

Supramolekulare Liganden für 14-3-3-Proteine

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

– Dr. rer. nat. –

vorgelegt von

Elvan Yilmaz

geboren in Neuss

Fakultät für Chemie
der
Universität Duisburg-Essen

2018

Für meine Mutter

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Mai 2014 bis März 2018 im Arbeitskreis von Prof. Dr. Markus Kaiser am Zentrum für Medizinische Biotechnologie in der Abteilung für Chemische Biologie an der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

Tag der Disputation: 18.05.2018

Gutachter: Prof. Dr. Markus Kaiser

Prof. Dr. Christian Ottmann

Vorsitzender: Prof. Dr. Sebastian Schlücker

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	7
2.	Theoretische Grundlagen	8
2.1.	Supramolekulare Chemie	8
2.2.	Protein-Protein-Interaktionen (PPI)	16
2.3.	14-3-3-Proteine als PPI-Adapterproteine	20
2.3.1.	Entdeckung und Benennung	20
2.3.2.	Struktur und Funktion	21
2.3.3.	Stabilisatoren und Inhibitoren für 14-3-3-Proteine	24
3.	Zielsetzung	28
4.	Ergebnisse und Diskussion	30
4.1.	Synthese des Phosphophenoethers 1	30
4.1.1.	Synthese des Phosphates 2	31
4.1.2.	Umlagerung zum Phosponat	32
4.1.3.	Synthese des Bromacetamidderivates (4)	33
4.1.4.	Substitution zum geschützten Phosphophenoether	33
4.1.5.	Verseifung zum Phosphophenoether (1)	34
4.2.	Synthese von Biv1	34
4.3.	Synthese von Biv2	36
4.4.	Synthese von Biv3	39
4.5.	Synthese von Mov1	40
4.6.	Biochemische Evaluation von Biv1, Biv2 und Biv3	41
4.7.	Kristallstrukturen von Biv1, Biv2 und Biv3	44
4.8.	Modifizierung von Biv3	47
4.9.	Synthese von Biv4	48
4.10.	Synthese von Biv5	51

4.11.	<i>Biochemische Evaluation von Biv4 und Biv5</i>	53
4.12.	<i>Synthese von monovalenten Verbindungen</i>	54
4.13.	<i>Biochemische Evaluation der Mov-Verbindungen</i>	57
4.14.	<i>Kristallstruktur von Mov2</i>	58
4.15.	<i>Synthese der Mal-Verbindungen</i>	59
4.16.	<i>Biochemische Evaluation der Mal-Verbindungen</i>	62
4.17.	<i>Synthese von Succinimid-Verbindungen</i>	63
4.18.	<i>Biochemische Evaluation der Suc-Verbindungen</i>	64
5.	<i>Zusammenfassung und Ausblick</i>	66
6.	<i>Summary and Outlook</i>	68
7.	<i>Experimentaltteil</i>	70
7.1.	<i>Arbeitsmaterialien und Instrumente</i>	70
7.1.1.	<i>Chemikalien</i>	70
7.1.2.	<i>Säulenchromatographie</i>	70
7.1.3.	<i>Dünnschichtchromatographie (DC)</i>	70
7.1.4.	<i>Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC/MS)</i>	70
7.1.5.	<i>Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)</i>	71
7.1.6.	<i>Gefriertrocknung</i>	71
7.1.7.	<i>NMR-Spektroskopie</i>	72
7.2.	<i>Allgemeine Methoden</i>	73
7.2.1.	<i>Methode A: Bildung des Phosphophenoleters durch Williamsonsche Ethersynthese</i>	73
7.2.2.	<i>Methode B: Esterverseifung</i>	73
7.2.3.	<i>Methode C: Amidkupplung</i>	73
7.2.4.	<i>Methode D: Entschützung des Phosphonates</i>	74
7.3.	<i>Synthese des Phosphophenoleters 1</i>	75
7.4.	<i>Synthese des bivalenten Inhibitors Biv1</i>	80

7.5.	<i>Synthese des bivalenten Inhibitors Biv2</i>	82
7.6.	<i>Synthese des bivalenten Inhibitors Biv3</i>	86
7.7.	<i>Synthese des bivalenten Inhibitors Biv4</i>	87
7.8.	<i>Synthese des bivalenten Inhibitors Biv5</i>	94
7.9.	<i>Synthese der monovalenten Verbindungen</i>	98
7.10.	<i>Synthese der Maleimid-Verbindungen</i>	106
7.11.	<i>Synthese der Succinimid-Verbindungen</i>	112
8.	<i>Literatur</i>	116
9.	<i>Anhang</i>	124
9.1.	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	124
9.2.	<i>Abbildungsverzeichnis</i>	127
9.3.	<i>Tabellenverzeichnis</i>	130
9.4.	<i>Lebenslauf</i>	131
9.5.	<i>Erklärung</i>	132
9.6.	<i>Danksagung</i>	133

1. Einleitung

Proteine sind in allen Zellen vorhanden und an nahezu allen biologischen Prozessen beteiligt. Sie fungieren gewissermaßen als molekulare Werkzeuge der Zelle. Ihre Aufgaben reichen von Zellbewegung über Transport von Metaboliten bis hin zur Katalyse chemischer Reaktionen und Erkennung von Signalen.¹ Daher stehen Proteine oftmals im Mittelpunkt der molekularbiologischen Forschung. Für die Erforschung der biologischen Funktion ausgewählter Proteine reicht es aber nicht länger aus, nur Methoden einer naturwissenschaftlichen Disziplin zu verwenden, vielmehr ist aufgrund der Komplexität biologischer Systeme ein Zusammenspiel mehrerer Disziplinen erforderlich. Wechselwirkungen innerhalb eines Proteins oder zwischen Proteinen und anderen Molekülen können mithilfe der Supramolekularen Chemie beschrieben werden, welche komplementär zu den „klassischen“ Forschungsrichtungen wie z. B. der Biochemie steht.²

In der vorliegenden Arbeit sollen auf der Basis supramolekularer Überlegungen neuartige Modulatoren einer definierten Proteinklasse, den 14-3-3-Proteinen, entwickelt werden. Diese sind in einer Vielzahl von Protein-Protein-Interaktionen involviert und dementsprechend können supramolekulare Hemmstoffe und Stabilisatoren dieser Wechselwirkung entwickelt werden.³⁻⁵

2. Theoretische Grundlagen

2.1. Supramolekulare Chemie

Leben ist komplex und dementsprechend zeichnen sich viele Prozesse und Reaktionen in der Natur auch durch eine große Komplexität aus. Nichtsdestotrotz zeigen diese Prozesse oftmals eine hohe Effektivität. Es gehört zu den großen Fragestellungen der Biologie, wie eine hohe Komplexität wie Leben in solch hoher Effektivität erreicht werden kann.

Ein Beispiel für die hohe Effektivität von biologischen Prozessen ist der Aufbau von spezifischen Funktionsmolekülen, der auf der Knüpfung von kovalenten Bindungen beruht. So wird das Coenzym Vitamin B12 hocheffizient von Mikroorganismen biosynthetisiert und übernimmt nach Aufnahme durch die Nahrung eine Vielzahl von biologischen Funktionen in komplexen Organismen. Vitamin B12 ist beim Menschen an der Produktion von roten Blutkörperchen beteiligt und wirkt an verschiedenen Nervenzellen- und Stoffwechselprozessen im Organismus mit.⁶ Im Labor dagegen waren mehr als 10 Jahre Forschungsarbeiten notwendig, um eine Totalsynthese des Coenzym Vitamin B12 zu erreichen.⁷ Die Entwicklung effizienter Methoden zum Aufbau kovalenter Bindungen ist eine klassische Fragestellung der Organischen Chemie.

Ein weiteres Funktionsmolekül mit einer Vitamin B12-verwandten Struktur ist der Eisenporphyrinkomplex der Hämeinheit des Proteins Hämoglobin. Diese prosthetische Gruppe kann molekularen Sauerstoff effizient und reversibel binden und gibt dem Protein Hämoglobin somit die Möglichkeit, den Transport von Sauerstoff in Wirbeltieren zu übernehmen. Um diese Funktion effektiv zu erfüllen, ist der Eisenporphyrinkomplex jedoch in eine charakteristische Proteinumgebung integriert, welche die reversible Bindung des molekularen Sauerstoffs unterstützt. Des Weiteren wird das funktionale Hämoglobinprotein erst durch eine nicht-kovalente Oligomerisierung aus vier einzelnen Hämproteineinheiten gebildet. Nicht-kovalente Wechselwirkungen spielen beim Hämoglobin also sowohl eine wichtige Rolle bei der effektiven Bindung von Sauerstoff als auch bei der Bildung der funktionsfähigen Quartärstruktur. Ein weiteres, mittlerweile klassisches Beispiel für biologisch-relevante, nicht-kovalente Wechselwirkungen jenseits der Proteine ist die

Zusammensetzung von zwei komplementären DNA-Einzelsträngen zur Doppelhelixstruktur der DNA.⁸⁻⁹ Beispiele wie diese zeigen, dass die Bildung von Funktionsmolekülen in biologischen Systemen nicht allein auf kovalenten Wechselwirkungen beruht, sondern auch auf gerichteten, nicht-kovalenten Interaktionen, welche zu einer höheren Effektivität führen. Hierzu ist eine optimale Nutzung von molekularer Erkennung und Selbstorganisation notwendig, welche maßgeblich durch schwache Wechselwirkungen vermittelt wird. Schwache Wechselwirkungen wie diese werden im Themengebiet der *Supramolekularen Chemie* aufgegriffen.

Somit beschreibt die *Supramolekulare Chemie* ein Gebiet der Chemie, das die Interaktionen von Molekülen auf einer übergeordneten Ebene betrachtet. Während auf der molekularen Ebene ausschließlich kovalente Bindungen von Bedeutung sind, werden auf der supramolekularen Ebene nicht-kovalente Wechselwirkungen von Molekülen betrachtet. Dazu zählen unter anderem van-der-Waals-Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen und Dispersionskräfte.¹⁰⁻¹¹ Im Vergleich zur molekularen Chemie beschäftigt sich die Supramolekulare Chemie daher nicht mit der Knüpfung von kovalenten Bindungen zur Erschaffung neuer Moleküle, sondern mit der Assemblierung mehrerer Moleküle zu so genannten „Übermolekülen“. ¹²⁻¹⁴ Ein wichtiges Konzept zur Beschreibung der Bildung solcher Übermoleküle ist dabei das bereits 1894 entwickelte *Schlüssel-Schloss-Prinzip* von Emil Fischer, welches die allgemeine Beziehung zwischen Gast und Wirt in der Natur beschreibt.¹⁵ Diese Wechselwirkungen beschränken sich dabei nicht nur auf intermolekulare Prozesse, sondern finden sich auch auf intramolekularer Ebene wieder. Das beste Beispiel hierfür ist die Proteinfaltung, welche ohne gerichteten intramolekularen Wechselwirkungen innerhalb des Moleküls nicht ablaufen kann.¹⁶⁻¹⁷

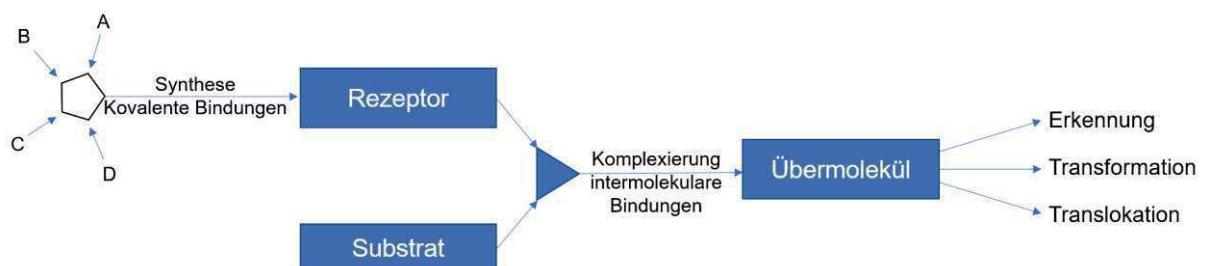


Abbildung 1 Die Entwicklung von der molekularen zur supramolekularen Chemie (modifiziert nach ¹²).

Ein bedeutender Meilenstein in der Geschichte der Supramolekularen Chemie war die Entdeckung der Kronenether durch Charles J. Pedersen in den 60er Jahren. Pedersen stellte fest, dass bestimmte cyclische Ether Alkali- und Erdalkalimetalle komplexieren können. Er führte diesen Effekt auf Ion-Dipol-Wechselwirkungen zwischen den Kationen und den partiell negativ-geladenen Sauerstoffatomen zurück.¹⁸ Nur wenig später folgte die Entdeckung der Sphäranden und Cryptanden durch Donald J. Cram und Jean-Marie P. Lehn.^{12, 19} Allen drei wurde für diese Entdeckungen im Jahr 1987 der Chemie-Nobelpreis verliehen.

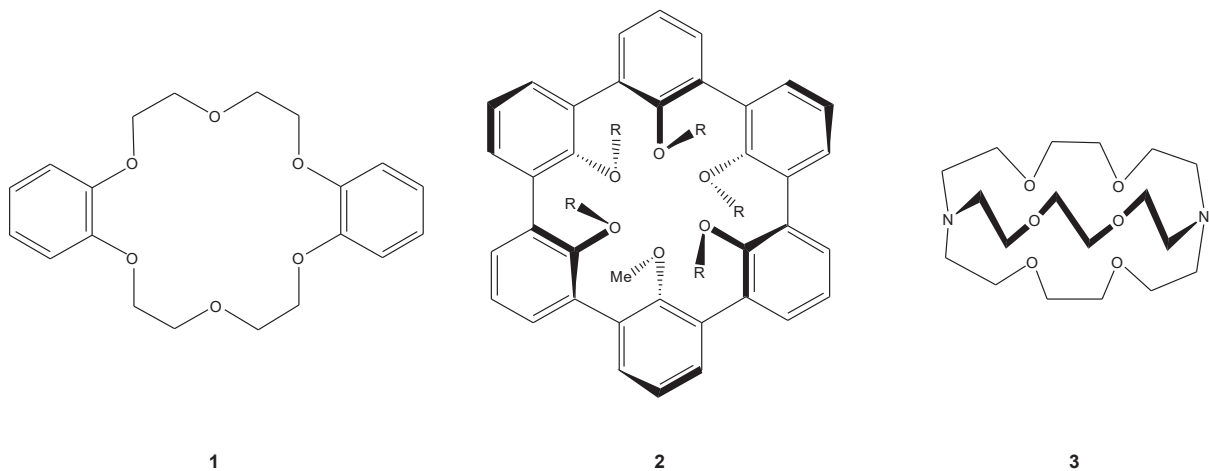


Abbildung 2 Struktur der Kronenether (1), Sphäranden (2) und Cryptanden (3) nach *Pedersen, Cram* und *Lehn*.^{12, 18-19}

Ihre Entdeckungen stellten somit den Startschuss für die Erkundung der Supramolekularen Chemie dar und mündeten unter anderem in eine Erforschung der molekularen Grundlagen der Gast-Wirt-Beziehung.

Eine Gegenüberstellung der Bindungsenergien von kovalenten und nicht-kovalenten Wechselwirkungen zeigt, dass die meisten nicht-kovalenten Bindungen schwächere Bindungsenergien als die kovalente Bindung aufweisen (Tab. 1).^{6, 16} Nichtsdestotrotz stellen diese schwachen Wechselwirkungen die molekulare Basis für biologische Erkennungsprozesse, wie z. B. der Erkennung der DNA-Basenpaarung, der Rezeptor-Ligand-Bindung, der Enzymkatalyse oder der Bildung von α -Helix- und β -Faltblattstrukturen, dar.²⁰

Tab. 1 Chemische und supramolekulare Bindungen und ihre Energien (erstellt nach ^{6, 16})

Art der Interaktion	Energie [kJ/mol]	Beispiel
Ionisch	100 - 350	NaCl
Kovalent	150 - 1100	H-H
Ion-Dipol	50 - 200	NaOH
Wasserstoffbrücken	4 - 60	H ₂ O
Dipol-Dipol	5 - 50	I-Cl---I-Cl
Van-der-Waals	< 5	F-F---F-F

Dabei können nicht-kovalente Wechselwirkungen grob in folgende Klassen unterteilt werden:

Ion-Ion-Wechselwirkung: Die wohl stärkste nicht-kovalente Wechselwirkung ist die Ion-Ion-Wechselwirkung (100-350 kJ/mol). Sie kommt durch die Coulombsche Anziehung zwischen Atomen oder Molekülen zustande, die entgegengesetzte Ladungen tragen.¹⁶ Ein supramolekulares Beispiel ist die Interaktion zwischen dem Tris(diazabicyclooctan) (Wirt), das ein 3-fach geladenes Anion wie $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ (Gast) aufnehmen kann.²¹

Ion-Dipol-Wechselwirkung: Die Ion-Dipol-Wechselwirkung findet zwischen einem Ion und einem Molekül statt, welches aufgrund einer polarisierten Bindung ein Dipolmoment besitzt. Die Bindung ist mit 50-200 kJ/mol wesentlich schwächer als die Ion-Ion-Wechselwirkung und im Gegensatz zu dieser meist gerichtet. Bekannte Beispiele für das Vorkommen dieser Wechselwirkung sind die Hydratation beim Lösen von Salzen in Wasser und die Komplexbildung von Alkalimetallkationen durch Kronenether.^{16, 18, 22}

Dipol-Dipol-Wechselwirkung: Eine Dipol-Dipol-Wechselwirkung findet zwischen zwei Dipolen statt und hängt stark von der Polarität der beteiligten Moleküle ab. Die Bindungsenergien variieren zwischen 5-50 kJ/mol. Je polarer die Moleküle sind (große Elektronegativitätsunterschiede der Bindungspartner), desto größer ist dabei die Interaktion. Dipol-Dipol-Wechselwirkungen sind typisch für Carbonylverbindungen. Berechnungen dazu zeigen sogar, dass in der festen Phase die Stärke der Wechselwirkung mit der einer starken Wasserstoffbrücke verglichen werden kann. Allerdings deutet der niedrige Siedepunkt einiger Carbonylverbindungen daraufhin,

dass Dipol-Dipol-Interaktionen dieser Art in der flüssigen Phase eher schwach sind.²³⁻

24

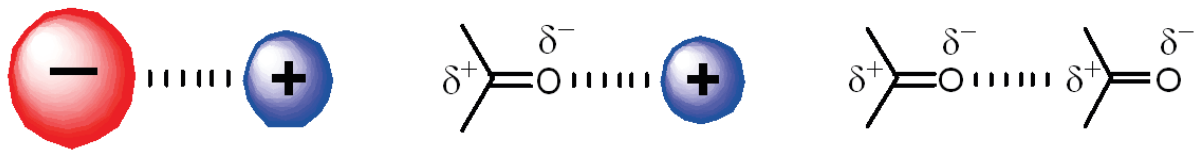


Abbildung 3 Elektrostatische Wechselwirkungen: ionische Wechselwirkung (links), Ion-Dipol-Wechselwirkung (Mitte), Dipol-Dipol-Wechselwirkung (rechts) (erstellt nach ¹⁶).

Wasserstoffbrückenbindungen: Die wahrscheinlich wichtigste, nicht-kovalente Wechselwirkung ist die Wasserstoffbrückenbindung. Sie wird zwischen Atomen, deren Elektronegativität größer ist als die des Wasserstoffs und von denen mindestens eines über ein freies Elektronenpaar verfügt, und Wasserstoffatomen, welche wiederum an ein Heteroatom gebunden sind, ausgebildet.²⁵ Klassische Heteroatome für Wasserstoffbrückenbindungen sind N, O, S, F, Cl, Se, Br und I. Dabei wird das kovalent-gebundene Atom meist mit X und das Atom, welches die Brücke zum H-Atom ausbildet, als Y bezeichnet. Die X-H-Gruppe wird im Allgemeinen als Protonendonor (D) und die Y-Gruppe als Protonenakzeptor (A) bezeichnet.^{9, 25-26}

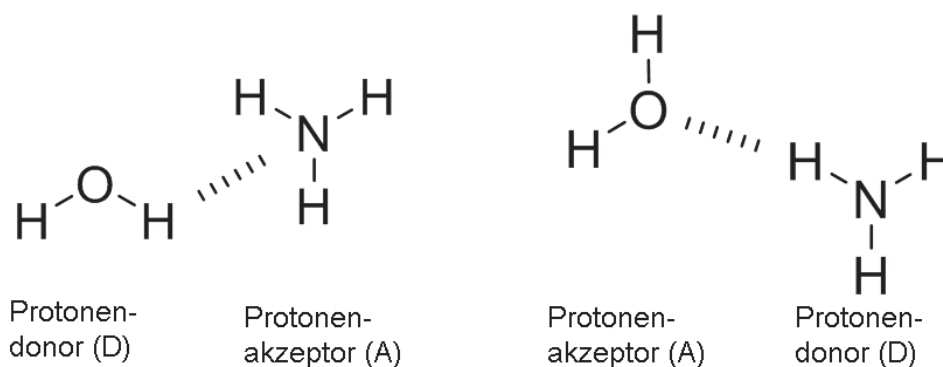


Abbildung 4 Zwei Möglichkeiten einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen einem Wasser- und einem Ammoniak-Molekül (modifiziert nach ²⁵⁻²⁶).

Die Stärke der Wasserstoffbrücke hängt vom Dipolmoment der X-H-Bindung und vom freien Elektronenpaar des Y-Atoms ab. Zu den stärksten Wasserstoffbrücken gehört die Wechselwirkung zwischen Wasserstoff und Sauerstoff. Auf diese Beziehung sind viele außergewöhnliche Eigenschaften des Wassers wie der hohe Siedepunkt (vgl. mit -60.7 °C für H_2S), die Kontraktion von festem Wasser beim Schmelzen und das Dichtemaximum von flüssigem Wasser bei ca. 4 °C zurückzuführen.¹⁶

Van-der-Waals-Kräfte: Die van-der-Waals-Kräfte (< 5 kJ/mol) beschreiben eine Wechselwirkung zwischen Molekülen mit induzierten Dipolen. Diese Dipole kommen meist durch fluktuierende Elektronendichten zustande und verursachen durch das kurzzeitige Elektronendichte-Ungleichgewicht in einem benachbarten Molekül ebenfalls ein Dipol.^{16, 27}

Hydrophober Effekt: Beim hydrophoben Effekt lagern sich unpolare und nicht-geladene Moleküle in einem polaren Medium zusammen, um die energetisch ungünstige Interaktion mit dem Lösungsmittel zu reduzieren. Durch die verringerte Oberfläche aggregierter hydrophober Moleküle wird dabei der Energieaufwand zur Solvation dieser hydrophoben Moleküle in einem polaren Lösungsmittel reduziert. Der hydrophobe Effekt ist somit hauptsächlich entropisch-getrieben.²⁸

π - π -Wechselwirkung: Eine weitere bedeutende, nicht-kovalente Wechselwirkung ist die Wechselwirkung zwischen π -Systemen. *Hunter* und *Sanders* stellten 1990 bei ihren Experimenten mit Porphyrinen fest, dass es mit den bis dahin bekannten Modellen nicht immer eindeutig möglich war, die Wechselwirkung zwischen zwei π -Systemen zu beschreiben. Daher erstellten sie ein neues Modell, das eine getrennte Betrachtung von σ -Gerüst und π -System zugrunde legt. Dementsprechend befindet sich das σ -Gerüst zwischen den Elektronen des π -Systems und kann somit als Quadrupol beschrieben werden. Sie postulierten außerdem, dass die Wechselwirkung auf elektrostatische Wechselwirkungen und van-der-Waals-Kräfte zwischen den einzelnen Systemen zurückzuführen sei. Damit es allerdings zu einer Wechselwirkung kommen kann, muss die Summe der Energien dieser Wechselwirkungen positiv sein. Außerdem fanden sie heraus, dass die Anordnung der π -Systeme zueinander eine entscheidende Rolle bei der Stärke der Wechselwirkung spielt.²⁹⁻³⁰

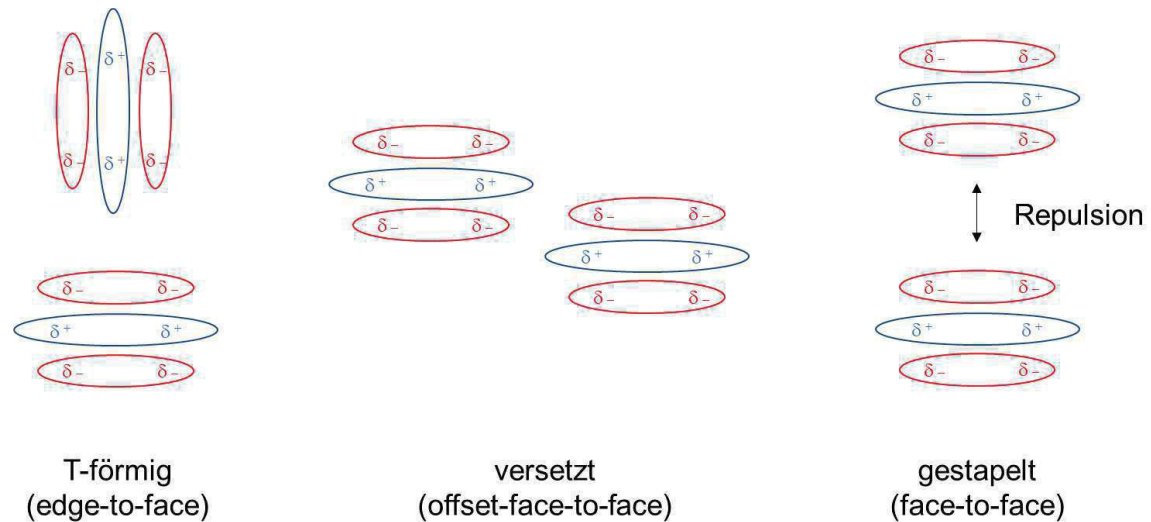


Abbildung 5 Mögliche Anordnungen der π -Systeme (erstellt nach ^{16, 30}).

Damit es zu einer attraktiven Wechselwirkung kommt, sind zwei Geometrien bevorzugt: T-förmig (edge-to-face) und versetzt (offset-face-to-face). Bei der T-förmigen Anordnung liegen die π -Systeme senkrecht zueinander und ermöglichen so eine Interaktion des σ -Gerüsts mit den π -Elektronen. Aufgrund der negativen Ladung der Oberflächen der jeweiligen π -Systeme, die zu einer Abstoßung führt, kann eine exakte Stapelung (face-to-face) nicht stattfinden. Folglich stapeln sich die π -Systeme versetzt zueinander.^{16, 31}

Kation- π -Wechselwirkung: Die Kation- π -Wechselwirkung beschreibt eine Wechselwirkung zwischen Kationen und der Oberfläche von π -Systemen, die auf elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der positiven Ladung des Kations und dem Quadrupolmoment des aromatischen Systems zurückzuführen ist.³²

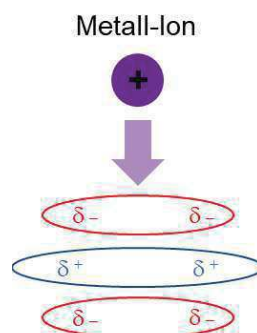


Abbildung 6 Anordnung von Kation und π -System (erstellt nach ³²)

Die Bedeutung dieser Wechselwirkung in biologischen Systemen lässt sich am Beispiel der Liganden-Rezeptor-Wechselwirkung zeigen. In Proteinen fungieren

Metallkationen oder positiv geladene Seitenketten als Kationen, die dann mit den aromatischen Seitenketten von Tyrosin, Tryptophan oder Phenylalanin wechselwirken können. Diese Interaktion gehört zu den wichtigsten, nicht-kovalenten „Kräften“ in biochemischen Prozessen. So findet sich dieses Prinzip auch bei der Protein-DNA-Bindung, bei Ionenkanälen während der Durchflussbewegung der Metallkationen und sogar bei der Stabilisierung von α -Helices.^{16, 22, 32}

Anion- π -Wechselwirkung: Eine Anion- π -Wechselwirkung findet zwischen einem Anion und einem elektronenarmen π -System statt. Die Stärke der Wechselwirkung hängt dabei vom Quadrupolmoment und der Polarisierbarkeit des Aromaten ab.

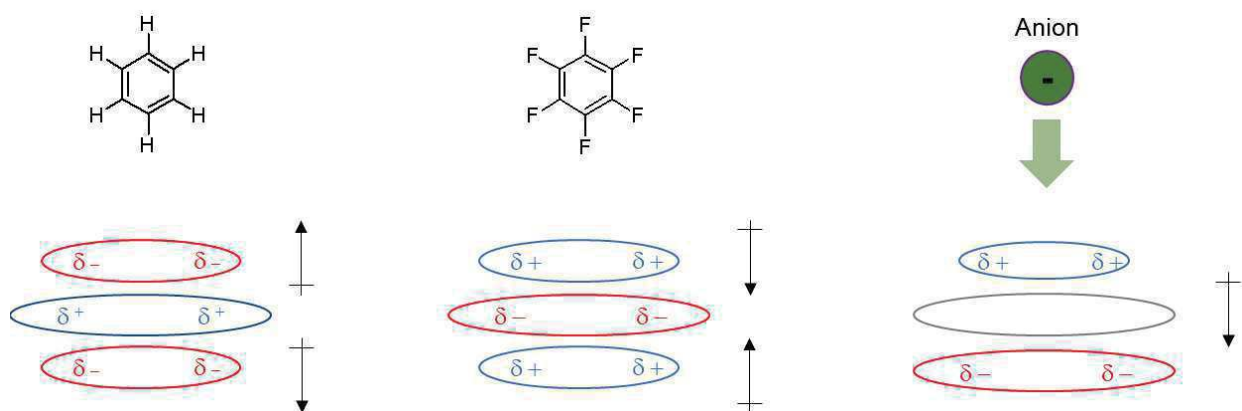


Abbildung 7 Schematische Darstellung der Quadrupolmomente von Benzol (links) und Hexafluorbenzol (Mitte) und des Anion-induzierten Dipols (rechts) (modifiziert nach ³³).

Während Kation- π -Interaktionen bereits lange bekannt und mittlerweile gut verstanden sind, wurden Anion- π -Wechselwirkung bisher erst wenig studiert. Aufgrund ihrer Rolle in vielen biologischen und chemischen Prozessen werden diese jedoch in der Zwischenzeit intensiver bearbeitet.³⁴⁻³⁶ So werden diese Interaktionen in der supramolekularen Chemie zum Beispiel bei der Konstruktion hochselektiver Anionenrezeptoren und -kanäle zunehmend häufiger verwendet.³⁷⁻³⁸

2.2. Protein-Protein-Interaktionen (PPI)

Die Charakterisierung von Trypsin und Antitrypsin durch Hedin *et al.* im Jahre 1906 stellt wahrscheinlich den ersten bekannten Bericht über eine regulatorische Protein-Protein-Interaktion (PPI) dar.³⁹ Seitdem wurde unser Verständnis von Proteinen und PPIs schrittweise durch bahnbrechende konzeptionelle und technologische Fortschritte in der molekularen Zellbiologie, Biochemie und Biophysik stetig erweitert.⁴⁰ Dabei hat sich gezeigt, dass Proteine die „Taktgeber“ in biologischen Systemen sind, indem sie als Katalysatoren, Signalrezeptoren, Schalter, Motoren oder als Pumpen fungieren. Ihre Funktion können sie jedoch erst durch Einbettung in ein Protein-Netzwerk, das zwischen den einzelnen Proteinen und seinen Bindungspartnern (Liganden) gebildet wird, erfüllen. Dieses Netzwerk wird durch Protein-Protein-Interaktionen gebildet.⁴¹

Eine Protein-Protein-Interaktion wird im Allgemeinen als Interaktion zwischen zwei identischen (Bildung eines Homokomplexes) oder zwei ungleichen Proteinen (Bildung eines Heterokomplexes) definiert. Die Interaktion basiert dabei auf schwachen, nicht-kovalenten und somit supramolekularen Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrücken, ionischen Bindungen, van-der-Waals-Kräften und den hydrophoben Effekt.⁴²⁻⁴³

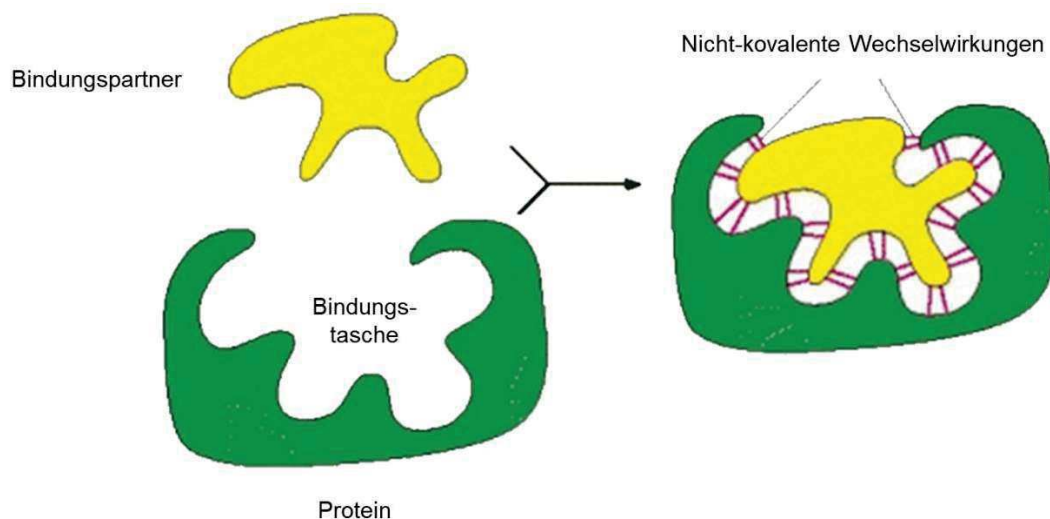


Abbildung 8 Selektive Bindung eines Proteins an ein anderes Molekül durch das Zusammenspiel mehrerer nicht-kovalenter supramolekularer Wechselwirkungen (modifiziert nach ⁴²).

Man nimmt an, dass die Gesamtzahl der PPIs in einem Organismus, das sogenannte *Interaktom*, bei schätzungsweise 130000 – 650000 unterschiedlichen Wechselwirkungen liegt.⁴⁴ Diese Zahlen verdeutlichen die Dimension und Relevanz

von PPIs in lebenden Systemen. Es ist daher auch nicht verwunderlich, dass PPIs auch bei der Entstehung von Krankheiten bzw. deren chemische Modulation bei der Entwicklung von Chemotherapien bzw. chemischen Tools eine große Rolle spielen. Dabei kann prinzipiell zwischen zwei Modulationstypen einer Protein-Protein-Interaktion unterschieden werden: Zum einen kann die Wechselwirkung durch einen chemischen Stabilisator verstärkt werden, zum anderen ist es möglich, die Wechselwirkung durch einen Inhibitor zu verhindern.⁴⁵⁻⁴⁶

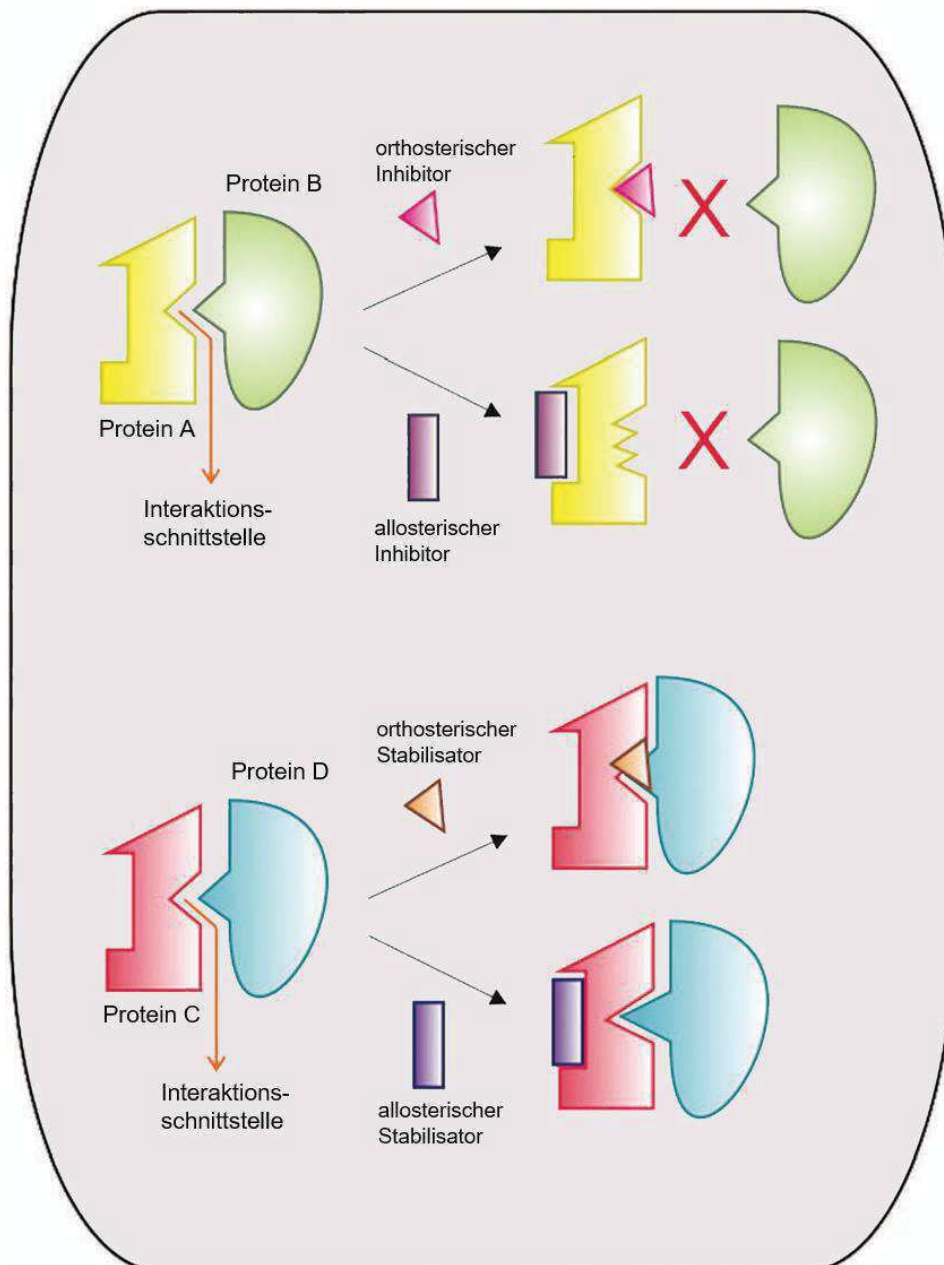


Abbildung 9 Verschiedene Mechanismen der Modulation einer Protein-Protein-Interaktion (modifiziert nach ⁴⁷).

