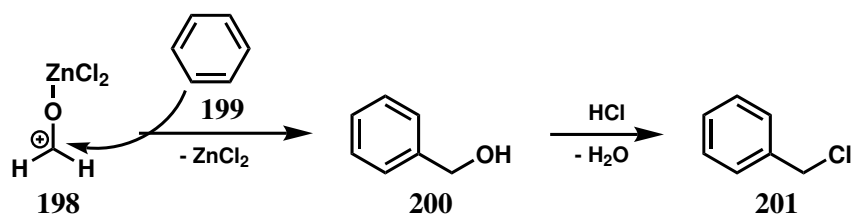
Schema 35: Generierung von **197** als unerwünschter Ausgang der radikalischen Bromierung von **192**.

Zusammenfassend musste für die vierte, in Retrospektive, letzte Synthesestrategie, eine Möglichkeit für die frühere Einführung des *N*-Methyltriazols gefunden werden. Alle folgenden Schritte wurden bereits adäquat etabliert und sollten im weiteren Verlauf keine Probleme darstellen.

5.2.5 Synthese 4: Imidazolaufbau + frühe Triazoleinführung

Die vorherigen Syntheseansätze haben deutlich demonstriert, dass die notwendige *ortho*-Funktionalisierung eines 1,4-substituierten Anisols ein nicht-triviales Problem darstellt. Das benötigte, asymmetrische 1,2,4-Substitutionsmuster lässt sich darüber hinaus nicht zufriedenstellend durch kommerziell verfügbare Startmaterialien einführen.

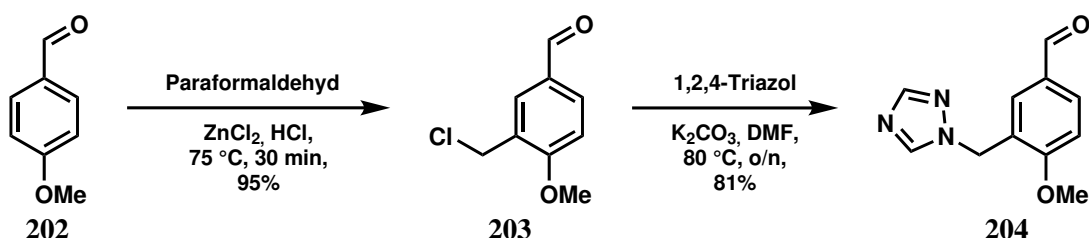
Als letzte Alternative für die Synthese von **168** wurde die Blanc-Reaktion, trotz der Generierung des krebserregenden Bis(chlormethyl)ethers als Nebenprodukt, untersucht. Der Reaktionsmechanismus (**Schema 36**, Nebenprodukte ausgelassen) startet mit einer elektrophilen aromatischen Substitution (S_EAr) des Lewisäure-aktivierten Formaldehyds **198** mit einem entsprechenden Aromaten **199**, um den benzylichen Alkohol **200** zu generieren, welcher direkt mit HCl als Lösungsmittel per dehydrierender S_N1 -Reaktion zum gewünschten Benzylchlorid **201** reagiert.



Schema 36: Vereinfachter Mechanismus der Blanc-Chlormethylierung.

Aldehyde wirken auf ein aromatisches System durch ihren $-M$ -Effekt leicht deaktivierend und dirigieren dadurch Elektrophile in die entsprechenden *meta*-Positionen. Im Gegensatz dazu aktivieren Alkylether über den $+M$ -Effekt und erhöhen somit die negative Partialladung in *ortho*- und *para*-Position.

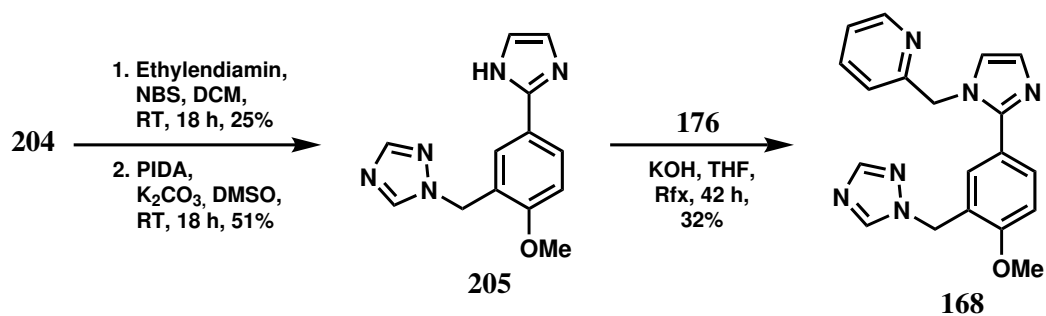
4-Methoxybenzaldehyd **202** (Schema 37) inkorporiert diese beiden synergistischen Effekte, was letztendlich in einer erhöhten Regioselektivität für die gewünschte Funktionalisierung der 3-Position des 4-Methoxybenzaldehyds zu Verbindung **203** in sehr guter Ausbeute resultiert.¹⁰⁰ Des Weiteren gelang danach ebenfalls die *bis dato* nicht erfolgreiche Einführung des Triazols mittels S_N2 -Reaktion zu **204**.



Schema 37: Blanc-Chlormethylierung von 4-Methoxybenzaldehyd **202** zur Generierung des Zwischenprodukts **203** und weitergehende Reaktion zu **204**.

Die nachfolgenden Schritte (Schema 38) wurden bereits durch vorherige Ansätze etabliert und stellten keine weiteren Hindernisse dar, wodurch die Zielverbindung **168** letztendlich in einer Gesamtausbeute von 3% synthetisiert werden konnte. Interessanterweise scheinen zusätzliche, stickstofftragende Substituenten einen negativen Effekt auf die Imidazolsynthese zu **205**, ausgehend von **204**, zu haben. Bei Vergleich dieser Sequenz mit dem mehrstufigen Aufbau von **192** (Schema 34) lässt sich insbesondere für den ersten Schritt der Generierung des Imidazolins eine nahezu halbierte Ausbeute feststellen.

Darüber hinaus ist womöglich eine erhöhte sterische Hinderung durch das Triazol für die relativ geringe Ausbeute der Einführung des 2-Methylenpyridins mittels S_N2 -Reaktion mit **176** verantwortlich, welche fast um zwei Drittel schlechter ist als der Vergleich aus **5.2.2** (Schema 26).



Schema 38: Vollendung der vierten Synthesestrategie zu **168**, ausgehend von **204** durch Imidazolauflösung und finaler S_N2 -Reaktion an **205**.

5.2.6 Up-scaling der vierten Synthese

Für die anstehende SAR-Studie musste ein *up-scaling* der nun etablierten Synthese erfolgen, jedoch wurde inmitten dieser Anstrengungen das Projekt auf Grund erster Testungsergebnisse mit AW9 **168** eingestellt. Nichtsdestotrotz wurden die ersten drei Schritte bereits optimiert (**Tabelle 2**) und sollen im Folgenden kurz behandelt werden.

Tabelle 2: *Up-scaling* der ersten drei Schritte von Synthese 4.

Schritt Nr.	Verunreinigungen	Modifizierung	Maßstab
1	SM	Umkristallisation nicht möglich	256 mmol
2	DMF, K ₂ CO ₃	(MTBE + MeOH)-Waschung	218 mmol
3	Succinimid	I ₂ , K ₂ CO ₃	1 mmol*

* Keine weitere Anstrengung aus o. g. Gründen

Zunächst wurde versucht, rückständiges Startmaterial (4-Methoxybenzaldehyd, **202**) von dem Produkt der Blanc-Reaktion **203** (**Schritt 1** sowie **Schema 37**) per Umkristallisation aus verschiedenen Lösungsmitteln abzutrennen. Hierbei wurde ein Problem durch den relativ niedrigen Schmelzpunkt (45 °C) von **203** offenbart, welches auslöte bevor Refluxbedingungen erreicht wurden. Die Verunreinigung spielte für die Reinigung der nächsten Zwischenprodukte jedoch keine weitere Rolle und musste lediglich zur Charakterisierung der ersten Stufe chromatographisch abgetrennt werden.

Ein nicht-triviales Problem trat bei der S_N2-Reaktion von **203** mit 1,2,4-Triazol und K₂CO₃ zu **204** auf (**Schritt 2** sowie **Schema 37**). Das verwendete, hochsiedende, DMF wird üblicherweise durch Ausschütteln der organische Phase mit einer 5%-igen wässrigen Lösung von LiCl entfernt, was jedoch in größerem Maßstab sehr zeit- und arbeitsintensiv wäre. Zusätzlich muss beachtet werden, dass durch die DMF-Verunreinigung auch anorganische Salze in das Produkt eingetragen wurden.

Es wurde herausgefunden, dass MTBE nicht das Produkt, sondern nur die Verunreinigung löst und sich hierdurch ein beträchtlicher Teil des DMFs nach initialer Konzentration im Vakuum entfernen ließ. Der so behandelte Rückstand wurde weitergehend mit MeOH gewaschen, um eine methanolische Produktlösung zu erzeugen, welche nun frei von anorganischen Salzen war. Unglücklicherweise ließ sich nach Konzentration dieser Lösung weiterhin eine DMF-Verunreinigung nachweisen, die jedoch durch erneutes Verrühren des verklumpten Feststoffs mit MTBE in einem feinen Pulver nach der Trocknung resultierte. Ohne die Zuhilfenahme von langwierigen Extraktionstechniken erlaubt diese Methode die leichte Abtrennung von DMF aus Ansätzen größerer Maßstäbe.

Schlussendlich wurde der Ringschluss zum Imidazol **205** (**Schritt 3** sowie **Schema 38**), in Hinblick auf die Aktivierung, durch Nutzung eines I_2/K_2CO_3 -Systems (vorgeschlagener Mechanismus in Originalliteratur) anstatt des vorher genannten NBS (**5.2.4**, **Schema 32**) optimiert. Das entstandene Succinimid konnte in vorherigen Ansätzen nicht zufriedenstellend ohne chromatographische Methoden abgetrennt werden und stellte daher einen erheblichen Nachteil für die Nutzung von NBS im größeren Maßstab dar.⁹⁸

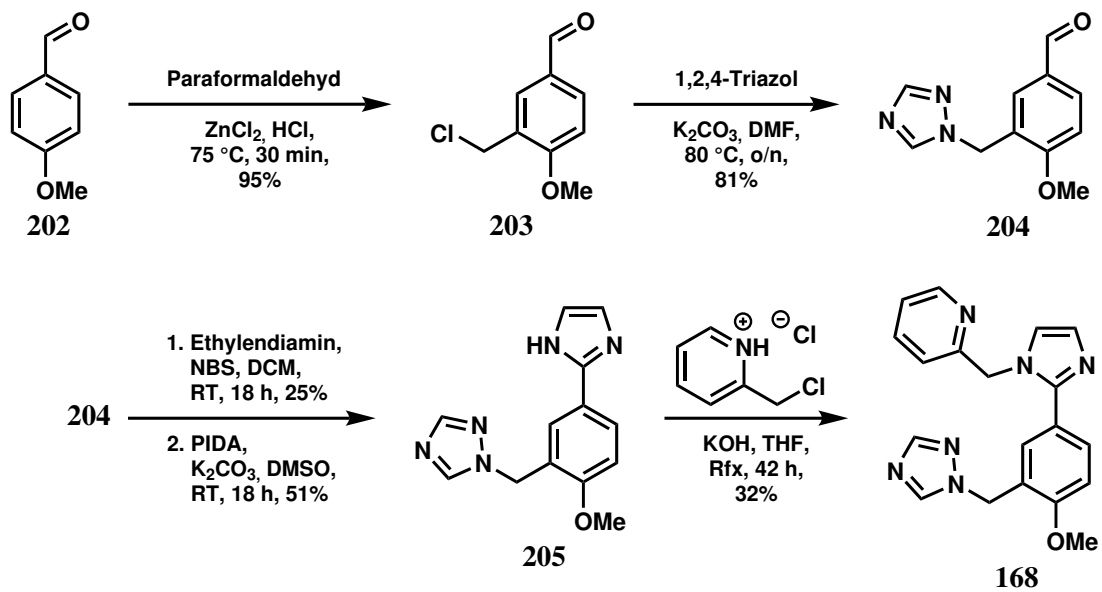
5.3 Zusammenfassung

Auf der Suche nach potentiellen, intrazellulär allosterisch bindenden, Liganden für den mAChR vom Subtyp M₂ wurde von der Arbeitsgruppe Kolb durch kombinatorische *in-silico* Synthese sowie Dockingexperimente der *Hits* AW9 **168** ermittelt. Dieser ist kommerziell erhältlich, jedoch zu einem relativ hohen Preis. Darüber hinaus gab es *bis dato* keine dokumentierte Synthese, die jedoch essentiell für den weiteren Verlauf der Aufstellung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen ist.

Nach zwei nicht erfolgreichen Syntheseansätzen, die unter anderem Pd-katalysierte Arylierungen zur Einführung (s. **5.2.2**) sowie einen direkten Aufbau (s. **5.2.3**) des Imidazolmotivs beinhalteten, wurde in einer dritten und erfolgreicheren Synthese (s. **5.2.4**) das Gros der synthetischen Stufen etabliert.

Interessanterweise lieferte der vorletzte Schritt einer NBS-Bromierung nicht die gewünschte Funktionalisierung der Benzylposition, sondern halogenierte das im vorherigen Schritt aufgebaute Imidazol.

Der vierte Ansatz (s. **5.2.5**, **Schema 39**) kombinierte die etablierten Schritte der dritten Synthese mit einer Funktionalisierung des preisgünstigen Startmaterials 4-Methoxybenzaldehyd **202** mittels einer Blanc-Chlormethylierung, die das gewünschte Funktionalisierungsmuster erzielte. Der Dockinghit AW9 **168** konnte so in einer Aubeute von 3% über fünf Stufen synthetisiert werden.



Schema 39: Übersicht der Synthese von AW9 **168** ausgehend von **202** und Blanc-Chlormethylierung zu **203**, darauffolgender S_N2 -Reaktion mit 1,2,4-Triazol zu **204**, konsekutivem Imidazolaufbau zu **205** und finaler S_N2 -Reaktion.

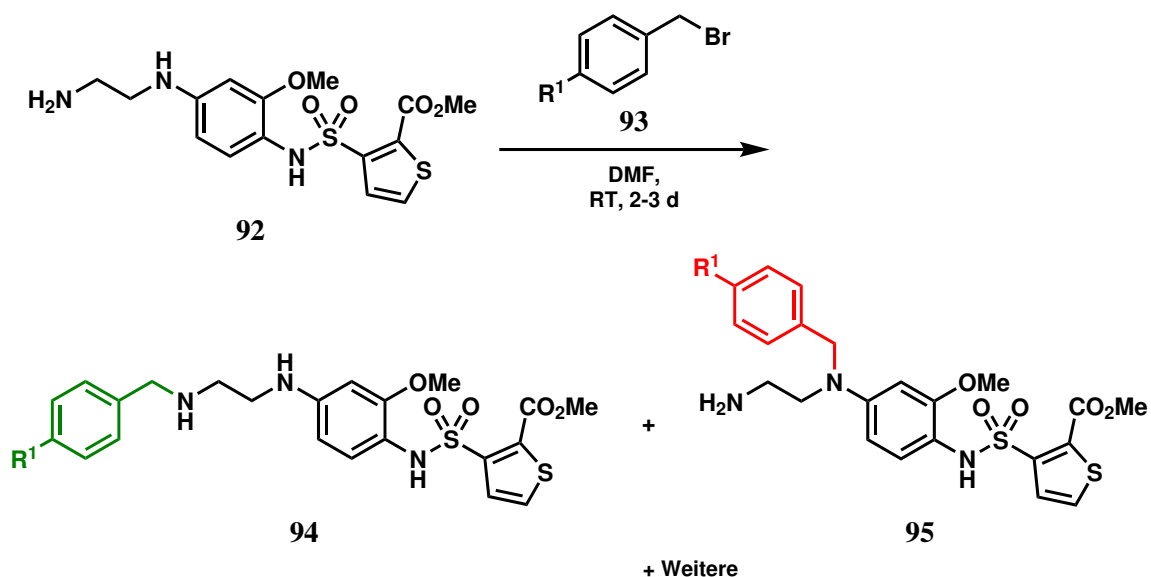
6 Zusammenfassung

6.1 Photoaffinitätsmarkierung von PPAR β/δ -Liganden

Die Photoaffinitätsmarkierung (PAL) lässt sich komplementär zum klassischen Ansatz der röntgenkristallografischen Aufklärung von Bindungsmodi einsetzen. Für PPAR β/δ sollten im Arbeitskreis entwickelte, inverse Agonisten zu Photoaffinitätsliganden modifiziert werden, um durch Markierung von benachbarten Aminosäuren eine Bindungshypothese aufstellen zu können.

Verbindungen der „DG-Serie“ konnten dabei für dieses Projekt ausgeschlossen werden, da ihr zentrales Cyanostilbenmotiv unter den Reaktionsbedingungen der Markierungsversuche eine lichtinduzierte (*E*)/(*Z*)-Isomerie eingeht.

Aus der „ST-Serie“ wurde das primäre Amin **92** als potentieller Kandidat für die Modifizierung mit photoreaktiven Gruppen ausgewählt (**Schema 40**). Nach erfolgreicher Synthese scheiterten jedoch die weiteren Reaktionen mit Benzylbromid-Derivaten an der Bildung von nicht separierbaren Produktmischungen aus den erwünschten Photoaffinitätsliganden **94**, den entsprechenden Regioisomeren **95** und einem weiteren Nebenprodukt. Aus Zeitgründen wurde die Etablierung einer Auftrennung mittels HPLC-Methoden schlussendlich nicht weiter verfolgt.



Schema 40: Reaktion von **92** mit Benzylbromiden **93** zum unerwünschten Produktgemisch aus **94** und **95** sowie weiteren Nebenprodukten. $R^1 = \text{H}, \text{N}_3, \text{Trifluormethyldiaziriny}$.

Zur Umgehung dieses Problems wurde ein *N*-methyliertes Derivat **98** synthetisiert (**Abbildung 53**), welches überdies einen Ethoxyethylrest zur Verbesserung des Wirkprofils enthält. Ziel war es, durch diese Kombination inverse Agonisten zu ermöglichen, die im späteren Verlauf und nach weiterem Einbau einer Ethylendiaminkette (anstatt des Hexylrestes) isolierbare Photoaffinitätskandidaten generieren zu können. Aufgrund der Ergebnisse eines FRET-Corepressorassays konnte **98** jedoch nicht als potenter inverser Agonist eingestuft werden.

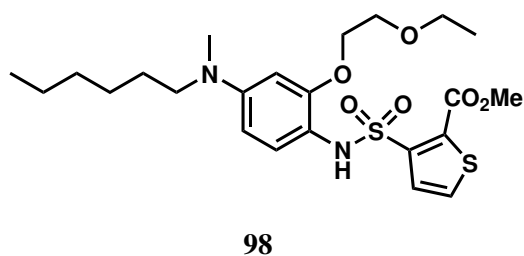
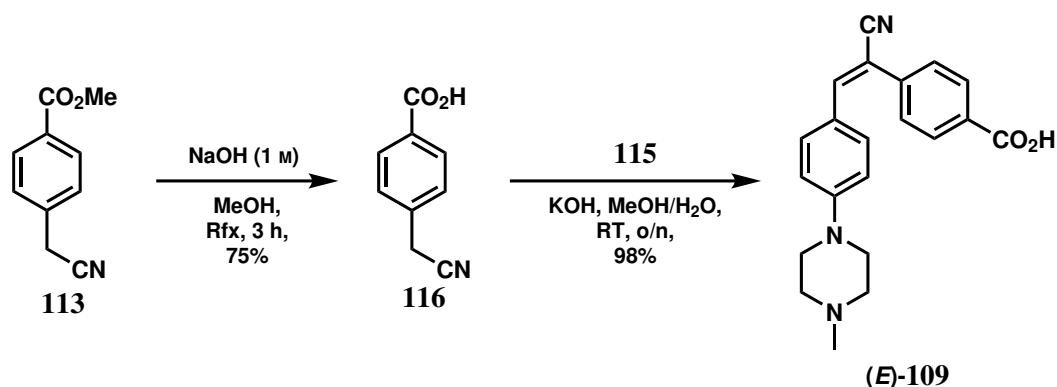


Abbildung 53: Das *N*-methylierte Derivat **98**, welches sich als nicht-potenter inverser Agonist herausstellte.

Letztendlich wurde dieses Projekt eingestellt, um den weiteren experimentellen Schwerpunkten der Dissertation den Vorzug zu lassen.

6.2 Off-Target Aufklärung von DG172

Zur Aufklärung des *Off-Target*-Effekts von DG172 **52** wurde auf Basis der initialen SAR eine Strukturanalyse der Cyanostilbene vorgenommen. Als Verknüpfungspunkt des Liganden mit der Biotin-*Spacer*-Verbindung wurde sich für die *para*-Position entschieden. Ferner resultierte durch die Sichtung gut etablierter Methodiken die Auswahl einer Amidkupplung als entscheidende Reaktion der Funktionalisierung. Das Carbonsäurederivat **109** wurde einem entsprechenden Anilinderivat vorgezogen und konnte in sehr guter Ausbeute dargestellt werden (Schema 41).



Schema 41: Verseifung des Esters **113** zur Säure **116** mit anschließender Darstellung von **109** als *Off-Target*-Ligand, welcher hauptsächlich als (*E*)-Isomer in einem Verhältnis von 3:1 vorlag.

Entgegen aller vorherigen Liganden der "DG Serie" wurde **109** vorwiegend als (*E*)-Isomer erhalten. Durch ein ¹³C-gated-decoupled-Experiment konnte dieser Befund untermauert werden. Es wird vermutet, dass der Einsatz einer anderen Base sowie die Zugabe von Wasser hierfür verantwortlich ist. Ein kompetitiver FRET-Assay stellte überdies sicher, dass der Ligand keine Affinität bezüglich PPAR β/δ aufwies.

Die Synthese der Biotin-*Spacer*-Verbindung **117** wurde anhand publizierter Syntheseschritte *in-house* etabliert und optimiert, so dass nun die Darstellung nun im Gramm-Maßstab über vier Stufen erfolgen kann. Außerdem wurde sich durch den Einsatz des gut etablierten PEG₃-*Spacers* eine Verbesserung der Löslichkeit von **109** unter Assaybedingungen, also in wässrigen Medien, versprochen.

6.3 SAR und Targetaufklärung von ISX-9

Ausgehend vom potentiellen Hedgehog-Modulator ISX-9 bzw. OX-12 **54** (**Abbildung 55**), sollte zunächst durch eine SAR-Studie das Kernmotiv sowie weitere potentiell aktive Substanzen gefunden werden. Ferner galt es, mögliche Ansatzpunkte für eine Modifizierung zur Affinitätssonde zu finden, um das unbekannte *Target* der GLI2-Induktion zu identifizieren.

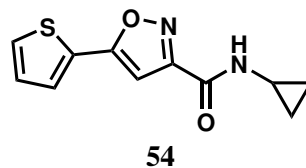


Abbildung 55: Der potentielle Hedgehog-Modulator ISX-9 bzw. OX-12 **54**.

Das Kernmotiv wurde in der ersten Serie durch strukturelle Reduktion ermittelt. Es konnte festgestellt werden, dass die Ausgangsverbindung keine für die Aktivität unnötigen Strukturelemente aufweist (**Abbildung 56**). Alle reduzierten Derivate sind inaktiv und lediglich das durch biosiosteren Austausch des Thiophens erhaltene Phenylderivat OX-02 **131** weist eine etwas bessere Aktivität auf.

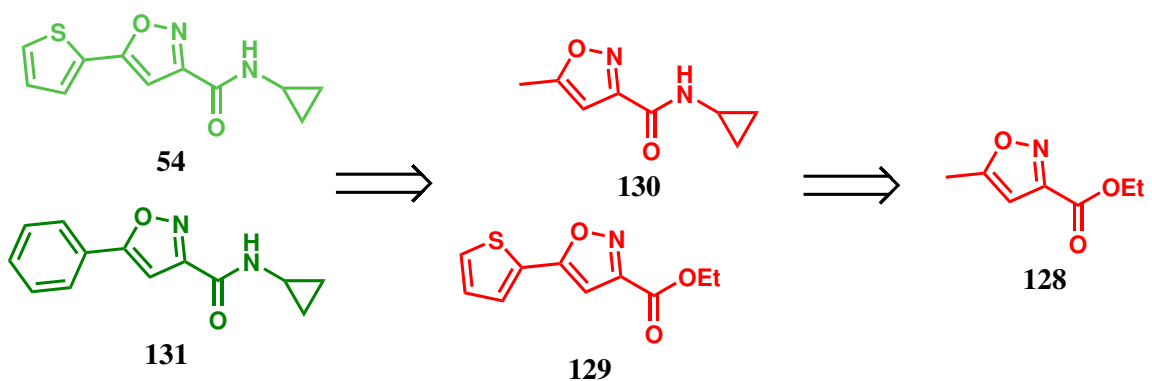


Abbildung 56: Identifizierung des Kernmotivs durch strukturelle Reduktion. Grün = aktiv, rot = inaktiv.

Die zweite Serie fokussierte sich auf Amidvariationen und umfasste Derivate mit linearen, verzweigten sowie zyklischen Alkylresten. Dabei wurde eine Aktivitätsklippe sterischer Natur festgestellt, die die Nutzung verzweigter Alkylamide sowie größerer Zyklen nicht ermöglicht und längere Alkylketten mit Aktivitätseinbußen belegt.

Nachfolgend scheiterte die dritte Serie möglicher Arylfunktionalisierungen zur Umgehung eines Patents gänzlich. In keiner Position des Phenyls konnte ein Substituent ohne Eintreten des völligen Aktivitätsverlustes eingebracht werden.

Zuletzt konnte in Analogie zum Hexylderivat OX-03 **147** unter Nutzung eines PEG-*Spacers* zunächst gezeigt werden, dass die Testsubstanz OX-19 **164** eine gewisse Aktivität aufrechterhält (**Abbildung 57**). Darauf aufbauend, wurde schließlich die Affinitätssonde OX-23 **165** dargestellt, welche zwar weitere Aktivitätseinbußen zeigte, aber dennoch zur Initiierung der *pull-down*-Experimente verwendet wurde.

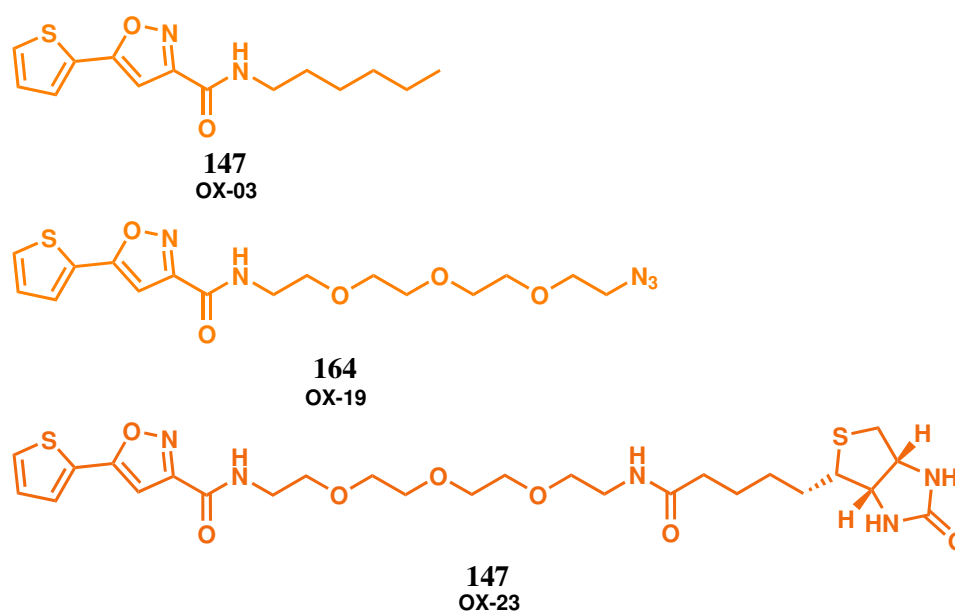


Abbildung 57: Entwicklung der Affinitätssonde OX-23 **165** ausgehend von der Hexylverbindung OX-03 **147** sowie der Testsubstanz OX-19 **164**. Orange = mäßige Aktivität.

Aufgrund erster Ergebnisse dieser Experimente, welche nahelegen, dass das potentielle *Target* im Zellkern angesiedelt ist, wurde die Verbindung OX-40 **167** konzipiert (**Abbildung 58**). Ein Fluorescein aufweisend, soll sie durch Markierung des entsprechenden Zielproteins eine visuelle Validierung der Affinitätschromatographie sicherstellen. Zum Zeitpunkt der Niederschrift standen diesbezügliche Ergebnisse aber aus.

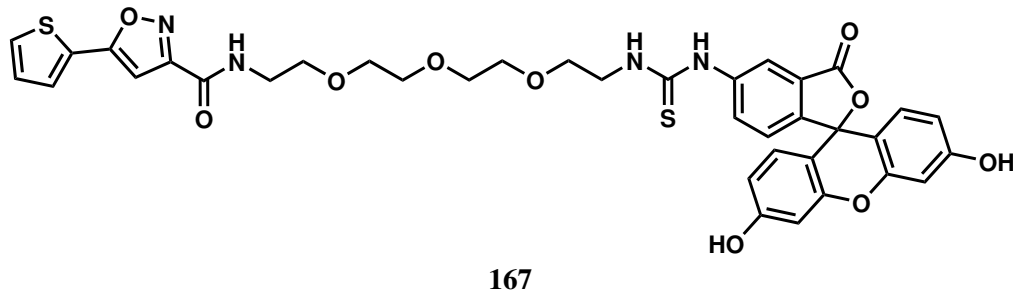


Abbildung 58: Die Fluoreszenzsonde OX-40 **167** zur visuellen Validierung der *pull-down*-Experimente.

7 Experimenteller Teil

7.1 Allgemein

7.1.1 Anmerkung

Literaturangaben bei eigenen Prozeduren beziehen sich auf Quellen, deren Vorschriften zur Synthese eines *bis dato* nicht dokumentierten Moleküls oder zur Optimierung der Reaktionsführung adaptiert wurden.

Für Assayprozeduren sei auf die Dissertation von Iris Nee sowie die entsprechenden Veröffentlichungen verwiesen.

7.1.2 Allgemeine Arbeitsweise

Alle Reaktionen mit sauerstoff- oder feuchtigkeitsempfindlichen Reagenzien wurden in ausgeheizten Glasapparaturen durchgeführt. Als Schutzatmosphäre wurde trockenes und sauerstofffreies Argon N50 (*Air Liquide*) verwendet.

Kommerziell erhältliche Reagenzien und Lösungsmittel wurden ohne weitere Aufreinigung benutzt.

7.1.3 Mikrowellenreaktionen

Reaktionen unter Einwirkung von Mikrowellenstrahlung wurden in geschlossenen, druck-sicheren Glasreaktionsgefäßen durchgeführt.

Reaktor: Discover (*CEM*)

Autosampler: Explorer (*CEM*)

7.1.4 Kugelrohrdestillation

Kugelrohrdestillationen wurden am Platz durchgeführt.

Pumpe: Vacuum System MZ 2C NT+AK+EK (*vacuubrand*)

Ofen: Glass Oven B-585 (*Büchi*)

7.1.5 Hochvakuum

Die Trocknung der synthetisierten Verbindungen erfolgte unter vermindertem Druck in einer Dauer von mindestens einer Stunde, bis zu mehreren Tagen und teilweiser Verwendung eines Ofens.

Pumpe: Chemistry Hybrid Pump RC 6 (*vacuubrand*)

Manometer: VAP 5 (*vacuubrand*)

Ofen: Glass Oven B-585 (*Büchi*)

7.2 Analytik

7.2.1 Flüssigkeitschromatographie

DC-Platten: 60 F₂₅₄ (*Merck*)

Kieselgel: 60 (0,063 - 0,04 nm) (*Macherey-Nagel*)

Für die Aufreinigung mittels MPLC wurden zwei Systeme verwendet, bei denen entweder vorgepackte (Endstufen) oder selbstgepackte Kartuschen verschiedener Hersteller zum Einsatz kamen:

System 1: Reveleris X2 (*Grace*, jetzt *Büchi*)

System 2: Pumpenmodul C-601 (x2), Pumpmanager C-615, UV-Detektor C-630, Fraktionsskolektor C-660 (*Büchi*)

Kartuschen: FlashPure (*Büchi*), Reveleris (*Grace*, jetzt *Büchi*), PuriFlash (*Interchim*)

7.2.2 Kernmagnetresonanzspektroskopie (NMR)

Die chemischen Verschiebungen (in ppm) wurden auf den Restprotonengehalt der entsprechenden Lösungsmittel bezogen (¹H/¹³C):¹⁰¹

CDCl₃: 7,26 / 77,16, DMSO-d₆: 2,50 / 39,52, CD₃OD: 3,31 / 49,00, D₂O: 4,79.

