



JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ

Design, Synthese und biologische Evaluierung neuer TRP-Ionenkanal-Aktivatoren

Synthese und Reaktivität neuer Bortezomib- Kongenere mit diversen *Warheads* als potenzielle Proteasom-Inhibitoren

Dissertation zur Erlangung des Grades

„DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN“

im Promotionsfach Chemie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie, Geographie und Geowissenschaften der

Johannes Gutenberg-Universität Mainz

von

Kevin Schwickert

geboren in Bad Kreuznach

Mainz, 2020

Meinen Eltern gewidmet

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt und dabei alle benutzten Hilfsmittel (Literatur, Apparaturen, Material) angegeben habe. Ich versichere, dass wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut eindeutig kenntlich gemacht wurde. Diese Dissertation wurde noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht. Zudem wurden bisher weder die gleiche noch Teile der Arbeit als Dissertation bei einer anderen Fakultät oder einem anderen Fachbereich eingereicht.

Mainz, 09. Dezember 2020

Ort, Datum

Kevin Schwickert

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei zahlreichen Menschen bedanken, die mich gerade in den letzten Jahren während meiner Promotion begleitet und im großen Umfang unterstützt haben, was maßgeblich zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen hat.

Mein erster und ganz besonderer Dank gebührt meiner Doktormutter [REDACTED] für die freundliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die Bereitstellung mehrerer interessanter und aktueller Forschungsthemen. Ihr großes entgegengebrachtes Vertrauen und die umfangreiche Freiheit bei der Gestaltung und Bearbeitung der Forschungsprojekte war für meine persönliche und wissenschaftliche Entwicklung von großer Bedeutung. Ohne ihre kontinuierliche Unterstützung in Form vieler anregender Diskussionen, hilfreicher Ratschläge und stetige Förderung wäre die hierin beschriebene Arbeit so nicht möglich gewesen. Vielen, vielen Dank!

Mein großer Dank gilt ebenfalls meinem „Nachbarn“ [REDACTED] für die zahlreichen angenehmen und freundschaftlichen Gespräche. Sein stets offenes Ohr für jegliche Probleme oder Anliegen, die gutherzige Art sowie die regelmäßigen motivierenden Worte waren jedes Mal eine Bereicherung für mich. Außerdem hat mir die gemeinsame Zeit bei der Betreuung von Seminaren und Laborpraktika sehr viel Spaß gemacht.

Bei [REDACTED] bedanke ich mich für die Bereitschaft zur Begutachtung dieser Dissertation sowie für die Betreuung der vorangegangenen Diplomarbeit in seiner Arbeitsgruppe.

Im Rahmen meiner Promotion hatte ich zudem das Glück, an vielen Forschungs Kooperationen mitzuwirken. In diesem Zusammenhang möchte ich mich vor allem bei [REDACTED] für die Kooperation an vielen spannenden TRPML-Projekten sowie für die Integration in ihre Arbeitsgruppe bedanken. Zudem danke ich [REDACTED] und [REDACTED] für die freundschaftliche Zusammenarbeit an diesen Projekten. Weiterhin danke ich [REDACTED] für die gemeinsame Arbeit am TRPC6-Projekt und für die Bereitschaft zur Übernahme des Vorsitzes bei meiner mündlichen Promotionsprüfung. Mein großer Dank gilt auch [REDACTED] aus ihrer Arbeitsgruppe für die Durchführung vieler zellbasierter Tests.

Für die Kooperation an einer Vielzahl weiterer Projekte bedanke ich mich außerdem bei [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED] und [REDACTED]. [REDACTED]
[REDACTED] danke ich für das entgegengebrachte Vertrauen bei der Benutzung und Instandhaltung des Massenspektrometers. Ich danke [REDACTED] und [REDACTED]
[REDACTED] für die Realisierung zahlreicher analytischer Messungen. Mithilfe ihres

engagierten Einsatzes war eine zuverlässige und fundierte Charakterisierung vieler der synthetisierten Verbindungen möglich.

Bei der Gutenberg-Akademie möchte ich mich sowohl für die individuelle als auch finanzielle Förderung während meiner Promotion bedanken. Den Juniormitgliedern danke ich vor allem für den regelmäßigen Austausch und die gemeinsamen Unternehmungen. Mein großer Dank gilt ebenfalls [REDACTED] für seine Bereitschaft zur Übernahme des Mentorings, die damit verbundenen Gespräche und vielen Ratschläge in fachlicher und beruflicher Hinsicht.

[REDACTED] danke ich nicht nur herzlich für die große Unterstützung bei der Durchführung zahlreicher Enzymassays, sondern auch für die gelegentliche Versorgung mit Nervennahrung in Form von Schokolade. Ein großes Dankeschön gebührt auch [REDACTED] [REDACTED] und [REDACTED] [REDACTED] für die Umsetzung biologischer Experimente. Bei [REDACTED] möchte ich mich u. a. für seine Hilfestellungen und Ratschläge in Bezug auf computergestützte Methoden bedanken.

Danke an [REDACTED] [REDACTED] und [REDACTED], die mich im Rahmen von Forschungsmodulen bei der Laborarbeit unterstützt haben.

Ein sehr großer Dank gilt meinen Freunden und Kollegen innerhalb und außerhalb des Arbeitskreises sowie allen Ehemaligen für das freundschaftliche und sehr angenehme Arbeitsklima. Wir hatten eine wunderbare gemeinsame Zeit, welche auch häufig außerhalb des Labors stattfand und die ich immer in sehr guter Erinnerung behalten werde. In diesem Zusammenhang bedanke ich mich vor allem bei der „Korea-Crew“ ([REDACTED]) für die erholsamen Tage in Seoul und Sokcho. 감사합니다!

Ich bedanke mich bei [REDACTED] sowie [REDACTED] für die gewissenhafte und kritische Durchsicht Teile dieser Arbeit und die vielen hilfreichen Anmerkungen.

Ich danke all meinen Freunden und meinem Bruder [REDACTED] für die wunderbare Zeit außerhalb des Labors sowie [REDACTED] für ihre stets aufmunternden Worte und die kontinuierliche Unterstützung gerade in den letzten Monaten.

Abschließend gilt mein größter Dank meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, für den Rückhalt sowie die unermüdliche moralische Unterstützung zu jeder Zeit. Ihr stetiger Zuspruch bestärkte mich immer wieder, nicht aufzugeben und selbst in schwierigen Phasen das Ziel nicht aus den Augen zu verlieren. Zudem wäre das vorangegangene Studium durch ihre finanzielle Unterstützung nicht möglich gewesen, weshalb ich ihnen sehr dankbar bin. Ihnen sei diese Arbeit daher gewidmet.

Vielen Dank!

Zusammenfassung

Mutationen im humanen TRPML1-Ionenkanal sind für die autosomal-rezessive lysosomale Speicherkrankheit *Mucopolysaccharidose Typ IV* (MLIV) verantwortlich, die klinisch vor allem durch tiefgreifende neurobiologische Entwicklungsstörungen, neuroretinale Degeneration sowie Eisenmangelanämie charakterisiert ist. Der synthetische TRPML1-Agonist **MK6-83** kann die Funktion spezifischer, mutierter TRPML1-Isoformen wiederherstellen, jedoch sind die genaue Lage der Bindungsstelle innerhalb des Ionenkanals und die zugrunde liegenden Aktivierungsmechanismen bisher noch nicht bekannt. Zur Aufklärung der Schlüsselinteraktionen zwischen dem Liganden und dem Rezeptor wurden zwei photoreaktive (Trifluormethyl)diazirin-basierte Analoga entwickelt, synthetisiert und in umfassenden Photoaktivierungsstudien mittels ¹⁹F-NMR-Spektroskopie und HPLC-MS-Analyse kinetisch evaluiert. Diese photoaktivierbaren TRPML1-Agonisten stellen sehr nützliche und wertvolle Werkzeuge für die Identifizierung der Bindestelle von **MK6-83** mithilfe von *Photoaffinity Labeling* in Kombination mit einem Proteomik-Massenspektrometrie-Ansatz dar, sodass das strukturbasierte Design neuer und potenterer TRPML-Aktivatoren zur Behandlung der *Mucopolysaccharidose Typ IV* maßgeblich gefördert werden kann. Zudem wurden detaillierte Analysen mithilfe fortgeschrittener, computergestützter Methoden basierend auf der hochauflösenden Kristallstruktur der extracytosolischen/luminalen Domäne (ELD) des humanen TRPML2-Kanals durchgeführt, sodass ein signifikanter Beitrag zu dessen strukturellen und funktionellen Charakterisierung geleistet wurde. Im Rahmen eines Design- und Synthesesyklus wurden darüber hinaus >45 neue potenzielle TRPML- sowie TRPC6-Aktivatoren auf Grundlage bekannter Agonisten entwickelt. Anhand der Befunde aus zukünftigen biologischen Studien könnten mögliche Struktur-Wirkungs-Beziehungen abgeleitet und wertvolle Informationen zur Entwicklung potenterer und selektiverer Liganden für die Behandlung von MLIV bzw. Depressionen gewonnen werden.

Proteasom-Inhibitoren haben sich in den letzten Jahren in der Klinik zur Behandlung verschiedener nicht-solider Tumore wie dem Multiplen Myelom oder dem Mantelzell-Lymphom bewährt. Ihre therapeutische Anwendung ist jedoch aufgrund der Toxizität und der damit verbundenen häufig auftretenden, schwerwiegenden Nebenwirkungen limitiert, weshalb nach wie vor großes Interesse an der Entwicklung neuer und selektiverer Proteasom-Inhibitoren besteht. Um die Sicherheit von Proteasom-Hemmstoffen zu verbessern und eine spezifischere Inhibition durch Modulation der Reaktivität zu gewährleisten, wurden neuartige Moleküle auf Grundlage des hochaffinen Proteasom-Inhibitors Bortezomib konzipiert. Es wurden verschiedene bisher unerforschte elektrophile *Warheads* in das peptidomimetische Grundgerüst integriert, wobei das Inhibitordesign durch (nicht-)kovalente molekulare Dockingstudien und Analyse der resultierenden Bindemodi unterstützt wurde. Die potenziellen Inhibitoren wurden in umfangreichen Synthesen und Analysen erfolgreich dargestellt und in ersten biologischen Assays an der Chymotrypsin-ähnlichen Untereinheit des humanen 20S-Proteasoms zur Einordnung ihrer *in vitro*-Wirksamkeit evaluiert.

Abstract

Mutations in the human TRPML1 channel, a member of the mucolipin subfamily of the *Transient Receptor Potential* (TRP) ion channels, are responsible for the autosomal recessive lysosomal storage disease *Mucopolipidosis Type IV* (MLIV) which is clinically characterized by profound neurobiological developmental disorders, neuroretinal degeneration and iron deficiency anemia. The synthetic TRPML1 agonist **MK6-83** can restore the function of specific TRPML1 mutant isoforms but the exact location of the binding site within the ion channel and the underlying mechanisms of activation remain unknown. To elucidate the key interactions between the ligand and the receptor, two photoreactive (trifluoromethyl)diazirine-based analogues were developed, synthesized, and kinetically evaluated in comprehensive photoactivation studies by ¹⁹F-NMR spectroscopy and HPLC-MS analysis. These photoactivatable TRPML1 agonists represent very useful and valuable tools for the identification of the binding site of **MK6-83** via photoaffinity labeling in combination with a proteomics mass spectrometry approach. The knowledge gained from these studies will significantly enhance the structure-based design of new and more potent TRPML activators for the treatment of *Mucopolipidosis type IV*. Furthermore, detailed analyses on the high-resolution crystal structure of the extracytosolic/luminal domain (ELD) of the human TRPML2 channel were performed using advanced computer-based methods, thus making a significant contribution to its structural and functional characterization. In addition, >45 new potential TRPML and TRPC6 activators based on known agonists were developed in design and synthesis cycles for their biological evaluation in subsequent experiments and future projects. These findings could be used to derive possible structure-activity relationships and could provide valuable information for the development of more potent as well as selective ligands for the treatment of MLIV and depression, respectively.

Proteasome inhibitors have been clinically proven in recent years for the treatment of various non-solid tumors such as multiple myeloma or mantle cell lymphoma. However, their therapeutic application is limited due to their toxicity and the associated frequent and serious side effects, highlighting the great interest in the development of new and more selective inhibitors. To improve the safety profile of proteasome inhibitors and to ensure a more specific inhibition by modulating their reactivity, novel molecules based on the high-affinity proteasome inhibitor Bortezomib have been designed. The inhibitor design included several previously unexplored electrophilic warheads that were integrated into the peptidomimetic backbone and was supported by (non-)covalent molecular docking studies and analysis of the resulting binding modes. These potential proteasome inhibitors were successfully synthesized and evaluated in first biological assays on the chymotrypsin-like subunit of the human 20S proteasome to determine their efficacy *in vitro*.

Inhaltsverzeichnis

Erklärung	vii
Danksagung.....	ix
Zusammenfassung.....	xi
Abstract.....	xii
Inhaltsverzeichnis	xiii
Bemerkungen.....	xv
Abkürzungsverzeichnis	xix
I Design, Synthese und biologische Evaluierung neuer TRP-Ionenkanal-Aktivatoren ..	1
1 Einleitung.....	1
1.1 <i>Transient Receptor Potential</i> (TRP)-Ionenkanäle.....	1
1.2 Photoaffinitätsmarkierung (<i>Photoaffinity Labeling</i>).....	18
2 Projektübersicht	27
3 Design, Synthese und photochemische Charakterisierung von (Trifluormethyl)- diazirin-basierten TRPML1-Liganden	29
3.1 Einleitung, Motivation und Vorarbeiten.....	29
3.2 Manuskript.....	35
3.3 Ansätze zur Identifikation potenzieller Bindestellen in der humanen TRPML1-ELD	71
4 Struktur der ELD des humanen TRPML2-Ionenkanals.....	77
4.1 Zusammenfassung und eigener Beitrag	77
4.2 Publikation	82
5 Synthese von (potenziellen) TRPML-Aktivatoren	113
5.1 Einleitung und Zielsetzung	113
5.2 Ergebnisse und Diskussion.....	115
5.3 Resazurin-basierter Zellviabilitätstest.....	120
5.4 Zusammenfassung und Ausblick.....	121
6 TRPC6-Aktivatoren.....	123
6.1 Einleitung und Zielsetzung	123
6.2 Ergebnisse und Diskussion.....	126
6.3 Zusammenfassung und Ausblick.....	133
II Synthese und Reaktivität neuer Bortezomib-Kongenere mit diversen <i>Warheads</i> als potenzielle Proteasom-Inhibitoren.....	135
7 Synthese und Reaktivität neuer Bortezomib-Kongenere mit diversen <i>Warheads</i>	137
7.1 Einleitung.....	137

7.2	Motivation und Zielsetzung	149
7.3	Ergebnisse und Diskussion	151
7.4	Zusammenfassung und Ausblick	184
III	Sonstige Projekte	189
8	Synthese des kovalenten <i>Cdu1</i> -Inhibitors HJR108	191
8.1	Einleitung	191
8.2	Zusammenfassung und eigener Beitrag	193
9	Ruthenium(II)- und Palladium(II)- homo- und heterobimetallische Komplexe: Synthese, Kristallstrukturen, theoretische Berechnungen und biologische Studien	199
9.1	Einleitung	199
9.2	Zusammenfassung und eigener Beitrag	201
9.3	Publikation.....	204
IV	Experimenteller Teil und Anhang	223
10	Experimenteller Teil	225
10.1	Allgemeine Methoden und Messgeräte	225
10.2	Kinetische Analysen der Diazirinphotolyse	232
10.3	Photoaffinitätsmarkierung.....	233
10.4	Fluorimetrische Assays.....	233
10.5	Computergestützte Datenanalyse/Docking	236
10.6	Versuchsvorschriften zu Kapitel 3	238
10.7	Versuchsvorschriften zu Kapitel 5	257
10.8	Versuchsvorschriften zu Kapitel 6	285
10.9	Versuchsvorschriften zu Kapitel 7	312
10.10	Versuchsvorschriften zu Kapitel 8	354
11	Literaturverzeichnis	361
12	Anhang	383
12.1	NMR-Spektren	383
12.2	Kristallstrukturanalyse	506
12.3	Zusätzliche Daten zum PAL der TRPML1-ELD.....	538
12.4	Testung an Cysteinproteasen	539
	Curriculum Vitae	540

Bemerkungen

Im Rahmen der hier beschriebenen Promotion ergaben sich verschiedene Kooperationen in den einzelnen Forschungsprojekten. [REDACTED] sowie [REDACTED] (Department Chemie, Abt. Biochemie) waren maßgeblich am TRPML-Projekt (Expression der Proteine, Bestimmung der Kristallstruktur der extrazellulären/luminalen Domäne des humanen TRPML2-Ionenkanals) beteiligt. [REDACTED] (AK Prof. [REDACTED]) realisierte viele biologische Untersuchungen potenzieller Aktivatoren am TRPC6-Kanal in zellbasierten Tests. [REDACTED] sowie [REDACTED] ([REDACTED], Institut für Immunologie, Universitätsmedizin Mainz) führten die tryptischen Verdauung sowie die anschließenden massenspektrometrischen Analysen nach den Photoaffinitätsmarkierungs-Experimenten durch. [REDACTED] und [REDACTED] bestimmten die Kristallstrukturen der synthetisierten Diazirine. [REDACTED] ermöglichte durch die Durchführung zahlreicher Enzymassays eine rasche Bearbeitung des Proteasom-Projektes. Die Laborarbeit wurde zudem durch sieben studentische Forschungspraktika (je vier bis sechs Wochen; aufgeführt in chronologischer Reihenfolge) unterstützt:

- [REDACTED] („Synthese eines potenziellen Taspase1-Inhibitors“)
- [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] („Synthese und Charakterisierung potenzieller Taspase1-Inhibitoren“)
- [REDACTED] („Synthese eines modifizierten Aktivators zur Photoaffinitätsmarkierung von TRPML1-Kanälen“)
- [REDACTED] („Synthese von 6-Benzyl-2,4-diisovalerylphloroglucinolderivaten als potenzielle TRPC6-Aktivatoren“)
- [REDACTED] („Synthese eines modifizierten TRPML-Aktivators mit photoreaktiver Trifluormethyl-Diazirineinheit“)
- [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] („Synthese von TRPC6-Aktivatoren mit verschiedenen C5-Arylderivaten“)
- [REDACTED] („Synthese des Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP)-Inhibitors Rucaparib“)

Die Beiträge dieser sowie anderer nicht hier aufgeführter Personen (Testungen an anderen Enzymen sowie Zelltoxizitätsbestimmungen) sind an den betreffenden Stellen klar kenntlich gemacht.

Darüber hinaus wurden während des Promotionsvorhabens einige Bachelor- und Masterarbeiten im Studiengang Chemie/Biomedizinische Chemie konzipiert und betreut (aufgeführt in chronologischer Reihenfolge):

- [REDACTED] („Triazoldicarbonsäurederivate als potenzielle Aspartat-Mimetika“ – Bachelorarbeit (Juni 2017))
- [REDACTED] („Design und Synthese neuer Proteasominhibitoren“ – Masterarbeit (November 2017))
- [REDACTED] („Synthese und Modifikation von PARP-Inhibitoren zu Vorstufen von drug conjugates“ – Bachelorarbeit (November 2018))
- [REDACTED] („Synthese und Design von Poly(ADP-Ribose)Polymerase (PARP)-Inhibitoren“ – Masterarbeit (Mai 2019))
- [REDACTED] („Synthese und Testung neuer potenzieller Proteasom-Inhibitoren“ – Masterarbeit (September 2019))
- [REDACTED] („Etablierung neuer Syntheserouten zur Darstellung potenzieller 20S-Proteasominhibitoren“ – Masterarbeit (September 2019))

Publikationen der im Rahmen dieser Dissertation erhaltenen Ergebnisse:

- K. Schwickert, M. Andrzejewski, S. Grabowski, T. Schirmeister, *Synthesis, X-ray Structure Determination and Comprehensive Photochemical Characterization of (Trifluoromethyl)-diazirine-containing TRPML1 Ligands*, *J. Org. Chem.*, submitted.

Eigener Beitrag: Strategisches Design und Synthese der neuen (Trifluormethyl)diazirin-basierten TRPML1-Liganden, Photoaktivierungsstudien (kinetische Charakterisierung der photochemischen Reaktion) mittels ¹⁹F-NMR und HPLC-MS-Analysen, Verfassen der dazugehörigen Abschnitte (inkl. Erstellung der Abbildungen) in der Publikation sowie der *Supplementary Information* (SI).

- K. K. Viet, A. Wagner, K. Schwickert, N. Hellwig, M. Brennich, N. Bader, T. Schirmeister, N. Morgner, H. Schindelin, U. A. Hellmich, *Structure of the Human TRPML2 Ion Channel Extracytosolic/Luminal Domain*. *Structure* **2019**, 27, 1246–1257.e5

Eigener Beitrag: Datenanalyse und Interpretation (v. a. Vergleich der humanen TRPML1-, 2- und 3-ELDs, Berechnung der Porendimensionen mit HOLE, Kalkulation der elektrostatischen Potentialoberflächen, Erstellung des Homologiemodells für TRPML2, paarweises Strukturalignment der drei humanen TRPML-Kanal-ELDs), Verfassen der dazugehörigen Abschnitte (inkl. Erstellung der Abbildungen) in der Publikation sowie der *Supplementary Information* (SI).

Weitere Veröffentlichungen aus der Zeit im Arbeitskreis [REDACTED]:

- B. Askari, H. Amiri Rudbari, N. Micale, T. Schirmeister, T. Efferth, E.-J. Seo, G. Bruno, K. Schwickert, *Ruthenium(II) and palladium(II) homo- and heterobimetallic complexes: synthesis, crystal structures, theoretical calculations and biological studies*. *Dalton Trans.* **2019**, *48*, 15869–15887.

Eigener Beitrag: Durchführung von Stabilitätsstudien mittels UV/Vis-Spektroskopie und HPLC-ESI-MS sowie Analyse des Fragmentierungsmusters der Massenspektren; Verfassen des entsprechenden Parts des Manuskripts/der *Supplementary Information* (SI).

- M. Konhäuser, E. Steiert, K. Schwickert, T. Schirmeister, P. R. Wich, *Coencapsulation of L-Asparaginase and Etoposide in Acetalated-Dextran Nanoparticles for the Treatment of CML*, in preparation.

Eigener Beitrag: Methodenetablierung und Durchführung von HPLC-ESI-MS-Analysen.

Abkürzungsverzeichnis

$\tilde{\nu}$	Wellenzahl
Å	Ångström
abs.	absolut
Ac	Acetyl
AMC	7-Amino-4-methylcoumarin
app.	<i>apparent</i>
aq.	wässrig
Äq./Äquiv.	Äquivalent(e)
Ar	Aryl
Arg	Arginin
ATR	<i>Attenuated Total Reflection</i> /abgeschwächte Totalreflexion
ber.	Berechnet
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl
br	breit
Bu	Butyl
Bz	Benzoyl
<i>c</i>	Konzentration (für die Polarimetrie in g/100 mL)
CD	<i>Circular Dichroism</i> (Circulardichroismus)
^c Hex	Cyclohexan
ChlaDub1/Cdu1	<i>Chlamydia trachomatis deubiquitinase 1</i>
CID	<i>Collision-Induced Decay</i>
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
CP	<i>Core Particle</i>
CT	<i>Chlamydia trachomatis</i>
d	Dublett
d. r.	<i>diastereomeric ratio</i>
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
Dabcyl	4-((4-(Dimethylamino)phenyl)azo)benzoesäure

DBA	Dibenzylidenacetone
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DIPEA	Diisopropylethylamin
D ⁱ Q	Dihydroisochinolin
DMAP	4- <i>N,N</i> -(Dimethylamino)pyridin
DME	Ethylenglycoldimethylether
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dppf	1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen
DQ	Dihydrochinolin
DTT	Dithiothreitol
E	Enzym
Edans	5-((2-Aminoethyl)amino)naphthalen-1-sulfonsäure
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
ELD	<i>Extracytosolic/Luminal Domain</i>
ESI	Elektrosprayionisation
Et	Ethyl
FGI	<i>Functional Group Interconversion</i>
FT	<i>Fourier Transform</i>
ges.	gesättigt
Glu	Glutaminsäure/Glutamat
$h \cdot \nu$	Licht(einwirkung)
hept	heptett
Hex	Hexan bzw. Hexyl
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HMDS	Hexamethyldisilazid
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> / Hochleistungs-Flüssigchromatographie

HRMS	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i> /hochaufgelöste Massenspektrometrie
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
HWE	<i>Horner-Wadsworth-Emmons</i>
I	Inhibitor
<i>i</i>	<i>iso</i>
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
Ind	2,3-Dihydro-1 <i>H</i> -indol/Indolin
IR	Infrarotspektroskopie
ISC	<i>Intersystem Crossing</i>
<i>J</i>	Kopplungskonstante
Kat./kat.	Katalysator/katalytisch
KHMDS	Kaliumhexamethyldisilazid
konz.	konzentriert
LED	<i>Light-Emitting Diode</i> /Leuchtdiode
Leu	Leucin
Lit.	Literatur
LM	Lösemittel
Lsg.	Lösung
Lys	Lysin
<i>m</i>	<i>meta</i>
M	Molarität (Stoffmengenkonzentration in mol/L)
m	Multiplett
<i>m/z</i>	Masse/Ladungs-Verhältnis (Massenspektrometrie)
max	maximal
<i>m</i> CPBA	<i>m</i> -Chlorperbenzoesäure
Me	Methyl
MOE	<i>Molecular Operating Environment</i>
mol%	Molprozent (1 mol% = 0.01 Äquiv.)
Mor	Morpholin/Morpholino
MS	Massenspektrometrie

MSH	<i>O</i> -Mesitylsulfonyl-Hydroxylamin
<i>n</i>	normal bzw. primär (gebundener Rest/Substituent)
NaHMDS	Natriumhexamethyldisilazid/Natrium-bis(trimethylsilyl)amid
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect/Enhancement Spectroscopy</i>
<i>o</i>	<i>ortho</i>
ORTEP	<i>Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot Program</i>
<i>p</i>	<i>para</i>
p	Pentett
PAL	<i>Photoaffinity Labeling/Photoaffinitätsmarkierung</i>
Pd/C	Palladium auf Aktivkohle
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
Pent	Pentan bzw. Pentyl
PFP	Pentafluorphenyl
Ph	Phenyl
PhtIm	Phthalimid
PIFA	Phenyliod(III)bis(trifluoracetat)/[Bis(trifluoracetoxy)iod]benzol
Pip	Piperidin(yl)
PIP ₂	Phosphatidylinositolbisphosphat
ppm	<i>parts per million</i>
Pr	Propyl
präp.	präparativ
<i>p</i> TsCl	<i>para</i> -Toluolsulfonsäurechlorid
Pyr	Pyrimidin
Pyz	Pyrazin(yl)
q	Quartett
quant.	quantitativ
quin.	Quintett
R	Rest (Substituent)

Ref.	Referenz
R_f	<i>Ratio of Fronts</i>
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation (of atomic positions)</i>
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
SAR	<i>Structure Activity Relationship/Struktur-Aktivitäts-Beziehung</i>
SAXS	<i>Small Angle X-Ray Scattering</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate/Natriumdodecylsulfat</i>
sept.	Septett
Smb.	Schmelzbereich
Suc	Succinyl
T	Temperatur
t	tertiär (auch <i>tert</i>)
t	Triplett
T3P®	1-Propanphosphonsäureanhydrid-Lösung
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
<i>TbMLP</i>	<i>Trypanosoma brucei Mucolipin-Like Protein</i>
TBTU	2-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluoroborat
Tf	Trifluormethansulfonyl-, Triflyl-
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
Thio	Thiophen
Thr	Threonin
TMQ	2,2,4-Trimethyl-1,2-dihydrochinolin
t_R	Retentionszeit
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRP(ML)	<i>Transient Receptor Potential (Mucolipin)</i>
Ts	Tosyl (<i>p</i> -Toluolsulfonyl)
Tyr	Tyrosin
ü. N.	über Nacht

UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
UV	Ultraviolettstrahlung (UV-C/B/A: $\lambda = 100\text{--}280/280\text{--}315/315\text{--}380$ nm)
Val	Valin
Vis	<i>visible</i> bzw. sichtbarer Spektralbereich
Z	Benzyloxycarbonyl (-Schutzgruppe)
δ	chemische Verschiebung
λ	Wellenlänge

Griechische Buchstaben (δ , λ , ν) sind in das deutsche Alphabet integriert. SI-Einheiten, physikalische Konstanten und gängige Abkürzungen sind nicht aufgeführt.



Teil I

Design, Synthese und biologische Evaluierung neuer
TRP-Ionenkanal-Aktivatoren

1 Einleitung

1.1 *Transient Receptor Potential* (TRP)-Ionenkanäle

Ionenkanäle spielen eine zentrale Rolle beim Transfer geladener Ionen (v. a. Na^+ , K^+ , Cl^- , Mg^{2+} und Ca^{2+}) über impermeable Membranen von menschlichen Zellen sowie die der darin befindlichen Organellen.^[1-2] Sie fungieren als molekulare Schalter, die den selektiven Transport von mehr als zehn Millionen Ionen pro Sekunde entlang eines Konzentrationsgradienten ermöglichen.^[3-4] Diese präzise und zeitlich kontrollierte freigesetzte elektrische Energie ist relevant für die Steuerung einer Vielzahl physiologischer Prozesse wie z. B. die Kommunikation zwischen den Zellen (Synapsen), Reizweiterleitung, Kontraktion von Muskulatur, Signaltransduktion und Kontrolle der zellulären Homöostase. Die Fähigkeit minimale umweltbedingte Änderungen wahrzunehmen und adäquat auf diese zu reagieren, ist für alle Lebewesen essenziell.^[5] Beispielsweise ermöglichen Ionenkanäle in Hautzellen, thermische Schwankungen über einen bestimmten Schwellenwert hinaus (Hitze oder Kälte) zu registrieren, sodass infolge des Ionenflusses und der Reizweiterleitung zum Gehirn eine Reflexreaktion ausgelöst wird, die eine weitere Schädigung des Gewebes unterbindet.^[6-7] Viele Ionenkanäle stellen somit zelluläre Sensoren dar, die chemische und physikalische Fluktuationen in der äußeren oder inneren Umgebung der Zelle in (elektrische) Signale, v. a. über Ca^{2+} -Ionen als *second messenger*, umwandeln und somit unter anderem eine Anpassungs- und Schutzfunktion ausüben.^[5]

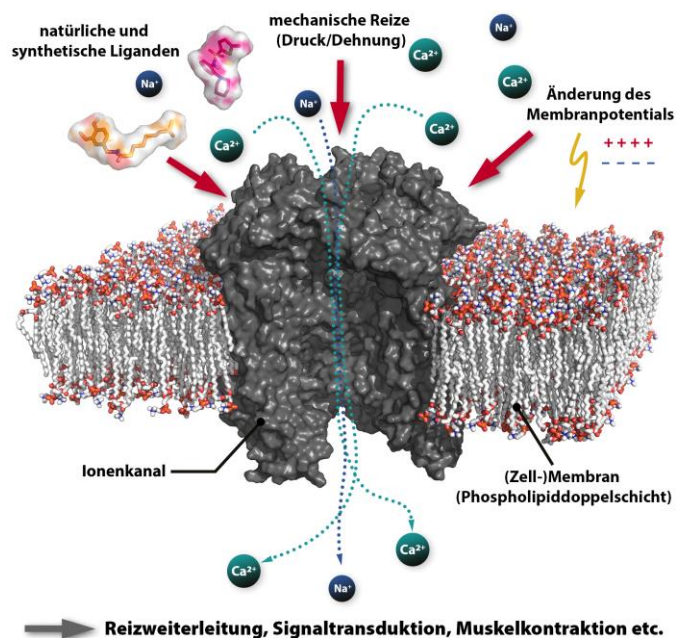


Abb. 1.1: Schematische Darstellung eines in einer biologischen Membran integrierten Ionenkanals. Die Aktivierung und die damit verbundene Erhöhung der Ionenleitfähigkeit können über diverse Mechanismen (u. a. liganden- oder spannungsgesteuert bzw. mechanosensitiv) erfolgen.

Innerhalb der Ionenkanäle stellen *Transient Receptor Potential*-(TRP)-Ionenkanäle die signifikantesten Vertreter in der sensorischen Physiologie dar, da sie für die Wahrnehmung vieler diverser Stimuli eine substanzielle Rolle einnehmen.^[4,8-12] Sie sind unter anderem maßgeblich an der Differenzierung zwischen verschiedenen Temperaturen, Schmerzwahrnehmung (Nozizeption), am Geruch, Geschmack (Unterscheidung zwischen süß, bitter und umami) sowie am Sehvermögen, beteiligt.^[6-7,13-17] Die TRP-Superfamilie der Kationenkanäle umfasst sieben Subfamilien, die basierend auf sequenziellen und topologischen Unterschieden in zwei Gruppen eingeteilt sind und sich durch eine größere Vielfalt an Ionenselektivitäten und Aktivierungsmechanismen von anderen Ionenkanaltypen abgrenzen.^[4,9,11] Gruppe I besteht aus fünf Unterfamilien: TRPC (*classical/canonical*), TRPV (*vanilloid*), TRPM (*melastatin*), TRPA (*ankyrin*) und TRPN (*NOMPC*), die untereinander eine hohe Sequenzidentität innerhalb der Transmembrandomänen besitzen. Gruppe II wird aus den TRPP (*polycystin*)- und TRPML (*mucoipin*)-Subfamilien gebildet, welche im Vergleich zu Gruppe I aufgrund der geringeren Sequenzähnlichkeit und der Anwesenheit einer charakteristischen großen extrazellulären Domäne (*extracytosolic/luminal domain*, ELD) zwischen den Transmembransegmenten S1 und S2 separat klassifiziert werden (**Abb. 1.2**).

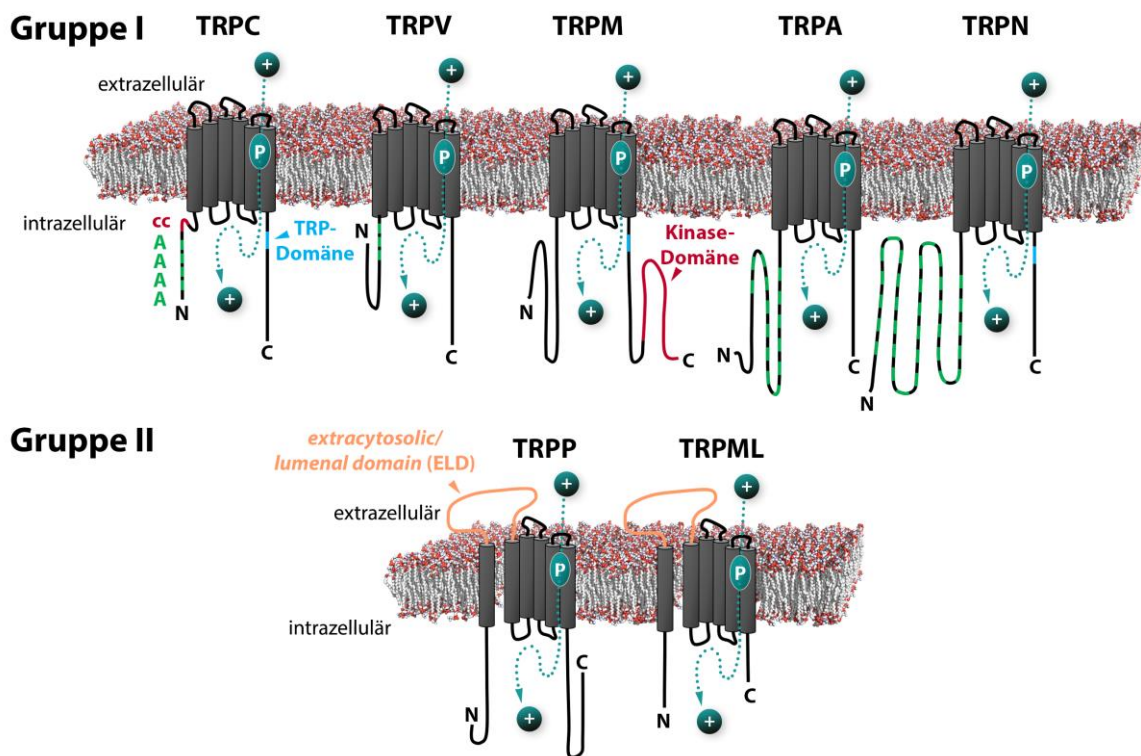


Abb. 1.2: Übersicht über die sieben TRP-Subfamilien, welche in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die Transmembrandomänen sind als vertikale schwarze Zylinder dargestellt, wobei sich zwischen S5 und S6 die Porenschleife (P) befindet. Kationen werden als mit (+) gekennzeichnete Kugeln visualisiert. A: Ankyrin-Repeat (grün), cc: *coiled-coil*-Domäne (rot), TRP-Domäne (blau), Kinase-Domäne (rot): nur TRPM6 und 7. ELD: *extracytosolic/luminal domain* (orange). Modifiziert in Anlehnung an Venkatachalam und Montell.^[9]

Alle insgesamt ca. 30 Mitglieder der TRP-Superfamilie weisen sechs Transmembrandomänen (6-TM) einschließlich der Porenschleife zwischen den Segmenten S5 und S6 auf, die sich zu Tetrameren zusammenlagern und somit die für Kationen durchlässige Pore bilden. Sie werden in verschiedenen Gewebetypen exprimiert und sind hauptsächlich für Ca^{2+} - und Na^+ -Ionen permeabel, sodass die intrazelluläre Ca^{2+} - und Na^+ -Ionenkonzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$ sowie $[\text{Na}^+]_i$) entsprechend ihres elektrochemischen Gradienten entlang der Membran erhöht wird und somit die Depolarisierung der Zelle bzw. weitere Effekte in der Signaltransduktionskaskade bedingen.^[12]

Die Aktivierung und Regulation der TRP-Ionenkanäle kann generell auf unterschiedliche Art und Weise erfolgen:^[6,11-12,16,18]

- 1) Einfluss exogener (und zum Teil auch endogener) Liganden, wie z. B. kleine organische Moleküle synthetischen oder natürlichen Ursprungs (Capsaicin, Menthol etc.), Purinnucleotide und -metabolite (ADP-ribose, NAD^+), Derivate aus dem Lipidstoffwechsel (Diacylglycerol (DAG), Phospholipide etc.).
- 2) (Indirekte) Stimulierung über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) durch Aktivierung von Phospholipase C (PLC) mit resultierender Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2)-Hydrolyse und der damit verbundenen DAG- sowie Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3)-Produktion.
- 3) Direkte Aktivierung durch thermischen bzw. mechanischen Einfluss oder osmotisch bedingte Zellschwellungen.

In vielen Fällen wird der Ablauf des exakten Aktivierungsmechanismus kontrovers diskutiert, sodass die oben beschriebenen Wege häufig als Modelle anzusehen sind.^[11-12] Die Tatsache, dass nicht nur ein konkreter Weg für jeden Kanal existiert, sondern die Öffnung eines bestimmten Kanalsubtyps durch multiple interne bzw. externe Stimuli induziert und die Modulierung der TRP-Kanal-abhängigen Ionenleitfähigkeit überdies durch posttranslationale Modifikationen, wie z. B. Phosphorylierungen, gesteuert werden kann, hebt die Komplexität der TRP-Kanal-Modulation zusätzlich hervor.^[12] Der Ursprung der TRP-Kanäle ist auf das für die Lichtreaktion verantwortliche *trp*-Gen in *Drosophila melanogaster*-Photorezeptorzellen zurückzuführen.^[19-21] Mutationen im *trp*-Gen führten zu einer transienten (vorübergehenden) anstelle einer anhalten Lichtreaktion mit einer ca. 10-fachen Abnahme des lichtinduzierten Ca^{2+} -Einstroms in die Photorezeptorzellen.^[19] Das damit verbundene transiente Rezeptorpotenzial (*transient receptor potential*) führte schließlich zur Namensgebung des verantwortlichen Ca^{2+} -Ionenkanals *TRP*, dessen Klonierung und funktionelle Charakterisierung ca. 20 Jahre nach Entdeckung der Mutanten erfolgte.^[20-21]

Mit einer Sequenzidentität von $\geq 30\%$ sind die TRPC-Kanäle (*canonical/classical*) in Säugetieren am nächsten mit den *Drosophila* TRPs verwandt und waren somit die ersten Homologe, die identifiziert wurden.^[22-23] Insgesamt sind sieben TRPCs beschrieben (TRPC1–7), wobei in Menschen jedoch nur sechs derselben exprimiert werden, da es sich bei TRPC2 um ein Pseudogen handelt.^[22]

TRPC1 ist in nahezu allen Gewebetypen vorzufinden, während andere Mitglieder dieser Subfamilie hauptsächlich im Nervensystem lokalisiert sind.^[9,22-23] Die Aktivierung dieser Ionenkanäle erfolgt durch den Einfluss verschiedener Phospholipase C-Isoformen (siehe oben) und Diacylglycerol (insbesondere TRPC6 und 7; vgl. auch **Kap. 1.1.2**); zudem wird für einige TRPC-Proteine zusätzlich eine Aktivierung durch Entleerung interner Ca²⁺-Speicher (kontrovers) diskutiert (*store-operated channel*, SOC), jedoch sind die zugrundeliegenden Mechanismen dieser Signalkaskade bisher nicht exakt aufgeklärt worden.^[24] In Analogie zu den *Drosophila* TRPs weisen TRPC-Ionenkanäle in Säugetieren die charakteristische Sechs-Transmembrandomäne zwischen den beiden cytoplasmatisch lokalisierten *N*- und *C*-Termini auf, in welchen weitere nennenswerte Sequenzelemente vorzufinden sind: Der *N*-Terminus enthält drei bis vier Ankyrin-Repeats, die in variabler Anzahl auch struktureller Bestandteil der anderen Subfamilien aus Gruppe I der TRP-Superfamilie (TRPV, TRPA, TRPN, nicht jedoch TRPM) sind. Darüber hinaus umfasst das *C*-terminale Ende die sogenannte TRP-Domäne mit einem hochkonservierten TRP-Box-Motiv (Glu-Trp-Lys-Phe-Ala-Arg) sowie eine prolinreiche Sequenz (TRP-Box 2), welche auch in TRPM- und TRPN-Ionenkanälen enthalten sind.^[4,9,11] Der TRPV1-Ionenkanal aus der Unterfamilie der TRPV (*vanilloid*)-Kanäle (TRPV1–6) gehört zu den populärsten Vertretern der TRP-Superfamilie, dessen Wirkungsweise z. B. beim Genuss pikanter Speisen im täglichen Leben wahrgenommen werden kann. Die Aktivierung dieses Ca²⁺-Ionenkanals erfolgt vor allem durch inflammatorische Vanilloide wie Capsaicin, das in scharfen Lebensmitteln (z. B. Chili) den typischen „heißen“ Geschmack induziert.^[25] Dieselben Effekte werden durch andere chemische Liganden, unter anderem das Endocannabinoid Anandamid, Piperin (in schwarzem Pfeffer), Allicin (Knoblauch), Campher und darüber hinaus durch Hitze ($T \geq 43 \text{ °C}$) hervorgerufen.^[25-29] Die Aktivierungsschwelle für die Kationenleitfähigkeit von TRPV1 wird durch den Einfluss proinflammatorischer Cytokine sowie durch einen niedrigeren pH-Wert ($\text{pH} \leq 5.9$), welcher im Gewebe bei Verletzungen bzw. Entzündungsprozessen einhergeht, zusätzlich herabgesetzt.^[30] Neben TRPV1 fungiert TRPV2 ebenfalls als molekularer Integrator für das Schmerzempfinden in sensorischen Neuronen, der durch hohe Temperaturen ($T \geq 52 \text{ °C}$) und Zellschwellungen, jedoch im Vergleich zu TRPV1 nicht durch Capsaicin oder pH-Wert-Änderungen aktiviert wird.^[31] Die Stimulierung von TRPV3 und TRPV4 erfolgt ebenfalls durch Wärmeeinwirkung ($T \geq 30 \text{ °C}$ und $T \geq 27 \text{ °C}$) und Campher (TRPV3), während TRPV5 und TRPV6 keine temperatursensitiven Ionenkanäle darstellen und sich vor allem durch eine sehr hohe Ca²⁺-Ionenselektivität (Permeabilitätsverhältnis $P_{\text{Ca}} : P_{\text{Na}} > 100$) auszeichnen, die bei der Ca²⁺-(Re)Absorption im Darm sowie den Nieren eine wichtige Rolle einnimmt.^[27,32-35]

Die TRPM (*melastatin*)-Subfamilie besteht aus acht Mitgliedern (TRPM1–8) und leitet sich vom TRPM1-Kanal ab, dessen ursprüngliche Bezeichnung *Melastatin* aufgrund der Korrelation seiner Expressionslevel in metastatischen Melanomzelllinien für diese Unterfamilie namensgebend ist.^[9,11,36] Für das mutmaßliche Tumorsuppressor-Protein TRPM1 konnte eine verringerte Expression

in metastatischen im Vergleich zu nicht-metastatischen Melanomzellen nachgewiesen werden.^[36] TRPM5-Ionenkanäle sind unter anderem in Rezeptorzellen der Zunge vorzufinden, wo sie für die Wahrnehmung süßen, bitteren und umami Geschmacks relevant sind.^[17,37] TRPM6- und TRPM7-Kanäle nehmen unter den Ionenkanälen eine einzigartige Position ein, was auf das Vorhandensein einer atypischen Proteinkinasedomäne im C-Terminus zurückzuführen ist (sog. *Chanzyme*), deren spezifische Funktion und physiologische Bedeutung bisher nicht eindeutig geklärt ist.^[9,38-39] Untersuchungen legen nahe, dass diese Domäne vermutlich eine Rolle bei der Assemblierung des Ionenkanals und der subzellulären Lokalisierung spielt, sich jedoch für die Aktivierung des Kanals nicht als essentiell erweist.^[40-41] Sowohl TRPM6- als auch TRPM7-Kanäle sind für Mg^{2+} -Ionen permeabel, sodass diese einen relevanten Beitrag in der Mg^{2+} -Homöostase, vor allem in Nieren und Darm leisten.^[41-42] Bei TRPM8 handelt es sich um einen weiteren thermisch regulierten TRP-Ionenkanal („*ThermoTRP*“; vgl. auch TRPV1–4) in sensorischen Neuronen, der vor allem durch kühlere Temperaturen ($T = 8\text{--}28\text{ °C}$) und Chemikalien wie Menthol, Icilin und 1,8-Cineol (Eucalyptol), die einen charakteristischen kühlenden Effekt hervorrufen, stimuliert wird.^[43-45]

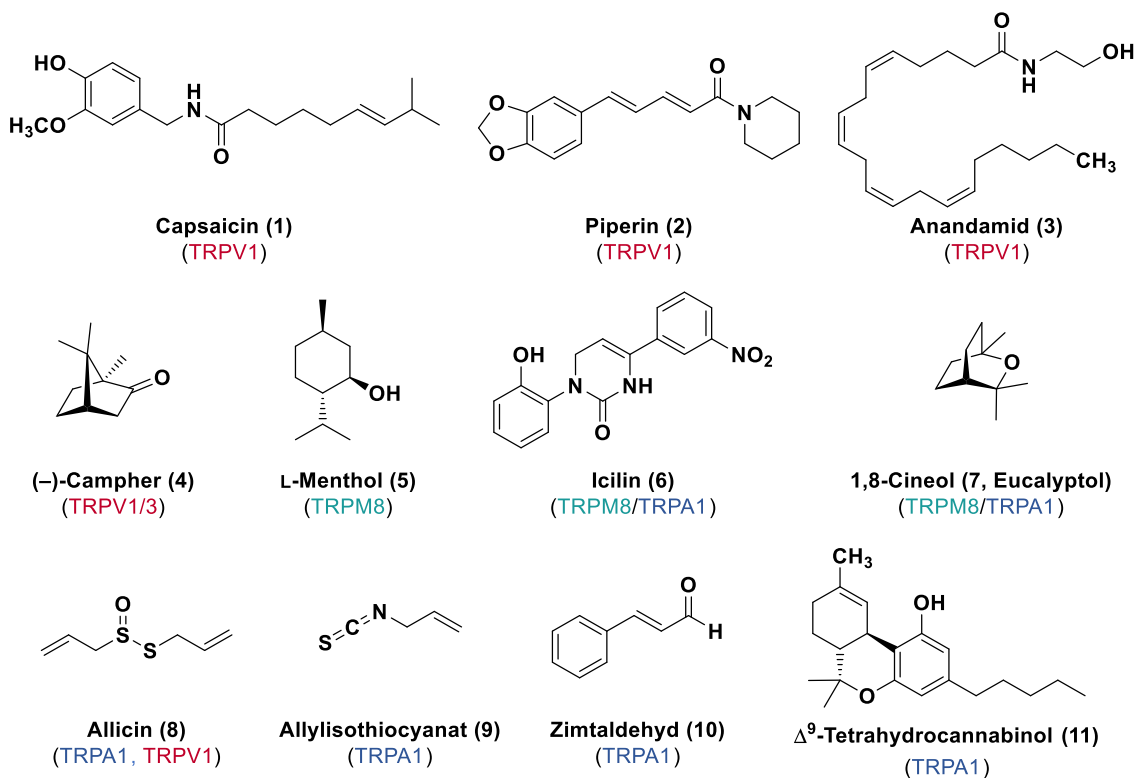


Abb. 1.3: Strukturen einiger typischer TRP-Kanal-Agonisten. In Klammern ist der jeweils adressierte Ionenkanal angegeben. Für eine detaillierte Übersicht zu natürlich vorkommenden TRP-Kanal-Agonisten/Antagonisten sei auf die *Supplementary Information* des entsprechenden Übersichtsartikels von Ramsey *et al.* verwiesen.^[12]

TRPA1 stellt bisher das einzige Mitglied der TRPA-Subfamilie in Menschen und Säugetieren dar und grenzt sich vor allem durch die Anwesenheit von 14 *N*-terminal lokalisierten Ankyrin-Repeats von den anderen TRP-Kanälen ab.^[46] Die Aktivierung des Kanals erfolgt vor allem durch Agonisten wie Isothiocyanate (in Senfölen, Wasabi, Meerrettich), Zimtaldehyd, Allicin (Knoblauch), Acrolein und Tetrahydrocannabinol.^[47-49] TRPN-Kanäle sind in Säugetieren nicht vorzufinden, sie existieren lediglich in Würmern, *Drosophila* und Zebrafischen und weisen analog zu den TRPA1-Kanälen multiple Ankyrin-Repeats im *N*-terminalen Ende der Aminosäuresequenz auf.^[46] Diese Unterfamilie wird vor allem in mechanosensorischen Geweben und in Haarzellen exprimiert, sodass sie beispielsweise für das Gehör von Zebrafisch-Larven erforderlich sind.^[50-51]

TRPP- und TRPML-Ionenkanäle bilden aufgrund ihrer hohen Sequenzanalogie untereinander und der geringen Ähnlichkeit bezüglich der Primärsequenz verglichen zu den Unterfamilien der Gruppe I eine separate Gruppe II innerhalb der TRP-Superfamilie.^[9] Neben den sechs Transmembrandomänen und der Kationenleitfähigkeit (vor allem Ca^{2+}) wird als charakteristisches strukturelles Merkmal eine große extrazelluläre Domäne (*extracytosolic/luminal domain*, ELD) zwischen den Transmembransegmenten S1 und S2 dokumentiert, die als zusätzliches Differenzierungskriterium für Gruppe II anzusehen ist.^[9,11] Mitglieder der TRPP- und TRPML-Unterfamilien wurden unter anderem infolge der Suche nach defekten Genen bzw. Proteinen in menschlichen Erkrankungen identifiziert. Die autosomal-dominante polycystische Nierenkrankheit (*autosomal dominant polycystic kidney disease*, ADPKD) wird mit einer Mutation in TRPP2 (Polycystin-2) assoziiert und äußert sich phänotypisch durch die Entwicklung von mit Flüssigkeit gefüllten Cysten in der Niere, sodass die Nierenfunktion stark beeinträchtigt wird.^[52-53] Mutationen in TRMPL1 sind für die lysosomale Speicherkrankheit *Mucopolipidose Typ IV*, die mit schweren neurodegenerativen Effekten einhergeht, verantwortlich.^[54-56] TRPML-Ionenkanäle (TRPML1–3) sowie *Mucopolipidose Typ IV* sind wesentliche Bestandteile dieser Arbeit und werden daher in einem separaten Unterkapitel (**Kap. 1.1.1**) im Detail behandelt.

