

UNIVERSITÄT
DUISBURG
ESSEN

Offen im Denken

ZMB

Zentrum für Medizinische Biotechnologie
Center of Medical Biotechnology

Dissertation

Stefan Kleine

2021

**Synthese und biologische Validierung hetero-
bifunktionaler Moleküle zum gerichteten
Proteinabbau in Bakterien**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für Biologie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Stefan Kleine

aus Rotenburg (a. d. Wümme)

Februar 2021

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden chemischen Synthesen und Experimente wurden am Zentrum für Medizinische Biotechnologie in der Abteilung Chemische Biologie der Universität Duisburg-Essen unter der Anleitung von Prof. Dr. Markus Kaiser durchgeführt. Die beschriebenen biochemischen und biologischen Validierungsexperimente erfolgten in Kooperation in der Arbeitsgruppe von Dr. Tim Clausen am Forschungsinstitut für Molekulare Pathologie (IMP) in Wien.

1. Gutachter: Prof. Dr. Markus Kaiser

2. Gutachter: Dr. Tim Clausen

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Stefan Westermann

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Mai 2021

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT
DUISBURG
ESSEN
Offen im Denken

ub | universitäts
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/74746
URN: urn:nbn:de:hbz:465-20231031-105728-3

Alle Rechte vorbehalten.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	8
Abbildungsverzeichnis	10
Tabellenverzeichnis.....	13
Zusammenfassung/Summary.....	14
1. Einleitung.....	16
1.1. Ubiquitin vermittelter Proteinabbau in Eukaryoten	16
1.2. Proteinabbau in Bakterien.....	17
1.3. PROTAC	19
1.4. Cyclomarin.....	25
2. Zielsetzung.....	28
3. Ergebnisse und biologische Validierung	30
3.1. Phosphorylierte bacPROTACs	30
3.2. Canavaninhaltige bacPROTACs	36
3.3. Cyclomarinderivate	44
3.4. Cyclomarin-bacPROTACs	63
4. Zusammenfassung und Ausblick.....	89
5. Experimenteller Teil.....	93
5.1. Geräte und Chemikalien	93
5.2. Synthese der phosphorylierten bacPROTACs	94
5.2.1. Allgemeine Synthesevorschrift 1: Harzbeladung	94
5.2.2. Allgemeine Synthesevorschrift 2: Festphasensynthese	95
5.2.3. Allgemeine Synthesevorschrift 3: Abspaltung der Peptide vom Harz.....	95
5.2.4. Allgemeine Synthesevorschrift 4: Hydrierung und finale Aufreinigung.....	96
5.3. Phosphorylierte bacPROTACs	96

5.3.1.	bacPROTAC_01	96
5.3.2.	bacPROTAC_02	97
5.3.3.	bacPROTAC_03	98
5.4.	Canavaninhaltige PROTACs.....	98
5.4.1.	Cav_bacPROTAC_01	99
5.4.1.1.	Boc-DOOA-(+)-JQ1 (50).....	99
5.4.1.2.	Fmoc-L-Cav(Boc)-DOOA-(+)-JQ1 (51).....	99
5.4.1.3.	Acetyl-L-Cav(Boc)-DOOA-(+)-JQ1 (52).....	100
5.4.1.4.	Acetyl-L-pCav(Tce) ₃ -DOOA-(+)-JQ1 (53)	101
5.4.1.5.	Acetyl-L-pCav-DOOA-(+)-JQ1 (<i>Cav_bacPROTAC_01</i>) (54).....	102
5.4.2.	Cav_bacPROTAC_02	102
5.4.2.1.	Acetyl-L-pCav(OEt) ₂ -DOOA-(+)-JQ1 (<i>Cav_bacPROTAC_02</i>) (55).....	102
5.4.3.	Cav_bacPROTAC_03	103
5.4.3.1.	Acetyl-L-pCav(POM) ₂ -DOOA-(+)-JQ1 (<i>Cav_bacPROTAC_03</i>) (56).....	103
5.5.	Synthese der Cyclomarinderivate	104
5.5.1.	Allgemeine Synthesevorschrift 1: Harzbeladung	104
5.5.2.	Allgemeine Synthesevorschrift 2: Festphasensynthese	104
5.5.3.	Allgemeine Synthesevorschrift 3: Abspaltung der linearen Peptide vom Harz	105
5.5.4.	Allgemeine Synthesevorschrift 4: Zyklisierung in Lösung	105
5.5.5.	Allgemeine Synthesevorschrift 5: Schutzgruppenabspaltung und Reinigung	106
5.6.	Cyclomarinderivate und Cym_bacPROTACs	108
5.6.1.	Cym_1	108
5.6.2.	Cym_2	109
5.6.3.	Cym_3	110
5.6.4.	Cym_4	111

5.6.5.	Cym_5	112
5.6.6.	Cym_6	113
5.6.7.	Cym_7	114
5.6.8.	Cym_8	115
5.6.9.	Cym_9	116
5.6.10.	Cym_10	117
5.6.11.	Cym_11	118
5.6.12.	Cym_12	119
5.6.13.	Cym_13	120
5.6.14.	Cym_14	121
5.6.15.	Cym_15	122
5.6.16.	Cym_bacPROTAC_01	123
5.6.17.	Cym_bacPROTAC_02	124
5.6.18.	Cym_bacPROTAC_03	125
5.6.19.	Cym_bacPROTAC_04	126
5.6.20.	Cym_bacPROTAC_05	128
5.6.21.	Cym_bacPROTAC_06	129
5.6.22.	Cym_bacPROTAC_07	130
5.6.23.	Cym_bacPROTAC_08	132
5.7.	Synthese der Verbindungen	133
5.7.1.	Fmoc-N-Me-L-Glu(tBu)-OAll (1)	133
5.7.2.	Fmoc-N-Me-L-Glu-OAll (2)	134
5.7.3.	Fmoc-N-Me-L-Nva-OAll (3)	134
5.7.4.	Fmoc-N-Me-L-Nva(OTBDMS)-OAll (4)	135
5.7.5.	Fmoc-N-Me-L-Nva(OTBDMS)-OH (5)	136
5.7.6.	Phth-L-Phe(3R-OH)-OH (6)	137

5.7.7.	Phth-L-Phe(3 <i>R</i> -MeO)-OMe (7).....	138
5.7.8.	Fmoc-L-Phe(3 <i>R</i> -MeO)-OMe (8).....	138
5.7.9.	Fmoc-L-Phe(3 <i>R</i> -MeO)-OH (9).....	139
5.7.10.	Fmoc-L-tryptophan-methylester (10).....	140
5.7.11.	Fmoc-L- <i>N'</i> - <i>tert</i> -prenyl-tryptophan-methylester (11)	141
5.7.12.	Fmoc-L- <i>N'</i> - <i>tert</i> -prenyl-tryptophan (12)	142
5.7.13.	(<i>S,E</i>)- <i>N</i> -Boc-glycin-(3-penten-2-yl)-ester (13).....	142
5.7.14.	(2 <i>S</i> ,3 <i>R,E</i>)- <i>N</i> -Boc-2-amino-3-methylhex-4-ensäure (14).....	143
5.7.15.	(2 <i>S</i> ,3 <i>R,E</i>)-2-amino-3-methylhex-4-ensäure (15).....	144
5.7.16.	(2 <i>S</i> ,3 <i>R,E</i>)- <i>N</i> -Fmoc-2-amino-3-methylhex-4-ensäure (16).....	144
5.7.17.	Fmoc-L-Glu(TOTA-Biotin)- <i>Ot</i> Bu (17).....	145
5.7.18.	Fmoc-L-Glu(TOTA-Biotin)-OH (18).....	146
5.7.19.	Pemetrexed-Methylester (19)	146
5.7.20.	Boc-TOTA-Pemetrexed-Methylester (20).....	147
5.7.21.	Fmoc-L-Glu(TOTA-Pemetrexed-Methylester)-OH (21).....	148
5.7.22.	4-((2,4-Diaminopyrimidin-5-yl)methyl)-2,6-dimethoxyphenol (22).....	149
5.7.23.	2-(4-((2,4-Diaminopyrimidin-5-yl)methyl)-2,6-dimethoxyphenoxy)essigsäure methylester (23)	150
5.7.24.	2-(4-((2,4-Diaminopyrimidin-5-yl)methyl)-2,6-dimethoxyphenoxy)essigsäure (24).....	150
5.7.25.	Boc-TOTA-TMP (25)	151
5.7.26.	Fmoc-L-Glu(TOTA-TMP)- <i>Ot</i> Bu (26).....	152
5.7.27.	Fmoc-L-Glu(TOTA-TMP)-OH (27)	153
5.7.28.	Boc-TOTA-(+)JQ1 (28)	153
5.7.29.	Fmoc-L-Glu(TOTA-(+)JQ1)- <i>Ot</i> Bu (29).....	154
5.7.30.	Fmoc-L-Glu(TOTA-(+)JQ1)-OH (30).....	155

5.7.31.	Boc-TOTA-(-)JQ1 (31)	156
5.7.32.	Fmoc-L-Glu(TOTA-(-)JQ1)-OtBu (32).....	156
5.7.33.	Fmoc-L-Glu(TOTA-(-)JQ1)-OH (33).....	157
5.7.34.	(1 <i>R</i>)-1,1-Dimethylethyl[3-[3-(3,4-dimethoxyphenyl)-1-hydroxypropyl]phenoxy]-acetat (34).....	158
5.7.35.	(1 <i>R</i>)-3-(3,4-Dimethoxyphenyl)-1-[3-(<i>t</i> -butoxycarbonylmethoxy)phenyl]-1-propyl-(2 <i>S</i>)-1-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-2-piperidinecarboxylate (35) .	159
5.7.36.	SLF-CO ₂ <i>t</i> Bu (36).....	160
5.7.37.	SLF-CO ₂ H (37).....	160
5.7.38.	SLF-TOTA-Boc (38)	161
5.7.39.	Fmoc-L-Glu(TOTA-SLF)-OtBu (39).....	162
5.7.40.	Fmoc-L-Glu(TOTA-SLF)-OH (40)	163
5.7.41.	Z-L-pArg(Tce) ₂ -OBn (41).....	164
5.7.42.	Fmoc-L-pArg(Tce) ₂ -OH (42)	165
5.7.43.	Pemetrexed (43)	166
5.7.44.	Pemetrexed-Diglutamat (44).....	167
5.7.45.	Tris(POM)phosphat (45)	168
5.7.46.	Bis(POM)phosphat (46)	169
5.7.47.	Chlorobis(POM)phosphat (47).....	169
5.7.48.	Pemetrexed-Diglutamat-Dimethylester (48).....	170
5.7.49.	Boc-TOTA-PMX(GluOMe) ₂ (49).....	171
6.	Literaturverzeichnis	173
7.	Anhang	186
7.1.	Lebenslauf	186
7.2.	Danksagung	186

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
ADHA	engl. <i>(2S,3R)-2-amino-3,5-dimethylhex-4-enoic acid methyl ester</i>
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Cbz	Benzyloxycarbonyl
DCM	Dichlormethan
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DMAP	Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
ESI	Elektrospray-Ionisierung
FA	engl. <i>formic acid</i> , Ameisensäure
FKBP	engl. <i>FK506-binding protein</i>
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorphosphat
HBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HFIP	Hexafluoroisopropanol
HRMS	engl. <i>high resolution mass spectrometry</i> , hochauflösende Massenspektrometrie

Abkürzungsverzeichnis

HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBT	1-Hydroxybenzotriazol
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
NMR	engl. <i>nuclear magnetic resonance</i> , Kernspinresonanzspektroskopie
NTD	N-terminale Domäne
PMX	Pemetrexed
PPI	Protein-Protein-Interaktion
PROTAC	engl. <i>proteolysis targeting chimera</i>
SEC	engl. <i>size exclusion chromatography</i> , Größenausschlusschromatographie
SLF	engl. <i>synthetic ligand for FKBP</i>
TBAF	<i>tert</i> -Butylammoniumfluorid
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TBDMSOTf	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyltriflat
Tce	Trichloroethyl
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
ThyA	Thymidylatsynthase A
TMP	Trimethoprim
TMSO	Trimethylsilyl
TMSOTf	Trimethylsilyltriflat
TSA	engl. <i>Thermal shift assay</i>
T3P	Propylphosphorsäureanhydrid

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Proteinabbau durch das Proteasom.	17
Abbildung 1.2: Proteinabbau durch die ClpC AAA+-ATPase ClpC1 und den ClpP-Proteasekomplex ClpP1/P2 aus Mycobakterien.	18
Abbildung 1.3: Allgemeines Funktionsprinzip eines PROTACs.	20
Abbildung 1.4: Der erstmalig 2001 publizierte peptidische PROTAC von Sakamoto <i>et al.</i>	21
Abbildung 1.5: Chemische Struktur des ersten Small-Molecule-basierten PROTACs von Schneekloth und Crews.	21
Abbildung 1.6: Photoschaltbarer PROTAC von Pfaff <i>et al.</i>	23
Abbildung 1.7: A: Homo-bifunktionaler PROTAC zum Selbstabbau der E3-Ligase CRBN. B: hetero-bifunktionaler PROTAC zum Abbau von CRBN.	23
Abbildung 1.8: Chemische Strukturen der Naturstoffe Cyclomarin A-D.	25
Abbildung 1.9: A: Phosphoryliertes Arginin als Ersatz bzw. Analogon für natürliche Substrate des Proteins B: Chemische Struktur von Desoxy-Cyclomarin C.	26
Abbildung 3.1: Strukturen der bacPROTAC 1-3.	30
Abbildung 3.2: Synthese von Fmoc-pArg(Tce) ₂ -OH, in Analogie zur Syntheseroute von Hofmann <i>et al.</i>	31
Abbildung 3.3: Allgemeine Syntheseroute für bacPROTAC 1-3.	32
Abbildung 3.4: Bindungsaffinitäten und K _D -Werte von bacPROTAC_03.	33
Abbildung 3.5: <i>in-vitro</i> -Abbau von mSA und Streptavidin-Fusionsproteinen mit bacPROTAC_03 durch ClpCP aus <i>Bacillus subtilis</i>	34
Abbildung 3.6: Vergleich der chemischen Strukturen von L-Canavanin (A) und L-Arginin (B).	36
Abbildung 3.7: (+)-JQ1 im Komplex mit Brd4 (PDB-Code 4FLP).	37
Abbildung 3.8: Synthese von Acetyl-L-Cav(Boc)-DOOA-(+)-JQ1 (52)	38
Abbildung 3.9: Synthesen von Cav_bacPROTAC_01-03, ausgehend von Acetyl-L-Cav(Boc)-DOOA-(+)-JQ1 (52).	39
Abbildung 3.10: Syntheseroute von Chlorobis(POM)phosphat (47).	40
Abbildung 3.11: Stabilitätstest von Cav_bacPROTAC_01 (A) und einem entsprechenden Argininderivat (B) bei pH 4 zu unterschiedlichen Zeitpunkten (LC-Messungen).	41

Abbildung 3.12: <i>in vitro</i> Abbau von BRDT durch Cav_bacPROTAC_01 nach 2 Stunden Inkubationszeit.	43
Abbildung 3.13: Chemische Struktur von Cyclomarin C (A) und Desoxy-Cyclomarin C (B)	44
Abbildung 3.14: Übersicht über die synthetisierte Aminosäuren für die Darstellung der anvisierten Cyclomarinderivaten.	44
Abbildung 3.15: Syntheseroute zur Darstellung von Fmoc- <i>N</i> -Me-L-Nva(OTBDMS)-OH (5) ...	45
Abbildung 3.16: Syntheseroute zur Darstellung von Fmoc-L-Phe(3 <i>R</i> -MeO)-OH (9)	46
Abbildung 3.17: Syntheseroute zur Darstellung von Fmoc-L- <i>N'</i> - <i>tert</i> -prenyl-tryptophan (12)	47
Abbildung 3.18: Vorgeschlagener Mechanismus für die Prenylierung von Tryptophan	48
Abbildung 3.19: Syntheseroute zur Darstellung von (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> , <i>E</i>)- <i>N</i> -Fmoc-2-amino-3-methylhex-4-ensäure (16)	49
Abbildung 3.20: Mechanismus der Claisen-Ireland-Umlagerung von Verbindung 13 zu Verbindung 14	50
Abbildung 3.21: Mechanismus der Fmoc-Abspaltung (1) mit anschließender Diketopiperazinbildung und Abspaltung des Allylesters (2) während der Cyclomarin synthese.	51
Abbildung 3.22: Allgemeines Syntheseschema der Festphasensynthese zur Darstellung von Cyclomarinderivaten.	52
Abbildung 3.23: Struktur von Propylphosphorsäureanhydrid T3P	53
Abbildung 3.24: Allgemeine Grundstruktur der synthetisierten Cyclomarinderivate	54
Abbildung 3.25: Ausschnitt der Kristallstruktur von ClpC1 _{NTD} in Komplex mit Cyclomarin A (PDB-Code 3WDC)	57
Abbildung 3.26: Cym_8 im Komplex mit ClpC1 _{NTD}	60
Abbildung 3.27: Cym_8 im Komplex mit ClpC1 _{NTD}	62
Abbildung 3.28: Allgemeine Struktur der Cyclomarin-basierten Cym_bacPROTACs.....	64
Abbildung 3.29: Syntheseroute zur Darstellung von Fmoc-L-Glu(TOTA-Biotin)-OH (18).....	65
Abbildung 3.30: Vergleich der bacPROTAC-induzierten <i>in vitro</i> -Verdaus von mSA-Kre durch den Cyclomarin-basierten PROTAC Cym_bacPROTAC_02 (A) und den Arginin-phosphorylierten PROTAC bacPROTAC_03 (B).....	66
Abbildung 3.31: Vergleich der Bindungsaffinitäten von bacPROTAC_03 (A) und Cym_bacPROTAC_02 (B) an die mykobakterielle ClpC1-Domäne.	67
Abbildung 3.32: Syntheseroute zur Darstellung von SLF (37).	69

Abbildung 3.33: Synthese zur Darstellung von Fmoc-L-Glu(TOTA-SLF)-OH (40).....	70
Abbildung 3.34: Chemische Strukturen einiger ausgewählter Antifolate aus der Gruppe der Diaminopyrimidine.....	71
Abbildung 3.35: Trimethoprim im Komplex mit der mykobakteriellen Dihydrofolatreduktase (PDB-Code 1DG5).	72
Abbildung 3.36: Synthese von Fmoc-L-Glu(TOTA-TMP)-OH (27).....	73
Abbildung 3.37: Synthese von Fmoc-L-Glu(TOTA-(+)JQ1)-OH (30).	76
Abbildung 3.38: Synthese von Fmoc-L-Glu(TOTA-(-)JQ1)-OH (33).....	77
Abbildung 3.39: Analyse des durch Cym_bacPROTAC_05 induzierten <i>in vitro</i> Abbaus von BRDT durch ClpC1P1P2 mittels SDS-PAGE nach zweistündiger Inkubation.	78
Abbildung 3.40: Analyse des Abbauxperiments mit Cym_bacPROTAC_06 mittels SDS-PAGE nach zweistündiger Inkubation.	79
Abbildung 3.41: Kapillar-Western-Blot des <i>in vivo</i> Abbauxperiments in <i>Mycobacterium smegmatis</i>	80
Abbildung 3.42: Proteomanalyse des <i>in vivo</i> Abbaus von BRDT in <i>Mycobacterium smegmatis</i> durch Cym_bacPROTAC_05.	81
Abbildung 3.43: ITC-Messungen zur Ermittlung der Bindungsaffinitäten zwischen Cym_bacPROTAC_05 und BRDT (A) bzw. ClpC1 (B).....	81
Abbildung 3.44: Chemische Struktur von Pemetrexed in Form des Monoglutamats (A) und als Pentaglutamat (B).....	82
Abbildung 3.45: Kristallstruktur von mykobakterieller Thymidylatsynthase A im Komplex mit Pemetrexed Monoglutamat (PDB 4FQS).....	83
Abbildung 3.46: SDS-PAGE Analyse des <i>in vitro</i> Abbaus von ThyA (rechte Bahn) durch ClpC1P1P2 im Vergleich zu BRDT (linke Bahn) nach 2 Stunden.....	83
Abbildung 3.47: Synthese von Fmoc-L-Glu(TOTA-Pemetrexed-Methylester)-OH (21).....	84
Abbildung 3.48: Mittels <i>Thermal Shift Assay</i> auf Bindung zu mykobakterieller Thymidylatsynthase A untersuchte Verbindungen.....	85
Abbildung 3.49: Festphasensynthesen von Pemetrexed (43) und Pemetrexed-Diglutamat (44).	86
Abbildung 3.50: Struktur von Cym_bacPROTAC_08.....	88

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Übersicht ausgewählter Chaperone und Proteasen aus <i>E. coli</i>	19
Tabelle 1.2: Auswahl gängiger E3-Ligase-Binder..	22
Tabelle 1.3: Auswahl einiger publizierter PROTACs mit Angabe der rekrutierten E3-Ligase und dem erfolgreich abgebauten Targetprotein.	24
Tabelle 3.1: Synthetisierte Cyclomarinderivate.....	55
Tabelle 3.2: MIC- und K_D -Werte der synthetisierten Peptide.	55
Tabelle 3.3: Synthetisierte Cym_bacPROTACs.....	64
Tabelle 3.4: Resultate der TSA-Messung..	87
Tabelle 5.1: Gradientenprogramme für die Aufreinigung der finalen Substanzen.....	94

Zusammenfassung/Summary

Proteolysis targeting chimera, auch bekannt als PROTACs, sind mittlerweile etablierte chemische Werkzeuge zum gerichteten Proteinabbau in eukaryotischen Zellen. Besonders im Bereich der Krebsforschung werden die Einsatzmöglichkeiten dieser Technologie inklusive einer Anwendung als mögliche alternative Chemotherapeutika zurzeit intensiv erforscht.

In der vorliegenden Arbeit wurde nun untersucht, ob dieses erfolgreiche Konzept auch auf bakterielle Systeme übertragen werden kann. Hierzu wurden erstmals bacPROTACs (für bakteriengerichtete PROTACs) entwickelt und in biochemischen und biologischen Testsystemen validiert. Als zu adressierendes Proteolysesystem wurde dabei der intrazelluläre ClpCP-Proteasekomplex ausgewählt, für den vor Beginn der Arbeiten bereits verschiedene Bindemoleküle in der Literatur beschrieben waren. Im Rahmen der Arbeit wurden dementsprechend verschiedene hetero-bifunktionale Moleküle wie z. B. Phosphorarginin- bzw. Phosphocanavanin oder Cyclomarin-basierte bacPROTACs synthetisiert und deren Funktionalität in verschiedenen biochemischen und biologischen Testsystemen untersucht. So gelang es zum Beispiel, bacPROTACs zum zielgerichteten Abbau von Streptavidin-Fusionsproteinen als auch in *M. smegmatis* überexprimierten Testproteinen wie dem humanen Protein BRDT zu entwickeln. Zur Untersuchung des Potentials der bacPROTACs in der Antibiotikaforschung wurden zudem erste erfolgversprechende Versuche zum Abbau von endogenen bakteriellen Zielproteinen durchgeführt.

Zusammenfassend konnte somit im Rahmen der Arbeit somit erstmals ein bakterielles bacPROTAC-System etabliert werden.

Summary

Proteolysis targeting chimera, also known as PROTACs, are nowadays well-established chemical tools for the targeted degradation of proteins in eukaryotic cells. Particularly in the field of cancer research, diverse studies not only on their application as research tools but also as novel chemotherapeutics are currently undertaken.

In the present thesis, a potential transfer of this emerging technology to bacterial organisms is investigated. To this end, bacPROTACS (as an abbreviation for bacteria-directed PROTACs)

were developed and extensively evaluated in various biochemical and biological assays. The intracellular bacterial ClpCP degradation system was chosen as the target proteolysis system for bacPROTAC development due to the availability of different ClpCP targeting small molecule binders. Accordingly, several heterobifunctional bacPROTACS, e.g. harbouring a phospho arginine, a phospho canavanine or a cyclomarin moiety were synthesized and their scope as bacPROTACS in different biochemical and biological degradation assays evaluated. For example, successful targeted degradation of streptavidin fusion proteins or of a heterologously expressed BRDT protein in bacterial cells were achieved. To gain also first insights into their antibiotic potential, bacPROTACS for degrading endogenic proteins were also generated.

Overall, the present thesis thus describes the first successful establishment of a bacterial PROTAC approach.

1. Einleitung

1.1. Ubiquitin vermittelter Proteinabbau in Eukaryoten

Das Proteom, die Gesamtheit aller in einer Zelle zu einem definierten Zeitpunkt vorliegenden Proteine, ist hochdynamisch und unterliegt ständigen Schwankungen in der Zusammensetzung und Anzahl der vorhandenen Proteine [1]. Die Regulation biologischer Prozesse erfolgt durch eine zielgerichtete Veränderung des Proteoms und entscheidet damit z. B. welche Vorgänge innerhalb der Zelle zu einem gegebenen Zeitpunkt gerade ablaufen oder pausieren. Den Begriff des Proteoms unterteilt man zusätzlich in das sogenannte zellspezifische Proteom und dem zentralen Proteom [2]. Letzteres stellt die Schnittmenge aus allen zellspezifischen Proteomen dar, also die Proteine, die unabhängig vom Zelltyp in jeder Zelllinie in exprimierter Form vorkommen [2].

Regulierte Proteolyse in Zusammenarbeit mit kontrollierter Expression von Proteinen stellt sicher, dass in einer Zelle nur die Proteine vorhanden sind, die zu einem bestimmten Zeitpunkt benötigt werden. Hierdurch wird unter anderem gewährleistet, dass keine unerwünschten Proteinaktivitäten in der Zelle auftreten. Störungen dieser Mechanismen bewirkt häufig die Entstehung diverser Krankheiten, wie z.B. das Auftreten neurodegenerativer Erkrankungen durch massive Proteinaggregationen oder die Entstehung von Krebs [3] [4]. Daher ist es notwendig, dass Zellen über effiziente Mechanismen zum Abbau nicht mehr benötigter Proteine verfügen. Gleiches gilt für Proteine, deren Faltung nicht korrekt erfolgt ist. Auch diese müssen ebenso effizient aus der Zelle entfernt werden.

Dies geschieht in eukaryotischen Zellen über eine Vielzahl unterschiedlicher Proteolysemechanismen. Einer der wichtigsten ist dabei der Proteinabbau durch das Ubiquitin-Proteasom-System. Das Proteasom ist ein proteolytisch-wirkender Proteinkomplex, der eine wichtige Rolle in der zellulären Proteostase durch den selektiven Abbau von zuvor posttranslational ubiquitinierten Proteinen spielt [4] [5] [6]. Die Polyubiquitinierung eines Proteins wirkt als ein molekularer Marker zum Proteinabbau. Diese werden vom Proteasom als Substrate erkannt (d.h. gebunden) und in einem zweiten Schritt proteolytisch abgebaut. Allerdings reicht der Ubiquitin-Tag allein noch nicht aus, um eine schnelle Hydrolyse des Proteins durch das Proteasom zu bewirken. Als katalytische bzw. den Abbau induzierenden Elemente spielen des Weiteren unstrukturierte Bereiche innerhalb des Proteins eine wichtige Rolle, deren

Entfaltung und Abbau besonders leicht erfolgen kann, so dass sie die Proteinhydrolyse gewissermaßen katalysieren [7] [8].

Der mehrstufige Prozess der Polyubiquitinierung beginnt mit der ATP-abhängigen Übertragung von Ubiquitin auf die E1-Ubiquitin-Protein-Ligase [9]. Dies geschieht über die Bildung eines Thioesters zwischen dem C-terminalen Glycins des Ubiquitins und dem Thiol eines katalytisch-aktiven Cysteins der E1-Ligase [10] [11]. Das so gebundene Ubiquitin wird dann auf ein Cystein im katalytischen Zentrum der E2-Ubiquitin-Protein-Ligase übertragen, von wo dann wiederum die Übertragung des Ubiquitins auf das terminale Amin eines Lysins des abzubauenen Proteins durch eine E3-Ubiquitin-Protein-Ligase oder nach Übertragung auf eine E3-Ubiquitin-Protein-Ligase katalysiert wird [9]. Dieser Prozess läuft mehrmals hintereinander ab. Das so polyubiquitinierte Protein wird anschließend dem Proteasom zugeführt und dort abgebaut. Abbildung 1.1 veranschaulicht diesen Prozess in vereinfachter Form.

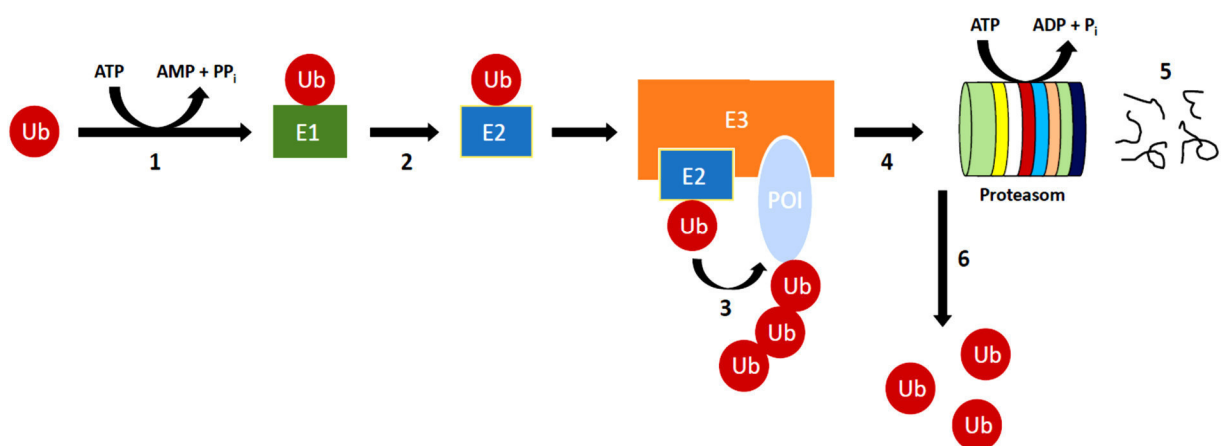


Abbildung 1.1: Proteinabbau durch das Proteasom. Zunächst wird Ubiquitin (Ub) durch das E1-Enzym aktiviert (1). Anschließend erfolgt die Übertragung des Ubiquitins auf das E2-Enzym (2). Im dritten Schritt wird die Übertragung des Ubiquitins auf das Zielprotein (POI) durch die E3-Ligase katalysiert (3), das dann dem Proteasom zugeführt (4) und zu kurzketigen Peptiden abgebaut (5) wird. Abhängig von der Art der E3-Ubiquitin-Protein-Ligase kann das Ubiquitin auch erst auf die E3-Ligase überführt werden. Das wieder freigewordene Ubiquitin wird bei diesem Prozess nicht verbraucht und kann einem neuen Abbauzyklus zugeführt werden (6) (Adaptiert nach [9]).

1.2. Proteinabbau in Bakterien

Bakterien verfügen nicht über ein solches Proteolysesystem. Bei ihnen erfolgt der kontrollierte Abbau von Proteinen auf anderen Wegen. Dazu existiert ein komplexes Netzwerk, bestehend

aus Proteasen und Chaperonen, dessen beide wichtigsten Vertreter die AAA+ und die Hsp70-Familie darstellen [12].

Zu den Vertretern der AAA+ Familie gehört auch das Protein ClpC, welches in Zellen mit der Protease ClpP einen funktionellen Proteolysekomplex ClpCP bildet. Dieser wirkt ähnlich dem Proteasom in eukaryotischen Zellen. ClpCP bindet somit an zuvor zum Abbau markierte Proteine, entfaltet diese und baut sie dann ab. Dazu wird das abzubauen Protein zunächst durch die Argininproteinkinasen McsA und McsB an spezifischen Argininresten phosphoryliert [13] [14] [15]. Diese Phosphorylierung dient als Abbaumarker, welcher von der N-terminalen regulatorischen Subdomäne des hexameren Proteins ClpC erkannt wird [13]. ClpC entfaltet dann das Zielprotein unter Hydrolyse von ATP. Anschließend erfolgt die Translokation zu den heptameren ClpP Serinproteasen, die dann den eigentlichen Proteinabbau übernehmen [16] (Abb. 1.2).

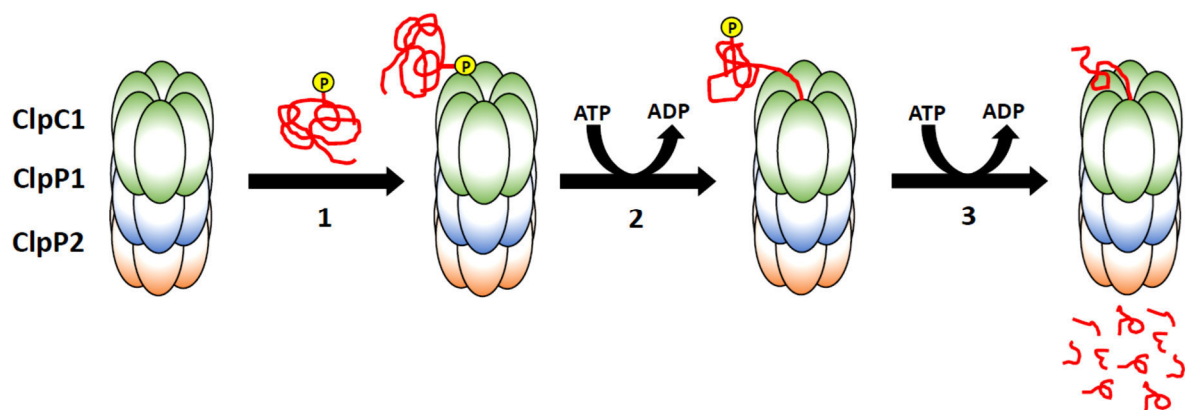


Abbildung 1.2: Proteinabbau durch die ClpC AAA+-ATPase ClpC1 und dem ClpP-Proteasekomplex ClpP1/P2 aus Mycobakterien. Zunächst bindet das Arginin-phosphorylierte Zielprotein an ClpC1 (1). Anschließend erfolgt unter ATP-Hydrolyse die Translokation des Proteins in den Hohlraum im Innern des Proteasekomplexes (2), bevor das Protein schließlich von den beiden Proteasen ClpP1 und ClpP2 zu kurz-kettigen Peptiden abgebaut wird (3) (Adaptiert nach [16]).

Neben diesem System gibt es noch eine Reihe weiterer Möglichkeiten, wie fehlgefaltete oder nicht mehr benötigte Proteine in Bakterien zurückgefaltet bzw. abgebaut werden können. Einige davon sind in Tabelle 1.1 dargestellt.

Tabelle 1.1: Übersicht ausgewählter Chaperone und Proteasen aus *E. coli* (nach [12]).

Name	Familie	Funktion
GroEL	Hsp60	Proteinfaltung
DnaK	Hsp70	Proteinfaltung
HscA	Hsp70	Einbau von Fe/S
ClpB	AAA+	Proteindisaggregation
ClpX	AAA+	Proteinabbau
Hsp33	Hsp33	Redoxregulation
ClpP	Peptidase	Proteinabbau

Obwohl sich all diese Proteine in ihrer Funktionsweise doch teils deutlich voneinander unterscheiden, tragen sie alle dem übergeordneten Ziel der Aufrechterhaltung der bakteriellen Proteostase bei.

1.3. PROTAC

Bei PROTACs (engl. ***Proteolysis Targeting Chimera***) handelt es sich um in der Regel heterobifunktionale Moleküle, die durch räumliche Zusammenführung zweier Proteine den gerichteten Abbau eines Proteins induzieren. Bisherige PROTACs nutzen dabei das in Eukaryoten vorkommende Ubiquitin-Proteasom-System. Hierzu vermitteln die PROTACs durch Protein-Protein-Interaktionen (PPI) Wechselwirkungen zwischen einer E3-Proteinubiquitinligase und einem abzubauenen Zielprotein, wodurch dessen Polyubiquitinierung ausgelöst wird. Dieses somit für den Abbau markierte Protein wird anschließend vom Proteasom abgebaut. PROTACs stellen somit einen alternativen Ansatz zur Deaktivierung in der Form eines zielgerichteten Abbaus zellulärer Proteine dar und stellen somit eine hochinteressante Option zur Entwicklung neuer Chemotherapeutika dar.

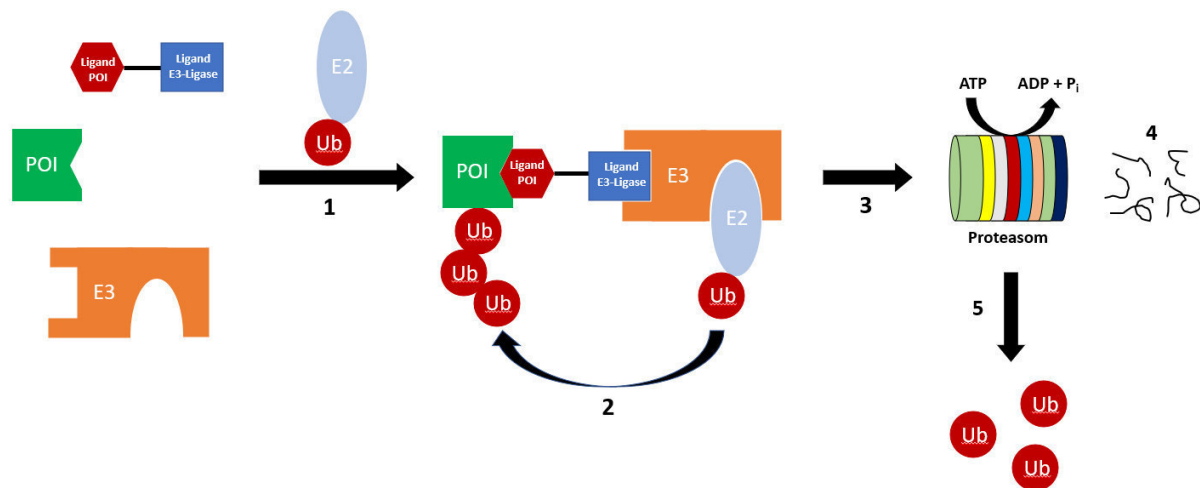


Abbildung 1.3: Allgemeines Funktionsprinzip eines PROTACs. (Adaptiert nach [9] und [17]). Der PROTAC bringt das abzubauen Zielprotein (POI) und die E3-Ligase durch gleichzeitige Bindung an beide in räumliche Nähe (1). Dies führt zur Polyubiquitinierung des POI (2). Der gebildete Proteinkomplex wird anschließend dem Proteasom (3) zugeführt und unter Hydrolyse von ATP zu kurzketigen Peptiden abgebaut (4). Das abgespaltene und wieder frei gewordene Ubiquitin steht für weitere Abbauprozesse zur Verfügung (5).

Klassische Wirkstoffe führen meistens zur Inhibition eines Proteins, wodurch der durch das Protein katalysierte Prozess unterdrückt wird und infolgedessen letztendlich die Krankheitssymptome des Patienten gelindert oder beseitigt werden können. Viele Proteine lassen sich auf diese Weise jedoch nicht beeinflussen, so dass viele Krankheiten nur unzureichend therapierbar sind. Schätzungen gehen davon aus, dass bis zu 80 % aller Proteine mit klassischen Inhibitoren nicht oder nur sehr schwer adressiert werden können, was meist daran liegt, dass solche Wirkstoffe zur Entfaltung einer inhibierenden Wirkung in der Regel an eine ausgeprägte, für die Funktion des Proteins relevante Bindestelle binden müssen.

Anfang des 21. Jahrhunderts wurde jedoch erstmalig eine neue Wirkstoffklasse beschrieben, deren Ziel nicht eine Hemmung des Zielproteins an einer funktionalen Bindestelle im Protein war, sondern die Hemmung der Funktion dieses Proteins durch dessen intrazellulären Abbau. Dies gelang Sakamoto *et al.* durch Synthese eines bifunktionalen Moleküls, mit dem erfolgreich eine Protein-Protein-Interaktion zwischen einem E3-Ligasekomplex und einer Methionin-Aminopeptidase (MetAP) herbeigeführt werden konnte, was zunächst zur Ubiquitinierung und schließlich zum Abbau von MetAP führte [18] (Abb. 1.4).

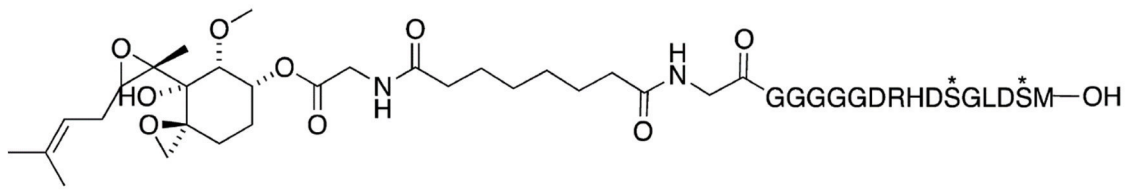


Abbildung 1.4: Der erstmalig 2001 publizierte peptidische PROTAC von Sakamoto *et al.* [18]. Während der linke Teil des Moleküls (Ovalicin) an das Zielprotein MetAP-2 bindet, rekrutiert der peptidische rechte Teil des Moleküls die E3-Ligase SCF^{β-TRCP}. Die mit Sternchen markierten Aminosäuren weisen eine Phosphorylierung auf.

Diese neue Wirkstoffklasse wurde Proteolysis Targeting Chimera, kurz PROTAC, genannt. Bei dieser neuen Substanzklasse ist es für die beabsichtigte Wirkung, den Abbau des Zielproteins durch das Proteasom, völlig irrelevant, ob die Bindung zwischen Ligand und Protein im aktiven Zentrum des Zielproteins oder außerhalb davon erfolgt.

In den Folgejahren wurden viele weitere PROTACs entwickelt, insbesondere in der Arbeitsgruppe von Craig M. Crews von der Universität Yale. Während der PROTAC von Sakamoto *et al.* noch auf peptidischer Basis synthetisiert wurde, entwickelten Crews und seine Mitarbeiter 2008 erstmalig Small-Molecule-basierte PROTACs, wodurch er heute als Pionier auf diesem Gebiet gilt [19].

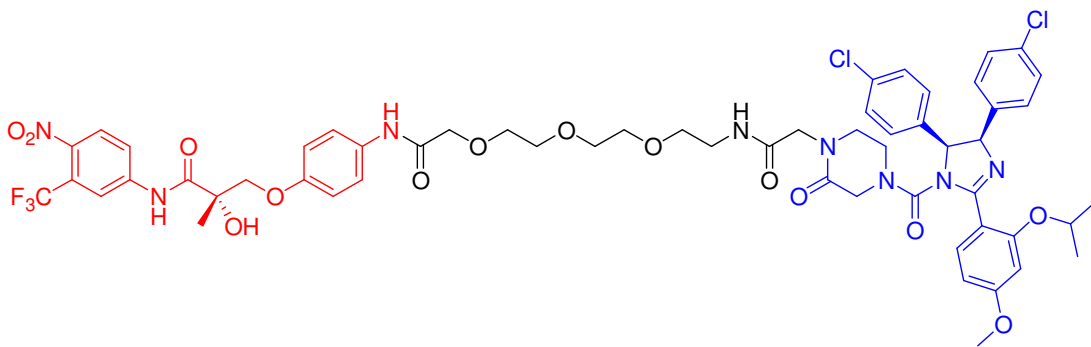
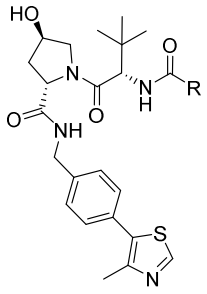
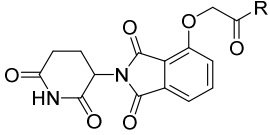
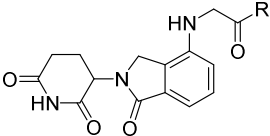
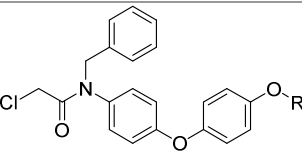
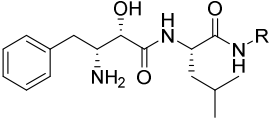
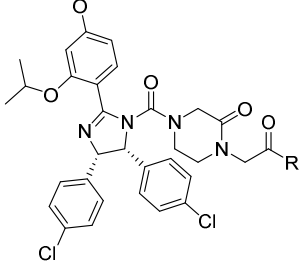


Abbildung 1.5: Chemische Struktur des ersten Small-Molecule-basierten PROTACs von Schneekloth und Crews [19]. Der rot markierte Bereich des Molekül bindet an das Targetprotein SARM, einen nicht-steroidalen androgenen Rezeptor. Blau markiert ist der Ligand Nutlin, ein Bindungspartner der E3-Ligase MDM2. Beide Liganden sind durch einen Linker miteinander verbunden (schwarz).

Bei dem 2008 publizierten PROTAC wurde Nutlin als Ligand für die Rekrutierung der E3-Ligase MDM2 verwendet. Nutlin bindet in die p53-Bindetasche der Ligase und sorgt so für die zum Abbau notwendige räumliche Nähe der beiden Proteine. Einige Jahre später waren bereits

viele andere E3-Ligase-Bindermotive bekannt, die es ermöglichen viele unterschiedliche E3-Ligasen zu rekrutieren [20] (Tabelle 1.2).

Tabelle 1.2: Auswahl gängiger E3-Ligase-Binder. R markiert die Position für die Verknüpfung mit einem Linker.

Struktur	Rekrutierte E3-Ligase
	VHL [21]
	CRBN [22]
	CRBN [23]
	RNF4 [24]
	cIAP1 [25]
	MDM2 [26]

Ein weiterer Meilenstein in der Entwicklung von PROTACs gelang Pfaff *et al.* 2019 mit der erstmaligen Synthese eines photoschaltbaren PROTACs. Durch den Einbau einer Azoverbindung in den Linker war es möglich, den PROTAC durch Bestrahlung mit Licht einer

Wellenlänge von 530 nm zu inaktivieren, während die Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 415 nm ihn wieder aktivierte [27].

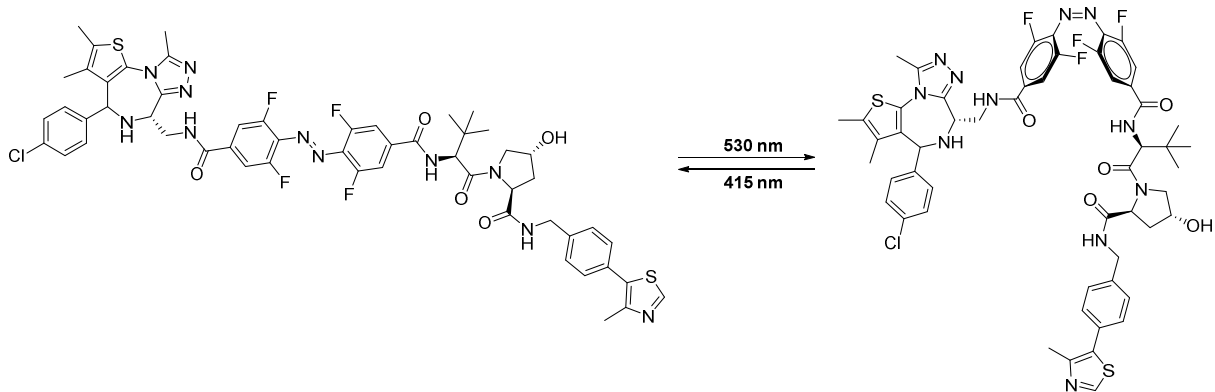


Abbildung 1.6: Photoschaltbarer PROTAC von Pfaff *et al.* [27]. Durch Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 530 nm isomerisiert die Doppelbindung im Linker von der trans- in die cis-Stellung, was zu einer reversiblen Inaktivierung des PROTACs führt.

Fast zeitgleich wurden weitere photoschaltbare PROTACs von Jin *et al.* [28] und Liu *et al.* [29] publiziert.

Obwohl es sich bei den weitaus meisten PROTACs um hetero-bifunktionale Moleküle handelt, so sind dennoch auch homo-bifunktionale PROTACs bekannt, die zum Selbstabbau der entsprechenden E3-Ligase führen (Abb. 1.7) [30].

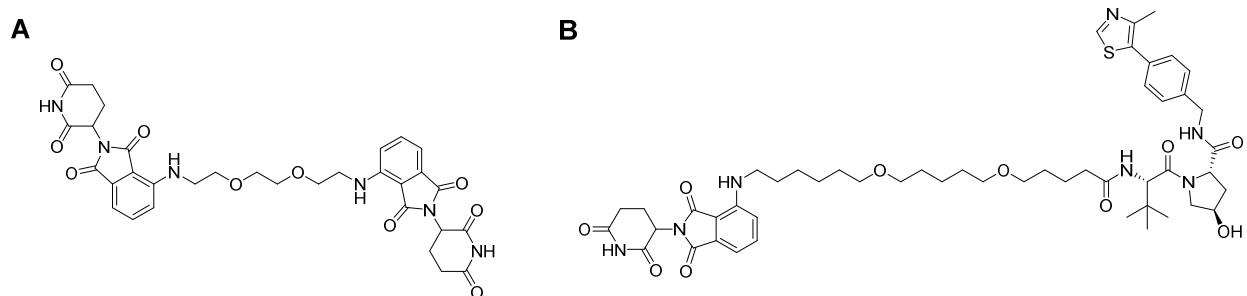
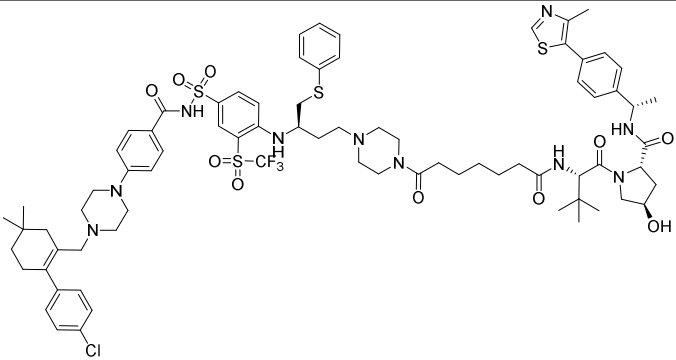
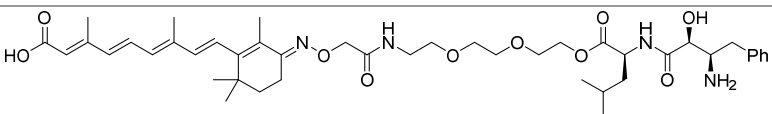
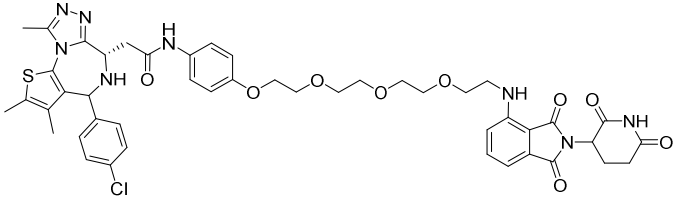
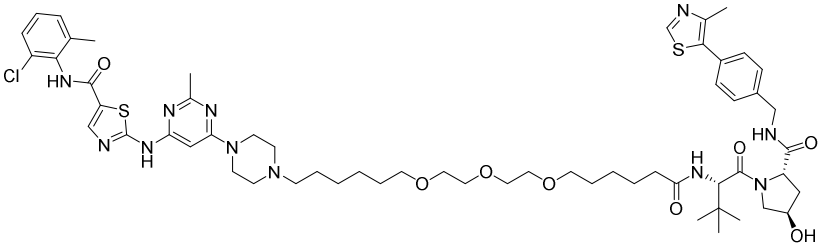
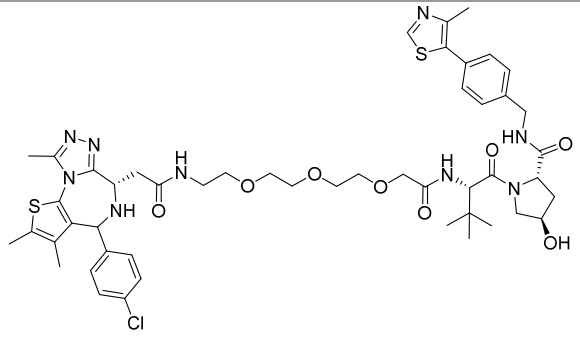


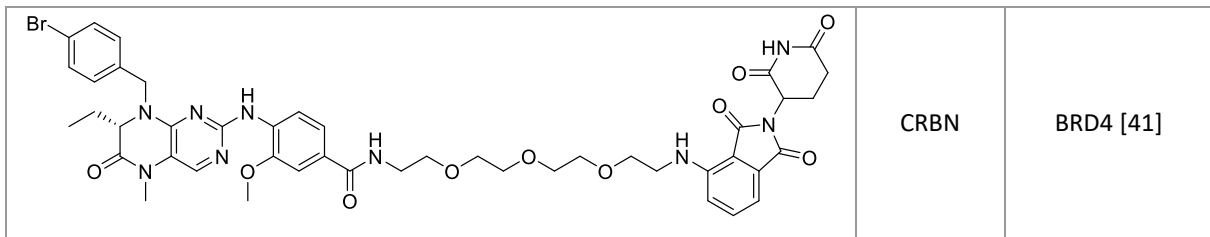
Abbildung 1.7: A: Homo-bifunktionaler PROTAC zum Selbstabbau der E3-Ligase CRBN [30]. **B:** hetero-bifunktionaler PROTAC zum Abbau von CRBN. Nach 24stündiger Inkubation mit dem PROTAC konnte ein Rückgang des CRBN-Levels in MM1S-Zellen von 90 % beobachtet werden [31].

Mittlerweile sind viele verschiedene PROTACs bekannt, mit denen der Abbau der unterschiedlichsten Proteine induziert werden kann. Besonders im Bereich der Krebstherapie wird intensiv an der Nutzung des PROTAC-Konzepts geforscht [32] [33] [34]. Das US-amerikanische biopharmazeutische Unternehmen Arvinas untersuchte 2019 in Phase-I-

Studien bereits die Wirksamkeit zweier dort entwickelter PROTACs gegen metastasierenden Prostatakrebs und gegen metastasierenden Brustkrebs. Beide Substanzen befinden sich aktuell in Phase-II-Studien der klinischen Prüfung und unterstreichen somit eindrucksvoll das pharmazeutische Potential dieser Wirkstoffklasse [35].

Tabelle 1.3: Auswahl einiger publizierter PROTACs mit Angabe der rekrutierten E3-Ligase und dem erfolgreich abgebauten Targetprotein.

Struktur	E3-Ligase	Targetprotein
	VHL	BCL-2/BCL-X [36]
	clAP1	CRABP-I und II [37]
	CRBN	BRD4 [38]
	VHL	c-Abl [39]
	VHL	BRD4 [40]



Eine Eigenschaft haben jedoch alle bisher bekannten und publizierten PROTACs gemeinsam: Sie sind für den Einsatz in eukaryotischen Systemen entwickelt worden. Ob und in welchem Rahmen das Grundprinzip des gerichteten Proteinabbaus mit Hilfe der PROTAC-Technologie auch auf Bakterien übertragbar ist und wie es dort gegebenenfalls zur Entwicklung dringend benötigter neuer Antibiotika verwendet werden kann, wurde bisher noch nicht untersucht. Diese Untersuchung ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

1.4. Cyclomarin

Bei Cyclomarinen handelt es sich um cyclische Heptapeptid-Naturstoffe, die erstmalig 1999 beschrieben wurden [42]. Insgesamt sind heute 4 Mitglieder dieser Naturstofffamilie bekannt, die als Cyclomarine A-D bezeichnet werden (Abb. 1.8).

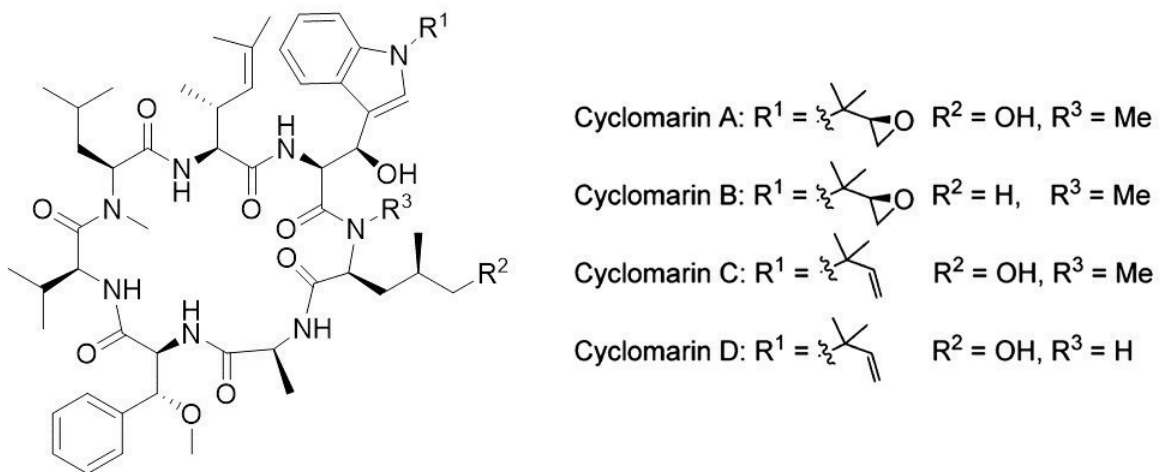


Abbildung 1.8: Chemische Strukturen der Naturstoffe Cyclomarin A-D (adaptiert nach [43]).

Eine Analyse der Struktur zeigt, dass in Cyclomarinen gleich vier recht ungewöhnliche und in Peptidnaturstoffen seltene Aminosäuren im Molekül vorkommen.

Alle Cyclomarinderivate weisen antibiotische Wirkung gegenüber Mycobakterien auf. Eine Besonderheit ist ihre antibiotische Wirksamkeit sowohl gegenüber sich teilenden, als auch

gegenüber von humanen Makrophagen eingekapselten Mycobakterien [44]. Während Cyclomarin A einen MIC von 0.3 μM gegenüber *Mycobacterium tuberculosis* aufweist, konnte dagegen bei vielen anderen Gram-positiven als auch Gram-negativen Bakterien, wie z.B. *Staphylococcus aureus* oder *Pseudomonas aeruginosa*, keine biologische Aktivität festgestellt werden [44]. Diese Eigenschaften machen Cyclomarine zu einer interessanten Leitstruktur zur Entwicklung neuer Tuberkulose-Chemotherapien, da sie nicht nur sehr potente antimykotische Eigenschaften besitzen, sondern darüber hinaus auch noch eine große Selektivität zu besitzen scheinen.

Seine antibiotische Wirkung entfaltet Cyclomarin, indem es an eine Bindetasche in der N-terminalen Domäne von mycobakteriellem ClpC bindet. Diese Bindetasche ist jedoch nicht das aktive Zentrum der AAA+-ATPase ClpC; die genaue Funktion dieser konservierten Tasche ist bisher noch nicht bekannt [45]. ClpC1 erkennt seine natürlich vorkommenden Substrate anhand von phosphoryliertem Arginin, bindet und entfaltet sie anschließend und führt sie schließlich ClpP1P2 zum Abbau zu [13]. Wie aus Abbildung 1.9 ersichtlich ist, befindet sich diese Bindestelle an einer anderen Position der N-terminalen Domäne von ClpC.

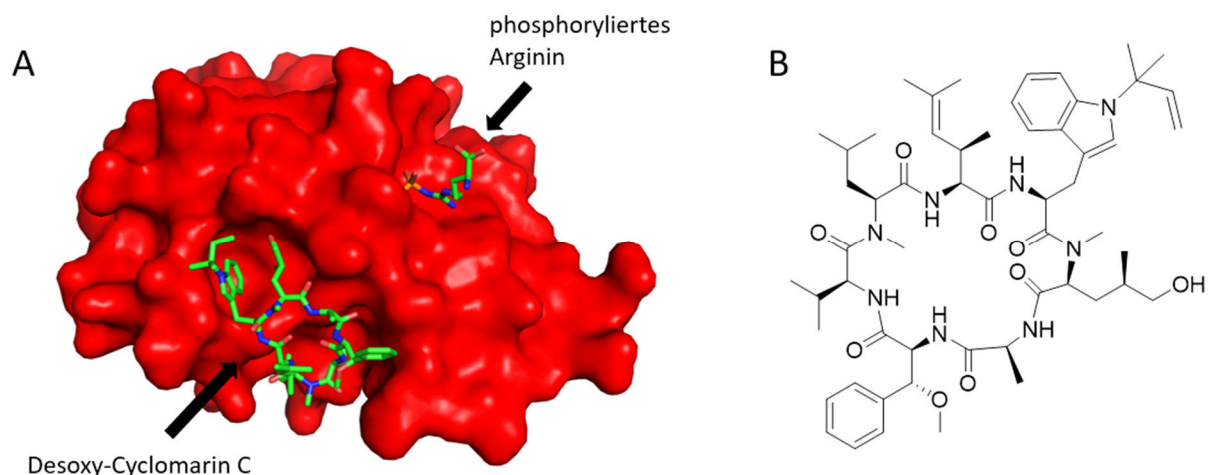


Abbildung 1.9: **A:** Phosphoryliertes Arginin als Ersatz bzw. Analogon für natürliche Substrate des Proteins bindet an die sogenannte Phosphoarginin-Bindestasche der N-terminalen Domäne von ClpC1. Desoxy-Cyclomarin C hingegen bindet in eine alternative Bindetasche; die Funktion dieser Bindetasche ist bisher noch ungeklärt. **B:** Chemische Struktur von Desoxy-Cyclomarin C. (PDB-Code 5HBN, kristallographische Bindedaten von Desoxy-Cyclomarin C im Komplex mit ClpC1_{NTD} wurden von der Arbeitsgruppe von Dr. Tim Clausen bestimmt).

Der genaue Wirkmechanismus war bis vor kurzem jedoch noch ungeklärt. Weinhäupl *et al.* fanden 2018 heraus, dass durch die Bindung von phospho-Arginin enthaltenden Peptiden an

die N-terminale Domäne von ClpC1 dynamische, konformationelle Änderungen im Protein induziert werden [46]. Sie postulierten, dass die Bindung von Cyclomarin diese Dynamiken unterdrückt und somit das System moduliert.

Maurer *et al.* konnten 2019 schließlich zeigen, dass durch die Bindung von Cyclomarin eine dauerhafte Aktivierung des Proteins bewirkt wird, die letztlich zur unkontrollierten Proteolyse und damit zum Zelltod führt [47].

Die erste erfolgreich Totalsynthese eines Cyclomarins wurde 2004 mit der Synthese von Cyclomarin C durch Wen *et al.* erreicht [48]. In den vergangenen Jahren wurden weitere Synthesen für Cyclomarine entwickelt. Besonders die Arbeitsgruppe von Uli Kazmaier tat sich auf diesem Gebiet hervor und veröffentlichte zwischen 2016 und 2019 mehrere Syntheserouten [43] [49] [50]. Bei all diesen Syntheserouten handelte es sich um Synthesen in Lösung. Festphasensynthesen von Cyclomarin wurden bisher noch nicht veröffentlicht.

2. Zielsetzung

In der jüngeren Vergangenheit gab es große Fortschritte im Bereich der Chemischen Biologie und der Wirkstoffforschung durch Einsatz neuer Technologien wie *High Throughput Screening* (HTS) oder der Proteomik, die es ermöglichen große Mengen an chemischen Substanzen in verhältnismäßig kurzer Zeit auf ihre biologische Aktivität hin zu untersuchen. Während es dadurch in vielen Bereichen der Arzneimittelforschung zu großen Fortschritten kam, ist dies bisher im Bereich der Antibiotika und Antiinfektiva nicht der Fall gewesen [51]. Hier ist daher die Entwicklung neuer Ansätze notwendig, um der zunehmenden Gefahr multiresistenter Keime auch durch neue Therapieansätze statt lediglich durch Kombination bereits zugelassener Wirkstoffe [52] und verschärfter Hygienemaßnahmen begegnen zu können [53] [54]. Während die toxische Wirkung klassischer Antibiotika bisher in der Regel durch Inhibition von essenziellen Proteinen erreicht wird, wurde bis dato noch nie untersucht, welche Auswirkungen der Abbau anstatt einer Hemmung eines Zielproteins auf ein Bakterium hat.

Das Ziel dieser Arbeit war daher die chemische Synthese von hetero-bifunktionalen Molekülen zur Etablierung eines experimentellen Systems zum gerichteten Proteinabbau in Bakterien. Während die chemischen Synthesen in der Abteilung für Chemische Biologie an der Universität Duisburg-Essen durchgeführt werden sollten, erfolgten die biochemische und biologische Validierung dieser Verbindungen durch die Arbeitsgruppe von Dr. Tim Clausen am IMP in Wien.

PROTACs zum zielgerichteten Abbau von Proteinen werden bislang lediglich in eukaryotischen Zellen genutzt. In bakteriellen Zellen ist eine solche Technik jedoch bisher noch nie beschrieben worden. Überhaupt wurde der induzierte selektive Abbau von Proteinen erst in einem Fall beobachtet: Das Antimykotikum Pyrazinamid wird intrazellulär in seine bioaktive Form Pyrazinsäure überführt und bindet an das essenzielle Protein Aspartatdecarboxylase, was wiederum zu dessen Abbau durch ClpC1/ClpP1P2 und damit zum Absterben der Bakterien führt [55]. Wie bereits in Abschnitt 1.2 beschrieben, funktioniert der Proteinabbau in prokaryotischen Zellen grundlegend anders als der in eukaryotischen Zellen. Der Abbau der ausgewählten Zielproteine im Zuge dieser Arbeit sollte durch den ClpCP-Proteasekomplex erfolgen, der durch Wahl eines geeigneten Liganden angesteuert und umprogrammiert

werden sollte. Die hierzu entwickelten PROTACs werden von mir als bacPROTACs bezeichnet (für Bakterien-gerichtete PROTACs).

Zunächst sollten bacPROTACs erzeugt werden, die phosphoryliertes Arginin als Marker zur Bindung an die N-terminalen Subdomäne von ClpC bzw. ClpC1 enthielten. Das zuvor synthetisch hergestellte phosphorylierte Arginin sollte mittels eines Linkers mit einem Liganden verknüpft werden, der das abzubauen Protein rekrutiert und in räumliche Nähe zum ClpCP-Proteasekomplex bringt, wo dieses Protein anschließend abgebaut werden soll.

Aufgrund der mangelnden Stabilität gegenüber Säuren und der ladungsbedingten schlechten Membrangängigkeit von phosphoryliertem Arginin sollten zudem Prodrug-Formen von bacPROTACs entwickelt werden, die zum einen säurestabiler und zum anderen durch Maskierung der Phosphatgruppe mit *in vivo*-abspaltbaren Schutzgruppen zellgängiger sind. Die Freisetzung des eigentlichen Wirkstoffes sollte erst nach Durchdringen der bakteriellen Zellwand durch Metabolisierung erfolgen.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand darin, Cyclomarin-derivate mittels Festphasensynthese zu synthetisieren. Durch Ermittlung von MIC und K_D -Werten sollte anschließend ein geeignetes Derivat bestimmt werden, das einerseits zwar an ClpC1 bindet, andererseits aber auch keine zu große Toxizität gegenüber Bakterien aufweist. Hier galt es einen ausgewogenen Mittelweg aus Bindungsstärke und Cytotoxizität zu finden. Das am besten geeignete Derivat sollte dann ebenfalls zur Synthese von bacPROTACs verwendet werden. Dies sollte zuerst unter Verwendung von (+)-JQ1 als Ligand für das Protein BRDT geschehen. Dieses humane Protein konnte erfolgreich in *Mycobacterium smegmatis* kloniert und dort stabil exprimiert werden, ohne dass *M. smegmatis* im Wachstum dadurch beeinflusst wurde. Dadurch eignet es sich ideal als Modellorganismus für die Entwicklung von bacPROTACs in Bakterien. In weiteren Synthesen sollte dann ein cyclomarinbasierter bacPROTAC entwickelt werden, der zum Abbau eines endogenen bakteriellen Targets führt. Als potenzielles Ziel wurde hierbei der Folatstoffwechsel ausgewählt. Durch Auswahl von Trimethoprim (TMP) und Pemetrexed (PMX) als Liganden sollte versucht werden, Dihydrofolatreduktase (TMP, PMX) bzw. Thymidylatsynthase (PMX) *in vivo* abzubauen. Beide Proteine stellen bedeutende Targets in der aktuellen Antibiotikaforschung im Bereich der Tuberkulosebekämpfung dar [56] [57] [58].

3. Ergebnisse und biologische Validierung

3.1. Phosphorylierte bacPROTACs

Bei den ersten synthetisierten bacPROTACs handelte es sich um bivalente Moleküle, bestehend aus phosphoryliertem Arginin, Biotin und einen die beiden Komponenten verbindenden Linker. Insgesamt wurden hierzu drei bacPROTACs mit unterschiedlichen Linkerlängen hergestellt (Abb. 3.1). Durch die verschiedenen Längen der Linker sollte untersucht werden, ob und inwiefern die Länge des verwendeten Linkers einen Einfluss auf den induzierten Proteinabbau nimmt. Als Linker wurde mit 9-Amino-4,7-dioxa-nonansäure ein säure- bzw. aminofunktionalisiertes PEG-Derivat gewählt.

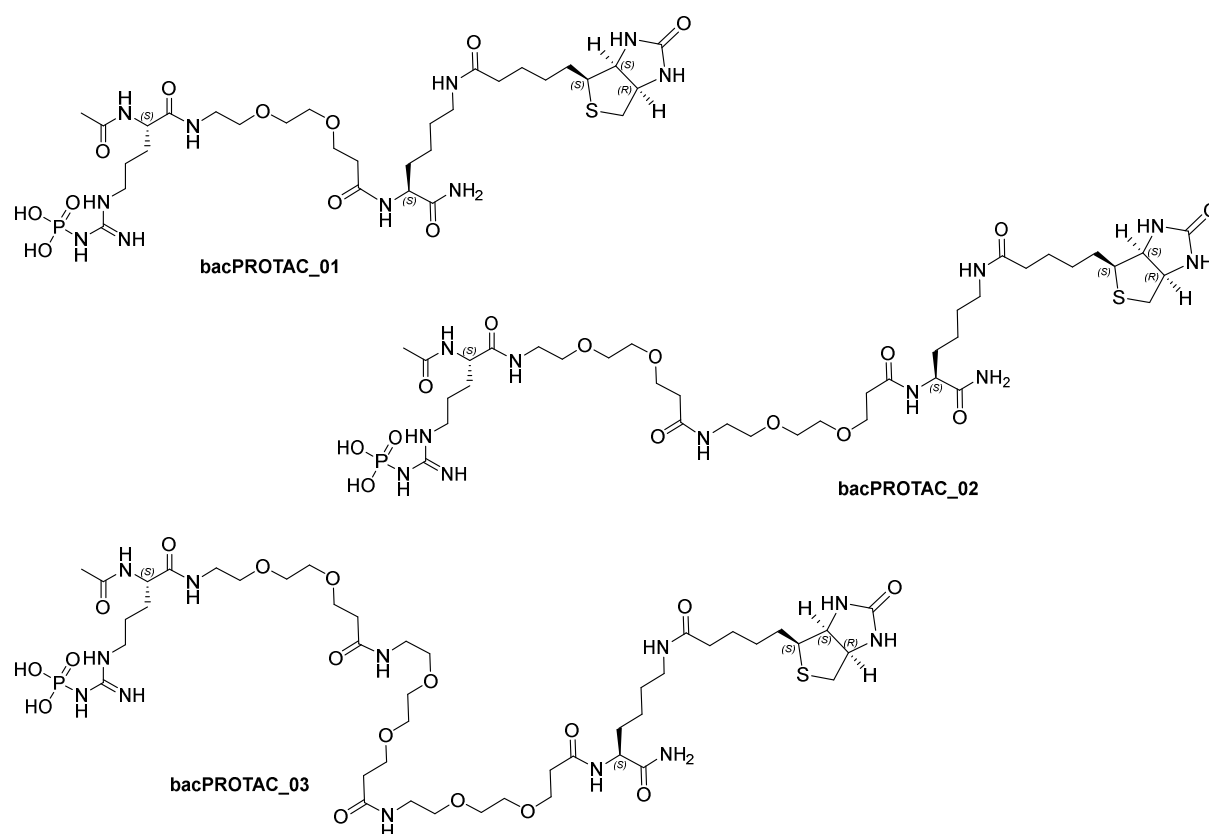


Abbildung 3.1: Strukturen der bacPROTAC 1-3.

Bevor mit der Synthese der bacPROTACs begonnen werden konnte, musste zunächst das phosphorylierte Arginin (**41**) synthetisiert werden (Abb. 3.2). Dazu wurde auf eine bereits literaturbekannte Syntheseroute zurückgegriffen [59].