Folgende Abkürzungen wurden für die Spinmultiplizitäten gewählt:

s = Singulett, br s = breites Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett, sm = symmetrisches Multiplett.

Bei Nummerierung der Verbindungen zum Zwecke der Signalzuordnung wurde von der gängigen Konvention abgewichen, um eine einfachere Vergleichbarkeit zwischen den Verbindungen einer Serie herzustellen. Die genaue Kennzeichnung ist vor der jeweiligen Synthesevorschrift dargestellt. Darüber hinaus befinden sich ausgewählte Spektren am Ende des jeweiligen Kapitels.

Software: Delta 5.2.1 (*JEOL*)

Messungen am Fachbereich Chemie:

250 MHz: AV III HD 250 MHz (*Bruker*)

300 MHz: AV III 300 MHz (*Bruker*)

Messungen am Fachbereich Pharmazie:

400 MHz: ECX400 (*JEOL*)

500 MHz: ECA500 (*JEOL*)

7.2.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie + Massenspektroskopie (HPLC-MS)

HPLC-System: 1260 Infinity (*Agilent*)

MS: expression S CMS (*Advion*)

7.2.4 Hochauflösende Massenspektroskopie (HRMS)

Die Messungen wurden durch das Gerätezentrum für Massenspektrometrie und Elementanalytik am Fachbereich Chemie durchgeführt.

EI: AccuTOF-GCv (*JEOL*)

ESI: LTQ-FT (*Finnigan*)

7.2.5 Elementaranalytik (EA)

Die Messungen wurden durch das Gerätezentrum für Massenspektrometrie und Elementanalytik am Fachbereich Chemie durchgeführt.

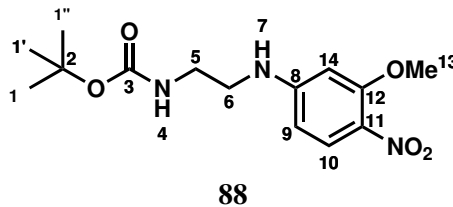
7.2.6 Schmelzpunktbestimmung (MP)

Messgeräte: MPM-M2 (*Schorpp*), M 5000 (*Krüss*)

7.3 Photoaffinitätsmarkierung von PPAR β/δ -Liganden

7.3.1 Synthese des ST247-Derivats für die PA-Markierung

tert-Butyl-(2-((3-methoxy-4-nitrophenyl)amino)ethyl)carbamate, **88**



4-Fluoro-2-methoxy-1-nitrobenzol (856 mg, 5,00 mmol, 1,00 Äq.) und *t*-Butyl-(2-hydroxyethyl)carbamate (3204 mg, 20,00 mmol, 4,00 Äq.) wurden in MeCN (10,00 mL) gelöst und für 2 h bei 120 °C (300 W) in einer Mikrowelle gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit H₂O und mit DCM extrahiert. Die vereinigte organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie (DCM/MeOH, 40:1), um **88** (1425 mg, 4,58 mmol) als gelben Feststoff in 91% Ausbeute zu erhalten.

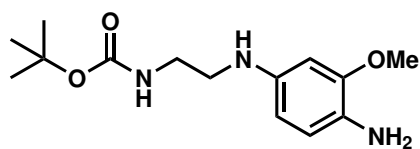
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): $\delta_H = 7,84$ (d, $^3J_{H,H} = 9,2$ Hz, 1H, H-10), 7,10 (t, $^3J_{H,H} = 5,4$ Hz, 1H, H-4), 6,90 (t, $^3J_{H,H} = 5,4$ Hz, 1H, H-7), 6,29 (d, $^4J_{H,H} = 1,7$ Hz, 1H, H-14), 6,24 (dd, $^3J_{H,H} = 9,3$ Hz, $^4J_{H,H} = 2,2$ Hz, 1H, H-9), 3,87 (s, 3H, H-13), 3,25 - 3,17 (m, 2H, H-5 oder H-6), 3,14 - 3,06 (m, 2H, H-5 oder H-6), 1,37 (s, 9H, H-1/1'/1'') ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆): $\delta_C = 156,8$ (C-12), 155,7 (C-3), 155,1 (C-8), 128,6 (C-11), 126,7 (C-10), 104,2 (C-9), 94,1 (C-14), 77,8 (C-2), 56,0 (C-13), 42,1 (C-6), 39,0 (C-5), 28,2 (C-1/1'/1'') ppm.

HRMS (ESI, *m/z*): [M+H]⁺ berechnet für [C₁₄H₂₂N₃O₅]⁺: 312,1554; gefunden: 312,1554.

MP: 97 °C.

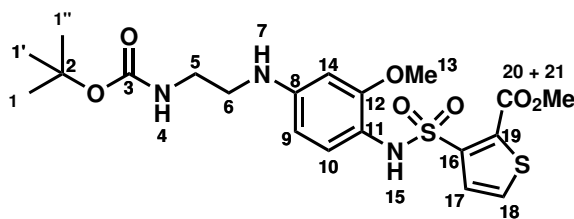
tert-Butyl-(2-((4-amino-3-methoxyphenyl)amino)ethyl)carbammat, **89**



89

88 (1233 mg, 3,96 mmol, 1,00 Äq.) wurde in EtOAc (20,00 mL) gelöst und Pd/C (10%, 103 mg) hinzugefügt. Eine H₂-Atmosphäre (Ballon) wurde installiert und der Reaktionsansatz bei Raumtemperatur für 3 d unter Lichtausschluss gerührt. Die Lösung wurde über Celite filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, um **89** zu erhalten. Das Rohprodukt wurde umgehend für den nächsten Reaktionsschritt verwendet.

Methyl-3-(N-(4-((2-((t-butoxycarbonyl)amino)ethyl)amino)-2-methoxyphenyl)sulfamoyl)thiophen-2-carboxylat, **90**



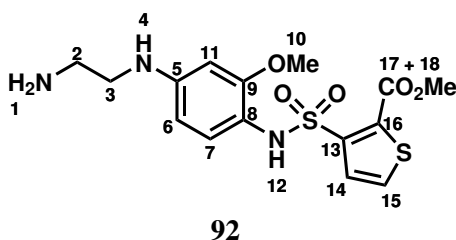
90

89 (1185 mg, 4,21 mmol, 1,00 Äq.), Methyl-3-(chlorosulfonyl)thiophen-2-carboxylat (1115 mg, 4,63 mmol, 1,10 Äq.) und DMAP (257 mg, 2,11 mmol, 0,50 Äq.) wurden in trockenem Pyridin (42,10 mL) gelöst, vor Licht und Luft geschützt, bei Raumtemperatur für 3 d gerührt und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie (cHex/EtOAc, 1:1), um **90** (1346 mg, 2,77 mmol) als Gemisch mit Nebenprodukten zu erhalten (NMR-Reinheit \approx 80%). Dieses wurde für die nächste Reaktion verwendet, da die möglichen Nebenprodukte bei den weiteren Reaktionen als nicht störend eingeschätzt wurden.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ_H = 8,12 (s, 1H, H-15), 7,38 (d, ³J_{H,H} = 5,3 Hz, 1H, H-18), 7,36 (d, ³J_{H,H} = 5,3 Hz, 1H, H-17), 7,29 (d, ³J_{H,H} = 8,3 Hz, 1H, H-10, *unter Lösungsmittelsignal*), 6,14 (dd, ³J_{H,H} = 8,7 Hz, ⁴J_{H,H} = 2,3 Hz, H-9), 5,99 (d, ⁴J_{H,H} = 1,5 Hz, H-14), 4,78 (br s, 1H, H-7), 4,00 (br s, 3H, H-21, *), 3,48 (s, 3H, H-13, *), 3,38 - 3,28 (m, 2H, H-5 oder H-6), 3,21 - 3,14 (m, 2H, H-5 oder H-6), 1,43 (s, 9H, H-1/1'/1'', *) ppm.
* = Mischung mit Signal anderer Nebenprodukte.

HRMS (ESI, m/z): [M+H]⁺ berechnet für [C₂₀H₂₈N₃O₇S₂]⁺: 486,1363; gefunden: 486,1363.

Methyl-3-(N-(4-((2-aminoethyl)amino)-2-methoxyphenyl)sulfamoyl)thiophen-2-carboxylat, **92**



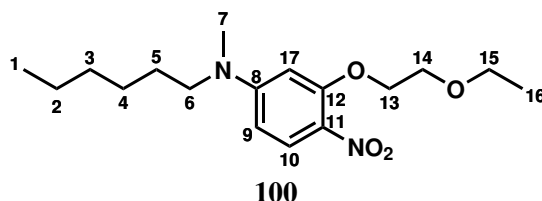
90 (400 mg, 0,82 mmol, 1,00 Äq.) wurde bei 0 °C in DCM (8,00 mL) gelöst, nachfolgend HCl (4,0 M in Dioxan, 1,86 mL, 9,00 Äq.) hinzugegeben und bei Raumtemperatur für 3 h gerührt. Die Lösung wurde mit H₂O, sowie einer gesättigten, wässrigen K₂CO₃-Lösung verdünnt und mit DCM extrahiert. Die vereinigte organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie (DCM/MeOH, 10:1), um **92** als orangen Feststoff (163 mg, 0,42 mmol) in 51% Ausbeute zu erhalten. Aufgrund der beobachteten Luftempfindlichkeit wurde **92** umgehend weiterverwendet (Nicht gezeigt, da nicht erfolgreich, **4.1.3**).

¹H-NMR (300 MHz, MeOD): δ_H = 7,37 (d, ³J_{H,H} = 5,3 Hz, 1H, H-14 oder H-15), 7,35 (d, ³J_{H,H} = 5,3 Hz, 1H, H-14 oder H-15), 7,26 (d, ³J_{H,H} = 8,7 Hz, 1H, H-7), 6,14 (dd, ³J_{H,H} = 8,7 Hz, ⁴J_{H,H} = 2,5 Hz, 1H, H-6), 5,98 (d, ⁴J_{H,H} = 2,5 Hz, 1H, H-11), 4,00 (s, 3H, H-18), 3,47 (s, 3H, H-10), 3,12 (t, ³J_{H,H} = 5,8 Hz, 2H, H-2 oder H-3), 2,92 (t, ³J_{H,H} = 5,8 Hz, 2H, H-2 oder H-3) ppm.

HRMS (ESI, m/z): $[M+H]^+$ berechnet für $[C_{15}H_{20}N_3O_5S_2]^+$: 386,0839; gefunden: 386,0840.

7.3.2 Synthese eines neuen *N*-methylierten PPAR β/δ -Liganden

3-(2-Ethoxyethoxy)-*N*-hexyl-*N*-methyl-4-nitroanilin, **100**



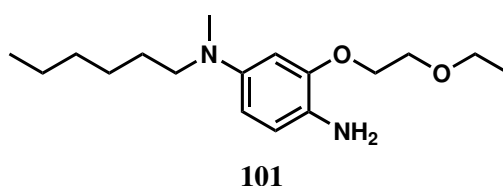
3-(2-Ethoxyethoxy)-*N*-hexyl-4-nitroanilin (1086 mg, 3,50 mmol), sowie NaH (60% w/w in Paraffin, 166 mg, 4,20 mmol, 1,20 Äq.) wurden in DMF (35,00 mL) gelöst und bei Raumtemperatur für 15 min gerührt. Anschließend wurde MeI (596 mg, 4,20 mmol, 1,20 Äq.) hinzugefügt und für weitere 2 h gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von H₂O und einer gesättigten, wässrigen K₂CO₃-Lösung gequencht und mit EtOAc extrahiert. Die vereinigte organische Phase wurde mit einer wässrigen LiCl-Lösung (5%) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie (cHex/EtOAc, 4:1), um **100** (850 mg, 2,62 mmol) als gelbes Öl in 75% Ausbeute zu erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): $\delta_H = 7,88$ (d, $^3J_{H,H} = 9,5$ Hz, 1H, H-10), 6,36 (dd, $^3J_{H,H} = 9,7$ Hz, $^4J_{H,H} = 2,6$, 1H, H-9), 6,24 (d, $^4J_{H,H} = 2,6$, 1H, H-17), 4,24 (t, $^3J_{H,H} = 4,7$ Hz, 2H, H-13), 3,74 (t, $^3J_{H,H} = 4,7$ Hz, 2H, H-14), 3,54 (q, $^3J_{H,H} = 7,1$ Hz, 2H, H-15), 3,43 (t, $^3J_{H,H} = 7,5$ Hz, 2H, H-6), 3,03 (s, 3H, H-7), 1,58 - 1,48 (m, 2H, H-5), 1,33 - 1,22 (m, 6H, H-2 + H-3 + H-4), 1,12 (t, $^3J_{H,H} = 7,0$, 3H, H-16), 0,91 (t, $^3J_{H,H} = 7,0$ Hz, 3H, H-1) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6): $\delta_C = 155,7$ (C-12), 154,1 (C-8), 128,3 (C-11), 126,6 (C-10), 103,7 (C-9), 95,2 (C-17), 68,8 (C-14), 67,9 (C-13), 65,4 (C-15), 51,5 (C-7), 38,1 (C-6), 31,0 (C-3), 26,3 (C-4), 25,8 (C-5), 22,0 (C-2), 15,0 (C-16), 13,8 (C-1) ppm.

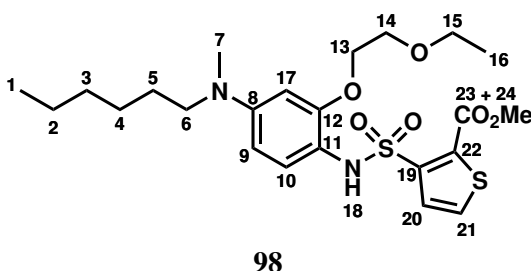
HRMS (ESI, m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ berechnet für $[\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_4\text{Na}]^+$: 347,1941; gefunden: 347,1934.

3-(2-Ethoxyethoxy)- N_1 -hexyl- N_1 -methylbenzol-1,4-diamin, **101**



100 (850 mg, 2,62 mmol) wurde in EtOAc (7,00 mL) gelöst und Pd/C (10%, 68 mg) hinzugefügt. Eine H_2 -Atmosphäre (Ballon) wurde installiert und der Reaktionsansatz bei Raumtemperatur für 1 d unter Lichtausschluss gerührt. Die Lösung wurde über Celite filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, um **101** zu erhalten. Das Rohprodukt wurde umgehend für den nächsten Reaktionsschritt verwendet.

Methyl-3-(N -(2-(2-ethoxyethoxy)-4-(hexyl(methyl)amino)phenyl)sulfamoyl)thiophen-2-carboxylat, **98**



101 (711 mg, 2,62 mmol), Methyl-3-(chlorosulfonyl)thiophen-2-carboxylat (694 mg, 2,88 mmol, 1,10 Äq.) und DMAP (160 mg, 2,88 mmol, 0,50 Äq.) wurden in trockenem Pyridin gelöst und bei Raumtemperatur 3 d unter Lichtausschluss gerührt.

Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in HCl (1 M) aufgenommen und mit DCM extrahiert. Die vereinigte organische Phase wurde mit einer gesättigten, wässrigen NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie (cHex/EtOAc, 1:1), um **98** (160 mg, 0,32 mmol) als orangen Feststoff in 12% Ausbeute zu erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): $\delta_H = 8,45$ (s, 1H, H-18), 7,88 (d, $^3J_{H,H} = 5,2$ Hz, 1H, H-21), 7,29 (d, $^3J_{H,H} = 5,2$ Hz, 1H, H-20), 7,08 (d, $^3J_{H,H} = 8,6$ Hz, 1H, H-10), 6,19 (dd, $^3J_{H,H} = 8,9$ Hz, $^4J_{H,H} = 2,6$ Hz, 1H, H-9), 6,16 (d, $^4J_{H,H} = 2,6$ Hz, 1H, H-17), 3,91 (s, 3H, H-24), 3,89 (t, $^3J_{H,H} = 5,0$ Hz, 2H, H-13), 3,48 (t, $^3J_{H,H} = 5,0$ Hz, 2H, H-14), 3,44 (q, $^3J_{H,H} = 7,7$ Hz, 2H, H-15), 3,23 (t, $^3J_{H,H} = 7,5$ Hz, 2H, H-6), 2,82 (s, 3H, H-7), 1,44 (sm, $^3J_{H,H} = 7,0$ Hz, 2H, H-5), 1,30 – 1,20 (m, 6H, H-2 + H-3 + H-4), 1,13 (t, $^3J_{H,H} = 7,0$ Hz, 3H, H-16), 0,85 (t, $^3J_{H,H} = 6,7$ Hz, 3H, H-1) ppm.

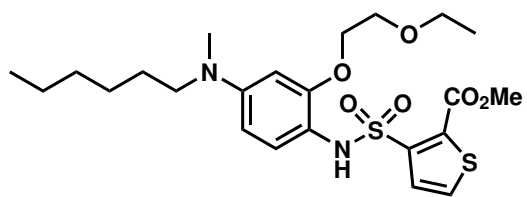
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆): $\delta_C = 160,2$ (C-23), 152,6 (C-12), 148,6 (C-8), 144,4 (C-19), 131,6 (C-21), 131,6 (C-22), 130,3 (C-20), 127,2 (C-10), 113,1 (C-11), 104,0 (C-9), 97,0 (C-17), 68,0 (C-14), 67,7 (C-13), 65,6 (C-15), 53,0 (C-24), 51,7 (C-7), 37,9 (C-6), 31,0 (C-3), 26,02 (C-4), 26,00 (C-5), 22,0 (C-2), 15,0 (C-16), 13,8 (C-1) ppm.

HRMS (ESI, m/z): $[M+Na]^+$ berechnet für $[C_{23}H_{34}N_2O_6NaS_2]^+$: 521,1750; gefunden: 521,1742.

EA (C/H/N/S, %): Berechnet für $[C_{23}H_{34}N_2O_6S_2]$: 55,40 / 6,87 / 5,62 / 12,86; gefunden: 55,11 / 6,57 / 5,54 / 12,66.

MP: 67 °C.

7.3.3 Ausgewählte NMR-Spektren

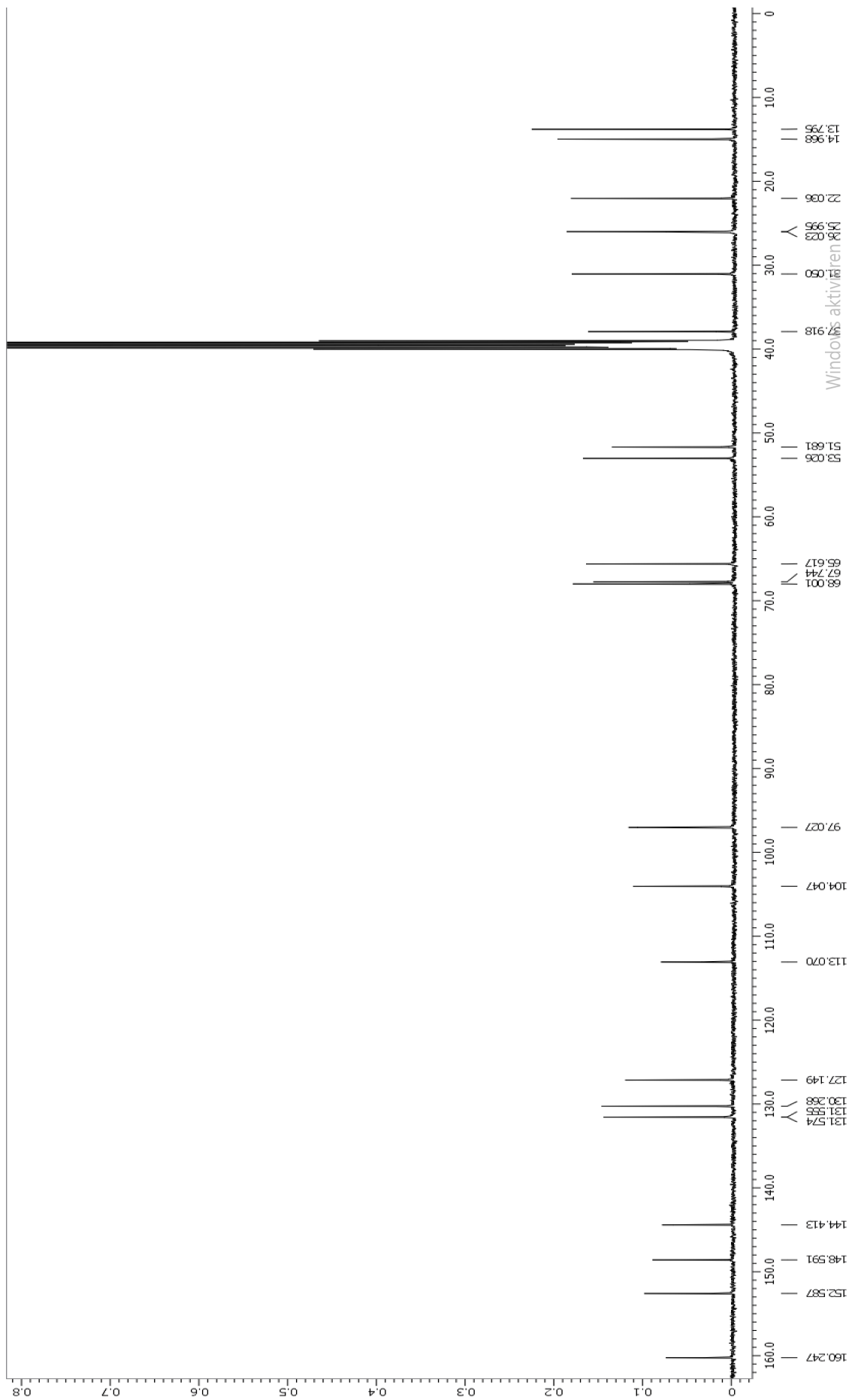


98

98:

¹H-NMR: 500 MHz, DMSO-d₆, s. S. 120

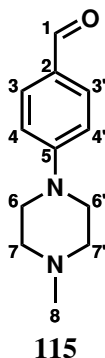
¹³C-NMR: 125 MHz, DMSO-d₆, s. S. 121



7.4 *Off-Target* Aufklärung von DG172

7.4.1 Synthese von LD222

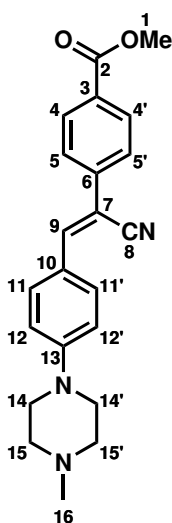
4-(4-Methylpiperazin-1-yl)benzaldehyd, 115



4-Fluorobenzaldehyd (1160 mg, 1,00 mL, 9,35 mmol, 1,00 Äq.), 1-Methylpiperazin (1461 mg, 1,60 mL, 14,59 mmol, 1,56 Äq.) und K_2CO_3 (1934 mg, 14,03 mmol, 1,50 Äq.) wurden in H_2O (9,40 mL) suspendiert und für 21 h zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde mit H_2O (25,00 mL) verdünnt und mit DCM extrahiert. Die vereinigte organische Phase wurde mit H_2O gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, um **115** (1910 mg, 9,35 mmol) als hellgelben Feststoff in quantitativer Ausbeute zu erhalten.¹⁰²

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): $\delta_H = 9,78$ (s, 1H, H-1), 7,75 (d, $^3J_{H,H} = 6,4$ Hz, 2H, H-3/3'), 6,91 (d, $^3J_{H,H} = 6,8$ Hz, 2H, H-4/4'), 3,41 (s, 4H, H-6/6'), 2,56 (s, 4H, H-7/7'), 2,35 (s, 3H, H-8) ppm.

Methyl-(Z)-4-(1-cyano-2-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)vinyl)benzoat, **114**



115 (1910 mg, 9,35 mmol, 1,00 Äq.), **113** (1638 mg, 9,35 mmol, 1,00 Äq.) und Pyrrolidin (1,53 mL, 18,70 mmol, 2,00 Äq.) wurden in MeOH (47,00 mL) gelöst, für 1 h bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgte mittels Umkristallisation aus MeOH, um **114** (2796 mg, 7,74 mmol) als gelben Feststoff in 83% Ausbeute als gemisch der beiden *E/Z*-Isomere (1:6) zu erhalten.⁶⁵

¹**H-NMR** (500 MHz, DMSO_d₆): $\delta_H = 8,02$ (d, $^3J_{H,H} = 8,6$ Hz, 2H, H-4/4'), 7,99 (s, 1H, H-9), 7,91 (d, $^3J_{H,H} = 8,9$ Hz, 2H, H-11/11'), 7,83 (d, $^3J_{H,H} = 8,6$ Hz, 2H, H-5/5'), 7,05 (d, $^3J_{H,H} = 8,9$ Hz, 2H, H-12/12'), 3,87 (s, 3H, H-1), 3,35 (t, 4H, $^3J_{H,H} = 5,0$ Hz, H-14/14'), 2,43 (t, $^3J_{H,H} = 5,0$ Hz, 4H, H-15/15'), 2,20 (s, 3H, H-16) ppm.

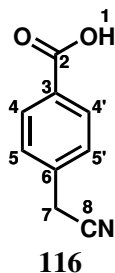
¹³**C-NMR** (125 MHz, DMSO_d₆) $\delta_C = 165,7$ (C-2), 152,4 (C-13), 144,5 (C-9), 139,2 (C-6), 131,5 (C-4/4'), 129,8 (C-11/11'), 128,7 (C-3), 125,2 (C-5/5'), 122,4 (C-6), 118,6 (C-8), 113,8 (C-12/12'), 102,5 (C-7), 54,2 (C-15/15'), 52,1 (C-1), 46,4 (C-14/14'), 45,7 (C-16) ppm.

HRMS (ESI, *m/z*): [M+H]⁺ berechnet für [C₂₂H₂₄N₃O₂]⁺: 362,1863; gefunden: 362,1858.

EA (C/H/N, %): Berechnet für [C₂₂H₂₃N₃O₂]: 73,11 / 6,41 / 11,63; gefunden: 73,09 / 6,50 / 11,52.

MP: 135 °C.

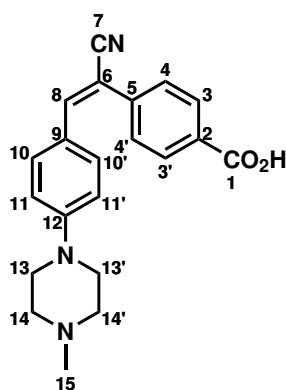
4-(Cyanomethyl)benzoesäure, **116**



Methyl-4-(cyanomethyl)benzoat (1000 mg, 5,71 mmol, 1,00 Äq.) wurde in MeOH (12,10 mL) und NaOH-Lösung (1 M, 6,50 mL, 1,14 Äq.) gelöst und für 3 h zum Sieden erhitzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in H₂O (20,00 mL) aufgenommen und der pH auf 2-3 mit konz. HCl eingestellt. Das Präzipitat wurde mit H₂O gewaschen und im Vakuum getrocknet, um **116** (609 mg, 3,78 mmol) als farblosen Feststoff in 75% Ausbeute zu erhalten.¹⁰³

¹**H-NMR** (300 MHz, DMSO-d₆): $\delta_H = 12,97$ (br s, 1H, H-1), 7,95 (d, ³ $J_{H,H} = 9,3$ Hz, 2H, H-4/4'), 7,46 (d, ³ $J_{H,H} = 8,3$ Hz, 2H, H-5/5'), 4,14 (s, 2H, H-7) ppm.

(E)-4-(1-Cyano-2-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)vinyl)benzoesäure, 109



115 (127 mg, 0,62 mmol, 1,00 Äq.), **116** (100 mg, 0,62 mmol, 1,00 Äq.) und KOH (35 mg, 0,62 mmol, 1,00 Äq.) wurden in MeOH (5,00 mL) suspendiert, gefolgt von tropfenweiser Zugabe von H₂O bis zur vollständigen Lösung und fortgesetztem Rühren bei Raumtemperatur über Nacht. Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie (DCM/MeOH, 15:1), um **109** (212 mg, 0,61 mmol) als gelben Feststoff in 98% Ausbeute als Gemisch der beiden (*E*)/(*Z*)-Isomere (3:1) zu erhalten.⁶⁵

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆ + TFA):

(E)-Isomer, Hauptprodukt: $\delta_H = 10,25$ (br s, 1H, N⁺-H), 8,01 (d, ³J_{H,H} = 8,3 Hz, 2H, H-3/3'), 7,58 (s, 1H, H-8), 7,52 (d, ³J_{H,H} = 8,3 Hz, 2H, H-4/4'), 7,09 (d, ³J_{H,H} = 9,2 Hz, 2H, H-10/10'), 6,89 (d, ³J_{H,H} = 9,2 Hz, 2H, H-11/11'), 3,96 (br s, 2H, H-13a/13'a), 3,46 (br s, 2H, H-13b/13'b), 3,07 (br s, 4H, H-14/14'), 2,82 (s, 3H, H-15/15') ppm.

(Z)-Isomer, Nebenprodukt: $\delta_H = 10,24$ (br s, 1H, N⁺-H), 8,04 (s, 1H, H-8), 8,03 (d, 2H, H-3/3', teilweise von H-3/3' des Hauptprodukts überlagert), 7,96 (d, ³J_{H,H} = 8,8 Hz, 2H, H-10/10'), 7,83 (d, ³J_{H,H} = 8,6 Hz, 2H, H-4/4'), 7,16 (d, ³J_{H,H} = 9,2 Hz, 2H, H-11/11'), 4,11 (br s, 2H, H-13a/13'a), 3,53 (br s, 2H, H-13b/13'b), 3,16 (br s, 4H, H-14/14'), 2,86 (s, 3H, H-15/15') ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆ + TFA):

(E)-Isomer, Hauptprodukt: $\delta_C = 166,7$ (C-1), 150,4 (C-12), 145,4 (C-8), 137,8 (C-5), 131,6 (C-10/10'), 131,3 (C-2), 130,3 (C-3/3'), 128,9 (C-4/4'), 123,5 (C-9), 120,3 (C-7), 114,4 (C-11/11'), 107,5 (C-6), 51,8 (C-14/14'), 44,0 (C-13/13'), 42,0 (C-15) ppm.

(Z)-Isomer, Nebenprodukt: $\delta_C = 166,7$ (C-1), 151,0 (C-12), 144,2 (C-8), 138,5 (C-5), 131,2 (C-10/10'), 130,3 (C-2, teilweise von C-3/3' des Hauptprodukts überlagert), 130,0 (C-3/3'), 125,3 (C-4/4'), 123,9 (C-9), 118,5 (C-7), 114,7 (C-11/11'), 104,3 (C-6), 51,8 (C-14/14', teilweise von C-14/14' des Hauptprodukts überlagert), 44,1 (C-13/13'), 42,0 (C-15) ppm.

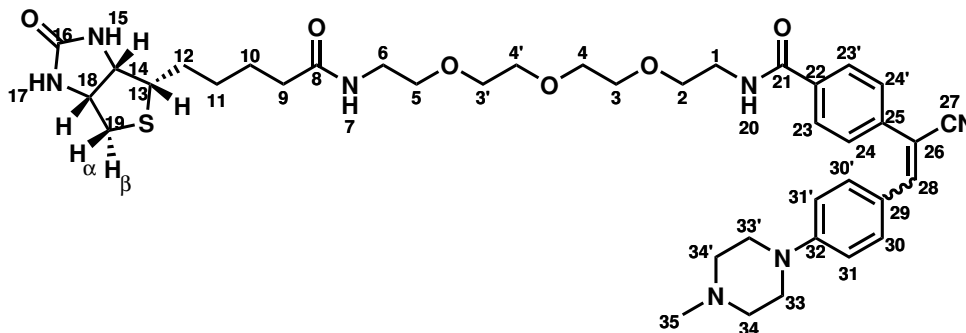
HRMS (ESI, *m/z*): [M+H]⁺ berechnet für [C₂₁H₂₂N₃O₂]⁺: 348,1707; gefunden: 348,1708.

Reinheit (qNMR, 500 MHz, DMSO-d₆, Maleinsäure): 88%.

MP: Zersetzung.