Wie im obigen Abschnitt bereits angedeutet, wird die zentrale Bedeutung der TRP-Kanäle für die menschliche Gesundheit nicht nur durch ihre Eigenschaft als Mediatoren in der (Sinnes-)Physiologie und als Regulatoren der Homöostase in verschiedenen Geweben, sondern auch durch die Tatsache, dass Mutationen in TRP-Kanälen für mehrere teils schwere Erkrankungen (sog. „*channelopathies*“) verantwortlich sind, zusätzlich untermauert.^[57-60] Neben Mutationen in TRPP2 und TRPML1 sind insbesondere Defekte in TRPM6-Ionenkanälen von besonderer Bedeutung, da eine Kanalfehlfunktion und somit eine gestörte Mg^{2+} -Aufnahme im Darm sowie Mg^{2+} -Resorption in der Niere zu Hypomagnesiämie und sekundärer Hypocalciämie führen kann.^[61-62] Auf Störungen in TRPC6-Ionenkanälen, die in der fokal segmentalen Glomerulosklerose (FSGS), einer mit Proteinurie und fortschreitendem Nierenversagen verbundenen Nierenerkrankung resultiert, wird in **Kap. 1.1.2** genauer eingegangen.^[63-65] Darüber hinaus existieren zunehmend mehrere Studien, die einen

substanziellen Zusammenhang zwischen TRP-Proteinen und den pathologischen Prozess einiger Herzerkrankungen (Hypertrophie, Fibrose und Leitungsstörungen) belegen.^[66-68] Da Änderungen im Expressionsmuster und der Funktion von TRP-Proteinen mit Vorgängen wie Zellproliferation sowie Apoptose zusammenhängen können, werden zudem einige TRP-Ionenkanäle hinsichtlich ihrer Eignung als potenzielle Targets in verschiedenen Krebsarten in Betracht gezogen.^[69-70]

Im Rahmen dieser Arbeit kommt den TRPML- sowie TRPC6-Subfamilien eine besondere Bedeutung zu, weshalb diese in den nächsten Unterkapiteln detaillierter betrachtet werden. Für genauere Informationen zu den anderen oben aufgeführten TRP-Ionenkanalsubfamilien wird aufgrund des breiten Spektrums an Sachverhalten auf entsprechend zitierte Übersichtsartikel verwiesen.^[4,9,11-12,59]

1.1.1 TRPML-Ionenkanäle

Die *Transient Receptor Potential Mucolipin* (TRPML)-Familie setzt sich aus drei evolutionär konservierten Mitgliedern (TRPML1–3; MCOLN1–3) zusammen, die hauptsächlich im endolysosomalen System von Zellen vorzufinden sind.^[71] Ihre Relevanz und entscheidende funktionelle Bedeutung wird vor allem dadurch illustriert, dass Mutationen in den Genen, die für diese Kationenkanäle codieren, schwere pathophysiologische Auswirkungen zur Folge haben können. *Loss-of-Function*-Mutationen im humanen TRPML1-Gen sind für die autosomal-rezessive lysosomale Speicherkrankheit *Mucopolidose Typ IV* (MLIV) verantwortlich, die vor allem durch tiefgreifende neurobiologische Entwicklungsstörungen, neuro-retinale Degeneration sowie andere ophthalmologische Symptome wie z. B. Schielen oder Hornhauttrübung bis hin zur Erblindung gekennzeichnet ist.^[54-56,72] Die Beeinträchtigungen sind so grundlegend, dass die kognitiven Fähigkeiten betroffener Patienten selten über das für zwei- bis dreijährige Kinder typische Niveau hinausgehen, auch wenn ein Lebensalter von ca. 30 Jahren erreicht werden kann.^[73] Neben den kognitiven und linguistischen Defiziten gehören konstitutive Achlorhydrie (Mangel an Magensäure), verbunden mit Eisenmangelanämie und deutlich erhöhten Serumgastrinspiegeln zu den weiteren typischen Ausprägungen der MLIV.^[74-76] Charakteristischerweise führt die Fehlfunktion des TRPML1-Kanals auf morphologischer Ebene zur intrazellulären Anreicherung lysosomaler Einschlüsse von Lipiden und wasserlöslichen Substanzen in verschiedenen Geweben, was auf eine defekte Prozessierung und Störung des Transports im endolysosomalen System hindeutet.^[77-80] Aus diesem Grund werden üblicherweise Hautbiopsien sowie histologische Analysen neben der Bestimmung des Serumgastrinspiegels für die Diagnose der *Mucopolidose Typ IV* durchgeführt.^[81-83] Bis heute existieren keine effektiven Behandlungsmöglichkeiten für MLIV-Patienten; mehrere Ansätze wie z. B. physikalische Therapie zur Verbesserung der motorischen Funktionen oder die Gabe von Eisenpräparaten dienen lediglich der symptomatischen Verbesserung.^[83] Für TRPML3 sind zwei *Gain-of-Function*-Mutationen dokumentiert (A419P und I362T), die Hörverlust,

Gleichgewichtsstörungen (kreisendes Verhalten, Watscheln) und Pigmentdefekte in Mäusen (sog. *varitint-waddler*-(*Va*-)Phänotyp) zur Folge haben.^[84-86] Die durch die Mutation bedingte konstitutive Aktivität des TRPML3-Kanals führt zu einer Überladung der intrazellulären Ca²⁺-Ionenkonzentration und somit zur Apoptose von Melanozyten und sensorischen Haarzellen, in welchen dieser Kanal vorwiegend exprimiert wird.^[87-88] Entsprechende krankheitsverursachende Ausprägungen TRPML2-assoziiierter Gendefekte sind weder beim Menschen noch in Mäusen bisher bekannt.^[84] TRPML1-Ionenkanäle werden in Säugetieren in allen Gewebetypen (v. a. in den Nieren, in der Milz, im Gehirn, im Herzen und in der Leber) exprimiert, während die Verteilung von TRPML2 und TRPML3 im Gegensatz dazu auf bestimmte Gewebe und spezielle Zelltypen limitiert ist, was auf ausgeprägte gewebespezifische Funktionen dieser TRPML-Ionenkanalisformen hindeutet.^[71,89]

Tab. 1.1: Übersicht über die in Säugetieren vorkommenden TRPML-Kanäle sowie deren Funktionen, welche nicht alle eindeutig geklärt sind. n. b.: nicht bekannt. In Anlehnung an Cheng *et al.*^[71]

Ionenkanal	Ionenspezifität	Funktion	Assoziierte Krankheiten
TRPML1	Ca ²⁺ , Na ⁺ , Fe ²⁺ , Mg ²⁺ , K ⁺	Regulation des luminalen pH- und Ca ²⁺ -Haushaltes, lysosomale Exocytose, Vesikeltransport etc.	<i>Mucopolipidose Typ IV</i>
TRPML2	Ca ²⁺ , Na ⁺ , Fe ²⁺ , K ⁺	Beitrag zur angeborenen Immunantwort (Makrophagenrekrutierung), mögliche Erhöhung Infektiosität bei Viruserkrankungen	n. b.
TRPML3	Ca ²⁺ , Na ⁺ , Mg ²⁺ , K ⁺	Regulation Endocytose, Autophagie, Membrantransport, Sekretion pathogener Bakterien	<i>Varitint-Waddler-Phänotyp</i> (Mausmodell)

Auf intrazellulärer Ebene sind TRPML-Kanäle in den Membranen von Organellen, typischerweise in Endosomen und Lysosomen lokalisiert und sind somit in vielen endolysosomalen Prozessen involviert.^[90-92] TRPML1-Kanäle nehmen eine wichtige Rolle bei der Regulation des luminalen pH- und Ca²⁺-Ionenhaushalts ([Ca²⁺]_{Lumen} ~0.5 mM; [Ca²⁺]_{Cytosol} ~100 nM)^[93] sowie bei der Mobilisierung von Fe²⁺- und Zn²⁺-Ionen innerhalb der Lysosomen ein und sind somit vor allem für zelluläre Prozesse wie z. B. Vesikeltransport, Autophagie, Exocytose und der Signaltransduktion essenziell.^[73,94-95] Im Vergleich zur ubiquitären Verteilung von TRPML1 ist die Expression von TRPML2-Kanälen vorwiegend auf Lymphozyten sowie andere Zellen des Immunsystems beschränkt, sodass diese einen wesentlichen Beitrag zur angeborenen Immunantwort leisten.^[96-97] Nach Aktivierung von *Toll-like*-Rezeptoren konnte beispielsweise ein Anstieg der TRPML2-mRNA- und Proteinlevel in Makrophagen nachgewiesen werden, während in TRPML2-KO-Mäusen (TRPML2^{-/-}) die Abwesenheit von TRPML2-Kanälen mit einer reduzierten Makrophagen-

rekrutierung in Verbindung gebracht wird.^[97] Zudem werden im Mausmodell sowohl der Chemokintransport, als auch die -freisetzung aus Makrophagen durch TRPML2 beeinflusst.^[98] Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass MCOLN2 die Infektiosität einiger RNA-Viren (z. B. Gelbfiebertvirus, Dengue-, Zikavirus und Influenza A-Virus) durch Erhöhung der Transporteffizienz endocytierter Viren ausübt.^[99] TRPML3-Ionenkanäle sind in Thymus, Nieren, Melanozyten, Lunge, Augen sowie in sensorischen Haarzellen vorzufinden und im Gegensatz zu TRPML1 und TRPML2 primär auf der Plasmamembran und in Vesikeln verteilt.^[86,100] Neben der Rolle als Regulator von Endocytose, Autophagie und Membrantransport, konnte für den TRPML3-Ionenkanal eine relevante Beteiligung in der lysosomalen/exosomalen Sekretion pathogener Bakterien nachgewiesen werden.^[92,101]

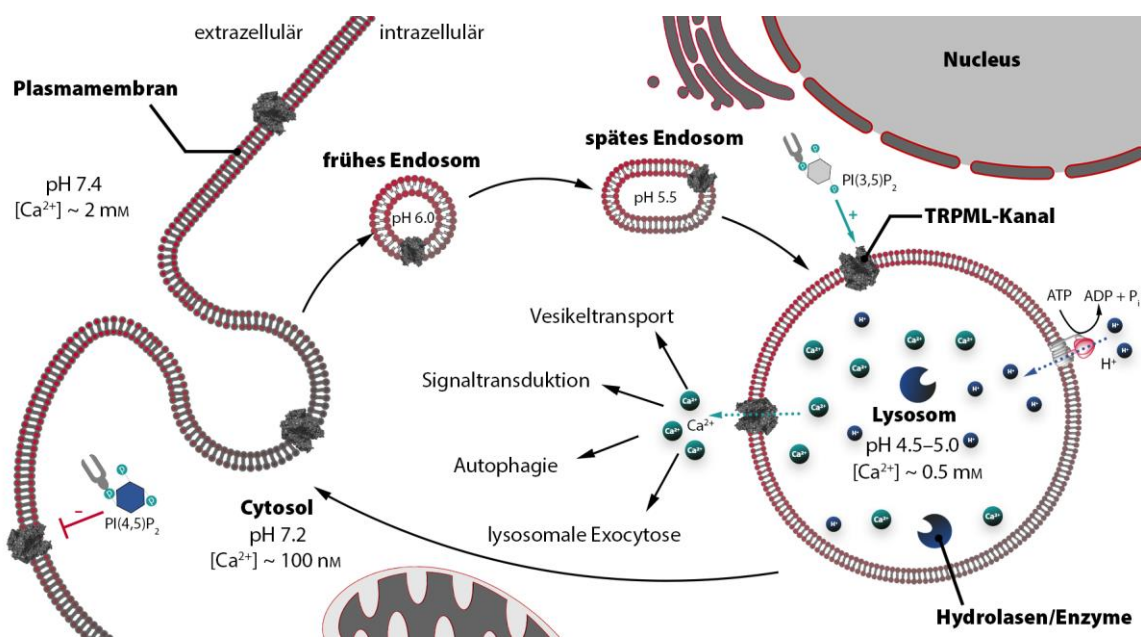


Abb. 1.4: Vereinfachte Darstellung zur intrazellulären Verteilung sowie der biologischen Funktionen von TRPML-Kanälen im endolysosomalen System. In Anlehnung an Venkatachalam *et al.* und Cheng *et al.*^[71,73]

Alle TRPML-Ionenkanäle können durch diverse endogene (Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphat/PI(3,5)P₂)^[102-103] sowie zahlreiche (exogene) synthetische Verbindungen (z. B. **SF-51**, **ML-SA1** oder **MK6-83**; siehe auch **Kap. 5**)^[85,98,104] aktiviert bzw. durch **ML-SI3**^[105], Sphingomyeline^[106] und Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat/PI(4,5)P₂ inhibiert werden. Auf synthetische TRPML-Aktivatoren und deren Einsatz als nützliche Werkzeuge zur Untersuchung der physiologischen Funktionen von TRPML-Ionenkanälen oder als potenzielle Wirkstoffe u. a. für die Behandlung der *Mucopolipidose Typ IV* wird in **Kap. 5** detaillierter eingegangen.

In den letzten Jahren konnte der detaillierte Aufbau der TRPML1- und TRPML3-Kanäle sukzessive mittels Röntgenstrukturanalysen bzw. Kryo-Elektronenmikroskopie (Kryo-EM) aufgeklärt werden, sodass neben den strukturellen auch funktionelle Analysen ermöglicht wurden (**Abb. 1.5** und **Tab. 1.2**).^[107-112] Analog zu den anderen TRP-Kanälen handelt es sich bei TRPML-Ionenkanälen um

Tetramere mit einer vierfachen Rotationssymmetrie, deren Untereinheiten jeweils aus sechs Transmembrandomänen (S1–S6) mit cytosolisch orientierten *N*- und *C*-Termini sowie zwei Porenhelices (PH1 und PH2) bestehen. Der signifikante Unterschied zu anderen TRP-Kanälen geht jedoch aus der Anwesenheit einer ausgeprägten extracytosolischen/luminalen Domäne (ELD) zwischen den Transmembransegmenten S1 und S1 (vgl. **Abb. 1.5**) hervor.^[113]

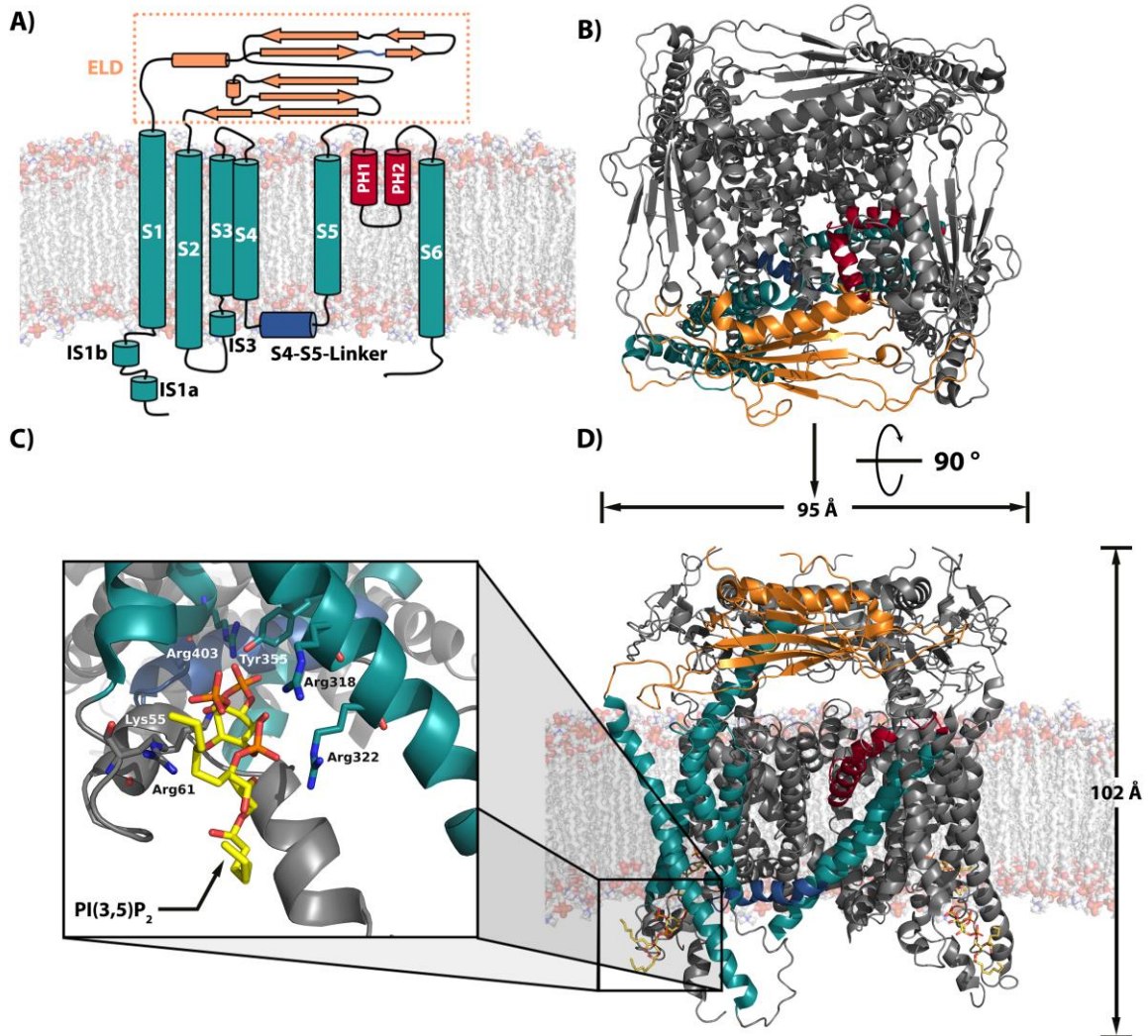


Abb. 1.5: **A)** Schematische Darstellung der Sekundärstruktur von TRPML-Ionenkanälen. Orange: extracytosolische/luminalen Domäne (ELD, ca. 25 kDa); α -Helices werden durch Zylinder, β -Faltblätter durch Pfeile dargestellt; petrol: Transmembrandomänen S1–S6/cytosolische Verlängerungen IS1–3; blau: S4-S5-Linker; rot: Porenhelices PH1/2. **B)** Struktur des humanen TRPML1-Ionenkanals (PDB: 6E7P) aus der extracytosolischen/luminalen Perspektive. Zentral befindet sich die ionenleitende Pore. **C)** PI(3,5)P₂ (gelb)-Bindestelle mit den für die Interaktion relevanten Aminosäuren (PDB: 6E7P). **D)** Seitenansicht einer Cartoon-Repräsentation der humanen TRPML1-Struktur in Komplex mit PI(3,5)P₂ (gelb). Die verschiedenen Domänen einer einzelnen Untereinheit sind farbig hervorgehoben. Die anderen drei Protomere werden der Übersichtlichkeit halber in grau dargestellt. In Anlehnung an Fine *et al.*^[103,113]

Tab. 1.2: Übersicht über kürzlich ermittelte Röntgenkristall- bzw. Kryo-EM-(Teil-)Strukturen von TRPML-Ionenkanälen, wobei die dazugehörigen PDB-Codes, der pH-Wert, die Methode, Auflösung d sowie das Veröffentlichungsjahr inkl. der Quellen an entsprechender Stelle vermerkt sind. hs: *homo sapiens*, mm: *mus musculus*, cj: *callithrix jacchus*. Erstellt in Anlehnung an Fine *et al.*^[113]

#	PDB	Struktur	pH	Methode	d [Å]	Jahr	Quellen
1	5TJA	hsTRPML1-ELD	6.0	X-Ray	2.3	2017	
2	5TJB	hsTRPML1-ELD	4.5	X-Ray	2.4	2017	[107]
3	5TJC	hsTRPML1-ELD	7.5	X-Ray	2.4	2017	
4	5YE2	mmTRPML1 in amphipol	7.4	Kryo-EM	5.8	2017	
5	5YDZ	mmTRPML1 in amphipol-Zustand I	7.4	Kryo-EM	5.8	2017	[108]
6	5YE1	mmTRPML1 in amphipol-Zustand II	7.4	Kryo-EM	5.8	2017	
7	5YE5	mmTRPML1 in Nanodisk	7.4	Kryo-EM	5.8	2017	
8	5W3S	cjTRPML3	7.4	Kryo-EM	2.9	2017	[109]
9	5WPQ	mmTRPML1 in Nanodisk-Zustand I	8.0	Kryo-EM	3.6	2017	
10	5WPT	mmTRPML1 in Nanodisk-Zustand II	8.0	Kryo-EM	3.7	2017	[110]
11	5WPV	mmTRPML1 in Nanodisk	8.0	Kryo-EM	3.6	2017	
12	5WJ5	hsTRPML1	7.0	Kryo-EM	3.7	2017	[111]
13	5WJ9	hsTRPML1 + ML-SA1	5.5	Kryo-EM	3.5	2017	
14	6AYG	hsTRPML3	4.8	Kryo-EM	4.6	2017	
15	6AYE	hsTRPML3	7.4	Kryo-EM	4.0	2017	[112]
16	6AYF	hsTRPML3 + ML-SA1	7.4	Kryo-EM	3.6	2017	
17	6E7P	hsTRPML1 + PI(3,5)P ₂	5.5	Kryo-EM	3.5	2018	
18	6E7Y	hsTRPML1 + PI(4,5)P ₂	5.5	Kryo-EM	3.6	2018	[114]
19	6E7Z	hsTRPML1 + PI(3,5)P ₂ + ML-SA1	5.5	Kryo-EM	3.7	2018	
20 [†]	6HRS	hsTRPML2-ELD	4.5	X-Ray	2.9	2019	[115]
21 [†]	6HRR	hsTRPML2-ELD	6.5	X-Ray	2.0	2019	

[†]**Bem.:** Die Bestimmung und strukturelle Charakterisierung der humanen TRPML2-ELD stellte ein Projekt im Rahmen dieser Promotion dar, welches in Kooperation mit [REDACTED] und [REDACTED] aus der Arbeitsgruppe von [REDACTED] (Johannes Gutenberg-Universität Mainz) bearbeitet wurde.^[115] Die erhaltenen Resultate werden in **Kap. 4** ausführlich behandelt.

Untereinander weisen die drei Mitglieder der Mucolipinfamilie eine Sequenzidentität von ca. 40% auf und gewährleisten als einwärtsgerichtete (*inward-rectifying*) Kationenkanäle den Ionenfluss (v. a. Ca²⁺-Ionen) vom Lysosomenlumen bzw. vom extrazytosolischen Raum in das Cytosol der Zelle.^[71,112] Die zentrale elektronegative Pore von TRPML1, welche aus den vier Untereinheiten und einer Vielzahl negativ geladener Aspartat/Glutamat-Reste in der ELD gebildet wird, erlaubt die physiologische Regulierung der Kanalaktivität basierend auf der subzellulären Verteilung der

Ionenkanäle im endolysosomalen System: In der aciden Umgebung des Lysosoms (pH 4.5–5.0)^[93] liegen diese Reste im protonierten Zustand vor, sodass diese über eine geringe Affinität zu Ca^{2+} -Ionen verfügen und eine Kationenleitung möglich ist. Bei der Exocytose lysosomaler Vesikel werden das saure Lumen und die elektronegative Pore einem zunehmend steigenden pH-Wert (extracytosolischer pH 7.2–7.4)^[93] ausgesetzt, sodass die Aspartat-Reste nun vorwiegend deprotoniert sind, sodass in dieser Umgebung attraktive Wechselwirkungen mit Ca^{2+} -Ionen möglich sind, die somit als „Porenblocker“ fungieren und schließlich die Ionenleitung verhindern.^[107,113] Dieser hypothetische duale pH/ Ca^{2+} -Bindemechanismus konnte auch für die TRPML2-ELD nachgewiesen werden (vgl. Kap. 4).^[115] Konträr dazu wird in TRPML3-Kanälen der Ionenfluss in Anwesenheit von höheren H^+ -Konzentrationen sowie durch Na^+ -Ionen inhibiert.^[116] Der niedrige pH-Wert induziert globale Konformationsänderungen innerhalb des TRPML3-Kanals, sodass dieser schließlich in einem stabileren geschlossenen Zustand vorliegt.^[112,116] Die Bedeutung dieses Unterschieds wird vor allem durch die physiologische Rolle von TRPML3 bei der lysosomalen Sekretion neutralisierter Lysosomen und Exocytose pathogener Bakterien illustriert:^[101] Der Kanal bleibt unter physiologischen Bedingungen (niedriger pH-Wert und hohe Na^+ -Konzentrationen) in der lysosomalen Membran inaktiviert. Bei einer bakteriellen Infektion werden die Lysosomen in den betroffenen Zellen abgebaut, sodass sowohl die hohe H^+ - als auch Na^+ -Ionenkonzentration verloren geht. Dies führt zur Umwandlung des TRPML3-Kanals aus der geschlossenen in eine offene Konformation und der resultierende Ca^{2+} -Ionenfluss induziert die Sekretion der beschädigten Lysosomen.^[101,113] Eine weitere Möglichkeit der Steuerung der TRPML-Ionenkanalaktivität erfolgt, wie bereits oben beschrieben, über $\text{PI}(3,5)\text{P}_2$ (Agonist) bzw. $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ (Antagonist).^[102] Kürzlich veröffentlichte Kryo-EM-Strukturen von TRPML1 belegen, dass sowohl $\text{PI}(3,5)\text{P}_2$ als auch $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ dieselbe Bindestelle zwischen den verlängerten S1-, S2- und S3-Helices besitzen.^[103] Eine Wechselwirkung zwischen der 3'-Phosphatgruppe in $\text{PI}(3,5)\text{P}_2$ mit einem Tyrosinrest in der Transmembranhelix S3 (Y355) führt zur Ausbildung einer π -Kationenwechselwirkung mit R403 am C-Terminus von S4, sodass die resultierende Konformationsänderung zu einer allosterischen Aktivierung des Ionenkanals führt.^[103] Diese Interaktion wird durch $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ in Abwesenheit von $\text{PI}(3,5)\text{P}_2$ hingegen nicht erzielt.^[103] Die unterschiedlichen Effekte der Phosphoinositide ermöglichen eine zusätzliche Modulierung der TRPML1-Kanalaktivität in Abhängigkeit von ihrer intrazellulären Lokalisierung. Lysosomen sind mit $\text{PI}(3,5)\text{P}_2$ angereichert, sodass TRPML1-Ionenkanäle innerhalb dieser Kompartimente aktiv bleiben. Hohe Konzentrationen von $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ in der Plasmamembran führen dazu, dass TRPML1 z. B. im Verlauf lysosomaler Sekretion schließlich inaktiviert wird.^[102-103] Darüber hinaus konnte mittels Kryo-EM die Bindestelle des synthetischen TRPML1/3-Aktivators **ML-SA1** in einer hydrophoben Tasche, die durch aromatische und hydrophobe Reste der Porenhelix PH1 und den Transmembransegmenten S5 sowie S6 ausgebildet wird, identifiziert werden (Details siehe Kap. 5).^[111-112]

Interessanterweise konnte 2013 von Taylor *et al.* ein zu TRPML1 orthologes Protein im Lysosom der infektiösen Form von *Trypanosoma brucei*, dem parasitären Erreger der Afrikanischen Schlafkrankheit, nachgewiesen werden.^[117] Trypanosomen sind von Eisenionen abhängig, die sie für wichtige Stoffwechselprozesse einschließlich DNA-Replikation, antioxidative Abwehr und mitochondriale Atmung benötigen.^[118] Sie beziehen Fe³⁺-Ionen vom Wirt über den sog. Transferrin-Rezeptor, die schließlich nach Rezeptor-vermittelter Endocytose ins Lysosom des Parasiten transportiert werden. Die experimentellen Daten von Taylor *et al.* liefern grundlegende Hinweise, dass für den Transport der Eisenionen vom Lumen des Lysosoms in das Cytoplasma nach ihrer Reduktion zu Fe²⁺ über Reduktasen vor allem das *Trypanosoma brucei* *Mucolipin-Like Protein* (*TbMLP*) verantwortlich ist.^[117] Allerdings existieren bisher keine exakten strukturellen Daten von *TbMLP* und es ist nicht eindeutig geklärt, ob es sich hierbei um die einzige Möglichkeit hinsichtlich des parasitären Eisenionentransfers handelt.^[117]

Aus den in diesem Unterkapitel beschriebenen Sachverhalten geht deutlich hervor, dass TRPML-Ionenkanäle durch ihre Beteiligung an den wichtigsten Kontrollpunkten vieler zellphysiologischer Prozesse eine nicht unerhebliche Bedeutung für das Überleben der Zelle aufweisen. Dies wird vor allem durch die schweren Auswirkungen der mutierten Formen von TRPML1 und TRPML3 und ihrer zentrale Rolle bei der Regulation der Ca²⁺-Ionenkonzentration in der Zelle unterstrichen. Zudem konnten in den letzten Jahren einige Tumorarten mit veränderten Expressionsleveln und Funktionen von TRPML-Kanälen in Verbindung gebracht werden, auch wenn die zugrunde liegenden genetischen und epigenetischen Abläufe noch erforscht werden müssen.^[70,119]

Die in den letzten Jahren gefundenen Kristall- bzw. Kryo-EM-Strukturen sowie die daraus abgeleiteten funktionellen Analysen ermöglichten fundamentale Einblicke in den Aufbau sowie Mechanismen zur Regulation der TRPML-Kanäle und konnten somit das Wissen über diese Subfamilie der TRP-Ionenkanäle erheblich erweitern. Dennoch sind bis heute viele physiologische Funktionen und die detaillierte Architektur noch nicht ausreichend und in vollem Umfang geklärt worden. Beispielsweise werden im Vergleich zu TRPML1 und TRPML3 die zelluläre Rolle und strukturellen Eigenschaften von TRPML2 wesentlich weniger gut verstanden und mit den kürzlich erhaltenen Daten zur TRPML2-ELD konnte eine strukturelle Charakterisierung erstmals vorgenommen werden (vgl. **Kap. 4**).^[115] Darüber hinaus stellt die Adressierung von TRPML-Ionenkanälen durch synthetische Wirkstoffe einen neuartigen und innovativen Ansatz für die Behandlung verschiedener Krebsarten bzw. für die *Mucopolipidose Typ IV* dar, allerdings ist der therapeutische Nutzen bereits existierender TRPML-Modulatoren bisher weitestgehend unerforscht und steht noch am Anfang der Entwicklung.^[70,104,120]

1.1.2 TRPC6-Ionenkanal

TRPC6-(*Transient Receptor Potential Canonical/Classical 6*-)Kanäle sind nichtselektive Kationenkanäle, die in den meisten menschlichen Organen und Geweben, vor allem im Gehirn, in der Lunge, in den Nieren, in der Plazenta, im Herzen sowie generell in vaskulären Endothel- und glatten Muskelzellen vorzufinden sind.^[121-122] Die Expression von TRPC6 in den Glomeruli der Niere konnte vor allem durch Analyse einer großen Familie, in welcher Mitglieder mehrerer Generationen eine aggressive Form der fokal segmentalen Glomerulosklerose (FSGS) aufwiesen, nachvollzogen werden.^[65] Bei der FSGS handelt es sich um eine schwere Nierenerkrankung mit weltweit hoher Relevanz, die mit Proteinurie, Bluthochdruck und Niereninsuffizienz einhergeht und im schlimmsten Fall Nierenversagen zur Folge hat.^[123] Die gravierende phänotypische Erscheinung dieser Form der FSGS ist auf *Gain-of-Function*-Mutationen im TRPC6-Kationenkanal (v. a. P112Q) zurückzuführen, die in HEK293-Zellen zu einem signifikant höheren Ca^{2+} -Einstrom führt.^[64-65,124] Es existieren Hinweise darauf, dass die gesteigerte Aktivität verbunden mit einer veränderten intrazellulären Verteilung der TRPC6-Kanäle für die Podocyten-Dysfunktion und somit für das Nierenversagen bei der FSGS verantwortlich ist.^[63,125] Allerdings sind die genauen pathogenen Mechanismen, die auf den nachgewiesenen Mutationen beruhen, bisher nicht vollständig verstanden.^[63] Obwohl die exakten physiologischen Funktionen von TRPC6 nicht eindeutig geklärt sind, existieren viele weitere Hinweise, die eine relevante Beteiligung dieses Ionenkanals an wichtigen physiologischen Prozessen belegen. Neben der renalen Ausprägung werden beispielsweise auch schwere pathophysiologische Effekte in der Lunge, wie z. B. Ödembildung oder hypoxische pulmonale Vasokonstriktion mit atypischen TRPC6-Funktionen assoziiert.^[126-127] Ferner werden veränderte Expressionsmuster von TRPC6-Kanälen mit der Entwicklung und Proliferation von Prostata-, Nieren- sowie Brustzellkarzinomen in Zusammenhang gebracht.^[128-130] Die hier beschriebenen Sachverhalte liefern lediglich einen Überblick und es wurden viele weitere Studien veröffentlicht, in welchen (patho)physiologische Erscheinungen in kausaler Relation mit TRPC6 gebracht wurden. Für umfassendere Ausführungen sei daher auf entsprechend zitierte Literatur verwiesen.^[125,131]

Strukturell handelt es sich beim TRPC6-Ionenkanal um ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 110 kDA, das aus 931 Aminosäuren zusammengesetzt ist und dessen Untereinheiten aus sechs Transmembrandomänen mit cytosolisch ausgerichteten *N*- und *C*-Termini bestehen.^[132] Der *N*-Terminus enthält zusätzliche Motive wie z. B. vier Ankyrin-Repeats sowie eine *coiled-coil*-Domäne, die vermutlich bei Protein-Protein-Interaktionen beteiligt und für die Stabilisierung der Tetramerstruktur verantwortlich sind.^[131,133] Am *C*-terminalen Ende kann die innerhalb der TRPC-Unterfamilie hochkonservierte TRP-Box (Glu-Trp-Lys-Phe-Ala-Arg) gefolgt von einer prolinreichen Sequenz (TRP-Box 2) gefunden werden. Wie zudem aus der von Tang *et al.* (3.8 Å, 2018) erhaltenen Kryo-EM-Struktur des TRPC6-Kanals hervorgeht, bilden vier der Untereinheiten ein Tetramer mit einer ausgeprägten Rotationssymmetrie und zweischichtigen Architektur, die aus der

Transmembrandomäne (TMD) und einer intrazellulären-cytoplasmatischen Domäne (ICD) besteht.^[132] Die ICD bildet mit ihren C- und N-Termini eine kuppelartige Struktur, die dem Cytosol zugewandt ist.^[132]

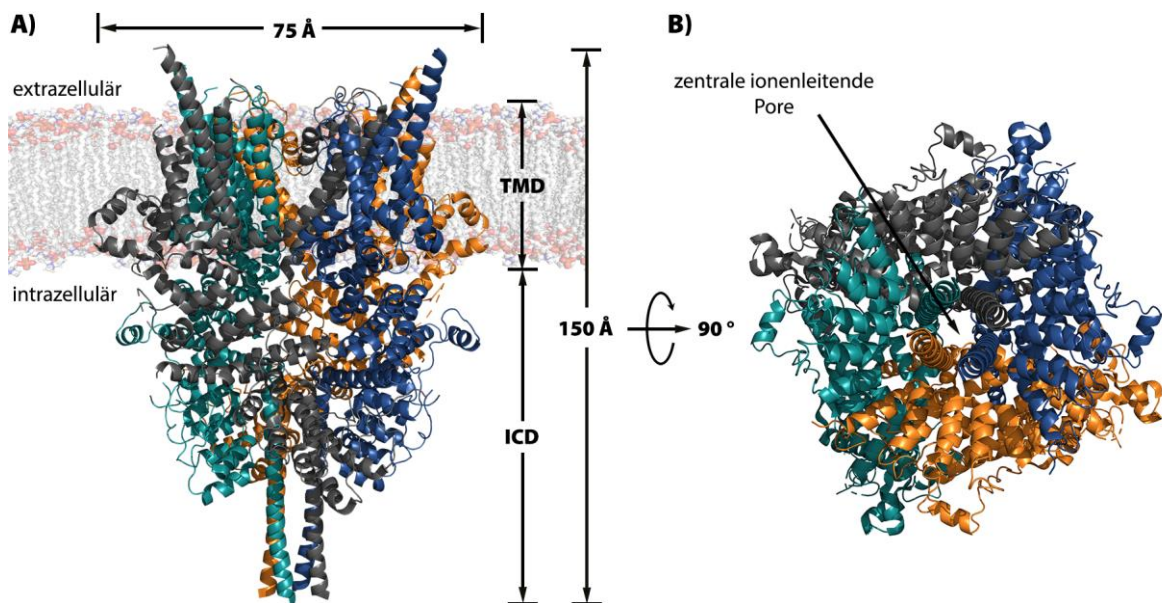


Abb. 1.6: **A)** Struktur des humanen TRPC6-Ionenkanals (PDB: 5YX9) aus der Seitenansicht. Die Position des Kanals innerhalb der Membran wird durch eine transparente Phospholipiddoppelschicht visualisiert. Die vier einzelnen Untereinheiten sind in unterschiedlichen Farben gekennzeichnet. TMD: Transmembrandomäne, ICD: intrazelluläre/cytoplasmatische Domäne. **B)** Cartoon-Struktur aus der intrazellulären Perspektive mit der deutlich erkennbaren ionenleitenden Pore im Zentrum des Kanals. In Anlehnung an Tang *et al.*^[132]

Als nichtselektiver Ionenkanal ermöglicht TRPC6 die Permeabilität verschiedener Kationen, darunter Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , Cs^+ , Mn^{2+} und Ba^{2+} , wobei ein relatives Permeabilitätsverhältnis $P_{\text{Ca}} : P_{\text{Na}}$ von ca. 5 beobachtet werden konnte.^[134-136] Die Regulation der TRPC6-Aktivität kann durch eine Vielzahl multipler Mechanismen erfolgen. Die Ionenleitfähigkeit wird unter physiologischen Bedingungen vor allem durch den *second-messenger* Diacylglycerol (DAG) unabhängig von der Proteinkinase C erhöht, welcher innerhalb der GPCR ($\text{G}_{q/11}$)-PLC β - bzw. Rezeptor-Tyrosinkinase/PLC γ -Signalkaskade aus der Hydrolyse von PI(4,5)P₂ erzeugt wird (*rezeptor-aktivierter nicht-selektiver Ionenkanal*).^[134,137] DAG-basierte Analoga wie z. B. 1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG) sind ebenfalls bekannte TRPC6-Aktivatoren und werden daher häufig experimentell eingesetzt.^[134] Die komplexe Regulation der TRPC6-Aktivität wird zudem durch die Tatsache verdeutlicht, dass u. a. Phosphorylierungsmuster, Calmodulin, Phosphoinositide wie PI(4,5)P₂ und PI(3,4,5)P₃ sowie reaktive Sauerstoffspezies (H_2O_2) zusätzlich Einfluss auf den TRPC6-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom in Zellen nehmen können.^[131,138-141] Wie die meisten anderen TRP-Proteine lassen sich TRPC6-Ionenkanäle durch trivalente Kationen wie La^{3+} ($\text{IC}_{50} = 4\text{--}6 \mu\text{M}$) und Gd^{3+} ($\text{IC}_{50} = 1.9 \mu\text{M}$) inhibieren.^[142-143] In den letzten Jahren konnten auch selektivere Antagonisten identifiziert werden, welche in der Lage sind, den OAG-induzierten Ca^{2+} -Einstrom in

TRPC6-exprimierenden Zellen zu blockieren (**Abb. 1.8**). Neben Norgestimat (**14**, 2012, $IC_{50} = 5.2 \mu\text{M}$)^[144] wurden mit Verbindung **8009-5364** (**15**, 2012, $IC_{50} = 3.2 \mu\text{M}$, 2.5-fache Selektivität gegenüber den eng verwandten TRPC3-Kanal)^[145] und dem (+)-Larixol-Derivat **SH045** (**16**, 2018, $IC_{50} = 5.8 \text{ nM}$, 13-fache Selektivität gegenüber TRPC3)^[146] weitere affine TRPC6-Inhibitoren beschrieben.

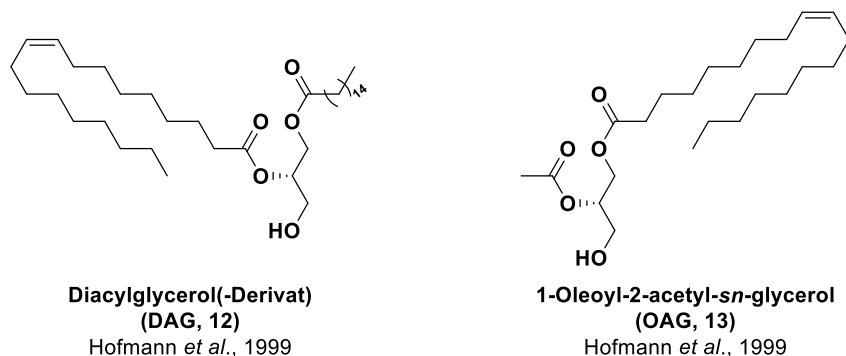


Abb. 1.7: Strukturen eines DAG-Derivats und OAG, die als (natürliche) Aktivoren des TRPC6-Ionenkanals fungieren. Synthetische Agonisten werden im Detail in **Kap. 6** besprochen.

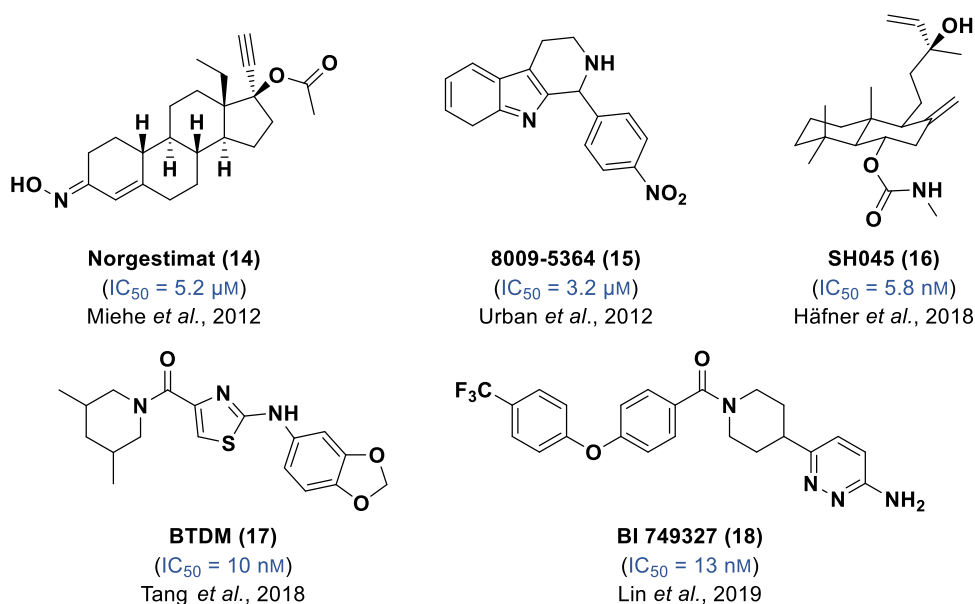


Abb. 1.8: Strukturen ausgewählter TRPC6-Kanal-Inhibitoren. Entsprechende IC_{50} -Werte sind in Blau angegeben.

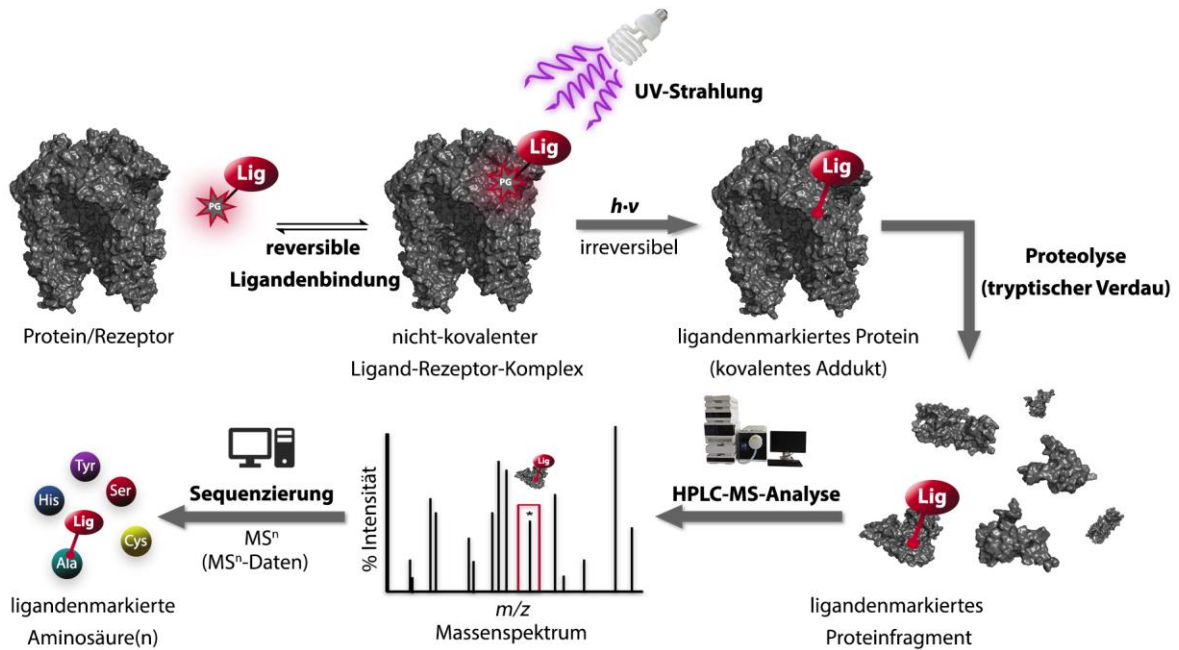
Aufgrund ihrer Eigenschaften, *in vivo* eine TRPC6-bedingte akute hypoxische Vasokonstriktion oder die Bildung von Ödemen in Mäuse-Lungen zu unterbinden, werden letztere als potenzielle Wirkstoffe für die Behandlung pulmonaler Hypertonie bzw. des Lungenischämie-Reperfusionsoödems in Betracht gezogen.^[146] Zur Stabilisierung der geschlossenen Konformation des humanen TRPC6-Kanals in ihren Kryo-EM-Studien, nutzten Tang *et al.* das Benzo[*d*][1,3]dioxol-Derivat **BTDM** (**17**) als hoch-affinen Blocker ($IC_{50} = 10 \text{ nM}$), den sie im Rahmen eines Screenings identifiziert haben.^[132] So waren sie in der Lage, die Struktur des humanen TRPC6-Kanals im

Komplex mit BTDM aufzuklären, dessen Bindestelle von den Transmembranhelices S3, S4 und dem S4-S5-Linker umgeben ist; der detaillierte Bindemodus konnte aufgrund der limitierten lokalen Auflösung nicht modelliert werden.^[132] Erst vor kurzem wurde eine Publikation veröffentlicht (März 2020), in welcher jeweils eine Kryo-EM-Struktur des humanen TRPC6-Kanals im Komplex mit einem Antagonisten bzw. im Agonist-gebundenen Zustand beschrieben wird; jedoch befindet sich die Bindestelle des Inhibitors im Vergleich zu **BTDM** an einer anderen Stelle innerhalb des Kanals.^[147] Mit **BI749327** (**18**, 2019, IC₅₀ = 13 nM; 85-fache Selektivität gegenüber TRPC3) wurde 2019 zudem ein oral bioverfügbarer TRPC6-Antagonist vorgestellt, mit welchem *in vivo* im Tiermodell eine Verbesserung der Herz- und Nierenfunktion unter fibrotischen Bedingungen demonstriert werden konnte.^[148]

Um ein tiefgründigeres Verständnis bezüglich der biologischen Funktion und der damit verbundenen pathophysiologischen Effekte von TRPC6-Kanälen zu erhalten, sind weitere Untersuchungen in diesem Gebiet erforderlich. Dabei könnten sich spezifische TRPC6-Inhibitoren bzw. -Aktivatoren als Werkzeuge zur Untersuchung der zugrundeliegenden molekularbiologischen Mechanismen sowie für die therapeutische Intervention als Vorteilhaft erweisen.^[125,131] Natürlich vorkommende und synthetische TRPC6-Aktivatoren, ein möglicher kausaler Zusammenhang mit Depressionen sowie ihr potenzieller pharmakologischer Nutzen werden in **Kap. 6** genauer besprochen.