Die Modulation kann dabei nach zwei Mechanismen erfolgen: (1) der Modulator bindet unmittelbar an die Interaktionsschnittstelle der Proteine (orthosterische Modulation) oder (2) er bindet an nur eines der Proteine, wodurch eine Konformationsänderung induziert wird, welche die Stärke der PPI moduliert (allosterische Modulation).

Zur Identifikation von chemischen Stabilisatoren oder Inhibitoren einer PPI werden sowohl rationale, hauptsächlich strukturbasierte Ansätze verwendet, als auch Methoden, welche mehr auf dem „Zufallsprinzip“ basieren und technologische Ansätze wie das Hochdurchsatz-Screening (HTS) nutzen.⁴⁸⁻⁴⁹

Zur biochemischen Charakterisierung der Stärke einer PPI stehen heute viele unterschiedliche Methoden zur Verfügung. Diese werden unter anderem von Ottmann *et al.* ausführlich beschrieben.⁴³ Im Rahmen dieser Arbeit wurde unter anderem Fluoreszenzpolarisation zur biochemischen Charakterisierung eingesetzt, auf die daher hier kurz detaillierter eingegangen werden soll.

Bei der Fluoreszenzpolarisation werden Fluorophore mit linear polarisiertem Licht angeregt, worauf sie anschließend ebenfalls linear-polarisiertes Licht emittieren. Die „Stärke“ der Emittierung des polarisierten Lichtes hängt jedoch von der Beweglichkeit des Fluorophores ab. Je geringer die Beweglichkeit des Fluorophors, umso höher ist die Stärke der Fluoreszenzpolarisation. Diese Änderung lässt sich mit Hilfe der Rotationsdiffusionskonstanten näher erläutern. Die Zeit zwischen Absorption und Emission des Lichts, die sogenannte Lebensdauer des angeregten Zustandes, liegt zwar im Nanosekunden-Bereich, doch die durchschnittliche Rotationsgeschwindigkeit eines Fluorophors reicht aus, um in dieser kurzen Zeit eine Änderung der Fluoreszenzpolarisation zu bewirken.⁵⁰⁻⁵¹

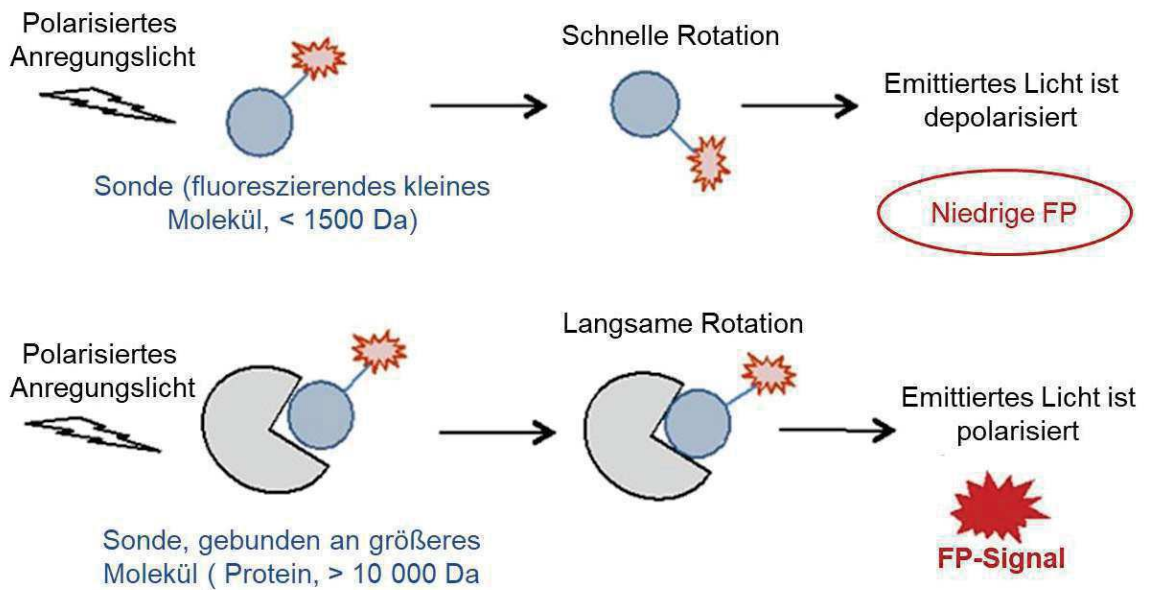


Abbildung 10 Prinzip der Fluoreszenz-Polarisation (modifiziert nach ⁵²).

Für die Messung wird Licht mit einem Polarisator linear polarisiert und auf die Probe geleitet. Die Emission wird dann über einen zweiten Polarisator, dem Analysator, gemessen. Polarisator und Analysator können sich dabei in verschiedenen Stellungen zueinander befinden. Zum einen können sie parallel zueinanderstehen, d.h. die Intensität der Emission wird parallel zum Anregungslicht bestimmt. Zum anderen können sie senkrecht zueinanderstehen. In diesem Fall wird die Intensität der Emission senkrecht zur Ebene des Anregungslichtes gemessen. Die Differenz dieser beiden Intensitäten ist ein Maß für den Grad der Polarisation.

$$P = \frac{I_{\text{parallel}} - I_{\text{senkrecht}}}{I_{\text{parallel}} + I_{\text{senkrecht}}}$$

Die Polarisation und die Anisotropie stehen in folgendem Verhältnis zueinander.⁵³⁻⁵⁴

$$P = \frac{3A}{2+A} \quad A = \frac{2P}{3-P}$$

Bringt man nun dementsprechend einen Fluorophor kovalent auf ein Protein in einer PPI ein, so kann das Gleichgewicht der Interaktion durch die „Stärke“ der Fluoreszenzpolarisation (Abbildung 10) gemessen werden.

2.3. 14-3-3-Proteine als PPI-Adapterproteine

2.3.1. Entdeckung und Benennung

Die 14-3-3-Proteine gehören zu einer hochkonservierten Familie von sauren Adapterproteinen, die mittels der Ausbildung von PPIs an der Regulation von zahlreichen zellbiologischen Prozessen beteiligt sind.

Sie weisen in der Regel ein Molekulargewicht zwischen 25 bis 30 kDa auf und liegen meist als Dimer vor. Sie kommen in Pflanzen, Wirbeltieren und höheren Eukaryoten vor und wurden erstmals 1967 von *Moore* und *Perez* als ein in Gehirnen vorkommendes Protein beschrieben. Ihr einzigartiger Name ist dabei aus ihrem Elutionsverhalten in einer zweidimensionalen DEAD-Cellulose-Chromatographie (Fraktion 14) und ihrer Migration während der Stärkegel-Elektrophorese (Position 3.3) abgeleitet.⁵⁵ Dennoch wurden einzelnen Mitgliedern dieser Proteinfamilie im Laufe der Zeit aufgrund ihrer Beteiligung an unterschiedlichen Regulationsprozessen immer wieder unterschiedliche Namen gegeben.

In der Tat war lange Zeit nicht bekannt, ob und wie 14-3-3-Proteine in zellbiologische Prozesse integriert waren, bis Anfang der 90er Jahre ihre Bedeutung schrittweise aufgrund ihrer Beteiligung an zahlreichen Regulationsprozessen nachgewiesen werden konnte. Die erste regulatorische Funktion, die 14-3-3-Proteinen zugeordnet werden konnte, war ihre Rolle in der Aktivierung von Tyrosin- und Tryptophanhydroxylasen. In vielen nachfolgenden Studien konnte dann gezeigt werden, dass 14-3-3-Proteine insbesondere an der Regulation der Aktivität vieler Proteinkinasen beteiligt sind, darunter auch die Raf-Kinasen.⁵⁶ So konnten mittlerweile weit über 500 Interaktionspartner von 14-3-3 identifiziert und somit die Bedeutung der 14-3-3-Proteine bewiesen werden.⁵⁷⁻⁵⁹

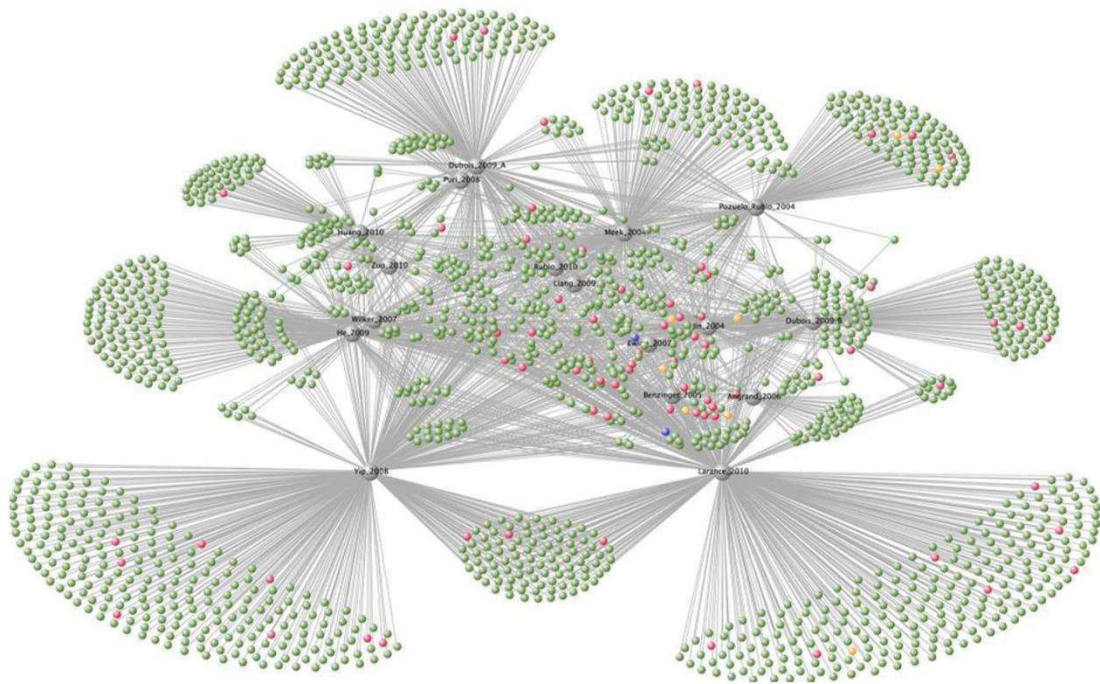


Abbildung 11 Graphische Darstellung des Interaktoms der 14-3-3-Proteine.⁶⁰

2.3.2. Struktur und Funktion

14-3-3-Proteine kommen ubiquitär in allen Eukaryoten vor. Dabei konnten in nahezu jedem bekannten, eukaryotischen Organismus mindestens zwei Isoformen der 14-3-3-Proteine beschrieben werden. In *Arabidopsis thaliana* werden sogar mindestens 12 Isoformen exprimiert. Sieben 14-3-3-Isoformen kommen in Säugetieren vor und werden nach ihrem jeweiligen Laufverhalten bei der Chromatographie durch die Verwendung von griechischen Buchstaben (β , ε , γ , η , σ , τ , ζ) unterschieden. Die ursprünglich als α und δ bezeichneten Isoformen waren, wie sich später herausstellte, lediglich die phosphorylierten Formen der β - und ζ -Isoformen und fehlen daher in dieser Aufzählung.

14-3-3-Proteine werden in den meisten Gewebetypen exprimiert. In eukaryotischen Zellen sind 14-3-3-Proteine hauptsächlich im Cytoplasma lokalisiert, obwohl diese auch in anderen Organellen aufgefunden werden konnten. So wurden sie beispielsweise auch im Nucleus oder dem Golgi-Apparat nachgewiesen.⁶¹

Die ersten 14-3-3 Röntgenstrukturen wurden für die τ - und ζ -Isoformen erhalten. Diese Untersuchungen zeigten, dass 14-3-3-Proteine zur Klasse der α -Proteine gehören und dimere Strukturen ausbilden. Jedes Monomer setzt sich dabei aus neun α -Helices zusammen, von denen die meisten paarweise antiparallel zueinander angeordnet sind. Die Dimerbildung erfolgt durch Bindung der α 1-Helix von Monomer 1 mit den α 2- und α 3-Helices von Monomer 2. Dabei entsteht eine Öffnung in der Mitte des Dimers mit einem Durchmesser von etwa 6-8 Å. Außerdem entsteht bei der Dimerbildung ein negativ-geladener Kanal. Er besteht aus den polaren und geladenen Helices 1, 3 und 5, die den Boden bilden, und den hydrophoben Helices 7 und 9, aus denen die Wände des Kanals bestehen. Dieser Kanal befindet sich innerhalb des Proteins und ist in allen Isoformen weitestgehend identisch. Dies lässt vermuten, dass dieser Bereich für die Erkennung von allgemeinen Eigenschaften eines Zielproteins zuständig ist, während die variablen Bereiche, die sich an der Oberfläche des Proteins befinden, für die Spezifität jeder einzelnen Isoform verantwortlich sind.^{59, 62-63}

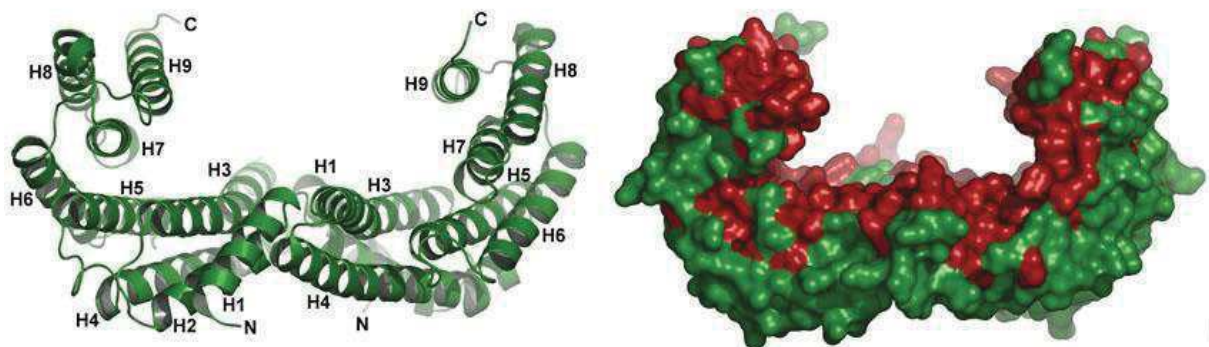


Abbildung 12 Kristallstruktur eines 14-3-3 Dimers (menschliche Zeta-Isoform): Die Farbbanddarstellung (links) und die die Oberflächendarstellung (rechts; Reste, die bei allen sieben menschlichen Isoformen vollständig konserviert sind, sind dunkelrot dargestellt) (modifiziert nach⁶⁴).

Die Dimere können sowohl als Homo- als auch als Heterodimere vorliegen. So bildet die 14-3-3 ϵ -Isoform hauptsächlich Homodimere, währenddessen die 14-3-3 σ - und 14-3-3 τ -Isoformen z. B. bevorzugt Heterodimere bilden. Durch den dimeren Aufbau ist es den 14-3-3-Proteinen dabei möglich, entweder zwei Liganden gleichzeitig oder einen Liganden mit zwei Bindungsmotiven zu binden.

Die meisten Bindungspartner der 14-3-3-Proteine interagieren in etwa gleich stark mit den unterschiedlichen Isoformen. Die Bindung findet dabei in vielen Fällen an der konservierten Bindungstasche (amphipathic groove) eines jeden Monomers statt.

Muslin *et al.* konnten zeigen, dass ein Phosphoserinmotiv in Raf-Kinasen dabei essentiell für die Interaktion mit 14-3-3-Proteinen ist.⁶⁵ Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung des Liganden entscheidend für eine potente Bindung an 14-3-3-Proteine ist, da 14-3-3-Proteine selektiv an phosphorylierte Serin- und Threoninsequenzen binden. Bei der Interaktion mit 14-3-3-Proteinen werden drei Bindungsmotive unterschieden: Das erste Bindungsmotiv hat die Sequenz RSXpS/pTXP (mode I), das zweite die Sequenz RXY/FXpS/pTXP (mode II), während das dritte die Sequenz pS/pT(X_{0,1,2})-COOH (mode III) hat, wobei X eine beliebige Aminosäure ist. Die strukturelle Aufklärung der Bindungsmotive I und II erfolgte durch Yaffe *et al.*. Dabei konnte er zeigen, dass das Arginin an Position -3 bzw. -4 und das Prolin an Position +2 (bezogen auf das phosphorylierte Serin bzw. Threonin) zwar zur Bindung beitragen, im Gegensatz zum phosphorylierten Serin bzw. Threonin jedoch nicht essentiell für die Bindung an das 14-3-3-Protein sind.^{64, 66-67} Das Bindungsmotiv III wurde unter anderem von Coblitz *et al.* und Panni *et al.* untersucht. Im Gegensatz zu den Bindungsmotiven I und II beschreibt es die Bindung an die phosphorylierten C-Termini eines Proteins.⁶⁸⁻⁶⁹

Die Interaktionen der 14-3-3-Protein mit ihren Proteinliganden können verschiedene biologische Konsequenzen nach sich ziehen. So kann die Bindung eines Proteins zur Veränderung seiner Struktur führen, wodurch beispielsweise die enzymatische Aktivität dieses Proteins reguliert werden kann. Eine andere Möglichkeit ist das Zusammenführen von zwei Proteinen, um eine Wechselwirkung zu ermöglichen bzw. einen Komplex zu stabilisieren. Des Weiteren ermöglicht die Bindung eines Proteins an 14-3-3-Proteine die Regulation der subzellulären Lokalisation eines Proteins, eine Inhibition einer anderenfalls möglichen Protein-Protein-Interaktion oder einen Einfluss auf post-translationale Modifikationen, wie z. B. die Hemmung einer Dephosphorylierung oder eines proteolytischen Abbaus.

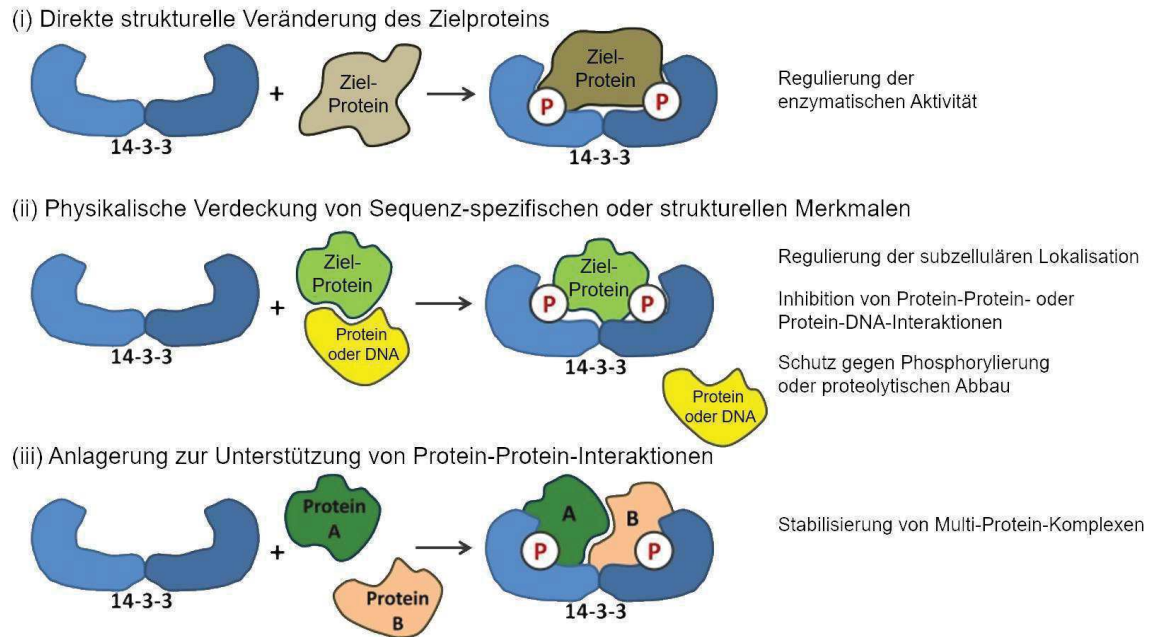


Abbildung 13 Interaktionsformen des 14-3-3-Proteins.

2.3.3. Stabilisatoren und Inhibitoren für 14-3-3-Proteine

Die Familie der 14-3-3-Proteine ist an einer Vielzahl von zellbiologischen Prozessen wie Zellzyklusregulation, Signaltransduktion und Apoptose beteiligt. So ist es auch naheliegend, dass sie auch in die Entstehung von Krankheiten integriert ist. Es wird vermutet, dass 14-3-3-Proteine eine wichtige Rolle in Krankheiten wie Krebs, Diabetes, Neurodegeneration und Lungenerkrankungen spielen. Daher stellt die Entwicklung von Modulatoren für 14-3-3-Proteine ein attraktives Konzept für eine mögliche chemotherapeutische Intervention dar. Bei der Modulation von Protein-Protein-Interaktionen kann zwischen Stabilisierung und Inhibition einer PPI unterschieden werden (Abbildung 14). 14-3-3-Inhibitoren belegen dabei meist die Substratbindungstasche des 14-3-3-Proteins und verhindern so die Protein-Protein-Interaktion mit einem natürlichen Liganden. Die Stabilisatoren dagegen binden meist an eine Stelle neben der Bindungstasche und ermöglichen beispielweise durch weitere Wechselwirkungsmöglichkeiten eine Stabilisierung der Protein-Protein-Interaktion.⁷⁰

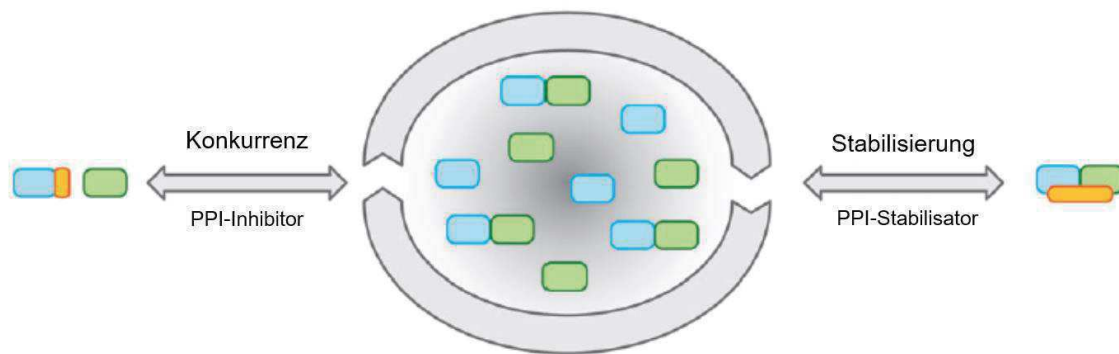


Abbildung 14 Stabilisierung und Inhibition von PPIs (modifiziert nach ⁴⁴).

Der erste Inhibitor für eine 14-3-3-Protein-Protein-Interaktion war das Peptid R18. Es wurde von Fu *et al.* bei der Untersuchung von Phagen entdeckt und umfasst 20 Aminosäuren. Das Peptid weist die zentrale Sequenz WLDLE auf, für die in Kristallstrukturen von 14-3-3 Komplexen bereits gezeigt werden konnte, dass sie mit der hoch konservierten Bindungstasche von 14-3-3-Proteinen interagiert. Bei weiteren Untersuchungen konnte anhand von Peptiden mit 64 Aminosäuren, die eine dimere Anordnung von R18 enthielten, unter anderem gezeigt werden, dass die Anti-Apoptose-Wirkung von 14-3-3-Proteinen gehemmt werden konnte. Diese Arbeit gilt somit als *proof-of-concept*-Studie, dass 14-3-3-Proteinen-vermittelte PPIs mit chemischen Wirkstoffen gehemmt werden können.⁷¹

Im Laufe der Zeit wurden weitere Inhibitoren durch Verwendung verschiedener Methoden wie SMM (small molecule microarray) entwickelt. Shao *et al.* verwendeten z. B. die SMM-Methode, um das bekannte Bindemotiv mit der Sequenz RFRpSYPP am C- und N-Terminus zu modifizieren. Dazu verwendeten sie 50 verschiedene Modifikationen am N- und 243 verschiedene Derivatisierungen am C-Terminus. Mithilfe von Fluoreszenzmarkierung konnten 5 potentielle Inhibitoren gefunden werden. Durch Titrations- und FP-Messungen konnten für diese 5 Verbindungen K_d - bzw. IC_{50} -Werte zwischen 0.6 und 1.03 μM ermittelt werden.

Weitere Inhibitoren konnten durch Molecular Modelling, Virtual Screening und Docking gefunden werden. So entwickelten Botta *et al.* basierend auf diesen Methoden drei weitere Verbindungen, die erfolgreich als Inhibitoren für 14-3-3-Proteine etabliert werden konnten.⁷²

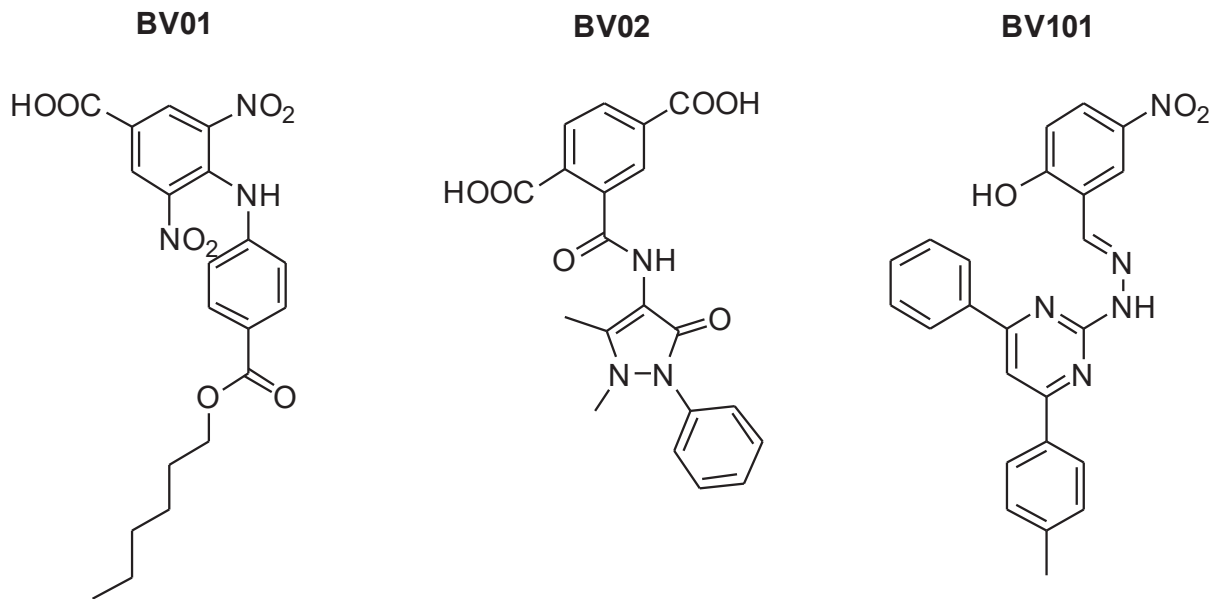


Abbildung 15 Drei von Botta *et al.* entwickelte Inhibitoren für 14-3-3-Proteine: BV01 (links), BV02 (Mitte) und BV101 (rechts) (erstellt nach ⁷²).

Der erste kovalent gebundene Inhibitor wurde 2011 von Fu *et al.* aus einer Verbindung aus der LOPAC-Substanzbibliothek entwickelt. Die Pyridoxalphosphat-Verbindung mit dem Namen FOBISIN101 (Fourteen-three-three Binding Small molecule Inhibitor) verhindert die Bindung von sowohl phosphorylierten als auch nicht-phosphorylierten 14-3-3-Liganden durch kovalente Bindung mit Lys120, das sich in unmittelbarer Nähe der amphipathischen Bindungstasche des 14-3-3-Proteins befindet. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass FOBISIN101 in der Lage ist, die Interaktion mit C-Raf und PRA40 und die Aktivierung von ExoS durch 14-3-3-Proteine zu verhindern.⁶²

Im Gegensatz zu der Entwicklung von Inhibitoren ist die Entwicklung von Stabilisatoren für Protein-Protein-Interaktionen ein weitaus weniger erforschtes Gebiet. Viele dieser Verbindungen konnten meist durch Fermentierung oder Isolierung aus natürlichen Quellen erhalten werden. Bekannte Beispiele sind Fusicoccin A und Cotylenin A. Fusicoccin A wurde in den 60er Jahren aus dem Pilz *Phomopsis amygdali* isoliert. Dort wirkt es als Toxin, das das Verwelken der befallenen Pflanzen induziert. Spätere Untersuchungen zeigten dann, dass es an die PPI-Interaktionsfläche des 14-3-3/PMA-Komplexes bindet und so die Affinität beider Proteinbindedpartner um das 90-fache erhöht. Auch Cotylenin A, das aus dem Pilz *Cladosporium* isoliert werden konnte, kann den Komplex zwischen einem 14-3-3-Protein und PMA2 stabilisieren. Die ersten nicht-natürlichen Stabilisatoren für 14-3-3-Protein-Protein-Interaktionen konnten Ottmann *et al.* 2013 durch HTS (High-Throughput-Screening) einer Substanzbibliothek

identifizieren. Zwei Verbindungen, das Dipeptid Epibestatin und ein Wirkstoff mit dem Namen Pyrrolidon 1, konnten als Stabilisatoren des 14-3-3/PMA2 Komplexes ausgemacht werden.

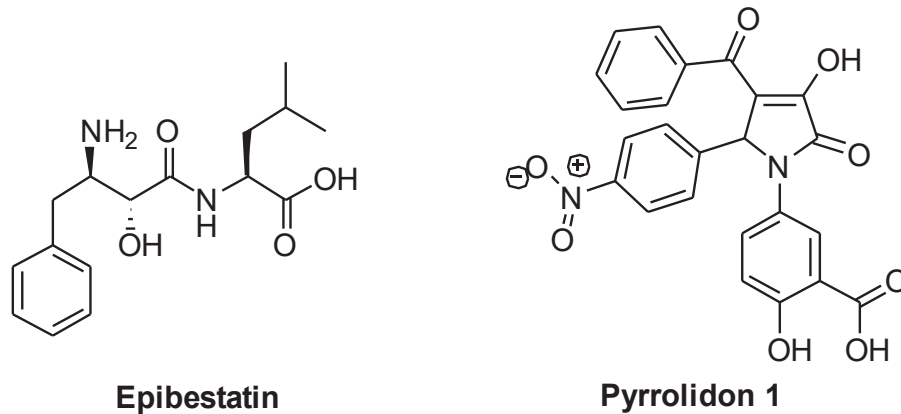


Abbildung 16 Strukturen von Epibestatin (links) und Pyrrolidon (rechts) (erstellt nach ⁷⁰).

Kristallstrukturen von Epibestatin und Pyrrolidon 1 mit dem Komplex von 14-3-3 und einem Fragment von PMA2 zeigten, dass auch diese beiden Verbindungen die Interaktionsfläche der Protein-Protein-Interaktionsfläche binden, allerdings an unterschiedlichen Bereichen.^{70, 72}

Insgesamt belegen diese Studien somit, dass sowohl Inhibitoren als auch Stabilisatoren von 14-3-3-vermittelten PPIs entwickelt werden können. Im Rahmen dieser Arbeit soll dieses Konzept nun weiter aufgegriffen werden.

3. Zielsetzung

Ziel der Arbeit war die Synthese von chemisch-neuartigen 14-3-3-Inhibitoren als mögliche, medizinisch-relevante Wirkstoffe. Aufgrund der Beteiligung von 14-3-3-Proteinen an einer Vielzahl von zellbiologischen Prozessen wird zurzeit getestet, ob die Hemmung der Funktion von 14-3-3-Proteinen chemotherapeutisch nutzbar ist. Um diese Hypothese zu validieren, sind jedoch geeignete, d.h. potente und selektive, Inhibitoren notwendig. Zwar sind bereits zahlreiche Inhibitoren für 14-3-3-Proteine bekannt, diese verfügen jedoch nicht über die benötigte Potenz bzw. Selektivität für solche Studien. Auch handelt es sich bei allen bisher dargestellten Inhibitoren um chemische Verbindungen, welche nur eine der beiden Substratbindungstaschen adressieren (sie wirken somit als monovalente Inhibitoren). Bei Affinitätsmessungen von 14-3-3-Proteinen mit natürlichen Liganden konnte jedoch festgestellt werden, dass Liganden, die zeitgleich an beide Bindungstaschen und somit bivalent binden, eine um ein Vielfaches höhere Affinität aufweisen, als solche, die einfach an das Protein binden. Diese Affinitätssteigerung durch einen bivalenten Hemmmodus ist auch aus der medizinischen Chemie lange bekannt.⁷³⁻⁷⁵ Daher sollten in dieser Arbeit erstmals bivalente Inhibitoren synthetisiert und bezüglich ihrer Hemmeigenschaften von 14-3-3-Proteinen charakterisiert werden. Grundlage der Entwicklung war dabei ein Phosphophenoether-Hemmmotiv, welches von Ottmann *et al.* in früheren Studien als neuartige Inhibitorenklasse für 14-3-3-Proteine entwickelt wurde.⁷⁶

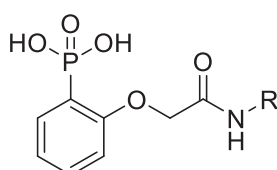


Abbildung 17 Von Ottmann *et al.* etabliertes 14-3-3-Inhibitorbindemotiv.

Aus diesem Grund sollten bivalente Inhibitoren, in welchen das etablierte Phosphophenoether-Bindemotiv über eine Polyethylenglycol (PEG)-Brücke miteinander verbunden werden, dargestellt werden (für einen Beispielinhibitor, siehe Struktur von **Biv1** in Abbildung 18).

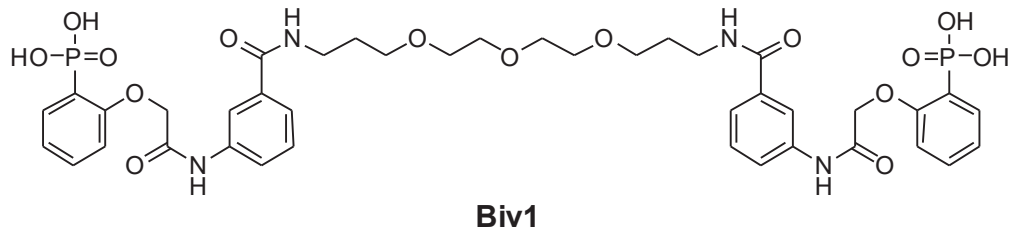


Abbildung 18 Struktureller Aufbau des bivalenten Inhibitors Biv1.

Zur Verbrückung der Bindeeinheiten wurde PEG gewählt, da die Modifizierung von Molekülen durch Polyethylenglycol im Bereich der biologischen Chemie, Biochemie und Biomedizin bereits etabliert ist. PEG-Ketten eignen sich vor allem durch ihren niedrigen immunogenen Charakter und ihre inerte chemische Eigenschaft für die Verwendung bei der Medikamentenentwicklung. Zudem konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von PEG-Ketten sich positiv auf die Löslichkeit von Molekülen in wässrigen Medien auswirkt, was wiederum ein wichtiges Kriterium bei der Entwicklung von medizinischen Wirkstoffen darstellt.

In einem zweiten Teil der Arbeit sollte auch untersucht werden, ob die Entwicklung von isospezifischen 14-3-3-Inhibitoren möglich ist. Die Isoformen des 14-3-3-Proteins weisen nur sehr geringe Unterschiede in ihren Bindungstaschen auf. Daher sollte versucht werden, chemische Inhibitoren zu entwickeln, die mit der Oberfläche in unmittelbarer Nähe der Bindungstaschen interagieren, um so die Wechselwirkung von Liganden mit der Bindungstasche des Proteins zu beeinflussen.

4. Ergebnisse und Diskussion

Zur Untersuchung von bivalenten Inhibitoren für 14-3-3-Proteine wurde zunächst der bereits von Ottmann *et al.* etablierte Phosphophenoylether hergestellt (Kapitel 4.1). Anschließend wurde der erste bivalente Inhibitor **Biv1** durch Verbrückung von zwei Phosphophenoylethern über einen PEG-Linker synthetisiert (Kap. 4.2). Basierend auf den Ergebnissen der biochemischen Untersuchungen wurden die weiteren Verbindungen **Biv2** (Kapitel 4.3) und **Biv3** (Kapitel 4.4) durch Veränderung der Linkerlänge entwickelt.

4.1. Synthese des Phosphophenoylethers 1

Zur Darstellung der geplanten bivalenten Inhibitoren wurde mit der Synthese des Phosphophenoylether-Bindemotives begonnen. Die Struktur des Phosphophenoylethers (**1**) besteht aus zwei aromatischen Ringen, die über eine Etherverbindung miteinander verknüpft sind. Der erste Aromat ist dabei ein Phosphonat-modifiziertes Phenol. Der zweite Aromat wird ausgehend von einem Anilinderivat hergestellt. Der Phosphophenoylether sollte daher aus zwei Bausteinen aufgebaut werden können, wie folgende Retrosynthese zeigt (Abbildung 19):

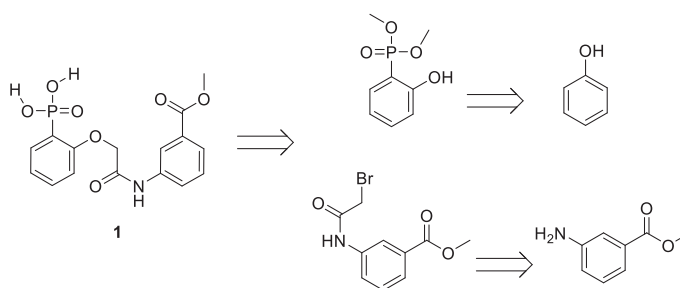


Abbildung 19 Retrosynthese des Phosphophenoylethers (**1**).