7.4.2 Synthese von LD253

4-((*E*)/(*Z*)-1-Cyano-2-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)vinyl)-*N*-(13-oxo-17-((3*aS*,4*S*,6*aR*)-2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)-3,6,9-trioxa-12-azaheptadecyl)-benzamid, **112**



112

117 (67 mg, 0,16 mmol, 1,00 Äq.), **109** (22 mg, 0,16 mmol, 1,00 Äq.), DCC (33 mg, 0,16 mmol, 1,00 Äq.), HOBt (22 mg, 0,16 mmol, 1,00 Äq.) und Et₃N (0,07 mL, 0,60 mmol, 2,98 Äq.) wurden in DMF (3,00 mL) gelöst, bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die Mischung wurde filtriert, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und die Reinigung erfolgte per Säulenchromatographie (DCM/MeOH, 6:1), um **112** (79 mg, 0,11 mmol) als gelbes Wachs in 66% Ausbeute als 1:1 Mischung der (*E*)/(*Z*)-Isomere zu erhalten.¹⁰⁴

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD):

(*E*)-Isomer: $\delta_H = 7,89$ (d, $^3J_{H,H} = 8,3$ Hz, 2H, H-23/23'), 7,50 (d, $^3J_{H,H} = 8,0$ Hz, 2H, H-24/24'), 7,41 (s, 1H, H-28), 7,09 (d, $^3J_{H,H} = 8,9$ Hz, 2H, H-30/30'), 6,78 (d, $^3J_{H,H} = 8,3$ Hz, 2H, H-31/31'), 4,47 (dd, $^3J_{H,H} = 7,9$ Hz, 5,2 Hz, 1H, H-18), 4,27 (dd, $^3J_{H,H} = 7,9$ Hz, 4,6 Hz, 1H, H-14), 3,70 – 3,62 (m, 8H, H-3/3' + H-4/4', *), 3,62 – 3,56 (m, 4H, H-1 + H-5, *), 3,50 (t, $^3J_{H,H} = 5,4$ Hz, 2H, H-2, *), 3,45 (t, $^3J_{H,H} = 4,9$ Hz, 2H, H-33a/33'a, *), 3,35 – 3,41 (m, 4H, H-6 + H-33b/33'b, unter Lösungsmittelsignal, *), 3,19 – 3,12 (m, 1H, H-13, *), 2,90 (dd, $^2J_{H,H} = 12,7$ Hz, $^3J_{H,H} = 4,6$ Hz, 1H, H-19_α), 2,73 (t, $^3J_{H,H} = 4,4$ Hz, 4H, H-34/34'), 2,68 (d, $^2J_{H,H} = 12,9$ Hz, 1H, H-19_β), 2,46 (s, 3H, H-35), 2,18 (t, $^3J_{H,H} = 7,2$ Hz, 2H, H-9), 1,74 – 1,52 (m, 4H, H-10 + H-12, *), 1,45 – 1,36 (m, 2H, H-11, *) ppm.

(Z)-Isomer: $\delta_H = 7,93$ (d, $^3J_{H,H} = 7,7$ Hz, 2H, H-30/30'), 7,91 (d, $^3J_{H,H} = 7,2$ Hz, 2H, H-23/23'), 7,77 (s, 1H, H-28), 7,77 (d, $^3J_{H,H} = 7,7$ Hz, 2H, H-24/24'), 7,04 (d, $^3J_{H,H} = 8,0$ Hz, 2H, H-31/31'), 4,46 (dd, $^3J_{H,H} = 7,9$ Hz, 5,2 Hz, 1H, H-18), 4,26 (dd, $^3J_{H,H} = 7,9$ Hz, 4,6 Hz, 1H, H-14), 3,70 – 3,62 (m, 8H, H-3/3' + H-4/4', *), 3,62 – 3,56 (m, 4H, H-1 + H-5, *), 3,50 (t, $^3J_{H,H} = 5,4$ Hz, 2H, H-2, *), 3,45 (t, $^3J_{H,H} = 4,9$ Hz, 2H, H-33a/33'a, *), 3,35 – 3,41 (m, 4H, H-6 + H-33b/33'b, unter Lösungsmittelsignal, *), 3,19 – 3,12 (m, 1H, H-13, *), 2,89 (dd, $^2J_{H,H} = 12,6$ Hz, $^3J_{H,H} = 4,4$ Hz, 1H, H-19 $_{\alpha}$), 2,79 (t, $^3J_{H,H} = 4,6$ Hz, 4H, H-34/34'), 2,68 (d, $^2J_{H,H} = 12,9$ Hz, 1H, H-19 $_{\beta}$), 2,50 (s, 3H, H-35), 2,17 (t, $^3J_{H,H} = 7,2$ Hz, 2H, H-9), 1,74 – 1,52 (m, 4H, H-10 + H-12, *), 1,45 – 1,36 (m, 2H, H-11, *) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD₃OD):

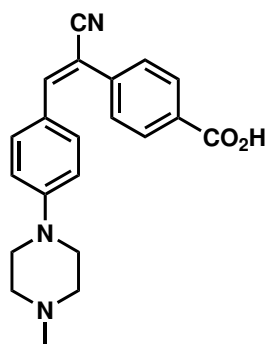
(E)-Isomer: $\delta_C = 176,0$ (C-8, *), 169,2 (C-21), 166,0 (C-16, *), 153,2 (C-32), 146,7 (C-28), 138,5 (C-25), 136,0 (C-22), 132,9 (C-30/30'), 130,2 (C-24/24'), 129,4 (C-23/23'), 125,1 (C-29), 121,6 (C-27), 115,5 (C-31/31'), 109,4 (C-26), 71,6 + 71,3 + 71,2 + 70,6 + 70,5 + 7,5 (C-3/3' + C-4/4' + C-2 + C-5, *), 63,3 (C-14, *), 61,6 (C-18, *), 57,0 (C-13, *), 55,3 (C-34/34'), 47,7 (C-33/33', *), 45,5 (C-35), 41,1 (C-6, *), 41,0 (C-19, *), 40,3 (C-1, *), 36,7 (C-9, *), 29,7 (C-11, *), 29,5 (C-12, *), 26,8 (C-10, *) ppm.

(Z)-Isomer: $\delta_C = 176,0$ (C-8, *), 169,3 (C-21), 166,0 (C-16, *), 153,7 (C-32), 144,9 (C-28), 139,5 (C-25), 135,1 (C-22), 132,6 (C-30/30'), 129,2 (C-23/23'), 126,5 (C-24/24'), 125,5 (C-29), 119,7 (C-27), 115,7 (C-31/31'), 106,0 (C-26), 71,6 + 71,3 + 71,2 + 70,6 + 70,5 + 70,5 (C-3/3' + C-4/4' + C-2 + C-5, *), 63,3 (C-14, *), 61,6 (C-18, *), 57,0 (C-13, *), 55,4 (C-34/34'), 47,7 (C-33/33', *), 45,6 (C-35), 41,1 (C-6, *), 41,0 (C-19, *), 40,3 (C-1, *), 36,7 (C-9, *), 29,7 (C-11, *), 29,5 (C-12, *), 26,8 (C-10, *) ppm.

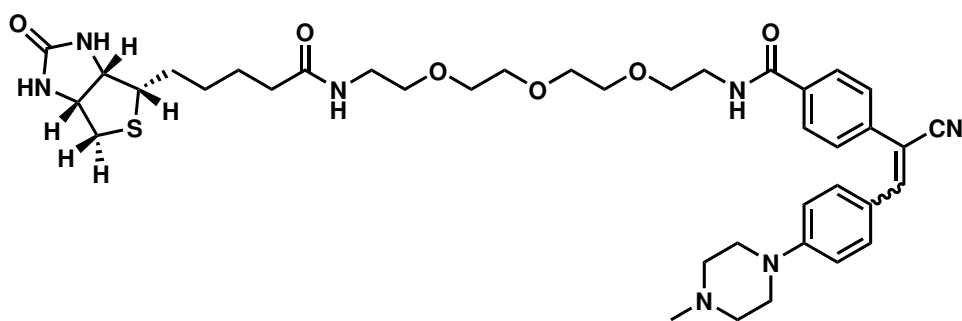
* = Mischung mit entsprechendem Signal des anderen Isomers.

HRMS (ESI, m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ berechnet für $[\text{C}_{39}\text{H}_{54}\text{N}_7\text{O}_6\text{S}]^+$: 748,3851; gefunden: 748,3865.

7.4.3 Ausgewählte NMR-Spektren



109



112

109:

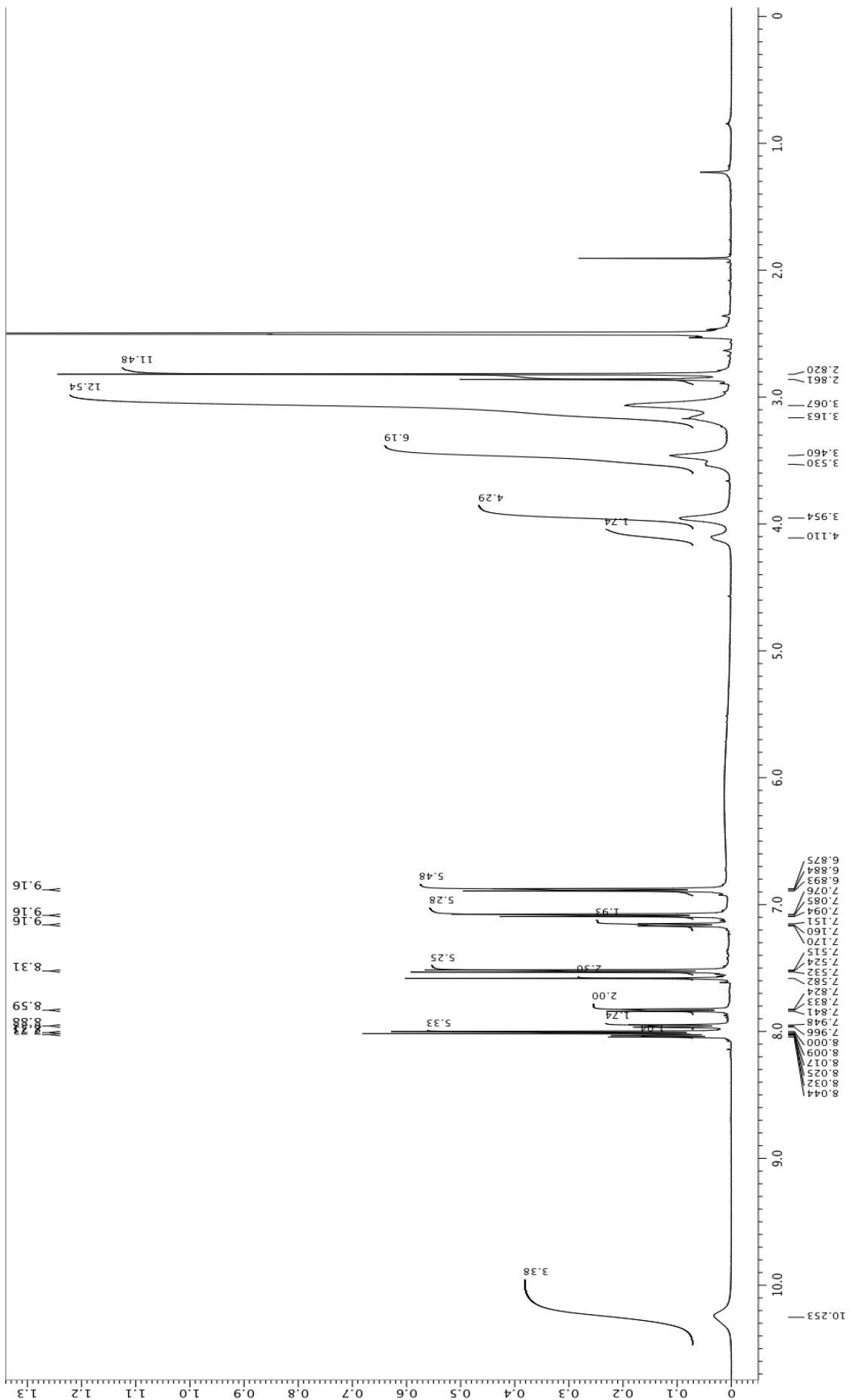
¹H-NMR: 500 MHz, DMSO-d₆ + TFA, s. S. 130

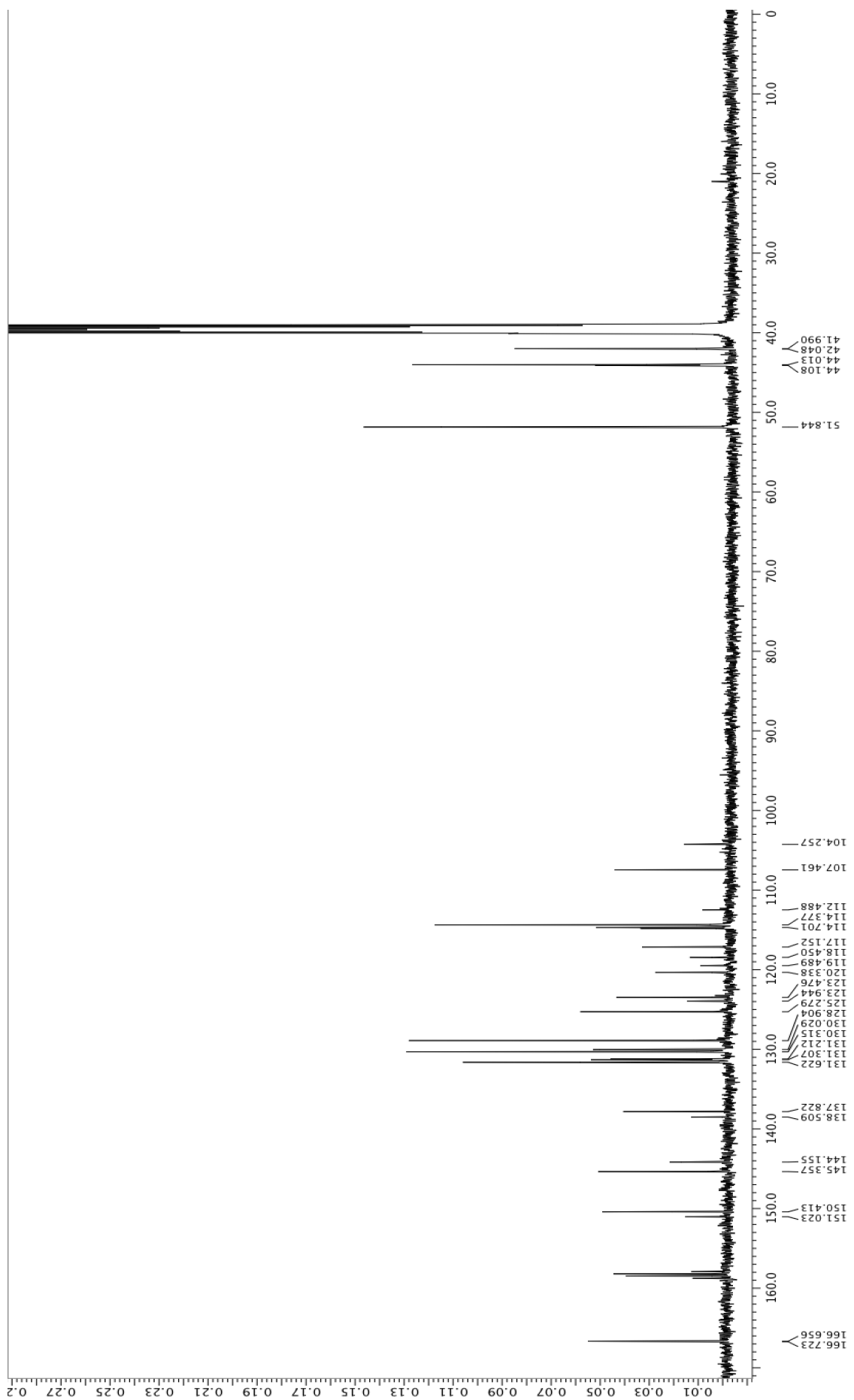
¹³C-NMR: 125 MHz, DMSO-d₆ + TFA, s. S. 131

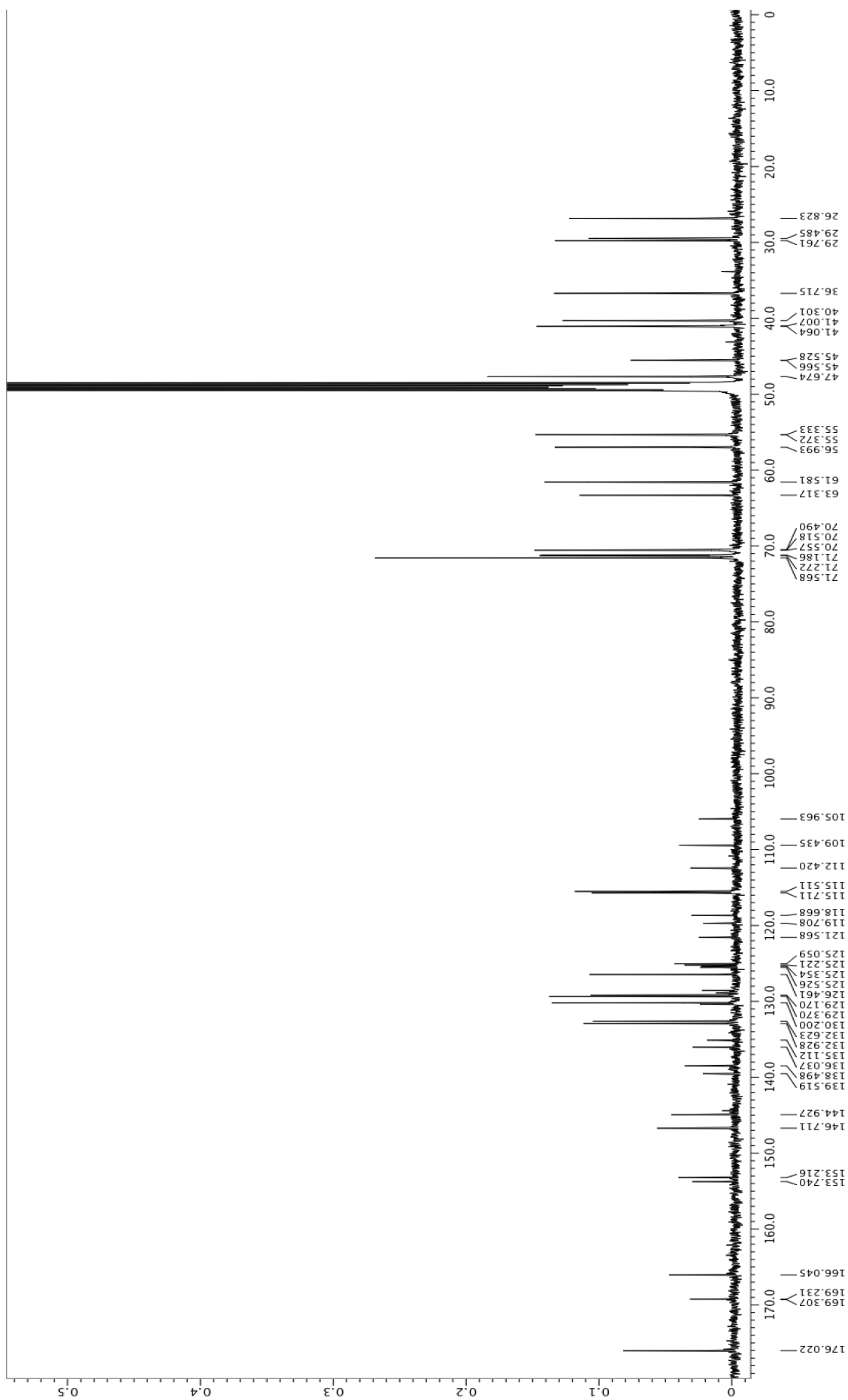
112:

¹H-NMR: 500 MHz, CD₃OD, s. S. 132

¹³C-NMR: 125 MHz, CD₃OD, s. S. 131







7.5 SAR und Targetaufklärung von ISX-9

7.5.1 Allgemeine Vorschrift 1: Synthese der Säurechloride

Die entsprechende Carbonsäure (1,00 Äq.) wurde in DCM suspendiert und DMF (katalytisch), sowie Thionylchlorid hinzugefügt. Die Reaktionslösung wurde für 3 h zum Sieden erhitzt, gefolgt durch Hinzugabe von *c*Hex und Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum. Das Rohprodukt wurde umgehend für den nächsten Reaktionsschritt verwendet.

7.5.2 Allgemeine Vorschrift 2: Synthese der Carboxamide

Das entsprechende Amin (1,10 Äq.), sowie Et₃N (5,00 Äq.) wurden in DCM gelöst und bei Raumtemperatur gerührt, gefolgt von tropfenweiser Zugabe der Säurechloridlösung (DCM, 1,00 Äq., z.B. aus 7.5.1) mit fortgesetztem Rühren über Nacht. Die organische Phase wurde mit HCl (1,00 M, 3x) und anschließend einer gesättigten, wässrigen NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, um das Produkt als farblose Kristalle zu erhalten.

7.5.3 Allgemeine Vorschrift 3: Synthese der 2-Hydroxy-4-oxo-but-2-enoate

Variante A:

Zu einer frisch hergestellten NaOMe-Lösung (0,80 M, 2,00 Äq.) wurde unter Ar-Atmosphäre eine Lösung des entsprechenden Ketons (2,00 M, 1,00 Äq.) und Dimethyloxalat (2,00 Äq.) hinzugefügt und die Reaktionslösung über Nacht zum Sieden erhitzt. Anschließend wurde mit konz. HCl angesäuert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das resultierende Präzipitat wurde abfiltriert (**A1**) *oder* die wässrige Phase mit DCM extrahiert, die vereinigte organische Phase mit einer gesättigten, wässrigen NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt (**A2**). Das Rohprodukt wurde umgehend für den nächsten Reaktionsschritt verwendet.¹⁰⁵

Variante B:

Das entsprechende Keton (1,00 Äq.) und Dimethyloxalat (1,00 Äq.) wurden in Et₂O (1,0 M) gelöst, gefolgt von tropfenweiser Zugabe einer frisch hergestellten NaOMe-Lösung (0,20 M, 1,20 Äq.). Die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt, gefolgt von anschließender Abtrennung und Waschung des Präzipitats mit kaltem MeOH, sowie Et₂O und anschließender Trocknung im Vakuum. Daraufhin wurde der Feststoff in H₂O aufgenommen, für 1 h gerührt, mit konz. HOAc auf pH 3 angesäuert und für 1 h bei 0 °C gerührt. Das neue Präzipitat wurde abfiltriert, mit H₂O gewaschen und im Vakuum getrocknet. Das Rohprodukt wurde umgehend für den nächsten Reaktionsschritt verwendet.

7.5.4 Allgemeine Vorschrift 4: Synthese der Isoxazole

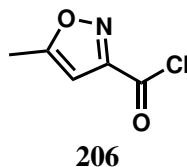
Das entsprechende 2-Hydroxy-4-oxo-but-2-enoat (1,00 Äq., z.B. aus 7.5.3) und Hydroxylaminhydrochlorid (1,18 Äq.) wurden in MeOH suspendiert (0,30 M) und für 24 h bei 60 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in HCl (1,00 M) aufgenommen und mit EtOAc extrahiert. Die vereinigte organische Phase wurde mit einer gesättigten, wässrigen NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie, um das Produkt als farblose Kristalle zu erhalten.¹⁰⁵

7.5.5 Allgemeine Vorschrift 5: Synthese der Carboxamide

Das entsprechende Amin (2,00 Äq.) und der Isoxazolmethylester (1,00 mmol, 1,00 Äq., z.B. aus 7.5.4) wurden in *i*PrOH (1,00 M) suspendiert in einer Mikrowelle bei 100 °C (300 W) für 2 h gerührt. Das Präzipitat wurde abfiltriert, mit *i*PrOH gewaschen und im Vakuum getrocknet, um das Produkt als farblos bis beigen Feststoff zu erhalten.

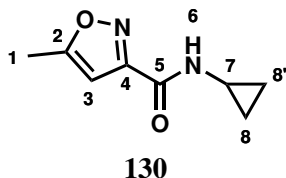
7.5.6 Serie 1: Bestimmung der Kernstruktur

5-Methylisoxazol-3-carbonylchlorid, 206



Nach **7.5.1**: Unter Verwendung einer 0,20 M Lösung von 5-Methylisoxazol-3-carbonsäure, sowie 10,00 Äq. SOCl₂.

N-Cyclopropyl-5-methylisoxazol-3-carboxamid, 130



Nach **7.5.2**: Unter Verwendung einer 0,15 M Lösung von Cyclopropylamin, sowie **206** (145 mg, 1,00 mmol, 0,25 M). Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie (cHex/EtOAc, 2:1), um **130** (90 mg, 0,54 mmol) in 54% Ausbeute über zwei Stufen zu erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ_H = 8,69 (d, ³J_{H,H} = 2,5 Hz, 1H, H-6), 6,50 (s, 1H, H-3), 2,88 – 2,78 (m, 1H, H-7), 2,44 (s, 3H, H-1), 0,73 – 0,55 (m, 4H, H-8/8') ppm.

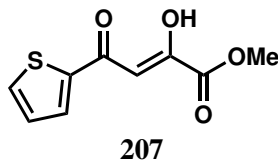
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆): δ_C = 171,5 (C-2), 160,4 (C-5), 159,4 (C-4), 101,7 (C-3), 23,2 (C-7), 12,3 (C-1), 6,1 (C-8/8') ppm.

MS (ESI, *m/z*): [M+NH₄]⁺ berechnet für [C₈H₁₄N₃O₂]⁺: 184,11; gefunden: 184,16.

EA (C/H/N, %): Berechnet für [C₈H₁₀N₂O₂]: 57,82 / 6,07 / 16,86; gefunden: 58,20 / 6,09 / 16,99.

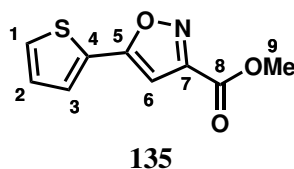
MP: 100 °C.

Methyl-(Z)-2-hydroxy-4-oxo-4-(thiophen-2-yl)but-2-enoat, **207**



Nach **7.5.3 A2**: Unter Verwendung von 1-(Thiophen-2-yl)ethan-1-on (4,28 mL, 39,63 mmol).

Methyl-5-(thiophen-2-yl)isoxazol-3-carboxylat, **135**



Nach **7.5.4**: Unter Verwendung von **207** (6450 mg, 30,39 mmol) und Reinigung mittels Säulenchromatographie (DCM/MeOH, 20:1), um **135** (4990 mg, 23,85 mmol) in 60% Ausbeute über zwei Stufen zu erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): $\delta_H = 7,89$ (dd, $^3J_{H,H} = 5,0$ Hz, $^4J_{H,H} = 1,3$ Hz, 1H, H-3), $7,83$ (dd, $^3J_{H,H} = 3,7$ Hz, $^4J_{H,H} = 1,2$ Hz, 1H, H-1), $7,32$ (s, 1H, H-6), $7,28$ (dd, $^3J_{H,H} = 5,2, 3,7$ Hz, 1H, H-2), $3,92$ (s, 3H, H-9) ppm.

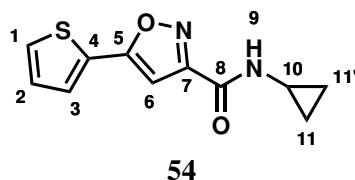
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆): $\delta_C = 166,4$ (C-8), $159,6$ (C-5), $156,6$ (C-7), $130,4$ (C-2), $129,0$ (C-3), $128,7$ (C-1), $127,2$ (C-4), $99,9$ (C-6), $52,8$ (C-9) ppm.

HRMS (ESI, *m/z*): [M+H]⁺ berechnet für [C₉H₈NO₃S]⁺: 210,0219; gefunden: 210,0222.

EA (C/H/N/S, %): Berechnet für [C₉H₇NO₃S]: 51,67 / 3,37 / 6,69 / 15,32; gefunden: 51,59 / 3,39 / 6,66 / 15,27.

MP: 97 °C.

N-Cyclopropyl-5-(thiophen-2-yl)isoxazol-3-carboxamid, **54**



Nach **7.5.5**: Unter Verwendung von **135** (2000 mg, 9,56 mmol) und Cyclopropylamin (1,33 mL), um **54** (1300 mg, 5,55 mmol) in 55% Ausbeute zu erhalten.

¹**H-NMR** (500 MHz, DMSO-d₆): $\delta_H = 8,83$ (d, $^3J_{H,H} = 4,4$ Hz, 1H, H-9), 7,86 (dd, $^3J_{H,H} = 5,0$ Hz, $^4J_{H,H} = 1,1$ Hz, 1H, H-3), 7,78 (dd, $^3J_{H,H} = 3,7$ Hz, $^4J_{H,H} = 1,0$ Hz, 1H, H-1), 7,26 (dd, $^3J_{H,H} = 5,0, 3,7$ Hz, 1H, H-2), 7,20 (s, 1H, H-6), 2,90 – 2,83 (m, 1H, H-10), 0,75 – 0,58 (m, H-11/11') ppm.

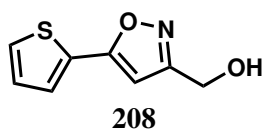
¹³**C-NMR** (125 MHz, DMSO-d₆): $\delta_C = 165,5$ (C-8), 159,5 (C-5), 159,3 (C-7), 130,0 (C-2), 128,7 (C-3), 128,6 (C-1), 127,5 (C-4), 99,0 (C-6), 22,7 (C-10), 5,6 (C-11/11') ppm.

HRMS (ESI, *m/z*): [M+Na]⁺ berechnet für [C₁₁H₁₀N₂O₂NaS]⁺: 257,0355; gefunden: 257,0356.

EA (C/H/N, %): Berechnet für [C₁₁H₁₀N₂O₂S]: 56,40 / 4,30 / 11,96; gefunden: 56,49 / 4,35 / 11,95.

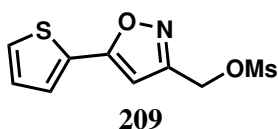
MP: 154 °C.

(5-(Thiophen-2-yl)isoxazol-3-yl)methanol, 208



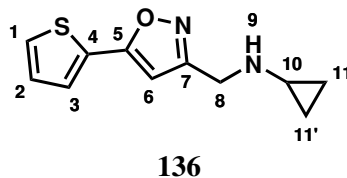
135 (512 mg, 2,45 mmol, 1,00 Äq.) wurde in MeOH (4,90 mL) gelöst, auf 0 °C gekühlt, anschließend NaBH₄ (370 mg, 9,79 mmol, 4,00 Äq.) portionsweise zugegeben, langsam auf Raumtemperatur aufgewärmt und über Nacht gerührt. Der Reaktionsansatz wurde durch Zugabe von H₂O gequenchet, mit HCl (1,00 M) angesäuert und mit DCM extrahiert. Die vereinigte organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, um **208** (438 mg, 2,42 mmol) in 99% Ausbeute zu erhalten.

(5-(Thiophen-2-yl)isoxazol-3-yl)methylmethansulfonat, 209



208 (430 mg, 2,37 mmol, 1,00 Äq.), Et₃N (0,69 mL, 4,98 mmol, 2,10 Äq.) und MsCl (0,24 mL, 3,08 mmol, 1,30 Äq.) wurden in DCM (12,00 mL) gelöst und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Nachfolgend wurde H₂O (100,0 mL) hinzugefügt, mit DCM extrahiert, die vereinigte organische Phase über MgSO₄ getrocknet sowie das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. **209** wurde umgehend für den nächsten Reaktionsschritt verwendet.

N-((5-(Thiophen-2-yl)isoxazol-3-yl)methyl)cyclopropanamin, 136



Nach **7.5.5**: Unter Verwendung von **209** (615 mg, 2,37 mmol), Cyclopropylamin (0,33 mL) sowie DCM (1,00 mL). Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie (DCM), um **136** (150 mg, 0,68 mmol) als gelben Feststoff in 29% Ausbeute über zwei Schritte zu erhalten.

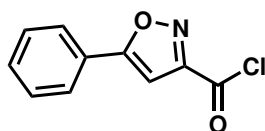
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): $\delta_H = 7,79$ (dd, $^3J_{H,H} = 4,9$ Hz, $^4J_{H,H} = 1,2$ Hz, 1H, H-3), $7,66$ (dd, $^3J_{H,H} = 3,7$ Hz, $^4J_{H,H} = 1,2$ Hz, 1H, H-1), $7,23$ (dd, $^3J_{H,H} = 4,9$ Hz, $3,7$ Hz, 1H, H-2), $6,80$ (s, 1H, H-6), $3,77$ (s, 2H, H-8), $2,85$ (br s, 1H, H-9), $2,09$ (sm, 1H, H-10), $0,38 - 0,24$ (m, 4H, H-11/11') ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆): $\delta_C = 164,3$ (C-5), $163,7$ (C-7), $129,0$ (C-4), $128,51$ (C-2), $128,49$ (C-3), $127,4$ (C-1), $99,3$ (C-6), $43,7$ (C-8), $29,7$ (C-10), $6,1$ (C-11/11') ppm.

HRMS (ESI, m/z): $[M+H]^+$ berechnet für $[C_{11}H_{13}N_2OS]^+$: 221,0743; gefunden: 221,0744.

EA (C/H/N/S, %): Berechnet für $[C_{11}H_{12}N_2OS]^*0,25H_2O$: 58.77 / 5.60 / 12.46 / 14.26; gefunden: 58.90 / 5.42 / 12.78 / 13.95.