1.2 Photoaffinitätsmarkierung (*Photoaffinity Labeling*)

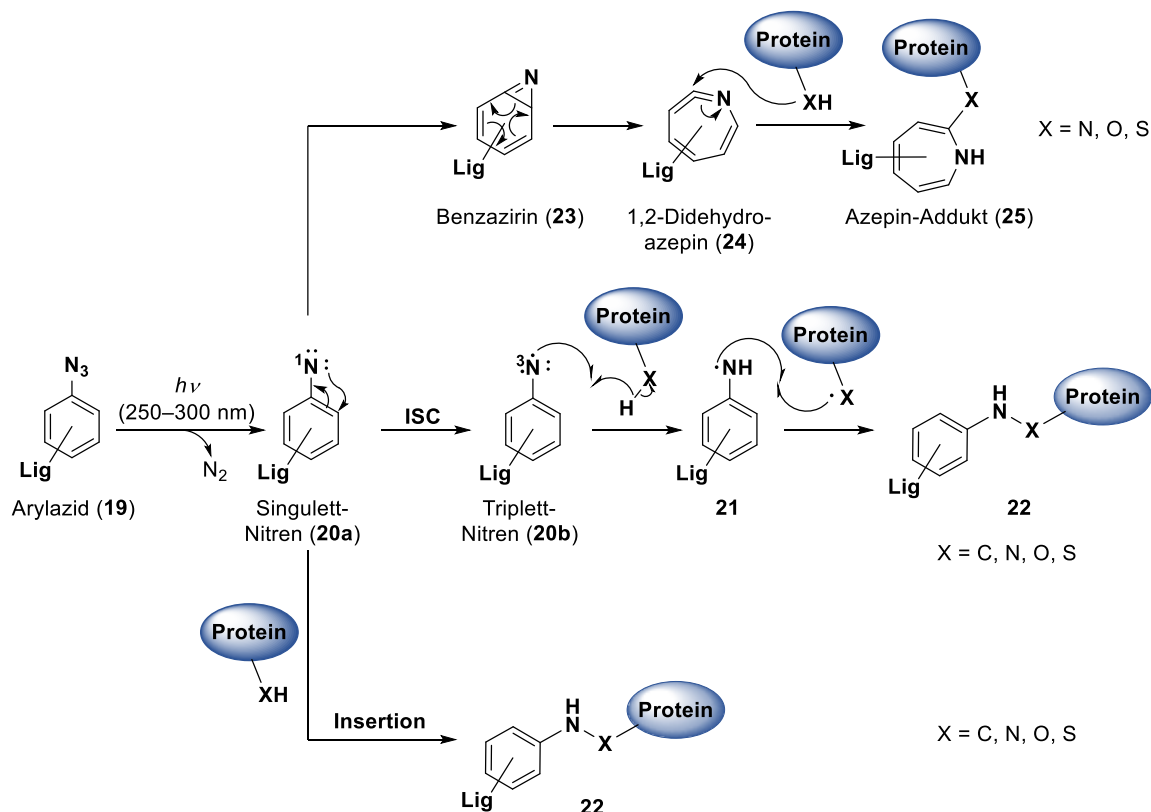
Für ein rationales Struktur-basiertes Wirkstoffdesign ist die Kenntnis der Bindestelle(n) eines Liganden bzw. eines Wirkstoffs innerhalb eines Zielproteins oder Rezeptors essenziell. Die detaillierte Analyse der physikalischen Eigenschaften der Bindetasche ermöglicht ein tiefgreifendes Verständnis der molekularen Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen und der daraus resultierenden biologischen Effekte. So können aus den erhaltenen Daten Informationen abgeleitet werden, in welchem Maß strukturelle Variationen eines Liganden die Affinität zum Rezeptor beeinflussen, was für die Entwicklung von Wirkstoffen von entscheidender Bedeutung ist.^[149-150] Zur Identifizierung von möglichen Bindestellen und Strukturaufklärung auf molekularbiologischer Ebene wird unter anderem auf Methoden wie NMR-Spektroskopie, Röntgen-Kristallographie (X-Ray), Kryoelektronenmikroskopie (Kryo-EM) und Mutagenesestudien zurückgegriffen.^[151-153] Allerdings kann die Anwendung dieser Techniken limitiert sein, vor allem wenn sich Liganden beispielsweise mit ihren Zielproteinen aufgrund niedriger Affinität nicht cokrystallisieren lassen oder Mutagenesestudien eine signifikante Beeinträchtigung der Tertiärstruktur (Veränderung der Proteindynamik) zur Folge haben. Als chemisches und komplementäres Verfahren zur strukturellen Analyse von Ligand-Protein-Interaktionen hat sich vor allem die Photoaffinitätsmarkierung (*Photoaffinity Labeling*, PAL) durchgesetzt.^[154-161] Erstmals in den frühen 1960er Jahren von Singh, Thornton und Westheimer eingeführt, hat sich dieses Konzept im Laufe der Jahrzehnte zunehmend in der pharmazeutischen und medizinischen Chemie etabliert.^[154-155,158,162] Die Photoaffinitätsmarkierung stellt eine sehr effiziente Technik in der Wirkstoffforschung zur Untersuchung spezifischer Protein-Ligand-Wechselwirkungen dar, bei der (alternative) Ligandbindestellen, unbekannte Zielproteine/-rezeptoren in komplexen Proteinmischungen identifiziert sowie Protein-Protein-Interaktionen analysiert werden können.^[154-155] Bei der Photoaffinitätsmarkierung wird ein mit einer photoreaktiven Gruppe (PG) chemisch modifizierter Ligand zunächst mit dem entsprechenden Zielprotein bzw. Rezeptor zur Ausbildung eines nicht-kovalenten Ligand-Rezeptor-Komplexes inkubiert und im Anschluss mit einer bestimmten Wellenlänge des Lichts (i. d. R. UV-Licht) bestrahlt (**Schema 1.1**). Die Photolyse führt zur Generierung hochreaktiver Intermediate (hauptsächlich Carbene und Nitrene), welche unmittelbar eine kovalente Bindung zum Makromolekül ausbilden und somit eine irreversible Anlagerung des Liganden, idealerweise in der Bindetasche, ermöglichen. Diese Modifikation kann nach proteolytischem Verdau schließlich mittels SDS-PAGE, HPLC und Massenspektrometrie (MS) untersucht werden, sodass wertvolle strukturelle und mechanistische Informationen in Bezug auf den Ligand-Protein- bzw. -Rezeptor-Komplex gewonnen werden können. In Kombination mit massenspektrometrischen Methoden ist es vor allem möglich, die Stöchiometrie zwischen Liganden und Rezeptor sowie durch Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS bzw. MSⁿ) die exakten Aminosäurereste in der Bindetasche zu ermitteln (**Schema 1.1**).^[163]



Schema 1.1: Schematische Darstellung eines repräsentativen *Photoaffinity Labeling*-Experiments in Kombination mit massenspektrometrischen Verfahren zur Charakterisierung von Protein-Ligand-Interaktionen. Die Methode ermöglicht die Identifizierung von Zielproteinen/-rezeptoren (Proteinlevel), die strukturelle Bestimmung der Bindestelle (Oligopeptidlevel) sowie der ligandenmarkierten Aminosäure (Aminosäurelevel) nach Sequenzierung *via* Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS bzw. MS^n). Lig: Ligand; PG: photoreaktive Gruppe.^[163-164]

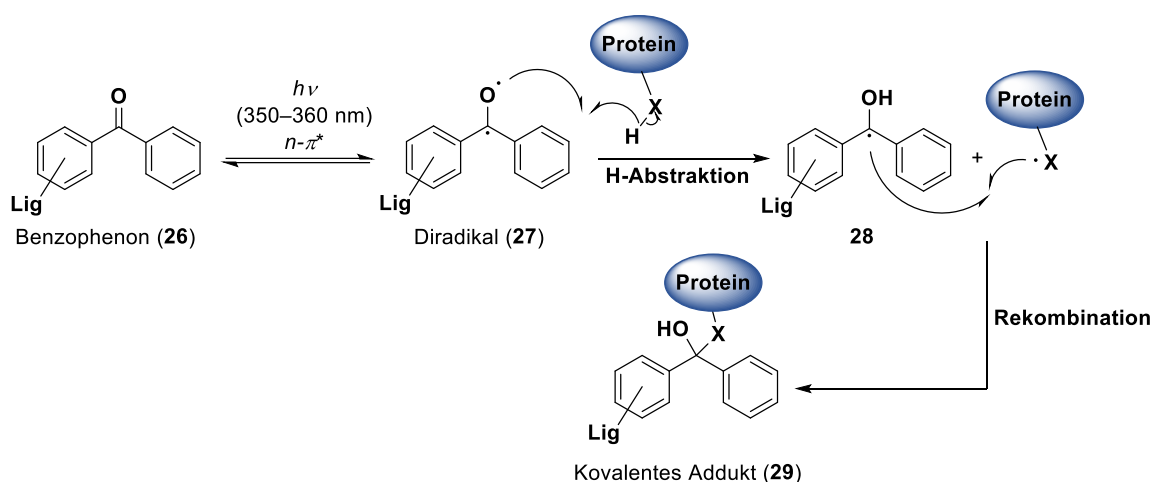
Mithilfe der erhaltenen Resultate kann ein 3D-Modell zur Visualisierung der Ligand-Protein-Interaktion erstellt werden, welches z. B. das Struktur-basierte Wirkstoffdesign zur Herstellung potenterer Arzneistoffe signifikant vorantreiben kann. Für den Einsatz in *Photoaffinity Labeling*-Experimenten muss eine geeignete photoreaktive Gruppe einige Kriterien erfüllen.^[154-155] Idealerweise kann in Abwesenheit von Licht bzw. unter milden Umgebungslicht-Bedingungen und innerhalb eines breiten pH-Bereiches eine Stabilität gewährleistet werden. Zusätzlich zu den chemischen Gesichtspunkten sollte die Affinität durch die Einführung des zusätzlichen Bausteins in den Liganden nicht signifikant beeinträchtigt werden und das reaktive Intermediat nur ein einziges kovalentes und stabiles Addukt generieren, um Fehlinterpretationen bei der Auswertung zu vermeiden. Zudem sollte die Lebensdauer der reaktiven Zwischenstufe so kurz wie möglich sein, sodass die Ausbildung der kovalenten Bindung zum Zielprotein noch vor Dissoziation des nicht-kovalenten Ligand-Rezeptor-Komplexes erfolgt; umgekehrt sollte jedoch der angeregte Zustand lange genug dauern, sodass die Verweildauer in unmittelbarer Nähe der Bindestelle genügt, um eine kovalente Bindung zu knüpfen. Eine ideale PG sollte zusätzlich in der Lage sein, sowohl (inerte) C-H-, als auch nucleophile X-H-Bindungen ($X = N, O, S$) nach photolytischer Aktivierung anzugreifen.^[154-155] Eine abschließende kritische Überlegung berücksichtigt die Wellenlänge, bei welcher der modifizierte Ligand aktiviert wird. Diese sollte in einem Bereich stattfinden, in welchem der photolytische Schaden an den biologischen Proben auf ein Minimum beschränkt wird.^[154-155]

Die am häufigsten bei der Photoaffinitätsmarkierung eingesetzten photoreaktiven Gruppen sind Arylazide, Benzophenone und (Trifluormethyl-)Diazirine.^[154-156,159,165-166] Aufgrund ihrer simplen Synthese und der kommerziellen Erhältlichkeit stellen Arylazide (**19**) die am meisten eingesetzten PG dar, die bei Bestrahlung zunächst Singulett-Nitrene (**20a**) unter Freisetzung von Stickstoff generieren (**Schema 1.2**).^[156,167-168] Im Vergleich zu Carbenen ist die Reaktivität der Nitrene geringer und ihre Reaktion führt i. d. R. zur Ausbildung von Stickstoff-Kohlenstoff- bzw. labilen Stickstoff-Heteroatombindungen, was für die Bestimmung einer Aminosäure in der Bindestelle ungeeignet sein kann.^[156] Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Arylnitrene schnell unter Ausbildung von Benzazirinen (**23**) cyclisieren, die anschließend einer intramolekularen Ringexpansion zu cyclischen Ketenimininen (1,2-Didehydroazepin, **24**) unterliegen. Letztere stellen stabilere Elektrophile dar, welche aufgrund ihrer erhöhten Lebensdauer jedoch die Quervernetzungs-effizienz und Selektivität im *Photoaffinity Labeling*-Experiment herabsetzen können und nicht in der Lage sind, mit nicht-aktivierten C-H-Bindungen zu reagieren.^[166,168] Durch *Intersystem Crossing* (ISC) kann zudem aus dem Singulett-Nitren der entsprechende Triplett-Zustand generiert werden, aus dem ein radikalischer und daher unvorhersagbarer Reaktionsverlauf resultiert. Eine weitere Komplikation von Arylaziden kann sich aus der für ihre Photoaktivierung erforderlichen kurzen Wellenlänge (λ ca. 250–300 nm) ergeben, bei welcher eine substantielle Beschädigung der eingesetzten Biomoleküle möglich ist.^[155]



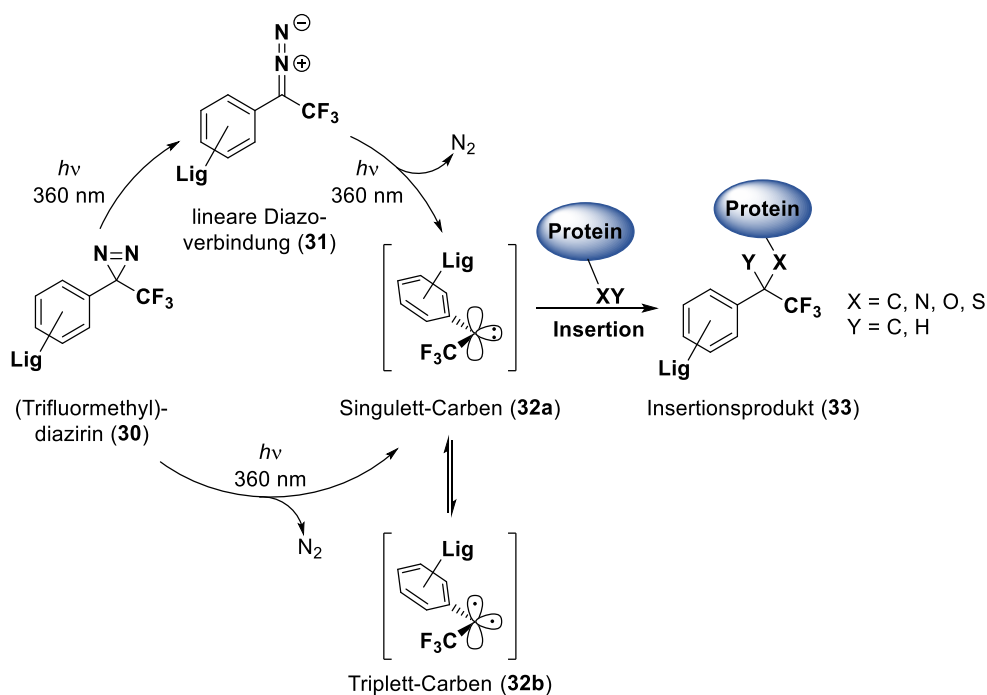
Schema 1.2: Photoaktivierungsmechanismus von Arylaziden. Lig: Ligand; ISC: *Intersystem Crossing*. in Anlehnung an Rizk *et al.* bzw. Hibert *et al.*^[168-169]

Benzophenone (**26**) können hingegen bei längeren und weniger schädlichen Wellenlängen ($\lambda \approx 360$ nm) aktiviert werden, wobei in einem reversiblen Schritt reaktive Triplett-Diradikale (**27**) entstehen (Anregung eines Elektrons aus einem nichtbindenden sp^2 -n-Orbital des Sauerstoffs in das antibindende π^* -Orbital der Carbonylgruppe), die in der Lage sind, H-Atome aus schwachen C-H- σ -Bindungen selbst in Gegenwart von Wasser zu abstrahieren und somit eine Quervernetzung zum Zielprotein realisiert wird (**Schema 1.3**).^[170] Darüber hinaus hat sich ihre Stabilität und inertes Verhalten in vielen Lösemitteln sowie ihre einfache synthetische Zugänglichkeit als vorteilhaft erwiesen.^[155] Meist sind bei Benzophenon-Derivaten als PG jedoch längere Belichtungszeiten erforderlich, was die Gefahr von unspezifischen Markierungen maßgeblich erhöht. Zudem können der größere Raumanpruch und die erhöhte Lipophilie durch Einführen einer Benzophenon-Einheit im Vergleich zu Arylaziden oder -Diazirinen (s. u.) zu einer signifikanten Reduktion der Affinität zum Zielprotein bzw. Rezeptor führen.^[155-156]



Schema 1.3: Photochemische Aktivierung der Benzophenon-Einheit. Lig: Ligand.

Bei Diazirinen handelt es sich um dreigliedrige Ringsysteme mit einem Kohlenstoff- und zwei Stickstoffatomen, die im Vergleich zu den oben aufgeführten photoreaktiven Gruppen die geringste Größe aufweisen, wodurch der sterische Anspruch des modifizierten Liganden minimiert und die Bindung innerhalb der Bindetasche erleichtert wird.^[163,171-173] Die häufige und breite Anwendung von (Trifluormethyl)diazirinen (**30**) in *Photoaffinity Labeling*-Experimenten ist unter anderem auf die hohe thermische sowie chemische Stabilität gegenüber eine Vielzahl diverser Reagenzien (Nucleophile, Elektrophile, Säuren und Basen, Oxidations- und Reduktionsmittel etc.) trotz ihrer Ringspannung zurückzuführen.^[172,174] Ein weiterer entscheidender Vorteil ist ihre Aktivierung bei längeren Wellenlängen ($\lambda \approx 360$ nm), sodass die photolytische Beschädigung des eingesetzten biologischen Systems auf ein Minimum reduziert wird.^[172-174] Bei Exposition mit langwelliger UV-Strahlung werden unter Freisetzung molekularen Stickstoffs Carbene (**32**) als hoch reaktive und kurzlebige (Lebensdauer von einigen ps bis ns)^[175] Photointermediate in hoher Quantenausbeute generiert, die inert gegenüber intramolekularen Umlagerungsreaktionen sind (**Schema 1.4**).^[163,171]

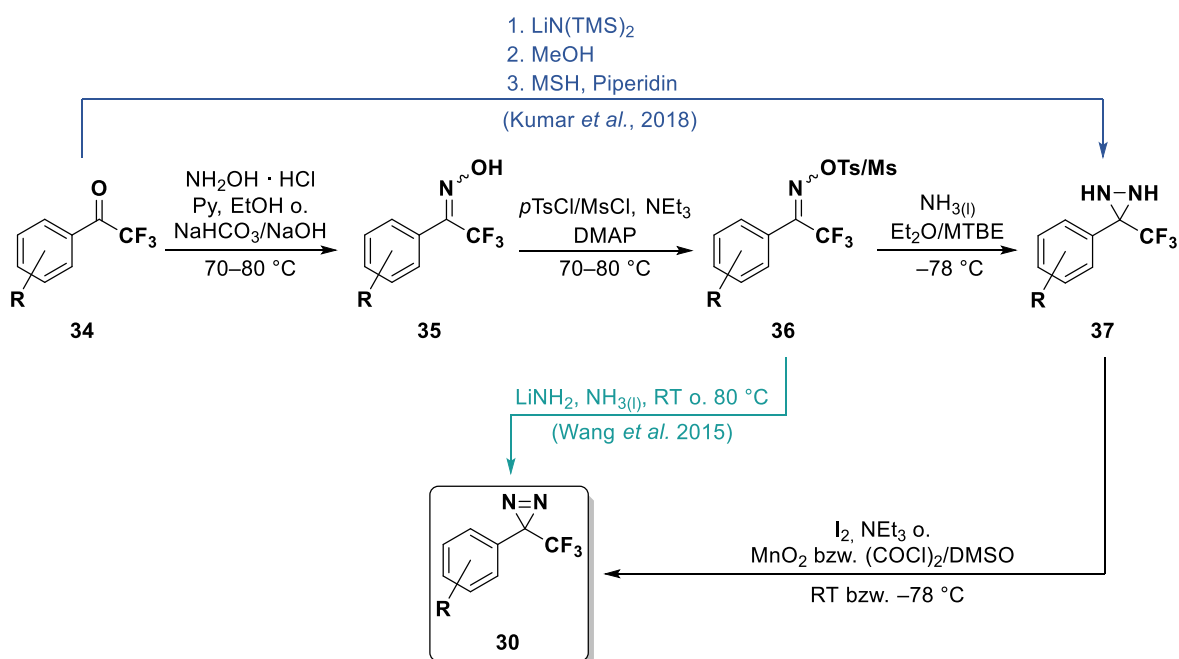


Schema 1.4: Photoreaktion von 3-Aryl-3(trifluormethyl)-3H-diazirinen sowie repräsentative Darstellung der elektronischen Zustände der intermediär gebildeten Carbene. Lig: Ligand.

Carbene besitzen als bivalente Kohlenstoffintermediate zwei nicht-bindende Orbitale und können im Singulett- bzw. im Triplett-Zustand mit zwei unterschiedlich verteilten Elektronen vorliegen.^[163,172] In Singulett-Carbenen **32a** weisen beide Elektronen einen antiparallelen Spin auf und besetzen dasselbe Orbital, während die Elektronen im Triplett-Zustand **32b** eine parallele Spin-Orientierung einnehmen und auf zwei verschiedene Orbitale verteilt sind (siehe **Schema 1.4**).^[163,172] Singulett-Carbene bilden charakteristischerweise kovalente Verknüpfungen durch schnelle Insertionsreaktionen mit C-C-, C-H- und X-H-Bindungen (X = N, O, S) mit Nachbarmolekülen unter Ausbildung stabiler Addukte aus.^[176] Im Grundzustand liegen Carbene aufgrund geringerer Coulomb-Abstoßung zwischen den nichtbindenden Elektronen durch ihre Verteilung auf zwei Orbitale mit parallelem Spin generell als Triplett-Spezies vor.^[163,177-178] Die Energiedifferenz zwischen dem Triplett- und dem Singulettzustand (ca. $8\text{--}10 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$)^[163] kann durch Phenylsubstituenten deutlich herabgesetzt werden (auf ca. $2\text{--}4 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$), sodass die beiden Zustände sehr schnell konvertieren und im Gleichgewicht zueinander stehen.^[179] Auch wenn im Grundzustand prinzipiell Triplett-Carbene vorliegen, konnte für den Großteil der in *Photoaffinity Labeling*-Experimenten erhaltenen Produkte primär ein Ursprung aus dem energetisch tiefliegenden und hochreaktiven Singulett-Zustand nachgewiesen werden.^[163] Die vorteilhaften photochemischen Eigenschaften der Carbene führen dazu, dass Diazirine infolge der Photolyse mit hoher Selektivität Quervernetzungen zum Zielprotein ausbilden und somit die Gefahr von unspezifischer Markierung herabgesetzt wird.^[172-173] Durch ihre hohe Reaktivität werden Carbene jedoch häufig schnell durch umgebendes Wasser gequench, sodass im Hinblick auf die PAL-Ausbeute ein vermeintlicher Nachteil entsteht. Dieses Charakteristikum kann sich hingegen als Vorteil erweisen, da dadurch die

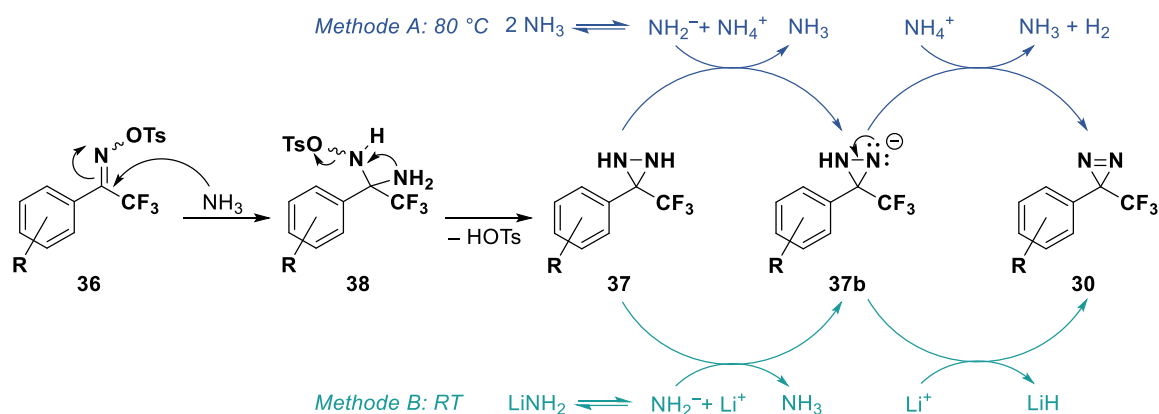
Ausbildung nicht-spezifischer Addukte signifikant minimiert wird.^[172] Parallel zur Carbenbildung unterliegen Diazirine einer photochemisch induzierten Isomerisierung zu linearen Diazoverbindungen (**31**; vgl. **Schema 1.4**), die eine wesentlich höhere Lebensdauer und geringere Reaktivität als Carbene aufweisen. Infolgedessen können Diazoverbindungen von ihrer ursprünglichen Bildungsstelle dissoziieren und nichtspezifisch mit anderen Teilen des Zielproteins bzw. mit anderen Makromolekülen reagieren.^[163,173] Durch das Einführen einer Trifluormethyl- und Phenylgruppe in α -Position zum Diazirinring kann das photochemisch generierte Diazoisomer u. a. aufgrund der elektronenziehenden Natur der CF_3 -Einheit unter normalen Photolysebedingungen substanziell stabilisiert werden und somit einer unspezifischen Photoaffinitätsmarkierung entgegengewirkt werden.^[163,174]

Im Vergleich zu den Arylaziden und Benzophenon-Derivaten sind für die Darstellung von (Trifluormethyl)diazirinen weitaus längere und komplexere synthetische Transformationen erforderlich (**Schema 1.5**).^[172-173] Typischerweise sind aromatische (Trifluormethyl)diazirin-Analoga aus den Trifluormethylketonen **34** synthetisch zugänglich, die zunächst mit Hydroxylamin-Hydrochlorid unter basischen Bedingungen bei 70–80 °C zum entsprechenden Oxim **35** umgesetzt werden. Im nächsten Schritt wird die Hydroxygruppe von **35** unter Verwendung von *p*TsCl bzw. MsCl in Gegenwart von Triethylamin sowie DMAP aktiviert und das resultierende *O*-Sulfonyloxim **36** durch Einwirkung von flüssigem Ammoniak in das Diaziridin **37** überführt. Die Synthese kann schließlich durch Oxidation von **37** unter Zuhilfenahme diverser Oxidationsmittel (I_2/NEt_3 , MnO_2 , $(\text{COCl})_2/\text{DMSO}$ etc.) komplettiert werden, wobei das (Trifluormethyl)diazirin **30** in der Regel in hohen Ausbeuten gewonnen wird.^[172]



Schema 1.5: Synthetische Routen zur Darstellung von aromatischen (Trifluormethyl)diazirin-Derivaten.

Eine direkte Darstellung des Diazirins **30** aus dem Tosyloxim **36** wurde von Wang *et al.* unter Verwendung von flüssigem Ammoniak bei 80 °C oder bei Raumtemperatur in Gegenwart von Lithiumamid realisiert.^[180] Mechanistisch betrachtet wird bei beiden Reaktionsbedingungen eine Deprotonierung des intermediär entstehenden Diaziridins **37** durch freie Amid-Ionen diskutiert (Schema 1.6).



Schema 1.6: Vorgeschlagener Mechanismus der Diazirinsynthese nach Wang *et al.*^[180]

Eine ammoniakfreie Darstellung des Diaziridins **37** aus dem Trifluormethylketon **34** wurde von Kumar *et al.* 2018 veröffentlicht, welche in einer Folge aus *N*-TMS-Ketimin-Synthese mittels Lithiumbis(trimethylsilyl)amid, Methanolsolvolyse und Aminierung über *O*-Mesitylsulfonyl-Hydroxylamin (MHS) gewährleistet werden konnte.^[181] Auch wenn sich die Synthese der (Trifluormethyl)diazirine vergleichsweise als komplexer erweist, werden diese heutzutage aufgrund der exzellenten chemischen Stabilität sowie den einzigartigen Vorteilen (geringe Größe, längere Anregungswellenlängen, höhere Quervernetzungseffizienz etc.) häufig und zunehmend in PAL-Experimenten eingesetzt.^[172,176]

Zusätzlich zu den photoreaktiven Gruppen können modifizierte Liganden entsprechende Reportereinheiten zur leichteren Isolierung der photomarkierten Biomoleküle beinhalten.^[155,161] Oftmals werden beispielsweise radioaktive Isotope (z. B. ^{125}I , ^3H), Biotin, Epitop-*Tags* oder Fluorophore wie z. B. Fluorescein oder BODIPYs direkt in die Photosonde eingebaut.^[155,161] Radioaktive Reportereinheiten weisen eine besonders geringe Größe auf und lassen sich hoch sensitiv detektieren. Allerdings unterliegen diese aufgrund kurzer Halbwertszeiten einer schnellen Zersetzung und erfordern einen speziellen Umgang. Biotin als *Affinity-Tag*, Antikörper-Epitop-Reportereinheiten sowie Fluorophore ermöglichen ebenfalls eine leichte Anreicherung, Isolierung und Detektion der PAL-Produkte, ihr Nachteil besteht jedoch in ihrer Größe, sodass ihre biologische Aktivität zum entsprechenden Rezeptor bzw. Zielprotein negativ beeinträchtigt werden kann.^[155,161]

Die Anwendung und Leistungsfähigkeit der Photoaffinitätsmarkierung als Methode zur Identifikation der Bindestelle eines Liganden soll schließlich anhand eines Beispiels demonstriert werden: Woll *et al.* nutzten 2017 ein chemisch modifiziertes Derivat des Anästhetikums Propofol (**39**, **Abb. 1.9**) mit einem (Trifluormethyl)diazirin als photoreaktive Gruppe, um eine oder mehrere allosterische Bindestelle(n) innerhalb des TRPA1-Ionenkanals (vgl. auch **Kap. 1.1**) zu identifizieren.^[182]

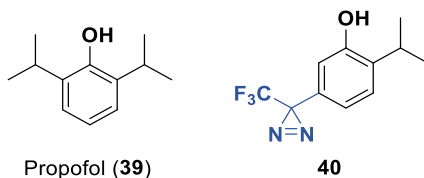


Abb. 1.9: Chemische Strukturen von Propofol (**39**) und des modifizierten Liganden **40**.

Mithilfe von Mutagenesestudien wurde zwar zuvor eine potenzielle Bindestelle von Propofol vorgeschlagen, jedoch konnte nicht eindeutig zwischen ligand- bzw. protein-basierten Effekten differenziert werden.^[182-183] Aus diesem Grund sollte mit der Photoaffinitätsmarkierung ein direktes Verfahren für den Nachweis der Propofol-Bindestelle(n) durchgeführt werden. Nach Überprüfung, dass das modifizierte Propofol-Derivat **40** über eine ähnliche TRPA1-Aktivität wie Propofol selbst verfügt, wurden isolierte Membranen mit *m*TRPA1-Ionenkanälen inklusive FLAG-Reportereinheit (für die Erkennung durch spezifische Antikörper bei der Aufreinigungsprozedur) mit dem ³H-markierten Photoliganden **40** belichtet.^[182] Im Anschluss an die Reinigung und Isolierung der *m*TRPA1-Kanäle konnten unter Zuhilfenahme massenspektrometrischer Methoden zwei modifizierte Aminosäurereste (V954 und E969) in der S6-Transmembranhelix detektiert werden.^[182] Wie aus den von Woll *et al.* generierten Modellen des humanen TRPA1-Kanals und damit durchgeführten Dockingstudien hervorgeht, befinden sich die o. g. Reste nicht in einer gemeinsamen Kavität, sondern sind in verschiedenen Bindetaschen aufzufinden (**Abb. 1.10**).^[182] Durch die Ergebnisse der Photoaffinitätsmarkierung in Kombination mit den computergestützten Studien konnte somit ein Nachweis für die Bindung von Propofol an der zuvor vermuteten und an einer weiteren Bindestelle erbracht werden. Diese Resultate stehen im Einklang mit der beobachtbaren bimodalen TRPA1-Aktivität von Propofol, welches den Kanal in niedrigen Konzentrationen aktiviert und bei hohen Konzentrationen eine inhibitorische Wirkung ausübt.^[182]

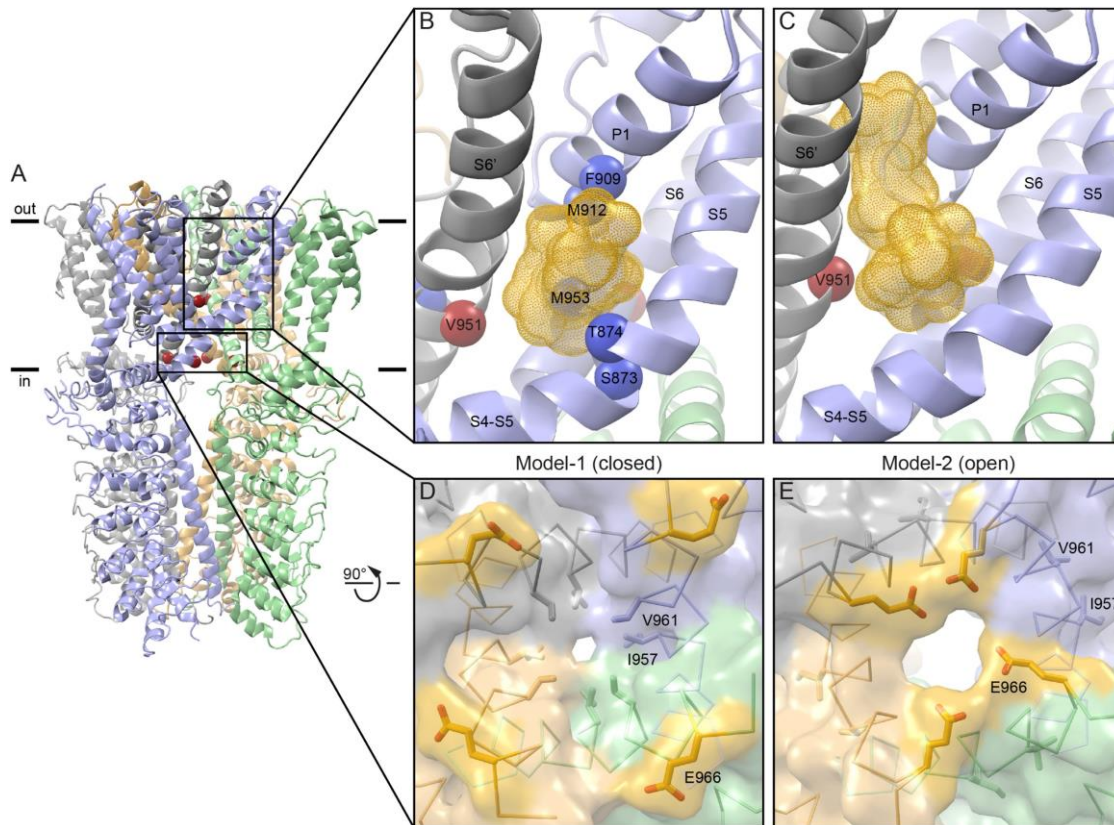


Abb. 1.10: Lage der photomarkierten Reste im Modell der geschlossenen und offenen Konformation des humanen TRPA1-Kanals.^[182] Die photomarkierten Aminosäurereste V954 und E969 in *m*TRPA1-FLAG können mit V951 und E966 im *h*TRPA1 übereinander gelagert werden. (A) Seitenansicht einer Cartoon-Repräsentation der Kryo-EM-Struktur von *h*TRPA1, wobei die ungefähre Lage der Membran mit schwarzen Balken angegeben, jede Untereinheit unterschiedlich eingefärbt ist und die α -Atome der modifizierten Reste als rote Kugeln dargestellt werden. (B) und (C) Darstellung der Docking-Ergebnisse mit Propofol und dem modifizierten Derivat im geschlossenen (Modell 1) und offenen Zustand (Modell 2). Die gelb gepunkteten Connolly-Oberflächendarstellungen ergeben sich aus den jeweils fünf höchst bewerteten vorhergesagten Docking-Posen (AutoDockVina).^[182] Für detailliertere Erläuterungen sei auf die entsprechende Publikation von Woll *et al.* verwiesen.^[182] Reprinted from: *Biophysical Journal*, Vol 113, Kellie A. Woll *et al.*, Sites Contributing to TRPA1 Activation by the Anesthetic Propofol Identified by Photoaffinity Labeling, 2168–2172, Copyright (2017), with permission from Elsevier.^[182]

2 Projektübersicht

Dieser Teil (Teil I) der vorliegenden Ausarbeitung umfasst vier verschiedene Kapitel (**Kap. 3–6**), in welchen die experimentell erhaltenen Befunde jedes Forschungsprojektes beschrieben sind. Jede dieser Aufgabenstellungen wird von einer kapitelspezifischen Einleitung und Zielsetzung bzw. einer Zusammenfassung eröffnet. Darin werden die relevanten Publikationen sowie Ziele in Kürze vorgestellt, um eine Einordnung in Verbindung mit der allgemeinen Einleitung (**Kap. 1**) zu ermöglichen. Die Ausführungen der Projekte werden zudem mit einer kurzen Zusammenfassung und einem Ausblick auf zukünftige Arbeiten abgerundet.

Kap. 3 befasst sich mit einer detaillierten Diskussion zur Synthese und eingehenden Charakterisierung photoreaktiver TRPML1-Agonisten für die Anwendung in *Photoaffinity Labeling*-Experimenten zur Aufklärung potenzieller Bindestellen im humanen TRPML1-Kanal. Die finalen Resultate dieses Forschungsprojektes werden in Form eines Manuskripts ausführlich erörtert.

In einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von [REDACTED] (Johannes Gutenberg-Universität Mainz) wurden basierend auf ihren erhaltenen TRPML2-ELD-Kristallstrukturen sorgfältige computergestützte strukturelle Analysen durchgeführt, um charakteristische Merkmale der Architektur aufzudecken und diese in einem möglichen Zusammenhang zur physiologischen Funktion gebracht. Die erhaltenen Ergebnisse sind bereits im Rahmen einer Publikation veröffentlicht worden (**Kap. 4**).

Den in **Kap. 5** aufgeführten Resultaten liegt ein kombinatorischer Ansatz zum Design neuer TRPML-Aktivatoren zur Erhöhung der Selektivität und Aktivierungsprofils zugrunde. Basierend auf den Leitstrukturen zweier bekannter TRPML-Agonisten wurden Teile der Strukturen chemisch modifiziert, sodass eine Substanzbibliothek mit neuen potenziellen TRPML-Aktivatoren generiert wurde. Die Verbindungen wurden im Rahmen dieses Projekts bereits in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von [REDACTED] in einem Zellviabilitätstest hinsichtlich ihrer Cytotoxizität getestet.

Ferner wurden analog dazu in einer Forschungsk Kooperation mit der Arbeitsgruppe von [REDACTED] (Johannes Gutenberg-Universität Mainz) auf Grundlage bekannter TRPC6-Agonisten synthetisch Reste variiert, um den Einfluss verschiedener Substituenten auf die Ionenleitfähigkeit von TRPC6 zu eruieren. Die dazugehörigen experimentellen Befunde werden schließlich in **Kap. 6** diskutiert.

3 Design, Synthese und photochemische Charakterisierung von (Trifluormethyl)diazirin-basierten TRPML1-Liganden

3.1 Einleitung, Motivation und Vorarbeiten

Das in diesem Kapitel beschriebene Projekt beschreibt einen fundierten chemischen Ansatz zur Identifizierung potenzieller Bindestellen und zur Aufklärung der Ligand-Rezeptor-Interaktionen eines TRPML1-Aktivators innerhalb des TRPML1-Ionenkanals. Wie aus den in **Kap. 1.1.1** beschriebenen Sachverhalten hervorgeht, führt die Erkrankung an der lysosomalen Speicherkrankheit *Mucopolipidose Typ IV* (MLIV), die das Resultat mutierter TRPML1-Ionenkanäle im menschlichen Organismus darstellt, zu gravierenden gesundheitlichen Beeinträchtigungen der betroffenen Patienten.^[55-56,74] Gegenwärtig existieren jedoch keine spezifischen Therapiemöglichkeiten für MLIV-Patienten, die lediglich auf symptomatische Behandlungen zurückgreifen können.^[83,104] 2014 entwickelten Chen *et al.* den niedermolekularen TRPML1-Agonisten **MK6-83** (**41**, **Abb. 3.1**) und demonstrierten in Patientenzellen mit spezifischen MLIV-Punktmutationen dessen Potenzial zur Wiederherstellung der Kanalaktivität sowie die Fähigkeit, krankheitsspezifische Anomalien wie z. B. die gestörte Schwermetallionenhomöostase und Defekte im endolysosomalen System zu verbessern.^[104]

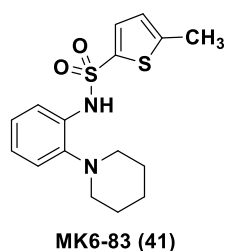


Abb. 3.1: Struktur des von Chen *et al.* identifizierten TRPML1-Aktivators **MK6-83**.^[104]

Die Ergebnisse in Kombination mit der besonders hohen Affinität bzw. Aktivität an TRPML1 ($EC_{50}(\text{TRPML1}) = 0.11 \pm 0.01 \mu\text{M}$; vgl. auch **Kap. 5**) deuten darauf hin, dass der TRPML1-Aktivator **MK6-83** als Grundlage für einen pharmakologischen *small-molecule* Behandlungsansatz fungieren könnte, der sich an eine spezifische Untergruppe von *Mucopolipidose Typ IV*-Patienten richtet.^[104] Bisher existiert jedoch keine Kenntnis über die exakte Position der Bindestelle von **MK6-83** innerhalb des TRPML1-Kanals und der zugrunde liegenden Schlüsselinteraktionen zum Rezeptor, was für das strukturbasierte Design und für die Entwicklung von neuen Medikamenten zur Behandlung von MLIV von fundamentaler Bedeutung wäre.^[184-185]

Die Identifizierung der Bindestelle(n) dieses TRPML1-Agonisten ist aus den oben erörterten Gründen von besonders hohem biologischen und klinischem Interesse, wobei die strukturelle Analyse der Ligand-Ionenkanal-Wechselwirkungen über das effiziente chemische Verfahren der Photoaffinitätsmarkierung zur Erreichung dieses Ziels geeignet scheint. Es existiert bereits eine

Vielzahl an Veröffentlichungen, in welchen erfolgreich über das *Photoaffinity Labeling* von Ionenkanälen durch modifizierte Agonisten bzw. Antagonisten berichtet wurde.^[182,186-188]

In diesem Forschungsprojekt und als vorrangiges Ziel dieses Teils der Dissertation sollte daher ein chemisches Analogon des TRPML1-Aktivators **MK6-83** mit photoreaktiver (Trifluormethyl)diazirin-Gruppe (PG) entworfen und mithilfe modernster Methoden der organischen Chemie synthetisiert werden. Eine anschließende umfangreiche kinetische Charakterisierung der photochemischen Eigenschaften sowie Analyse der Stabilität unter massenspektrometrischen Bedingungen und bei langfristiger Lagerung soll zusätzliche relevante Informationen für eine nachfolgende Anwendung in der Photoaffinitätsmarkierung von TRPML1-Kanälen liefern. Zudem wäre die Integration der photoreaktiven Gruppe an verschiedene Positionen des ursprünglichen Aktivators zur Durchführung einer Kartierung (*binding site mapping*) und Erhöhung der topologischen Auflösung der Bindetasche vorteilhaft. Diesen und den bereits von *Chen et al.* gefundenen Struktur-Wirkungsbeziehungen zufolge (im folgenden Kapitel (**Kap. 3.2**) detaillierter beschrieben), wurde der zentrale aromatische Kern von **MK6-83** für eine Verknüpfung mit der photoaktivierbaren Struktureinheit ausgewählt (**Abb. 3.2**).

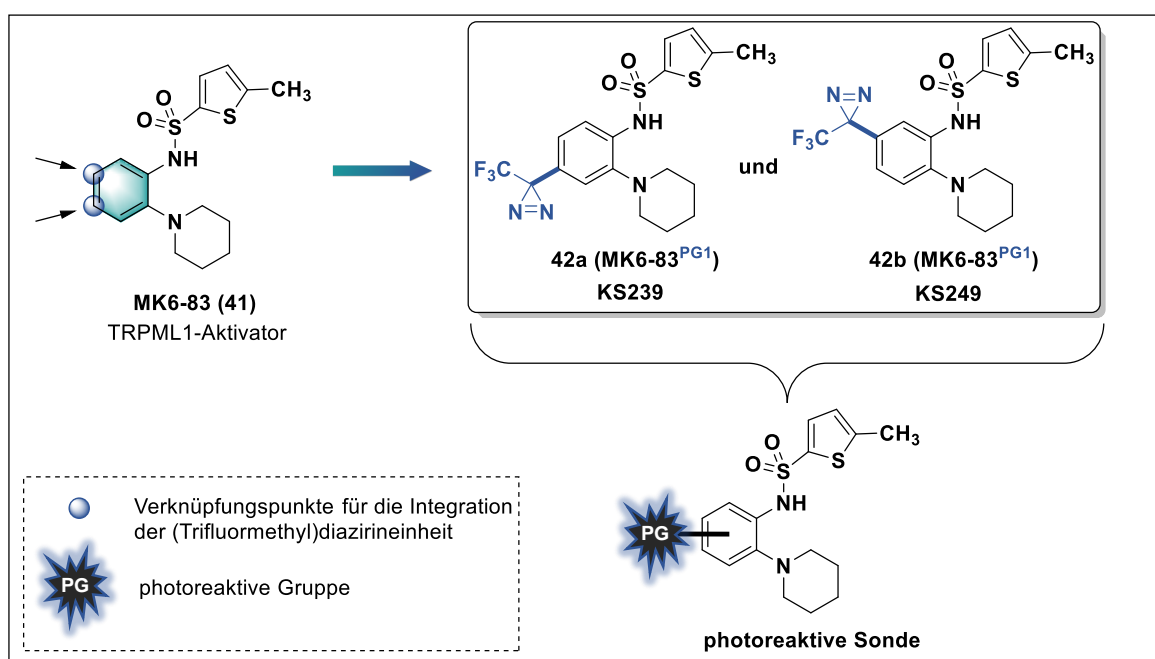
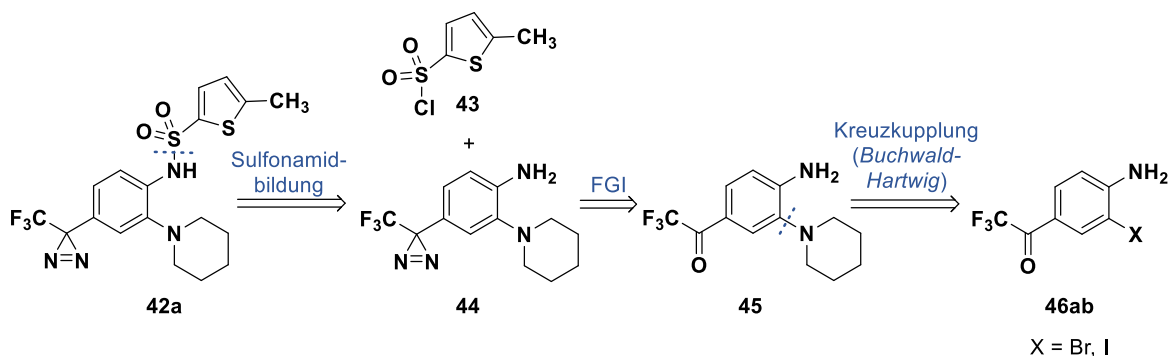


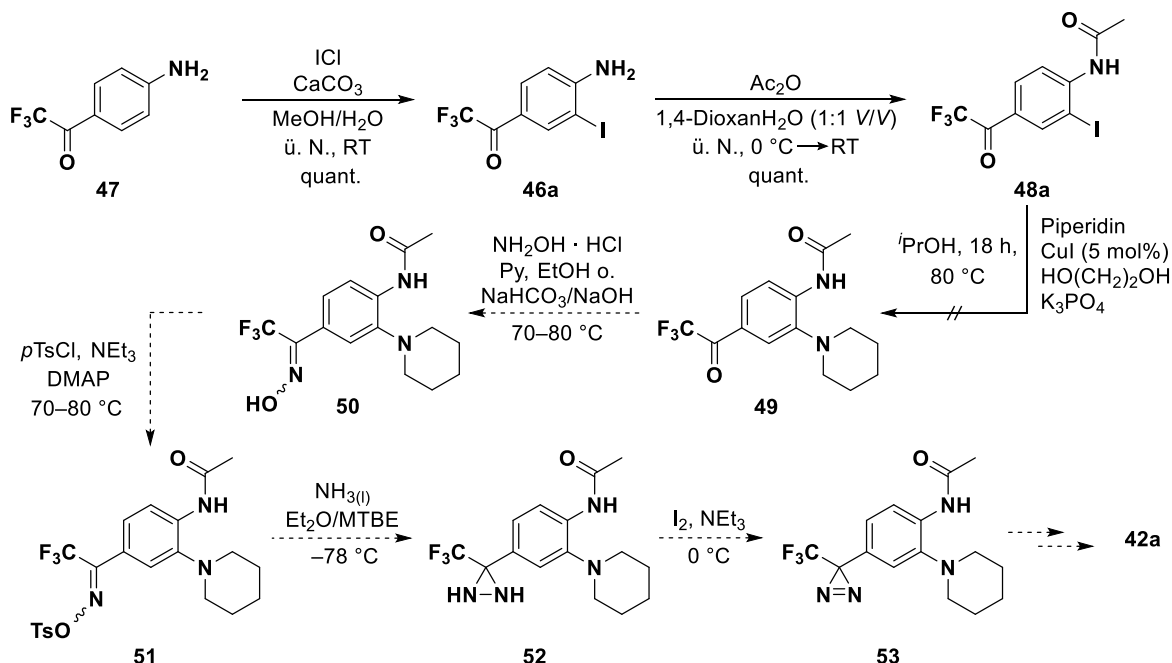
Abb. 3.2: Design der neuen photoreaktiven Sonden für die Photoaffinitätsmarkierung von TRPML1-Kanälen. Siehe **Kap. 3.2** für Details.

Zunächst sollte ein synthetischer Zugang zu (Trifluormethyl)diazirinyl-substituierten Derivaten von **MK6-83** etabliert werden, wobei eine retrosynthetische Analyse der initial geplanten Synthesesequenz von **42a** in **Schema 3.1** gezeigt ist.



Schema 3.1: Retrosynthetische Analyse der initial geplanten Sequenz zur Darstellung des (Trifluormethyl)diazirins **42a**.

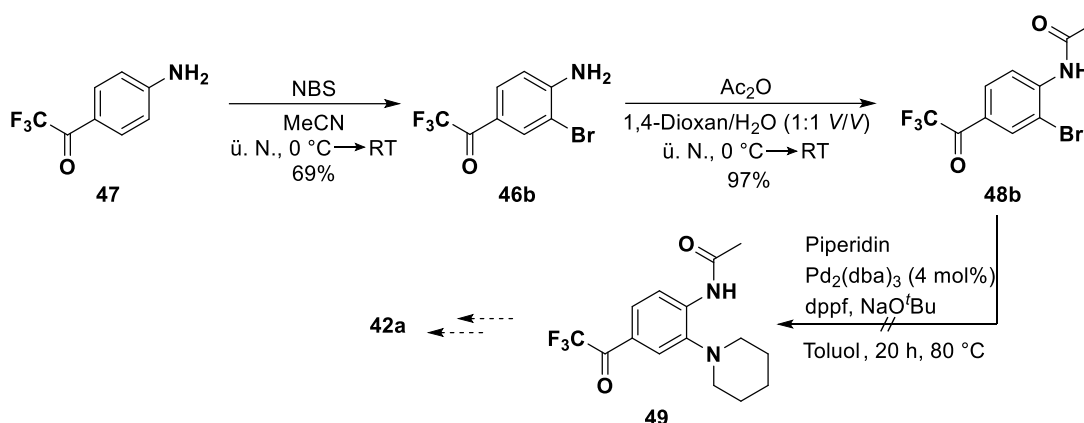
Die Einführung der (Trifluormethyl)diazirin-Gruppe sollte angelehnt an die in **Schema 1.5** und **Kap. 1.2** beschriebenen Methoden durch Transformation der entsprechenden trifluoracetylierten Verbindung **45** möglich sein, wobei die Sulfonamidbildung aus 5-Methylthiophen-2-sulfonylchlorid (**43**) gemäß dem Verfahren zur Darstellung von **MK6-83** erfolgen sollte.^[104] Als Edukt für die geplante Synthese von **42a** wurde 4-(Trifluoracetyl)anilin (**47**) identifiziert, welches zunächst in einer Folge aus selektiver *ortho*-Monoiodierung mit Iodmonochlorid^[189] und Einführung einer *N*-Acetyl-Schutzgruppe mittels Essigsäureanhydrid in Gegenwart katalytischer Mengen Schwefelsäure^[190] zum iodierten Trifluoracetylderivat **46a** umgesetzt wurde (**Schema 3.2**).