4.1.1. Synthese des Phosphates 2

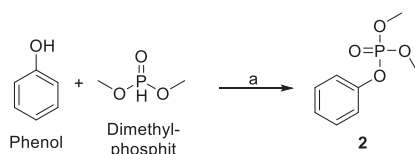


Abbildung 20 Umsetzung von Phenol mit Dimethylphosphit zu Phosphat 2. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) Triethylamin, CCl_4 , $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 18 h.

Der erste Baustein **2** wurde ausgehend von Phenol durch Umsetzung mit Dimethylphosphit unter basischen Bedingungen in Tetrachlormethan hergestellt (Abbildung 20).⁷⁷ Dieser Reaktion geht die Atherton-Todd-Reaktion voran. Dabei wird mithilfe von Tetrachlormethan und einer Base (meist ein primäres, sekundäres oder tertiäres Amin) eine Chlorierung von Dimethylphosphit erreicht.⁷⁸ Der erste Schritt der Atherton-Todd-Reaktion ist die Abstraktion einer Methylgruppe des Dimethylphosphits durch eine Base (Abbildung 21).

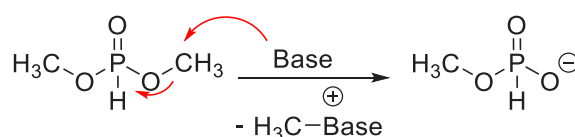


Abbildung 21 Abstraktion einer Methylgruppe durch eine Base.

Anschließend findet eine Umlagerung der Elektronen statt, so dass ein negativ geladenes Sauerstoffatom entsteht. Dieses kann anschließend ein Proton eines weiteren Dimethylphosphit-Moleküls angreifen, wodurch die Intermediate **B** und **C** entstehen (Abbildung 22).

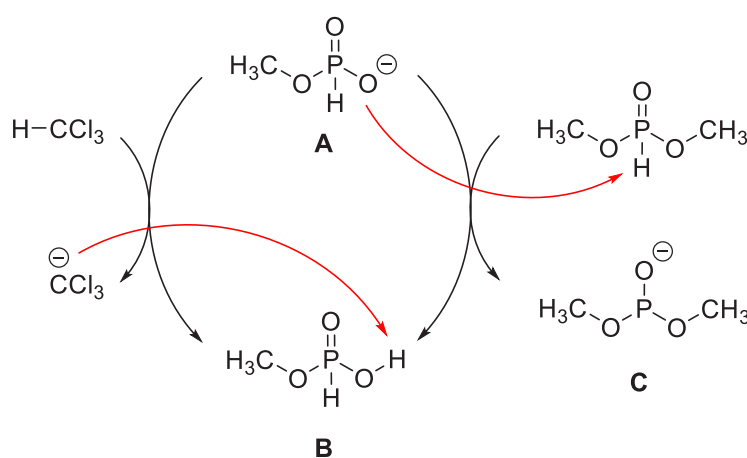


Abbildung 22 Mechanismus der Atherton-Todd-Reaktion (erstellt nach ⁷⁸).

Das Intermediat **C** kann anschließend durch Reaktion mit Tetrachlormethan chloriert werden (Abbildung 23).

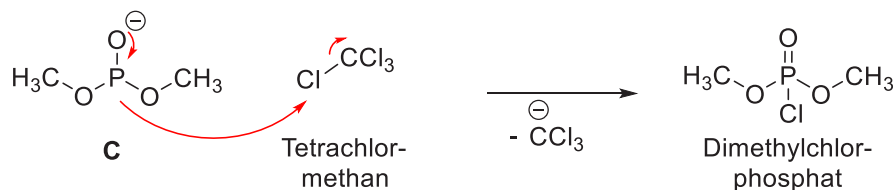


Abbildung 23 Chlorierung von Intermediat **C**.

Der dadurch entstehende negativ geladene Trichlorkohlenstoff kann dann von **B** wiederum ein Wasserstoffatom abstrahieren, wodurch wieder Verbindung **A** entsteht und der Kreislauf geschlossen wird. Mithilfe des Dimethylchlorphosphats, welches aus dieser Reaktion hervorgeht, konnte die Substitution des Chlors durch das Phenol durchgeführt werden. Das Phosphat (**2**) konnte mit einer Ausbeute von 58 % als gelbes Öl erhalten werden.

4.1.2. Umlagerung zum Phosphonat

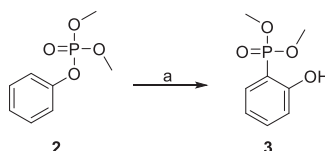


Abbildung 24 LDA-vermittelte Umlagerung zum Phosphonat. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) LDA, THF, $-78\text{ }^{\circ}\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 18h.

Um das Phosphat **2** in das entsprechende Phosphonat **3** zu überführen, wurde anschließend eine anionische *ortho*-Fries-Umlagerung mit LDA durchgeführt, das zuvor *in situ* aus *n*-BuLi und Diisopropylamin hergestellt wurde (Abbildung 24).⁷⁹⁻⁸⁰ Nach erfolgter Reaktion und säulenchromatographischer Reinigung konnte Verbindung **3** mit einer Ausbeute von 60 % als weißer Feststoff erhalten werden.

4.1.3. Synthese des Bromacetamiderivates (4)

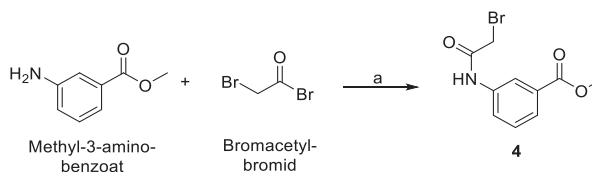


Abbildung 25 Synthese der Verbindung 4. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) Triethylamin, DCM, 0 °C → RT, 18 h.

Für den zweiten Baustein wurde Methyl-3-aminobenzoat mit Bromoacetyl bromid unter basischen Bedingungen umgesetzt (Abbildung 25). Die Reaktion fand unter Bildung einer Amidbindung zwischen der Aminogruppe des Methyl-3-aminobenzoats und dem Säurebromid des Bromoacetyl bromids statt.⁸¹ Das Produkt (**4**) konnte nach Umkristallisation in Ethylacetat als reiner, kristalliner Stoff und in einer Ausbeute von 80 % erhalten werden.

4.1.4. Substitution zum geschützten Phosphophenoylether

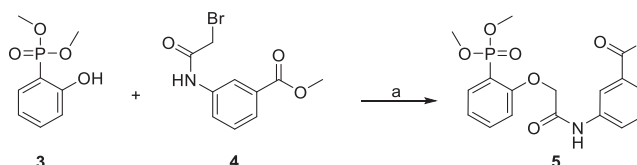


Abbildung 26 Verknüpfung der beiden Bausteine 3 und 4 zu Verbindung 5. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) K₂CO₃, Aceton, RT, 3h.

Im nächsten Schritt der Synthese des Phosphophenoylethers wurden die Bausteine **3** und **4** durch eine Substitution unter Bildung eines Ethers miteinander verknüpft (Abbildung 26). Die Reaktion fand unter basischen Bedingungen statt. Kaliumcarbonat diente dabei während der Reaktion zur Deprotonierung des Phenols.⁸² Die Reaktion verläuft nach einem S_N2-Mechanismus, d.h. die Anlagerung des Nukleophils und die Abspaltung der Abgangsgruppe finden gleichzeitig statt. Der S_N2-Mechanismus wird außerdem durch die Verwendung eines aprotisch-polaren Lösungsmittels unterstützt. Das Produkt (**5**) wurde nach säulenchromatographischer Reinigung als weißer Feststoff erhalten.

4.1.5. Verseifung zum Phosphophenoylether (1)

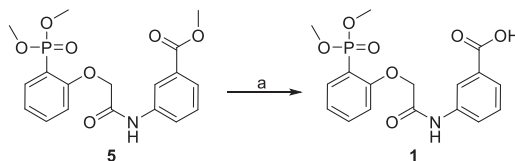


Abbildung 27 Hydrolyse des Methylesters in Verbindung 5. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) LiOH, THF / H₂O (1:1), 40 °C, 3 h.

Der letzte Schritt in der Synthese des Phosphophenoylethers **1** war die Verseifung von Verbindung **5** (Abbildung 27). Diese erfolgte mittels Lithiumhydroxid in einem Lösungsmittelgemisch aus THF und Wasser.⁸³ Die Verseifung gehört mechanistisch zu den Additions-Eliminierungsreaktionen. Die negativ-geladene Hydroxygruppe des Lithiumhydroxids addiert dabei an den Carbonylkohlenstoff des Methylesters, woraufhin die Eliminierung des Methanolats stattfinden kann.

4.2. Synthese von Biv1

Das erste bivalente Molekül **Biv1** setzt sich aus zwei Phosphophenoylether-Bausteinen und einem Linker zusammen. Als Linker wurde 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin verwendet. Da es sich dabei um ein Diamin mit zwei terminalen Aminogruppen handelt, war es möglich, an beiden Enden den Phosphophenoylether über Amidbindungen mit dem Linker zu verbinden. Die Retrosynthese ist in Abbildung 28 dargestellt.

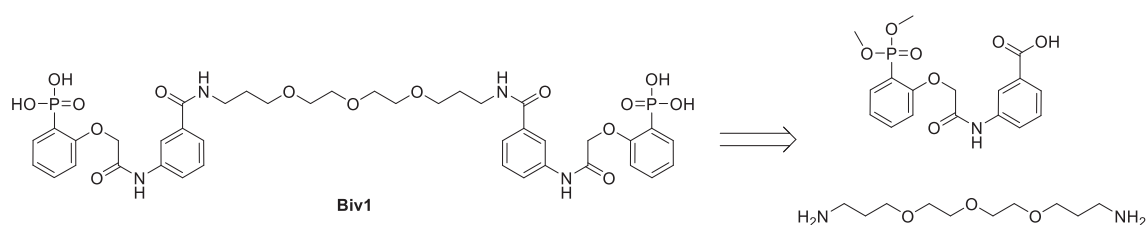


Abbildung 28 Retrosynthese von Biv1.

Zu Beginn wurde der Linker mit einem Äquivalent des Phosphophenoylethers umgesetzt, so dass zunächst das einseitige Molekül erhalten wurde (Abbildung 29). Die Synthese wurde mit dem Kupplungsreagenz 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) unter basischen Bedingungen in DCM durchgeführt. Mithilfe des Carbodiimids wird die

Carbonsäure in einen reaktiven Acylisoharnstoff überführt. Anschließend wird durch Reaktion mit HOBt der reaktivere Aktivester gebildet. Dieser reagiert dann aufgrund der erhöhten Reaktivität mit der eingesetzten Aminogruppe. Der Vorteil der Verwendung von EDC ist die leichte Abtrennung des entstehenden Harnstoffderivates.⁸⁴⁻⁸⁵ Das Produkt konnte nach Aufreinigung per HPLC in guten Ausbeuten erhalten werden. Anschließend erfolgte die erneute Umsetzung mit dem Phosphophenoylether. Hierzu wurde nochmals mit EDC und HOBt unter basischen Bedingungen gearbeitet. Das Produkt konnte auch hier nach Reinigung mittels HPLC in zufriedenstellenden Ausbeuten erhalten werden.

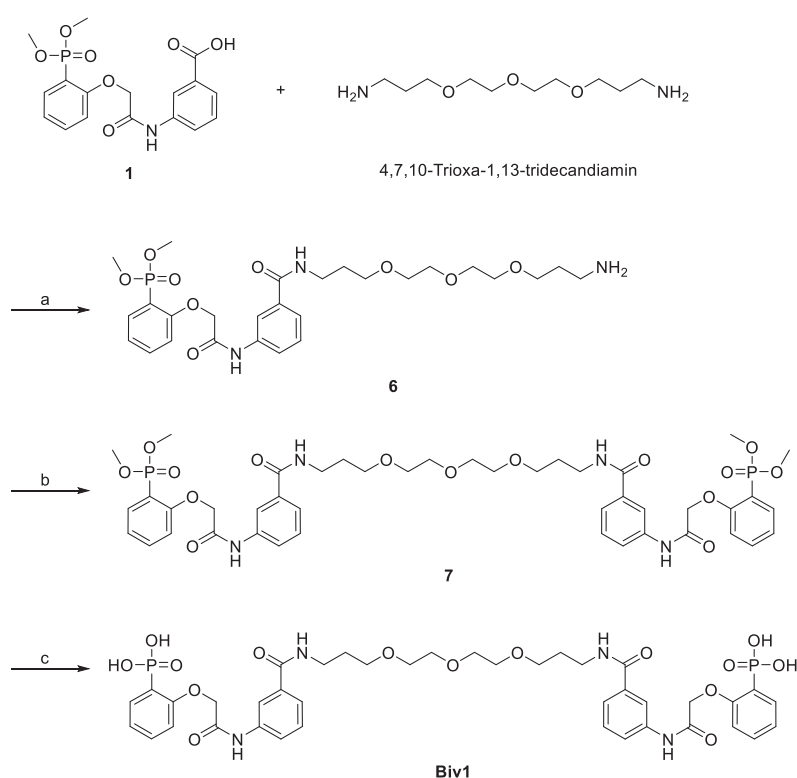


Abbildung 29 Syntheseweg von Verbindung 1 zu Biv1. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) EDC, HOBt, DIPEA, DCM, RT, 24 h. (b) 1, EDC, HOBt, DIPEA, DCM, RT, 48 h. (c) 1. TMSBr, DCM, RT, 30 min. 2. MeOH / H₂O (3:1), RT, 30 min.

Um das finale bivalente Produkt **Biv1** zu erhalten, wurden die Methylgruppen an den Phosphoratomen an den jeweiligen Enden des Moleküls **7** mit Bromtrimethylsilan (TMSBr) abgespalten. Die Abspaltung erfolgte dabei in zwei Stufen. In der ersten Stufe wurde die Methylgruppe am Phosphonat durch Reaktion mit TMSBr zu einem Silylether umgesetzt. In der zweiten Stufe wurde dieses Intermediat dann durch Zugabe eines Lösungsmittelgemisches aus Methanol und Wasser hydrolysiert, so dass dann das freie Phosphonat erhalten werden konnte.⁸⁶⁻⁸⁷

4.3. Synthese von Biv2

Um auch Derivate wie z. B. **Biv2** mit einem längeren Linker zu erhalten, wurde zuerst die Synthese eines PEG-Linkers mit definierter Länge etabliert. Hierzu wurden zwei kommerziell erhältliche PEG-Bausteine über einen kurzen Zwischenbaustein miteinander verbunden (Abbildung 30).

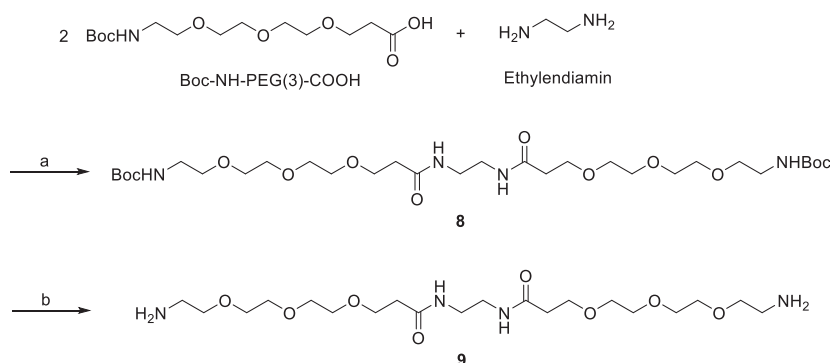


Abbildung 30 Synthese des Linkers 9. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) EDC, HOBT, DIPEA, DCM, RT, 24 h. (b) HCl (4M in Dioxan), RT, 3 h.

Für die Synthese wurde 3-(2-(2-(2-Aminoethoxy)ethoxy)ethoxy)propionsäure mit Boc-geschützter Aminogruppe eingesetzt. Über zwei Amidbindungen konnte es mit Ethylendiamin zu Linker **8** umgesetzt werden. Für die Kupplung wurden EDC und HOBT als Kupplungsreagenzien eingesetzt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung erfolgte mit HCl (in Dioxan) die Abspaltung der Boc-Schutzgruppen, so dass das HCl-Salz des Diamin-Linkers **9** erhalten werden konnte.⁸⁸

Im nächsten Schritt wurde dieses Diaminsalz dann unter Einsatz von EDC und HOBT als Kupplungsreagenzien über eine Amidbindung an die freie Säure des Phosphophenoethers **1** gebunden. Allerdings konnte bei der Reaktionskontrolle über LC-MS kein Umsatz festgestellt werden (Abbildung 31).

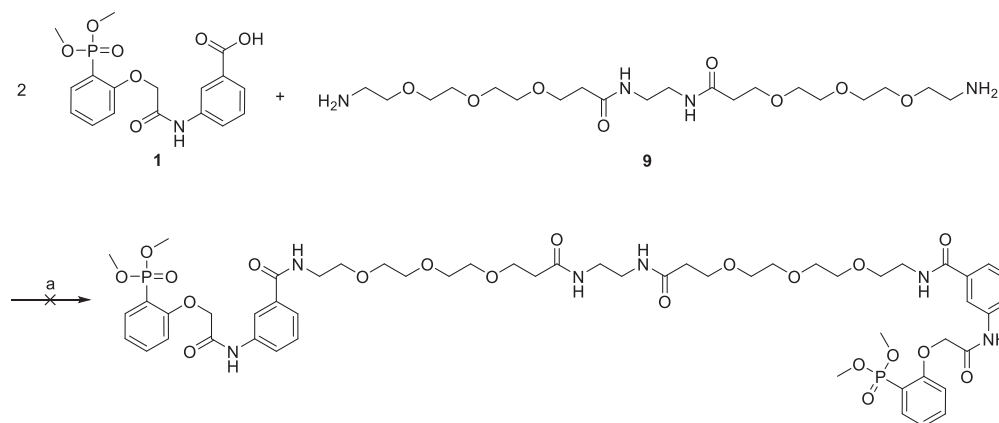


Abbildung 31 Syntheserversuch zur Herstellung von Biv2. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) EDC, HOBT, DIPEA, DCM / DMF, RT, 48 h.

Auch die Zugabe von Dimethylformamid zur Steigerung der Löslichkeit des PEG-Linkers **9** führte nicht zum gewünschten Zielmolekül. Aus diesem Grund wurde die Synthese umgestellt und es wurde zunächst der Phosphophenoylether **1** mit einer einfachen PEG-Kette (Abbildung 32) hergestellt.

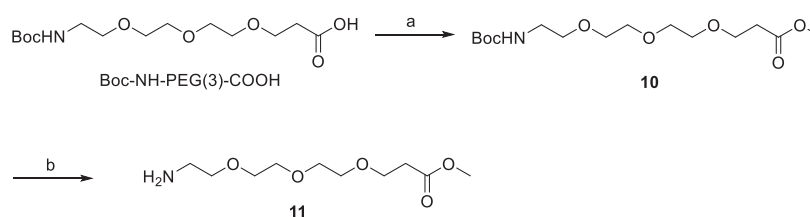


Abbildung 32 Synthese der geschützten Säure 11. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) SOCl_2 , MeOH, $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 18 h.

Hierzu wurde Boc-geschützte 3-(2-(2-(2-Aminoethoxy)ethoxy)ethoxy)propionsäure über Thionylchlorid-vermittelte Methylierung zum Methylester umgesetzt. Bei dieser Reaktionsführung wurde die Boc-Schutzgruppe bereits teilweise abgespalten. Um eine 100%ige Abspaltung zu erreichen, wurde dieses Produkt anschließend jedoch noch einmal mit HCl in Dioxan umgesetzt, so dass eine vollständige Umsetzung zum gewünschten Produkt **11** erreicht wurde.

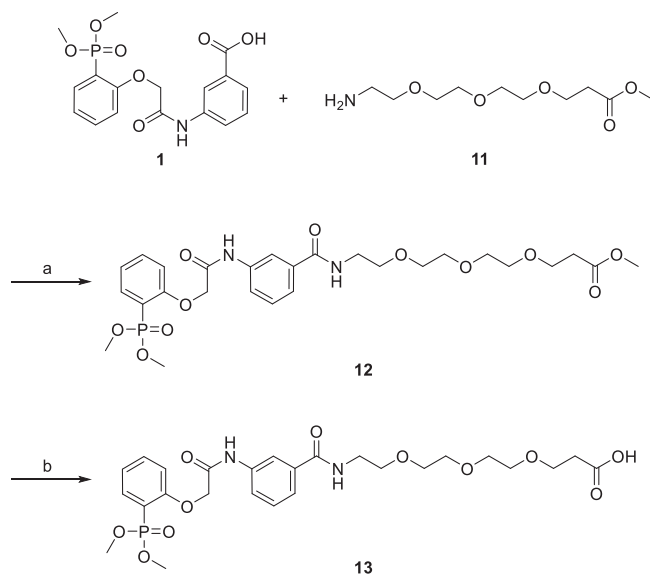


Abbildung 33 Synthese der Verbindung **13**. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) EDC, HOBt, DIPEA, DCM, RT, 24 h. (b) LiOH, THF / H₂O (1:1), 40 °C, 15 min.

Im nächsten Schritt erfolgte die Kupplung über eine Amidbindung der freien Säure am Phosphophenoether **1** und der freien Aminogruppe am PEG-Derivat **11** (Abbildung 33). Es wurden HOBt und EDC als Kupplungsreagenzien verwendet. Daraufhin wurde mit LiOH eine Verseifung des Methylesters **12** durchgeführt, um somit die freie Säure **13** zu erhalten.

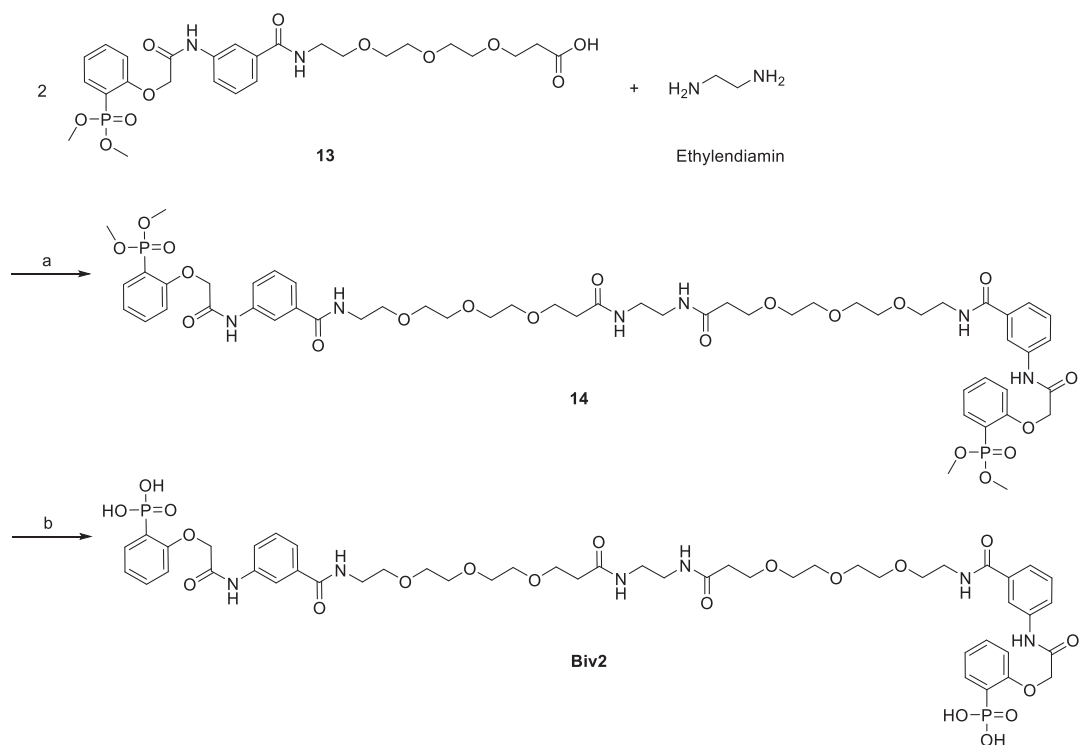


Abbildung 34 Synthese von **Biv2**. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) EDC, HOBt, DIPEA, DCM, RT, 48 h. (b) 1. TMSBr, DCM, RT, 30 min. 2. MeOH / H₂O (3:1), RT, 30 min.

Im Anschluss wurde **13** durch Kupplung mit Ethylendiamin zum Zielmolekül **14** umgesetzt (Abbildung 34). Der letzte Schritt der Synthese war dann die Abspaltung der Methylgruppen am Phosphonat mit TMSBr. Nach Aufreinigung mittels HPLC konnte **Biv2** mit einer Ausbeute von 37% (über zwei Stufen) als weißer Feststoff erhalten werden.

4.4. Synthese von Biv3

Das bivalente Molekül **Biv3** besteht wie auch **Biv1** und **Biv2** aus zwei Phosphophenoether-Einheiten, die über einen Linker miteinander verbunden sind. Der Linker sollte diesmal aus drei definierten PEG-Ketten zusammengesetzt werden, welche über Amidbindungen miteinander verknüpft werden sollten. Die Syntheseroute für **Biv3** entspricht dabei dem Syntheseweg von **Biv2**. Die Retrosynthese ist in Abbildung 35 dargestellt.

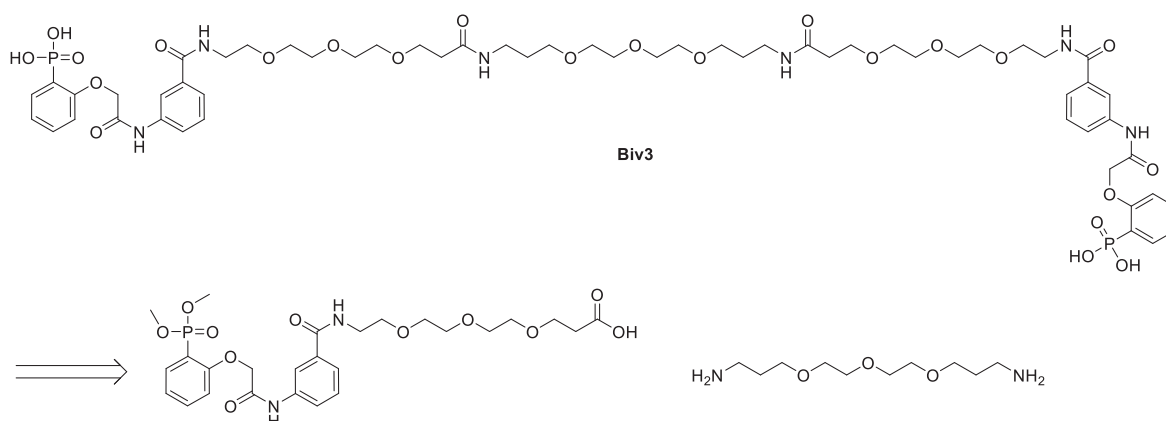


Abbildung 35 Retrosynthese für Biv3.

Im ersten Schritt der Synthese von **Biv3** wurde die bereits beschriebene Verbindung **13** verwendet. Zum Erreichen der Dimerisierung wurden daher zwei Äquivalente von **13** mit einem Äquivalent von 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin unter Einsatz von EDC und HOBt unter basischen Bedingungen umgesetzt. Das so erhaltene Produkt **15** wurde im Anschluss wurde mit TMSBr und in einem zweiten Schritt mit einer Lösung aus Methanol und Wasser zum gewünschten Produkt **Biv3**, welches als weißer Feststoff erhalten werden konnte, überführt.

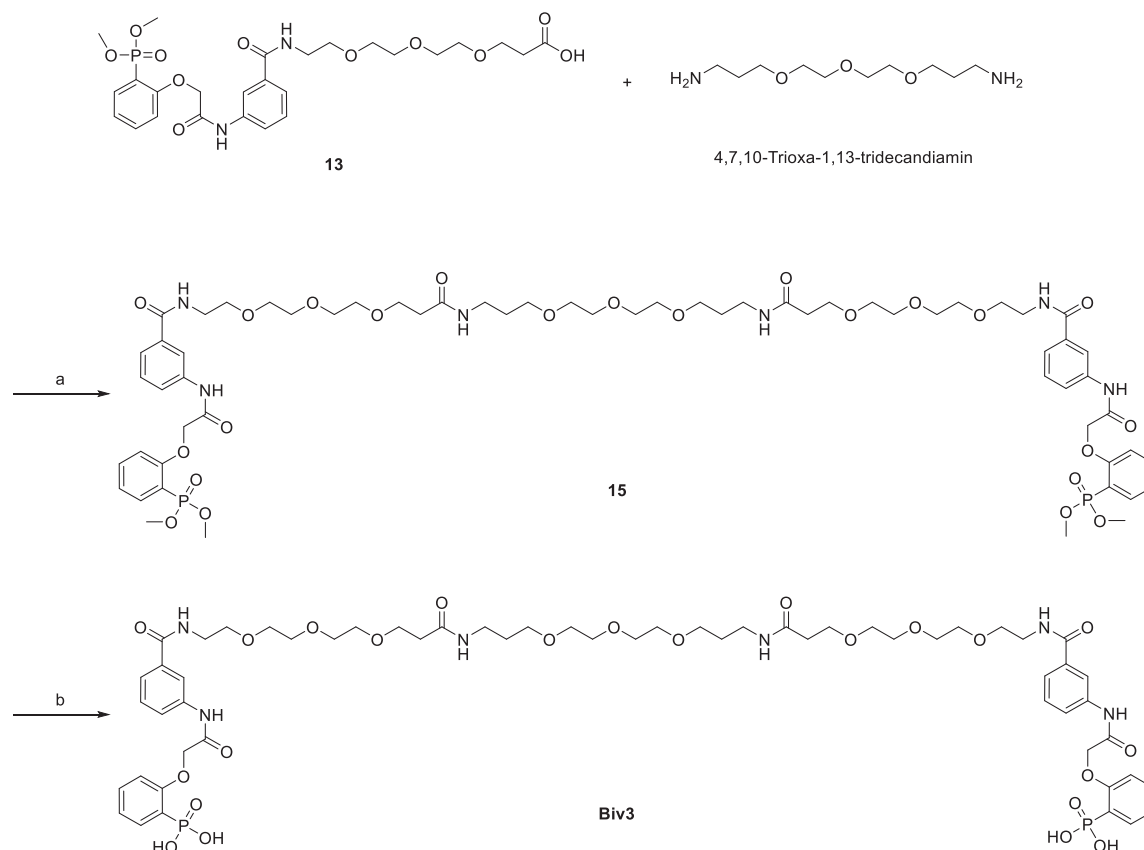


Abbildung 36 Synthese von Biv3. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) EDC, HOBT, DIPEA, DCM, RT, 48 h. (b) 1. TMSBr, DCM, RT, 30 min. 2. MeOH / H₂O (3:1), RT, 30 min.

4.5. Synthese von Mov1

Als Kontrollsubstanz zur Testung des bivalenten Bindungsmodus wurde anschließend ein monovalentes Derivat **Mov1** hergestellt (Abbildung 37).

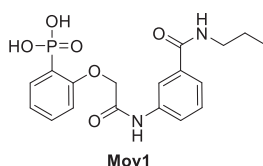


Abbildung 37 Monovalente Verbindung Mov1.

Die Verbindung besteht formal aus dem bereits bekannten Phosphophenoxyetherbaustein **1** und einer kurzen Alkylkette, die verhindern soll, dass weitergehende Wechselwirkungen in den Bindungstaschen der 14-3-3-Proteine stattfinden. Dadurch wird gewährleistet, dass in den biochemischen Bindungsassays lediglich der Beitrag der monovalent-bindenden Phosphophenoxyether-Einheit gemessen wird.

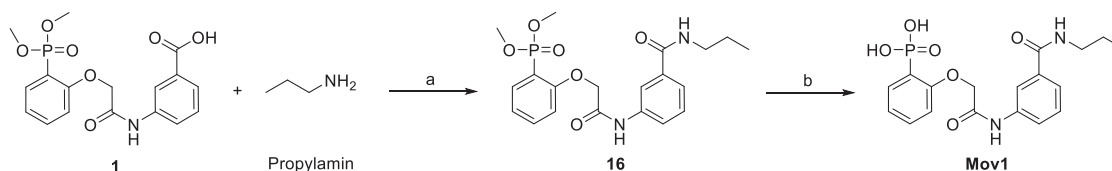


Abbildung 38 Synthese von Mov1. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) EDC, HOBT, DIPEA, DCM, RT, 24 h. (b) 1. TMSBr, DCM, RT, 30 min. 2. MeOH / H₂O (3:1), RT, 30 min.

Der erste Schritt zur Synthese von **Mov1** war daher die Kupplung der Alkylkette an den Phosphophenoxyether über eine Amidbindung (Abbildung 38). Dafür wurden der Phosphophenoxyether als freie Säure und Propylamin als Amin eingesetzt. Für die Kupplung wurde mit DIPEA, EDC und HOBT in DCM bei Raumtemperatur gearbeitet. Nach erfolgreicher Kupplung wurden mithilfe von TMSBr und einem Lösungsmittelgemisch aus Methanol und Wasser (3:1) wie auch bei den **Biv**-Derivaten die Methylgruppen des Phosphorsäureesters hydrolysiert. Das so erhaltene Rohprodukt wurde anschließend mittels HPLC aufgereinigt und die Verbindung **Mov1** als weißer Feststoff erhalten.

4.6. Biochemische Evaluation von Biv1, Biv2 und Biv3

Die Verbindungen **Biv1**, **Biv2** und **Biv3** wurden von der Gruppe von Prof. C. Ottmann an der Technischen Universität Eindhoven in den Niederlanden biochemisch evaluiert. Die Untersuchung erfolgte mittels Fluoreszenzpolarisations-Messungen. Für die Messung von **Biv1**, **Biv2** und **Biv3** wurde eine Lösung aus dem 14-3-3ζ Protein mit einer Konzentration von 20 μM und dem Peptid FAM-cRaf, einem 14-3-3-bindenden Phosphopeptid mit dem Fluorophor FAM, in der Konzentration 100 nM vorgelegt. Anschließend wurden die verschiedenen Inhibitoren konzentrationsabhängig (bis zu einer Maximalkonzentration von 500 μM) hinzugegeben. Durch die Bindung der Inhibitoren wird das FAM-cRaf-Peptid von seinem Bindepartner, dem 14-3-3-Protein, verdrängt und gelangt so in ungebundener Form in Lösung. Durch die Freisetzung des Fluorophors nimmt daher seine Beweglichkeit zu, wodurch eine Änderung in der Polarisation bzw. Anisotropie des Fluorophors bewirkt wird. Das bedeutet, dass die Änderung der FAM-Polarisation zur Quantifizierung der Affinität der Protein-Inhibitor-Bindung herangezogen werden kann. Dementsprechend können die Ergebnisse aus den Fluoreszenzpolarisationsmessungen Aufschluss über den inhibitorischen

Charakter der bivalenten Moleküle geben. Die Ergebnisse der FP-Messung sind in Abbildung 39 dargestellt.

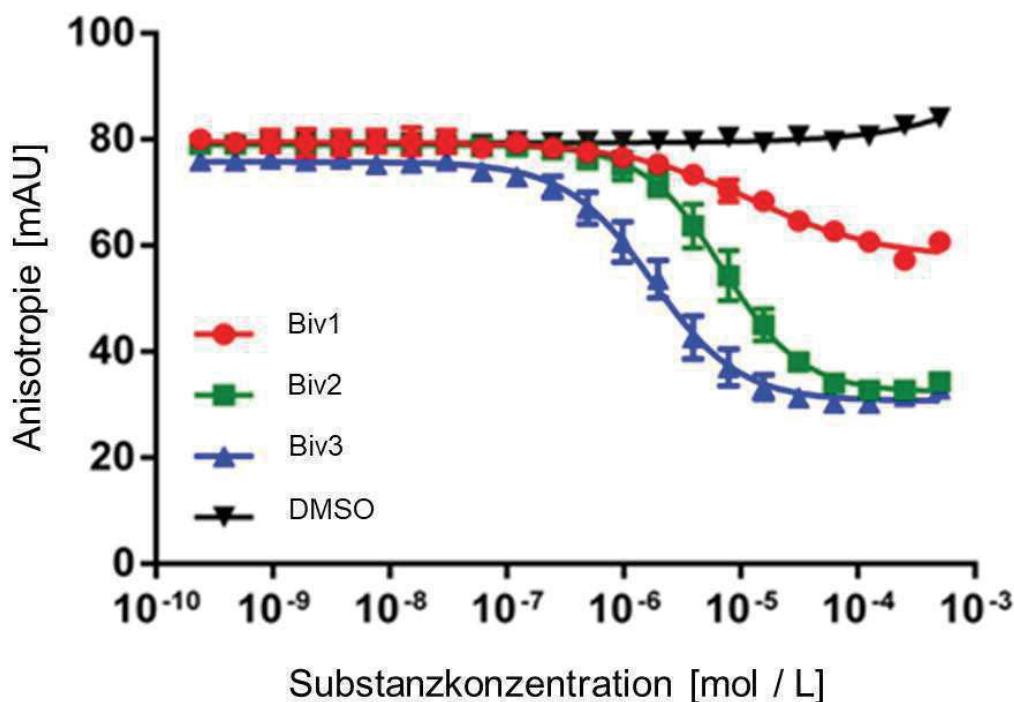


Abbildung 39 FP-Messung für **Biv1-Biv3**. Messbedingungen: [14-3-3] = 20 μM , [FAM-cRaf] = 100 nM, [Substanz]_{max} = 500 μM .