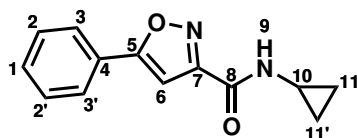
5-Phenylisoxazol-3-carbonylchlorid, **210**



210

Nach **7.5.1**: Unter Verwendung einer 0,18 M Lösung von 5-Phenylisoxazol-3-carbonsäure (132 mg, 0,70 mmol), sowie $SOCl_2$ (7,00 Äq.).

N-Cyclopropyl-5-phenylisoxazol-3-carboxamid, **131**



131

Nach **7.5.2**: Unter Verwendung einer 0,15 M Lösung von Cyclopropylamin, sowie **210** (145 mg, 0,70 mmol, 0,18 M). Die Reinigung erfolgte per Säulenchromatographie (DCM/MeOH, 20:1), um **131** (90 mg, 0,39 mmol) in 56% Ausbeute über zwei Stufen zu erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ_H = 8,68 (d, ³J_{H,H} = 7,3 Hz, 1H, H-9), 7,95 – 7,89 (m, 2H, H-3/3'), 7,60 – 7,48 (m, 3H, H-1 + H-2/2'), 7,33 (s, 1H, H-6), 4,29 – 4,17 (m, 1H, H-10), 1,97 – 1,45 (m, 4H, H-11/11') ppm.

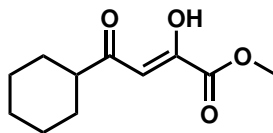
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆): δ_C = 170,1 (C-8), 159,9 (C-5), 158,2 (C-7), 130,8 (C-1), 129,4 (C-2), 126,4 (C-4), 125,8 (C-3), 99,9 (C-6), 22,8 (C-10), 5,7 (C-11/11') ppm.

MS (ESI, *m/z*): [M+NH₄]⁺ berechnet für [C₁₃H₁₆N₃O₂]⁺: 246,12; gefunden: 246,22.

EA (C/H/N, %): Berechnet für [C₁₃H₁₂N₂O₂]: 68,41 / 5,30 / 12,27; gefunden: 68,19 / 5,36 / 12,40.

MP: 139 °C.

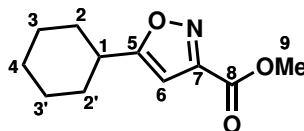
Methyl-(Z)-4-cyclohexyl-2-hydroxy-4-oxobut-2-enoat, **211**



211

Nach **7.5.3 B**: Unter Verwendung von 1-Cyclohexylethan-1-on (1893 mg, 15,00 mmol), um **211** (1715 mg, 8,07 mmol) in 54% Ausbeute zu erhalten.

Methyl-5-cyclohexylisoxazol-3-carboxylat, **212**



212

Nach **7.5.4**: Unter Verwendung von **211** (1715 mg, 8,07 mmol), um **212** (328 mg, 1,57 mmol) in 19% Ausbeute zu erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ_H = 6,65 (s, 1H, H-6), 3,88 (s, 3H, H-9), 2,89 (m, 1H, H-1), 2,00 – 1,20 (m, 10H, H-2/2' + H-3/3' + H-4) ppm.

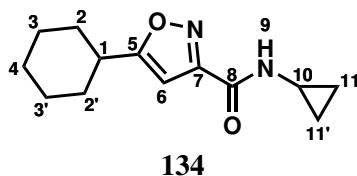
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆): δ_C = 179,5 (C-8), 160,0 (C-5), 155,6 (C-7), 100,1 (C-6), 52,6 (C-9), 35,4 (C-1), 30,3 (C-2/2'), 25,1 (C-4), 24,9 (C-3/3') ppm.

HRMS (ESI, *m/z*): [M+H]⁺ berechnet für [C₁₁H₁₆NO₃]: 210,1152; gefunden: 210,1128.

EA (C/H/N, %): Berechnet für [C₁₁H₁₅NO₃]⁺: 63,14 / 7,23 / 6,69; gefunden: 62,96 / 7,17 / 6,56.

MP: 71 °C.

5-Cyclohexyl-*N*-cyclopropylisoxazol-3-carboxamid, **134**



Nach **7.5.5**: Unter Verwendung von **212** und Cyclopropylamin (0,20 mL). Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie (cHex/EtOAc, 4:1), um **134** (60 mg, 0,26 mmol) in 18% Ausbeute zu erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ_H = 8,68 (d, ³J_{H,H} = 4,3 Hz, 1H, H-9), 6,50 (s, 1H, H-6), 2,88 – 2,80 (m, 2H, H-1 + H-10), 2,01 – 1,20 (m, 10H, H-2/2' + H-3/3' + H-4), 0,70 – 0,57 (m, 4H, H-11 + H-11') ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆): δ_C = 178,4 (C-8), 159,9 (C-5), 158,6 (C-7), 98,9 (C-6), 35,3 (C-1), 30,5 (C-2/2'), 25,2 (C-4), 24,9 (C-3/3'), 22,6 (C-10), 5,5 (C-11/11') ppm.

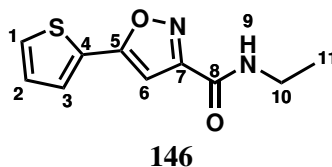
HRMS (ESI, m/z): $[M+Na]^+$ berechnet für $[C_{13}H_{18}N_2O_2Na]^+$: 257,1260; gefunden: 257,1264.

EA (C/H/N, %): Berechnet für $[C_{13}H_{18}N_2O_2]$: 66,64 / 7,74 / 11,96; gefunden: 66,62 / 7,69 / 11,93.

MP: 139 °C.

7.5.7 Serie 2: Amidvariationen

N-Ethyl-5-(thiophen-2-yl)isoxazol-3-carboxamid, **146**



Nach **7.5.5**: Unter Verwendung von **135** und Ethylamin (60% v/v, 0,17 mL), um **146** (127 mg, 0,57 mmol) als farblose Kristalle in 57% Ausbeute zu erhalten.

¹**H-NMR** (500 MHz, DMSO- d_6): δ_H = 8,77 (t, $^3J_{H,H}$ = 5,3 Hz, 1H, H-9), 7,86 (dd, $^3J_{H,H}$ = 5,1 Hz, $^4J_{H,H}$ = 1,3 Hz, 1H, H-1), 7,78 (dd, $^3J_{H,H}$ = 3,6 Hz, $^4J_{H,H}$ = 1,3 Hz, 1H, H-3), 7,26 (dd, $^3J_{H,H}$ = 4,9 Hz, 3,7 Hz, 1H, H-2), 7,16 (s, 1H, H-6), 3,29 (dq, $^3J_{H,H}$ = 7,2 Hz, 6,0 Hz, 2H, H-10, unter H₂O Signal), 1,12 (t, $^3J_{H,H}$ = 7,2 Hz, 3H, H-11) ppm.

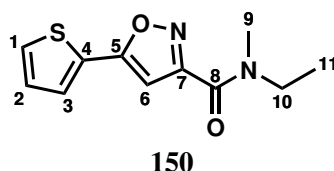
¹³**C-NMR** (125 MHz, DMSO- d_6): δ_C = 165,5 (C-8), 159,7 (C-5), 157,9 (C-7), 130,0 (C-2), 128,7 (C-3), 128,6 (C-1), 127,5 (C-4), 99,0 (C-6), 33,7 (C-10), 14,4 (C-11) ppm.

HRMS (ESI, m/z): $[M+Na]^+$ berechnet für $[C_{10}H_{10}N_2O_2NaS]^+$: 245,0355; gefunden: 245,0356.

EA (C/H/N, %): Berechnet für $[C_{10}H_{10}N_2O_2S]$: 54,04 / 4,54 / 12,60; gefunden: 53,95 / 4,51 / 12,58.

MP: 125 °C.

N-Ethyl-N-methyl-5-(thiophen-2-yl)isoxazol-3-carboxamid, **150**



146 (42 mg, 0,19 mmol) wurde in DMF (1,0 mL) gelöst, anschließend wurden NaH (60% w/w in Mineralöl, 10 mg, 0,40 mmol, 2,10 Äq.) und MeI (0,01 mL, 0,20 mmol, 1,05 Äq.) hinzugegeben. Es wurde für 1 h bei Raumtemperatur gerührt, gefolgt von einer Extraktion mit DCM gegen eine wässrige LiCl-Lösung (5% w/w). Die vereinigte organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, um **150** (42 mg, 0,18 mmol) als farblosen Feststoff in 94% Ausbeute zu erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ_H = 7,86 (dd, ³J_{H,H} = 5,0 Hz, ⁴J_{H,H} = 1,0 Hz, 1H, H-1), 7,77 (dt, ³J_{H,H} = 3,3 Hz, ⁴J_{H,H} = 1,2 Hz, 1H, H-3), 7,27 (dd, ³J_{H,H} = 5,0 Hz, 3,9 Hz, 1H, H-2), 7,09 + 7,08 (s, 3H, H-6), 3,50 + 3,44 (q, 2H, ³J_{H,H} = 7,2 + 7,1 Hz, H-10), 3,08 + 3,00 (s, 3H, H-9), 1,17 – 1,12 (m, 3H, H-11) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆): δ_C = 164,7 + 164,6 (C-8), 159,9 + 159,6 (C-5), 159,5 + 159,3 (C-7), 130,00 + 129,96 (C-2), 128,6 (C-3), 128,6 + 128,5 (C-1), 127,50 + 127,48 (C-4), 99,8 + 99,6 (C-6), 45,0 + 42,0 (C-10), 35,5 + 32,2 (C-9), 13,7 + 11,7 (C-11) ppm.

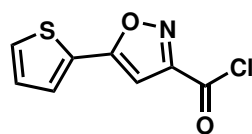
* = Rotamere

HRMS (ESI, *m/z*): [M+H]⁺ berechnet für [C₁₁H₁₃N₂O₂S]⁺: 237,0692; gefunden: 237,0693.

EA (C/H/N/S, %): Berechnet für [C₁₁H₁₂N₂O₂S]: 55,92 / 5,12 / 11,86 / 13,57; gefunden: 55,60 / 4,96 / 11,86 / 13,21.

MP: 82 °C.

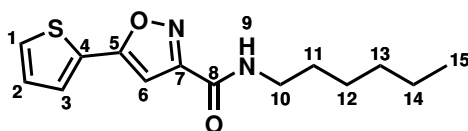
5-(Thiophen-2-yl)isoxazol-3-carbonylchlorid, **213**



213

Nach **7.5.1**: Unter Verwendung einer 0,19 M Lösung von 5-(Thiophen-2-yl)isoxazol-3-carbonsäure (146 mg, 0,75 mmol), sowie SOCl₂ (10,00 Äq.)

N-Hexyl-5-(thiophen-2-yl)isoxazol-3-carboxamid, **147**



147

Nach **7.5.2**: Unter Verwendung von **213** (160 mg, 0,75 mmol, 0,15 M) und einer 0,17 M Lösung von *n*-Hexylamin. Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie (*c*Hex/EtOAc, 6:1), um **147** (197 mg, 0,71 mmol) in 94% Ausbeute über zwei Stufen zu erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ_H = 8,75 (t, ³J_{H,H} = 5,6 Hz, 1H, H-9), 7,86 (d, ³J_{H,H} = 5,0 Hz, 1H, H-1), 7,78 (d, ³J_{H,H} = 3,7 Hz, 1H, H-3), 7,26 (dd, ³J_{H,H} = 4,7 Hz, 4,0 Hz, 1H, H-2), 7,16 (s, 1H, H-6), 3,24 (q, ³J_{H,H} = 6,7 Hz, 2H, H-10), 1,62 – 1,44 (m, 2H, H-11), 1,37 – 1,19 (m, 6H, H-12 + H-13 + H-14), 0,97 – 0,79 (m, 3H, H-15) ppm.

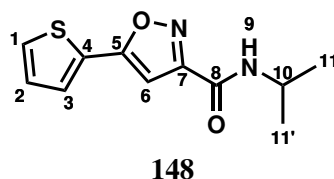
¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ_C = 166,6 (C-8), 159,4 (C-5), 158,7 (C-7), 128,8 (C-2), 128,6 (C-4), 128,3 (C-3), 127,8 (C-1), 99,0 (C-6), 39,7 (C-10), 31,6 (C-13), 29,5 (C-11), 26,7 (C-12), 22,7 (C-14), 14,2 (C-15) ppm.

MS (ESI, *m/z*): [M+NH₄]⁺ berechnet für [C₁₄H₂₂N₃O₂S]⁺: 296,14; gefunden: 296,25.

EA (C/H/N, %): Berechnet für $[C_{14}H_{18}N_2O_2S] \cdot 0,25H_2O$: 59,44 / 6,59 / 9,90; gefunden: 59,27 / 6,41 / 9,85.

MP: 92 °C.

N-Isopropyl-5-(thiophen-2-yl)isoxazole-3-carboxamid, 148



Nach **7.5.5**: Unter Verwendung von **135** und *i*-Propylamin (0,17 mL). Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie (*c*Hex/EtOAc, 6:1), um **148** (139 mg, 0,59 mmol) als farblose Kristalle in 59% Ausbeute zu erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta_H = 8,58$ (d, $^3J_{H,H} = 8,0$ Hz, 1H, H-9), 7,86 (dd, $^3J_{H,H} = 4,9$ Hz, $^4J_{H,H} = 1,2$ Hz, 1H, H-1), 7,78 (dd, $^3J_{H,H} = 3,6$ Hz, $^4J_{H,H} = 1,3$ Hz, 1H, H-3), 7,26 (dd, $^3J_{H,H} = 4,9$, 3,7 Hz, 1H, H-2), 7,16 (s, 1H, H-6), 4,10 (sm, 1H, H-10), 1,17 (d, $^3J_{H,H} = 6.6$ Hz, 6H, H-11/11') ppm.

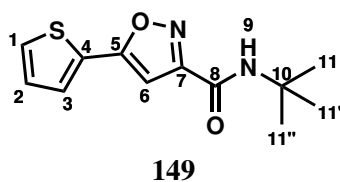
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta_C = 165,4$ (C-8), 159,8 (C-5), 157,3 (C-7), 129,9 (C-2), 128,7 (C-3), 128,5 (C-1), 127,6 (C-4), 99,1 + 99,0 (C-6), 41,0 (C-10), 21,9 (C-11/11') ppm.

HRMS (ESI, *m/z*): $[M+Na]^+$ berechnet für $[C_{11}H_{12}N_2O_2NaS]^+$: 259,0512; gefunden: 259,0509.

EA (C/H/N, %): Berechnet für $[C_{11}H_{12}N_2O_2S]$: 55,92 / 5,12 / 11,86; gefunden: 55,88 / 5,13 / 11,88.

MP: 112 °C.

N-(*tert*-Butyl)-5-(thiophen-2-yl)isoxazol-3-carboxamid, **149**



Nach **7.5.2**: Unter Verwendung von **213** (163 mg, 0,76 mmol, 0,10 M) und einer 0,17 M Lösung von *t*-Butylamin. Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie (*c*Hex/EtOAc, 6:1), um **149** (51 mg, 0,20 mmol) in 27% Ausbeute über zwei Stufen zu erhalten.

¹**H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta_H = 7,99$ (br s, 1H, H-9), 7,85 (dd, ³ $J_{H,H} = 5,2$ Hz, ⁴ $J_{H,H} = 1,2$ Hz, 1H, H-1), 7,76 (dd, ³ $J_{H,H} = 3,6$ Hz, ⁴ $J_{H,H} = 1,3$ Hz, 1H, H-3), 7,26 (dd, ³ $J_{H,H} = 5,2$ Hz, 3,7 Hz, 1H, H-2), 7,13 (s, 1H, H-6), 1,38 (s, 9H, H-11/11'/11'') ppm.

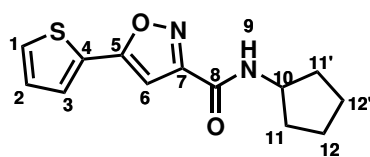
¹³**C-NMR** (125 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta_C = 165,3$ (C-8), 160,3 (C-5), 157,9 (C-7), 129,9 (C-2), 128,7 (C-3), 128,5 (C-1), 127,6 (C-4), 99,0 (C-6), 51,3 (C-10), 28,3 (C-11/11'/11'') ppm.

HRMS (ESI, *m/z*): [M+Na]⁺ berechnet für [C₁₂H₁₄N₂O₂NaS]⁺: 273,0668; gefunden: 273,0666.

EA (C/H/N, %): Berechnet für [C₁₂H₁₄N₂O₂S]: 57,58 / 5,64 / 11,19; gefunden: 57,59 / 5,64 / 11,21.

MP: 119 °C.

N-Cyclopentyl-5-(thiophen-2-yl)isoxazol-3-carboxamid, 151



151

Nach **7.5.2**: Unter Verwendung von **213** (146 mg, 0,69 mmol), Cyclopentylamin (0,08 mL, 1,20 mmol, 1,75 Äq.) und Et₃N (2,48 Äq.). Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie (cHex/EtOAc, 9:1), um **151** (131 mg, 0,50 mmol) in 73% Ausbeute über zwei Stufen zu erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): $\delta_H = 8,68$ (d, $^3J_{H,H} = 7,6$ Hz, 1H, H-9), 7,86 (dd, $^3J_{H,H} = 5,0$ Hz, $^4J_{H,H} = 1,1$ Hz, 1H, H-1), 7,77 (dd, $^3J_{H,H} = 3,7$ Hz, $^4J_{H,H} = 1,1$ Hz, 1H, H-3), 7,26 (dd, $^3J_{H,H} = 5,0$ Hz, 3,7 Hz, 1H, H-2), 7,16 (s, 1H, H-6), 4,28 – 4,15 (m, 1H, H-10), 1,96 – 1,44 (m, 8H, H-11/11' + H-12/12') ppm.

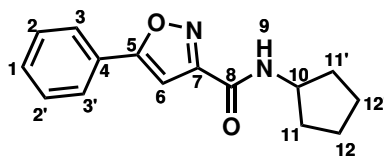
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆): $\delta_C = 165,4$ (C-8), 159,7 (C-5), 157,8 (C-7), 129,9 (C-2), 128,7 (C-3), 128,5 (C-1), 127,6 (C-4), 99,1 (C-6), 50,7 (C-10), 31,8 (C-11/11'), 23,5 (C-12/12') ppm.

HRMS (ESI, *m/z*): [M+Na]⁺ berechnet für [C₁₃H₁₄N₂O₂NaS]⁺: 285,0668; gefunden: 285,0670.

EA (C/H/N, %): Berechnet für [C₁₃H₁₄N₂O₂S]: 59,52 / 5,38 / 10,68; gefunden: 59,33 / 5,39 / 10,61.

MP: 148 °C.

N-Cyclopentyl-5-phenylisoxazol-3-carboxamid, 153



153

Nach **7.5.2**: Unter Verwendung von **210** (270 mg, 1,30 mmol, 0,16 M) und einer 0,20 M Lösung von Cyclopentylamin. Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie (cHex/EtOAc, 9:1), um **153** (237 mg, 0,92 mmol) in 71% Ausbeute über zwei Stufen zu erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): $\delta_H = 8,68$ (d, $^3J_{H,H} = 7,3$ Hz, 1H, H-9), 7,95 – 7,89 (m, 2H, H-3/3'), 7,60 – 7,48 (m, 3H, H-1 + H-2/2'), 7,33 (s, 1H, H-6), 4,23 (sm, 1H, H-10), 1,97 – 1,45 (m, 8H, H-11/11' + H-12/12') ppm.

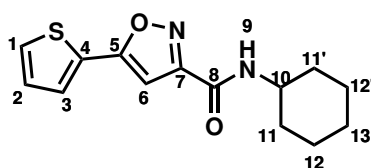
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆): $\delta_C = 170,1$ (C-8), 159,9 (C-5), 158,2 (C-7), 130,8 (C-1), 129,4 (C-2/2'), 126,4 (C-4), 125,8 (C-3/3'), 99,9 (C-6), 50,7 (C-10), 31,9 (C-11/11'), 23,6 (C-12/12') ppm.

HRMS (ESI, *m/z*): [M+Na]⁺ berechnet für [C₁₅H₁₆N₂O₂Na]⁺: 279,1104; gefunden: 279,1106.

EA (C/H/N, %): Berechnet für [C₁₅H₁₆N₂O₂]: 70,29 / 6,29 / 10,93; gefunden: 70,20 / 6,30 / 10,89.

MP: 139 °C.

N-Cyclohexyl-5-(thiophen-2-yl)isoxazol-3-carboxamid, 152



Nach **7.5.5**: Unter Verwendung von **135** und Cyclohexylamin (0,23 mL), um **152** (188 mg, 0,68 mmol) als farblose Kristalle in 68% Ausbeute zu erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta_H = 8,56$ (d, $^3J_{H,H} = 8,0$ Hz, 1H, H-9), 7,86 (dd, $^3J_{H,H} = 4,9$ Hz, $^4J_{H,H} = 1,2$ Hz, 1H, H-1), 7,78 (dd, $^3J_{H,H} = 3,7$ Hz, $^4J_{H,H} = 1,2$ Hz, 1H, H-3), 7,23 (dd, $^3J_{H,H} = 4,9$ Hz, 3,7 Hz, 1H, H-2), 7,16 (s, 1H, H-6), 3,80 – 3,71 (m, 1H, H-10), 1,86 – 1,06 (m, 10H, H-11/11' + H-12/12' + H-13) ppm.

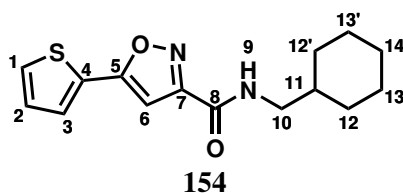
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta_C = 165,4$ (C-8), 159,8 (C-5), 157,3 (C-7), 129,9 (C-2), 128,6 (C-3), 128,5 (C-1), 127,6 (C-4), 99,1 (C-6), 48,2 (C-10), 31,9 (C-11/11'), 25,0 (C-13), 24,7 (C-12/12') ppm.

HRMS (ESI, *m/z*): [M+Na]⁺ berechnet für [C₁₄H₁₆N₂O₂NaS]⁺: 299,0825; gefunden: 299,0826.

EA (C/H/N/S, %): Berechnet für [C₁₄H₁₆N₂O₂S]: 60,85 / 5,84 / 10,14 / 11,60; gefunden: 60,46 / 5,78 / 10,04 / 11,30.

MP: 180 °C.

N-(Cyclohexylmethyl)-5-(thiophen-2-yl)isoxazol-3-carboxamid, 154



Nach **7.5.5**: Unter Verwendung von **135** und Cyclohexylmethanamin (0,26 mL), um **154** (188 mg, 0,75 mmol) als farblose Kristalle in 75% Ausbeute zu erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): $\delta_H = 8,56$ (t, ³J_{H,H} = 5,9 Hz, 1H, H-9), 7,86 (dd, ³J_{H,H} = 4,9 Hz, ⁴J_{H,H} = 1,2 Hz, 1H, H-1), 7,78 (dd, ³J_{H,H} = 3,7 Hz, ⁴J_{H,H} = 1,2 Hz, 1H, H-3), 7,26 (dd, ³J_{H,H} = 4,9, 3,7 Hz, 1H, H-2), 7,16 (s, 1H, H-6), 3,10 (dd, ³J_{H,H} = 6,6 Hz, 6,6 Hz, 2H, H-10), 1,76 – 0,84 (m, 11H, H-11 + H-12/12' + H-13/13' + H-14) ppm.

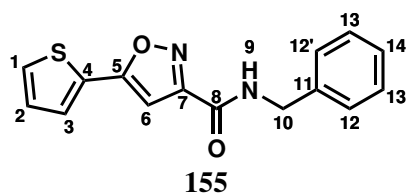
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆): $\delta_C = 165,5$ (C-8), 159,7 (C-5), 158,2 (C-7), 129,9 (C-2), 128,6 (C-3), 128,5 (C-1), 127,6 (C-4), 99,0 (C-6), 45,0 (C-10), 37,2 (C-11), 30,3 (C-12/12'), 26,0 (C-14), 25,3 (C-13/13') ppm.

HRMS (ESI, *m/z*): [M+Na]⁺ berechnet für [C₁₅H₁₈N₂O₂NaS]⁺: 313,0981; gefunden: 313,0983.

EA (C/H/N, %): Berechnet für [C₁₅H₁₈N₂O₂S]: 62,04 / 6,25 / 9,65; gefunden: 62,11 / 6,50 / 9,50.

MP: 156 °C.

N-Benzyl-5-(thiophen-2-yl)isoxazole-3-carboxamid, 155



Nach **7.5.2**: Unter Verwendung von **213** (106 mg, 0,75 mmol, 0,13 M) und einer 0,18 M Lösung von Benzylamin. Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie (cHex/EtOAc, 4:1), um **155** (70 mg, 0,25 mmol) in 94% Ausbeute über zwei Stufen zu erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): $\delta_H = 9,35$ (t, $^3J_{H,H} = 6,1$ Hz, 1H, H-9), 7,87 (dd, $^3J_{H,H} = 5,0$ Hz, $^4J_{H,H} = 1,1$ Hz, 1H, H-1), 7,79 (dd, $^3J_{H,H} = 3,6$ Hz, $^4J_{H,H} = 1,1$ Hz, 1H, H-3), 7,38 - 7,34 (m, $^3J_{H,H} = 4,6$ Hz, 4H, H-12/12' + H-13/13'), 7,30 - 7,23 (m, 2H, H-2 + H-14), 7,20 (s, 1H, H-6), 4,47 (d, $^3J_{H,H} = 6,2$ Hz, 2H, H-10) ppm.

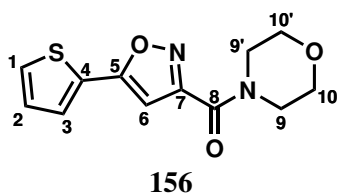
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆): $\delta_C = 166,3$ (C-8), 160,1 (C-5), 158,8 (C-7), 139,4 (C-11), 130,7 (C-4), 129,3 (C-2), 129,3 (C-3), 128,9 (C-13/13'), 128,1 (C-1), 127,9 (C-12/12'), 127,5 (C-14), 99,7 (C-6), 42,9 (C-10) ppm.

MS (ESI, *m/z*): [M+NH₄]⁺ berechnet für [C₁₅H₁₆N₃O₂S]⁺: 302,10; gefunden: 302,19.

EA (C/H/N, %): Berechnet für [C₁₅H₁₂N₂O₂S]*0,5H₂O: 61,42 / 4,47 / 9,55; gefunden: 61,56 / 4,24 / 9,52.

MP: 135 °C.

Morpholino(5-(thiophen-2-yl)isoxazol-3-yl)methanon, **156**



Nach **7.5.2**: Unter Verwendung von **213** (200 mg, 1,02 mmol, 0,10 M) und einer 0,06 M Lösung von Morpholin. Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie (*c*Hex/*Et*OAc, 6:1) und Umkristallisierung aus *c*Hex, um **156** (60 mg, 0,23 mmol) in 22% Ausbeute über zwei Stufen zu erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta_H = 7,87$ (dd, $^3J_{H,H} = 4,9$ Hz, $^4J_{H,H} = 1,2$ Hz, 1H, H-1), $7,78$ (dd, $^3J_{H,H} = 3,7$ Hz, $^4J_{H,H} = 1,2$ Hz, 1H, H-3), $7,27$ (dd, $^3J_{H,H} = 5,0$ Hz, 3,6 Hz, 1H, H-2), $7,11$ (s, 1H, H-6), $3,69 - 3,58$ (m, 8H, H-9/9' + H-10/10') ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta_C = 164,9$ (C-8), $158,81$ (C-5), $158,78$ (C-7), $130,1$ (C-2), $128,7$ (C-3 + C-1), $127,4$ (C-4), $100,0$ (C-6), $66,3 + 65,8$ (C-10/10'), $47,0 + 42,2$ (C-9/9') ppm.

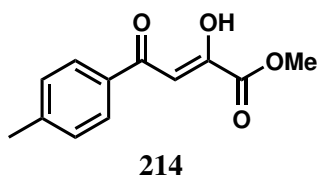
HRMS (ESI, *m/z*): $[M+Na]^+$ berechnet für $[C_{12}H_{12}N_2O_3NaS]^+$: 287,0461; gefunden: 287,0459.

EA (C/H/N/S, %): Berechnet für $[C_{12}H_{12}N_2O_3S]$: 54,53 / 4,58 / 10,60; gefunden: 54,51 / 4,65 / 10,61.

MP: 127 °C.

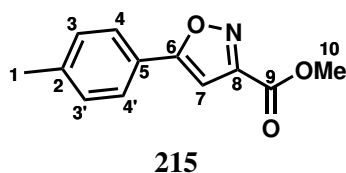
7.5.8 Serie 3: Arylvariationen

Methyl-(Z)-2-hydroxy-4-oxo-4-(p-tolyl)but-2-enoat, 214



Nach **7.5.3 B**: Unter Verwendung von 1-(p-Tolyl)ethan-1-on (1342 mg, 10,00 mmol), um **214** (757 mg, 3,43 mmol) in 34% Ausbeute zu erhalten.

Methyl-5-(p-tolyl)isoxazol-3-carboxylat, 215



Nach **7.5.4**: Unter Verwendung von **214** (746 mg, 3,39 mmol), um **215** (494 mg, 2,27 mmol) in 67% Ausbeute zu erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): $\delta_H = 7,84$ (d, $^3J_{H,H} = 8,3$ Hz, 2H, H-4/4'), 7,41 (s, 1H, H-7), 7,36 (d, $^3J_{H,H} = 8,0$ Hz, 2H, H-3/3'), 3,92 (s, 3H, H-10), 2,37 (s, 3H, H-1) ppm.

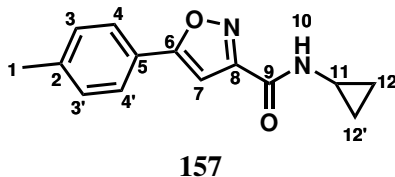
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆): $\delta_C = 171,3$ (C-9), 159,8 (C-6), 156,6 (C-8), 141,0 (C-2), 129,8 (C-3/3'), 125,7 (C-4/4'), 123,4 (C-5), 100,1 (C-7), 52,8 (C-10), 21,0 (C-1) ppm.

HRMS (ESI, m/z): $[M+Na]^+$ berechnet für $[C_{12}H_{11}NO_3Na]^+$: 240,0631; gefunden: 240,0632.

EA (C/H/N, %): Berechnet für $[C_{12}H_{11}NO_3]$: 66,35 / 5,10 / 6,45; gefunden: 66,28 / 5,14 / 6,36.

MP: 117 °C.

N-Cyclopropyl-5-(*p*-tolyl)isoxazol-3-carboxamid, **157**



Nach **7.5.5**: Unter Verwendung von **215** und Cyclopropylamin (0,14 mL), um **157** (125 mg, 0,52 mmol) in 52% Ausbeute zu erhalten.

¹**H-NMR** (500 MHz, DMSO-d₆): $\delta_H = 8,80$ (d, $^3J_{H,H} = 4,3$ Hz, 1H, H-10), 7,80 (d, $^3J_{H,H} = 8,3$ Hz, 2H, H-4/4'), 7,36 (d, $^3J_{H,H} = 8,0$ Hz, 2H, H-3/3'), 7,24 (s, 1H, H-7), 2,90 – 2,83 (m, 1H, H-11), 2,37 (s, 3H, H-1), 0,73 – 0,62 (m, 4H, H-12/12') ppm.

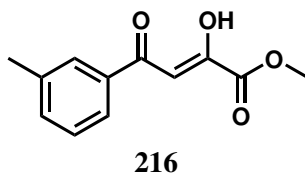
¹³**C-NMR** (125 MHz, DMSO-d₆): $\delta_C = 170,3$ (C-9), 159,7 (C-6), 159,5 (C-8), 140,7 (C-2), 129,8 (C-3/3'), 125,7 (C-4/4'), 123,6 (C-5), 99,1 (C-7), 22,7 (C-11), 21,0 (C-1), 5,6 (C-12/12') ppm.

HRMS (ESI, *m/z*): [M+Na]⁺ berechnet für [C₁₄H₁₄N₂O₂Na]⁺: 265,0947; gefunden: 265,0948.

Reinheit (qNMR, 500 MHz, DMSO-d₆, Maleinsäure): 97%.

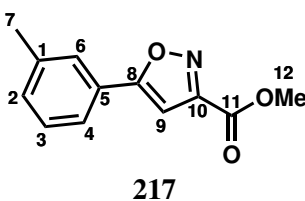
MP: 164 °C.

Methyl-(Z)-2-hydroxy-4-oxo-4-(*m*-tolyl)but-2-enoat, **216**



Nach **7.5.3 A**: Unter Verwendung von 1-(*m*-Tolyl)ethan-1-on (2012 mg, 15,00 mmol), um **216** (1120 mg, 5,09 mmol) in 34% Ausbeute zu erhalten.

Methyl-5-(*m*-tolyl)isoxazol-3-carboxylat, **217**



Nach **7.5.4**: Unter Verwendung von **216** (1120 mg, 5,09 mmol), um **217** (746 mg, 3,34 mmol) in 67% Ausbeute zu erhalten.