Schema 3.2: Initiale geplante Syntheseroute zur Darstellung der photoreaktiven Sonde **42a**.

Schließlich wurde versucht, den Piperidinbaustein über eine Übergangsmetallkatalysierte Kreuzkupplung (*Ullmann*- bzw. *Buchwald-Hartwig*-Reaktion) in **48a** einzuführen. Aus diesem Grund wurde einer etablierten Kupfer(I)-katalysierten Aminierung nach Kwong *et al.* in Gegenwart von Ethylenglycol als Ligand sowie Kaliumphosphat als unterstützende Base erprobt.^[191] Die

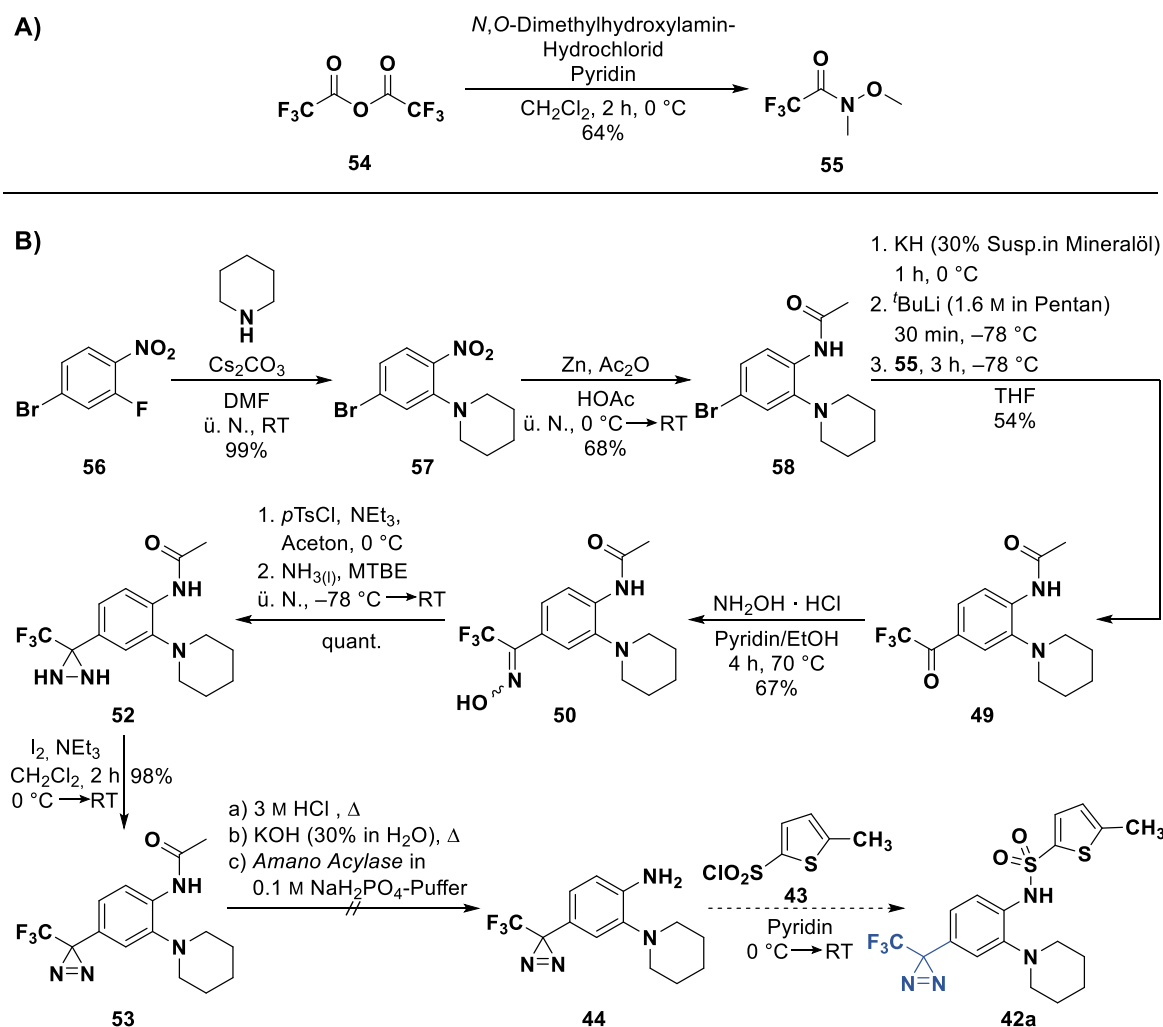
Analyse der Reaktionsmischung mittels LC-MS ergab jedoch ein komplexes Produktgemisch, in welchem das Produkt lediglich in sehr geringer Menge nachgewiesen wurde. Aus diesem Grund wurde als Alternative für die Verwirklichung dieser Transformation eine Syntheseroute mit dem entsprechend bromierten Analogon von **42a** untersucht, das in einer Sequenz aus Bromierung mittels *N*-Bromsuccinimid (NBS) und folgender Acetylierung dargestellt wurde (**Schema 3.3**). Hierbei wurde auf ein Pd(0)-Katalysesystem mit einem elektronenreichen 1,1'-Bis(diphenylphosphino)-ferrocen/(dppf)-Chelatliganden zurückgegriffen,^[192-193] welches jedoch nicht zum erhofften Produkt führte, da nur ein geringfügiger Umsatz festgestellt werden konnte.



Schema 3.3: Versuch zur Pd-katalysierten Aminierung des Trifluoracetylderivats **48b**.

Auf eine weitergehende Optimierung der Aminierungsreaktion wurde verzichtet, da mit **47** ein eher kostspieliges Edukt vorlag und zeitgleich ein neuer differenter Syntheseansatz entwickelt wurde, der aus ökonomischen Gesichtspunkten und mit Blick auf die Skalierbarkeit der durchzuführenden Reaktionen bis zum finalen Produkt weit überlegen war. In diesem alternativen Konzept wird die übergangsmetallkatalysierte Transformation umgangen und das Einführen des Piperidinringes über eine nucleophile aromatische Substitutionsreaktion realisiert (**Schema 3.4**). Dabei fungierte 4-Brom-2-fluor-1-nitrobenzol (**56**) als Edukt dieser Umsetzung, wobei 1-(5-Brom-2-nitrophenyl)piperidin (**57**) stets in sehr guten und reproduzierbaren Ausbeuten von über 97% erhalten wurde.^[194] Die Reduktion der Nitrogruppe und Acetylierung des freien Amins erfolgte simultan in einem Reaktionsschritt mit Zinkstaub in Eisessig in Gegenwart stöchiometrischer Mengen Essigsäureanhydrid.^[195] Die anschließende Trifluoracetylierungsreaktion stellte ein Schlüsselschritt der neu entworfenen Syntheseroute dar, da zunächst geeignete Reaktionsbedingungen zur Realisierung dieser Transformation gefunden werden mussten (**Tab. 3.1**). Erste Ansätze mit diversen Trifluoracetylendonoren und Organolithium-Verbindungen zur Lithiierung an der 4-Position von **58** blieben ohne Erfolg, da geringe Umsatzraten bzw. große Mengen des entsprechend debromierten Derivates **59** nachgewiesen wurden (Einträge 1–5). Vermutlich konkurrierte der Halogen-Metall-Austausch mit der NH-Abstraktion, was schließlich zu einer signifikanten Verringerung der Ausbeute und zur Bildung des dehalogenierten Produktes durch intermolekulare Reaktion des *in situ*

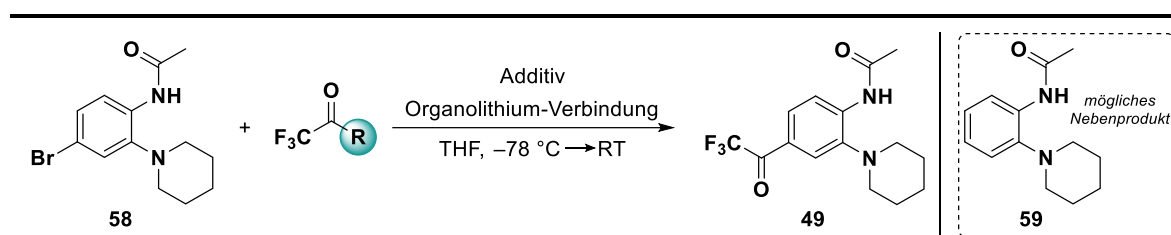
gebildeten Lithioaromaten und der NH-Funktion führte. Die Bildung des unerwünschten Nebenproduktes **59** konnte erst durch eine vorausgehende vollständige Deprotonierung des Amids mittels KH (30% in Mineralöl) und anschließendem Halogen-Metall-Austausch mit ^tBuLi/ⁿBuLi umgangen werden, sodass schließlich das (Trifluoracetyl)-Derivat **49** erhalten wurde (Eintrag 6; **Tab. 3.1**).^[196]



Schema 3.4: Alternative Syntheseroute zur Darstellung des modifizierten TRPML-Aktivators.

Die Reaktion von **49** mit Hydroxylamin-Hydrochlorid in Pyridin/Ethanol unter Rückfluss lieferte das Oxim **50**, welches als Mischung von *E/Z*-Isomeren erhalten und daraufhin mit *p*-Toluolsulfonylchlorid unter basischen Bedingungen bei 0 °C umgesetzt wurde. Das erhaltene *O*-Tosyloxim neigte zur Zersetzung bei Erwärmung und Kontakt mit Kieselgel, weshalb dieses ohne weitere Aufreinigung mit flüssigem Ammoniak bei -78 °C behandelt wurde und die Darstellung des Diaziridins **52** stets in exzellenter Ausbeute gelang. Die darauffolgenden Oxidation mit Iod in Gegenwart von Triethylamin erlaubte schließlich den Zugang zum photoreaktiven Diazirin **53**.

Tab. 3.1: Optimierung der Trifluoracetylierung von **58**.



#	Trifluoracetyl-Donor [†] (R) =	Organolithium-Verb.	Additiv	Ausbeute
1	OEt (2.0)	ⁿ BuLi (2.5 M in Hex.; 2.1 Äquiv.)	–	0% ^{a,b}
2	N(Me)O(Me) (2.0)	ⁿ BuLi (2.5 M in Hex.; 2.1 Äquiv.)	–	0% ^{a,b}
3	OEt (2.0)	^t BuLi (1.6 M in Pent.; 3.5 Äquiv.)	–	0% ^{a,b}
4	OEt (2.0)	^t BuLi (1.6 M in Pent.; 3.5 Äquiv.)	–	0%
5	CF ₃ CO ₂ (10.0)	^t BuLi (1.6 M in Pent.; 3.5 Äquiv.)	–	0% ^{a,c}
6	N(Me)O(Me) (2.0)	^t BuLi (1.6 M in Pent.; 3.5 Äquiv.)	KH [§]	54% [*]

Repräsentative Durchführung (ohne Additiv): In einem ausgeheiztem 25 mL-Schlenk-Kolben wurde **58** (0.07 M, 1.0 Äquiv.) in abs. THF (5 mL) unter Argonatmosphäre vorgelegt und bei –78 °C eine Lösung der Organolithium-Verbindung tropfenweise zugegeben. Es wurde 1 h bei dieser Temperatur gerührt und schließlich das Trifluoracetylierungsmittel (gelöst in 0.5 mL abs. THF) langsam zugegeben und weitere 3 h bei –78 °C gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe einer NH₄Cl-Lösung (ges., aq., 5 mL) gequencht und mit EtOAc (3 × 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Reaktionsführung mit Additiv: siehe Kap. 10.6.

[†]Zahlenangaben in Klammern: eingesetzte Äquivalente. [§]30% Susp. in Mineralöl. ^aKaum Umsatz. ^bDebromierung zu **59**. ^cKomplexes Produktgemisch. ^{*}Isolierte Ausbeute nach chromatographischer Reinigung.

Im weiteren Verlauf der Synthese stellte sich jedoch heraus, dass die für die Deblockierung der *N*-Acetylgruppe typischerweise eingesetzten Bedingungen (saure bzw. basische Hydrolyse)^[197-198] in diesem Fall nicht anwendbar waren, da diese Reaktionen stets mit einer Zersetzung des Diazirin-Ringes einhergingen. Eine alternative Abspaltung der Acetylgruppe auf enzymatischem Weg^[199] (*Amano acylase*) blieb ebenfalls erfolglos (kein Umsatz). Da sich Acetamide schwer hydrolysieren lassen und eher forcierte Bedingungen erforderlich sind, wurde schließlich der Einsatz einer anderen, leichter zu deblockierenden Schutzgruppe in Betracht gezogen.^[200] Letztendlich konnte durch das Einführen einer *tert*-Butoxycarbonyl-(Boc)-Schutzgruppe zu Beginn der Sequenz erreicht werden, dass der Diazirin-Ring im Verlauf der Schutzgruppenabspaltung unbeeinträchtigt blieb und somit die Synthese des photoreaktiven TRPML1-Aktivators **42a** (**KS239**) sowie dessen 5'-Konstitutionsisomer **42b** (**KS249**) erfolgreich realisiert werden konnte.

Die finale Syntheseroute, umfangreiche Kinetikstudien bezüglich der photochemischen Reaktivität sowie weitere Resultate zu den neuen photoreaktiven TRPML1-Sonden sind in Form eines Manuskripts (verfasst in englischer Sprache; siehe Kap. 3.2) zusammengefasst und werden dort detailliert erörtert. Die Laborarbeiten bei der Ausarbeitung der Synthese wurden von [REDACTED] und [REDACTED] im Rahmen ihrer Forschungsmodule unterstützt. Die Kristallstrukturanalysen wurden von [REDACTED] und [REDACTED] durchgeführt.

Eigener Beitrag: Strategisches Design und Synthese der neuen (Trifluormethyl)diazirin-basierten TRPML1-Liganden, Photoaktivierungsstudien (kinetische Charakterisierung der photochemischen Reaktion) mittels ¹⁹F-NMR und HPLC-MS-Analysen, Verfassen der dazugehörigen Abschnitte (inkl. Erstellung der Abbildungen) in der Publikation sowie der *Supplementary Information* (SI).

3.2 Manuskript

Synthesis, X-ray Structure Determination and Comprehensive Photochemical Characterization of (Trifluoromethyl)diazirine-containing TRPML1 Ligands

Kevin Schwickert,[†] Michal Andrzejewski,[‡] Simon Grabowsky,[‡] Tanja Schirmeister^{,†}*

[†]Institute of Pharmaceutical and Biomedical Sciences, Johannes Gutenberg University Mainz, Staudinger Weg 5, 55128 Mainz, Germany

[‡]Department of Chemistry and Biochemistry, University of Bern, Freiestrasse 3, 3012 Bern, Switzerland

KEYWORDS

mucopolipidosis type IV, TRP channel, photoaffinity labeling, cross-linking, (trifluoromethyl)-diazirine, mass spectrometry

ABSTRACT

(Trifluoromethyl)diazirine-based TRPML1 ion channel ligands were designed, synthesized and their structures were determined by single-crystal X-ray diffraction analysis. Photoactivation studies via ¹⁹F NMR spectroscopy and HPLC-MS analysis revealed distinct kinetical characteristics in selected solvents and favorable photochemical properties in aqueous buffer. These photoactivatable TRPML activators represent useful and valuable tools for TRPML photoaffinity labeling combined with mass spectrometry.

INTRODUCTION

Mucopolipidosis type IV (MLIV) is an autosomal recessive lysosomal storage disease, which is clinically characterized by severe neurodegenerative defects, profound cognitive impairment and eye abnormalities (e.g. corneal opacity, strabismus and progressive retinopathy).^[1-4] These hallmark symptoms are often accompanied by other manifestations such as constitutive achlorhydria and iron deficiency anemia.^[5,6] MLIV patients also feature accumulated lysosomal inclusions containing different lipids and proteins that appear in almost all tissues as demonstrated by electron microscopy.^[7-9] MLIV is caused by mutations in the MCOLN1 gene, encoding for mucolipin-1, a member of the transient receptor potential mucolipin (TRPML) cation channel subfamily.^[1,10,11]

TRPML1 is a non-selective cation channel consisting of a six-transmembrane helix core and a large (~100 kDa) extracytosolic/luminal domain (ELD) that is exposed to the lysosomal lumen or the extracytosolic side of the cell.^[12-15] The main function of the TRPML1 channel is the Ca²⁺-transfer from the lysosome lumen to the cytoplasm and its activity is influenced by different Ca²⁺ concentrations and pH, therefore playing a crucial role in vesicular transport, exocytosis and autophagy.^[13,14,16] Currently, there are no specific treatment options for MLIV patients, particularly for those carrying mutations in the MCOLN1 gene that result in complete TRPML1 absence in cells.^[3,17] Chen *et al.* identified a new small-molecule agonist of TRPML1 (**MK6-83 (1)**, **Fig. 1**), demonstrated its restoring effect on specific TRPML1 channel mutant isoforms and its ability to improve defects in endolysosomal trafficking as well as heavy metal ion homeostasis.^[17]

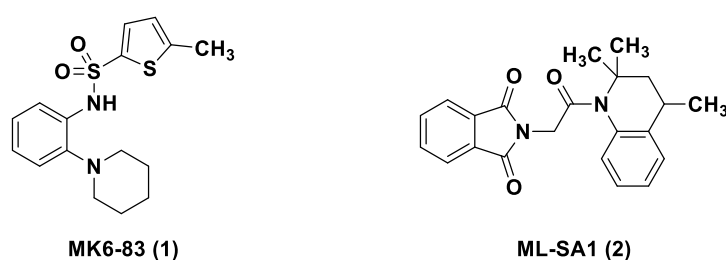


Fig. 1: Structures of known TRPML channel agonists.^[17-19]

These findings suggest that the TRPML1 activator **MK6-83** may serve as a basis for a small molecule treatment approach addressing a specific subgroup of MLIV patients.^[17] However, the exact location of the binding site of **MK6-83** could not yet be determined and currently, only cryo-EM structures of TRPML1 and TRPML3, respectively, bound with the non-selective and (structurally) different agonist (**ML-SA1 (2)**, **Fig. 1**)^[17,19] are available.^[20,21] It is not unambiguously clarified if **MK6-83** possesses the same binding site within the channel and which key interactions there are to explain its different TRPML selectivity and activation profile compared to **ML-SA1**.^[22] For a fundamental design and development of new drug molecules, an in-depth understanding of ligand-target recognition and the interaction between the receptor protein and its small-molecule ligand is essential.^[23,24] In the past decades, photoaffinity labeling (PAL) has emerged as a very powerful tool in medicinal chemistry and chemical biology for studying ligand-target interactions and to provide additional information of the binding pocket and the amino acid residues involved in drug binding.^[25-30] This valuable technique exploits the intrinsic property of ligands featuring a photoreactive group (PG) to produce a highly reactive species (e.g. a carbene), which –after formation of a particular non-covalent ligand-receptor complex– covalently and irreversibly binds to proximate residues within the binding site during photolysis by irradiation with a specific wavelength of light.^[25,26,29,31] In this study, we focused on the synthesis as well as structural determination of novel (trifluoromethyl)diazirine-containing TRPML1 activators and extensively investigated their photochemical insertion reactivity in different solvents. These stable and useful photoactivatable

analogues of **MK6-83** may allow the identification of the binding site within the TRPML1 channel and thus make a relevant contribution to the elucidation of the molecular mechanisms involved in the specific ligand-protein interaction between the TRPML1 activator and its target ion channel.

RESULTS AND DISCUSSION

Strategic Design of the Photoaffinity Probes (PAPs)

In designing of new photoaffinity probes (PAPs) for crosslinking experiments with TRPML1 channels, we used the known TRPML1 activator **MK6-83** as the parent molecule.^[17] We started our design with general considerations and requirements regarding the properties for the PAPs: (i) the incorporated photoreactive group (PG) should be as small as possible, minimizing the risk of significantly altering the biological activity of the parent molecule; (ii) the modified activator should exhibit relative chemical stability in the dark at room temperature; (iii) crosslinking should be specific and possible at higher wavelengths (~360 nm), reducing the risk of damage to targeted proteins. Consequently, we envisioned that the introduction of a (trifluoromethyl)diazirine group would meet our criteria as it represents the smallest PG among all commonly used photophores. This keeps the structural changes of the parent molecule to a minimum and its physicochemical properties are not substantially altered (contrary to, e.g., benzophenones).^[31,32] Furthermore, diazirines generate highly reactive carbenes upon photoactivation with longwave (~360 nm) UV light and their selective crosslinking property reduces the risk of nonspecific binding due to the short lifetime of the reactive intermediate.^[28,31-33] Their relative chemical stability (e.g. under acidic and basic conditions, towards nucleophiles and electrophiles) enables easy handling and performance of demanding synthetic transformations.^[26,32,34]

We decided to use the pre-existing phenyl ring of the parent ligand **MK6-83** as the most suitable substitution site for PG's (**Fig. 2**) since structural modifications such as chlorine at the 5'-position of the aromatic core only slightly reduced efficacy on TRPML1 activation whereas larger substituents at the thiophene ring and other residues than piperidine affected the activity significantly.^[17] In addition, the central orientation of the reactive group within the whole molecule should facilitate crosslinking with a residue of the potential binding site. We further assumed that generating two constitution isomers of the diazirine-containing PAPs, in which the PG is attached at different positions along the aromatic core, would provide an opportunity to perform binding site mapping and thus to achieve an increased topological resolution of the cavity.^[31,34]

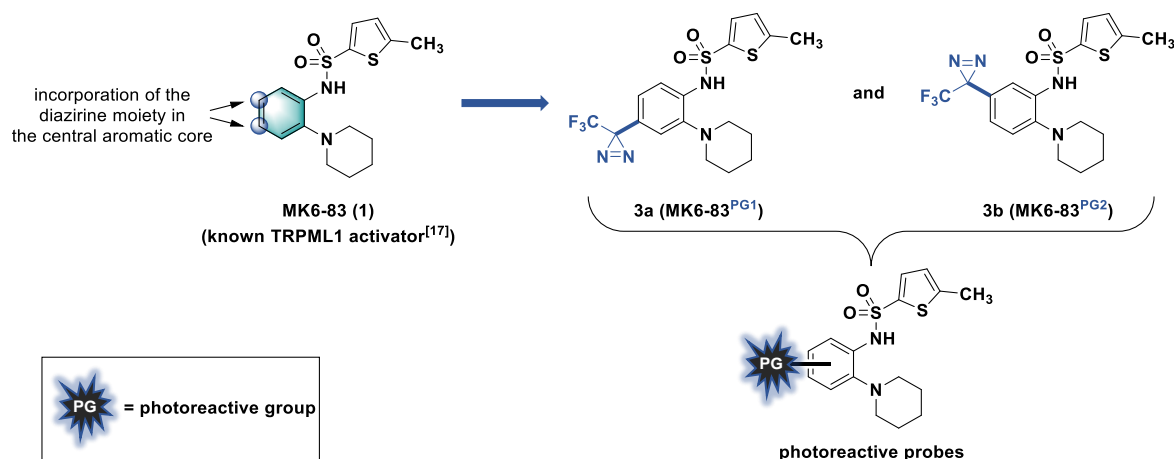
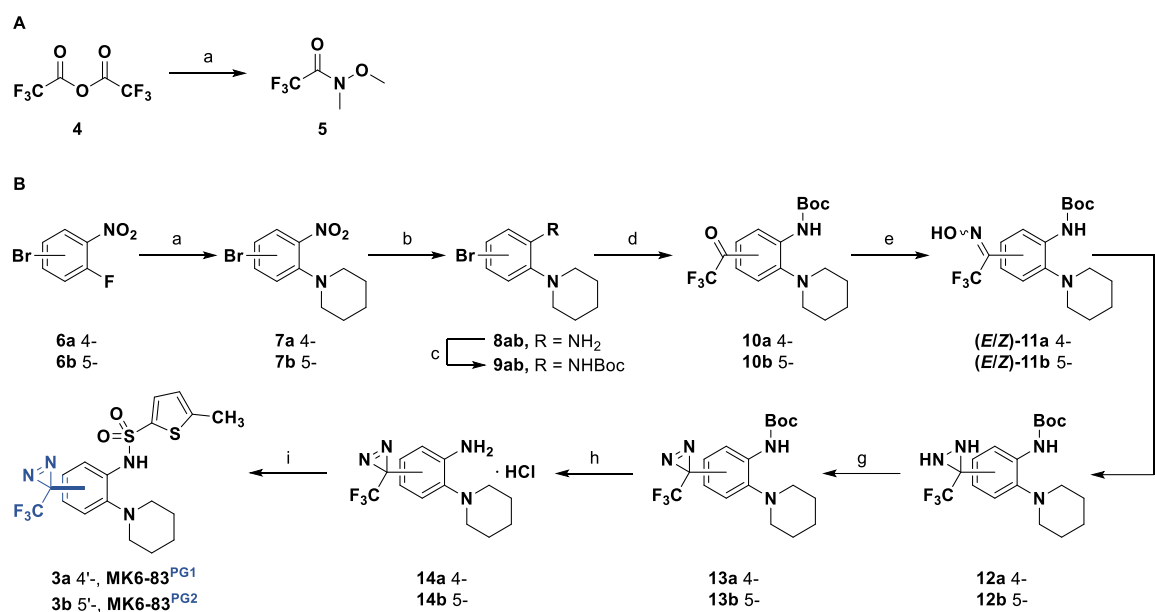


Fig. 2: Design of new photoaffinity probes based on the known TRPML1 activator **MK6-83**.

Synthesis

The multi-step syntheses of the new photoaffinity probes **MK6-83^{PG1}** (**3a**) and **MK6-83^{PG2}** (**3b**) started from commercially available 4- or 5-bromo-2-fluoro-1-nitrobenzenes, in which a piperidine ring was introduced by application of a nucleophilic aromatic substitution using Cs_2CO_3 as a base to give **7a** and **7b** in high yields (**Scheme 1, B**).^[35]



Scheme 1: Synthesis of the (trifluoromethyl)diazirine-substituted TRPML1 activator.^a

^aReagents and conditions: **A:** (a) *N,O*-dimethylhydroxylamine hydrochloride, py, CH_2Cl_2 , 0 °C, 2 h, 64%. **B:** (a) Piperidine, Cs_2CO_3 , DMF, rt, overnight, 99%; (b) $\text{SnCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, EtOAc, rt, 1 h–overnight, 93–96%; (c) **8a**: Boc_2O , $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (5 mol-%), CH_2Cl_2 , 45 °C, 10 h, 83%; **8b**: Boc_2O , NaHMDS (1.9 M in THF), THF, rt, overnight, 60%; (d) 1. KH (30% susp. in mineral oil), 0 °C, 1 h; 2. $t\text{-BuLi}$ (1.6 M in pentane), **5**, –78 °C, 6 h, 66–77%; (e) $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$, py/EtOH, 80 °C, 4–5 h, 88–96%; (f) 1. TsCl, Et₃N, acetone; 0 °C, 3 h; 2. $\text{NH}_3(\text{l})$, MTBE, –78 °C → rt, overnight, 86–99%; (g) I_2 , Et₃N, CH_2Cl_2 , 0 °C → rt, 2 h, 82–95%; (h) HCl (4.0 M in 1,4-dioxane), rt, 1–2 h, quant.; (i) 5-methylthiophene-2-sulfonyl chloride, py, 0 °C → rt, overnight, 63–72%.

The nitro derivatives **7a** and **7b** were then reduced to provide the corresponding anilines **8a** and **8b** using $\text{SnCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$.^[35] Boc-protection of **8a** was accomplished with Boc_2O in the presence of the Lewis acid $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ as the catalyst.^[35] Since this procedure was not suitable for the protection of **8b** due to longer reaction times and side reactions such as biscarbamylation, an alternative method using NaHMDS ^[37] as strong base for the introduction of the Boc group was applied to obtain **9b**. Our initial synthetic approach involved the use of an acetyl protecting group, which was introduced in one step in a reduction and acetylation reaction starting from the nitro derivative **7a** using zinc dust in a mixture of glacial acid and acetic anhydride. Unfortunately, the harsh conditions required for its deprotection led to the decomposition of the diazirinyl ring (data not shown). Therefore, we selected the Boc group as a comparatively more labile protective group, which proved to be well suited for the established synthesis route since no ring opening was observed during removal. For the preparation of the key intermediate (trifluoromethyl)ketones **10a** and **10b**, the bromo derivatives **9a** and **9b** were subjected to a trifluoroacetylation reaction, which was achieved via NH-deprotonation with potassium hydride^[38] at 0 °C, followed by subsequent halogen-metal exchange with $^t\text{BuLi}$ ^[39] at -78 °C and treatment of the *in situ* formed organolithium compound with 2,2,2-trifluoro-*N*-methoxy-*N*-methylacetamide (**5**, prepared from trifluoroacetic anhydride and *N,O*-dimethylhydroxylamine hydrochloride^[40,41] (**Scheme 1, A**)). The deprotonation step in the trifluoroacetylation sequence was crucial since it turned out that the halogen-metal exchange competed with NH-abstraction, leading to a significant reduction in yield due to formation of the according dehalogenated side-product. The trifluoroacetylated compounds **10a** and **10b** were then converted to oximes **11a** and **11b** with hydroxylamine hydrochloride in pyridine/ethanol under reflux, which were isolated as mixture of *E/Z*-diastereomers (88% and 96% yield, respectively) and subsequently tosylated with tosyl chloride under basic conditions at 0 °C. The obtained *O*-tosyl oximes were immediately used for the next step without further purification because of their instability on silica and warming during evaporation. The construction of the (trifluoromethyl)-diazirine moiety on the aromatic core was realized by reaction of the tosylated oximes with liquid ammonia at -78 °C to give diaziridines **12a** and **12b** in 99% and 86% yield, respectively, which were then oxidized with iodine/ NEt_3 in CH_2Cl_2 to provide the photoreactive diazirines **13a** and **13b**. Deprotection of the amino group using HCl (4.0 M in 1,4-dioxane) went smoothly without affecting the diazirine ring and the hydrochlorides **14a** and **14b** were isolated in quantitative yields. Formation of the sulfonamide with 5-methylthiophene-2-sulfonyl chloride in pyridine at 0 °C completed the synthesis and the final photoaffinity probes were obtained in good yields (63% and 72%, respectively) and high purity ($\geq 99\%$) as confirmed by HPLC-MS analysis (SI **Fig. S1** and **Fig. S2**). The synthesized compounds retain their stability even after several months of storage in the dark at -21 °C under an argon atmosphere. No decomposition of **3a** and **3b** could be observed, providing both, the 4'- and 5'-(trifluoromethyl)diazirine-substituted analogue, as stable and easy-to-handle reagents for photoaffinity labeling purposes.

With the HPLC-MS analysis, we also investigated the fragmentation pattern of the synthesized diazirines to evaluate their stability under electrospray ionization (ESI) MS/MS conditions and to identify potential fragments in mass spectrometry experiments that might occur after the photoaffinity labeling procedure with proteins. For both compounds, a high abundance of the parent ion $[M+H]^+$ ($m/z = 445.1$) was observed with only a minor amount of a fragment ion ($m/z = 417$) resulting from the loss of molecular nitrogen ($\Delta m/z = 28$) (SI Fig. S5 and Fig. S6, Scheme S1 and Scheme S2). Under collision-induced dissociation (CID) conditions (MS/MS), the precursor ion was completely converted to the above-mentioned fragment ion, which in case of constitution isomer **3a** was accompanied by trace amounts of another product ion (4%, $m/z = 255.1$) as a consequence of additional loss of the 5-methylthiophene-2-sulfonyl moiety or cleavage of the entire sulfonamide residue without extrusion of nitrogen (3%, $m/z = 268.1$). Fragmentation of diazirine **3b**, on the other hand, resulted in a concurrent appearance of a different product ion with approx. 60% abundance ($m/z = 240.0$), in which the whole sulfonamide fragment was presumably dissociated in addition to loss of nitrogen. The high abundance of the precursor ions in the LC-MS mode as well as the occurrence of defined product ions under application of moderate collision energy indicates that the (trifluoromethyl)diazirines **3a** and **3b**, respectively, exhibit outstanding structural integrity and stability under ESI-MS conditions, which facilitates the identification of labeled protein residues or amino acids after photoaffinity labeling.

X-ray Structure Determination

Single-crystal X-ray diffraction data of **3a** and **3b** were collected at 100K on a Rigaku SuperNova diffractometer with MoK α radiation using an Eos CCD detector. The structures were solved and refined inside Olex2^[42] with the SHELXT^[43] and the SHELXL^[44] software, respectively. Both compounds crystallize in the monoclinic $P2_1/c$ space group. Selected crystallographic data for **3a** and **3b** are listed in Table 1. Full experimental and crystallographic data are in Table S1 in the SI.

Table 1: Selected crystallographic data for **3a** and **3b**.

Parameter	3a (MK6-83 ^{PG1})	3b (MK6-83 ^{PG2})
$a/\text{\AA}$	14.8659(2)	15.34810(10)
$b/\text{\AA}$	7.68040(10)	8.43370(10)
$c/\text{\AA}$	17.72280(10)	16.1087(2)
$\beta/^\circ$	101.6910(10)	111.7130(10)
Volume/ \AA^3	1981.54(4)	1937.19(4)
Z	4	4
$\rho_{\text{calc}}/\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	1.490	1.524
R_{int}	0.0362	0.0543
R_1	0.0457	0.0527
wR_2	0.1372	$wR_2 = 0.1544$

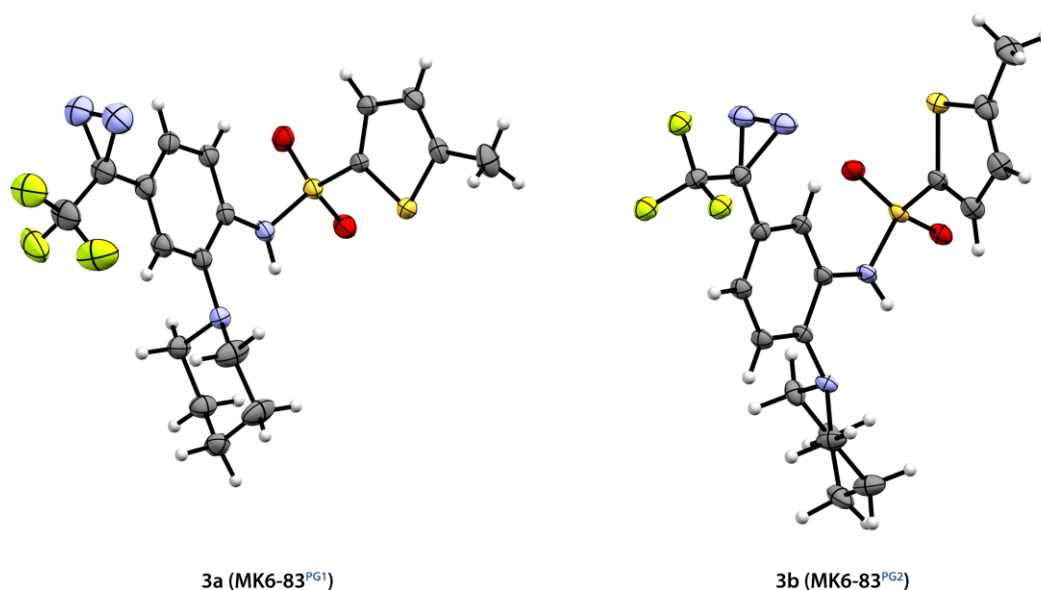


Fig. 3: Crystal structures of the studied compounds **3a** and **3b**.

In the context of quantum-crystallographic electron-density research, the inter- and intramolecular bonding of biologically active vinyl sulfone groups has been studied in detail.^[45-46] Moreover, the motif of an aziridine three-membered ring in protease inhibitor model compounds has been scrutinized by experimental quantum crystallography.^[47-48] Therefore, we had a closer look at the three-membered diazirine ring motif here in comparison to the aziridine motif, although disorder and reduced resolution of the data prevented an electron-density analysis. The N-N bond is quite short with 1.228(3)/1.218(2) Å in **3a/b** and the two C-N bonds are long, being just below 1.50 Å. In the aziridine three-membered ring, the C-N bonds are significantly shorter at 1.45 Å.^[47-48] The C-N-N angles are between 65–66° and the N-C-N angle below 49° in both compounds **3a/b** leading to an acute triangle, whereas in aziridine all three angles are around 60°. These geometric details point toward an asymmetric distribution of electron density in the three-membered ring, an accumulation of electron density in the N-N bond and hence a different reactivity than aziridine-containing biologically active compounds. Since it is known that geometrical and electron-density features of biologically active compounds in small-molecule crystal structure packings can resemble those in biological ensembles,^[49-50] we employed Hirshfeld Surface Analysis^[51] here to get an overall picture of the intermolecular interactions that dominate the crystal packing in **3a** and **3b**, respectively (**Fig. 4**; red dots highlight close intermolecular interactions). In **3a**, there is only a C-H···O hydrogen bond involving the sulfonyl group, but the N-H group does not act as a hydrogen bonding donor (**Fig. 4 (A)**). Instead, there is a remarkably short inverse diaziridine-CF₃ intermolecular contact, basically a N···F interaction between two electron-rich atoms, which deserves further study in the context of recent discussions around halogen and pnictogen bonding.^[52]

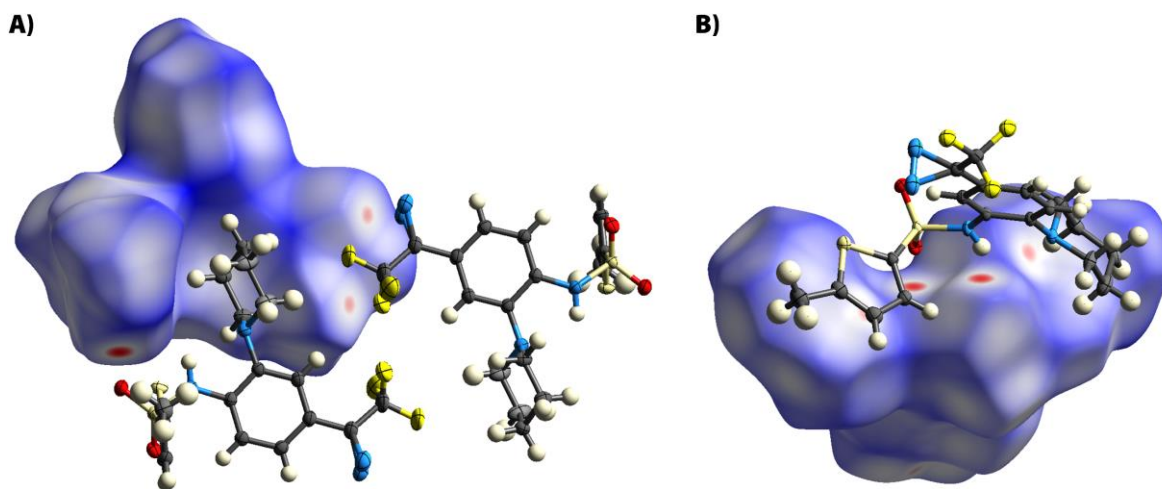
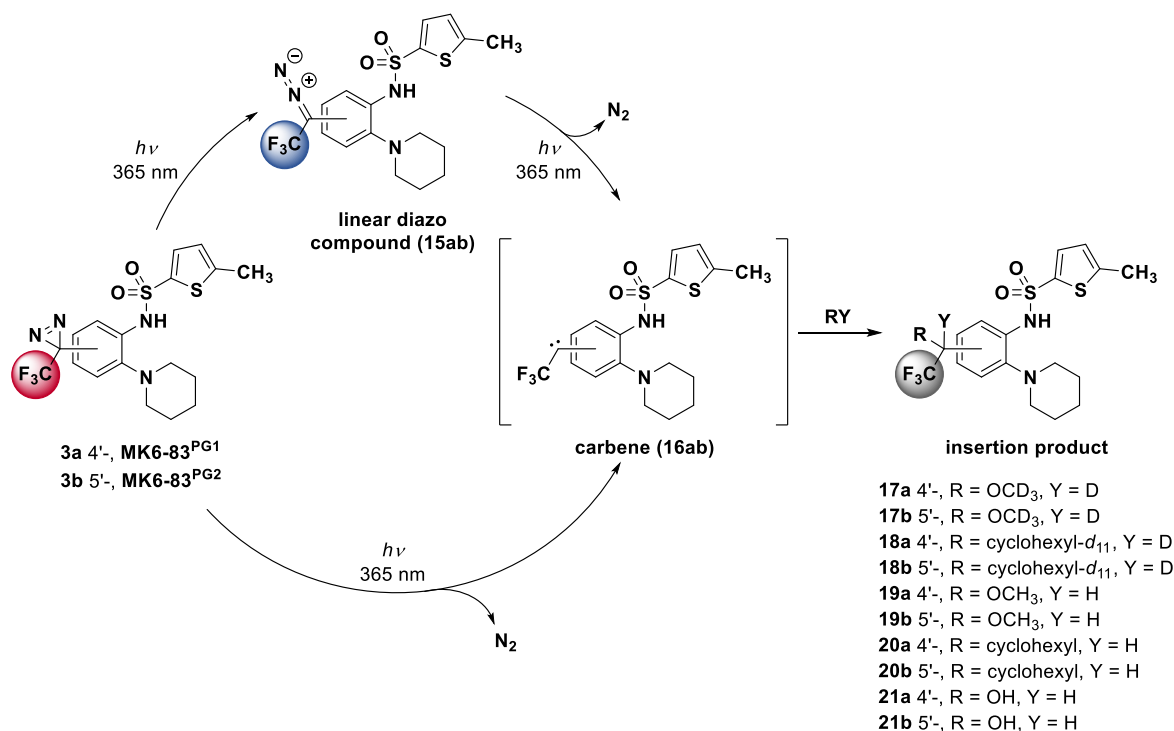


Fig. 4: Hirshfeld surfaces of (A) **3a** and (B) **3b** color coded with the property d_{norm} . The color range is -0.1773 (red) to 0 (white) to 1.4995 (blue). Red dots represent short atom-atom contacts, and the symmetry-generated interaction partners outside the Hirshfeld surfaces are given. Displacement ellipsoids and spheres are given at a 50% probability level. The pictures were generated with the software *CrystalExplorer*.^[53]

In contrast, the crystal packing in **3b** is dominated by the more usual inverse $\text{N-H}\cdots\text{O}_{\text{sulfonyl}}$ bonding motif one might expect with a N-H hydrogen bonding donor group present in the structure. Obviously, this N-H group is more accessible for intermolecular interactions because of the meta- instead of para-substitution of the phenyl ring in **3b**. The diaziridine- CF_3 contact is present in **3b**, too, but less pronounced, and there is no $\text{C-H}\cdots\text{O}$ hydrogen bond either. In summary, the difference in substitution leads to significantly different crystal packings in both compounds which might have consequences on their activities.

Kinetical Characterization of the Photochemical Reaction of **3a** and **3b**

Next, we investigated the kinetical photoactivation behavior of the new TRPML photoaffinity probes in different media.^[33,54-56] Solutions of **3a** and **3b** in the appropriate (deuterated) solvent (methanol($-d_4$), cyclohexane($-d_{12}$) and aqueous buffer as carbene scavengers) were exposed to UV light ($\lambda = 365$ nm) delivered by a high-power UV LED (*Opsytec Dr. Gröbel GmbH*, Germany) for different irradiation intervals, ^1H and ^{19}F NMR, respectively, as well as HPLC-MS spectra were recorded to monitor the course of the photoinduced diazirine decay (see **Scheme 2**, **Fig. 5**, **Fig. 6**, **Fig. 8**, **SI Fig. S7** and **SI Fig. S8**). First, the photolysis reactions were performed in deuterated methanol and cyclohexane ($c = 5$ mM), respectively, and the signal changes of the fluorine signals (CF_3 group) were followed by ^{19}F NMR spectroscopy at various time intervals. Upon irradiation with UV light, diazirines **3a** and **3b** ($\delta = -68$ ppm) completely underwent photolysis in methanol within 48 minutes (**3a**) and 78 minutes (**3b**) to form either the insertion products **17ab** and **18ab** ($\delta = -79$ ppm) or the linear diazo isomer **15ab** ($\delta = -60$ ppm) (**Fig. 5** and **SI Fig. S7**) as a result of photoisomerization which is in competition with the appearance of the singlet carbene.



Scheme 2: Photoactivation reaction of diazirines **3a** and **3b** in different solvents.

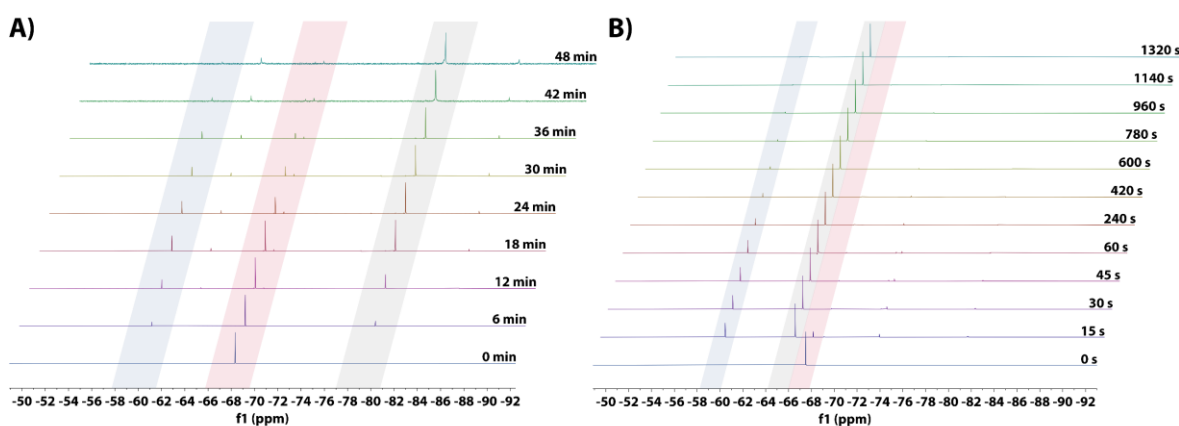


Fig. 5: ¹⁹F NMR spectra of a 5 mM solution of **3a** in methanol-*d*₄ (A) and cyclohexane-*d*₁₂ (B) upon irradiation with UV light ($\lambda = 365$ nm) recorded at different irradiation intervals. Spectra are shifted for better visualization and signals of the diazirine, linear diazo isomer and the corresponding insertion product are highlighted in red, blue and gray, respectively (see **Scheme 2**). For ¹⁹F NMR spectra of the photoinduced decay of the constitution isomer **3b** see SI **Fig. S7**.

The observed photolytic characteristics and chemical shifts are in accordance with studies and spectral data reported for other aromatic (trifluoromethyl)diazirines.^[33,54,56] The linear diazo compound was converted to the methyl ether on further UV light exposure, as indicated by the subsequent decrease of the corresponding ¹⁹F NMR signal under continued irradiation. Remarkably, the photoactivation kinetics of **3a** and **3b** in cyclohexane-*d*₁₂ strikingly differed from the experiments in methanolic solution since complete decay of the diazirines was already observed after 30 s, while the lifetime of the linear diazo compound relative to the diazirines proved to be significantly longer (full conversion after 960 s and 1320 s for **3a** and **3b**, respectively). This deviation can be explained

by the different ability of the solvents to exert a stabilizing effect on the intermediate formed singlet carbene. In several studies it could be shown that polar solvents like methanol preferably stabilize the singlet carbene by interaction of the empty p-orbital with non-bonding electrons of the solvent.^[57-58] Nevertheless, our results proved that diazirines **3a** and **3b** even readily undergo rapid photolysis in a nonpolar environment suggesting that the insertion reaction can also take place with hydrophobic amino acid residues (e. g. leucine or valine) within the binding site. For a more quantitative description and physicochemical characterization, the photochemical reactions of (trifluoromethyl)diazirines **3a** and **3b** in methanol and cyclohexane ($c = 2 \text{ mM}$) were additionally followed by HPLC-MS analysis. Since photoaffinity labeling experiments are commonly accomplished in aqueous media, we also investigated the photochemical properties of these compounds in an aqueous buffer solution ($c = 50 \text{ }\mu\text{M}$) e. g. to define the reaction conditions required for high-yield crosslinking of biological samples. Aliquots from the irradiation experiment were taken after fixed periods of time, subjected to LC-MS analysis and the resulting peak areas (UV detection at $\lambda = 254 \text{ nm}$) of the diazirines **3a** and **3b**, linear diazo compounds **15ab** and the insertion products **19ab–21ab** were integrated. As expected, the obtained results agreed well with the observations of the ^{19}F NMR spectroscopy data (vide supra) since similar irradiation times were required for the complete photolysis of the starting material and the normalized integrated peak areas confirmed the recorded signal intensities in the ^{19}F NMR experimental set-up (Fig. 6 and SI Fig. S8).

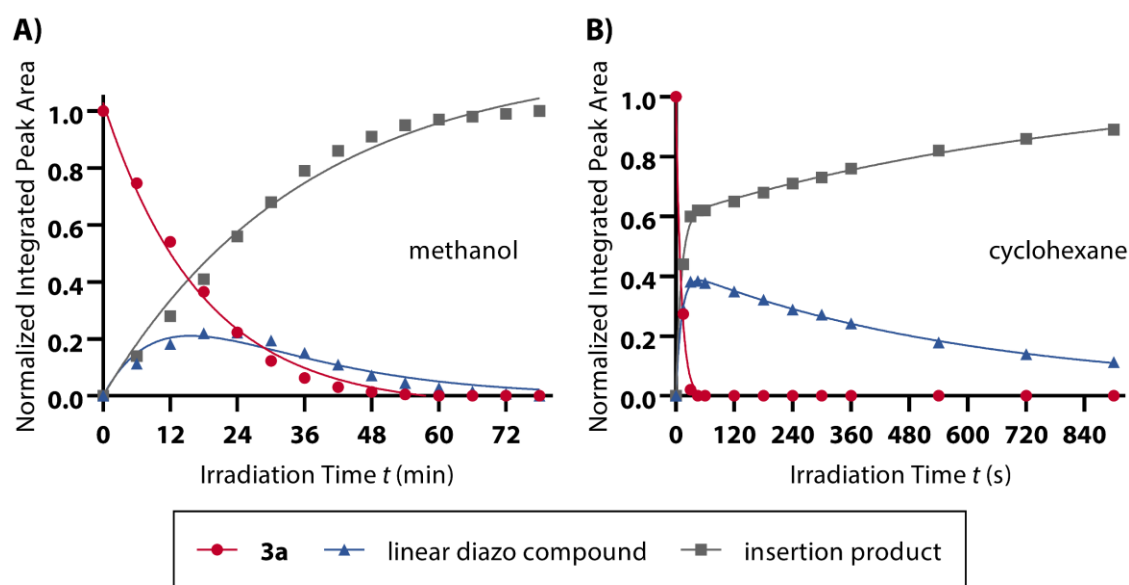


Fig. 6: Photoinduced decay of diazirine **3a** ($c = 2 \text{ mM}$; $\lambda = 365 \text{ nm}$) in methanol (A) and cyclohexane (B) investigated via HPLC (C_{18}). Aliquots were collected and analyzed at different time intervals of UV activation. The resulting peak areas (UV detection at $\lambda = 254 \text{ nm}$) of the diazirine (red, circles), linear diazo compound (blue, triangles) and the insertion product (gray, squares) in the chromatograms were integrated and plotted against the irradiation time after normalization. Diazirine turnover as well as the product formation can be fitted by first-order exponential functions, while the evolution and subsequent decay of the linear diazo isomer can be expressed by a biexponential trend line.