Die Messung zeigt für **Biv1** einen Abfall der Anisotropie um ca. 20 mAU. Daraus lässt sich schließen, dass ein Teil der Bindungsstellen durch **Biv1** besetzt wurden und FAM-cRaf teilweise freigesetzt wurde. Allerdings wird durch Zugabe von **Biv1** kein Plateau erreicht, so dass im getesteten Konzentrationsbereich keine vollständige Verdrängung des FAM-cRAF-Peptides erreicht wurde. Für **Biv1** liegt der IC_{50} -Wert daher oberhalb von 400 μM . Insgesamt belegt der Verlauf der Messung bei **Biv1**, dass zwar Hemmung auftritt, diese jedoch nicht sehr effizient ist. Daher ist anzunehmen, dass keine bivalente Hemmung vorliegt. Dementsprechend liegt es nahe, dass die Molekül- bzw. Linkerlänge nicht ausreicht, um den Abstand der beiden Bindungsstellen zu überbrücken.

Der Graph für die FP-Messung von **Biv2** zeigt einen stärkeren Abfall der Anisotropie. Der Wert fällt von ca. 80 mAU auf ein Plateau bei knapp 35 mAU. Durch Auswertung des Wendepunktes kann daher ein IC_{50} -Wert von ca. 7 μM für **Biv2** ermittelt werden. Damit zeigt **Biv2** eine vielfach-bessere Hemmung als **Biv1**. Die enorme Steigerung der Hemmung bei gleichbleibendem Hemmmotiv für die 14-3-3-Bindungstasche legt

daher nahe, dass die Erhöhung der Hemmung auf eine bivalente Inhibition zurückzuführen ist.

Die Messung für **Biv3**, welches über eine noch längeren Linker als **Biv2** verfügt, konnte eine weitere Steigerung der Inhibition bei diesem Derivat aufzeigen. Der aus der Auswertung des Graphen errechnete IC_{50} -Wert liegt dabei bei ca. $1.8 \mu\text{M}$. Auch hier sollte also eine bivalente Hemmung vorliegen, welche durch einen noch-längeren Linker unterstützt wird.

Um nun aber eindeutig zu belegen, dass die Steigerung der Hemmung auf einen bivalenten Hemmmechanismus zurückgeführt werden kann, wurde anschließend FP-Messungen für das Derivat **Mov1** durchgeführt (Abbildung 40).

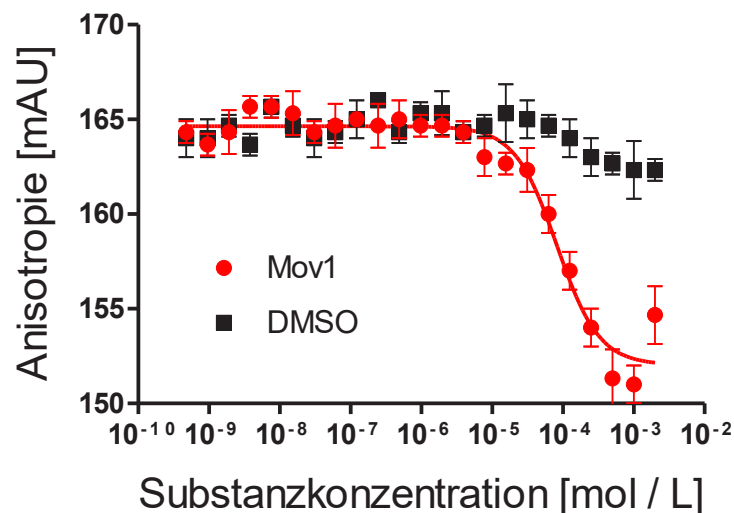


Abbildung 40 FP-Messung mit **Mov1**. Messbedingungen: $[14-3-3] = 20 \mu\text{M}$, $[\text{TMR-cRaf}] = 100 \text{ nM}$, $[\text{Mov1}]_{\text{max}} = 2 \text{ mM}$.

Die Messung wurde wiederum mit dem Protein 14-3-3 ζ mit einer Konzentration von $20 \mu\text{M}$ und cRaf-TMR als zu verdrängende Bindungskomponente bei einer Konzentration von 100 nM durchgeführt. **Mov1** wurde bis zu einer Konzentration von 2 mM zugegeben. Dabei konnte nur eine sehr schwache Verdrängung des Peptids beobachtet werden, so dass auch hier ein IC_{50} -Wert $> 400 \mu\text{M}$ abgeleitet wurde. Da die Verbindung **Mov1** aufgrund der Struktur nur an eine Bindungsstelle des Proteins binden kann, ist davon auszugehen, dass dieser Wert als Referenz für eine monovalente Inhibition dient. Dies bedeutet daher auch, dass **Biv1** nur monovalent an 14-3-3 bindet, währenddessen **Biv2** und **Biv3** als bivalente Inhibitoren fungieren.

4.7. Kristallstrukturen von Biv1, Biv2 und Biv3

Neben den FP-Messungen gelang es Mitarbeitern der AG Ottmann, Kristallstrukturen der Verbindungen **Biv1**, **Biv2** und **Biv3** im Komplex mit dem 14-3-3-Protein aufzunehmen. Anhand der Kristallstrukturen war es somit möglich, die Anordnung der Moleküle in Wechselwirkung mit dem Protein zu sehen

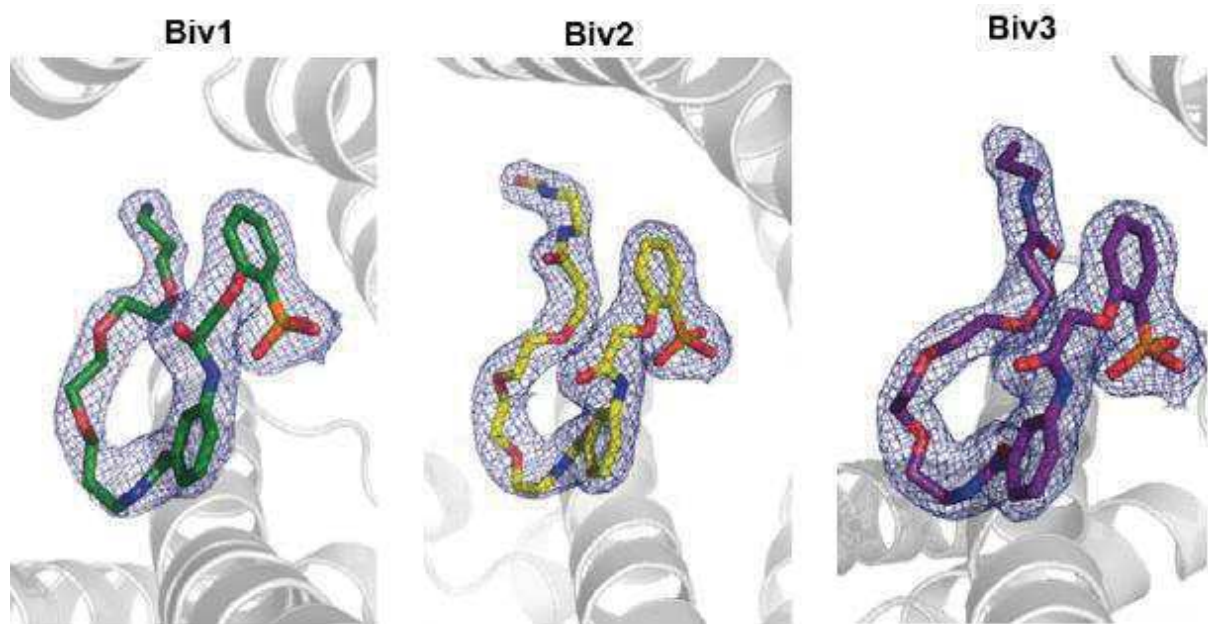


Abbildung 41 Kristallstrukturen der Verbindungen Biv1 - Biv3.

Die Aufnahmen für die bivalenten Moleküle zeigen deutlich, dass diese mit der Bindungstasche des 14-3-3-Proteins interagieren. Die Phosphophenolethereinheit liegt dabei bei allen drei Molekülen in derselben Konformation vor, die analog zum Bindemodus der Ottmann *et al.*-Studie ist.⁷⁶ Zusätzlich und unerwarteterweise ist jedoch zu sehen, dass die PEG-Kette der Moleküle sich statt in die Richtung der gegenüberliegenden Bindungstasche zu richten, eine Art Schlaufe bildet und zurück in die bereits besetzte Bindungstasche zeigt. Die Kette nimmt dabei eine Kronenetherartige Form an, bei der das Lys49 koordiniert wird. Diese Koordination kann vermutlich auf Wechselwirkungen zwischen den Sauerstoffatomen der PEG-Kette und der Aminogruppe des Lysins zurückgeführt werden. Um von dort aus die gegenüberliegende Bindungstasche zu erreichen, müsste das Molekül eine Entfernung von etwa 30 Å überbrücken. Um festzustellen, ob die vorliegenden Verbindungen theoretisch dazu in der Lage wären, wurden von Dr. Y. B. Ruiz-Blanco aus der Arbeitsgruppe von Prof. Elsa Sánchez am MPI in Mülheim Berechnungen zur Linkerlänge für **Biv1**, **Biv2** und **Biv3** durchgeführt.

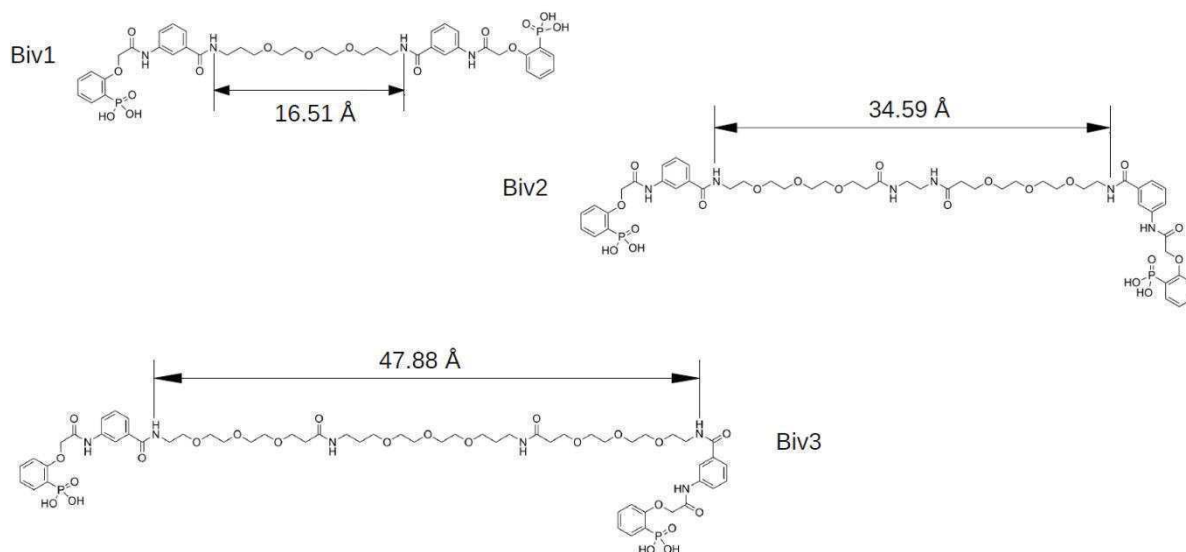


Abbildung 42 Berechnete Linkerlängen der Verbindungen **Biv1**, **Biv2** und **Biv3**.

Die Berechnungen zeigen, dass für **Biv1** eine Linkerlänge von 16.5 Å vorliegt. Wie bereits bekannt ist, beträgt der Abstand der beiden Bindungstaschen in einem 14-3-3-Proteins etwa 30 Å. Dementsprechend ist bei **Biv1** davon auszugehen, dass eine bivalente Hemmung aufgrund der Länge der Verbindung nicht möglich ist, was sich ebenfalls mit dem Ergebnis aus der FP-Messung deckt. Für **Biv2** wurde eine Linkerlänge von 34.6 Å berechnet. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass das gesamte Molekül durch die beiden Phosphophenoxyether-Motive an beiden Enden deutlich länger ist, besteht bei der Verbindung **Biv2** somit theoretisch die Möglichkeit einer bivalenten Hemmung, was auch durch das Ergebnis der FP-Messung gestützt wird. Für den Linker der Verbindung **Biv3** ergab die Berechnung eine Länge von 47.9 Å. Zusammen mit den beiden Phosphophenoxyether-Motiven an beiden Enden ist **Biv3** damit sogar sichtlich länger als die erforderlichen 30 Å bzw. 40 Å und somit auch in der Lage, eine bivalente Inhibition zu realisieren.

Wie die Kristallstrukturen der drei Verbindungen verdeutlichen, bildet ein Teil des Linkers eine Schlaufe, die in die bereits besetzte Bindungstasche zeigt. Das restliche Molekül müsste daher eine weitere Drehung vollziehen, um die gegenüberliegende Tasche zu erreichen.

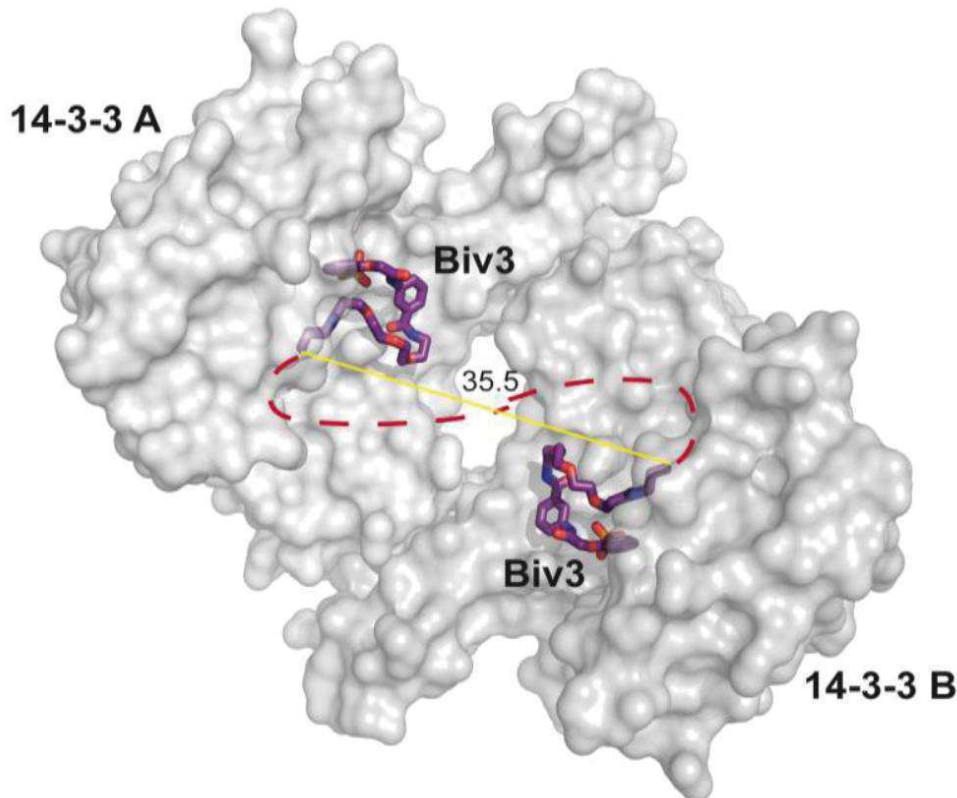


Abbildung 43 Abstand der dargestellten Strukturen.

In Abbildung 43 sind die Kristallstrukturen von zwei Bindungstaschen mit **Biv3** zu einer Gesamtdarstellung des Proteins zusammengeführt worden. Die Abbildung zeigt mit einer gelben durchgezogenen Linie den Abstand zwischen den Linkern, der nach Vollführung der Schlaufe zwischen den beiden dargestellten Enden der Verbindung **Biv3** vorliegt. Dieser beträgt ca. 35,5 Å. Da das Molekül allerdings eine weitere Drehung ausführen müsste, um in die Richtung der gegenüberliegenden Bindungstasche zu zeigen, verlängert sich der zu überbrückende Abstand (rote gestrichelte Linie). Da in der Kristallstruktur in Abbildung 43 zwei der drei PEG-Ketten des Linkers von **Biv3** bereits sichtbar sind, bliebe nur noch eine PEG-Kette zur Überbrückung der Entfernung übrig. Die Berechnungen von Dr. Y. B. Ruiz-Blanco zeigen aber, dass eine PEG-Kette lediglich eine Länge zwischen 16 und 17 Å aufweist. Demzufolge ist auszuschließen, dass die beiden dargestellten Enden über die verbleibende PEG-Kette miteinander verbunden sind. Obwohl nicht die gesamte molekulare Struktur der Moleküle anhand der Strukturanalyse dargestellt werden konnte, ist daher davon auszugehen, dass in der Röntgenstruktur keine der synthetisierten Moleküle eine klassische bivalente Hemmung eingeht. Somit zeigt die Röntgenkristallstrukturanalyse ein unterschiedliches Ergebnis als die biochemische Messung.

Ursache für diese Diskrepanz könnten z. B. die Messbedingungen während der Kristallstrukturanalyse sein. Die Bindungsaffinität einer PEG-Kette an ein Kation wie die protonierte Lysin-Seitenkette ist im Gegensatz zum entsprechenden Kronenether-Analogon aufgrund entropischer Effekte sehr viel niedriger.⁸⁹ Das bedeutet, dass die Koordination des Lys49 durch die PEG-Kette, wodurch sich weder die Aminogruppe des Lysins, noch die PEG-Kette frei bewegen können, einen entropisch ungünstigen Prozess darstellt und dementsprechend temperaturabhängig sein sollte. Die meisten Röntgenstrukturanalysen, einschließlich der für diese Arbeit verwendeten Analyse, werden jedoch bei kryogenen Temperaturen hergestellt, wodurch wie im Fall der PEG-Kette und des Lys49 eventuell auch die Belegung von Konformationen mit bei normaler Raumtemperatur ungünstiger freier Gibbs Enthalpie möglich werden.⁹⁰ Folglich kann davon ausgegangen werden, dass das Ergebnis der Röntgenstrukturanalyse nicht zwangsläufig dem tatsächlichen Bindungszustand in Lösung entsprechen muss und unter den Lösungsbedingungen dennoch eine bivalente Hemmung vorliegen kann.

4.8. Modifizierung von Biv3

Die Studien von Ottmann *et al.* zeigten nicht nur, dass Phosphophenoether zu einer neuen hochpotenten Klasse von 14-3-3 Inhibitoren gehören, sondern dass durch geeignete Modifikationen am zweiten Aromaten auch die Hemmung in ihrer Wirksamkeit moduliert werden konnte.

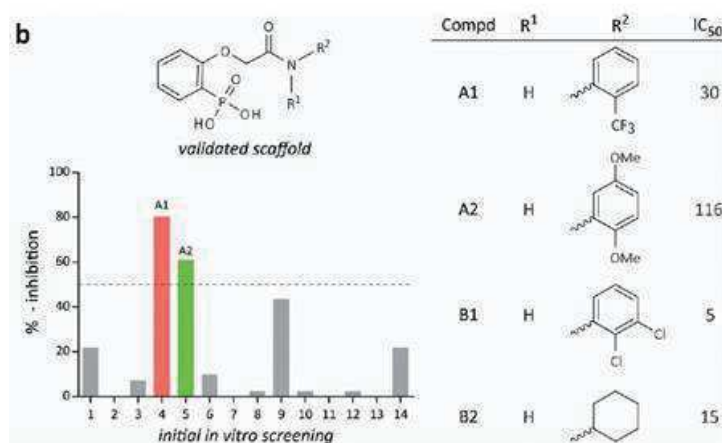


Abbildung 44 Effekt verschiedener Substituenten am zweiten Aromaten/Alkylrest auf die Inhibition der Phosphophenoether.⁷⁶

Dabei wurden vor allem Aromaten mit verschiedenen Substituenten untersucht. Dabei zeigten die Studien, dass ein Benzolring mit Chlorresten in *ortho*- und *meta*-Stellung zum Anilinrest (Verbindung **B1**, Abbildung 44) die beste Hemmung mit einem IC₅₀-Wert von 5 µM zeigte. Dies lässt vermuten, dass die an diesen Stellen befindlichen Chlorreste einen positiven Einfluss auf die Inhibition haben. Auf dieser Grundlage sollten daher zwei alternative, bivalente Derivate **Biv4** und **Biv5** entwickelt werden (Abbildung 45).

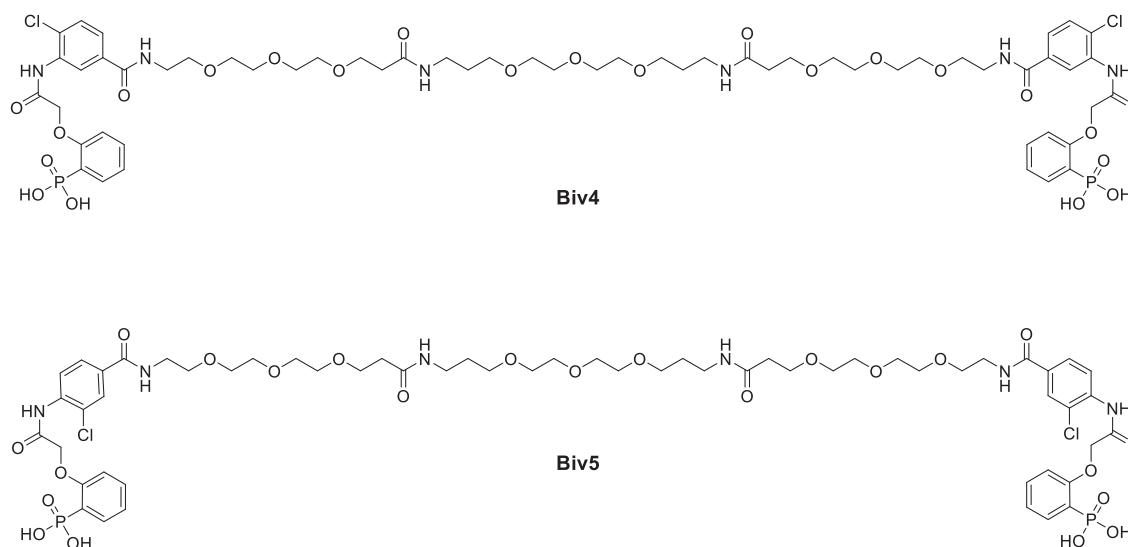


Abbildung 45 Strukturen der bivalenten Inhibitoren **Biv4** und **Biv5**.

Die Strukturen von **Biv4** und **Biv5** entsprechen dabei dem Grundgerüst von **Biv3** (d.h. eine möglichst lange PEG-Kette). Allerdings hat **Biv4** im Gegensatz zu **Biv3** einen Chlorsubstituenten am zweiten Ring, der sich in *ortho*-Position zur Amidbindung befindet. Die Struktur von **Biv5** beinhaltet demgegenüber sogar zwei Modifikationen. Zum einen befindet sich auch hier ein Chlorsubstituent am zweiten Ring in *ortho*-Position zum Amid, zum anderen befindet sich der Linker nicht mehr in *meta*-, sondern in *para*-Stellung zum Amid.

4.9. Synthese von **Biv4**

Um am zweiten Ring einen Chlorsubstituenten einzuführen, wurde bereits zu Beginn der Synthese ein entsprechendes Chlorderivat des Methyl-3-aminobenzoats verwendet.

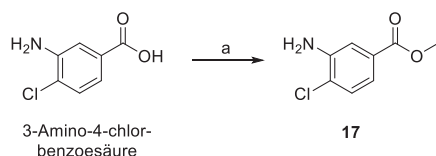


Abbildung 46 Synthese der chlorierten Verbindung 17. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) SOCl_2 , MeOH, $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 18 h.

Dazu wurde 3-Amino-4-chlorbenzoesäure kommerziell erworben und, um Nebenreaktionen der freien Säure zu verhindern, die Carboxylgruppe mithilfe von Thionylchlorid in Methanol als Methyl ester geschützt (Abbildung 46). Die Verbindung **17** konnte nach säulenchromatographischer Aufreinigung in quantitativer Ausbeute als hellbrauner Feststoff erhalten werden.

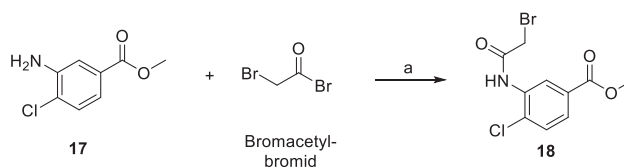


Abbildung 47 Synthese der Verbindung 18. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) Et_3N , DCM, $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 3 h.

Anschließend wurde **17** unter basischen Bedingungen mit Bromoacetyl bromid unter Ausbildung einer Amidbindung umgesetzt (Abbildung 47). Auch Verbindung **18** konnte nach säulenchromatographischer Aufreinigung in guter Ausbeute (71%) erhalten werden.

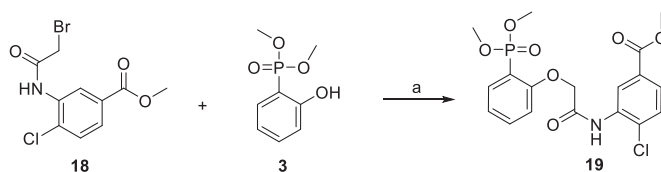


Abbildung 48 Umsetzung der Verbindungen 18 und 3 zum Phosphophenoether 19. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) K_2CO_3 , Aceton, RT, 3 h.

Im nächsten Schritt fand die Reaktion zum chlorierten Phosphophenoether-Derivat **19** statt (Abbildung 48). Hierzu wurde **18** mit dem Phosphonat **3** unter Zugabe von Kaliumcarbonat umgesetzt. Verbindung **19** lag nach säulenchromatographischer Aufreinigung mit einer Ausbeute von 46% vor.

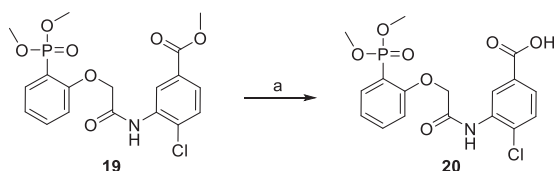


Abbildung 49 Verseifung von Verbindung 19. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) LiOH, THF / H₂O (1:1), 40 °C, 3 h.

Im Anschluss wurde der Methylester mit LiOH zur freien Carbonsäure verseift. Die Verseifung verlief mit einer Ausbeute von 85 % und lieferte Verbindung **20** als gelben Feststoff. Die weitere Synthese verlief analog zur Synthese von **Biv3** und ist in Abbildung 50 dargestellt.

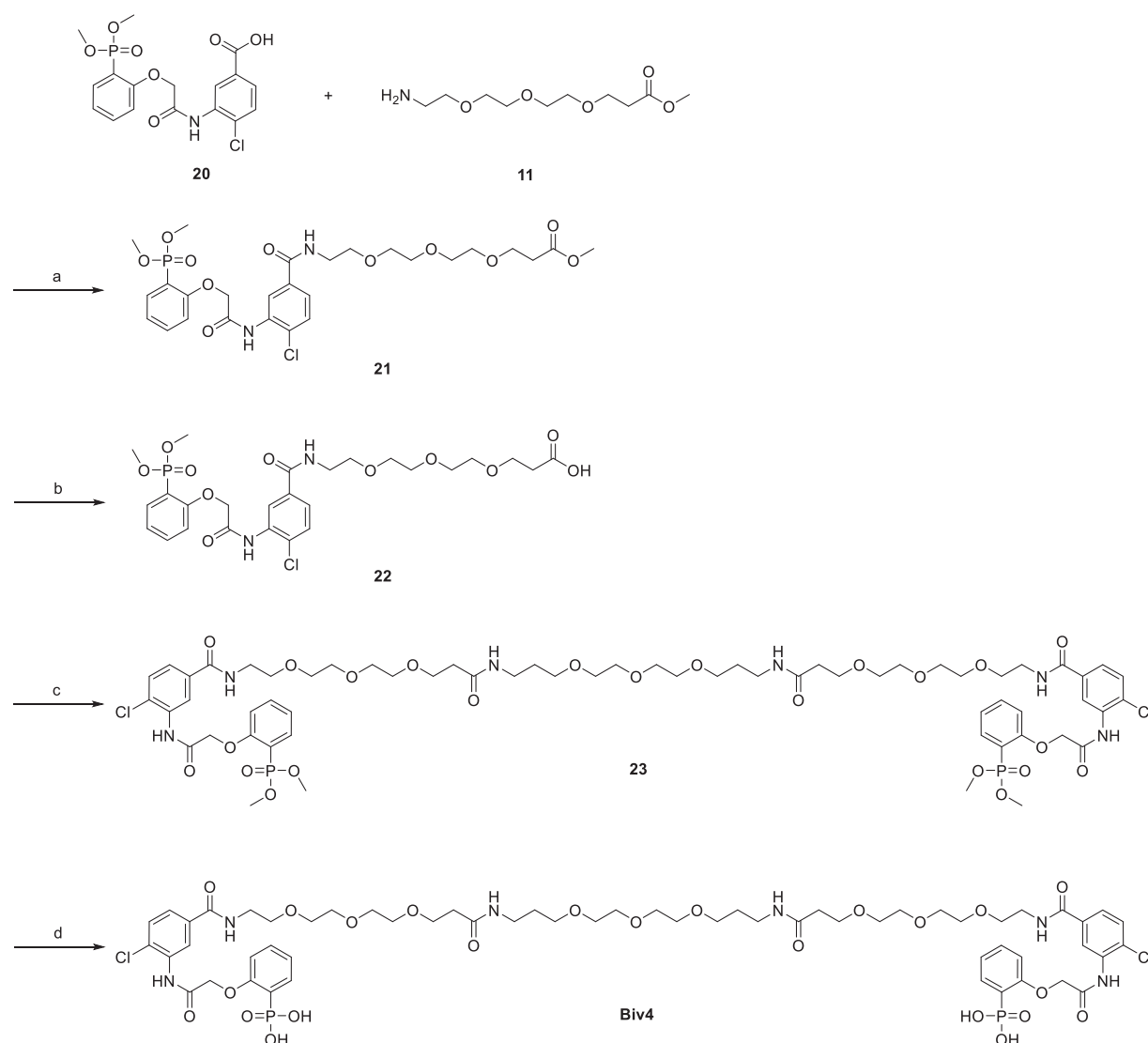


Abbildung 50 Schematische Darstellung der Synthese von Biv4. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) EDC, HOBt, DIPEA, DCM, RT, 24 h. (b) LiOH, THF / H₂O (1:1), 40 °C, 15 min. (c) 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin, EDC, HOBt, DIPEA, DCM, RT, 48 h. (d) 1. TMSBr, DCM, RT, 30 min. 2. MeOH / H₂O (3:1), RT, 30 min.

Im ersten Schritt der weiteren Synthese erfolgte die Kupplung des einfachen PEG-Linkers **11** via Amidbindung und unter Einsatz von HOBt, EDC und DIPEA an den Phosphophenoylether **20**. Nach Verseifung von **21** mit LiOH konnte Verbindung **22** als freie Säure erhalten und mit 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin unter Verwendung von Kupplungsreagenzien umgesetzt werden. Das daraus entstandene Produkt **23** konnte schließlich durch Abspaltung der Methylgruppen mit TMSBr zu **Biv4** umgesetzt werden.

4.10. Synthese von Biv5

Auch bei der Synthese von **Biv5** wurde schon zu Beginn ein Chlorderivat des Methyl-3-aminobenzoats eingesetzt, um einen Chlor-Substituenten am zweiten Ring einzuführen. Dabei befand sich die Carboxylgruppe in *para*-Stellung zur Aminogruppe.

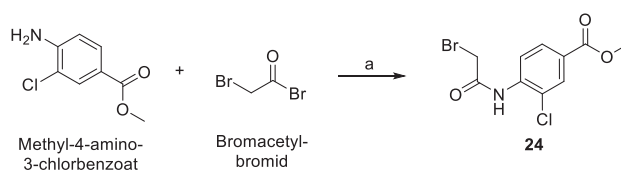


Abbildung 51 Synthese der chlorierten Verbindung 24. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) Et₃N, DCM, 0 → RT, 3 h.

Im ersten Schritt der Synthese wurde Methyl-4-amino-3-chlorbenzoat zusammen mit Bromoacetyl bromid unter Verwendung von Triethylamin als Base zu **24** umgesetzt (Abbildung 51). Die Synthese lieferte Verbindung **24** als braunen Feststoff mit einer Ausbeute von 89 %.

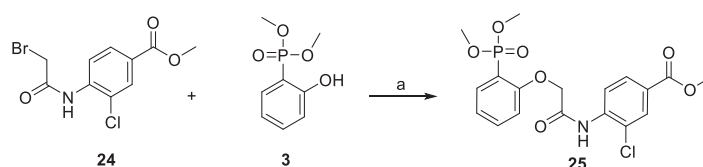


Abbildung 52 Substitutionsreaktion zum chlorierten Phosphophenoylether 25. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) K₂CO₃, Aceton, RT, 3 h.

Im Anschluss konnte erfolgreich die Umsetzung von **24** mit dem Phosphonat **3** unter basischen Bedingungen zum Phosphophenoylether-Derivat **25** durchgeführt werden (Abbildung 52).

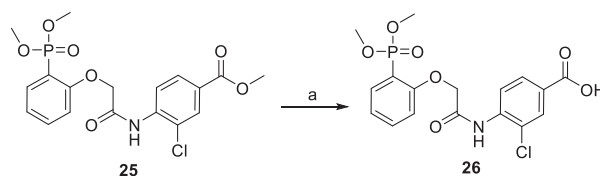


Abbildung 53 Verseifung von **25** zur freien Säure **26**. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) LiOH, THF / H₂O (1:1), 40 °C, 3 h.

Nach Verseifung des Methylresters mit Lithiumhydroxid zur freien Säure (Abbildung 53) wurde analog zu **Biv3** die weitere Synthese zu **Biv5** durchgeführt (Abbildung 54).

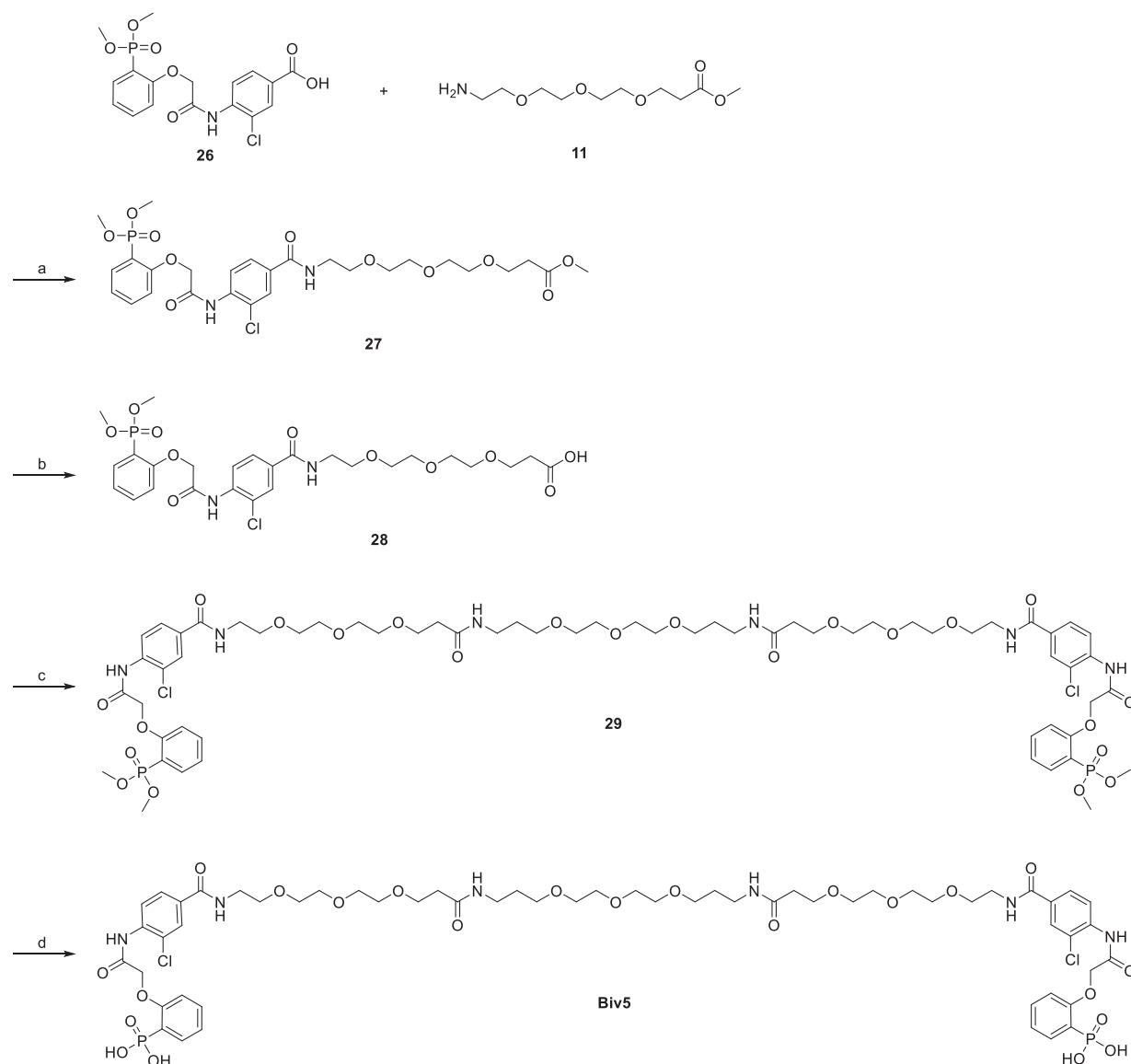


Abbildung 54 Schematische Darstellung der Synthese von **Biv5**. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) EDC, HOBT, DIPEA, DCM, RT, 24 h. (b) LiOH, THF / H₂O (1:1), 40 °C, 15 min. (c) 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin, EDC, HOBT, DIPEA, DCM, RT, 48 h. (d) 1. TMSBr, DCM, RT, 30 min. 2. MeOH / H₂O (3:1), RT, 30 min.

In der weiteren Synthese wurde hierzu zunächst der Phosphophenoylether **26** mit dem PEG-Linker **11** unter Ausbildung einer Amidbindung zu Verbindung **27** umgesetzt.