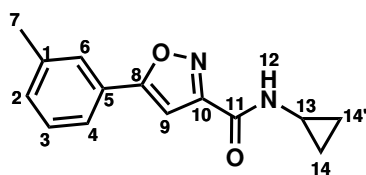
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta_H = 7,79$ (s, 1H, H-6), 7,74 (d, $^3J_{H,H} = 7,7$ Hz, 1H, H-4), 7,45 (s, 1H, H-9), 7,44 (d, $^3J_{H,H} = 7,7$ Hz, 7,7 Hz, 1H, H-3), 7,36 (d, $^3J_{H,H} = 7,7$ Hz, 7,7 Hz, 1H, H-2), 3,93 (s, 3H, H-12), 2,39 (s, 3H, H-7) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta_C = 171,2$ (C-11), 159,8 (C-8), 156,6 (C-10), 138,7 (C-1), 131,6 (C-6), 129,1 (C-2), 126,1 (C-3), 125,9 (C-5), 122,9 (C-4), 100,6 (C-9), 52,7 (C-12), 20,8 (C-7) ppm.

HRMS (ESI, *m/z*): [M+Na]⁺ berechnet für [C₁₂H₁₁NO₃Na]⁺: 240,0631; gefunden: 240,0634.

MP: 118 °C.

N-Cyclopropyl-5-(*m*-tolyl)isoxazol-3-carboxamid, **161**



161

Nach **7.5.5**: Unter Verwendung von **217** und Cyclopropylamin (0,20 mL). Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie (cHex/EtOAc, 4:1), um **161** (66 mg, 0,27 mmol) in 18% Ausbeute zu erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): $\delta_H = 8,80$ (d, ³J_{H,H} = 4,3 Hz, 1H, H-12), 7,77 - 7,72 (m, 1H, H-6), 7,72 - 7,68 (m, 1H, H-4), 7,43 (t, ³J_{H,H} = 7,7 Hz, 1H, H-3), 7,36 - 7,32 (m, 1H, H-2), 7,24 (s, 1H, H-9), 2,90 - 2,83 (m, 1H, H-13), 2,37 (s, 3H, H-7), 0,73 - 0,62 (m, 4H, H-14/14') ppm.

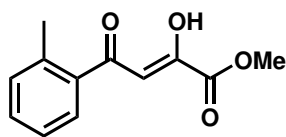
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆): $\delta_C = 170,3$ (C-8), 159,6 (C-11), 159,5 (C-10), 138,7 (C-1), 131,4 (C-6), 129,1 (C-5), 126,2 (C-3), 126,1 (C-2), 122,9 (C-4), 99,6 (C-9), 22,7 (C-13), 20,8 (C-7), 5,5 (C-14/14') ppm.

HRMS (ESI, *m/z*): [M+Na]⁺ berechnet für [C₁₄H₁₄N₂O₂Na]⁺: 265,0947; gefunden: 265,0951.

EA (C/H/N, %): Berechnet für [C₁₄H₁₄N₂O₂]: 69,41 / 5,82 / 11,56; gefunden: 69,14 / 5,82 / 11,52.

MP: 107 °C.

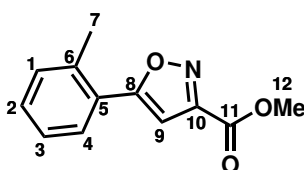
Methyl-(Z)-2-hydroxy-4-oxo-4-(*o*-tolyl)but-2-enoat, **218**



218

Nach **7.5.3 A**: Unter Verwendung von 1-(*o*-Tolyl)ethan-1-on (2013 mg, 15,00 mmol), um **216** (1122 mg, 5,10 mmol) in 34% Ausbeute zu erhalten.

Methyl-5-(*o*-tolyl)isoxazol-3-carboxylat, **219**



219

Nach **7.5.4**: Unter Verwendung von **218** (1122 mg, 5,10 mmol), um **219** (737 mg, 3,39 mmol) in 66% Ausbeute zu erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta_H = 7,77$ (dd, $^3J_{H,H} = 7,7$ Hz, $^4J_{H,H} = 1,4$ Hz, 1H, H-4), 7,49 - 7,34 (m, 3H, H-1 + H-2 + H-3), 7,21 (s, 1H, H-9), 3,94 (s, 3H, H-12), 2,48 (s, 3H, H-7) ppm.

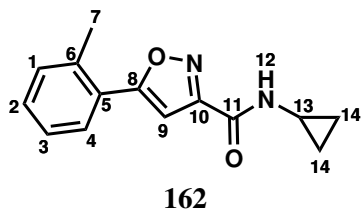
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta_C = 171,1$ (C-11), 159,8 (C-8), 156,2 (C-10), 136,1 (C-6), 131,4 (C-1), 130,7 (C-4), 128,4 (C-2), 126,4 (C-3), 125,6 (C-5), 103,3 (C-9), 52,8 (C-12), 20,7 (C-7) ppm.

HRMS (ESI, *m/z*): [M+Na]⁺ berechnet für [C₁₂H₁₁NO₃Na]⁺: 240,0631; gefunden: 240,0633.

EA (C/H/N, %): Berechnet für [C₁₂H₁₁NO₃]: 66,35 / 5,10 / 6,45; gefunden: 66,28 / 5,14 / 6,41.

MP: 51 °C.

N-Cyclopropyl-5-(*o*-tolyl)isoxazol-3-carboxamid, **162**



Nach **7.5.5**: Unter Verwendung von **219** und Cyclopropylamin (0,22 mL). Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie (cHex/EtOAc, 4:1), um **162** (96 mg, 0,40 mmol) in 25% Ausbeute zu erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ_H = 8,83 (d, ³J_{H,H} = 4,3 Hz, 1H, H-12), 7,72 (dd, ³J_{H,H} = 7,6 Hz, ⁴J_{H,H} = 1,3 Hz, 1H, H-4), 7,45 - 7,35 (m, 3H, H-1 + H-2 + H-3), 7,07 (s, 1H, H-9), 2,87 (sm, 1H, H-13), 2,47 (s, 3H, H-7), 0,73 - 0,61 (m, 4H, H-14/14') ppm.

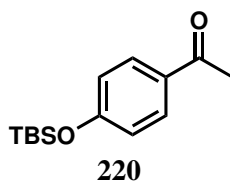
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆): δ_C = 170,1 (C-11), 159,6 (C-8), 159,1 (C-10), 135,8 (C-6), 131,8 (C-1), 130,2 (C-2), 128,0 (C-4), 126,4 (C-3), 125,9 (C-5), 102,3 (C-9), 22,7 (C-13), 20,8 (C-7), 5,6 (C-14/14') ppm.

HRMS (ESI, *m/z*): [M+Na]⁺ berechnet für [C₁₄H₁₄N₂O₂Na]⁺: 265,0947; gefunden: 265,0949.

EA (C/H/N, %): Berechnet für [C₁₄H₁₄N₂O₂]: 69,41 / 5,82 / 11,56; gefunden: 69,22 / 5,84 / 11,49.

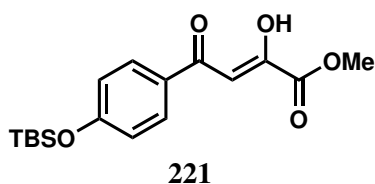
MP: 105 °C.

1-(4-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)phenyl)ethan-1-on, **220**



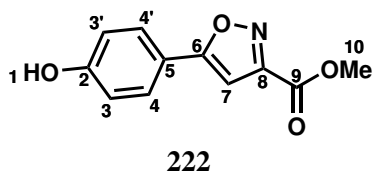
1-(4-Hydroxyphenyl)ethan-1-on (1362 mg, 10,00 mmol, 1,00 Äq.), Imidazol (1021 mg, 15,00 mmol, 1,50 Äq.) und TBSCl (1959 mg, 13,00 mmol, 1,30 Äq.) wurden in DMF (17,00 mL) gelöst, über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurde der Reaktionsansatz mit *c*Hex/Et₂O (1:1, 100 mL) verdünnt. Die organische Phase wurde mit H₂O (3x) und einer gesättigten, wässrigen NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, um **220** (2410 mg, 9,62 mmol) als farblosen Feststoff in 96% Ausbeute zu erhalten.¹⁰⁶

Methyl-(*Z*)-4-(4-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)phenyl)-2-hydroxy-4-oxobut-2-enoat, **221**



Nach **7.5.3 A2**: Unter Verwendung von **220** (2300 mg, 9,18 mmol), um **221** (1362 mg, 4,05 mmol) in 44% Ausbeute zu erhalten.

Methyl-5-(4-hydroxyphenyl)isoxazol-3-carboxylat, **222**



Nach **7.5.4**: Unter Verwendung von **221** (1362 mg, 4,05 mmol), um **222** (463 mg, 2,11 mmol) als lila Feststoff in 52% Ausbeute zu erhalten (Rohprodukt). Die Reinigung für die Analytik erfolgte mittels Säulenchromatographie (DCM/MeOH, 20:1), um ein beiges Rohprodukt (!) zu erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): $\delta_H = 10,15$ (s, 1H, H-1), 7,77 (d, $^3J_{H,H} = 8,9$ Hz, 2H, H-4/4'), 7,23 (s, 1H, H-7), 6,91 (d, $^3J_{H,H} = 8,9$ Hz, 2H, H-3/3'), 3,91 (s, 3H, H-10) ppm.

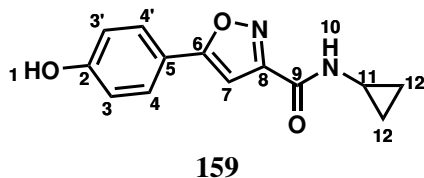
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆): $\delta_C = 171,6$ (C-9), 159,98 (C-6), 159,95 (C-2), 156,4 (C-8), 127,7 (C-4/4'), 116,0 (C-3/3'), 98,5 (C-7), 52,7 (C-10) ppm.

HRMS (ESI, *m/z*): [M+Na]⁺ berechnet für [C₁₁H₉NO₄Na]⁺: 242,0424; gefunden: 242,0426.

EA (C/H/N/S, %): Nicht bestimmt.

MP: Nicht bestimmt.

N-Cyclopropyl-5-(4-hydroxyphenyl)isoxazole-3-carboxamid, **159**



Nach **7.5.5**: Unter Verwendung von **222** und Cyclopropylamin (0,14 mL), um **159** (122 mg, 0,50 mmol) in 50% Ausbeute zu erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): $\delta_H = 10,09$ (s, 1H, H-1), 8,76 (d, $^3J_{H,H} = 4,3$ Hz, 1H, H-10), 7,73 (d, $^3J_{H,H} = 8,9$ Hz, 2H, H-4/4'), 7,06 (s, 1H, H-7), 6,90 (d, $^3J_{H,H} = 8,9$ Hz, 2H, H-3/3'), 2,86 (sm, 1H, H-11), 0,74 – 0,58 (m, 4H, H-12/12') ppm.

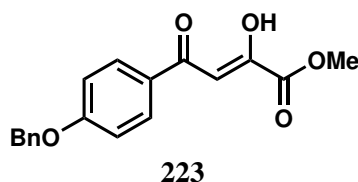
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆): $\delta_C = 170,6$ (C-9), 159,8 (C-2), 159,7 (C-6), 159,4 (C-8), 127,6 (C-4/4'), 117,5 (C-5), 116,0 (C-3/3'), 97,5 (C-7), 22,7 (C-11), 5,6 (C-12/12') ppm.

HRMS (ESI, m/z): $[M+Na]^+$ berechnet für $[C_{13}H_{12}N_2O_3Na]^+$: 267,0740; gefunden: 267,0740.

EA (C/H/N, %): Berechnet für $[C_{13}H_{12}N_2O_3]$: 63,93 / 4,95 / 11,47; gefunden: 63,89 / 4,98 / 11,42.

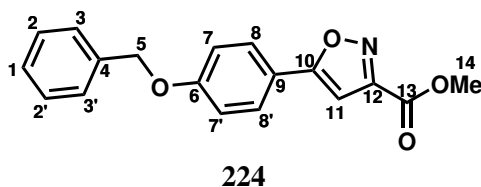
MP: 191 °C.

Methyl-(Z)-4-(4-(benzyloxy)phenyl)-2-hydroxy-4-oxobut-2-enoat, **223**



Nach **7.5.3 B**: Unter Verwendung von 1-(4-(benzyloxy)phenyl)ethan-1-on (905 mg, 4,00 mmol), um **223** (433 mg, 1,39 mmol) in 35% Ausbeute zu erhalten.

Methyl-5-(4-(benzyloxy)phenyl)isoxazol-3-carboxylat, **224**



Nach **7.5.4**: Unter Verwendung von **223** (433 mg, 1,39 mmol), um **224** (238 mg, 0,77 mmol) in 55% Ausbeute zu erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): $\delta_H = 7,89$ (d, $^3J_{H,H} = 8,9$ Hz, 2H, H-8/8'), 7,50 – 7,31 (m, 6H, H-1 + H-2/2' + H-7/7' + H-11), 7,18 (d, $^3J_{H,H} = 8,9$ Hz, 2H, H-3/3'), 5,20 (s, 2H, H-5), 3,92 (s, 3H, H-14) ppm.

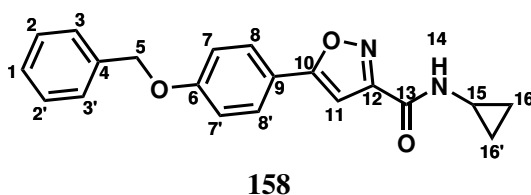
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆): δ_C = 171,1 (C-13), 160,3 (C-10), 159,9 (C-6), 156,5 (C-12), 136,5 (C-4), 128,4 (C-2/2'), 127,9 (C-1), 127,7 (C-8/8'), 127,6 (C-3/3'), 118,9 (C-9), 115,6 (C-7/7'), 99,3 (C-11), 69,4 (C-5), 52,7 (C-14) ppm.

HRMS (ESI, m/z): [M+H]⁺ berechnet für [C₁₈H₁₆NO₄]⁺: 310,1074; gefunden: 310,1079.

EA (C/H/N, %): Berechnet für [C₁₈H₁₅NO₄]: 69,89 / 4,89 / 4,53; gefunden: 69,92 / 4,89 / 4,42.

MP: 139 °C.

5-(4-(Benzyloxy)phenyl)-N-cyclopropylisoxazol-3-carboxamid, 158



Nach 7.5.5: Unter Verwendung von **224** und Cyclopropylamin (0,07 mL) und einer Reaktionszeit von 4 h. Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie (DCM), um **158** (253 mg, 0,76 mmol) in 77% Ausbeute zu erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ_H = 8,78 (d, ³J_{H,H} = 4,6 Hz, 1H, H-14), 7,85 (d, ³J_{H,H} = 8,9 Hz, 2H, H-8/8'), 7,49 – 7,31 (m, 5H, H-1 + H-2/2' + H-7/7'), 7,19 – 7,15 (m, 3H, H-3/3' + H-11), 5,20 (s, 2H, H-5), 2,89 – 2,84 (m, 1H, H-15), 0,74 – 0,61 (m, 4H, H-16/16') ppm.

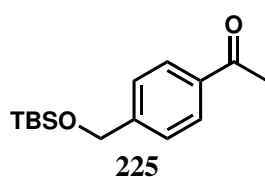
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆): δ_C = 170,2 (C-13), 160,2 (C-10), 159,7 (C-6), 159,5 (C-12), 136,6 (C-4), 128,4 (C-2/2'), 127,9 (C-1), 127,7 (C-8/8'), 127,5 (C-3/3'), 119,2 (C-9), 115,5 (C-7/7'), 98,3 (C-11), 69,4 (C-5), 22,7 (C-15), 5,6 (C-16/16') ppm.

HRMS (ESI, m/z): $[M+Na]^+$ berechnet für $[C_{20}H_{18}N_2O_3Na]^+$: 357,1210; gefunden: 357,1209.

EA (C/H/N, %): Berechnet für $[C_{20}H_{18}N_2O_3]$: 71,84 / 5,43 / 8,38; gefunden: 71,58 / 5,44 / 8,32.

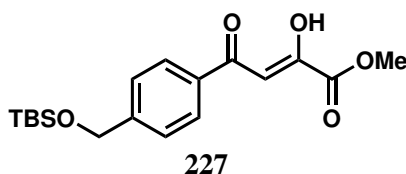
MP: 180 °C.

1-(4-(((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)methyl)phenyl)ethan-1-on, **225**



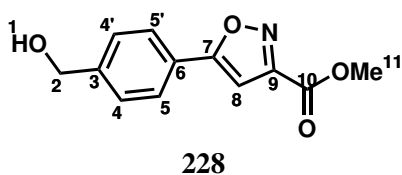
1-(4-(Hydroxymethyl)phenyl)ethan-1-on (6758 mg, 45,00 mmol, 1,00 Äq.), Et_3N (9,40 mL, 67,50 mmol, 1,50 Äq.), DMAP (katalytisch) und TBSCl (8817 mg, 58,50 mmol, 1,30 Äq.) wurden in DCM (90,00 mL) gelöst und bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in *c*Hex aufgenommen und bei Raumtemperatur 3 h gerührt und anschließend abfiltriert. Die Lösung wurde mit H_2O und einer gesättigten, wässrigen NaCl-Lösung gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgte mittels Kugelrohrdestillation, um **226** (11,71 g, 44,28 mmol) als hellgelbes Öl in 98% Ausbeute zu erhalten.

Methyl-(*Z*)-4-(4-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)phenyl)-2-hydroxy-4-oxobut-2-enoat, **227**



Nach **7.5.3 A2**: Unter Verwendung von **225** (2300 mg, 8,69 mmol), um **227** (1613 mg, 4,60 mmol) in 53% Ausbeute zu erhalten.

Methyl-5-(4-hydroxyphenyl)isoxazol-3-carboxylat, 228



Nach **7.5.4**: Unter Verwendung von **227** (1613 mg, 4,60 mmol), um **228** (414 mg, 1,60 mmol) in 39% Ausbeute zu erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta_H = 7,91$ (d, $^3J_{H,H} = 8,6$ Hz, 2H, H-5/5'), 7,49 (d, $^3J_{H,H} = 8,6$ Hz, 2H, H-4/4'), 7,45 (s, 1H, H-8), 5,33 (t, $^3J_{H,H} = 5,7$ Hz, 1H, H-1), 4,57 (d, $^3J_{H,H} = 5,7$ Hz, 2H, H-2), 3,93 (s, 3H, H-11) ppm.

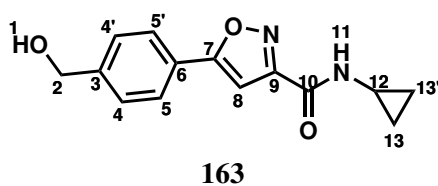
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta_C = 171,2$ (C-10), 159,8 (C-7), 156,6 (C-9), 145,8 (C-3), 127,0 (C-5/5'), 125,6 (C-4/4'), 124,4 (C-6), 100,3 (C-8), 62,4 (C-2), 52,8 (C-11) ppm.

HRMS (ESI, *m/z*): [M+Na]⁺ berechnet für [C₁₂H₁₁NO₄Na]⁺: 256,0580; gefunden: 256,0584.

EA (C/H/N, %): Berechnet für [C₁₂H₁₁NO₄]: 61,80 / 4,75 / 6,01; gefunden: 61,31 / 4,76 / 5,85.

MP: 131 °C.

N-Cyclopropyl-5-(4-(hydroxymethyl)phenyl)isoxazol-3-carboxamid, 163



Nach **7.5.5**: Unter Verwendung von **228** und Cyclopropylamin (0,14 mL), um **163** (147 mg, 0,60 mmol) in 60% Ausbeute zu erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta_H = 8.79$ (d, $^3J_{H,H} = 4,2$ Hz, 1H, H-11), 7,88 (d, $^3J_{H,H} = 8,3$ Hz, 2H, H-5/5'), 7,48 (d, $^3J_{H,H} = 8,3$ Hz, 2H, H-4/4'), 7,28 (s, 1H, H-8), 5,34 (t, $^3J_{H,H} = 5,9$ Hz, 1H, H-1), 4,57 (d, $^3J_{H,H} = 5,7$ Hz, 2H, H-2), 2,87 (sm, 1H, H-12), 0,80 – 0,55 (m, 4H, H-13/13') ppm.

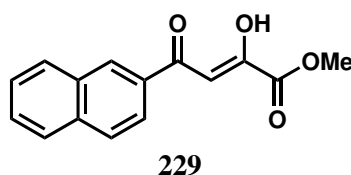
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta_C = 170,3$ (C-10), 159,6 (C-7), 159,5 (C-9), 145,6 (C-3), 127,0 (C-5/5'), 125,5 (C-4/4'), 124,7 (C-6), 99,3 (C-8), 62,4 (C-2), 22,7 (C-12), 5,6 (C-13/13') ppm.

HRMS (ESI, *m/z*): [M+Na]⁺ berechnet für [C₁₄H₁₄N₂O₃Na]⁺: 281,0897; gefunden: 281,0900.

EA (C/H/N, %): Berechnet für [C₁₄H₁₄N₂O₃]: 65,11 / 5,46 / 10,85; gefunden: 65,16 / 5,50 / 10,75.

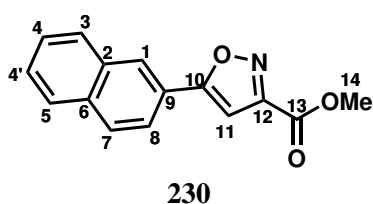
MP: 179 °C.

Methyl-(Z)-2-hydroxy-4-(naphthalen-2-yl)-4-oxobut-2-enoat, 229



Nach **7.5.3 B**: Unter Verwendung von 1-(Naphthalen-2-yl)ethan-1-on (1702 mg, 10,00 mmol), um **229** (1722 mg, 6,72 mmol) in 67% Ausbeute zu erhalten.

Methyl-5-(naphthalen-2-yl)isoxazol-3-carboxylat, 230



Nach **7.5.4**: Unter Verwendung von **229** (1711 mg, 6,68 mmol), um **230** (930 mg, 3,67 mmol) in 55% Ausbeute zu erhalten.

¹**H-NMR** (500 MHz, DMSO-d₆): $\delta_H = 8,56$ (d, $^4J_{H,H} = 0.9$ Hz, 1H, H-1), 8,10 – 7,97 (m, 4H, H-3 + H-5 + H-7 + H-8), 7,64 – 7,61 (m, 2H, H-4/4'), 7,60 (s, 1H, H-11), 3,95 (s, 3H, H-14) ppm.

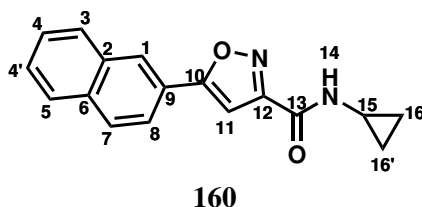
¹³**C-NMR** (125 MHz, DMSO-d₆): $\delta_C = 171,1$ (C-13), 159,8 (C-10), 156,7 (C-12), 133,7 (C-6), 132,5 (C-2), 129,0 (C-5), 128,7 (C-3), 127,7 (C-4/4'), 127,1 (C-7), 125,6 (C-1), 123,3 (C-9), 122,7 (C-8), 101,1 (C-11), 52,8 (C-14) ppm.

HRMS (ESI, m/z): $[M+Na]^+$ berechnet für $[C_{15}H_{11}NO_3Na]^+$: 276,0631; gefunden: 276,0632.

EA (C/H/N, %): Berechnet für $[C_{15}H_{11}NO_3]$: 71,14 / 4,38 / 5,53; gefunden: 71,22 / 4,42 / 5,47.

MP: 126 °C.

N-Cyclopropyl-5-(naphthalen-2-yl)isoxazol-3-carboxamid, **160**



Nach **7.5.5**: Unter Verwendung von **230** und Cyclopropylamin (0,21 mL) mit einer Reaktionszeit von 4 h. Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie (DCM), um **160** (141 mg, 0,51 mmol) in 34% Ausbeute zu erhalten.

¹**H-NMR** (500 MHz, DMSO-d₆): δ_H = 8,88 (d, ³J_{H,H} = 4,6 Hz, 1H, H-14), 8,54 (d, ⁴J_{H,H} = 1,2 Hz, 1H, H-1), 8,10 – 7,96 (m, 4H, H-3 + H-5 + H-7 + H-8), 7,63 – 7,59 (m, 2H, H-4/4'), 7,44 (s, 1H, H-11), 2,94 – 2,86 (m, 1H, H-15), 0,74 – 0,64 (m, 4H, H-16/16') ppm.

¹³**C-NMR** (125 MHz, DMSO-d₆): δ_C = 170,2 (C-13), 159,7 (C-10), 159,6 (C-12), 133,6 (C-6), 132,6 (C-2), 129,0 + 128,7 + 127,6 + 127,1 + 125,4 (C-3 + C-4/4' + C-5 + C-7 + C-8), 123,6 + 122,8 (C-1 + C-9), 100,2 (C-11), 22,8 (C-15), 5,6 (C-16/16') ppm.

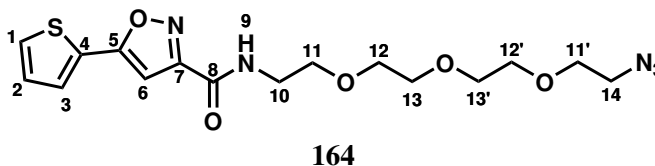
HRMS (ESI, *m/z*): [M+Na]⁺ berechnet für [C₁₇H₁₄N₂O₂Na]⁺: 301,0947; gefunden: 301,0949.

EA (C/H/N, %): Berechnet für [C₁₇H₁₄N₂O₂]: 73,37 / 5,07 / 10,07; gefunden: 73,25 / 5,08 / 9,99.

MP: 185 °C.

7.5.9 Serie 4: Biotinylierung und Fluoreszenzmarkierung

N-(2-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-5-(thiophen-2-yl)isoxazol-3-carbox
-amid, 164



Nach 7.5.5: Unter Verwendung von **135** und 2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethan-1-amin (340 mg). Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie (DCM), um **164** (264 mg, 0,66 mmol) als gelbes Öl in 85% Ausbeute zu erhalten.

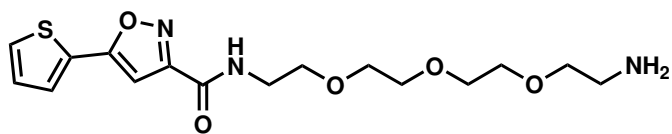
¹**H-NMR** (500 MHz, DMSO-d₆): $\delta_H = 8,70$ (t, $^3J_{H,H} = 5,6$ Hz, 1H, H-9), 7,86 (dd, $^3J_{H,H} = 4,9$ Hz, $^4J_{H,H} = 1,2$ Hz, 1H, H-1), 7,79 (dd, $^3J_{H,H} = 3,7$ Hz, $^4J_{H,H} = 1,2$ Hz, 1H, H-3), 7,26 (dd, $^3J_{H,H} = 5,0$ Hz, 3,6 Hz, 1H, H-2), 7,17 (s, 1H, H-6), 3,57 – 3,52 (m, 12H, H-11/11' + H-12/12' + H-13/13'), 3,45 – 3,40 (m, 2H, H-14), 3,37 (t, $^3J_{H,H} = 5,0$ Hz, 2H, H-10) ppm.

¹³**C-NMR** (125 MHz, DMSO-d₆): $\delta_C = 165,6$ (C-8), 159,5 (C-5), 159,3 (C-7), 130,0 (C-2), 128,7 (C-3), 128,6 (C-1), 127,5 (C-4), 99,0 (C-6), 69,8 + 69,7 + 69,7 + 69,5 + 69,2 + 68,4 (C-11/11' + C-12/12' + C-13/13'), 50,0 (C-14), 38,8 (C-10) ppm.

HRMS (ESI, m/z): $[M+Na]^+$ berechnet für $[C_{16}H_{21}N_5O_5NaS]^+$: 418,1156; gefunden: 418,1155.

Reinheit (qNMR, 500 MHz, DMSO-d₆, Maleinsäure): 95%.

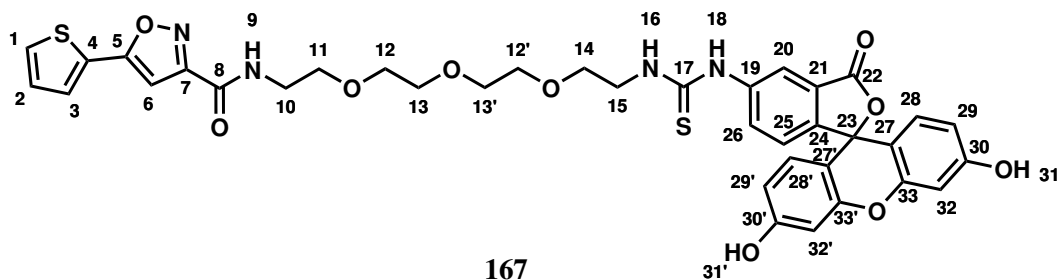
N-2-(2-(2-(2-Aminoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-5-(thiophen-2-yl)isoxazol-3-carbox-
-amid, **231**



231

164 (204 mg, 0,52 mmol) wurde in MeOH (8,00 mL) gelöst, Pd/C (10%, 40 mg) hinzugefügt und eine H₂-Atmosphäre installiert (Ballon). Es wurde bei Raumtemperatur für 2 h gerührt, anschließend über Celite filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, um **231** zu erhalten. Das Rohprodukt wurde umgehend für den nächsten Reaktionsschritt verwendet.

N-(1-((3',6'-Dihydroxy-3-oxo-3*H*-spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthen]-5-yl)amino)-1-thi-
-oxo-5,8,11-trioxa-2-azatridecan-13-yl)-5-(thiophen-2-yl)isoxazol-3-carboxamid, **167**



167

231 (177 mg, 0,48 mmol, 1,00 Äq.), DIPEA (0,10 mL, 0,53 mmol, 1,10 Äq.), 5/6 FITC (187 mg, 0,48 mmol, 1,00 Äq.) wurden in DMF (10,00 mL) gelöst, bei Raumtemperatur über Nacht gerührt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie (DCM/MeOH, 7:1), um **167** (238 mg, 0,31 mmol) als rötlichen Feststoff in 60% Ausbeute über zwei Stufen zu erhalten.

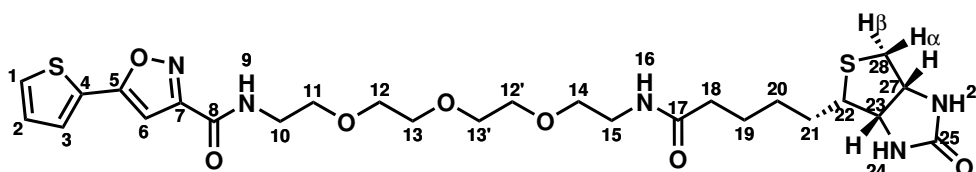
¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): δ_H = 8,16 (d, ⁴J_{H,H} = 1,7 Hz, 1H, H-20), 7,75 (d, ³J_{H,H} = 7,7 Hz, 1H, H-26), 7,65 (dd, ³J_{H,H} = 5,0 Hz, ⁴J_{H,H} = 1,0 Hz, 1H, H-1), 7,63 (dd, ³J_{H,H} = 3,7 Hz, ⁴J_{H,H} = 1,2 Hz, 1H, H-3), 7,18 (dd, ³J_{H,H} = 5,2 Hz, 3,7 Hz, 1H, H-2), 7,13 (d, ³J_{H,H} = 8,3 Hz, 1H, H-25), 6,88 (s, 1H, H-6), 6,68 - 6,64 (m, 4H, H-28/28' + H-32/32'), 6,54 (d, ³J_{H,H} = 8,6 Hz, 1H, H-29 oder H-29'), 6,53 (d, ³J_{H,H} = 8,6 Hz, 1H, H-29 oder H-29'), 3,87 - 3,50 (m, 16H, H-10 + H-11 + H-12/12' + H-13/13', H-14 + H-15) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD): δ_C = 182,9 (C-17), 171,2 (C-22), 168,0 (C-8), 161,3 (C-30/30'), 161,1 (C-5), 160,5 (C-7), 154,2 (C-24), 142,5 (C-33/33'), 131,7 (C-26), 130,3 (C-3), 130,3 (C-28/28'), 130,2 (C-19), 129,5 (C-2), 129,4 (C-4), 129,2 (C-1), 129,0 (C-21), 125,7 (C-25), 119,7 (C-20), 113,6 (C-29/29'), 111,5 (C-27/27'), 103,5 (C-32/32'), 99,3 (C-6), 86,2 (C-23, *via* HMBC), 71,6 + 71,5 + 71,3 + 70,3 (C-11 + C-12/12' + C-13/13' + C-14), 45,5 (C-15), 40,4 (C-10) ppm.

HRMS (ESI, *m/z*): [M+Na]⁺ berechnet für [C₃₇H₃₄N₄O₁₀NaS₂]⁺: 781,1609; gefunden: 781,1604.