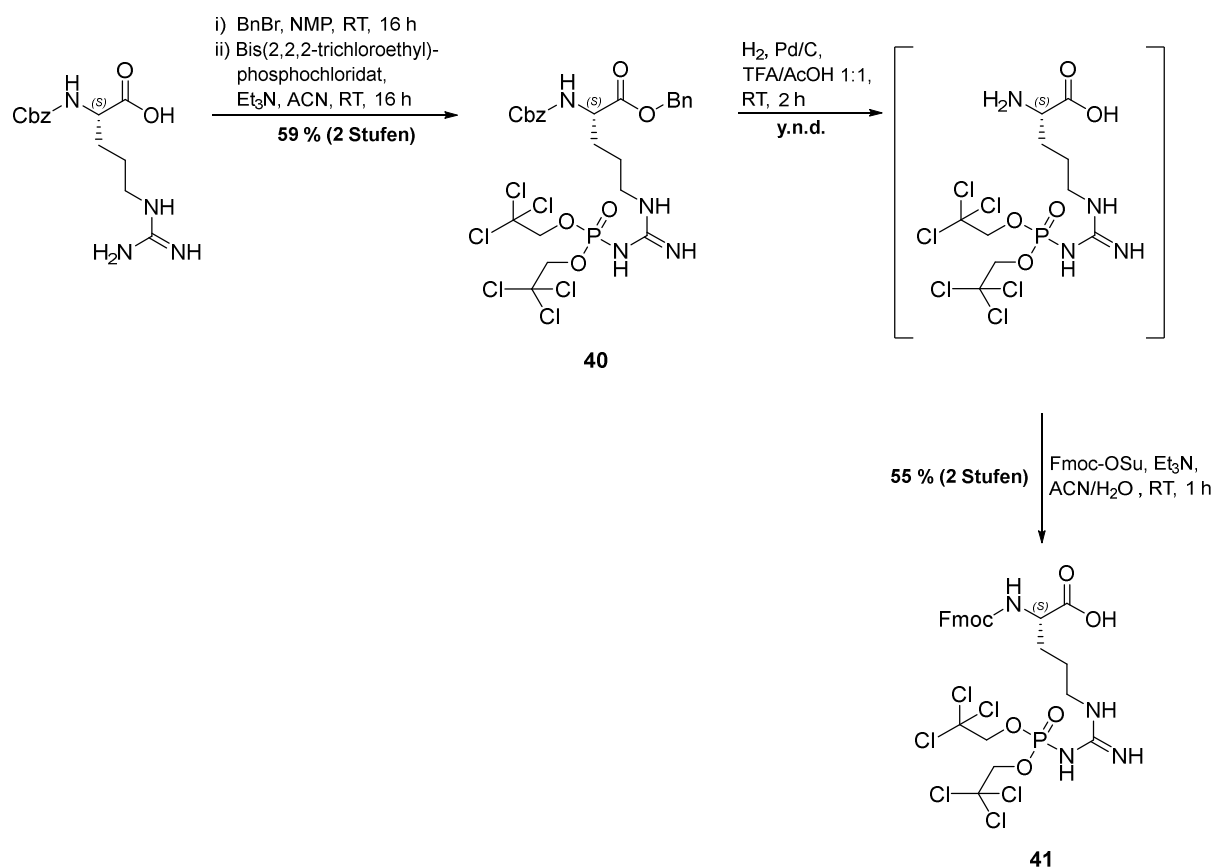


Abbildung 3.2: Synthese von Fmoc-pArg(Tce)₂-OH, in Analogie zur Syntheseroute von Hofmann *et al.* [59].

Im ersten Schritt erfolgte die Benzylschützung der Carboxygruppe, bevor in Stufe 2 die Phosphatgruppe durch Verwendung von Bis(2,2,2-trichloroethyl)phosphochloridat eingeführt wurde. Verbindung **40** konnte nach erfolgreicher chromatographischer Aufreinigung in einer Ausbeute von 59 % erhalten werden und bewegte sich damit im literaturbekannten Bereich. Die Abspaltungen der Benzyl- und der Cbz-Gruppe erfolgte anschließend hydrolytisch unter stark sauren Bedingungen. Diese Bedingungen waren notwendig, um den Erhalt der Tce-Schutzgruppen des Phosphats, die in basischen Milieu wiederum instabil und spaltbar sind, zu gewährleisten. Die entschützte Aminosäure wurde direkt weiter mit Fmoc-OSu umgesetzt, um schließlich Fmoc-pArg(Tce)₂-OH **41** in einer Ausbeute von 55 % zu erhalten. Die Gesamtausbeute dieser Synthese lag bei 32 % und damit im erwarteten Bereich.

Mit diesem Baustein konnte nun begonnen werden, phosphorylierte bacPROTACs zu synthetisieren. Dazu wurde phosphoryliertes Arginin mit Hilfe eines PEG-Linkers in unterschiedlichen Längen C-terminal mit biotinyliertem L-Lysin verknüpft (Abb. 3.3).

Die bacPROTACs 1-3 wurden hierzu mit einer Kombination aus Festphasensynthese mit Fmoc-Schutzgruppenstrategie und Synthese in Lösung erzeugt. Da die finalen bacPROTACs C-terminal ein Amid enthalten sollten, wurde Rink-Amid-Harz verwendet.

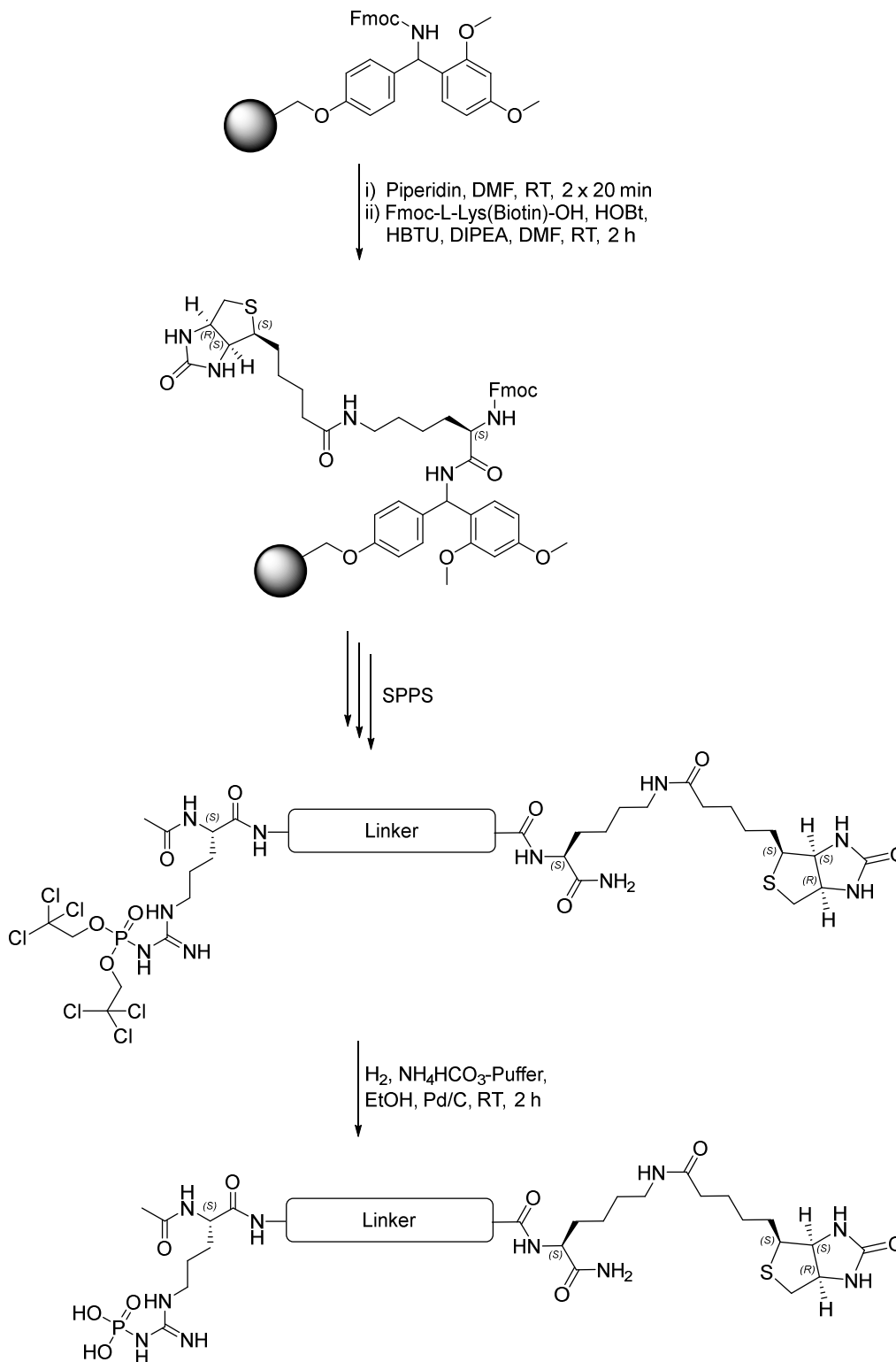


Abbildung 3.3: Allgemeine Syntheseroute zur Darstellung der bacPROTAC 1-3.

Nach Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe vom Harz erfolgte dessen Beladung mit Fmoc-L-Lys(Biotin)-OH. Anschließend erfolgten iterativ die Abspaltung der Fmoc-Gruppe und die Kupplung der jeweiligen nächsten Aminosäure. Nachdem alle erforderlichen Aminosäuren gekuppelt waren, wurde das Peptid N-terminal acetyliert und vom Harz abgespalten, so dass die hydrolytische Entschützung der Phosphatgruppe erfolgen konnte. Dies geschah unter basischen Bedingungen in einem Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer bei einem pH-Wert von 9. Da die P-N Bindung der entschützten Phosphatgruppe säurelabil ist, war hier die strikte Einhaltung basischer Reaktionsbedingungen essenziell. Die bacPROTACs 1-3 konnten in Gesamtausbeuten zwischen 11 % und 18 % (bezogen auf eine theoretische maximale Harzbeladung) erhalten werden.

Diese Substanzen wurden anschließend von der AG Clausen auf ihre Abbau-induzierende Wirkung untersucht. Zunächst wurden mittels ITC-Messungen die K_D -Werte für bacPROTAC_03 ermittelt, um die Bindungsaffinität beider Liganden an die jeweiligen Proteine zu ermitteln (Abb. 3.4). Es zeigte sich hierbei, dass beide Liganden im niedrigen bis mittleren einstelligen mikromolaren Bereich an die jeweiligen Proteine binden. Dies belegt, dass bacPROTAC_03 über die notwendige Bindungsaffinität für eine räumliche Zusammenbringung beider Zielproteine verfügt.

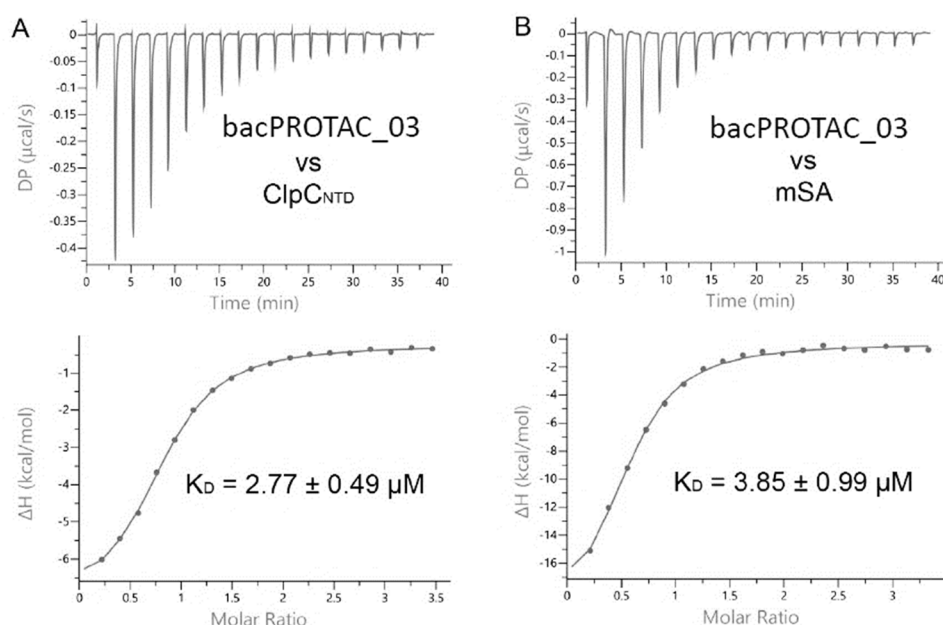


Abbildung 3.4: Bindungsaffinitäten und K_D -Werte von bacPROTAC_03. Gemessen wurde bacPROTAC_03 gegen die N-terminale Domäne von ClpC aus *Bacillus subtilis* (A), sowie gegen mSA (B). (Die gezeigten Messungen wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. Tim Clausen durchgeführt).

Auffällig war bei diesen Messungen jedoch, dass die erhaltenen K_D -Werte deutlich von literaturbekannten Werten abwichen. So findet sich für die Bindungsaffinität von phosphoryliertem Arginin zu ClpC_{NTD} ein Wert von 13 μ M [13], während für die Bindung von Biotin an mSA sogar ein K_D -Wert von 2.8 nM bekannt ist [60]. Eine mögliche Erklärung für die Abweichung der ermittelten K_D -Werte ist, dass in der Literatur die Einzelsubstanzen verwendet wurden. Im bacPROTAC sind beide Substanzen jedoch über einen Linker miteinander verbunden, was zu veränderten Bindungseigenschaften führen kann. Im Fall des phosphorylierten Arginins führt der angehängte Linker zu einer besseren Bindung, während er im Fall des Biotins zu einer deutlich schwächeren Bindung an Streptavidin zu führen scheint. Der folgende *in-vitro*-Assay zum Proteinabbau wurde in der AG Clausen mit rekonstituierten Proteinkomplexen durchgeführt (Abb. 3.5).

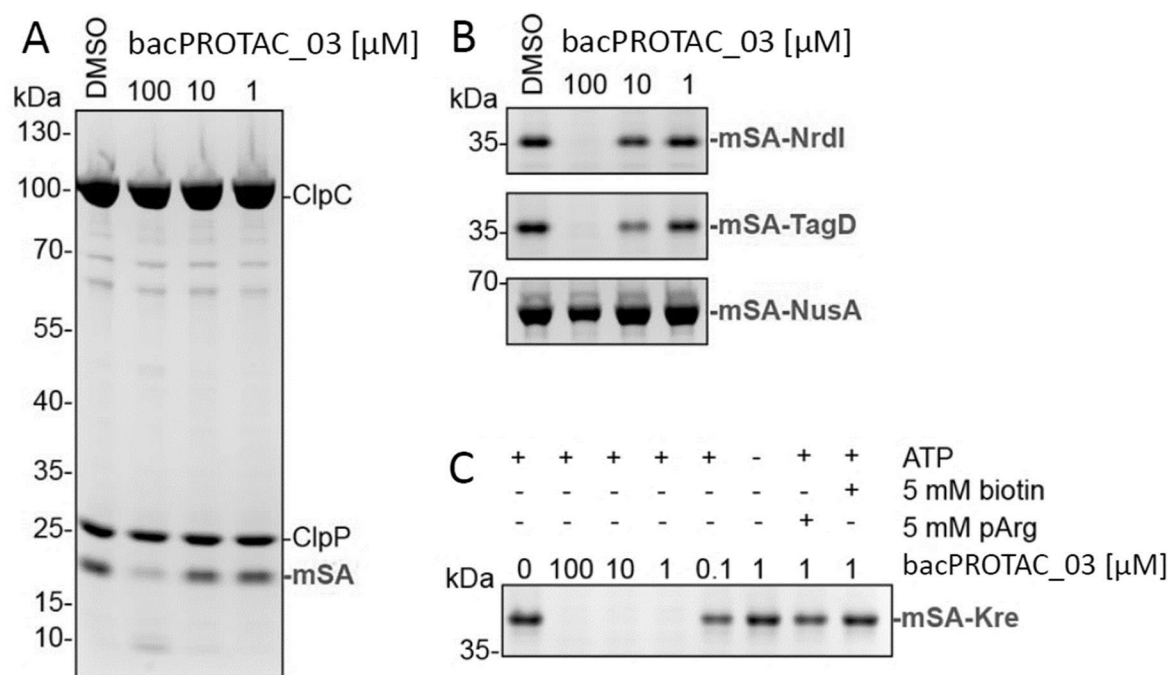


Abbildung 3.5: *in-vitro*-Abbau von mSA und Streptavidin-Fusionsproteinen mit bacPROTAC_03 durch ClpCP aus *Bacillus subtilis* nach 2 Stunden Inkubationszeit. **A:** Abbau von mSA. **B:** Abbau von verschiedenen Streptavidin-Fusionsproteinen (mSA-NrdI, mSA-TagD und mSA-NusA). **C:** Detaillierte Untersuchung des Abbaus von mSA-Kre. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE. (Die gezeigten Abbauxperimente wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. Tim Clausen durchgeführt).

Für dieses Experiment wurde das zuvor überexprimierte, gereinigte und rekonstituierte ClpCP-System aus *Bacillus subtilis* verwendet. Dabei zeigte sich recht schnell, dass monomeres Streptavidin (mSA) alleine nicht durch ClpCP abgebaut wurde (Abb. 3.5 A). Erst bei einer

bacPROTAC-Konzentration von 100 μM war ein geringer Proteinabbau erkennbar. Da Streptavidin eine sehr kompakte und geordnete Struktur aufweist, kann es möglicherweise durch ClpC nur sehr schwer bzw. sehr langsam entfaltet werden, was dann zu einem schwachen Abbau führen könnte.

Da der Abbau von mSA nur sehr langsam erfolgte, wurde nach alternativen Substraten gesucht, die eine weniger geordnete Struktur aufwiesen. Dazu wurden Streptavidin-Fusionsproteine generiert, damit weiterhin ein Bindungspartner für das im bacPROTAC verwendete Biotin vorhanden war. Hierbei erwies sich mSA-Kre als am besten geeignet. Bei diesem Streptavidin-Fusionsprotein zeigte sich bereits bei einer bacPROTAC_03-Wirkstoffkonzentration von 1 μM ein nahezu vollständiger Abbau (Abb. 3.5 C). Bei mSA-TagD und mSA-NrdI erfolgte ein signifikanter Proteinabbau erst bei einer Konzentration von 100 μM (Abb. 3.5 B). Mit dem Substrat mSA-Kre wurden anschließend detailliertere Untersuchungen zum Proteinabbau durchgeführt. So wurden in Kontrollreaktionen Biotin bzw. phosphoryliertes Arginin in Konzentrationen von jeweils 5 mM als Kompetitoren eingesetzt. Wie erwartet konnte in beiden Experimenten kein Proteinabbau beobachtet werden. Sowohl Biotin als auch pArg wurden in so großem Überschuss zugegeben, dass sie die Bindung des bacPROTACs verhinderten. Dadurch wird deutlich, dass der beobachtete Effekt (Verschwinden der korrespondierenden Bande im SDS-Gel) auch wirklich auf einen bacPROTAC-induzierten Proteinabbau zurückzuführen ist. Ebenso verhielt es sich, wenn kein ATP zur Reaktion zugegeben wurde. Auch in diesem Fall konnte wie erwartet kein Abbau beobachtet werden, da der Proteinabbau durch ClpCP ATP-abhängig ist.

bacPROTAC_01 und bacPROTAC_02 zeigten sehr ähnliche Resultate, woraus sich schließen lässt, dass die Länge des verwendeten Linkers bei den hier untersuchten Molekülen zweitrangig für deren biochemische Aktivität ist. Ein Problem, das jedoch alle drei getesteten Substanzen zeigten, war die mangelnde Membranpermeabilität. Bedingt durch die unter physiologischen Bedingungen negative Ladung der Phosphatgruppe konnten die bacPROTACs die bakterielle Zellmembran nicht durchdringen, was dazu führte, dass *in vivo* keinerlei biologische Abbauaktivität zu beobachten war.

Zudem erwiesen sich diese Substanzen als sehr empfindlich gegenüber Säuren, so dass nach einer Möglichkeit gesucht wurde, die Säurestabilität ohne Schwächung der Bindung zum

Proteasekomplex zu erhöhen. Hierzu wurde getestet, inwiefern die Verwendung von Canavanin anstelle von Arginin zu einer Erhöhung der Säurestabilität führt.

3.2. Canavaninhaltige bacPROTACs

Canavanin ist eine nicht-kanonische Aminosäure, die in der Natur vor allem in Leguminosen vorkommt und dort als Schutz vor Fressfeinden dient. Sie weist eine dem Arginin sehr ähnliche Struktur auf und unterscheidet sich lediglich in einer Substitution eines Kohlenstoff- durch ein Sauerstoffatom in der Seitenkette (Abb. 3.6).

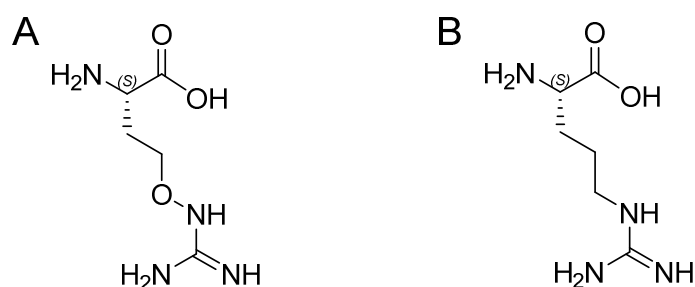


Abbildung 3.6: Vergleich der chemischen Strukturen von L-Canavanin (A) und L-Arginin (B).

Die toxische Wirkung des Canavanins beruht auf seinem Einbau als Argininmimetikum in Proteine, da aufgrund der ähnlichen Struktur Canavanin analog zu Arginin vom Enzym Arginyl-tRNA-Synthetase als Substrat anerkannt wird. Jedoch ist Canavanin weniger basisch als Arginin, wodurch sich die Säure-Base-Eigenschaften und damit die Protonierungszustände der Canavanin-substituierten Proteine verändern. In der Summe führen diese Veränderungen zu weniger funktionalen Proteinen, welche letztendlich bis zum Tod Canavanin-versetzter Zellen führen können [61].

Die Synthese der canavaninhaltigen bacPROTACs wurde in Lösung durchgeführt. Es wurden drei Derivate hergestellt, von denen ein Derivat (Cav_bacPROTAC_01) mit einer freien Phosphatgruppe und zwei Derivate mit einer durch Ethyl- (Cav_bacPROTAC_02) bzw. mit einer durch Pivalolyester geschützten Phosphatgruppe (Cav_bacPROTAC_03) versehen waren. Für die Synthese dieser bacPROTACs wurde (+)-JQ1 als Ligand ausgewählt, da diese Substanz eine sehr hohe Affinität zum humanen Protein BRTD aufweist. Dieses Protein kann in *Mycobacterium smegmatis* stabil überexprimiert werden, ohne dass dadurch das Bakterium in seinem Wachstum beeinflusst wird. Dadurch stellt es ein ideales Modellprotein zur Testung von bacPROTAC-Strategien in Bakterien dar.

Aus bereits publizierten Kristallstrukturen war bekannt, dass die *tert*-Butylgruppe von (+)-JQ1 aus der Bindetasche des Protein hinaus orientiert ist (Abb. 3.7 B). Aus diesem Grund wurde diese Position im Molekül ausgewählt, um (+)-JQ1 mittels Linker mit Canavanin zu einem bacPROTAC zu verbinden.

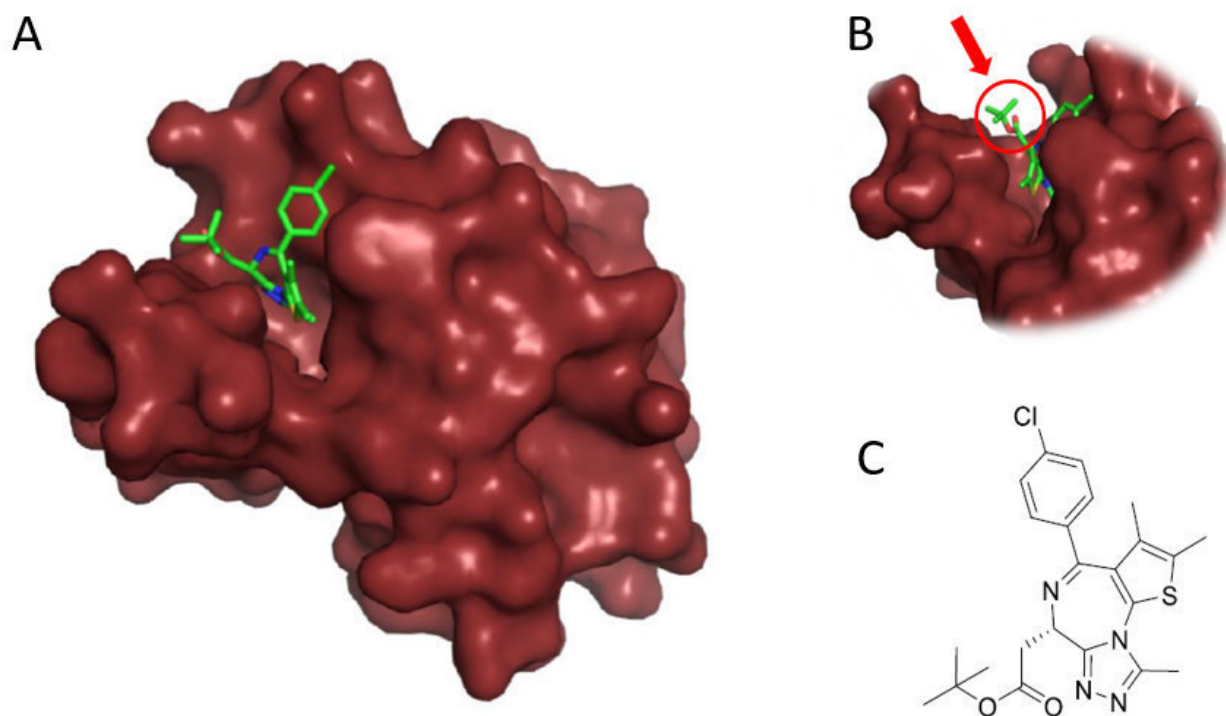


Abbildung 3.7: (+)-JQ1 im Komplex mit Brd4 (PDB-Code 4FLP). **A:** Gesamtansicht. **B:** Die *tert*-Butylgruppe ragt aus der Bindetasche des Proteins hinaus und ermöglicht so das Anbringen eines Linkers am Inhibitor durch Substitution. **C:** Struktur von (+)-JQ1.

Zunächst wurde Acetyl-L-Cav(Boc)-DOOA-(+)-JQ1 **52** ausgehend von (+)-JQ1 mit einer Gesamtausbeute von 59 % synthetisiert (Abb. 3.8). Nach Entschützung von (+)-JQ1 wurde anschließend der Linker Boc-DOOA-OH auf die freie Säure gekuppelt. Nach erfolgter Kuppelung wurde die Boc-Gruppe abgespalten und Fmoc-Cav(Boc)-OH gekuppelt. In einem letzten Schritt wurde die Fmoc-Gruppe abgespalten und das freie Amin acetyliert.

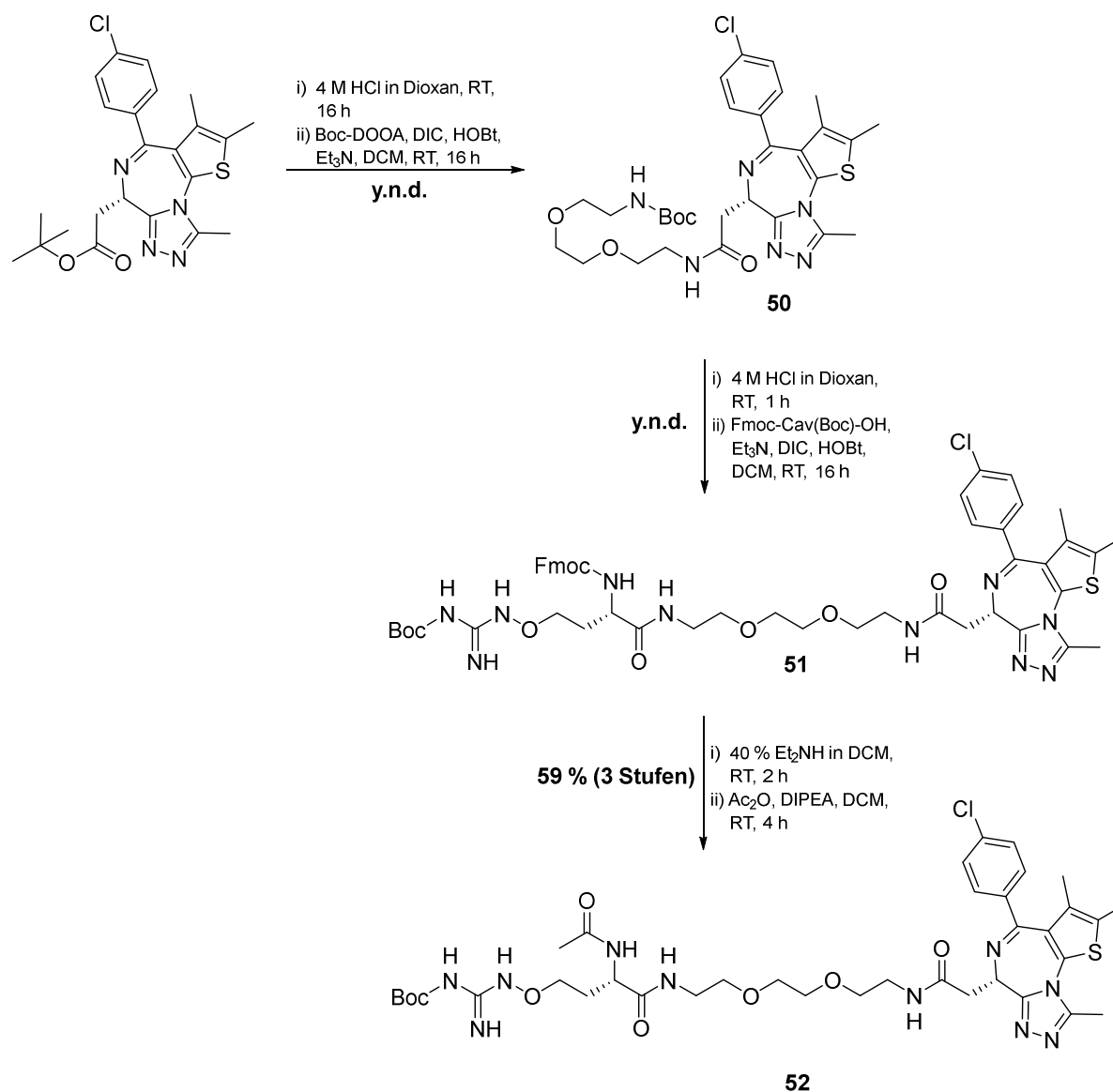


Abbildung 3.8: Synthese von Acetyl-L-Cav(Boc)-DOOA-(+)-JQ1 (**52**).

Von Verbindung Acetyl-L-Cav(Boc)-DOOA-(+)-JQ1 (**52**) ausgehend konnten nun canavaninhaltige bacPROTACs synthetisiert werden (Abb. 3.9).

Für Cav_bacPROTAC_01 wurde dabei die geringste Gesamtausbeute erzielt. Sie lag bei nur 3 %. Dies lässt sich auf die hohe Säureempfindlichkeit der P-N-Bindung zwischen Phosphat und Guanidin des Canavanins zurückführen. War die Phosphatgruppe durch Ethyl- (Cav_bacPROTAC_02) oder Pivaloyl-ester (Cav_bacPROTAC_03) geschützt, so stieg die Ausbeute der Synthesen auf 48 – 60 % stark an.

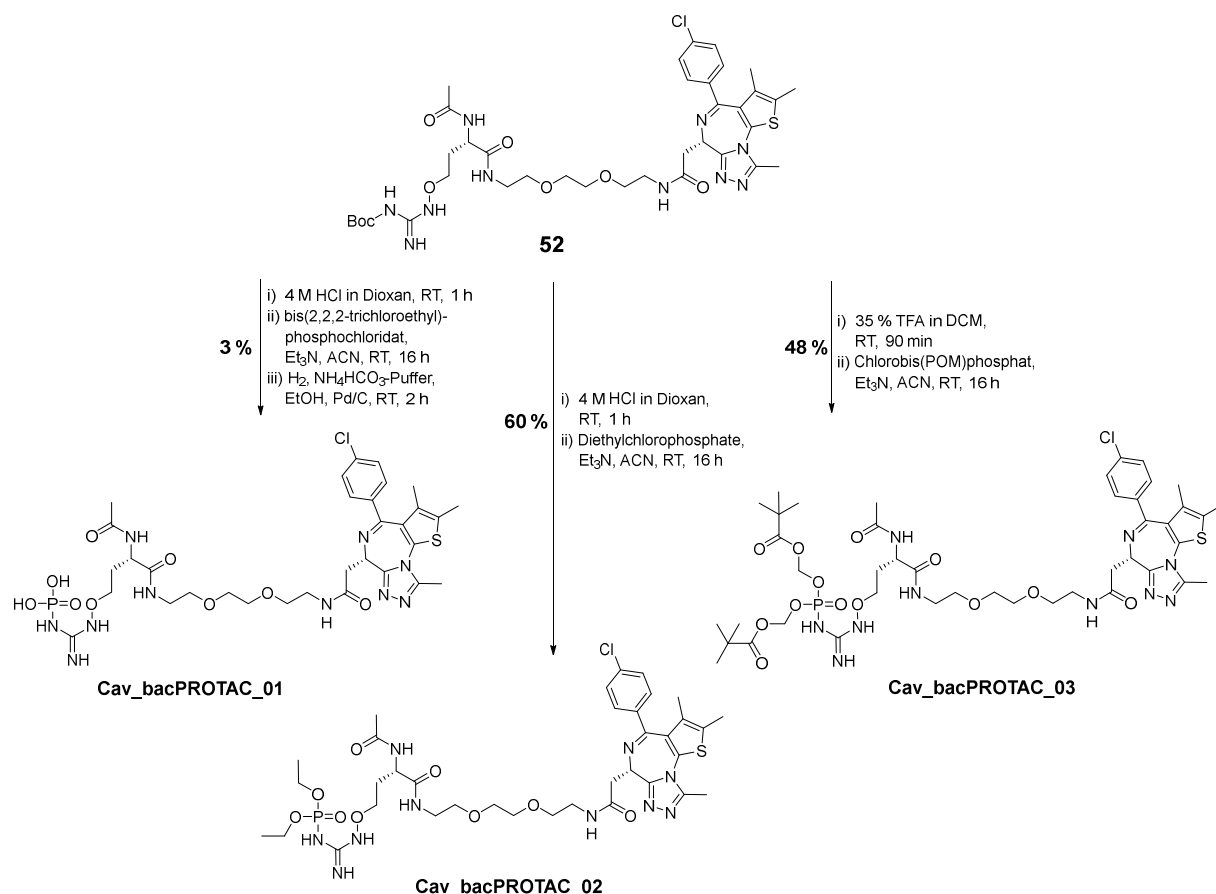


Abbildung 3.9: Synthesen von Cav_bacPROTAC_01-03, ausgehend von Acetyl-L-Cav(Boc)-DOOA-(+)-JQ1 (**52**).

Da die freie Phosphatgruppe eine negative Ladung aufweist, musste auch hier davon ausgegangen werden, dass Cav_bacPROTAC_01 unter Umständen in nur geringem Maße oder gar nicht membrangängig ist. Aus diesem Grund wurden auch die Derivate Cav_bacPROTAC_02 und Cav_bacPROTAC_03 synthetisiert. Zum einen erhöht sich durch die Schutzgruppen auf der Phosphatgruppe deren Stabilität gegenüber Säuren, zum anderen wird auf diese Weise die Ladung der Phosphatgruppe maskiert, was wiederum die Membrangängigkeit der Substanzen erhöhen sollte. Dieses Vorgehen wurde bereits bei der Optimierung der Zellgängigkeit des Phosphonats Fosmidomycin erfolgreich angewendet [62].

Mykobakterien verfügen über eine Reihe von Esterasen, die strukturell unterschiedliche Ester spalten können [63] [64]. Dadurch sollte es möglich sein, bacPROTACs in Form von Pro-Drugs zu synthetisieren, d.h. Derivate eines Wirkstoffes, in denen die Schutzgruppen der Phosphatgruppe erst nach dem Durchdringen der Zellmembran intrazellulär abgespalten werden, wodurch der eigentlich bioaktive Wirkstoff freigesetzt wird. Sowohl die Ethylester in Cav_bacPROTAC_02 als auch die Pivalylester in Cav_bacPROTAC_03 sind literaturbekannte

Substrate bakterieller Esterasen und wurden schon als Phosphonat-Prodrugs in Bakterien eingesetzt [63] [65].

Für die Synthese von Cav_bacPROTAC_03 war es zusätzlich erforderlich, den Phosphorylierungsbaustein Chlorobis(POM)phosphat (**47**) zu synthetisieren (Abb. 3.10). Hierzu wurde auf literaturbekannte Syntheseschritte zurückgegriffen [66] [67] [68].

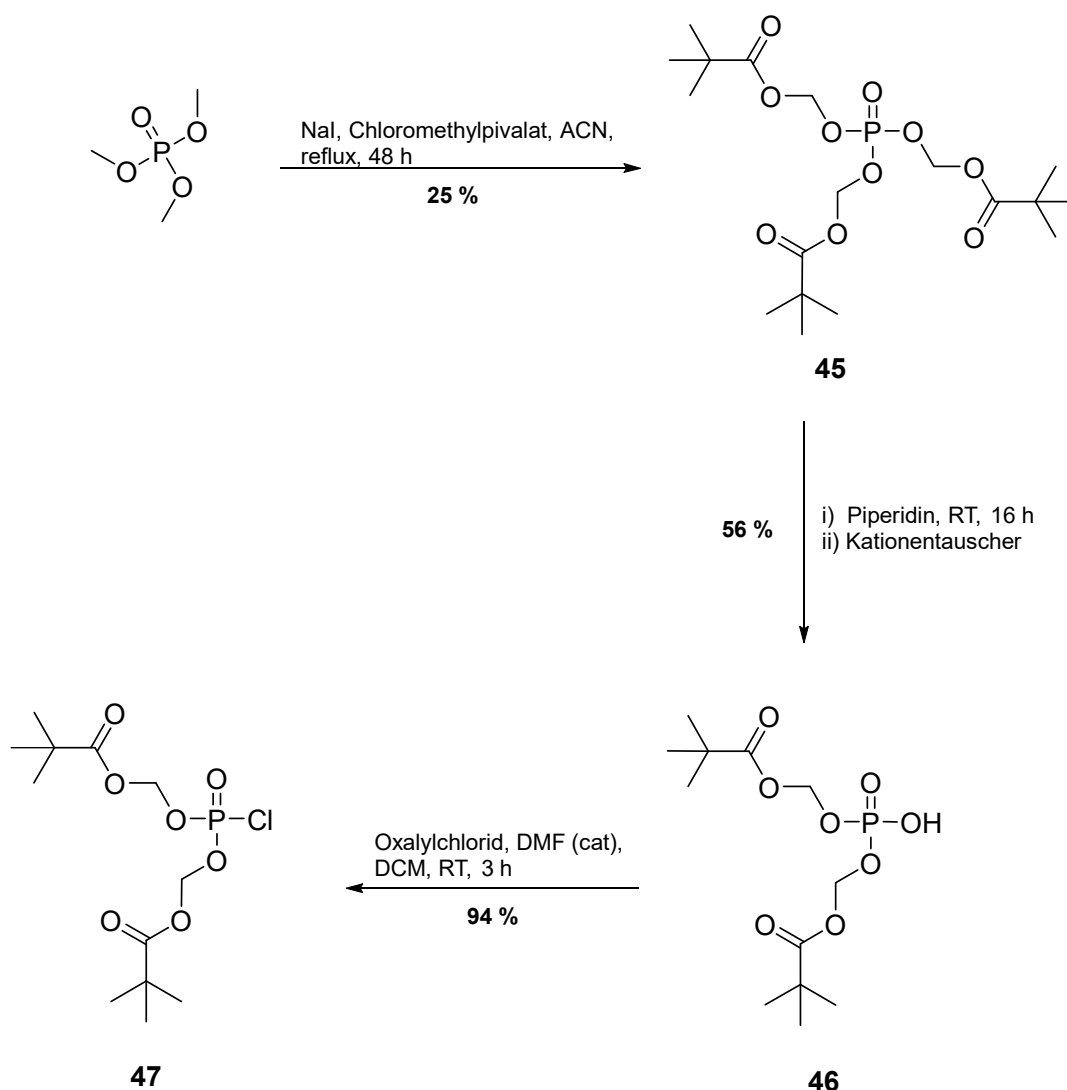


Abbildung 3.10: Syntheseroute zur Darstellung von Chlorobis(POM)phosphat (**47**).

In einem ersten Syntheseschritt wurden Trimethylphosphat und Chloromethylpivalat zu Verbindung **45** umgesetzt. Die Ausbeute dieser Transesterifizierung lag mit lediglich 25 % jedoch weit unter den publizierten Literaturwerten von 46-74 %. Möglicherweise lag die verhältnismäßig geringe Ausbeute an einer zu kurzen Reaktionsdauer oder an nicht vollständig trockenen Reaktionsbedingungen. Die höchste Ausbeute von 74 % wurde von Pahor *et al.*

nach einer Reaktionszeit von mindestens 72 Stunden unter absolut trockenen Reaktionsbedingungen erzielt [67]. Verbindung **45** wurde anschließend durch Piperidin partiell gespalten und das resultierende Piperidinsalz mittels saurem Kationenaustauscher aufgereinigt. Die entsprechende Ausbeute des Alkohols **46** lag mit 56 % wieder im erwarteten Bereich. Im letzten Schritt erfolgte die Umsetzung des Alkohols zum Chlorophosphat **47**. Hierzu wurde **46** in trockenem DCM gelöst und unter Argon tropfenweise mit einer Lösung von Oxalylchlorid in DCM versetzt. Da das finale Produkt äußerst reaktiv und sehr empfindlich gegenüber Feuchtigkeit ist, wurde auf eine Aufreinigung verzichtet. Das Lösemittel wurde nach erfolgter Reaktion im Hochvakuum vorsichtig entfernt. Verbindung **47** konnte als gelblicher, ölgiger Rückstand mit einer Ausbeute von 94 % erhalten werden, der anschließend direkt zur Phosphorylierung von Acetyl-L-Cav(Boc)-DOOA-(+)-JQ1 (**52**) eingesetzt wurde, wodurch Cav_bacPROTAC_03 erhalten wurde.

Zeitabhängige LC/MS-Messungen von Cav_bacPROTAC_01 bei saurem pH-Wert zeigten im Anschluss an die erfolgte Synthese, dass durch die Verwendung von Canavanin anstelle von Arginin die Säurestabilität tatsächlich signifikant erhöht werden konnte (Abb. 3.11).

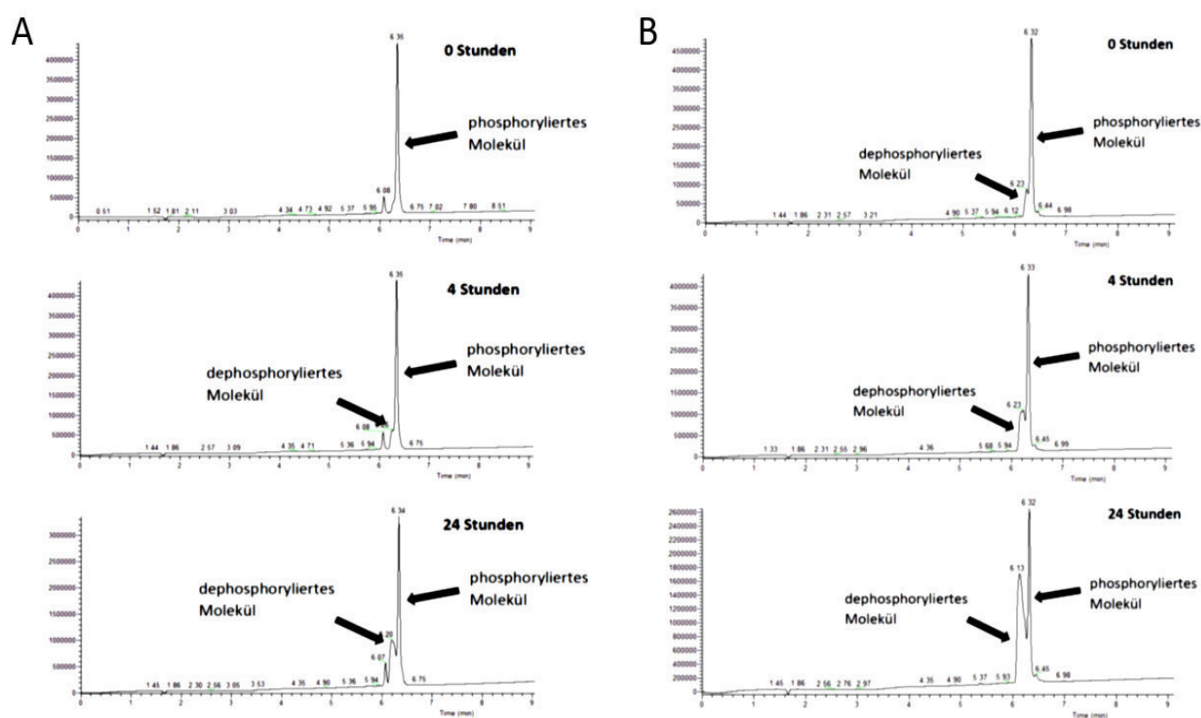


Abbildung 3.11: Stabilitätstest von Cav_bacPROTAC_01 (A) und einem entsprechenden Argininderivat (B) bei pH 4 zu unterschiedlichen Zeitpunkten (LC-Messungen).

Während zu Beginn des Experiments Cav_bacPROTAC_01 bei pH 4 noch nahezu komplett phosphoryliert vorlag, trat zeitabhängig Hydrolyse auf. Bereits nach 4 Stunden konnte die Bildung eines neuen Peaks im Chromatogramm beobachtet werden, der einem dephosphorylierten bacPROTAC-Derivat entsprach. Nach 24 Stunden war dieser Peak deutlich angewachsen. Eine entsprechende Vergleichssubstanz mit Argininphosphat anstelle von Canavaninphosphat zeigte unter identischen Bedingungen jedoch eine deutlich raschere Hydrolyse. Bereits nach 4 Stunden war die Hydrolyse im Falle des Argininderivats genauso weit fortgeschritten, wie im Falle des Canavaninderivats nach 24 Stunden.

Diese erhöhte Stabilität könnte darauf zurückzuführen sein, dass das zusätzliche Sauerstoffatom im Molekül durch seine beiden freien, vollbesetzten p-Orbitale sehr elektronenreich ist und somit Elektronen in Richtung Guanidineinheit geschoben werden. Dadurch wird die P-N-Bindung am Guanidin nicht so stark wie beim Arginin polarisiert, was wiederum zu einer höheren Hydrolysestabilität führen könnte.

Cav_bacPROTAC_01 zeigte im Zuge der biochemischen Validierung *in vitro* den gewünschten Proteinabbau (Abb. 3.12). *In vivo* war jedoch keine Aktivität zu beobachten. Dies lässt sich jedoch mit der mangelnden Membrangängigkeit der Verbindung durch die freie Phosphatgruppe erklären. Beide Experimente wurden in der AG Clausen durchgeführt.

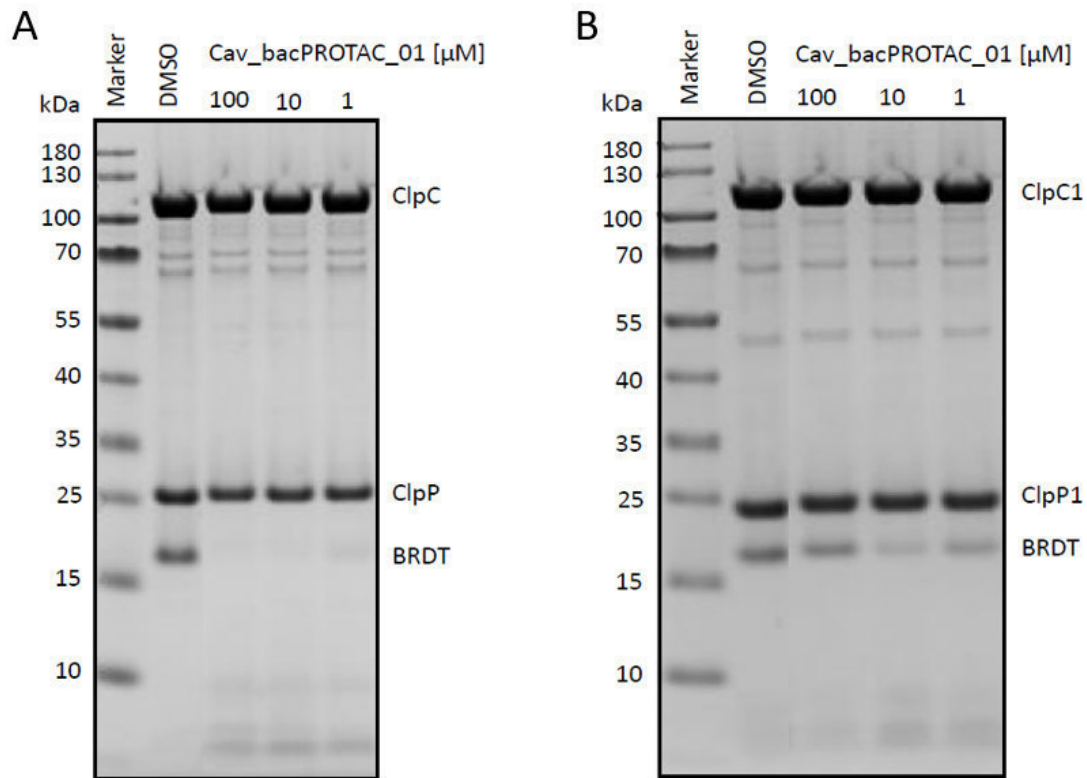


Abbildung 3.12: *in vitro*-Abbau von BRDT durch Cav_bacPROTAC_01 nach 2 Stunden Inkubationszeit. **A:** unter Verwendung von ClpCP aus *Bacillus subtilis*. **B:** unter Verwendung von ClpC1/P1P2 aus *Mycobacterium smegmatis*. (Die Abbauxperimente wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. Tim Clausen durchgeführt).

Bei Betrachtung der Gelbilder fällt auf, dass der bacPROTAC-induzierte Abbau von BRDT durch das ClpCP-System aus *Bacillus subtilis* besser bzw. vollständiger verläuft als der Abbau von BRDT durch ClpC1/P1P2 aus *Mycobacterium smegmatis*. Bereits bei einer bacPROTAC-Konzentration von 1 μM war das Substrat nahezu vollständig abgebaut. Ein vergleichbar effizienter Abbau konnte bei Verwendung des ClpC1/P1-Systems aus *M. smegmatis* bei keiner der drei untersuchten Konzentrationen erreicht werden. Zudem fällt auf, dass beim Verdau mittels ClpC1/P1P2 bei einer bacPROTAC-Konzentration von 100 μM nur ein geringer Abbau stattfand. Diese Beobachtung könnte auf eine Übersättigung der beiden beteiligten Proteine mit ihrem jeweiligen Liganden zurückzuführen zu sein, was eine zum Proteinabbau notwendige Verknüpfung beider Proteine durch den bacPROTAC verhindert.

Von den als Prodrugs für den *in vivo*-Abbau synthetisierten Derivate Cav_bacPROTAC_02 und Cav_bacPROTAC_03 lagen zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit noch keine weiteren biologischen Daten vor.

3.3. Cyclomarinderivate

Als strukturelle Ausgangsverbindung für die Synthese der Cyclomarinderivate diente der Naturstoff Cyclomarin C bzw. Desoxy-Cyclomarin C (Abb. 3.13). Da aus der Fachliteratur bekannt war, dass die Hydroxygruppe des Tryptophans nur geringfügig zur Bindung an ClpC1 beiträgt [49], wurde in dieser Arbeit ausschließlich nicht-hydroxyliertes Tryptophan verwendet.

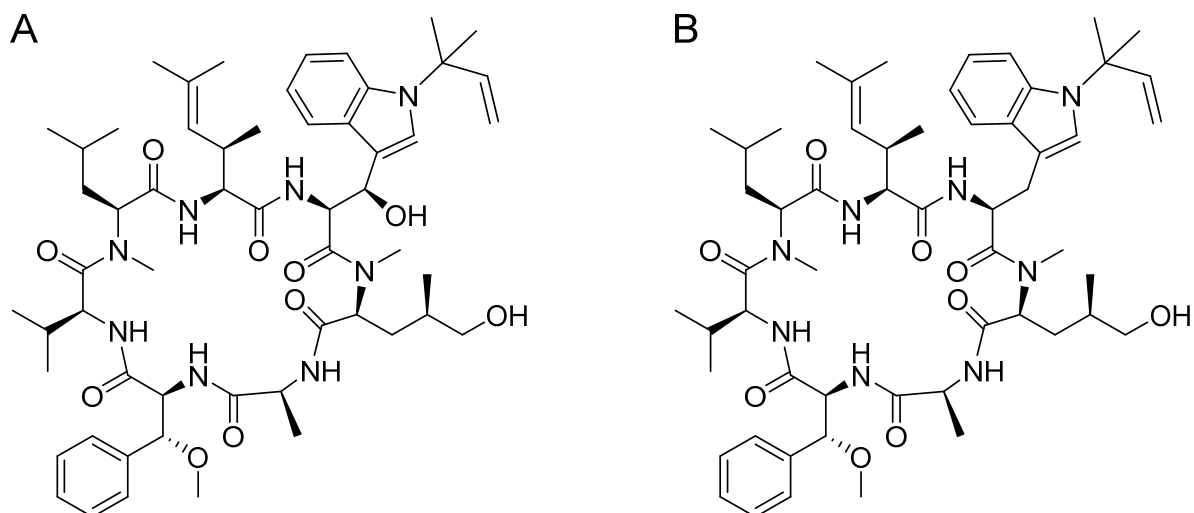


Abbildung 3.13: Chemische Struktur von Cyclomarin C (A) und Desoxy-Cyclomarin C (B).

Bevor eine Strategie für die Festphasensynthese von Cyclomarinderivaten unter Einsatz der Fmoc-Strategie entwickelt werden konnte, mussten zunächst jedoch erst einige kommerziell nicht erhältliche Aminosäuren synthetisiert werden (Abb. 3.14).

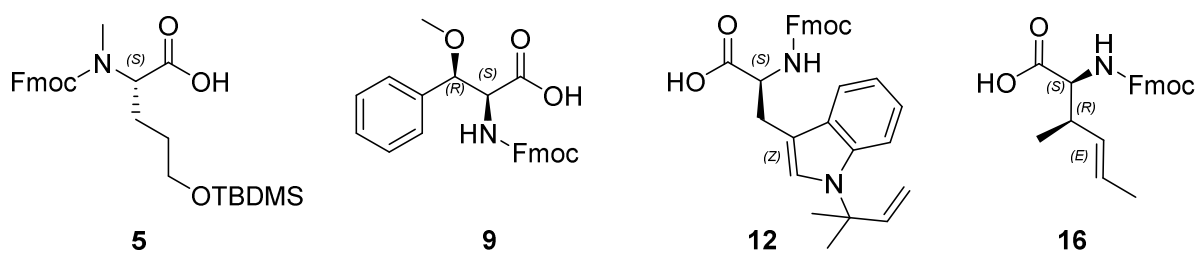


Abbildung 3.14: Übersicht über die synthetisierten Aminosäuren für die Darstellung der anvisierten Cyclomarin-Derivate.

Fmoc-*N*-Me-*L*-Nva(OTBDMS)-OH (**5**) konnte ausgehend von Fmoc-*N*-Me-*L*-Glu(*t*Bu)-OH in 5 Stufen mit einer Gesamtausbeute von 34 % erfolgreich synthetisiert werden (Abb. 3.15).

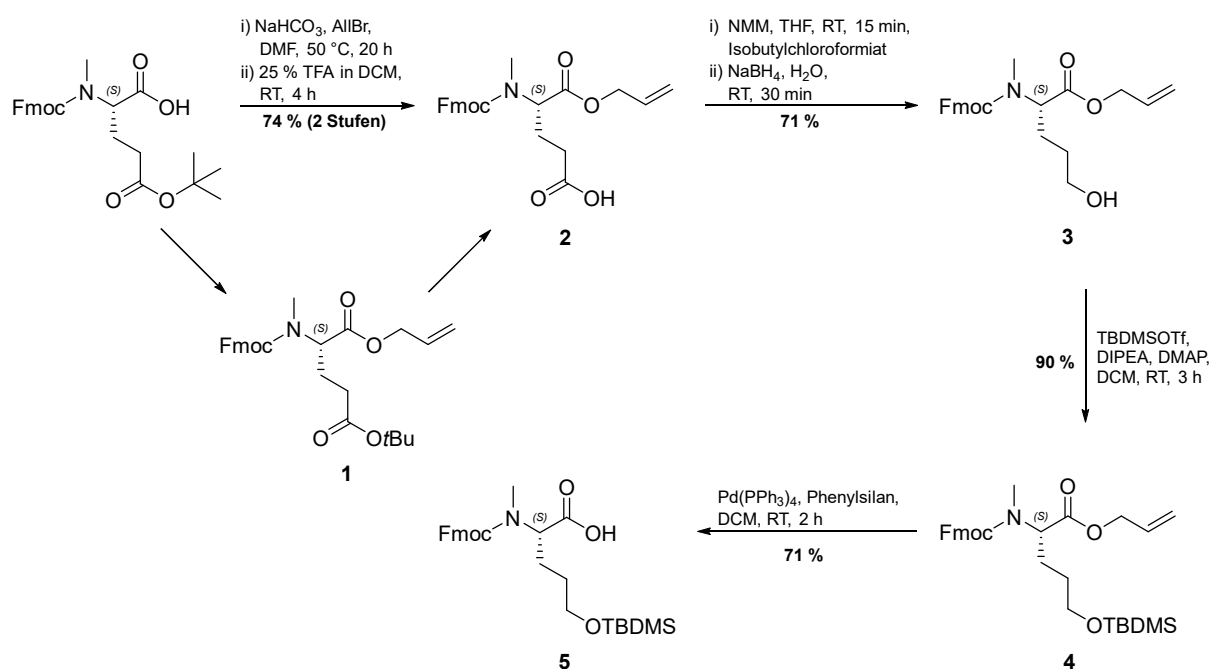


Abbildung 3.15: Syntheseroute zur Darstellung von Fmoc-N-Me-L-Nva(OTBDMS)-OH (5).

Zunächst wurde Fmoc-N-Me-L-Glu(*t*Bu)-OAll (2) durch Reaktion von Fmoc-N-Me-L-Glu(*t*Bu)-OH mit Allylbromid dargestellt. Nach anschließender saurer Abspaltung der *tert*-Butylgruppe durch TFA konnte Verbindung 2 mit einer Ausbeute von 74 % isoliert werden. Im nächsten Schritt wurde dann die Carboxylgruppe zum entsprechenden Alkohol reduziert. Dazu wurde 2 in THF gelöst und nach Zugabe der Base NMM und Isobutylchloroformiat 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Durch Zugabe von in einer geringen Menge Wasser vorgelöstem Natriumborhydrid erfolgte anschließend die Reduktion zum Alkohol 3. Bei dieser Reaktion wurde eine Ausbeute von 71 % erzielt, welche damit im literaturbekannten Bereich lag [69]. Nach Schützung der freien Hydroxygruppe als Silylether 4 wurde im letzten Schritt die Allylgruppe unter reduktiven Bedingungen durch $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ und Phenylsilan mit einer Ausbeute von 71 % abgespalten. Das so erhaltene Fmoc-N-Me-L-Nva(OTBDMS)-OH (5) konnte nun für die Synthese von Cyclomarininen nach der Fmoc-Strategie verwendet werden.

Ein weiterer zu synthetisierender Baustein war Fmoc-L-Phe(3*R*-MeO)-OH (9). Als Startverbindung diente in dieser Synthese L-*threo*-Phenylserin (Abb. 3.16).

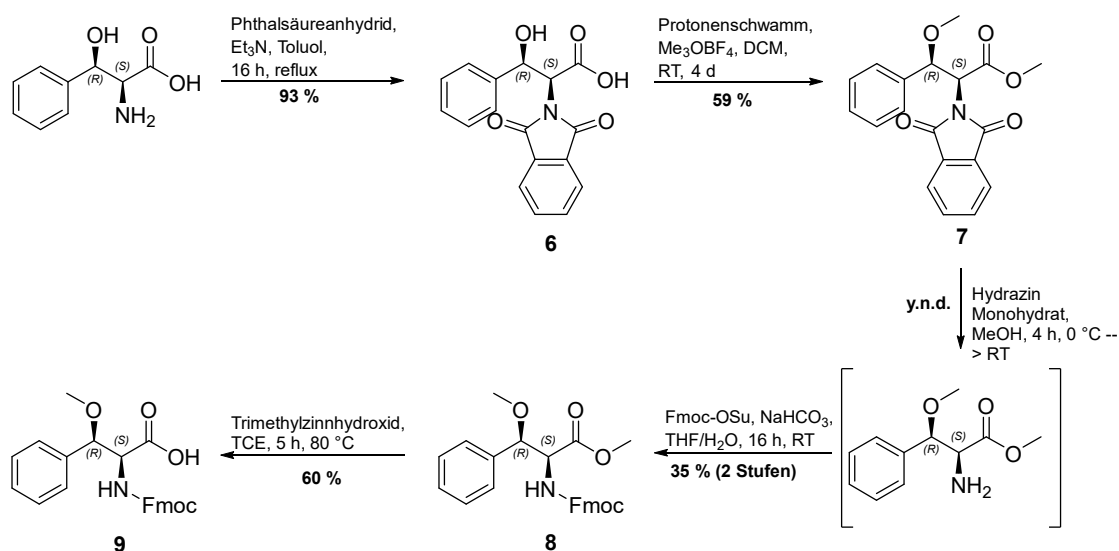


Abbildung 3.16: Syntheseroute zur Darstellung von Fmoc-L-Phe(3R-MeO)-OH (**9**).

L-*threo*-Phenylserin wurde zunächst N-terminal mit einer Phthalylschutzgruppe versehen. Die Ausbeute von Verbindung **6** lag mit 93 % im erwarteten Bereich. Im nächsten Schritt wurde die Hydroxygruppe methyliert. Zunächst sollte die Methylierung mit Methyljodid bzw. mit Dimethylsulfat als Methylierungsreagenzien erfolgen. Beide Reagenzien erwiesen sich hier jedoch als ungeeignet, da eine Produktbildung lediglich in Spuren beobachtet werden konnte. Mit 59 % konnte eine adäquate Ausbeute von Verbindung **7** jedoch durch Verwendung von Trimethyloxonium Tetrafluoroborat nach einer Reaktionsdauer von 4 Tagen erzielt werden. Bei diesem Reagenz, welches auch als Meerwein's Salz nach dem deutschen Chemiker Hans Meerwein bezeichnet wird, handelt es sich um ein sehr starkes Methylierungsreagenz [70]. Aus diesem Grund war auch zuvor die Einführung der Phthalylschutzgruppe notwendig. Wurde die Fmoc-Gruppe bereits zu Beginn der Synthese vor der Methylierung des Alkohols eingeführt, so wurde nicht nur die Hydroxygruppe, sondern trotz vorhandener Schutzgruppe auch der Stickstoff methyliert. Diese Nebenreaktion konnte jedoch durch die hier gewählte Schutzgruppenstrategie erfolgreich vermieden werden.

Nach erfolgter Methylierung wurde die Phthalylgruppe unter Verwendung von Hydrazin Monohydrat wieder abgespalten. Der Fortschritt der Entschützung wurde mittels LC/MS verfolgt. Nach vollständiger Abspaltung wurden das Lösemittel und Hydrazin Monohydrat am Hochvakuumrotationsverdampfer entfernt und das freie Amin ohne weitere Aufreinigung direkt mittels Zugabe von Fmoc-OSu in einer Ausbeute von 35 % zur Aminosäure **8** umgesetzt.

In einem letzten Syntheseschritt erfolgte anschließend die Verseifung des Methylester **8** zu Verbindung **9**. Hierzu wurde Trimethylzinnhydroxid verwendet. Dadurch war es möglich, die Verseifung des Esters unter neutralen, anstatt basischen Bedingungen durchzuführen. Üblicherweise werden zur Spaltung von Alkylestern Alkalimetallhydroxide wie Lithium- oder Natriumhydroxid verwendet. Bei Verwendung solcher Hydroxide besteht jedoch die Gefahr, dass die zuvor eingeführte Fmoc-Gruppe ebenfalls wieder abgespalten wird, weshalb hier auf eine andere Methode zurückgegriffen wurde. Die Verwendung von Trimethylzinnhydroxid bzw. von Alkylzinnoxiden zur Spaltung von Estern wurde bereits 1991 von Salomon *et al.* erstmalig in der Fachliteratur erwähnt [71] und unter anderem auch von Nicolao *et al.* 2004 bei der Totalsynthese des Peptids Thiostrepton erfolgreich angewandt [72]. Ein weiterer Grund für die Anwendung dieser Methode war, dass Verbindung **8** ein sehr acides Proton in alpha-Position aufweist. Unter basischen Bedingungen besteht somit die Gefahr, dass dieses Proton abgespalten wird, was dann wiederum die Eliminierung der Methoxygruppe zur Folge haben könnte.

Die Synthese von Fmoc-L-*N'*-*tert*-prenyl-tryptophan (**12**) erfolgte ausgehend von Fmoc-L-Trp(Boc)-OH (Abb. 3.17).

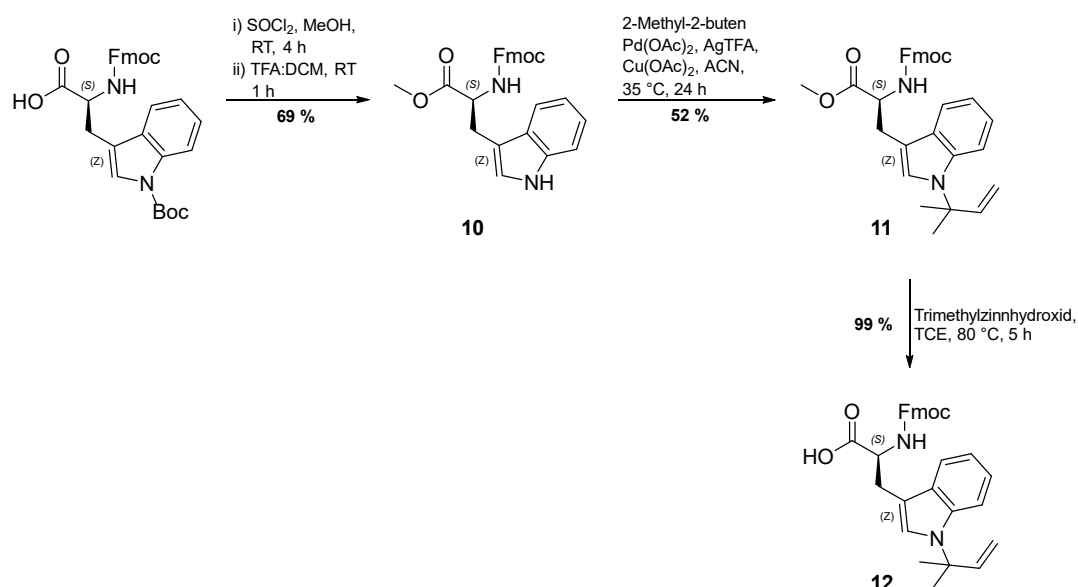


Abbildung 3.17: Syntheseroute zur Darstellung von Fmoc-L-*N'*-*tert*-prenyl-tryptophan (**12**).

Zunächst wurde Fmoc-L-Trp(Boc)-OH in Methanol gelöst und mit Thionylchlorid zum entsprechenden Methylester umgesetzt. Da bei dieser Reaktion *in situ* HCl entsteht, wurde erhofft, dass die Reaktion unter gleichzeitiger Abspaltung der Boc-Schutzgruppe am Stickstoff

des Indols erfolgen würde. Diese Abspaltung verlief jedoch laut LC/MS-Analytik unvollständig. Daher wurde eine komplette Abspaltung anschließend durch Zugabe von TFA in DCM erreicht. Die erzielte Ausbeute von 69 % für Verbindung **10** bewegte sich im erwarteten Rahmen.

Für die folgende direkte N-Prenylierung am Indol wurde auf eine von Luzung *et al.* veröffentlichte Methode zurückgegriffen [73]. Dabei wurden Pd(OAc)₂ als Katalysator und stöchiometrische Mengen Kupfer(II)-acetat sowie Silbertrifluoroacetat verwendet. Die Prenylgruppe wurde durch Einsatz eines 30-fachen Überschusses von 2-Methyl-2-buten in das Molekül eingeführt. Ein möglicher Reaktionsmechanismus für den Ablauf dieser Reaktion ist in Abb. 3.18 dargestellt [73].

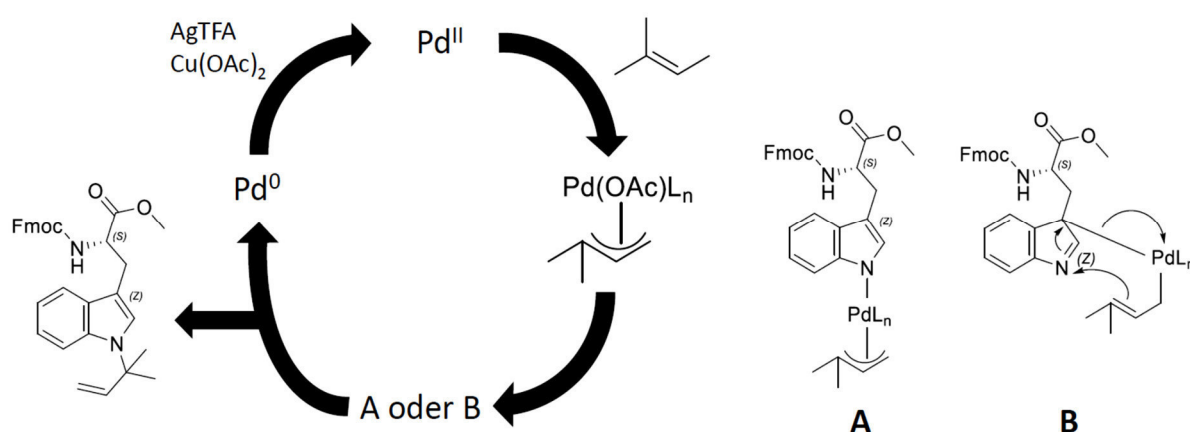


Abbildung 3.18: Vorgeschlagener Mechanismus für die Prenylierung von Tryptophan (Adaptiert nach [73]).

Verbindung **11** konnte auf diesem Wege mit einer Ausbeute von 52 % erhalten werden. Die Ausbeute bewegte sich somit leicht unterhalb des aus der Literatur bekannten Wertes von 61 %.

Für die anschließende Verseifung des Methylesters wurde, wie schon bei der Synthese von Verbindung **9**, erneut auf Trimethylzinnhydroxid zurückgegriffen. Die Spaltung des Esters zur freien Säure **12** gelang mit einer Ausbeute von 99 % nahezu quantitativ.

Die Synthese von (2*S*,3*R*,*E*)-*N*-Fmoc-2-amino-3-methylhex-4-ensäure (**16**) erfolgte ausgehend von 3-Penten-2-ol auf chemo-enzymatischem Wege (Abb. 3.19).

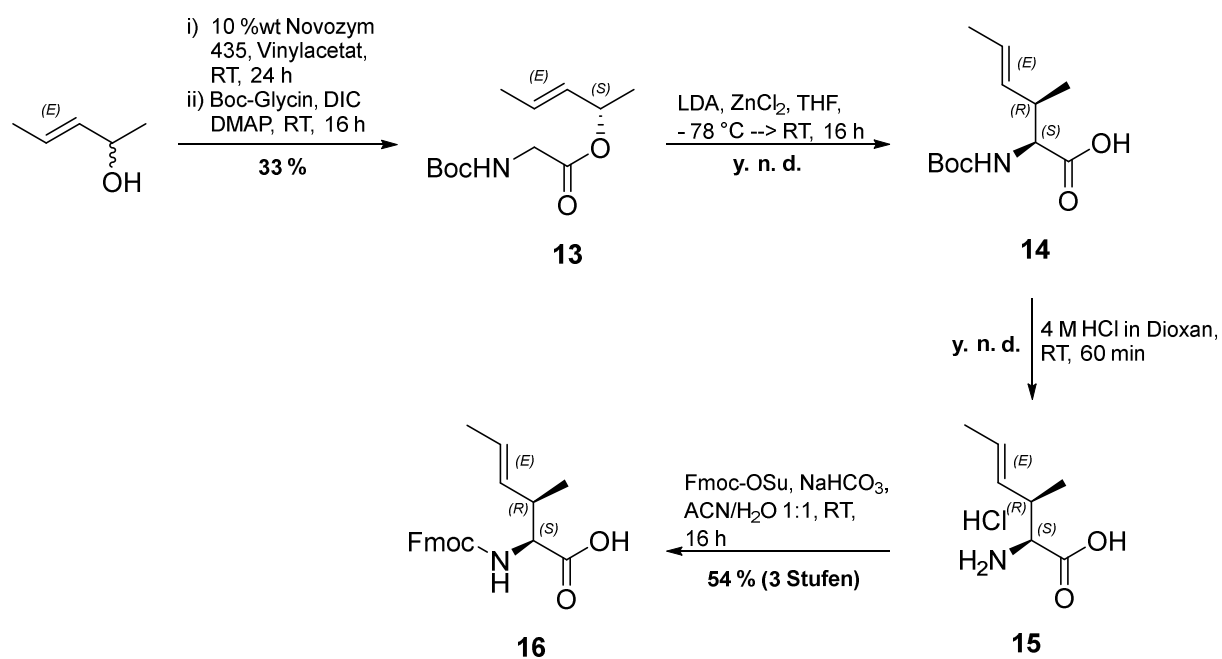


Abbildung 3.19: Syntheseroute zur Darstellung von (2*S*,3*R*,*E*)-*N*-Fmoc-2-amino-3-methylhex-4-ensäure (16).

Der als Enantiomergemisch vorliegende Alkohol wurde zunächst durch das auf Acrylharz immobilisierte Enzym Novozym 435, eine aus *Candida antarctica* B isolierte Lipase, durch Übertragung einer Acetylgruppe vom als Lösemittel verwendeten Vinylacetats auf die Hydroxygruppe acetyliert. Aufgrund der Enantioselectivität des Enzyms wurde jedoch nur das *R*-Enantiomer umgesetzt, während das *S*-Enantiomer des Alkohols unmodifiziert zurückblieb. Nach Abschluss der Reaktion wurde das Enzym durch Filtration abgetrennt und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt. Ester **13** wurde anschließend durch eine Steglich-Veresterung unter Verwendung von Boc-Glycin, DIC und DMAP in einer Ausbeute von 33 % bezogen auf das anfängliche Enantiomergemisch erhalten.