Parallel controls proved that the diazirines remained unaffected in the absence of a light source (data not shown). In all solvents approximately first-order kinetics were obtained for the photolytic diazirine decomposition which can be described by a typical exponential decay (eq (1)).

$$N(t) = N_0 \cdot e^{-kt} \quad (1)$$

The photoactivation half-life $t_{1/2}$ and the time constant τ of the diazirine derivatives **3a** and **3b** were calculated from the resulting rate constant k according to eq (2) and listed in Table 2.

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k} = \tau \cdot \ln(2) \quad (2)$$

Table 2: Calculated photoactivation half-lives and time constants of the synthesized diazirines in different solvents.^a

cpd	methanol		cyclohexane		aqueous buffer [†]	
	$t_{1/2}$	τ	$t_{1/2}$	τ	$t_{1/2}$	τ
3a	12 min	18 min	8 s	11 s	10 s	14 s
3b	34 min	49 min	7 s	9 s	9 s	12 s

^aDistance from UV light source ($\lambda = 365$ nm): 2 cm (see experimental section for details). [†] $c = 50 \mu\text{M}$ in 50 mM TRIS, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 5 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 4 mM EDTA and 250 mM sucrose.

In cyclohexane and aqueous buffer, diazirine decomposition over the course of light exposure occurred immediately within a few seconds ($t_{1/2}$ 7–9 s), whereas prolonged irradiation times were required in methanol ($t_{1/2}$ 12 min and 34 min for **3a** and **3b**, respectively), which is consistent with the results of the NMR experiments. Interestingly, the curves and half-lives of diazirines **3a** and **3b** in methanolic solution illustrated substantial kinetical differences indicating distinct photolytic properties between both constitution isomers, which were not observed in cyclohexane or aqueous solution. Presumably, the corresponding photochemical properties of the diazirines **3a** and **3b** can be attributed to a different stabilization of the intermediate carbenes: the empty p-orbital in case of **16b** can additionally be stabilized by the electron-donating piperidine moiety in para position (Fig. 7). In contrast, the electron deficiency in **16a** cannot be compensated to the same extent, resulting in higher reactivity and thus faster insertion. The carbene-stabilizing effect is probably especially enhanced by the methanolic solvent but is not as pronounced in the other solvents since the reactive intermediates are directly scavenged by solvent molecules. Similar observations have already been reported in which substituent and solvent effects on carbene reactions explained their different reactivity.^[58-61] The higher reactivity of the carbenes towards water compared to methanol can presumably be explained by the higher acidity and the extended hydrogen bonding network of water.^[62]

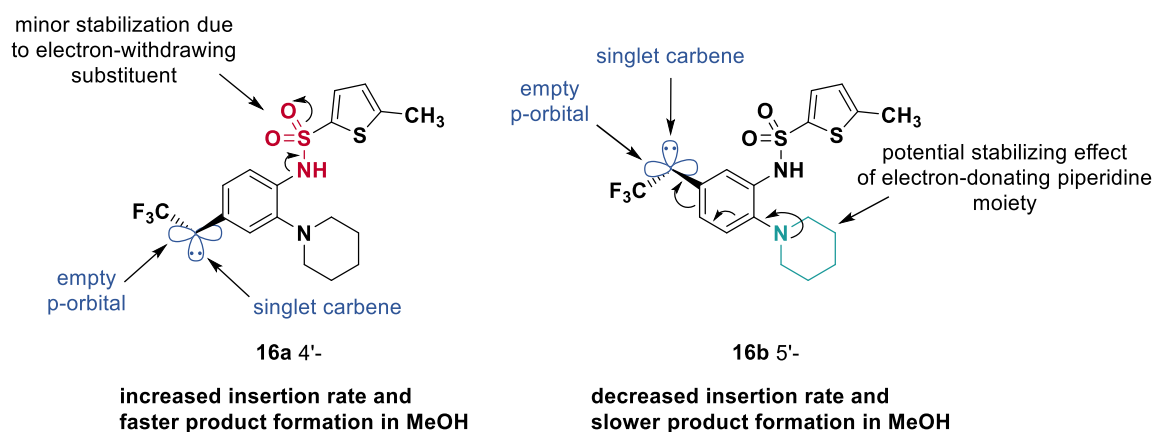


Fig. 7: Potentially different influence of the substitution pattern on the carbene stability in **16a** and **16b** explaining the heterogeneous reactivity and product formation times of both constitution isomers.

In aqueous buffer, both modified TRPML activators cleanly underwent photolysis at 365 nm within 90 s and product formation was completed after 360 s including a fast decay of the linear diazo compound (Fig. 8).

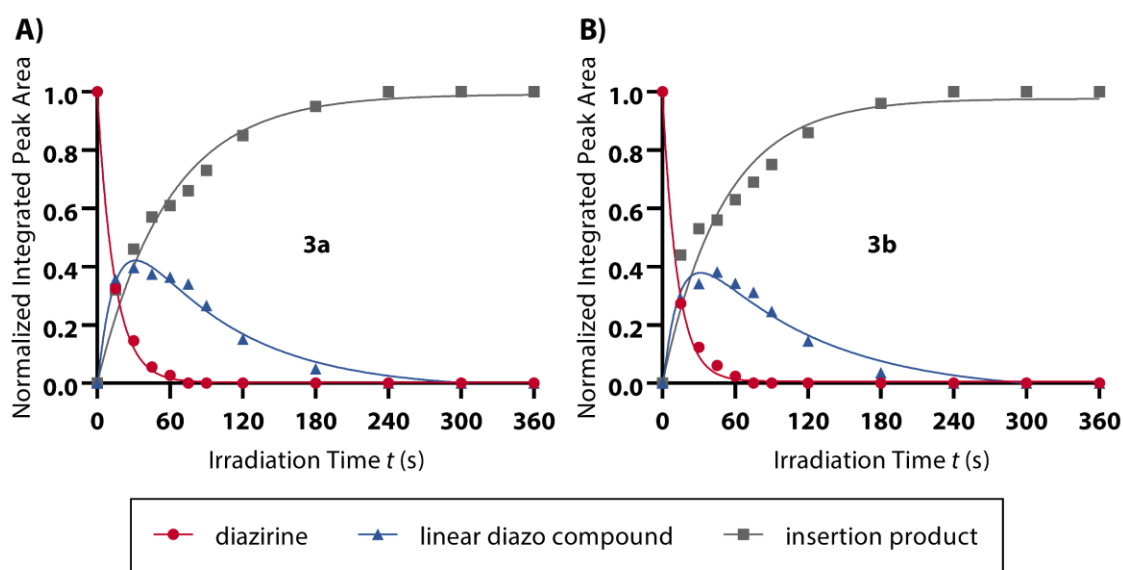


Fig. 8: Investigation of the photoinduced decay of diazirines **3a** (A) and **3b** (B) ($c = 50 \mu\text{M}$; $\lambda = 365 \text{ nm}$) in aqueous buffer (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl_2 , 5 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 4 mM EDTA and 250 mM sucrose) via reversed-phase HPLC. Aliquots were collected and analyzed at different time intervals of UV activation. The resulting peak areas (UV detection at $\lambda = 254 \text{ nm}$) of the diazirine (red, circles), linear diazo compound (blue, triangles) and the insertion product (gray, squares) in the chromatograms were integrated and plotted against the irradiation time after normalization. Diazirine turnover as well as the product formation can be fitted by first-order exponential functions, while the evolution and subsequent decay of the linear diazo isomer can be expressed by a biexponential trend line.

The short irradiation times required combined with a temporarily short-lived formation of the undesired linear diazo compound demonstrated an efficient photoactivation of (trifluoromethyl)-diazirines **3a** and **3b**, respectively, highlighting their suitability for photoaffinity labeling in aqueous

environment since long irradiation periods exhibit an increased risk of unspecific labeling (pseudo-affinity labeling) or even damage of biological systems.^[31-32] These results also reveal the ability of water to quench the highly reactive carbenes immediately which further contributes to minimize unspecific labeling: only molecules in close environment to the binding site of the protein will react covalently with amino acid residues, whereas free and unbound molecules are directly scavenged by the aqueous medium.^[32] In all photolysis experiments no characteristic products arising from hydrogen atom abstraction (such as reduced derivatives of **3a** and **3b**) were observed, suggesting that involvement of triplet carbene intermediates is rather unlikely. Indeed, it was previously noted that most of the products developed during photolysis of aromatic diazirines result from a singlet carbene state.^[63-64]

CONCLUSION

Two modified TRPML1 activators featuring a photoreactive (trifluoromethyl)diazirine moiety were designed and synthesized. These **MK6-83** analogues exhibited favorable physicochemical properties since they efficiently underwent clean photolysis to the desired insertion products as demonstrated in detailed photoactivation studies in various solvents. Furthermore, fast diazirine decay associated with short irradiation times required in aqueous buffer additionally proved their suitability for photoaffinity labeling procedures. They were also shown to be stable during long-term storage at low temperatures in the absence of light which highlights their value as useful and important photoreactive analogues of the TRPML1 activator **MK6-83**. In their crystal structures, the differences in the substitution pattern led to significant differences in the crystal packing pattern involving an unusual diazirine-CF₃ close contact. We are currently investigating the benefits of the **MK6-83** analogues introduced here in biological functional analysis and photoaffinity labeling experiments in combination with a proteomics mass spectrometry approach to elucidate the binding site within the TRPML1 channel. This knowledge could be very important for the structure-based design of new TRPML activators and helpful to further explore the mechanism of TRPML activation by synthetic molecules.

EXPERIMENTAL SECTION

Chemistry

All solvents and reagents were obtained from commercial suppliers (*Sigma-Aldrich, Acros Organics, Alfa Aesar, TCI* or *Apollo Scientific*) and used without any prior purification, if not stated otherwise. Anhydrous methyl *tert*-butyl ether, tetrahydrofuran and 1,4-dioxane were freshly distilled from sodium and benzophenone. Dichloromethane was dried by distillation from calcium hydride. Reactions under anhydrous conditions were performed under argon atmosphere using flame-dried glassware. Reactions at -78 °C were conducted in a dry ice/acetone cooling bath. Purifications by flash-chromatography were performed on silica gel (0.015–0.040 mm, *Machery-Nagel*). Reaction progress was monitored by thin-layer chromatography (TLC) using *Machery-Nagel* Alugram Xtra

Sil G/UV₂₅₄ silica 60 plates. Compound visualization on these plates was attained by radiation at 254 nm or by staining with *Ehrlichs* reagent (prepared from 4-(*N,N*-dimethylamino)benzaldehyde (1.6 g) and conc. HCl (80 mL) in methanol (120 mL)).

¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on a *Bruker Fourier 300*, a *Bruker Avance-III HD* (¹H NMR: 300 MHz, ¹³C NMR: 75.5 MHz, ¹⁹F-NMR: 282 MHz) or a *Bruker Avance-II* (¹H NMR: 400 MHz, ¹³C NMR: 100.6 MHz, ¹⁹F-NMR: 376 MHz). Two-dimensional NMR experiments (COSY, HSQC and HMBC) were used for assignments. All chemical shifts are referenced to the signal of the residual solvent (CDCl₃: 7.26 ppm & 77.16 ppm, DMSO-*d*₆: 2.50 ppm & 39.52 ppm, methanol-*d*₄: 3.31 ppm & 49.00 ppm, cyclohexane-*d*₁₂: 1.38 ppm & 26.43 ppm for ¹H NMR and ¹³C NMR respectively) and reported in parts per million (ppm) relative to tetramethylsilane (TMS). For ¹⁹F NMR, chemical shifts are given in ppm relative to C(³⁵Cl)₂(³⁷Cl)F. The spectrometer was calibrated with *α,α,α*-trifluorotoluene in CDCl₃ (-63.9 ppm). Multiplicities of the corresponding NMR signals are given using the following abbreviations: br = broad, s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet and combinations thereof. Infrared (IR-) spectra were recorded on a FT-IR spectrometer (*Avatar, Thermo-Nicolet*) with an ATR correction and are reported in terms of frequency of absorption $\bar{\nu}$ [cm⁻¹].

Analytical HPLC analysis was performed on a *HP Agilent 1100 series* HPLC system using an *Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈* (150 × 2.10 mm, 4 μm) column at 40 °C oven temperature and a detection wavelength of 254 nm. The mobile phase consisted of mixtures of acetonitrile, MilliQ-grade water and 10% of a 0.1% solution of formic acid in MilliQ-grade water and was adapted to each separation problem (injection volume: 5–20 μL, flow rate: 0.5–0.7 mL·min⁻¹). Electro spray ionization (ESI-) mass spectra were recorded on an *Agilent 1100 series LC/MSD Ion trap* spectrometer in the positive ion mode (drying gas temperature: 350 °C, nebulizer pressure: 70 psi, capillary voltage: 3500 V, drying gas (N₂): 12 L · min⁻¹). Purity of the final compounds was confirmed by HPLC analysis and was higher than 95% in all cases. Semi-preparative HPLC was performed on a *Varian PrepStar* system using an *Agilent Zorbax PrepHT XDB C₁₈* (150 × 21.2 mm, 5 μm) column at a detection wavelength of 254 nm. The mobile phase consisted of mixtures of acetonitrile, MilliQ-grade water and was adapted to each separation problem (injection volume: 1–5 mL, flow rate: 10–20 mL·min⁻¹). Melting points were determined in open capillaries on a *Krüess-Optronic KSP 1 N* apparatus (heating rate: 1 °C/min).

Note: All photolabile compounds were stored in the dark under an argon atmosphere at -21 °C to prevent decomposition.

2,2,2-Trifluoro-*N*-methoxy-*N*-methylacetamide (5)

This compound was prepared according to reported procedures.^[40,41] To a mixture of *N,O*-dimethylhydroxylamine hydrochloride (7.90 g, 80.99 mmol, 1.05 equiv) and trifluoroacetic anhydride (10.9 mL, 77.14 mmol, 1.00 equiv) in CH₂Cl₂ (200 mL) was added pyridine (18.5 mL, 229.2 mmol, 2.97 equiv.) dropwise at 0 °C. The resulting mixture was stirred for 2 h at 0 °C and then quenched with water (50 mL). The organic layer was washed with water (1 × 50 mL), 1 M HCl_(aq) (2 × 100 mL) and a solution of NaCl_(aq) (sat., 1 × 100 mL), dried over Na₂SO₄ and the solvent was removed under reduced pressure to afford the title compound (7.74 g, 49.27 mmol, 64% yield) as a colorless oil which was used for the next reaction without further purification. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 3.70 (s, 3H, OCH₃), 3.22 (s, 3H, NCH₃) ppm. ¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ = 156.8 (q, ²J_{CF} = 37.3 Hz, CF₃C(O)), 116.2 (q, ¹J_{CF} = 286.4 Hz, CF₃), 62.1 (OCH₃), 32.7 (NCH₃) ppm. IR (ATR): $\bar{\nu}$ = 1701, 1257, 1211, 1152, 1082, 983, 896, 745, 662 cm⁻¹.

1-(5-Bromo-2-nitrophenyl)piperidine (7a)

This compound was synthesized according to a modified procedure by Yin *et al.*^[35] To a mixture of 4-bromo-2-fluoro-1-nitrobenzene (8.00 g, 36.36 mmol, 1.00 equiv) and Cs₂CO₃ (15.04 g, 46.17 mmol, 1.27 equiv) in DMF (100 mL) was added piperidine (3.8 mL, 38.18 mmol, 1.05 equiv) at room temperature. After stirring overnight, the solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was dissolved in EtOAc (100 mL) and water (100 mL). The aqueous phase was extracted with EtOAc (3 × 100 mL) and the combined organic phases were dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure to obtain the title compound (10.29 g, 36.09 mmol, 99% yield) as an orange solid. R_f = 0.65 (SiO₂, ^cHex/EtOAc = 10:1). mp 60–61 °C. ¹H NMR, COSY (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.63 (d, ³J = 8.7 Hz, 1H, *H*-3^{Ph}), 7.22 (d, ⁴J = 2.0 Hz, 1H, *H*-6^{Ph}), 7.03 (dd, ³J = 8.7, ⁴J = 2.0 Hz, 1H, *H*-4^{Ph}), 3.06–2.97 (m, 4H, 2 × *H*-2^{Pip} and 2 × *H*-6^{Pip}), 1.76–1.65 (m, 4H, 2 × *H*-3^{Pip} and 2 × *H*-5^{Pip}), 1.65–1.53 (m, 2H, 2 × *H*-4^{Pip}) ppm. ¹³C NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, CDCl₃): δ = 147.8 (*C*-1^{Ph}), 140.7 (*C*-2^{Ph}), 128.1 (*C*-5^{Ph}), 127.7 (*C*-3^{Ph}), 123.9 (*C*-6^{Ph}), 123.3 (*C*-4^{Ph}), 52.8 (*C*-2^{Pip} and *C*-6^{Pip}), 25.8 (*C*-3^{Pip} and *C*-5^{Pip}), 23.9 (*C*-4^{Pip}) ppm. IR (ATR): $\bar{\nu}$ = 2934, 2852, 1591, 1548, 1498, 1332, 1295, 1231, 1135, 1033 cm⁻¹. MS (ESI): *m/z* calculated for [C₁₁H₁₃BrN₂O₂+H]⁺ ([M+H]⁺): 285.0/287.0. Found *m/z* = 285.2 (90%, [M+H]⁺)/287.0 (100%, [M+H]⁺).

4-Bromo-2-(piperidin-1-yl)aniline (8a)

This compound was synthesized according to a modified procedure by Yin *et al.*^[35] To a solution of **7a** (9.24 g, 32.40 mmol, 1.00 equiv) in EtOAc (250 mL) was added SnCl₂ · 2 H₂O (24.80 g, 97.20 mmol, 3.00 equiv). After stirring overnight at room temperature, the reaction was quenched by the addition of a KF_(aq) solution (1 M, 100 mL) and stirred further 30 min. The mixture was extracted with EtOAc (2 × 250 mL). The combined organic layers were washed with a KF_(aq) solution (1 M, 1 × 100 mL) and a solution of NaCl_(aq) (sat., 2 × 100 mL), dried over Na₂SO₄ and the solvent

was removed under reduced pressure. The title compound was obtained as a yellow-brown solid (7.65 g, 29.98 mmol, 93% yield) which was used without any further purification. $R_f = 0.50$ (SiO₂, ^cHex/EtOAc = 5:1). mp 40–41 °C. ¹H NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 6.98$ – 6.89 (m, 2H, *H*-3^{Ph} and *H*-5^{Ph}), 6.70–6.60 (m, 1H, *H*-6^{Ph}), 4.91 (s (br), 2H, NH₂), 2.76–2.67 (m, 4H, 2 × *H*-2^{Pip} and 2 × *H*-6^{Pip}), 1.70–1.57 (m, 4H, 2 × *H*-3^{Pip} and 2 × *H*-5^{Pip}), 1.56–1.44 (m, 2H, 2 × *H*-4^{Pip}) ppm. ¹³C NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 141.6$ (*C*-2^{Ph}), 139.9 (*C*-1^{Ph}), 126.1 (*C*-5^{Ph}), 121.9 (*C*-3^{Ph}), 115.7 (*C*-6^{Ph}), 107.0 (*C*-4^{Ph}), 51.6 (*C*-2^{Pip} and *C*-6^{Pip}), 26.0 (*C*-3^{Pip} and *C*-5^{Pip}), 23.7 (*C*-4^{Pip}) ppm. IR (ATR): $\bar{\nu} = 3423, 3330, 2936, 1601, 1487, 1438, 1272, 1226, 1029, 929, 805$ cm⁻¹. MS (ESI): m/z calculated for [C₁₁H₁₅BrN₂+H]⁺ ([M+H]⁺): 255.0/257.0. Found $m/z = 255.2$ (95%, [M+H]⁺)/257.0 (100%, [M+H]⁺).

tert-Butyl (4-bromo-2-(piperidin-1-yl)phenyl)carbamate (9a)

This compound was synthesized according to a method by Bartoli *et al.*^[36] To a solution of 4-bromo-2-(piperidin-1-yl)aniline (**8a**, 6.79 g, 26.61 mmol, 1.00 equiv) in CH₂Cl₂ (50 mL), Boc₂O (8.71 g, 39.91 mmol, 1.50 equiv) and Zn(ClO₄)₂ · 6 H₂O (496 mg, 1.33 mmol, 0.05 equiv) were added. The mixture was stirred at 45 °C for 5 h, then an additional portion of Boc₂O (8.71 g, 39.91 mmol, 1.50 equiv.) was added and stirred for further 5 h at 45 °C. After stirring overnight at room temperature, water was added (100 mL) and the aqueous phase was extracted with CH₂Cl₂ (3 × 100 mL). The combined organic extracts were dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure. After purification by flash chromatography on silica gel (^cHex/EtOAc = 80:1), the title compound was obtained as light-yellow solid (7.85 g, 22.10 mmol, 83% yield). $R_f = 0.53$ (SiO₂, ^cHex/EtOAc = 25:1). mp 89–91 °C. ¹H NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 7.74$ (d, ³*J* = 8.6 Hz, 1H, *H*-6^{Ph}), 7.72 (s, 1H, NH), 7.28–7.17 (m, 2H, *H*-3^{Ph} and *H*-5^{Ph}), 2.72 (*pseudo-t*, *J* ≈ 5.2 Hz, 4H, 2 × *H*-2^{Pip} and 2 × *H*-6^{Pip}), 1.74–1.58 (m, 4H, 2 × *H*-3^{Pip} and 2 × *H*-5^{Pip}), 1.58–1.49 (m, 2H, 2 × *H*-4^{Pip}), 1.46 (s, 9H, C(CH₃)₃) ppm. ¹³C NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 152.3$ (C=O), 144.7 (*C*-2^{Ph}), 132.4 (*C*-1^{Ph}), 126.8 (*C*-5^{Ph}), 123.5 (*C*-3^{Ph}), 120.7 (*C*-6^{Ph}), 114.7 (*C*-4^{Ph}), 79.8 (C(CH₃)₃), 52.6 (*C*-2^{Pip} and *C*-6^{Pip}), 27.9 (C(CH₃)₃), 26.0 (*C*-3^{Pip} and *C*-5^{Pip}), 23.4 (*C*-4^{Pip}) ppm. IR (ATR): $\bar{\nu} = 3360, 2934, 1714, 1502, 1446, 1396, 1245, 1146, 1022, 925, 833$ cm⁻¹. MS (ESI): m/z calculated for [C₁₆H₂₃BrN₂O₂+H]⁺ ([M+H]⁺): 355.1/357.1. Found $m/z = 355.2$ (100%, [M+H]⁺)/357.1 (96%, [M+H]⁺) and 299.2 (21%, [M-^tBu+H]⁺)/301.1 (26%, [M-^tBu+H]⁺).

tert-Butyl (2-(piperidin-1-yl)-4-(2,2,2-trifluoroacetyl)phenyl)carbamate (10a)

Under an argon atmosphere, a solution of **9a** (4.69 g, 13.20 mmol, 1.00 equiv) in anhydrous THF (25 mL) was added dropwise to a suspension of KH (30% suspension in mineral oil, 2.64 g, 19.80 mmol, 1.50 equiv) in anhydrous THF (75 mL) at 0 °C. After 1 h at 0 °C, the reaction mixture was cooled down to -78 °C and a solution of ^tBuLi (1.6 M in pentane, 17.3 mL, 27.72 mmol, 2.10 equiv.) was carefully added dropwise via cannula. After 45 min, 2,2,2-trifluoro-*N*-methoxy-*N*-

methylacetamide (**5**, 4.15 g, 26.40 mmol, 2.00 equiv) was added and stirring was continued for 6 h at $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. The reaction was quenched by the addition of a solution of $\text{NH}_4\text{Cl}_{(\text{aq})}$ (sat., 20 mL). Water (50 mL) and EtOAc (100 mL) were added, the phases were separated, and the aqueous layer was extracted with EtOAc ($3 \times 100\text{ mL}$). The combined organic phases were dried over Na_2SO_4 and the solvent was removed under reduced pressure. After purification by flash chromatography on silica gel ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc} = 80:1$), the title compound was obtained as a yellow solid (3.78 g, 10.15 mmol, 77% yield). $R_f = 0.42$ (SiO_2 , $^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc} = 10:1$). mp $110\text{--}111\text{ }^{\circ}\text{C}$. $^1\text{H NMR}$, COSY (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 8.19$ (d, $^3J = 8.7\text{ Hz}$, 1H, $H\text{-}6^{Ph}$), 8.05 (s, 1H, NH), 7.80–7.72 (m, 2H, $H\text{-}3^{Ph}$ and $H\text{-}5^{Ph}$), 2.76 (*pseudo-t*, $J \approx 5.2\text{ Hz}$, 4H, $2 \times H\text{-}2^{Pip}$ and $2 \times H\text{-}6^{Pip}$), 1.82–1.64 (m, 4H, $2 \times H\text{-}3^{Pip}$ and $2 \times H\text{-}5^{Pip}$), 1.64–1.53 (m, 2H, $2 \times H\text{-}4^{Pip}$), 1.50 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ppm. $^{13}\text{C NMR}$, HSQC, HMBC (75.5 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 177.4$ (q, $^2J_{\text{CF}} = 34.0\text{ Hz}$, $\text{CF}_3\text{C}(\text{O})$), 151.3 ($\text{C}=\text{O}$), 141.8 ($\text{C-}2^{Ph}$), 140.8 ($\text{C-}1^{Ph}$), 127.8 ($\text{C-}5^{Ph}$), 122.7 ($\text{C-}4^{Ph}$), 121.8 ($\text{C-}3^{Ph}$), 116.4 (q, $^1J_{\text{CF}} = 292.1\text{ Hz}$, CF_3), 116.3 ($\text{C-}6^{Ph}$), 80.7 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 52.8 ($\text{C-}2^{Pip}$ and $\text{C-}6^{Pip}$), 27.7 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 26.0 ($\text{C-}3^{Pip}$ and $\text{C-}5^{Pip}$), 23.2 ($\text{C-}4^{Pip}$) ppm. $^{19}\text{F NMR}$ (376 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = -71.12$ (s, CF_3) ppm. IR (ATR): $\bar{\nu} = 2936, 2359, 1738, 1697, 1593, 1519, 1442, 1223, 1190, 1127, 1051, 908\text{ cm}^{-1}$. MS (ESI): m/z calculated for $[\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_3+\text{H}]^+$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 373.2. Found $m/z = 373.2$ (100%, $[\text{M}+\text{H}]^+$) and 317.2 (35%, $[\text{M}-^t\text{Bu}+\text{H}]^+$).

tert-Butyl (*E/Z*)-(2-(piperidin-1-yl)-4-(2,2,2-trifluoro-1-(hydroxyimino)ethyl)phenyl)-carbamate (**11a**)

To a solution of **10a** (2.00 g, 5.37 mmol, 1.00 equiv) in pyridine/EtOH (37.5 mL, 2:1 *v/v*) was added hydroxylamine hydrochloride (448 mg, 6.44 mmol, 1.20 equiv) and the mixture was stirred for 5 h at $80\text{ }^{\circ}\text{C}$. After complete conversion of the starting material the reaction mixture was cooled, and the solvent removed under reduced pressure. The residue was dissolved in EtOAc (100 mL), washed with water ($2 \times 50\text{ mL}$) and a solution of $\text{NaCl}_{(\text{aq})}$ (sat., $2 \times 50\text{ mL}$), dried over Na_2SO_4 and the solvent was removed under reduced pressure. After purification by flash chromatography on silica gel ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc} = 8:1$), the title compound was obtained as a mixture of (*E/Z*)-diastereomers (colorless solid, 1.84 g, 4.75 mmol, 88% yield). $R_f = 0.33$ and 0.36 (SiO_2 , $^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc} = 5:1$). mp $143\text{--}144\text{ }^{\circ}\text{C}$. $^1\text{H NMR}$, COSY (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 12.90$ and 12.66 ($2 \times$ s, 1H, NOH , both isomers), 7.95 and 7.93 ($2 \times$ d, $J = 8.5\text{ Hz}$, 1H, $H\text{-}6^{Ph}$, both isomers), 7.88 and 7.85 ($2 \times$ s, 1H, NH , both isomers), 7.32–7.14 (m, 2H, $H\text{-}3^{Ph}$ and $H\text{-}5^{Ph}$), 2.73 (*pseudo-q*, $J \approx 4.9\text{ Hz}$, 4H, $2 \times H\text{-}2^{Pip}$ and $2 \times H\text{-}6^{Pip}$), 1.73–1.60 (m, 4H, $2 \times H\text{-}3^{Pip}$ and $2 \times H\text{-}5^{Pip}$), 1.60–1.50 (m, 2H, $2 \times H\text{-}4^{Pip}$), 1.48 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ppm. $^{13}\text{C NMR}$, HSQC, HMBC (75.5 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 152.2$ ($\text{C}=\text{O}$), 144.3 (q, $^2J_{\text{CF}} = 28.1\text{ Hz}$, CF_3CNOH , one isomer), 144.0 (q, $^2J_{\text{CF}} = 30.8\text{ Hz}$, CF_3CNOH , other isomer), 142.4 and 142.2 ($\text{C-}2^{Ph}$, both isomers), 134.80 and 134.76 ($\text{C-}1^{Ph}$, both isomers), 124.9 ($\text{C-}5^{Ph}$, one isomer), 124.7 ($\text{C-}4^{Ph}$, one isomer), 124.5 ($\text{C-}5^{Ph}$, other isomer), 121.3 (q, $^1J_{\text{CF}} = 274.0\text{ Hz}$, CF_3 , one isomer), 120.9 ($\text{C-}3^{Ph}$, one isomer), 120.7 ($\text{C-}4^{Ph}$, other isomer), 120.4 ($\text{C-}3^{Ph}$, other isomer), 118.6 (q, $^1J_{\text{CF}} = 283.0\text{ Hz}$, CF_3 ,

other isomer), 117.9 ($C-6^{Ph}$), 80.04 and 80.00 ($C(CH_3)_3$, both isomers), 52.9 ($C-2^{Pip}$ and $C-6^{Pip}$), 27.9 ($C(CH_3)_3$), 26.2 ($C-3^{Pip}$ and $C-5^{Pip}$), 23.4 ($C-4^{Pip}$) ppm. ^{19}F NMR (376 MHz, DMSO- d_6): $\delta = -62.80$ and -65.58 (s, CF_3 , both isomers) ppm. IR (ATR): $\bar{\nu} = 3346, 2940, 2360, 1720, 1701, 1523, 1369, 1238, 1192, 1153, 1023, 964$ cm^{-1} . MS (ESI): m/z calculated for $[C_{18}H_{24}F_3N_3O_3+H]^+$ ($[M+H]^+$): 388.2. Found $m/z = 388.3$ (100%, $[M+H]^+$), 410.2 (5%, $[M+Na^+]$) and 332.3 (19%, $[M-tBu+H]^+$).

tert-Butyl (2-(piperidin-1-yl)-4-(3-(trifluoromethyl)diaziridin-3-yl)phenyl)carbamate (12a)
Under an argon atmosphere, to a solution of the oxime **11a** (1.22 g, 3.14 mmol, 1.00 equiv) in acetone (50 mL) and triethylamine (1.3 mL, 9.42 mmol, 3.00 equiv) was added a solution of *p*-toluenesulfonyl chloride (658 mg, 3.45 mmol, 1.10 equiv) in acetone (5 mL) dropwise at 0 °C. After stirring for 3 h at 0 °C, the solvent was removed under reduced pressure (no warming!) to give the crude *O*-tosyl oxime as a yellow solid, which was immediately used for the next step without further purification. Note: The product is not stable upon warming and on silica, so it is crucial to avoid further purification and warming during evaporation to obtain higher yields.

To a cooled schlenk flask containing liquid ammonia (approx. 50 mL) under an argon atmosphere at -78 °C was added a suspension of the crude *O*-tosyl oxime in anhydrous MTBE (25 mL) dropwise. The mixture was stirred for 5 h at -78 °C and warmed to room temperature overnight (side arm of the Schlenk flask opened to allow ammonia to evaporate slowly). The resulting suspension was diluted with MTBE (50 mL) and water (50 mL) and extracted with MTBE (3×50 mL). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure to obtain the diaziridine **12a** as a colorless solid (1.21 g, 3.13 mmol, 99% yield). $R_f = 0.38$ (SiO_2 , $^{t}Hex/EtOAc = 5:1$). mp 122–123 °C. 1H NMR, COSY (300 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 7.87$ (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, $H-6^{Ph}$), 7.81 (s, 1H, NH), 7.30–7.21 (m, 2H, $H-3^{Ph}$ and $H-5^{Ph}$), 4.02 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, $NH^{diaziridine}$), 3.89 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, $NH^{diaziridine}$), 2.79–2.68 (m, 4H, $2 \times H-2^{Pip}$ and $2 \times H-6^{Pip}$), 1.74–1.60 (m, 4H, $2 \times H-3^{Pip}$ and $2 \times H-5^{Pip}$), 1.59–1.50 (m, 2H, $2 \times H-4^{Pip}$), 1.48 (s, 9H, $C(CH_3)_3$) ppm. ^{13}C NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 152.3$ ($C=O$), 142.4 ($C-2^{Ph}$), 134.1 ($C-1^{Ph}$), 126.4 ($C-4^{Ph}$), 124.6 ($C-5^{Ph}$), 124.2 (q, $^1J_{CF} = 278.9$ Hz, CF_3), 120.5 ($C-3^{Ph}$), 118.2 ($C-6^{Ph}$), 79.9 ($C(CH_3)_3$), 57.1 (q, $^2J_{CF} = 34.8$ Hz, $C_q^{diaziridine}$), 52.9 ($C-2^{Pip}$ and $C-6^{Pip}$), 27.9 ($C(CH_3)_3$), 26.2 ($C-3^{Pip}$ and $C-5^{Pip}$), 23.5 ($C-4^{Pip}$) ppm. ^{19}F NMR (376 MHz, DMSO- d_6): $\delta = -74.98$ (s, CF_3) ppm. IR (ATR): $\bar{\nu} = 3367, 2937, 2359, 1722, 1522, 1464, 1420, 1371, 1215, 1146, 1095, 1027, 948, 831$ cm^{-1} . MS (ESI): m/z calculated for $[C_{18}H_{25}F_3N_4O_2+H]^+$ ($[M+H]^+$): 387.2. Found $m/z = 387.3$ (100%, $[M+H]^+$), 409.2 (3%, $[M+Na^+]$) and 331.3 (9%, $[M-tBu+H]^+$).

tert-Butyl (2-(piperidin-1-yl)-4-(3-(trifluoromethyl)-3*H*-diazirin-3-yl)phenyl)carbamate (13a)

Note: This reaction was performed in the dark to avoid partial photolysis of the product (aluminium foil was used to cover flasks and columns). To a solution of the diaziridine **12a** (1.00 g, 2.59 mmol,

1.00 equiv) in anhydrous CH₂Cl₂ (25 mL) was added triethylamine (897 μL, 6.47 mmol, 2.50 equiv) and iodine (980 mg, 3.89 mmol, 1.50 equiv) at 0 °C. The reaction mixture was stirred 1 h at 0 °C and 1 h at room temperature. After complete conversion of the starting material, the reaction was quenched by the addition of a Na₂S₂O_{3(aq)} solution (1 M, 50 mL) and the aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂ (3 × 50 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄ and the solvent was removed under reduced pressure. After flash-chromatographic purification on silica gel (Hex/EtOAc = 50:1), the title compound was obtained as a colorless solid (948 mg, 2.47 mmol, 95% yield). R_f = 0.20 (SiO₂, Hex/EtOAc = 50:1). mp 46–48 °C. ¹H NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.94 (d, ³J = 8.5 Hz, 1H, *H*-6^{Ph}), 7.85 (s, 1H, *NH*), 7.02 (dd, ³J = 8.5, ⁴J = 1.8 Hz, 1H, *H*-5^{Ph}), 6.92 (d, ⁴J = 1.8 Hz, 1H, *H*-3^{Ph}), 2.76–2.67 (m, 4H, 2 × *H*-2^{Pip} and 2 × *H*-6^{Pip}), 1.72–1.59 (m, 4H, 2 × *H*-3^{Pip} and 2 × *H*-5^{Pip}), 1.57–1.49 (m, 2H, 2 × *H*-4^{Pip}), 1.47 (s, 9H, C(CH₃)₃) ppm. ¹³C NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 152.2 (C=O), 143.3 (C-2^{Ph}), 135.0 (C-1^{Ph}), 122.8 (C-5^{Ph}), 122.0 (q, ¹J_{CF} = 274.8 Hz, CF₃), 121.6 (C-4^{Ph}), 119.1 (C-6^{Ph}), 118.4 (C-3^{Ph}), 80.2 (C(CH₃)₃), 52.6 (C-2^{Pip} and C-6^{Pip}), 28.0 (q, ²J_{CF} = 39.8 Hz, C_q^{diazirine}), 27.9 (C(CH₃)₃), 26.1 (C-3^{Pip} and C-5^{Pip}), 23.4 (C-4^{Pip}) ppm. ¹⁹F NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆): –65.88 (CF₃) ppm. IR (ATR): $\bar{\nu}$ = 3357, 2932, 1723, 1584, 1523, 1421, 1364, 1245, 1143, 1046, 979, 830 cm⁻¹. MS (ESI): *m/z* calculated for [C₁₈H₂₃F₃N₄O₂+H]⁺ ([M+H]⁺): 385.2. Found *m/z* = 385.3 (100%, [M+H]⁺), 329.2 (17%, [M-^tBu+H]⁺) and 301.2 (2%, [M-^tBu-N₂]⁺).

2-(Piperidin-1-yl)-4-(3-(trifluoromethyl)-3*H*-diazirin-3-yl)aniline hydrochloride (14a)

Note: This reaction was performed in the dark to avoid partial photolysis of the product (aluminium foil was used to cover flasks and columns). Under an argon atmosphere, the diazirine **13a** (1.20 g, 3.12 mmol, 1.00 equiv) was submitted in a round bottom flask and a hydrogen chloride solution (4.0 M in 1,4-dioxane, 15 mL) was added at room temperature. After stirring for 2 h, the solvent was removed under reduced pressure and the residue dried in a fine vacuum to obtain the title compound (998 mg, 3.11 mmol, quant.) as a colorless solid, which was used without further purification in the next step. R_f = 0.41 (SiO₂, Hex/EtOAc = 10:1). mp decomposition ≥ 200 °C. ¹H NMR, COSY (300 MHz, methanol-*d*₄): δ = 7.34–7.26 (m, 2H, *H*-3^{Ph} and *H*-5^{Ph}), 7.14 (d, ³J = 8.3 Hz, 1H, *H*-6^{Ph}), 3.54 (*pseudo-t*, *J* ≈ 5.6 Hz, 4H, 2 × *H*-2^{Pip} and 2 × *H*-6^{Pip}), 2.20–2.05 (m, 4H, 2 × *H*-3^{Pip} and 2 × *H*-5^{Pip}), 1.86–1.70 (m, 2H, 2 × *H*-4^{Pip}) ppm. ¹³C NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, methanol-*d*₄): δ = 141.5 (C-1^{Ph}), 132.0 (C-2^{Ph}), 129.8 (C-5^{Ph}), 123.5 (q, ¹J_{CF} = 273.7 Hz, CF₃), 121.8 (C-3^{Ph}), 121.3 (C-6^{Ph}), 121.2 (C-4^{Ph}), 56.3 (C-2^{Pip} and C-6^{Pip}), 29.2 (q, ²J_{CF} = 40.6 Hz, C_q^{Diazirin}), 24.8 (C-3^{Pip} and C-5^{Pip}), 22.6 (C-4^{Pip}) ppm. ¹⁹F NMR (376 MHz, methanol-*d*₄): δ = –68.72 (s, CF₃) ppm. IR (ATR): $\bar{\nu}$ = 3418, 3154, 2400, 1655, 1524, 1317, 1244, 1148, 1137, 997, 820 cm⁻¹. MS (ESI): *m/z* calculated for [C₁₃H₁₅F₃N₄+H]⁺ ([M+H]⁺): 285.1. Found *m/z* = 285.1 (100%, [M+H]⁺), 257.2 (18%, [M-N₂]⁺) and 172.1 (7%, [M-piperidine-N₂]⁺).

5-Methyl-*N*-(2'-(piperidin-1-yl)-4'-(3-(trifluoromethyl)-3*H*-diazirin-3-yl)phenyl)thiophene-2-sulfonamide (MK6-83^{PG1}, 3a)

Note: This reaction was performed in the dark to avoid partial photolysis of the product (aluminium foil was used to cover flasks and columns). Under an argon atmosphere, 5-methylthiophene-2-sulfonyl chloride (574 mg, 2.92 mmol, 1.00 equiv) was added dropwise to a solution of **14a** (935 mg, 2.92 mmol, 1.00 equiv) in anhydrous pyridine (10 mL) at 0 °C. The mixture was stirred 1 h at 0 °C and at room temperature overnight. The solvent was removed under reduced pressure and the residue dissolved in EtOAc (100 mL). The organic layer was washed with a NH₄Cl_(aq) solution (sat., 1 × 50 mL) and a solution of NaCl_(aq) (sat., 2 × 50 mL), dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure. After purification by column chromatography on silica gel (°Hex/EtOAc = 30:1), the title compound was isolated as a light-yellow solid (824 mg, 1.85 mmol, 63% yield). In general, no further purification was required in this step. However, if necessary, preparative HPLC purification (C₁₈, eluent A: MilliQ-grade water, eluent B: acetonitrile, isocratic (20:80) over 90 min with a flow rate of 12.5 mL·min⁻¹ and detection at 254 nm) can be performed. R_f = 0.15 (SiO₂, °Hex/EtOAc = 20:1). mp 92–94 °C. ¹H NMR, COSY (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.07 (s, 1H, NH), 7.47 (d, ³J = 8.6 Hz, 1H, *H*-6^{Ph})¹, 7.47 (d, ³J = 3.7 Hz, 1H, *H*-3^{Thio})¹, 7.03 (ddd, ³J = 8.6 Hz, ⁴J = 2.2 Hz, *J* = 1.0 Hz, 1H, *H*-5^{Ph}), 6.89 (d, ⁴J = 2.2 Hz, 1H, *H*-3^{Ph}), 6.86 (dd, ³J = 3.7 Hz, ⁴J = 1.1 Hz, 1H, *H*-4^{Thio}), 2.59–2.52 (m, 4H, 2 × *H*-2^{Pip} and 2 × *H*-6^{Pip}), 2.45 (d, ⁴J = 1.1 Hz, 3H, CH₃), 1.67–1.57 (m, 4H, 2 × *H*-3^{Pip} and 2 × *H*-5^{Pip}), 1.52–1.42 (m, 2H, 2 × *H*-4^{Pip}) ppm. ¹³C NMR, HSQC, HMBC (100.6 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 148.1 (*C*-2^{Thio}), 145.6 (*C*-2^{Ph}), 136.9 (*C*-5^{Thio}), 133.8 (*C*-1^{Ph}), 133.1 (*C*-3^{Thio}), 126.4 (*C*-4^{Thio}), 123.8 (*C*-4^{Ph}), 122.8 (*C*-5^{Ph}), 121.9 (q, ¹J_{CF} = 274.8 Hz, CF₃), 120.7 (*C*-6^{Ph}), 119.2 (*C*-3^{Ph}), 52.8 (*C*-2^{Pip} and *C*-6^{Pip}), 27.9 (q, ²J_{CF} = 39.9 Hz, C_q^{diazirine}), 25.6 (*C*-3^{Pip} and *C*-5^{Pip}), 23.4 (*C*-4^{Pip}), 15.1 (CH₃) ppm. ¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO-*d*₆): δ = -65.79 (CF₃) ppm. IR (ATR): $\bar{\nu}$ = 2938, 2855, 1505, 1440, 1342, 1245, 1153, 1123, 1022, 905, 823 cm⁻¹. MS (ESI): *m/z* calculated for [C₁₈H₁₉F₃N₄O₂S₂+H]⁺ ([M+H]⁺): 445.1. Found *m/z* = 445.2 (100%, [M+H]⁺), 467.1 (3%, [M+Na]⁺) and 417.2 (4%, [M-N₂]⁺). HPLC analysis: retention time = 2.51 min; peak area: 99.80%; eluent A: MilliQ-grade water; eluent B: CH₃CN; eluent C: 0.1% solution of formic acid in MilliQ-grade water; isocratic (10:80:10) over 8 min with a flow rate of 0.7 mL·min⁻¹ and detection at 254 nm; injection volume: 5 μL; column temperature: 40 °C.

1-(4-Bromo-2-nitrophenyl)piperidine (7b)

This compound was synthesized according to a modified procedure by Yin *et al.*^[35] To a mixture of 4-bromo-1-fluoro-2-nitrobenzene (20.00 g, 90.91 mmol, 1.00 equiv) and Cs₂CO₃ (44.43 g, 136.37 mmol, 1.50 equiv) in DMF (200 mL) was added piperidine (9.4 mL, 95.45 mmol, 1.05 equiv) at room temperature. After stirring for 1 h, the solvent was evaporated under reduced pressure and

¹overlapping signals

the residue was dissolved in EtOAc (200 mL) and a NaCl_(aq) solution (sat., 200 mL). The aqueous phase was extracted with EtOAc (3 × 200 mL) and the combined organic layers were washed with a solution of NaCl_(aq) (sat., 1 × 200 mL), dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure to obtain the title compound (25.80 g, 90.87 mmol, 99% yield) as a bright red oil, which crystallizes upon freezing to give red crystals. $R_f = 0.49$ (SiO₂, ^cHex/EtOAc = 20:1). mp 51–52 °C. ¹H NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 7.98$ (d, ⁴*J* = 2.5 Hz, 1H, *H*-3^{Ph}), 7.69 (dd, ³*J* = 8.9 Hz, ⁴*J* = 2.5 Hz, 1H, *H*-5^{Ph}), 7.23 (d, ³*J* = 8.9 Hz, 1H, *H*-6^{Ph}), 3.01–2.89 (m, 4H, 2 × *H*-2^{Pip} and 2 × *H*-6^{Pip}), 1.65–1.45 (m, 6H, 2 × *H*-3^{Pip}, 2 × *H*-5^{Pip} and 2 × *H*-4^{Pip}) ppm. ¹³C NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 145.2$ (*C*-1^{Ph}), 142.5 (*C*-2^{Ph}), 136.1 (*C*-5^{Ph}), 127.6 (*C*-3^{Ph}), 123.3 (*C*-6^{Ph}), 111.4 (*C*-4^{Ph}), 52.1 (*C*-2^{Pip} and *C*-6^{Pip}), 25.4 (*C*-3^{Pip} and *C*-5^{Pip}), 23.3 (*C*-4^{Pip}) ppm. IR (ATR): $\bar{\nu} = 2933, 2814, 1598, 1506, 1448, 1324, 1281, 1224, 1127, 1022, 828$ cm⁻¹. MS (ESI): *m/z* calculated for [C₁₁H₁₃BrN₂O₂+H]⁺ ([M+H]⁺): 285.0/287.0. Found *m/z* = 285.1 (87%, [M+H]⁺)/287.0 (100%, [M+H]⁺).