Reinheit (qNMR, 500 MHz, MeOD, Maleinsäure): 88%.

N-(13-Oxo-17-((3*aS*,4*S*,6*aR*)-2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)-3,6,9-tri-oxa-12-azaheptacyl)-5-(thiophen-2-yl)isoxazol-3-carboxamid, **165**



165

Nach **7.5.5**: Unter Verwendung von **135** (71 mg, 0,34 mmol) und *N*-(2-(2-(2-(2-Amino-ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-5-((3*aS*,4*S*,6*aR*)-2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)pentanamid (340 mg). Die Reinigung erfolgte per Säulenchromatographie (DCM/MeOH, 9:1), um **165** (89 mg, 0,15 mmol) als gelbes Wachs in 44% Ausbeute zu erhalten.

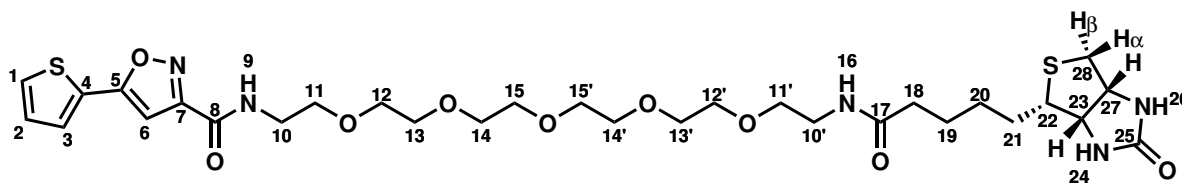
¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): $\delta_H = 7,69$ (dd, $^3J_{H,H} = 5,2$ Hz, $^4J_{H,H} = 1,2$ Hz, 1H, H-1), 7,66 (dd, $^3J_{H,H} = 3,6$ Hz, $^4J_{H,H} = 1,0$ Hz, 1H, H-3), 7,20 (dd, $^3J_{H,H} = 4,9$ Hz, 3,7 Hz, 1H, H-2), 6,94 (s, 1H, H-6), 4,48 (dd, $^3J_{H,H} = 7,7$, 4,3 Hz, 1H, H-27), 4,28 (dd, $^3J_{H,H} = 7,9$, 4,4 Hz, 1H, H-23), 3,69 – 3,58 (m, 12 H, H-11 + H-12/12' + H-13/13' + H-14), 3,52 (t, $^3J_{H,H} = 5,4$ Hz, 2H, H-10), 3,37 – 3,33 (m, 2H, H-15), 3,22 – 3,15 (m, 1H, H-22), 2,90 (dd, $^2J_{H,H} = 12,7$ Hz, $^3J_{H,H} = 5,0$ Hz, 1H, H-28 _{α}), 2,69 (d, $^2J_{H,H} = 12,6$ Hz, 1H, H-28 _{β}), 2,20 (t, $^3J_{H,H} = 7,6$ Hz, 2H, H-18), 1,77 – 1,53 (m, 4H, H-19 + H-21), 1,48 – 1,37 (m, 2H, H-20) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD): $\delta_C = 176,1$ (C-17), 167,9 (C-25), 166,1 (C-8), 161,1 (C-5), 160,6 (C-7), 130,4 (C-4), 129,5 (C-2), 129,4 (C-3), 129,2 (C-1), 99,4 (C-6), 71,6 + 71,5 + 71,3 + 71,2 + 70,6 + 70,3 (C-11 + C-12/12' + C-13/13' + C-14), 63,3 (C-23), 61,6 (C-27), 57,0 (C-22), 41,1 (C-15), 40,4 (C-10), 40,3 (C-28), 36,7 (C-18), 29,8 (C-20), 29,5 (C-21), 26,8 (C-19) ppm.

HRMS (ESI, m/z): $[M+Na]^+$ berechnet für $[C_{26}H_{37}N_5O_7NaS_2]^+$: 618,2027; gefunden: 618,2028.

Reinheit (qNMR, 500 MHz, DMSO-d₆, Maleinsäure): 88%.

N-(19-Oxo-23-((3*aS*,4*S*,6*aR*)-2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)-3,6,9,12,-15-pentaoxa-18-azatricosyl)-5-(thiophen-2-yl)isoxazol-3-carboxamid, **166**



166

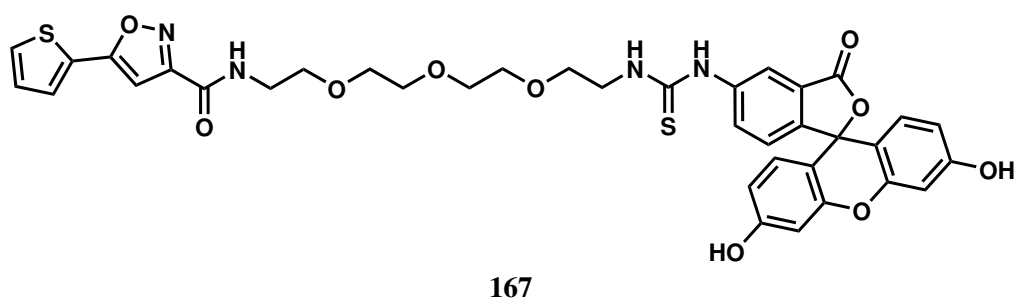
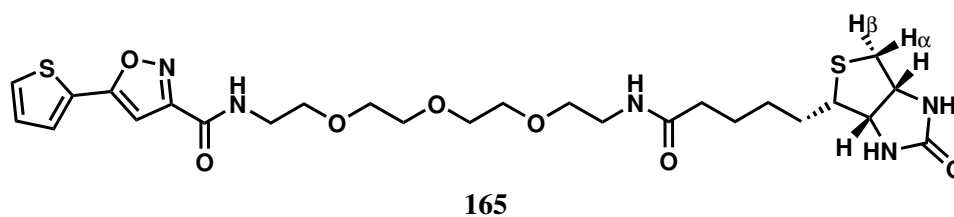
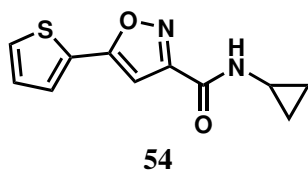
Nach **7.5.5**: Unter Verwendung von **135** (73 mg, 0,35 mmol) und *N*-(17-amino-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecyl)-5-((3*aS*,4*S*,6*aR*)-2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)pentanamid (223 mg). Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie (DCM/MeOH, 9:1), um **166** (38 mg, 0,06 mmol) als gelbes Wachs in 16% Ausbeute zu erhalten.

¹**H-NMR** (500 MHz, CD₃OD): $\delta_H = 7,69$ (dd, ³ $J_{H,H} = 5,0$ Hz, ⁴ $J_{H,H} = 1,2$ Hz, 1H, H-1), 7,67 (dd, ³ $J_{H,H} = 3,7$ Hz, ⁴ $J_{H,H} = 1,2$ Hz, 1H, H-3), 7,21 (dd, ³ $J_{H,H} = 5,2$ Hz, 3,7 Hz, 1H, H-2), 6,94 (s, 1H, H-6), 4,48 (dd, ³ $J_{H,H} = 7,7$ Hz, 4,3 Hz, 1H, H-27), 4,29 (dd, ³ $J_{H,H} = 7,7$ Hz, 4,3 Hz, 1H, H-23), 3,69 – 3,57 (m, 20H, H-11/11' + H-12/12' + H-13/13' + H-14/14' + H-15/15'), 3,52 (t, ³ $J_{H,H} = 5,4$ Hz, 2H, H-10), 3,35 (t, ³ $J_{H,H} = 5,4$ Hz, 2H, H-10'), 3,22 – 3,16 (m, 1H, H-22), 2,91 (dd, ² $J_{H,H} = 12,7$ Hz, ³ $J_{H,H} = 5,0$ Hz, 1H, H-28_α), 2,70 (d, ² $J_{H,H} = 12,9$ Hz, 1H, H-28_β), 2,21 (t, ³ $J_{H,H} = 7,2$ Hz, 2H, H-18), 1,77 – 1,54 (m, 4H, H-19 + H-21), 1,49 – 1,37 (m, 2H, H-20) ppm.

¹³**C-NMR** (125 MHz, CD₃OD): $\delta_C = 176,1$ (C-17), 167,9 (C-25), 166,1 (C-8), 161,1 (C-5), 160,1 (C-7), 130,3 (C-4), 129,5 (C-2), 129,4 (C-3), 129,2 (C-1), 99,4 (C-6), 71,6 – 71,5 + 70,5 + 70,2 (C-11/11' + C-12/12' + C-13/13' + C-14/14' + C-15/15'), 63,3 (C-23), 61,6 (C-27), 57,0 (C-22), 41,0 (C-28), 40,5 (C-10'), 40,4 (C-10), 36,7 (C-18), 29,8 (C-20), 29,5 (C-21), 26,8 (C-19) ppm.

HRMS (ESI, *m/z*): [M+Na]⁺ berechnet für [C₃₀H₄₅N₅O₉NaS₂]⁺: 706,2551; gefunden: 706,2558.

7.5.10 Ausgewählte NMR-Spektren



54:

¹H-NMR: 500 MHz, DMSO-d₆, s. S. 175

¹³C-NMR: 125 MHz, DMSO-d₆, s. S. 176

165:

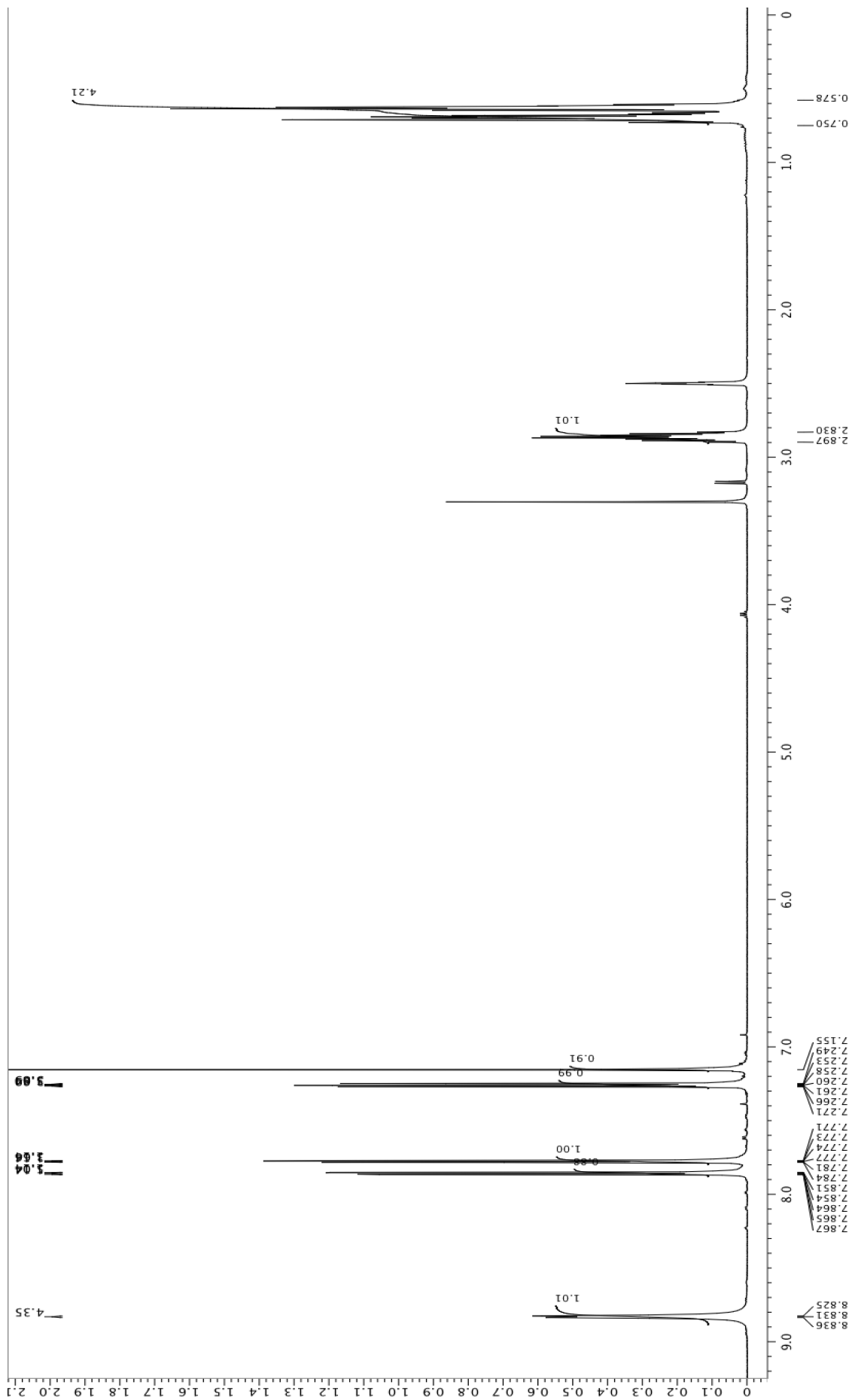
¹H-NMR: 500 MHz, CD₃OD, s. S. 177

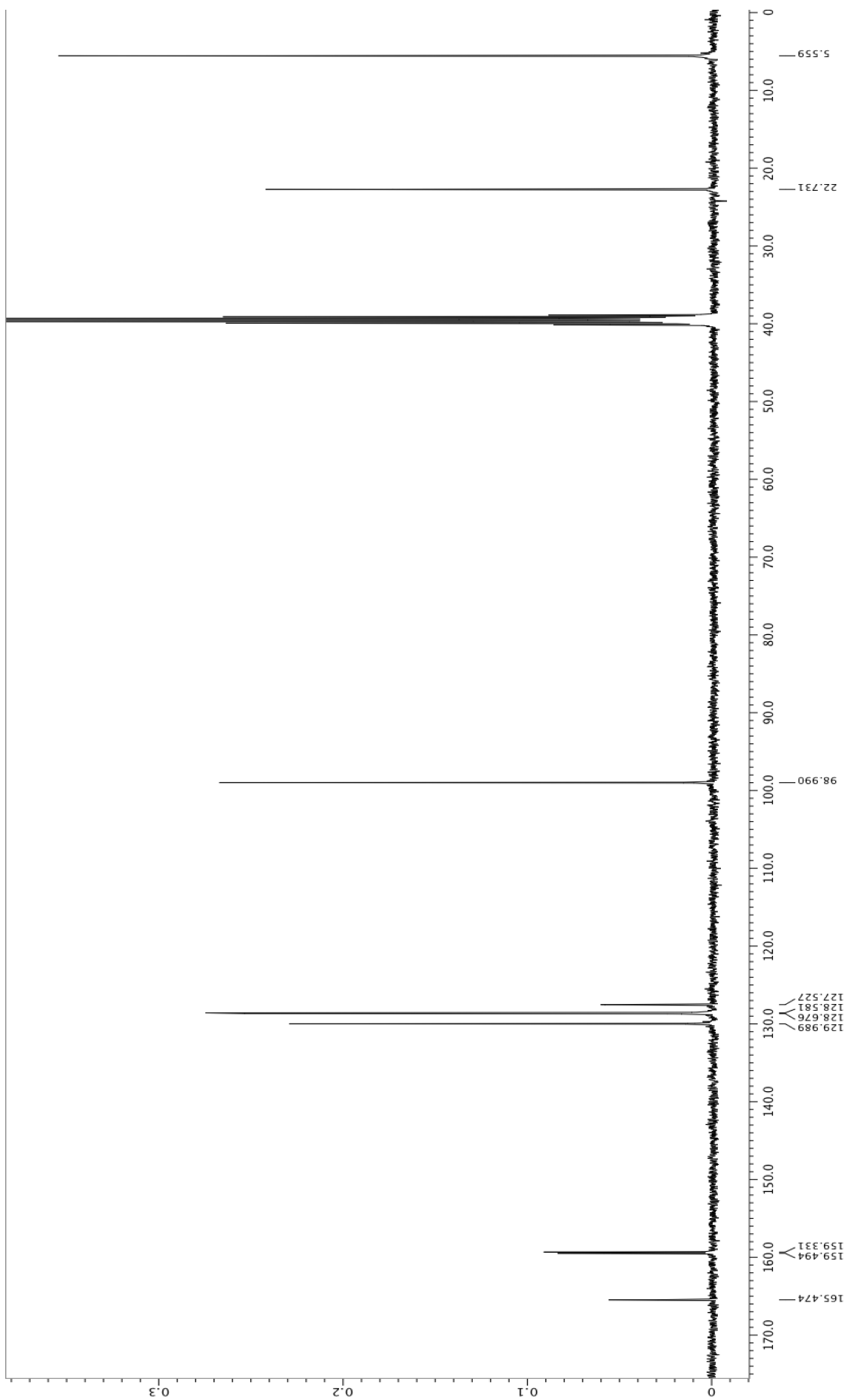
¹³C-NMR: 125 MHz, CD₃OD, s. S. 178

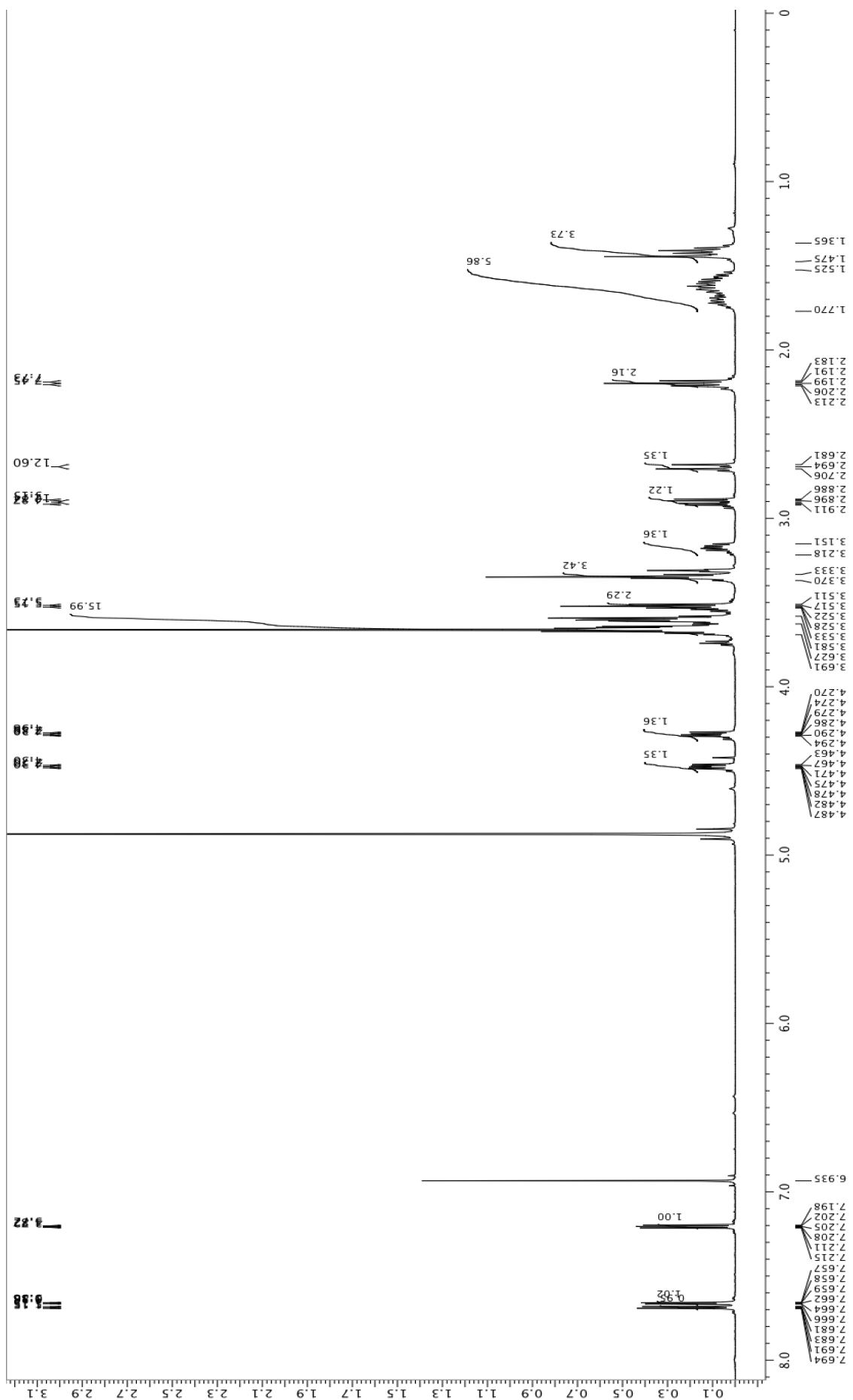
167:

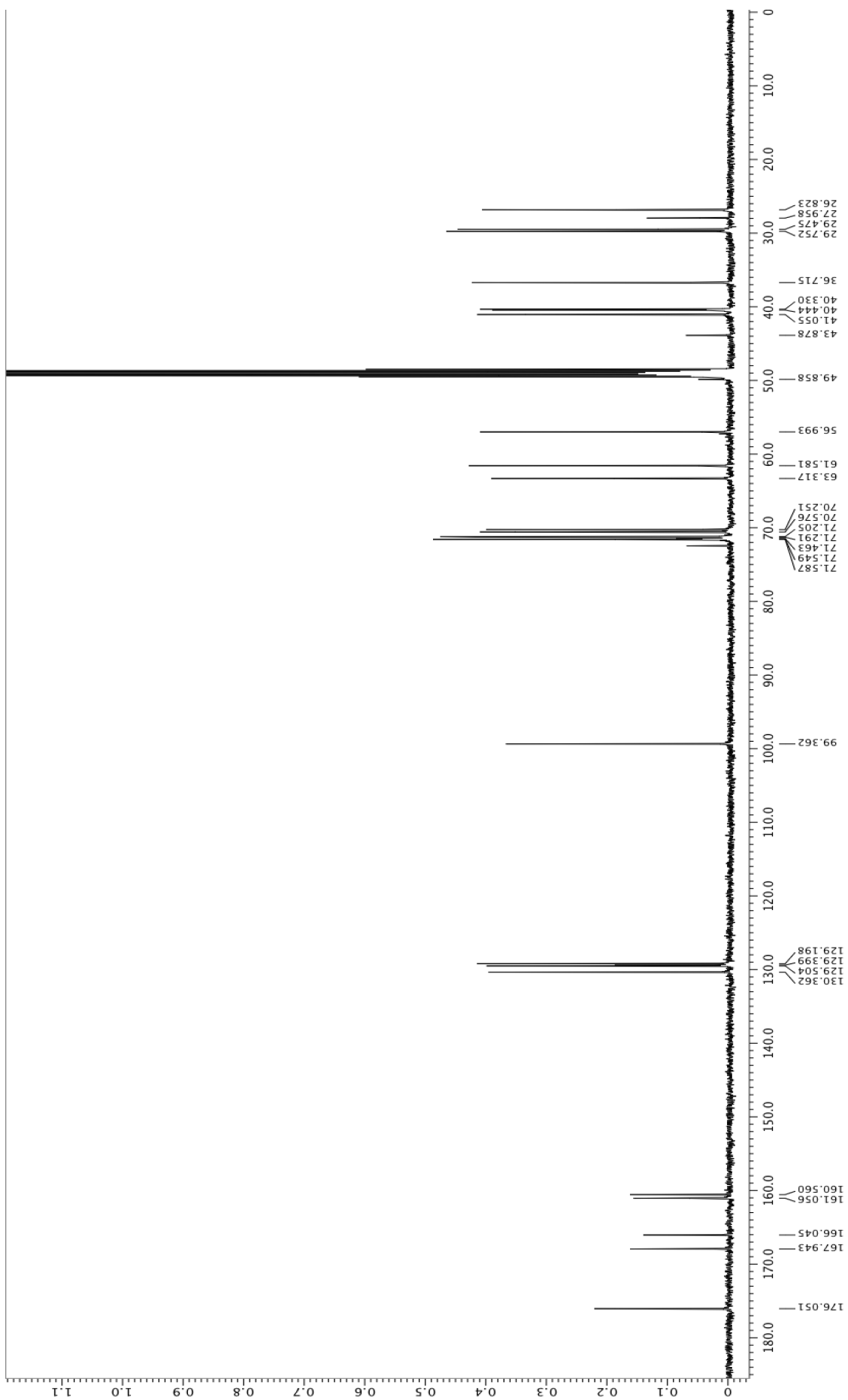
¹H-NMR: 500 MHz, CD₃OD, s. S. 179

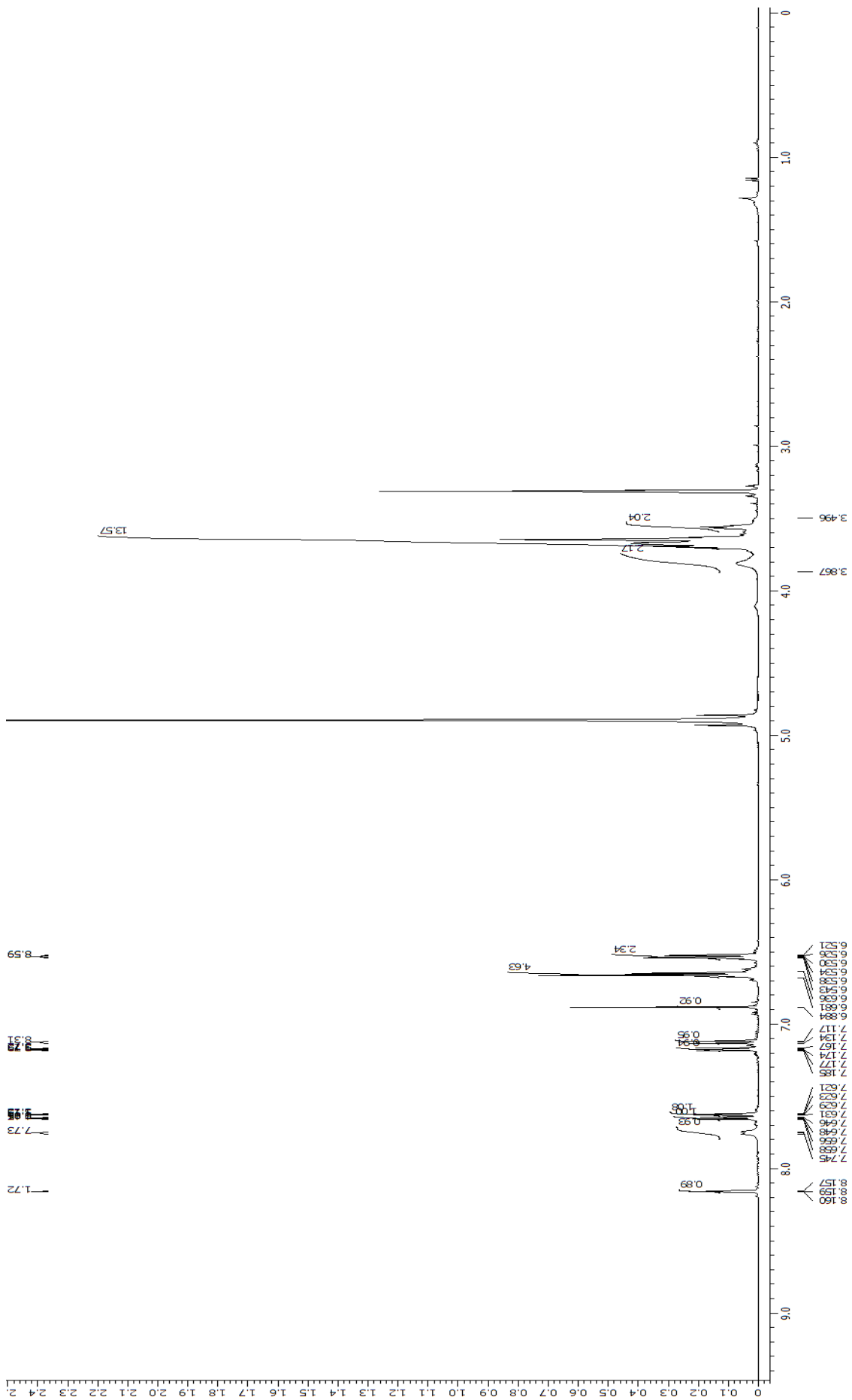
¹³C-NMR: 125 MHz, CD₃OD, s. S. 180

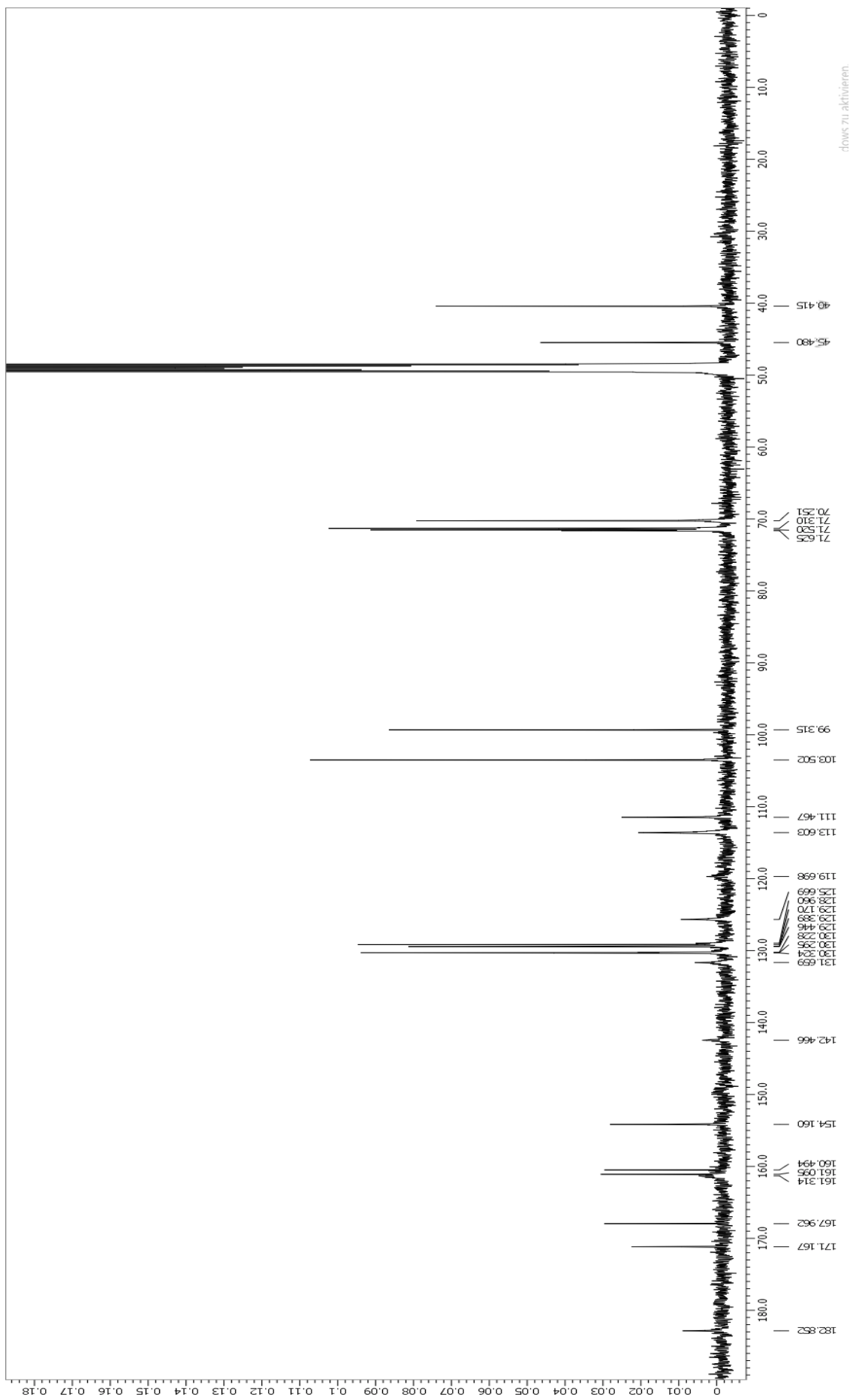












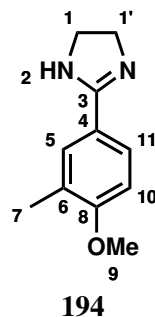
7.6 Nebenprojekt: Synthese von AW9

7.6.1 Anmerkung

Im Folgenden werden lediglich die experimentellen Ergebnisse des dritten (5.2.4) und vier-ten (5.2.5) Syntheseansatzes aufgeführt, da im Ersten nur literaturbekannte Stufen hergestellt wurden und im zweiten kein Versuch zufriedenstellend gelang.