Nach Verseifung von **27** konnte über die freie Säure von Verbindung **28** mithilfe von Kupplungsreagenzien und 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin Verbindung **29** synthetisiert werden. Nach Abspaltung der Methylgruppen mit TMSBr und säulenchromatographischer Reinigung konnte **Biv5** erhalten werden.

4.11. Biochemische Evaluation von Biv4 und Biv5

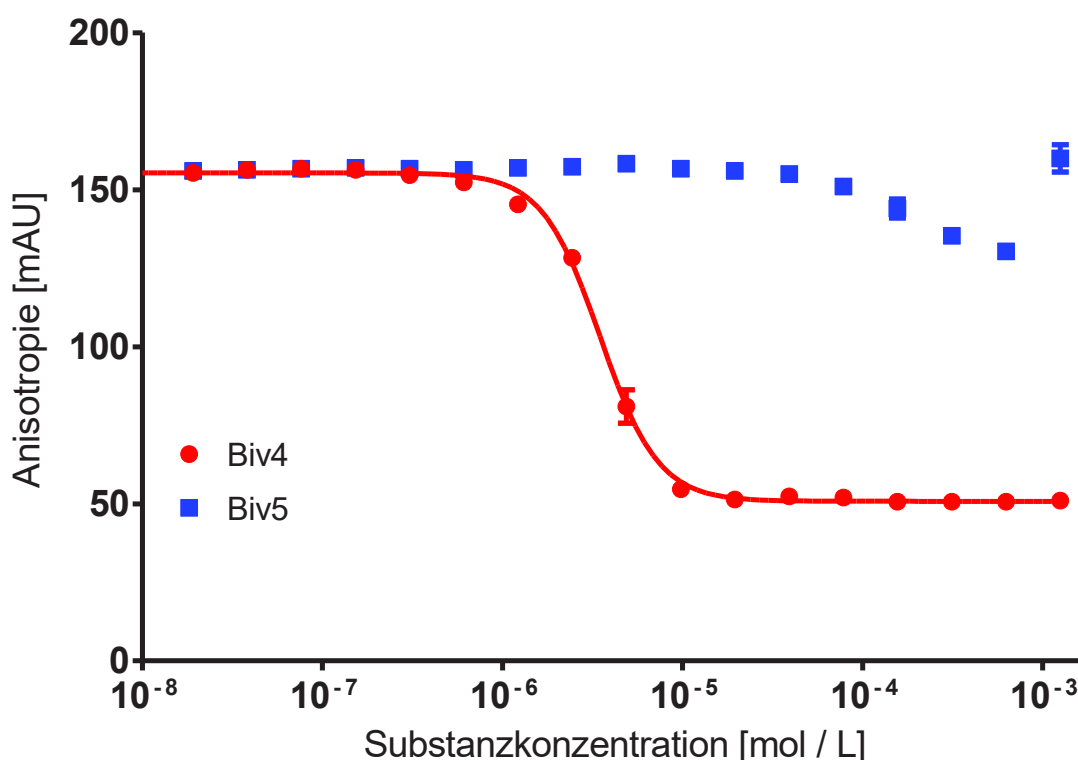


Abbildung 55 Ergebnisse der FP-Messungen für Biv4 und Biv5.

Die biochemische Analyse von **Biv4** und **Biv5** erfolgte mittels FP-Messung und wurde ebenfalls durch die Gruppe von Prof. Ottmann in Eindhoven durchgeführt. Für die Messung wurde 14-3-3 γ mit einer Konzentration von 10 μ M verwendet. Ein phosphoryliertes Modellpeptid, welches vom 14-3-3-Bindungspartner ERaC abgeleitet wurde, wurde mit dem Fluorophor FAM markiert und mit einer Konzentration von 50 μ M eingesetzt. In Abbildung 55 sind die Ergebnisse aus den FP-Messungen für **Biv4** und **Biv5** dargestellt. Sie zeigen für **Biv4** eine deutliche Verringerung der Anisotropie und somit eine gute Hemmung an. Der dazugehörige IC₅₀ Wert ist 3.55 μ M.

Im Gegensatz dazu zeigt die Messung von **Biv5** fast keine Veränderung der Anisotropie. Das bedeutet, dass durch **Biv5** keine Verdrängung und somit keine Inhibition stattfindet.

Der Vergleich zwischen den Ergebnissen der FP-Messungen für **Biv4** und **Biv5** zeigt, dass durch die Veränderung der Position des Linkers ein erheblicher Einfluss auf die Inhibition auftritt. Das Experiment verdeutlicht, dass ein Linker in *meta*-Position zum Amid essentiell für eine Inhibition ist, währenddessen ein Linker in *para*-Stellung die Hemmung fast komplett aufhebt

Die beiden Verbindungen **Biv3** und **Biv4** unterscheiden sich in ihrem strukturellen Aufbau lediglich an einer Position. **Biv4** besitzt im Gegensatz zu **Biv3** am zweiten aromatischen Ring der Phosphophenoether-Einheit einen Chlor-Substituenten. Da die FP-Messungen der beiden Verbindungen mit unterschiedlichen Peptiden durchgeführt wurden, ist es jedoch leider nicht möglich, die Ergebnisse der chlorierten und nicht-chlorierten Verbindungen direkt miteinander zu vergleichen, um Rückschlüsse auf den Einfluss des Chlor-Substituenten zu ziehen.

4.12. Synthese von monovalenten Verbindungen

Um den Effekt der PEG-Kette auf die Inhibition besser zu untersuchen, sollten in einem nächsten Schritt strukturell-ähnliche monovalente Verbindungen hergestellt werden. Da aus den Kristallstrukturen ersichtlich ist, dass die Moleküle **Biv1** bis **Biv3** einen Bindungsmodus einnehmen, in welchem Wechselwirkungen zwischen einer Lysinseitenkette an der Oberfläche des Proteins und der PEG-Kette auftreten. Diese Wechselwirkungen lassen eine Kronenether-artige Interaktion zwischen den Sauerstoffatomen der PEG-Kette und der Aminogruppe in der Seitenkette der Aminosäure vermuten. Aus diesem Grund wurden vier verschiedene monovalente Verbindungen synthetisiert, die Aufschluss über den Effekt der PEG-Kette geben sollen.

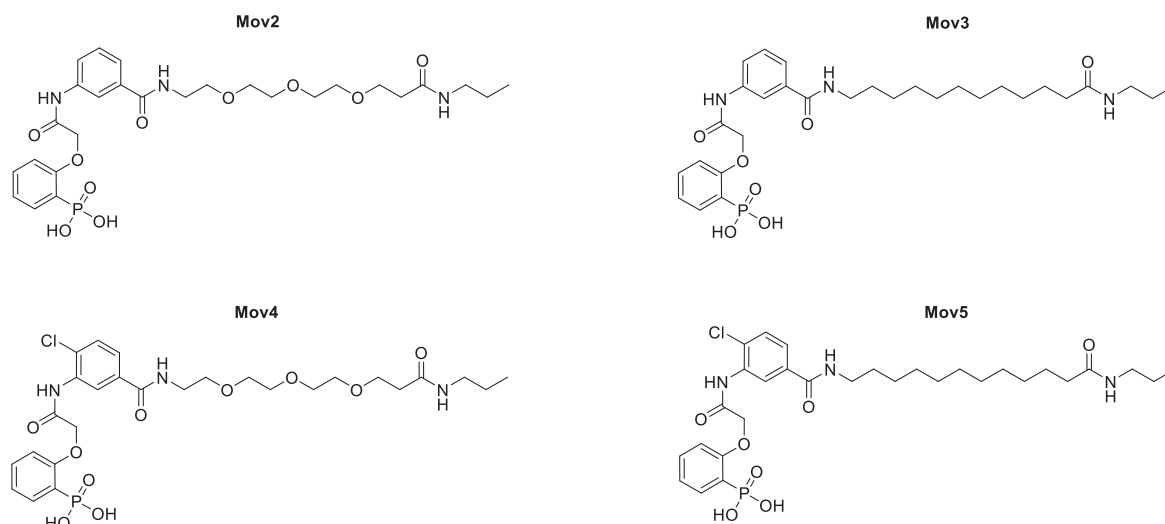


Abbildung 56 Struktureller Aufbau der monovalenten Verbindungen **Mov2** bis **Mov5**.

Die Verbindungen besitzen alle die Phosphophenoxy-Einheit, welche für den „korrekten Sitz“ in der 14-3-3-Bindungstasche dienen soll. Zwei der Verbindungen (**Mov2** und **Mov4**) sind über die Carbonsäureeinheit mit einer einfachen PEG-Kette verbunden, während die anderen zwei Derivate (**Mov3** und **Mov5**) einfache Alkylketten tragen. **Mov4** und **Mov5** haben zudem einen Chlorsubstituenten am zweiten Ring, der sich in *ortho*-Stellung zum Amid befindet.

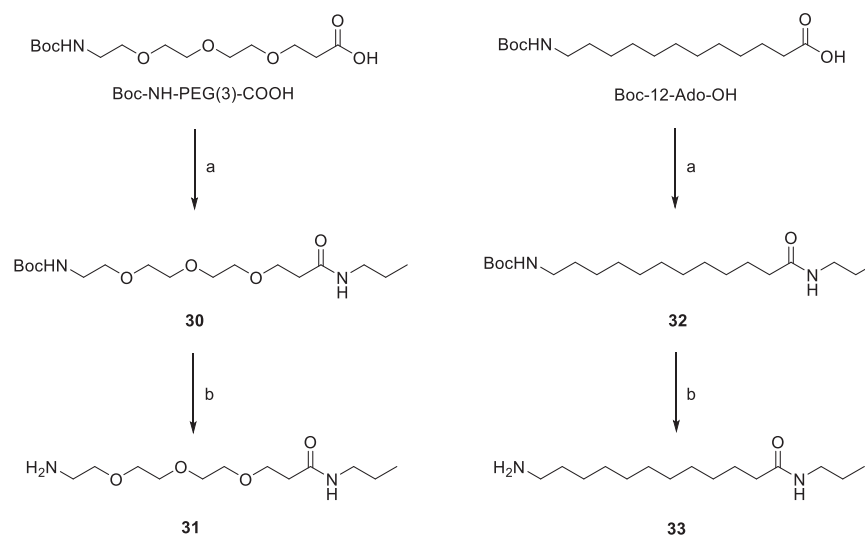


Abbildung 57 Synthese der Linker **31** und **33**. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) Propylamin, EDC, HOBt, DIPEA, DCM, RT, 24 h. (b) HCl (4 M in Dioxan), RT, 3 h.

Für die Synthese der monovalenten Moleküle wurden zunächst der PEG- bzw. der Alkylketten-Baustein synthetisiert (Abbildung 57). Dazu wurden die Boc-geschützte Amino-PEG(3)-Säure und die ebenfalls Boc-geschützte 12-Aminododecansäure unter

Verwendung von Kupplungsreagenzien mit Propylamin umgesetzt. Im Anschluss erfolgte die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe unter sauren Bedingungen.

Die Synthese der monovalenten Verbindungen erfolgte dann nach einem gemeinsamen Syntheschema (Abbildung 58).

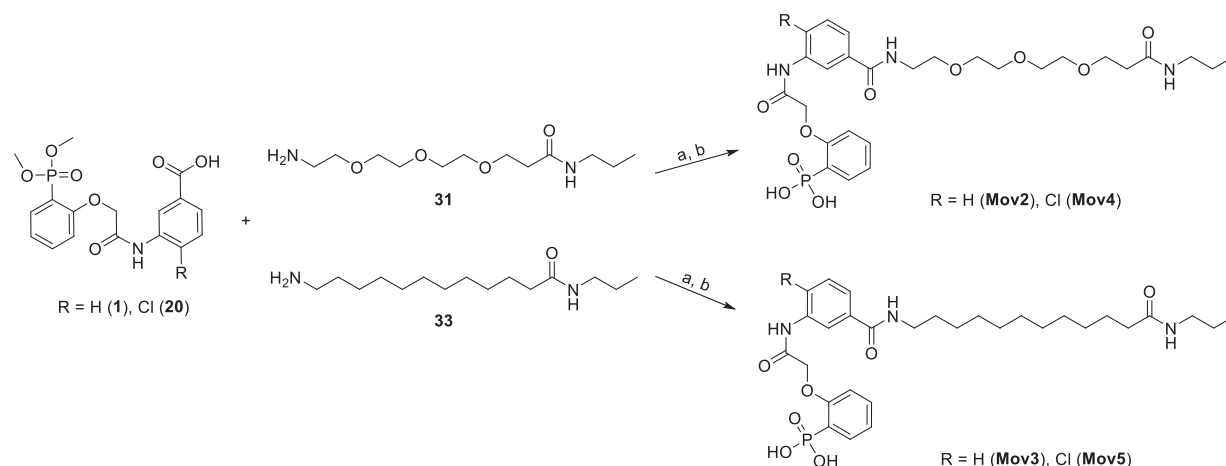


Abbildung 58 Syntheschema zur Darstellung der monovalenten Verbindungen. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) EDC, HOBt, DIPEA, DCM, RT, 24 h. (b) 1. TMSBr, DCM, RT, 30 min. 2. MeOH / H₂O (3:1), RT, 30 min.

Die Kupplung des Phosphophenoylether-Bausteins an die jeweilige Kette fand unter Bildung einer Amidbindung statt. Die Entschützung der Hydroxygruppen am Phosphor wurde mit TMSBr durchgeführt und lieferte die vier monovalenten Verbindungen **Mov2**, **Mov3**, **Mov4** und **Mov5** in guten bis moderaten Ausbeuten.

4.13. Biochemische Evaluation der Mov-Verbindungen

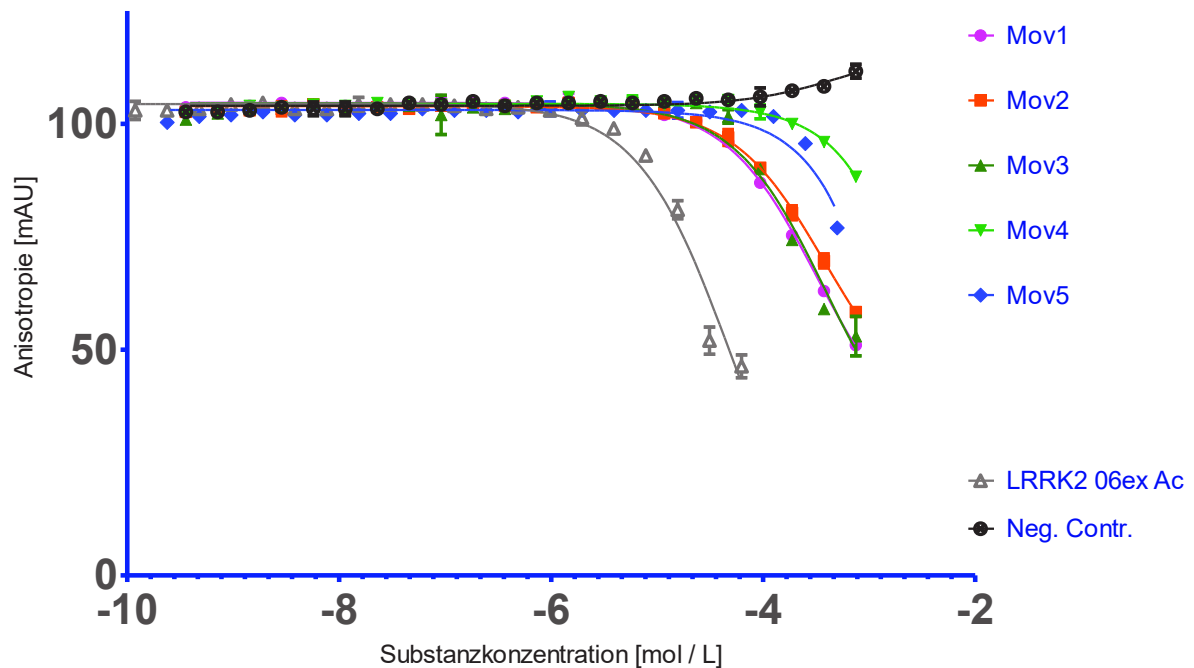


Abbildung 59 Ergebnisse aus den FP-Messungen der monovalenten Verbindungen.

Die biochemische Evaluation der monovalenten Verbindungen **Mov2**, **Mov3**, **Mov4** und **Mov5** fand mittels FP-Messung statt. Die Messungen wurden ebenfalls von der Arbeitsgruppe von Prof. Ottmann an der Universität Eindhoven durchgeführt. Für die Messungen wurde 14-3-3 γ in einer Konzentration von 10 μ M eingesetzt. Für die Messung wurde zunächst ein Gleichgewicht zwischen dem Protein und dem Peptid LRRK2 pS935-FITC mit einer Konzentration von 100 nM eingestellt. Als positive Kontrolle wurde das Peptid LRRK2 06ex Ac ohne Fluoreszenzmarker genutzt. Dabei korreliert, wie auch bei den vorherigen Messungen, eine Reduktion der Anisotropie mit einer Bindung. Die Messungen zeigen, dass alle monovalenten Verbindungen einen Rückgang der Anisotropie induzieren. Dabei weisen die Verbindungen **Mov1**, **Mov2** und **Mov3** untereinander vergleichbare Werte auf. Im Gegensatz dazu ist die Veränderung für die Verbindungen **Mov4** und **Mov5** wesentlich geringer.

Aus den Ergebnissen der FP-Messungen lässt sich daher schließen, dass in allen Fällen eine Verdrängung des Peptids aus der Bindungstasche des Proteins erfolgt. Allerdings ist die Affinität der Verbindungen nur sehr gering, wie ein Vergleich zur positiven Kontrolle zeigt. Während diese positive Kontrolle schon bei geringen Konzentrationen einen Effekt auf die Anisotropie hat, tritt ein Effekt bei den

monovalenten Verbindungen erst bei höheren Konzentrationen auf. Zudem wird deutlich, dass durch die strukturellen Unterschiede zwischen **Mov2/Mov4** und **Mov3/Mov5** kein Unterschied in der Wechselwirkung mit dem 14-3-3-Protein zu beobachten ist. Die Verbindungen **Mov2** und **Mov4** enthalten beide eine PEG-Kette, während **Mov3** und **Mov5** eine Alkylkette beinhalten. Das Experiment zeigt, dass **Mov2** und **Mov4** keine effektivere Verdrängung des gebundenen Peptids bewirken als **Mov3** und **Mov5**. Daher lässt sich in diesen Messungen kein positiver Effekt der PEG-Kette im Vergleich zur Alkylkette auf die 14-3-3-Bindung nachweisen. Dies könnte einerseits daran liegen, dass bei diesen Derivaten entweder keine „Lysin-Kronenether“-Bindung auftritt oder diese, trotz der Präsenz in den kristallographischen Studien, bei den Lösungsmessungen keine Rolle spielt.

Die FP-Messungen erlaubten weiterhin, den Einfluss der Chlor-Modifizierung auf die Bindungsaffinität näher zu bestimmen. Die Verbindungen **Mov4** und **Mov5** tragen im Vergleich zu **Mov2** und **Mov3** einen Chlor-Substituenten am zweiten aromatischen Ring der Phosphophenoether-Einheit. Anhand der FP-Messungen ist deutlich zu erkennen, dass die Einbringung des Chlor-Substituenten nicht die erwartete Steigerung der Hemmung, sondern im Gegenteil eine Reduktion der Inhibition bewirkt. Die Ergebnisse der Ottmann *et al.*-Studie, welche einen positiven Effekt einer *ortho*-Chlor-Substitution auf die Bindungsaffinität zeigten, lassen sich also nicht direkt auf strukturell-komplexere Phosphophenoether-Derivate übertragen.

4.14. Kristallstruktur von Mov2

Auch für die Verbindung **Mov2** war es den Mitarbeitern der AG Ottmann möglich, eine Kristallstruktur im Komplex mit dem 14-3-3-Protein aufzunehmen (Abbildung 60).

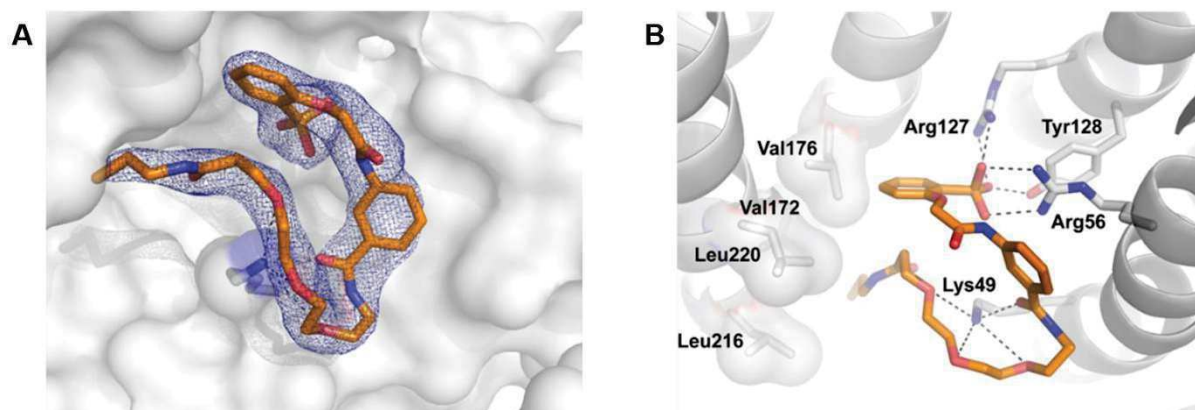


Abbildung 60 Kristallstruktur der Verbindung Mov2. A) Die Röntgenstrukturanalyse eines **Mov2** : 14-3-3 ζ -Komplexes zeigt die Elektronendichte für das gesamte Molekül. B) Detaillierter Überblick über die molekularen Wechselwirkungen, die der Bindung von **Mov2** an 14-3-3 ζ zugrunde liegen.

In der Kristallstruktur der Verbindung **Mov2** im Komplex mit 14-3-3 ζ ist in Abbildung 60A die Elektronendichte zu sehen. Hier ist eindeutig erkennbar, dass das Phosphophenoether-Bindemotiv, wie auch bereits in den Studien von Ottmann *et al.* gezeigt wurde und auch während dieser Arbeit anhand der Kristallstrukturen von **Biv1** bis **Biv3** zu sehen ist, mit der Bindungstasche des Proteins interagiert. Des Weiteren ist zu erkennen, dass auch hier die PEG-Kette eine Drehung vollzieht und zurück in die Bindungstasche zeigt. In Abbildung 60B ist jedoch zu sehen, dass die PEG-Kette der Verbindung **Mov2** wie bei den Verbindungen **Biv1** bis **Biv3** ebenfalls das Lys49 koordiniert. Diese entropisch ungünstige Konformation ist vermutlich ebenso auf die kryogenen Bedingungen während der Röntgenstrukturanalyse zurückzuführen und spiegelt somit nicht die tatsächliche Konformation in Lösung wider.

4.15. Synthese der Mal-Verbindungen

Ein weiteres Thema dieser Arbeit ist die Synthese von Isoform-spezifischen 14-3-3-Inhibitoren. Da die unterschiedlichen 14-3-3-Isoformen allerdings in ihren Bindungstaschen weitestgehend identisch sind, ist dies eine große Herausforderung für das Design der Verbindungen. Jedoch unterscheidet sich die Bindungstasche in der 14-3-3 σ -Isoform von allen anderen Isoformen durch ein Cystein an der Proteinoberfläche. Die Thiolgruppe der Seitenkette könnte somit durch kovalent-wirkende Inhibitoren adressiert werden, wodurch eine Isoform-Selektivität möglich sein könnte.

Daher sollten Phosphophenoether-Derivate mit einer Cystein-spezifischen, bioreaktiven Gruppe dargestellt werden. Eine solche bioreaktive Gruppe ist die Maleimid-Einheit, welche mittels eines unterschiedlichen-langen Linkers mit der Phosphophenoether-Bindegruppe verbunden wurde. Aus diesem Moleküldesign ergaben sich drei mögliche Derivate **Mal1** – **Mal3** als Zielstrukturen für eine Synthese (Abbildung 61).

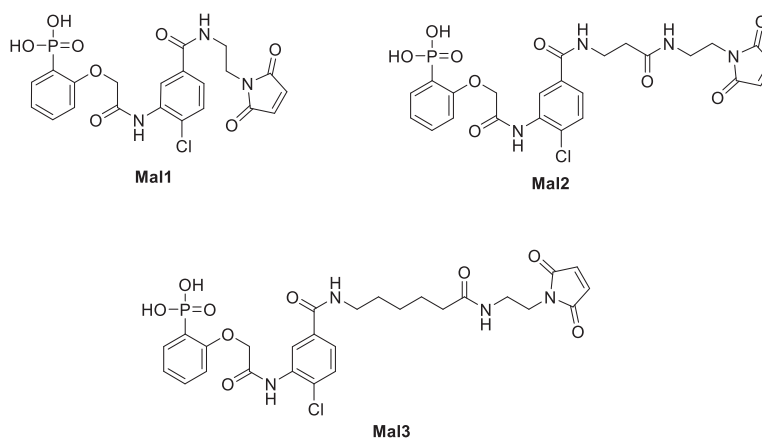


Abbildung 61 Strukturen der Maleimid-Verbindungen **Mal1**, **Mal2** und **Mal3**.

Das zur Darstellung von Verbindung **Mal1** benötigte Maleimid kann kommerziell erworben werden. Für die Synthese von **Mal2** und **Mal3** hingegen wurden zunächst die Linker mit dem Maleimid-Rest synthetisiert (Abbildung 62).

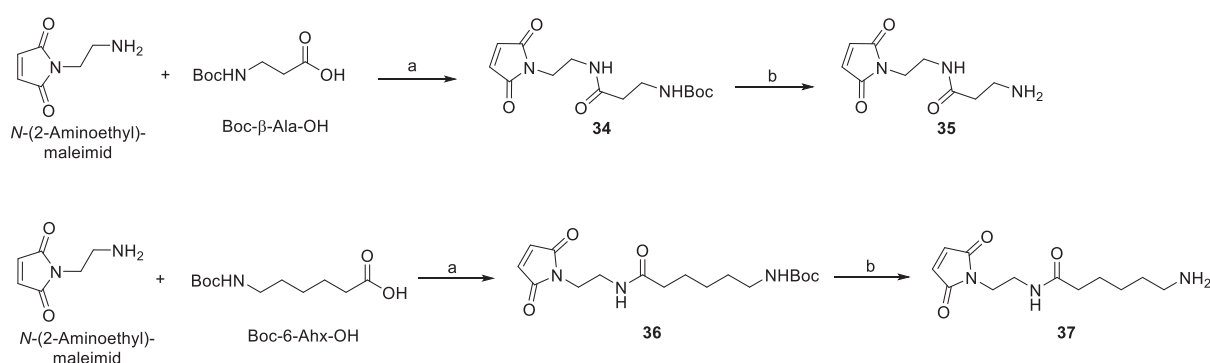


Abbildung 62 Syntheschema zur Herstellung der Maleimid-Linker **35** und **37**. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) EDC, HOBT, DIPEA, DCM, RT, 24 h. (b) HCl (4M in Dioxan), RT, 3 h.

Dazu wurde Boc-geschützte 3-Aminopropionsäure bzw. die ebenfalls Boc-geschützte 6-Aminohexansäure jeweils mit dem HCl-Salz von 1-(2-Aminoethyl)maleimid unter Bildung eines Amids gekuppelt. Anschließend erfolgte die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mithilfe von HCl in Dioxan.

Die Synthese der drei Maleimid-Verbindungen wurde nach dem bereits vorher etablierten Syntheseweg durchgeführt (Abbildung 63).

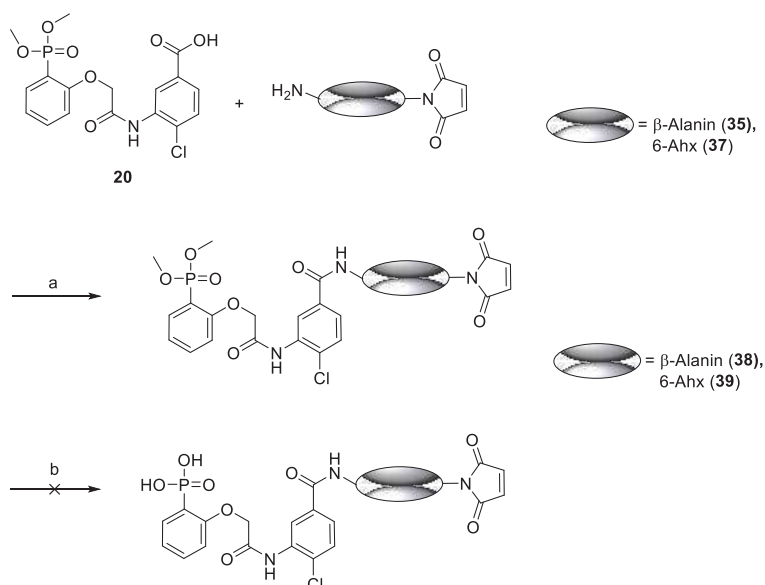


Abbildung 63 Schematische Darstellung der Synthese der Maleimid-Verbindungen. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) EDC, HOBt, DIPEA, DCM, RT, 48 h. (b) 1. TMSBr, DCM, RT, 30 min. 2. MeOH / H₂O (3:1), RT, 30 min.

Die Verknüpfung zwischen Phosphophenoylether-Einheit und Linker erfolgte somit mittels Amidbildung über die freie Säure des Phosphophenoylethers und des freien Amins des Linkers. Nach erfolgreicher Kupplung wurde dann die Phosphonatgruppe mit TMSBr entschützt.

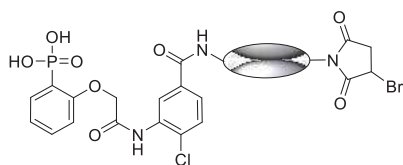


Abbildung 64 Allgemeine Struktur der bromierten Maleimid-Verbindungen.

Diese Reaktion lieferte allerdings ein modifiziertes Produkt (Abbildung 64). Durch die Zugabe von TMSBr fand eine Addition an die Doppelbindung des Maleimids statt, wodurch die Verbindungen **Mal1_Br**, **Mal2_Br** und **Mal3_Br** erhalten wurden. Dennoch konnten die entstandenen Verbindungen für die Untersuchung der Spezifität genutzt werden, da auch diese α -Bromoamidderivate gegenüber Cysteinen reaktiv sind und daher eine Bindung zur Thiol-Gruppe des Cysteins eingehen können.

4.16. Biochemische Evaluation der Mal-Verbindungen

Die biochemische Evaluation der Maleimid-Verbindungen erfolgte mittels FP-Messung in der Arbeitsgruppe Ottmann. Es wurde sowohl eine FP-Messung mit der 14-3-3 σ als auch mit der 14-3-3 ζ -Isoform durchgeführt. Bis auf **Mal3_Br** konnte für keine der Maleimid-Verbindungen eine Interaktion mit 14-3-3 σ nachgewiesen werden. Diese Tatsache führt zu der Annahme, dass die Linkerlängen der Verbindungen **Mal1_Br** und **Mal2_Br** möglicherweise nicht ausreichend waren, um die Thiol-Gruppe des Cysteins zu erreichen. Deshalb ist im Folgenden lediglich das Ergebnis der FP-Messungen mit **Mal3_Br** abgebildet.

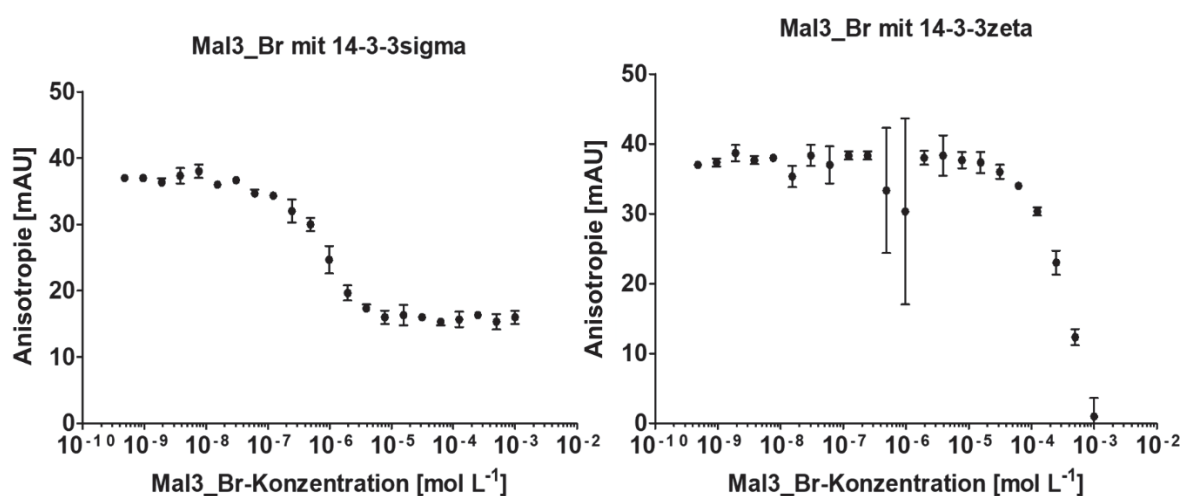


Abbildung 65 Ergebnisse der FP-Messungen der Maleimid-Verbindung **Mal3_Br** mit 14-3-3 σ (links) und 14-3-3 ζ (rechts).

Der Graph der FP-Messung von **Mal3_Br** mit 14-3-3 σ zeigt einen klaren Abfall der Anisotropie bis zur Einstellung eines neuen Gleichgewichts an. Daraus wird deutlich, dass eine Wechselwirkung zwischen 14-3-3 σ und **Mal3_Br** stattfindet. Im Vergleich dazu ist im Graphen der FP-Messung mit **Mal3_Br** und 14-3-3 ζ kein neues Gleichgewicht erkennbar. Auch hier ist zwar eine Veränderung der Anisotropie zu sehen, allerdings fällt diese bei höheren Konzentrationen abrupt auf einen Wert von 0 ab. Dieses Phänomen lässt sich eventuell mit einer Aggregation der Moleküle erklären. Der hier-beobachtete Effekt wäre somit ein Artefakt der Messung und nicht der spezifischen Interaktion.

Daher lassen die FP-Messungen vermuten, dass die Unterschiede der Ergebnisse auf die Möglichkeit der Verbindung **Mal3_Br** mit der Thiol-Gruppe des Cysteins an der Oberfläche des Proteins zu interagieren, zurückzuführen sind. Zudem kann

angenommen werden, dass die Interaktion auf einer kovalenten Bindung basiert, da diese bei 14-3-3 ζ nicht zu beobachten ist.

4.17. Synthese von Succinimid-Verbindungen

Um diesen Effekt besser untersuchen zu können, sollten als Kontrollsubstanzen zusätzlich zu den Maleimid-Verbindungen Succinimid-Verbindungen hergestellt werden. Diese Derivate haben den gleichen strukturellen Aufbau wie das Bromomaleimid-Derivat **Mal3_Br**, können jedoch im Gegensatz zu diesen keine kovalente Bindung ausbilden (Abbildung 66). Dabei wurde auch eine Succinimid-Verbindung ohne Chlor-Substituent synthetisiert, um die beiden Verbindungen miteinander vergleichen und somit einen eventuellen Effekt des Chlor-Substituenten untersuchen zu können.

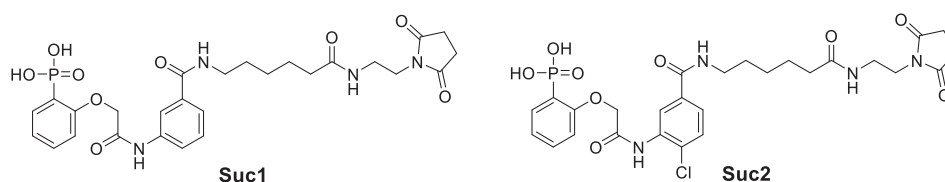


Abbildung 66 Strukturen der Succinimid-Verbindungen Suc1 und Suc2.

Der erste Schritt in der Synthese der Succinimid-Verbindungen war die Herstellung des Linkers mit dem Succinimid-Rest (Abbildung 67). Dazu wurde 6-(Boc-amino)hexansäure mit 1-(2-Aminoethyl)-pyrrolidin-2,5-dion unter Einsatz von HOBT und EDC als Kupplungsreagenzien zu Verbindung **40** umgesetzt. Anschließend wurde unter sauren Bedingungen die Boc-Schutzgruppe abgespalten, um Verbindung **41** zu erhalten.

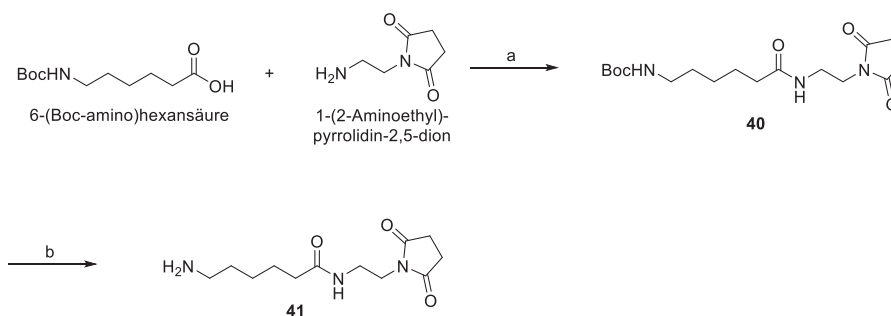


Abbildung 67 Synthese des Succinimid-Linkers **41**. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) EDC, HOBT, DIPEA, DCM, RT, 48 h. (b) HCl (4M in Dioxan), RT, 3 h.

Der weitere Syntheseweg entspricht dem von **Mal3_Br** und ist in Abbildung 68 schematisch abgebildet. Es fand zunächst eine Kupplung zwischen der Phosphophenoylether-Einheit (**1** oder **20**) und der Succinimid-Verbindung **41** unter Verwendung von HOBT und EDC als Kupplungsreagenzien statt. Anschließend erfolgte die Abspaltung der Methylgruppe mit TMSBr, so dass nach säulenchromatographischer Reinigung **Suc1** und **Suc2** erhalten werden konnten.