5-Bromo-2-(piperidin-1-yl)aniline (8b)

This compound was synthesized according to a modified procedure by Yin *et al.*^[35] To a solution of **7b** (10.00 g, 35.21 mmol, 1.00 equiv) in EtOAc (250 mL) was added SnCl₂ · 2 H₂O (27.00 g, 105.63 mmol, 3.00 equiv) at room temperature. After stirring for 1 h, the reaction was quenched by the addition of a KF_(aq) solution (2 M, 200 mL) and stirred further 30 min. The phases were separated, and the aqueous layer was extracted with EtOAc (3 × 100 mL). The combined organic extracts were washed with a KF_(aq) solution (1 M, 1 × 100 mL), a solution of NaCl_(aq) (sat., 2 × 100 mL), dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure. The title compound was obtained as a yellow solid (8.64 g, 33.86 mmol, 96% yield) which was used without any further purification. $R_f = 0.43$ (SiO₂, ^cHex/EtOAc = 20:1). mp 71–73 °C. ¹H NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 6.82$ (d, ⁴*J* = 2.3 Hz, 1H, *H*-6^{Ph}), 6.76 (d, ³*J* = 8.3 Hz, 1H, *H*-3^{Ph}), 6.63 (dd, ³*J* = 8.3, ⁴*J* = 2.4 Hz, 1H, *H*-4^{Ph}), 4.96 (s (br), 2H, NH₂), 2.69 (*pseudo-t*, *J* ≈ 5.1 Hz, 4H, 2 × *H*-2^{Pip} and 2 × *H*-6^{Pip}), 1.63 (*pseudo-p*, *J* ≈ 5.5 Hz, 4H, 2 × *H*-3^{Pip} and 2 × *H*-5^{Pip}), 1.55–1.43 (m, 2H, 2 × *H*-4^{Pip}). ¹³C NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 144.3$ (*C*-1^{Ph}), 138.6 (*C*-2^{Ph}), 121.0 (*C*-3^{Ph}), 118.5 (*C*-4^{Ph}), 116.0 (2C, *C*-5^{Ph} and *C*-6^{Ph}), 51.7 (*C*-2^{Pip} and *C*-6^{Pip}), 26.1 (*C*-3^{Pip} and *C*-5^{Pip}), 23.9 (*C*-4^{Pip}) ppm. IR (ATR): $\bar{\nu} = 3443, 3343, 2932, 2794, 1593, 1495, 1379, 1229, 1200, 843, 795$ cm⁻¹. MS (ESI): *m/z* calculated for [C₁₁H₁₅BrN₂+H]⁺ ([M+H]⁺): 255.0/257.0. Found *m/z* = 255.2 (96%, [M+H]⁺)/257.0 (100%, [M+H]⁺).

tert-Butyl (5-bromo-2-(piperidin-1-yl)phenyl)carbamate (9b)

This compound was synthesized according to a method by Kelly *et al.*^[37] Under an argon atmosphere, a solution of NaHMDS (1.9 M in THF, 25.0 mL, 47.02 mmol, 2.00 equiv) was added dropwise to a solution of the aniline **8b** (6.00 g, 23.51 mmol, 1.00 equiv) in anhydrous THF (25 mL) at room

temperature. After stirring for 15 min, a solution of Boc₂O (5.13 g, 23.51 mmol, 1.00 equiv) in anhydrous THF (5 mL) was added and the reaction mixture was stirred overnight. NH₄Cl_(aq) (sat., 20 mL) was added to quench the reaction, the solvent was removed under reduced pressure and the aqueous layer was extracted with EtOAc (3 × 100 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, concentrated under reduced pressure and purified by flash-chromatography on silica gel (^cHex/EtOAc = 80:1) to obtain the title compound as a red oil, which crystallizes upon freezing (5.04 g, 14.19 mmol, 60% yield). R_f = 0.53 (SiO₂, ^cHex/EtOAc = 20:1). mp 83–85 °C. ¹H NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.03 (d, ⁴J = 2.3 Hz, 1H, *H*-6^{Ph}), 7.80 (s, 1H, NH), 7.16 (dd, ³J = 8.5, ⁴J = 2.3 Hz, 1H, *H*-4^{Ph}), 7.10 (d, ³J = 8.5 Hz, 1H, *H*-3^{Ph}), 2.69 (*pseudo-t*, *J* ≈ 5.2 Hz, 4H, 2 × *H*-2^{Pip} and 2 × *H*-6^{Pip}), 1.71–1.58 (m, 4H, 2 × *H*-3^{Pip} and 2 × *H*-5^{Pip}), 1.58–1.48 (m, 2H, 2 × *H*-4^{Pip}), 1.47 (s, 9H, C(CH₃)₃) ppm. ¹³C NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 152.2 (C=O), 141.8 (C-2^{Ph}), 134.6 (C-1^{Ph}), 125.3 (C-4^{Ph}), 122.7 (C-3^{Ph}), 120.6 (C-6^{Ph}), 116.5 (C-5^{Ph}), 80.2 (C(CH₃)₃), 52.8 (C-2^{Pip} and C-6^{Pip}), 27.9 (C(CH₃)₃), 26.1 (C-3^{Pip} and C-5^{Pip}), 23.4 (C-4^{Pip}) ppm. IR (ATR): $\bar{\nu}$ = 3443, 3343, 2932, 2814, 2358, 1718, 1593, 1495, 1437, 1228, 1026, 843, 796 cm⁻¹. MS (ESI): *m/z* calculated for [C₁₆H₂₃BrN₂O₂+H]⁺ ([M+H]⁺): 355.1/357.1. Found *m/z* = 355.2 (100%, [M+H]⁺)/357.1 (91%, [M+H]⁺) and 299.2 (24%, [M-^tBu+H]⁺)/301.1 (23%, [M-^tBu+H]⁺).

tert-Butyl (2-(piperidin-1-yl)-5-(2,2,2-trifluoroacetyl)phenyl)carbamate (10b)

Under an argon atmosphere, a solution of **9b** (4.74 g, 13.34 mmol, 1.00 equiv) in anhydrous THF (25 mL) was added dropwise to a suspension of KH (30% suspension in mineral oil, 2.68 g, 20.01 mmol, 1.50 equiv) in anhydrous THF (100 mL) at 0 °C. After 1 h at 0 °C, the reaction mixture was cooled down to –78 °C and a solution of ^tBuLi (1.9 M in pentane, 14.7 mL, 28.01 mmol, 2.10 equiv) was carefully added dropwise via cannula. After 60 min, 2,2,2-trifluoro-*N*-methoxy-*N*-methylacetamide (**4**, 4.19 g, 26.68 mmol, 2.00 equiv) was added and stirring was continued for 6 h at –78 °C. The reaction was quenched by the addition of a solution of NH₄Cl_(aq) (sat., 25 mL). Water (50 mL) and EtOAc (100 mL) were added, the phases were separated, and the aqueous layer was extracted with EtOAc (3 × 100 mL). The combined organic phases were dried over Na₂SO₄ and the solvent was removed under reduced pressure. After purification by flash chromatography on silica gel (^cHex/EtOAc = 30:1), the title compound was obtained as a light-yellow solid (3.26 g, 8.76 mmol, 66% yield). Note: The product may be in equilibrium with its hydrate form (≈ 3.0–1.5:1, determined by ¹H NMR spectroscopy). R_f = 0.18 (SiO₂, ^cHex/EtOAc = 20:1). mp 106–107 °C. ¹H NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.21 (d, ⁴J = 2.3 Hz, 1H, *H*-6^{Ph}), 8.04 (s, 1H, NH), 7.73 (ddq, ³J = 8.6 Hz, ⁴J = 2.3 Hz, *J* = 1.4 Hz, 1H, *H*-4^{Ph}), 7.22 (d, ³J = 8.6 Hz, 1H, *H*-3^{Ph}), 3.03–2.93 (m, 4H, 2 × *H*-2^{Pip} and 2 × *H*-6^{Pip}), 1.80–1.62 (m, 4H, 2 × *H*-3^{Pip} and 2 × *H*-5^{Pip}), 1.62–1.52 (m, 2H, 2 × *H*-4^{Pip}), 1.47 (s, 9H, C(CH₃)₃) ppm. ¹³C NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 178.0 (q, ²J_{CF} = 33.5 Hz, CF₃C(O)), 152.8 (C=O), 152.0 (C-2^{Ph}), 131.4 (C-1^{Ph}), 127.0 (C-4^{Ph}), 123.9 (C-6^{Ph}), 122.4 (C-5^{Ph}), 119.8 (C-3^{Ph}), 116.7 (q, ¹J_{CF} = 292.0 Hz, CF₃), 79.8 (C(CH₃)₃), 51.3 (C-2^{Pip} and C-6^{Pip}), 28.0

(C(CH₃)₃), 25.5 (C-3^{Pip} and C-5^{Pip}), 23.6 (C-4^{Pip}) ppm. ¹⁹F NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆): δ = -71.13 (CF₃) ppm. IR (ATR): $\bar{\nu}$ = 2945, 1731, 1699, 1599, 1527, 1442, 1239, 1138, 1127, 1103, 917, 767, 734, 657 cm⁻¹. MS (ESI): *m/z* calculated for [C₁₈H₂₃F₃N₂O₃+H]⁺ ([M+H]⁺): 373.2. Found *m/z* = 373.2 (100%, [M+H]⁺) and 317.2 (30%, [M-^tBu+H]⁺).

tert-Butyl (*E/Z*)-(2-(piperidin-1-yl)-5-(2,2,2-trifluoro-1-(hydroxyimino)ethyl)phenyl)-carbamate (11b)

To a solution of **10b** (3.06 g, 8.22 mmol, 1.00 equiv) in pyridine/EtOH (60 mL, 2:1 *v/v*) was added hydroxylamine hydrochloride (685 mg, 9.86 mmol, 1.20 equiv) and the mixture was stirred for 4 h at 80 °C. After complete conversion of the starting material the reaction mixture was cooled, and the solvent removed under reduced pressure. The residue was dissolved in EtOAc (100 mL), washed with a solution of NH₄Cl_(aq) (sat., 1 × 50 mL), with water (1 × 50 mL) and a solution of NaCl_(aq) (sat., 1 × 50 mL), dried over Na₂SO₄ and the solvent was removed under reduced pressure. The title compound was obtained as a mixture of (*E/Z*)-diastereomers (colorless solid, 3.07 g, 7.92 mmol, 96% yield). *R_f* = 0.32 (SiO₂, ^oHex/EtOAc = 5:1). mp 69–72 °C. ¹H NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.95 and 12.67 (2 × s, 1H, NOH, both isomers), 7.98 and 7.95 (2 × d, ⁴*J* = 2.0 Hz, 1H, *H*-6^{Ph}, both isomers), 7.77 and 7.75 (2 × s, 1H, NH, both isomers), 7.21 and 7.18 (2 × d, ³*J* = 8.2 Hz, 1H, *H*-3^{Ph}, both isomers), 7.15–7.08 (m, 1H, *H*-4^{Ph}), 2.76 (*pseudo*-q, *J* ≈ 4.8 Hz, 4H, 2 × *H*-2^{Pip} and 2 × *H*-6^{Pip}), 1.73–1.59 (m, 4H, 2 × *H*-3^{Pip} and 2 × *H*-5^{Pip}), 1.59–1.48 (m, 2H, 2 × *H*-4^{Pip}), 1.46 (2 × s, 9H, C(CH₃)₃, both isomers) ppm. ¹³C NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 152.4 (C=O), 144.49 and 144.36 (C-2^{Ph}, both isomers), 144.41 (q, ²*J*_{CF} = 28.1 Hz, CF₃CNOH, one isomer) and 144.40 (q, ²*J*_{CF} = 31.0 Hz, CF₃CNOH, other isomer), 132.8 and 132.7 (C-1^{Ph}, both isomers), 126.0 (C-5^{Ph}, one isomer), 123.5 and 122.9 (C-4^{Ph}, both isomers), 122.0 (C-5^{Ph}, other isomer), 121.2 (q, ¹*J*_{CF} = 274.2 Hz, CF₃, one isomer), 120.34 and 120.31 (C-3^{Ph}, both isomers), 119.2 and 118.58 (C-6^{Ph}, both isomers), 118.56 (q, ¹*J*_{CF} = 283.0 Hz, CF₃, both isomers), 79.9 and 79.8 (C(CH₃)₃, both isomers), 52.6 and 52.5 (C-2^{Pip} and C-6^{Pip}, both isomers), 27.9 (C(CH₃)₃), 26.0 (C-3^{Pip} and C-5^{Pip}), 23.5 (C-4^{Pip}) ppm. ¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO-*d*₆): δ = -62.78 and -65.86 (s, CF₃, both isomers) ppm. IR (ATR): $\bar{\nu}$ = 3331, 2938, 1681, 1522, 1444, 1369, 1235, 1150, 1128, 1105, 1023, 978, 821, 719 cm⁻¹. MS (ESI): *m/z* calculated for [C₁₈H₂₄F₃N₃O₃+H]⁺ ([M+H]⁺): 388.2. Found *m/z* = 388.3 (100%, [M+H]⁺) and 332.3 (20%, [M-^tBu+H]⁺).

tert-Butyl (2-(piperidin-1-yl)-5-(3-(trifluoromethyl)diaziridin-3-yl)phenyl)carbamate (12b)

Under an argon atmosphere, to a solution of the oxime **11b** (3.05 g, 7.87 mmol, 1.00 equiv) in acetone (80 mL) and triethylamine (3.3 mL, 23.61 mmol, 3.00 equiv) was added a solution of *p*-toluenesulfonyl chloride (1.65 g, 8.66 mmol, 1.10 equiv) in acetone (10 mL) dropwise at 0 °C. After stirring for 3 h at 0 °C, the solvent was removed under reduced pressure (no warming!) to give the crude *O*-tosyl oxime as a yellow solid, which was immediately used for the next step without

further purification. Note: The product is not stable upon warming and on silica, so it is crucial to avoid further purification and warming during evaporation to obtain higher yields.

To a cooled schlenk flask containing liquid ammonia (approx. 100 mL) under an argon atmosphere at $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ was added a suspension of the crude *O*-tosyl oxime in anhydrous MTBE (75 mL) dropwise. The mixture was stirred for 6 h at $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ and warmed to room temperature overnight (side arm of the Schlenk flask opened to allow ammonia to evaporate slowly). The resulting suspension was diluted with MTBE (100 mL) and water (100 mL) and extracted with MTBE ($3 \times 100\text{ mL}$). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure to obtain the diaziridine **12b** as a colorless amorphous solid (2.61 g, 6.75 mmol, 86% yield). $R_f = 0.33$ (SiO_2 , $^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc} = 5:1$). $^1\text{H NMR}$, COSY (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 8.10$ (d, $^4J = 1.8\text{ Hz}$, 1H, $H\text{-}6^{Ph}$), 7.77 (s, 1H, NH), 7.25–7.12 (m, 2H, $H\text{-}3^{Ph}$ and $H\text{-}4^{Ph}$), 4.02 (d, $^3J = 8.2\text{ Hz}$, 1H, $\text{NH}^{diaziridine}$), 3.88 (d, $^3J = 8.2\text{ Hz}$, 1H, $\text{NH}^{diaziridine}$), 2.73 (*pseudo-t*, $J \approx 5.2\text{ Hz}$, 4H, $2 \times H\text{-}2^{Pip}$ and $2 \times H\text{-}6^{Pip}$), 1.73–1.60 (m, 4H, $2 \times H\text{-}3^{Pip}$ and $2 \times H\text{-}5^{Pip}$), 1.60–1.49 (m, 2H, $2 \times H\text{-}4^{Pip}$), 1.48 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ppm. $^{13}\text{C NMR}$, HSQC, HMBC (75.5 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 152.3$ ($\text{C}=\text{O}$), 143.7 ($\text{C-}2^{Ph}$), 132.8 ($\text{C-}1^{Ph}$), 127.9 ($\text{C-}5^{Ph}$), 124.2 (q, $^1J_{\text{CF}} = 278.6\text{ Hz}$, CF_3), 123.1 ($\text{C-}4^{Ph}$), 120.3 ($\text{C-}3^{Ph}$), 118.6 ($\text{C-}6^{Ph}$), 79.8 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), 57.3 (q, $^2J_{\text{CF}} = 34.8\text{ Hz}$, $\text{C}_q^{diaziridine}$), 52.7 ($\text{C-}2^{Pip}$ and $\text{C-}6^{Pip}$), 27.9 ($\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$), 26.1 ($\text{C-}3^{Pip}$ and $\text{C-}5^{Pip}$), 23.5 ($\text{C-}4^{Pip}$) ppm. $^{19}\text{F NMR}$ (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = -74.98$ ppm. IR (ATR): $\bar{\nu} = 3258, 2936, 1725, 1581, 1524, 1443, 1368, 1231, 1211, 1140, 1104, 1049, 1024, 819, 709\text{ cm}^{-1}$. MS (ESI): m/z calculated for $[\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_2+\text{H}]^+$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 387.2. Found $m/z = 387.3$ (100%, $[\text{M}+\text{H}]^+$) and 331.3 (17%, $[\text{M-}^t\text{Bu}+\text{H}]^+$).

tert-Butyl (2-(piperidin-1-yl)-5-(3-(trifluoromethyl)-3*H*-diazirin-3-yl)phenyl)carbamate (13b)

Note: This reaction was performed in the dark to avoid partial photolysis of the product (aluminium foil was used to cover flasks and columns). To a solution of the diaziridine **12b** (2.44 g, 6.31 mmol, 1.00 equiv) in anhydrous CH_2Cl_2 (70 mL) was added triethylamine (2.2 mL, 15.79 mmol, 2.50 equiv) and iodine (2.39 g, 9.47 mmol, 1.50 equiv) at $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. The reaction mixture was stirred 1 h at $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ and 1 h at room temperature. After complete conversion of the starting material, the reaction was quenched by the addition of a $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3(\text{aq})$ solution (1 M, 50 mL) and the aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 ($3 \times 100\text{ mL}$). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 and the solvent was removed under reduced pressure. After flash-chromatographic purification on silica gel ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc} = 100:1$), the title compound was obtained as a bright yellow solid (2.00 g, 5.20 mmol, 82% yield). $R_f = 0.33$ (SiO_2 , $^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc} = 50:1$). mp $56\text{--}58\text{ }^{\circ}\text{C}$. $^1\text{H NMR}$, COSY (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 7.82\text{--}7.74$ (m, 2H, $H\text{-}6^{Ph}$ and NH), 7.22 (d, $^3J = 8.4\text{ Hz}$, 1H, $H\text{-}3^{Ph}$), 6.86 (dd, $^3J = 8.3$, $^4J = 2.4\text{ Hz}$, 1H, $H\text{-}4^{Ph}$), 2.72 (*pseudo-t*, $J \approx 5.2\text{ Hz}$, 4H, $2 \times H\text{-}2^{Pip}$ and $2 \times H\text{-}6^{Pip}$), 1.71–1.58 (m, 4H, $2 \times H\text{-}3^{Pip}$ and $2 \times H\text{-}5^{Pip}$), 1.58–1.49 (m, 2H, $2 \times H\text{-}4^{Pip}$), 1.47 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ppm.

^{13}C NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO- d_6): δ = 152.3 (C=O), 144.5 (C-2^{Ph}), 133.6 (C-1^{Ph}), 122.6 (C-5^{Ph}), 122.0 (q, $^1J_{\text{CF}}$ = 274.8 Hz, CF₃), 121.3 (C-3^{Ph}), 121.1 (C-4^{Ph}), 116.2 (C-6^{Ph}), 80.2 (C(CH₃)₃), 52.5 (C-2^{Pip} and C-6^{Pip}), 28.1 (q, $^2J_{\text{CF}}$ = 39.9 Hz, C_q^{diazirine}), 27.9 (C(CH₃)₃), 26.0 (C-3^{Pip} and C-5^{Pip}), 23.5 (C-4^{Pip}) ppm. ^{19}F NMR (282 MHz, DMSO- d_6): -65.85 (CF₃) ppm. IR (ATR): $\bar{\nu}$ = 3356, 2940, 1729, 1525, 1440, 1366, 1252, 1148, 1106, 1049, 989, 894, 806 cm⁻¹. MS (ESI): m/z calculated for [C₁₈H₂₃F₃N₄O₂+H]⁺ ([M+H]⁺): 385.2. Found m/z = 385.2 (100%, [M+H]⁺), 329.2 (54%, [M-^tBu+H]⁺), 301.2 (17%, [M-^tBu-N₂]⁺), 257.2 (9%, [M-Boc-N₂]⁺).

2-(Piperidin-1-yl)-5-(3-(trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl)aniline hydrochloride (14b)

Note: This reaction was performed in the dark to avoid partial photolysis of the product (aluminium foil was used to cover flasks and columns). Under an argon atmosphere, the diazirine **13b** (1.20 g, 3.12 mmol, 1.00 equiv) was submitted in a round bottom flask and a hydrogen chloride solution (4.0 M in 1,4-dioxane, 15 mL) was added at room temperature. After stirring for 1 h, the solvent was removed under reduced pressure and the residue dried in a fine vacuum to obtain the title compound (1.00 g, 3.12 mmol, quant.) as a yellow oil, which was used without further purification in the next step. R_f = 0.59 (SiO₂, ^cHex/EtOAc = 10:1). ^1H NMR, COSY (300 MHz, methanol- d_4): δ = 7.58 (d, 3J = 8.7 Hz, 1H, H-3^{Ph}), 6.94 (d, 4J = 2.2 Hz, 1H, H-6^{Ph}), 6.80 (dd, 3J = 8.7 Hz, 4J = 2.2 Hz, 1H, H-4^{Ph}), 3.52–3.43 (m, 4H, 2 × H-2^{Pip} and 2 × H-6^{Pip}), 2.15–2.01 (m, 4H, 2 × H-3^{Pip} and 2 × H-5^{Pip}), 1.83–1.69 (m, 2H, 2 × H-4^{Pip}) ppm. ^{13}C NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, methanol- d_4): δ = 139.9 (C-1^{Ph}), 134.6 (C-2^{Ph}), 131.1 (C-5^{Ph}), 123.4 (q, $^1J_{\text{CF}}$ = 274.0 Hz, CF₃), 123.4 (C-3^{Ph}), 119.7 (C-4^{Ph}), 118.8 (C-6^{Ph}), 56.2 (C-2^{Pip} and C-6^{Pip}), 29.1 (q, $^2J_{\text{CF}}$ = 40.6 Hz, C_q^{Diazirin}), 25.1 (C-3^{Pip} and C-5^{Pip}), 23.0 (C-4^{Pip}) ppm. ^{19}F NMR (282 MHz, methanol- d_4): δ = -68.06 (s, CF₃) ppm. IR (ATR): $\bar{\nu}$ = 3323, 3191, 1955, 1609, 1519, 1441, 1286, 1220, 1151, 1120, 1012, 872, 854, 723 cm⁻¹. MS (ESI): m/z calculated for [C₁₃H₁₅F₃N₄+H]⁺ ([M+H]⁺): 285.1. Found m/z = 285.1 (100%, [M+H]⁺), 257.2 (10%, [M-N₂]⁺) and 172.1 (7%, [M-piperidine-N₂]⁺).

5-Methyl-*N*-(2'-(piperidin-1-yl)-5'-(3-(trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl)phenyl)thiophene-2-sulfonamide (MK6-83^{PG2}, 3b)

Note: This reaction was performed in the dark to avoid partial photolysis of the product (aluminium foil was used to cover flasks and columns). Under an argon atmosphere, 5-methylthiophene-2-sulfonyl chloride (610 mg, 3.10 mmol, 1.00 equiv) was added dropwise to a solution of **14b** (994 mg, 3.10 mmol, 1.00 equiv) in anhydrous pyridine (25 mL) at 0 °C. The mixture was stirred for 1 h at 0 °C and at room temperature overnight. The solvent was removed under reduced pressure and the residue dissolved in EtOAc (100 mL). The organic layer was washed with a NH₄Cl_(aq) solution (sat., 2 × 100 mL) and a solution of NaCl_(aq) (sat., 1 × 100 mL), dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure. After purification by column chromatography on silica gel (^cHex/EtOAc = 30:1), the title compound was isolated as a light-yellow solid (991 mg, 2.23 mmol, 72% yield). In general,

no further purification was required in this step. However, if necessary, preparative HPLC purification (C₁₈, eluent A: MilliQ-grade water, eluent B: acetonitrile, isocratic (30:70) over 90 min with a flow rate of 12.5 mL·min⁻¹ and detection at 254 nm) can be performed. R_f = 0.21 (SiO₂, °Hex/EtOAc = 10:1). mp 107–109 °C. ¹H NMR, COSY (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.15 (s, 1H, NH), 7.39 (d, ³J = 3.8 Hz, 1H, *H*-3^{Thio}), 7.19 (d, ³J = 8.4 Hz, 1H, *H*-3^{Ph})¹, 7.19 (dd, ⁴J = 2.3, ³J = 0.8 Hz, 1H, *H*-6^{Ph})¹, 6.89 (dd, ³J = 8.4 Hz, ⁴J = 2.3 Hz, 1H, *H*-4^{Ph}), 6.88 (dd, ³J = 3.8 Hz, ⁴J = 1.4 Hz, 1H, *H*-4^{Thio}), 2.66–2.59 (m, 4H, 2 × *H*-2^{Pip} and 2 × *H*-6^{Pip}), 2.47 (d, ⁴J = 1.1 Hz, 3H, CH₃), 1.66–1.56 (m, 4H, 2 × *H*-3^{Pip} and 2 × *H*-5^{Pip}), 1.52–1.42 (m, 2H, 2 × *H*-4^{Pip}) ppm. ¹³C NMR, HSQC, HMBC (100.6 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 148.0 (C-2^{Thio}), 147.1 (C-2^{Ph}), 137.0 (C-5^{Thio}), 132.9 (C-3^{Thio}), 131.8 (C-1^{Ph}), 126.3 (C-4^{Thio}), 123.5 (C-4^{Ph}), 122.4 (C-5^{Ph}), 122.1 (C-3^{Ph}), 121.8 (q, ¹J_{CF} = 274.9 Hz, CF₃), 119.3 (C-6^{Ph}), 52.5 (C-2^{Pip} and C-6^{Pip}), 27.8 (q, ²J_{CF} = 39.9 Hz, C_q^{diazirine}), 25.5 (C-3^{Pip} and C-5^{Pip}), 23.5 (C-4^{Pip}), 15.1 (CH₃) ppm. ¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO-*d*₆): δ = -65.81 (CF₃) ppm. IR (ATR): $\bar{\nu}$ = 3245, 2947, 2811, 1515, 1436, 1337, 1228, 1144, 1021, 921, 906, 822, 806, 721 cm⁻¹. MS (ESI): *m/z* calculated for [C₁₈H₁₉F₃N₄O₂S₂+H]⁺ ([M+H]⁺): 445.1. Found *m/z* = 445.2 (100%, [M+H]⁺), 467.1 (4%, [M+Na]⁺) and 417.2 (6%, [M-N₂]⁺). HPLC analysis: retention time = 4.87 min; peak area: 99.60%; eluent A: MilliQ-grade water; eluent B: CH₃CN; eluent C: 0.1% solution of formic acid in MilliQ-grade water; isocratic (20:70:10) over 8 min with a flow rate of 0.7 mL·min⁻¹ and detection at 254 nm; injection volume: 5 μL; column temperature: 40 °C.

Photochemical Kinetic Studies and Instrumentation

The photoactivation studies were performed according to procedures as reported by Brunner *et al.*^[33] and Seifert *et al.*^[42] using a high-power UV LED (λ_{\max} = 365 nm; *UV LED smart*; *Opsytec Dr. Gröbel GmbH*) with the “standard” optic for a small spot diameter and a focused beam profile. Please refer to the homepage of the UV light source supplier (<https://www.opsytec.com/products/uv-led-light-sources>) for further details. Irradiation experiments were conducted within a ventilated fume hood in quartz cuvettes (*d* = 10 mm) including a tiny magnetic stirring bar placed 2 cm from the light source for a very effective photoactivation. Under these conditions, no further cooling was necessary to maintain ambient temperature since development of heat by the LED light source is negligible. A typical reaction setup is shown in **Fig. S9** (supplementary information). For the analysis of the photolytic decay via ¹⁹F NMR spectroscopy, (trifluoromethyl)diazirines **3a** and **3b** were dissolved in methanol-*d*₄ or cyclohexane-*d*₁₂ (*c* = 5 mM) and after different irradiation intervals, samples were transferred and measured in 5 mm NMR amber glass tubes (type: 507-HP-AT-7 by *Norell*) before irradiation was continued. In HPLC-MS photolysis experiments, aliquots of 50 μL were collected from solutions of the diazirines **3a** and **3b** in selected solvents (HPLC-MS grade; *c* = 2 mM (methanol and cyclohexane) or *c* = 50 μM (aqueous buffer)), diluted (1:10 *v/v*) with acetonitrile/water (1:1 *v/v*),

¹overlapping signals

filtered through PTFE syringe filters ($d = 13$ mm, $0.2 \mu\text{M}$ pore size) and subsequently injected (injection volume: 5–10 μL) in the HPLC-MS system described above.

ASSOCIATED CONTENT (Supporting Information)

HPLC traces of key target compounds **3a** and **3b**, details about the crystal structures, fragmentation pattern of diazirines **3a** and **3b**, 19F NMR as well as LC-MS kinetic data of photolysis of compound **3b** and ^1H and ^{13}C NMR spectra for all synthesized compounds (PDF). The crystallographic information files (deposition numbers CCDC-2046164/2046165) can be obtained free of charge from the Cambridge Structural Database under <https://www.ccdc.cam.ac.uk/structures>.

REFERENCES

- [1] M. Sun, E. Goldin, S. Stahl, J. L. Falardeau, J. C. Kennedy, J. S. Acierno Jr, C. Bove, C. R. Kaneski, J. Nagle, M. C. Bromley, M. Colman, R. Schiffmann, S. A. Slaugenhaupt, *Hum. Mol. Genet.* **2000**, *9*, 2471–2478.
- [2] G. Bach, *Mol. Genet. Metab.* **2001**, *73*, 197–203.
- [3] K. Wakabayashi, A. M. Gustafson, E. Sidransky, E. Goldin, *Mol. Genet. Metab.* **2011**, *104*, 206–213.
- [4] J. A. Smith, C.-C. Chan, E. Goldin, R. Schiffmann, *Ophthalmology* **2002**, *109*, 588–594.
- [5] R. Schiffmann, N. K. Dwyer, I. A. Lubensky, M. Tsokos, V. E. Sutliff, J. S. Latimer, K. P. Frei, R. O. Brady, N. W. Barton, E. J. Blanchette-Mackie, E. Goldin, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1998**, *95*, 1207–1212.
- [6] G. Altarescu, M. Sun, D. F. Moore, J. A. Smith, E. A. Wiggs, B. I. Solomon, N. J. Patronas, K. P. Frei, S. Gupta, C. R. Kaneski, O. W. Quarrell, S. A. Slaugenhaupt, E. Goldin, R. Schiffmann, *Neurology* **2002**, *59*, 306–313.
- [7] E. R. Berman, N. Livni, E. Shapira, S. Merin, I. S. Levij, *The Journal of Pediatrics* **1974**, *84*, 519–526.
- [8] S. Merin, N. Livni, E. R. Berman, S. Yatziv, *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **1975**, *14*, 437–448.
- [9] D. A. Zeevi, A. Frumkin, G. Bach, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **2007**, *1772*, 851–858.
- [10] R. Bargal, N. Avidan, E. Ben-Asher, Z. Olender, M. Zeigler, A. Frumkin, A. Raas-Rothschild, G. Glusman, D. Lancet, G. Bach, *Nat. Genet.* **2000**, *26*, 118–122.
- [11] M. T. Bassi, M. Manzoni, E. Monti, M. T. Pizzo, A. Ballabio, G. Borsani, *The American Journal of Human Genetics* **2000**, *67*, 1110–1120.
- [12] K. Venkatachalam, C. Montell, *Annu. Rev. Biochem.* **2007**, *76*, 387–417.
- [13] M. Li, W. K. Zhang, N. M. Benveniste, X. Zhou, D. Su, H. Li, S. Wang, I. E. Michailidis, L. Tong, X. Li, J. Yang, *Nat Struct Mol Biol* **2017**, *24*, 205–213.
- [14] X. Cheng, D. Shen, M. Samie, H. Xu, *FEBS Lett.* **2010**, *584*, 2013–2021.

- [15] K. K. Viet, A. Wagner, K. Schwickert, N. Hellwig, M. Brennich, N. Bader, T. Schirmeister, N. Morgner, H. Schindelin, U. A. Hellmich, *Structure* **2019**, *27*, 1246–1257.e1245.
- [16] K. Venkatachalam, C.-O. Wong, M. X. Zhu, *Cell Calcium* **2015**, *58*, 48–56.
- [17] C.-C. Chen, M. Keller, M. Hess, R. Schiffmann, N. Urban, A. Wolfgardt, M. Schaefer, F. Bracher, M. Biel, C. Wahl-Schott, C. Grimm, *Nature Commun.* **2014**, *5*, 4681.
- [18] C. Grimm, S. Jörs, S. A. Saldanha, A. G. Obukhov, B. Pan, K. Oshima, M. P. Cuajungco, P. Chase, P. Hodder, S. Heller, *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 135–148.
- [19] D. Shen, X. Wang, X. Li, X. Zhang, Z. Yao, S. Dibble, X.-p. Dong, T. Yu, A. P. Lieberman, H. D. Showalter, H. Xu, *Nature Commun.* **2012**, *3*, 731.
- [20] P. Schmiede, M. Fine, G. Blobel, X. Li, *Nature* **2017**, *550*, 366–370.
- [21] X. Zhou, M. Li, D. Su, Q. Jia, H. Li, X. Li, J. Yang, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2017**, *24*, 1146–1154.
- [22] C. Grimm, *Messenger* **2016**, *5*, 30–36.
- [23] S. Leis, S. Schneider, M. Zacharias, *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 1550–1562.
- [24] J. L. Ludington, in *Fragment-Based Methods in Drug Discovery* (Ed.: A. E. Klon), Springer New York, New York, NY, **2015**, pp. 145–154.
- [25] D. Robinette, N. Neamati, K. B. Tomer, C. H. Borchers, *Expert Review of Proteomics* **2006**, *3*, 399–408.
- [26] E. Smith, I. Collins, *Future medicinal chemistry* **2015**, *7*, 159–183.
- [27] M. Hashimoto, Y. Hatanaka, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, *2008*, 2513–2523.
- [28] Y. Hatanaka, *Chem. Pharm. Bull.* **2015**, *63*, 1–12.
- [29] Y. Sadakane, Y. Hatanaka, *Anal. Sci.* **2006**, *22*, 209–218.
- [30] G. Dormán, G. D. Prestwich, *Trends Biotechnol.* **2000**, *18*, 64–77.
- [31] J. Brunner, *Annu. Rev. Biochem.* **1993**, *62*, 483–514.
- [32] L. Dubinsky, B. P. Krom, M. M. Meijler, *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 554–570.
- [33] J. Brunner, H. Senn, F. M. Richards, *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 3313–3318.
- [34] J. R. Hill, A. A. B. Robertson, *J. Med. Chem.* **2018**.
- [35] Y. Yin, M. D. Cameron, L. Lin, S. Khan, T. Schröter, W. Grant, J. Pocas, Y. T. Chen, S. Schürer, A. Pachori, P. LoGrasso, Y. Feng, *ACS Med. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 175–179.
- [36] G. Bartoli, M. Bosco, M. Locatelli, E. Marcantoni, M. Massaccesi, P. Melchiorre, L. Sambri, *Synlett* **2004**, *2004*, 1794–1798.
- [37] T. A. Kelly, D. W. McNeil, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 9003–9006.
- [38] M. P. Moyer, J. F. Shiurba, H. Rapoport, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 5106–5110.
- [39] W. S. DiMenna, *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 2129–2132.
- [40] S. Nahm, S. M. Weinreb, *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 3815–3818.
- [41] C. J. Trabbic, J. H. Overmeyer, E. M. Alexander, E. J. Crissman, H. M. Kvale, M. A. Smith, P. W. Erhardt, W. A. Maltese, *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 2489–2512.

- [42] O. V. Dolomanov, L. J. Bourhis, R. J. Gildea, J. A. K. Howard, H. Puschmann, *J. Appl. Crystallogr.* **2009**, *42*, 339–341.
- [43] G. Sheldrick, *Acta Crystallographica Section A* **2015**, *71*, 3–8.
- [44] G. Sheldrick, *Acta Crystallographica Section C* **2015**, *71*, 3–8.
- [45] S. Grabowsky, P. Luger, J. Buschmann, T. Schneider, T. Schirmeister, A. N. Sobolev, D. Jayatilaka, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 6776–6779.
- [46] T. H. Schneider, M. Rieger, K. Ansorg, A. N. Sobolev, T. Schirmeister, B. Engels, S. Grabowsky, *New J. Chem.* **2015**, *39*, 5841–5853.
- [47] S. Grabowsky, T. Pfeuffer, L. Chęcińska, M. Weber, W. Morgenroth, P. Luger, T. Schirmeister, *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, *2007*, 2759–2768.
- [48] S. Grabowsky, T. Pfeuffer, W. Morgenroth, C. Paulmann, T. Schirmeister, P. Luger, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 2295–2307.
- [49] M. Mladenovic, M. Arnone, R. F. Fink, B. Engels, *The Journal of Physical Chemistry B* **2009**, *113*, 5072–5082.
- [50] F. Kleemiss, E. K. Wieduwilt, E. Hupf, M. W. Shi, S. G. Stewart, D. Jayatilaka, M. J. Turner, K. Sugimoto, E. Nishibori, T. Schirmeister, T. C. Schmidt, B. Engels, S. Grabowsky, *Chem. Eur. J.* **2020**, *in press*.
- [51] M. A. Spackman, D. Jayatilaka, *CrystEngComm* **2009**, *11*, 19–32.
- [52] L. Brammer, *Faraday Discuss.* **2017**, *203*, 485–507.
- [53] J. J. M. M. J. Turner, S. K. Wolff, D. J. Grimwood, P. R. Spackman, D. Jayatilaka, M. A. Spackman, CrystalExplorer17, University of Western Australia, **2017**.
- [54] T. Seifert, M. Malo, J. Lengqvist, C. Sihlbom, E. M. Jarho, K. Luthman, *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 10794–10799.
- [55] A. Babu Kumar, J. M. Anderson, R. Manetsch, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 6284–6292.
- [56] A. B. Kumar, J. D. Tipton, R. Manetsch, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 2729–2732.
- [57] J. Wang, J. Kubicki, T. L. Gustafson, M. S. Platz, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2304–2313.
- [58] J. Wang, J. Kubicki, H. Peng, M. S. Platz, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6604–6609.
- [59] X. Creary, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 1611–1618.
- [60] P. H. Mueller, N. G. Rondan, K. N. Houk, J. F. Harrison, D. Hooper, B. H. Willen, J. F. Liebman, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 5049–5052.
- [61] R. A. Moss, L. A. Perez, N. J. Turro, I. R. Gould, N. P. Hacker, *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 685–688.
- [62] D. Griller, M. T. H. Liu, J. C. Scaiano, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 5549–5551.
- [63] J. Das, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4405–4417.
- [64] M. Platz, A. S. Admasu, S. Kwiatkowski, P. J. Crocker, N. Imai, D. S. Watt, *Bioconjugate Chem.* **1991**, *2*, 337–341.

SUPPORTING INFORMATION

HLPC Traces of Key Target Compounds 3a and 3b

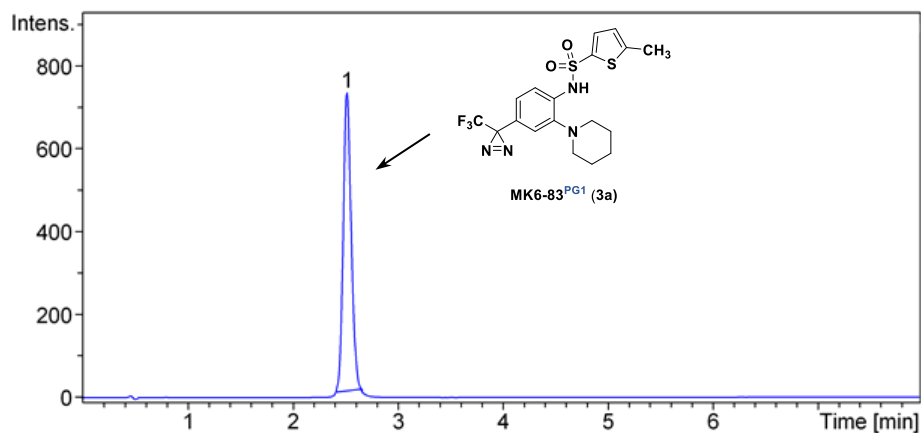


Fig. S1: HPLC trace of **MK6-83^{PG1} (3a)**. Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈ (150 × 2.10 mm, 4 μm) column at 40 °C oven temperature and a detection wavelength of 254 nm. eluent A: MilliQ-grade water; eluent B: CH₃CN; eluent C: 0.1% solution of formic acid in MilliQ-grade water; isocratic (10: 80:10) over 8 min with a flow rate of 0.7 mL·min⁻¹; injection volume: 5 μL; retention time: 2.51 min; peak area: 99.80%.

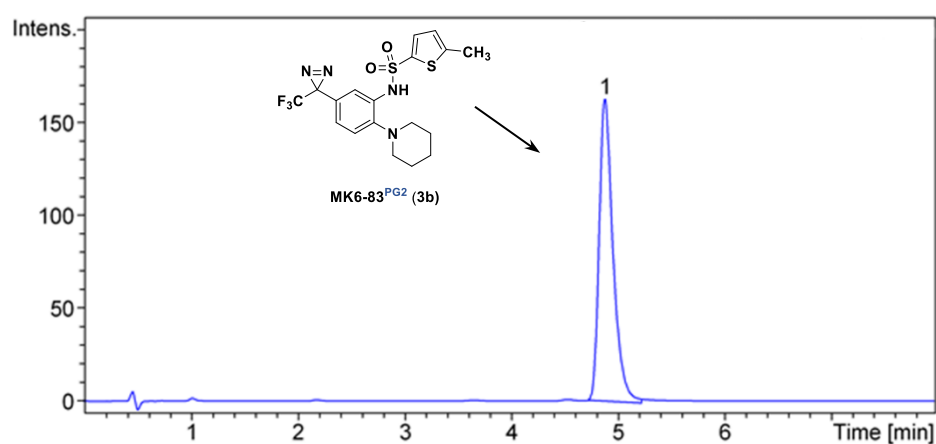


Fig. S2: HPLC trace of **MK6-83^{PG2} (3b)**. Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈ (150 × 2.10 mm, 4 μm) column at 40 °C oven temperature and a detection wavelength of 254 nm. eluent A: MilliQ-grade water; eluent B: CH₃CN; eluent C: 0.1% solution of formic acid in MilliQ-grade water; isocratic (20:70:10) over 8 min with a flow rate of 0.7 mL·min⁻¹; injection volume: 5 μL; retention time: 4.87 min; peak area: 99.60%.

Crystal structures

X-ray diffraction of yellow single crystals of both **MK6-83^{PG1}** (**3a**) and **MK6-83^{PG2}** (**3b**) (**Fig. S3**) was measured at 100K on a Rigaku SuperNova diffractometer with a CCD Eos detector using monochromated Mo K α ($\lambda = 0.71073$ Å) radiation. The CrysAlisPro software was used to collect and reduce data including absorption correction with SCALE3 ABSPACK. Structures were solved by intrinsic phasing using SHELXT and refined by least-squares methods in SHELXL. All atoms were refined anisotropically and H-atoms were assigned from the molecular geometry with isotropic displacement parameters being 1.2 U_{eq} of the parent atom (1.5 U_{eq} for the methyl group). -CF₃ and -NN groups in **MK6-83^{PG2}** are disordered over two positions with approx. 93 and 7% of occupancies.

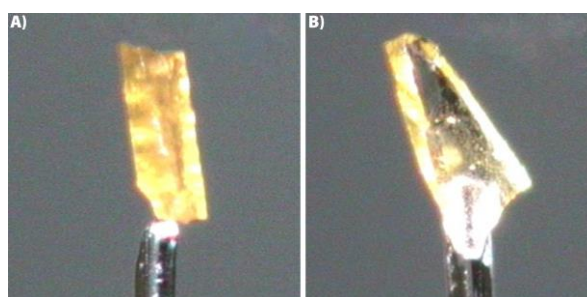


Fig. S3: Single crystals of **MK6-83^{PG1}** (**3a**) and **MK6-83^{PG2}** (**3b**) mounted on a glass fiber.

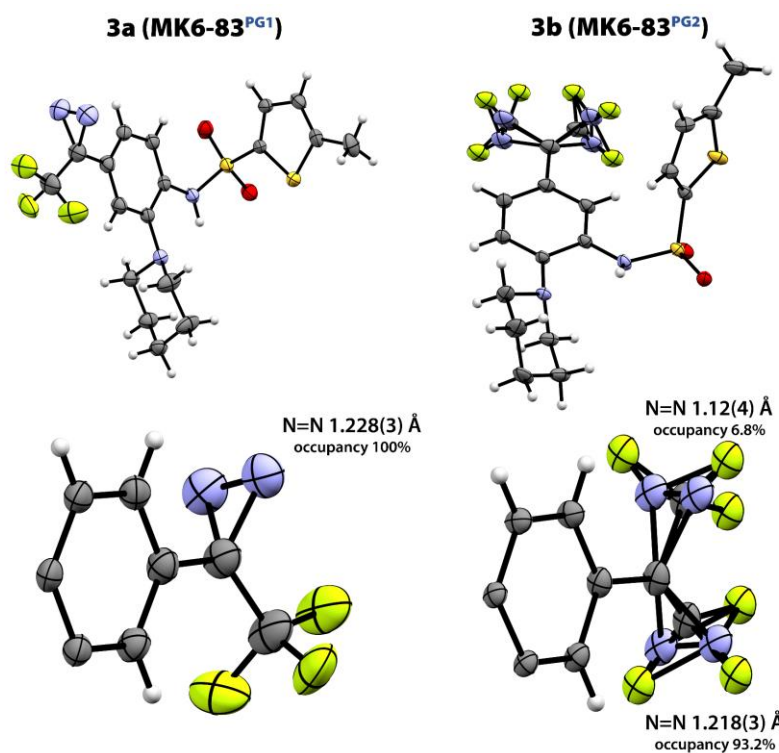


Fig. S4: Crystal structures of **3a (MK6-83^{PG1})** and **3b (MK6-83^{PG2})**. -CF₃ and -N₂ groups in **MK6-83^{PG2}** are disordered over two positions.

Table S1: Structural and experimental data of the studied compounds **3a** and **3b**.

Parameter	3a (MK6-83 ^{PG1})	3b (MK6-83 ^{PG2})
Empirical formula	C ₁₈ H ₁₉ F ₃ N ₄ O ₂ S	C ₁₈ H ₁₉ F ₃ N ₄ O ₂ S
Formula weight	444.49	444.49
Temperature/K	100.01(1)	100.01(1)
Crystal system	monoclinic	monoclinic
Space group	P2 ₁ /c	P2 ₁ /c
a/Å	14.8659(2)	15.34810(10)
b/Å	7.68040(10)	8.43370(10)
c/Å	17.72280(10)	16.1087(2)
α/°	90	90
β/°	101.6910(10)	111.7130(10)
γ/°	90	90
Volume/Å ³	1981.54(4)	1937.19(4)
Z	4	4
ρ _{calc} /g·cm ⁻³	1.490	1.524
μ/mm ⁻¹	0.319	0.326
F(000)	920	920
Crystal size/mm ³	0.362 × 0.165 × 0.08	0.486 × 0.228 × 0.055
Radiation	Mo Kα (λ = 0.71073)	Mo Kα (λ = 0.71073)
2θ range for data collection/°	4.694 to 63.914	3.132 to 74.476
Index ranges	-21 ≤ h ≤ 21, -11 ≤ k ≤ 11, -26 ≤ l ≤ 26	-25 ≤ h ≤ 26, -14 ≤ k ≤ 14, -27 ≤ l ≤ 27
Reflections collected	94794	146360
Independent reflections	6617 [R _{int} = 0.0362, R _{sigma} = 0.0151]	9856 [R _{int} = 0.0543, R _{sigma} = 0.0190]
Data/restraints/parameters	6617/0/263	9856/0/270
Goodness-of-fit on F ²	1.073	1.032
Final R indexes [I ≥ 2σ (I)]	R ₁ = 0.0457, wR ₂ = 0.1310	R ₁ = 0.0527, wR ₂ = 0.1461
Final R indexes [all data]	R ₁ = 0.0534, wR ₂ = 0.1372	R ₁ = 0.0617, wR ₂ = 0.1544
Largest diff. peak/hole /e Å ⁻³	0.57/-0.47	1.12/-1.00

Table S2: Atomic occupancy for disordered atoms in **3b**.

Atom	Occupancy	Atom	Occupancy
F1A	0.9126(13)	N1A	0.932(3)
F1B	0.0874(13)	N1B	0.068(3)
F2A	0.9126(13)	N2A	0.932(3)
F2B	0.0874(13)	N2B	0.068(3)
F3A	0.9126(13)	C8A	0.918(4)
F3B	0.0874(13)	C8B	0.082(4)

Fragmentation Pattern of Diazirines **3a** and **3b**

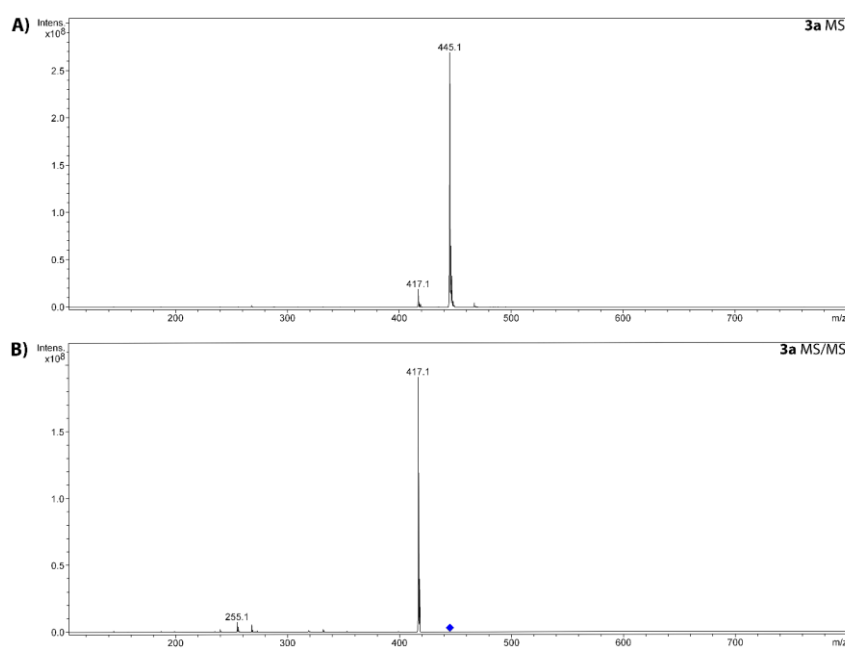


Fig. S5: Electrospray Ionization (ESI) MS (**A**) and MS/MS (**B**) spectra of (trifluoromethyl)diazirine **3a**. Collision-induced dissociation (CID) cleanly leads to a product ion resulting from the loss of molecular nitrogen ($\Delta m/z = 28$) and only a small amount of fragment ions exhibiting additional cleavage of the 5-methylthiophene-2-sulfonyl moiety (4%, $m/z = 255.1$) or the complete sulfonamide moiety (3%, $m/z = 268.1$) was detected. The blue diamond at $m/z = 445.1$ in the MS/MS spectrum (**B**) indicates the precursor ion.