7.6.2 Synthese 3: Imidazolaufbau + *late-stage* Bromierung

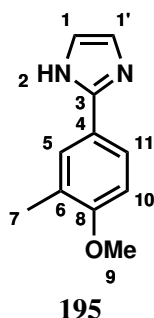
2-(4-Methoxy-3-methylphenyl)-4,5-dihydro-1*H*-imidazol, 194



4-Methoxybenzaldehyd (1502 mg, 10,00 mmol, 1,00 Äq.) wurde in DCM gelöst (15,90 mL), Ethylendiamin (0,70 mL, 10,50 mmol, 1,50 Äq.) bei 0 °C hinzugefügt und anschließend für 30 min gerührt. Währenddessen wurde NBS (1869 mg, 10,50 mmol, 1,05 Äq.) portionsweise hinzugefügt und für weitere 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde die Reaktion mit einer wässrigen, 10%-igen NaOH-Lösung (420 mg, 10,50 mmol, 1,50 Äq.) gequencht, für weitere fünf Minuten gerührt und dann H₂O (16 mL) hinzugegeben. Die wässrige Phase wurde mit DCM extrahiert, die vereinigte organische Phase über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie (EtOAc, dann EtOAc/MeOH/Et₃N 15:1:1 → 15:2:2), um **194** als gelben Feststoff (866 mg, 4,55 mmol) in 46% Ausbeute zu erhalten.⁹⁹

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ_H = 7,62 (d, ⁴*J*_{H,H} = 2,1 Hz, 1H, H-5), 7,60 (dd, ³*J*_{H,H} = 8,6 Hz, ⁴*J*_{H,H} = 2,1 Hz, 1H, H-11), 6,82 (d, ³*J*_{H,H} = 8,2 Hz, 1H, H-10), 3,86 (s, 3H, H-9), 3,77 (s, 4H, H-1+H-1'), 2,22 (s, 3H, H-7) ppm.

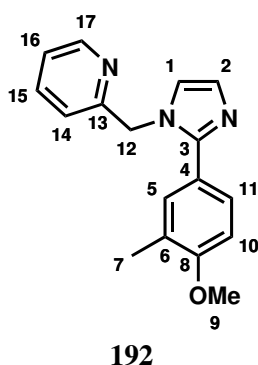
2-(4-Methoxy-3-methylphenyl)-1H-imidazol, 195



194 (692 mg, 3,64 mmol, 1,00 Äq.) und K_2CO_3 (553 mg, 4,00 mmol, 1,10 Äq.) wurden in DMSO (15,90 mL) suspendiert und $PhI(OAc)_2$ (1289 mg, 4,00 mmol, 1,10 Äq.) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 18 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend durch Hinzugabe einer gesättigten, wässrigen $NaHCO_3$ -Lösung gequenchet. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc extrahiert, die vereinigte organische Phase über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie (cHex, dann EtOAc/MeOH 20:1), um **195** als rötliche Kristalle (307 mg, 1,63 mmol) in 45% Ausbeute zu erhalten.

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): $\delta_H = 9,44$ (br s, 1H, H-2), 7,69 (d, $^4J_{H,H} = 2,3$ Hz, 1H, H-11), 7,69 - 7,67 (m, 2H, H-5 + H-11), 7,09 (s, 2H, H-1+H-1'), 6,75 (d, $^3J_{H,H} = 8,2$ Hz, 1H, H-10), 3,80 (s, 3H, H-9), 2,12 (s, 3H, H-7) ppm.

2-((2-(4-Methoxy-3-methylphenyl)-1H-imidazol-1-yl)methyl)pyridin, **192**



195 (692 mg, 3,64 mmol, 1,00 Äq.), 2-Chlormethylpyridinhydrochlorid **176** (87 mg, 0,53 mmol, 1,00 Äq.) und KOH (119 mg, 2,13 mmol, 4,00 Äq.) wurden in THF (1,70 mL) suspendiert, für einen Tag bei Reflux gerührt und anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in DCM (2,00 mL) und H₂O (2,00 mL) gelöst. Die wässrige Phase wurde mit DCM extrahiert, die vereinigte organische Phase mit H₂O gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, um **192** als braunes Öl (119 mg, 0,43 mmol, Rohprodukt) zu erhalten.⁹²

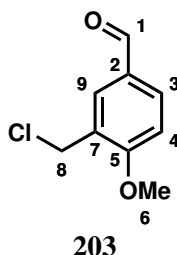
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta_H = 8,54$ (d, $^3J_{H,H} = 4,5$ Hz, 1H, H-17), $7,59$ (dd, $^3J_{H,H} = 7,9$ Hz, $^3J_{H,H} = 7,6$ Hz, 1H, H-15, *), $7,34$ (s, 1H, H-5), $7,27$ (d, $^3J_{H,H} = 8,3$ Hz, 1H, H-11, *), $7,16$ (dd, $^3J_{H,H} = 7,4$ Hz, $^3J_{H,H} = 4,9$ Hz, 1H, H-16), $7,13$ (s, 1H, H-1), $6,98$ (s, 1H, H-2), $6,85$ (d, $^3J_{H,H} = 7,6$ Hz, 1H, H-14), $6,76$ (d, $^3J_{H,H} = 8,7$ Hz, 1H, H-10), $5,27$ (s, 2H, H-12), $3,77$ (s, 3H, H-9), $2,15$ (s, 3H, H-7) ppm.

* = Zuordnungen nicht eindeutig.

MS (APCI, m/z): $[M+H]^+$ berechnet für $[C_{17}H_{18}N_3O]^+$: 280; gefunden: 280.

7.6.3 Synthese 4: Imidazolaufbau + frühe Triazoleinführung

3-(Chlormethyl)-4-methoxybenzaldehyd, 203



4-Methoxybenzaldehyd (34,88 g, 0,256 mol, 31,10 mL, 1,00 Äq.), Paraformaldehyd (15,37 g) und ZnCl_2 (51,26 g, 0,376 mol, 1,47 Äq.) wurden in HCl (37%, 215,30 mL) gelöst und die Reaktionslösung wurde für 30 min auf 75 °C erwärmt. Das Quenchen erfolgte durch Schütten des Ansatzes in Wasser (ca. 1 L), wobei das Öl kristallisierte. Die Substanz wurde mit H_2O gewaschen und im Vakuum getrocknet, um **203** als rotbraunen Feststoff (40,18 g, 0,218 mol) in 85% Ausbeute zu erhalten.¹⁰⁰ Nur zur Charakterisierung erfolgte die Reinigung mittels Säulenchromatographie (cHex/EtOAc 3:1), um **203** als hellgelbe Kristalle zu erhalten.

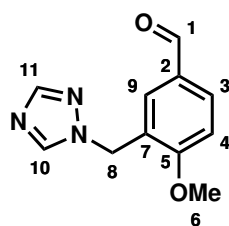
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta_{\text{H}} = 9,89$ (s, 1H, H-1), 7,91 (d, $^4J_{\text{H,H}} = 2,0$ Hz, 1H, H-9), 7,86 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 8,5$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 2,0$ Hz, 1H, H-3), 7,02 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8,6$ Hz, 1H, H-4), 4,66 (s, 2H, H-8), 3,97 (s, 3H, H-6) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): $\delta_{\text{C}} = 190,6$ (C-1), 162,3 (C-5), 132,8 (C-3), 132,0 (C-9), 129,8 (C-2), 126,9 (C-7), 110,9 (C-4), 56,2 (C-6), 41,0 (C-8) ppm.

HRMS (EI, m/z): $[\text{M}]^+$ berechnet für $[\text{C}_9\text{H}_9^{35}\text{ClO}_2]^+$: 184,0291; gefunden: 184,0290.

MP: 54 °C.

3-((1H-1,2,4-Triazol-1-yl)methyl)-4-methoxybenzaldehyd, **204**



204

203 (40,18 g, 0,218 mol, 1,00 Äq.), 1,2,4-Triazol (15,03 mg, 0,218 mol, 1,00 Äq.) und K_2CO_3 (45,12 g, 0,327 mol, 1,50 Äq.) wurden in DMF (120,00 mL) gelöst und bei 80 °C über Nacht gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt bis ein Feststoff ausfiel. Dieser wurde drei Mal mit MTBE gewaschen und dann in MeOH gelöst. Die methanolische Lösung wurde im Vakuum eingengt, der resultierende Feststoff homogenisiert und in MTBE gerührt. Nach Trocknung im Vakuum wurde **204** als leicht beiges Pulver (37912 mg, 174,52 mmol) in einer Ausbeute von 80% erhalten (Rückgewinnung aus MTBE-Waschungen inbegriffen). Zur Charakterisierung erfolgte die Reinigung mittels Säulenchromatographie (cHex dann EtOAc/MeOH 20:1) und Trocknung im Ofen (HV, 80 °C), um **204** als nahezu farbloses Pulver oder farblose Nadeln zu erhalten.

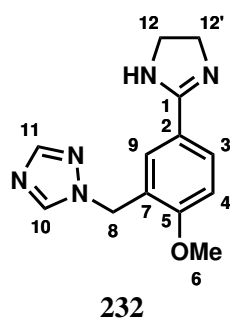
1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$): $\delta_H = 9,86$ (s, 1H, H-1), 8,13 (s, 1H, H-10), 7,93 (s, 1H, H-11), 7,89 (dd, $^3J_{H,H} = 8,6$ Hz, $^4J_{H,H} = 2,0$ Hz, 1H, H-3), 7,73 (d, $^4J_{H,H} = 2,0$ Hz, 1H, H-9), 7,03 (d, $^3J_{H,H} = 8,3$ Hz, 1H, H-4), 5,38 (s, 2H, H-8), 3,95 (s, 3H, H-6) ppm.

^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$): $\delta_C = 190,5$ (C-1), 162,1 (C-5), 152,2 (C-11), 143,6 (C-10), 132,9 (C-3), 131,8 (C-9), 130,0 (C-2), 124,1 (C-7), 111,0 (C-4), 56,2 (C-6), 48,5 (C-8) ppm.

HRMS (ESI, m/z): $[M+Na]^+$ berechnet für $[C_{11}H_{11}N_3NaO_2]^+$: 240,0743; gefunden: 240,0739.

MP: 97 °C.

1-(5-(4,5-Dihydro-1*H*-imidazol-2-yl)-2-methoxybenzyl)-1*H*-1,2,4-triazol, 232



204 (217 mg, 1,00 mmol, 1,00 Äq.) und Ethylendiamin (0,07 mL, 1,10 mmol, 1,10 Äq.) wurden in *t*BuOH (10,00 mL) gelöst und für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Darauf folgend wurden K₂CO₃ (415 mg, 3,00 mmol, 3,00 Äq) und I₂ (317 mg, 1,25 mmol, 1,25 Äq.) hinzugefügt und der Ansatz für weitere 3 h bei 70 °C gerührt. Es wurde durch Zugabe einer gesättigten, wässrigen Lösung von Na₂S₂O₃ gequenchet und die wässrige Phase mit DCM extrahiert. Die vereinigte organische Phase wurde mit gesättigten, wässrigen Lösungen von NaHCO₃ und danach NaCl gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, um **232** als gelben Feststoff (112 mg, 0,44 mmol) in 44% Ausbeute zu erhalten.¹⁰⁷

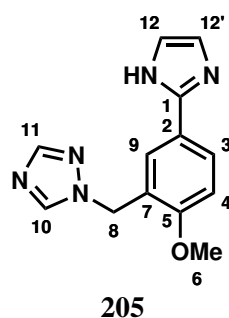
¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): δ_H = 8,54 (s, 1H, H-10), 7,95 (s, 1H, H-11), 7,86 (dd, ³J_{H,H} = 8,9 Hz, ⁴J_{H,H} = 2,2 Hz, 1H, H-3), 7,74 (d, ⁴J_{H,H} = 2,3 Hz, 1H, H-9), 7,17 (d, ³J_{H,H} = 8,6 Hz, 1H, H-4), 5,45 (s, 2H, H-8), 3,94 (s, 3H, H-6), 3,89 (s, 4H, H-12/12') ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD): δ_C = 166,6 (C-1), 162,4 (C-5), 152,2 (C-11), 145,6 (C-10), 131,6 (C-3), 131,1 (C-9), 125,4 (C-7), 119,5 (C-2), 112,4 (C-4), 56,6 (C-6), 49,4 (C-8, teilweise unter Lösungsmittelpeak), 48,0 (C-12+C-12') ppm.

HRMS (ESI, *m/z*): [M+H]⁺ berechnet für [C₁₃H₁₆N₅O]⁺: 258,1349; gefunden: 258,1346.

MP: 146 °C.

1-(5-(1*H*-Imidazol-2-yl)-2-methoxybenzyl)-1*H*-1,2,4-triazol, **205**



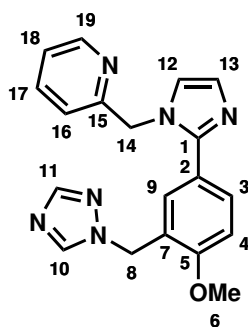
232 (1832 mg, 7,12 mmol, 1,00 Äq.), K_2CO_3 (1082 mg, 7,83 mmol, 1,10 Äq.) und $PhI(OAc)_2$ (2523 mg, 7,83 mmol, 1,10 Äq.) wurden in DMSO (8,90 mL) suspendiert. Der Ansatz wurde bei RT für 18 h gerührt und anschließend durch Zugabe einer wässrigen, gesättigten $NaHCO_3$ -Lösung gequenchet. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc extrahiert, die vereinigte organische Phase mit einer gesättigten, wässrigen $NaCl$ -Lösung gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie (DCM/MeOH 10:1) und anschließender Verreibung mit Et_2O , um **205** als orangen Feststoff (603 mg, 2,36 mmol) in 33% Ausbeute zu erhalten.⁹⁹ Zur Charakterisierung wurde erneut aus H_2O umkristallisiert, um **205** als farblose Kristalle zu erhalten.

¹**H-NMR** (500 MHz, MeOD): $\delta_H = 8,50$ (s, 1H, H-10), 7,95 (s, 1H, H-11), 7,84 (dd, $^3J_{H,H} = 8,6$ Hz, $^4J_{H,H} = 2,3$ Hz, 1H, H-3), 7,76 (d, $^4J_{H,H} = 2,3$ Hz, 1H, H-9), 7,10 (d, 1H, H-4, teilweise von H-12/12' überlagert), 7,08 (s, 2H, H-12/12'), 5,44 (s, 2H, H-8), 3,88 (s, 3H, H-6) ppm.

¹³**C-NMR** (125 MHz, MeOD): $\delta_C = 159,3$ (C-5), 152,1 (C-11), 147,6 (C-1), 145,4 (C-10), 128,7 (C-3), 128,6 (C-9), 125,0 (C-7), 124,4 (C-2), 123,7 (C-12+C-12', breites Signal), 112,4 (C-4), 56,3 (C-6), 49,7 (C-8) ppm.

HRMS (ESI, m/z): $[M+H]^+$ berechnet für $[C_{13}H_{14}N_5O]^+$: 256,119; gefunden: 256,1192.

2-((2-(3-((1*H*-1,2,4-Triazol-1-yl)methyl)-4-methoxyphenyl)-1*H*-imidazol-1-yl)methyl)pyridin, **168**



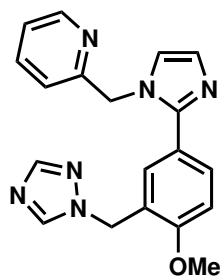
205 (479 mg, 1,88 mmol, 1,00 Äq.), 2-(Chloromethyl)pyridinhydrochlorid (308 mg, 1,88 mmol, 1,00 Äq.) und KOH (421 mg, 7,51 mmol, 4,00 Äq.) wurden in THF (10,00 mL) suspendiert, für 40 h zum Sieden erhitzt und anschließend im Vakuum konzentriert. Der Rückstand wurde in DCM (10,00 mL) und H₂O (10 mL) aufgenommen, die organische Phase wurde mit H₂O gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie (DCM/MeOH 10:1) und Trocknung im Ofen (HV, 80 °C). **168** wurde als gelber Feststoff (235 mg, 0,68 mmol) in 36% Ausbeute erhalten.⁹²

¹**H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): $\delta_H = 8,57$ (ddd, ³ $J_{H,H} = 4,8$ Hz, ⁴ $J_{H,H} = 1,7$ Hz, ⁵ $J_{H,H} = 0,9$ Hz, 1H, H-19), $8,02$ (s, 1H, H-10), $7,82$ (s, 1H, H-11), $7,63$ (ddd, ³ $J_{H,H} = 7,7$ Hz + $7,7$ Hz, ⁴ $J_{H,H} = 1,7$ Hz, 1H, H-17), $7,51$ (dd, ³ $J_{H,H} = 8,5$ Hz, ⁴ $J_{H,H} = 2,3$ Hz, 1H, H-3), $7,45$ (d, ⁴ $J_{H,H} = 2,3$ Hz, 1H, H-9), $7,21$ (ddd, ³ $J_{H,H} = 7,7$ Hz + $4,9$ Hz, ⁴ $J_{H,H} = 0,9$ Hz, 1H, H-18), $7,15$ (d, ³ $J_{H,H} = 1,2$ Hz, 1H, H-12), $7,02$ (d, ³ $J_{H,H} = 1,4$ Hz, 1H, H-13), $6,90$ (d, ³ $J_{H,H} = 8,6$ Hz, 1H, H-4), $6,89$ (d, ³ $J_{H,H} = 8,1$ Hz, 1H, H-16), $5,29$ (s, 2H, H-14), $5,24$ (s, 2H, H-8), $3,84$ (s, 3H, H-6) ppm.

¹³**C-NMR** (125 MHz, CDCl₃): $\delta_C = 157,7$ (C-5), $156,7$ (C-15), $151,8$ (C-11), $149,9$ (C-19), $147,5$ (C-1), $143,4$ (C-10), $137,4$ (C-17), $131,0$ (C-3), $130,7$ (C-9), $129,1$ (C-13), $123,3$ (C-7), $123,2$ (C-2), $122,9$ (C-16), $121,4$ (C-18), $121,0$ (C-12), $110,8$ (C-4), $55,7$ (C-6), $52,2$ (C-14), $48,6$ (C-8) ppm.

HRMS (ESI, m/z): $[M+H]^+$ berechnet für $[C_{19}H_{19}N_6O]$: 347,1615; gefunden: 347,1609.

7.6.4 Ausgewählte NMR-Spektren

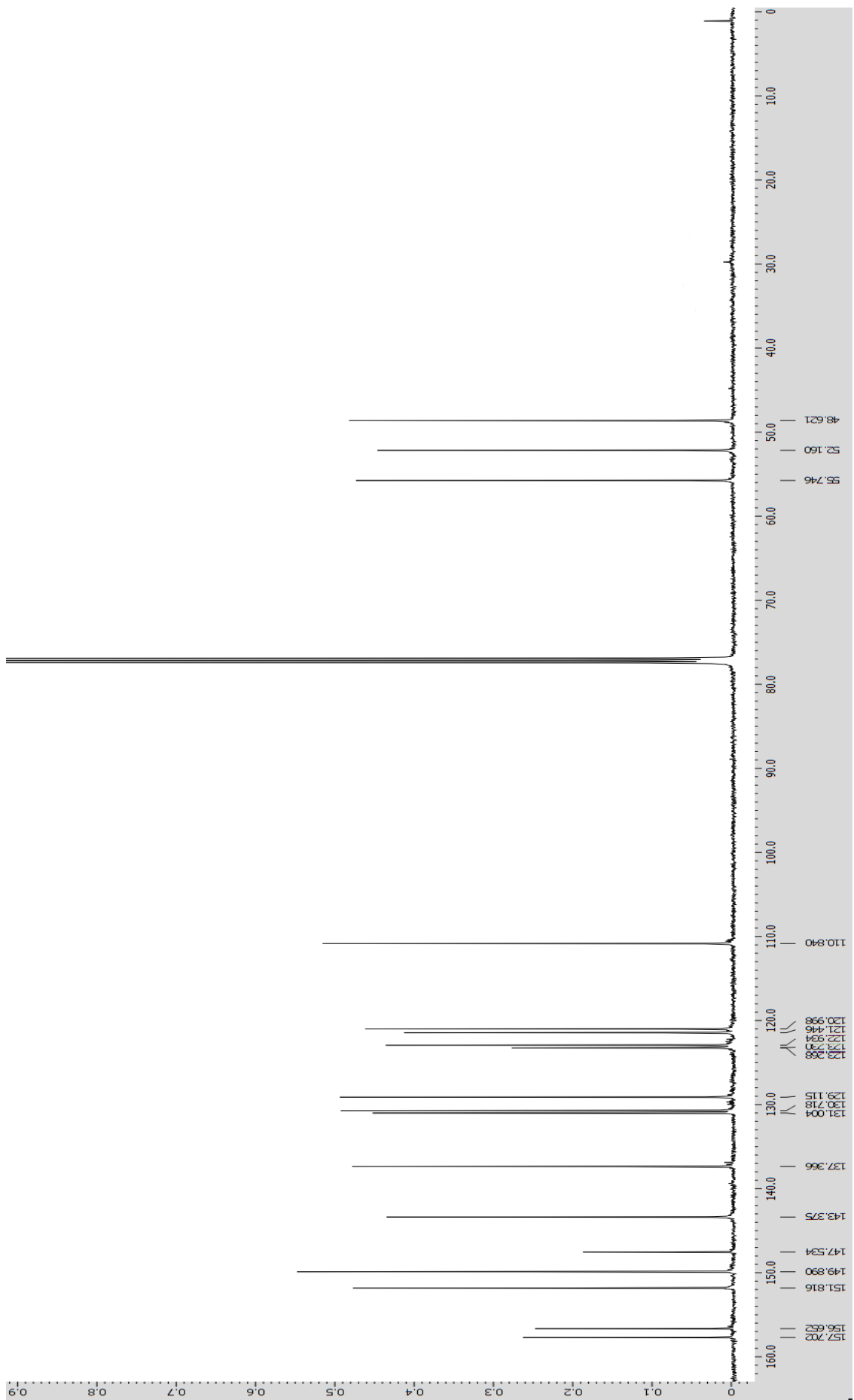


168

168:

$^1\text{H-NMR}$: 500 MHz, CDCl_3 , s. S. 190

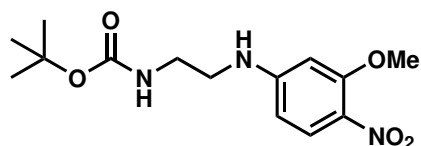
$^{13}\text{C-NMR}$: 125 MHz, CDCl_3 , s. S. 191



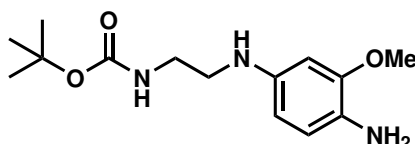
8 Strukturverzeichnis

8.1 Photoaffinitätsmarkierung von PPAR β/δ -Liganden

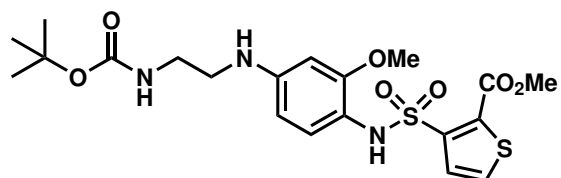
8.1.1 Synthese des ST247-Derivats für die PA-Markierung



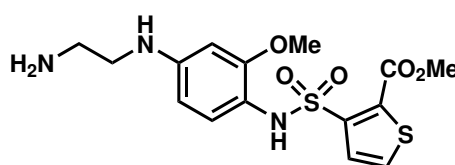
88
S. 113



89
S. 114

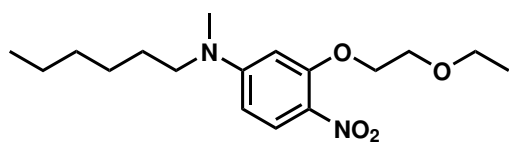


90
S. 114

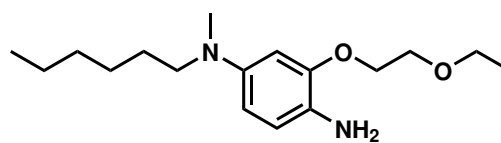


92
S. 115

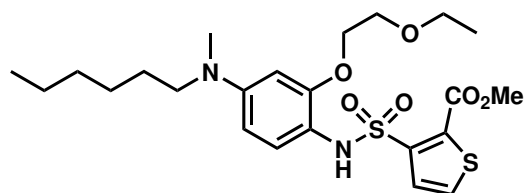
8.1.2 Synthese eines neuen *N*-methylierten PPAR β/δ -Liganden