Im nächsten Syntheseschritt erfolgte eine Claisen-Ireland-Umlagerung zu Verbindung **14** (Abb. 3.20).

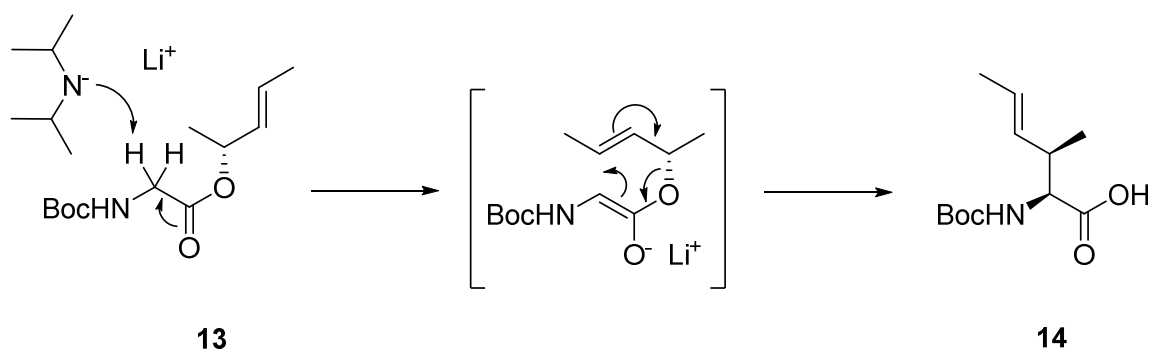


Abbildung 3.20: Mechanismus der Claisen-Ireland-Umlagerung von Verbindung **13** zu Verbindung **14**. Zunächst wurde **13** durch LDA am α -Kohlenstoff bei -78 °C deprotoniert. Das gebildete Enolat ist nur bei tiefen Temperaturen stabil und lagert bei Erwärmung auf Raumtemperatur in einer sigmatropen [3,3] Umlagerung zur Verbindung **14** um.

Das erhaltene Rohprodukt wurde unter sauren Bedingungen wässrig aufgearbeitet, bevor die Boc-Gruppe abgespalten und anschließend die Fmoc-Gruppe eingeführt wurde, so dass Verbindung **16** in einer Ausbeute von 54 % über 3 Stufen ausgehend von Verbindung **13** erhalten werden konnte.

Mit den erfolgreich synthetisierten Bausteinen **5**, **9**, **12** und **16** konnten im Folgenden nun Cyclomarinderivate hergestellt werden.

Zunächst wurde versucht, Fmoc-N-Me-L-Glu-OAll (**2**) über die freie Säurefunktion der Seitenkette auf 2-Chlorotryl-Harz zu verankern und anschließend durch iteratives Abspalten der Fmoc-Gruppe und Kupplung der folgenden Aminosäuren das Peptid so aufzubauen, dass eine Zyklisierung auf dem Harz möglich ist. Es stellte sich hierbei jedoch sehr schnell heraus, dass diese Synthesestrategie nicht zum gewünschten Erfolg führen würde.

Nach N-terminaler Kupplung der zweiten Aminosäure Fmoc-L-Trp(Boc)-OH und folgender Abspaltung der Fmoc-Gruppe zeigte sich bei LC/MS-Messungen zur Überprüfung des Kupplungserfolgs, dass das nun frei gewordene Amin unter basischen Bedingungen sehr schnell mit dem Allylester des Glutamats reagierte und ein Diketopiperazin unter Abspaltung von Allylalkohol bildete (Abb. 3.21).

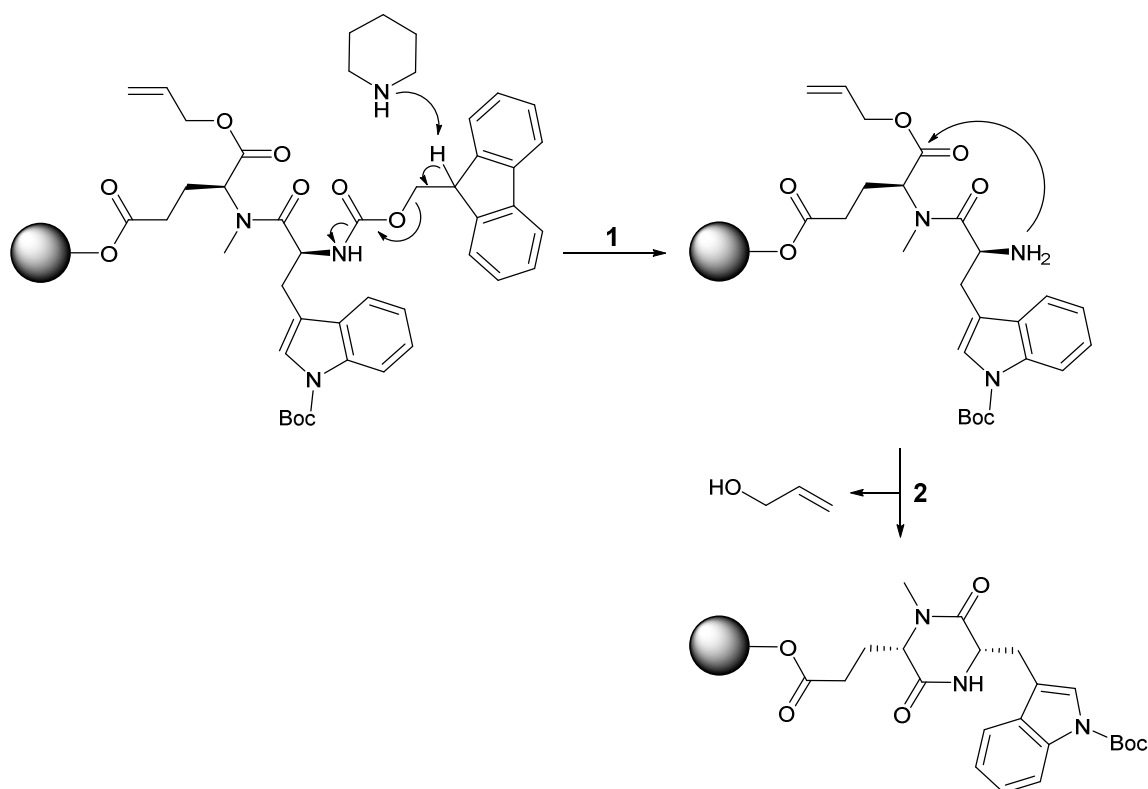


Abbildung 3.21: Mechanismus der Fmoc-Abspaltung (1) mit anschließender Diketopiperazinbildung und Abspaltung des Allylesters (2) während der Cyclomarinsynthese.

Diese Nebenreaktion kann unter bestimmten Voraussetzungen besonders dann bei Festphasensynthesen auftreten, wenn *N*-methylierte Aminosäuren an der Synthese beteiligt sind [74] [75]. Auch der komplette Verlust der beiden *N*-terminalen Aminosäuren wurde in der Literatur in diesem Zusammenhang schon beobachtet und beschrieben [76], trat in der hier durchgeführten Synthese jedoch nicht auf.

Mit dem gebildeten Diketopiperazin war die weitere Peptidsynthese nicht mehr möglich, so dass eine neue Syntheseroute entwickelt werden musste.

Um dieses Problem zu umgehen, wurde daher ein neuer Startpunkt zur Verankerung der ersten Aminosäure des Cyclopeptides festgelegt. Die Wahl fiel hierbei auf L-Phenylalanin bzw. L-Phe(3*R*-MeO)-OH. Die allgemeine Syntheseroute wird in der folgenden Abbildung 3.22 grafisch veranschaulicht.

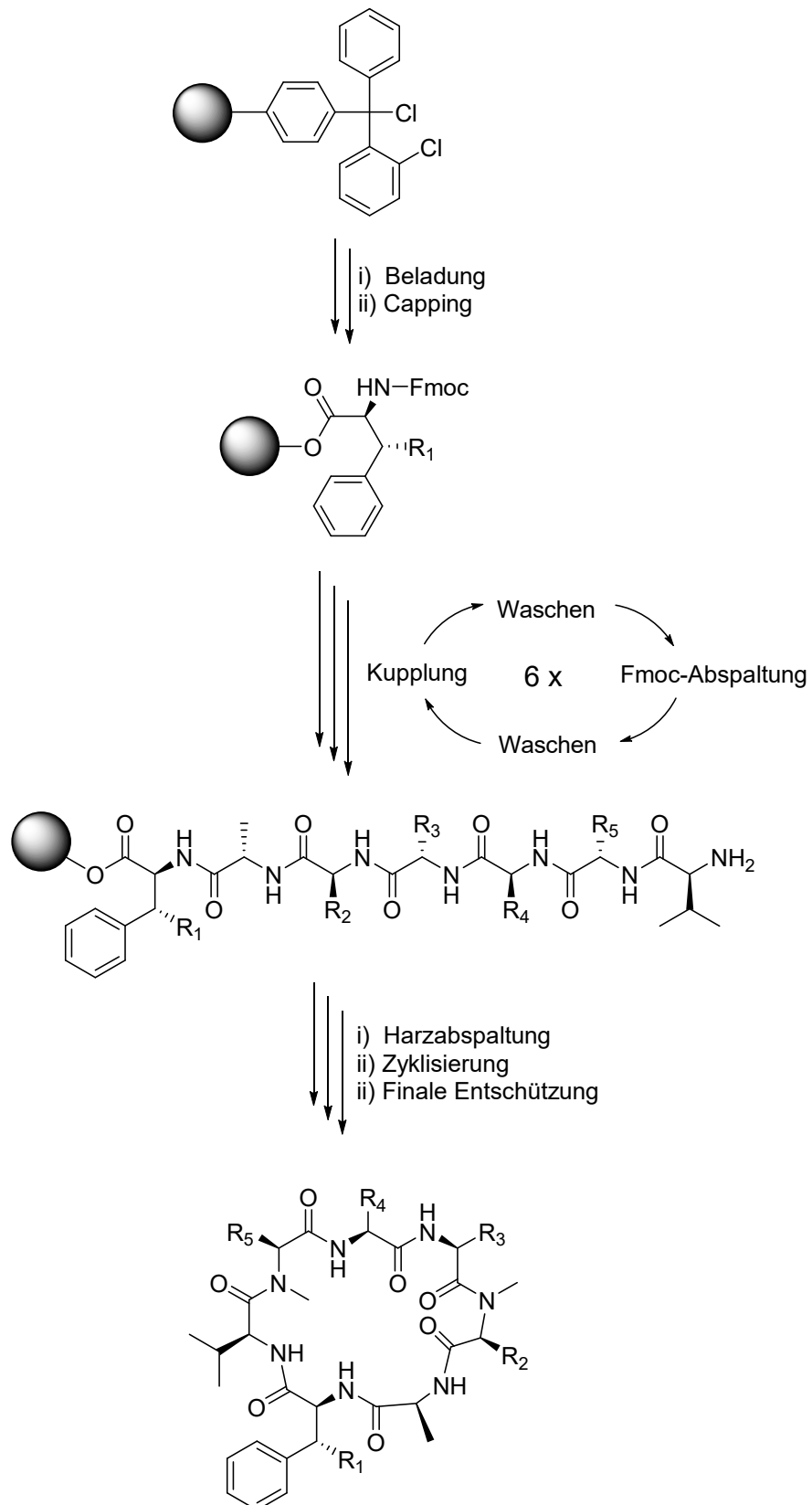


Abbildung 3.22: Allgemeines Syntheschema der Festphasensynthese zur Darstellung von Cyclomarinderivaten. Lediglich die Positionen der *N*-Methylierungen, sowie L-Ala-OH und L-Val-OH blieben bei allen Derivaten unverändert.

Zunächst wurde die Startaminosäure C-terminal auf 2-Chlorotrityl-Harz geladen. Nach Blocken der noch freien Bindestellen auf dem Harz durch eine 30-minütige Inkubation mit DCM:Methanol 3:1 in Gegenwart von DIPEA erfolgten anschließend iterativ die Abspaltung der Fmoc-Gruppe, das Waschen des Harzes und die Kupplung der jeweiligen nächsten Aminosäure. Testabspaltungen zur Überprüfung des Kupplungserfolgs zeigten bei dieser Syntheseroute die gewünschten Ergebnisse. Die unerwünschte Bildung von Diketopiperazinen konnte erfolgreich vermieden werden. Nach Kupplung der letzten Aminosäure wurden die jeweiligen linearen Peptide unter Verwendung von Hexafluoroisopropanol vom Harz abgespalten, zyklisiert und final entschützt. Hexafluoroisopropanol hat gegenüber klassischen sauren Abspaltreagenzien wie z.B. TFA den Vorteil, dass seine Säurestärke aufgrund der elektronenziehenden Wirkung der Fluoratome zwar hoch genug ist, um das Peptid vom säurelabilen 2-Chlorotrityl-Harz abzuspalten, andererseits aber nicht ausreichend ist, um säurelabile Schutzgruppen wie z.B. die hier verwendeten Boc-Schutzgruppen oder Silylether zu spalten [77]. Da im folgenden Schritt die Zyklisierung des Peptids in Lösung geschehen sollte, war es essenziell, dass die Schutzgruppen auf den Seitenketten der Aminosäuren an dieser Stelle noch erhalten blieben.

Für die Zyklisierung der linearen Peptide wurde auf zwei verschiedene Methoden zurückgegriffen. Peptide, die prenyliertes Tryptophan enthielten, wurden dabei unter Verwendung von 1-Hydroxy-7-azabenzotriazol (HOAt) und Diisopropylcarbodiimid als Kupplungsreagenzien sowie Triethylamin als Base zyklisiert. Für alle anderen Derivate wurden das zyklische Phosphorsäureanhydrid T3P (Abb. 3.23) und DIPEA verwendet.

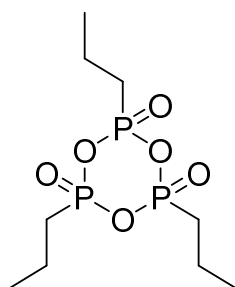


Abbildung 3.23: Struktur von Propylphosphorsäureanhydrid T3P.

T3P ist ein sehr starkes Kupplungsreagenz und führt zwar einerseits zu einer geringeren Racemisierung als andere Kupplungsreagenzien, kann aber durch seine große Reaktivität und seine vielseitigen Einsatzmöglichkeiten auch zu unerwünschten Nebenreaktionen führen [78].

Da die Prenylgruppe am Tryptophan sehr empfindlich gegenüber Säuren reagiert und leicht abspaltbar ist, wurde daher in diesen Fällen auf andere Reagenzien zurückgegriffen.

Die zyklisierten Peptide wurden anschließend entschützt und per RP-HPLC aufgereinigt. Aufgrund der unterschiedlichen Stabilität gegenüber Säuren wurden auch hier wieder verschiedene Methoden angewandt.

Zur Abspaltung von Boc-Gruppen wurde in der Regel eine 3:1 Mischung aus DCM und TFA oder 4 M HCl in 1,4-Dioxan verwendet. Ebenso wurde bei der Abspaltung der *tert*-Butylgruppe des Tyrosins von Derivat Cym_5 verfahren. Bei Derivat Cym_4 erfolgte die selektive Abspaltung der TBDMS-Gruppe am 5-Hydroxy-Norvalin durch die Verwendung von TBAF, da hier die *tert*-Butylgruppe am Tyrosin erhalten bleiben sollte.

Eine Ausnahme bildeten Peptide, die prenyliertes Tryptophan enthielten. Um die säurelabile Prenylgruppe nicht abzuspalten, wurde in diesen Fällen die Boc-Abspaltung unter basischen Bedingungen durchgeführt. Dazu wurden große Überschüsse der Base 2,6-Lutidin (20 eq.) in Kombination mit der Lewissäure TMSOTf (16 eq.) zur Reaktionslösung gegeben [79].

Mit den so synthetisierten Cyclomarinderivaten konnten anschließend anhand der unterschiedlichen Strukturen im Zuge der biochemischen bzw. biologischen Validierung Struktur-Wirkungs-Beziehungen aufgestellt werden.

Insgesamt wurden 15 Derivate erfolgreich synthetisiert. Die Strukturen sind der Abb. 3.24 und Tabelle 3.1 zu entnehmen.

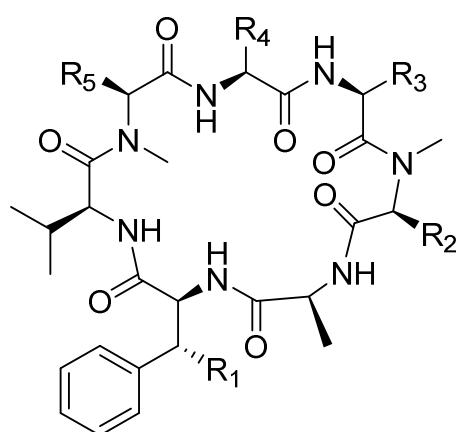


Abbildung 3.24: Allgemeine Grundstruktur der synthetisierten Cyclomarinderivate.

Tabelle 3.1: Synthetisierte Cyclomarinderivate.

Derivat	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Cym_1	H	<i>N</i> -Me-L-Glu	L-Trp	L-Ile	<i>N</i> -Me-L-Leu
Cym_2	H	<i>N</i> -Me-L-Glu(<i>tert</i> -Bu)	L-Trp(Boc)	L-Ile	<i>N</i> -Me-L-Leu
Cym_3	H	<i>N</i> -Me-5-Hydroxy-L-Nva	L-Trp	L-Ile	<i>N</i> -Me-L-Leu
Cym_4	H	<i>N</i> -Me-5-Hydroxy-L-Nva	L-Tyr(<i>tert</i> -Bu)	L-Ile	<i>N</i> -Me-L-Leu
Cym_5	H	<i>N</i> -Me-5-Hydroxy-L-Nva	L-Tyr	L-Ile	<i>N</i> -Me-L-Leu
Cym_6	H	<i>N</i> -Me-L-Lys	L-Trp	L-Ile	<i>N</i> -Me-L-Leu
Cym_7	H	<i>N</i> -Me-5-propyl-L-Gln	L-Trp	L-Ile	<i>N</i> -Me-L-Leu
Cym_8	OMe	<i>N</i> -Me-L-Lys	L-Trp	L-Ile	<i>N</i> -Me-L-Leu
Cym_9	H	<i>N</i> -Me-L-Lys	L-Trp(prenyl)	L-Ile	<i>N</i> -Me-L-Leu
Cym_10	OMe	<i>N</i> -Me-L-Lys	L-Trp(prenyl)	L-Ile	<i>N</i> -Me-L-Leu
Cym_11	OMe	<i>N</i> -Me-L-Lys	L-Trp	L-Ile	<i>N</i> -Me-L-Glu
Cym_12	H	<i>N</i> -Me-L-Orn	L-Trp	L-Ile	<i>N</i> -Me-L-Leu
Cym_13	H	<i>N</i> -Me-L-Lys	L-Trp	L-Glu(OMe)	<i>N</i> -Me-L-Leu
Cym_14	H	<i>N</i> -Me-L-Lys	L-Trp	L-Glu	<i>N</i> -Me-L-Leu
Cym_15	OMe	<i>N</i> -Me-L-Lys	L-Trp(prenyl)	(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> , <i>E</i>)-2-amino-3-methylhex-4-ensäure	<i>N</i> -Me-L-Leu

Mit den synthetisierten Cyclomarinderivaten wurden anschließend MIC-Werte für das Wachstum von *Mycobacterium smegmatis* sowie K_D-Werte zur Bestimmung der Bindungsaffinitäten an ClpC1_{NTD} gemessen. Diese Messungen erfolgten mittels SPR und wurden ebenso wie alle weiteren biochemischen und biologischen Assays dieser Arbeit durch die Arbeitsgruppe von Dr. Tim Clausen am IMP in Wien bestimmt. Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

Tabelle 3.2: MIC- und K_D-Werte der synthetisierten Peptide.

Derivat	MIC [μM]	K _D [μM]
Cym_1	n.d.	225
Cym_2	n.d.	n.d.
Cym_3	> 30	107
Cym_4	> 30	128
Cym_5	n.d.	326

Cym_6	24	14.9
Cym_7	> 120	26.8
Cym_8	12.5	0.8
Cym_9	40	n.d.
Cym_10	20	1.4
Cym_11	> 200	70.8
Cym_12	26	11.6
Cym_13	59	15.1
Cym_14	> 200	43.5
Cym_15	20	n.d.

Verbindung Cym_1 weist eine gegenüber dem Naturstoff Cyclomarin C stark vereinfachte Struktur auf. Wie bereits in Kap. 2 beschrieben, muss für die Nutzung in bacPROTACs ein Derivat gefunden werden, das zwar einerseits eine gute Bindungsstärke zum Zielprotein aufweist, gleichzeitig aber gegenüber Bakterien eine nicht zu große Toxizität aufweist. Aus diesem Grund wurde zunächst ein Derivat synthetisiert, das gegenüber den Naturstoffen strukturell vereinfacht war.

Cym_1 weist weder eine Methoxygruppe am Phenylalanin noch eine Modifizierung am Indol des Tryptophans auf. Zudem wurde hier *N*-Me-5-Hydroxynorvalin gegen *N*-Me-Glutamat ausgetauscht und Isoleucin anstelle der ungesättigten Aminohexensäure verwendet. In der Summe führten diese strukturellen Vereinfachungen zu einem K_D -Wert von 225 μ M. Dieser hohe Wert bedeutet eine nur geringe Bindungsaffinität des Peptids an das Protein, was sich auch darin widerspiegelt, dass ein MIC-Wert hier nicht gemessen werden konnte.

Letzteres kann jedoch möglicherweise auch an einer mangelnden Zellgängigkeit des Moleküls liegen. Die Carboxygruppe weist unter physiologischen Bedingungen eine negative Ladung auf. Bedingt durch den hohen Anteil von Lipiden und Mykolsäuren ist die mykobakterielle Zellwand besonders widerstandsfähig und nur schwer von polaren Substanzen zu durchdringen. Zudem weist sie dadurch eine hohe Resistenz gegenüber vielen Antibiotika auf [80] [81].

Der Grund für die mangelnde Bindung zwischen Protein und Peptid wird bei Betrachtung der Kristallstruktur von an ClpC1 gebundenem Cyclomarin A deutlich (Abb. 3.25).

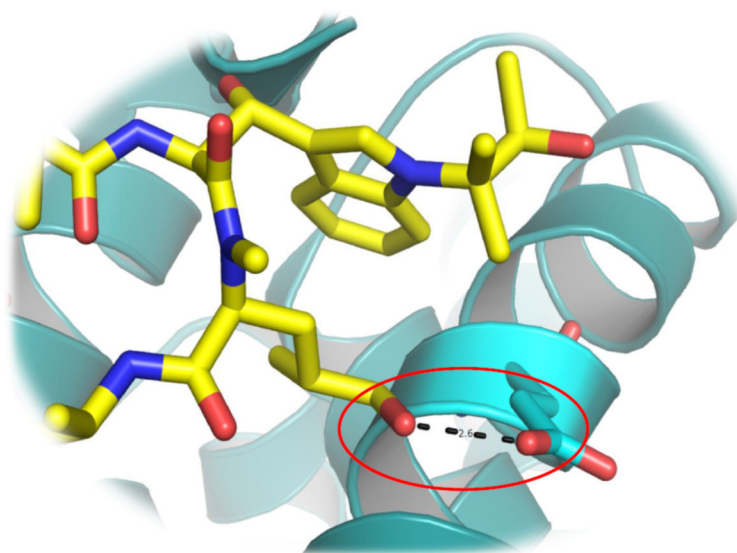


Abbildung 3.25: Ausschnitt der Kristallstruktur von ClpC1_{NTD} in Komplex mit Cyclomarin A (PDB-Code 3WDC). Rot umrandet ist die Wasserstoffbrücke zwischen Peptid und Glu89 des Proteins. Die mit Pymol bestimmte Distanz zwischen beiden Interaktionspartnern beträgt 2.6 Å.

Die Wasserstoffbrücke zwischen der Hydroxygruppe des Norvalins und der Carboxylgruppe an Glu89 des Proteins bewirkt eine Stabilisation der Bindungskonformation und stärkt somit die Bindung des Peptids an das Protein. Durch Substitution des Alkohols gegen Glutamat ist diese Wechselwirkung nicht mehr möglich und die Stabilität der Bindung geht verloren. Da nun zwei Aminosäurereste mit identischer Ladung in direkter räumlicher Nähe aufeinandertreffen, wird die Bindung durch gegenseitige Abstoßung signifikant geschwächt.

Derivat Cym_2 weist eine fast identische Struktur wie Cym_1 auf, allerdings sind hier sowohl am Indol des Tryptophans als auch am Glutamat noch beide Schutzgruppen vorhanden. Da alle natürlich vorkommenden Cyclomarine am Stickstoff des Tryptophans entweder Prenyl- oder Epoxid-Gruppen aufweisen, kann davon ausgegangen werden, dass die Boc-Gruppe am Tryptophan keine gravierende Auswirkung auf die Bindung haben wird. Daher scheint das Vorhandensein der *tert*-Butylgruppe am Glutamat für den kompletten Verlust der Bindungsaffinität und der biologischen Aktivität des Peptids verantwortlich zu sein. Dies lässt sich mit dem großen Platzbedarf der *tert*-Butylgruppe erklären, wodurch das Molekül zu groß für die Bindetasche wird und eine Bindung an das Protein daher nicht mehr möglich ist.

Bei der Synthese von Cym_3 wurde im Vergleich zu Cym_2 die Boc-Gruppe am Tryptophan entfernt. Zudem wurde das Glutamat gegen *N*-Me-5-Hydroxynorvalin ersetzt. Durch diese

Substitution wurde eine Wechselwirkung zwischen der Hydroxygruppe des Peptids und Glu89 des Proteins wieder ermöglicht, was sich in einem Anstieg der Bindungsaffinität bemerkbar machte. Cym_3 wies einen K_D -Wert von 107 μM auf. Die Bindung zum Protein ist zwar auch hier noch nicht sehr ausgeprägt, jedoch stärker als bei den beiden vorherigen Derivaten Cym_1 und Cym_2.

Mit den Derivaten Cym_4 und Cym_5 sollte die Rolle des Tryptophans bei der Bindung des Peptids untersucht werden. Cym_5 besitzt ein Tyrosin mit ungeschützter Hydroxylgruppe. Hier stieg der K_D -Wert auf 326 μM an. War die Hydroxylgruppe dagegen durch eine *tert*-Butylgruppe geschützt, wie in Cym_4, so wurde ein K_D -Wert von 128 μM gemessen. Diese Beobachtung ist dadurch erklärbar, dass hier die unmittelbare Umgebung des Peptids in der Bindetasche des Proteins eine sehr hydrophobe Umgebung bildet. Dadurch bedingt bindet das geschützte Peptid besser als das ungeschützte Derivat Cym_5. Bei Cym_5 handelt es sich zudem chemisch betrachtet um ein Phenol. Bei Phenolen ist das Proton leicht abspaltbar, da die resultierende negative Ladung über den aromatischen Ring delokalisiert und durch Mesomerie stabilisiert wird. Durch die negative Ladung steigt jedoch auch gleichzeitig die Polarität des Moleküls in diesem Bereich an, was letztlich in einer Schwächung der Bindungsaffinität resultiert.

Bei Cym_6 wurde im Vergleich zu Cym_3 das Norvalin gegen *N*-Me-Lysin ausgetauscht. Diese Substitution führt zu einem deutlichen Anstieg der Bindungsstärke, was sich in einem K_D -Wert von 14.9 μM zeigte. Auch der ermittelte MIC-Wert von 24 μM deutete auf eine gesteigerte biologische Aktivität *in vivo* hin. Die zuvor synthetisierten Derivate Cym_1-5 wiesen allesamt MIC-Werte größer als 30 μM auf oder lagen außerhalb des jeweils untersuchten Bereichs. Die verbesserte biologische Aktivität bezüglich des MIC- und des K_D -Werts durch den Einbau des basischen Lysins in das Peptid ist dadurch erklärbar, dass hierdurch eine verbesserte Interaktion mit dem sauren Glu89 in der Bindetasche des Proteins ermöglicht wurde.

Die Synthese der ersten sechs Derivate und deren biologische Validierung zeigte, dass die Aminosäure an Position R_2 (s. Abb. 3.24) im Peptid große Bedeutung für die biologische Aktivität und die Bindung an ClpC1 hat. Mit der Synthese von Cym_7 wurde dies weiter untersucht. Hier wurde Cym_1 als Grundlage genommen und durch Kupplung von Propylamin auf die freie Carboxylgruppe ein Propylglutaminderivat erzeugt. Auch hier wurden wieder MIC

und K_D -Wert gemessen. Im Vergleich zu Cym_6 zeigte sich hier ein Anstieg des K_D -Werts von 14.9 μM auf 26.8 μM . Der MIC stieg sogar auf über 120 μM an und lag damit außerhalb des untersuchten Bereichs der Messreihe. Verglichen mit Cym_1 war der K_D -Wert jedoch deutlich niedriger. Dies lässt sich durch den Ersatz der negativ geladenen Carboxylgruppe (Cym_1) durch einen ungeladenen Propylamidrest erklären, der die Abstoßung mit Glu89 in der Bindetasche des Proteins verringerte. Gleichzeitig wird eventuell die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen Amid und Glu89 möglich. Insgesamt wies Cym_7 jedoch gegenüber dem zuvor synthetisierten Cym_6 die schlechteren Messwerte auf, so dass für die folgenden Derivate Lysin an Position R_2 verwendet wurde.

Dementsprechend enthielt auch Cym_8 *N*-Me-Lysin an dieser Position. Cym_8 wies gegenüber Cym_6 zudem durch die Verwendung von Fmoc-L-Phe(3*R*-MeO)-OH (**9**) an Position R_1 eine weitere Annäherung an die Struktur der natürlich vorkommenden Derivate auf. Mit diesem Derivat konnte bei der Messung der biologischen Aktivität ein Durchbruch erzielt werden. Während der MIC bei 12.5 μM lag, konnte bei der Bestimmung der Bindungsaffinität sogar ein K_D -Wert von 0.8 μM gemessen werden. Bei diesem Derivat lagen die Bindungsaffinität und die Toxizität gegenüber bakteriellen Zellen erstmals in einem Bereich, bei dem die Nutzung des Peptids in einem bacPROTAC denkbar wurde. Einerseits lag nun die Bindungsaffinität im nanomolaren Bereich, andererseits verhielt sich das Peptid gegenüber Mykobakterien nur moderat toxisch.

Der starke Anstieg der Bindungsaffinität gegenüber den bisherigen Derivaten ließ sich durch eine deutliche Stabilisierung der Bindungskonformation durch die Einführung der Methoxygruppe am Phenylalanin erklären. Durch die hohe Bindungsstärke konnte hier zudem eine Kristallstruktur im Komplex mit ClpC1_{NTD} ermittelt werden (Abb. 3.26).

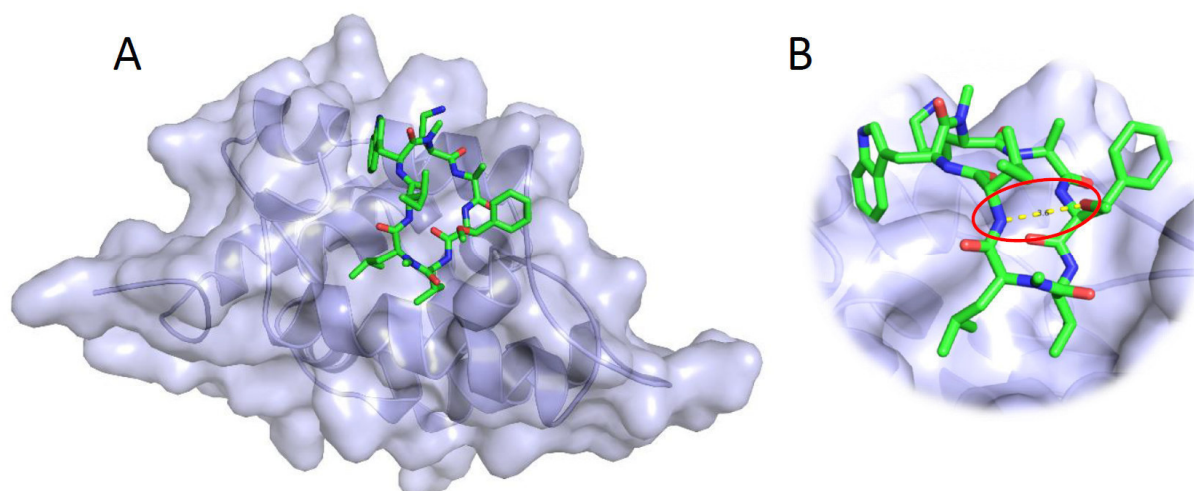


Abbildung 3.26: Cym_8 im Komplex mit ClpC1_{NTD}. **A:** Gesamtstruktur des Komplexes. **B:** Detailansicht zur Verdeutlichung der stabilisierenden intramolekularen Wasserstoffbrücke zwischen der Methoxygruppe des Methoxyphenylalaninrestes und dem Stickstoff zwischen Ile und N-Me-Leu im Peptid (rot umrandet). (Daten wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. Tim Clausen gemessen).

Wie in Abb. 3.25 B ersichtlich, kommt es zur intramolekularen Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Sauerstoff der Methoxygruppe des Methoxyphenylalaninrestes und dem Wasserstoff am Stickstoff der Amidbindung zwischen Isoleucin und N-Me-Leucin. Diese Wasserstoffbrückenbindung stabilisiert die Bindungskonformation des Peptids so stark, dass die Bindungsaffinität signifikant anstieg. Die starke Bindung des Peptids an das Protein führt zudem zu einem deutlich geringeren MIC gegenüber den zuvor synthetisierten Cyclomarinderivaten.

Um zu untersuchen, ob eine weitere Annäherung an die Struktur des Naturstoff zu einer weiteren Verbesserung bei der Bindungsaffinität führt, wurden die Derivate Cym_9, Cym_10 und Cym_15 synthetisiert.

Bei Cym_10 wurde im Vergleich zu Cym_8 ein prenyliertes Tryptophan in die Struktur eingeführt. Durch diese strukturelle Annäherung an den Naturstoff Cyclomarin C konnte jedoch zunächst keine Verbesserung der biologischen Aktivität festgestellt werden. Der MIC stieg auf 20 μM an, was jedoch auf unterschiedliche Gründe zurückzuführen sein kann. Möglicherweise ist durch den Einbau des prenylierten Tryptophans die Zellgängigkeit des Peptids gesunken. Ebenso ist eine Schwächung der Bindung zum Protein denkbar. Ein verringerter MIC-Wert geht in der Regel mit einer verstärkten Bindung des Wirkstoffs an das

Zielprotein einher. Steigt der MIC-Wert jedoch an, so kann neben einer abgeschwächten Bindung zwischen Protein und Testsubstanz auch eine verringerte Zellgängigkeit der Grund sein. Der anschließend gemessene K_D -Wert von Cym_10 betrug 1.4 μM . Verglichen mit Cym_8 kam es also tatsächlich zu einer Schwächung der Bindungsaffinität des Peptids zum Protein, obwohl durch die Prenylgruppe eine weitere Annäherung an den Naturstoff stattgefunden hatte.

Ähnlich verhält es sich mit den Derivaten Cym_9 und Cym_15. Bei Cym_9 wurde auf methyliertes Phenylserin verzichtet und stattdessen erneut Phenylalanin verwendet. Im Vergleich zu Cym_6 wurde jedoch ebenso wie bei Cym_9 eine Prenylierung des Tryptophans vorgenommen. Auch hier stieg der MIC-Wert verglichen mit der korrespondierenden Verbindung ohne Prenylgruppe am Tryptophan an. Während Cym_6 noch einen MIC von 24 μM aufwies, lag der ermittelte Wert bei Cym_9 lediglich noch bei 40 μM . Die Einführung der Prenylgruppe am Tryptophan bewirkt also zumindest in Bezug auf die antibiotische Wirkung des Peptids gegenüber Mykobakterien eine Verschlechterung der Aktivität.

Bei Cym_15 wurde im Vergleich zu Cym_10 zusätzlich eine ungesättigte Aminohexensäure an Position R₄ anstelle von Isoleucin eingeführt. Der MIC verringerte sich dadurch auf einen Wert von 20 μM . Ein K_D -Wert konnte sowohl für Cym_9 als auch für Cym_15 nicht bestimmt werden.

Derivat Cym_11, wurde auf Grundlage der für Cym_8 erhaltenen Kristallstruktur synthetisiert und ist von dessen Struktur abgeleitet.

Bei Betrachtung der Kristallstruktur wurde deutlich, dass *N*-Me-Leucin an Position R₅ in eine Bindetasche hinein orientiert ist, die an ihrer Oberfläche ein Arginin in einer Entfernung von 3.7 Å zum Peptid aufweist (Abb. 3.27). Aus diesem Grund wurde durch den Austausch von *N*-Me-Leucin gegen *N*-Me-Glutamat mit Derivat Cym_11 versucht, dieses Lysin zu adressieren, wodurch eine weitere Verbesserung der Bindungsaffinität gegenüber Cym_8 erhofft wurde.

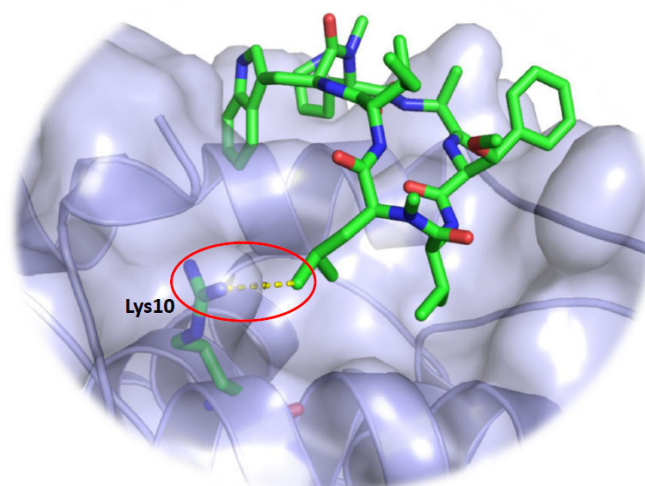


Abbildung 3.27: Cym_8 im Komplex mit Clp_{CNTD}. Die mit Pymol ermittelte Distanz zwischen Arg10 und Leucin an Position R₅ des Peptids beträgt lediglich 3.7 Å (rot umrandet). Durch Einbau von Glutamat in das Peptid sollte versucht werden, eine Interaktion zwischen Lysin und Peptid zu erreichen und dadurch die Bindung zwischen Peptid und Protein zu stärken. (Die Röntgenstruktur wurde in der Arbeitsgruppe von Dr. Tim Clausen bestimmt).

Der entsprechende MIC der Verbindung war jedoch größer als 200 µM. Ähnlich wie bei dem Derivat Cym_1 wäre eine mögliche Erklärung für diesen hohen Wert die unter physiologischen Bedingungen negative Ladung der freien Carboxylgruppe des Glutamats, durch die das Peptid eventuell schlechter in die Zelle eindringen könnte. Nichtsdestotrotz könnte die Bindungsaffinität von Cym_8 an das Protein höher sein. Durch Messung des K_D-Werts konnte hier jedoch das Gegenteil gezeigt werden. Der ermittelte Wert lag bei 70.8 µM und damit deutlich höher als bei Cym_8. Durch den Einbau von *N*-Me-Glutamat an Position R₅ verringerte sich die biologische Aktivität des Peptids also signifikant.

Die Derivate Cym_12, Cym_13 und Cym_14 wurden von der Struktur von Cym_6 abgeleitet. Mit Cym_12 sollte der Einfluss des Lysins auf die biologische Aktivität des Peptids untersucht werden. Der für Cym_12 ermittelte MIC von 26 µM gegenüber 24 µM für Cym_6 deutet jedoch darauf hin, dass es keinen Unterschied macht, ob an dieser Position Lysin oder Ornithin im Peptid vorliegt. Gleiches zeigt sich bei einem Vergleich der ermittelten K_D-Werte. Cym_12 weist einen Wert von 11.6 µM auf und unterscheidet sich somit hinsichtlich seiner Bindungsaffinität zum Protein nur unwesentlich von Cym_6.

Cym_13 und Cym_14 wurden synthetisiert, da zunächst nicht klar war, welche Position des Peptids sich zur Verknüpfung mit einem Linker eignen würde. Da aus den kristallographischen

Daten ersichtlich wurde, dass Isoleucin an Position R₄ aus der Bindetasche des Proteins hinaus ragt, wurde an dieser Stelle ein Glutamatmethylester mit Methylgruppe in gamma-Position eingebaut, um dann anschließend nach Verseifung des Esters die Möglichkeit zur Verknüpfung mit einem Linker zu haben. Beide erhaltenen Derivate wurden anschließend auf ihre biologische Aktivität untersucht. Auch hier wurden wieder MIC- und K_D-Werte bestimmt. Während der MIC-Wert von Cym_14 größer als 200 µM war und damit außerhalb des untersuchten Bereichs lag, wurde ein K_D-Wert von 43.5 µM ermittelt. Auch hier ist der große MIC-Wert sehr wahrscheinlich auf mangelnde Zellgängigkeit durch die Ladung der freien Carboxylgruppe zurückzuführen. Der für Cym_13 ermittelte K_D lag bei 15.1 µM und ist damit nahezu identisch zum für Cym_6 ermittelten Wert von 14.9 µM. Allerdings wies diese Verbindung einen MIC-Wert von 59 µM auf und lag damit wie Cym_14 deutlich höher als Cym_6. Eine Steigerung der biologischen Aktivität konnte hier somit nicht erzielt werden.

Auf Grundlage der Auswertung der Messdaten und der aufgestellten Struktur-Wirkungsbeziehungen wurde daher Cym_8 als geeignetster Kandidat für die Synthese cyclomarinbasierter bacPROTACs ausgewählt.

3.4. Cyclomarin-bacPROTACs

Analog zur Synthese der Cyclomarinderivate wurden Cyclomarin-basierte bacPROTACs entwickelt. Hierzu diente das Cyclomarinderivat Cym_8 aufgrund der biochemischen und biologischen Bindungs- und Aktivitätsdaten als Ausgangsstruktur. Die Aminosäure Alanin wurde gegen Glutaminsäure ausgetauscht, die über die Seitenkette an den Linker TOTA gekuppelt wurde, der wiederum mit einem Ligand für die Bindung an das abzubauen Target-Protein verbunden wurde. Insgesamt wurden 8 verschiedene Cym_bacPROTACs synthetisiert und auf ihre biochemisch und biologische Aktivität hin untersucht (Abb. 3.28, Tab. 3.3).

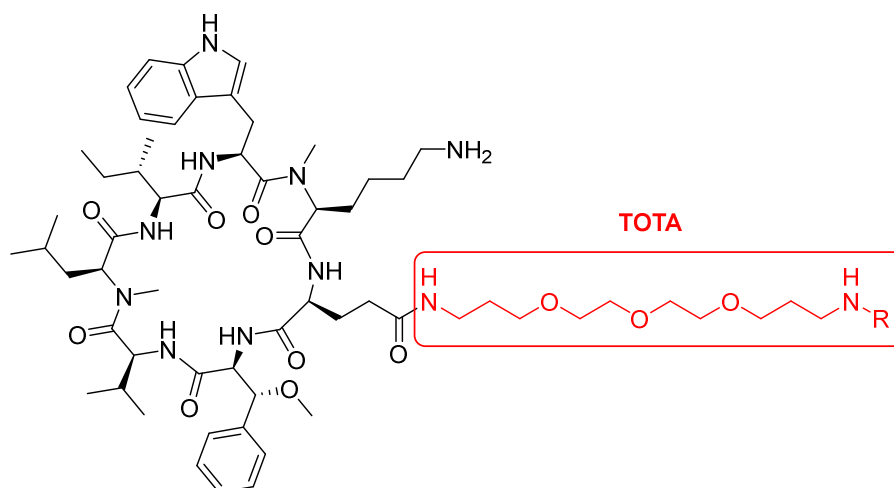
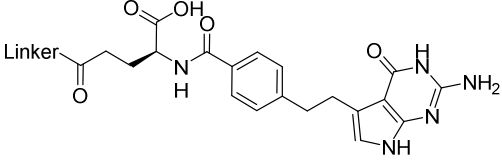
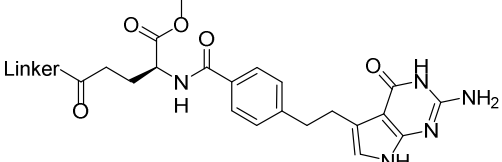


Abbildung 3.28: Allgemeine Struktur der Cyclomaritin-basierten Cym_bacPROTACs.

Tabelle 3.3: Synthetisierte Cym_bacPROTACs.

Derivat	R	Targetprotein
Cym_bacPROTAC_01		Streptavidin-Fusionsproteine
Cym_bacPROTAC_02		Streptavidin-Fusionsproteine
Cym_bacPROTAC_03		FKBP
Cym_bacPROTAC_04		DHFR
Cym_bacPROTAC_05		BRDT
Cym_bacPROTAC_06		BRDT

Cym_bacPROTAC_07		ThyA, DHFR
Cym_bacPROTAC_08		ThyA, DHFR

Bei Cym_bacPROTAC_01 wurde anstelle des Glutamats kommerziell erhältliches biotinyliertes Lysin verwendet und es wurde auf einen zusätzlichen Linker verzichtet. Mit diesem PROTAC sollten ebenso wie mit Cym_bacPROTAC_02 analog zu bacPROTAC_03 Streptavidin-Fusionsproteine adressiert und *in vitro* abgebaut werden.

Die zweistufige Synthese des für Cym_bacPROTAC_02 benötigten Glutamatbausteins ist in Abb. 3.29 dargestellt.

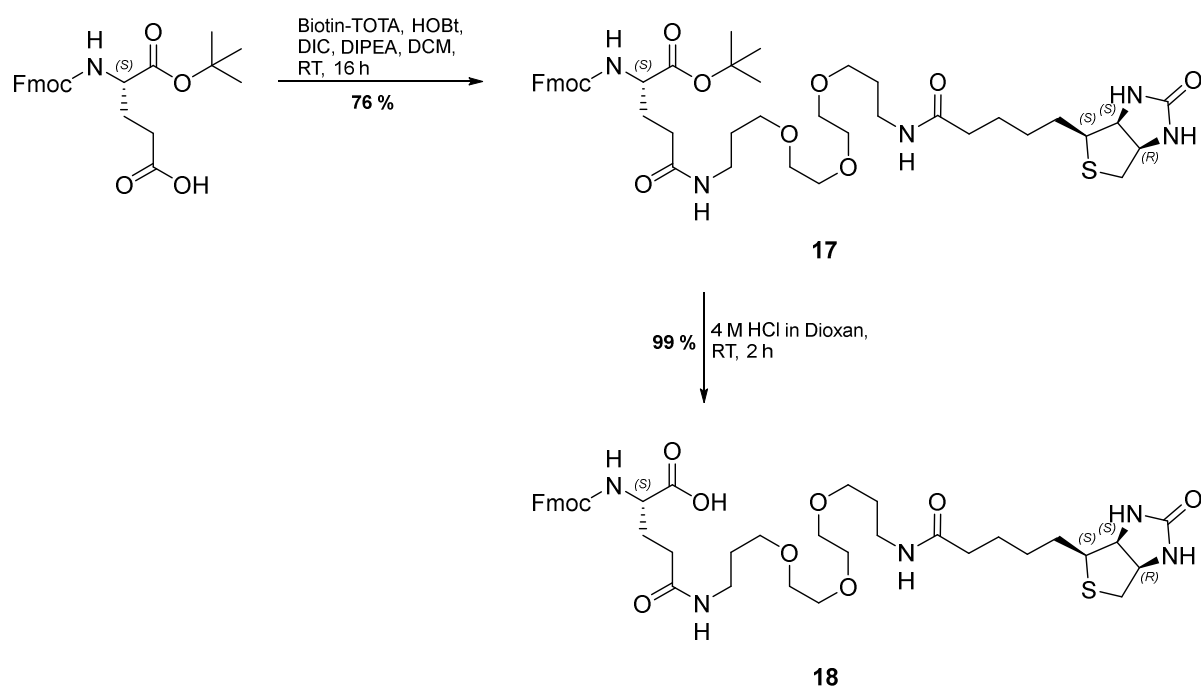


Abbildung 3.29: Syntheseroute zur Darstellung von Fmoc-L-Glu(TOTA-Biotin)-OH (**18**).

Zunächst wurde Biotin-TOTA auf die freie Carboxygruppe von Fmoc-L-Glu-OtBu gekuppelt. Mit einer Ausbeute von 76 % konnte Verbindung **17** erhalten werden, die anschließend zu Fmoc-L-Glu(TOTA-Biotin)-OH (**18**) durch Verwendung von 4 M HCl in 1,4-Dioxan entschützt wurde.

Die Abspaltung des *tert*-Butylesters verlief dabei mit einer Ausbeute von 99 % nahezu quantitativ.

Nach dem erfolgreichen Abschluss der Synthese dieses Baustein konnte Cym_bacPROTAC_02 über den etablierten Cyclomarin-Syntheseweg dargestellt werden. Anschließend wurden Cym_bacPROTAC_01 und Cym_bacPROTAC_02 auf ihre biochemische und biologische Aktivität untersucht.

Während Cym_bacPROTAC_01 keine Aktivität im Proteinabbau-Assay zeigte, was wahrscheinlich auf eine zu kurze Linkerlänge zurückzuführen ist, war Cym_bacPROTAC_02 wie das vorher identifizierte Arginin-phosphorylierte bacPROTAC_03 aktiv. Aufgrund der zuvor gesammelten Erkenntnisse über den Abbau von Streptavidin bzw. Streptavidin-Fusionsproteinen wurde hier erneut mSA-Kre als Substrat gewählt. Dabei zeigte sich, dass der durch die beiden bacPROTACs induzierte Proteinabbau bei vergleichbaren Konzentrationen auftritt (Abb. 3.30).

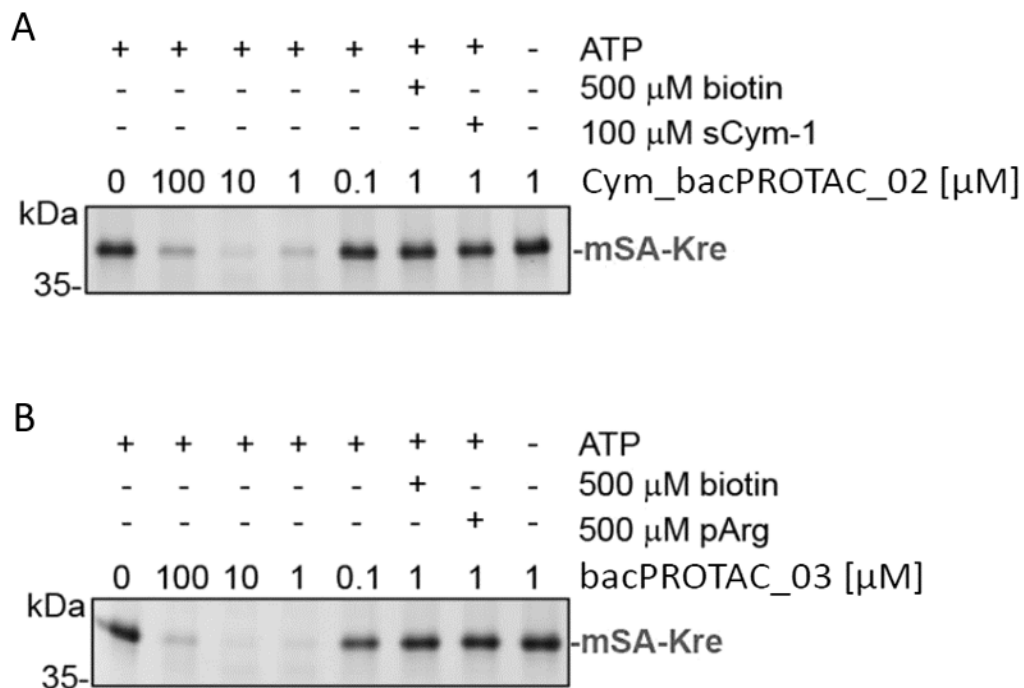


Abbildung 3.30: Vergleich der bacPROTAC-induzierten *in vitro*-Verdaus von mSA-Kre durch den Cyclomarin-basierten bacPROTAC Cym_bacPROTAC_02 (A) und den Arginin-phosphorylierten bacPROTAC bacPROTAC_03 (B) nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden bei verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen in Gegenwart von ClpC1P1P2 aus *Mycobacterium smegmatis*. (Die gezeigten Abbauprobungen wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. Tim Clausen durchgeführt).

Bei genauer Betrachtung der Bandenintensitäten bei einer bacPROTAC-Konzentration von jeweils 1 μM ist jedoch erkennbar, dass das Arginin-phosphorylierte Molekül bacPROTAC_03 geringfügig aktiver zu sein scheint. Der Grund hierfür könnte in der höheren Bindungsaffinität des Arginin-phosphorylierten bacPROTACs liegen (Abb. 3.31). Darüber hinaus lässt sich hier auch erkennen, dass bei beiden Abbauxperimenten der Proteinverdau bei einer Wirkstoffkonzentration von 100 μM unvollständiger abläuft als bei den beiden geringeren Konzentrationen. Wie bereits bei den canavaninhaltigen bacPROTACs festzustellen war, ist auch hier wahrscheinlich eine Übersättigung der beiden Proteine mit ihrem jeweiligen Liganden aufgetreten (auch bekannt als *hook*-Effekt), wodurch die für den Proteinabbau notwendige Interaktion zwischen Targetprotein und Proteasekomplex verhindert wird.

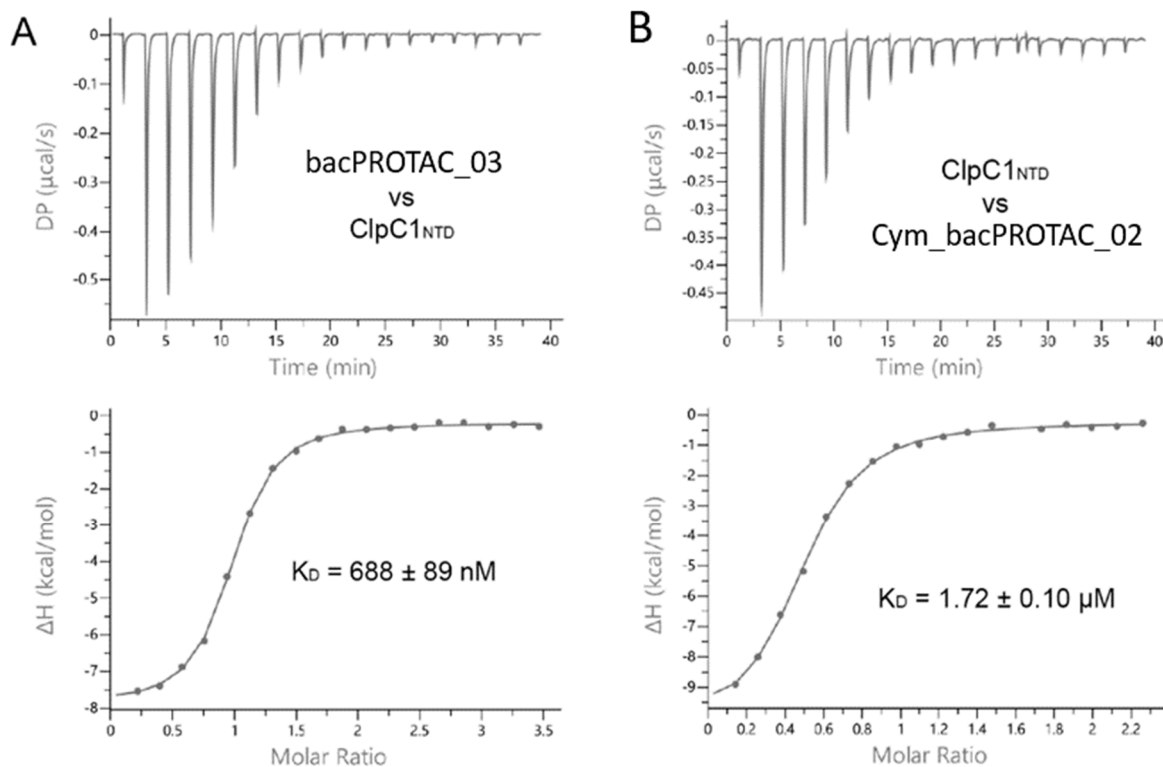


Abbildung 3.31: Vergleich der Bindungsaffinitäten von bacPROTAC_03 (A) und Cym_bacPROTAC_02 (B) an die mykobakterielle ClpC1-Domäne. (Die gezeigten Daten wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. Tim Clausen bestimmt).

Ein *in vivo*-Abbau konnte jedoch auch hier nicht beobachtet werden. Dies liegt zum einen daran, dass mSA-Kre in *Bacillus subtilis* exprimiert wurde und Cyclomarin hier nicht an ClpCP bindet. Darüber hinaus war jedoch auch in *Mycobacterium smegmatis* kein Proteinabbau *in vivo* nachweisbar. Hier wurde versucht, Biotinligase, ein aktuelles Target in der Entwicklung

neuer Antimykotika [82] [83], abzubauen. Dies gelang jedoch nicht, obwohl Biotin eine Bindungsaffinität zu mykobakterieller Biotinligase von 1.1 μM aufweist [84]. Warum der Proteinabbau *in vivo* nicht erfolgreich war, lässt sich ohne weiterführende Untersuchungen nicht genau bestimmen. Eine Möglichkeit ist auch hier, dass Biotinligase eine sehr geordnete Struktur aufweist und daher möglicherweise nicht als Substrat für das ClpC1P1P2-System in Frage kommt, da dieses System eventuell Proteine mit eher ungeordneter Struktur besser als stabil-geordnete Proteine abbauen kann. Dies könnte beispielsweise durch Generierung von Fusionsproteinen, ähnlich wie bei der Substratoptimierung von bacPROTAC_03, untersucht werden.

Cym_bacPROTAC_03 beinhaltet den Ligand SLF. Dieser Wirkstoff bindet in humanen Zellen im nanomolaren Bereich an FKBP-Proteine [85]. FKBP-Proteine gehören zur Familie der Immunophiline, die wiederum zu den Chaperonen gehören und eine hochkonservierte Struktur aufweisen [86]. Sie sind in humanen Zellen an vielen verschiedenen Prozessen beteiligt. Dazu zählen u.a. die Aktivierung von T-Zellen oder auch die Transkription. Darüber hinaus weisen sie eine Peptidylprolyl-*cis/trans*-Isomeraseaktivität auf [87], wodurch sie eine wichtige Rolle bei der korrekten Faltung von Proteinen spielen. Peptidylprolyl-*cis/trans*-Isomerasen katalysieren die Bindungsachsenrotation an Prolin-Amidbindungen, einem langsamen Schritt in der Proteinfaltung. Ähnliche Proteine wurden in der Vergangenheit bereits in *Eschericia coli* [88], *Shewanella* sp. [89] und *Streptomyces lividans* [90] gefunden.

Die Synthese des Liganden SLF umfasste insgesamt 4 Stufen (Abb. 3.32) und verlief mit einer Gesamtausbeute von 67 % sehr erfolgreich. Als Ausgangsverbindung diente hier 1,1-Dimethyl [3-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-1-oxopropyl]phenoxy]-acetat. Bei dieser Synthese wurde weitestgehend eine bereits literaturbekannte Route befolgt [91]. Während Liu *et al.* jedoch SLF' für die Bindung an die Mutante F36V von FKBP unter Verwendung von 2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-Buttersäure synthetisierten, wurde für die hier erfolgte Synthese von SLF die Carbonsäure 3,3-Dimethyl-2-oxopentansäure verwendet.

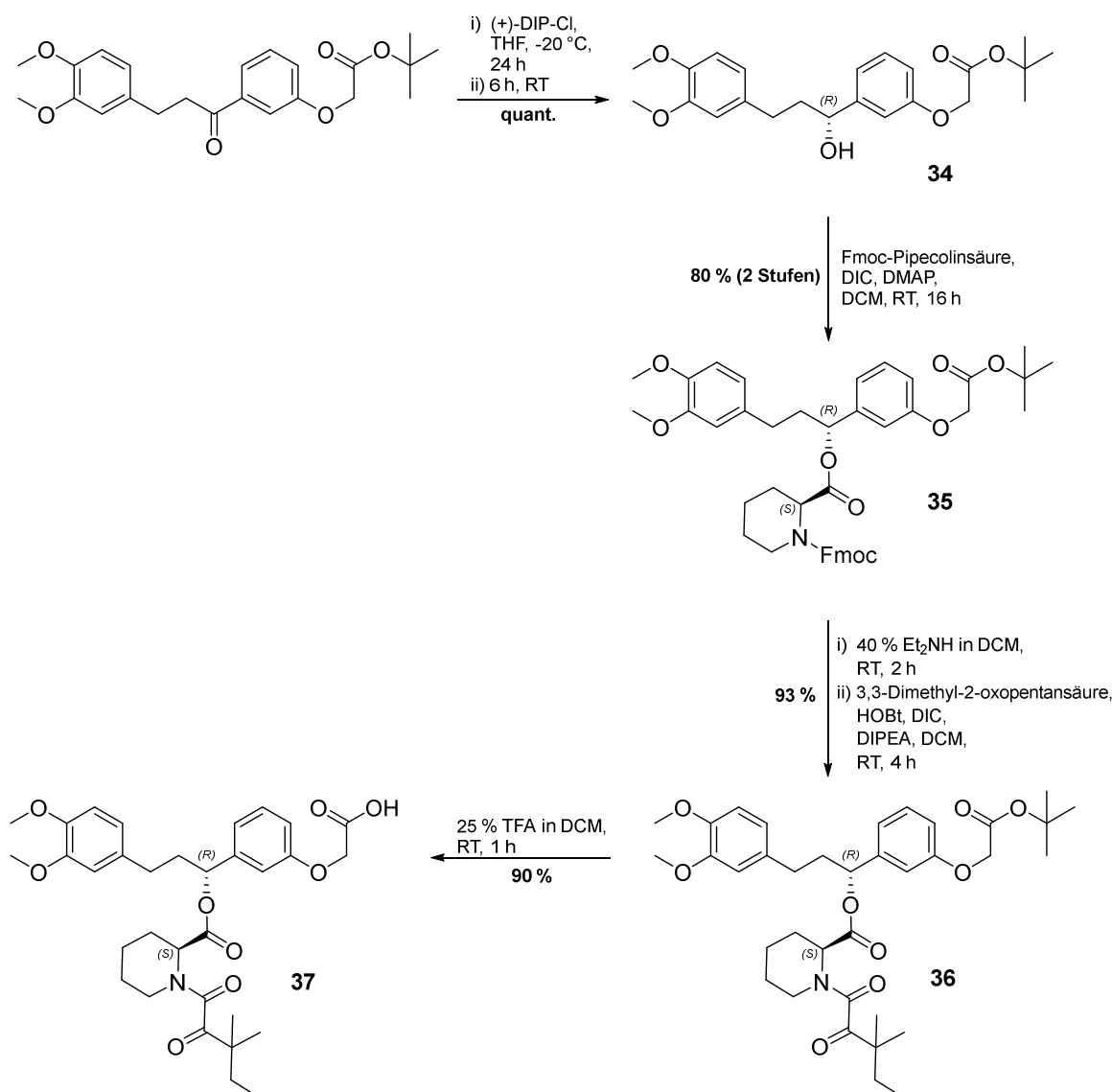


Abbildung 3.32: Syntheseroute zur Darstellung von SLF (**37**).

Zunächst erfolgte die stereoselektive Reduktion von 1,1-Dimethyl [3-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-1-oxopropyl]phenoxy]-acetat mittels (+)-DIP-Cl zu Alkohol **34**. Dabei konnte mit einer nahezu quantitativen Ausbeute die Literaturangabe (60 %) deutlich übertroffen werden. Verbindung **34** wurde anschließend in einer Steglichveresterung mit Fmoc-L-Pipecolinsäure zum Ester **35** umgesetzt. Die Ausbeute von 80 % entsprach hier weitestgehend den Literaturangaben. Nach Abspaltung der Fmoc-Gruppe wurde 3,3-Dimethyl-2-oxopentansäure auf das nun freie Amin gekuppelt, so dass Verbindung **36** in einer Ausbeute von 93 % erhalten werden konnte. Die finale Entschützung von **36** mit 25 % TFA in DCM ergab schließlich nach erfolgter Aufarbeitung SLF-CO₂H (**37**) in einer Ausbeute von 90 %. Eine chromatographische Aufreinigung war hier nicht erforderlich, daher wurde das Molekül

direkt weiter für die Synthese von Fmoc-L-Glu(TOTA-SLF)-OH (**40**) verwendet. Die folgende Abbildung 3.33 veranschaulicht diese Syntheseroute.

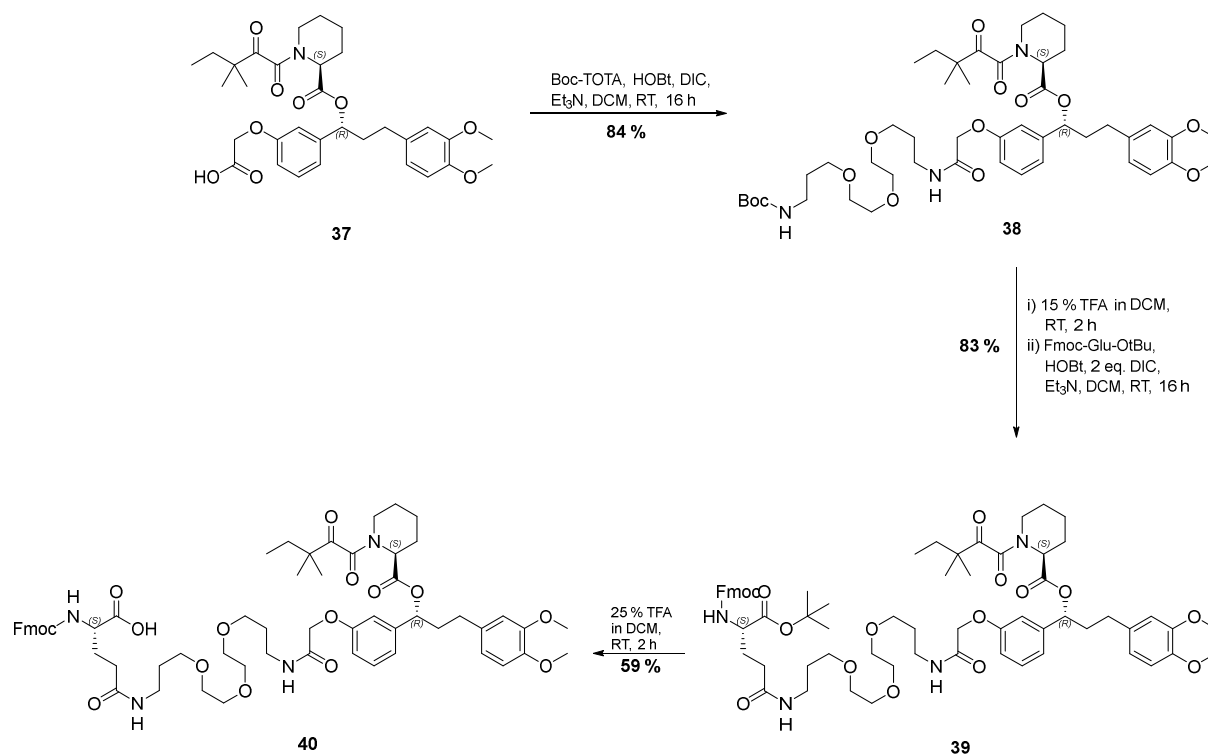


Abbildung 3.33: Synthese zur Darstellung von Fmoc-L-Glu(TOTA-SLF)-OH (**40**).

Boc-TOTA wurde auf die zuvor mit HOBt und DIC aktivierte Carbonsäure SLF-CO₂H (**37**) gekuppelt. Mit 84 % bewegte sich die Ausbeute von Verbindung **38** hier im erwarteten Rahmen. Anschließend wurde zunächst die Boc-Gruppe mit TFA in DCM abgespalten. Nachdem per LC/MS die Vollständigkeit der Abspaltung überprüft worden war, wurde nach Entfernung der Lösemittel der erhaltene Rückstand des freien Amins erneut in DCM gelöst und mit Fmoc-L-Glu-OtBu in einer Ausbeute von 83 % zu Verbindung **39** umgesetzt. Nach Abspaltung der *tert*-Butylgruppe und Aufreinigung mittels C18-RP-Säulenchromatographie konnte Fmoc-L-Glu(TOTA-SLF)-OH (**40**) in einer Ausbeute von 59 % erhalten und für die Synthese von Cym-bacPROTAC_03 eingesetzt werden.

Nach Abschluss der Synthese von Cym_bacPROTAC_03 erfolgte die biologische Validierung. Allerdings zeigte sich hier, dass die Substanz *in vivo* keinerlei biologische Aktivität gegenüber Mykobakterien aufwies. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass FKBP's in Mykobakterien möglicherweise eine veränderte SLF-Bindetasche aufweisen. Ebenso wäre denkbar, dass das Molekül aufgrund seiner Größe die Zellmembran nicht durchdringen kann.

Cym_bacPROTAC_04 beinhaltet einen Trimethoprim enthaltenden Baustein. Trimethoprim ist ein zur Gruppe der Antifolate gehörendes Diaminopyrimidinderivat und inhibiert das Enzym Dihydrofolatreduktase (DHFR) sowohl bei grampositiven wie auch bei gramnegativen Bakterien [92]. Seine Bindungsaffinität reicht dabei vom nanomolaren bis in den mikromolaren Bereich [93]. Aus der Gruppe der Diaminopyrimidine sind noch eine ganze Reihe weiterer Antifolate bekannt [92]. Einige bekannte Beispiele sind Methotrexat, Trimetrexat oder Piritrexim (Abb. 3.34).

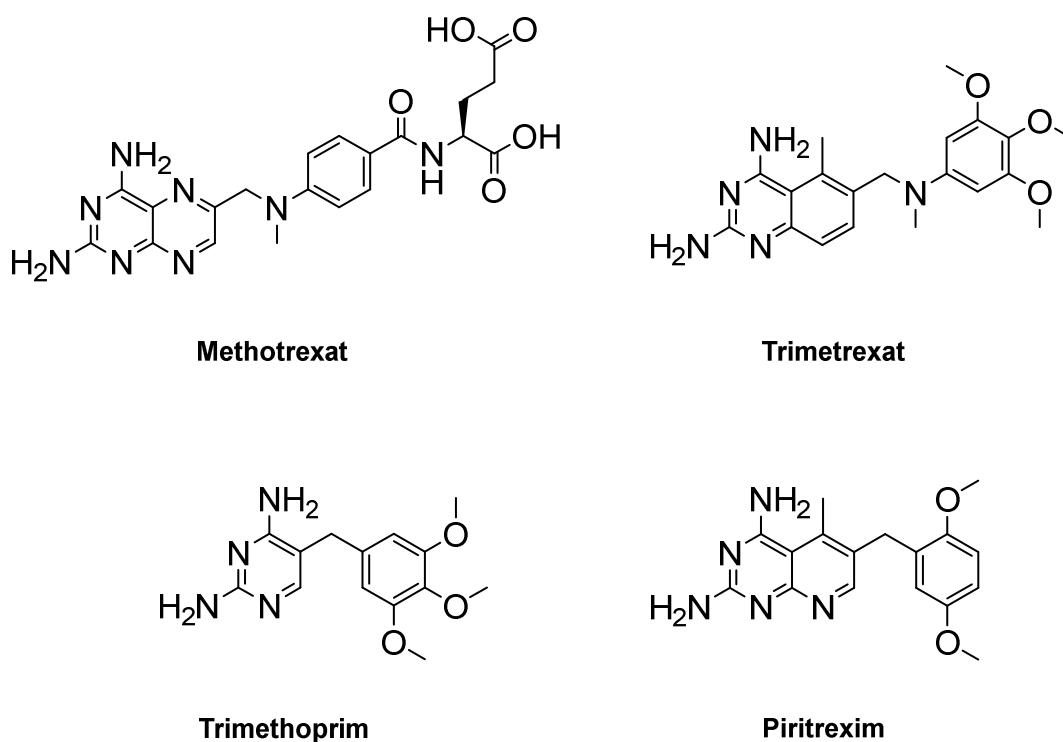


Abbildung 3.34: Chemische Strukturen einiger ausgewählter Antifolate aus der Gruppe der Diaminopyrimidine.

Gegen Mykobakterien wirken diese Substanzen jedoch nur bedingt. Während der MIC₉₉ von Trimetrexat gegen *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv mit 6.25 µM noch im niedrigen mikromolaren Bereich liegt, steigen die Werte für die anderen drei Substanzen auf mehr als 100 µM an [94]. Am isolierten Protein zeigen jedoch wiederum alle Substanzen eine große Bindungsaffinität bzw. eine hohe Inhibition mit IC₅₀-Werten von 7 nM für Methotrexat, 17 nM für Trimethrexat und 22 nM für Piritrexim. Lediglich Trimethoprim weist mit 19 µM einen deutlich höheren IC₅₀-Wert auf [94]. Die Bindungsaffinität zur DHFR von Methicillin-resistentem *Staphylococcus aureus* (MRSA) dagegen liegt bei 0.9 nM [93]. Zusammenfassend

lässt sich hier also festhalten, dass die Wirkung von Trimethoprim von Bakterium zu Bakterium stark schwankt.