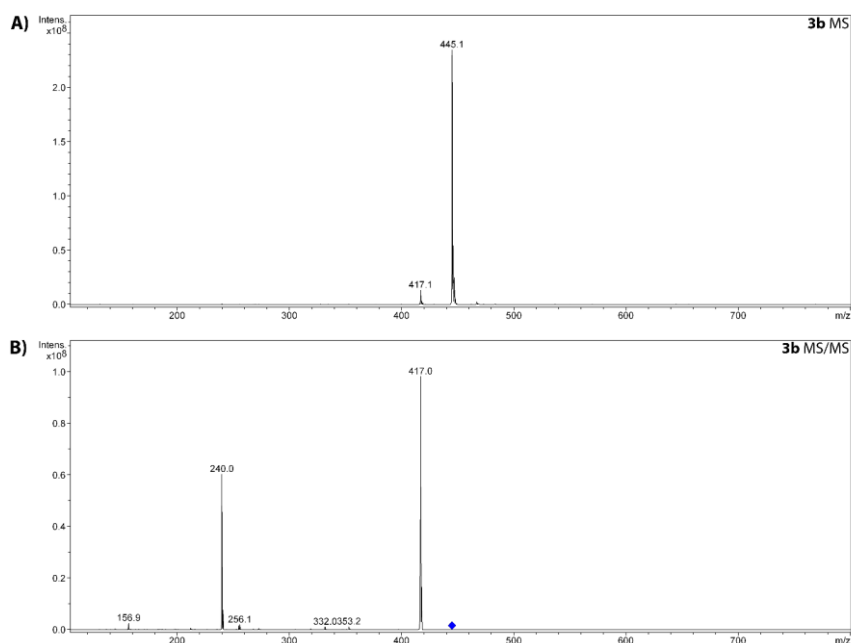
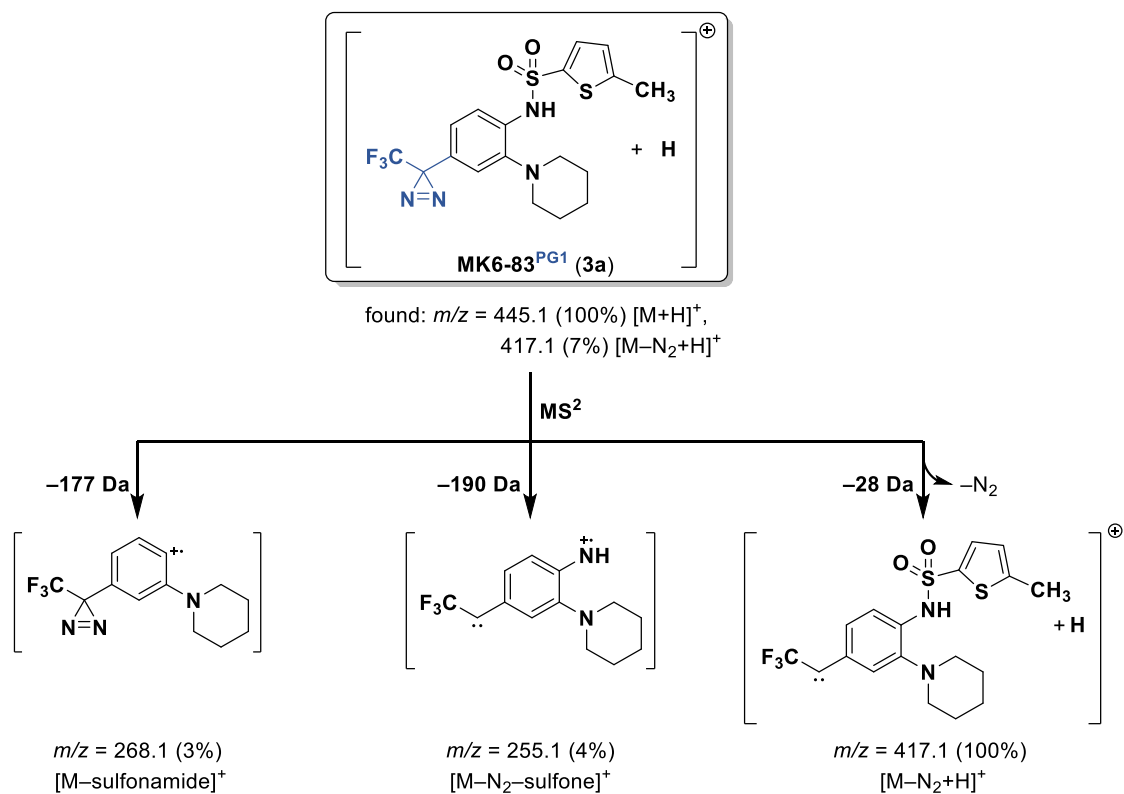
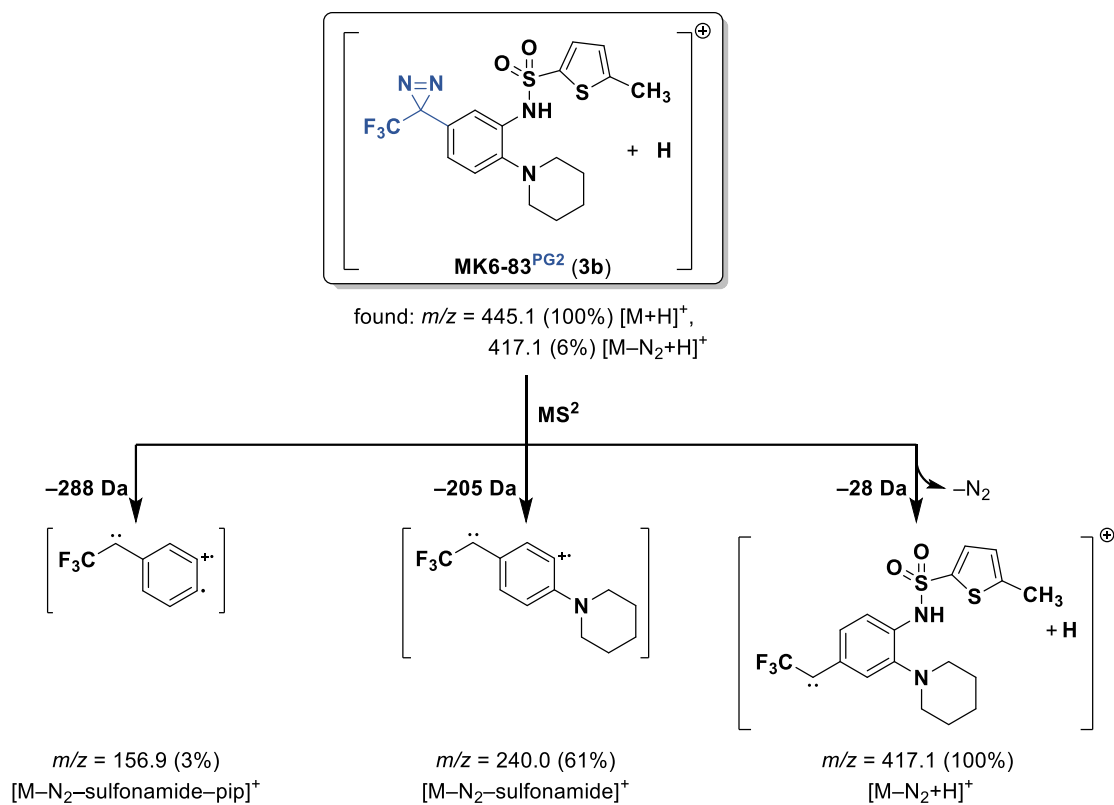


Fig. S6: Electrospray Ionization (ESI) MS (**A**) and MS/MS (**B**) spectra of (trifluoromethyl)diazirine **3b**. Collision-induced dissociation (CID) cleanly leads to product ions resulting from the loss of molecular nitrogen ($\Delta m/z = 28$) and additional cleavage of the sulfonamide residue ($m/z = 240.0$). The blue diamond at $m/z = 445.1$ in the MS/MS spectrum (**B**) indicates the precursor ion.



Scheme S1: Proposed ESI-MS/MS fragmentation pattern of (trifluoromethyl)diazirine **3a**.



Scheme S2: Proposed ESI-MS/MS fragmentation pattern of (trifluoromethyl)diazirine **3b**.

Kinetic Studies (Additional Figures)

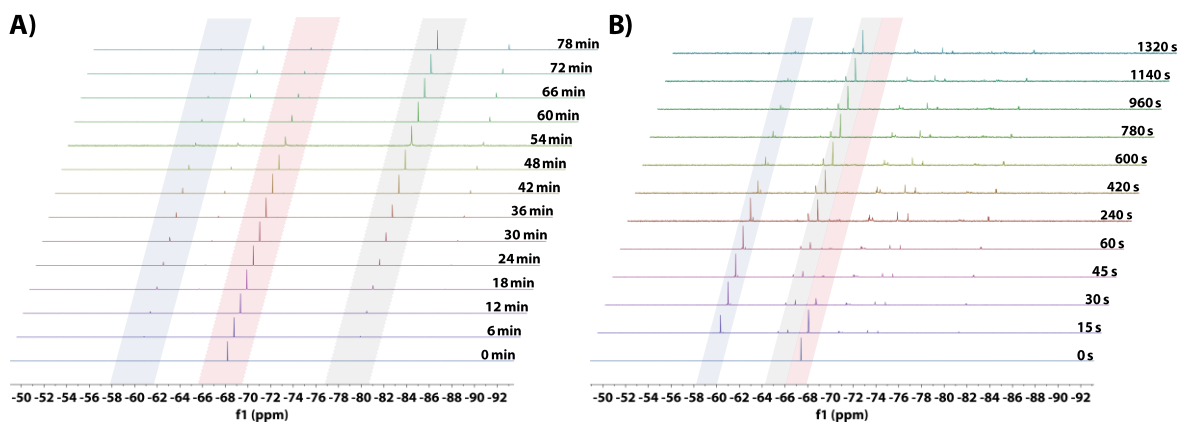


Fig. S7: ^{19}F NMR spectra of a 5 mm solution of **3b** in methanol- d_4 (A) and cyclohexane- d_{12} (B) upon irradiation with UV light ($\lambda = 365 \text{ nm}$) recorded at different irradiation intervals. Spectra are shifted for better visualization and signals of the diazirine, linear diazo isomer and the corresponding insertion product are highlighted in red, blue and gray, respectively (see **Scheme 2**).

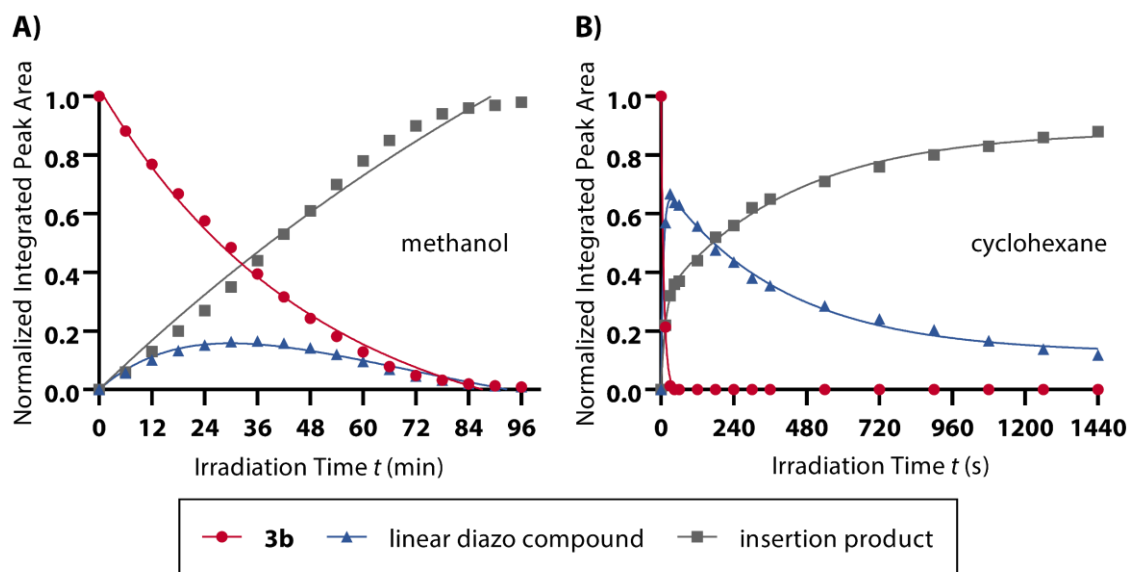


Fig. S8: Photoinduced decay of diazirine **3b** ($c = 2$ mm; $\lambda = 365$ nm) in methanol (**A**) and cyclohexane (**B**) investigated via HPLC (C₁₈). Aliquots were collected and analyzed at different time intervals of UV activation. The resulting peak areas (UV detection at $\lambda = 254$ nm) of the diazirine (red, circles), linear diazo compound (blue, triangles) and the insertion product (gray, squares) in the chromatograms were integrated and plotted against the irradiation time after normalization. Diazirine turnover as well as the product formation can be fitted by first-order exponential function, while the evolution and subsequent decay of the linear diazo isomer can be expressed by a biexponential trend line.

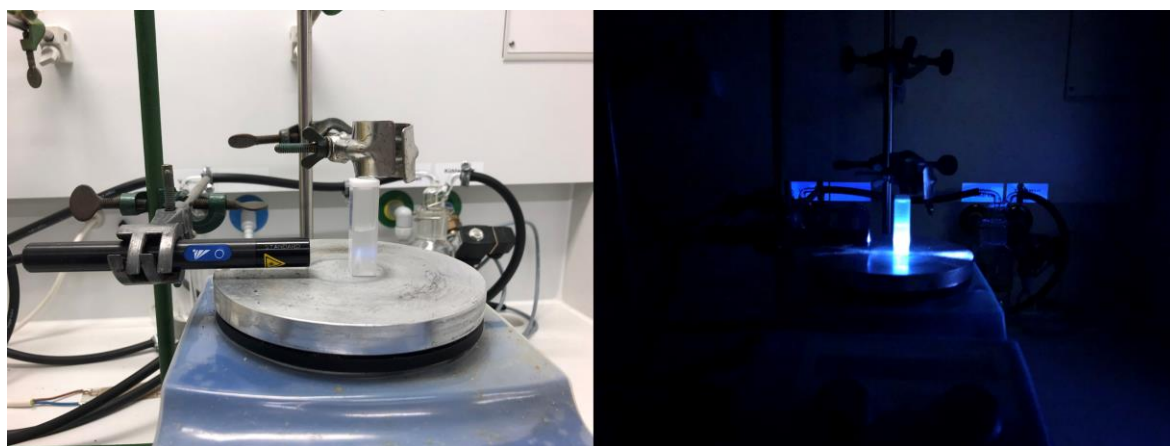


Fig. S9: Experimental set up for irradiations with a high-power UV LED (*Opsytec Dr. Gröbel GmbH*).

3.3 Ansätze zur Identifikation potenzieller Bindestellen in der humanen TRPML1-ELD

Wie in den **Kap. 1.1** und **Kap. 4** detailliert beschrieben, stellt die extracytosolische/lumenale Domäne (ELD) eine charakteristische und signifikante strukturelle Einheit der TRPML-Ionenkanäle dar, die mit ca. 100 kDa etwa einen Drittel des Ionenkanals ausmacht.^[107,115] Viele Hinweise und strukturelle Studien deuten darauf hin, dass dieser Bestandteil eine wichtige Rolle bei der Regulation der Ionenleitfähigkeit des Kanals spielt und möglicherweise einen substanziellen Beitrag bei der Interaktion mit anderen Proteinen oder Molekülen sowie bei der Kommunikation mit dem Rest des Kanals über die Transmembrandomänen leistet.^[107,115] Aus diesen Sachverhalten geht deutlich hervor, dass eine Modulation der Kanalaktivität durch den TRPML1-Aktivator **MK6-83** oder andere synthetische Moleküle über die extracytosolische/lumenale Domäne vorstellbar ist und potenzielle Bindestellen innerhalb dieser Architektur lokalisiert sind. Zwar sind in den letzten Jahren Kryo-EM-Strukturen von TRPML1 und TRPML3 im Komplex mit dem (nicht-selektiven) TRPML-Aktivator **ML-SA1 (41)** veröffentlicht worden,^[111-112] die eine Bindetasche zwischen den Transmembrandomänen aufzeigten, allerdings handelt es sich hierbei um einen von **MK6-83** strukturell diversen Agonisten (siehe **Kap. 3.2**). Zudem ist bisher nicht eindeutig geklärt, ob **MK6-83** die gleiche Bindestelle innerhalb des Kanals einnimmt und welche Schlüsselinteraktionen zugrunde liegen, um die TRPML1-Selektivität dieses Aktivators fundiert zu erklären. Die Kenntnis der Bindetasche von **MK6-83** ist von besonderem Interesse, da mithilfe der gewonnenen Informationen bezüglich der Ligand-Rezeptor-Interaktionen die Basis für die Entwicklung von (potenteren) Wirkstoffen zur Behandlung von *Mucopolysaccharidose Typ IV* gelegt werden kann, bei der mutierte TRPML1-Kanäle adressiert werden.

Motiviert von diesen Überlegungen, sollten mithilfe computergestützter Berechnungen und über Photoaffinitätsmarkierung unter Einsatz der synthetisierten photoaktivierbaren TRPML1-Aktivatoren **42a** und **42b** (siehe **Kap. 3.2**) potenzielle Bindestellen innerhalb der TRPML1-ELD identifiziert und charakterisiert werden. Dieses Forschungsvorhaben wurde in Kooperation mit [REDACTED] (AG [REDACTED] Johannes Gutenberg-Universität Mainz) bearbeitet, die durch die Realisierung der Expression und Reinigung der humanen TRPML1- und TRPML2-ELD sowie bei der Durchführung der Photoaffinitätsmarkierung zu diesem Projekt maßgeblich beitrug. Der anschließende tryptische Verdau (Proteolyse) sowie die massenspektrometrische Untersuchung der Photoaffinitätsproben wurden von [REDACTED] sowie [REDACTED] ([REDACTED], Institut für Immunologie, Universitätsmedizin Mainz) verwirklicht.

3.3.1 Computergestützte Identifikation potenzieller Bindestellen

Als 2017 mit der extracytosolischen/luminalen Domäne die erste (Teil-)Struktur des TRPML1-Ionenkanals von Li *et al.* (PDB: 5TJA) veröffentlicht wurde, wurden zunächst prospektive computergestützte Berechnungen zur Identifikation potenzieller Bindestellen innerhalb dieser Domäne durchgeführt. Basierend auf den atomaren 3D-Koordinaten des Rezeptors wurden mithilfe von *MOE Site Finder* (MOE 2015.1001) mögliche Bindestellen kalkuliert, wobei in einem geometrischen Ansatz Regionen mit dichter atomarer Packung und solche, die dem umgebenden Lösemittel nicht zu sehr ausgesetzt sind (also eher eine Kavität bilden) in Betracht gezogen werden.^[201-202] Interessanterweise konnte bei den erhaltenen Resultaten eine definierte Tasche an der Schnittstelle zwischen jeweils zwei Untereinheiten des Tetramers nachgewiesen werden, die den Berechnungen zufolge den höchsten PLB-score¹ (*Propensity for Ligand Binding*)^[202] (hier: PLB = 1.58) aufwies (**Abb. 3.3**).

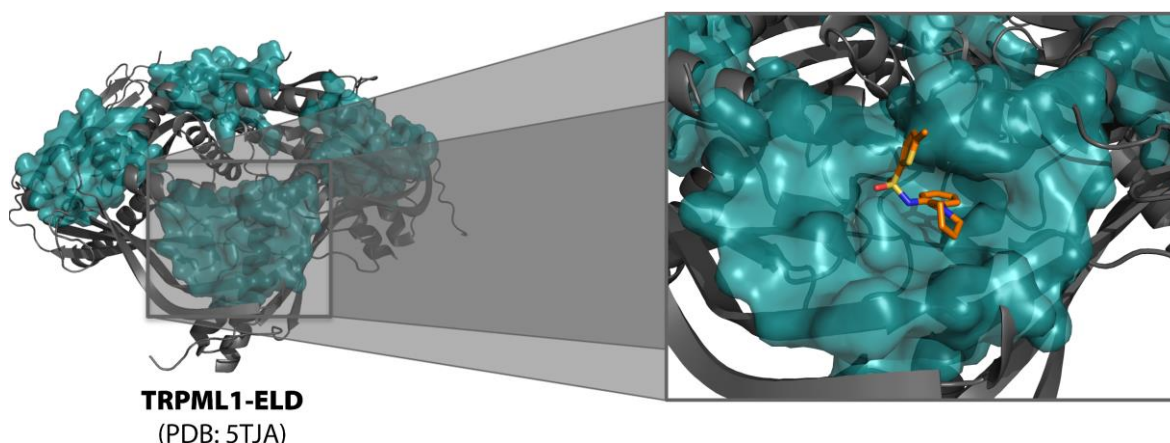


Abb. 3.3: Struktur der humanen TRPML1-ELD (PDB: 5TJA) mit der berechneten Bindetasche (petrol, Oberflächenrepräsentation) und der vorhergesagten Positionierung (Bindepose) des TRPML1-Aktivators **MK6-83** (orange, rechts).

Diese potenzielle Bindetasche wurde anschließend zur Plausibilitätsüberprüfung als Grundlage für eine Dockingstudie (*FlexX LeadIt 2.1.6*) mit dem TRPML1 Aktivator **MK6-83** nach vorhergehender Energieminimierung (MMFF94x-Kraftfeld) verwendet. Im Rahmen dieser computergestützten Analyse konnte tatsächlich ein evidenter Bindemodus von **MK6-83** nachgewiesen werden, der vor allem durch polare Wechselwirkungen der Sulfonamidgruppe des Aktivators mit den Argininresten **Arg122** und **Arg 146** gekennzeichnet ist. (**Abb. 3.4**)

¹Der *PLB score* beschreibt die Neigung zur Ligandenbindung einer Tasche innerhalb eines Proteins und berücksichtigt dabei insbesondere die spezifische Aminosäurezusammensetzung der potenziellen Bindestelle. Für Details sei auf die entsprechende Veröffentlichung von Soga *et al.* verwiesen.^[202]

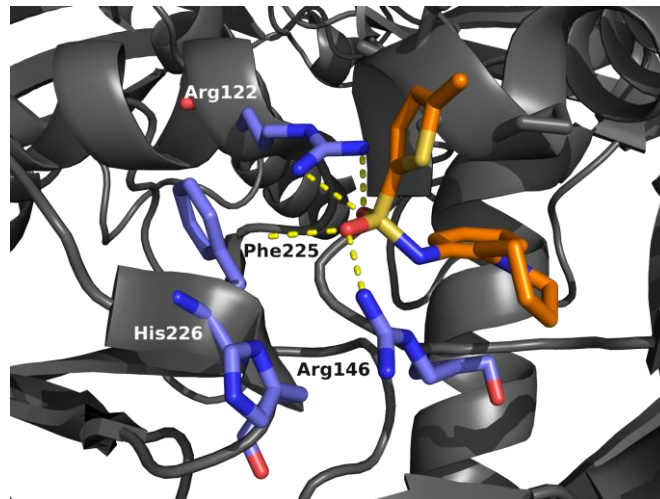


Abb. 3.4: Möglicher Bindemodus des TRPML1-Aktivators **MK6-83** in der prognostizierten Bindetasche.

In späteren Analysen zu den elektrostatischen Oberflächenpotentialen und Ladungsverteilungsmuster der TRPML ELDs (siehe **Kap. 4**) konnten an dieser Position außerdem charakteristische positiv geladene Bereiche („Hotspots“) bei TRPML1 ausgemacht werden.^[115] Diese Resultate liefern einen zusätzlichen Hinweis, dass diese Region für eine (allosterische) Modulation durch **MK6-83** oder andere Moleküle prädestiniert ist.

3.3.2 Photoaffinitätsmarkierung der humanen TRPML1-ELD

Nach Fertigstellung der Synthese und der detaillierten kinetischen Charakterisierung der (Trifluormethyl)diazirine **MK6-83^{PG1}** und **MK6-83^{PG2}** (vgl. **Kap. 3.2**) wurden erste Photoaffinitätsmarkierungsexperimente zur Identifikation möglicher Bindestellen des TRPML1-Aktivators **MK6-83** sowie zur Verifizierung bzw. Falsifizierung der über computergestützte Methoden (**Kap. 3.3.1**) ermittelten Bindetasche durchgeführt (**Tab. 3.2**). In diesen Ansätzen wurde primär die humane TRPML1-ELD eingesetzt, da zum Zeitpunkt der Bearbeitung dieses Forschungsprojektes im Rahmen der Promotion der vollständige Ionenkanal noch nicht exprimiert werden konnte und somit nicht zur Verfügung stand. Auf Basis der photochemischen Charakterisierung beider Diazirine in wässrigem Puffer (vgl. **Kap. 3.2**) wurden kurze Belichtungszeiten von 15 min für eine effiziente und vollständige Photoaktivierung gewählt. Dabei wurden die photosensitiven TRPML1-Aktivatoren im 2.5-fachen molaren Überschuss relativ zum Protein ($c = 2 \mu\text{M}$, hTRPML1) eingesetzt, um eine ausreichende Sättigung sicherzustellen.

Tab. 3.2: Ansätze zur Photoaffinitätsmarkierung der humanen TRPML1-ELD in wässrigem Puffer.*

#	Diazirin		Belichtung [†] $\lambda = 365 \text{ nm}$	Bemerkung
	4-, MK6-83 ^{PG1}	5-, MK6-83 ^{PG2}		
1	+	–	+	–
2	–	+	+	–
3	–	–	+	Negativkontrolle
4 [†]	–	–	–	Referenz/Dunkelkontr.

*50 mM TRIS, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 5 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 4 mM EDTA, 250 mM Saccharose.

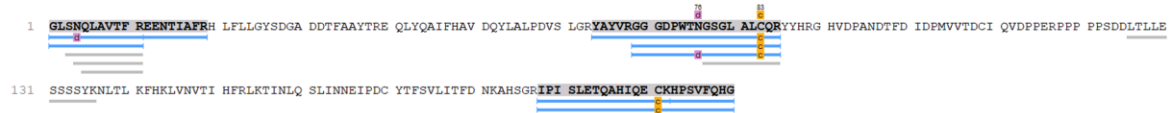
[†]High-Power UV-LED smart (Opsytec Dr. Gröbel GmbH), „Standard“-Optik, Abstand $d = 2 \text{ cm}$, 100% Intensität.

Die Proben wurden bei 0–5 °C mit der hTRPML1-ELD zur Gewährleistung einer hinreichenden Equilibrierung unter Lichtausschluss 10 min vorinkubiert und schließlich in einer Quartz-Küvette ($d = 10 \text{ mm}$) in einem Abstand von 2 cm von der Lichtquelle (High-Power UV-LED) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 365 \text{ nm}$ 15 min unter Rühren bestrahlt. Nach Beendigung der Belichtungsperiode wurden die Proben in flüssigem Stickstoff bei –196 °C schockgefrostet und bei –80 °C bis zur Durchführung des tryptischen Verdau und der massenspektrometrischen Analyse der Proteinfragmente gelagert. Es wurden jeweils beide konstitutionsisomeren Diazirine mit der humanen TRPML1-ELD inkubiert und einer Belichtung unterworfen (Einträge 1 und 2), während die Negativkontrolle keine *Photoaffinity*-Reagenzien enthielt und lediglich die hTRPML1-ELD der UV-Strahlung ausgesetzt wurde, um einen möglichen Einfluss der Strahlungsquelle auf das Protein zu identifizieren (Eintrag 3). Außerdem wurde eine vollständig unbehandelte Probe mit dem nativen Protein als Referenz und zur Lichtausschlusskontrolle vorbereitet (Eintrag 4).

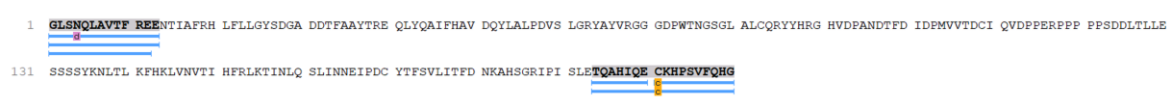
Die proteolytische Verarbeitung (tryptischer Verdau) sowie die massenspektrometrische Untersuchung der (modifizierten) Proteinfragmente erfolgte unmittelbar nach Durchführung der *Photoaffinity-Labeling*-Experimente in der Arbeitsgruppe von [REDACTED] (Institut für Immunologie, Universitätsmedizin Mainz) von [REDACTED] und [REDACTED]. Die Evaluierung der Bedingungen für den Verdau wurde zunächst am unbehandelten nativen Protein vorgenommen (Eintrag 4), wobei als Proteasen Trypsin, Chymotrypsin und die Endoproteinase GluC getestet wurden, um eine möglichst hohe Sequenzabdeckung zu erzielen. In diesen Experimenten zeigte sich, dass vor allem eine proteolytische Prozessierung durch Chymotrypsin mit einer Sequenzabdeckung¹ von 58% als geeignet einzustufen ist, während bei der Behandlung mit den Proteasen Trypsin (30%) und GluC (14%) lediglich eine geringe Übereinstimmung der gefundenen Peptidfragmente mit der AS-Sequenz der hTRPML1-ELD festzustellen ist (**Abb. 3.5**). Anhand der Daten ist ersichtlich, dass eine Kombination der Proteolysen durch Trypsin und Chymotrypsin (über entsprechende Software bei der computergestützten Auswertung) für eine hohe Sequenzabdeckung empfehlenswert ist.

¹Peptidkartierung mittels PEAKS X (Bioinformatics Solutions Inc.).

A) Trypsin



B) GluC



C) Chymotrypsin

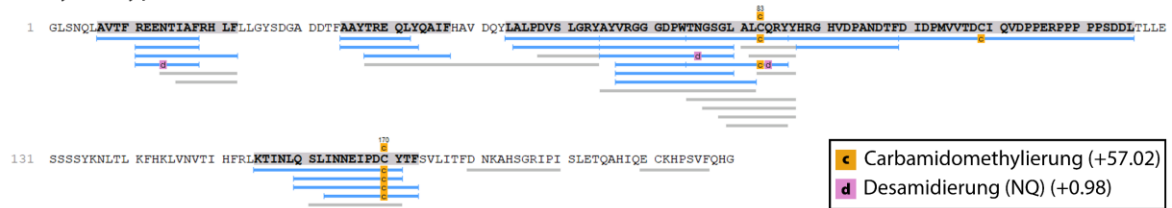


Abb. 3.5: Sequenzabgleich nach Proteolyse der humanen TRPML1-ELD durch unterschiedliche Proteasen. In blau sind die mittels Massenspektrometrie detektierten Peptidfragmente dargestellt.

Bei der anschließenden Untersuchung des belichteten nativen Proteins (Negativkontrolle, Eintrag 3, **Tab. 3.2**) konnte keine nennenswerte Änderung bezüglich der Peptidsequenz festgestellt werden; hierbei konnten alle erhaltenen LC-MS-Signale der hTRPML1-ELD zugeordnet werden (vgl auch **Abb. 12.251** (Anhang)). Diese Resultate legen die Schlussfolgerung nahe, dass unter den durchgeführten Belichtungsbedingungen die Proteinintegrität erhalten bleibt und mit keinem relevanten Einfluss der Strahlungsquelle zu rechnen ist. Bei der massenspektrometrischen Analyse der diazirinhaltigen Ansätze (Einträge 1 und 2, **Tab. 3.2**) konnte keine signifikante Änderung des Signalmusters aufgedeckt werden, d. h. es wurden weder „neue“ Signale beobachtet noch solche, die nach Inkubation mit den photoreaktiven Verbindungen verschwinden. Dabei wurde explizit nach modifizierten Peptidfragmenten mit einer Massendifferenz von 417.09 Da (entsprechend des Molekulargewichts der Diazirine nach Abspaltung von molekularem Stickstoff durch die Photolyse und anschließender Insertion) gesucht. Dennoch wurde der Sequenzabschnitt um die Aminosäuren 54–64 ($^{54}\text{LALPDVSLGRY}^{64}$, entspricht den AS137–147 in der berechneten Bindetasche aus der PDB 5TJA, siehe **Kap. 3.3.1**) detaillierter analysiert. Hier lässt sich ein Signal geringer Intensität bei der Probe mit **KS239/MK6-83^{PG1}** (4'-substituiertes Isomer, Eintrag 1, **Tab. 3.2**) identifizieren, dass auf eine potenzielle Modifikation des o. g. Peptidfragments ($m/z = 810.8852 [\text{M}+2\text{H}]^{2+}$; konsistent mit $[\text{}^{54}\text{LALPDVSLGRY}^{64}+\text{KS239}-\text{N}_2+2\text{H}]^{2+}$) hinweist und nicht in der Kontrolle vorhanden ist. Allerdings können keine gesicherten Aussagen getroffen werden, ob es sich hierbei tatsächlich um ein photoaffinitätsmarkiertes Peptidfragment handelt, da aufgrund der geringen Signalintensität kein Fragmentspektrum aufgenommen und somit ein Untergrundrauschen ausgeschlossen werden konnte. Das Fehlen von manifesten Hinweisen kann auf diverse Faktoren zurückzuführen sein: 1) Es ist denkbar, dass innerhalb der extracytosolischen/luminalen Domäne des humanen TRPML1-Kanals keine Bindestelle des Aktivators **MK6-83** existiert, da diese Architektur nur einen Teil des

Gesamtproteins ausmacht. 2) Das möglicherweise entstandene Photoaddukt ist labil und führt zum Nachweis des unmodifizierten Peptidfragmentes nach Dissoziation des Labels vom markierten Protein im Elektrospray-Ionisationsprozess. In vorangegangenen ESI-MS/MS-Experimenten der reinen Diazirine konnte zwar kein substanzieller kollisions-induzierter Zerfall (CID, *collision-induced decay*) beobachtet werden, dennoch sind reversible Photoinsertionen aufgrund labiler Photoaddukte bereits beschrieben worden.^[203-205] 3) Der modifizierte TRPML1-Agonist könnte durch die zusätzlich eingeführte Gruppe im Vergleich zum ursprünglichen Aktivator (**MK6-83**) eine geringere Affinität zum Zielprotein aufweisen. Auch wenn beim Design der photoreaktiven Modulatoren mit den (Trifluormethyl)diazirinen eine photoreaktive Gruppe mit vergleichsweise geringerem sterischem Anspruch (gegenüber z. B. Benzophenonen) gewählt wurde, kann eine Beeinträchtigung der Aktivität nicht ausgeschlossen werden. Um einer potenziell reduzierten Affinität in den ersten *Photoaffinity-Labeling*-Experimenten entgegenzuwirken, wurden **MK6-83^{PG1}** (**KS239**) und **MK6-83^{PG2}** (**KS249**) in höherer Konzentration ($c = 5 \mu\text{M}$) relativ zur mittleren effektiven Konzentration von **MK6-83** ($\text{EC}_{50} = 0.11 \pm 0.01 \mu\text{M}$)^[104] eingesetzt. Eine entsprechende experimentelle Bestimmung der TRPML1-Aktivität der synthetisierten photoaktivierbaren Derivate stand zum Zeitpunkt der Bearbeitung dieses Projektes im Rahmen der Dissertation noch nicht zur Verfügung und ist noch offen.

Für präzise Schlussfolgerungen, ob innerhalb der extracytosolischen/luminalen Domäne potenzielle Bindestellen des TRPML1-Aktivators **MK6-83** existieren, sind aus den oben erörterten Gründen weitere Versuchsansätze zur Photoaffinitätsmarkierung inklusive der massenspektrometrischen Analyse erforderlich. Da mit der ELD lediglich ein struktureller Abschnitt des TRPML-Kanals vorliegt, sind darüber hinaus Photoaffinitätsmarkierungsexperimente mit dem gesamten Ionenkanal obligatorisch. Mithilfe des Designs, der Synthese sowie der detaillierten kinetischen Analyse der photochemischen Eigenschaften der neuen (Trifluormethyl)diazirin-basierten TRPML1-Aktivatoren **MK6-83^{PG1}** (**KS239**) und **MK6-83^{PG2}** (**KS249**) konnte in diesem Forschungsprojekt jedoch ein signifikanter und entscheidender Meilenstein auf dem Weg zur Identifizierung der Bindetasche des TRPML1-selektiven Aktivators **MK6-83** realisiert werden. Dadurch sind zukünftige Experimente hinsichtlich der Photoaffinitätsmarkierung der TRPML-Ionenkanäle in Kombination mit massenspektrometrischen Untersuchungen möglich, sodass ein fundamentaler Beitrag zur Erforschung des Mechanismus der TRPML-Modulation durch synthetische Moleküle geleistet werden kann.

4 Struktur der ELD des humanen TRPML2-Ionenkanals

Das in diesem Kapitel beschriebene Projekt basiert auf einer Forschungskooperation mit [REDACTED] und [REDACTED] der Arbeitsgruppe von [REDACTED] (Department Chemie, Abt. Biochemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz).^[115]

4.1 Zusammenfassung und eigener Beitrag

Von allen drei Mitgliedern der TRPML-Subfamilie der *Transient Receptor Potential*-Ionenkanäle stellt TRPML2 den bisher strukturell am wenigsten charakterisierte Vertreter dar (siehe auch **Kap. 1.1.1**). Aus diesem Grund sind dessen zelluläre Funktion sowie strukturellen Eigenschaften im Vergleich zu TRPML1 und TRPML3 nur unzureichend verstanden. Auf subzellulärer Ebene ist dieser Ionenkanal in Recycling-Endosomen, Lysosomen und geringer Konzentration in der Plasmamembran vorzufinden, wobei TRPML2-mRNA- und Proteinlevel vor allem in Lymphocyten und anderen Zellen des Immunsystems nachgewiesen werden konnten.^[97,206] Zudem konnte gezeigt werden, dass TRPML2 einen Einfluss auf den viralen Vesikeltransport sowie bei der Chemokinsekretion in Makrophagen ausübt.^[98-99] Im Vergleich zu anderen TRP-Kanälen besitzt die Familie der TRPML-Kanäle eine große extracytosolische/lumenale Domäne (ELD; ca. 100 kDa) zwischen den Transmembransegmenten S1 und S2 als charakteristisches strukturelles Merkmal (vgl. auch **Kap. 1.1.1**), die im Lumen des endolysosomalen Systems bzw. auf der extracytosolischen Seite der Zelle lokalisiert ist.^[9,107] Es wird angenommen, dass die ELD aufgrund der sauren und hoch-elektronegativen zentralen Pore an der Regulation der Kationenleitfähigkeit von TRPML-Ionenkanälen beteiligt ist.^[107]

[REDACTED] und [REDACTED] konnten 2018 die Röntgenkristallstruktur der tetrameren humanen TRPML2-ELD bei pH 6.5 (2.0 Å, PDB: 6HRR) und 4.5 (2.95 Å, PDB: 6HRS) entsprechend der pH-Werte in Endo- bzw. Lysosomen bestimmen.^[115] In *Isothermen Titrationskalorimetrie* (ITC)-Experimenten wurde eine pH-abhängige Ca²⁺-Interaktion mit der sauren zentralen Vorporenschleife (sog. *pre-pore loop*) des TRPML2-Kanals nachgewiesen, was mit dem Modell der pH-abhängigen Kanalregulation im Einklang ist.^[107,115] Mithilfe von *Small Angle X-Ray Scattering* (SAXS), nativer Massenspektrometrie, CD-Spektroskopie und Größenausschluss-Chromatographie wurde darüber hinaus das strukturelle Verhalten der TRPML2-ELD in Lösung sowie in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Ca²⁺-Ionenkonzentration analysiert. So konnte dokumentiert werden, dass Änderungen des pH-Wertes oder der Ca²⁺-Konzentration die Sekundärstruktur der TRPML2-ELD nicht beeinträchtigen, aber einen Einfluss auf Oligomerstabilität in Lösung haben.^[115]

Basierend auf den erhaltenen TRPML2-ELD-Strukturen wurden im Rahmen dieser Dissertation detaillierte strukturelle Analysen durchgeführt und die drei verschiedenen humanen TRPML-ELDs im sauren und nahe-neutralen pH-Wert gegenübergestellt. Wie aus dem paarweisen Strukturalignment der drei humanen TRPML-Kanal-ELDs (PDBs: 5TJB (TRPML1)^[107], 6HRS (TRPML2) und 6AYG (TRPML3)^[112]; pH 4.5–4.8) deutlich hervorgeht, ist die tetramere ELD-Architektur in allen drei Kanälen identisch (Gesamt-RMSD 3.42 Å), jedoch sind signifikante Unterschiede in der zentralen Vorporenschleifenregion feststellbar (**Abb. 4.1**).

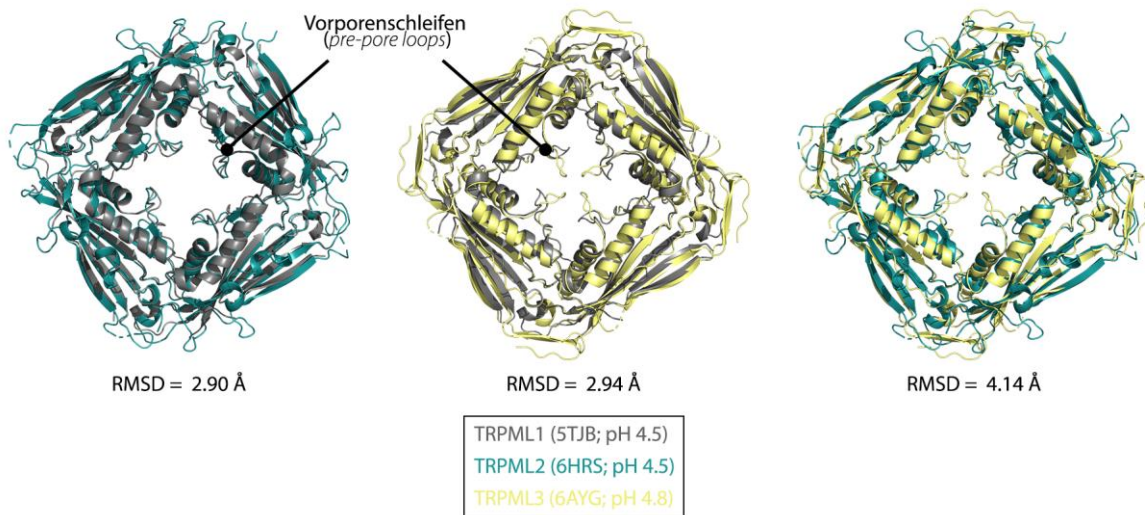


Abb. 4.1: Struktureller Vergleich der drei humanen TRPML-ELDs unter sauren Bedingungen (PDBs: 5TJB (TRPML1), 6HRS (TRPML2), 6AYG (TRPML3)) durch paarweises Strukturalignment. Die Ausrichtung, Überlagerung sowie Kalkulation der RMSD-Werte erfolgten mit MOE 2015.10. In Anlehnung an Viet *et al.*^[115]

Zur präzisen Charakterisierung der zentral lokalisierten Porenregion, welche aus vier Vorporenschleifen (*pre-pore loops*) gebildet wird, wurden die entsprechenden Porendimensionen mithilfe des Programmes HOLE von Smart *et al.* analysiert und graphisch visualisiert (**Abb. 4.2**).^[207] Die Auswahl der zu vergleichenden ELDs erfolgte auf Grundlage verfügbarer Strukturen der humanen TRPML-Kanäle, die unter den ähnlichsten Bedingungen (v. a. pH-Wert, Abwesenheit von Agonisten/Liganden) erhalten wurden. Bei der Gegenüberstellung der Porenarchitektur resultieren erhebliche Differenzen in Hinblick auf die Porendurchmesser sowie die relative Position der Porenverengung (*pore constriction points*) (**Abb. 4.2**). Sowohl TRPML1 (PDB: 5TJB, pH 4.5)^[107] als auch TRPML2 (PDB: 6HRS, pH 4.5) weisen beispielsweise bei saurem pH-Wert an der engsten Stelle zwischen den S110-Resten mit 11.6 Å bzw. 12.5 Å ähnliche Vorporendurchmesser auf. Konträr dazu wird die Konstriktion bei TRPML3 (PDB: 6AYG, pH 4.8)^[112] von D108-Resten gebildet und ist auf einen Durchmesser von weniger als 1 Å limitiert, sodass die ELD somit unter diesen Bedingungen im geschlossenen Zustand vorliegt. Die höhere strukturelle Ähnlichkeit der TRPML1- und TRPML2-ELD-Porenarchitektur im Vergleich zu TRPML3 könnte eine rationale Erklärung für den beobachteten Unterschied bei der Organell-spezifischen Kanalaktivierung liefern

(siehe dazu auch **Kap. 1.1.1**). Bei einer hohen H^+ -Konzentration wird der Ionenfluss bei TRPML3 unterbunden, während für TRPML1 sowie TRPML2 eine Aktivierung im sauren Milieu demonstriert werden konnte.^[73,107,112,116]

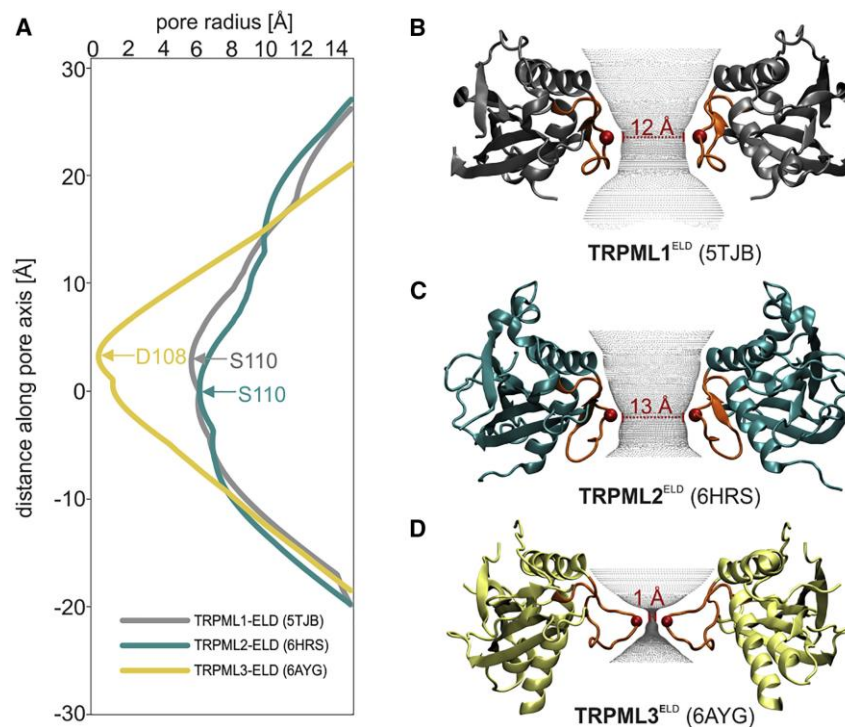


Abb. 4.2: Vergleich der Vorporenschleifen (orange) in den drei humanen TRPML-ELDs. **A)** Vorporenradi der drei humanen TRPML-Kanäle unter sauren Bedingungen basierend auf den TRPML1- (grau, PDB: 5TJB; pH 4.5), TRPML2- (blaugrün, PDB: 6HRS, pH 4.5) und TRPML3-Strukturen (gelb, PDB: 6AYG, pH 4.8). Die Porendimensionen wurden mit HOLE (Smart *et al.*)^[207] berechnet und das relative Zentrum der Porenachse an die TRPML2-Verengung angepasst (Zentrierung am Rest S110). **B–D)** Architektur der Vorporenrichter. Die Aminosäuren an der Verengungsstelle (*constriction points*) sind durch rote Kugeln gekennzeichnet (S110^{ML1} (**B**), S110^{ML2} (**C**) und D108^{ML3} (**D**)). Die vorderen und hinteren Untereinheiten wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit entfernt. Mit freundlicher Genehmigung von Viet *et al.*, *Structure* **2019**, 27, 1246–1257.e1245 (<https://doi.org/10.1016/j.str.2019.04.016>) entnommen.^[115]

Interessanterweise konnten beim Vergleich der elektrostatischen Oberflächenpotentiale zwischen den drei humanen TRPML-ELDs ausgeprägte Variationen bezüglich des Ladungsverteilungsmusters ermittelt werden (**Abb. 4.3**). Die ELD des TRPML1-Ionenkanals weist aus der extracytosolischen/luminalen Perspektive betrachtet (obere Reihe) vier charakteristische positiv geladene Bereiche („Hotspots“) an der Schnittstelle zwischen zwei Protomeren auf, die möglicherweise bei der (allosterischen) TRPML1-Regulation durch endogene bzw. exogene Modulatoren eine Rolle spielen. Bei TRPML2 und TRPML3 sind solche auffälligen positiv geladenen Bereiche nicht vorzufinden. Darüber hinaus existieren markante Unterschiede im Eintrittsbereich zur Pore, der im Fall von TRPML1 und TRPML2 eine „kreuzförmige“ Ausprägung besitzt, während bei der Oberflächenladung in der TRPML3-ELD im Gegensatz dazu eine homogenere Verteilung vorzufinden ist. Hier ist jedoch eine höhere lokale elektronegative

Ladungsdichte im Zentrum der ELD anzutreffen. Die aufgezeigten trichterartigen Vertiefungen in der extracytosolischen/luminalen Domäne von TRPML1 und TRPML2 fungieren möglicherweise als Ionenleitsystem, indem sie das Einfangen und Leiten von Kationen erleichtern. Die evidenten Unterschiede im Ladungsverteilungsmuster zwischen den drei humanen TRPML-ELDs in Abhängigkeit vom Betrachtungswinkel (vgl. **Abb. 4.3**) können Hinweise darüber liefern, inwiefern diese Domänen mit anderen Proteinen, Lipiden und Ionen wechselwirken und mit ihren jeweiligen Transmembrandomänen kommunizieren.^[115]

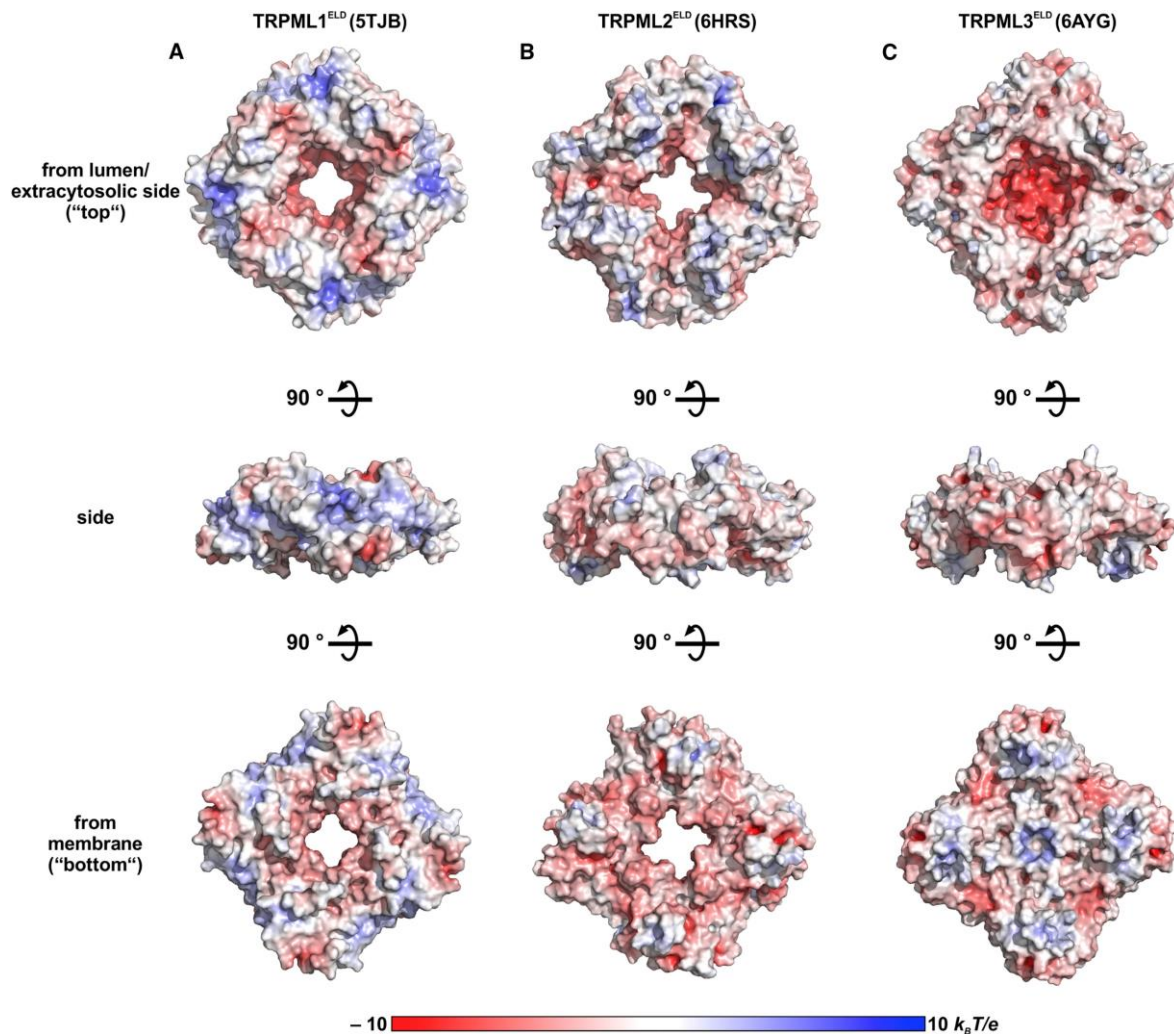


Abb. 4.3: Vergleich der elektrostatischen Potentialoberflächen der drei humanen TRPML-Kanal-ELDs im sauren pH. A–C) In der oberen Reihe sind die ELDs aus der extracytosolischen/luminalen Perspektive (*top view*) dargestellt. Die mittlere Reihe zeigt die entsprechende Seitenansicht (*side*), während die untere Reihe (*bottom*) den Betrachtungswinkel von der Membran wiedergibt. Mit freundlicher Genehmigung von Viet *et al.*, *Structure* **2019**, 27, 1246–1257.e1245 (<https://doi.org/10.1016/j.str.2019.04.016>) entnommen.^[115]

Mithilfe der durchgeführten Berechnungen konnten signifikante Unterschiede in Bezug auf die ELD-Porenarchitektur sowie auf die elektrostatischen Potentialoberflächen eruiert werden und somit ein wertvoller Beitrag zur strukturellen Charakterisierung der TRPML2 extracytosolischen/luminalen Domäne geleistet werden. Die Heterogenität dieser Untereinheit innerhalb der TRPML-Familie

beeinflusst vermutlich die Ionenselektivität oder Empfindlichkeit in Abhängigkeit vom umgebenden pH-Wert und hat möglicherweise relevante Effekte auf die Interaktion mit anderen Proteinen oder Molekülen sowie mit dem Rest des Ionenkanals. Auf Basis der Vergleiche mit bereits verfügbaren ELD-Strukturen konnten potenzielle Erklärungsansätze zu funktionellen Unterschieden zwischen den Kanälen in verschiedenen Zellkompartimenten gefunden werden.^[115]

Durch die im Rahmen dieser Forschungs Kooperation erhaltenen Resultate konnte die Gruppe von hochauflösenden Strukturen der humanen TRPML-ELD komplettiert werden und ein Meilenstein zur strukturellen und biophysikalischen Beschreibung des TRPML2-Ionenkanals erreicht werden. Die oben beschriebenen Ausführungen dienen lediglich als Resümee über die im Rahmen der Promotion durchgeführten Analysen zur extracytosolischen/luminalen Domäne von der TRPML-Subfamilie. Für eine detailliertere Deskription und Diskussion der erhaltenen Daten sowie weitere Abbildungen, die essenzielle strukturelle Merkmale und Unterschiede verdeutlichen, sei auf die Publikation sowie den betreffenden SI-Part verwiesen (**DOI: 10.1016/j.str.2019.04.016**).^[115]

Eigener Beitrag: Datenanalyse und Interpretation (v. a. Vergleich der humanen TRPML1-, 2- und 3-ELDs, Berechnung der Porendimensionen mit HOLE, Kalkulation der elektrostatischen Potentialoberflächen, Erstellung des Homologiemodells für TRPML2, paarweises Strukturalignment der drei humanen TRPML-Kanal-ELDs), Verfassen der dazugehörigen Abschnitte (inkl. Erstellung der Abbildungen) in der Publikation sowie der *Supplementary Information* (SI). Assoziierte Abbildungen (Nummerierung entsprechend der Publikation): **Figure 4, Figure 5, Figure S2, Figure S3, Figure S5 und Figure S6.**

4.2 Publikation

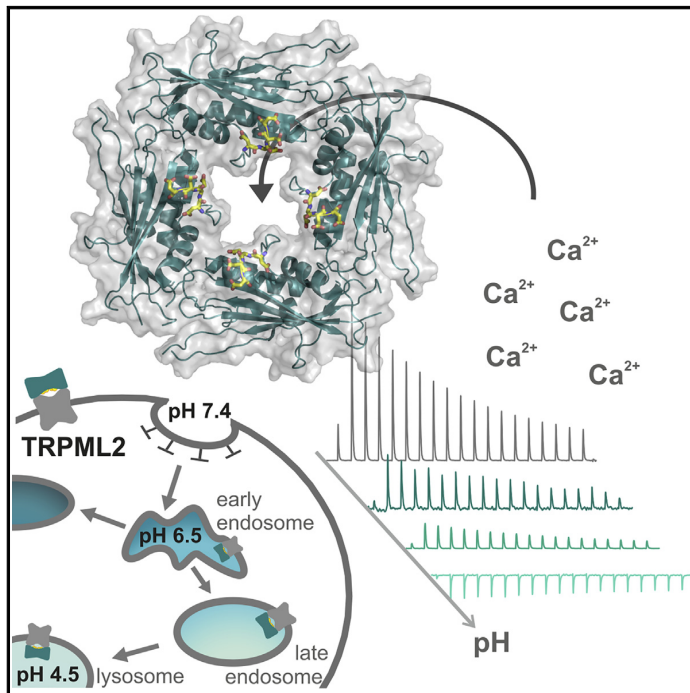
Reprinted with permission from *Structure*, 2019, 27, 1246–1257.e5. © Elsevier.