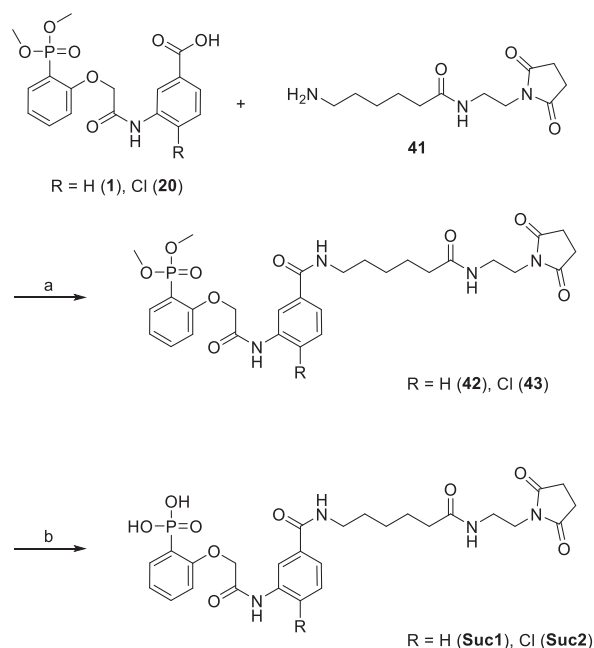


Abbildung 68 Allgemeines Syntheschema zur Herstellung der Succinimid-Verbindungen. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) EDC, HOBT, DIPEA, DCM, RT, 48 h. (b) 1. TMSBr, DCM, RT, 30 min. 2. MeOH / H₂O (3:1), RT, 30 min.

4.18. Biochemische Evaluation der Suc-Verbindungen

Die biochemische Evaluation der Suc-Verbindungen erfolgte, wie auch für die Maleimid-Verbindungen, via FP-Messung mit 14-3-3 σ in der Arbeitsgruppe Ottmann. Das Ergebnis ist im Folgenden dargestellt:

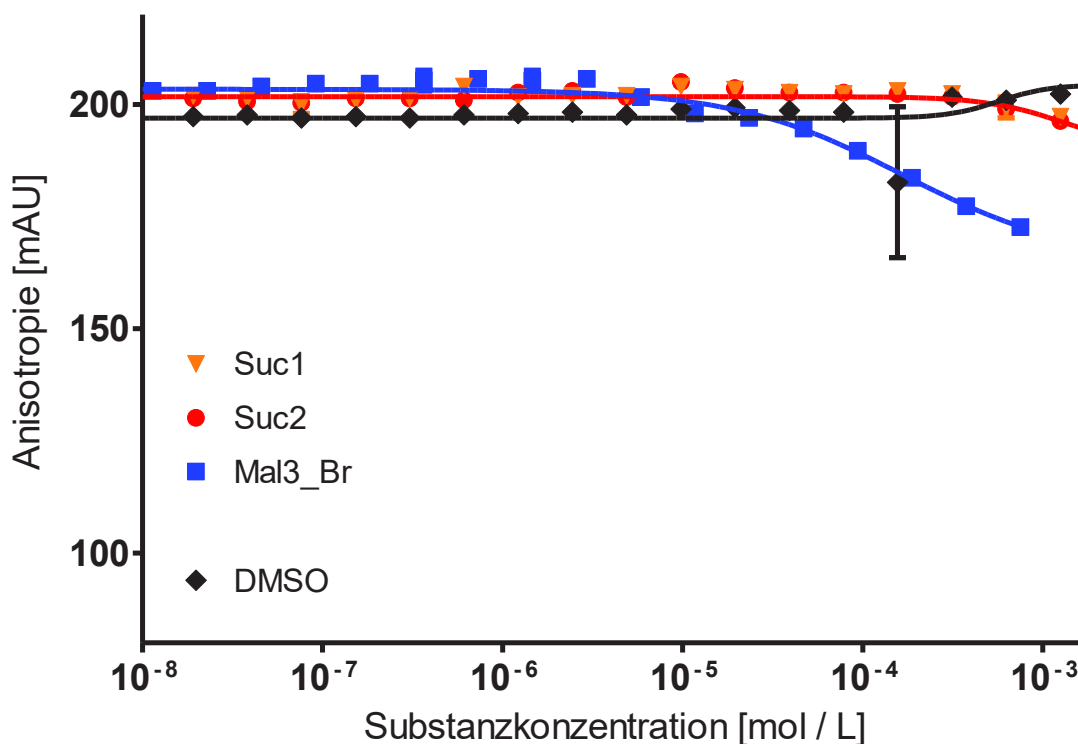


Abbildung 69 Ergebnis der FP-Messung mit den Verbindungen Suc1 und Suc2.

Aus den Graphen in Abbildung 69 ist ersichtlich, dass der Wert der Anisotropie mit steigender Konzentration der Succinimid-Verbindungen **Suc1** und **Suc2** kaum eine Veränderung erkennen lässt. Demzufolge ist eine Interaktion der Verbindungen mit der Thiol-Gruppe des Cysteins und folglich mit der Oberfläche des 14-3-3 σ Proteins auszuschließen. Demgegenüber hemmt die Maleimid-Verbindung **Mal3_Br** stärker. Allerdings trat bei dieser Messung eine schwächere Hemmung als im vorherigen Experiment auf. Die molekulare Ursache für diesen unterschiedlichen Effekt ist bisher noch unbekannt, könnte aber zum Beispiel an leicht veränderten Assaybedingungen liegen.

Daher sind im Moment noch weitere Untersuchungen zum kovalenten Bindungsmodus, z. B. in der Form von Kristallstrukturmessungen notwendig, die allerdings im zeitlich-begrenzten Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden konnten. Versuche in diese Richtung werden zurzeit in der AG Ottmann an der Universität Eindhoven durchgeführt. Diese werden dann einen besseren Aufschluss über eine mögliche kovalente Modifikation des Cysteins liefern können.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten supramolekular-wirkende 14-3-3-Inhibitoren entwickelt und untersucht werden. Da 14-3-3-Proteine funktionale Dimere bilden, sollten hierzu bivalente Liganden synthetisiert werden, welche zeitgleich beide Bindungstaschen besetzen können und somit affiner als monovalente Inhibitoren binden sollten. Zur Bindung an die 14-3-3-Phosphoserin/-threonin-Bindungstasche sollte dabei das früher etablierte Phosphophenoether-Bindungsmotiv verwendet werden.

Innerhalb dieser Arbeit konnten erfolgreich fünf verschiedene, potentiell bivalent-bindende Phosphophenoether-Derivate (**Biv1** bis **Biv5**) hergestellt und untersucht werden. Für alle synthetisierten bivalenten Moleküle konnte dann mittels FP-Messung eine Wechselwirkung mit dem 14-3-3-Protein nachgewiesen werden. Jedoch zeigten diese großen Unterschiede in ihrer Affinität. Während zum Beispiel **Biv1** einen IC_{50} -Wert $>400 \mu\text{M}$ zeigte, hemmte **Biv3** mit einem IC_{50} -Wert von $1.8 \mu\text{M}$. Diese unterschiedlichen Werte legen nahe, dass zwischen beiden Derivaten ein unterschiedlicher Hemmmodus vorliegt. Währenddessen **Biv3** bivalent bindet, kann **Biv1** aufgrund des kürzeren Linkers nur monovalent binden.

Interessanterweise zeigten die anschließend erstellten Kristallstrukturen von **Biv1** – **Biv3** jedoch einen nicht-erwarteten Bindungsmodus. Denn in allen Kristallstrukturen, unabhängig von der gemessenen Bindungsaffinität, wurde ein identischer Bindungsmodus deutlich, in welchem die Phosphophenoethergruppe in die Phosphoserin/-threonin-Bindungstasche bindet, die PEG-Kette sich jedoch in einer Kronenether-artigen Anordnung um die Aminogruppe von Lys49 legt. Damit kann die Röntgenstrukturanalyse keine strukturelle Erklärung für die biochemisch-unterschiedlichen Affinitäten liefern. Somit ist in dieser Arbeit der besondere Fall gegeben, dass die Röntgenstrukturanalyse einen Bindungsmodus aufzeigt, welcher vermutlich wenig Relevanz für die „wirkliche“ Situation in Lösung hat.

Neben dieser unerwarteten Erkenntnis konnten durch Variation des strukturellen Aufbaus der Moleküle auch neue Erkenntnisse über den Einfluss von Substituenten und der Position des Linkers erlangt werden. Das Ergebnis der FP-Messungen zur Verbindung **Biv4** zeigte, dass auch nach Einführung eines Chlor-Substituenten am

zweiten aromatischen Ring eine Inhibition stattfindet. Da die Messungen zu **Biv3** und **Biv4** allerdings mit unterschiedlichen Peptiden durchgeführt wurden, war ein direkter Vergleich der beiden Verbindungen nicht möglich. Um detaillierte Informationen über den Einfluss des Chlor-Substituenten zu erhalten, sind daher weitere Untersuchungen und eine Messung mit identischen Bedingungen notwendig. Allerdings zeigten Messungen mit den monovalenten Inhibitoren, dass dort die Einführung eines Substituenten in *ortho*-Stellung zu einer schwächeren Hemmung führte. Dies legt nahe, dass die Ergebnisse aus der Ottmann *et al.*-Studie nicht direkt auf strukturell-komplexere Phosphophenoether übertragen werden können.

Die Änderung der Position des Linkers zeigte keinen positiven Effekt auf die Inhibition. Allerdings wurde bisher nur eine Variation untersucht. Weitere Derivate könnten daher detaillierte Informationen über die Art der Anlagerung eines Inhibitors an die Bindungstasche des 14-3-3-Proteins liefern.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war die Entwicklung von Isoform-spezifischen Inhibitoren. Hierzu wurden bioreaktive Phosphophenoether-Verbindungen entwickelt, die aufgrund ihrer bioreaktiven Gruppe speziell mit der σ -Isoform interagieren sollten, da nur diese Isoform über ein Cystein und damit eine Thiol-Gruppe in der Nähe der Phosphophenoether-Bindungstasche verfügt.

Im Rahmen der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die bioreaktive Verbindung **Mal3_Br** mit einer reaktiven α -Bromoamid-Einheit in der Tat Isoform-selektiv binden kann. Dieses Ergebnis stellt somit einen ersten Schritt in Richtung isospezifischer 14-3-3-Inhibitoren dar, auch wenn noch weitere Untersuchungen und Optimierungen der Hemmwirkung in späteren Studien notwendig sein werden.

6. Summary and Outlook

Aim of this work was the development and investigation of supramolecular inhibitors of 14-3-3 proteins. Due to the dimeric nature of 14-3-3 proteins, a particular focus was thereby set on the development of bivalent ligands which simultaneously may occupy both substrate binding pockets and thus should display better binding affinities than monovalent ligands. For targeting of the phosphoserine/threonine site, the previously established phosphophenol ether motif should thereby be used.

Within this work, five different, potentially bivalent-binding phosphophenol ether derivatives (**Biv1** to **Biv5**) were prepared and investigated.

All newly synthesized bivalent molecules were subsequently characterized by FP-based affinity measurements that revealed that all compounds bound the 14-3-3 proteins, however with strongly different affinities. For example, while **Biv1** was only a weak binder displaying an IC_{50} value of $> 400 \mu\text{M}$, **Biv3** strongly bound with an IC_{50} of $1.8 \mu\text{M}$. These different affinities therefore indicated that the compounds display different binding modes. While **Biv1** only binds in a monovalent fashion, **Biv3** displays a bivalent binding mode.

The subsequently determined crystal structures of **Biv1** – **Biv3** however revealed a surprising binding mode: All phosphophenol ethers displayed the same molecular binding mode, in which the phosphophenol ether bound as expected to the phosphoserine/threonine binding site but the PEG linker intertwined in a crown-ether-like fashion the amino group of Lys49. Accordingly, the X-ray structure does not reveal a molecular basis of the observed different binding affinities and most probably displays a binding mode that is not relevant for the binding situation in solution.

Besides this unexpected finding, the impact of substituents on the phenyl moiety and the position of the linker for binding affinity was also studied in this work. The FP measurements of compound **Biv4** revealed that inhibition is maintained after introduction of a chlorine substituent on the second aromatic ring. However, since the measurements of **Biv3** and **Biv4** were so far performed with different reporter peptides, a direct comparison of the two compounds was not possible. To obtain detailed information on the influence of the chlorine substituent, further investigations and a measurement with identical conditions are necessary and will be performed in the future. However, additional studies with the monovalent ligands revealed that the

introduction of a chlorine residue in *ortho*-position reduced binding affinity. Accordingly, the results from the Ottmann *et al.*-study cannot be transferred directly to structurally more complex phosphophenol ether derivatives.

The results with **Biv5** however revealed that the position of the linker is critical for binding as a shift into a *para*-position significantly lowers binding affinity. However, further studies with additional derivatives are still required to provide more detailed information on the best linkage position of the phosphophenol ethers for efficient 14-3-3 binding.

Another aspect of this work was the development of 14-3-3 isoform-specific inhibitors. For this purpose, bioreactive phosphophenol ethers were developed, which due to their bioreactive group were envisaged to display 14-3-3 σ specificity as only this isoform harbors a cysteine residue in vicinity of the phosphophenol ether binding pocket. Within this work, it was successfully shown that the generated bioreactive compound **Mal3_Br** indeed displayed the suspected isoform-selectivity. This result thus represents a first step towards the development of isoform-specific 14-3-3 inhibitors also further steps are still required to improve potency and to better understand the molecular binding mode of such inhibitors.

7. Experimentalteil

7.1. Arbeitsmaterialien und Instrumente

7.1.1. Chemikalien

Es wurden Reagenzien und Lösungsmittel der Firmen ABCR, Acros, Alfa Aesar, Carl Roth, Fisher, Fluka, Iris Biotech, Merck, Novabiochem, Riedel de Hën, Scientific und Sigma-Aldrich ohne weitere Reinigung verwendet. Trockene Lösungsmittel wurden in der besten verfügbaren Qualität von den gleichen Anbietern bezogen.

7.1.2. Säulenchromatographie

Die säulenchromatographische Reinigung von Produkten wurde in Glassäulen mit Kieselgel der Firma Acros (Partikelgröße 35 – 70 µm) durchgeführt.

7.1.3. Dünnschichtchromatographie (DC)

Die Dünnschichtchromatographie (DC) erfolgte auf Kieselgel-beschichteten Aluminium-Platten (60 F254) der Firma Merck. Die Spots wurden durch Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm oder 366 nm oder durch Anfärben der DC-Platten mit einer Kaliumpermanganat-Lösung (1.5 g KMnO_4 , 10 g K_2CO_3 , 1.25 mL 10 % aq. NaOH in 200 mL Wasser) und anschließendem Trocknen sichtbar gemacht. Die ermittelten R_f -Werte und die dafür verwendeten Laufmittel sind in den entsprechenden Arbeitsvorschriften aufgeführt.

7.1.4. Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC/MS)

Die LC/MS-Analysen wurden an einem LC/MS-System der Firma Thermo Scientific mit einer Eclipse XDB-C18 (Partikelgröße 5 µm) Säule von Agilent (Signaldetektion

bei 210 nm) und einem Thermo Scientific LCQ Fleet™ ESI-Spektrometer durchgeführt. Für die Analyse im positiven Modus wurde ein linearer Gradient von Lösungsmittel B (0.1 % Ameisensäure in Acetonitril) in Lösungsmittel A (0.1 % Ameisensäure in Wasser) bei einer Flussrate von 1 mL/min verwendet. Für die Analyse im negativen Modus wurde ein linearer Gradient von Lösungsmittel C (5 mM NH₄OAc in Acetonitril) in Lösungsmittel D (5 mM NH₄OAc in Wasser) bei einer Flussrate von 1 mL/min verwendet. Gradient für den positiven Modus: 0 min (10 % B) → 1 min (10 % B) → 10 min (100 % B) → 12 min (100 % B) → 15 min (10 % B). Gradient für den negativen Modus: 0 min (10 % C) → 1 min (10 % C) → 10 min (100 % C) → 12 min (100 % C) → 15 min (10 % C).

7.1.5. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Reinigung der Produkte erfolgte an einem HPLC-System von Shimadzu auf einer RP-C18-Säule von Phenomenex (Phenomenex Luna® 5 µm C18(2), 100 x 21.20 mm) mit einer Signaldetektion bei 210 und 254 nm. Es wurde ein linearer Gradient von Lösungsmittel B (0.1 % TFA in Acetonitril) in Lösungsmittel A (0.1 TFA in Wasser) bei einer Flussrate von 20 – 25 mL/min eingesetzt.

7.1.6. Gefriertrocknung

Die Gefriertrocknung der Produkte wurde an einem Gefriertrockner ALPHA 2-4 LD plus (CHRIST) bei einer Eiskondensatortemperatur von -80 °C durchgeführt. Um eine möglichst große Eis-Oberfläche zu erhalten, wurde die wässrige Lösung der zu trocknenden Substanzen zuvor mit flüssigem Stickstoff in einer rotierenden Bewegung eingefroren. Der Trocknungsprozess wird durch eine große Eis-Oberfläche und eine geringe Eis-Dicke begünstigt. Nach 24 - 48 h waren die Substanzen vollständig lyophilisiert.

7.1.7. NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektren wurden an einem Bruker Avance II 400 (400 MHz für ^1H -NMR und 101 MHz für ^{13}C -NMR) aufgenommen und auf die charakteristischen Signale des undeuterten Lösungsmittels kalibriert. Die ^1H -NMR-Spektren sind wie folgt angegeben: Die chemische Verschiebung δ in ppm, die Multiplizität (s, Singulett; d, Dublett; t, Triplett; dd, Dublett von Dublett; m, Multiplett), der Kopplungskonstante J in Hz und der Anzahl der Protonen H.

Für die ^{13}C -NMR-Spektren wird die chemische Verschiebung angegeben.

7.2. Allgemeine Methoden

7.2.1. Methode A: Bildung des Phosphophenoethers durch Williamsonsche Ethersynthese

Zu einer Lösung einer bromierten Verbindung in Aceton wurde unter Rühren K_2CO_3 gegeben. Anschließend wurde der entsprechende Alkohol zugegeben und es wurde zwischen 3 und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach erfolgter Reaktion wurde gesättigte NH_4Cl -Lösung hinzugegeben und mit Essigsäureethylester extrahiert. Der Waschprozess wurde wiederholt bis die wässrige Phase einen pH-Wert unter 7 aufwies. Die organische Phase wurde dann über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel mittels Vakuum entfernt.

7.2.2. Methode B: Esterverseifung

Eine Lösung aus einem Ester in einem Lösungsmittelgemisch aus THF und Wasser (1:1) wurde unter Rühren auf 40 °C erwärmt. Dann wurde LiOH zugegeben und 3 h bei 40 °C gerührt. Nach vollständiger Umsetzung wurde 3-mal mit gesättigter NH_4Cl -Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel destillativ entfernt.

7.2.3. Methode C: Amidkupplung

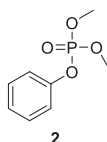
Zu einer Lösung aus einer Carbonsäure in DCM wurden unter Rühren EDC, HOBT und DIPEA zugegeben. Anschließend wurde das entsprechende Amin dazugegeben. Es wurde zwischen 24 und 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach erfolgter Reaktion wurde die organische Phase jeweils 3-mal mit 5%-iger $KHSO_4$ -Lösung und 3-mal mit 5%-iger $NaHCO_3$ -Lösung gewaschen. Dann wurde die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

7.2.4. Methode D: Entschützung des Phosphonates

Das geschützte Phosphonat wurde in trockenem DCM gelöst und TMSBr wurde vorsichtig hinzuge tropft. Dann wurde 30 min bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das Lösungsmittel mittels Vakuum entfernt. Daraufhin wurde ein Lösungsmittelgemisch aus Methanol und Wasser (3:1) zugegeben und es wurde erneut 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach erfolgter Reaktion wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

7.3. Synthese des Phosphophenoleters 1

Dimethylphenylphosphat (2)



Substanz	Stoffmenge [mmol]	Masse [g]	Volumen [mL]	Äquivalent [eq]
Dimethylphosphit	100	11	9.2	1.0
Phenol	100	10	-	1.0
Et ₃ N	100	-	14.9	1.0
CCl ₄	-	-	30	-

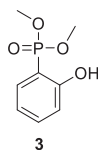
Eine Lösung aus Phenol in Tetrachlormethan wurde auf 0 °C gekühlt. Es wurde Triethylamin zugegeben. Dann wurde über eine Stunde Dimethylphosphit langsam zur Lösung getropft. Das Reaktionsgemisch wurde eine Stunde bei 0 °C und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde 3-mal mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: 11.84 g = 58.6 %

LC-MS (ESI): $t_R = 6.32$ min, m/z 202.95 $[M + H]^+$

¹H-NMR (400 MHz, Chloroform-d): δ 7.35 - 7.31 (m, 2H), 7.23 - 7.15 (m, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.82 (s, 3H).

¹³C-NMR (101 MHz, Chloroform-d): δ 150.49, 129.87, 129.37, 119.90, 119.85, 55.06, 54.99.

Dimethyl-(2-hydroxyphenyl)phosphonat (3)

Substanz	Stoffmenge [mmol]	Masse [g]	Volumen [mL]	Äquivalent [eq]
2	5	1	-	1
DIPA	8.5	0.86	1.195	1.7
<i>n</i> -BuLi	7.5	0.48	4.71 (15%ige Lsg.)	1.5
THF	-	-	30	-

Eine Lösung aus DIPA in trockenem Tetrahydrofuran wurde auf $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Eine ebenfalls auf $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlte Lösung aus *n*-BuLi in trockenem Tetrahydrofuran wurde langsam zugegeben. Die Reaktionslösung wurde ca. 20 min bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde erneut auf $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Eine Lösung aus **2** in trockenem Tetrahydrofuran, die auch auf $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt wurde, wurde langsam zur Reaktionslösung zugegeben. Es wurde ca. eine Stunde bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt, anschließend wurde das Reaktionsgemisch langsam auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Nach erfolgter Reaktion wurde die Reaktionslösung 3-mal mit gesättigter NH_4Cl -Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel destillativ entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Essigsäureethylester / Cyclohexan 1:2) gereinigt und konnte als weißer Feststoff erhalten werden.

Ausbeute: 612 mg = 60.4 %

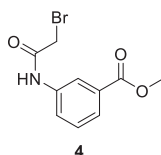
R_f -Wert: 0.48

LC-MS (ESI): $t_R = 5.29\text{ min}$, $m/z\ 202.97\ [M + H]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Chloroform-*d*): $\delta\ 10.01\ (\text{s}, 1\text{H})$, $7.48 - 7.43\ (\text{m}, 1\text{H})$, $7.37 - 7.31\ (\text{m}, 1\text{H})$, $7.00 - 6.90\ (\text{m}, 2\text{H})$, $3.69\ (\text{d}, J = 11.5\ \text{Hz}, 6\ \text{H})$.

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, Chloroform-d): δ 162.43, 135.48, 131.56, 119.77, 117.85, 108.10, 53.01.

Methyl-3-(2-bromacetamido)benzoat (4)



Substanz	Stoffmenge [mmol]	Masse [g]	Volumen [mL]	Äquivalent [eq]
Methyl-3-aminobenzoat	13.3	2.0	-	1.0
Bromacetyl bromid	13.3	2.62	1.13	1.0
Triethylamin	14.3	1.45	1.99	1.1
DCM	-	-	50	-

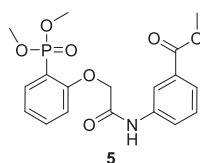
Eine Lösung aus Methyl-3-aminobenzoat in trockenem DCM wurde auf 0 °C gekühlt. Triethylamin wurde zugegeben. Anschließend wurde Bromacetyl bromid langsam zugetropft. Nach erfolgter Zugabe wurde 1 h bei 0 °C und über Nacht bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde 3-mal mit gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung gewaschen. Die organischen Phasen wurden vereinigt und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde durch Umkristallisieren in Essigsäureethylester gereinigt.

Ausbeute: 2.8 g = 80 %

LC-MS (ESI): $t_R = 7.06$ min, m/z 271.97 $[\text{M} + \text{H}]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Chloroform-d): δ 8.22 (s, 1H), 8.04 (t, $J = 1.9$ Hz, 1H), 7.92 - 7.89 (m, 1H), 7.85-7.82 (m Hz, 1H), 7.44 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.03 (s, 2H), 3.92 (s, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, Chloroform-d): 166.52, 163.73, 137.21, 131.06, 129.32, 126.20, 124.49, 120.96, 52.35, 29.35.

Methyl-3-(2-(2-(dimethoxyphosphoryl)phenoxy)acetamido)benzoat (5)

Substanz	Stoffmenge [mmol]	Masse [mg]	Volumen [mL]	Äquivalent [eq]
Edukt	0.5	135.5	-	1.0
Phosphonat	0.5	100	-	1.0
Kaliumcarbonat	1.0	138.2	-	2.0
Aceton	-	-	15	-

Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Methode A durchgeführt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (Essigsäureethylester / Cyclohexan 1:1) gereinigt.

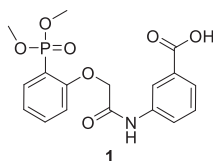
Ausbeute: 190 mg = 97 %

R_f-Wert: 0.4

LC-MS (ESI): t_R = 7.83 min, m/z 393.96 [M + H]⁺

¹H-NMR (400 MHz, Chloroform-d): δ 10.54 (s, 1H), 8.55 (t, J = 1.9 Hz, 1H), 8.08 – 7.87 (m, 2H), 7.86 – 7.74 (m, 1H), 7.72 - 7.66 (m, 1H), 7.61 - 7.54 (m, 1H), 7.48 – 7.36 (m, 1H), 7.16 - 7.11 (m, 1H), 7.03 – 6.94 (m, 1H), 4.74 (s, 2H), 4.14 – 4.09 (m, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.85 (s, 3H).

¹³C-NMR (101 MHz, Chloroform-d): δ 166.95, 166.20, 159.44, 138.48, 134.99, 133.99, 130.85, 128.95, 125.40, 124.53, 122.26, 122.02, 121.08, 112.79, 68.03, 53.20, 53.14, 52.15.

3-(2-(2-(Dimethoxyphosphoryl)phenoxy)acetamido)benzoesäure (1)

Substanz	Stoffmenge [mmol]	Masse [mg]	Volumen [mL]	Äquivalent [eq]
5	0.22	88	-	1.0
Lithiumhydroxid	0.66	16	-	3.0
THF / H ₂ O (1:1)	-	-	40	-

Die Verseifung wurde nach der allgemeinen Methode B durchgeführt. Das Produkt konnte als weißer Feststoff erhalten werden.

Ausbeute: 47.5 mg = 57 %

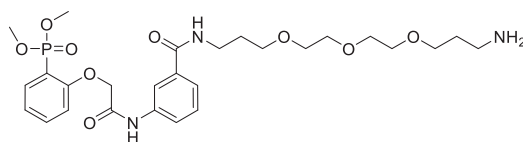
LC-MS (ESI): $t_R = 6.50$ min, m/z 379.90 [M + H]⁺

¹H-NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄): δ 8.48 (s, 1H), 7.98 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.85 – 7.63 (m, 4H), 7.46 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.23 – 7.17 (m, 2H), 4.83 (s, 2H), 3.86 (dd, $J = 11.4, 3.1$ Hz, 7H).

¹³C-NMR (101 MHz, Methanol-*d*₄): δ 169.39, 168.58, 160.91, 139.52, 136.66, 135.25, 132.78, 130.05, 126.77, 125.50, 123.30, 122.36, 114.42, 114.33, 68.95, 53.85.

7.4. Synthese des bivalenten Inhibitors Biv1

Dimethyl-(2-(2-((3-((3-(2-(2-(3-aminopropoxy)ethoxy)ethoxy)propyl)carbamoyl)phenyl)amino)-2-oxoethoxy)phenyl)phosphonat (6)



6

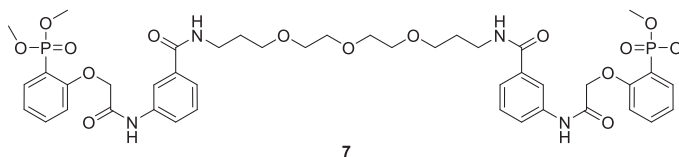
Substanz	Stoffmenge [mmol]	Masse [mg]	Volumen [mL]	Äquivalent [eq]
1	0.22	83	-	1.0
4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin	0.22	-	0.048	1.0
EDC	0.44	84.5	-	2.0
HOBt	0.44	59.4	-	2.0
DIPEA	1.32	-	0.286	6.0
DCM	-	-	3	-

Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode C durchgeführt. Das Rohprodukt wurde mittels HPLC gereinigt.

Ausbeute: 55 mg = 43 %

LC-MS (ESI): $t_R = 4.95$ min, m/z 582.18 $[M + H]^+$

Tetramethyl-((((((6,9,12-trioxa-2,16-diazaheptadecandioyl)bis(3,1-phenylen))-bis(azandiyl))bis(2-oxoethan-2,1-diyl))bis(oxy))bis(2,1-phenylen))bis(phosphonat) (7)



Substanz	Stoffmenge [mmol]	Masse [mg]	Volumen [mL]	Äquivalent [eq]
6	0.095	55	-	1.0
1	0.189	71.74	-	2.0
EDC	0.19	36.4	-	2.0
HOBt	0.19	25.7	-	2.0
DIPEA	0.57	-	0.099	6.0
DCM	-	-	4	-

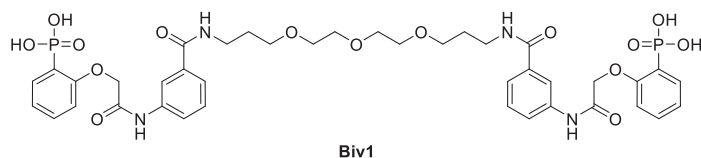
Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Methode C durchgeführt.

Ausbeute: 26.4 mg = 30 %

LC-MS (ESI): $t_R = 7.31$ min, m/z 943.22 [M + H]⁺

¹H-NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ 10.47 (s, 2H), 8.31 (t, $J = 1.9$ Hz, 2H), 8.05 – 8.02 (m, 2H), 7.94 – 7.92 (m, 2H), 7.71 – 7.64 (m, 4H), 7.60 – 7.53 (m, 6H), 7.44 – 7.40 (m, 2H), 4.70 (s, 4H), 3.84 (d, $J = 11.3$ Hz, 12H), 2.16 (s, 8H), 1.89 – 1.81 (m, 4H), 1.27 – 1.20 (m, 4H).

¹³C-NMR (101 MHz, Chloroform-*d*): δ 167.29, 159.41, 143.42, 138.47, 135.62, 134.99, 133.91, 125.05, 123.02, 122.14, 122.00, 118.42, 77.23, 70.43, 70.21, 53.19, 38.59, 29.70.

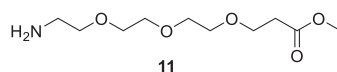
Bivalenter Inhibitor Biv1

Substanz	Stoffmenge [mmol]	Masse [mg]	Volumen [mL]	Äquivalent [eq]
7	0.014	13.2	-	1.0
TMSBr	-	-	0.2	-
DCM	-	-	2	-
MeOH / H ₂ O (3:1)	-	-	2	-

Die Entschützung der Phosphonatgruppe erfolgte nach der allgemeinen Methode D. Das Rohprodukt wurde per HPLC gereinigt.

Ausbeute: 20 mg = 81 %

LC-MS (ESI): $t_R = 5.07$ min, m/z 887.23 [M+H]⁺

7.5. Synthese des bivalenten Inhibitors Biv2**Methyl-3-(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethoxy)propanoat (11)**

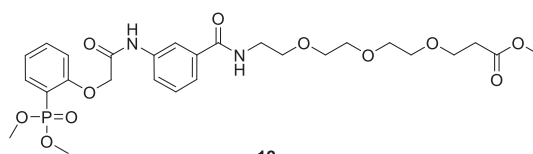
Substanz	Stoffmenge [mmol]	Masse [g]	Volumen [mL]	Äquivalent [eq]
Boc-NH-PEG(3)-COOH	3.11	1	-	1.0
SOCl ₂	12.45	1.48	0.903	4.0
MeOH	-	-	40	-
HCl (4M in Dioxan)	-	-	5	-

Eine Lösung aus Boc-NH-PEG(3)-COOH wurde in Methanol gelöst und auf 0 °C gekühlt. Thionylchlorid wurde langsam hinzugegeben. Es wurde 1 h bei 0 °C und anschließend über Nacht bei RT gerührt. Nach LC-Kontrolle wurde das Reaktionsgemisch 3 h unter Rückfluss erhitzt. Nach erfolgter Reaktion wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mit HCl (4 M in Dioxan) aufgenommen und es wurde erneut über Nacht bei RT gerührt. Dann wurde das Lösungsmittel wiederum destillativ entfernt. Das Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt.

Ausbeute: 801 mg = 95 % (HCl-Salz)

LC-MS (ESI): $t_R = 1.75$ min, m/z 235.05 [M+H]⁺

Methyl-1-(3-(2-(2-(dimethoxyphosphoryl)phenoxy)acetamido)phenyl)-1-oxo-5,8,11-trioxa-2-azatetradecan-14-olat (12)



Substanz	Stoffmenge [mmol]	Masse [mg]	Volumen [mL]	Äquivalent [eq]
1	0.155	61.0	-	1.0
11	0.155	36.5	-	1.0
EDC	0.31	59.6	-	2.0
HOBt	0.31	42.0	-	2.0
DIPEA	0.93	-	0.162	6.0
DCM	-	-	5	-

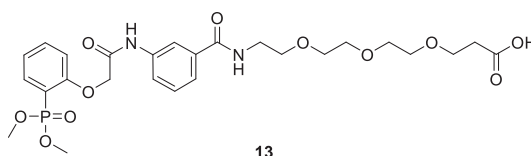
Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode C durchgeführt.

Ausbeute: 53.1 mg = 58 %

LC-MS (ESI): $t_R = 6.63$ min, m/z 597.06 [M+H]⁺

¹H-NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ 10.44 (s, 1H), 8.26 (t, $J = 1.9$ Hz, 1H), 7.90 - 7.87 (m, 1H), 7.66 – 7.49 (m, 4H), 7.38 – 7.31 (m, 1H), 7.09 - 7.04 (m, 1H), 6.95 – 6.90 (m, 1H), 4.67 (s, 2H), 3.81 - 3.78 (m, 6H), 3.67 – 3.61 (m, 3H), 3.60 - 3.59 (m, 8H), 3.58 – 3.54 (m, 4H), 3.53 - 3.50 (m, 2H), 2.50 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H).

1-(3-(2-(2-(Dimethoxyphosphoryl)phenoxy)acetamido)phenyl)-1-oxo-5,8,11-trioxa-2-azatetradecan-14-onsäure (13)



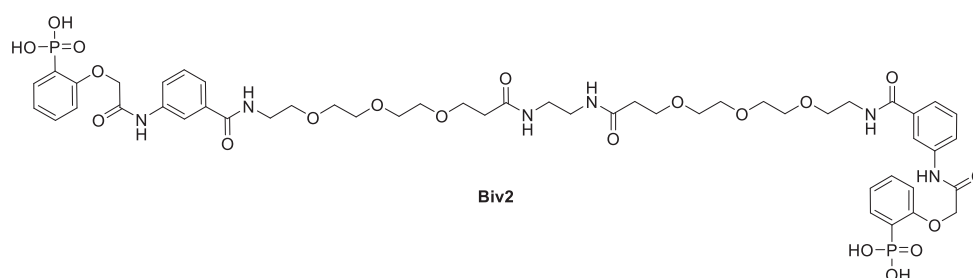
Substanz	Stoffmenge [mmol]	Masse [mg]	Volumen [mL]	Äquivalent [eq]
12	0.034	20	-	1.0
Lithiumhydroxid	0.102	2.44	-	3.0
THF / H ₂ O (1:1)	-	-	3	-

Die Verseifung erfolgte nach der allgemeinen Methode B.

Ausbeute: 18 mg = 90 %

LC-MS (ESI): $t_R = 5.96$ min, m/z 583.17 [M+H]⁺

¹H-NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ 10.37 (s, 1H), 8.30 (t, $J = 1.9$ Hz, 1H), 7.92 - 7.90 (m, 1H), 7.75 – 7.70 (m, 1H), 7.70 – 7.66 (m, 1H), 7.65 - 7.61 (m, 1H), 7.45 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.20 – 7.15 (m, 1H), 7.03 (dd, $J = 8.2, 7.0$ Hz, 1H), 4.79 (s, 2H), 3.90 – 3.89 (m, 6H), 3.75 – 3.67 (m, 10H), 3.65 – 3.59 (m, 4H), 2.56 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H).

Bivalenter Inhibitor Biv2

Substanz	Stoffmenge [mmol]	Masse [mg]	Volumen [mL]	Äquivalent [eq]
13	0.008	4.7	-	2.2
Ethylendiamin	0.004	-	0.024	1.0
EDC	0.007	1.38	-	2.0
HOBt	0.007	0.97	-	2.0
DIPEA	0.022	-	0.0038	6.0
TMSBr	-	-	0.1	-
DCM	-	-	2	-
MeOH / H ₂ O (3:1)	-	-	2	-

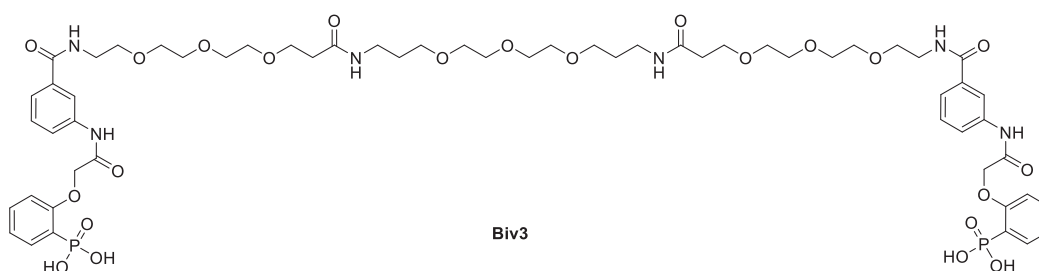
Zu einer Lösung aus **13** in DCM wurden EDC, HOBt und DIPEA gegeben. Dann wurde Ethylendiamin hinzugegeben. Daraufhin wurde 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach erfolgter Reaktion wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt unter Hochvakuum getrocknet. Im Anschluss wurde das Rohprodukt in trockenem DCM aufgenommen und TMSBr wurde zugegeben. Es wurde 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde das Lösungsmittel erneut unter vermindertem Druck entfernt und ein Lösungsmittelgemisch aus Methanol und Wasser wurde hinzugegeben. Es wurde wieder 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde daraufhin ein weiteres Mal mittels Hochvakuum entfernt und das Rohprodukt mittels HPLC gereinigt.