Dennoch stellt Trimethoprim bei der therapeutischen Behandlung bakterieller Infektionen in einigen Fällen das Mittel der Wahl dar. Unter dem Handelsnamen Cotrimoxazol wird es in Kombination mit Sulfamethoxazol als gängiges Mittel zur Behandlung von Harnwegsinfekten sowie zur Behandlung von bakteriell-bedingten Erkrankungen der oberen Atemwege eingesetzt [92].

Durch die Inhibition von DHFR mittels Trimethoprim kann die NADPH-abhängige Reduktion von 5,6-Dihydrofolat zu 5,6,7,8-Tetrahydrofolat nicht mehr erfolgen [93] [95]. 5,6,7,8-Tetrahydrofolat stellt einen wichtigen Co-Faktor bei der Synthese der Nucleobase Thymidin dar. Wird dieser Stoffwechselprozess unterdrückt, führt dies zu einem Wachstumsstopp der Zelle. Aufgrund seiner essenziellen Rolle für das Zellwachstum stellt DHFR daher ein wichtiges Target in der aktuellen Antibiotikaforschung dar [92] [94] [57].

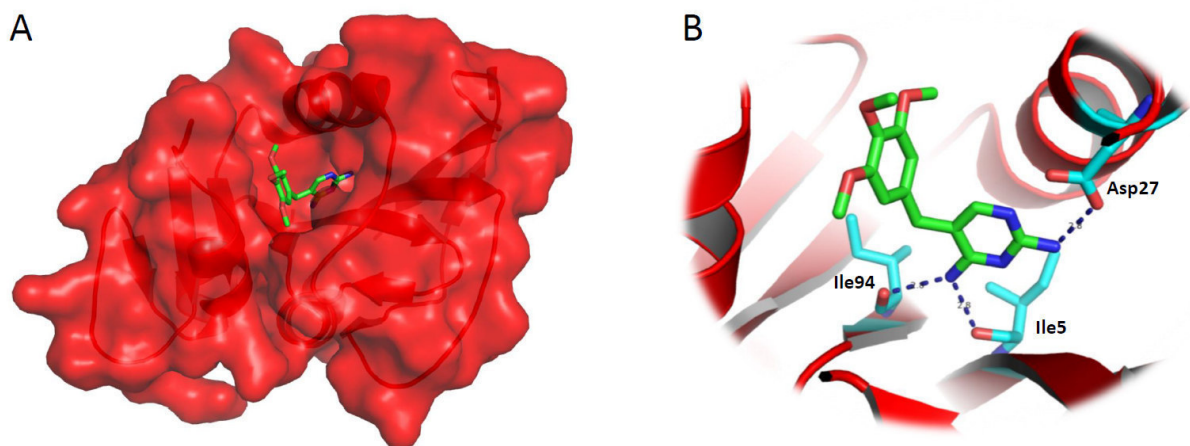


Abbildung 3.35: Trimethoprim im Komplex mit der mykobakteriellen Dihydrofolatreduktase (PDB-Code 1DG5). **A:** Trimethoprim (grün) ragt tief in der Bindetasche des Proteins hinein. **B:** Über den Heterozyklus werden polare Wechselwirkungen mit Ile5, Asp27 und Ile94 des Proteins ausgebildet, während die drei Methoxygruppen aus der Bindetasche hinausragen und als potenzielle Verknüpfungspunkte für einen Linker infrage kommen.

Wie aus der Kristallstruktur (Abb. 3.35 A) hervorgeht, ist TMP über den Pyrimidinring tief in die Bindetasche des Proteins hinein orientiert und geht dort polare Interaktionen mit den drei Aminosäuren Ile5, Asp27 und Ile94 ein. Lediglich der Teil des Moleküls, an dem sich die drei Methoxygruppen befinden, ragt aus der Bindetasche heraus und ist für die Verknüpfung mit

einem Linker geeignet. Durch Verknüpfung der mittleren Methoxygruppe mit einem Linker konnten bereits 2014 von Liu *et al.* erfolgreich bivalente Moleküle synthetisiert werden, mit deren Hilfe in humanen Zellen Protein-Protein-Interaktionen zwischen FKBP und DHFR untersucht werden konnten [91]. Daher wurde diese Position ausgewählt, um TMP mittels Linker mit einem Cyclomarinderivat als Ligand für ClpC_{1NTD} zu verknüpfen, um so den gezielten Abbau mykobakterieller DHFR durch ClpC1P1P2 zu induzieren.

Die Synthese des zur Darstellung des bacPROTACs benötigten Bausteins Fmoc-L-Glu(TOTA-TMP)-OH (**27**) umfasste insgesamt 5 Stufen bei einer Gesamtausbeute von 6 %, ausgehend von Trimethoprim als Startverbindung (Abb. 3.36).

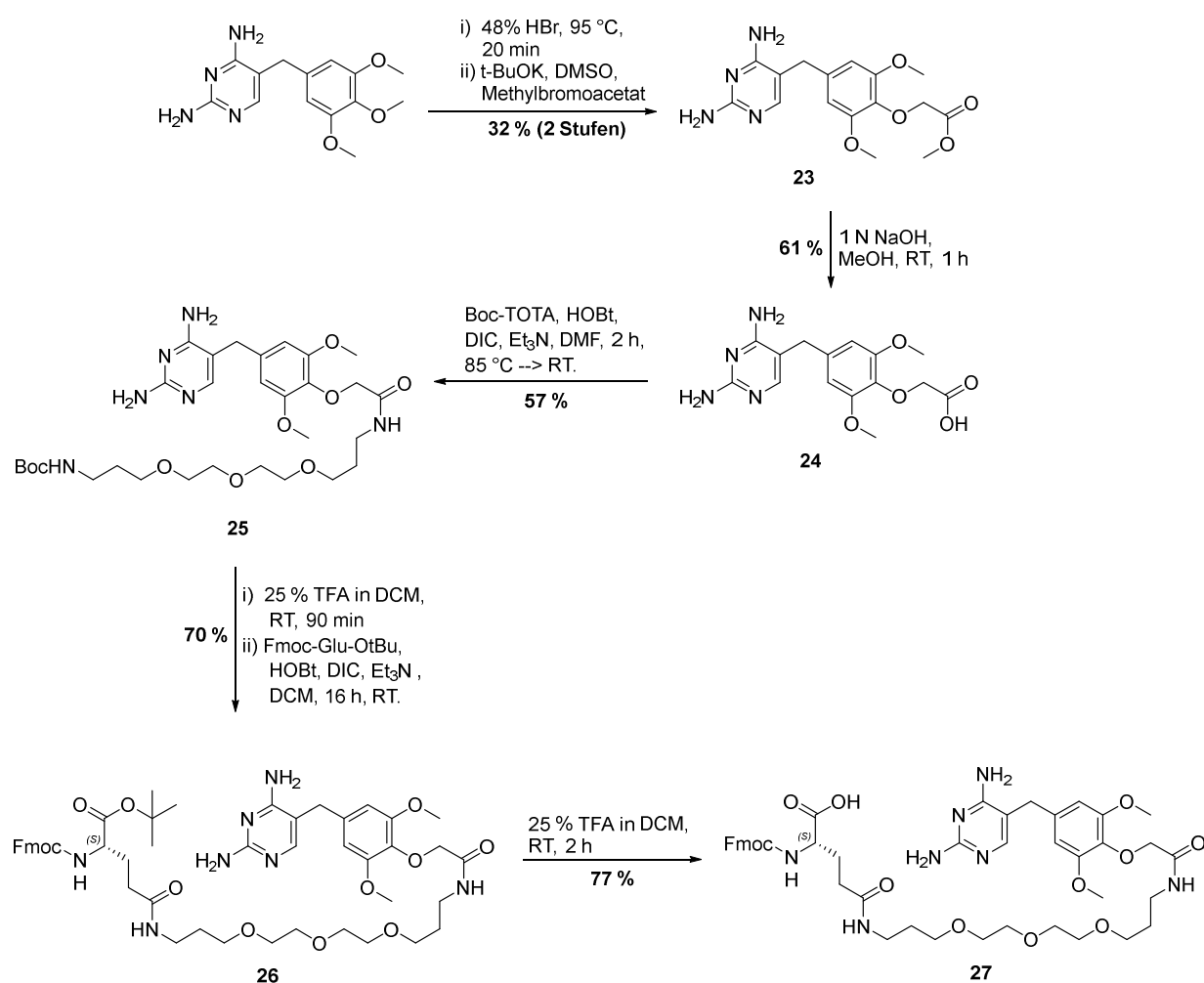


Abbildung 3.36: Synthese von Fmoc-L-Glu(TOTA-TMP)-OH (**27**).

Trimethoprim wurde zunächst in auf 95 °C erhitzter, 48 %iger wässriger HBr gelöst und 20 min bei dieser Temperatur gerührt. Nach Stoppen der Reaktion durch Zugabe von wässriger NaOH und Abkühlung auf Raumtemperatur bildete sich ein feinkristalliner, weißer Niederschlag, der

durch Filtration abgetrennt wurde. Bei dieser Synthesestufe war es wichtig, dass die wässrige HBr zunächst vorerhitzt wurde. Andernfalls bildete sich nach Zugabe von Trimethoprim lediglich eine Suspension, die auch nach längerem Erhitzen nicht aufklarte. Zudem spielte hier die Reaktionsdauer eine große Rolle. Mittels HBr war eine selektive Spaltung der mittleren Methoxygruppe des Trimethoprim nur möglich, wenn eine Reaktionsdauer von 20 Minuten nicht überschritten wurde. Bei einer längeren Reaktionszeit konnte auch die Abspaltung der anderen Methoxygruppen beobachtet werden. War die Reaktionsdauer signifikant kürzer als 20 Minuten, so verlief die Spaltung wiederum nicht vollständig, was sich in einer deutlich verringerten Ausbeute bemerkbar machte. Das durch anschließende Umkristallisation aus heißem Wasser nochmals gereinigte Phenol konnte dann in einer Williamson-Ethersynthese mit Methylbromoacetat zu Methylester **23** umgesetzt werden. Die erzielte Ausbeute lag hier bei 32 % und damit im literaturbekannten Bereich [91]. Nach Verseifung von **23** und Neutralisation der Reaktionslösung konnte die freie Säure **24** als weißer, kristalliner Niederschlag durch Filtration abgetrennt und nach Trocknung in einer Ausbeute von 61 % erhalten werden.

Aufgrund der nur sehr geringen Löslichkeit von **24** wurde diese Verbindung anschließend zusammen mit Boc-TOTA sowie den Kupplungsreagenzien HOBt und DIC unter basischen Bedingungen in DMF suspendiert und bis zum Vorliegen einer klaren Lösung auf 85 °C erhitzt. Nach Abschluss der Reaktion konnte **25** mit einer Ausbeute von 57 % isoliert werden. Verbindung **25** wurde zur Abspaltung der Boc-Gruppe in TFA in DCM gelöst, bevor auf die nun freie Aminogruppe Fmoc-L-Glu-OtBu gekuppelt wurde. Die Ausbeute lag hier bei 70 % und damit im erwarteten Bereich. Nach Abspaltung der *tert*-Butylgruppe durch TFA in DCM, konnte schließlich Fmoc-L-Glu(TOTA-TMP)-OH (**27**) nach chromatographischer Aufreinigung in 77%iger Ausbeute isoliert werden. Mit Hilfe dieser Verbindung konnte Cym_bacPROTAC_04 synthetisiert und anschließend dessen biochemische bzw. biologische Aktivität untersucht werden.

Während erste *in vitro* Experimente mit DHFR aus *Mycobacterium tuberculosis* keinen Proteinabbau nachweisen konnten und auch keine Bindung an das Protein bestimmt werden konnte, zeigte sich bei *in vivo* Messungen des MIC mit *Mycobacterium smegmatis*, dass Cym_bacPROTAC_04 hier eine starke antibiotische Wirkung aufweist. Während sowohl das entsprechende Cyclomarinderivat Cym_8, Trimethoprim als auch interessanterweise eine

zeitgleiche Gabe beider Substanzen jeweils einen MIC-Wert von 12.5 μM aufweisen, besitzt Cym_bacPROTAC_04 einen MIC von 1.6 μM . Dieser ca. 10-fach niedrigere Wert deutet möglicherweise auf einen endogenen Abbau hin. Um diese Vermutung zu bestätigen, sind jedoch noch weitere Experimente notwendig. Eine Möglichkeit wäre hier die Analyse von Zelllysaten nach erfolgter Inkubation der mit Cym_bacPROTAC_04 mittels Western Blot. Durch Wahl eines geeigneten Antikörpers sollte es möglich sein, einen eventuellen Abbau von DHFR nachzuweisen. Eine weitere Option ist eine *full proteome* Analyse des bakteriellen Proteoms nach bacPROTAC-Gabe. Diese weiterführenden Analysen waren zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit jedoch noch nicht abgeschlossen.

Cym_bacPROTAC_05 und 06 dienen der Methodenentwicklung des selektiven Proteinabbaus in Bakterien. Der verwendete Ligand (+)-JQ1 in Derivat 05 weist eine hohe Bindungsaffinität zu BRDT auf, während das in Derivat 06 verwendete Enantiomer (-)-JQ1 keine biochemische bzw. biologische Aktivität aufweist und daher als Negativkontrolle Verwendung finden sollte [96]. BRDT ist ein zur Familie der BET-Proteine gehörendes humanes Protein. Charakteristisch für diese Proteinfamilie ist das Vorhandensein einer Bromodomäne. Dabei handelt es sich um hochkonservierte Proteindomänen, die acetyliertes Lysin erkennen und in vielen humanen Proteinen als Co-Faktor bei der Regulation der Transkription mitwirken [97] [98].

Die Synthese der beiden bacPROTACs verlief ebenso wie die Synthese der jeweils benötigten JQ1-Bausteine analog zueinander. Beide Bausteine, Fmoc-L-Glu(TOTA-(+)-JQ1)-OH (**30**) und Fmoc-L-Glu(TOTA-(-)-JQ1)-OH (**33**) wurden in jeweils 3-stufigen Synthesen hergestellt. Als Startverbindungen dienten (+)-JQ1 bzw. (-)-JQ1.

Zunächst wurde (+)-JQ1-*tert*-butyl-Ester in 4 M HCl in 1,4-Dioxan entschützt, bevor Boc-TOTA auf die nun freie Carboxylgruppe gekuppelt wurde. Nach Abspaltung der Boc-Gruppe von **28** wurde zuvor mit HOBt und DIC aktiviertes Fmoc-L-Glu-OtBu auf das freie Amin gekuppelt, so dass Verbindung **29** in 44 %iger Ausbeute ausgehend von (+)-JQ1, erhalten werden konnte. In einem letzten Schritt wurde die *tert*-Butylgruppe durch 4 M HCl in 1,4-Dioxan abgespalten. Verbindung **30** konnte nach Entfernung des Lösemittels in quantitativer Ausbeute isoliert und ohne weitere Aufreinigung für die Synthese von Cym_bacPROTAC_05 verwendet werden (Abb. 3.37).

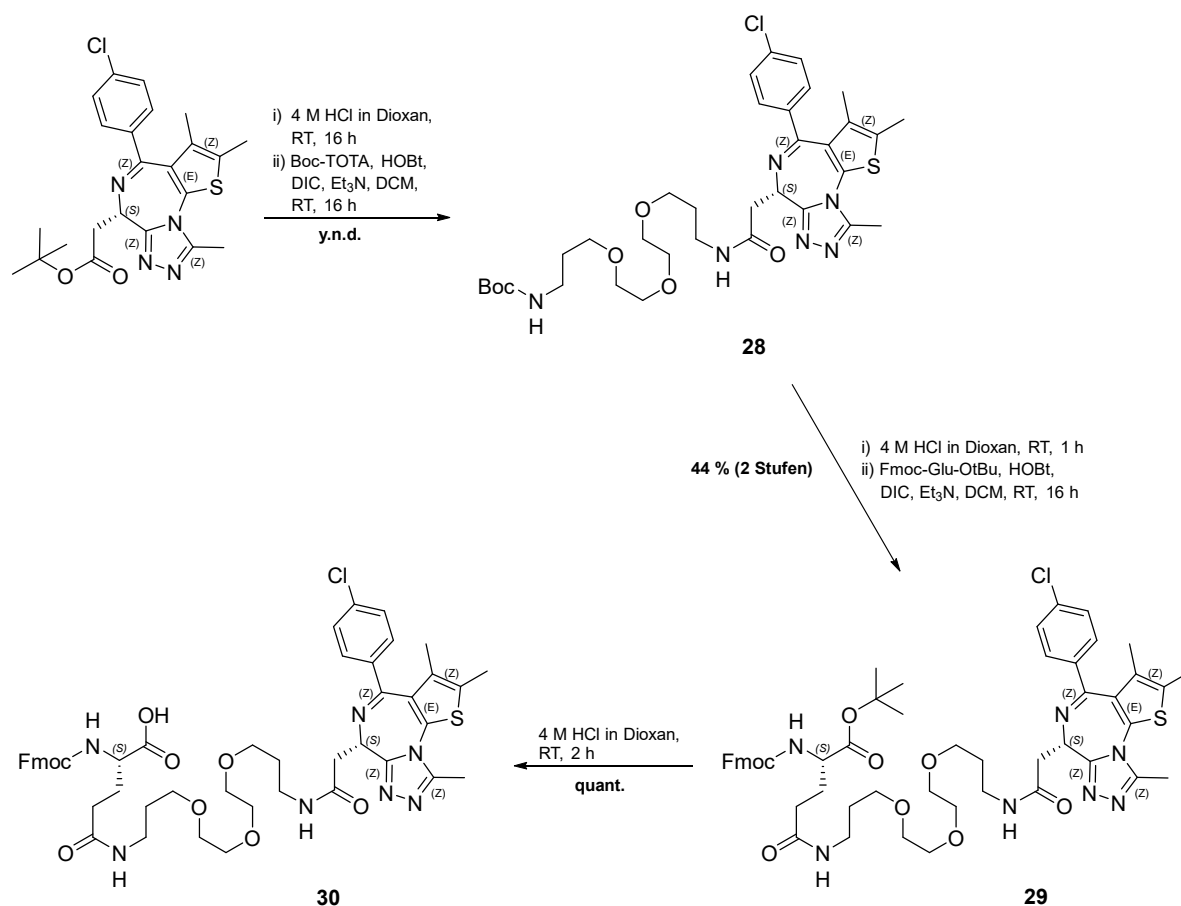


Abbildung 3.37: Synthese von Fmoc-L-Glu(TOTA-(+))JQ1-OH (**30**).

Die Synthese von Fmoc-L-Glu(TOTA-(-))JQ1-OH (**33**) erfolgte analog. Anstelle von (+)-JQ1 wurde hier allerdings (-)-JQ1 verwendet (Abb. 3.38). Die erzielten Ausbeuten waren nahezu identisch, was allerdings aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit, lediglich ein Stereozentrum weist eine andere Orientierung auf, nicht anders erwartet wurde.

Auch hier wurde zunächst die *tert*-Butylgruppe von (-)-JQ1 durch Verwendung von 4 M HCl in 1,4-Dioxan abgespalten, bevor der Boc-geschützte Linker TOTA gekuppelt wurde. Nach erfolgter Kupplung und Abspaltung der Boc-Schutzgruppe wurde auch hier zuvor mit HOBT und DIC aktiviertes Fmoc-L-Glu-OtBu gekuppelt. Die erzielte Ausbeute von Verbindung **32** betrug ausgehend von der Startverbindung (-)-JQ1 49 %. Im letzten Schritt wurde die *tert*-Butylgruppe in nahezu quantitativer Ausbeute sauer abgespalten und die erhaltene freie Säure **33** konnte für die Synthese von Cym_bacPROTAC_06 verwendet werden.

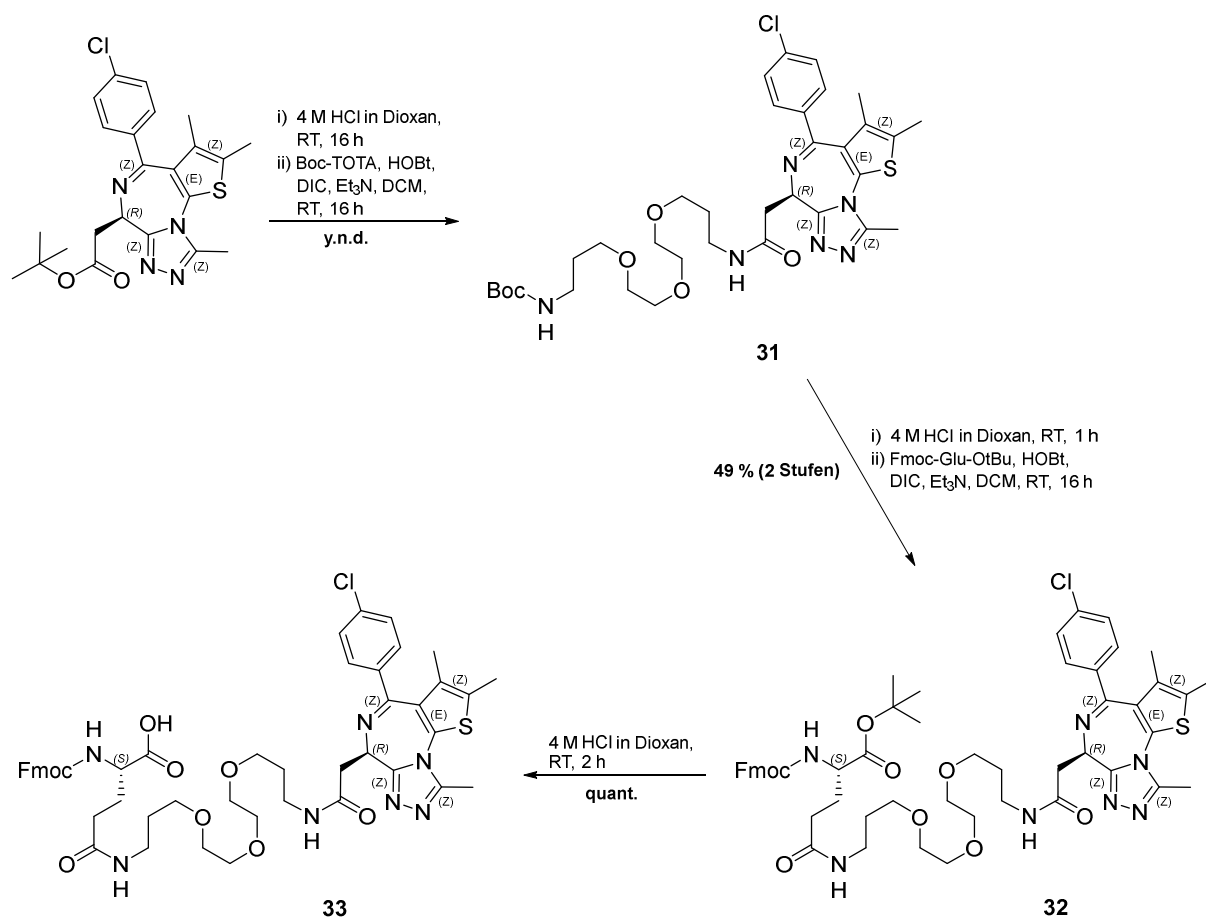


Abbildung 3.38: Synthese von Fmoc-L-Glu(TOTA-(-)JQ1)-OH (**33**).

Nach Abschluss der Synthesen wurde die Abbau-Aktivität von Cym_bacPROTAC_05 und 06 untersucht. Dabei zeigte sich bereits bei ersten *in vitro* Versuchen, dass überexprimiertes und gereinigtes BRDT durch mykobakterielles ClpC1P1P2 abgebaut werden konnte (Abb. 3.39). Bereits bei einer PROTAC-Konzentration von 1 μ M war ein deutlicher Abbau des Targetproteins zu erkennen.

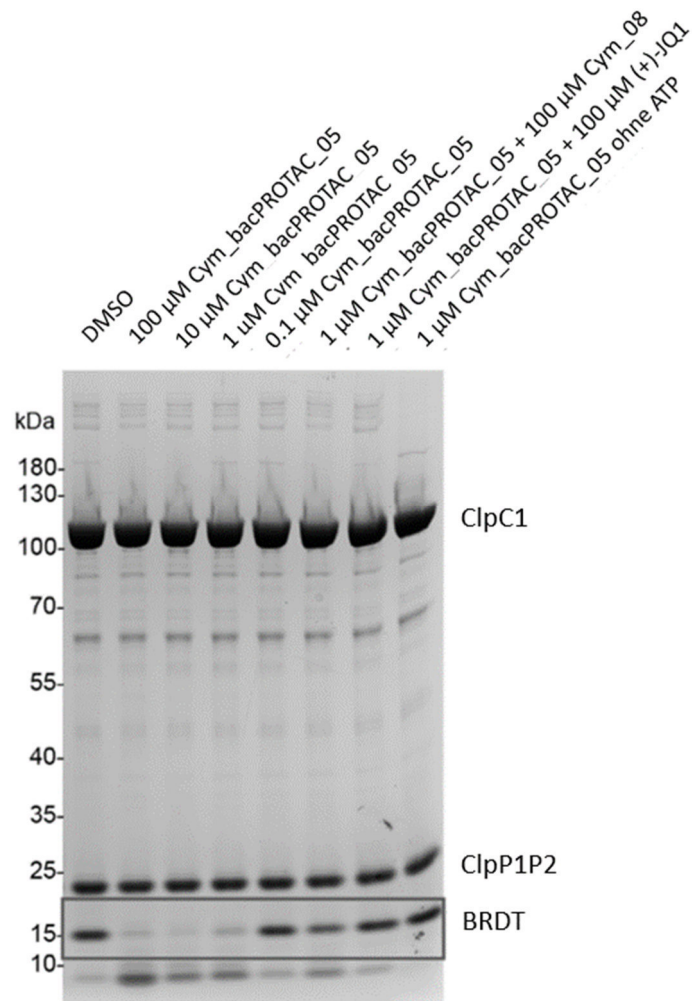


Abbildung 3.39: Analyse des durch Cym_bacPROTAC_05 induzierten *in vitro* Abbaus von BRDT durch ClpC1P1P2 mittels SDS-PAGE nach zweistündiger Inkubation. Als kompetitive Kontrollen wurden Cym_08 und (+)-JQ1 verwendet. (Die gezeigten Abbauxperimente wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. Tim Clausen durchgeführt).

Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurde ein analoges Experiment mit Cym_bacPROTAC_06 durchgeführt. Da Cym_bacPROTAC_06 das biologisch inaktive Derivat (-)-JQ1 enthielt, sollte hier kein Abbau zu sehen sein. Wie in Abb. 3.40 zu sehen, wurde diese Erwartung bestätigt. Im Größenbereich um 15 kDa ist nach 2-stündiger Inkubation mit dem bacPROTAC im untersuchten Konzentrationsbereich zwischen 0.1 μ M und 100 μ M kein signifikanter Proteinabbau erkennbar. Die leichte Abschwächung der Bandenintensität bei 100 μ M ist darauf zurückzuführen, dass das im Molekül verwendete Cyclomarinderivat gegenüber ClpC1 eine schwach-aktivierende Wirkung aufweist.

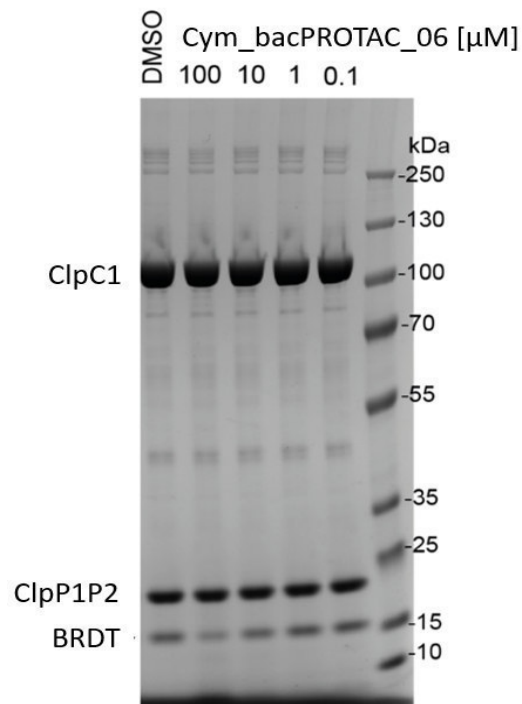


Abbildung 3.40: Analyse des Abbauelements mit Cym_bacPROTAC_06 mittels SDS-PAGE nach zweistündiger Inkubation. Da (-)-JQ1 nicht an BRDT bindet, konnte hier kein Proteinabbau beobachtet werden. (Das gezeigte Experiment wurde in der Arbeitsgruppe von Dr. Tim Clausen durchgeführt).

Nachdem ein erfolgreich durch Cym_bacPROTAC_05 induzierter Proteinabbau *in vitro* nachgewiesen werden konnte, wurde anschließend untersucht, ob auch *in vivo* ein bacPROTAC-vermittelter Proteinabbau beobachtet werden kann. Dazu wurden BRDT-exprimierende Kulturen von *Mycobacterium smegmatis* mit Cym_bacPROTAC_05 bei verschiedenen Konzentrationen inkubiert und anschließend der Proteingehalt mittels Kapillar-Western-Blots analysiert. Zudem wurde eine Proteomanalyse der inkubierten Zellen vorgenommen. Die Ergebnisse der Messungen sind in den folgenden Abbildungen dargestellt.

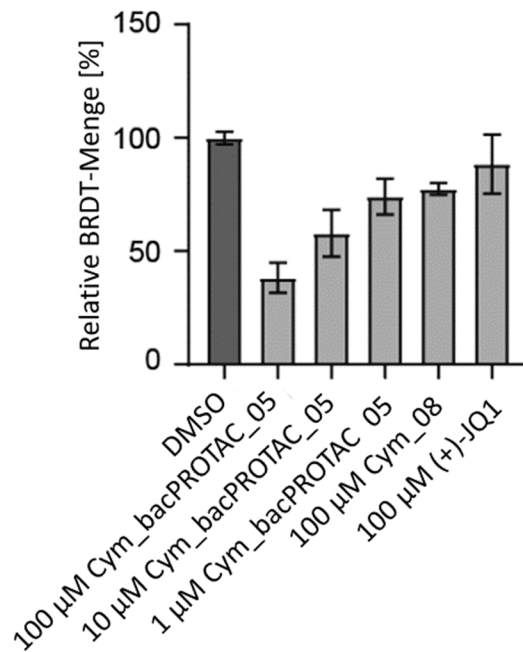


Abbildung 3.41: Kapillar-Western-Blot des *in vivo* Abbauxperiments in *Mycobacterium smegmatis*. Cym_bacPROTAC_05 wurde in verschiedenen Konzentrationen zwischen 1 µM bis 100 µM zugegeben. Als kompetitive Kontrollen wurden Cym_08 und (+)-JQ1 verwendet. Alle berechneten Proteinkonzentrationen wurden auf das BRDT-Level der mit DMSO behandelten Probe normiert. (Das gezeigte Experiment wurde in der Arbeitsgruppe von Dr. Tim Clausen durchgeführt).

Abb. 3.41 zeigt die Analyse des Verdaus mittels Kapillar-Western-Blots. Es zeigt sich hier, dass mit steigender bacPROTAC-Konzentration die BRDT-Konzentration in den Zellen sinkt. Ein vollständiger Abbau wurde jedoch auch bei einer Wirkstoffkonzentration von 100 µM nicht erreicht. Jedoch betrug die Inkubationsdauer lediglich 30 Minuten. Möglicherweise kann durch eine längere Inkubationsdauer ein stärkerer Rückgang des BRDT-Levels in den Zellen erreicht werden. Dies wurde hier jedoch nicht weiter untersucht.

Neben der Analyse mittels Kapillar-Western-Blot wurde der Proteinabbau auch durch eine Proteomanalyse untersucht. Für diese Messung wurden die Zellen zuvor über einen Zeitraum von 2 Stunden mit dem bacPROTAC inkubiert. Die Auswertung der Daten zeigte auch hier, dass BRDT in signifikantem Umfang abgebaut wurde (Abb. 3.42).

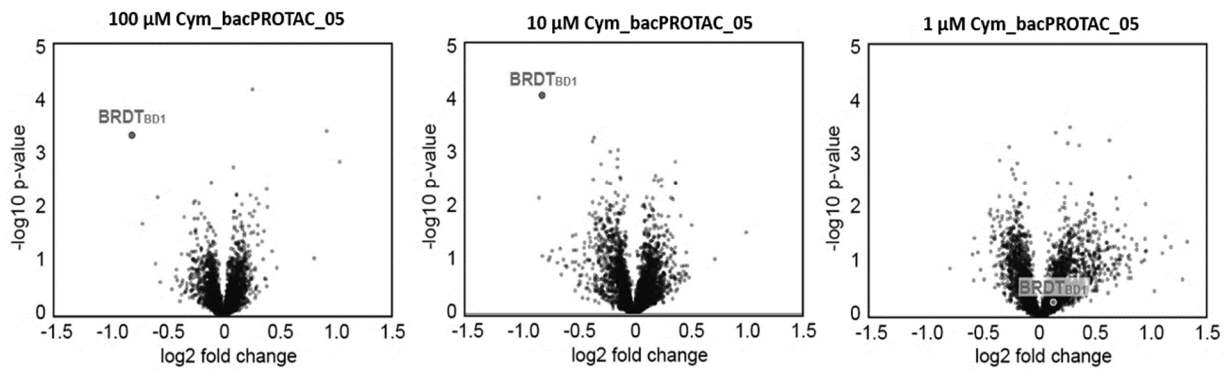


Abbildung 3.42: Proteomanalyse des *in vivo* Abbaus von BRDT in *Mycobacterium smegmatis* durch Cym_bacPROTAC_05. (Das gezeigte Experiment wurde in der Arbeitsgruppe von Dr. Tim Clausen durchgeführt).

Abschließend wurden für Cym_bacPROTAC_05 zudem die Bindungsaffinitäten zu BRDT und zu ClpC1 mittels ITC gemessen. Dabei zeigte sich, dass für die Bindung des bacPROTACs an BRDT mit 173 nM ein K_D -Wert im nanomolaren Bereich vorlag, während für die Bindung an ClpC1 mit 1.4 μ M ein K_D -Wert im niedrigen mikromolaren Bereich bestimmt werden konnte (Abb. 3.43).

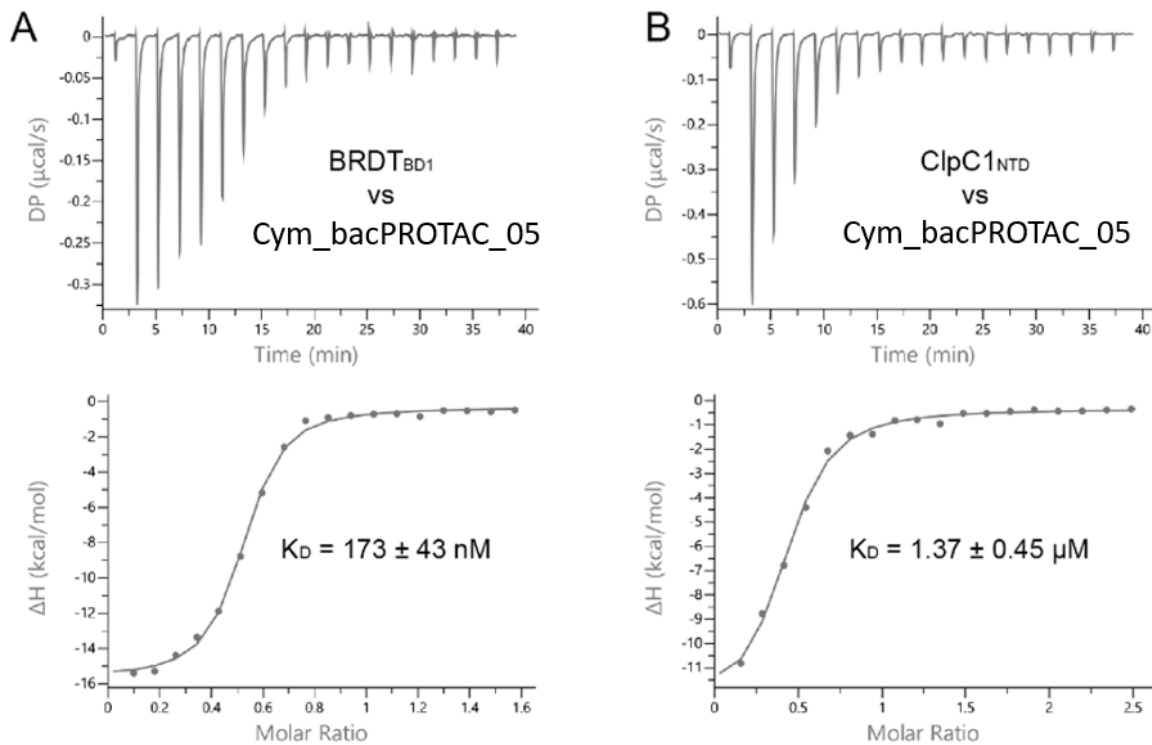


Abbildung 3.43: ITC-Messungen zur Ermittlung der Bindungsaffinitäten zwischen Cym_bacPROTAC_05 und BRDT (A) bzw. ClpC1 (B). (Die gezeigten Daten wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. Tim Clausen gemessen).

Ebenso wie Cym_bacPROTAC_04 wurden auch die Cylomarin-basierten bacPROTACs 07 und 08 synthetisiert, um endogene mykobakterielle Targets zu adressieren. Als Ligand wurde hier Pemetrexed ausgewählt, ein Wirkstoff, der sowohl an Dihydrofolatreduktase als auch an Thymidylatsynthase A (ThyA), ein weiteres Protein des Folatstoffwechsels, bindet (Abb. 3.44). Erstmals wurde dieser Wirkstoff 1992 in der Literatur vom Princeton-Chemiker Edward. C. Taylor beschrieben [99]. Heute ist Pemetrexed zur Behandlung verschiedener Krebsarten wie Mesotheliomen und nicht-kleinzelligen Lungentumoren zugelassen. Gegenüber vielen anderen Antifolaten weist Pemetrexed eine Besonderheit auf: seine Bindungsaffinität und Selektivität gegenüber Thymidylatsynthase A steigt stark an, wenn die Substanz als Pentaglutamat vorliegt [100] [101]. Während die Bindungsaffinität des Monoglutamats gegenüber ThyA bei 109 nM liegt, steigt sie beim Pentaglutamat um den Faktor 84 auf 1.3 nM stark an. Gegenüber DHFR konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden. Dort wird sowohl für das Mono- wie auch für das Pentaglutamat ein K_D -Wert von 7 nM gemessen [101].

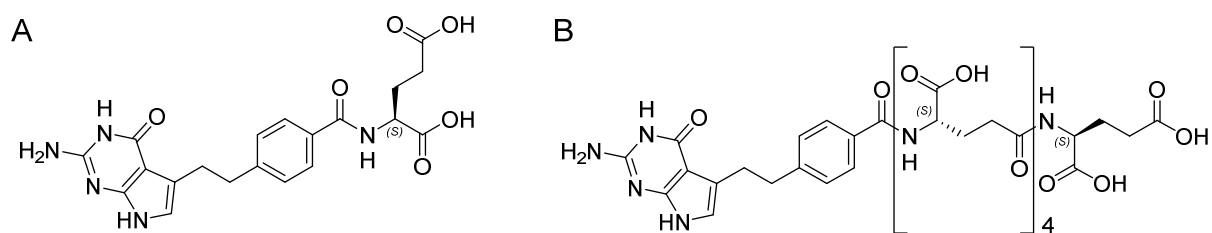


Abbildung 3.44: Chemische Struktur von Pemetrexed in Form des Monoglutamats (A) und als Pentaglutamat (B). Während Pemetrexed als Inhibitor für humane Proteine gut erforscht ist, so ist über seine Bindungsaffinität gegenüber bakteriellen Proteinen bislang noch nichts bekannt. Da unter dem PDB-Code 4FQS jedoch eine Kristallstruktur verfügbar ist, ist davon auszugehen, dass Pemetrexed auch an mykobakterielle Thymidylatsynthase bindet (Abb. 3.45).

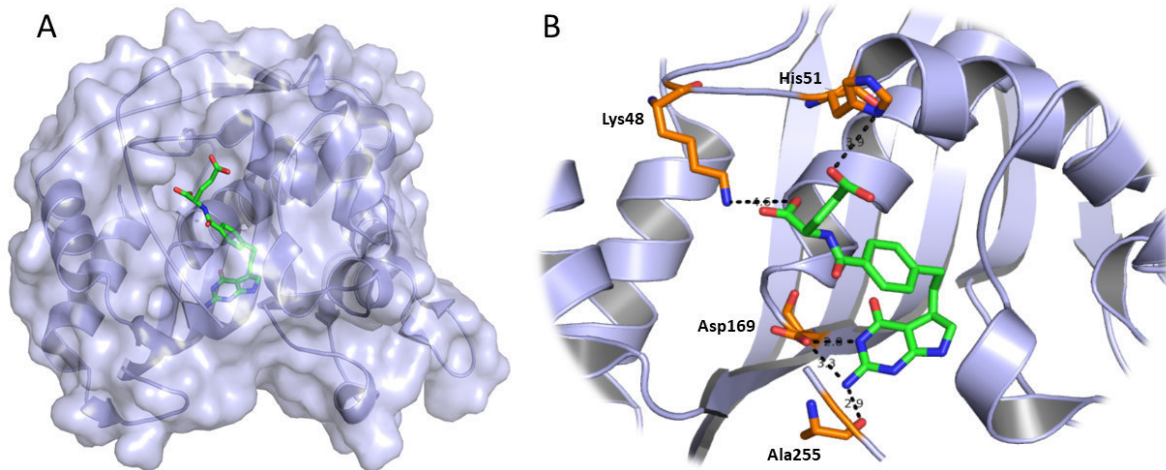


Abbildung 3.45: Kristallstruktur von mykobakterieller Thymidylsynthase A im Komplex mit Pemetrexed Monoglutamat (PDB 4FQS). **A:** Gesamtansicht. **B:** Detailansicht. Pemetrexed Monoglutamat tritt über Lys48, His51, Asp169 und Ala255 mit ThyA in Wechselwirkung. Da die unmittelbare Umgebung des Glutamats in der Bindetasche einige basische Aminosäuren an der Proteinoberfläche enthält, lässt sich die verstärkte Bindungsaffinität des Pentaglutamats erklären.

Zudem konnte im Rahmen der endogenen Substratsuche durch die Arbeitsgruppe von Dr. Tim Clausen ThyA als potenzielles Substrat für ClpC1P1P2 ausgemacht werden. Dazu wurde *in vitro* ThyA mit McsB phosphoryliert und durch ClpC1P1P2 abgebaut (Abb. 3.46).

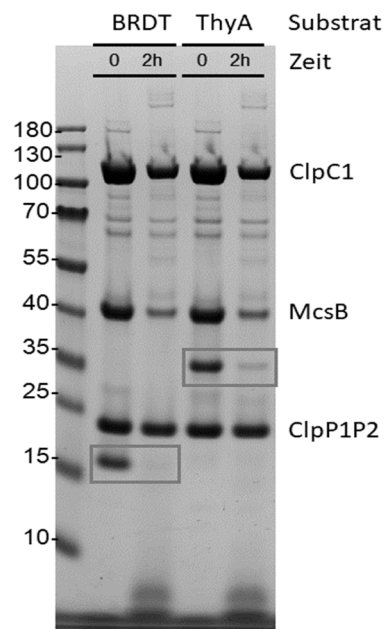


Abbildung 3.46: SDS-PAGE Analyse des *in vitro* Abbaus von ThyA (rechte Bahn) durch ClpC1P1P2 im Vergleich zu BRDT (linke Bahn) nach 2 Stunden. (Die Abbauxperimente wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. Tim Clausen durchgeführt).

Nach zweistündiger Inkubationsdauer konnte durch die Analyse mittels SDS-PAGE gezeigt werden, dass durch die Argininproteinkinase McsB phosphoryliertes und dadurch für den Abbau durch ClpC1P1P2 markiertes ThyA in ähnlichem Maße wie BRDT abgebaut wird.

Die Synthese des entsprechenden Bausteins erfolgte zum Teil an der festen Phase und zum Teil in Lösung (Abb. 3.47). Zunächst wurde 2-Chlorotriethylharz mit Fmoc-L-Glu-OMe beladen. Nach Abspaltung der Fmoc-Gruppe und Kupplung von zuvor aktivierter 4-[2-(2-Amino-4,7-dihydro-4-oxo-3H-pyrrolo[2,3]pyrimidin-5-yl)ethyl]benzoesäure wurde der Pemetrexed-Methylester **19** vom Harz abgespalten und konnte nach Trocknung mit einer nahezu quantitativen Ausbeute von 97 % erhalten werden.

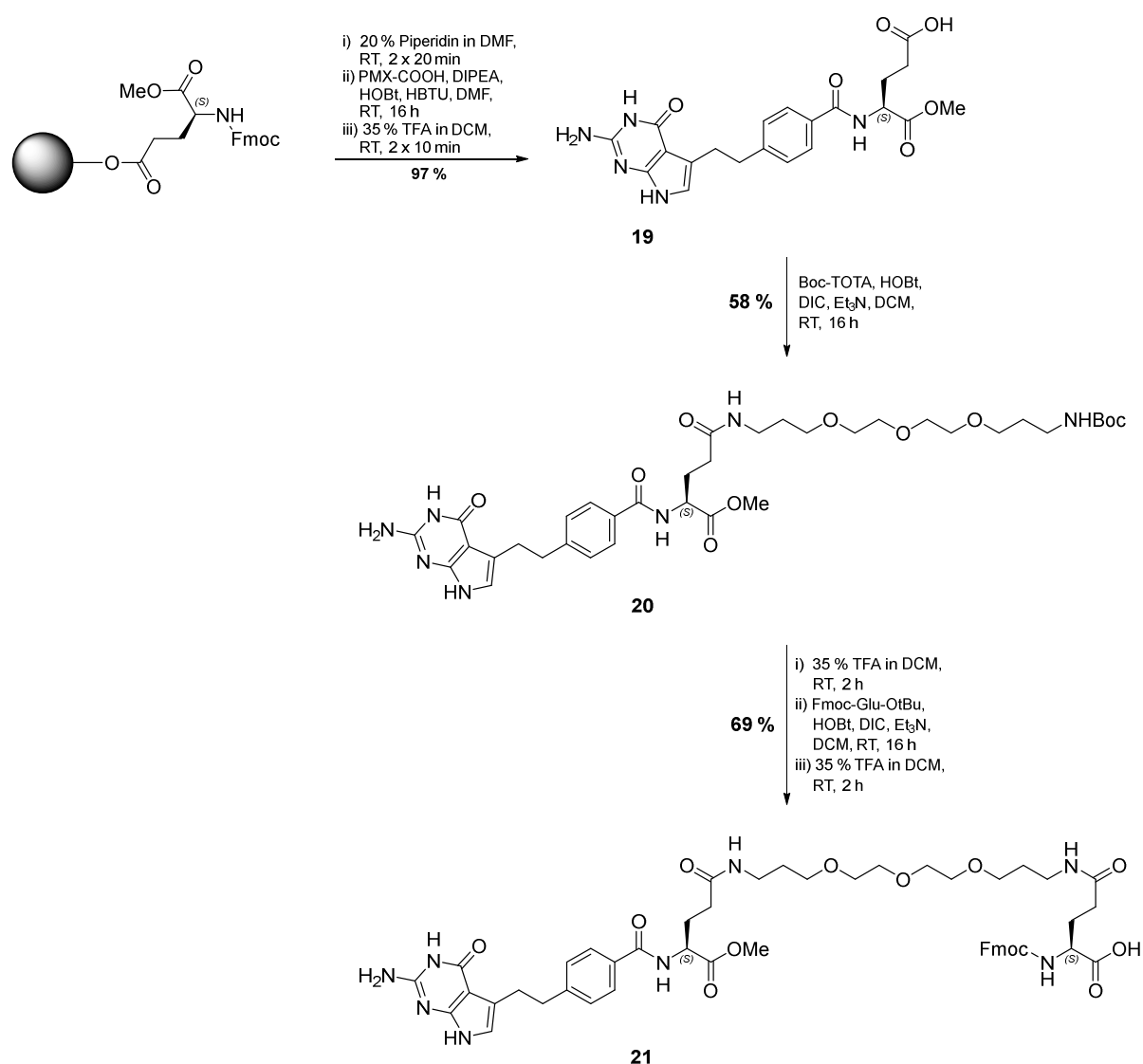


Abbildung 3.47: Synthese von Fmoc-L-Glu(TOTA-Pemetrexed-Methylester)-OH (**21**).

Ausgehend von Verbindung **19** konnte nun die Synthese von **21** in Lösung vervollständigt werden. Nach Kupplung des Boc-geschützten Linkers Boc-TOTA in 58 %iger Ausbeute, erfolgte zunächst die Abspaltung der Boc-Gruppe und anschließend die Kupplung von Fmoc-L-Glu-OMe. Nach Abspaltung der *tert*-Butylgruppe und finaler Aufreinigung konnte Fmoc-L-Glu(TOTA-Pemetrexed-Methylester)-OH (**21**) mit einer Ausbeute von 69 % erhalten werden. Mit diesem Baustein wurde anschließend Cym_bacPROTAC_08 synthetisiert.

Bei der folgenden biologischen Validierung zeigte sich jedoch, dass Cym_bacPROTAC_08 keine Abbauprodukte aufwies. Um zu ergründen, warum keine Aktivität beobachtet werden konnte, wurden Zwischenverbindungen der Synthese des verwendeten PMX-Bausteins auf ihre Bindung an die bakterielle Thymidylatsynthase untersucht. Dazu wurde ein *Thermal Shift Assay* (TSA) durchgeführt. Dieser Assay basiert auf einer erhöhten thermischen Stabilität von Proteinen, wenn sie einen Liganden gebunden haben. Dabei steht die ermittelte Entfaltungstemperatur des Proteins in direkter Beziehung zur Bindungsstärke zwischen Ligand und Protein. Je größer die gemessene Temperaturdifferenz, umso größer ist die Bindungsaffinität zwischen beiden Interaktionspartnern.

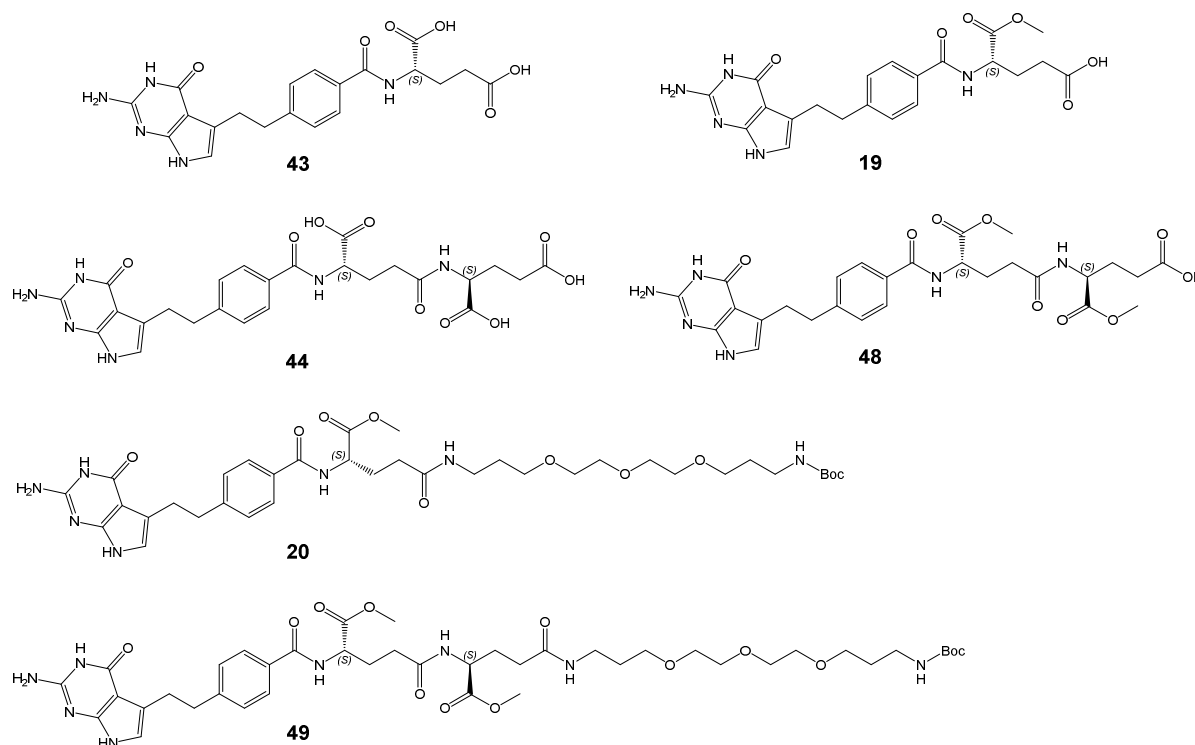


Abbildung 3.48: Mittels *Thermal Shift Assay* auf Bindung zu mykobakterieller Thymidylatsynthase A untersuchte Verbindungen.

Da aus der Literatur bekannt ist, dass die Kupplung weiterer Glutamateinheiten an Pemetrexed zu einer deutlich gesteigerten Bindungsaffinität gegenüber Thymidylatsynthase führt, wurden zusätzlich zu den Monoglutamaten **19**, **20** und **43** auch die entsprechenden Diglutamate **44**, **48** und **49** untersucht. Auf weitere Glutamateinheiten wurde verzichtet, da befürchtet wurde, dass durch weitere freie Carboxygruppen die Zellgängigkeit der Substanzen sinken würde. Aus diesem Grund wurde für die Synthese von Cym_bacPROTAC_08 daher auch Pemetrexed-Methylester **19** verwendet. Durch den Methylester wird eine negative Ladung im Molekül vermieden, die andernfalls durch die Carboxygruppe unter physiologischen Bedingungen aufgetreten wäre. Dies sollte die Membrangängigkeit des Moleküls verbessern. Zunächst erfolgte jedoch die Synthese der für diesen fragmentbasierten Ansatz benötigten Substanzen. Während die Verbindungen **19** und **20** im Zuge der Synthese von Fmoc-L-Glu(TOTA-Pemetrexed-Methylester)-OH (**21**) als Zwischenverbindungen anfielen und daher bereits vorhanden waren, mussten die drei Diglutamate **44**, **48** und **49**, sowie Pemetrexed (**43**) erst synthetisiert werden.

Die Synthese von Pemetrexed erfolgte an der festen Phase und umfasste nur wenige Stufen (Abb. 3.49).

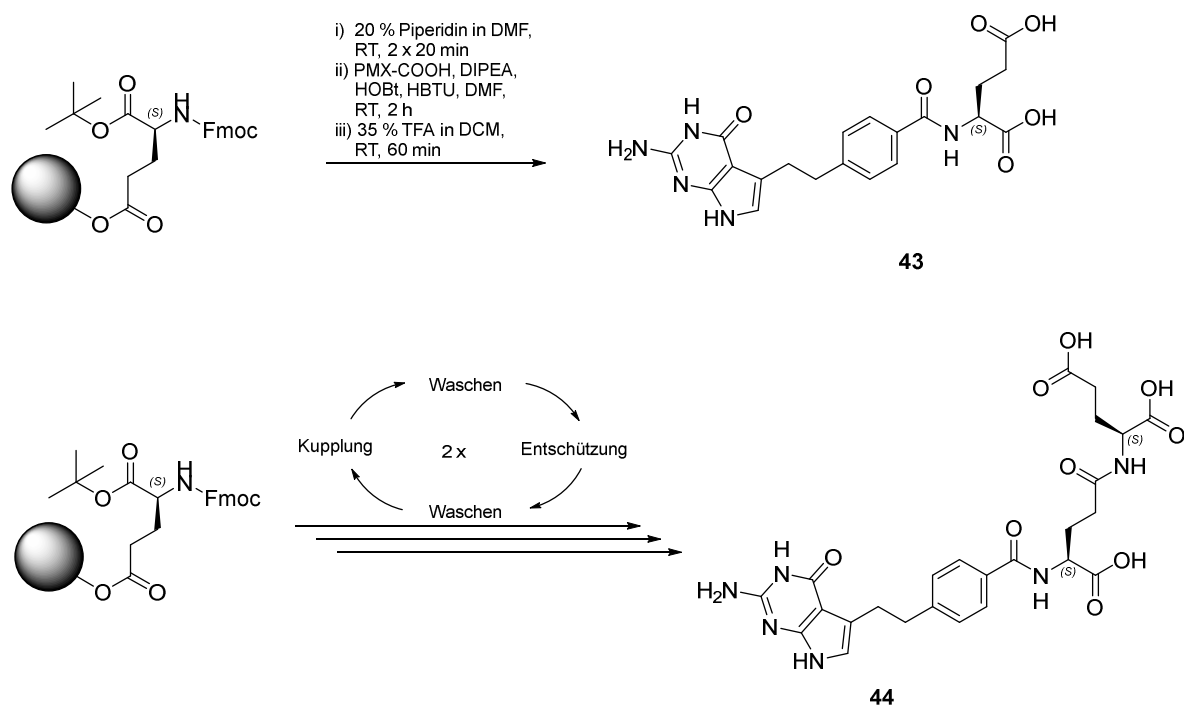


Abbildung 3.49: Festphasensynthesen von Pemetrexed (**43**) und Pemetrexed-Diglutamat (**44**).

Nach Beladung von 2-Chlorotriethylharz mit Fmoc-L-Glu-OtBu erfolgte dessen N-terminale Entschützung, so dass erst 4-[2-(2-Amino-4,7-dihydro-4-oxo-3H-pyrrolo[2,3]pyrimidin-5-yl)ethyl]benzoesäure gekuppelt und anschließend Verbindung **43** in einer Ausbeute von 49 % vom Harz abgespalten werden konnte.

Die Synthese des Diglutamats **44** erfolgte weitestgehend analog. Es wurde nach der Harzbeladung lediglich zunächst ein zweites Glutamat im Rahmen der SPPS gekuppelt, bevor auch hier 4-[2-(2-Amino-4,7-dihydro-4-oxo-3H-pyrrolo[2,3]pyrimidin-5-yl)ethyl]-benzoesäure gekuppelt wurde und anschließend Verbindung **44** mit einer Ausbeute von 39 % vom Harz abgespalten werden konnte.

Boc-TOTA-PMX(GluOMe)₂ (**49**) wurde analog zu Verbindung **20** synthetisiert. Dabei wurde eine Gesamtausbeute von 26 % erzielt, ausgehend von der maximalen Harzbeladung.

Nach Abschluss aller Synthesen konnten mittels TSA die Bindungsaffinitäten der Substanzen untersucht werden. Die erhaltenen Messwerte sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst.

Tabelle 3.4: Resultate der TSA-Messung. (Die Daten wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. Tim Clausen gemessen).

Substanz	ΔT_m [°C]
Pemetrexed (43)	10.1
Pemetrexed-Methylester (19)	0.4
Boc-TOTA-Pemetrexed-Methylester (20)	- 0.3
Pemetrexed-Diglutamat (44)	10.7
Pemetrexed-Diglutamat-Dimethylester (48)	0.3
Boc-TOTA-PMX(GluOMe) ₂ (49)	- 0.3
Cym_bacPROTAC_08	0.2

Die Messdaten zeigen deutlich, dass die Methylgruppe am ersten Glutamat die Bindung des Liganden zum Protein signifikant abschwächt. Dies könnte die fehlende biologische Aktivität von Cym_bacPROTAC_08 erklären.

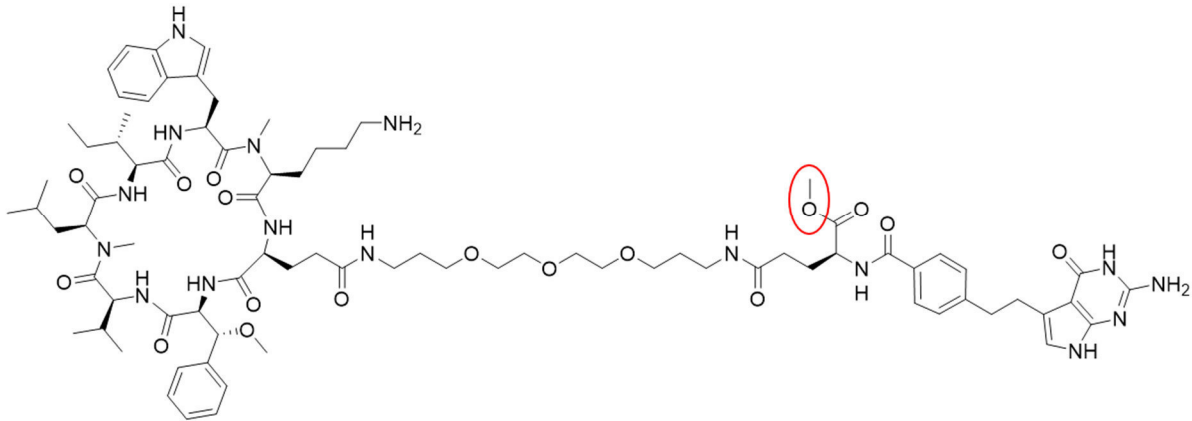


Abbildung 3.50: Struktur von Cym_bacPROTAC_08. Rot umrandet ist die Methylgruppe am Glutamat, durch die die Bindung des Liganden zum Protein signifikant abgeschwächt wird, was in einem Verlust der biochemischen bzw. biologischen Aktivität resultieren könnte.

Um dieses Problem zu umgehen, wurde Cym_bacPROTAC_07 synthetisiert. Bei diesem bacPROTAC erfolgte ausgehend von Cym_bacPROTAC_08 zusätzlich zum Ende der Synthese die Verseifung des Methylesters am Glutamat. Die biochemische und biologische Validierung dieses Derivats war zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit jedoch noch nicht abgeschlossen.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Synthese und biologische Validierung von bacPROTACs für den gerichteten Proteinabbau in Bakterien.

Dazu wurden zunächst bacPROTACs entwickelt, die Biotin als Bindungspartner für mSA bzw. mSA-Fusionsproteine und phosphoryliertes Arginin als Abbaumarker für das bakterielle ClpCP-Protease-System enthielten. Nach der erfolgreichen Entwicklung einer Syntheseroute konnten mit den erhaltenen Substanzen *in vitro*-Abbauexperimente durch die AG Clausen am IMP in Wien durchgeführt werden.

Es zeigte sich hierbei, dass monomeres Streptavidin nur bedingt als Substrat geeignet war, vermutlich da es eine hochgeordnete und kompakte Struktur aufweist, die durch ClpC nur in geringem Maße entfaltet und somit durch ClpP auch nur in geringem Maße abgebaut werden kann. Da für den proteolytischen Abbau von Proteinen ungeordnete Strukturbereiche eine große Rolle spielen [7] [8], wurden anschließend verschiedene mSA-Fusionsproteine mit weniger geordneten Bereichen generiert und ebenfalls als Substrate in Abbauexperimenten eingesetzt. Dabei zeigte sich, dass ein nahezu vollständiger Abbau von mSA-Kre durch bacPROTAC_3 bereits bei bacPROTAC-Konzentrationen zwischen 0.1 und 1 μ M erfolgte. Der Abbau anderer Fusionsproteine erfolgte in Abhängigkeit von der Ordnung ihrer Strukturen in teilweise deutlich geringerem Maße (Abb. 3.5). Während bei vielen PROTACs für humane Zellanwendungen die Linkerlänge eine wichtige Rolle für die Effizienz des Proteinabbaus spielt, konnte hier kein signifikanter Unterschied diesbezüglich festgestellt werden. Verkürzte Linkerlängen in bacPROTAC_1 und bacPROTAC_2 führten zu ähnlichen Ergebnissen, wie bacPROTAC_3.

Allerdings konnte für diese bacPROTACs kein *in vivo*-Abbau beobachtet werden. Dies könnte durch die unter physiologischen Bedingungen negativ geladene Phosphatgruppen verursacht werden, wodurch die Moleküle die bakterielle Zellwand eventuell nicht durchdringen können. Darüber hinaus stellten sich die phosphorylierten bacPROTACs als sehr empfindlich gegenüber bereits milde Säuren heraus.

Es wurde daher nach einer Möglichkeit gesucht, um zum einen bacPROTACs mit einer höheren Säurestabilität und zum anderen mit einer verbesserten Zellgängigkeit der Substanzen zu erhalten. Dementsprechend wurden drei bacPROTACs, die die nicht-kanonische Aminosäure

Canavanin anstelle von Arginin enthalten, synthetisiert (Abb. 3.9). Cav_bacPROTAC_1 wurde anschließend hinsichtlich seiner Hydrolyseempfindlichkeit bei pH 4 über einen Zeitraum von 24 Stunden untersucht (Abb. 3.11). Als Vergleichssubstanz diente hierbei ein phospho-Arginin enthaltendes Derivat. Es stellte sich heraus, dass die Substitution von Arginin gegen Canavanin zu einer signifikanten Steigerung der Stabilität führte. Da zudem *in vitro* ein Proteinabbau beobachtet werden konnte (Abb. 3.12), wurden zwei weitere Derivate in Form von Pro-Drugs synthetisiert. Hier stehen die biologischen Daten jedoch noch aus.

Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit eine Festphasensynthese für die Darstellung von Cyclomarinderivaten entwickelt (Abb. 3.22). Es wurden insgesamt 15 Derivate synthetisiert und durch Bestimmung von MIC und K_D -Werten auf ihre biologische Aktivität untersucht. Ziel war es, ein Derivat zu finden, das zwar einerseits eine gute Bindungsaffinität gegenüber ClpC1_{NTD} aufweist, andererseits aber auch nicht zu toxisch gegenüber *M. smegmatis* ist. Dieses Derivat sollte anschließend für die Synthese von cyclomarinbasierten bacPROTACs verwendet werden. Mit einem MIC von 12.5 μ M und einem K_D -Wert von 0.8 μ M erwies sich hierbei Derivat Cym_8 als am geeignetsten (Tabelle 3.2).

Basierend auf Cym_8 konnten acht bacPROTACs synthetisiert werden. Dabei wurden verschiedene Liganden für die Bindung an verschiedene Zielproteine verwendet (Tabelle 3.3). Während für Cym_bacPROTAC_1 aufgrund einer zu kurzen Linkerlänge kein Proteinabbau beobachtet werden konnte, konnte mit Cym_bacPROTAC_2 der *in vitro* Abbau von mSA-Kre induziert werden.

Um auch *in vivo* einen Proteinabbau induzieren zu können, wurden anschließend die Derivate Cym_bacPROTAC 3-8 synthetisiert. Zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit lagen jedoch noch nicht zu allen Verbindungen valide biologische Daten vor.

Mit Cym_bacPROTAC_3 wurde versucht, FKBP-ähnliche Proteine abzubauen, was jedoch nicht gelang.

Cym_bacPROTAC_4 hingegen adressiert bakterielle DHFR und weist gegenüber *M. smegmatis* einen MIC von 1.6 μ M auf. Cym_8 und TMP allein und in Kombination führten zu einem MIC von jeweils 12.5 μ M. Möglicherweise ist die signifikant höhere antibiotische Aktivität des bacPROTACs somit auf einen induzierten Abbau von DHFR zurückzuführen. Dies muss jedoch

durch geeignete Experimente noch überprüft werden, die zum Zeitpunkt des Verfassens der Arbeit noch ausstanden.

Mit Cym_bacPROTAC_5 gelang schließlich erstmalig ein *in vivo*-Abbau. Dieser bacPROTAC führte zum Abbau des in *M. smegmatis* überexprimierten humanen Proteins BRDT (Abb. 3.41, Abb. 3.42). Als Negativkontrolle wurde mit Cym_bacPROTAC_6 ein Derivat mit dem biologisch inaktivem Ligand (-)-JQ1 entwickelt, wodurch klar gezeigt werden konnte, dass der beobachtete Abbau tatsächlich durch Cym_bacPROTAC_5 ausgelöst wurde.

Cym_bacPROTAC 7 und 8 dienten wiederum dazu, ein endogenes bakterielles Target zu finden. Der in diesen Molekülen verwendete Ligand Pemetrexed bindet an DHFR und an ThyA. Durch vorangegangene *in vitro* Experimente in der AG Clausen konnte gezeigt werden, dass ThyA als Substrat für den ClpCP-Komplex geeignet ist (Abb. 3.46), so dass nun versucht werden sollte, dieses Protein mit einem bacPROTAC abzubauen. Durch TSA-Messungen konnte gezeigt werden, dass Pemetrexedmethylester aus Cym_bacPROTAC_8 als Ligand ungeeignet ist, da durch die Methylierung die Bindung zum Zielprotein signifikant geschwächt wird. Da die biologische Validierung zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit noch nicht abgeschlossen war, kann allerdings momentan noch keine Aussage darüber gemacht werden, ob Cym_bacPROTAC_7 zu einem *in vivo*-Abbau von ThyA führt oder nicht.

Abschließend kann festgestellt werden, dass sowohl die Entwicklung einer Festphasensynthese für Cyclomarinderivate als auch die Synthese von bacPROTACs im Rahmen dieser Arbeit erreicht werden konnten. Es sind jedoch noch einige weiterführenden Analysen und Experimente nötig, um das hier entwickelte Konzept des selektiven Proteinabbaus in Bakterien auch für die Entwicklung neuer Antibiotika nutzen zu können. Hierzu gehören besonders die aktuell noch nicht abgeschlossenen biologischen Validierungen der beiden vielversprechenden Verbindungen Cym_bacPROTAC_4 und Cym_bacPROTAC_7.

Darüber hinaus bieten auch canavaninbasierte bacPROTACs großes Potential. Allerdings ist hier noch nicht klar, ob die Zellgängigkeit durch die Maskierung der Phosphatgruppe auch erreicht werden kann. Da jedoch aus der Literatur bekannt ist, dass Pivaloylester durch mycobakterielle Esterasen intrazellulär gespalten werden können [63] [64], besteht hier die berechtigte Hoffnung, dass Cav_bacPROTAC_3 einen *in vivo*-Abbau von BRDT induzieren könnte. Sollte sich diese Annahme bestätigen, so könnten in Zukunft analog zu den

cyclomarinbasierten Cym_bacPROTACs auch hier bacPROTACs zum Abbau endogener bakterieller Targets entwickelt werden.

5. Experimenteller Teil

5.1. Geräte und Chemikalien

Reagenzien und Lösemittel. Alle verwendeten Reagenzien und Lösemittel wurden von Acros Organics, Fluka, Merck, Novabiochem, Labseeker, Sigma Aldrich, ABCR oder Iris Biotech bezogen und ohne weitere Aufreinigung verwendet. Trockene Lösemittel wurden von Sigma Aldrich im höchstmöglichen Reinheitsgrad bezogen.

Dünnschichtchromatographie (DC). Die Dünnschichtchromatographien wurden auf silicagelbeschichteten Aluminiumplatten der Firma Merck (20 x 20 cm, 60F₂₅₄) durchgeführt. Die Substanzspots wurden mittels UV-Licht einer Wellenlänge von 254 nm oder durch das Anfärben der Platte mit einer Färbelösung (1.5 g KMnO₄, 10 g K₂CO₃ und 1.25 mL einer 10 %-igen wässrigen Natronlauge in 200 mL Wasser) detektiert. Nach Anfärben der Spots wurden diese durch Erhitzen der Platte sichtbar gemacht. Elutionsmittel und R_f-Werte sind an der entsprechenden Stelle im experimentellen Teil angegeben.

Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie (LC-MS). Die LC-MS-Analysen erfolgten mit einem System von Thermo Scientific mit einer Eclipse XDB-C18 (5 µm) Säule von Agilent. Die Peakdetektion erfolgte durch einen UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 210 nm, die Massendetektion durch ein Thermo Scientific LCQ-FleetTM ESI-Massenspektrometer. Es wurde das folgende Gradientenprogramm verwendet: 0-1 min: 90 % Wasser, 10 % Acetonitril mit jeweils 0.1 % Ameisensäure; 1-10 min: linearer Anstieg auf 100 % Acetonitril mit 0.1 % Ameisensäure; 10-15 min: 100 % Acetonitril mit 0.1 % Ameisensäure. Die Flussrate betrug 1 mL min⁻¹.

HPLC Aufreinigung. Die Aufreinigung mittels HPLC erfolgte mit einem Prominence UFLC System der Firma Shimadzu. Zur Detektion der Peaks wurde ein UV-Detektor mit einer Wellenlänge von 210 nm verwendet, bei der verwendeten Säule handelte es sich um das Modell Luna 5 µm C18(2), 100 x 21.20 mm von Phenomenex. Die Flussrate betrug bei allen Aufreinigungen 20 mL min⁻¹. Als Eluenten wurden Wasser und Acetonitril mit Zusatz von jeweils 0.1 % TFA, NH₃ oder ohne weitere Zusätze verwendet. Dabei wurden die folgende Gradientenprogramme verwendet:

Tabelle 5.1: Gradientenprogramme für die Aufreinigung der finalen Substanzen.

Substanzen	Gradient	Zusatz
bacPROTAC 1-3	0-5 min: 2 % ACN, 98 % H ₂ O 5-25 min: linearer Anstieg auf 18 % ACN und 82 % H ₂ O	jeweils 0.1 % NH ₃ (30 % in H ₂ O)
Cav_bacPROTAC_1	0-5 min: 5 % ACN, 95 % H ₂ O 5-45 min: linearer Anstieg auf 45 % ACN und 55 % H ₂ O	jeweils 0.1 % NH ₃ (30 % in H ₂ O)
Cym_1 – Cym_3, Cym_7	0-5 min: 30 % ACN, 70 % H ₂ O 5-55 min: linearer Anstieg auf 75 % ACN und 25 % H ₂ O	jeweils 0.1 % TFA
Cym_4 – Cym_6, Cym_8, Cym_11 – Cym_14	0-5 min: 30 % ACN, 70 % H ₂ O 5-25 min: linearer Anstieg auf 60 % ACN und 40 % H ₂ O	jeweils 0.1 % TFA
Cym_9 – Cym_10, Cym_15	0-5 min: 30 % ACN, 70 % H ₂ O 5-55 min: linearer Anstieg auf 75 % ACN und 25 % H ₂ O	--
Cym_bacRROTACs	0-5 min: 30 % ACN, 70 % H ₂ O 5-25 min: linearer Anstieg auf 60 % ACN und 40 % H ₂ O	jeweils 0.1 % TFA

5.2. Synthese der phosphorylierten bacPROTACs

Bei der Synthese der phosphorylierten bacPROTACs wurde eine Kombination aus Festphasen- und Lösungssynthese angewandt. Dazu wurden folgende allgemeinen Vorschriften verwendet.