100
S. 116



101
S. 117

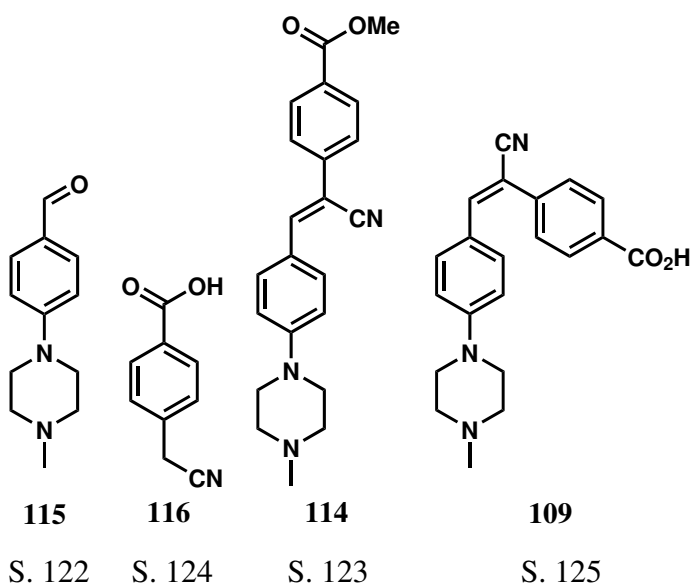


98

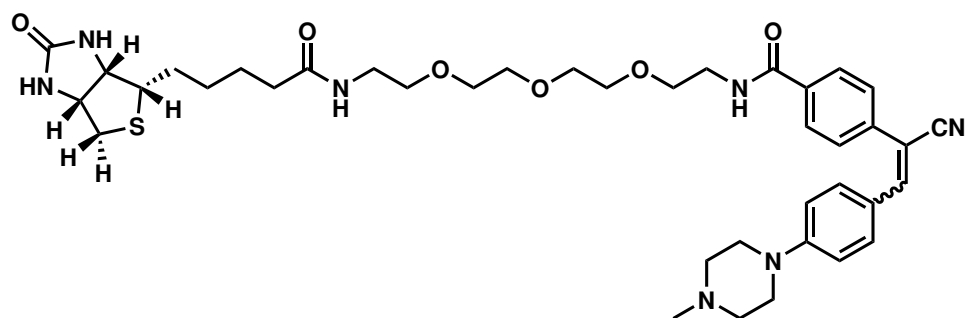
S. 117

8.2 Off-Target Aufklärung von DG172

8.2.1 Synthese von LD222



8.2.2 Synthese von LD253

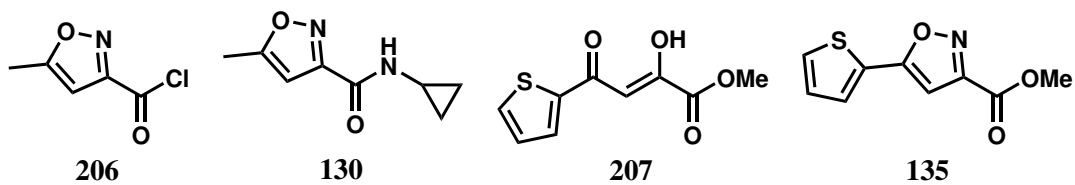


112

S. 127

8.3 SAR und Targetaufklärung von ISX-9

8.3.1 Serie 1: Bestimmung der Kernstruktur

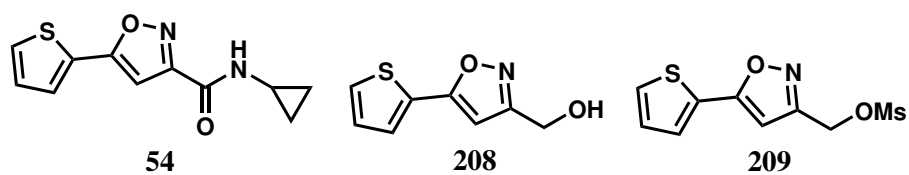


S. 136

S. 136

S. 137

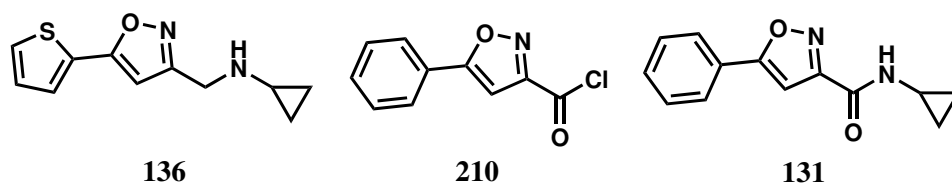
S. 137



S. 138

S. 139

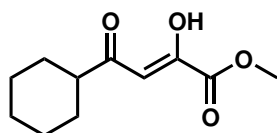
S. 139



S. 139

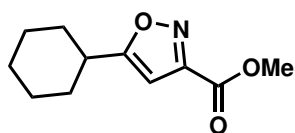
S. 140

S. 140



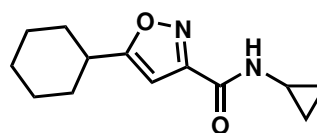
211

S. 141



212

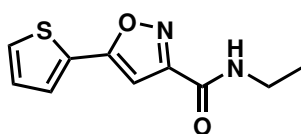
S. 141



134

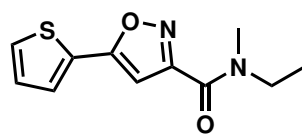
S. 142

8.3.2 Serie 2: Amidvariationen



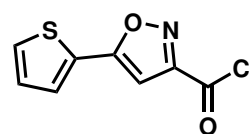
146

S. 143



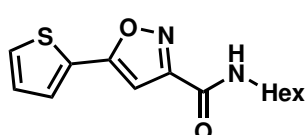
150

S. 144



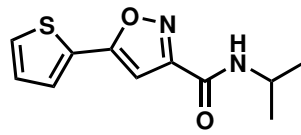
213

S. 145



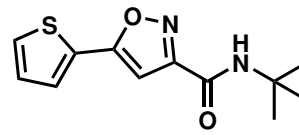
147

S. 145



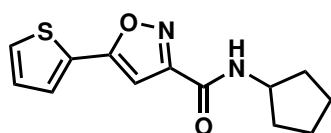
148

S. 146



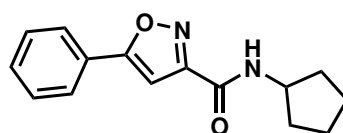
149

S. 147



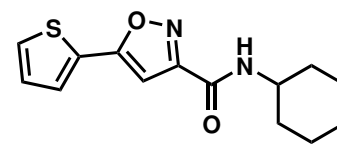
151

S. 148



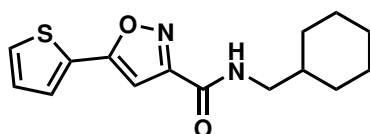
153

S. 149



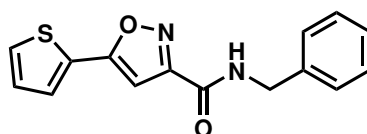
152

S. 150



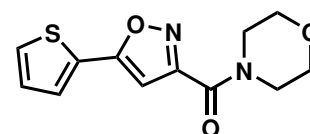
155

S. 151



156

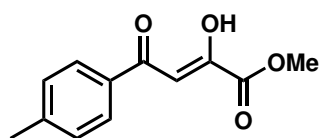
S. 152



156

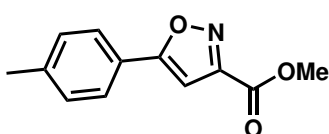
S. 153

8.3.3 Serie 3: Arylvariationen



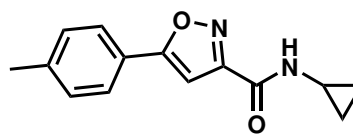
214

S. 154



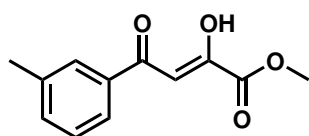
215

S. 154



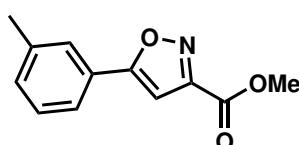
157

S. 155



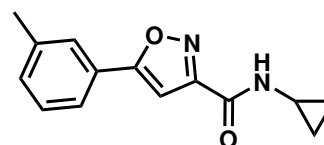
216

S. 156



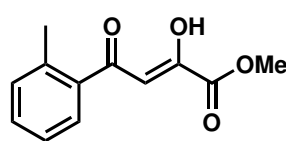
217

S. 156



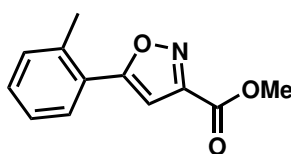
161

S. 157



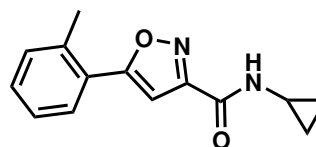
218

S. 158



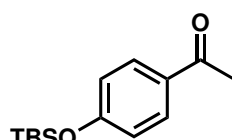
219

S. 158



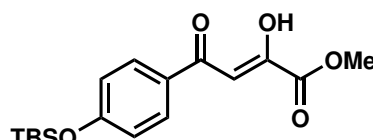
162

S. 159



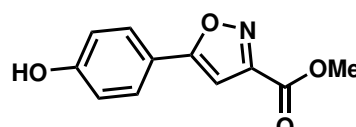
220

S. 160



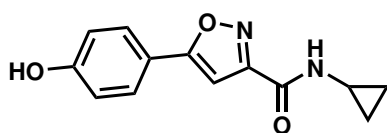
221

S. 160



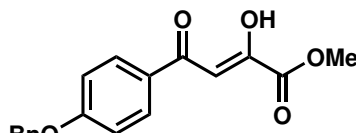
222

S. 160



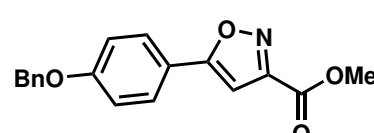
159

S. 161



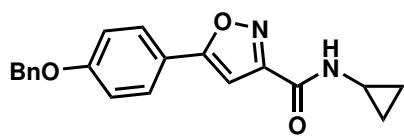
223

S. 162



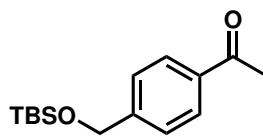
224

S. 162



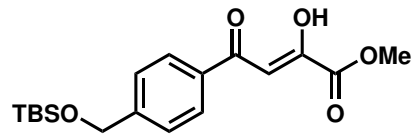
158

S. 163



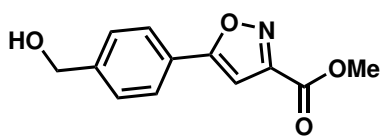
225

S. 164



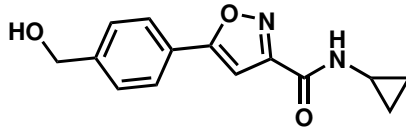
227

S. 164



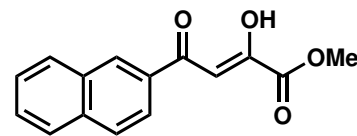
228

S. 165

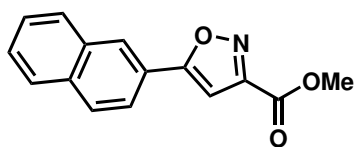


163

S. 166

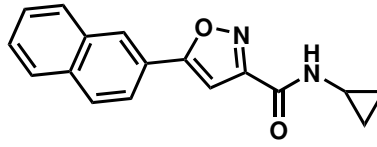


S. 167



230

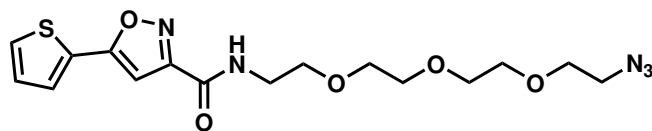
S. 167



160

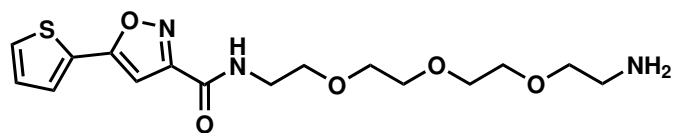
S. 168

8.3.4 Serie 4: Biotinylierung und Fluoreszenzmarkierung



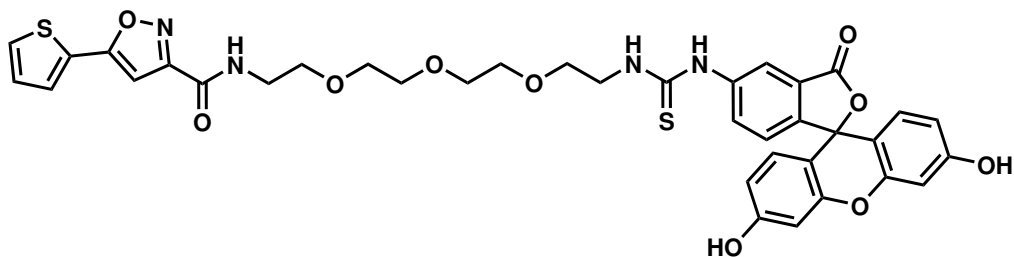
164

S. 169



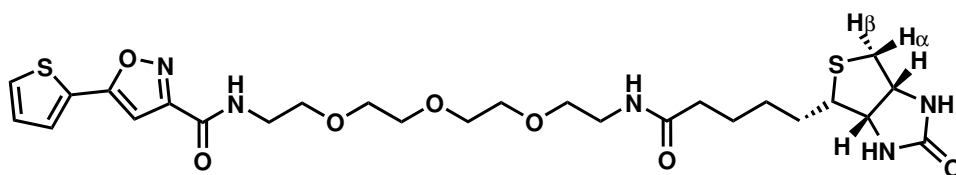
231

S. 170



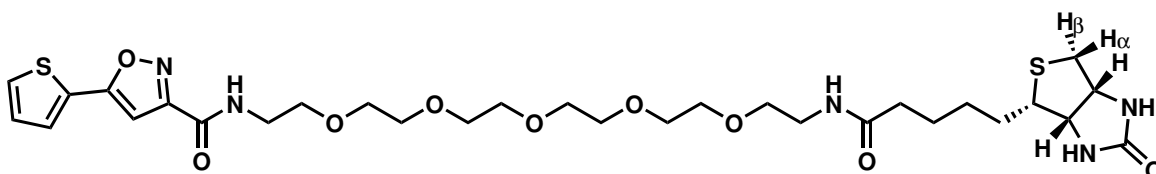
167

S. 170



165

S. 171

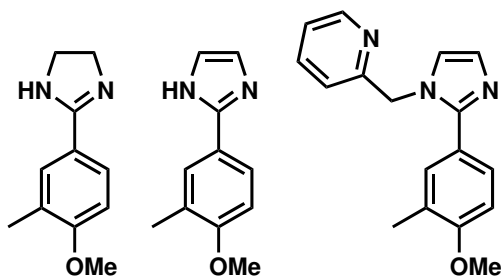


166

S. 173

8.4 Nebenprojekt: Synthese von AW9

8.4.1 Synthese 3: Imidazolaufbau + *late-stage* Bromierung



194

S. 181

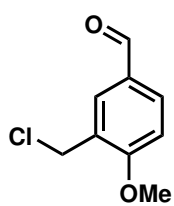
195

S. 182

192

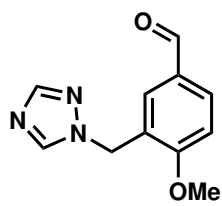
S. 183

8.4.2 Synthese 4: Imidazolaufbau + frühe Triazoleinführung



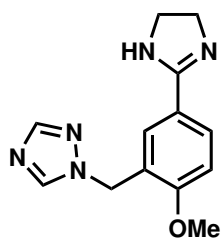
203

S. 184



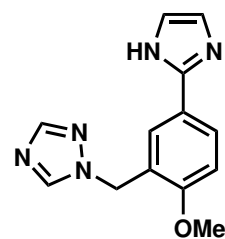
204

S. 185



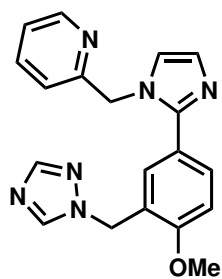
232

S. 186



205

S. 187



168

S. 188

9 Referenzen

- (1) Klebe, G., *Wirkstoffdesign*, 2. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag: 2009.
- (2) Borzelleca, J. F. (2000). Paracelsus: Herald of Modern Toxicology. *Toxicol. Sci.* 53, 2–4.
- (3) Drews, J. (2000). Drug Discovery: A Historical Perspective. *Science* (80-.). 287, 1960–1964.
- (4) Huxtable, R. J. und Schwarz, S. K. (2001). The isolation of morphine—first principles in science and ethics. *Mol. Interv.* 1, 189–191.
- (5) Bialobrzewski, M. und Nencki, M. (1897). Ueber die Acetsalicylsäure. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* 30, 1776.
- (6) Fleming, A. (1929). On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to their Use in the Isolation of B. influenzae. *British Journal of Experimental Pathology* 10, 226–236.
- (7) Knowles, J. und Gromo, G. (2003). Target selection in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* 2, 63–69.
- (8) Brown, D. und Superti-Furga, G. (2003). Rediscovering the sweet spot in drug discovery. *Drug Discovery Today* 8, 1067–1077.
- (9) Owens, J. (2007). Determining druggability. *Nature Reviews Drug Discovery* 6, 187–187.
- (10) Brown, D. G. und Boström, J. (2018). Where Do Recent Small Molecule Clinical Development Candidates Come From? *Journal of Medicinal Chemistry*, Article ASAP.
- (11) Anderson, A. C. (2003). The Process of Structure-Based Drug Design. *Chemistry & Biology* 10, 787–797.

- (12) Arkin, M. R., Tang, Y. und Wells, J. A. (2014). Small-Molecule Inhibitors of Protein-Protein Interactions: Progressing toward the Reality. *Chemistry & Biology* 21, 1102–1114.
- (13) Pellecchia, M., Sem, D. S. und Wüthrich, K. (2002). NMR in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* 1, 211–219.
- (14) Evers, A. und Klabunde, T. (2005). Structure-based drug discovery using GPCR homology modeling: Successful virtual screening for antagonists of the alpha1A adrenergic receptor. *Journal of Medicinal Chemistry* 48, 1088–1097.
- (15) Dimasi, J. A. und Faden, L. B. (2011). Competitiveness in follow-on drug R&D: A race or imitation? *Nature Reviews Drug Discovery* 10, 23–27.
- (16) Bleicher, K. H. u. a. (2003). Hit and lead generation: Beyond high-throughput screening. *Nature Reviews Drug Discovery* 2, 369–378.
- (17) Lipinski, C. A. u. a. (1997). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews* 23, 3–25.
- (18) Congreve, M. u. a. (2003). A ‘Rule of Three’ for fragment-based lead discovery? *Drug Discov. Today* 8, 876–877.
- (19) Young, R. J. und Leeson, P. D. (2018). Mapping the Efficiency and Physicochemical Trajectories of Successful Optimizations. *Journal of Medicinal Chemistry*, Article ASAP.
- (20) Swinney, D. C. und Anthony, J. (2011). How were new medicines discovered? *Nature Reviews Drug Discovery* 10, 507–519.
- (21) Wermuth, C. G., *The Practice of Medicinal Chemistry*, Second Edi; Elsevier: 2003.
- (22) Patani, G. A. und LaVoie, E. J. (1996). Bioisosterism: A Rational Approach in Drug Design. *Chem. Rev.* 96, 3147–3176.

- (23) Leelananda, S. P. und Lindert, S. (2016). Computational methods in drug discovery. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* 12, 2694–2718.
- (24) Stumpfe, D. und Bajorath, J. (2012). Exploring Activity Cliffs in Medicinal Chemistry. *J. Med. Chem.* 55, 2932–2942.
- (25) Maggiora, G. u. a. (2014). Molecular similarity in medicinal chemistry. *Journal of Medicinal Chemistry* 57, 3186–3204.
- (26) Wermuth, C. G. u. a. (1998). Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC Recommendations 1998). *Pure and Applied Chemistry* 70, 1129–1143.
- (27) Langer, T. und Wolber, G. (2004). Pharmacophore definition and 3D searches. *Drug Discov. Today Technol.* 1, 203–207.
- (28) Yang, S.-Y. (2010). Pharmacophore modeling and applications in drug discovery: challenges and recent advances. *Drug Discovery Today* 15, 444–450.
- (29) Verma, J., Khedkar, V. M. und Coutinho, E. C. (2010). 3D-QSAR in drug design—a review. *Curr. Top. Med. Chem.* 10, 95–115.
- (30) Dudek, A., Arodz, T. und Galvez, J. (2006). Computational Methods in Developing Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR): A Review. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 9, 213–228.
- (31) Cherkasov, A. u. a. (2014). QSAR Modeling: Where Have You Been? Where Are You Going To? *Journal of Medicinal Chemistry* 57, 4977–5010.
- (32) Ziegler, S. u. a. (2013). Target identification for small bioactive molecules: Finding the needle in the haystack. *Angewandte Chemie - International Edition* 52, 2744–2792.
- (33) Green, N. M. (1963). Avidin - 1. The Use of [¹⁴C]Biotin for Kinetic Studies and for Assay. *The Biochemical Journal* 89, 585–91.
- (34) Weber, P. u. a. (1989). Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin. *Science* 243, 85–88.

- (35) Prestwich, G. D. und Dormán, G. (2000). Using photolabile ligands in drug discovery and development. *Tibtech* 18, 299–312.
- (36) Hatanaka, Y. und Sadakane, Y. (2002). Photoaffinity labeling in drug discovery and developments: chemical gateway for entering proteomic frontier. *Current topics in medicinal chemistry* 2, 271–288.
- (37) Kotzyba-Hibert, F., Kapfer, I. und Goeldner, M. (1995). Neue Entwicklungen bei der Photoaffinitätsmarkierung. *Angewandte Chemie* 107, 1391–1408.
- (38) Fleming, S. A. Chemical reagents in photoaffinity labeling., 1995.
- (39) Vodovozova, E. L. (2007). Photoaffinity labeling and its application in structural biology. *Biochemistry. Biokhimiia* 72, 1–20.
- (40) Das, J. Aliphatic diazirines as photoaffinity probes for proteins: Recent developments., 2011.
- (41) Olefsky, J. M. (2001). Nuclear Receptor Minireview Series. *J. Biol. Chem.* 276, 36863–36864.
- (42) Novac, N. und Heinzl, T. (2004). Nuclear Receptors: Overview and Classification. *Current Drug Target -Inflammation & Allergy* 3, 335–346.
- (43) Chinetti, G., Fruchart, J. C. und Staels, B. (2000). Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): Nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm. Res.* 49, 497–505.
- (44) Evans, R. M. (1988). The steroid and thyroid hormone superfamily. *Science* (80-). 240, 889–895.
- (45) Wurtz, J.-M. u. a. (1996). A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nature Structural Biology* 3, 87–94.
- (46) Harmon, G. S., Lam, M. T. und Glass, C. K. (2011). PPARs and lipid ligands in inflammation and metabolism. *Chemical Reviews* 111, 6321–6340.
- (47) Issemann, I. und Green, S. (1990). Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347, 645–650.

- (48) Bishop-Bailey, D. und Wray, J. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptors: A critical review on endogenous pathways for ligand generation. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators* 71, 1–22.
- (49) Kersten, S. (2002). Peroxisome proliferator activated receptors and obesity. *European journal of pharmacology* 440, 223–34.
- (50) Bocher, V. u. a. (2006). PPARs: Transcription Factors Controlling Lipid and Lipoprotein Metabolism. *Annals of the New York Academy of Sciences* 967, 7–18.
- (51) Maltarollo, V. G. u. a. (2018). Advances and Challenges in Drug Design of PPAR δ Ligands. *Curr. Drug Targets* 19, 144–154.
- (52) Murphy, G. J. und Holder, J. C. (2000). PPAR- γ agonists: therapeutic role in diabetes, inflammation and cancer. *Trends in Pharmacological Sciences* 21, 469–474.
- (53) Kim, T. G. u. a. (2009). Crystal structures of substrate and inhibitor complexes of ribose 5-phosphate isomerase A from *Vibrio vulnificus* YJ016. *Molecules and Cells* 27, 99–103.
- (54) Batista, F. A. H. u. a. (2012). Structural Insights into Human Peroxisome Proliferator Activated Receptor Delta (PPAR-Delta) Selective Ligand Binding. *PLoS ONE* 7, hrsg. von Pastore, A., e33643.
- (55) Schwarz, R. u. a. (2016). Monitoring Solution Structures of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor β/δ upon Ligand Binding. *PLOS ONE* 11, hrsg. von Müller, R., e0151412.
- (56) Wagner, G. u. a. (2010). StructureReactivity Relationships: Reactions of a 5-Substituted Aziadamantane in a Resorcin[4]arene-based Cavitand. *Organic Letters* 12, 332–335.
- (57) Müller, R. (2017). PPAR β/δ in human cancer. *Biochimie* 136, 90–99.
- (58) Liu, Y. u. a. (2018). The Role of PPAR- δ in Metabolism, Inflammation, and Cancer: Many Characters of a Critical Transcription Factor. *International Journal of Molecular Sciences* 19, 3339.

- (59) Sznajdman, M. L. u. a. (2003). Novel selective small molecule agonists for peroxisome proliferator-activated receptor δ (PPAR δ) - Synthesis and biological activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 13, 1517–1521.
- (60) Shearer, B. G. u. a. (2008). Identification and Characterization of a Selective Peroxisome Proliferator-Activated Receptor β/δ (NR1C2) Antagonist. *Molecular Endocrinology* 22, 523–529.
- (61) Shearer, B. G. u. a. (2010). Identification and Characterization of 4-Chloro- N -(2-{[5-trifluoromethyl]-2-pyridyl}sulfonyl)ethyl)benzamide (GSK3787), a Selective and Irreversible Peroxisome Proliferator-Activated Receptor δ (PPAR δ) Antagonist. *Journal of Medicinal Chemistry* 53, 1857–1861.
- (62) Naruhn, S. u. a. (2011). High-affinity peroxisome proliferator-activated receptor β/δ -specific ligands with pure antagonistic or inverse agonistic properties. *Molecular pharmacology* 80, 828–38.
- (63) Toth, P. M. u. a. (2012). Development of Improved PPAR β/δ Inhibitors. *ChemMedChem* 7, 159–170.
- (64) Toth, P. M. u. a. (2016). Design and Synthesis of Highly Active Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) β/δ Inverse Agonists with Prolonged Cellular Activity. *ChemMedChem* 11, 488–496.
- (65) Lieber, S. u. a. (2012). (Z)-2-(2-Bromophenyl)-3-{[4-(1-methyl-piperazine)amino]-phenyl}acrylonitrile (DG172): An Orally Bioavailable PPAR β/δ -Selective Ligand with Inverse Agonistic Properties. *Journal of Medicinal Chemistry* 55, 2858–2868.
- (66) Lieber, S. u. a. (2014). The Inverse Agonist DG172 Triggers a PPAR/ -Independent Myeloid Lineage Shift and Promotes GM-CSF/IL-4-Induced Dendritic Cell Differentiation. *Molecular Pharmacology* 87, 162–173.
- (67) Rubin, L. L. und de Sauvage, F. J. (2006). Targeting the Hedgehog pathway in cancer. *Nature Reviews Drug Discovery* 5, 1026–1033.

- (68) Schneider, J. W. u. a. (2008). Small-molecule activation of neuronal cell fate. *Nature Chemical Biology* 4, 408–410.
- (69) Schneider, J. und Hsieh, J. Chemical Inducers of Neurogenesis., 2008.
- (70) Zhang, L. u. a. (2011). Small-molecule blocks malignant astrocyte proliferation and induces neuronal gene expression. *Differentiation* 81, 233–242.
- (71) Petrik, D. u. a. (2012). Functional and mechanistic exploration of an adult neurogenesis-promoting small molecule. *The FASEB Journal* 26, 3148–3162.
- (72) Bettio, L. E. u. a. (2016). ISX-9 can potentiate cell proliferation and neuronal commitment in the rat dentate gyrus. *Neuroscience* 332, 212–222.
- (73) Bettio, L. E. B. u. a. (2017). Effects of Isx-9 and stress on adult hippocampal neurogenesis: Experimental considerations and future perspectives. *Neurogenesis* 4, e1317692.
- (74) Scheer, F. Entwicklung neuer selektiver inverser Agonisten für PPARbeta/delta., Diss., 2013.
- (75) Zhu, L. u. a. (2012). Luminescent Color Conversion on Cyanostilbene-Functionalized Quantum Dots via In-situ Photo-Tuning. *Advanced Materials* 24, 4020–4024.
- (76) Chung, J. W. u. a. (2013). High-Contrast On/Off Fluorescence Switching via Reversible E – Z Isomerization of Diphenylstilbene Containing the α -Cyanostilbenic Moiety. *The Journal of Physical Chemistry C* 117, 11285–11291.
- (77) Lu, H. u. a. (2014). Electrically switchable photoluminescence of fluorescent-molecule-dispersed liquid crystals prepared via photoisomerization-induced phase separation. *Journal of Materials Chemistry C* 2, 1386.
- (78) Toth, P. M. Entwicklung von Antagonisten und inversen Agonisten für den Peroxisom Proliferator aktivierten Rezeptor / auf Basis der Struktur von GSK0660., Diss., 2013.
- (79) Hatanaka, Y. u. a. (1994). A Novel Family of Aromatic Diazirines for Photoaffinity Labeling. *Journal of Organic Chemistry* 59, 383–387.

- (80) Song, M.-g. und Sheridan, R. S. (2011). Regiochemical Substituent Switching of Spin States in Aryl(trifluoromethyl)carbenes. *Journal of the American Chemical Society* 133, 19688–19690.
- (81) Udumula, V. u. a. (2016). Chemo- and Site-Selective Alkyl and Aryl Azide Reductions with Heterogeneous Nanoparticle Catalysts. *ACS Catalysis* 6, 4423–4427.
- (82) Chen, H. u. a. (2017). A General Strategy Toward Highly Fluorogenic Bioprobes Emitting across the Visible Spectrum. *Journal of the American Chemical Society* 139, 10157–10163.
- (83) Reetz, M. T., Peter, R. und Itzstein, M. V. (1987). Titanium-Mediated Stereoselective Knoevenagel Condensation of Ethyl (Diethoxyphosphoryl)acetate with Aldehydes. *Chemische Berichte* 120, 121–122.
- (84) Wang, C. u. a. (2016). Chemoproteomics-Enabled Discovery of a Potent and Selective Inhibitor of the DNA Repair Protein MGMT. *Angew. Chemie Int. Ed.* 55, 2911–2915.
- (85) Okoth, R. und Basu, A. (2013). End-labeled amino terminated monotelechelic glycopolymers generated by ROMP and Cu(I)-catalyzed azide–alkyne cycloaddition. *Beilstein J. Org. Chem.* 9, 608–612.
- (86) Fusz, S. u. a. (2008). Photocleavable Initiator Nucleotide Substrates for an Aldolase Ribozyme. *J. Org. Chem.* 73, 5069–5077.
- (87) Hur, W. u. a. (2010). A Small-Molecule Inducer of the Antioxidant Response Element. *Chem. Biol.* 17, 537–547.
- (88) Vollhardt, K. P. C. und Schore, N. E., *Organische Chemie*, Vierte Auf; Wiley VCH: 2005.
- (89) Shire, K. u. a. (1999). EBP2, a human protein that interacts with sequences of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 important for plasmid maintenance. *Journal of virology* 73, 2587–95.

- (90) Chevillard, F. und Kolb, P. (2015). SCUBIDOO: A Large yet Screenable and Easily Searchable Database of Computationally Created Chemical Compounds Optimized toward High Likelihood of Synthetic Tractability. *Journal of Chemical Information and Modeling* 55, 1824–1835.
- (91) Kruse, A. C. u. a. (2013). Activation and allosteric modulation of a muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* 504, 101–106.
- (92) Chiu, P. L. u. a. (2005). Synthesis, Structural Characterization, Computational Study, and Catalytic Activity of Metal Complexes Based on Tetradentate Pyridine/N-Heterocyclic Carbene Ligand. *Organometallics* 24, 6169–6178.
- (93) He, Y.-P. u. a. (2011). Biphenomycin B and Derivatives: Total Synthesis and Transition Inhibition. *Chemistry - An Asian Journal* 6, 1546–1556.
- (94) Bellina, F., Caucheruccio, S. und Rossi, R. (2006). Palladium- and Copper-Mediated Direct C-2 Arylation of Azoles - Including Free (NH)-Imidazole, -Benzimidazole and -Indole - Under Base-Free and Ligandless Conditions. *European Journal of Organic Chemistry* 2006, 1379–1382.
- (95) Joule, J. A. und Mills, K., *Heterocyclic Chemistry*, Fifth Edit; Wiley & Sons, Ltd.: 2010.
- (96) Radwan, M. A. und El-Zemity, S. R. (2001). Synthesis and molluscicidal structure-activity relationships of some novel 1,2,4-triazole N-methyl carbamates. *Pest Management Science* 57, 707–712.
- (97) Li, Z., Zhu, A. und Yang, J. (2012). One-Pot Three-Component Mild Synthesis of 2-Aryl-3-(9-alkylcarbazol-3-yl)thiazolin-4-ones. *Journal of heterocyclic chemistry* 49, 1458–1461.
- (98) Bai, G.-y. u. a. (2011). A Facile and Efficient Synthesis of 2-Imidazolines from Aldehydes Using Hydrogen Peroxide and Substoichiometric Sodium Iodide. *Synthesis* 2011, 1599–1603.

- (99) Lau, G. P. S. u. a. (2016). New Insights Into the Role of Imidazolium-Based Promoters for the Electroreduction of CO₂ on a Silver Electrode. *Journal of the American Chemical Society* 138, 7820–7823.
- (100) Davidson, H. und Johnson, K. T. Styryl-Diphenyl Derivatives., 1973.
- (101) Fulmer, G. R. u. a. (2010). NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Common Laboratory Solvents, Organics, and Gases in Deuterated Solvents Relevant to the Organometallic Chemist. *Organometallics* 29, 2176–2179.
- (102) Lipford, G. B. und Zepp, C. M. Quinazoline Derivative Useful as Toll-Like Receptor Agonist., 2008.
- (103) Chen, D. u. a. (2014). Discovery of potent N-(isoxazol-5-yl)amides as HSP90 inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* 87, 765–781.
- (104) Athuluri-Divakar, S. K. u. a. (2016). A Small Molecule RAS-Mimetic Disrupts RAS Association with Effector Proteins to Block Signaling. *Cell* 165, 643–655.
- (105) Russell, J. L. u. a. (2012). Regulated Expression of pH Sensing G Protein-Coupled Receptor-68 Identified through Chemical Biology Defines a New Drug Target for Ischemic Heart Disease. *ACS Chemical Biology* 7, 1077–1083.
- (106) Han, Y. T. u. a. (2014). Pyrazole-5-carboxamides, novel inhibitors of receptor for advanced glycation end products (RAGE). *European Journal of Medicinal Chemistry* 79, 128–142.
- (107) Ishihara, M. und Togo, H. (2006). An Efficient Preparation of 2-Imidazolines and Imidazoles from Aldehydes with Molecular Iodine and (Diacetoxyiodo)benzene. *Synlett*, 227–230.

10 Anhang

10.1 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Lukas Dempwolff
Geburtsort, -datum: Hannover, 07.10.1990
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Akademische Ausbildung:

Mai '15 - Februar '19 Promotion (Dr. rer. nat.): Philipps-Universität Marburg;
Prof. Dr. Wibke E. Diederich

Oktober '12 - Januar '15 Master (M. Sc.): Leibniz Universität Hannover;
Natur- und Wirkstoffchemie
Prof. Dr. Tanja Gaich

ERASMUS: Stockholms Universitet, Schweden;
Prof. Dr. Kálmán J. Szabó

Oktober '09 - September '12 Bachelor (B. Sc.): Leibniz Universität Hannover;
Chemie
Prof. Dr. Andreas Kirschning

Schulische Ausbildung:

August '00 - Mai '09 Sek. I/II: KGS Albert-Einstein-Schule, Laatzen

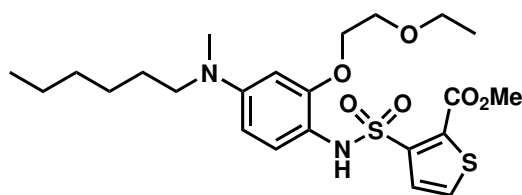
August '96 - Juni '00 Grundschule am Sandberge, Hannover

10.2 Summary

Ligand-based Drug Design for Target Elucidation and Development of Novel Transcription Modulators

The studies encompassed three main and several side projects, of which only the major projects will be discussed within this summary.

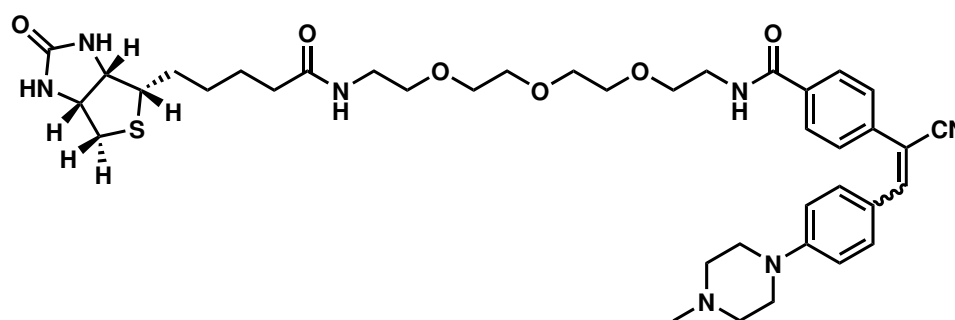
The first project dealt with the structural modification of previously in-house identified PPAR β/δ inverse agonists aimed for the generation of photoaffinity probes, which potentially should enable the resolution of the yet unknown binding mode of the two distinct compound classes *via* photoaffinity labeling. While the modulators originate from two different series, only one could be used for further structural modifications. It could be demonstrated, that the cyanostilbene derived so called “DG-series” underwent a presumable light-induced (*E*)/(*Z*)- isomerization instead of generating the desired radical. Potential probes from the so called “ST-series” derived ligands were synthesized, however, could unfortunately not be isolated from a mixture of several by-products. Another approach of generating a N-methylated, potential inverse agonist resulted in the synthesis of **98** (Figure 59), which failed to qualify as a potent candidate for the additional introduction of PA functions.



98

Figure 59: **98** as a potential starting point for the optimization towards photoaffinity probes, which, however, could not be classified as a PPAR β/δ inverse agonist.

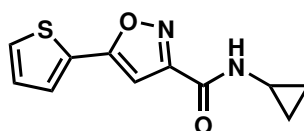
In order to identify the off-target of compound DG172 **52** an affinity probe was designed for further pull-down experiments. Based on the basis of the previously reported SAR, a novel ligand of the “DG-series” was successfully developed and was proven to not exhibit any affinity towards the PPAR β/δ ligand binding domain. In utilizing a broadly applied biotin-linker methodology, the final probe **112** (**Figure 60**) was generated *via* a traditional coupling approach. At the time of writing, the pull-down assays were still ongoing.



112

Figure 60: The affinity probe **112** for the determination of the off-target of DG172.

The final project is a cooperation with the group of Prof. Dr. Matthias Lauth dealing with the optimization of a potential Hedgehog pathway modulator ISX-9 **54** (**Figure 61**).



54

Figure 61: The potential Hedgehog modulator ISX-9 **54**.

Overall three ligand series were synthesized to deduce the underlying structure-activity relationship. One series included the systematical variation of the central core structure, which seems to be indispensable for the observed biological effect. In the other two series, the substituents in 3- and 5-position were systematically altered, however, only one of the compounds was more active. Finally, the generation of affinity probes, e.g. **165** (**Figure 62**), lead to the discovery of three nucleus-based, potential protein targets after pull-down experiments.

Moreover, a fluorescence probe **167** was synthesized in order to validate the pull-down results.

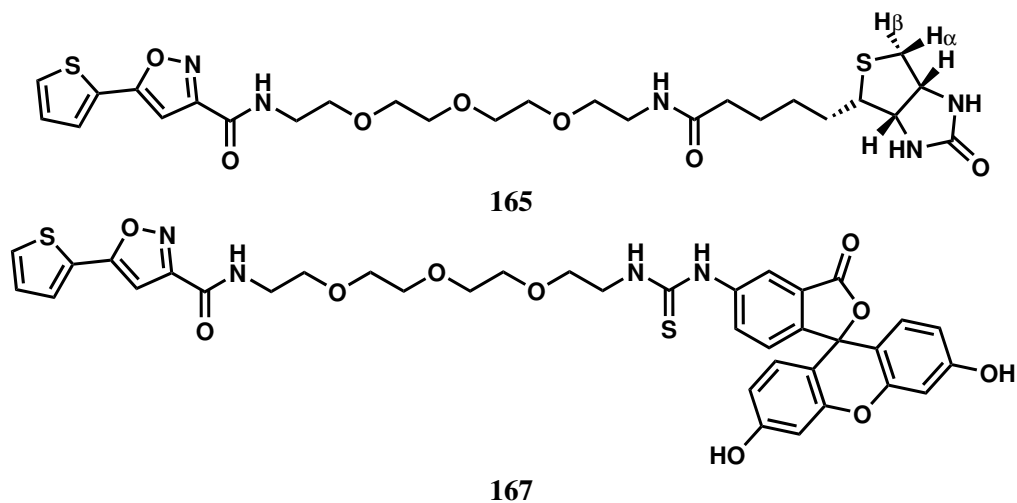


Figure 62: The affinity probe **165**, as well as the fluorescence probe **167** for the determination and validation of target proteins.