Ausbeute: 16.8 mg = 37 % (über zwei Stufen)

LC-MS (ESI): $t_R = 4.71$ min, m/z 1133.40 $[M+H]^+$

¹H-NMR (700 MHz, Chloroform-*d*): δ 10.06 (s, 2H), 8.45 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.74 – 7.66 (m, 4H), 7.66 – 7.61 (m, 2H), 7.59 (s, 2H), 7.52 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H), 7.45 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H), 7.05 - 7.02 (m, 2H), 6.90 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 5.15 (bs, 4H), 4.67 (s, 4H), 3.71 – 3.46 (m, 28H), 3.35 (s, 4H), 2.33 (t, $J = 5.6$ Hz, 4H).

7.6. Synthese des bivalenten Inhibitors Biv3



Substanz	Stoffmenge [mmol]	Masse [mg]	Volumen [mL]	Äquivalent [eq]
13	0.11	64.1	-	2.0
4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin	0.06	-	0.0132	1.0
EDC	0.11	21	-	2.0
HOBt	0.11	15	-	2.0
DIPEA	0.33	-	0.058	6.0
TMSBr	-	-	0.5	-
DCM	-	-	4	-
MeOH / H ₂ O (3:1)	-	-	3	-

13 wurde in DCM gelöst. EDC, HOBt und DIPEA wurden hinzugefügt. Dann wurde 4,7,10-Trioxa-1,13-undecanediamin dazu getropft. Es wurde 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt in trockenem DCM aufgenommen. Es erfolgte die Zugabe von TMSBr und erneutes Rühren bei Raumtemperatur für 30 min. Dann wurde das Reaktionsgemisch ein weiteres Mal eingedampft und ein Lösungsmittelgemisch aus Methanol und Wasser (3:1) wurde hinzugegeben. Es wurde nochmals 30 min bei

Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter Hochvakuum entfernt und das Rohprodukt mittels HPLC gereinigt.

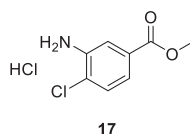
Ausbeute: 20.5 mg = 26 % (über zwei Stufen)

LC-MS (ESI): $t_R = 4.93$ min, m/z 1293.27 [M+H]⁺

¹H-NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ 10.03 (d, $J = 3.3$ Hz, 2H), 8.26 – 8.20 (m, 2H), 7.76 – 7.66 (m, 6H), 7.58 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H), 7.51 – 7.44 (m, 2H), 7.35 (t, $J = 8.0$ Hz, 4H), 7.03 - 6.98 (m, 2H), 6.87 - 6.84 (m, 2H), 4.59 (s, 4H), 3.66 – 3.47 (m, 36H), 3.45 – 3.42 (m, 4H), 3.24 – 3.20 (m, 4H), 2.42 – 2.39 (m, 4H), 1.71 - 1.64 (m, 4H).

7.7. Synthese des bivalenten Inhibitors Biv4

Methyl-3-amino-4-chlorbenzoat (17)



Substanz	Stoffmenge [mmol]	Masse [g]	Volumen [mL]	Äquivalent [eq]
3-Amino-4-chlorbenzoesäure	5.85	1.0	-	1.0
SOCl ₂	11.7	-	0.849	2.0
MeOH	-	-	50	-

3-Amino-4-chlorbenzoesäure wurde unter Schutzgasatmosphäre in trockenem Methanol vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Dann wurde eine Lösung aus Thionylchlorid in trockenem Methanol ebenfalls auf 0 °C gekühlt. Diese wurde unter Rühren langsam zur 3-Amino-4-chlorbenzoesäure getropft und es wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Essigsäureethylester / Cyclohexan 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 283.2 mg = 22 %

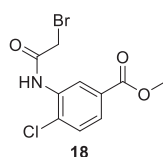
R_f-Wert: 0.81

LC-MS (ESI): t_R = 7.62 min, 186.96 m/z [M+H]⁺

¹H-NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ 7.40 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 7.32 – 7.29 (m, 1H), 7.23 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 3.84 (s, 3H).

¹³C-NMR (101 MHz, Chloroform-*d*): δ 166.60, 142.90, 129.61, 129.41, 119.89, 116.56, 77.34, 77.03, 76.71, 52.19.

Methyl-3-(2-bromacetamido)-4-chlorbenzoat (18)



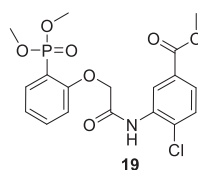
Substanz	Stoffmenge [mmol]	Masse [mg]	Volumen [mL]	Äquivalent [eq]
17	1.08	200	-	1.0
Bromacetyl bromid	1.08	-	0.093	1.0
Triethylamin	1.20	-	0.167	1.1
DCM	-	-	15	-

Eine Lösung aus **17** in trockenem DCM wurde unter Rühren auf 0 °C gekühlt. Daraufhin wurde Triethylamin zugegeben. Anschließend erfolgte die tropfenweise Zugabe von Bromacetyl bromid. Nach vollständiger Zugabe wurde 1 h bei 0 °C und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde dann 3-mal mit gesättigter NH₄Cl-Lösung gewaschen und die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Essigsäureethylester / Cyclohexan 1:2) gereinigt.

Ausbeute: 251.7 mg = 71 %

R_f-Wert: 0.76

LC-MS (ESI): t_R = 7.87 min, m/z 304.69 [M+H]⁺

Methyl-4-chlor-3-(2-(2-(dimethoxyphosphoryl)phenoxy)acetamido)benzoat (19)

Substanz	Stoffmenge [mmol]	Masse [mg]	Volumen [mL]	Äquivalent [eq]
3	0.742	150	-	1.0
18	0.742	225.3	-	1.0
Kaliumcarbonat	1.485	205.2	-	2.0
Aceton	-	-	5	-

Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode C durchgeführt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (Essigsäureethylester / Cyclohexan 1:1 → Dichlormethan / Methanol 3:1) gereinigt.

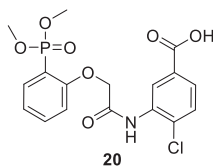
Ausbeute: 145 mg = 46 %

R_f-Wert: 0.41

LC-MS (ESI): t_R = 7.56 min, m/z 428.05 [M+H]⁺

¹H-NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ 9.80 (s, 1H), 8.51 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.84 – 7.74 (m, 2H), 7.62 - 7.58 (m, 1H), 7.49 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.18 – 7.13 (m, 1H), 7.03 - 7.00 (m, 1H), 4.80 (s, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.80 (d, *J* = 11.4 Hz, 6H).

¹³C-NMR (101 MHz, Chloroform-*d*): δ 166.62, 165.92, 159.10, 134.99, 134.71, 134.64, 133.99, 132.53, 129.84, 129.50, 127.71, 127.18, 122.31, 122.16, 112.91, 112.82, 68.11, 53.00, 52.35.

4-Chlor-3-(2-(2-(dimethoxyphosphoryl)phenoxy)acetamido)benzoesäure (20)

Substanz	Stoffmenge [mmol]	Masse [mg]	Volumen [mL]	Äquivalent [eq]
19	0.187	80	-	1.0
Lithiumhydroxid	0.562	14	-	3.0
THF / H ₂ O (1:1)	-	-	10	-

Die Verseifung erfolgte nach der allgemeinen Methode B. Das Produkt konnte als gelber Feststoff erhalten werden.

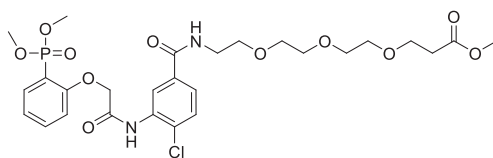
Ausbeute: 65.7 mg = 85 %

LC-MS (ESI): $t_R = 6.40$ min, m/z 414.07 [M+H]⁺

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.10 (s, 1H), 8.35 – 8.32 (m, 1H), 7.86 – 7.83 (m, 1H), 7.76 – 7.69 (m, 3H), 7.35 – 7.32 (m, 1H), 7.25 – 7.21 (m, 1H), 5.02 (s, 2H), 3.76 (dd, $J = 11.3, 0.6$ Hz, 6H).

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ 249.51, 245.57, 220.48, 166.85, 138.40, 131.78, 130.07, 127.50, 121.61, 52.81.

Methyl-1-(4-chlor-3-(2-(2-(dimethoxyphosphoryl)phenoxy)acetamido)phenyl)-1-oxo-5,8,11-trioxa-2-azatetradecan-14-oat (21)



21

Substanz	Stoffmenge [mmol]	Masse [mg]	Volumen [mL]	Äquivalent [eq]
20	0.121	50.0	-	1.0
11	0.121	28.5	-	1.0
EDC	0.242	46.4	-	2.0
HOBt	0.242	32.7	-	2.0
DIPEA	0.726	-	0.127	6.0
DCM	-	-	15	-

Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode C durchgeführt.

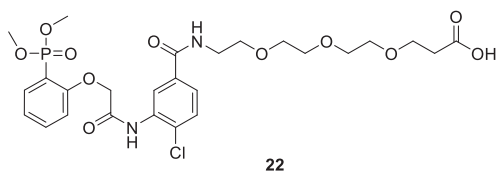
Ausbeute: 61 mg = 80 %

LC-MS (ESI): $t_R = 6.61$ min, m/z 631.13 $[M+H]^+$

1H -NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ 9.75 (s, 1H), 8.26 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.80 – 7.74 (m, 1H), 7.65 – 7.57 (m, 2H), 7.47 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.17 – 7.13 (m, 1H), 7.03 – 7.01 (m, 2H), 4.78 (s, 2H), 3.79 (d, $J = 11.3$ Hz, 6H), 3.72 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 3.63 (dd, $J = 17.0, 5.3$ Hz, 15H), 2.56 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H).

^{13}C -NMR (101 MHz, Chloroform-*d*): δ 166.63, 166.21, 134.97, 134.04, 133.83, 130.48, 129.89, 125.72, 124.29, 122.32, 70.56, 70.44, 70.36, 70.29, 69.80, 68.12, 66.56, 53.00, 51.67, 39.97, 34.81.

1-(4-Chlor-3-(2-(2-(dimethoxyphosphoryl)phenoxy)acetamido)phenyl)-1-oxo-5,8,11-trioxa-2-azatetradecan-14-onsäure (22)



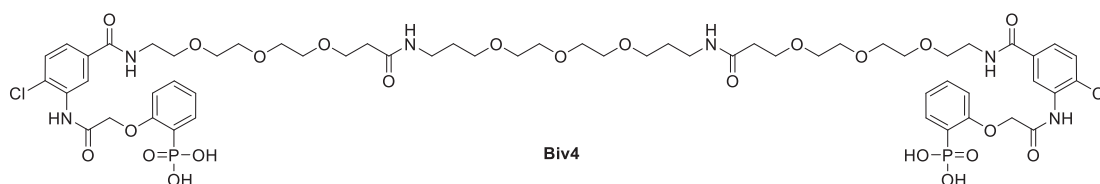
Substanz	Stoffmenge [mmol]	Masse [mg]	Volumen [mL]	Äquivalent [eq]
21	0.038	23.1	-	1.0
Lithiumhydroxid	0.113	2.7	-	3.0
THF / H ₂ O (1:1)	-	-	5	-

Die Verseifung erfolgte nach der allgemeinen Methode B.

Ausbeute: 11.6 mg = 51 %

LC-MS (ESI): $t_R = 5.97$ min, m/z 616.99 [M+H]⁺

Bivalenter Inhibitor Biv4



Substanz	Stoffmenge [mmol]	Masse [mg]	Volumen [mL]	Äquivalent [eq]
22	0.022	13.7	-	3.0
4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin	0.008	-	0.00162	1.0
EDC	0.03	5.75	-	4.0
HOBt	0.03	4.05	-	4.0
DIPEA	0.09	-	0.016	6.0
TMSBr	-	-	0.5	-

DCM	-	-	6	-
MeOH / H ₂ O (3:1)	-	-	2	-

Das Edukt wurde in DCM gelöst und EDC, HOBt und DIPEA wurden dazugegeben. Anschließend wurde 4,7,10-Trioxaundecandiamin zum Reaktionsgemisch gegeben. Dann wurde 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach erfolgter Reaktion wurde das Lösungsmittel mittels Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in trockenem DCM aufgenommen und TMSBr wurde hinzugegeben. Es wurde 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in einem Lösungsmittelgemisch aus Methanol und Wasser (3:1) aufgenommen. Es wurde erneut für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Daraufhin wurde das Lösungsmittel ein weiteres Mal destillativ entfernt und das Rohprodukt per HPLC gereinigt.

Ausbeute: 6.6 mg = 58 % (über zwei Stufen)

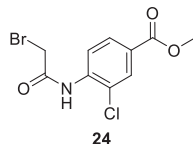
LC-MS (ESI): $t_R = 4.97$ min, m/z 1361.21 [M+H]⁺

¹H-NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄): 10.03 (s, 4H), 8.47 (d, $J = 2.0$ Hz, 2H), 8.20 (d, $J = 2.1$ Hz, 2H), 7.82 – 7.76 (m, 2H), 7.68 – 7.65 (m, 2H), 7.59 – 7.53 (m, 4H), 7.20 – 7.11 (m, 4H), 4.89 (s, 4H), 3.74 – 3.52 (m, 34H), 3.28 (s, 8H), 3.22 (t, $J = 6.8$ Hz, 4H), 2.38 (t, $J = 6.1$ Hz, 4H), 1.72 (t, $J = 6.5$ Hz, 4H).

¹³C-NMR (101 MHz, Methanol-*d*₄): δ 173.92, 169.72, 168.75, 160.31, 135.20, 134.49, 134.41, 132.69, 130.99, 127.04, 126.44, 123.05, 122.91, 114.13, 114.04, 71.59, 71.55, 71.49, 71.38, 71.32, 71.25, 70.50, 69.85, 68.95, 68.29, 48.79, 41.14, 37.85, 37.71, 30.76, 30.39.

7.8. Synthese des bivalenten Inhibitors Biv5

Methyl-4-(2-bromacetamido)-3-chlorbenzoat (24)



Substanz	Stoffmenge [mmol]	Masse [mg]	Volumen [mL]	Äquivalent [eq]
Methyl-4-amino-3-chlorbenzoat	1.08	200	-	1.0
Bromacetyl bromid	2.16	-	0.188	2.0
Triethylamin	4.32	-	0.599	4.0
DCM	-	-	15	-

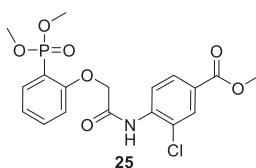
Eine Lösung aus Methyl-4-amino-3-chlorbenzoat in trockenem DCM wurde unter Rühren auf 0 °C gekühlt. Triethylamin wurde zugegeben. Dann wurde Bromacetyl bromid tropfenweise hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 1 h bei 0 °C gerührt und über Nacht bei Raumtemperatur. Nach beendeter Reaktion wurde 3-mal mit gesättigter NH₄Cl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mittels Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt per Säulenchromatographie (Essigsäureethylester / Cyclohexan 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 294 mg = 89 %

LC-MS (ESI): $t_R = 8.22$ min, m/z 306.10 [M+H]⁺

¹H-NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ 8.99 (s, 1H), 8.50 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 8.10 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 7.99 – 7.96 (m, 1H), 4.09 (s, 2H), 3.92 (s, 3H).

¹³C-NMR (101 MHz, Chloroform-*d*): δ 164.42, 163.64, 130.51, 129.37, 126.95, 122.97, 119.99, 52.39, 29.48.

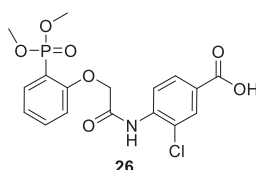
Methyl-3-chlor-4-(2-(2-(dimethoxyphosphoryl)phenoxy)acetamido)benzoat (25)

Substanz	Stoffmenge [mmol]	Masse [mg]	Volumen [mL]	Äquivalent [eq]
24	0.33	100	-	1.0
3	0.33	66.3	-	1.0
K ₂ CO ₃	0.66	91.2	-	2.0
Aceton	-	-	10	-

Die Substitutionsreaktion wurde nach der allgemeinen Methode A durchgeführt. Das Produkt konnte als gelber Feststoff erhalten werden.

Ausbeute: 140.6 mg = 99 %

LC-MS (ESI): $t_R = 7.63$ min, m/z 427.95 [M+H]⁺

3-Chlor-4-(2-(2-(dimethoxyphosphoryl)phenoxy)acetamido)benzoesäure (26)

Substanz	Stoffmenge [mmol]	Masse [mg]	Volumen [mL]	Äquivalent [eq]
25	0.37	159.4	-	1.0
KOH	1.12	63	-	3.0
THF / H ₂ O (1:1)	-	-	10	-

Der Phosphophenolether **25** wurde in einem Lösungsmittelgemisch aus THF und Wasser (1:1) gelöst und unter Rühren auf 45 °C erwärmt. Dann wurde Kaliumhydroxid zugegeben und für 3 h bei 45°C gerührt. Nach erfolgter Reaktion wurde 3-mal mit

gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel destillativ entfernt.

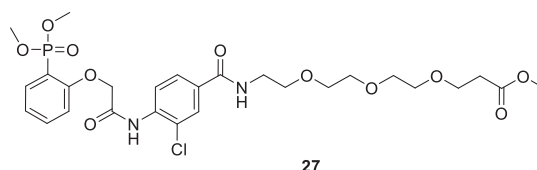
Ausbeute: 75.2 mg = 49 %.

LC-MS (ESI): $t_R = 6.30$ min, m/z 414.04 $[M+H]^+$

1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 9.97 (s, 1H), 7.99 – 7.96 (m, 2H), 7.92 – 7.90 (m, 1H), 7.72 – 7.63 (m, 2H), 7.30 – 7.23 (m, 1H), 7.19 – 7.14 (m, 1H), 4.97 (s, 2H), 3.70 (d, $J = 11.3$ Hz, 6H).

^{13}C -NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ 166.79, 165.73, 159.09, 137.90, 134.94, 133.93, 130.27, 128.74, 128.59, 125.97, 125.23, 121.76, 121.62, 116.28, 67.68, 52.77, 52.72.

Methyl-1-(3-chlor-4-(2-(2-(dimethoxyphosphoryl)phenoxy)acetamido)phenyl)-1-oxo-5,8,11-trioxa-2-azatetradecan-14-olat (27)



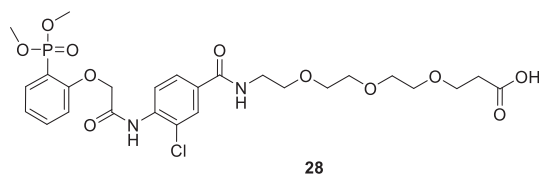
Substanz	Stoffmenge [mmol]	Masse [mg]	Volumen [mL]	Äquivalent [eq]
26	0.065	26.8	-	1.0
11	0.078	21	-	2.0
EDC	0.13	25	-	2.0
HOBt	0.13	18	-	2.0
DIPEA	0.39	-	0.068	6.0
DCM	-	-	5	-

Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Methode C durchgeführt. Das Rohprodukt wurde mittels HPLC gereinigt.

Ausbeute: 29.2 mg = 71 %

LC-MS (ESI): $t_R = 6.53$ min, m/z 631.22 $[M+H]^+$

1-(3-Chlor-4-(2-(2-(dimethoxyphosphoryl)phenoxy)acetamido)phenyl)-1-oxo-5,8,11-trioxa-2-azatetradecan-14-onsäure (28)



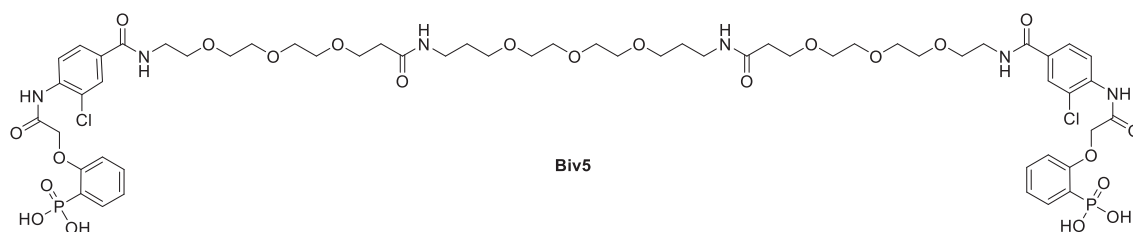
Substanz	Stoffmenge [mmol]	Masse [mg]	Volumen [mL]	Äquivalent [eq]
27	0.046	29.2	-	1.0
LiOH	0.14	3.35	-	3.0
THF / H ₂ O (1:1)	-	-	5	-

Die Verseifung erfolgte nach der allgemeinen Methode B.

Ausbeute: 21 mg = 73 %

LC-MS (ESI): $t_R = 5.91$ min, m/z 617.17 [M+H]⁺

Bivalenter Inhibitor Biv5



Substanz	Stoffmenge [mmol]	Masse [mg]	Volumen [mL]	Äquivalent [eq]
28	0.046	28.6	-	3.0
4,7,10-trioxa-1,13-undecandiamin	0.0153	-	0.0034	1.0
EDC	0.061	11.5	-	4.0
HOBt	0.061	8.1	-	4.0
DIPEA	0.18	-	0.032	12.0
TMSBr	-	-	0.2	-

DCM	-	-	5	-
MeOH / H ₂ O (3:1)	-	-	5	-

Das Edukt (**28**) wurde in DCM gelöst. EDC, HOBt und DIPEA wurden hinzugefügt. Dann wurde 4,7,10-Trioxa-1,13-undecanediamin dazu getropft. Es wurde 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt in trockenem DCM aufgenommen. Es erfolgte die Zugabe von TMSBr und erneutes Rühren bei Raumtemperatur für 30 min. Dann wurde das Reaktionsgemisch ein weiteres Mal eingedampft und ein Lösungsmittelgemisch aus Methanol und Wasser (3:1) wurde hinzugegeben. Es wurde nochmals 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter Hochvakuum entfernt und das Rohprodukt mittels HPLC gereinigt.

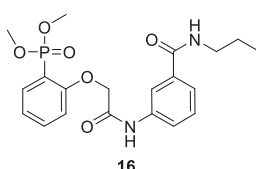
Ausbeute: 2.1 mg = 10 % (über zwei Stufen)

LC-MS (ESI): $t_R = 4.96$ min, m/z 1361.50 [M+H]⁺

¹H-NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄): δ 8.03 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.83 – 7.77 (m, 4H), 7.60 – 7.55 (m, 2H), 7.18 – 7.11 (m, 4H), 4.87 (s, 4H), 3.71 – 3.47 (m, 40H), 3.23 (t, $J = 6.8$ Hz, 4H), 2.39 (t, $J = 6.1$ Hz, 4H), 1.75 – 1.68 (m, 4H).

7.9. Synthese der monovalenten Verbindungen

Dimethyl-(2-(2-oxo-2-((3-(propylcarbamoyl)phenyl)amino)ethoxy)phenyl)-phosphonat (**16**)



Substanz	Stoffmenge [mmol]	Masse [mg]	Volumen [mL]	Äquivalent [eq]
1	0.112	42.5	-	1.0
Propylamin	0.224	-	0.0182	2.0
EDC	0.224	43	-	2.0

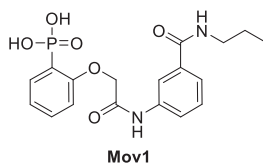
HOBt	0.224	30.3	-	2.0
DIPEA	0.672	-	0.117	6.0
DCM	-	-	5	-

Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode A durchgeführt.

Ausbeute: 33 mg = 70 %

LC-MS (ESI): $t_R = 6.99$ min, m/z 421.30 $[M+H]^+$

Mov1



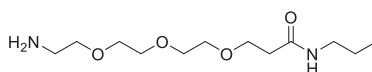
Substanz	Stoffmenge [mmol]	Masse [mg]	Volumen [mL]	Äquivalent [eq]
16	0.08	33	-	1.0
TMSBr	-	-	0.5	-
DCM	-	-	2	-
MeOH / H ₂ O (3:1)	-	-	2	-

Die Entschützung des Phosphonates erfolgte nach der allgemeinen Methode D. Das Produkt wurde mittels HPLC gereinigt.

Ausbeute: 2.4 mg = 8 %

LC-MS (ESI): $t_R = 4.85$ min, 393.20 m/z $[M+H]^+$

¹H-NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ 10.38 (s, 1H), 8.43 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.82 (dd, $J = 15.2, 7.5$ Hz, 1H), 7.56 – 7.48 (m, 1H), 7.32 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.21 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.07 (s, 1H), 6.92 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 4.71 (s, 2H), 3.26 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 1.53 (h, $J = 7.4$ Hz, 2H), 0.87 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H).

3-(2-(2-(2-Aminoethoxy)ethoxy)ethoxy)-N-propylpropanamid (31)

31

Substanz	Stoffmenge [mmol]	Masse [mg]	Volumen [mL]	Äquivalent [eq]
Boc-NH-PEG(3)-COOH	0.311	100	-	1.0
Propylamin	0.622	36.8	0.051	2.0
EDC	1.244	238.5	-	4.0
HOBt	1.244	168.1	-	4.0
DIPEA	1.866	241.2	0.325	6.0
DCM	-	-	10	-
HCl (4M in Dioxan)	-	-	4	-

Die Synthese erfolgte nach der allgemeinen Methode C. Das Rohprodukt wurde im Anschluss in einer 4 M-Lösung HCl in Dioxan aufgenommen. Es wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde anschließend destillativ entfernt und das Produkt mittels HPLC gereinigt.

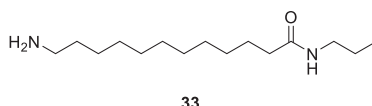
Ausbeute: 73 mg = 88 %

LC-MS (ESI): $t_R = 2.26$ min, 263.30 m/z $[M+H]^+$

1H -NMR (400 MHz, Methanol- d_4): δ 3.79 – 3.72 (m, 4H), 3.71 – 3.59 (m, 10H), 3.20 – 3.13 (m, 4H), 2.50 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H), 1.59 – 1.50 (m, 2H), 0.95 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H).

¹H-NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄): δ 8.17 (s, 1H), 7.92 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.79 (t, *J* = 10.0 Hz, 1H), 7.58 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 7.43 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.15 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.66 (d, *J* = 8.0 Hz, 8H), 3.62 – 3.51 (m, 6H), 3.14 - 3.09 (m, 2H), 2.40 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 1.52 – 1.46 (m, 2H), 0.89 (s, 3H).

12-Amino-*N*-propyldodecanamid (33)

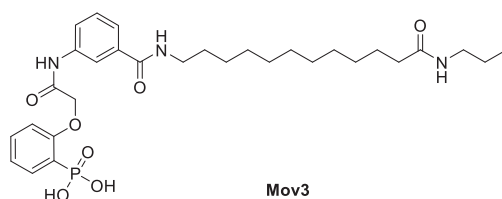


Substanz	Stoffmenge [mmol]	Masse [mg]	Volumen [mL]	Äquivalent [eq]
Boc-12-Ado-OH	0.317	100	-	1.0
Propylamin	0.634	37.5	0.052	2.0
EDC	1.268	243.1	-	4.0
HOBt	1.268	171.33	-	4.0
DIPEA	1.902	-	0.331	6.0
DCM	-	-	10	-
HCl (4M in Dioxan)	-	-	4	-

Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode C durchgeführt. Das Rohprodukt wurde im Anschluss in einer 4 M-Lösung HCl in Dioxan aufgenommen. Es wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde anschließend destillativ entfernt und das Produkt am Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 68 mg = 83 % (über zwei Stufen)

LC-MS (ESI): $t_R = 5.20$ min, 257.24 *m/z* [M+H]⁺

Mov3

Substanz	Stoffmenge [mmol]	Masse [mg]	Volumen [mL]	Äquivalent [eq]
1	0.079	30	-	1.0
33	0.158	40.5	-	2.0
EDC	0.316	60.6	-	4.0
HOBt	0.316	42.6	-	4.0
DIPEA	0.474	-	0.0826	6.0
TMSBr	-	-	0.5	-
DCM	-	-	10	-
MeOH / H ₂ O (3:1)	-	-	2	-

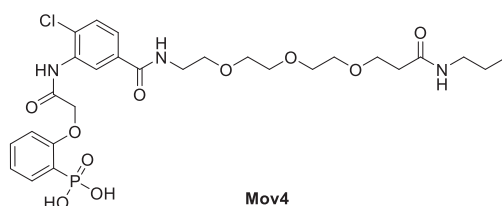
Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Methode C durchgeführt. Anschließend erfolgte ohne weitere Aufreinigung die Entschützung des Phosphonates nach der allgemeinen Methode D. Das Produkt wurde via HPLC gereinigt und konnte als leichtgelblicher Feststoff erhalten werden.

Ausbeute: 14.2 mg = 31 % (über zwei Stufen)

LC-MS (ESI): $t_R = 6.92$ min, 590.41 m/z $[M+H]^+$

¹H-NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄): δ 8.10 (t, $J = 1.9$ Hz, 1H), 7.91 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.82 – 7.74 (m, 1H), 7.61 – 7.53 (m, 2H), 7.42 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.17 – 7.12 (m, 2H), 4.81 (s, 2H), 3.36 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 3.10 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.15 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.64 – 1.57 (m, 4H), 1.52 – 1.46 (m, 2H), 1.35 – 1.28 (m, 14H), 0.90 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H).

Mov4



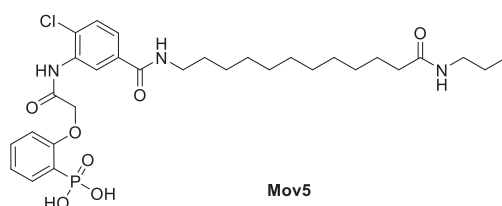
Substanz	Stoffmenge [mmol]	Masse [mg]	Volumen [mL]	Äquivalent [eq]
20	0.073	30	-	1.0
31	0.146	38.3	-	2.0
EDC	0.292	56.6	-	4.0
HOBt	0.292	39.5	-	4.0
DIPEA	0.438	-	0.0763	6.0
TMSBr	-	-	0.3	-
DCM	-	-	10	-
MeOH / H ₂ O (3:1)	-	-	2	-

Die Synthese erfolgte nach der allgemeinen Methode C. Daraufhin wurde ohne weitere Aufreinigung die Entschützung des Phosphonates nach der allgemeinen Methode D durchgeführt. Das Produkt wurde mittels HPLC aufgereinigt und konnte als weißer Feststoff erhalten werden.

Ausbeute: 7.6 mg = 17 % (über zwei Stufen)

LC-MS (ESI): $t_R = 4.91$ min, m/z 630.33 $[M+H]^+$

¹H-NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄): δ 7.98 (s, 1H), 7.70 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.59 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.46 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.38 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H), 7.29 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.24 – 7.12 (m, 2H), 7.01 (s, 2H), 3.99 – 3.91 (m, 2H), 3.54 (d, $J = 2.3$ Hz, 2H), 3.46 (s, 2H), 3.19 (s, 10H), 3.03 – 2.97 (m, 2H), 2.30 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 2.20 – 2.15 (m, 2H), 1.54 – 1.48 (m, 2H), 0.85 – 0.70 (m, 3H).

Mov5

Substanz	Stoffmenge [mmol]	Masse [mg]	Volumen [mL]	Äquivalent [eq]
20	0.073	30	-	1.0
33	0.146	37.4	-	2.0
EDC	0.292	56	-	4.0
HOBt	0.292	39.5	-	4.0
DIPEA	0.438	-	0.0763	6.0
TMSBr	-	-	0.5	-
DCM	-	-	8	-
MeOH / H ₂ O (3:1)	-	-	2	-

Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Methode C durchgeführt. Im Anschluss wurde ohne weitere Aufreinigung die Entschützung des Phosphonates nach der allgemeinen Methode D durchgeführt. Das Produkt wurde mittels HPLC gereinigt und konnte als gelber Feststoff erhalten werden.

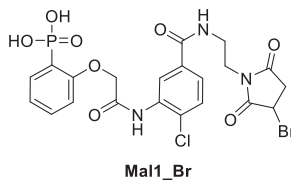
Ausbeute: 5.1 mg = 11 % (über zwei Stufen)

LC-MS (ESI): $t_R = 6.93$ min, 624.40 m/z $[M+H]^+$

¹H-NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄): δ 8.05 – 8.00 (m, 2H), 7.68 – 7.59 (m, 2H), 7.58 – 7.46 (m, 3H), 7.18 – 7.08 (m, 2H), 6.51 (s, 1H), 4.87 (s, 2H), 3.36 – 3.30 (m, 2H), 3.08 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 2.16 – 2.10 (m, 2H), 1.62 – 1.54 (m, 4H), 1.52 – 1.43 (m, 2H), 1.27 (d, $J = 6.8$ Hz, 14H), 0.88 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H).

7.10. Synthese der Maleimid-Verbindungen

Mal1_Br

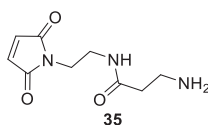


Substanz	Stoffmenge [mmol]	Masse [mg]	Volumen [mL]	Äquivalent [eq]
20	0.024	10	-	1.0
1-(2-Aminoethyl)- 1 <i>H</i> -pyrrol-2,5-dion	0.048	8.5	-	2.0
EDC	0.048	9.2	-	2.0
HOBt	0.048	6.5	-	2.0
DIPEA	0.144	-	0.025	4.0
DCM	-	-	5	-
TMSBr	-	-	0.5	-
MeOH / H ₂ O (3:1)	-	-	-	-

Die Synthese erfolgte nach der allgemeinen Methode C. Im Anschluss wurden das Phosphonat nach Methode D entschützt. Es folgte eine Aufreinigung mittels HPLC. Das Produkt konnte nach Gefriertrocknung als weißer Feststoff erhalten werden.

Ausbeute: 3.5 mg = 25 % (über zwei Stufen)

LC-MS (ESI): $t_R = 4.95$ min, m/z 587.99, 590.02 [M+H]⁺

3-Amino-N-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl)propanamid (35)

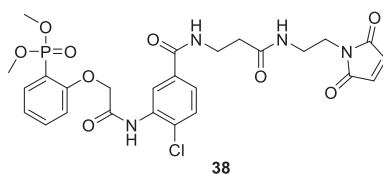
Substanz	Stoffmenge [mmol]	Masse [mg]	Volumen [mL]	Äquivalent [eq]
<i>N</i> -(2-Aminoethyl)-maleimid	0.17	30	-	1.0
Boc-β-Ala-OH	0.20	39	-	1.2
EDC	0.34	65	-	2.0
HOBt	0.34	46	-	2.0
DIPEA	1.02	-	0.178	6.0
DCM	-	-	5	-
4M HCl in Dioxan	-	-	3	-

Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode C durchgeführt. Das Rohprodukt wurde dann in einer 4 M-Lösung HCl in Dioxan aufgenommen. Es wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde anschließend destillativ entfernt und das Produkt am Hochvakuum getrocknet. Das Produkt konnte als gelber Feststoff erhalten werden.

Ausbeute: 34 mg = 80 % (über zwei Stufen)

LC-MS (ESI): t_R = 5.61 min, m/z 211.99 [M+H]⁺

Dimethyl-(2-(2-((2-chlor-5-((3-((2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl)-amino)-3-oxopropyl)carbamoyl)phenyl)-amino)-2-oxoethoxy)phenyl)-phosphonat (38)



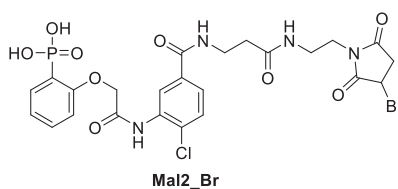
Substanz	Stoffmenge [mmol]	Masse [mg]	Volumen [mL]	Äquivalent [eq]
35	0.19	48	-	2.0
20	0.095	39	-	1.0
EDC	0.19	36	-	2.0
HOBt	0.19	26	-	2.0
DIPEA	0.57	-	0.104	6.0
DCM	-	-	5	-

Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode C durchgeführt. Das Produkt konnte als hochviskoses gelbes Öl erhalten werden.

Ausbeute: 48 mg = 83 %

LC-MS (ESI): $t_R = 5.98$ min, 607.00 m/z $[M+H]^+$

Mal2_Br



Substanz	Stoffmenge [mmol]	Masse [mg]	Volumen [mL]	Äquivalent [eq]
38	0.08	48	-	1.0
TMSBr	-	-	0.5	-

DCM	-	-	3	-
MeOH / H ₂ O (3:1)	-	-	3	-

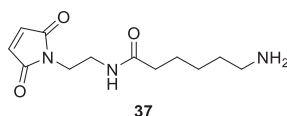
Die Entschützung des Phosphonates erfolgte nach der allgemeinen Methode D. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels HPLC gereinigt und das Produkt konnte als weißer Feststoff isoliert werden.

Ausbeute: 15.3 mg = 24 %

LC-MS (ESI): $t_R = 4.76$ min, m/z 658.92, 660.89 [M+H]⁺

¹H-NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄): δ 8.21 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 7.84 – 7.78 (m, 1H), 7.68 (dd, $J = 8.4, 2.2$ Hz, 1H), 7.62 – 7.54 (m, 2H), 7.21 – 7.14 (m, 2H), 4.90 (s, 2H), 4.81 (dd, $J = 8.5, 3.6$ Hz, 1H), 3.65 – 3.56 (m, 2H), 3.47 – 3.32 (m, 4H), 3.01 – 2.85 (m, 2H).