5.2.1. Allgemeine Synthesevorschrift 1: Harzbeladung

Rink-Amid-Harz (maximale Beladung 0.8 mmol g⁻¹) wurde zunächst in DMF:Piperidin (3:2, 5 mL) suspendiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung entfernt und das Harz mit 2 x DMF, 2 x DCM und 2 x NMP gewaschen. Fmoc-Lys(Biotin)-OH (3 eq.), DIPEA (6 eq.), HOBt Monohydrat (3 eq.) und HBTU (3 eq.) wurden in NMP (5 mL) gelöst und zum Harz gegeben. Die resultierende Suspension wurde 16 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Dann wurde die Reaktionslösung entfernt und das Harz wie zuvor beschrieben gewaschen. Zum Blockieren der verbliebenen freien Bindestellen auf dem Harz wurden in

NMP (5 mL) gelöstes Essigsäureanhydrid (2 eq.) und DIPEA (3 eq.) zum Harz gegeben. Die Suspension wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde die Reaktionslösung entfernt und das Harz erneut gewaschen (2 x DMF, 2 x DCM und 2 x DMF).

5.2.2. Allgemeine Synthesevorschrift 2: Festphasensynthese

Die phosphorylierten Peptide wurden durch iterative Anwendung der folgenden Schritte synthetisiert.

Fmoc-Abspaltung

Eine Lösung aus DMF und Piperidin (3:2, 5 mL) wurde zum Harz gegeben und 20 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Entfernen der Lösung wurde dieser Schritt ein weiteres Mal wiederholt. Anschließend wurde das Harz mit 2 x DMF, 2 x DCM und 2 x DMF gewaschen.

Kupplung der Fmoc-geschützten Aminosäuren

Die jeweilige Aminosäure (3 eq.), HOBT Monohydrat (3 eq.), HBTU (3 eq.) und DIPEA (3 eq.) wurden in DMF (5 mL) gelöst. Die resultierende Lösung wurde zum Harz gegeben und 2 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung entfernt und das Harz mit 2 x DMF, 2 x DCM und 2 x DMF gewaschen.

Acetylierung

Nach Kupplung der letzten Aminosäure wurde das Peptid acetyliert. Dazu wurden Essigsäureanhydrid (3 eq.) und DIPEA (4 eq.) in DMF gelöst und zum Harz gegeben. Die Suspension wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde das Harz mit 2 x DMF, 2 x DCM und 2 x DMF gewaschen.

5.2.3. Allgemeine Synthesevorschrift 3: Abspaltung der Peptide vom Harz

Eine Mischung aus TFA und DCM (3:1, 5 mL) wurde zum Harz gegeben. Die resultierende Suspension wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Entfernung der Abspalllösung wurde das Harz dreimal mit DCM (2 mL) gewaschen. Die Waschlösungen wurden mit der Abspalllösung vereint und unter vermindertem Druck bis zur Trockne eingengt. Anschließend erfolgte die Aufreinigung mittels RP-HPLC mit 0.1 % TFA in Wasser und 0.1 % TFA in Acetonitril als Eluenten. Fraktionen, die das gewünschte Produkt enthielten, wurden vereinigt und lyophilisiert.

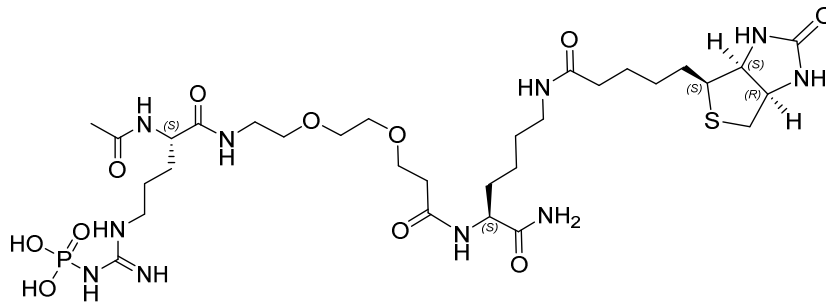
5.2.4. Allgemeine Synthesevorschrift 4: Hydrierung und finale Aufreinigung

Das Tce-geschützte Peptid wurde in einer Mischung aus Pufferlösung (100 mM NH_4HCO_3 , pH 9, 5 mL) und absolutem Ethanol (5 mL) gelöst. Es wurden 30 Gew.% des Katalysators Pd/C (10 %) zugegeben und für 15 Minuten Argon in die Lösung eingeleitet. Dann erfolgte die Einleitung von Wasserstoff in das Reaktionsgemisch. Die erhaltene Suspension wurde 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der Katalysator abfiltriert, der Filterkuchen mit Ethanol (10 mL) gewaschen und das Filtrat unter vermindertem Druck zur Trockne eingengt. Die finale Aufreinigung erfolgte mittels RP-HPLC mit 0.1 % NH_4OH in Wasser und 0.1 % NH_4OH in Acetonitril als Eluenten. Fraktionen, die das gewünschte Produkt enthielten, wurden vereinigt und lyophilisiert.

5.3. Phosphorylierte bacPROTACs

Aufgrund der thermischen und chemischen Instabilität der entschützten phosphorylierten Peptide gegenüber Säuren wurde auf die Messung von NMR-Spektren der Verbindungen bacPROTAC_01 und bacPROTAC_02 verzichtet, da beide nur in geringen Mengen verfügbar waren. Beide Substanzen wurden nach erfolgter finaler Aufreinigung direkt für die biologische Validierung eingesetzt.

5.3.1. bacPROTAC_01



100 mg Rink-Amid-Harz (entspricht 0.08 mmol Initialbeladung) wurden mit 142 mg (0.24 mmol) Fmoc-L-Lys(Biotin)-OH gemäß Abschnitt 5.2.1 beladen. Das Tce-geschützte Peptid wurde nach Abschnitt 5.2.2 und 5.2.3 unter Verwendung von Fmoc-L-Lys(Biotin)-OH, Fmoc-AEEP-OH, Fmoc-L-pArg(Tce)₂-OH (**42**) und Essigsäureanhydrid synthetisiert.

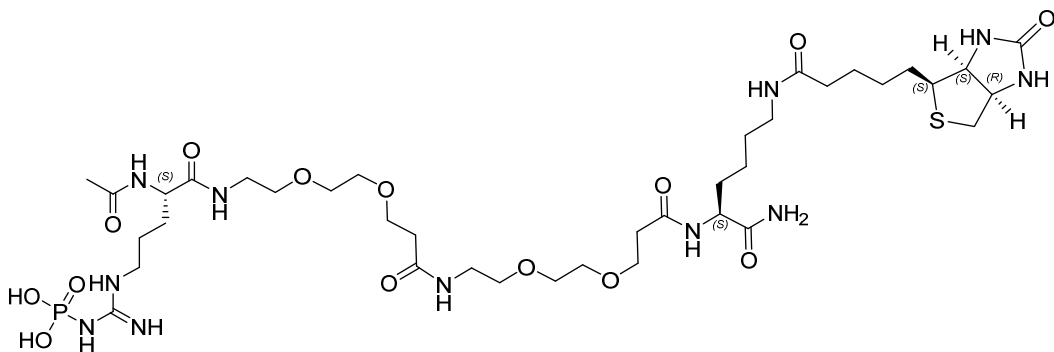
Das geschützte Peptid konnte mit einer Ausbeute von 45 mg (0.042 mmol, 53 %) erhalten werden.

LC-MS (ESI): $t_R = 6.12$ min, m/z 1068.2 berechnet für $C_{35}H_{59}Cl_6N_{10}O_{11}PS$, gefunden: 1071.2 $[M+H]^+$.

Das so erhaltene Peptid wurde anschließend gemäß Abschnitt 5.2.4 entschützt und aufgereinigt. Es konnten 12 mg (0.015 mmol, 36 %) des gewünschten Peptids erhalten werden.

LC-MS (ESI): $t_R = 3.82$ min, m/z 808.4 berechnet für $C_{31}H_{57}N_{10}O_{11}PS$, gefunden: 809.3 $[M+H]^+$.

5.3.2. bacPROTAC_02



100 mg Rink-Amid-Harz (entspricht 0.08 mmol Initialbeladung) wurden mit 142 mg (0.24 mmol) Fmoc-L-Lys(Biotin)-OH gemäß Abschnitt 5.2.1 beladen. Das Tce-geschützte Peptid wurde nach Abschnitt 5.2.2 und 5.2.3 unter Verwendung von Fmoc-L-Lys(Biotin)-OH, Fmoc-AEEP-OH, Fmoc-L-pArg(Tce)₂-OH (**42**) und Essigsäureanhydrid synthetisiert.

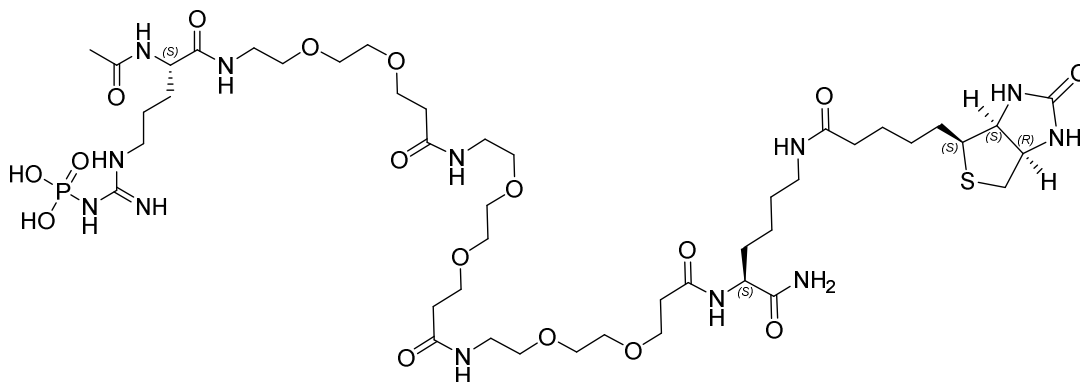
Das geschützte Peptid konnte mit einer Ausbeute von 55 mg (0.046 mmol, 56 %) erhalten werden.

LC-MS (ESI): $t_R = 6.01$ min, m/z 1227.3 berechnet für $C_{42}H_{72}Cl_6N_{11}O_{14}PS$, gefunden: 1230.3 $[M+H]^+$.

Das so erhaltene Peptid wurde anschließend gemäß Abschnitt 5.2.4 entschützt und aufgereinigt. Es wurden 9 mg (0.009 mmol, 20 %) des gewünschten Peptids erhalten.

LC-MS (ESI): $t_R = 3.88$ min, m/z 967.5 berechnet für $C_{38}H_{70}N_{11}O_{14}PS$, gefunden: 968.3 $[M+H]^+$.

5.3.3. bacPROTAC_03



150 mg Rink-Amid-Harz (entspricht 0.12 mmol Initialbeladung) wurden mit 214 mg (0.36 mmol) Fmoc-L-Lys(Biotin)-OH gemäß Abschnitt 5.2.1 beladen. Das Tce-geschützte Peptid wurde nach Abschnitt 5.2.2 und 5.2.3 unter Verwendung von Fmoc-L-Lys(Biotin)-OH, Fmoc-AEEP-OH, Fmoc-L-pArg(Tce)₂-OH (**42**) und Essigsäureanhydrid synthetisiert.

Das geschützte Peptid konnte mit einer Ausbeute von 121 mg (0.087 mmol, 73 %) erhalten werden.

LC-MS (ESI): $t_R = 5.93$ min, m/z 1386.4 berechnet für C₄₉H₈₅Cl₆N₁₂O₁₇PS, gefunden: 1389.4 [M+H]⁺.

66 mg (0.047 mmol) des Peptids wurden anschließend gemäß Abschnitt 5.2.4 entschützt und aufgereinigt. Es wurden 16 mg (0.014 mmol, 26 %) des gewünschten Peptids erhalten.

LC-MS (ESI): $t_R = 3.88$ min, m/z 1126.6 berechnet für C₄₅H₈₃N₁₂O₁₇PS, gefunden: 1127.4 [M+H]⁺.

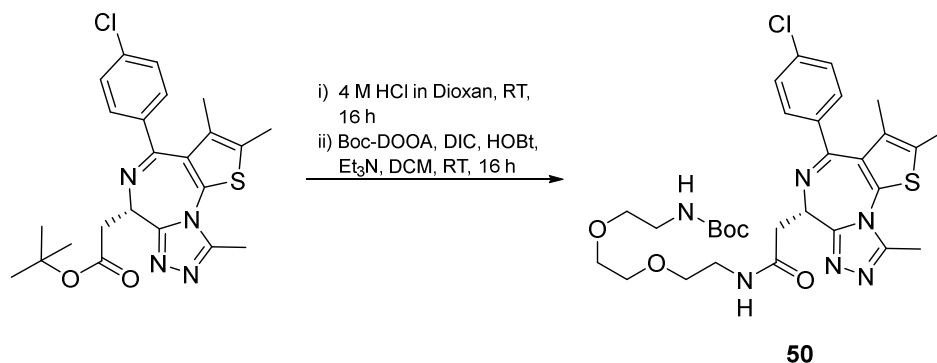
¹H NMR (400 MHz, D₂O): $\delta = 6.02$ -5.97 (m, 1H), 5.82-5.78 (m, 1H), 5.70-5.64 (m, 2H), 5.19 (t, $J = 5.6$ Hz, 6H), 5.06 (s, 12H), 5.03-4.97 (m, 6H), 4.81 (t, $J = 5.1$ Hz, 6H), 4.65-4.56 (m, 4H), 4.40 (dd, $J = 5.0/13.0$ Hz, 1H), 4.16 (t, $J = 12.4$ Hz, 1H), 3.99 (t, $J = 5.9$ Hz, 2H), 3.94 (t, $J = 6.0$ Hz, 4H), 3.65 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.44 (s, 3H), 3.29-3.20 (m, 2H), 3.18-2.90 (m, 10H), 2.87-2.74 (m, 4H), 2.51 (d, $J = 6.6$ Hz, 1H).

5.4. Canavaninhaltige PROTACs

Die Canavanin-enthaltenden bacPROTACs wurden in Lösung synthetisiert.

5.4.1. Cav_bacPROTAC_01

5.4.1.1. Boc-DOOA-(+)-JQ1 (50)



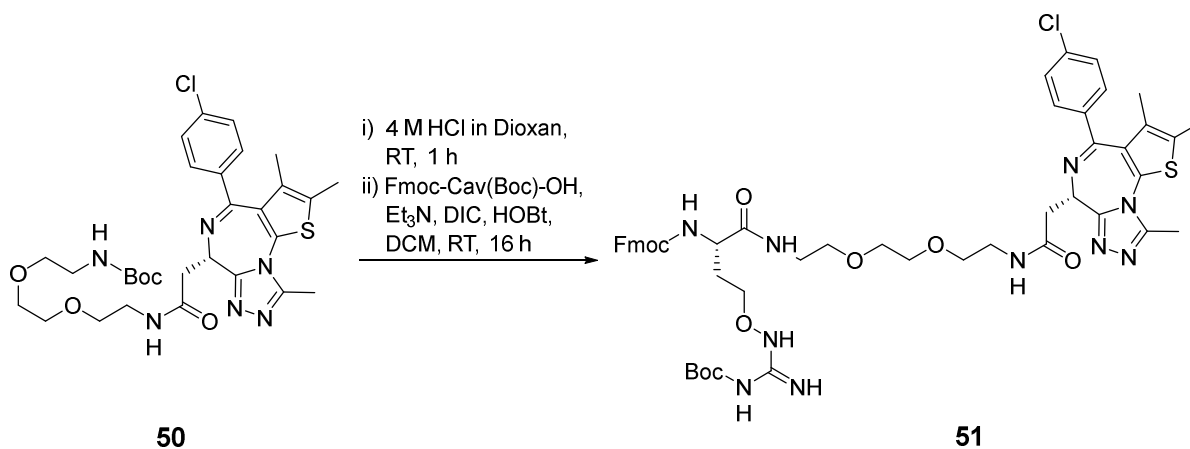
(+)-JQ-1 (200 mg, 0.44 mmol) wurde in 4 M HCl in 1,4-Dioxan (5 mL) gelöst und 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der verbliebene Rückstand in DCM (10 mL) gelöst. Nach Zugabe von Boc-DOOA (164 mg, 0.66 mmol), HOBt Monohydrat (134 mg, 0.88 mmol), DIC (136 µL, 0.88 mmol) und Triethylamin (275 µL, 2 mmol) wurde die resultierende Reaktionslösung 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 %iger NaHCO₃-Lösung (10 mL) gequencht. Die organische Phase wurde abgetrennt, über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Nach Entfernung des Lösemittels wurde das erhaltene Rohprodukt **50** im Hochvakuum getrocknet und ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt.

LC-MS (ESI): $t_R = 8.93$ min, m/z 630.24 berechnet für C₃₀H₃₉ClN₆O₅S, gefunden: 631.10 [M+H]⁺.

5.4.1.2. Fmoc-L-Cav(Boc)-DOOA-(+)-JQ1 (51)



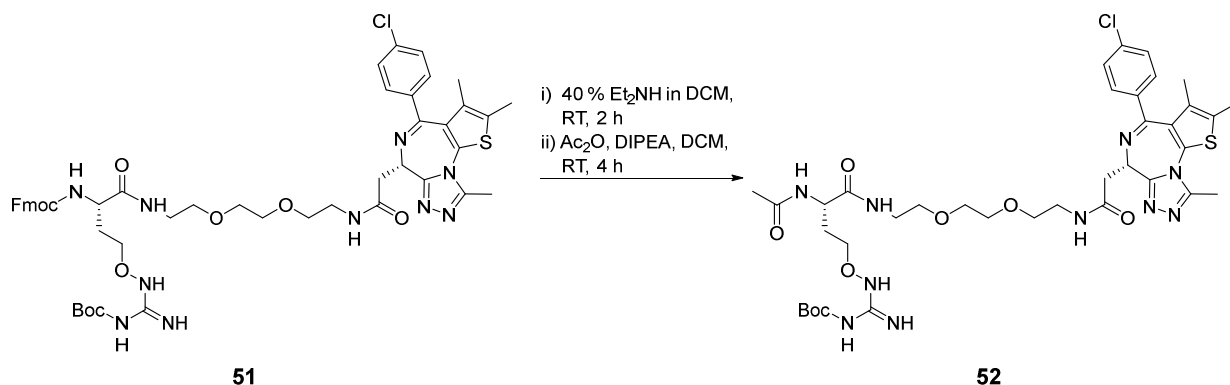
Das Edukt **50** wurde in 4 M HCl in 1,4-Dioxan (5 mL) gelöst und 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt.

Anschließend wurde das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Nachdem der Rückstand in DCM (10 mL) gelöst wurde, wurden Fmoc-L-Cav(Boc)-OH (250 mg, 0.50 mmol), HOBt Monohydrat (134 mg, 0.88 mmol), DIC (136 μ L, 0.88 mmol) und Triethylamin (275 μ L, 2 mmol) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Am Folgetag wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 %iger NaHCO₃-Lösung (10 mL) gequencht, die organische Phase abgetrennt, über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Nach Entfernung des Lösemittels wurde das erhaltene Rohprodukt **51** im Hochvakuum getrocknet und ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt.

LC-MS (ESI): t_R = 9.39 min, m/z 1010.39 berechnet für C₅₀H₅₉ClN₁₀O₉S, gefunden: 1011.18 [M+H]⁺.

5.4.1.3. Acetyl-L-Cav(Boc)-DOOA-(+)-JQ1 (**52**)



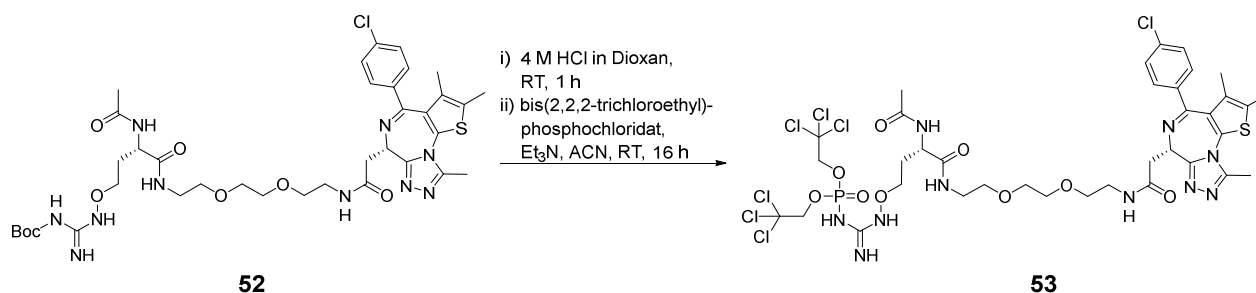
Das Rohprodukt wurde in DCM:Et₂NH (3:2, 10 mL), gelöst und 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung gegen 5 %ige NaHCO₃-Lösung (10 mL) ausgeschüttelt, die organische Phase abgetrennt, über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der verbliebene Rückstand erneut in DCM (5 mL) gelöst. Essigsäureanhydrid (49.9 μ L, 0.53 mmol) und Triethylamin (183 μ L, 1.32 mmol) wurden zugegeben und die erhaltene Reaktionslösung 4 Stunden bei Raumtemperatur gelöst. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand chromatographisch aufgereinigt (C18-RP, 30% → 60 % ACN in Wasser). Das

gewünschte Produkt **52** wurde als weißer Feststoff erhalten (186.6 mg, 0.26 mmol, 59 %, 3 Stufen).

TLC (DCM/MeOH = 9:1): $R_f = 0.3$.

LC-MS (ESI): $t_R = 7.07$ min, m/z 830.3 berechnet für $C_{37}H_{51}ClN_{10}O_8S$, gefunden: 830.9 $[M+H]^+$.

5.4.1.4. Acetyl-L-pCav(Tce)₃-DOOA-(+)-JQ1 (**53**)



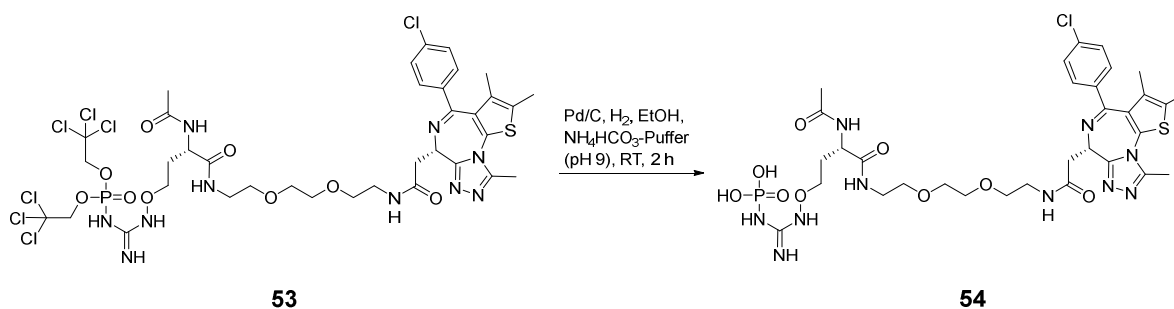
52 (186.6 mg, 0.26 mmol) wurde in 4 M HCl in 1,4-Dioxan (5 mL) gelöst und eine Stunde bei Raumtemperatur gelöst. Anschließend wurde das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt.

Der erhaltene Rückstand wurde in trockenem ACN gelöst. Nach Zugabe von Triethylamin (151.4 μ L, 1.1 mmol) unter Argon wurde Bis(trichloroethyl)phosphoryloxychlorid (42 mg, 0.11 mmol) zugegeben. Nach 90 und 180 Minuten wurde erneut Bis(trichloroethyl)phosphoryloxychlorid zugegeben (jeweils 42 mg). Die Reaktionslösung wurde für 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand im Hochvakuum getrocknet und chromatographisch aufgereinigt (C18-RP, 50 % ACN in Wasser). Das gewünschte Produkt **53** wurde als weißer Feststoff erhalten (87 mg, 0.081 mmol, 31 %).

TLC (DCM/MeOH/Ameisensäure = 9:1:0.05): $R_f = 0.3$.

LC-MS (ESI): $t_R = 9.15$ min, m/z 1070.1 berechnet für $C_{36}H_{46}Cl_7N_{10}O_9PS$, gefunden: 1073.3 $[M+H]^+$.

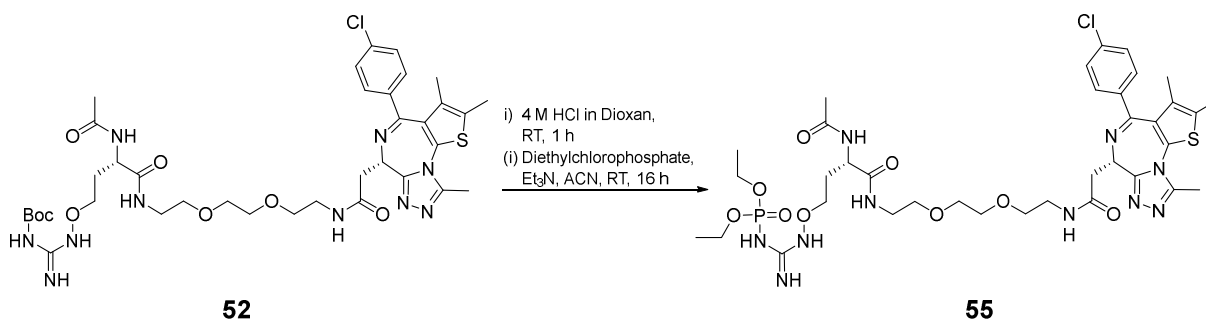
5.4.1.5. Acetyl-L-pCav-DOOA-(+)-JQ1 (*Cav_bacPROTAC_01*) (54)


53 (87 mg, 0.08 mmol) wurde in NH_4HCO_3 -Puffer (100 mM, pH 9, 5 mL) und abs. EtOH (5 mL) gelöst. Nach Zugabe von Pd/C (10 %, 25 mg) wurde für 15 Minuten Argon in das Reaktionsgemisch eingeleitet. Anschließend wurde Wasserstoff eingeleitet und die Suspension für 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Der Katalysator wurde abfiltriert und das Filtrat unter vermindertem Druck bis zur Trockne eingengt. Anschließend wurde der Rückstand mittels RP-HPLC aufgereinigt (Elution mit 0.1 % NH_4OH in ACN:Wasser). *Cav_bacPROTAC_01* (**54**) wurde nach Trocknung im Hochvakuum als weißer Feststoff erhalten (6.2 mg, 0.0076 mmol, 10 %).

LC-MS (ESI): $t_R = 6.36$ min, m/z 810.2 berechnet für $\text{C}_{32}\text{H}_{44}\text{ClN}_{10}\text{O}_9\text{PS}$, gefunden: 810.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

^1H NMR (400 MHz, MeOD: D_2O 1:1): $\delta = 7.45$ (s, 4H), 4.49 (t, $J = 6.7$ Hz, 1H), 3.97 (t, $J = 6.7$ Hz, 1H), 3.72-3.63 (m, 6H), 3.60 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H), 3.53-3.35 (m, 8H), 2.72 (s, 3H), 2.46 (s, 3H), 2.24-2.14 (m, 1H), 2.03 (s, 3H).

5.4.2. *Cav_bacPROTAC_02*
5.4.2.1. Acetyl-L-pCav(OEt)₂-DOOA-(+)-JQ1 (*Cav_bacPROTAC_02*) (55)


Acetyl-L-Cav(Boc)-TOTA-(+)-JQ1 (**52**, 16 mg, 0.019 mmol) wurde in 4 M HCl in 1,4-Dioxan (5 mL) gelöst und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der verbliebene Rückstand unter Argon in Acetonitril (1 mL,

trocken) gelöst. Anschließend erfolgte die Zugabe von Diethylchlorophosphat (0.93 μ L, 0.007 mmol). Nach 90 und 180 Minuten wurde erneut Diethylchlorophosphat zugegeben (jeweils 0.93 μ L). Die resultierende Reaktionslösung wurde 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Am Folgetag wurde das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand chromatographisch aufgereinigt (C18-RP, 30% \rightarrow 50 % ACN in Wasser). Cav_bacPROTAC_02 (**55**) wurde als weißer Feststoff erhalten (10 mg, 0.0115 mmol, 60 %).

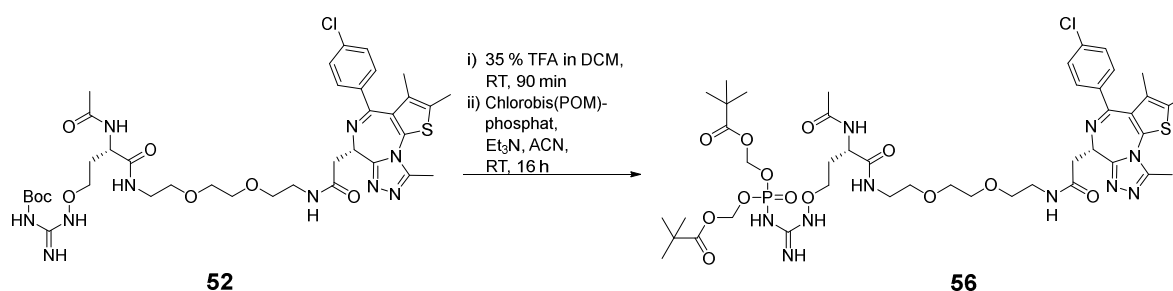
TLC (DCM/MeOH = 9:1): R_f = 0.2.

LC-MS (ESI): t_R = 6.90 min, m/z 866.3 berechnet für $C_{36}H_{52}ClN_{10}O_9S$, gefunden: 867.1 $[M+H]^+$.

1H NMR (400 MHz, MeOD): δ = 7.46 (dd, J = 8.6/20.1 Hz, 4H), 4.65 (q, J = 4.7 Hz, 1H), 4.52 (q, J = 4.6 Hz, 1H), 4.22 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 4.05-3.97 (m, 4H), 3.92-3.87 (m, 2H), 3.78-3.61 (m, 10H), 3.57 (t, J = 5.4 Hz, 2H), 3.49-3.36 (m, 6H), 2.71 (s, 3H), 2.46 (s, 3H), 2.19-2.10 (m, 1H), 2.00 (s, 4H), 1.72 (s, 3H), 1.28 (s, 6H).

5.4.3. Cav_bacPROTAC_03

5.4.3.1. Acetyl-L-pCav(POM)₂-DOOA-(+)-JQ1 (Cav_bacPROTAC_03) (**56**)



Acetyl-L-Cav(Boc)-TOTA-(+)-JQ1 (**52**, 78 mg, 0.094 mmol) wurde in 35 % TFA in DCM (5 mL) gelöst und 90 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösemittel unter reduziertem Druck entfernt und die überschüssige Säure mit Toluol (5 mL) co-evaporiert. Der erhaltene Rückstand wurde in DCM gelöst und gegen 5 %ige NaHCO_3 -Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde abgetrennt, über MgSO_4 getrocknet und filtriert. Nachdem das Lösemittel entfernt worden war, wurde der verbliebene Rückstand ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt.

LC-MS (ESI): t_R = 6.08 min, m/z 730.3 berechnet für $C_{32}H_{43}ClN_{10}O_6S$, gefunden: 731.2 $[M+H]^+$.

Der Rückstand (25 mg, 0.034 mmol) wurde unter Argon in trockenem Acetonitril (1.5 mL) gelöst. Nach Zugabe von DIPEA (46.4 μ L, 0.274 mmol) wurde langsam in trockenem Acetonitril

(600 μ L) gelöstes Chlorobis(POM)phosphat (**47**, 35 mg, 0.103 mmol) zugetropft. Anschließend wurde die Reaktionslösung 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Am Folgetag wurden DCM (5 mL) und 5 %ige NaHCO₃-Lösung (5 mL) zugegeben. Die organische Phase wurde abgetrennt, über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Nach Entfernung des Lösemittels unter vermindertem Druck, wurde der verbliebene Rückstand chromatographisch aufgereinigt (C18-RP, 30% \rightarrow 50 % ACN in Wasser). Cav_bacPROTAC_03 (**56**) wurde als weißer Feststoff erhalten (17 mg, 0.016 mmol, 48 %).

TLC (DCM/MeOH = 9:1): R_f = 0.3.

LC-MS (ESI): t_R = 8.80 min, m/z 1038.4 berechnet für C₄₄H₆₄ClN₁₀O₁₃PS, gefunden: 1039.0 [M+H]⁺.

¹H NMR (400 MHz, MeOD): δ = 7.46 (dd, J = 8.5/20.4 Hz, 4H), 5.62-5.53 (m, 4H), 4.66 (q, J = 4.8 Hz, 1H), 4.53 (q, J = 4.7 Hz, 1H), 3.94-3.87 (m, 2H), 3.69-3.61 (m, 6H), 3.58 (t, J = 5.4 Hz, 2H), 3.50-3.36 (m, 6H), 2.71 (s, 3H), 2.47 (s, 3H), 2.21-2.12 (m, 1H), 2.00 (s, 3H), 1.98-1.90 (m, 1H), 1.72 (s, 3H), 1.40-1.29 (m, 2H), 1.22 (s, 18H).

5.5. Synthese der Cyclomarinderivate

Die Synthese der Cyclamarin-Derivate sowie der Cyclamarin-basierten bacPROTACs, erfolgte als Kombination aus Festphasen- und Lösungssynthese. Dazu wurden die folgenden allgemeinen Vorschriften verwendet.

5.5.1. Allgemeine Synthesevorschrift 1: Harzbeladung

Die erste Fmoc-Aminosäure und DIPEA (2 eq.) wurden in DMF (5 mL) gelöst. Diese Lösung wurde zu 2-Chlorotrytyl-Harz (maximale Beladung 1.6 mmol g⁻¹) gegeben. Die resultierende Suspension wurde für 16 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung entfernt und das Harz mit 2 x DMF, 2 x DCM und 2 x DMF gewaschen. Um verbliebene freie Bindestellen auf dem Harz zu blocken, wurde anschließend eine Mischung aus DCM:MeOH:DIPEA (3:1:0.1, 4 mL) zum Harz gegeben. Die Suspension wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt, bevor die Lösung entfernt und das Harz erneut wie zuvor beschrieben gewaschen wurde.

5.5.2. Allgemeine Synthesevorschrift 2: Festphasensynthese

Die linearen Peptide wurden durch iterative Abfolge der folgenden Schritte dargestellt.

Fmoc-Abspaltung

Eine Lösung aus DMF und Piperidin (3:2, 5 mL) wurde zum Harz gegeben und 20 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach dem Entfernen der Lösung wurde dieser Schritt ein weiteres Mal wiederholt. Anschließend wurde das Harz mit 2 x DMF, 2 x DCM und 2 x DMF gewaschen.

Kupplung der Fmoc-geschützten Aminosäuren

Die jeweilige Aminosäure (3 eq.), HOBt Monohydrat (3 eq.), HBTU (3 eq.) und DIPEA (3 eq.) wurden in DMF (5 mL) gelöst. Die resultierende Lösung wurde zum Harz gegeben und 2 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung entfernt und das Harz mit 2 x DMF, 2 x DCM und 2 x DMF gewaschen.

Kupplung auf N-methylierte Aminosäuren

Die jeweilige zu kuppelnde Aminosäure (3 eq.), 2-Bromo-1-ethyl-pyridinium Tetrafluoroborat (3 eq.) und DIPEA (6 eq.) wurden in DMF (5 mL) gelöst. Die Lösung wurde zum Harz gegeben und 4 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung entfernt und das Harz mit 2 x DMF, 2 x DCM und 2 x DMF gewaschen.

5.5.3. Allgemeine Synthesevorschrift 3: Abspaltung der linearen Peptide vom Harz

Eine Mischung aus DCM und Hexafluoroisopropanol (3:1, 5 mL) wurde zum Harz gegeben. Die resultierende Suspension wurde für 20 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Entfernung der Abspalllösung wurde das Harz dreimal mit DCM (2 mL) gewaschen. Die Waschlösungen wurden mit der Abspalllösung vereint und unter vermindertem Druck bis zur Trockne eingengt. Die so erhaltenen linearen Peptide wurden ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt eingesetzt.

5.5.4. Allgemeine Synthesevorschrift 4: Zyklisierung in Lösung

Um die zyklisierten Peptide zu erhalten, wurden zwei verschiedene Methoden angewandt.

Methode A

Das lineare Peptid wurde in einer finalen Konzentration von 0.75 mM in DCM gelöst. DIPEA (8 eq.) und 50 %iges Propylphosphorsäureanhydrid (4 eq., gelöst in Ethylacetat) wurden zugegeben. Die resultierende Lösung wurde bei Raumtemperatur für eine Stunde gerührt.

Anschließend wurde gesättigte Kochsalzlösung zugegeben. Nachdem die organische Phase abgetrennt, über MgSO_4 getrocknet und filtriert wurde, wurde das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene zyklisierte Peptid wurde ohne weitere Reinigung im nächsten Schritt weiter umgesetzt.

Methode B

Das lineare Peptid wurde in einer finalen Konzentration von 0.75 mM in DCM gelöst. Triethylamin (3 eq.), HOAt (3 eq.) und DIC (3 eq.) wurden zugegeben und die resultierende Lösung wurde 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 %iger NaHCO_3 -Lösung gequencht. Die organische Phase wurde abgetrennt, über MgSO_4 getrocknet und filtriert. Dann wurde das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das so erhaltene Peptid wurde ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt eingesetzt.

5.5.5. Allgemeine Synthesevorschrift 5: Schutzgruppenabspaltung und Reinigung

Zur Abspaltung der Schutzgruppen und der nachfolgenden Aufreinigung wurden 5 verschiedene Methoden angewandt.

Methode A

Das zyklisierte Peptid wurde in TFA:DCM (3:1, 5 mL) gelöst und 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernung des Lösemittels unter vermindertem Druck wurde der verbliebene Rückstand mittels RP-HPLC mit 0.1 % TFA in Wasser und 0.1 % TFA in Acetonitril als Eluenten aufgereinigt. Fraktionen, die das gewünschte Produkt enthielten, wurden vereinigt und lyophilisiert.

Methode B

Das zyklisierte Peptid wurde in trockenem DCM (5 mL) gelöst. Nachdem 2,6-Lutidin (20 eq.) zugegeben worden war, wurde die Lösung auf 0 °C herunter gekühlt. Anschließend wurde TMSOTf (16 eq.) zugegeben. Nach 15 Minuten wurde die Reaktionslösung langsam auf Raumtemperatur erwärmt und weitere 16 Stunden gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von gesättigter Kochsalzlösung (100 mL) gestoppt, die organische Phase wurde abgetrennt, über MgSO_4 getrocknet und filtriert. Nachdem das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt worden war, wurde der verbliebene Rückstand mittels RP-HPLC mit 0.1 % NH_4OH in

Wasser und 0.1 % NH_4OH in Acetonitril als Eluenten aufgereinigt. Fraktionen, die das gewünschte Produkt enthielten, wurden vereinigt und lyophilisiert.

Methode C

Das zyklisierte Peptid wurde in 1 M TBAF in THF (5 mL) gelöst und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 2 Stunden wurden DCM (10 mL) und 5 %ige NaHCO_3 -Lösung (5 mL) zugegeben. Die organische Phase wurde abgetrennt, über MgSO_4 getrocknet und filtriert. Der Rückstand wurde dann erneut in THF (5 mL) gelöst und 25 %ige KOH in MeOH (1 mL) zugegeben. Die erhaltene Reaktionslösung wurde 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt worden war, wurde der Rückstand mittels RP-HPLC mit 0.1 % TFA in Wasser und 0.1 % TFA in Acetonitril als Eluenten aufgereinigt. Fraktionen, die das gewünschte Produkt enthielten, wurden vereinigt und lyophilisiert.

Methode D

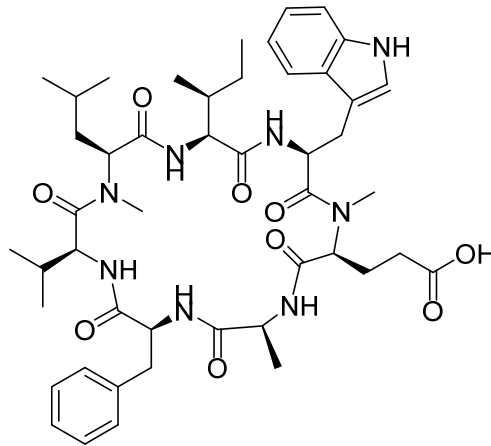
Das zyklisierte Peptid wurde ohne vorherige Abspaltung der Schutzgruppen mittels RP-HPLC mit 0.1 % TFA in Wasser und 0.1 % TFA in Acetonitril als Eluenten aufgereinigt. Fraktionen, die das gewünschte Produkt enthielten, wurden vereinigt und lyophilisiert.

Methode E

Das zyklisierte Peptid wurde in 1,4-Dioxan gelöst. Anschließend erfolgte die Zugabe von NaBH_4 und ein bis zwei Tropfen Wasser. Die erhaltene Reaktionslösung wurde für 10 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem das Gemisch mit DCM verdünnt und gegen gesättigte NaCl-Lösung ausgeschüttelt wurde, wurde die organische Phase separiert, über MgSO_4 getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in 4 M HCl in 1,4-Dioxan gelöst und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt, bevor das Lösemittel erneut entfernt wurde. Der erhaltene Rückstand wurde mittels RP-HPLC mit 0.1 % TFA in Wasser und 0.1 % TFA in Acetonitril als Eluenten aufgereinigt. Fraktionen, die das gewünschte Produkt enthielten, wurden vereinigt und lyophilisiert.

5.6. Cyclomarinderivate und Cym_bacPROTACs

5.6.1. Cym_1



250 mg 2-Chlorotritylharz (entspricht 0.40 mmol Initialbeladung) wurden mit 171 mg (0.44 mmol) Fmoc-L-Phe-OH gemäß Abschnitt 5.5.1 beladen. Das lineare Peptid wurde nach den Abschnitten 5.5.2 und 5.5.3 unter Verwendung von Fmoc-L-Ala-OH, Fmoc-N-Me-L-Glu(tBu)-OH, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-N-Me-L-Leu-OH und Fmoc-L-Val-OH synthetisiert.

Das lineare Peptid konnte mit einer Ausbeute von 340 mg (0.320 mmol, 80 %) erhalten werden.

LC-MS (ESI): $t_R = 7.79$ min, m/z 1060.6 berechnet für $C_{56}H_{84}N_8O_{12}$, gefunden: 1061.2 $[M+H]^+$.

197 mg (0.185 mmol) dieses Peptids wurden anschließend gemäß Methode A aus Abschnitt 5.5.4 zyklisiert. Es wurden 99 mg (0.095 mmol, 52 %) des zyklisierten Peptids erhalten.

LC-MS (ESI): $t_R = 12.55$ min, m/z 1042.6 berechnet für $C_{56}H_{82}N_8O_{11}$, gefunden: 1043.2 $[M+H]^+$.

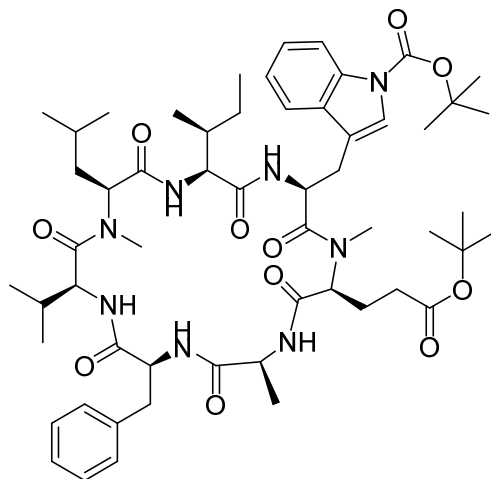
45 mg (0.043 mmol) hiervon wurden entschützt und aufgereinigt. Dazu wurde Methode A aus Abschnitt 5.5.5 befolgt. Es wurden 11.5 mg (0.013 mmol, 29 %) des gewünschten Produkts erhalten.

LC-MS (ESI): $t_R = 8.29$ min, m/z 886.5 berechnet für $C_{47}H_{66}N_8O_9$, gefunden: 887.1 $[M+H]^+$.

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 10.91$ (s, 1H), 8.78 (s, 1H), 8.46 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.51 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.35 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H), 7.25-7.15 (m, 4H), 7.13-7.05 (m, 2H), 7.04-6.98 (m, 3H), 6.58 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H), 5.06 (q, $J = 5.1$ Hz, 1H), 4.97 (q, $J = 5.1$ Hz, 1H), 4.74-4.68 (m, 1H), 4.62 (q, $J = 6.1$ Hz, 1H), 4.31-4.21 (m, 2H), 4.14 (t, $J = 8.5$ Hz, 1H), 3.06 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 2.86-2.82

(m, 2H), 2.61 (s, 3H), 2.42 (s, 3H), 2.00-1.90 (m, 1H), 1.86-1.63 (m, 3H), 1.61-1.51 (m, 2H), 1.48-1.29 (m, 4H), 1.16 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H), 1.04-0.95 (m, 1H), 0.89 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 0.82-0.69 (m, 16H).

5.6.2. Cym_2



250 mg 2-Chlorotritylharz (entspricht 0.40 mmol Initialbeladung) wurden mit 171 mg (0.44 mmol) Fmoc-L-Phe-OH gemäß Abschnitt 5.5.1 beladen. Das lineare Peptid wurde nach den Abschnitten 5.5.2 und 5.5.3 unter Verwendung von Fmoc-L-Ala-OH, Fmoc-N-Me-L-Glu(tBu)-OH, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-N-Me-L-Leu-OH und Fmoc-L-Val-OH synthetisiert.

Das lineare Peptid konnte mit einer Ausbeute von 340 mg (0.320 mmol, 80 %) erhalten werden.

LC-MS (ESI): $t_R = 7.79$ min, m/z 1060.6 berechnet für $C_{56}H_{84}N_8O_{12}$, gefunden: 1061.2 $[M+H]^+$.

140 mg (0.130 mmol) dieses Peptids wurden anschließend gemäß Methode A aus Abschnitt 5.5.4 zyklisiert. Es wurden 72 mg (0.070 mmol, 54 %) des zyklisierten Peptids erhalten.

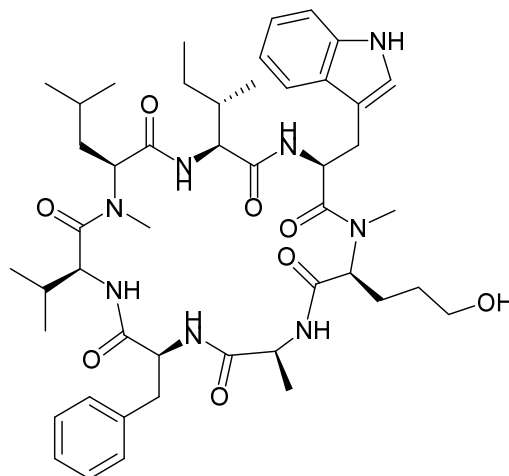
Dieses Peptid wurde anschließend ohne Abspaltung der Schutzgruppen gemäß Methode D aus Abschnitt 5.5.5 aufgereinigt. 53 mg (0.510 mmol, 39 %) des gewünschten Produkts konnten dabei erhalten werden.

LC-MS (ESI): $t_R = 12.56$ min, m/z 1042.6 berechnet für $C_{56}H_{82}N_8O_{11}$, gefunden: 1043.6 $[M+H]^+$.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 8.58$ (d, $J = 10.4$ Hz, 1H), 8.17 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 7.92 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.82 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H), 7.69 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.26 (d, $J = 4.2$ Hz, 1H),

7.19-7.10 (m, 10H), 6.83 (d, $J = 5.9$ Hz, 1H), 5.20-5.13 (m, 1H), 4.62-4.51 (m, 3H), 4.43-4.37 (m, 2H), 4.06 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H), 3.27-3.19 (m, 2H), 3.12-3.07 (m, 2H), 2.97-2.89 (m, 1H), 2.64 (s, 3H), 2.58 (s, 3H), 2.52-2.49 (m, 1H), 2.09-2.00 (m, 1H), 1.89-1.78 (m, 4H), 1.66-1.59 (m, 1H), 1.54 (s, 1H), 1.22 (s, 12H), 1.16 (t, $J = 6.1$ Hz, 5H), 0.88 (d, $J = 6.8$ Hz, 4H), 0.83 (t, $J = 7.8$ Hz, 8H), 0.78 (d, $J = 6.3$ Hz, 9H).

5.6.3. Cym_3



125 mg 2-Chlorotriethylharz (entspricht 0.20 mmol Initialbeladung) wurden mit 171 mg (0.44 mmol) Fmoc-L-Phe-OH gemäß Abschnitt 5.5.1 beladen. Das lineare Peptid wurde nach den Abschnitten 5.5.2 und 5.5.3 unter Verwendung von Fmoc-L-Ala-OH, Fmoc-*N*-Me-L-Nva(TBDMS)-OH, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-*N*-Me-L-Leu-OH und Fmoc-L-Val-OH synthetisiert.

Das lineare Peptid konnte mit einer Ausbeute von 85 mg (0.077 mmol, 39 %) erhalten werden.

LC-MS (ESI): $t_R = 8.71$ min, m/z 1105.5 berechnet für C₅₈H₉₂N₈O₁₁Si, gefunden: 1105.2 [M+H]⁺.

20 mg (0.018 mmol) dieses Peptids wurden anschließend gemäß Methode A aus Abschnitt 5.5.4 zyklisiert. Es wurden 19 mg (0.017 mmol, 94 %) des zyklisierten Peptids erhalten.

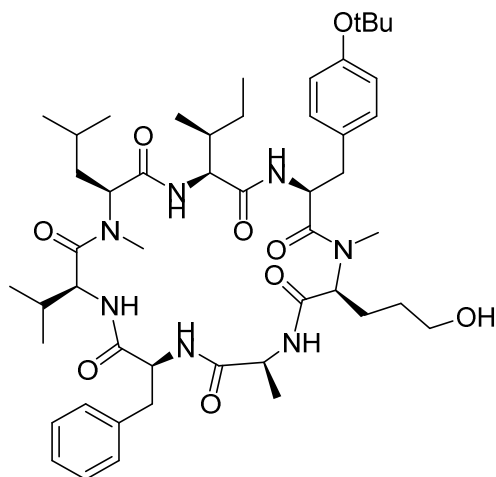
Dieses Peptid wurde anschließend gemäß Methode C aus Abschnitt 5.5.5 entschützt und aufgereinigt. Es wurden 6 mg (0.006 mmol, 35 %) des gewünschten Produkts erhalten.

LC-MS (ESI): $t_R = 8.68$ min, m/z 873.1 berechnet für C₄₇H₆₈N₈O₈, gefunden: 873.1 [M+H]⁺.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 10.64$ (s, 1H), 8.56 (s, 1H), 8.23 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.25 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.14-7.09 (m, 2H), 6.99-6.90 (m, 5H), 6.89-6.81 (m, 3H), 6.80-6.74 (m, 3H), 6.37

(d, $J = 9.4$ Hz, 1H), 4.83 (q, $J = 5.1$ Hz, 1H), 4.62 (q, $J = 5.2$ Hz, 1H), 4.51-4.46 (m, 1H), 4.39 (q, $J = 6.5$ Hz, 1H), 4.06-3.98 (m, 3H), 3.92 (t, $J = 8.6$ Hz, 1H), 2.97-2.92 (m, 1H), 2.90-2.85 (m, 1H), 2.83-2.77 (m, 2H), 2.61-2.55 (m, 2H), 2.47 (s, 3H), 2.17 (s, 3H), 1.63-1.49 (m, 2H), 1.39-1.22 (m, 3H), 1.16-1.07 (m, 3H), 0.91 (d, $J = 7.2$ Hz, 4H), 0.62-0.47 (m, 18H).

5.6.4. Cym_4



250 mg 2-Chlorotritylharz (entspricht 0.40 mmol Initialbeladung) wurden mit 171 mg (0.44 mmol) Fmoc-L-Phe-OH gemäß Abschnitt 5.5.1 beladen.

Das lineare Peptid wurde gemäß den Abschnitten 5.5.2 und 5.5.3 unter Verwendung von Fmoc-L-Ala-OH, Fmoc-N-Me-L-Glu(*t*Bu)-OH, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-N-Me-L-Leu-OH und Fmoc-L-Val-OH synthetisiert.

Das lineare Peptid konnte mit einer Ausbeute von 171 mg (0.172 mmol, 43 %) erhalten werden.

LC-MS (ESI): $t_R = 7.30$ min, m/z 993.6 berechnet für $C_{53}H_{83}N_7O_{11}$, gefunden: 994.4 $[M+H]^+$.

100 mg (0.1 mmol) des linearen Peptids wurden anschließend nach Methode A aus Abschnitt 5.5.4 zyklisiert. Es wurden 78.8 mg (0.0807 mmol, 81 %) des zyklisierten Rohpeptids erhalten.

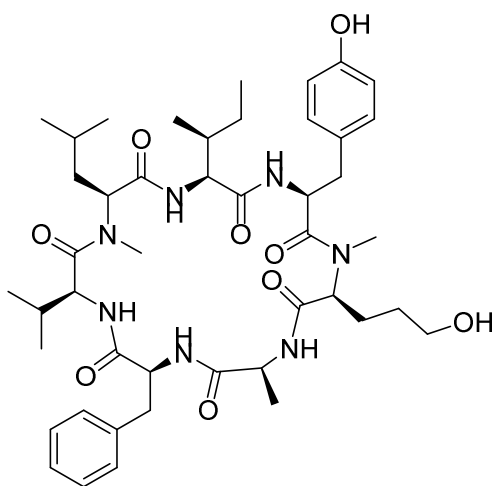
LC-MS (ESI): $t_R = 11.68$ min, m/z 975.6 berechnet für $C_{53}H_{81}N_7O_{10}$, gefunden: 976.3 $[M+H]^+$.

Das zyklisierte Rohprodukt wurde in 1,4-Dioxan gelöst und unter Verzicht auf die Behandlung mit 4 M HCl in 1,1-Dioxan gemäß Methode E aus Abschnitt 5.5.5 aufgereinigt. Es wurden 15 mg (0.017 mmol, 17 %) des gewünschten Produkts erhalten.

LC-MS (ESI): $t_R = 7.68$ min, m/z 905.6 berechnet für $C_{49}H_{75}N_7O_9$, gefunden: 906.2 $[M+H]^+$.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 8.29 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 8.21 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 8.01 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.71 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.43 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 7.27-7.16 (m, 6H), 7.09 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.97 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.83 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.62 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 5.10 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 4.60-4.50 (m, 2H), 4.30 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 4.05 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.93-3.85 (m, 1H), 3.33-3.28 (m, 2H), 3.26-3.20 (m, 1H), 2.94 (s, 4H), 2.85 (dd, *J* = 4.9/14.3 Hz, 1H), 2.73 (q, *J* = 8.0 Hz, 2H), 2.54 (s, 2H), 2.22-2.06 (m, 3H), 2.04-1.97 (m, 1H), 1.77-1.70 (m, 1H), 1.63-1.56 (m, 1H), 1.53-1.45 (m, 2H), 1.39-1.30 (m, 2H), 1.25 (s, 9H), 1.18 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 0.90-0.84 (m, 10H), 0.82 (d, *J* = 6.4 Hz, 4H).

5.6.5. Cym_5

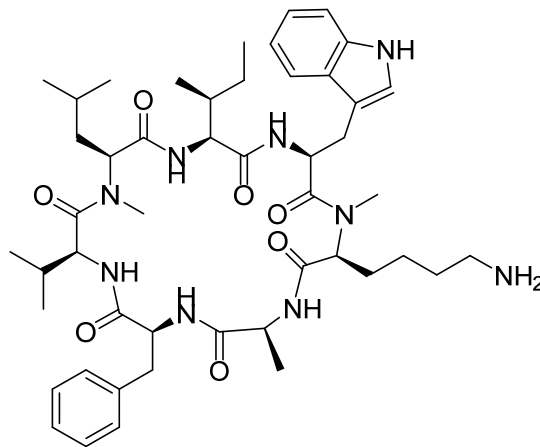


10 mg (0.011 mmol) Cym_4 wurden in 4 M HCl in 1,4-Dioxan (3 mL) gelöst. Nach einer Stunde Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und der verbliebene Rückstand mittels HPLC gemäß Methode E aus Abschnitt 5.5.5 aufgereinigt. Es wurden 9 mg (0.099 mmol, 90 %) des gewünschten Produkts erhalten.

LC-MS (ESI): *t_R* = 6.34 min, *m/z* 849.5 berechnet für C₄₅H₆₇N₇O₉, gefunden: 850.1 [M+H]⁺.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 9.16 (s, 1H), 8.40-8.25 (m, 2H), 8.14-8.02 (m, 2H), 7.78-7.70 (m, 1H), 7.49 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.32-7.19 (m, 6H), 7.08 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.02 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 6.73 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.68 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 5.16 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.71 (s, 1H), 4.64-4.57 (m, 1H), 4.35 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 4.15-4.07 (m, 2H), 3.95-3.85 (m, 1H), 3.65 (s, 3H), 3.30-3.24 (m, 1H), 3.06-2.96 (m, 4H), 2.83-2.74 (m, 2H), 2.62 (s, 3H), 2.26-2.14 (m, 3H), 2.09-2.02 (m, 1H), 1.82-1.75 (m, 1H), 1.72-1.63 (m, 1H), 1.60-1.51 (m, 2H), 1.43-1.35 (m, 2H), 1.22 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H), 0.95-0.91 (m, 10H), 0.88 (t, *J* = 5.7 Hz, 4H).

5.6.6. Cym_6



150 mg 2-Chlorotrylharz (entspricht 0.24 mmol Initialbeladung) wurden mit 171 mg (0.44 mmol) Fmoc-L-Phe-OH gemäß Abschnitt 5.5.1 beladen.

Das lineare Peptid wurde gemäß den Abschnitten 5.5.2 und 5.5.3 unter Verwendung von Fmoc-L-Ala-OH, Fmoc-N-Me-L-Lys(Boc)-OH, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-N-Me-L-Leu-OH und Fmoc-L-Val-OH synthetisiert.

Das lineare Peptid konnte mit einer Ausbeute von 191 mg (0.173 mmol, 72 %) erhalten werden.

LC-MS (ESI): $t_R = 7.67$ min, m/z 1103.7 berechnet für $C_{58}H_{89}N_9O_{12}$, gefunden: 1104.5 $[M+H]^+$.

Das lineare Peptid wurden anschließend nach Methode A aus Abschnitt 5.5.4 zyklisiert. Es wurden 142 mg (0.131 mmol, 75 %) des zyklisierten Rohpeptids erhalten.

LC-MS (ESI): $t_R = 12.20$ min, m/z 1085.6 berechnet für $C_{58}H_{87}N_9O_{11}$, gefunden: 1086.2 $[M+H]^+$.

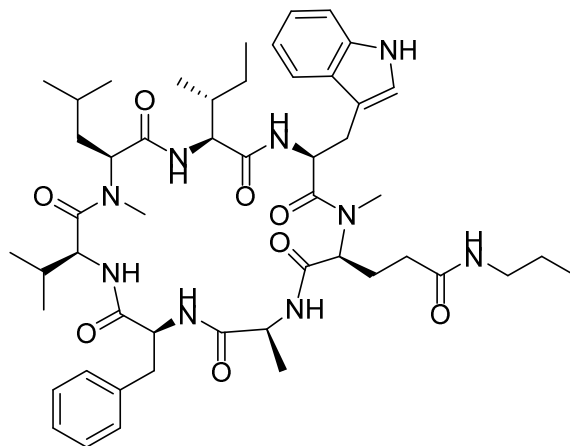
Von diesem Peptid wurden 50 mg (0.046 mmol) gemäß Methode A aus Abschnitt 5.5.5 entschützt und aufgereinigt. Dabei wurden 17 mg (0.019 mmol, 41 %) des gewünschten Produkts erhalten.

LC-MS (ESI): $t_R = 6.63$ min, m/z 885.6 berechnet für $C_{48}H_{71}N_9O_7$, gefunden: 886.5 $[M+H]^+$.

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 10.93$ (s, 1H), 9.19 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H), 9.14 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H), 8.39 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 8.14 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.63 (s, 3H), 7.46 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.39 (q, $J = 6.9$ Hz, 2H), 7.31-7.22 (m, 1H), 7.20-7.04 (m, 7H), 6.98 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 5.05 (d, $J = 10.6$ Hz, 1H), 4.88 (q, $J = 6.6$ Hz, 1H), 4.66 (q, $J = 6.3$ Hz, 1H), 4.42 (t, $J = 8.3$ Hz, 1H), 4.30 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 4.10 (t, $J = 7.8$ Hz, 3H), 3.14-3.08 (m, 3H), 3.03-2.96 (m, 1H), 2.67 (s, 3H), 2.58-2.53 (m,

1H), 2.45 (s, 3H), 2.24-2.15 (m, 2H), 1.53-1.42 (m, 1H), 1.39-1.29 (m, 3H), 1.18-1.03 (m, 4H), 1.00 (t, $J = 6.2$ Hz, 6H), 0.93 (t, $J = 5.5$ Hz, 7H), 0.85 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 0.79 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H), 0.70 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H).

5.6.7. Cym_7



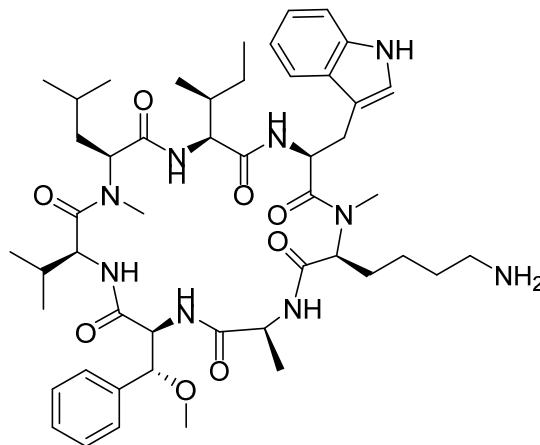
40 mg (0.045 mmol) Cym_1 wurden DCM (5 mL) gelöst. Dann wurden nacheinander DIPEA (15.3 μ L, 0.09 mmol), HOBT Monohydrat (13.8 mg, 0.09 mmol), EDC Hydrochlorid (17.2 mg, 0.09 mmol) und Propylamin (7.4 μ L, 0.09 mmol) zugegeben. Die erhaltene Reaktionslösung wurde 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 %iger NaHCO_3 -Lösung gequenchet. Die organische Phase wurde abgetrennt, über MgSO_4 getrocknet und filtriert. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 39 mg (0.042 mmol, 93 %) des Rohprodukts erhalten.

LC-MS (ESI): $t_R = 9.04$ min, m/z 927.6 berechnet für $\text{C}_{50}\text{H}_{73}\text{N}_9\text{O}_8$, gefunden: 928.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Das Rohprodukt wurde gemäß Methode D aus Abschnitt 5.5.5 aufgereinigt. Dabei wurden 19 mg (0.02 mmol, 44 %) des gewünschten Produkts erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 10.90$ (s, 1H), 8.72 (s, 1H), 8.45 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.50 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.44 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H), 7.36 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 7.28 (s, 1H), 7.18 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H), 7.14-6.99 (m, 6H), 6.56 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H), 5.04 (q, $J = 5.3$ Hz, 1H), 4.94 (q, $J = 5.1$ Hz, 1H), 4.75-4.69 (m, 1H), 4.63 (q, $J = 6.1$ Hz, 1H), 4.30-4.20 (m, 2H), 4.12 (t, $J = 8.4$ Hz, 1H), 3.07-2.95 (m, 4H), 2.87-2.82 (m, 2H), 2.55 (s, 3H), 2.00-1.90 (m, 1H), 1.87-1.79 (m, 1H), 1.76-1.67 (m, 1H), 1.61-1.51 (m, 3H), 1.46-1.28 (m, 7H), 1.15 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.04-0.95 (m, 1H), 0.86 (q, $J = 7.4$ Hz, 7H), 0.79 (q, $J = 6.1$ Hz, 10H), 0.71 (q, $J = 6.0$ Hz, 6H).

5.6.8. Cym_8



150 mg 2-Chlorotriethylharz (entspricht 0.24 mmol Initialbeladung) wurden mit 209 mg (0.50 mmol) Fmoc-L-Phe(3*R*-MeO)-OH (**9**) gemäß Abschnitt 5.5.1 beladen.

Das lineare Peptid wurde gemäß den Abschnitten 5.5.2 und 5.5.3 unter Verwendung von Fmoc-L-Ala-OH, Fmoc-*N*-Me-L-Lys(Boc)-OH, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-*N*-Me-L-Leu-OH und Fmoc-L-Val-OH synthetisiert.

Das lineare Peptid konnte mit einer Ausbeute von 156 mg (0.138 mmol, 58 %) erhalten werden.

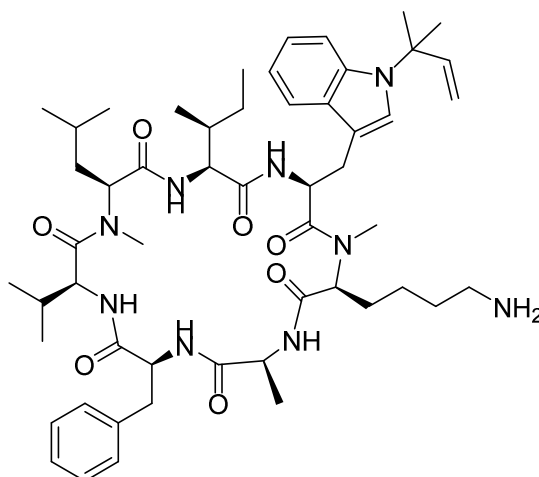
Dieses Peptid wurden anschließend nach Methode A aus Abschnitt 5.5.4 zyklisiert. Es wurden 135 mg (0.121 mmol, 88 %) des zyklisierten Rohpeptids erhalten.

Von diesem Peptid wurden 52 mg (0.047 mmol) gemäß Methode A aus Abschnitt 5.5.5 entschützt und aufgereinigt. Dabei wurden 7 mg (0.008 mmol, 17 %) des gewünschten Produkts erhalten.

LC-MS (ESI): $t_R = 7.78$ min, m/z 915.6 berechnet für $C_{49}H_{73}N_9O_8$, gefunden: 916.4 $[M+H]^+$.

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 10.92$ (s, 1H), 9.45 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H), 9.15 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 8.61 (d, $J = 10.3$ Hz, 1H), 8.10 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H), 7.56 (s, 3H), 7.47 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.38 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.29 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.24-7.18 (m, 4H), 7.09 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 6.99 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H), 5.16 (d, $J = 12.1$ Hz, 1H), 4.84-4.80 (m, 1H), 4.48-4.37 (m, 2H), 4.25 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 4.17-4.12 (m, 3H), 3.20-3.06 (m, 3H), 3.00 (s, 3H), 2.71 (s, 3H), 2.59-2.53 (m, 1H), 2.36 (s, 3H), 2.31-2.22 (m, 2H), 1.88-1.80 (m, 1H), 1.55-1.36 (m, 3H), 1.18-1.07 (m, 3H), 1.04 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H), 0.96-0.82 (m, 17H), 0.77 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H).

5.6.9. Cym_9



150 mg 2-Chlorotriethylharz (entspricht 0.24 mmol Initialbeladung) wurden mit 155 mg (0.40 mmol) Fmoc-L-Phe-OH gemäß Abschnitt 5.5.1 beladen.

Das lineare Peptid wurde gemäß den Abschnitten 5.5.2 und 5.5.3 unter Verwendung von Fmoc-L-Ala-OH, Fmoc-N-Me-L-Lys(Boc)-OH, Fmoc-L-N'-tert-prenyl-Tryptophan (**12**), Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-N-Me-L-Leu-OH und Fmoc-L-Val-OH synthetisiert.

Das lineare Peptid konnte mit einer Ausbeute von 48 mg (0.048 mmol, 20 %) erhalten werden.

LC-MS (ESI): $t_R = 8.22$ min, m/z 1071.7 berechnet für $C_{58}H_{89}N_9O_{10}$, gefunden: 1072.3 $[M+H]^+$.

Das lineare Peptid wurden anschließend nach Methode A aus Abschnitt 5.5.4 zyklisiert. Es wurden 81 mg (0.131 mmol, 75 %) des zyklisierten Rohpeptids erhalten.

LC-MS (ESI): $t_R = 12.06$ min, m/z 1053.7 berechnet für $C_{58}H_{87}N_9O_9$, gefunden: 1076.7 $[M+Na]^+$.

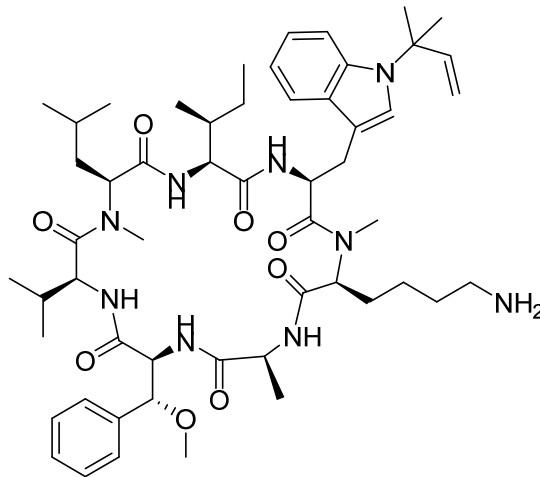
Von diesem Peptid wurden 49 mg (0.047 mmol) gemäß Methode B aus Abschnitt 5.5.5 entschützt und aufgereinigt. Dabei wurden 5 mg (0.005 mmol, 11 %) des gewünschten Produkts erhalten.

LC-MS (ESI): $t_R = 7.73$ min, m/z 953.6 berechnet für $C_{53}H_{79}N_9O_7$, gefunden: 954.4 $[M+H]^+$.

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 9.23$ (s, 1H), 8.40 (q, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.71-7.47 (m, 7H), 7.40 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.37-7.05 (m, 10H), 6.15 (q, $J = 9.5$ Hz, 1H), 5.30 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H), 5.23 (s, 1H), 5.05 (d, $J = 10.3$ Hz, 1H), 4.93 (q, $J = 6.6$ Hz, 1H), 4.71 (q, $J = 6.2$ Hz, 1H), 4.50 (t, $J = 8.8$ Hz, 1H), 4.41-4.33 (m, 1H), 4.27-4.18 (m, 1H), 3.26-2.98 (m, 5H), 2.85-2.79 (m, 1H), 2.75 (s, 3H), 2.31-2.22 (m, 1H), 1.75 (s, 6H), 1.60-1.49 (2H), 1.45-1.33 (m, 2H), 1.08 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 1.04

(d, $J = 7.1$ Hz, 3H), 0.99 (t, $J = 5.5$ Hz, 5H), 0.94 (d, $J = 6.6$ Hz, 4H), 0.83 (t, $J = 7.1$ Hz, 4H), 0.76 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H).

5.6.10. Cym_10



150 mg 2-Chlorotritylharz (entspricht 0.24 mmol Initialbeladung) wurden mit 140 mg (0.33 mmol) Fmoc-L-Phe(3*R*-MeO)-OH (**9**) gemäß Abschnitt 5.5.1 beladen.

Das lineare Peptid wurde gemäß den Abschnitten 5.5.2 und 5.5.3 unter Verwendung von Fmoc-L-Ala-OH, Fmoc-*N*-Me-L-Lys(Boc)-OH, Fmoc-L-*N'*-*tert*-prenyl-Tryptophan (**12**), Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-*N*-Me-L-Leu-OH und Fmoc-L-Val-OH synthetisiert.

Das lineare Peptid konnte mit einer Ausbeute von 129 mg (0.120 mmol, 50 %) erhalten werden.

LC-MS (ESI): $t_R = 9.23$ min, m/z 1101.7 berechnet für $C_{59}H_{91}N_9O_{11}$, gefunden: 1102.3 $[M+H]^+$.

Das lineare Peptid wurden anschließend nach Methode B aus Abschnitt 5.5.4 zyklisiert. Es wurden 93 mg (0.079 mmol, 65 %) des zyklisierten Rohpeptids erhalten.

LC-MS (ESI): $t_R = 12.39$ min, m/z 1083.7 berechnet für $C_{59}H_{89}N_9O_{10}$, gefunden: 1184.1 $[M+Na]^+$.

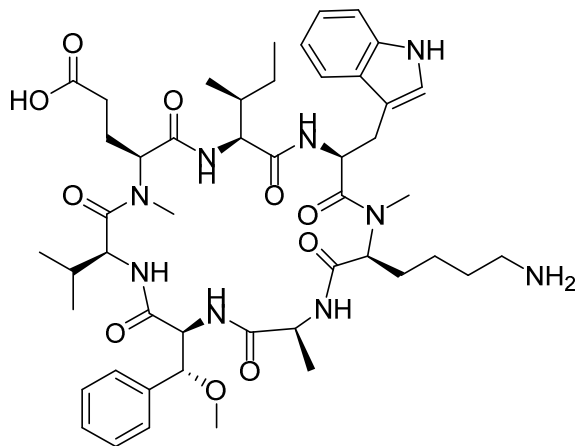
Das so erhaltene Peptid wurde gemäß Methode B aus Abschnitt 5.5.5 entschützt und aufgereinigt. Dabei wurden 9.7 mg (0.010 mmol, 12 %) des gewünschten Produkts erhalten.

LC-MS (ESI): $t_R = 8.97$ min, m/z 983.6 berechnet für $C_{54}H_{81}N_9O_8$, gefunden: 984.5 $[M+H]^+$.

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 9.50$ (s, 1H), 9.21 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 8.67 (d, $J = 10.4$ Hz, 1H), 8.29 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.64 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.58 (d, $J = 7.8$ Hz, 4H), 7.46-7.28 (m, 8H), 7.20-7.09 (m, 2H), 6.22-6.11 (m, 1H), 5.35-5.18 (m, 3H), 5.01-4.90 (m, 3H), 4.59 (t, $J = 9.3$ Hz, 1H),

4.52-4.43 (m, 2H), 4.26 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H), 3.28-3.16 (m, 3H), 3.11 (s, 3H), 2.80 (s, 3H), 2.42-2.30 (m, 2H), 1.96-1.86 (m, 1H), 1.77 (s, 6H), 1.64-1.51 (m, 4H), 1.30-1.17 (m, 3H), 1.14 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H), 1.04 (t, $J = 7.3$ Hz, 6H), 0.99-0.93 (m, 10H), 0.87 (d, $J = 6.8$ Hz, 4H).

5.6.11. Cym_11



150 mg 2-Chlorotritylharz (entspricht 0.24 mmol Initialbeladung) wurden mit 125 mg (0.30 mmol) Fmoc-L-Phe(3*R*-MeO)-OH (**9**) gemäß Abschnitt 5.5.1 beladen.

Das lineare Peptid wurde gemäß den Abschnitten 5.5.2 und 5.5.3 unter Verwendung von Fmoc-L-Ala-OH, Fmoc-*N*-Me-L-Lys(Boc)-OH, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-*N*-Me-L-Glu(*O**t*Bu)-OH und Fmoc-L-Val-OH synthetisiert.

Das lineare Peptid konnte mit einer Ausbeute von 156 mg (0.129 mmol, 46 %) erhalten werden.

LC-MS (ESI): $t_R = 8.62$ min, m/z 1205.7 berechnet für $C_{62}H_{95}N_9O_{15}$, gefunden: 1206.2 $[M+H]^+$.

Das lineare Peptid wurden anschließend nach Methode A aus Abschnitt 5.5.4 zyklisiert. Es wurden 80 mg (0.067 mmol, 52 %) des zyklisierten Rohpeptids erhalten.

LC-MS (ESI): $t_R = 12.74$ min, m/z 1187.6 berechnet für $C_{62}H_{93}N_9O_{14}$, gefunden: 1188.1 $[M+H]^+$.

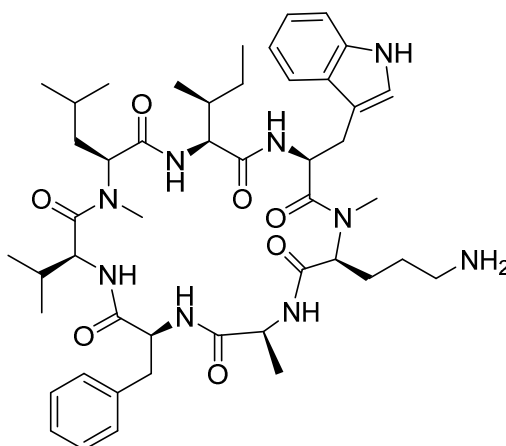
Das zyklisierte Peptid anschließend gemäß Methode A aus Abschnitt 5.5.5 entschützt und aufgereinigt. Dabei wurden 13.2 mg (0.014 mmol, 21 %) des gewünschten Produkts erhalten.

LC-MS (ESI): $t_R = 6.78$ min, m/z 931.5 berechnet für $C_{48}H_{69}N_9O_{10}$, gefunden: 932.3 $[M+H]^+$.

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 10.89$ (s, 1H), 9.47 (d, $J = 4.1$ Hz, 1H), 9.02 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 8.56 (d, $J = 10.3$ Hz, 1H), 8.24 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.58 (s, 3H), 7.46 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.39 (q, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.28 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.24-7.18 (m, 4H), 7.08 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 6.98 (t, $J =$

7.5 Hz, 1H), 5.27-5.22 (m, 1H), 4.89-4.76 (m, 4H), 4.62 (t, $J = 8.7$ Hz, 1H), 4.51 (t, $J = 9.6$ Hz, 1H), 4.22 (d, $J = 10.2$ Hz, 1H), 4.17-4.10 (m, 1H), 3.16-3.08 (m, 2H), 3.02 (s, 3H), 2.71 (s, 3H), 2.45-2.37 (m, 1H), 2.30 (s, 4H), 2.26-2.17 (m, 2H), 1.85-1.67 (m, 2H), 1.61-1.42 (m, 3H), 1.34-1.23 (m, 1H), 1.17-1.09 (m, 1H), 1.05 (d, $J = 6.4$ Hz, 4H), 0.93 (d, $J = 6.7$ Hz, 4H), 0.85 (t, $J = 5.4$ Hz, 6H), 0.79 (d, $J = 6.7$ Hz, 4H).

5.6.12. Cym_12



150 mg 2-Chlorotritylharz (entspricht 0.24 mmol Initialbeladung) wurden mit 155 mg (0.40 mmol) Fmoc-L-Phe-OH gemäß Abschnitt 5.5.1 beladen.

Das lineare Peptid wurde gemäß den Abschnitten 5.5.2 und 5.5.3 unter Verwendung von Fmoc-L-Ala-OH, Fmoc-*N*-Me-L-Orn(Boc)-OH, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-*N*-Me-L-Leu-OH und Fmoc-L-Val-OH synthetisiert.

Das lineare Peptid konnte mit einer Ausbeute von 155 mg (0.142 mmol, 59 %) erhalten werden.

LC-MS (ESI): $t_R = 7.97$ min, m/z 1089.7 berechnet für C₅₇H₈₇N₉O₁₂, gefunden: 1090.5 [M+H]⁺.

55 mg (0.050 mmol) des linearen Peptids wurden anschließend nach Methode A aus Abschnitt 5.5.4 zyklisiert. Es wurden 62 mg (0.058 mmol, 114 %) des zyklisierten Rohpeptids erhalten.

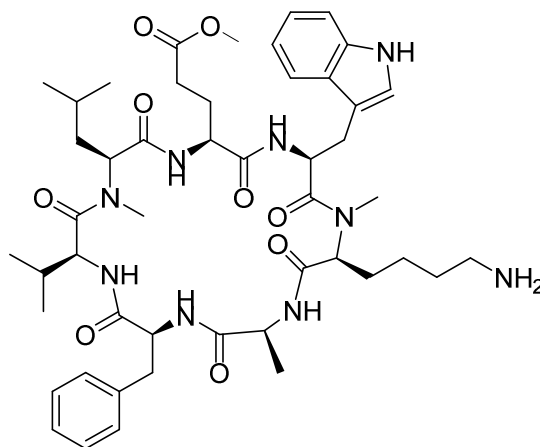
LC-MS (ESI): $t_R = 12.30$ min, m/z 1071.6 berechnet für C₅₇H₈₅N₉O₁₁, gefunden: 1094.3 [M+Na]⁺.

Das zyklisierte Peptid anschließend gemäß Methode A aus Abschnitt 5.5.5 entschützt und aufgereinigt. Dabei wurden 12.6 mg (0.014 mmol, 29 %) des gewünschten Produkts erhalten.

LC-MS (ESI): $t_R = 7.02$ min, m/z 871.5 berechnet für C₄₇H₆₉N₉O₇, gefunden: 872.3 [M+H]⁺.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 10.91 (s, 1H), 9.19 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 9.09 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H), 8.46 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 8.14 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.58 (s, 3H), 7.47 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.42 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.35 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.29-7.23 (m, 1H), 7.22-7.19 (m, 1H), 7.16-7.11 (m, 3H), 7.10-7.04 (m, 3H), 6.99 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 5.06-5.00 (m, 1H), 4.98-4.92 (m, 1H), 4.70-4.63 (m, 1H), 4.41 (t, *J* = 8.3 Hz, 1H), 4.32-4.27 (m, 1H), 4.11 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 3.12-3.06 (m, 3H), 3.03-2.95 (m, 1H), 2.67 (s, 3H), 2.44 (s, 3H), 2.40-2.30 (m, 3H), 2.24-2.13 (m, 2H), 1.50-1.42 (m, 2H), 1.37-1.29 (m, 2H), 1.09-1.04 (m, 1H), 1.01 (d, *J* = 6.6 Hz, 6H), 0.94-0.89 (m, 7H), 0.86 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 0.78 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 0.71 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H).

5.6.13. Cym_13



200 mg 2-Chlorotritylharz (entspricht 0.32 mmol Initialbeladung) wurden mit 350 mg (0.90 mmol) Fmoc-L-Phe-OH gemäß Abschnitt 5.5.1 beladen.

Das lineare Peptid wurde gemäß den Abschnitten 5.5.2 und 5.5.3 unter Verwendung von Fmoc-L-Ala-OH, Fmoc-*N*-Me-L-Lys(Boc)-OH, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-*N*-Me-L-Leu-OH und Fmoc-L-Val-OH synthetisiert.

Das lineare Peptid konnte mit einer Ausbeute von 109 mg (0.096 mmol, 30 %) erhalten werden.

LC-MS (ESI): t_R = 7.55 min, m/z 1133.6 berechnet für C₅₈H₈₇N₉O₁₄, gefunden: 1134.3 [M+H]⁺.

Das lineare Peptid wurde anschließend nach Methode A aus Abschnitt 5.5.4 zyklisiert. Es wurden 97 mg (0.087 mmol, 91 %) des zyklisierten Rohpeptids erhalten.

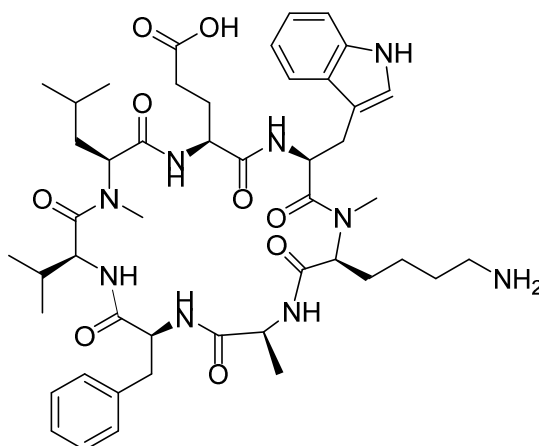
LC-MS (ESI): t_R = 11.01 min, m/z 1115.6 berechnet für C₅₈H₈₅N₉O₁₃, gefunden: 1116.2 [M+Na]⁺.

30 mg (0.027 mmol) des zyklisierten Peptids wurden anschließend gemäß Methode A aus Abschnitt 5.5.5 entschützt und aufgereinigt. Dabei wurden 11 mg (0.012 mmol, 44 %) des gewünschten Produkts erhalten.

LC-MS (ESI): $t_R = 6.48$ min, m/z 915.5 berechnet für $C_{48}H_{69}N_9O_9$, gefunden: 916.4 $[M+H]^+$.

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 10.72$ (s, 1H), 8.96 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 8.84 (s, 1H), 8.15 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.79 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H), 7.42 (s, 3H), 7.26 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.15 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.02-6.83 (m, 8H), 6.74 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 4.90 (d, $J = 10.1$ Hz, 1H), 4.76 (q, $J = 6.4$ Hz, 1H), 4.47-4.40 (m, 1H), 4.33-4.26 (m, 1H), 4.06 (t, $J = 9.0$ Hz, 1H), 3.71-3.66 (m, 1H), 2.94 (s, 3H), 2.89-2.83 (m, 2H), 2.74-2.69 (m, 2H), 2.44 (s, 3H), 2.31 (s, 3H), 2.03-1.88 (m, 5H), 1.34 (q, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.29-1.18 (m, 2H), 1.12-1.05 (m, 1H), 1.00-0.83 (m, 6H), 0.72 (q, $J = 7.0$ Hz, 10H), 0.60 (d, $J = 6.6$ Hz, 4H).

5.6.14. Cym_14

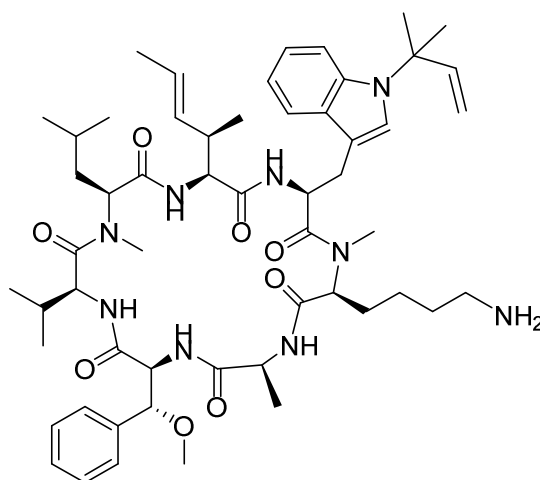


60 mg (0.054 mmol) des zyklisierten Rohprodukts aus der Synthese von Cym_13 wurden in TCE (5 mL) gelöst. Dann erfolgte die Zugabe von 196 mg (1.08 mmol) Trimethylzinnhydroxid. Das Reaktionsgemisch wurde auf 80 °C erhitzt und 16 Stunden bei dieser Temperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 %iger $KHSO_4$ -Lösung gequenchet. Die organische Phase wurde über $MgSO_4$ getrocknet und filtriert. Nachdem das Lösemittel unter reduziertem Druck entfernt worden war, wurde der verbliebene Rückstand gemäß Methode A aus Abschnitt 5.5.5 entschützt und aufgereinigt. Dabei wurden 17 mg (0.019 mmol, 49 %) des gewünschten Produkts erhalten.

LC-MS (ESI): $t_R = 6.34$ min, m/z 901.5 berechnet für $C_{47}H_{67}N_9O_9$, gefunden: 902.3 $[M+H]^+$.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 10.73 (s, 1H), 8.95 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.85 (s, 1H), 8.16 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.77 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.44-7.39 (m, 3H), 7.26 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.14 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.03-6.99 (m, 1H), 6.97 (s, 1H), 6.92-6.89 (m, 2H), 6.87-6.82 (m, 4H), 6.76 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 4.92-4.86 (m, 1H), 4.75 (q, *J* = 6.6 Hz, 1H), 4.43 (q, *J* = 7.1 Hz, 1H), 4.29 (q, *J* = 7.0 Hz, 1H), 4.08 (t, *J* = 8.9 Hz, 1H), 3.69 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 2.85 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.75-2.68 (m, 2H), 2.46 (s, 3H), 2.29 (s, 3H), 2.04-1.88 (m, 5H), 1.36 (q, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.28-1.17 (m, 2H), 1.13-1.04 (m, 1H), 1.01-0.89 (m, 2H), 0.86 (d, *J* = 7.0 Hz, 4H), 0.71 (q, *J* = 7.1 Hz, 10H), 0.59 (d, *J* = 6.6 Hz, 4H).

5.6.15. Cym_15



150 mg 2-Chlorotritylharz (entspricht 0.24 mmol Initialbeladung) wurden mit 150 mg (0.36 mmol) Fmoc-L-Phe(3*R*-MeO)-OH (**9**) gemäß Abschnitt 5.5.1 beladen.

Das lineare Peptid wurde gemäß den Abschnitten 5.5.2 und 5.5.3 unter Verwendung von Fmoc-L-Ala-OH, Fmoc-*N*-Me-L-Lys(Boc)-OH, Fmoc-L-*N'*-*tert*-prenyl-Tryptophan (**12**), (2*S*,3*R*,*E*)-*N*-Fmoc-2-amino-3-methylhex-4-ensäure (**16**), Fmoc-*N*-Me-L-Leu-OH und Fmoc-L-Val-OH synthetisiert.

Das lineare Peptid konnte mit einer Ausbeute von 111 mg (0.10 mmol, 42 %) erhalten werden.

LC-MS (ESI): *t_R* = 8.79 min, *m/z* 1113.7 berechnet für C₆₀H₉₁N₉O₁₁, gefunden: 1114.5 [M+H]⁺.

Das lineare Peptid wurden anschließend nach Methode B aus Abschnitt 5.5.4 zyklisiert. Es wurden 89 mg (0.081 mmol, 81 %) des zyklisierten Rohpeptids erhalten.

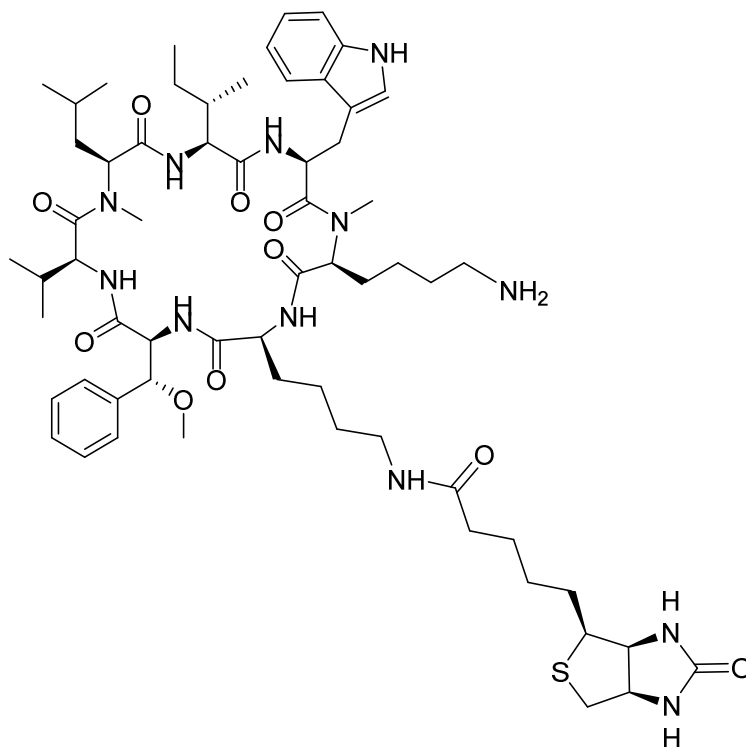
LC-MS (ESI): *t_R* = 12.59 min, *m/z* 1095.7 berechnet für C₆₀H₈₉N₉O₁₀, gefunden: 1096.2 [M+H]⁺.

Das so erhaltene Peptid wurde gemäß Methode B aus Abschnitt 5.5.5 entschützt und aufgereinigt. Dabei wurden 10 mg (0.010 mmol, 12 %) des gewünschten Produkts erhalten.

LC-MS (ESI): $t_R = 8.36$ min, m/z 995.6 berechnet für $C_{55}H_{81}N_9O_8$, gefunden: 996.5 $[M+H]^+$.

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 9.49$ (s, 1H), 9.36 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H), 8.71 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H), 8.50 (s, 1H), 7.88 (d, $J = 8.4$ Hz, 4H), 7.73 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.66 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.60 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.47-7.41 (m, 6H), 7.27-7.20 (m, 2H), 6.26 (q, $J = 9.3$ Hz, 1H), 5.39 (q, $J = 11.1$ Hz, 2H), 5.23 (d, $J = 9.9$ Hz, 1H), 5.10 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 4.94 (q, $J = 6.7$ Hz, 1H), 4.68-4.58 (m, 2H), 4.55 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 4.38 (t, $J = 8.2$ Hz, 1H), 3.35 (s, 3H), 3.30 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 3.22 (s, 3H), 2.61 (s, 3H), 2.48-2.38 (m, 2H), 1.85 (s, 6H), 1.82 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H), 1.69-1.61 (m, 3H), 1.24-1.17 (m, 6H), 1.14-1.08 (m, 11H), 1.06 (d, $J = 6.5$ Hz, 5H), 1.00 (d, $J = 6.9$ Hz, 4H).

5.6.16. Cym_bacPROTAC_01



150 mg 2-Chlorotritylharz (entspricht 0.24 mmol Initialbeladung) wurden mit 150 mg (0.36 mmol) Fmoc-L-Phe(3*R*-MeO)-OH (**9**) gemäß Abschnitt 5.5.1 beladen.

Das lineare Peptid wurde gemäß den Abschnitten 5.5.2 und 5.5.3 unter Verwendung von Fmoc-L-Ala-OH, Fmoc-*N*-Me-L-Lys(Biotin)-OH, Fmoc-L-Trp-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-*N*-Me-L-Leu-OH und Fmoc-L-Val-OH synthetisiert.

Das lineare Peptid konnte mit einer Ausbeute von 149 mg (0.113 mmol, 47 %) erhalten werden.

LC-MS (ESI): $t_R = 7.31$ min, m/z 1316.8 berechnet für $C_{72}H_{112}N_{12}O_{15}S$, gefunden: 1317.6 $[M+H]^+$.

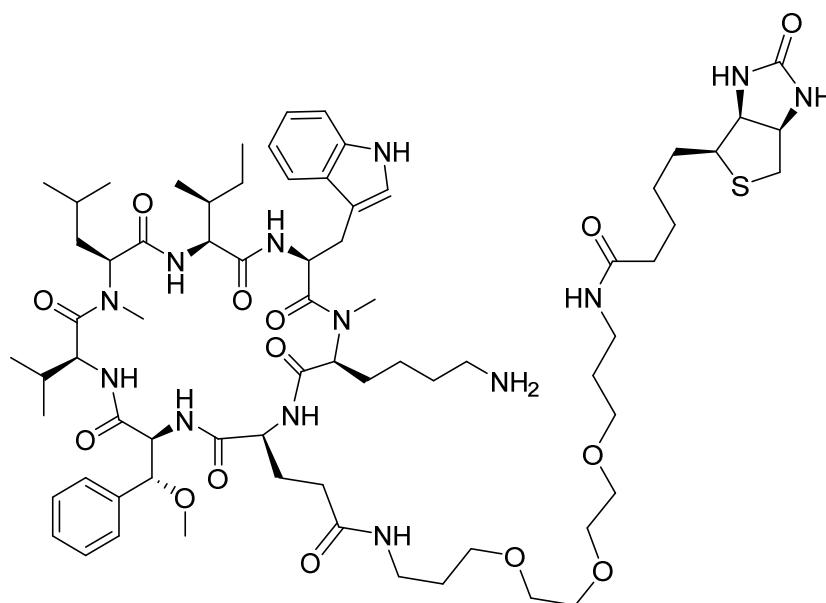
Das lineare Peptid wurden anschließend nach Methode B aus Abschnitt 5.5.4 zyklisiert. Es wurden 105 mg (0.081 mmol, 72 %) des zyklisierten Rohpeptids erhalten.

LC-MS (ESI): $t_R = 9.71$ min, m/z 1298.8 berechnet für $C_{72}H_{110}N_{12}O_{14}S$, gefunden: 1299.5 $[M+H]^+$.

Das so erhaltene Peptid wurde gemäß Methode A aus Abschnitt 5.5.5 entschützt und aufgereinigt. Dabei wurden 15 mg (0.012 mmol, 15 %) des gewünschten Produkts erhalten.

LC-MS (ESI): $t_R = 7.16$ min, m/z 1198.7 berechnet für $C_{62}H_{94}N_{12}O_{10}S$, gefunden: 1199.6 $[M+H]^+$.

5.6.17. Cym_bacPROTAC_02



200 mg 2-Chlorotritylharz (0.32 mmol Initialbeladung) wurden mit 150 mg (0.36 mmol) Fmoc-L-Phe(3*R*-MeO)-OH (**9**) gemäß Abschnitt 5.5.1 beladen.

Das lineare Peptid wurde gemäß den Abschnitten 5.5.2 und 5.5.3 unter Verwendung von Fmoc-L-Glu(TOTA-Biotin)-OH (**18**), Fmoc-*N*-Me-L-Lys(Boc)-OH, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-*N*-Me-L-Leu-OH und Fmoc-L-Val-OH synthetisiert.

Das lineare Peptid konnte mit einer Ausbeute von 269 mg (0.167 mmol, 67 %) erhalten werden.

LC-MS (ESI): $t_R = 8.27$ min, m/z 1619.9 berechnet für $C_{81}H_{129}N_{13}O_{19}S$, gefunden: 1620.6 $[M+H]^+$.

Das Peptid wurden anschließend nach Methode B aus Abschnitt 5.5.4 zyklisiert. Es wurden 169 mg (0.105 mmol, 63 %) des zyklisierten Rohpeptids erhalten.

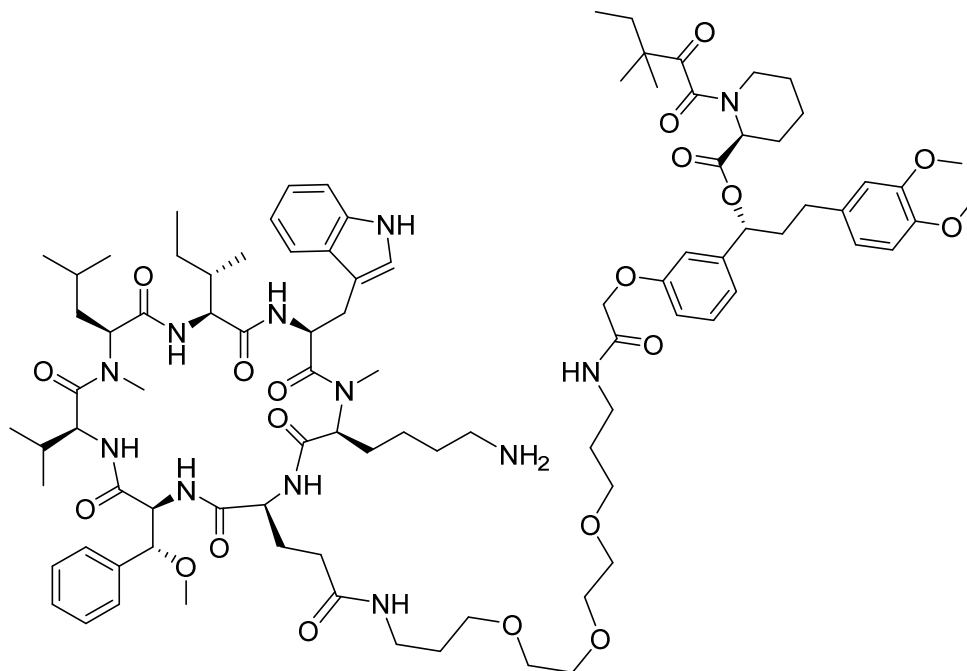
LC-MS (ESI): $t_R = 11.52$ min, m/z 1601.9 berechnet für $C_{81}H_{127}N_{13}O_{18}S$, gefunden: 1602.3 $[M+H]^+$.

93 mg (0.058 mmol) des so erhaltenen Peptids wurden gemäß Methode A aus Abschnitt 5.5.5 entschützt und aufgereinigt. Dabei wurden 4.7 mg (0.003 mmol, 6 %) des gewünschten Produkts erhalten.

LC-MS (ESI): $t_R = 7.31$ min, m/z 1401.8 berechnet für $C_{71}H_{111}N_{13}O_{14}S$, gefunden: 1402.5 $[M+H]^+$.

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 11.10$ (s, 1H), 9.64 (s, 1H), 9.32 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 8.84 (d, $J = 10.2$ Hz, 1H), 8.18 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.93 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H), 7.76-7.65 (m, 6H), 7.62 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.58 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.46-7.36 (m, 7H), 7.28 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.18 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 6.60 (s, 1H), 6.54 (s, 1H), 5.33 (d, $J = 10.3$ Hz, 1H), 5.07 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 5.01-4.94 (m, 1H), 4.64-4.54 (m, 2H), 4.50 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H), 4.45-4.30 (m, 1H), 4.34-4.23 (m, 3H), 3.32-3.22 (m, 8H), 3.18 (s, 3H), 3.01 (dd, $J = 5.1/12.3$ Hz, 1H), 2.89 (s, 3H), 2.60 (s, 3H), 2.53-2.39 (m, 2H), 2.23 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H), 2.05-1.96 (m, 1H), 1.80 (t, $J = 6.4$ Hz, 6H), 1.74-1.57 (m, 10H), 1.53-1.41 (m, 6H), 1.37-1.26 (m, 3H), 1.22 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 1.12 (d, $J = 6.2$ Hz, 7H), 1.08-0.96 (m, 16H).

5.6.18. Cym_bacPROTAC_03



200 mg 2-Chlorotritylharz (max. Beladung 1.6 mmol/g) wurden mit 105 mg (0.25 mmol) Fmoc-L-Phe(3*R*-MeO)-OH (**9**) gemäß Abschnitt 5.5.1 beladen.

Das lineare Peptid wurde gemäß den Abschnitten 5.5.2 und 5.5.3 unter Verwendung von Fmoc-L-Glu(TOTA-SLF)-OH (**39**), Fmoc-*N*-Me-L-Lys(Boc)-OH, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-*N*-Me-L-Leu-OH und Fmoc-L-Val-OH synthetisiert.

Das lineare Peptid konnte mit einer Ausbeute von 345 mg (0.176 mmol, 70 %) erhalten werden.

LC-MS (ESI): $t_R = 10.78$ min, m/z 1959.1 berechnet für $C_{103}H_{154}N_{12}O_{25}$, gefunden: 1960.5 $[M+H]^+$.

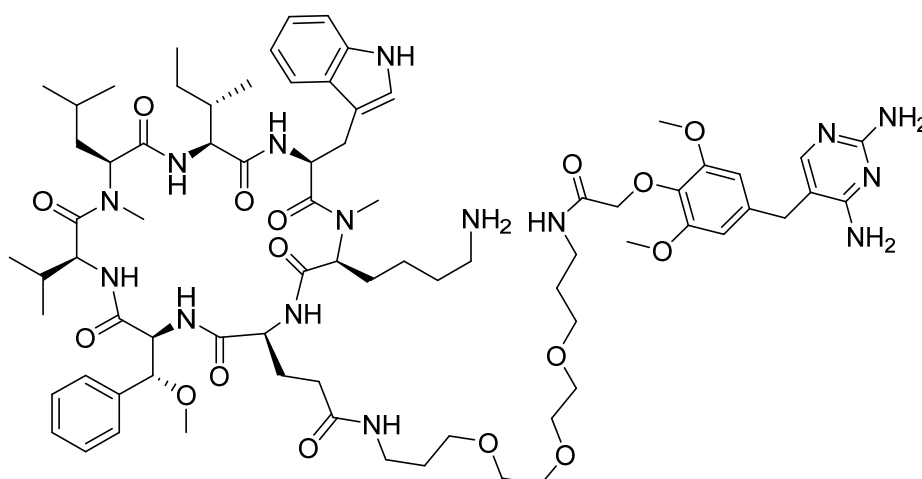
Das Peptid wurden anschließend nach Methode B aus Abschnitt 5.5.4 zyklisiert. Es wurden 183 mg (0.094 mmol, 54 %) des zyklisierten Rohpeptids erhalten.

LC-MS (ESI): $t_R = 15.78$ min, m/z 1941.1 berechnet für $C_{103}H_{152}N_{12}O_{24}$, gefunden: 1942.2 $[M+H]^+$.

48 mg (0.025 mmol) des so erhaltenen Peptids wurden gemäß Methode A aus Abschnitt 5.5.5 entschützt und aufgereinigt. Dabei wurden 6.4 mg (0.004 mmol, 15 %) des gewünschten Produkts erhalten.

LC-MS (ESI): $t_R = 9.55$ min, m/z 1741.0 berechnet für $C_{93}H_{136}N_{12}O_{20}$, gefunden: 1741.7 $[M+H]^+$.

5.6.19. Cym_bacPROTAC_04



200 mg 2-Chlorotritylharz (max. Beladung 1.6 mmol/g) wurden mit 118 mg (0.25 mmol) Fmoc-*N*-Me-L-Lys(Boc)-OH gemäß Abschnitt 5.5.1 beladen.

Das lineare Peptid wurde gemäß den Abschnitten 5.5.2 und 5.5.3 unter Verwendung von, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-N-Me-L-Leu-OH, Fmoc-L-Val-OH, Fmoc-L-Phe(3*R*-MeO)-OH (**9**) und Fmoc-L-Glu(TOTA-TMP)-OH (**27**) synthetisiert.

Das lineare Peptid konnte mit einer Ausbeute von 207 mg (0.121 mmol, 48 %) erhalten werden.

LC-MS (ESI): $t_R = 7.83$ min, m/z 1709.9 berechnet für $C_{86}H_{131}N_{15}O_{21}$, gefunden: 1710.5 $[M+H]^+$.

100 mg (0.058 mmol) des linearen Peptids wurden anschließend nach Methode B aus Abschnitt 5.5.4 zyklisiert. Es wurden 65 mg (0.038 mmol, 65 %) des zyklisierten Rohpeptids erhalten.

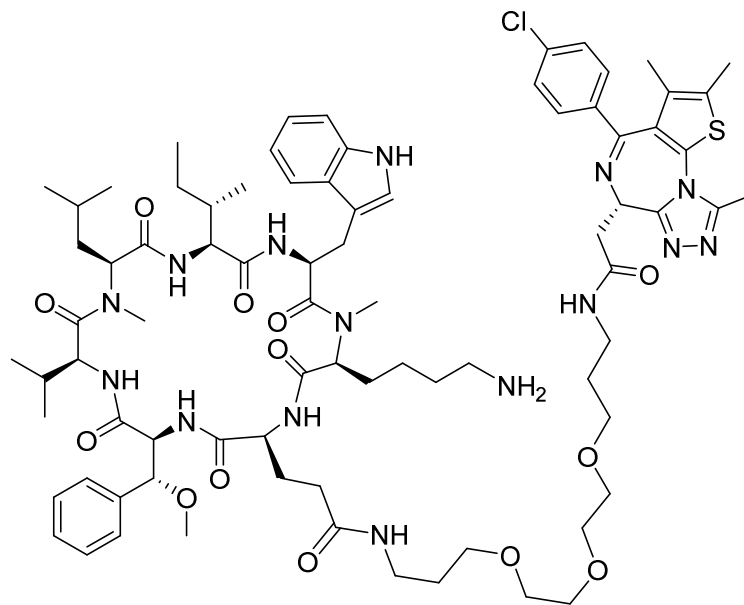
LC-MS (ESI): $t_R = 9.81$ min, m/z 1691.9 berechnet für $C_{86}H_{129}N_{15}O_{20}$, gefunden: 1692.4 $[M+H]^+$.

Das zyklisierte Peptid wurde anschließend gemäß Methode A aus Abschnitt 5.5.5 entschützt und aufgereinigt. Dabei wurden 11 mg (0.007 mmol, 19 %) des gewünschten Produkts erhalten.

LC-MS (ESI): $t_R = 6.78$ min, m/z 1491.8 berechnet für $C_{76}H_{113}N_{15}O_{16}$, gefunden: 1492.5 $[M+H]^+$.

1H NMR (400 MHz, MeOD): $\delta = 9.37$ (s, 1H), 9.20 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 8.95 (d, $J = 10.2$ Hz, 1H), 7.91 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H), 7.83 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.60 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.44-7.38 (m, 1H), 7.37-7.23 (m, 6H), 7.17 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.08 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 6.64 (s, 2H), 5.37 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 5.23-5.16 (m, 1H), 5.12-5.07 (m, 1H), 4.93 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 4.60 (t, $J = 8.2$ Hz, 1H), 4.49 (t, $J = 9.1$ Hz, 1H), 4.30 (q, $J = 8.5$ Hz, 1H), 4.01 (s, 1H), 3.87 (s, 6H), 3.81 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H), 3.71 (s, 2H), 3.65-3.55 (m, 10H), 3.51 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H), 3.42 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 3.37 (s, 3H), 3.27-3.21 (m, 4H), 3.18 (s, 2H), 3.07 (q, $J = 7.2$ Hz, 1H), 2.88 (s, 2H), 2.72-2.59 (m, 2H), 2.55 (s, 2H), 2.51-2.45 (m, 1H), 2.41-2.32 (m, 1H), 1.99-1.91 (m, 1H), 1.88-1.82 (m, 3H), 1.79-1.72 (m, 3H), 1.62-1.55 (m, 2H), 1.47-1.38 (m, 1H), 1.33 (q, $J = 6.9$ Hz, 3H), 1.28-1.20 (m, 1H), 1.14 (t, $J = 5.6$ Hz, 13H), 1.08 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 1.00 (q, $J = 7.0$ Hz, 10H).

5.6.20. Cym_bacPROTAC_05



200 mg 2-Chlorotritylharz (max. Beladung 1.6 mmol/g) wurden mit 105 mg (0.25 mmol) Fmoc-L-Phe(3*R*-MeO)-OH (**9**) gemäß Abschnitt 5.5.1 beladen.

Das lineare Peptid wurde gemäß den Abschnitten 5.5.2 und 5.5.3 unter Verwendung von Fmoc-L-Glu(TOTA-(+))JQ1)-OH (**29**), Fmoc-*N*-Me-L-Lys(Boc)-OH, Fmoc-L-Trp-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-*N*-Me-L-Leu-OH und Fmoc-L-Val-OH synthetisiert.

Das lineare Peptid konnte mit einer Ausbeute von 229 mg (0.137 mmol, 55 %) erhalten werden.

LC-MS (ESI): $t_R = 8.35$ min, m/z 1675.9 berechnet für $C_{85}H_{122}ClN_{15}O_{16}S$, gefunden: 1677.2 $[M+H]^+$.

Das lineare Peptid wurde anschließend nach Methode B aus Abschnitt 5.5.4 zyklisiert. Es wurden 146 mg (0.088 mmol, 64 %) des zyklisierten Rohpeptids erhalten.

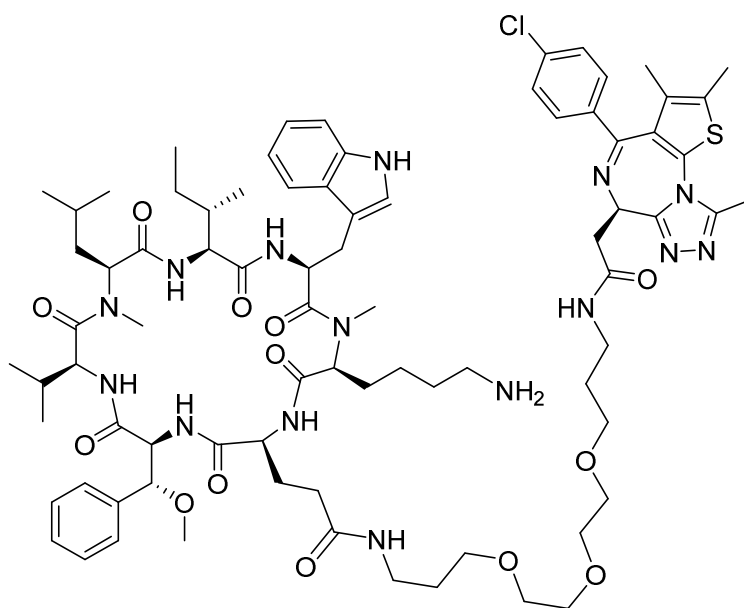
LC-MS (ESI): $t_R = 11.51$ min, m/z 1657.9 berechnet für $C_{85}H_{120}ClN_{15}O_{15}S$, gefunden: 1658.3 $[M+H]^+$.

Das zyklisierte Peptid anschließend gemäß Methode A aus Abschnitt 5.5.5 entschützt und aufgereinigt. Dabei wurden 42.5 mg (0.027 mmol, 35 %) des gewünschten Produkts erhalten.

LC-MS (ESI): $t_R = 7.94$ min, m/z 1557.8 berechnet für $C_{80}H_{112}ClN_{15}O_{13}S$, gefunden: 1559.4 $[M+H]^+$.

¹H NMR (400 MHz, MeOD): δ = 9.39 (s, 1H), 9.22 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.94 (d, J = 10.2 Hz, 1H), 7.93 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 7.83 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.61 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.50-7.44 (m, 6H), 7.37-7.27 (m, 7H), 7.18 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.09 (s, 3H), 5.38 (d, J = 10.1 Hz, 1H), 5.24-5.17 (m, 1H), 5.12 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 4.69 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 4.60 (t, J = 8.6 Hz, 1H), 4.49 (t, J = 10.9 Hz, 2H), 4.30 (q, J = 8.2 Hz, 1H), 3.67 (s, 6H), 3.62 (s, 8H), 3.54 (t, J = 5.9 Hz, 4H), 3.38 (s, 3H), 3.19 (s, 3H), 2.89 (s, 3H), 2.74 (s, 6H), 2.56 (s, 3H), 2.47 (s, 3H), 1.89-1.83 (m, 4H), 1.81-1.75 (m, 4H), 1.72 (s, 3H), 1.63-1.54 (m, 4H), 1.14 (d, J = 6.2 Hz, 7H), 1.08 (d, J = 6.8 Hz, 5H), 1.04-0.95 (m, 15H).

5.6.21. Cym_bacPROTAC_06



100 mg 2-Chlorotritylharz (max. Beladung 1.6 mmol/g) wurden mit 53 mg (0.125 mmol) Fmoc-L-Phe(3*R*-MeO)-OH (**9**) gemäß Abschnitt 5.5.1 beladen.

Das lineare Peptid wurde gemäß den Abschnitten 5.5.2 und 5.5.3 unter Verwendung von Fmoc-L-Glu(TOTA(-)-JQ1)-OH (**32**), Fmoc-*N*-Me-L-Lys(Boc)-OH, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-*N*-Me-L-Leu-OH und Fmoc-L-Val-OH synthetisiert.

Das lineare Peptid konnte mit einer Ausbeute von 89 mg (0.050 mmol, 40 %) erhalten werden.

LC-MS (ESI): t_R = 9.57 min, m/z 1775.9 berechnet für C₉₀H₁₃₀ClN₁₅O₁₈S, gefunden: 1778.1 [M+H]⁺.

Das Peptid wurde anschließend nach Methode B aus Abschnitt 5.5.4 zyklisiert. Es wurden 61 mg (0.035 mmol, 70 %) des zyklisierten Rohpeptids erhalten.

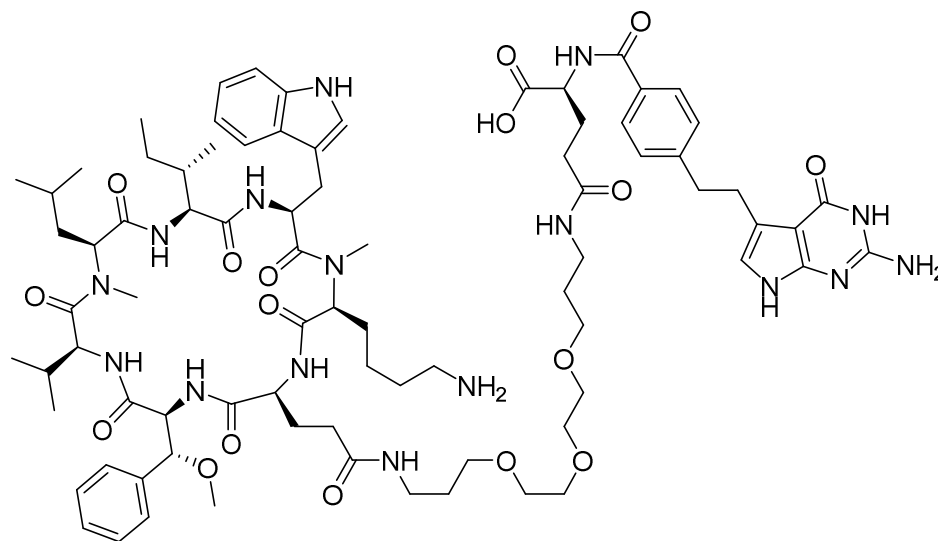
LC-MS (ESI): $t_R = 12.88$ min, m/z 1757.9 berechnet für $C_{90}H_{128}ClN_{15}O_{17}S$, gefunden: 1659.1 [M-Boc+H]⁺.

Das zyklisierte Peptid wurde anschließend gemäß Methode A aus Abschnitt 5.5.5 entschützt und aufgereinigt. Dabei wurden 3.3 mg (0.002 mmol, 10 %) des gewünschten Produkts erhalten.

LC-MS (ESI): $t_R = 8.38$ min, m/z 1557.8 berechnet für $C_{80}H_{112}ClN_{15}O_{13}S$, gefunden: 1559.2 [M+H]⁺.

¹H NMR (400 MHz, MeOD): $\delta = 7.96$ -7.78 (m, 1H), 7.60 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 7.51-7.25 (m, 16H), 7.22-7.15 (m, 2H), 7.12-7.03 (m, 2H), 5.39 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H), 5.24-5.18 (m, 1H), 5.13 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 4.71-4.66 (m, 1H), 4.60 (d, $J = 10.1$ Hz, 1H), 4.54-4.42 (m, 2H), 4.31 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 3.71-3.65 (m, 6H), 3.64-3.58 (m, 8H), 3.57-3.48 (m, 4H), 3.39 (s, 3H), 3.19 (s, 3H), 2.90 (s, 2H), 2.76-2.69 (m, 6H), 2.57 (s, 3H), 2.48 (s, 4H), 1.90-1.76 (m, 8H), 1.73 (s, 3H), 1.67-1.54 (m, 4H), 1.11-0.87 (m, 26H).

5.6.22. Cym_bacPROTAC_07



125 mg 2-Chlorotritylharz (max. Beladung 1.6 mmol/g) wurden mit 71 mg (0.15 mmol) Fmoc-N-Me-L-Lys(Boc)-OH gemäß Abschnitt 5.5.1 beladen.

Das lineare Peptid wurde gemäß den Abschnitten 5.5.2 und 5.5.3 unter Verwendung von, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-N-Me-L-Leu-OH, Fmoc-L-Val-OH, Fmoc-L-Phe(3*R*-MeO)-OH (**9**) und Fmoc-L-Glu(TOTA-PMX-OMe)-OH (**21**) synthetisiert.

Es wurden 64 mg (0.035 mmol, 23 %) des linearen Peptids erhalten.

LC-MS (ESI): $t_R = 8.18$ min, m/z 1817.00 berechnet für $C_{92}H_{136}N_{16}O_{22}$, gefunden: 1817.2 [M+H]⁺.

Das Peptid wurde anschließend nach Methode B aus Abschnitt 5.5.4 zyklisiert. Dabei wurden 49 mg (0.027 mmol, 77 %) des zyklisierten Rohpeptids erhalten.

LC-MS (ESI): $t_R = 10.91$ min, m/z 1799.0 berechnet für $C_{92}H_{134}N_{16}O_{21}$, gefunden: 1800.1 [M+H]⁺.

49 mg (0.027 mmol) des zyklisierten Peptids wurden anschließend in DCM:TFA 3:1 (5 mL) gelöst und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 2 Stunden wurde das Lösemittel unter reduziertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Es wurden 37 mg (0.023 mmol, 85 %) des gewünschten Rohprodukts erhalten.

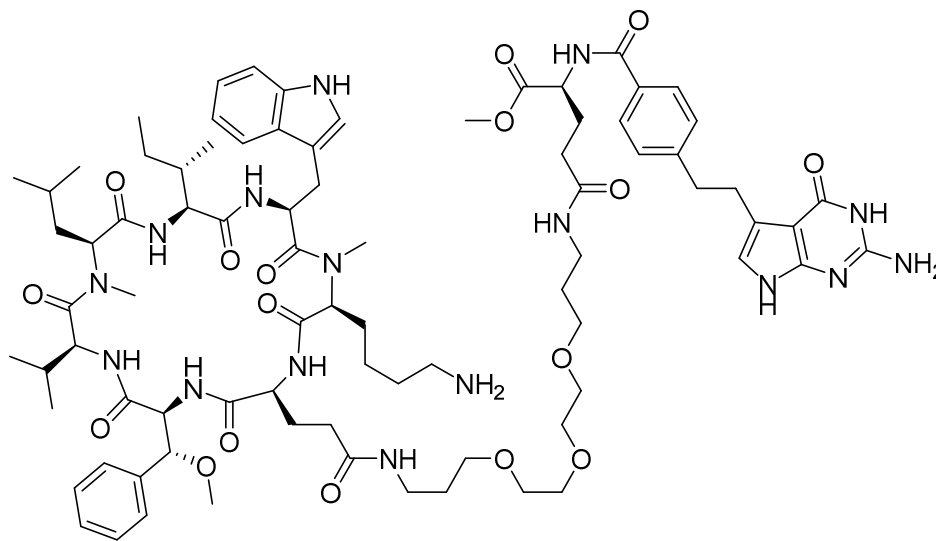
LC-MS (ESI): $t_R = 7.18$ min, m/z 1598.9 berechnet für $C_{82}H_{118}N_{16}O_{17}$, gefunden: 1600.4 [M+H]⁺.

Anschließend wurden 37 mg des Peptids in THF:MeOH:H₂O (5 mL, 3:1:1) gelöst und 4.8 mg LiOH Monohydrat zugegeben. Die erhaltene Reaktionslösung wurde 72 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt worden ist, wurde der Rückstand gemäß Methode D aus Abschnitt 5.5.5 aufgereinigt. Es wurden 4.4 mg (0.003 mmol, 12 %) des gewünschten Produkts erhalten.

LC-MS (ESI): $t_R = 6.95$ min, m/z 1584.9 berechnet für $C_{81}H_{116}N_{16}O_{17}$, gefunden: 1585.5 [M+H]⁺.

¹H NMR (400 MHz, MeOD): $\delta = 8.95$ (d, $J = 10.5$ Hz, 1H), 7.92 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H), 7.86-7.78 (m, 3H), 7.67-7.62 (m, 1H), 7.59 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.45-7.26 (m, 10H), 7.21-7.14 (m, 2H), 7.09 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 6.43 (s, 1H), 5.39 (d, $J = 10.5$ Hz, 1H), 5.31-5.17 (m, 2H), 5.15-5.11 (m, 1H), 4.66-4.59 (m, 1H), 4.50 (t, $J = 8.9$ Hz, 1H), 4.35-4.29 (m, 1H), 3.67-3.48 (m, 13H), 3.30-3.22 (m, 6H), 3.19 (s, 2H), 3.12-3.01 (m, 6H), 2.96-2.93 (m, 1H), 2.90 (s, 2H), 2.73-2.61 (m, 2H), 2.57 (s, 2H), 2.49 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H), 2.44-2.30 (m, 3H), 2.18-2.11 (m, 2H), 2.00-1.93 (m, 1H), 1.85-1.71 (m, 7H), 1.69-1.56 (m, 5H), 1.52-1.40 (m, 3H), 1.31-1.22 (m, 2H), 1.17-1.12 (m, 4H), 1.09 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 1.05-0.83 (m, 20H).

5.6.23. Cym_bacPROTAC_08



200 mg 2-Chlorotritylharz (max. Beladung 1.6 mmol/g) wurden mit 118 mg (0.25 mmol) Fmoc-N-Me-L-Lys(Boc)-OH gemäß Abschnitt 5.5.1 beladen.

Das lineare Peptid wurde gemäß den Abschnitten 5.5.2 und 5.5.3 unter Verwendung von, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-N-Me-L-Leu-OH, Fmoc-L-Val-OH, Fmoc-L-Phe(3*R*-MeO)-OH (**9**) und Fmoc-L-Glu(TOTA-PMX-OMe)-OH (**21**) synthetisiert.

Das lineare Peptid konnte mit einer Ausbeute von 160 mg (0.088 mmol, 35 %) erhalten werden.

LC-MS (ESI): $t_R = 8.32$ min, m/z 1817.00 berechnet für $C_{92}H_{136}N_{16}O_{22}$, gefunden: 1818.2 $[M+H]^+$.

Das Peptid wurden anschließend nach Methode B aus Abschnitt 5.5.4 zyklisiert. Es wurden 93 mg (0.051 mmol, 58 %) des zyklisierten Rohpeptids erhalten.

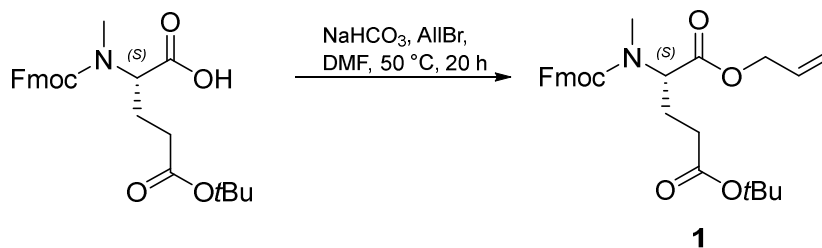
LC-MS (ESI): $t_R = 10.92$ min, m/z 1799.0 berechnet für $C_{92}H_{134}N_{16}O_{21}$, gefunden: 1800.1 $[M+H]^+$.

40 mg (0.022 mmol) des zyklisierten Peptids wurden anschließend gemäß Methode A aus Abschnitt 5.5.5 entschützt und aufgereinigt. Dabei wurden 3.6 mg (0.002 mmol, 9 %) des gewünschten Produkts erhalten.

LC-MS (ESI): $t_R = 7.20$ min, m/z 1598.9 berechnet für $C_{82}H_{118}N_{16}O_{17}$, gefunden: 1599.3 $[M+H]^+$.

5.7. Synthese der Verbindungen

5.7.1. Fmoc-N-Me-L-Glu(tBu)-OAll (1)



Fmoc-N-Me-L-Glu(tBu)-OH (1.5 g, 3.4 mmol) wurde in DMF (10 mL) gelöst. Dann wurden NaHCO₃ (717 mg, 8.5 mmol) und Allylbromid (1.46 mL, 16.9 mmol) zugegeben. Die erhaltene Suspension wurde anschließend bei 50 °C gerührt.

Nach 20 Stunden wurde das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt, der erhaltene Rückstand in DCM gelöst und gegen 5 %ige KHSO₄-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Nachdem das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt worden war, wurde der erhaltene Rückstand chromatographisch aufgereinigt (Kieselgel, 5 % → 25 % Ethylacetat in Cyclohexan). Das gewünschte Produkt **1** wurde als gelbes Öl erhalten (1.5 g, 3.1 mmol, 91 %).

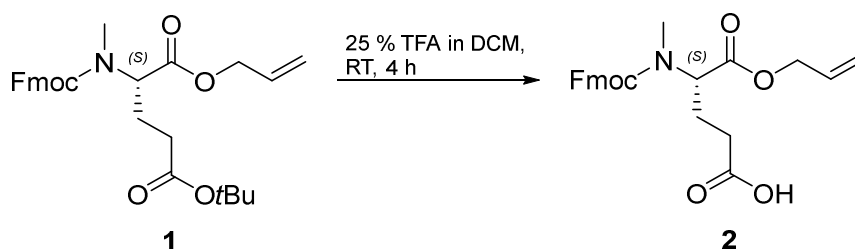
TLC (Ethylacetat/Cyclohexan = 3:1): R_f = 0.5.

LC-MS (ESI): t_R = 11.32 min, m/z 479.2 berechnet für C₂₈H₃₃NO₆, gefunden: 479.8 [M+H]⁺ und 502.0 [M+Na]⁺.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.79 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 7.65-7.55 (m, 2H), 7.41 (q, J = 6.9 Hz, 2H), 7.34 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 5.97-5.83 (m, 1H), 5.32 (dd, J = 7.4/17.3 Hz, 1H), 5.25 (d, J = 10.6 Hz, 1H), 4.82 (dd, J = 4.7/10.7 Hz, 1H), 4.69-4.53 (m, 3H), 4.51-4.38 (m, 2H), 4.27 (td, J = 6.5/22.9 Hz, 1H), 2.89 (d, J = 8.1 Hz, 3H), 2.38-2.23 (m, 2H), 2.22-1.98 (m, 2H), 1.46 (d, J = 5.2 Hz, 9H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 171.9, 170.7, 156.9, 156.3, 144.0, 143.9, 141.3, 131.7, 127.7, 127.1, 125.0, 124.9, 120.0, 118.7, 80.6, 67.8, 65.8, 58.4, 58.1, 47.2, 31.9, 31.6, 30.9, 28.1, 24.2, 24.0.

5.7.2. Fmoc-N-Me-L-Glu-OAll (2)



tert-butyl Ester **1** (1.5 g, 3.1 mmol) wurde in TFA:DCM (3:1, 5 mL) gelöst und 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene ölige Rückstand chromatographisch aufgereinigt (C18-RP, 40 % → 75 % ACN in Wasser). Das gewünschte Produkt **2** wurde als weißer Feststoff erhalten (1.0 g, 2.5 mmol, 81 %).

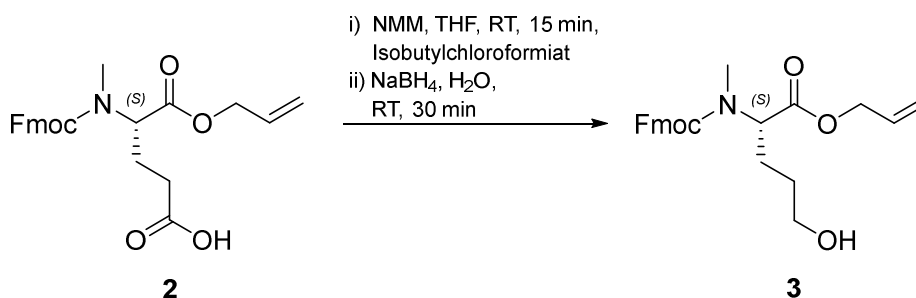
TLC (Ethylacetat/Cyclohexan = 1:1): $R_f = 0.3$.

LC-MS (ESI): $t_R = 8.97$ min, m/z 423.2 berechnet für $C_{24}H_{25}NO_6$, gefunden: 423.8 $[M+H]^+$.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7.78$ (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 7.62 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.56 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H), 7.42 (q, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.34 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 5.96-5.81 (m, 1H), 5.37-5.30 (m, 1H), 5.27 (d, $J = 10.5$ Hz, 1H), 4.87-4.80 (m, 1H), 4.69-4.53 (m, 2H), 4.52-4.42 (m, 2H), 4.26 (td, $J = 6.4/24.5$ Hz, 1H), 2.86 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H), 2.44-2.32 (m, 2H), 2.23-2.02 (m, 2H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 177.9, 170.4, 170.0, 156.9, 156.3, 143.8, 141.3, 131.6, 127.7, 127.1, 125.0, 124.7, 120.1, 118.8, 67.9, 65.9, 58.2, 47.2, 31.0, 30.5, 30.1, 23.9, 23.7$.

5.7.3. Fmoc-N-Me-L-Nva-OAll (3)



Carbonsäure **2** (790 mg, 1.9 mmol) wurde in THF (10 mL) gelöst. Nach Zugabe von NMM (226 μ L, 2.1 mmol) wurde das Gemisch im Eisbad auf 0 °C gekühlt, bevor Isobutylchloroformiat zugetropft wurde (267 μ L, 2.1 mmol). Die erhaltene Suspension wurde 15 min gerührt und dabei langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Anschließend wurde der gebildete

Niederschlag abfiltriert, der Rückstand mit THF gewaschen und das Filtrat erneut auf 0 °C gekühlt. Es wurde NaBH₄ (89 mg, 2.4 mmol, in einer minimalen Menge Wasser gelöst) zugegeben und die Reaktionslösung erneut unter 15-minütigem Rühren auf Raumtemperatur erwärmt. Anschließend wurde die Reaktionslösung durch Zugabe von 5 %iger KHSO₄-Lösung gequenchet und gegen DCM ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet, filtriert und bis unter vermindertem Druck bis zur Trockne eingeeengt. Der erhaltene Rückstand wurde chromatographisch aufgereinigt (Kieselgel, 5 % → 25 % Ethylacetat in Cyclohexan). Das gewünschte Produkt **3** wurde als farbloses Öl erhalten (539 mg, 1.3 mmol, 71 %).

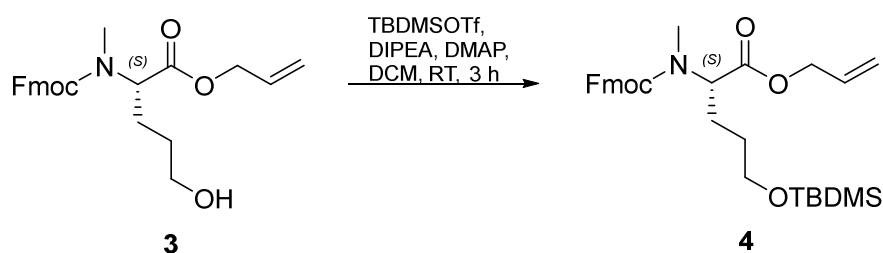
TLC (Ethylacetat/Cyclohexan = 1:1): R_f = 0.4.

LC-MS (ESI): t_R = 9.19 min, m/z 409.2 berechnet für C₂₄H₂₇NO₅, gefunden: 409.7 [M+H]⁺ und 432.1 [M+Na]⁺.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.77 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 7.63 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.58 (d, J = 6.9 Hz, 1H), 7.42 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 7.34 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 6.09-5.97 (m, 1H), 5.36-5.23 (m, 1H), 5.17 (d, J = 10.3 Hz, 1H), 4.70-4.54 (m, 1H), 4.49-4.34 (m, 3H), 4.27 (td, J = 6.0/18.0 Hz, 1H), 4.21-4.08 (m, 2H), 3.01 (s, 2H), 2.91-2.81 (m, 1H), 2.24-1.99 (m, 2H), 1.85-1.65 (m, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 169.9, 156.5, 143.9, 141.5, 137.4, 127.8, 127.2, 125.2, 120.1, 115.2, 68.9, 68.1, 63.9, 56.6, 47.2, 32.6, 24.1, 22.5.

5.7.4. Fmoc-N-Me-L-Nva(OTBDMS)-OAll (**4**)



Alkohol **3** (539 mg, 1.3 mmol) wurde unter Argon in trockenem DCM (10 mL) gelöst. Nach Zugabe von DIPEA (895 µL, 5.3 mmol) und DMAP (16 mg, 0.13 mmol) erfolgte die Zugabe von TBDMSTf (604 µL, 2.6 mmol). Die Reaktionslösung wurde 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 %iger NaHCO₃-Lösung (10 mL) gequenchet. Die organische Phase wurde abgetrennt, über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der verbliebene Rückstand

chromatographisch aufgereinigt (Kieselgel, 5 % → 25 % Ethylacetat in Cyclohexan). Das gewünschte Produkt **4** wurde als farbloses Öl erhalten (620 mg, 1.2 mmol, 90 %).

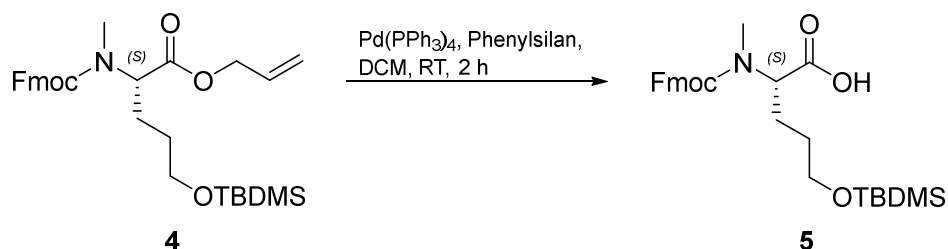
TLC (Ethylacetat/Cyclohexan = 3:1): $R_f = 0.7$.

LC-MS (ESI): $t_R = 13.77$ min, m/z 523.3 berechnet für $C_{30}H_{41}NO_5Si$, gefunden: 523.9 $[M+H]^+$ und 546.2 $[M+Na]^+$.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7.71$ (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 7.55 (q, $J = 3.9$ Hz, 1H), 7.50 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.34 (q, $J = 6.8$ Hz, 2H), 7.25 (t, $J = 8.2$ Hz, 2H), 5.89-5.77 (m, 1H), 5.29-5.21 (m, 1H), 5.17 (d, $J = 10.5$ Hz, 1H), 4.83-4.76 (m, 1H), 4.57 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H), 4.54-4.44 (m, 1H), 4.42-4.30 (m, 2H), 4.26-4.15 (m, 1H), 3.62-3.56 (m, 1H), 2.83 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H), 2.05-1.86 (m, 1H), 1.79-1.62 (m, 1H), 1.60-1.53 (m, 1H), 1.50-1.42 (m, 1H), 1.41-1.30 (m, 1H), 0.84 (s, 9H), 0.00 (d, $J = 3.2$ Hz, 6H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 144.1, 141.5, 127.8, 127.0, 124.9, 120.0, 67.7, 65.6, 62.1, 58.4, 47.6, 29.2, 25.9, 18.5, -5.4$.

5.7.5. Fmoc-N-Me-L-Nva(OTBDMS)-OH (**5**)



Silylether **4** (856 mg, 1.6 mmol) wurde unter Argon in trockenem DCM (10 mL) gelöst. Anschließend wurden Phenylsilan (968 μ L, 8.1 mmol) und Pd(PPh₃)₄ (92 mg, 0.08 mmol) zugegeben. Nach 90 min Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von gesättigter Kochsalzlösung gequenchet. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das erhaltene Rohprodukt chromatographisch aufgereinigt (C18-RP, 40 % → 60 % ACN in Wasser). Das gewünschte Produkt **5** wurde als weißer Feststoff erhalten (554 mg, 1.1 mmol, 71 %).

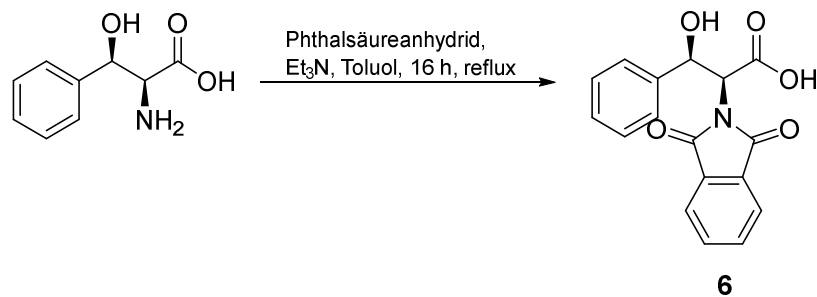
TLC (Ethylacetat/Cyclohexan = 1:1): $R_f = 0.2$.

LC-MS (ESI): $t_R = 12.10$ min, m/z 483.2 berechnet für $C_{27}H_{37}NO_5Si$, gefunden: 484.1 $[M+H]^+$ und 506.3 $[M+Na]^+$.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 7.93 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 7.71-7.63 (m, 2H), 7.47 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 7.38 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 5.30 (s, br, 1H), 4.69-4.52 (m, 1H), 4.49-4.24 (m, 4H), 3.48-3.41 (m, 1H), 2.85 (s, 1H), 2.78 (d, *J* = 11.0 Hz, 2H), 1.98-1.88 (m, 1H), 1.80-1.65 (m, 1H), 1.41-1.29 (m, 1H), 0.88 (s, 9H), 0.06 (s, 1H), 0.00 (s, 5H).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ = 172.4, 169.6, 143.7, 140.7, 127.6, 127.2, 125.2, 120.3, 68.8, 66.9, 66.3, 46.8, 25.9, 22.0, 17.8, -3.1.

5.7.6. Phth-L-Phe(3*R*-OH)-OH (**6**)



L-*threo*-Phenylserin (1 g, 5.5 mmol) wurde in Toluol (25 mL) suspendiert. Anschließend wurden Triethylamin (76 µL, 0.55 mmol) und Phthalsäureanhydrid (815 mg, 5.5 mmol) zugegeben und das Reaktionsgemisch auf 110 °C erhitzt. Nach 16 Stunden wurde das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand chromatographisch aufgereinigt (Kieselgel, 1 % → 10 % Methanol in DCM, 0.1 % Ameisensäure). Das gewünschte Produkt **6** wurde als weißer Feststoff erhalten (1.60 g, 5.14 mmol, 93 %).

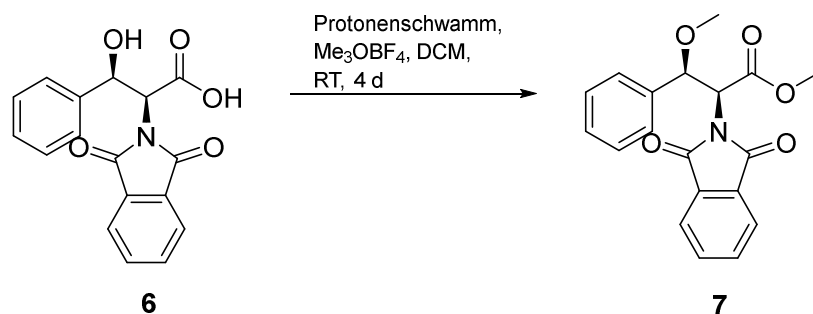
TLC (DCM/MeOH/Ameisensäure = 9:1:0.01): *R_f* = 0.4.

LC-MS (ESI): *t_R* = 7.57 min, *m/z* 311.1 berechnet für C₁₇H₁₃NO₅, gefunden: 311.8 [M+H]⁺.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 7.97-7.85 (m, 4H), 7.44 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.34 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.26 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 5.32 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 5.00 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ = 168.49, 167.34, 163.03, 142.78, 134.85, 131.14, 127.98, 127.41, 127.16, 123.38, 69.39, 57.51, 48.58.

5.7.7. Phth-L-Phe(3R-MeO)-OMe (7)



Phth-L-Phe(3R-OH)-OH **6** (1.60 g, 5.14 mmol) wurde in trockenem DCM (50 mL) unter Argon gelöst. Dann wurden Protonenschwamm (11 g, 51.4 mmol) und Me_3OBF_4 (7.6 g, 51.4 mmol) zugegeben und die resultierende Lösung für 4 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Kieselgel, 25 % \rightarrow 100 % Ethylacet in Cyclohexan). Das gewünschte Produkt **7** wurde als hellgelber, harzartiger Rückstand erhalten (1.02 g, 3.01 mmol, 59 %).

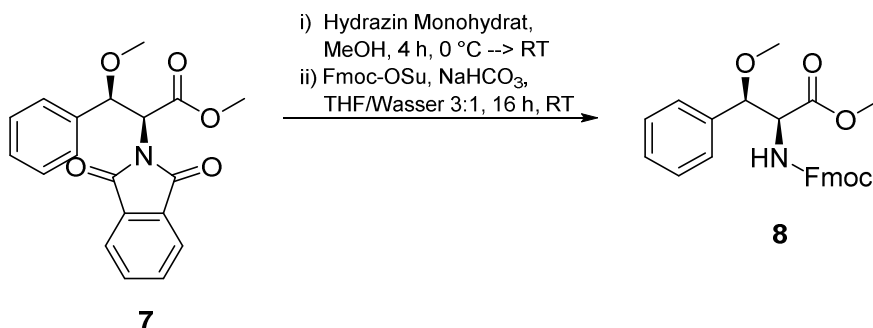
TLC (EtOAc): $R_f = 0.8$.

LC-MS (ESI): $t_R = 9.94$ min, m/z 339.1 berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{NO}_5$, gefunden: 339.7 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 7.98\text{-}7.89$ (m, 4H), 7.44-7.31 (m, 5H), 5.11 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 5.01 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 3.53 (s, 3H), 2.98 (s, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 167.07, 166.81, 138.40, 135.09, 131.60, 130.80, 128.66, 128.37, 127.84, 123.62, 78.64, 59.71, 56.18, 56.10, 52.56, 52.38, 20.71, 14.04$.

5.7.8. Fmoc-L-Phe(3R-MeO)-OMe (8)



Phth-L-Phe(3*R*-MeO)-OMe **7** (1.02 g, 3.01 mmol) wurde in Methanol (10 mL) gelöst und im Eisbad auf 0 °C gekühlt. Dann wurde Hydrazin Monohydrat (435 µL, 13.5 mmol) zugegeben und die resultierende Lösung für 4 Stunden bei 0 °C gerührt.

LC-MS (ESI): $t_R = 6.28$ min, m/z 209.1 berechnet für $C_{11}H_{15}NO_3$, gefunden: 209.8 $[M+H]^+$.

Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der ölige Rückstand in THF:H₂O (3:1, 10 mL) gelöst. Fmoc-OSu (2.53 g, 7.5 mmol) und NaHCO₃ (1.26 g, 15 mmol, vorgelöst in einer minimalen Menge Wasser) wurden zugegeben und die erhaltene Lösung bei Raumtemperatur für 16 Stunden gerührt. Nach Entfernung des Lösemittels unter reduziertem Druck wurde der verbliebene Rückstand mittels Säulenchromatographie (Kieselgel, 10 % → 16 % Ethylacetat in Cyclohexan) aufgereinigt. Es wurden 456 mg (1.06 mmol, 35 %) des gewünschten Produkts **8** erhalten.

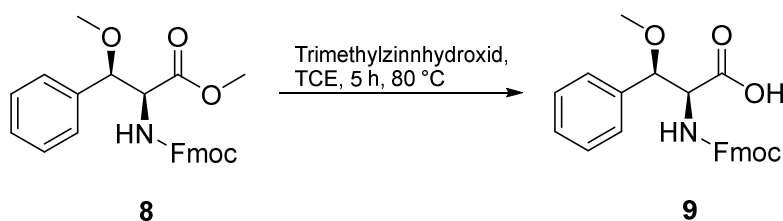
TLC (Cyclohexan/EtOAc = 3:1): $R_f = 0.4$.

LC-MS (ESI): $t_R = 11.20$ min, m/z 431.2 berechnet für $C_{26}H_{25}NO_5$, gefunden: 431.7 $[M+H]^+$.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 7.89$ (d, $J = 7.1$ Hz, 2H), 7.71 (q, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.45-7.27 (m, 10H), 4.72 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H), 4.35 (q, $J = 4.6$ Hz, 1H), 4.13 (s, 3H), 3.57 (s, 3H), 3.17 (s, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 170.46, 156.21, 143.72, 143.67, 140.63, 137.33, 128.14, 128.01, 127.62, 127.21, 127.03, 125.46, 125.37, 120.04, 81.99, 65.94, 60.01, 56.74, 51.95, 46.45$.

5.7.9. Fmoc-L-Phe(3*R*-MeO)-OH (**9**)



Fmoc-L-Phe(3*R*-MeO)-OMe **8** (456 mg, 1.06 mmol) und Me₃SnOH (955 mg, 5.28 mmol) wurden in Trichlorethan (10 mL) gelöst und 5 Stunden bei 80 °C gerührt. Dann wurde die Reaktion durch Zugabe von 5%iger KHSO₄-Lösung gequencht. Die organische Phase wurde separiert, über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Anschließend wurde das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und der verbliebene Rückstand per Säulenchromatographie

aufgereinigt (Kieselgel, 16 % → 50 % Ethylacetat in Cyclohexan, 0.1 % Ameisensäure). Das Produkt **9** (263 mg, 0.63 mmol, 60 %) wurde als weißer Feststoff erhalten.