6-Amino-N-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl)hexanamid (37)



Substanz	Stoffmenge [mmol]	Masse [mg]	Volumen [mL]	Äquivalent [eq]
N-(2-Aminoethyl)-maleimid	0.43	76.4	-	1.0
6-Aminohexansäure	0.43	100	-	1.0
EDC	0.86	165	-	2.0
HOBt	0.86	58	-	2.0
DIPEA	2.58	-	0.45	6.0
DCM	-	-	8	-
4 M HCl in Dioxan	-	-	3	-

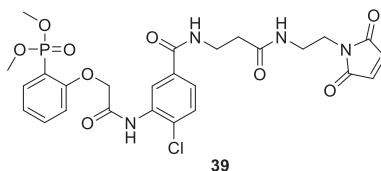
Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode D durchgeführt. Im Anschluss wurde das Rohprodukt mit 4 M HCl (in Dioxan) versetzt und es wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde destillativ entfernt und das Produkt

am Hochvakuum getrocknet. Das Produkt konnte als gelbes HCl-Salz erhalten werden.

Ausbeute: 101 mg = 81 % (über zwei Stufen)

LC-MS (ESI): $t_R = 1.47$ min, m/z 254.22 $[M+H]^+$

Dimethyl-(2-(2-((2-chlor-5-((6-((2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl)-amino)-6-oxohexyl)carbamoyl)phenyl)-amino)-2-oxoethoxy)phenyl)phosphonat (39)

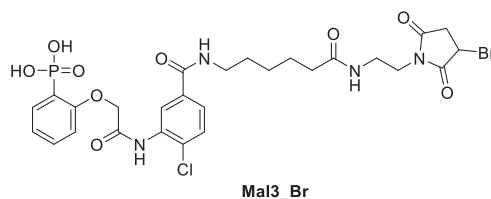


Substanz	Stoffmenge [mmol]	Masse [mg]	Volumen [mL]	Äquivalent [eq]
20	0.04	15	-	1.0
37	0.08	23.1	-	2.0
EDC	0.08	15	-	2.0
HOBt	0.08	11	-	2.0
DIPEA	0.24	-	0.042	6.0
DCM	-	-	5	-

Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode C durchgeführt. Das Produkt wurde als gelbes hochviskoses Öl erhalten.

Ausbeute: 23 mg = 90 %

LC-MS (ESI): $t_R = 6.28$ min, m/z 649.02 $[M+H]^+$

Mal3_Br

Substanz	Stoffmenge [mmol]	Masse [mg]	Volumen [mL]	Äquivalent [eq]
39	0.036	23.5	-	1.0
TMSBr	-	-	0.6	-
DCM	-	-	2	-
MeOH / H ₂ O (3:1)	-	-	2	-

Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode D durchgeführt. Das Rohprodukt wurde mittels HPLC gereinigt und konnte als weißer Feststoff erhalten werden.

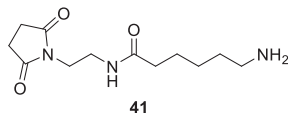
Ausbeute: 3.6 mg = 15 %

LC-MS (ESI): $t_R = 5.10$ min, m/z 701.04, 703.01 [M+H]⁺

¹H-NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄): δ 8.18 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 7.85 – 7.79 (m, 2H), 7.70 – 7.56 (m, 4H), 7.43 – 7.31 (m, 1H), 7.23 – 7.14 (m, 2H), 4.85 – 4.82 (m, 3H), 3.94 – 3.56 (m, 4H), 3.50 – 3.31 (m, 4H), 2.18 – 2.13 (m, 2H), 1.72 – 1.28 (m, 6H).

7.11. Synthese der Succinimid-Verbindungen

6-Amino-N-(2-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)ethyl)hexanamid (41)



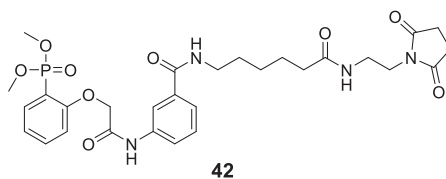
Substanz	Stoffmenge [mmol]	Masse [mg]	Volumen [mL]	Äquivalent [eq]
1-(2-Aminoethyl)- pyrrolidin-2,5-dion	0.56	100	-	1.0
6-(Boc-amino)- hexansäure	0.56	130	-	1.0
EDC	1.12	215	-	2.0
HOBt	1.12	151	-	2.0
DIPEA	3.36	-	0.585	6.0
DCM	-	-	10	-
4M HCl in Dioxan	-	-	4	-

Die Synthese erfolgte nach der allgemeinen Methode C. Das Produkt wurde anschließend mit 4 M HCl in Dioxan versetzt. Es wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde dann unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt am Hochvakuum getrocknet. Es folgte eine Aufreinigung mittels HPLC. Die Verbindung konnte als weißer Feststoff erhalten werden.

Ausbeute: 170 mg = 86 % (über zwei Stufen)

LC-MS (ESI): $t_R = 3.74$ min, m/z 256.13 $[M+H]^+$

Dimethyl-(2-(2-((3-((6-((2-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)ethyl)amino)-6-oxohexyl)-carbamoyl)phenyl)amino)-2-oxoethoxy)phenyl)phosphonat (42)



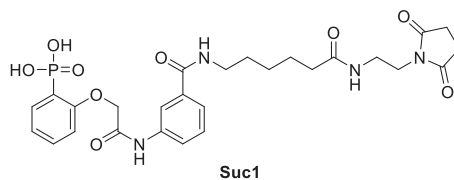
Substanz	Stoffmenge [mmol]	Masse [mg]	Volumen [mL]	Äquivalent [eq]
1	0.12	45	-	1.0
41	0.14	41.5	-	1.2
EDC	0.24	46	-	2.0
HOBt	0.24	32.4	-	2.0
DIPEA	0.72	-	0.125	6.0
DCM	-	-	10	-

Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode C durchgeführt. Das Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt.

Ausbeute: 38.4 mg = 52 %

LC-MS (ESI): $t_R = 5.97$ min, m/z 617.27 $[M+H]^+$

Suc1



Substanz	Stoffmenge [mmol]	Masse [mg]	Volumen [mL]	Äquivalent [eq]
42	0.06	38.4	-	1.0
TMSBr	-	-	0.5	-
DCM	-	-	2	-

MeOH / H ₂ O (3:1)	-	-	3	-
-------------------------------	---	---	---	---

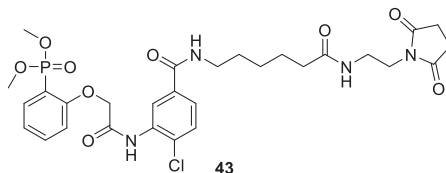
Die Abspaltung der Methoxygruppen erfolgte nach der allgemeinen Methode D. Das Produkt wurde anschließend mittels HPLC gereinigt und konnte als weißer Feststoff erhalten werden.

Ausbeute: 1.64 mg = 4.7 %

LC-MS (ESI): $t_R = 4.48$ min, m/z 589.29 [M+H]⁺

¹H-NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄): δ 8.01 (s, 1H), 7.85 – 7.81 (m, 1H), 7.72 – 7.66 (m, 1H), 7.53 – 7.41 (m, 2H), 7.36 – 7.25 (m, 2H), 7.09 – 7.01 (m, 2H), 6.84 – 6.73 (m, 1H), 4.72 (s, 2H), 3.49 – 3.47 (m, 2H), 3.33 – 3.25 (m, 4H), 2.55 (s, 4H), 2.09 – 2.02 (m, 2H), 1.58 – 1.50 (m, 4H), 1.36 – 1.25 (m, 2H).

Dimethyl-(2-(2-((2-chlor-5-((6-((2-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)ethyl)amino)-6-oxohexyl)carbamoyl)phenyl)amino)-2-oxoethoxy)phenyl)phosphonat (43)



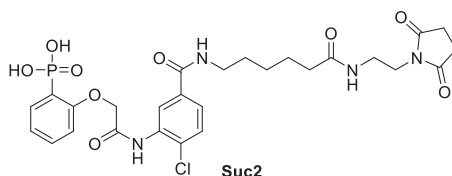
Substanz	Stoffmenge [mmol]	Masse [mg]	Volumen [mL]	Äquivalent [eq]
20	0.12	49.6	-	1.0
41	0.14	41.5	-	1.2
EDC	0.24	46	-	2.0
HOBt	0.24	32.4	-	2.0
DIPEA	0.72	-	0.125	6.0
DCM	-	-	10	-

Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode C durchgeführt. Das Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt.

Ausbeute: 32.8 mg = 42 %

LC-MS (ESI): $t_R = 5.93$ min, m/z 651.16 $[M+H]^+$

Suc2



Substanz	Stoffmenge [mmol]	Masse [mg]	Volumen [mL]	Äquivalent [eq]
43	0.05	32.8	-	1.0
TMSBr	-	-	0.5	-
DCM	-	-	2	-
MeOH / H ₂ O (3:1)	-	-	3	-

Die Synthese erfolgte nach der allgemeinen Methode D. Das Produkt wurde im Anschluss mittels HPLC gereinigt und konnte als weißer Feststoff isoliert werden.

Ausbeute: 4.9 mg = 16 %

LC-MS (ESI): $t_R = 4.54$ min, m/z 623.30 $[M+H]^+$

¹H-NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄): δ 8.17 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 8.02 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.93 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.79 – 7.76 (m, 1H), 7.67 – 7.64 (m, 1H), 7.61 – 7.54 (m, 1H), 7.21 – 7.12 (m, 2H), 4.90 (s, 3H), 3.60 – 3.56 (m, 2H), 3.40 – 3.34 (m, 4H), 2.65 (d, $J = 1.4$ Hz, 4H), 2.14 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.66 – 1.58 (m, 4H), 1.42 – 1.34 (m, 2H).

8. Literatur

1. Whitford, D., *Proteins: Structure and Function*. Wiley: 2013.
2. Desiraju, G. R., Chemistry beyond the molecule. *Nature* **2001**, 412 (6845), 35086640.
3. Overington, J. P.; Al-Lazikani, B.; Hopkins, A. L., How many drug targets are there? *Nature Reviews Drug Discovery* **2006**, 5, 993.
4. Hughes, J. P.; Rees, S.; Kalindjian, S. B.; Philpott, K. L., Principles of early drug discovery. *British Journal of Pharmacology* **2011**, 162 (6), 1239-1249.
5. van Dun, S.; Ottmann, C.; Milroy, L.-G.; Brunsveld, L., Supramolecular Chemistry Targeting Proteins. *Journal of the American Chemical Society* **2017**, 139 (40), 13960-13968.
6. Karsten Gloe, K. G., Holger Heßke, Leonard F. Lindoy, Supramolekulare Chemie: Vom Einzelmolekül zur komplexen Funktionseinheit. *Wissenschaftliche Zeitschrift der Technischen Universität Dresden* **2007**, 56 (Heft 1-2), 32-38.
7. Woodward, R. B., The total synthesis of vitamin B12. In *Pure and Applied Chemistry*, 1973; Vol. 33, p 145.
8. Franck, B.; Nonn, A., Novel Porphyrinoids for Chemistry and Medicine by Biomimetic Syntheses. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1995**, 34 (17), 1795-1811.
9. Jeffrey, G. A., *An Introduction to Hydrogen Bonding*. Oxford University Press: 1997.
10. Badjić, J. D.; Nelson, A.; Cantrill, S. J.; Turnbull, W. B.; Stoddart, J. F., Multivalency and Cooperativity in Supramolecular Chemistry. *Accounts of Chemical Research* **2005**, 38 (9), 723-732.
11. Ercolani, G., Assessment of Cooperativity in Self-Assembly. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125 (51), 16097-16103.
12. Lehn, J.-M., Supramolekulare Chemie – Moleküle, Übermoleküle und molekulare Funktionseinheiten (Nobel-Vortrag). *Angewandte Chemie* **1988**, 100 (1), 91-116.
13. H. Williams, D.; S. Westwell, M., Aspects of weak interactions. *Chemical Society Reviews* **1998**, 27 (1), 57-64.

14. Tobey, S. L.; Anslyn, E. V., Energetics of Phosphate Binding to Ammonium and Guanidinium Containing Metallo-Receptors in Water. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125* (48), 14807-14815.
15. Fischer, H. E.; Pinner, A., Sitzung vom 15. October 1894. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1894**, *27* (3), 2643-2658.
16. Steed, J. W.; Atwood, J. L., *Supramolecular Chemistry*. Wiley: 2009.
17. Desiraju, G. R., Chemistry beyond the molecule. *Nature* **2001**, *412*, 397.
18. Pedersen, C. J., Cyclic Polyethers and Their Complexes with Metal Salts. *Journal of the American Chemical Society* **1967**.
19. Cram, D. J.; Cram, J. M., Design of complexes between synthetic hosts and organic guests. *Accounts of Chemical Research* **1978**, *11* (1), 8-14.
20. Prins, L. J.; Reinhoudt, D. N.; Timmerman, P., Noncovalent Synthesis Using Hydrogen Bonding. *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40* (13), 2382-2426.
21. Garratt, P. J.; Ibbett, A. J.; Ladbury, J. E.; O'Brien, R.; Hursthouse, M. B.; Abdul Malik, K. M., Molecular design using electrostatic interactions. 1. Synthesis and properties of flexible tripodand tri- and hexa-cations with restricted conformations. Molecular selection of ferricyanide from ferrocyanide. *Tetrahedron* **1998**, *54* (5), 949-968.
22. Schalley, C. A., Analytical methods in supramolecular chemistry. 2., completely rev. and enl. ed. ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2012.
23. Le Fèvre, R. J. W., *Dipole moments : their measurement and application in chemistry*. Methuen: London, 1953.
24. Atkins, P. W., *Physical chemistry*. 3. ed., 3. [Dr.] H1 - D35 UOF1693(3)+6_d ed.; Freeman: New York, N.Y., 1986.
25. Kollman, P. A.; Allen, L. C., Theory of the hydrogen bond. *Chemical Reviews* **1972**, *72* (3), 283-303.
26. Gu, Y.; Kar, T.; Scheiner, S., Fundamental Properties of the CH \cdots O Interaction: Is It a True Hydrogen Bond? *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121* (40), 9411-9422.
27. Dzyaloshinskii, I. E.; Lifshitz, E. M.; Lev, P. P., GENERAL THEORY OF VAN DER WAALS' FORCES. *Soviet Physics Uspekhi* **1961**, *4* (2), 153.

28. Smithrud, D. B.; Sanford, E. M.; Chao, I.; Ferguson, S. B.; Carcanague, D. R.; Evanseck, J. D.; Houk, K. N.; Diederich, F., Solvent effects in molecular recognition. In *Pure and Applied Chemistry*, 1990; Vol. 62, p 2227.
29. A. Hunter, C.; Sanders, J., *The nature of TT-TT interactions*. 1990; Vol. 112, p 5525-5534.
30. Hunter, C. A.; Lawson, K. R.; Perkins, J.; Urch, C. J., Aromatic interactions. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* **2001**, (5), 651-669.
31. Kaufmann, L.; Schalley, C. A., Introduction. In *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 2012; pp 1-25.
32. Ma, J. C.; Dougherty, D. A., The Cation- π Interaction. *Chemical Reviews* **1997**, 97 (5), 1303-1324.
33. Frontera, A.; Gamez, P.; Mascal, M.; Mooibroek, T. J.; Reedijk, J., Anion- π -Wechselwirkungen ins rechte Licht gerückt. *Angewandte Chemie* **2011**, 123 (41), 9736-9756.
34. Estarellas, C.; Frontera, A.; Quiñonero, D.; Deyà, P. M., Relevant Anion- π Interactions in Biological Systems: The Case of Urate Oxidase. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, 50 (2), 415-418.
35. Caltagirone, C.; Gale, P. A., Anion receptor chemistry: highlights from 2007. *Chemical Society Reviews* **2009**, 38 (2), 520-563.
36. Schottel, B. L.; Chifotides, H. T.; Dunbar, K. R., Anion- π interactions. *Chemical Society Reviews* **2008**, 37 (1), 68-83.
37. Mareda, J.; Matile, S., Anion- π Slides for Transmembrane Transport. *Chemistry – A European Journal* **2009**, 15 (1), 28-37.
38. Gorteau, V.; Julliard, M. D.; Matile, S., Hydrophilic anchors for transmembrane anion- π slides. *Journal of Membrane Science* **2008**, 321 (1), 37-42.
39. Hedin, S. G., Trypsin and Antitrypsin. *Biochemical Journal* **1906**, 1 (10), 474-483.
40. Braun, P.; Gingras, A.-C., History of protein-protein interactions: From egg-white to complex networks. *PROTEOMICS* **2012**, 12 (10), 1478-1498.
41. De Las Rivas, J.; Fontanillo, C., Protein-Protein Interactions Essentials: Key Concepts to Building and Analyzing Interactome Networks. *PLoS Computational Biology* **2010**, 6 (6), e1000807.

42. Alberts, B., *Molecular biology of the cell*. 6. ed. ed.; Garland Science: New York, NY [u.a.], 2015.
43. Milroy, L.-G.; Grossmann, T. N.; Hennig, S.; Brunsveld, L.; Ottmann, C., Modulators of Protein–Protein Interactions. *Chemical Reviews* **2014**, *114* (9), 4695-4748.
44. Thiel, P.; Kaiser, M.; Ottmann, C., Small-Molecule Stabilization of Protein–Protein Interactions: An Underestimated Concept in Drug Discovery? *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51* (9), 2012-2018.
45. Rao, V. S.; Srinivas, K.; Sujini, G. N.; Kumar, G. N. S., Protein-Protein Interaction Detection: Methods and Analysis. *International Journal of Proteomics* **2014**, *2014*, 147648.
46. Perkins, J. R.; Diboun, I.; Dessailly, B. H.; Lees, J. G.; Orengo, C., Transient Protein-Protein Interactions: Structural, Functional, and Network Properties. *Structure* **2010**, *18* (10), 1233-1243.
47. Petta, I.; Lievens, S.; Libert, C.; Tavernier, J.; De Bosscher, K., Modulation of Protein–Protein Interactions for the Development of Novel Therapeutics. *Molecular Therapy* **2016**, *24* (4), 707-718.
48. Lounnas, V.; Ritschel, T.; Kelder, J.; McGuire, R.; Bywater, R. P.; Foloppe, N., CURRENT PROGRESS IN STRUCTURE-BASED RATIONAL DRUG DESIGN MARKS A NEW MINDSET IN DRUG DISCOVERY. *Computational and Structural Biotechnology Journal* **2013**, *5* (6), e201302011.
49. Schorpp, K.; Rothenaigner, I.; Salmina, E.; Reinshagen, J.; Low, T.; Brenke, J. K.; Gopalakrishnan, J.; Tetko, I. V.; Gul, S.; Hadian, K., Identification of Small-Molecule Frequent Hitters from AlphaScreen High-Throughput Screens. *Journal of Biomolecular Screening* **2014**, *19* (5), 715-726.
50. Introduction to Fluorescence. In *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Lakowicz, J. R., Ed. Springer US: Boston, MA, 2006; pp 1-26.
51. Silverman, L.; Campbell, R.; Broach, J. R., New assay technologies for high-throughput screening. *Current Opinion in Chemical Biology* **1998**, *2* (3), 397-403.
52. Arkin, M.; Glicksman, M.; Fu, H.; Havel, J.; Du, Y., *Inhibition of Protein-Protein Interactions: Non-Cellular Assay Formats*. 2017.
53. Instrumentation for Fluorescence Spectroscopy. In *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Lakowicz, J. R., Ed. Springer US: Boston, MA, 2006; pp 27-61.

54. Weber, G., Polarization of the fluorescence of macromolecules. 1. Theory and experimental method. *Biochemical Journal* **1952**, *51* (2), 145-155.
55. Grasso, A.; Roda, G.; Hogue-Angeletti, R. A.; Moore, B. W.; Perez, V. J., Preparation and properties of the brain specific protein 14-3-2. *Brain Research* **1977**, *124* (3), 497-507.
56. Freed, E.; Symons, M.; Macdonald, S.; McCormick, F.; Ruggieri, R., Binding of 14-3-3 proteins to the protein kinase Raf and effects on its activation. *Science* **1994**, *265* (5179), 1713-1716.
57. Aitken, A., 14-3-3 proteins: a historic overview. *Semin Cancer Biol* **2006**, *16* (3), 162-72.
58. Liu, D.; Bienkowska, J.; Petosa, C.; Collier, R. J.; Fu, H.; Liddington, R., Crystal structure of the zeta isoform of the 14-3-3 protein. *Nature* **1995**, *376*, 191.
59. van Hemert, M. J.; Steensma, H. Y.; van Heusden, G. P. H., 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis. *BioEssays* **2001**, *23* (10), 936-946.
60. Johnson, C.; Tinti, M.; Wood, N. T.; Campbell, D. G.; Toth, R.; Dubois, F.; Geraghty, K. M.; Wong, B. H. C.; Brown, L. J.; Tyler, J.; Gernez, A.; Chen, S.; Synowsky, S.; MacKintosh, C., Visualization and Biochemical Analyses of the Emerging Mammalian 14-3-3-Phosphoproteome. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP* **2011**, *10* (10), M110.005751.
61. Masters, S. C.; Fu, H., 14-3-3 Proteins Mediate an Essential Anti-apoptotic Signal. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276* (48), 45193-45200.
62. Fu, H.; Subramanian, R. R.; Masters, S. C., 14-3-3 Proteins: Structure, Function, and Regulation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **2000**, *40* (1), 617-647.
63. Ottmann, C.; Yasmin, L.; Weyand, M.; Veessenmeyer, J. L.; Diaz, M. H.; Palmer, R. H.; Francis, M. S.; Hauser, A. R.; Wittinghofer, A.; Hallberg, B., Phosphorylation-independent interaction between 14-3-3 and exoenzyme S: from structure to pathogenesis. *The EMBO Journal* **2007**, *26* (3), 902-913.
64. Rittinger, K.; Budman, J.; Xu, J.; Volinia, S.; Cantley, L. C.; Smerdon, S. J.; Gamblin, S. J.; Yaffe, M. B., Structural Analysis of 14-3-3 Phosphopeptide Complexes Identifies a Dual Role for the Nuclear Export Signal of 14-3-3 in Ligand Binding. *Molecular Cell* **1999**, *4* (2), 153-166.

65. Muslin, A. J.; Tanner, J. W.; Allen, P. M.; Shaw, A. S., Interaction of 14-3-3 with Signaling Proteins Is Mediated by the Recognition of Phosphoserine. *Cell* **84** (6), 889-897.
66. Anders, C.; Higuchi, Y.; Koschinsky, K.; Bartel, M.; Schumacher, B.; Thiel, P.; Nitta, H.; Preisig-Müller, R.; Schlichthörl, G.; Renigunta, V.; Ohkanda, J.; Daut, J.; Kato, N.; Ottmann, C., A Semisynthetic Fusicoccane Stabilizes a Protein-Protein Interaction and Enhances the Expression of K⁺ Channels at the Cell Surface. *Chemistry & Biology* **2013**, *20* (4), 583-593.
67. Aitken, A., 14-3-3 proteins: A historic overview. *Seminars in Cancer Biology* **2006**, *16* (3), 162-172.
68. Coblitz, B.; Wu, M.; Shikano, S.; Li, M., C-terminal binding: An expanded repertoire and function of 14-3-3 proteins. *FEBS Letters* **2006**, *580* (6), 1531-1535.
69. Panni, S.; Montecchi-Palazzi, L.; Kiemer, L.; Cabibbo, A.; Paoluzi, S.; Santonico, E.; Landgraf, C.; Volkmer-Engert, R.; Bachi, A.; Castagnoli, L.; Cesareni, G., Combining peptide recognition specificity and context information for the prediction of the 14-3-3-mediated interactome in *S. cerevisiae* and *H. sapiens*. *PROTEOMICS* **2011**, *11* (1), 128-143.
70. Ottmann, C., Small-molecule modulators of 14-3-3 protein-protein interactions. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2013**, *21* (14), 4058-4062.
71. Masters, S. C.; Fu, H., 14-3-3 proteins mediate an essential anti-apoptotic signal. *J Biol Chem* **2001**, *276* (48), 45193-200.
72. Mori, M.; Vignaroli, G.; Botta, M., Small molecules modulation of 14-3-3 protein-protein interactions. *Drug Discovery Today: Technologies* **2013**, *10* (4), e541-e547.
73. Schaschke, N.; Matschiner, G.; Zettl, F.; Marquardt, U.; Bergner, A.; Bode, W.; Sommerhoff, C. P.; Moroder, L., Bivalent inhibition of human β -tryptase. *Chemistry & Biology* **2001**, *8* (4), 313-327.
74. Gower, C. M.; Chang, M. E. K.; Maly, D. J., Bivalent Inhibitors of Protein Kinases. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* **2014**, *49* (2), 102-115.
75. Cox, K. J.; Shomin, C. D.; Ghosh, I., Tinkering outside the kinase ATP box: allosteric (type IV) and bivalent (type V) inhibitors of protein kinases. *Future Medicinal Chemistry* **2011**, *3* (1), 29-43.

76. Thiel, P.; Roglin, L.; Meissner, N.; Hennig, S.; Kohlbacher, O.; Ottmann, C., Virtual screening and experimental validation reveal novel small-molecule inhibitors of 14-3-3 protein-protein interactions. *Chemical Communications* **2013**, 49 (76), 8468-8470.
77. Kenner, G. W.; Williams, N. R., A method of reducing phenols to aromatic hydrocarbons. *Journal of the Chemical Society (Resumed)* **1955**, (0), 522-525.
78. Atherton, F. R.; Openshaw, H. T.; Todd, A. R., 174. Studies on phosphorylation. Part II. The reaction of dialkyl phosphites with polyhalogen compounds in presence of bases. A new method for the phosphorylation of amines. *Journal of the Chemical Society (Resumed)* **1945**, (0), 660-663.
79. Sibi, M. P.; Snieckus, V., The directed ortho lithiation of O-aryl carbamates. An anionic equivalent of the Fries rearrangement. *The Journal of Organic Chemistry* **1983**, 48 (11), 1935-1937.
80. Bonnaventure, I.; Charette, A. B., Probing the Importance of the Hemilabile Site of Bis(phosphine) Monoxide Ligands in the Copper-Catalyzed Addition of Diethylzinc to N-Phosphinoylimines: Discovery of New Effective Chiral Ligands. *The Journal of Organic Chemistry* **2008**, 73 (16), 6330-6340.
81. Mitra, A. W.; Hansen, M. M.; Laurila, M. E.; Kolis, S. P.; Martinelli, J. R., α -Aminoamides as ligands in Goldberg amidations. *Tetrahedron Letters* **2013**, 54 (48), 6580-6583.
82. Cui, J.; Jin, J.; Sagwal Chaudhary, A.; Hsieh, Y.-H.; Zhang, H.; Dai, C.; Damera, K.; Chen, W.; C Tai, P.; Wang, B., *Design, Synthesis and Evaluation of Triazole-Pyrimidine Analogues as SecA Inhibitors*. 2015; Vol. 11.
83. Waters, S. P.; Kozlowski, M. C., Synthesis of the isocoumarin portion of the rubromycins. *Tetrahedron Letters* **2001**, 42 (21), 3567-3570.
84. Valeur, E.; Bradley, M., Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *Chemical Society Reviews* **2009**, 38 (2), 606-631.
85. König, W.; Geiger, R., Eine neue Methode zur Synthese von Peptiden: Aktivierung der Carboxylgruppe mit Dicyclohexylcarbodiimid unter Zusatz von 1-Hydroxy-benzotriazolen. *Chemische Berichte* **1970**, 103 (3), 788-798.
86. Chougrani, K.; Niel, G.; Boutevin, B.; David, G., Regioselective ester cleavage during the preparation of bisphosphonate methacrylate monomers. *Beilstein J Org Chem* **2011**, 7, 364-8.

87. Gajewiak, J.; Xu, Y.; Lee, S. A.; Kutateladze, T. G.; Prestwich, G. D., Synthesis and Molecular Recognition of Phosphatidylinositol-3-methylenephosphate. *Organic letters* **2006**, *8* (13), 2811-2813.
88. Han, G.; Tamaki, M.; Hruby, V. J., Fast, efficient and selective deprotection of the tert-butoxycarbonyl (Boc) group using HCl/dioxane (4 m). *The Journal of Peptide Research* **2001**, *58* (4), 338-341.
89. Schneider, H.-J., Binding Mechanisms in Supramolecular Complexes. *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48* (22), 3924-3977.
90. Fraser, J. S.; van den Bedem, H.; Samelson, A. J.; Lang, P. T.; Holton, J. M.; Echols, N.; Alber, T., Accessing protein conformational ensembles using room-temperature X-ray crystallography. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2011**, *108* (39), 16247-52.

9. Anhang

9.1. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
Å	Ångström
aq.	lat. <i>aqua</i> (wässrig)
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
C	Konzentration
d	Duplett
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
dd	Dublett von Dublett
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
eq.	Äquivalente
ESI	Elektrosprayionisation
<i>et al.</i>	lat. <i>et alii</i> (und andere)
FP	Fluoreszenzpolarisation
g	Gramm

h	Stunde(n)
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>High pressure liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HTS	<i>High-Throughput-Screening</i> (Hochdurchsatz-Screening)
IC ₅₀	<i>half maximal inhibitory concentration</i> (mittlere inhibitorische Konzentration)
J	Kopplungskonstante
kDa	Kilodalton
l	Liter
LC/MS	<i>liquid chromatography mass spectrometry</i> (Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung)
Lsg.	Lösung
M	molar
M	Multipllett
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
min	Minute(n)
mL	Milliliter
mM	Millimolar
NMR	nuclear magnetic resonance (Kernspinresonanzspektroskopie)
pH	lat. pondus Hydrogenii
PPI	Protein-Protein-Interaktion

ppm	parts per million
R _f	Retentionsfaktor
RT	Raumtemperatur
t	Triplett
Tab.	Tabelle
t-Bu	<i>tert</i> -Butyl
TFA	<i>trifluoro acetic acid</i> (Trifluoressigsäure)
THF	Tetrahydrofuran
TLC	<i>thin layer chromatography</i> (Dünnschichtchromatographie)
TMSBr	Bromtrimethylsilan
t _R	Retentionszeit
UV	Ultraviolett
δ	Chemische Verschiebung
μ	mikro

9.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Die Entwicklung von der molekularen zur supramolekularen Chemie (modifiziert nach ¹²).	9
Abbildung 2 Struktur der Kronenether (1), Sphäranden (2) und Cryptanden (3) nach <i>Pedersen, Cram</i> und <i>Lehn</i> . ^{12, 18-19}	10
Abbildung 3 Elektrostatische Wechselwirkungen: ionische Wechselwirkung (links), Ion-Dipol-Wechselwirkung (Mitte), Dipol-Dipol-Wechselwirkung (rechts) (erstellt nach ¹⁶).	12
Abbildung 4 Zwei Möglichkeiten einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen einem Wasser- und einem Ammoniak-Molekül (modifiziert nach ²⁵⁻²⁶).	12
Abbildung 5 Mögliche Anordnungen der π -Systeme (erstellt nach ^{16, 30}).	14
Abbildung 6 Anordnung von Kation und π -System (erstellt nach ³²)	14
Abbildung 7 Schematische Darstellung der Quadrupolmomente von Benzol (links) und Hexafluorbenzol (Mitte) und des Anion-induzierten Dipols (rechts) (modifiziert nach ³³).	15
Abbildung 8 Selektive Bindung eines Proteins an ein anderes Molekül durch das Zusammenspiel mehrerer nicht-kovalenter supramolekularer Wechselwirkungen (modifiziert nach ⁴²).	16
Abbildung 9 Verschiedene Mechanismen der Modulation einer Protein-Protein-Interaktion (modifiziert nach ⁴⁷).	17
Abbildung 10 Prinzip der Fluoreszenz-Polarisation (modifiziert nach ⁵²).	19
Abbildung 11 Graphische Darstellung des Interaktoms der 14-3-3-Proteine. ⁶⁰	21
Abbildung 12 Kristallstruktur eines 14-3-3 Dimers (menschliche Zeta-Isoform): Die Farbbanddarstellung (links) und die die Oberflächendarstellung (rechts; Reste, die bei allen sieben menschlichen Isoformen vollständig konserviert sind, sind dunkelrot dargestellt) (modifiziert nach ⁶⁴).	22
Abbildung 13 Interaktionsformen des 14-3-3-Proteins.....	24
Abbildung 14 Stabilisierung und Inhibition von PPIs (modifiziert nach ⁴⁴).	25
Abbildung 15 Drei von <i>Botta et al.</i> entwickelte Inhibitoren für 14-3-3-Proteine: BV01 (links), BV02 (Mitte) und BV101 (rechts) (erstellt nach ⁷²).	26
Abbildung 16 Strukturen von Epibestatin (links) und Pyrrolidon (rechts) (erstellt nach ⁷⁰).	27
Abbildung 17 Von <i>Ottmann et al.</i> etabliertes 14-3-3-Inhibitorbindemotiv.....	28

Abbildung 18 Struktureller Aufbau des bivalenten Inhibitors Biv1.	29
Abbildung 19 Retrosynthese des Phosphophenoethers (1).....	30
Abbildung 20 Umsetzung von Phenol mit Dimethylphosphit zu Phosphat 2.....	31
Abbildung 21 Abstraktion einer Methylgruppe durch eine Base.	31
Abbildung 22 Mechanismus der Atherton-Todd-Reaktion (erstellt nach ⁷⁸).....	31
Abbildung 23 Chlorierung von Intermediat C.....	32
Abbildung 24 LDA-vermittelte Umlagerung zum Phosphonat.....	32
Abbildung 25 Synthese der Verbindung 4.	33
Abbildung 26 Verknüpfung der beiden Bausteine 3 und 4 zu Verbindung 5.....	33
Abbildung 27 Hydrolyse des Methylesters in Verbindung 5.....	34
Abbildung 28 Retrosynthese von Biv1.....	34
Abbildung 29 Syntheseweg von Verbindung 1 zu Biv1.	35
Abbildung 30 Synthese des Linkers 9.	36
Abbildung 31 Syntheserversuch zur Herstellung von Biv2.	37
Abbildung 32 Synthese der geschützten Säure 11.....	37
Abbildung 33 Synthese der Verbindung 13.	38
Abbildung 34 Synthese von Biv2.....	38
Abbildung 35 Retrosynthese für Biv3.	39
Abbildung 36 Synthese von Biv3.....	40
Abbildung 37 Monovalente Verbindung Mov1.....	40
Abbildung 38 Synthese von Mov1.....	41
Abbildung 39 FP-Messung für Biv1-Biv3.....	42
Abbildung 40 FP-Messung mit Mov1.....	43
Abbildung 41 Kristallstrukturen der Verbindungen Biv1 - Biv3.	44
Abbildung 42 Berechnete Linkerlängen der Verbindungen Biv1, Biv2 und Biv3.....	45
Abbildung 43 Abstand der dargestellten Strukturen.	46
Abbildung 44 Effekt verschiedener Substituenten am zweiten Aromaten/Alkylrest auf die Inhibition der Phosphophenoether. ⁷⁶	47
Abbildung 45 Strukturen der bivalenten Inhibitoren Biv4 und Biv5.	48
Abbildung 46 Synthese der chlorierten Verbindung 17.....	49
Abbildung 47 Synthese der Verbindung 18.	49
Abbildung 48 Umsetzung der Verbindungen 18 und 3 zum Phosphophenoether 19.	49
Abbildung 49 Verseifung von Verbindung 19.	50

Abbildung 50 Schematische Darstellung der Synthese von Biv4.	50
Abbildung 51 Synthese der chlorierten Verbindung 24.....	51
Abbildung 52 Substitutionsreaktion zum chlorierten Phosphophenoether 25.	51
Abbildung 53 Verseifung von 25 zur freien Säure 26.	52
Abbildung 54 Schematische Darstellung der Synthese von Biv5.	52
Abbildung 55 Ergebnisse der FP-Messungen für Biv4 und Biv5.	53
Abbildung 56 Struktureller Aufbau der monovalenten Verbindungen Mov2 bis Mov5.	55
Abbildung 57 Synthese der Linker 31 und 33.....	55
Abbildung 58 Syntheschema zur Darstellung der monovalenten Verbindungen. ..	56
Abbildung 59 Ergebnisse aus den FP-Messungen der monovalenten Verbindungen.	57
Abbildung 60 Kristallstruktur der Verbindung Mov2. A) Die Röntgenstrukturanalyse eines Mov2 : 14-3-3 ζ -Komplexes zeigt die Elektronendichte für das gesamte Molekül. B) Detaillierter Überblick über die molekularen Wechselwirkungen, die der Bindung von Mov2 an 14-3-3 ζ zugrunde liegen.....	59
Abbildung 61 Strukturen der Maleimid-Verbindungen Mal1, Mal2 und Mal3.	60
Abbildung 62 Syntheschema zur Herstellung der Maleimid-Linker 35 und 37.....	60
Abbildung 63 Schematische Darstellung der Synthese der Maleimid-Verbindungen.	61
Abbildung 64 Allgemeine Struktur der bromierten Maleimid-Verbindungen.	61
Abbildung 65 Ergebnisse der FP-Messungen der Maleimid-Verbindung Mal3_Br mit 14-3-3 σ (links) und 14-3-3 ζ (rechts).	62
Abbildung 66 Strukturen der Succinimid-Verbindungen Suc1 und Suc2.....	63
Abbildung 67 Synthese des Succinimid-Linkers 41.....	63
Abbildung 68 Allgemeines Syntheschema zur Herstellung der Succinimid- Verbindungen.....	64
Abbildung 69 Ergebnis der FP-Messung mit den Verbindungen Suc1 und Suc2.....	65

9.3. Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Chemische und supramolekulare Bindungen und ihre Energien (erstellt nach 6,16)	11
--	----

9.4. Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

9.5. Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

„Supramolekulare Liganden für 14-3-3-Proteine“

selbst verfasst und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen benutzt habe, und dass die Arbeit in dieser oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Universität eingereicht wurde.

Essen, im März 2018

9.6. Danksagung

Die Danksagung ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