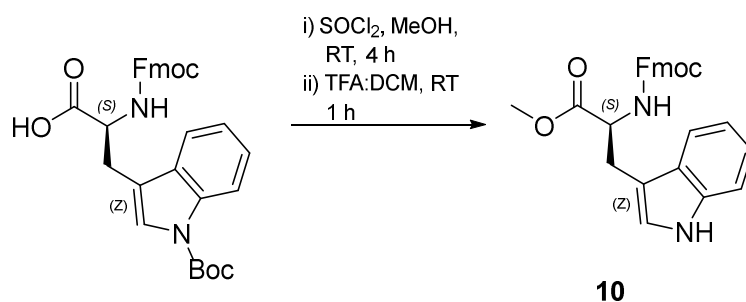
TLC (Cyclohexan:EtOAc:Ameisensäure = 1:1:0.01): $R_f = 0.4$.

LC-MS (ESI): $t_R = 10.12$ min, m/z 417.1 berechnet für $C_{25}H_{23}NO_5$, gefunden: 417.8 $[M+H]^+$.

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 7.87$ (d, $J = 7.3$, 2H), 7.76-7.66 (m, 3H), 7.49-7.20 (m, 9H), 4.78 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H), 4.30 (q, $J = 4.1$ Hz, 1H), 4.14-4.05 (m, 3H), 3.18 (s, 3H).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 171.41$, 167.34, 156.26, 143.74, 143.69, 140.59, 137.78, 131.62, 131.40, 128.67, 128.06, 127.80, 127.60, 127.25, 127.03, 125.55, 125.42, 120.01, 82.15, 65.93, 59.78, 56.78, 52.57, 46.46.

5.7.10. Fmoc-L-tryptophan-methylester (**10**)



Fmoc-L-Trp(Boc)-OH (5 g, 11.7 mmol) wurde in 100 mL Methanol gelöst. Die resultierende Lösung wurde im Eisbad auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde vorsichtig Thionylchlorid (7.5 mL, 103 mmol) unter Rühren hinzugesetzt. Nach weiteren 15 min bei 0 °C wurde das Eisbad entfernt und die Reaktionslösung für 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wurde unter reduziertem Druck entfernt, der verbliebene Rückstand in DCM:TFA (1:1, 20 mL) gelöst und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 16 Stunden wurde die Reaktionslösung mit gesättigter NaCl-Lösung (50 mL) versetzt. Die organische Phase wurde abgetrennt, über $MgSO_4$ getrocknet und filtriert. Nach Evaporation des Lösemittels wurde das erhaltene Rohprodukt **10** im Hochvakuum final getrocknet und ohne weitere Aufreinigung für die nächste Synthesestufe verwendet. Ausbeute: 3.57 g (8.09 mmol, 69 %).

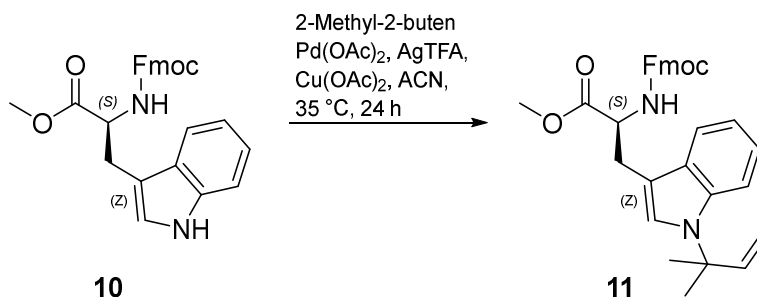
TLC (Ethylacetat/Cyclohexan = 1:1): $R_f = 0.7$.

LC-MS (ESI): $t_R = 10.02$ min, m/z 440.2 berechnet für $C_{27}H_{24} N_2O_4$, gefunden: 440.9 $[M+H]^+$.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.96 (s, 1H), 7.57 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.40-7.30 (m, 3H), 7.22 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 7.17-7.06 (m, 3H), 7.02 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 6.94 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 6.74 (s, 1H), 5.21 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 4.57 (q, J = 6.2 Hz, 1H), 4.26-4.14 (m, 2H), 4.02 (t, J = 7.1 Hz, 1H), 3.50 (s, 3H), 3.15 (d, J = 5.0 Hz, 2H).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ = 172.48, 155.83, 143.94, 143.81, 141.34, 136.18, 127.73, 127.62, 125.18, 122.91, 122.31, 120.01, 119.79, 118.59, 111.33, 109.92, 67.11, 67.01, 54.62, 52.43, 47.19, 30.96, 27.99.

5.7.11. Fmoc-L-*N'*-tert-prenyl-tryptophan-methylester (**11**)

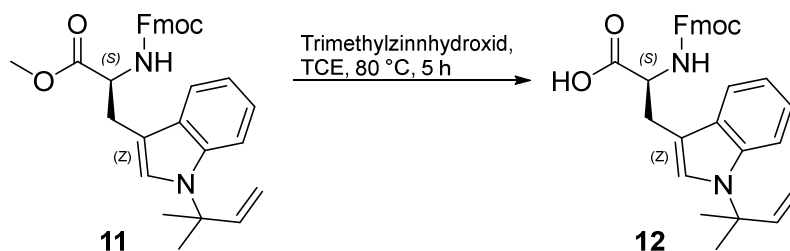


Fmoc-L-Trp-OMe **10** (2 g, 4.54 mmol), Kupfer(II)acetat (1.64 g, 9.03 mmol) und Silbertrifluoracetat (2 g, 9.05 mmol) wurden in einen Rundkolben gegeben, im Hochvakuum getrocknet und mit Argon gespült. Anschließend wurden unter Argon zunächst trockenes Acetonitril (35 mL), dann Palladium(II)acetat (112 mg, 0.57 mmol) und schließlich 2-Methyl-2-Buten (14.5 mL, 170 mmol) hinzugegeben. Die resultierende Suspension wurde auf 35 °C erwärmt und bei dieser Temperatur für 16 Stunden weiter gerührt. Nach 60, 120 und 180 min wurden jeweils weiteres Palladium(II)acetat (je 112 mg) zugegeben. Am Folgetag wurde das Lösemittel evaporiert und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Durch säulenchromatographische Aufreinigung (Kieselgel, 10% → 16 % Ethylacetat in Cyclohexan) konnte das gewünschte prenylierte Produkt **11** isoliert werden (1.32 g, 2.60 mmol, 57 %).

TLC (Ethylacetat/Cyclohexan = 1:3): R_f = 0.4.

LC-MS (ESI): t_R = 12.22 min, m/z 508.2 berechnet für $\text{C}_{32}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_4$, gefunden: 509.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): δ = 7.88 (d, J = 7.7 Hz, 2H), 7.72 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.67 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 7.59 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.49-7.35 (m, 4H), 7.32-7.21 (m, 2H), 7.09-6.97 (m, 2H), 6.09 (q, J = 9.3 Hz, 1H), 5.16 (d, J = 10.8 Hz, 1H), 5.10 (d, J = 17.4 Hz, 1H), 4.29-4.12 (m, 4H), 3.21 (dd, J = 4.1/14.7 Hz, 1H), 3.08-2.96 (m, 1H), 1.65 (s, 6H), 1.40 (s, 3H).

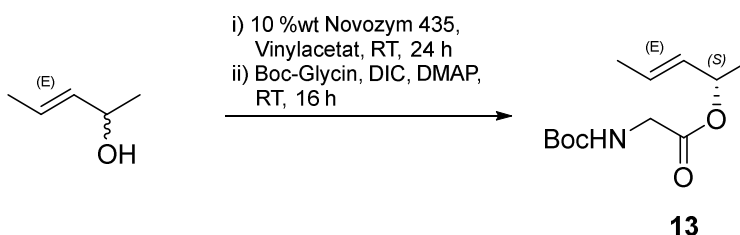
5.7.12. Fmoc-L-*N'*-*tert*-prenyl-tryptophan (12)


Fmoc-L-*N'*-*tert*-prenyl-tryptophan-methylester **11** (516 mg, 1.02 mmol) wurde in 1,1,2-Trichlorethan (10 mL) gelöst. Nach Zugabe von Trimethylzinnhydroxid (920 mg, 5.09 mmol) wurde die Reaktionslösung für 5 Stunden bei 80 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt, der verbliebene Rückstand im Hochvakuum getrocknet und mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (Kieselgel, 25 % Ethylacetat in Cyclohexan, 0.1 % Ameisensäure). Das Produkt **12** wurde als beiger Feststoff erhalten (469 mg, 0.95 mmol, 93 %).

TLC (Ethylacetat/Cyclohexan/Ameisensäure = 75:25:0.1): $R_f = 0.3$.

LC-MS (ESI): $t_R = 11.35$ min, m/z 494.2 berechnet für $C_{31}H_{30}N_2O_4$, gefunden: 494.9 $[M+H]^+$.

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 7.92$ -7.83 (m, 3H), 7.70-7.65 (m, 2H), 7.54 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.45-7.37 (m, 3H), 7.35-7.24 (m, 3H), 7.08-6.98 (m, 2H), 6.09 (q, $J = 9.4$ Hz, 1H), 5.18 (d, $J = 10.5$ Hz, 1H), 5.09 (d, $J = 17.3$ Hz, 1H), 4.32 (q, $J = 7.5$ Hz, 1H), 4.27-4.22 (m, 2H), 4.19 (q, $J = 6.0$ Hz, 1H), 3.18 (dd, $J = 5.2/14.5$ Hz, 1H), 3.10-3.01 (m, 1H), 1.66 (s, 6H).

5.7.13. (*S,E*)-*N*-Boc-glycin-(3-penten-2-yl)-ester (13)


3-Penten-2-ol (998 mg, 11.56 mmol) und Novozym 435 (150 mg, immobilisiert auf Acrylharz, 5000 U/g) wurden in Vinylacetat (10 mL) suspendiert und bei Raumtemperatur für 24 Stunden geschüttelt.

Das immobilisierte Enzym wurde abfiltriert und das Filtrat mit DCM (15 mL) verdünnt. Boc-Gly-OH (1 g, 5.71 mmol), Diisopropylcarbodiimid (885 μ L, 5.71 mmol) und DMAP (70 mg, 0.57

mmol) wurden hinzugegeben und die resultierende Lösung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung filtriert, das Filtrat unter reduziertem Druck eingengt und chromatographisch aufgereinigt (Kieselgel, 16 % Ethylacetat in Cyclohexan). Das Produkt **13** wurde als farbloses Öl erhalten (916 mg, 3.76 mmol, 33 %).

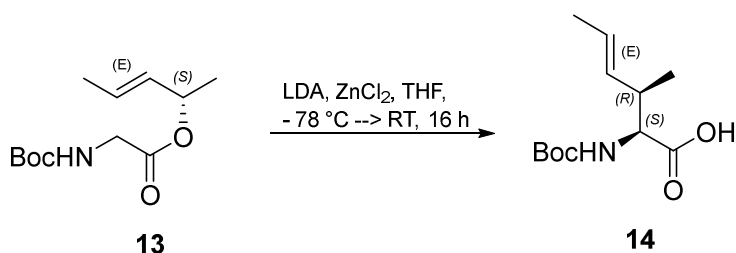
TLC (Ethylacetat/Cyclohexan = 1:4): $R_f = 0.3$.

LC-MS (ESI): $t_R = 9.53$ min, m/z 243.2 berechnet für $C_{12}H_{21}NO_4$, gefunden: 243.5 $[M+H]^+$.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 5.79$ - 5.68 (m, 1H), 5.47 (dd, $J = 6.7/15.0$ Hz, 1H), 5.40 - 5.32 (m, 1H), 5.15 - 4.86 (br s, 1H), 3.95 - 3.78 (br s, 2H), 1.79 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 1.45 (s, 9H), 1.31 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 169.7$, 155.8 , 130.3 , 128.9 , 79.9 , 72.5 , 42.7 , 28.4 , 20.3 , 17.7 .

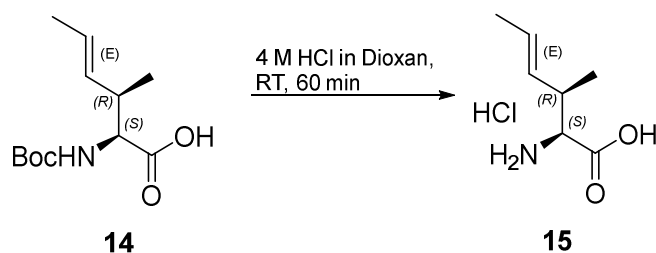
5.7.14. (2*S*,3*R*,*E*)-*N*-Boc-2-amino-3-methylhex-4-ensäure (**14**)



(*S*,*E*)-*N*-Boc-glycin-(3-penten-2-yl)-ester **13** (780 mg, 3.21 mmol) und $ZnCl_2$ (523 mg, 3.74 mmol) wurden in trockenem Tetrahydrofuran (15 mL) gelöst. Das Reaktionsgemisch wurde mit einer Kältemischung (Aceton/Trockeneis) auf -78 °C gekühlt. Anschließend wurde eine LDA-Lösung (2 M in Heptan/THF, 4.8 mL, 9.6 mmol) hinzugegeben. Die Lösung wurde 30 min bei -78 °C gerührt, langsam auf Raumtemperatur erwärmt und für weitere 16 Stunden gerührt. Die Reaktion wurde mit 5 %iger $KHSO_4$ -Lösung gequench und dreimal gegen Ethylacetat ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Extrakte wurden über $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und bis zur Trockne eingengt. Das erhaltene Rohprodukt **14** wurde ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt.

LC-MS (ESI): $t_R = 8.46$ min, m/z 243.2 berechnet für $C_{12}H_{21}NO_4$, gefunden: 143.9 $[M-\text{Boc}+H]^+$.

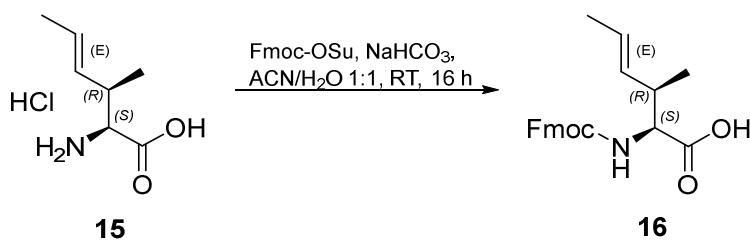
5.7.15. (2*S*,3*R*,*E*)-2-amino-3-methylhex-4-ensäure (15)



Die Boc-geschützte Aminosäure **14** wurde in 4 M HCl in 1,4-Dioxan (10 mL) gelöst und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 60 min wurde das Lösemittel unter reduziertem Druck entfernt und das gewünschte Produkt **15** im Hochvakuum getrocknet. Die weitere Umsetzung erfolgte ohne weitere Aufreinigung.

LC-MS (ESI): $t_R = 1.83 \text{ min}$, m/z 143.1 berechnet für $C_7H_{13}NO_2$, gefunden: 143.8 $[M+H]^+$.

5.7.16. (2*S*,3*R*,*E*)-*N*-Fmoc-2-amino-3-methylhex-4-ensäure (16)



15 wurde in einem Gemisch aus Acetonitril und Wasser (1:1, 20 mL) gelöst. Natriumhydrogencarbonat (837 mg, 9.96 mmol) und Fmoc-OSu (1.68 g, 4.98 mmol) wurden zugegeben und die resultierende Lösung 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden DCM (50 mL) und 5 %ige $KHSO_4$ -Lösung (50 mL) zugegeben. Die organische Phase wurde abgetrennt, über $MgSO_4$ getrocknet und filtriert. Das Lösemittel wurde durch Evaporation entfernt und der erhaltene Rückstand chromatographisch aufgereinigt (C18-RP, 40 % \rightarrow 70 % Acetonitril in Wasser, 0.1 % Ameisensäure). Das gewünschte Produkt **16** wurde als weißer Feststoff erhalten (627 mg, 1.72 mmol, 54 %).

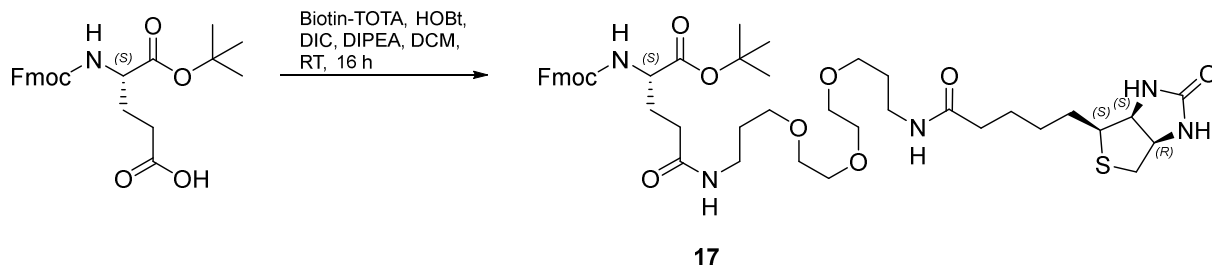
TLC (Ethylacetat/Cyclohexan/Ameisensäure = 1:1:0.01): $R_f = 0.4$.

LC-MS (ESI): $t_R = 10.15 \text{ min}$, m/z 365.4 berechnet für $C_{22}H_{23}NO_4$, gefunden: 365.8 $[M+H]^+$.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7.79$ (d, $J = 7.3 \text{ Hz}$, 2H), 7.61 (s, 2H), 7.43 (t, $J = 7.2 \text{ Hz}$, 2H), 7.34 (t, $J = 7.2 \text{ Hz}$, 2H), 6.30-6.12 (br s, 1H), 5.62-5.49 (m 1H), 5.41-5.30 (m, 2H), 4.52-4.35 (m, 3H), 4.25 (t, $J = 6.2 \text{ Hz}$, 1H), 2.69 (s, 1H), 1.70 (d, $J = 5.3 \text{ Hz}$, 3H), 1.13 (d, $J = 6.3 \text{ Hz}$, 3H).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 175.6, 156.0, 143.8, 141.4, 130.8, 127.7, 127.1, 125.0, 119.9, 67.2, 58.1, 50.7, 47.2, 39.6, 17.9, 16.2$.

5.7.17. Fmoc-L-Glu(TOTA-Biotin)-OtBu (17)



Fmoc-L-Glu-OtBu (425 mg, 1 mmol) und Biotin-TOTA (670 mg, 1.5 mmol) wurden in DCM (10 mL) gelöst. Nach Zugabe von HOBt Hydrat (306 mg, 2 mmol), DIC (309 μL , 2 mmol) und Triethylamin (277 μL , 2 mmol) wurde die resultierende Lösung 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde 5 %ige NaHCO_3 -Lösung (10 mL) zugegeben, die organische Phase abgetrennt, über MgSO_4 getrocknet und filtriert. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der verbliebene Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Nach chromatographischer Aufreinigung (Kieselgel, 5 % \rightarrow 25 % Methanol in DCM) wurde das gewünschte Produkt als weißer Feststoff erhalten (646 mg, 0.76 mmol, 76 %).

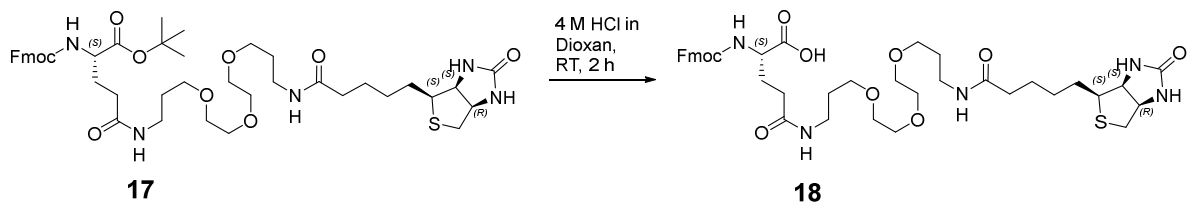
TLC (DCM/Methanol = 9:1): $R_f = 0.3$.

LC-MS (ESI): $t_R = 8.56$ min, m/z 853.4 berechnet für $\text{C}_{44}\text{H}_{63}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{S}$, gefunden: 854.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 7.90$ (d, $J = 7.7$ Hz, 2H), 7.81 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H), 7.77-7.70 (m, 3H), 7.67 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.43 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.34 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 6.24 (s, 1H), 6.35 (s, 1H), 4.34-4.19 (m, 4H), 4.15-4.11 (m, 1H), 3.91-3.85 (m, 1H), 3.53-3.44 (m, 8H), 3.38 (t, $J = 6.0$ Hz, 4H), 3.12-3.03 (m, 5H), 2.81 (dd, $J = 5.2/12.2$ Hz, 1H), 2.58 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H), 2.17 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.05 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.99-1.89 (m, 1H), 1.81-1.72 (m, 1H), 1.65-1.57 (m, 5H), 1.53-1.44 (m, 3H), 1.39 (s, 9H), 1.34-1.23 (m, 2H).

^{13}C NMR (400 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 171.8, 171.4, 171.1, 162.8, 156.1, 143.8, 140.7, 127.6, 127.1, 125.2, 120.2, 80.6, 69.7, 69.5, 68.0, 65.6, 61.0, 59.1, 55.4, 54.1, 48.5, 46.6, 35.7, 35.2, 31.6, 29.3, 28.1, 27.9, 27.6, 26.6, 25.2$.

5.7.18. Fmoc-L-Glu(TOTA-Biotin)-OH (**18**)



tert-Butyl-Ester **17** (300 mg, 0.35 mmol) wurde in 4 M HCl in 1,4-Dioxan (5 mL) gelöst und 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach Trocknung im Hochvakuum wurde die freie Säure **18** als weißer Feststoff erhalten (291 mg, 0.35 mmol, Hydrochlorid).

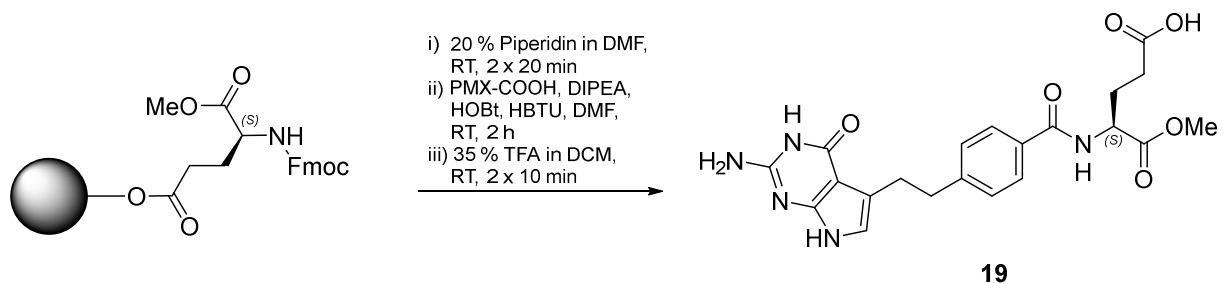
TLC (DCM/Methanol/Ameisensäure = 3:1:0.02): $R_f = 0.3$.

LC-MS (ESI): $t_R = 7.21\ min$, $m/z\ 797.4$ berechnet für $C_{44}H_{63}N_5O_{10}S$, gefunden: $798.2\ [M+H]^+$.

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 7.91$ (d, $J = 7.6\ Hz$, 2H), 7.86-7.77 (m, 2H), 7.74 (d, $J = 7.1\ Hz$, 2H), 7.67 (d, $J = 8.1\ Hz$, 1H), 7.43 (t, $J = 7.4\ Hz$, 2H), 7.33 (d, $J = 7.4\ Hz$, 2H), 4.34-4.18 (m, 4H), 4.15-4.10 (m, 1H), 3.98-3.91 (m, 1H), 3.75-3.64 (m, 3H), 3.52-3.43 (m, 8H), 3.39 (t, $J = 5.8\ Hz$, 4H), 3.13-3.02 (m, 5H), 2.81 (dd, $J = 5.0/12.3\ Hz$, 1H), 2.59 (d, $J = 12.1\ Hz$, 1H), 2.18 (t, $J = 7.3\ Hz$, 2H), 2.05 (t, $J = 7.3\ Hz$, 2H), 2.01-1.93 (m, 1H), 1.84-1.72 (m, 1H), 1.65-1.55 (m, 5H), 1.53-1.41 (m, 3H), 1.34-1.22 (m, 2H).

^{13}C NMR (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 173.7, 171.9, 171.1, 162.8, 156.1, 143.8, 140.7, 127.6, 127.0, 125.3, 120.1, 72.1, 70.4, 69.7, 69.5, 68.0, 66.3, 65.6, 61.1, 60.2, 59.3, 55.4, 53.4, 46.6, 43.6, 35.7, 35.1, 31.8, 29.3, 28.2, 28.0, 26.7, 25.2$.

5.7.19. Pemetrexed-Methylester (**19**)



Fmoc-L-Glu-OMe (383 mg, 1 mmol) und DIPEA (510 μ L, 3 mmol) wurden in DMF (10 mL) gelöst und zu 2-Chlorotrityl-Harz (1.25 g, 1.6 mmol/g) gegeben. Die erhaltene Suspension wurde 16 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt.

Nachdem das Harz abfiltriert und mit 2 x DMF, 2 x DCM, 2 x DMF gewaschen wurde, wurde eine Mischung aus DCM:MeOH (4:1, 10 mL) und DIPEA (510 μ L, 3 mmol) zum Harz gegeben und die Suspension für 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt.

Das Harz wurde erneut gewaschen (2 x DMF, 2 x DCM, 2 x DMF). Anschließend wurde die Fmoc-Gruppe durch Zugabe von Piperidin:DMF (1:4, 10 mL) abgespalten. Die Suspension wurde bei Raumtemperatur für 20 min geschüttelt. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt, bevor das Harz erneut gewaschen wurde (2 x DMF, 2 x DCM, 2 x DMF).

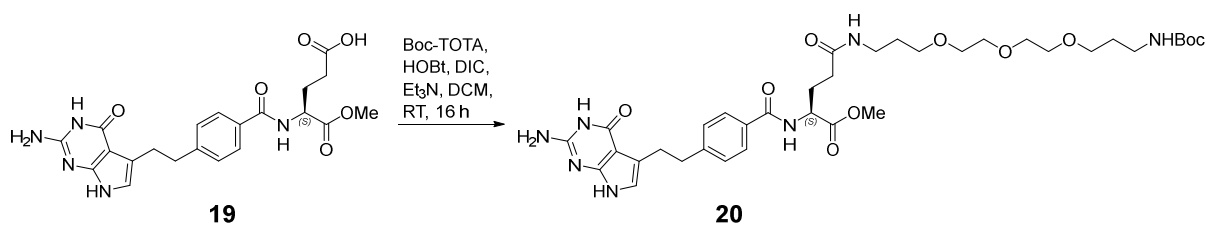
4-[2-(2-Amino-4,7-dihydro-4-oxo-3H-pyrrolo[2,3]pyrimidin-5-yl)ethyl]benzoesäure (447 mg, 1.5 mmol), DIPEA (341 μ L, 2 mmol), HOBt Monohydrat (306 mg, 2 mmol) und HBTU (759 mg, 2 mmol) wurden in DMF (10 mL) gelöst und 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde diese Lösung zum Harz gegeben und die resultierende Suspension wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt.

Nachdem erneutes Waschen des Harzes (5 x DCM) wurde eine 35 %ige Lösung von TFA in DCM (10 mL) zugegeben. Nach 10-minütigem Schütteln bei Raumtemperatur wurde dieser Schritt einmal wiederholt. Anschließend wurde das Harz mit DCM gewaschen (3 x 5 mL), die Wasch- und Abspaltlösungen wurden vereinigt und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Pemetrexed-Methylester **19** wurde als rosafarbener Feststoff erhalten und ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt (429 mg, 0.97 mmol, 97 %).

LC-MS (ESI): t_R = 5.55 min, m/z 441.2 berechnet für $C_{21}H_{23}N_5O_6$, gefunden: 442.1 $[M+H]^+$.

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 10.81 (s, 1H), 10.55 (s, 1H), 8.65 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.79 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.30 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 6.37 (s, 1H), 4.49-4.42 (m, 3H), 3.64 (s, 3H), 3.04-2.95 (m, 2H), 2.90-2.86 (m, 2H), 2.73 (s, 1H), 2.37 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 2.31-2.03 (m, 1H), 2.02-1.92 (m, 1H).

5.7.20. Boc-TOTA-Pemetrexed-Methylester (**20**)



Carbonsäure **19** (420 mg, 0.95 mmol), Et₃N (263 µL, 1.9 mmol), HOBt Monohydrat (214 mg, 1.4 mmol), DIC (294 µL, 1.9 mmol) und Boc-TOTA (456 mg, 1.4 mmol) wurden in DMF (5 mL) gelöst und 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

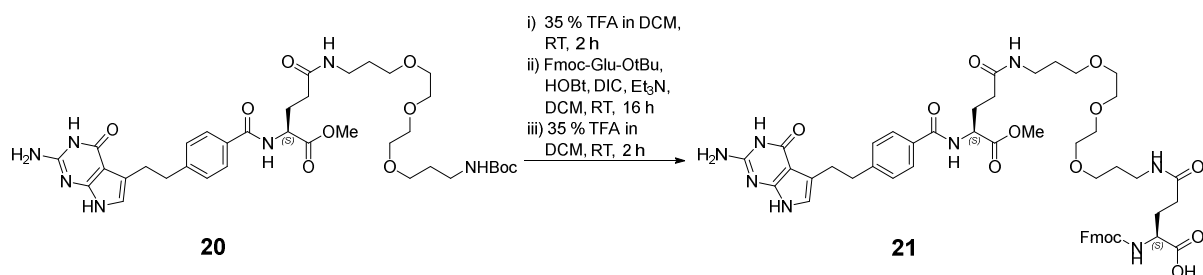
Anschließend wurde das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und der verbliebene Rückstand chromatographisch aufgereinigt (C18-RP, 25 % → 50 % Acetonitril in Wasser). Das gewünschte Produkt **20** wurde als fahlgrüner Feststoff erhalten (406 mg, 0.55 mmol, 58 %).

TLC (DCM/Methanol = 5:1): R_f = 0.6.

LC-MS (ESI): t_R = 6.74 min, m/z 743.4 berechnet für C₃₆H₅₃N₇O₁₀, gefunden: 744.0 [M+H]⁺.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 10.60 (s, 1H), 10.14 (s, 1H), 8.71 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.86-7.77 (m, 3H), 7.30 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 6.77-6.71 (m, 1H), 6.31 (s, 1H), 6.00 (s, 2H), 4.43-4.36 (m, 1H), 3.64 (s, 3H), 3.53-3.43 (m, 9H), 3.39-3.36 (m, 3H), 3.08 (q, J = 6.5 Hz, 2H), 3.01-2.92 (m, 4H), 2.86 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 2.22 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 2.13-2.03 (m, 1H), 2.00-1.91 (m, 1H), 1.64-1.55 (m, 4H), 1.37 (s, 9H).

5.7.21. Fmoc-L-Glu(TOTA-Pemetrexed-Methylester)-OH (**21**)



Das Boc-geschützte Amin **20** (406 mg, 0.55 mmol) wurde in 35 %iger TFA in DCM (5 mL) gelöst und 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

LC-MS (ESI): t_R = 4.96 min, m/z 643.3 berechnet für C₃₁H₄₅N₇O₈, gefunden: 644.2 [M+H]⁺.

Dann wurde das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und der verbliebene Rückstand in DCM (10 mL) gelöst. Fmoc-L-Glu-OtBu (281 mg, 0.66 mmol), HOBt Monohydrat (168 mg, 1.1 mmol), DIC (170 µL, 1.1 mmol) und Et₃N (305 µL, 2.2 mmol) wurden zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 %iger NaHCO₃-Lösung (10 mL) gequencht. Die organische Phase wurde abgetrennt, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck bis zur Trockne eingengt.

LC-MS (ESI): $t_R = 8.39$ min, m/z 1050.1 berechnet für $C_{55}H_{70}N_8O_{13}$, gefunden: 1051.1 $[M+H]^+$.

Der verbliebene Rückstand wurde ohne weitere Aufreinigung direkt weiter umgesetzt und in 35 %iger TFA in DCM (5 mL) gelöst. Nach 2 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und der resultierende Rückstand chromatographisch aufgereinigt (C18-RP, 30 % \rightarrow 70 % Acetonitril in Wasser). Das gewünschte Produkt **21** wurde als blauer Feststoff erhalten (382 mg, 0.38 mmol, 69 %).

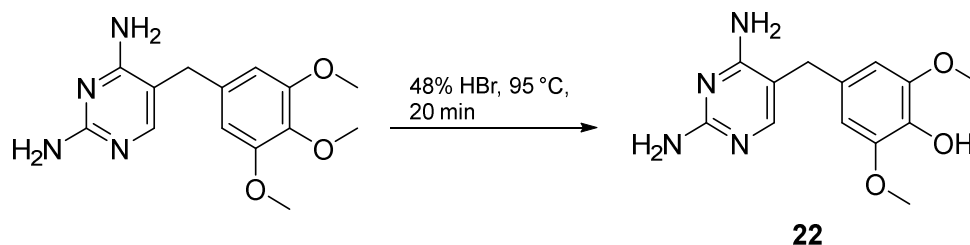
TLC (DCM/Methanol = 3:1): $R_f = 0.3$.

LC-MS (ESI): $t_R = 7.20$ min, m/z 994.4 berechnet für $C_{51}H_{62}N_8O_{13}$, gefunden: 995.2 $[M+H]^+$.

1H NMR (400 MHz, MeOD): $\delta = 7.82$ -7.74 (m, 5H), 7.68 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 7.39 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H), 7.31 (t, $J = 6.8$ Hz, 5H), 6.33 (s, 1H), 4.59 (q, $J = 4.6$ Hz, 1H), 4.42-4.35 (m, 2H), 4.31 (t, $J = 8.7$ Hz, 1H), 4.26-4.15 (m, 3H), 3.74 (s, 3H), 3.59-3.44 (m, 15H), 3.29-3.18 (m, 5H), 3.08-3.02 (m, 2H), 3.01-2.95 (m, 2H), 2.32-2.07 (m, 6H), 2.01-1.91 (m, 1H), 1.76-1.69 (m, 4H).

^{13}C NMR (400 MHz, MeOD): $\delta = 175.4, 174.8, 173.9, 152.7, 148.4, 145.2, 142.6, 129.8, 128.9, 128.5, 128.2, 126.3, 120.9, 119.8, 116.1, 71.5, 71.1, 69.9, 68.1, 54.1, 52.8, 38.0, 33.5, 30.4, 29.3, 28.0$.

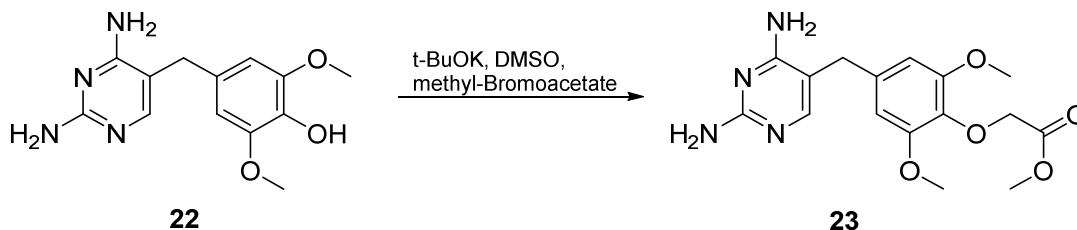
5.7.22. 4-((2,4-Diaminopyrimidin-5-yl)methyl)-2,6-dimethoxyphenol (**22**)



Trimethoprim (3 g, 10.3 mmol) wurde in zuvor auf 95 °C erhitzter wässriger HBr (48 %, 30 mL) gelöst und 20 min bei dieser Temperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von Natronlauge (50 Gew.-%, 6 mL) gequencht. Nachdem das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurden die gebildeten Kristalle abfiltriert und mit Eiswasser gewaschen. Der erhaltene weiße Niederschlag wurde in kochendem Wasser (25 mL) resuspendiert und für 20 min erhitzt, bevor das Reaktionsgemisch durch Zugabe von NH_4OH (30 %ige wässrige Lösung) neutralisiert wurde. Die gebildeten weißen Kristalle wurden abfiltriert und mit Eiswasser gewaschen. Nach Trocknung im Hochvakuum wurde das Rohprodukt **22** als weißer kristalliner Feststoff erhalten (1.34 g, 4.85 mmol, 47 %).

LC-MS (ESI): $t_R = 3.12$ min, m/z 276.1 berechnet für $C_{13}H_{16}N_4O_3$, gefunden: 277.2 $[M+H]^+$.

5.7.23. 2-(4-((2,4-Diaminopyrimidin-5-yl)methyl)-2,6-dimethoxyphenoxy)essigsäure methylester (23)

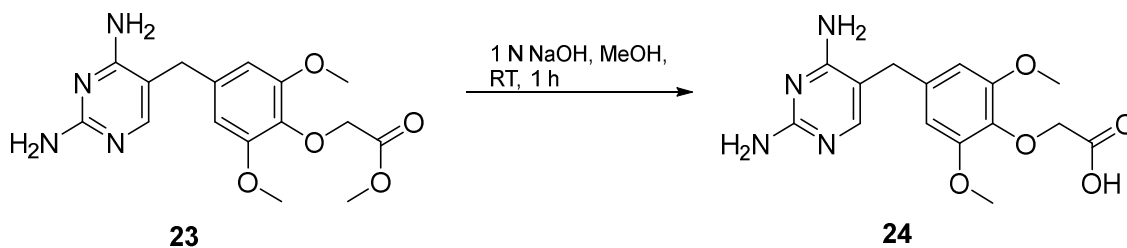


Das erhaltene Phenol **21** (1.2 g, 4.3 mmol) wurde ohne weitere Aufreinigung unter Argon in trockenem DMSO (15 mL) gelöst. Dann wurde Kalium-*tert*-butanolat (531 mg, 4.7 mmol) zugeben. Die Reaktionslösung wurde 15 min bei Raumtemperatur gerührt, bevor Bromomethylacetat (438 μ L, 4.7 mmol) hinzugefügt wurde. Nach 90 min Rühren bei RT wurde das Lösemittel im Hochvakuum evaporiert und der verbliebene Rückstand chromatographisch aufgereinigt (Kieselgel, 5 % \rightarrow 10 % MeOH in DCM). Das gewünschte Produkt konnte als weißer Feststoff erhalten werden (1.16 g, 3.3 mmol, 77 %).

TLC (DCM/MeOH 5:1): R_f 0.5.

LC-MS (ESI): $t_R = 4.85$ min, m/z 348.1 berechnet für $C_{16}H_{20}N_4O_5$, gefunden: 349.2 $[M+H]^+$.

5.7.24. 2-(4-((2,4-Diaminopyrimidin-5-yl)methyl)-2,6-dimethoxyphenoxy)essigsäure (24)

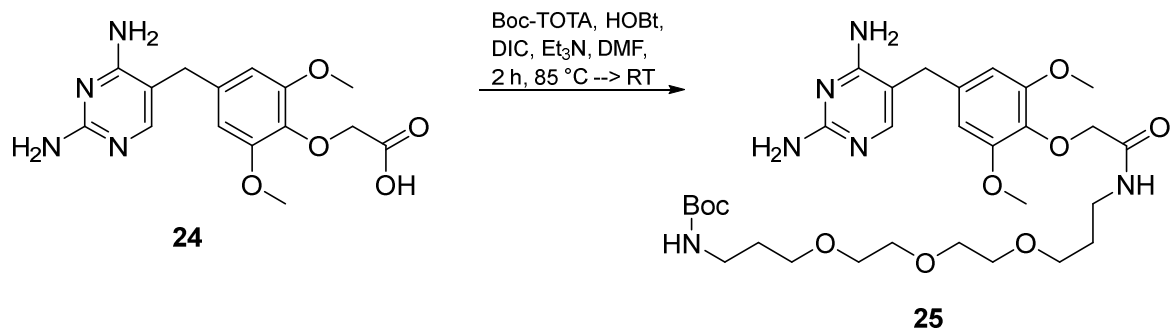


Ester **23** (1.16 g, 3.3 mmol) wurde in MeOH (7 mL) gelöst. Anschließend wurde 1N NaOH (3.3 mL) zugegeben. Nach einer Stunde wurde das Reaktionsgemisch mit 1N HCl neutralisiert. Der ausfallende Niederschlag wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Die gewünschte Carbonsäure **24** wurde als weißer Feststoff erhalten (670 mg, 2.0 mmol, 61 %).

LC-MS (ESI): $t_R = 4.28$ min, m/z 334.1 berechnet für $C_{15}H_{18}N_4O_5$, gefunden: 335.1 $[M+H]^+$.

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 7.46$ (s, 1H), 6.57 (s, 2H), 4.25 (s, 2H), 3.72 (s, 6H), 3.54 (s, 2H).

5.7.25. Boc-TOTA-TMP (25)



TMP-COOH **24** (334 mg, 1mmol) wurde in DMF (10 mL) suspendiert. Nach Zugabe von Boc-TOTA-NH₂ (480 mg, 1.5 mmol), HOBt Monohydrat (306 mg, 2 mmol), Triethylamin (554 µL, 4 mmol) und Diisopropylcarbodiimid (309 µL, 2 mmol) wurde die resultierende Suspension auf 85 °C erhitzt, bis eine klare Lösung vorlag. Die Reaktionslösung wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und 2 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt und der verbliebene Rückstand im Hochvakuum getrocknet.

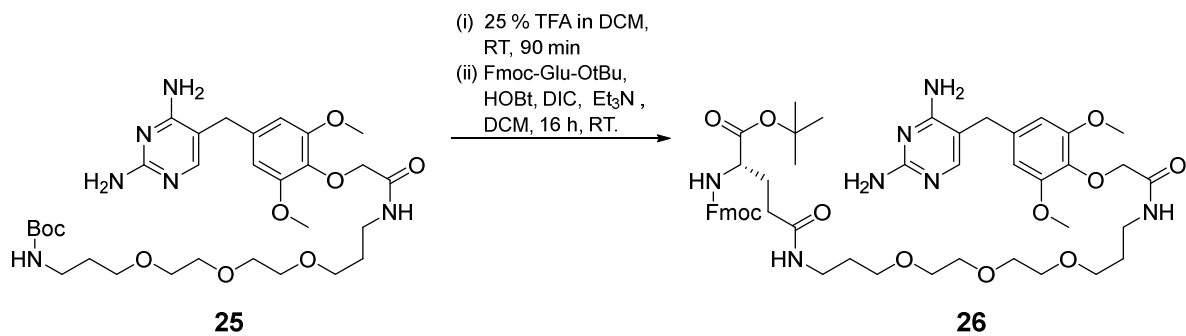
Der Rückstand wurde in Ethylacetat gelöst (10 mL) und gegen 5 %ige NaHCO₃-Lösung (10 mL) ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde abgetrennt, über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Nachdem das Lösemittel unter reduziertem Druck entfernt worden war, wurde das Rohprodukt im Hochvakuum getrocknet und anschließend chromatographisch aufgereinigt (C18-RP, 20 % → 40 % ACN in Wasser). Das gewünschte Produkt **25** wurde als farbloses, harzartiges Öl erhalten (361 mg, 0.57 mmol, 57 %).

TLC (DCM/MeOH 3:1): R_f 0.8.

LC-MS (ESI): t_R = 5.90 min, m/z 636.4 berechnet für C₃₀H₄₈N₆O₉, gefunden: 637.1 [M+H]⁺.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 7.95 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 7.53 (s, 1H), 6.74 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 6.61 (s, 2H), 6.09 (s, 2H), 5.68 (s, 2H), 4.26 (s, 2H), 3.77 (s, 6H), 3.54 (s, 2H), 3.52-3.35 (m, 12H), 3.23 (q, J = 6.5 Hz, 2H), 2.96 (q, J = 6.5 Hz, 2H), 1.74-1.66 (m, 2H), 1.63-1.54 (m, 2H), 1.37 (s, 9H).

5.7.26. Fmoc-L-Glu(TOTA-TMP)-OtBu (26)



25 (361 mg, 0.57 mmol) wurde in DCM:TFA (3:1, 10 mL) gelöst. Nach 90 min wurde das Lösemittel unter reduziertem Druck entfernt, der verbliebene Rückstand im Hochvakuum getrocknet und ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt.

LC-MS (ESI): $t_R = 4.25$ min, m/z 536.3 berechnet für C₂₅H₄₀N₆O₇, gefunden: 537.3 [M+H]⁺.

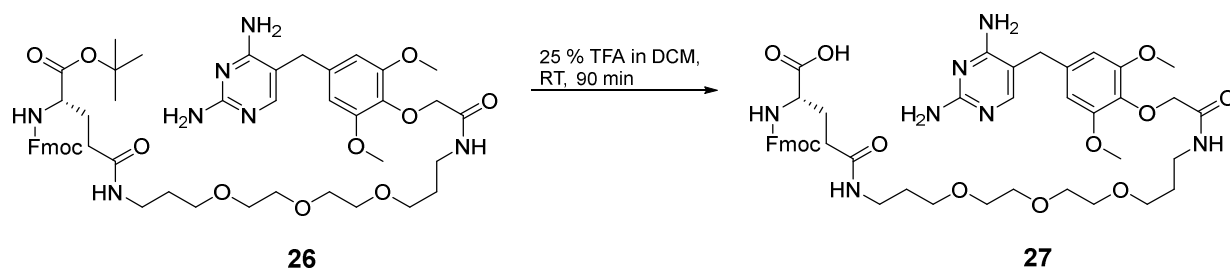
Das freie Amin wurde unter Argon in trockenem DCM (10 mL) gelöst. Dann wurden Fmoc-L-Glu-OtBu (448 mg, 1.1 mmol), HOBt Monohydrat (336 mg, 2.2 mmol), Triethylamin (610 µL, 4.4 mmol) und Diisopropylcarbodiimid (340 µL, 2.2 mmol) zugegeben. Nach 16 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösemittel unter reduziertem Druck entfernt, der Rückstand im Hochvakuum getrocknet und anschließend chromatographisch aufgereinigt (C18-RP, 30 % → 45 % ACN in Wasser). Das gewünschte Produkt **26** wurde als weißer Feststoff erhalten (360 mg, 0.38 mmol, 70 %).

TLC (DCM/MeOH 3:1): R_f 0.8.

LC-MS (ESI): $t_R = 7.63$ min, m/z 943.5 berechnet für C₄₉H₆₅N₇O₁₂, gefunden: 944.3 [M+H]⁺.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 7.95-7.87 (m, 3H), 7.79 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H), 7.73 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.68 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.56 (br s, 1H), 7.43 (t, $J = 8.1$ Hz, 3H), 7.34 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 6.68 (s, 2H), 4.34-4.20 (m, 5H), 3.91-3.85 (m, 1H), 3.78 (s, 6H), 3.61 (s, 2H), 3.53-3.68 (m, 12H), 3.23 (q, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.08 (q, $J = 6.3$ Hz, 2H), 2.16 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.98-1.89 (m, 1H), 1.80-1.74 (m, 1H), 1.69 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H), 1.61 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 1.39 (s, 9H).

5.7.27. Fmoc-L-Glu(TOTA-TMP)-OH (**27**)



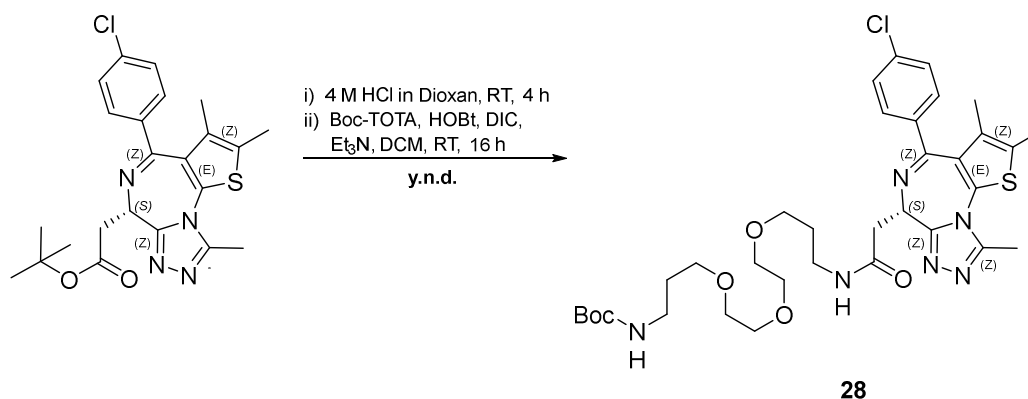
tert-Butylester **26** (360 mg, 0.38 mmol) wurde in DCM:TFA (3:1, 10 mL) gelöst und 90 min bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und der verbliebene Rückstand in Hochvakuum getrocknet. Nach chromatographischer Aufreinigung (C18-RP, 25 % → 40 % ACN in Wasser) wurde das gewünschte Produkt **27** als weißer Feststoff erhalten (243 mg, 0.27 mmol, 77 %).

TLC (DCM/MeOH 3:1): R_f 0.4.

LC-MS (ESI): $t_R = 6.49$ min, m/z 887.4 berechnet für $C_{45}H_{57}N_7O_{12}$, gefunden: 888.4 $[M+H]^+$.

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 7.95$ (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 7.90 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.77 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 7.73 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.49 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.44-7.38 (m, 3H), 7.33 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.17 (br s, 2H), 6.99 (br s, 2H), 6.65 (s, 2H), 4.31-4.18 (m, 5H), 3.93-3.87 (m, 1H), 3.77 (s, 6H), 3.57 (s, 2H), 3.49-3.35 (m, 12H), 3.22 (q, $J = 6.5$ Hz, 2H), 3.07 (q, $J = 6.3$ Hz, 2H), 2.14 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.03-1.94 (m, 1H), 1.83-1.74 (m, 1H), 1.70 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 1.60 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H).

5.7.28. Boc-TOTA-(+)JQ1 (**28**)



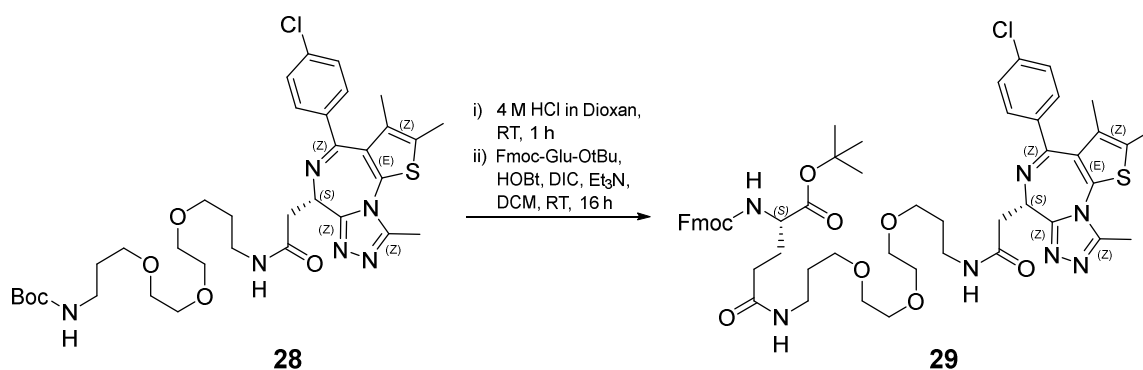
(+)-JQ1 (457 mg, 1 mmol) wurde in 4 M HCl in 1,4-Dioxan (10 mL) gelöst und 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt.

LC-MS (ESI): $t_R = 8.02$ min, m/z 400.1 berechnet für $C_{19}H_{17}ClN_4O_2S$, gefunden: 401.2 $[M+H]^+$.

Der Rückstand wurde in DCM (10 mL) gelöst. Anschließend wurden Triethylamin (693 μ L, 5 mmol), HOBT Monohydrat (306 mg, 2 mmol), DIC (310 μ L, 2 mmol) und Boc-TOTA-NH₂ (481 mg, 1.5 mmol) zugegeben. Die resultierende Lösung wurde bei Raumtemperatur gerührt. Nach 16 Stunden wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 %iger NaHCO₃ (15 mL) gequencht. Die organische Phase wurde abgetrennt, mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Nach Entfernung des Lösemittels unter vermindertem Druck wurde das erhaltene Rohprodukt **28** ohne weitere Aufarbeitung weiter umgesetzt.

LC-MS (ESI): $t_R = 9.53$ min, m/z 702.3 berechnet für $C_{34}H_{47}ClN_6O_6S$, gefunden: 702.9 $[M+H]^+$.

5.7.29. Fmoc-L-Glu(TOTA-(+)-JQ1)-OtBu (**29**)



28 wurde in 4 M HCl in 1,4-Dioxan (10 mL) suspendiert und bei Raumtemperatur gerührt. Nach einer Stunde wurde das Lösemittel entfernt und der Rückstand im Hochvakuum bis zur Trockne eingeengt.

LC-MS (ESI): $t_R = 6.49$ min, m/z 602.2 berechnet für $C_{29}H_{39}ClN_6O_4S$, gefunden: 603.2 $[M+H]^+$.

Der Rückstand wurde in DCM (10 mL) gelöst. Nach Zugabe von Triethylamin (693 μ L, 5 mmol), HOBT Monohydrat (306 mg, 2 mmol), DIC (310 μ L, 2 mmol) und Fmoc-L-Glu-OtBu (638 mg, 1.5 mmol) wurde die Reaktionslösung 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Am Folgetag wurde 5 %ige NaHCO₃ (15 mL) zugegeben. Die organische Phase wurde abgetrennt, mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Der erhaltene

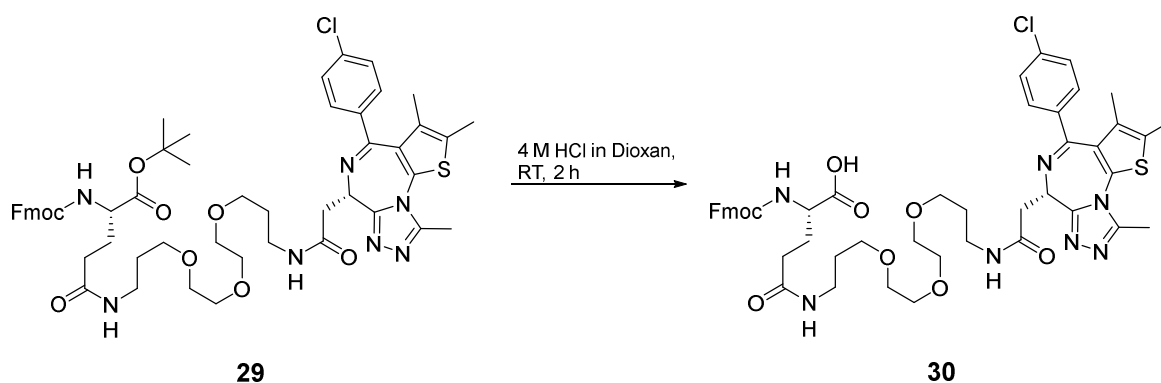
Rückstand wurde chromatographisch aufgereinigt (Kieselgel, 5 % → 10 % Methanol in DCM). Es wurden 414 mg (0.41 mmol, 41 %, 4 Stufen) des gewünschten Produkts **29** erhalten.

TLC (DCM/MeOH = 19:1): $R_f = 0.2$.

LC-MS (ESI): $t_R = 10.87$ min, m/z 1009.4 berechnet für $C_{53}H_{64}ClN_7O_9S$, gefunden: 1010.3 $[M+H]^+$.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7.76$ (d, $J = 7.1$ Hz, 2H), 7.64 (t, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.44-7.37 (m, 3H), 7.33 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 4.92 (s, 1H), 4.35 (s, 1H), 4.24-4.10 (m, 2H), 3.71-3.54 (m, 12H), 3.52-3.44 (m, 1H), 3.37 (s, 3H), 2.94 (s, 2H), 2.42-2.24 (m, 4H), 2.18-2.07 (m, 1H), 2.05-1.95 (m, 1H), 1.84 (d, $J = 5.6$ Hz, 4H), 1.63 (d, $J = 19.7$ Hz, 3H), 1.46 (s, 9H).

5.7.30. Fmoc-L-Glu(TOTA-(+)JQ1)-OH (**30**)



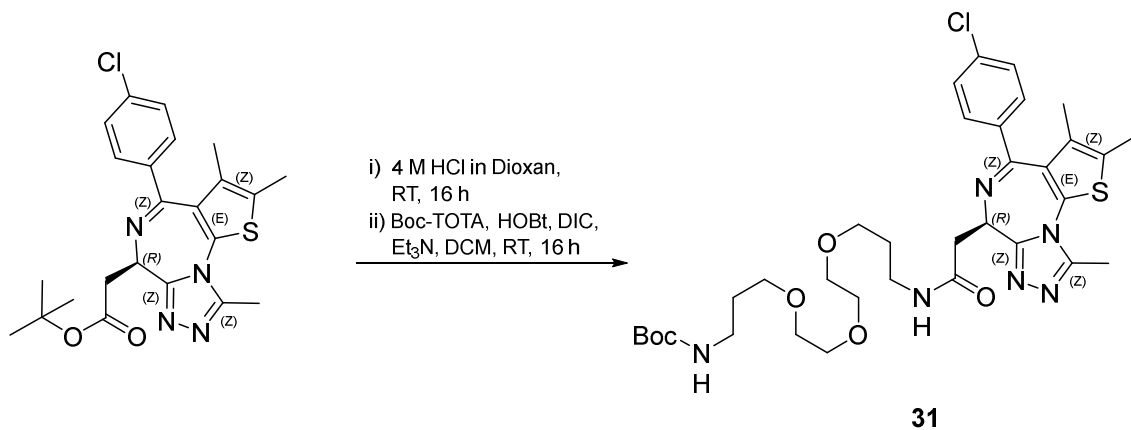
tert-Butylester **29** (400 mg, 0.39 mmol) wurde in 4 M HCl in 1,4-Dioxan (10 mL) gelöst und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 2 Stunden wurde das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und der verbliebene Rückstand im Hochvakuum zur Trockne eingengt. Das Produkt **30** wurde als gelber Feststoff erhalten (389 mg, 0.41 mmol, quant.).

TLC (DCM/MeOH = 3:1): $R_f = 0.3$.

LC-MS (ESI): $t_R = 9.24$ min, m/z 953.3 berechnet für $C_{49}H_{56}ClN_7O_9S$, gefunden: 954.5 $[M+H]^+$.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7.73$ (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.66 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.57-7.29 (m, 6H), 5.21 (s, 1H), 4.33-4.12 (m, 4H), 3.86 (s, 1H), 3.80-3.75 (m, 2H), 3.71 (s, 5H), 3.68-3.50 (m, 14H), 3.47-3.28 (m, 4H), 3.12 (s, 2H), 2.57 (s, 2H), 2.27 (s, 2H), 2.17-1.97 (m, 2H), 1.85 (s, 4H), 1.37 (s, 2H).

5.7.31. Boc-TOTA(-)JQ1 (31)



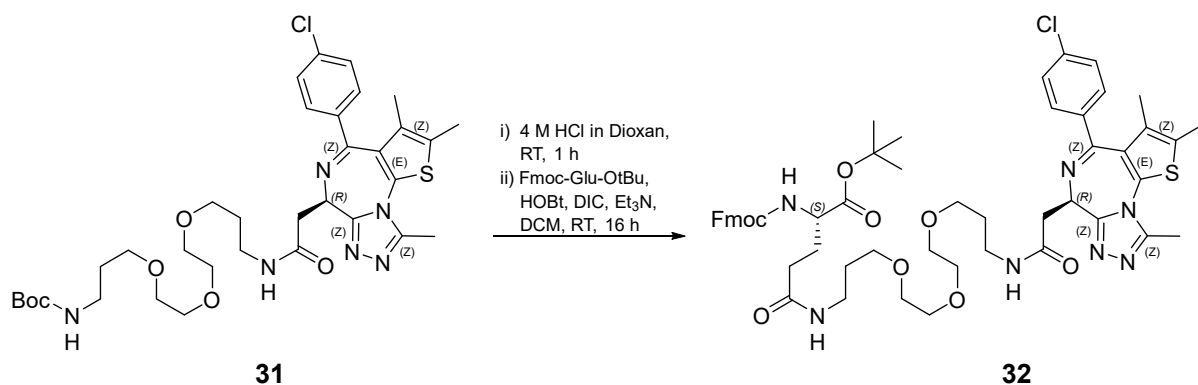
(-)-JQ1 (250 mg, 0.55 mmol) wurde in 4 M HCl in 1,4-Dioxan (5 mL) gelöst und 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt.

LC-MS (ESI): $t_R = 8.33$ min, m/z 400.1 berechnet für C₁₉H₁₇ClN₄O₂S, gefunden: 401.2 [M+H]⁺.

Der Rückstand wurde in DCM (10 mL) gelöst. Anschließend wurden Triethylamin (174 μ L, 2.75 mmol), HOBT Monohydrat (148 mg, 1.1 mmol), DIC (78 μ L, 1.1 mmol) und Boc-TOTA-NH₂ (120 mg, 0.82 mmol) zugegeben. Die resultierende Lösung wurde bei Raumtemperatur gerührt. Nach 16 Stunden wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 %iger NaHCO₃-Lösung (10 mL) gequencht. Die organische Phase wurde abgetrennt, mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Nach Entfernung des Lösemittels unter vermindertem Druck wurde das erhaltene Rohprodukt **31** ohne weitere Aufarbeitung weiter umgesetzt.

LC-MS (ESI): $t_R = 9.15$ min, m/z 702.3 berechnet für C₃₄H₄₇N₆O₆S, gefunden: 702.8 [M+H]⁺.

5.7.32. Fmoc-L-Glu(TOTA(-)JQ1)-OtBu (32)



31 wurde in 4 M HCl in 1,4-Dioxan (5 mL) suspendiert. Nach einer Stunde wurde das Lösemittel entfernt und der Rückstand im Hochvakuum zur Trockne eingengt.

LC-MS (ESI): $t_R = 6.16$ min, m/z 602.2 berechnet für $C_{29}H_{39}ClN_6O_4S$, gefunden: 603.3 $[M+H]^+$.

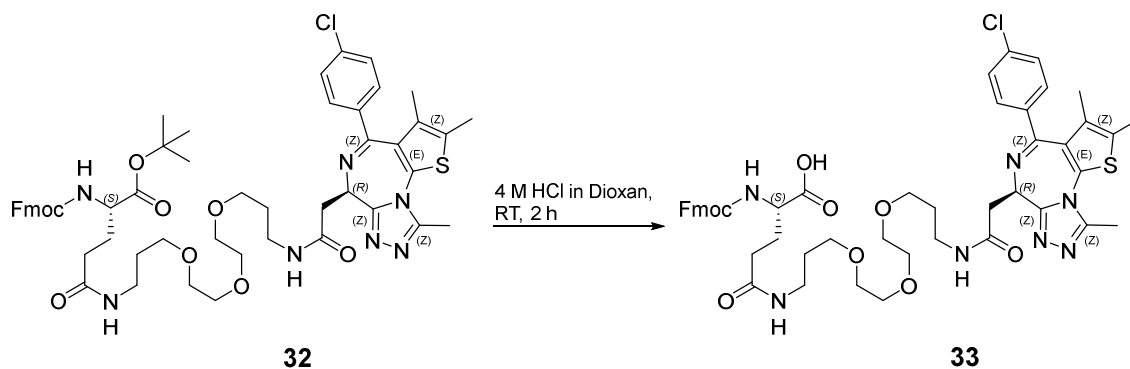
Der Rückstand wurde in DCM (10 mL) gelöst. Nach Zugabe von Triethylamin (174 μ L, 2.75 mmol), HOBt Monohydrat (148 mg, 1.1 mmol), DIC (78 μ L, 1.1 mmol) und Fmoc-L-Glu-OtBu (350 mg, 0.82 mmol) wurde die Reaktionslösung 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Am Folgetag wurde 5 %ige $NaHCO_3$ -Lösung (10 mL) zugegeben. Die organische Phase wurde abgetrennt, mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und filtriert. Der erhaltene Rückstand wurde chromatographisch aufgereinigt (Kieselgel, 5 % \rightarrow 10 % Methanol in DCM). Es wurden 273 mg (0.27 mmol, 49 %) des gewünschten Produkts **32** erhalten.

TLC (DCM/MeOH = 5:1): $R_f = 0.68$.

LC-MS (ESI): $t_R = 10.88$ min, m/z 1009.4 berechnet für $C_{53}H_{64}ClN_7O_9S$, gefunden: 1010.2 $[M+H]^+$.

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 8.19$ (t, $J = 5.3$ Hz, 1H), 7.90 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.79 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H), 7.73 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H), 7.67 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.49 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.44-7.39 (m, 4H), 7.33 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 4.51 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H), 4.33-4.19 (m, 3H), 3.97-3.84 (m, 1H), 3.54-3.41 (m, 9H), 3.38 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.28-3.12 (m, 5H), 3.07 (q, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.59 (s, 2H), 2.40 (s, 2H), 2.16 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 1.98-1.89 (m, 1H), 1.81-1.73 (m, 1H), 1.68 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 1.64-1.58 (m, 4H), 1.39 (s, 9H).

5.7.33. Fmoc-L-Glu(TOTA(-)-JQ1)-OH (**33**)



tert-Butylester **32** (260 mg, 0.27 mmol) wurde in 4 M HCl in 1,4-Dioxan (5 mL) gelöst. Nach 2 Stunden wurde das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und der verbliebene

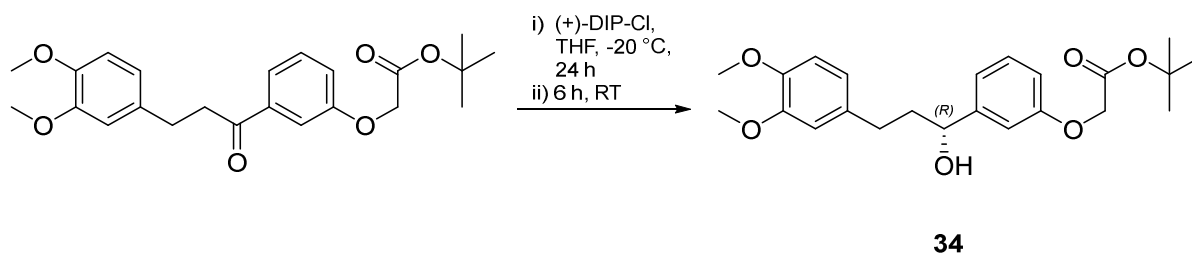
Rückstand im Hochvakuum zur Trockne eingengt. Die Carbonsäure **33** wurde als gelber Feststoff erhalten (257 mg, 0.27 mmol, quant.).

TLC (DCM/MeOH = 3:1): $R_f = 0.4$.

LC-MS (ESI): $t_R = 9.21$ min, m/z 953.4 berechnet für $C_{49}H_{56}ClN_7O_9S$, gefunden: 954.3 $[M+H]^+$.

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 8.30$ (t, $J = 5.3$ Hz, 1H), 7.90 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H), 7.86-7.79 (m, 1H), 7.75-7.70 (m, 2H), 7.68-7.60 (m, 1H), 7.53 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.43 (q, $J = 7.7$ Hz, 4H), 7.34 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 4.65 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H), 4.32-4.17 (m, 3H), 4.06-3.90 (m, 1H), 3.74-3.59 (m, 3H), 3.53-3.41 (m, 9H), 3.38 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 3.32-3.21 (m, 2H), 3.19-3.12 (m, 3H), 3.10-3.02 (m, 2H), 2.71 (s, 2H), 2.42 (s, 2H), 2.26-2.11 (m, 2H), 2.03-1.93 (m, 1H), 1.85-1.75 (m, 1H), 1.68 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 1.63-1.57 (m, 4H).

5.7.34. (1R)-1,1-Dimethylethyl[3-[3-(3,4-dimethoxyphenyl)-1-hydroxypropyl]phenoxy]-acetat (34**)**



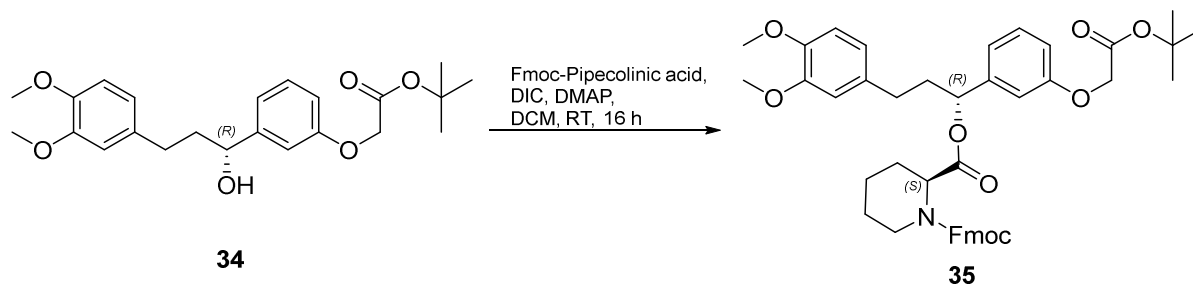
1,1-Dimethyl [3-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-1-oxopropyl]phenoxy]-acetat (500 mg, 1.25 mmol) wurde in unter Argon in THF (15 mL) gelöst. Nach Zugabe von (+)-DIP-Cl (922 mg, 2.87 mmol) wurde das Reaktionsgemisch für 24 Stunden bei -20 °C gelagert.

Am Folgetag wurde das Lösemittel unter reduziertem Druck entfernt und der verbliebene Rückstand in Diethylether (15 mL) gelöst. Nach Zugabe von Diethanolamin (1.2 mL) und zweistündigem Rühren bei Raumtemperatur wurde das gebildete Präzipitat abfiltriert. Der Filterkuchen wurde mit Ethylacetat gewaschen und das Filtrat im Vakuum zur Trockne eingengt. Das erhaltene Rohprodukt wurde chromatographisch aufgereinigt (Kieselgel, 16 % \rightarrow 50 % Ethylacetat in Cyclohexan), so dass das gewünschte Produkt **34** erhalten werden konnte (515 mg, 1.25 mmol, quant.).

TLC (Ethylacetat/Cyclohexan = 1:1): $R_f = 0.6$.

LC-MS (ESI): $t_R = 9.95$ min, m/z 402.2 berechnet für $C_{23}H_{30}O_6$, gefunden: 424.9 $[M+Na]^+$.

**5.7.35. (1R)-3-(3,4-Dimethoxyphenyl)-1-[3-(*t*-butoxycarbonylmethoxy)phenyl]-1-propyl-
(2S)-1-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-2-piperidinecarboxylate (35)**



Alkohol **34** (515 mg, 1.25 mmol) wurde in DCM (10 mL) gelöst. Nach Zugabe von Fmoc-Pipecolininsäure (527 mg, 1.5 mmol), Diisopropylcarbodiimid (232 μ L, 1.5 mmol) und DMAP (18.3 mg, 0.15 mmol) wurde die Reaktionslösung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt.

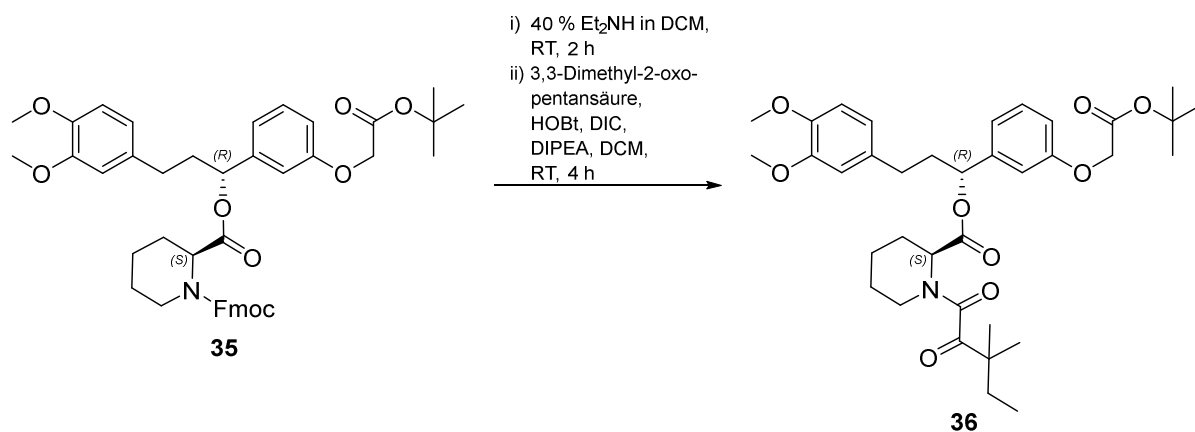
Nach 16 Stunden wurde der gebildete Niederschlag abfiltriert und das Filtrat unter reduziertem Druck bis zur Trockne eingengt. Der erhaltene Rückstand wurde chromatographisch aufgereinigt (Kieselgel, 10 % \rightarrow 50 % Ethylacetat in Cyclohexan) und das gewünschte Produkt **35** konnte als weißer Feststoff erhalten werden (733 mg, 0.996 mmol, 80 %).

TLC (Ethylacetat/Cyclohexan = 2:1): R_f = 0.6.

LC-MS (ESI): t_R = 9.95 min, m/z 735.3 berechnet für $C_{44}H_{49}NO_9$, gefunden: 758.2 $[M+Na]^+$.

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 7.91 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 7.84 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 7.63 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 7.55 (d, J = 8 Hz, 1H), 7.48-7.14 (m, 6H), 6.92 (t, J = 8 Hz, 1H), 6.87-6.75 (m, 3H), 6.67 (d, J = 19.1 Hz, 1H), 6.62-6.55 (m, 1H), 5.72-5.59 (m, 1H), 4.84-4.73 (m, 1H), 4.61 (d, J = 20.1 Hz, 2H), 4.43-4.26 (m, 2H), 4.17 (s, 1H), 3.91 (q, J = 12.7 Hz, 1H), 3.67 (d, J = 8 Hz, 6H), 3.03 (t, J = 12.5 Hz, 1H), 2.86 (t, J = 12.5 Hz, 1H), 2.47-2.31 (m, 2H), 2.19 (d, J = 12.5 Hz, 1H), 2.11-1.90 (m, 2H), 1.73-1.58 (m, 3H), 1.39 (s, 9H), 1.19-1.06 (m, 1H).

5.7.36. SLF-CO₂tBu (36)



35 (733 mg, 0.996 mmol) wurde in DCM:Piperidin (3:2, 10 mL) gelöst und 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

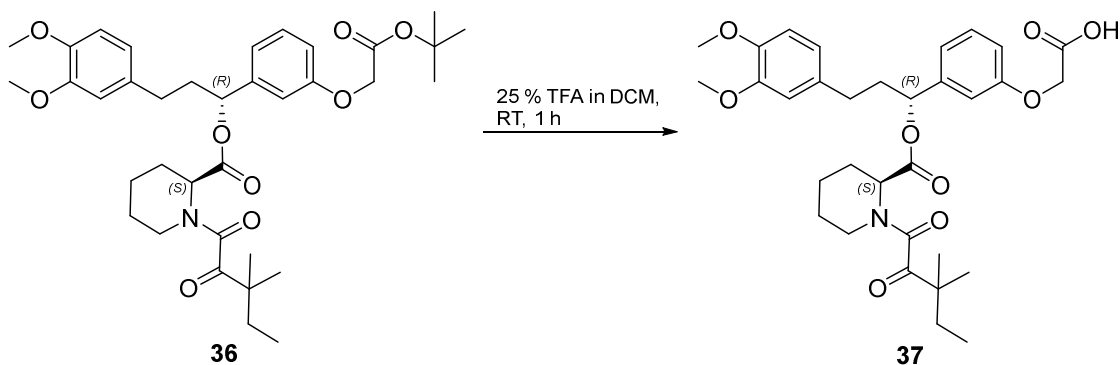
LC-MS (ESI): $t_R = 7.03$ min, m/z 513.4 berechnet für C₃₆H₄₉NO₉, gefunden: 514.1 [M+Na]⁺.

Anschließend wurde das Lösemittel unter reduziertem Druck entfernt und der verbliebene Rückstand in DCM (10 mL) gelöst. 3,3-Dimethyl-2-oxopentansäure (173 mg, 1.2 mmol), HOBt Monohydrat (306 mg, 2 mmol), DIC (310 µL, 2 mmol) und DIPEA (340 µL, 2 mmol) wurden zugegeben und die resultierende Reaktionslösung für 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösemittel im Vakuum entfernt und der Rückstand chromatographisch aufgereinigt (Kieselgel, 10 % → 50 % Ethylacetat in Cyclohexan). Das gewünschte Produkt **36** konnte als weißer Feststoff erhalten werden (592 mg, 0.925 mmol, 93 %).

TLC (Ethylacetat/Cyclohexan = 1:1): $R_f = 0.6$.

LC-MS (ESI): $t_R = 12.22$ min, m/z 639.3 berechnet für C₃₆H₄₉NO₉, gefunden: 662.0 [M+Na]⁺.

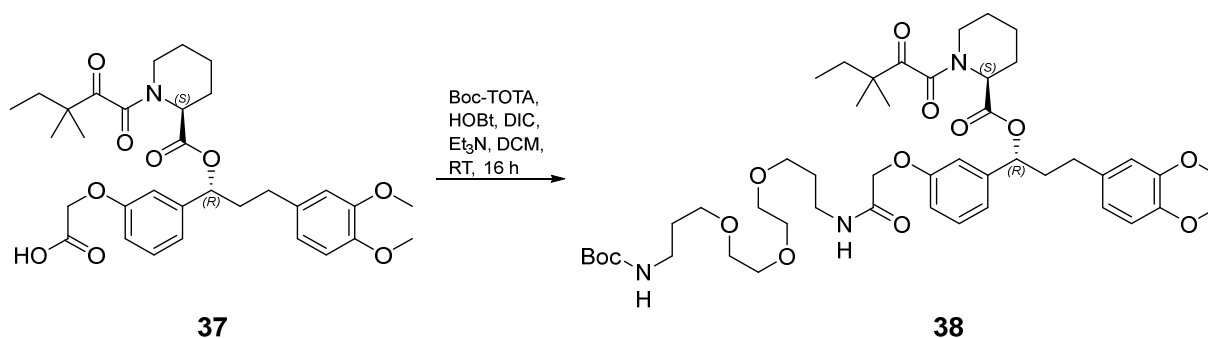
5.7.37. SLF-CO₂H (37)



tert-Butylester **36** (592 mg, 0.925 mmol) wurde in DCM:TFA (3:1, 15 mL) gelöst und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde aq. NaCl (10 mL) zugegeben, die organische Phase abgetrennt, über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Anschließend wurde das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und der verbliebene Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Es wurden 489 mg (0.83 mmol, 90 %) des gewünschten Produkts **37** erhalten.

LC-MS (ESI): $t_R = 10.52$ min, m/z 583.3 berechnet für C₃₆H₄₉NO₉, gefunden: 606.1 [M+Na]⁺.

5.7.38. SLF-TOTA-Boc (**38**)



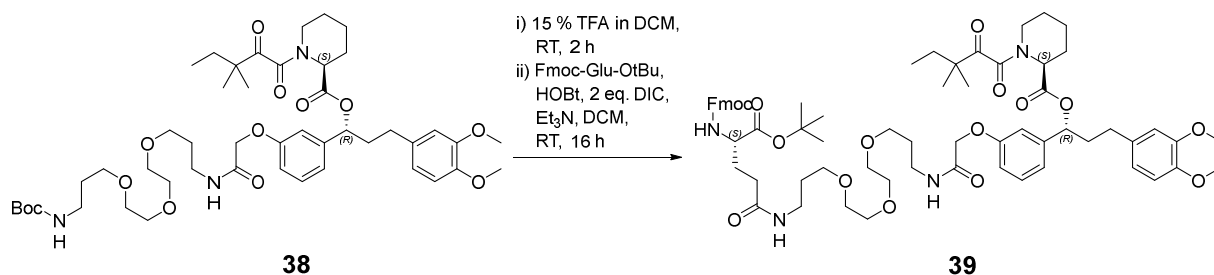
SLF-CO₂H **36** (483 mg, 0.83 mmol) wurde in DCM (10 mL) gelöst. Anschließend wurden Triethylamin (460 µL, 3.32 mmol), HOBt Monohydrat (254 mg, 1.66 mmol), DIC (257 µL, 1.66 mmol) und Boc-TOTA (399 mg, 1.24 mmol) zugegeben. Die erhaltene Reaktionslösung wurde für 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

5 %ige NaHCO₃-Lösung (10 mL) wurde zugegeben und die organische Phase abgetrennt, über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Nach Entfernung des Lösemittels wurde der erhaltene Rückstand chromatographisch aufgereinigt (Kieselgel, 10 % → 25 % MeOH in DCM). Das gewünschte Produkt **38** wurde als weißer Feststoff erhalten (615 mg, 0.69 mmol, 84 %).

TLC (Ethylacetat): $R_f = 0.5$.

LC-MS (ESI): $t_R = 11.88$ min, m/z 885.5 berechnet für C₄₇H₇₁N₃O₁₃, gefunden: 885.9 [M+H]⁺.

5.7.39. Fmoc-L-Glu(TOTA-SLF)-OtBu (39)



38 (615 mg, 0.69 mmol) wurde in DCM:TFA (3:1, 15 mL) gelöst und 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde 5 %ige NaHCO₃-Lösung zugegeben, die organische Phase abgetrennt, über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der verbliebene Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Das entschützte Amin wurde als harzartiger Rückstand erhalten und ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt.

LC-MS (ESI): $t_R = 7.39$ min, m/z 785.5 berechnet für C₄₂H₆₃N₃O₁₁, gefunden: 786.4 [M+H]⁺.

Der Rückstand wurde in DCM (10 mL) gelöst. Dann wurden Fmoc-L-Glu-OtBu (364 mg, 0.85 mmol), HOBt Monohydrat (211 mg, 1.38 mmol), Triethylamin (287 μ L, 2.07 mmol) und DIC (214 μ L, 1.38 mmol) zugegeben. Die Reaktionslösung wurde 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

5 %ige NaHCO₃-Lösung (10 mL) wurde zugegeben und die organische Phase abgetrennt, über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Nach Entfernung des Lösemittels wurde der erhaltene Rückstand chromatographisch aufgereinigt (Kieselgel, 10 % \rightarrow 25 % MeOH in DCM). Das gewünschte Produkt **39** wurde als weißer Feststoff erhalten (690 mg, 0.58 mmol, 83 %).

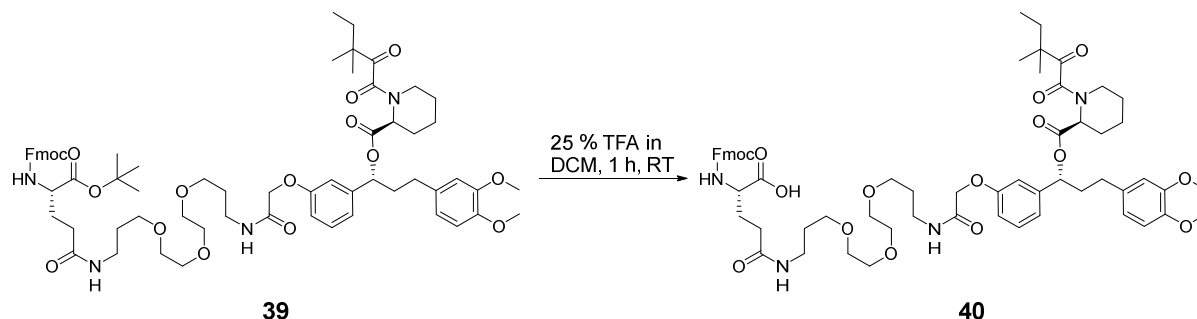
TLC (Ethylacetat): $R_f = 0.5$.

LC-MS (ESI): $t_R = 12.22$ min, m/z 1192.6 berechnet für C₆₆H₈₈N₄O₁₆, gefunden: 1193.3 [M+H]⁺.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 0.86$ (t, $J = 5.3$ Hz, 1H), 7.90 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.78 (t, $J = 5.1$ Hz, 1H), 7.73 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.66 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H), 7.42 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 7.34 (d, $J = 7.5$ Hz, 3H), 6.95 (d, $J = 10.1$ Hz, 2H), 6.91 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.85 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 6.75 (s, 1H), 6.67 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 5.72-5.65 (m, 1H), 5.48 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 5.15 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H), 4.46 (s, 2H), 4.32-4.21 (m, 4H), 3.98-3.91 (m, 1H), 3.90-3.84 (m, 1H), 3.72 (d, $J = 6.2$ Hz, 6H), 3.51-3.41 (m, 9H), 3.17 (q, $J = 6.5$ Hz, 3H), 3.12-3.02 (m, 3H), 2.34-2.28 (m, 1H), 2.16 (t, $J =$

7.0 Hz, 3H), 1.97-1.89 (m, 2H), 1.75-1.56 (m, 10H), 1.39 (s, 9H), 1.24-1.17 (m, 2H), 1.15 (d, $J = 7.6$ Hz, 5H), 1.06 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 0.81 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H), 0.72 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H).

5.7.40. Fmoc-L-Glu(TOTA-SLF)-OH (**40**)



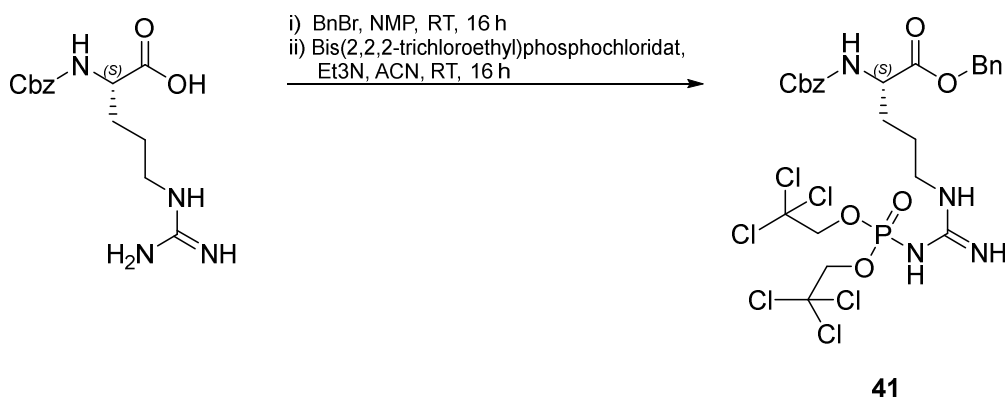
tert-Butylester **39** (690 mg, 0.58 mmol) wurde in DCM:TFA (3:1, 15 mL) gelöst und 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde 5 %ige NaCl-Lösung zugegeben, die organische Phase abgetrennt, über $MgSO_4$ getrocknet und filtriert. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der verbliebene Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wurde anschließend chromatographisch aufgereinigt (C18-RP, 50 % \rightarrow 80 % ACN in Wasser, angesäuert mit 0.1 % Ameisensäure). Das gewünschte Produkt **40** wurde als weißer Feststoff erhalten (389 mg, 0.34 mmol, 59 %).

TLC (DCM:MeOH:Ameisensäure 9:1:0.01): $R_f = 0.2$.

LC-MS (ESI): $t_R = 10.92$ min, m/z 1136.6 berechnet für $C_{62}H_{80}N_4O_{16}$, gefunden: 1137.3 $[M+H]^+$.

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 8.06$ (t, $J = 5.5$ Hz, 1H), 7.90 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.79 (t, $J = 5.1$ Hz, 1H), 7.73 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H), 7.65 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.42 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 7.34 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H), 6.96 (d, $J = 10.7$ Hz, 2H), 6.91 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 6.85 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 6.76 (s, 1H), 6.68 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 5.72-5.66 (m, 1H), 5.15 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H), 4.46 (s, 2H), 4.32-4.17 (m, 4H), 3.98-3.90 (m, 1H), 3.72 (d, $J = 6.1$ Hz, 6H), 3.52-3.41 (m, 9H), 3.17 (q, $J = 6.3$ Hz, 3H), 3.12-3.03 (m, 3H), 2.28-2.21 (m, 1H), 2.16 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H), 2.07-1.94 (m, 2H), 1.82-1.55 (m, 10H), 1.40-1.22 (m, 2H), 1.15 (d, $J = 7.4$ Hz, 5H), 1.06 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), 0.81 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H), 0.73 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H).

5.7.41. Z-L-pArg(Tce)₂-OBn (**41**)

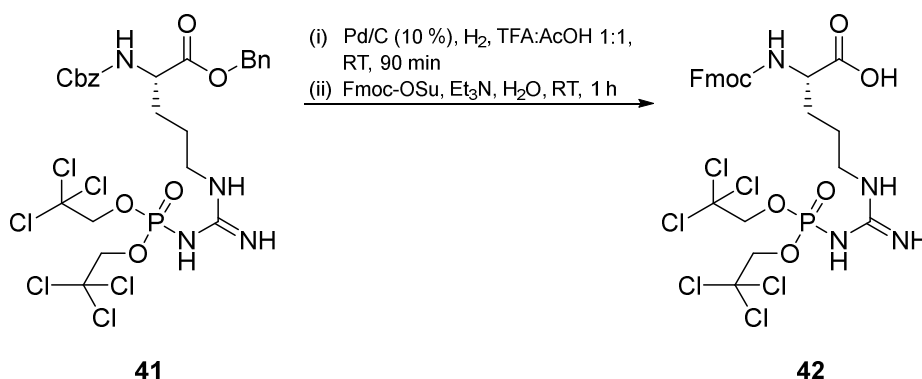


Z-Arg-OH (5 g, 16.2 mmol) wurde unter Argon in NMP (50 mL) suspendiert und bis zur vollständigen Lösung auf 90 °C erhitzt. Anschließend erfolgte bei Raumtemperatur die tropfenweise Zugabe von Benzylbromid (2.12 mL, 17.8 mmol). Die erhaltene Reaktionslösung wurde über Nacht im Dunkeln bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wurde im Hochvakuum entfernt und der verbliebene Rückstand in Acetonitril (50 mL) gelöst. Nachdem Triethylamin (9.1 mL, 65 mmol) zugegeben wurde, erfolgte die Zugabe von Bis(trichloroethyl)phosphoryloxychlorid (2.46 g, 6.5 mmol). Nach 90 Minuten und 180 Minuten wurde jeweils erneut Bis(trichloroethyl)phosphoryloxychlorid (2.46 g, 6.5 mmol) zugegeben. Die resultierende Lösung wurde 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösemittel im Hochvakuum einrotiert. Der verbliebene Rückstand wurde chromatographisch aufgereinigt (Kieselgel, 25 % → 50 % Ethylacetat in Cyclohexan, angesäuert mit 1 % Ameisensäure). Das gewünschte Produkt **41** wurde als weißer Feststoff erhalten (5.7 g, 7.7 mmol, 48 %).

TLC (Ethylacetat/Cyclohexan/Ameisensäure = 1:1:0.01): $R_f = 0.27$.

LC-MS (ESI): $t_R = 10.21$ min, m/z 738.0 berechnet für $C_{25}H_{29}Cl_6N_4O_7P$, gefunden: 741.0 $[M+H]^+$.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 8.14$ (s, 1H), 7.78 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.39-7.29 (m, 10H), 6.90-6.79 (s br, 1H), 6.34-6.25 (s br, 1H), 5.13 (s, 2H), 5.05 (d, $J = 5.3$ Hz, 2H), 4.60-4.51 (m, 4H), 4.13-4.06 (m, 1H), 3.17-3.01 (s br, 2H). 1.80-1.70 (m, 1H), 1.67-1.58 (m, 1H), 1.55-1.46 (m, 2H).

5.7.42. Fmoc-L-pArg(Tce)₂-OH (42)


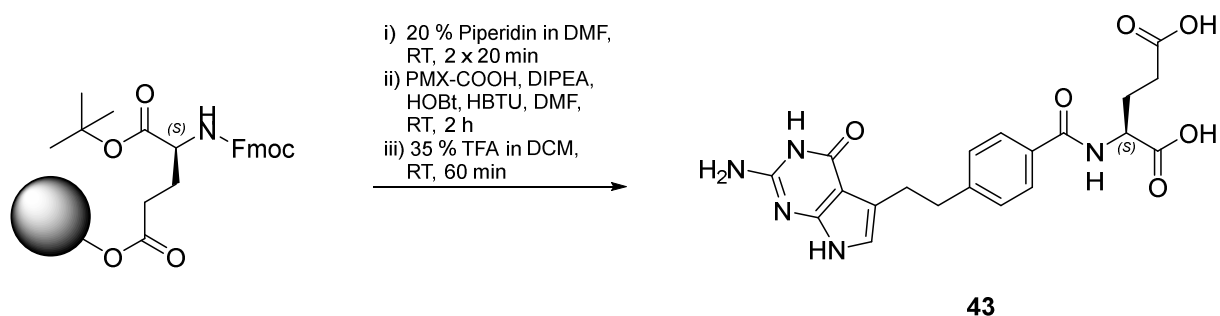
Z-pArg(Tce)₂-OBn (5.5 g, 7.4 mmol) wurde unter Argon in einem Gemisch aus TFA und Essigsäure (1:1, 100 mL) gelöst. Nach Zugabe von Pd/C (10 %, 850 mg) wurde zunächst 15 Minuten Argon durch die Lösung geblasen, anschließend wurde Wasserstoff eingeleitet. Die Suspension wurde 90 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem der Katalysator abfiltriert und das Filtrat zur Trockne eingeeengt worden ist, wurde der erhaltene Rückstand in Wasser (20 mL) gelöst und Triethylamin (1076 µL, 5.5 mmol) zugegeben. Zu der resultierenden Lösung wurde Fmoc-OSu (2.6 g, 5.5 mmol) gegeben. Anschließend wurde solange weiteres Triethylamin zugegeben, bis der pH stabil bei 9.0 lag. Nach 1 Stunde war der Umsatz vollständig und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in DCM gelöst und gegen 1 M HCl ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Nach Entfernung des Lösemittels wurde der verbliebene Rückstand chromatographisch gereinigt (Kieselgel, 50 % → 100 % Ethylacetat in Cyclohexan, angesäuert mit 1 % Ameisensäure). Die Tce-geschützte Fmoc-Aminosäure **42** konnte als beiger Feststoff erhalten werden (2.6 g, 3.5 mmol, 48 %).

TLC (Ethylacetat/Ameisensäure = 1:0.01): R_f = 0.50.

LC-MS (ESI): t_R = 9.65 min, m/z 736.0 berechnet für C₂₅H₂₇Cl₆N₄O₇P, gefunden: 739.0 [M+H]⁺.

¹H NMR (400 MHz, CD₃CN): δ = 7.85 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 7.68 (t, J = 6.1 Hz, 2H), 7.43 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 7.35 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 6.22-5.81 (m, 2H), 4.64 (s, 4H), 4.37 (d, J = 6.7 Hz, 2H), 4.25 (t, J = 6.8 Hz, 1H), 4.21-4.12 (m, 1H), 3.25 (s, 2H), 1.98-1.94 (m, 2H), 1.92-1.83 (m, 1H), 1.76-1.53 (m, 3H).

5.7.43. Pemetrexed (43)



Fmoc-L-Glu-OMe (102 mg, 0.24 mmol) und DIPEA (55 μ L, 0.96 mmol) wurden in DMF (5 mL) gelöst und zu 2-Chlorotrytil-Harz (100 mg, 1.6 mmol/g) gegeben. Die erhaltene Suspension wurde 16 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt.

Nachdem das Harz abfiltriert und mit 2 x DMF, 2 x DCM, 2 x DMF gewaschen wurde, wurde eine Mischung aus DCM:MeOH (4:1, 5 mL) und DIPEA (55 μ L, 0.96 mmol) zum Harz gegeben und die Suspension für 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt.

Nach erneutem Waschen des Harzes (2 x DMF, 2 x DCM, 2 x DMF) wurde anschließend die Fmoc-Gruppe durch Zugabe von Piperidin:DMF (1:4, 10 mL) abgespalten. Die Suspension wurde bei Raumtemperatur für 20 min geschüttelt. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt, bevor das Harz erneut gewaschen wurde (2 x DMF, 2 x DCM, 2 x DMF).

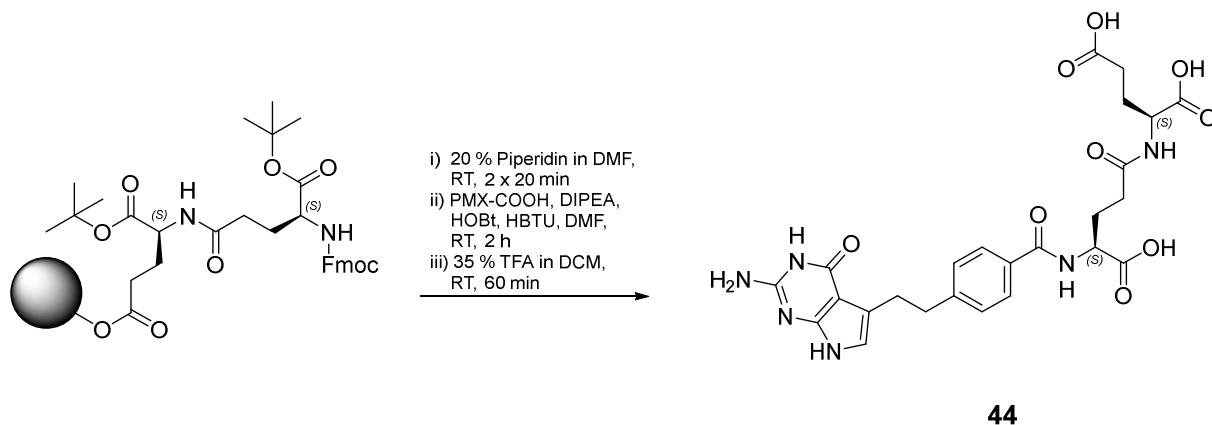
4-[2-(2-Amino-4,7-dihydro-4-oxo-3H-pyrrolo[2,3]pyrimidin-5-yl)ethyl]benzoesäure (76 mg, 0.24 mmol), DIPEA (41 μ L, 0.24 mmol), HOBt Monohydrat (37 mg, 0.24 mmol) und HBTU (91 mg, 0.24 mmol) wurden in DMF (5 mL) gelöst und 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde diese Lösung zum Harz gegeben und die resultierende Suspension 2 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt.

Nachdem das Harz erneut gewaschen worden war (5 x DCM), wurde eine 35 %ige Lösung von TFA in DCM (5 mL) zugegeben. Nach einer Stunde Schütteln bei Raumtemperatur wurde das Harz mit DCM gewaschen (3 x 5 mL), die Wasch- und Abspaltlösungen wurden vereinigt und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Pemetrexed (**43**) wurde als rosafarbener Feststoff erhalten (33.5 mg, 0.078 mmol, 49 %).

LC-MS (ESI): t_R = 5.04 min, m/z 427.2 berechnet für $C_{20}H_{21}N_5O_6$, gefunden: 428.0 $[M+H]^+$.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 10.83 (s, 1H), 10.59 (s, 1H), 8.52 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.79 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 7.30 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 6.38 (s, 1H), 4.43-4.36 (m, 2H), 3.03-2.95 (m, 2H), 2.88-2.83 (m, 2H), 2.36 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.14-2.04 (m, 2H), 2.01-1.98 (m, 1H).

5.7.44. Pemetrexed-Diglutamat (44)



Fmoc-L-Glu-OMe (102 mg, 0.24 mmol) und DIPEA (55 μL , 0.96 mmol) wurden in DMF (5 mL) gelöst und zu 2-Chlorotrityl-Harz (100 mg, 1.6 mmol/g) gegeben. Die erhaltene Suspension wurde 16 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt.

Nachdem das Harz abfiltriert und mit 2 x DMF, 2 x DCM, 2 x DMF gewaschen wurde, wurde eine Mischung aus DCM:MeOH (4:1, 5 mL) und DIPEA (55 μL , 0.96 mmol) zum Harz gegeben und die Suspension für 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt.

Nach erneutem Waschen des Harzes (2 x DMF, 2 x DCM, 2 x DMF) wurde anschließend die Fmoc-Gruppe durch Zugabe von Piperidin:DMF (1:4, 10 mL) abgespalten. Die Suspension wurde bei Raumtemperatur für 20 min geschüttelt. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt, bevor das Harz erneut gewaschen wurde (2 x DMF, 2 x DCM, 2 x DMF).

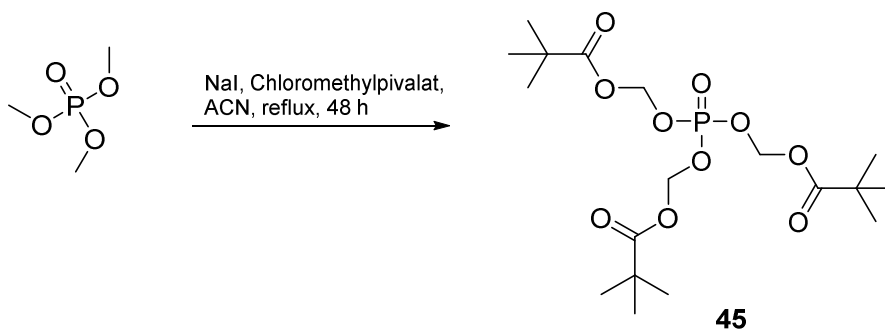
Fmoc-L-Glu-OMe (102 mg, 0.24 mmol), DIPEA (41 μL , 0.24 mmol), HOBt Monohydrat (37 mg, 0.24 mmol) und HBTU (91 mg, 0.24 mmol) wurden in DMF (5 mL) gelöst, zum Harz gegeben und 2 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend erfolgte ein Waschschritt (2 x DMF, 2 x DCM, 2 x DMF), bevor 4-[2-(2-Amino-4,7-dihydro-4-oxo-3H-pyrrolo[2,3]pyrimidin-5-yl)ethyl]benzoesäure (76 mg, 0.24 mmol), DIPEA (41 μL , 0.24 mmol), HOBt Monohydrat (37 mg, 0.24 mmol) und HBTU (91 mg, 0.24 mmol) in DMF (5 mL) gelöst und 15 min bei Raumtemperatur gerührt wurden. Anschließend wurde diese Lösung zum Harz gegeben und die resultierende Suspension erneut 2 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt.

Nachdem das Harz gewaschen worden war (5 x DCM), wurde eine 35 %ige Lösung von TFA in DCM (5 mL) zugegeben. Nach einer Stunde Schütteln bei Raumtemperatur wurde das Harz mit DCM gewaschen (3 x 5 mL), die Wasch- und Abspaltlösungen wurden vereinigt und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Pemetrexed-Diglutamat (**44**) wurde als blauer Feststoff erhalten (34.7 mg, 0.062 mmol, 39 %).

LC-MS (ESI): $t_R = 4.86$ min, m/z 556.2 berechnet für $C_{25}H_{28}N_6O_9$, gefunden: 557.0 $[M+H]^+$.

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 10.91$ (s, 1H), 10.75 (s, 1H), 8.58 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 8.14 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.81 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.30 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 6.39 (s, 1H), 4.39-4.33 (m, 1H), 4.23-4.18 (m, 1H), 3.14-3.05 (m, 1H), 3.03-2.94 (m, 2H), 2.88-2.84 (m, 2H), 2.33-2.23 (m, 4H), 2.15-2.04 (m, 1H), 2.01-1.89 (m, 2H), 1.80-1.69 (m, 1H).

5.7.45. Tris(POM)phosphat (**45**)



Trimethylphosphat (1.4 g, 10 mmol) wurde in trockenem Acetonitril (8.5 mL) unter Argon gelöst. Anschließend wurden Chloromethylpivalat (5.6 mL, 39 mmol) und NaI (4.5 g, 30 mmol) zugegeben und die resultierende Lösung 24 Stunden bei 85 °C gerührt.

Am Folgetag wurde das Reaktionsgemisch mit Diethylether (100 mL) versetzt und die organische Phase dreimal gegen H_2O ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Kieselgel, 25 % → 50 % Ethylacetat in Cyclohexan). Das gewünschte Produkt **45** wurde als weißer Feststoff erhalten (1.1 g, 2.5 mmol, 25 %).

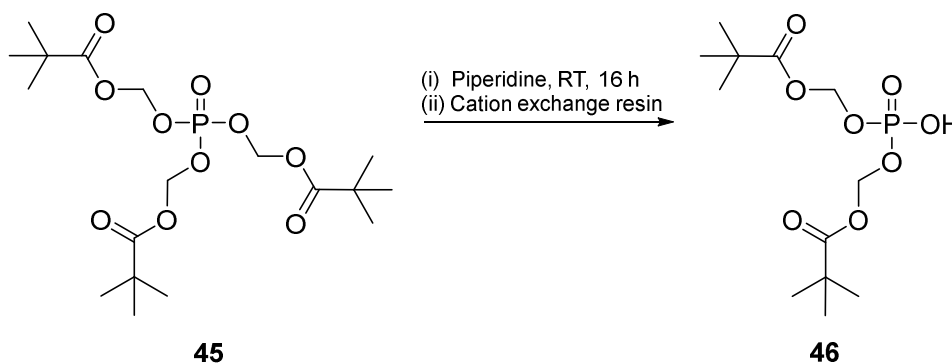
TLC (Ethylacetat/Cyclohexan = 1:1): $R_f = 0.90$.

LC-MS (ESI): $t_R = 11.16$ min, m/z 440.2 berechnet für $C_{18}H_{33}O_{10}P$, gefunden: 440.5 $[M+H]^+$.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 5.67$ (d, $J = 13.8$ Hz, 6H), 1.25 (s, 27H).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 176.6, 82.8, 38.8, 26.8$.

5.7.46. Bis(POM)phosphat (46)



45 (1.1 g, 2.5 mmol) wurde in Piperidin (7 mL) gelöst und 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösemittel im Hochvakuum evaporiert.

Der Rückstand (1.6 g) wurde in Wasser (25 mL) gelöst. Dann wurde Dowex W50X8 H^+ (31 g) zugegeben und die resultierende Suspension wurde eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Das Harz wurde abfiltriert und das Filtrat wurde bis zur Trockne eingengt.

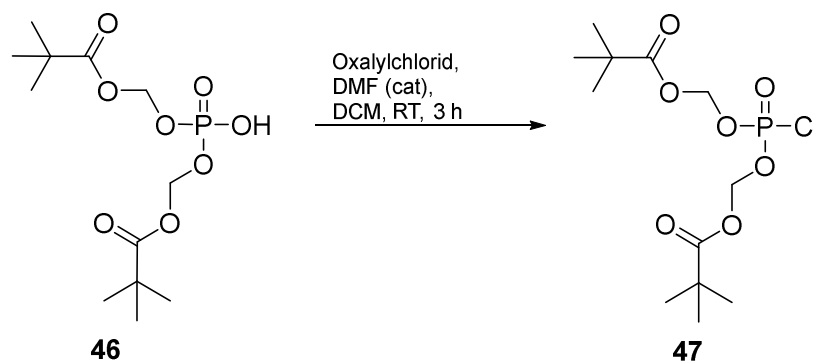
Nach finaler Trocknung des Rückstands im Hochvakuum wurde das gewünschte Produkt **46** als weißer Feststoff erhalten (454 mg, 1.39 mmol, 56 %), der ohne weitere Aufreinigung direkt weiter umgesetzt wurde.

LC-MS (ESI): $t_R = 6.04$ min, m/z 326.1 berechnet für $\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{O}_8\text{P}$, gefunden: 326.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.77$ (s, 1H), 5.57 (d, $J = 14.1$ Hz, 4H), 1.16 (s, 18H).

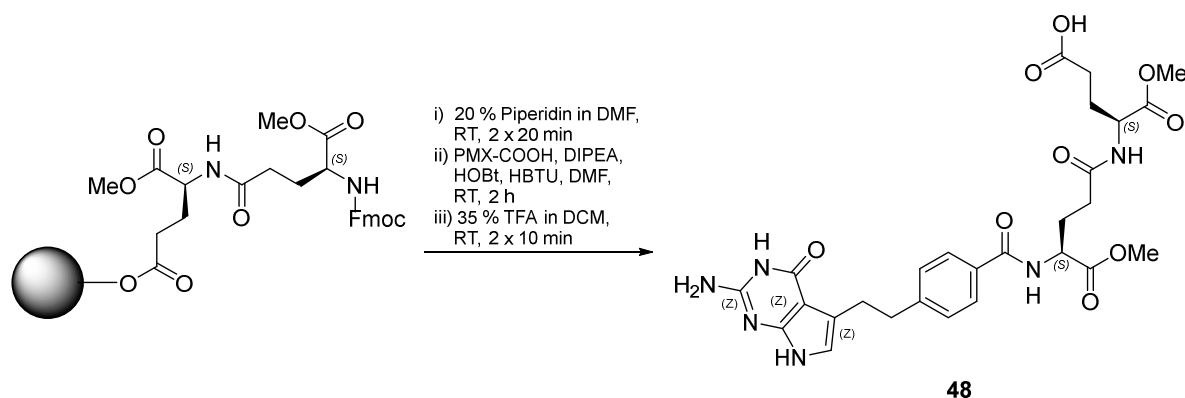
^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 176.8, 82.9, 38.8, 26.9$.

5.7.47. Chlorobis(POM)phosphat (47)



Phosphat **46** (30 mg, 0.092 mmol) wurde in DCM (300 μ L) gelöst. Nachdem eine katalytische Menge DMF (1 μ L) zugegeben worden war, erfolgte die tropfenweise Zugabe einer Lösung von Oxalylchlorid (34 μ L, 0.4 mmol) in DCM (300 μ L). Nach 2 stündigem Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösemittel im Hochvakuum vorsichtig entfernt und der verbliebene Rückstand getrocknet. Das erhaltene Rohprodukt **47** (30 mg, 0.087 mmol, 94 %) wurde aufgrund seiner Empfindlichkeit gegen Feuchtigkeit ohne weitere Analytik sofort weiter umgesetzt.

5.7.48. Pemetrexed-Diglutamat-Dimethylester (**48**)



Fmoc-L-Glu-OMe (383 mg, 1 mmol) und DIPEA (510 μ L, 3 mmol) wurden in DMF (10 mL) gelöst und zu 2-Chlorotriptyl-Harz (1.25 g, 1.6 mmol/g) gegeben. Die erhaltene Suspension wurde 16 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt.

Nachdem das Harz abfiltriert und mit 2 x DMF, 2 x DCM, 2 x DMF gewaschen wurde, wurde eine Mischung aus DCM:MeOH (4:1, 10 mL) und DIPEA (510 μ L, 3 mmol) zum Harz gegeben und die Suspension für 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt.

Das Harz wurde erneut gewaschen (2 x DMF, 2 x DCM, 2 x DMF). Anschließend wurde die Fmoc-Gruppe durch Zugabe von Piperidin:DMF (1:4, 10 mL) abgespalten. Die Suspension wurde bei Raumtemperatur für 20 min geschüttelt. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt, bevor das Harz erneut gewaschen wurde (2 x DMF, 2 x DCM, 2 x DMF).

Fmoc-Glu-OMe (575 mg, 1.5 mmol), DIPEA (341 μ L, 2 mmol), HOBt Monohydrat (306 mg, 2 mmol) und HBTU (759 mg, 2 mmol) wurden in DMF (10 mL) gelöst. Diese Lösung wurde zum Harz gegeben und 2 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt.

Dann wurde das Harz gewaschen (2 x DMF, 2 x DCM, 2 x DMF) und die Fmoc-Gruppe durch Zugabe von Piperidin:DMF (1:4, 10 mL) abgespalten. Die resultierende Suspension wurde bei

Raumtemperatur für 20 min geschüttelt. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt, bevor das Harz noch einmal gewaschen wurde (2 x DMF, 2 x DCM, 2 x DMF).

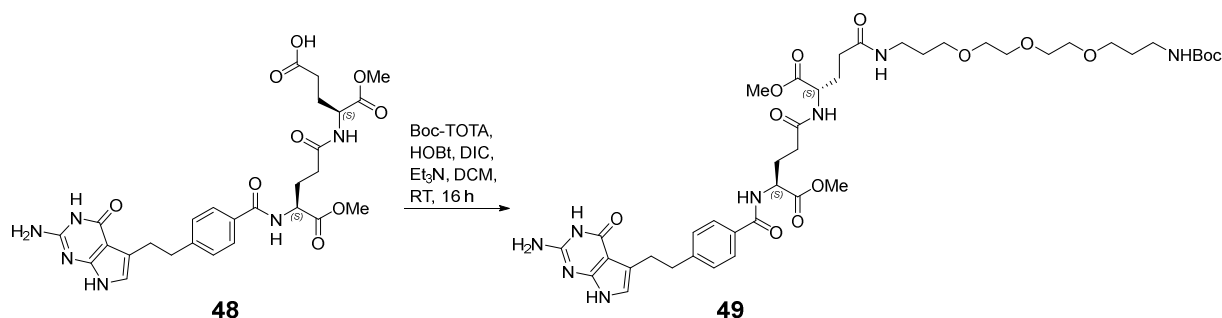
4-[2-(2-Amino-4,7-dihydro-4-oxo-3*H*-pyrrolo[2,3]pyrimidin-5-yl)ethyl]benzoesäure (447 mg, 1.5 mmol), DIPEA (341 μ L, 2 mmol), HOBt Monohydrat (306 mg, 2 mmol) und HBTU (759 mg, 2 mmol) wurden in DMF (10 mL) gelöst und 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde diese Lösung zum Harz gegeben und die erhaltene Suspension wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt.

Nachdem das Harz erneut gewaschen worden war (5 x DCM), wurde eine 35 %ige Lösung von TFA in DCM (10 mL) zugegeben. Nach 10-minütigem Schütteln bei Raumtemperatur wurde dieser Schritt einmal wiederholt. Anschließend wurde das Harz mit DCM gewaschen (3 x 5 mL), die Wasch- und Abspaltlösungen wurden vereinigt und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Pemetrexed-Diglutamat-Dimethylester **48** wurde als hellgrüner Feststoff erhalten und ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt (265 mg, 0.45 mmol, 45 %).

LC-MS (ESI): $t_R = 5.58$ min, m/z 584.2 berechnet für $C_{27}H_{32}N_6O_9$, gefunden: 585.1 $[M+H]^+$.

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 10.61$ (s, 1H), 10.14 (s, 1H), 8.68 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H), 8.28 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.79 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.30 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 6.31 (s, 1H), 5.20-5.11 (m, 2H), 4.45-4.38 (m, 1H), 4.30-4.23 (m, 1H), 4.04 (s, 2H), 3.65 (s, 3H), 3.61 (s, 3H), 2.99 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 2.85 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 2.32-2.21 (m, 4H), 2.14-2.05 (m, 1H), 2.00-1.89 (m, 2H), 1.83-1.72 (m, 1H).

5.7.49. Boc-TOTA-PMX(GluOMe) $_2$ (**49**)



48 (265 mg, 0.45 mmol) wurde in DMF (5 mL) gelöst. Anschließend wurden Triethylamin (131.6 μ L, 0.9 mmol), HOBt Monohydrat (109 mg, 0.67 mmol) Boc-TOTA (226 mg, 0.67 mmol) und DIC (147 μ L, 0.9 mmol) zugegeben. Die erhaltene Reaktionslösung wurde 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernung des Lösemittels unter vermindertem Druck wurde

der Rückstand chromatographisch aufgereinigt (C18-RP, 25 % → 50 % ACN in Wasser). Das gewünschte Produkt **49** wurde als hellgrüner Feststoff erhalten (234 mg, 0.26 mmol, 58 %).

TLC (DCM/MeOH = 5:1): R_f = 0.65.

LC-MS (ESI): t_R = 6.69 min, m/z 886.4 berechnet für $C_{42}H_{62}N_8O_{13}$, gefunden: 886.9 $[M+H]^+$.

1H NMR (400 MHz, MeOD): δ = 7.78 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.32 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 6.34 (s, 1H), 4.46 (q, J = 4.7 Hz, 1H), 4.43 (q, J = 4.7 Hz, 1H), 3.76 (s, 3H), 3.69 (s, 3H), 3.65-3.61 (m, 4H), 3.59-3.55 (m, 4H), 3.53-3.48 (m, 4H), 3.36 (s, 3H), 3.28-3.24 (m, 2H), 3.13 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 3.09-3.03 (m, 2H), 3.02-2.97 (m, 2H), 2.47-2.42 (m, 2H), 2.39-2.32 (m, 1H), 2.30-2.24 (m, 2H), 2.23-2.15 (m, 1H), 2.12-2.03 (m, 1H), 1.93-1.84 (m, 1H), 1.79-1.68 (m, 4H), 1.44 (s, 9H).

^{13}C NMR (100 MHz, MeOD): δ = 174.9, 174.6, 174.0, 173.8, 170.4, 148.5, 132.3, 129.8, 128.6, 119.8, 116.0, 100.3, 71.5, 71.3, 69.8, 53.7, 53.1, 52.9, 52.8, 38.7, 37.9, 37.8, 33.1, 32.7, 30.9, 30.4, 29.3, 28.8, 28.4, 27.7.

6. Literaturverzeichnis

- [1] P. R. Jungblut, H. G. Holzhütter, R. Apweiler and H. Schlüter, "The speciation of the proteome," *Chemistry Central Journal*, vol. 2, no. 16, pp. 1-10, 2008.
- [2] T. R. Burkard, M. Planyavsky, I. Kaupe, F. P. Breitwieser, T. Bürckstümmer, K. L. Bennett, G. Superti-Furga and J. Colinge, "Initial characterization of the human central proteome," *BMC Systems Biology*, vol. 5, no. 17, 2011.
- [3] M. S. Hipp, P. Kasturi and F. U. Hartl, "The proteostasis network and its decline in ageing," *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.*, vol. 20, pp. 421–435, 2019.
- [4] P. Majumder and W. Baumeister, "Proteasomes: unfoldase-assisted protein degradation machines," *Biological Chemistry*, vol. 401, no. 1, pp. 183–199, 2020.
- [5] S. Yasuda, H. Tsuchiya, A. Kaiho, Q. Guo, K. Ikeuchi, A. Endo, N. Arai, F. Ohtake, S. Murata, T. Inada, W. Baumeister, R. Fernandez-Busnadiego, K. Tanaka and Y. Saeki, "Stress- and ubiquitylation-dependent phase separation of the proteasome," *Nature*, vol. 578, pp. 296 - 300, 2020.
- [6] J. S. Thrower, L. Hoffmann, M. Rechsteiner and C. M. Pickart, "Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal," *The EMBO Journal*, vol. 19, no. 1, pp. 94–102, 2000.
- [7] S. Prakash, L. Tian, K. S. Ratliff, R. E. Lehotzky and A. Matouschek, "An unstructured initiation site is required for efficient proteasome-mediated degradation," *Nature Structural & Molecular Biology*, vol. 11, pp. 830–837, 2004.
- [8] E. K. Schrader, K. A. Harstad and A. Matouschek, "Targeting proteins for degradation," *Nature Chemical Biology*, vol. 5, no. 11, 2009.
- [9] R. L. Welchman, C. Gordon and R. J. Mayer, "Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals," *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.*, vol. 6, pp. 599-609, 2005.

- [10] A. Hershko, H. Heller, S. Elias and A. Ciechanover, "Components of Ubiquitin-Protein Ligase System," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 258, no. 13, pp. 8206-8214, 1983.
- [11] X. Huang and V. M. Dixit, "Drugging the undruggables: exploring the ubiquitin system for drug development," *Cell Research*, vol. 26, pp. 484-498, 2016.
- [12] D. A. Dougan, A. Mogk and B. Bukau, "Protein folding and degradation in bacteria: To degrade or not to degrade? That is the question," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 59, pp. 1607–1616, 2002.
- [13] D. B. Trentini, M. J. Suskiewicz, A. Heuck, R. Kurzbauer, L. Deszcz, K. Mechtler and T. Clausen, "Arginine phosphorylation marks proteins for degradation by a Clp protease," *Nature*, vol. 539, pp. 48-53, 2016.
- [14] J. Fuhrmann, A. Schmidt, S. Spiess, A. Lehner, K. Turgay, K. Mechtler, E. Charpentier and T. Clausen, "McsB Is a Protein Arginine Kinase That Phosphorylates and Inhibits the Heat-Shock Regulator CtsR," *Science*, pp. 1323-1327, 2009.
- [15] M. J. Suskiewicz, B. Hajdusits, R. Beveridge, A. Heuck, L. D. Vu, R. Kurzbauer, K. Hauer, V. Thoeny, K. Rumpel, K. Mechtler, A. Meinhart and T. Clausen, "Structure of McsB, a protein kinase for regulated arginine phosphorylation," *Nature Chemical Biology*, vol. 15, pp. 510–518, 2019.
- [16] H. Lee and J.-W. Suh, "Anti-tuberculosis lead molecules from natural products targeting Mycobacterium tuberculosis ClpC1," *J Ind Microbiol Biotechnol*, vol. 43, pp. 205–212, 2016.
- [17] X. Li and Y. Song, "Proteolysis-targeting chimera (PROTAC) for targeted protein degradation and cancer therapy," *Journal of Hematology & Oncology*, vol. 13, no. 50, 2020.
- [18] K. M. Sakamoto, K. B. Kim, A. Kumagai, F. Mercurio, C. M. Crews and R. J. Deshaies, "Protacs: Chimeric molecules that target proteins to the Skp1–Cullin–F box complex

- for ubiquitination and degradation," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 98, no. 15, 2001.
- [19] A. R. Schneekloth, M. Pucheault, H. S. Tae and C. M. Crews, "Targeted intracellular protein degradation induced by a small molecule: En route to chemical proteomics," *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, vol. 18, no. 22, pp. 5904-5908, 2008.
- [20] M. Pettersson and C. M. Crews, "PROteolysis TARgeting Chimeras (PROTACs) - Past, present and future," *Drug Discovery Today: Technologies*, vol. 31, pp. 15-27, 2019.
- [21] B. E. Smith, S. L. Wang, S. Jaime-Figueroa, A. Harbin, J. Wang, B. D. Hamman and C. M. Crews, "Differential PROTAC substrate specificity dictated by orientation of recruited E3 ligase," *Nature Communications*, vol. 10, 2019.
- [22] G. E. Winter, D. L. Buckley, J. Paulk, J. M. Roberts, A. Souza, S. Dhe-Paganon and J. E. Bradner, "Phthalimide conjugation as a strategy for in vivo target protein degradation," *Science*, vol. 348, no. 6241, pp. 1376-1381, 2015.
- [23] D. Remillard, D. L. Buckley, J. Paulk, G. L. Brien, M. Sonnett, H.-S. Seo, S. Dastjerdi, M. Wühr, S. Dhe-Paganon, S. A. Armstrong and J. E. Bradner, "Degradation of the BAF Complex Factor BRD9 by Heterobifunctional Ligands," *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 56, pp. 5738–5743, 2017.
- [24] S.-L. Paiva and C. M. Crews, "Targeted protein degradation: elements of PROTAC design," *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 50, pp. 111–119, 2019.
- [25] J. D. Harling and I. E. D. Smith, "lap e3 ligase directed proteolysis targeting chimeric molecules". Patent WO2016169989 (A1), 2016.
- [26] M. Scheepstra, K. F. W. Hekking, L. v. Hijfte and R. H. A. Folmer, "Bivalent Ligands for Protein Degradation in Drug Discovery," *Computational and Structural Biotechnology Journal*, vol. 17, pp. 160–176, 2019.

- [27] P. Pfaff, K. T. G. Samarasinghe, C. M. Crews and E. M. Carreira, "Reversible Spatiotemporal Control of Induced Protein Degradation by Bistable PhotoPROTACs," *ACS Cent. Sci.*, vol. 5, pp. 1682-1690, 2019.
- [28] Y.-H. Jin, M.-C. Lu, Y. Wang, W.-X. Shan, X.-Y. Wang, Q.-D. You and Z.-Y. Jiang, "Azo-PROTAC: Novel Light-Controlled Small-Molecule Tool for Protein Knockdown," *J. Med. Chem.*, vol. 63, no. 9, pp. 4644-4654, 2020.
- [29] J. Liu, H. Chen, L. Ma, Z. He, D. Wang, Y. Liu, Q. Lin, T. Zhang, N. Gray, H. Ü. Kaniskan, J. Jin and W. Wei, "Light-induced control of protein destruction by opto-PROTAC," *Sci. Adv.*, vol. 6, no. 8, 2020.
- [30] C. Steinebach, S. Lindner, N. D. Udeshi, D. C. Mani, H. Kehm, S. Köpff, S. A. Carr, M. Gütschow and J. Krönke, "Homo-PROTACs for the Chemical Knockdown of Cereblon," *ACS Chem. Biol.*, vol. 13, no. 9, pp. 2771-2782, 2018.
- [31] C. Steinebach, H. Kehm, S. Lindner, L. P. Vu, S. Köpff, A. L. Marmol, C. Weiler, K. G. Wagner, M. Reichenzeller, J. Krönke und M. Gütschow, „PROTAC-mediated crosstalk between E3 ligases," *Chem. Commun.*, Bd. 55, pp. 1821--1824, 2019.
- [32] J. Jin, Y. Wu, J. Chen, Y. Shen, L. Zhang, H. Zhang, L. Cheng, H. Yuan, H. Chen, W. Zhang and X. Luan, "The peptide PROTAC modality: a novel strategy for targeted protein ubiquitination," *Theranostics*, vol. 10, no. 22, pp. 10141-10153, 2020.
- [33] S. An and L. Fu, "Small-molecule PROTACs: An emerging and promising approach for the development of targeted therapy drugs," *EBioMedicine*, vol. 36, pp. 553-562, 2018.
- [34] T. Minko, "Nanoformulation of BRD4-Degrading PROTAC: Improving Druggability To Target the 'Undruggable' MYC in Pancreatic Cancer," *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 41, no. 10, pp. 684-686, 2020.
- [35] [Online]. Available: <https://www.arvinas.com/pipeline-programs/pipeline>. [Accessed 19 Januar 2021].

- [36] S. Khan, X. Zhang, D. Lv, Q. Zhang, Y. He, X. Liu, D. Thummuri, Y. Yuan, J. S. Wiegand, J. Pei, A. Sharma, C. R. McCurdy, V. M. Kuruvilla, N. Baran, A. A. Ferrando, Y. Kim, A. Rogojina, P. J. Houghton, G. Huang, R. Hromas, M. Konopleva, G. Zheng and D. Zhou, "A selective BCL-XL PROTAC degrader achieves safe and potent antitumor activity," *Nature Medicine*, vol. 25, pp. 1938–1947, 2019.
- [37] Y. Itoh, M. Ishikawa, M. Naito and Y. Hashimoto, "Protein Knockdown Using Methyl Bestatin–Ligand Hybrid Molecules: Design and Synthesis of Inducers of Ubiquitination-Mediated Degradation of Cellular Retinoic Acid-Binding Proteins," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 132, no. 16, pp. 5820 - 5826, 2010.
- [38] J. Lu, Y. Qian, M. Altieri, H. Dong, J. Wang, K. Raina, J. Hines, J. D. Winkler, A. P. Crew, K. Coleman and C. M. Crews, "Hijacking the E3 Ubiquitin Ligase Cereblon to Efficiently Target BRD4," *Chemistry & Biology*, vol. 22, pp. 755–763, 2015.
- [39] A. C. Lai, M. Toure, D. Hellerschmied, J. Salami, S. Jaime-Figueroa, E. Ko, J. Hines and C. M. Crews, "Modular PROTAC Design for the Degradation of Oncogenic BCR-Abl," *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 55, pp. 807 –810, 2016.
- [40] M. Zengerle, K.-H. Chan and A. Ciulli, "Selective Small Molecule Induced Degradation of the BET Bromodomain Protein BRD4," *ACS Chem. Biol.*, vol. 10, pp. 1770–1777, 2015.
- [41] S. Wang, Y. Song, Y. Wang, Y. Gao, S. Yu, Q. Zhao, X. Jin and H. Lu, "Design and synthesis of novel bispecific molecules for inducing BRD4 protein degradation," *Chemical Research in Chinese Universities*, vol. 34, pp. 67–74, 2018.
- [42] M. K. Renner, Y.-C. Shen, X.-C. Cheng, P. R. Jensen, W. Frankmoelle, C. A. Kauffman, W. Fenical, E. Lobkovsky and J. Clardy, "Cyclomarins A-C, New Antiinflammatory Cyclic Peptides Produced by a Marine Bacterium (*Streptomyces* sp.)," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 121, no. 49, pp. 11273-11276, 1999.

- [43] P. Barbie and U. Kazmaier, "Total synthesis of cyclomarines A, C and D, marine cyclic peptides with interesting anti-tuberculosis and anti-malaria activities," *Organic & Biomolecular Chemistry*, vol. 14, pp. 6036-6054, 2016.
- [44] E. K. Schmitt, M. Riwanto, V. Sambandamurthy, S. Roggo, C. Miault, C. Zwingelstein, P. Krastel, C. Noble, D. Beer, S. P. S. Rao, M. Au, P. Niyomrattanakit, V. Lim, J. Zheng, D. Jeffrey, K. Pethe and L. R. Camacho, "The Natural Product Cyclamarin Kills Mycobacterium Tuberculosis by Targeting the ClpC1 Subunit of the Caseinolytic Protease," *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 50, pp. 5889–5891, 2011.
- [45] D. Vasudevan, S. P. S. Rao and C. G. Noble, "Structural Basis of Mycobacterial Inhibition by Cyclamarin A," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 288, no. 43, pp. 30883–30891, 2013.
- [46] K. Weinhäupl, M. Brennich, U. Kazmaier, J. Lelievre, L. Ballell, A. Goldberg, P. Schanda and H. Fraga, "The antibiotic cyclamarin blocks arginine-phosphate-induced millisecond dynamics in the N-terminal domain of ClpC1 from Mycobacterium tuberculosis," *J. Biol. Chem.*, vol. 293, no. 22, pp. 8379–8393, 2018.
- [47] M. Maurer, D. Linder, K. B. Franke, J. Jäger, G. Taylor, F. Gloge, S. Gremer, L. L. Breton, M. P. Mayer, E. Weber-Ban, M. Carroni, B. Bukau and A. Mogk, "Toxic Activation of an AAA+ Protease by the Antibacterial Drug Cyclamarin A," *Cell Chemical Biology*, vol. 26, pp. 1169–1179, 2019.
- [48] S.-J. Wen and Z.-J. Yao, "Total Synthesis of Cyclamarin C," *Organic Letters*, vol. 6, no. 16, pp. 2721-2724, 2004.
- [49] A. Kiefer, C. D. Bader, J. Held, A. Esser, R. J. M. Empting, R. Müller and U. Kazmaier, "Synthesis of New Cyclamarin Derivatives and Their Biological Evaluation towards Mycobacterium Tuberculosis and Plasmodium Falciparum," *Chem. Eur. J*, vol. 25, no. 37, pp. 8894 –8902, 2019.

- [50] A. Kiefer and U. Kazmaier, "Syntheses of Cyclomarins - Interesting Marine Natural Products with Distinct Mode of Action towards Malaria and Tuberculosis," *Synthesis*, vol. 51, pp. 107-121, 2019.
- [51] D. J. Payne, M. N. Gwynn, D. J. Holmes and D. L. Pompliano, "Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 6, pp. 29-40, 2007.
- [52] A. R. Brochado, A. Telzerow, J. Bobonis, M. Banzhaf, A. Mateus, J. Selkrig, E. Huth, S. Bassler, J. Z. Beas, M. Zietik, N. Ng, S. Foerster, B. Ezraty, B. Py, F. Barras, M. M. Savitski, P. Bork, S. Göttig and A. Typas, "Species-specific activity of antibacterial drug combinations," *Nature*, vol. 559, pp. 259-263, 2018.
- [53] W. Witte and M. Mielke, "β-Laktamasen mit breitem Wirkungsspektrum," *Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch -*, vol. 46, pp. 881-890, 2003.
- [54] C. Wendt, H. v. Baum, M. Kaase, E. Meyer, H. Suger-Wiedeck and C. Ruscher, "Hygienemaßnahmen bei Infektionen oder Besiedlung mit multiresistenten gramnegativen Stäbchen," *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, vol. 55, pp. 1311-1354, 2012.
- [55] P. Gopal, J. P. Sarathy, M. Yee, P. Ragunathan, J. Shin, S. Bhushan, J. Zhu, T. Akopian, O. Kandror, T. K. Lim, M. Gegenbacher, Q. Lin, E. J. Rubin, G. Grüber and T. Dick, "Pyrazinamide triggers degradation of its target aspartate decarboxylase," *Nature Communications*, vol. 11, pp. 1-10, 2020.
- [56] C. Pozzi, L. Lopresti, G. Tassone and S. Mangani, "Targeting Methyltransferases in Human Pathogenic Bacteria: Insights into Thymidylate Synthase (TS) and Flavin-Dependent TS (FDTS)," *Molecules*, vol. 24, 2019.
- [57] J. A. Ribeiro, S. M. Chavez-Pacheco, G. S. d. Oliveira, C. d. S. Silva, J. H. P. Giudice, G. A. Libreros-Zuniga and M. V. B. Dias, "Crystal structures of the closed form of Mycobacterium tuberculosis dihydrofolate reductase in complex with dihydrofolate and antifolates," *Acta Cryst.*, vol. D75, pp. 682-693, 2019.

- [58] M. Choi, K. Karunaratne and A. Kohen, "Flavin-Dependent Thymidylate Synthase as a New Antibiotic Target," *Molecules*, vol. 21, no. 654, 2016.
- [59] F. T. Hofmann, C. Lindemann, H. Salia, P. Adamitzki, J. Karanicolas and F. P. Seebeck, "A phosphoarginine containing peptide as an artificial SH2 ligand," *Chem. Commun.*, vol. 47, no. 37, pp. 10335–10337, 2011.
- [60] K. H. Lim, H. Huang, A. Pralle and S. Park, "Stable, High-Affinity Streptavidin Monomer for Protein Labeling and Monovalent Biotin Detection," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 110, no. 1, pp. 57-67, 2013.
- [61] P. Staszek, L. A. Weston, K. Ciacka, U. Krasuska and A. Gniazdowska, "L-Canavanine: How does a simple non-protein amino acid inhibit cellular function in a diverse living system?," *Phytochem Rev*, vol. 16, pp. 1269–1282, 2017.
- [62] E. Uh, E. R. Jackson, G. San Jose, M. Maddox, R. E. Lee, R. E. Lee, H. I. Boshoff and C. S. Dowd, "Antitubercular activity of fosmidomycin, FR900098, and their Lipophilic Analogs," *Bioorg Med Chem Lett.*, vol. 21, no. 23, pp. 6973–6976, 2011.
- [63] K. R. Tallman, S. R. Levine and K. E. Beatty, "Profiling Esterases in Mycobacterium tuberculosis Using Far-Red Fluorogenic Substrates," *ACS Chem. Biol.*, vol. 11, pp. 1810–1815, 2016.
- [64] E. M. Larsen and R. J. Johnson, "Microbial esterases and ester prodrugs: An unlikely marriage for combating antibiotic resistance," *Drug Dev Res.*, vol. 80, pp. 33–47, 2019.
- [65] D. Awasthi and J. S. Freundlich, "Antimycobacterial Metabolism: Illuminating Mycobacterium tuberculosis Biology and Drug Discovery," *Trends in Microbiology*, vol. 25, no. 9, pp. 756-767, 2017.
- [66] S. Seo, K. Onizuka, C. Nishioka, E. Takahashi, S. Tsuneda, H. Abe and Y. Ito, "Phosphorylated 5-ethynyl-2'-deoxyuridine for advanced DNA labeling," *Org. Biomol. Chem.*, vol. 13, pp. 4589–4595, 2015.

- [67] J. Pahor, S. Stavber, A. Cusak, G. Kosec, H. Petkovic and A. P. Berke, "Toward the Efficient Synthesis of New Phosphopantothenate Derivatives by Using Chlorophosphate Reagents," *Synthesis*, vol. 48, pp. 3763–3772, 2016.
- [68] Y. Hwang and P. A. Cole, "Efficient Synthesis of Phosphorylated Prodrugs with Bis(POM)-phosphoryl Chloride," *Organic Letters*, vol. 6, no. 10, pp. 1555-1556, 2004.
- [69] S. Köcher, J. Rey, J. Bongards, A. N. Tiaden, M. Melzer, P. J. Richards, M. Ehrmann and M. Kaiser, "Tailored Ahp-cyclodepsipeptides as Potent Non-covalent Serine Protease Inhibitors," *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 56, pp. 8555–8558, 2017.
- [70] D. A. Evans, A. M. Ratz, B. E. Huff and G. S. Sheppard, "Mild Alcohol Methylation Procedures for the Synthesis of Polyoxygenated Natural Products. Applications to the Synthesis of Lonomycin A," *Tetrahedron Letters*, vol. 35, no. 39, pp. 7171-7172, 1994.
- [71] C. J. Salomon, E. G. Mata and O. A. Mascaretti, "Bis(Tributyltin)oxide. A mild, neutral and selective reagent for cleavage of esters. Scope and limitation of the reaction.," *Tetrahedron Letters*, vol. 32, no. 34, pp. 4239-4242, 1991.
- [72] K. C. Nicolaou, A. A. Estrada, M. Zak, L. S. H. and B. S. Safina, "A Mild and Selective Method for the Hydrolysis of Esters with Trimethyltin Hydroxide," *Angew. Chem.*, vol. 117, no. 9, pp. 1402–1406, 2005.
- [73] M. R. Luzung, C. A. Lewis and P. S. Baran, "Direct, Chemoselective N-tert-Prenylation of Indoles by C-H Functionalization," *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 48, pp. 7025–7029, 2009.
- [74] M. C. Koshla, R. R. Smeby and F. M. Bumpus, "Failure Sequence in Solid-Phase Peptide Synthesis Due to the Presence of an α -Alkylamino Acid," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 94, no. 13, pp. 4721–4724, 1972.
- [75] M. Teixido, F. Albericio and E. Giralt, "Solid-phase synthesis and characterization of N-methyl-rich peptides," *The Journal of Peptide Research*, vol. 65, no. 2, pp. 153-166, 2005.

- [76] E. Pedroso, A. Grandas, X. d. I. Heras, R. Eritja and E. Giralt, "Diketopiperazine formation in solid phase peptide synthesis using p-alkoxybenzyl ester resins and Fmoc-amino acids," *Tetrahedron Letters*, vol. 27, no. 6, pp. 743-746, 1986.
- [77] R. Bollhagen, M. Schmiedberger, K. Barlos and E. Grell, "A New Reagent for the Cleavage of Fully Protected Peptides synthesised on 2-Chlorotrityl Chloride Resin," *Journal of the Chemical Society Chemical Communications*, vol. 22, no. 22, pp. 2559-2560, 1994.
- [78] A. A. Waghmare, R. M. Hindupur and H. N. Pati, "Propylphosphonic Anhydride: An Expedient Reagent for Organic Synthesis," *Review Journal of Chemistry*, vol. 4, no. 2, pp. 53–131, 2014.
- [79] H. M. M. Bastiaans, J. L. v. d. Baan and H. C. J. Ottenheijm, "Flexible and Convergent Total Synthesis of Cyclotheonamide B," *J. Org. Chem.*, vol. 62, pp. 3880-3889, 1997.
- [80] K. A. Abrahams and G. S. Besra, "Mycobacterial cell wall biosynthesis: a multifaceted antibiotic target," *Parasitology*, vol. 145, pp. 116–133, 2018.
- [81] F. Pan, M. Jackson, Y. Ma and M. McNeil, "Cell Wall Core Galactofuran Synthesis Is Essential for Growth of Mycobacteria," *Journal of Bacteriology*, vol. 183, no. 13, pp. 3991-3998, 2001.
- [82] C. Shi, D. Tiwari, D. J. Wilson, C. L. Seiler, D. Schnappinger and C. C. Aldrich, "Bisubstrate Inhibitors of Biotin Protein Ligase in Mycobacterium tuberculosis Resistant to Cyclonucleoside Formation," *ACS Med. Chem. Lett.*, vol. 4, pp. 1213–1217, 2013.
- [83] J. Feng, A. S. Paparella, G. W. Booker, S. W. Polyak and A. D. Abell, "Biotin Protein Ligase Is a Target for New Antibacterials," *Antibiotics*, vol. 5, no. 26, 2016.
- [84] S. Purushothaman, G. Gupta, R. Srivastava, V. G. Ramu and A. Surolia, "Ligand Specificity of Group I Biotin Protein Ligase of Mycobacterium tuberculosis," *PLoS ONE*, vol. 3, no. 5, 2008.

- [85] J. M. Kolos, A. M. Voll, M. Bauder and F. Hausch, "FKBP Ligands - Where We Are and Where to Go?," *Frontiers in Pharmacology*, vol. 9, 2018.
- [86] C. B. Kang, H. Ye, S. Dhe-Paganon and H. S. Yoon, "FKBP Family Proteins: Immunophilins with Versatile Biological Functions," *Neurosignals*, vol. 16, pp. 318–325, 2008.
- [87] S. Barik, "Immunophilins: for the love of proteins," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 63, pp. 2889–2900, 2006.
- [88] J.-U. Rahfeld, K. P. Rücknagel, G. Stoller, S. M. Horne, A. Schierhorn, K. D. Young and G. Fischer, "Isolation and Amino Acid Sequence of a New 22-kDa FKBP-like Peptidyl-prolyl cis/trans-Isomerase of *Escherichia coli*," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 271, no. 36, pp. 22130–22138, 1996.
- [89] Y. Suzuki, M. Haruki, K. Takano, M. Morikawa and S. Kanaya, "Possible involvement of an FKBP family member protein from a psychrotrophic bacterium *Shewanella* sp. SIB1 in cold-adaptation," *Eur. J. Biochem.*, vol. 271, pp. 1372–1381, 2004.
- [90] R. L. Vicente, S. Marin, J. R. Valverde, C. Palomino, R. P. Mellado and S. Gullon, "Functional identification of a *Streptomyces lividans* FKBP-like protein involved in the folding of overproduced secreted proteins," *Open Biol*, vol. 9, no. 10, pp. 190-201, 2019.
- [91] P. Liu, A. Calderon, G. Konstantinidis, J. Hou, S. Voss, X. Chen, F. Li, S. Banerjee, J.-E. Hoffmann, C. Theiss, L. Dehmelt and Y.-W. Wu, "A Bioorthogonal Small-Molecule-Switch System for Controlling Protein Function in Live Cells," *Angew. Chem.*, vol. 126, pp. 10213 –10219, 2014.
- [92] A. Wrobel, K. Arciszewska, D. Maliszewski and D. Drozdowska, "Trimethoprim and other nonclassical antifolates an excellent template for searching modifications of dihydrofolate reductase enzyme inhibitors," *The Journal of Antibiotics*, vol. 73, pp. 5–27, 2020.
- [93] H. Heaslet, M. Harris, K. Fahnoe, R. Sarver, H. Putz, J. Chang, C. Subramanyam, G. Barreiro and J. R. Miller, "Structural comparison of chromosomal and exogenous

- dihydrofolate reductase from *Staphylococcus aureus* in complex with the potent inhibitor trimethoprim," *Proteins*, vol. 76, pp. 706–717, 2009.
- [94] M. R. Nixon, K. W. Saionz, M.-S. Koo, M. J. Szymonifka, H. Jung, J. P. Roberts, M. Nandakumar, A. Kumar, R. Liao, T. Rustad, J. C. Sacchettini, K. Y. Rhee, J. S. Freundlich and D. R. Sherman, "Folate Pathway Disruption Leads to Critical Disruption of Methionine Derivatives in *Mycobacterium tuberculosis*," *Chemistry & Biology*, vol. 21, pp. 819–830, 2014.
- [95] M. V. Raimondi, O. Randazzo, M. L. Franca, G. Barone, E. Vignoni, D. Rossi and S. Collina, "DHFR Inhibitors: Reading the Past for Discovering Novel Anticancer Agents," *Molecules*, vol. 24, no. 6, 2019.
- [96] P. Filippakopoulos, J. Qi, S. Picaud, Y. Shen, W. B. Smith, O. Fedorov, E. M. Morse, T. Keates, T. T. Hickman, I. Felletar, M. Philpott, S. Munro, M. R. McKeown, Y. Wang, C. A. French, O. Wiest, A. L. Kung, S. Knapp and J. E. Bradner, "Selective inhibition of BET bromodomains," *Nature*, vol. 468, pp. 1067-1073, 2010.
- [97] G. Zhang, S. G. Smith and M.-M. Zhou, "Discovery of Chemical Inhibitors of Human Bromodomains," *Chem. Rev.*, vol. 115, pp. 11625–11668, 2015.
- [98] S. R. Haynes, C. Dollard, F. Winston, S. Beck, J. Trowsdale and I. B. Dawid, "The Bromodomain - a Conserved Sequence Found in Human, *Drosophila* and Yeast Proteins.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 20, pp. 2603–2603, 1992.
- [99] E. C. Taylor and D. Kuhnt, "A Dideazatetrahydrofolate Analogue Lacking a Chiral Center at C-6, N-[4-[2-(2-Amino-3,4-dihydro-4-oxo-7H-pyrrolo[2,3-d]-pyrimidin-5-yl)ethyl]benzoyl]-L-glutamic Acid, Is an Inhibitor of Thymidylate Synthase," *J. Med. Chem.*, vol. 35, pp. 4450-4454, 1992.
- [100] C. Shih, V. J. Chen, L. S. Gossett, S. B. Gates, W. C. MacKellar, L. L. Habeck, K. A. Shackelford, L. G. Mendelsohn, D. J. Soose, V. F. Patel, S. L. Andis, J. R. Bewley, E. A. Rayl, B. A. Moroson, G. P. Beardsley, W. Kohler, M. Ratnam and R. M. Schultz,

“LY231514, a Pyrrolo[2,3-d]pyrimidine-based Antifolate That Inhibits Multiple Folate-requiring Enzymes,” *Cancer Research*, vol. 57, pp. 1116-1123, 1997.

- [101] S. Chattopadhyay, R. G. Moran and I. D. Goldman, “Pemetrexed: biochemical and cellular pharmacology, mechanisms, and clinical applications,” *Mol. Cancer Ther.*, vol. 6, no. 2, pp. 404-417, 2007.

7. Anhang

7.1. Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

7.2. Danksagung

An dieser Stelle möchte mich noch bei einigen Personen bedanken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Zuallererst möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Markus Kaiser für die Übertragung dieses überaus interessanten und spannenden Themas bedanken. Auch möchte ich mich für die vielen Ratschläge und Tipps bedanken, besonders, wenn es um die Lösung von unerwarteten Problemen während der Synthesen ging. Dafür ein großes Danke!

Ich möchte mich auch ganz herzlich bei Dr. Tim Clausen vom IMP in Wien für die Übernahme des Zweitgutachtens und die super Kooperation bedanken.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen aktuellen und ehemaligen Arbeitskollegen der AG Kaiser für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Mein besonderer Dank gilt vor allem Dr. Florian Schulz, Dr. Steffen Köcher, Dr. Sabrina Ninck, Dr. Geronimo Heilmann, Lorenz Fehr und Leonard Sewald. Vielen Dank für die vielen spannenden „fachlichen“ Gespräche! Ebenso hervorzuheben sind hier Svenja Heimann, Jenny Bormann und Svenja Kernchen für die Hilfe bei all den kleinen und größeren Problemchen im Laboralltag sowie bei der Lösung bürokratischer Angelegenheiten!

Zu guter Letzt möchte ich mich auch bei meiner Familie für die Unterstützung während des Studiums und der Promotionszeit bedanken. Und natürlich auch bei meiner Verlobten Stephanie, die es jederzeit geduldig ertragen hat, wenn ich nach der Arbeit schon wieder über den nächsten Labortag nachgedacht und Experimente durchgeplant habe, statt den Feierabend zu genießen. Danke für deine Geduld und Unterstützung!