Article

Structure

Structure of the Human TRPML2 Ion Channel Extracytosolic/Luminal Domain

Graphical Abstract



Authors

Kerstin K. Viet, Annika Wagner, Kevin Schwickert, ..., Nina Morgner, Hermann Schindelin, Ute A. Hellmich

Correspondence

u.hellmich@uni-mainz.de

In Brief

Viet et al. determined structures of the human TRPML2 ion channel extracytosolic/luminal domain (ELD) at different pH values, enabling a comparison with the other two human TRPML channels. The acidic TRPML2 ELD pre-pore loop exhibits a pH-dependent Ca²⁺ interaction, suggesting a mechanism for channel activity regulation in the endolysosomal system.

Highlights

- Human TRPML2 extracytosolic/luminal domain (ELD) structures at pH 4.5 and 6.5
- Comparison of the three human TRPML channel ELDs at acidic and near-neutral pH
- Ca²⁺ interacts with the TRPML2 acidic pre-pore loop in a pH-dependent manner
- Ca²⁺ and pH do not influence ELD structure but play a role in oligomer integrity



Viet et al., 2019, *Structure* 27, 1246–1257
August 6, 2019 © 2019 Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.str.2019.04.016>

CellPress

Structure of the Human TRPML2 Ion Channel Extracytosolic/Luminal Domain

Kerstin K. Viet,^{1,2,6} Annika Wagner,^{1,2,6} Kevin Schwickert,^{1,6} Nils Hellwig,³ Martha Brennich,⁴ Nicole Bader,⁵ Tanja Schirmeister,¹ Nina Morgner,³ Hermann Schindelin,⁵ and Ute A. Hellmich^{1,2,7,*}

¹Institute for Pharmacy and Biochemistry, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 55128 Mainz, Germany

²Center for Biomolecular Magnetic Resonance (BMRZ), Goethe-Universität, 60438 Frankfurt am Main, Germany

³Institute for Physical Chemistry, Goethe-Universität, 60438 Frankfurt am Main, Germany

⁴Synchrotron Crystallography Team, EMBL Grenoble Outstation, 38042 Grenoble, France

⁵Rudolf Virchow Centre for Experimental Biomedicine, Universität Würzburg, 97080 Würzburg, Germany

⁶These authors contributed equally

⁷Lead Contact

*Correspondence: u.hellmich@uni-mainz.de

<https://doi.org/10.1016/j.str.2019.04.016>

SUMMARY

TRPML2 is the least structurally characterized mammalian transient receptor potential mucolipin ion channel. The TRPML family hallmark is a large extracytosolic/luminal domain (ELD) between transmembrane helices S1 and S2. We present crystal structures of the tetrameric human TRPML2 ELD at pH 6.5 (2.0 Å) and 4.5 (2.95 Å), corresponding to the pH values in recycling endosomes and lysosomes. Isothermal titration calorimetry shows Ca²⁺ binding to the highly acidic central pre-pore loop which is abrogated at low pH, in line with a pH-dependent channel regulation model. Small angle X-ray scattering confirms the ELD dimensions in solution. Changes in pH or Ca²⁺ concentration do not affect the protein's secondary structure, but can influence ELD oligomer integrity according to native mass spectrometry. Our data thus complete the set of high-resolution views of human TRPML channel ELDs and reveal some structural responses to the conditions the TRPML2 ELD encounters as the channel traffics through the endolysosomal system.

INTRODUCTION

TRP (transient receptor potential) cation channels play crucial roles in the sensory physiology of organisms (McKemy et al., 2002; Zhang et al., 2003). These tetrameric proteins are activated by diverse stimuli and function as signal integrators. All TRP channel families share structural features such as their six-transmembrane helix core. However, the six mammalian TRP subfamilies (TRP -A, ankyrin; -V, vanilloid; -C, canonical; -M, melastatin; -ML, mucolipin; and -P, polycystin) have highly diverse cytosolic N- and C-terminal regions, often interacting with other proteins or lipids (Hellmich and Gaudet, 2014; Goretzki et al., 2018). In addition, the TRPML and TRPP families contain a ~100 kDa domain of yet unidentified function, which

we will refer to as the extracytosolic/luminal domain (ELD) as it is localized in the lumen of the endolysosomal system or on the extracytoplasmic side of the cell during channel trafficking (Venkatachalam and Montell, 2007). The ELD has also been termed the “I-II linker” (Li et al., 2017), as it is located between transmembrane helices S1 and S2 or the “polycystin-mucolipin domain” (Zhang et al., 2017). In mammals, the TRPML subfamily consists of three members: TRPML1, ML2, and ML3 with pairwise amino acid sequence identity levels of approximately 40% (Zhou et al., 2017) and overlapping structural and functional properties (Venkatachalam et al., 2015). The ELD has been structurally characterized in isolation for TRPML1 (Li et al., 2017) and in the context of the full-length protein in ML1 and ML3 as well as in TRPP channels (Chen et al., 2017; Grieben et al., 2017; Hirschi et al., 2017; Schmiede et al., 2017; Wilkes et al., 2017; Zhang et al., 2017; Zhou et al., 2017; Fine et al., 2018). In contrast, there is currently no structural information available for TRPML2.

TRPML1 is ubiquitously expressed, while ML3 is found, e.g., in the kidney, the lung, and organs of the endocrine system (Grimm et al., 2014) and ML2 predominantly in the thymus, the spleen, and cells of the immune system (Song et al., 2006; Karacsonyi et al., 2007). Most TRP channels are found in the plasma membrane. In contrast, members of the TRPML subfamily regulate vesicular calcium release in the endolysosomal system and are involved in vesicular transport, autophagy, and signal transduction (Cheng et al., 2010; Venkatachalam et al., 2015). TRPML channels are strongly inward rectifying, cation permeable (Cheng et al., 2010) and activated by phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate, which is present in endolysosomal membranes (Dong et al., 2010a). Importantly, as they traverse the endolysosomal system, TRPML channels face different Ca²⁺ concentrations and pH values which in turn influence channel activity (Li et al., 2017; Zhou et al., 2017). Compared with a typical extracellular pH value of approximately 7.4, endolysosomal vesicles undergo acidification during their maturation with lysosomal pH values dropping to pH ~4.5. Typical extracellular Ca²⁺ concentrations reach up to 2 mM, while reported concentrations for early endosomes are 3 μM to 2 mM, and ~0.5 mM for late endosomes and lysosomes,



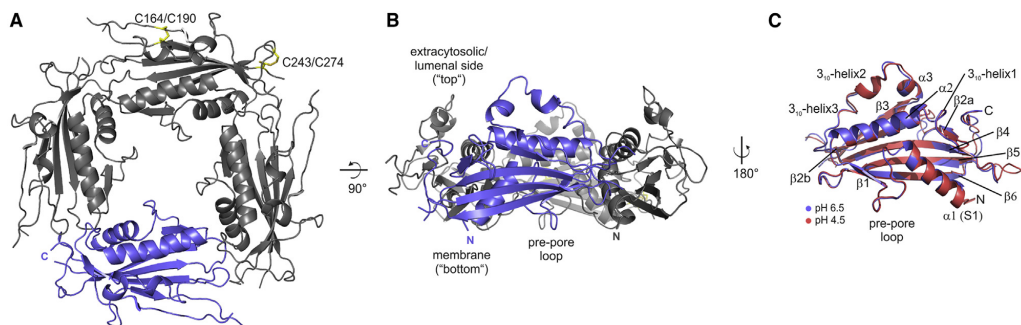


Figure 1. Crystal Structure of the Human TRPML2 Extracytosolic/Luminal Domain

(A) Structure of human TRPML2 ELD (construct/resolved residues A92-K285/A92-S282) at 2.0 Å resolution and pH 6.5 (top view, one monomer shown in blue). The ELD forms a tetramer with the pre-pore loops of all four subunits harboring the DEDD motif extending into the central pore (Figure 2). The intramolecular disulfide bridges (yellow) between C164/C190 and C243/C274 are highlighted in only one of the subunits.

(B) Side view of the TRPML2 ELD shows where the transmembrane S1 helices connect to the N terminus of the ELD. The teepee-shaped “lid” formed by α and 3_{10} helices is well resolved in our structure.

(C) Overlay of two ELD monomers at pH 6.5 (2.0 Å, blue) and pH 4.5 (2.95 Å, red). Individual helices and β strands are indicated (for details see text). Associated with Figures S1 and S2.

respectively (Dong et al., 2010b). It has been proposed that the ELD is involved in cation flux regulation of TRPML channels, presumably mediated by the highly acidic central pore of this domain (Li et al., 2017).

Mutations in the TRPML1 ELD can lead to mucopolidosis type IV (MLIV), a lysosomal storage disease characterized by severe cognitive impairment and eye abnormalities (Sun et al., 2000; Wakabayashi et al., 2011). TRPML3 is inhibited at acidic pH due to the protonation of three histidine residues in the ELD and mutation of H283 results in constitutively active channels due to a loss of pH regulation (Kim et al., 2008).

In comparison with TRPML1 and ML3, the cellular role and structural properties of TRPML2 are far less well understood. Subcellularly, it is present in recycling endosomes and in late endosomes, lysosomes, and, at low levels, in the plasma membrane (García-Añoveros and Wiwatpanit, 2014; Sun et al., 2015). In contrast to TRPML1 and ML3, ML2 mRNA and protein levels in macrophages increase after activation of Toll-like receptors (Sun et al., 2015). Macrophage recruitment to sites of bacterial infection and chemokine production is reduced in TRPML2 knockout mice (Sun et al., 2015). Furthermore, TRPML2 was found to influence viral trafficking (Rinkenberger and Schoggins, 2018) as well as chemokine trafficking and secretion from murine macrophages (Plesch et al., 2018). Taken together, these observations support a function of TRPML2 in the innate immune response.

To elucidate the enigmatic function of the ELD, particularly in human TRPML2, we present crystal structures of this tetrameric domain at pH 6.5 (2.0 Å) and pH 4.5 (2.95 Å). Comparisons with available structures of human TRPML1 and ML3 ELDs show strong differences in the pore loop architecture and surface electrostatics, thereby potentially explaining functional differences between the channels in different cellular compartments. Small angle X-ray scattering (SAXS), native mass spectrometry (native

MS/laser-induced liquid bead ion desorption), circular dichroism (CD) spectroscopy, and analytical size-exclusion chromatography (SEC) were furthermore used to investigate the behavior of the ELD in solution and in response to pH and Ca^{2+} . Isothermal titration calorimetry (ITC) shows that the acidic, central pre-pore loop of the TRPML2 ELD binds to Ca^{2+} in a physiologically relevant affinity range in a pH-dependent manner. Our data thus present an important step toward the structural and biophysical characterization of the human TRPML2 channel and complete the set of high-resolution ELD structures of the human TRPML subfamily.

RESULTS AND DISCUSSION

X-ray Structures of the Human TRPML2 ELD at pH 4.5 and 6.5

Since structural information for TRPML channels is currently restricted to TRPML1 and ML3, and the role of the ELD in TRPML and TRPP channel families remains enigmatic, we determined the crystal structures of the human TRPML2 ELD at different pH values. At pH 6.5, a 2.0-Å structure of a construct spanning amino acids A92 through K285 was determined (PDB: 6HRR). At pH 4.5, crystals of a construct comprising amino acids G84 through K285 were obtained that diffracted to 2.95 Å (PDB: 6HRS) (Figure 1, Table 1, Figure S1).

Similar to the ELDs of TRPML1 and ML3 (e.g., Li et al., 2017; Zhou et al., 2017), the TRPML2 ELD features a tetrameric assembly that exhibits C_4 rotational symmetry. However, our two crystal forms differ with respect to the identity of the 4-fold axis which is a crystallographic symmetry element in the high-resolution structure at pH 6.5 (space group I422, two monomers in the asymmetric unit) and a non-crystallographic axis in the lower-resolution structure at pH 4.5 (space group P2₁, two tetramers in the asymmetric unit) (Figures S1 and S2).

Structure 27, 1246–1257, August 6, 2019 1247

Table 1. Crystallographic Parameters of Human TRPML2 ELD at pH 6.5 and pH 4.5

	pH 6.5 (PDB: 6HRR)	pH 4.5 (PDB: 6HRS)
Data Collection		
Resolution range (Å)	46.53–2.0 (2.05–2.0)	48.61–2.95 (3.09–2.95)
Space group	I422	P2 ₁
Unit cell dimensions		
a, b, c (Å)	109.47, 109.47, 149.74	74.5, 142.5, 85.2
α, β, γ (°)	90, 90, 90	90, 104.5, 90
Measured/unique reflections	845,304/31,030	259,175/35,855
Completeness	0.999 (1.0)	0.989 (0.997)
Redundancy	27.2 (28.8)	7.2 (7.6)
R _{merge} ^a	0.102 (3.556)	0.144 (1.937)
R _{pim} ^b	0.020 (0.673)	0.058 (0.749)
<I/σI>	21.5 (1.3)	9.8 (1.0)
CC _{1/2} ^c	1.0 (0.645)	0.997 (0.411)
Refinement		
Resolution range (Å)	20.0–2.0 (2.07–2.0)	28.13–2.95 (3.04–2.95)
R _{cryst} ^d	0.186 (0.221)	0.182 (0.228)
R _{free} ^e	0.223 (0.249)	0.216 (0.250)
DPI based on R/R _{free} (Å) ^f	0.166/0.143	0.357/-
No. of protein/solvent atoms	3,517/453	3,656/624
Average B factors (Å ²)	56.8/65.9 (chains A/B)	117.1 (average chains A–H)
Solvent (Å ²)	68.1	77.1
RMSD		
Bond lengths (Å)	0.010	0.010
Bond angles (°)	1.02	1.08
Planar groups (Å)	0.0131	0.0116
Torsion angles (°)	3.07	3.38
Ramachandran statistics (%) ^g	97.66/2.01/0.33	95.54/3.36/1.10

RMSD, root-mean-square deviation. Numbers in parentheses refer to the respective highest-resolution data shell. Associated with Figures 1, S1, and S2.

^aR_{merge} = $\sum_{hkl} \sum_i |I_i - \langle I \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i$, where I_i is the i^{th} measurement and $\langle I \rangle$ is the weighted mean of all measurements of I .

^bR_{pim} = $\sum_{hkl} 1 / (N-1)^{1/2} \sum_i |I_i - \langle I \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i$, where N is redundancy of data and $I(hkl)$ the average intensity.

^cCC_{1/2} is the correlation coefficient between intensity estimates from half datasets.

^dR = $\sum_{hkl} ||F_o| - |F_c|| / \sum_{hkl} |F_o|$, where F_o and F_c are observed and calculated structure factor amplitudes.

^eR_{free} same as R_{cryst} for 4.9%/4.8% of the data randomly omitted from refinement.

^fDPI, data precision index.

^gRamachandran statistics indicate percentage of reflections in core/additional allowed/disallowed regions according to Coot 0.8.9.1.

The TRPML2 ELD monomers in the tetrameric assembly have a total surface area of 33,135 Å². A total of 6,166 Å² (18.6%) is buried due to intermonomer interactions. The overall tetramer dimensions are ~85 × ~85 Å parallel to the membrane plane and ~35 Å perpendicular to it. The two crystallographically independent monomers in the I422 crystal (pH 6.5) exhibit root-mean-square deviation (RMSD) of 0.53 Å for residues 92–168, 185–232, and 243–280. However, it should be noted that weak non-crystallographic symmetry (ncs) restraints were employed during refinement (Smart et al., 2012). In contrast, in the P2₁ space group for crystals obtained at pH 4.5, tight ncs restraints were employed during refinement resulting in average pairwise RMSD of 0.41 Å for residues 90–168, 185–232, and 243–280. This set of comparisons revealed that monomers B and, in particular, A, are more dissimilar to each other than the remaining six monomers (chains C–H). Comparing the structures of the monomers at the different pH values results in average pairwise RMSD of 0.68 Å, hence the low and high pH structures are slightly more dissimilar than the structural variability exhibited by the different chains present in the two pH forms. This is in line with observations by Li et al. (2017), who determined the structures of the TRPML1 ELD at pH 4.5, 6.5, and 7.5 and observed no significant differences between their structures.

In our pH 6.5 structure, the N terminus is fully resolved. The first 14 residues (92–105) extend the transmembrane helix S1 in the full-length protein and also adopt an α-helical conformation in the context of the isolated ELD (Figure 2). In our pH 4.5 structure, which is N-terminally extended to residue G84, three additional residues (L89, V90, and V91) have been modeled in all eight subunits with density for additional residues (up to three) present in four of the subunits. In both structures the C terminus is disordered and/or unresolved. The last visible residue with clearly observable electron density is found between aa 281 and 284 in different monomers. In the full-length channel, the disordered C-terminal residues would also adopt an α-helical conformation corresponding to transmembrane helix S2. However, in the absence of the transmembrane region and the lipid environment, this helix is apparently not stable.

In the following, the secondary structure annotation is based on chain A of our high-resolution structure (PDB: 6HRR): Beyond the first long α helix S1/α1 (residues 92–105), each TRPML2 ELD monomer is folded into an additional long α helix (α2, 124–140), one short α helix (α3, 195–199), as well as three 3₁₀ helices (141–143, 204–207, and 209–211, respectively) and six β strands, β1 (118–121), β2A (149–151), and β2B (161–164), β3 (186–193), β4 (220–229), β5 (244–253), and β6 (261–271), which are organized into a single antiparallel β sheet (Figure 1C). The main secondary structure elements, the two long α helices and the six-stranded antiparallel β sheet, are conserved in the crystal structures of the TRPML1 ELD (Li et al., 2017) and the cryoelectron microscopy structures of the full-length TRPML1 and ML3 channels (Chen et al., 2017; Hirschi et al., 2017; Schmiede et al., 2017; Zhang et al., 2017; Zhou et al., 2017; Fine et al., 2018), as is the oligomeric architecture of a C₄ symmetrical assembly.

Architecture of the TRPML2 Pre-pore Loop

The C-terminal residues in the N-terminal α1/S1 helix directly lead into a loop in the ELD consisting of 12 residues (K107–S118) including a stretch of four acidic residues (¹¹³DEDD¹¹⁶)

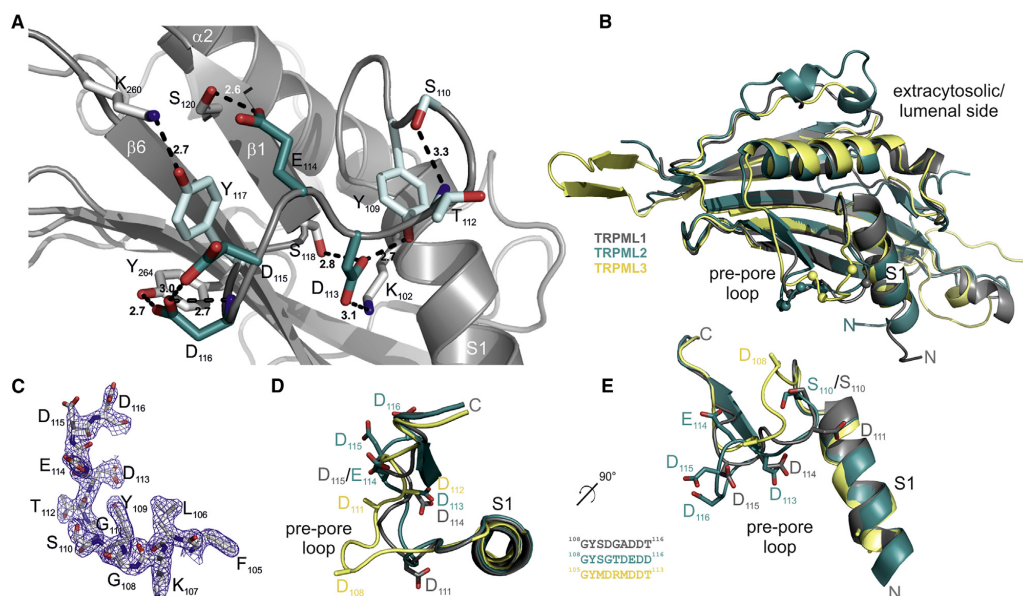


Figure 2. Architecture of the Human TRPML2 Channel Pre-pore Loop and Its Relative Position in Comparison with ML1 and ML3

(A) Hydrogen bonding network of the TRPML2 pre-pore loop. With the exception of the backbone amides of T112 and D116, only side-chain interactions are shown. The respective hydrogen bond distances (in Å) are indicated. Residues in the pre-pore loop are shown in teal, the four acidic residues in dark teal.

(B) Overlay of the human TRPML1 (gray), ML2 (teal), and ML3 (yellow) ELD monomers (PDB: 5TJB, 6HRS, and 6AYG) shows high overall structural similarity. The position of the acidic residues (ML1: D111, D114, and D115; ML2: D113, E114, D115, and D116; ML3: D108, D111, and D112) in the pre-pore loop are indicated by small spheres.

(C) SIGMAA-weighted $2F_o - F_c$ electron density for the TRPML2 pre-pore loop.

(D and E) Top (luminal/extracytosolic) (D) and side view (E) of the pre-pore loops in the three human TRPML channels reveal variations in loop orientation and positioning of acidic residues. In the TRPML3 structure (PDB: 6AYG) the side chains were not modeled due to the limited resolution and thus only the C β atoms are shown. Residues that represent constriction points for the ELDs (S110^{ML1}, S110^{ML2}, and D108^{ML3}) are also shown (compare Figure 4). Associated with Figures S2 and S3.

(Figure 2). In the context of the full-length channel, this loop is centered on top of the ion channel pore formed by transmembrane helices S5 and S6; therefore, we refer to it as the pre-pore loop. In TRPML1 and ML3, only two aspartates are present in the corresponding pre-pore tetrapeptides, ¹¹³ADDT¹¹⁶ and ¹¹⁰MDDT¹¹³, respectively, rendering the TRPML2 ELD pre-pore loop the most acidic of all TRPML channels (see alignment, Figure S3). In the context of the tetrameric TRPML2 channel at neutral pH, a cation will encounter the electrostatic potential of a ring of 16 acidic residues (four from each subunit) before it can pass through the ion channel pore spanning the membrane bilayer. It has been proposed that Ca²⁺ might interact with the TRPML ELD in response to pH fine-tuned via (de)protonation of the pre-pore acidic residues (Li et al., 2017). Indeed, we can show by ITC that the TRPML2 ELD pre-pore loop is able to bind Ca²⁺ in a pH-dependent manner (see below).

Just N-terminal of the DEDD motif, the TRPML2 ELD pre-pore loop contains a glycine- and serine/threonine-rich sequence (¹⁰⁸GYSGT¹¹²). This would suggest relatively high flexibility for this region; however, the entire pre-pore loop is very well resolved in our pH 6.5 structure. The corresponding B factors

with average main chain values of 45.4 and 45.0 Å² for residues 108–112 in chains A and B, respectively, are considerably lower than the average main chain B factors of chains A (52.2 Å²) and B (60.2 Å²). The residue with the highest main chain B factor in the pre-pore loop is D115 with values of 62.4 and 59.6 Å² (Figure S2).

The pre-pore loop is stabilized by an intricate set of hydrogen bonds which simultaneously connects it to the S1 helix N-terminal of the ELD and the C-terminal region of the ELD (Figure 2A): (1) the side chain of S110 is hydrogen bonded to the main chain atoms of T112. S110 also represents the constriction point for the TRPML2 ELD pore. (2) One of the side chain oxygens of D113 forms a bifurcated H-bond with the side chains of Y109 of the pre-pore loop and S118 in β 1, while the other is H-bonded to N ϵ of K102 in S1. The importance of these interactions for the structural integrity of the ELD is further underscored by our finding that mutation of D113 to alanine or asparagine led to insoluble misfolded protein (data not shown). (3) The side chain of E114 interacts weakly with the backbone amide and more favorably with the side chain -OH group of S120 in β 1. At the same time, the backbone amide of E114 engages in a bifurcated hydrogen bond with the backbone carbonyls of Y117 and S118.

Structure 27, 1246–1257, August 6, 2019 1249

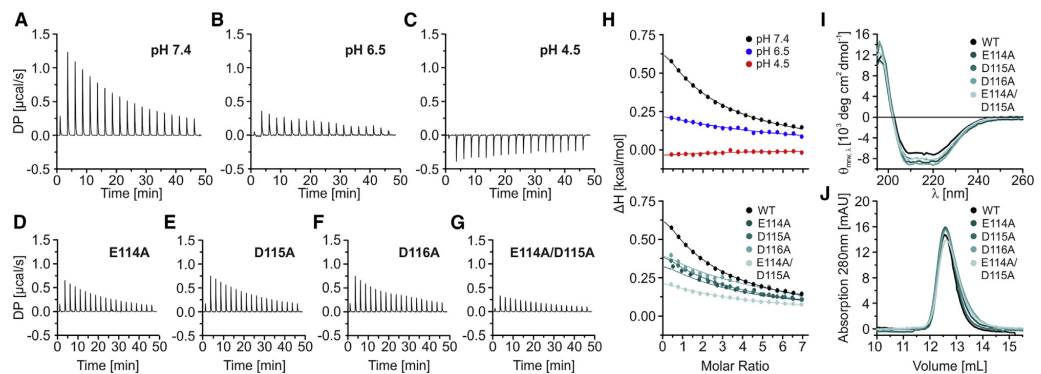


Figure 3. pH-Dependent Ca^{2+} Interaction of the Human TRPML2 ELD

(A–C) ITC thermograms for wild-type (WT) TRPML2 ELD reveal Ca^{2+} binding in a physiologically relevant concentration range at near-neutral pH (A), but not at lower pH values (B and C).

(D–G) Mutagenesis of the acidic residues of the pre-pore loop $^{113}\text{DEDD}^{116}$ motif, either individually (D, E, F) or in combination (G), leads to a near complete loss in Ca^{2+} binding, even at pH 7.4.

(H) Integrated heat signatures and fitted curves to compare Ca^{2+} binding for WT TRPML2 ELD at different pH values (top) and for pre-pore loop mutants at pH 7.4. (I and J) Mutations in the acidic pre-pore residues to alanine, with the exception of D113, led to soluble, tetrameric, structurally intact protein as seen by CD spectroscopy (I) and SEC (J).

Associated with [Figure S4](#).

While Y109 is conserved in all three TRPML channels, the TRPML2 $\beta 1$ is two amino acids longer, by residues $^{118}\text{SC}^{119}$, than in TRPML1 and ML3, and residue S120 is an alanine in TRPML1 and ML3 ([Figure S3](#)). There could thus be important structural, dynamic, or functional differences between the three channels encoded in this region. (4) The D116 side chain interacts with the side chain of Y264 in $\beta 6$, which is a serine in both TRPML1 and ML3. The positions of all these residues do not differ significantly between our structures at pH 4.5 and 6.5.

The carboxylate groups of D115 and D116 are in close spatial proximity (2.9–3.0 Å). This close proximity could indicate that one of the two carboxylate groups is in the protonated, neutral form allowing the formation of a hydrogen bond between the protonated and non-protonated carboxylate groups. However, typical distances of CO groups of acidic amino acid side chains with such a hydrogen bonding pattern are slightly shorter (~2.7 Å). Alternatively, a distance of ~3.0 Å between two Asp/Glu carboxylates can be indicative of a metal binding site ([Flocco and Mowbray, 1995](#)). To conclusively identify whether the TRPML2 ELD pre-pore loop harbors a Ca^{2+} binding site, we carried out ITC on the wild-type ELD and pre-pore loop mutants (see below).

C-terminally, $\beta 1$ is connected to the long helix $\alpha 2$, which lies on the back of the extensive β sheet core with the remaining antiparallel β strands ($\beta 2$ – $\beta 6$), typical for the ELD subunits of TRPML and TRPP channels. In this arrangement, the N-terminal end of $\beta 6$ interacts in an antiparallel fashion with $\beta 1$ and, via the side chain of Y264, also engages in contacts with D116 of the ELD pre-pore loop. $\beta 3$ and $\beta 4$ are joined by a longer connecting segment consisting of short helical and random coil segments. This region was partially unresolved in previous structures of TRPML1 and ML3. In our structure this region adopts a teepee-shaped α helix (α_3 /turn/3₁₀ helix(2)/3₁₀ helix(3) conformation that acts as a “lid” to the ELD and represents the most

membrane-distal part of the structure. It may be relevant for interactions of TRPML channels with other proteins. In TRPML1, this region harbors a proline-rich region ([Figure S3](#)), which is well known to mediate protein-protein contacts. $\beta 6$ ultimately leads into transmembrane helix S2, but in our X-ray structures, as mentioned above, the C-terminal residues are unresolved and the preceding 14 amino acids adopt a random coil conformation pointing in fact in the opposite direction to where helix S2 would be located in the full-length channel.

Ca^{2+} Interacts with the Acidic TRPML2 ELD Pre-pore Loop Residues in a pH-Dependent Manner

For TRPML1, an elegant model for the dual regulation of this channel by Ca^{2+} and pH has been proposed ([Li et al., 2017](#)). The ELD’s pre-pore loop acidic residues are negatively charged at an extracytosolic pH of 7.4 and thus attract and bind extracellular Ca^{2+} to form a cation block. This renders the channel inactive. Lower pH values in late endosomes or the lysosome lead to protonation of the acidic residues and subsequently weaken the Ca^{2+} block thereby enabling cation influx.

To assess whether a similar modus operandi is possible for TRPML2, we measured the interaction of its ELD with Ca^{2+} at different pH values using ITC ([Figure 3](#)). At pH 7.4, the ELD interacts with Ca^{2+} with a K_D of 2.97 ± 0.11 mM. Although the affinity for Ca^{2+} at pH 7.4 may seem low, it is in a physiologically relevant concentration range and would be sufficient to block the channel in the presence of millimolar Ca^{2+} concentrations, while at the same time enabling a fast reversal of cation block when the surrounding pH value drops. Notably, Ca^{2+} binding is endothermic and entropy driven, possibly due to the release of water molecules from the hydration shell of the pre-pore loop residues.

At pH 6.5, a more than 4-fold reduction in Ca^{2+} binding affinity is observed. Due to the very low binding affinity no reliable value

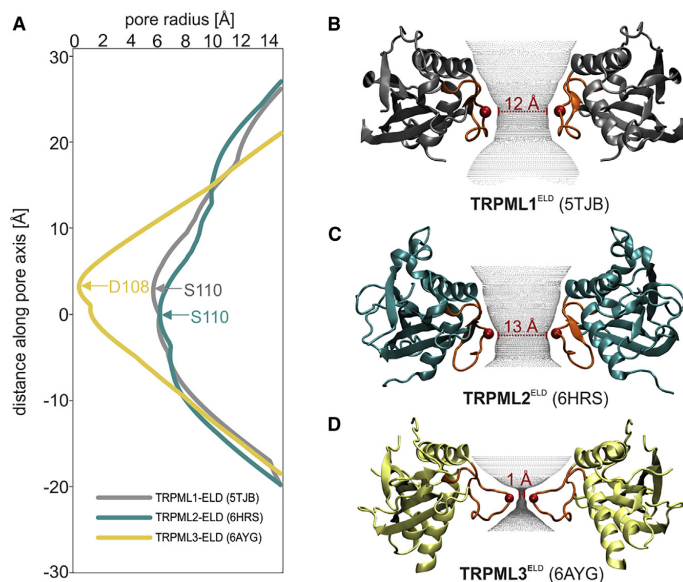


Figure 4. Comparison of the Pre-pore Loops in the Three Human TRPML Channel ELDs

(A) Pre-pore radii in the three human TRPML channels under acidic conditions based on TRPML1 (gray, PDB: 5TJB; pH 4.5), ML2 (teal, PDB: 6HRS; pH 4.5), and ML3 (yellow, PDB: 6AYG; pH 4.8) structures. Pore dimensions were calculated with HOLE (Smart et al., 1996) and the relative center was adjusted to the TRPML2 constriction (centered at residue S110).

(B–D) Architecture of the pre-pore funnel. The amino acids at the constriction point are indicated by red spheres: S110^{ML1} (B), S110^{ML2} (C), and D108^{ML3} (D), respectively. The front and rear subunits were removed for clarity.

Associated with Figures S2, S3, and S5.

In detail, comparisons of our high-resolution ML2 ELD crystal structure with the crystal structures published for the ML1 ELDs reveal RMSDs between 1.3 and 1.4 Å when monomers (PDB: 5TJA, 5TJB, 5TJC) (Li et al., 2017) are compared. Comparisons of our ML2 ELD with the human ML1/3 ELD tetramers in the context of the full-length channels revealed only marginally larger RMSDs, thus illustrating that the tetrameric ELD architecture is identical in all three channels (Figures S3B–S3D).

for the K_D can be determined and only qualitative comparisons are made. At pH 4.5, Ca^{2+} no longer interacts with the ELD. To test whether this pH-dependent binding mechanism is contingent on the pre-pore loop acidic residues, we subsequently mutated the four residues of the $^{113}DEDD^{116}$ motif. Mutagenesis of D113 into alanine or asparagine resulted in insoluble misfolded protein (data not shown). This suggests that the main function of this residue is the stabilization and folding of the pre-pore loop structure (Figure 2A). Mutagenesis of E114, D115, and D116 to alanine results in a soluble, tetrameric, and structurally intact protein as verified by analytical SEC and CD spectroscopy (Figures 3I and 3J). ITC measurements with TRPML2 ELD E114A and D115A showed a significant drop but not a complete loss in Ca^{2+} interaction at pH 7.4. For TRPML2 ELD D116A a reduction in Ca^{2+} affinity was also observed, although not to the degree of the E114A and D115A mutants. We therefore also created the TRPML2 ELD E114A/D115A double mutant, which essentially abrogates Ca^{2+} binding to the ELD, thus pinpointing a pH-dependent Ca^{2+} binding site in the center of the TRPML ELD pre-pore loop. These data strongly support the Ca^{2+} block model proposed by Li et al. (2017) for TRPML1. Therefore, it may present a general regulatory mechanism for TRPML channels that could be fine-tuned by the pH in different cellular compartments and potentially the relative positioning of the pre-pore loop acidic residues in different TRPML channels (Figure 4).

To analyze the pore formed by the four pre-pore loops, we chose the available structures of human TRPML channels obtained under the most similar conditions. For acidic conditions, these are the ML1 (Li et al., 2017) and our ML2 ELD structures at pH 4.5 (PDB: 5TJB and 6HRS) and the near full-length ML3 channel at pH 4.8 (PDB: 6AYG) (Zhou et al., 2017) (Figure 4). For pH values close to neutral, we chose the structures of ML1 at pH 7.0 (PDB: 5WJ5) (Schmiege et al., 2017), our ML2 ELD at pH 6.5 (PDB: 6HRR), and ML3 at pH 7.4 (PDB: 6AYE) (Zhou et al., 2017), because they are available without bound agonists or ligands (Figure S5).

Comparison of Human TRPML1, 2, and 3 ELDs

Overall, the structures of the ELDs of TRPML1 (Li et al., 2017) and ML2 in isolation (this paper), as well as the ELDs of ML1 and ML3 in the context of the transmembrane proteins (Chen et al., 2017; Hirschi et al., 2017; Schmiege et al., 2017; Zhang et al., 2017; Zhou et al., 2017; Fine et al., 2018) are highly similar (Figure 2B).

The architecture of the ELD pre-pore varies dramatically between the three TRPML channels (Figures 2, 4, and S5), as does the relative position of the pore constriction site. Relative to TRPML2, the ML1 and ML3 constrictions at acidic pH are displaced by +2.6 and +3.2 Å, respectively, away from the transmembrane ion channel pore. The ML2 pre-pore diameter at acidic pH at the narrowest point is 12.5 Å between its S110 residues (12.0 Å/S110 at pH 6.5). According to the PhosphoSitePlus Databank (Hornbeck et al., 2015), residue S110 in ML2 can potentially be phosphorylated. It may thus be perfectly located for reversible channel regulation. In TRPML1 the constriction is also formed by the S110 residues with a highly similar diameter of 11.6 Å. At neutral pH, the TRPML1 constriction does not dilate much (11.1 Å/S110 at pH 7.0). TRPML3 displays by far the narrowest constriction at acidic pH, with a diameter of less than 1 Å between its D108 residues. Its ELD pre-pore is thus closed. Strikingly, at pH 7.4, the TRPML3 ELD harbors two constriction points (6.9 Å/M107 and 5.7 Å/R109) (Figure S5), and both of

these are significantly wider than at acidic pH. In contrast to the predicted putative phosphorylation at position S110 in TRPML2, no such prediction exists for S110 of ML1. In ML3, a methionine occupies the corresponding position, thus precluding phosphorylation. Further studies will thus be required to elucidate whether channel-specific phosphorylation within the ELD pre-pore loop is indeed a relevant means of TRPML(2) channel regulation.

Intriguingly, the higher structural similarity with regard to ELD pore diameter between TRPML1 and ML2 compared with ML3 may present a rational explanation for the observed difference in organelle-specific channel activation. TRPML3 was described to be inhibited at low pH (Kim et al., 2008; Zhou et al., 2017), while ML1 is readily activated in the lysosome (Dong et al., 2010a). For TRPML2, it has been suggested that this channel is inhibited at low pH (Lev et al., 2010), while others have described it to be activated at acidic pH, similar to what was observed for ML1 (Venkatachalam and Montell, 2007; Venkatachalam et al., 2015). Only a double knockout of TRPML1 and ML2 led to the development of an MLIV phenotype in lymphocytes (Song et al., 2006), suggesting at least partial functional overlap between these channels. The role of the ELD in channel regulation under different physiological conditions remains unclear. Our data suggest that the pre-pore regions of TRPML1 and ML2 are structurally more similar to each other than to ML3 under acidic conditions. Likewise, we can demonstrate a pH-dependent Ca^{2+} interaction in agreement with electrophysiology data showing inhibition of TRPML1 at higher pH values, presumably at least partially in response to a Ca^{2+} block at the pre-pore loop (Li et al., 2017). Assuming a critical role of the ELD in channel regulation as suggested previously (Li et al., 2017; Zhou et al., 2017), channel regulation of TRPML1 and ML2 may thus be more similar to each other than to ML3 at low pH values.

The three human TRPML channel ELDs also differ when comparing the charge distribution patterns of their respective electrostatic-potential surfaces (Figures 5 and S6). When viewed from the luminal/extracytosolic side, the TRPML1 ELD (Li et al., 2017) features four characteristic positively charged “hotspots” on the interface between two protomers, which are generated by residues R122, R146, H226, and K227. These positions may play an important role in (allosteric) TRPML1 regulation by endogenous effectors. Similar positively charged patches are not present on top of the TRPML2 and ML3 ELD. Another difference between the three ion channels is the gateway into the lumen of the ELD: TRPML1 and ML2 feature a “cross-shaped” electronegative entrance to the luminal pore. In contrast, the surface charges are more evenly distributed in ML3, but with a high concentration of negative charges surrounding the ELD center. It is possible that the funnel-shaped excavations found in both TRPML1 and ML2 facilitate trapping and directing of cations into the luminal pore of the channel and thus act as an ion selection or guidance system. Furthermore, there are four electronegatively charged side entrances in the vicinity of the $^{113}\text{DEDD}^{116}$ signature sequences in the TRPML2 ELD which could allow access of cations.

Overall, when viewed from the membrane side, both the surfaces of the TRPML1 and ML3 ELDs display alternating negatively and positively charged patches, while the surface of ML2

shows a more even, but generally more negative, charge distribution. Viewed from the perspective of the membrane plane, there are also differences in the electrostatic surface of the three channels, which may affect their interaction with other channel regions and potentially lipids (Figure 5 bottom row, Figure S6). All these variations may be reflective of how the three different TRPML channels interact in unique ways with ions, lipids, and other proteins and how they communicate with their respective transmembrane domains.

Intramolecular Disulfide Bonds Are Important for ELD Folding but Not Tetramer Integrity

Each human TRPML2 ELD monomer contains five cysteine residues. C119 is the first residue of $\beta 1$. Its side chain points away from the pre-pore loop toward a hydrophobic pocket formed by the side chains of L106 in helix S1 as well as I263 in $\beta 6$. The side chains of C164 and C190 as well as those of C243 and C274 come into close proximity (Figure 1A) to form disulfide bridges in the native protein (similar to TRPML1, PDB: 5TJA, 5TJB, and 5TJC) (Li et al., 2017). In our high-resolution crystal structure, the disulfide bond between residues 243 and 274 is partially reduced with the side chain of C243 adopting two different rotamers. Although the disulfide bond connecting C164 and C190 does not show pronounced signs of alternative conformations, the presence of negative electron density on the disulfide bond also suggests its partial reduction which we attribute to partial photoreduction in the X-ray beam. In the lower-resolution structure, both disulfide bonds are in the reduced state in all eight subunits reflecting the higher radiation dose absorbed by these crystals, which was deliberately chosen to extend the high-resolution limit of these weaker diffracting crystals.

Nonetheless, the importance of intramolecular disulfide bonds for protein folding is highlighted by the fact that expression of the TRPML2 ELD in any other *E. coli* strain except Rosetta-gami 2(DE3), which allows enhanced disulfide bond formation in the cytoplasm for heterologous expression, led to high expression levels but insoluble protein (not shown). This requirement was also observed for the TRPML1 ELD (Li et al., 2017). Our subsequent purification was carried out under non-reducing conditions and yielded tetrameric protein as assessed by SEC (Figure 6). Variation of pH or addition of Ca^{2+} only slightly changed the elution volume of the ELD, presumably due to a change in protein surface charges and thus altered interactions with the SEC column in the presence of divalent cations in the running buffer. Of note, the shift to lower elution volumes of the TRPML2 ELD at pH 4.5 can be explained by the formation of transient, non-physiological octamers at low pH that are also apparent from our X-ray structure as well as the SAXS and native MS data (Figures S1 and 7).

To test if reduction of the TRPML2 ELD disulfide bonds affects the oligomeric state or structure of the TRPML2 ELD, we incubated the protein with β -mercaptoethanol and carried out analytical SEC and CD spectroscopy. Neither a difference in SEC elution volume nor a difference in the CD spectra with and without reducing agent were observed (Figure 6), thus indicating that the ELD disulfide bonds are important for initial domain folding, but not required to maintain the protein's structural integrity, both with regard to secondary and quaternary

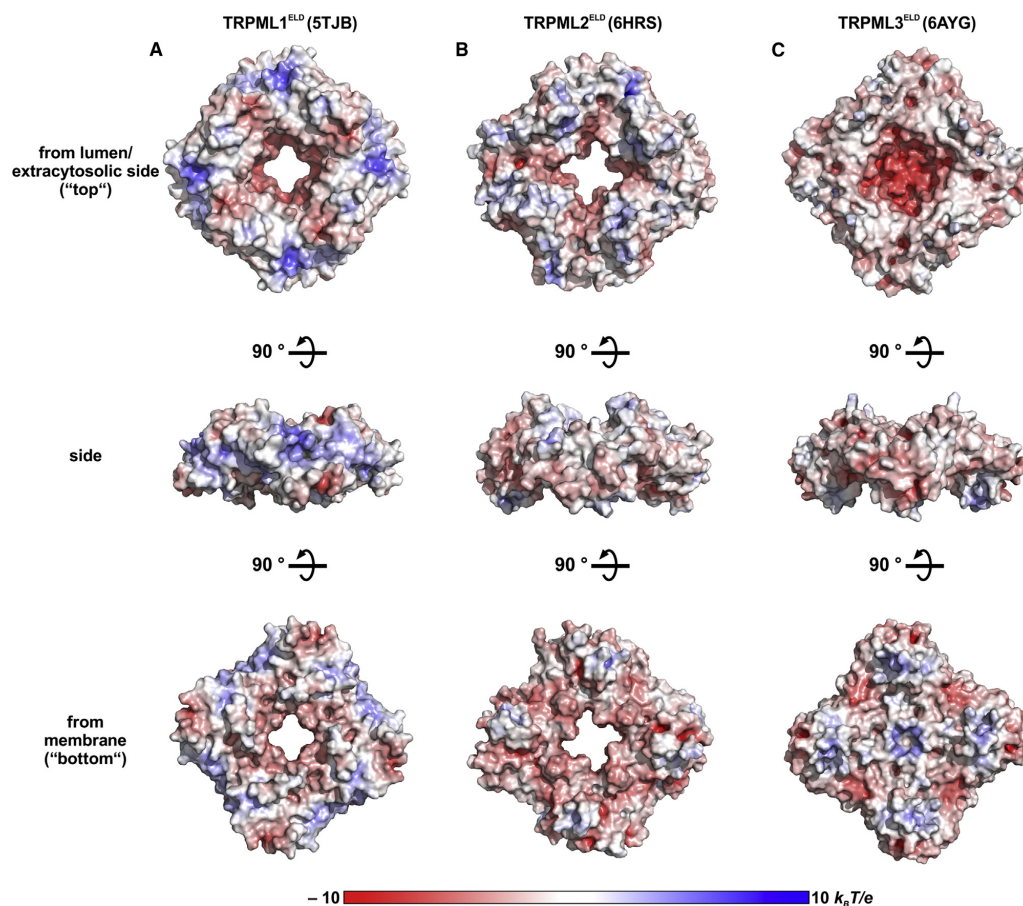


Figure 5. Comparison of Surface Electrostatics of the Three Human TRPML Channel ELDs at Acidic pH

(A–C) The top row depicts the ELD as seen from the extracytosolic/luminal side (top view). Note the dramatic differences between pre-pore opening and architecture of the central cavity as well as the pronounced cross-shaped “charge channels” for TRPML1 and TRPML2. In contrast, the TRPML3 channel ELD shows a pronounced electronegative ring around its ELD center, which is in the closed state compared to TRPML1 and TRPML2. The middle row displays side views, while the bottom row features views from the membrane. The three human TRPML channel ELDs are shown for TRPML1 (PDB: 5TJB; pH 4.5), ML2 (PDB: 6HRS; pH 4.5) and ML3 (PDB: 6AYG; pH 4.8) chosen based on available structures of human TRPML channels in the absence of agonists at acidic pH values. For a comparison at near-neutral pH, see associated Figure S6.

structure, at physiologically relevant pH values, once it has been correctly folded.

pH and Ca²⁺ Do Not Affect Human TRPML2 ELD Secondary Structure but Oligomer Stability

TRPML channels traffic through the endolysosomal system and thus their ELDs encounter different Ca²⁺ concentrations and pH values. We were interested in whether these differences have implications for ELD structure and/or tetramer stability in solution. We therefore carried out SAXS, native MS, analytical SEC, and CD spectroscopy (Figures 6 and 7; Table S1) under

conditions chosen to emulate the environments the channel faces during its lifetime: (1) pH 7.4 and 2 mM Ca²⁺ in the extracellular space, (2) pH 6.5 and 0.5 mM Ca²⁺ in early endosomes and recycling endosomes, and (3) pH 4.5 and 0.5 mM Ca²⁺ in late endosomes and lysosomes.

Our SAXS data show that, in solution, the TRPML2 ELD adopts the shape of a “doughnut,” the dimensions of which are in good agreement with the crystal structures, which can thus be used as modeling templates (Figures 7A and 7B). The overall shape of the TRPML2 ELD is not dependent on pH and Ca²⁺, but, at pH 4.5, stacking of two tetramers into larger

Structure 27, 1246–1257, August 6, 2019 1253

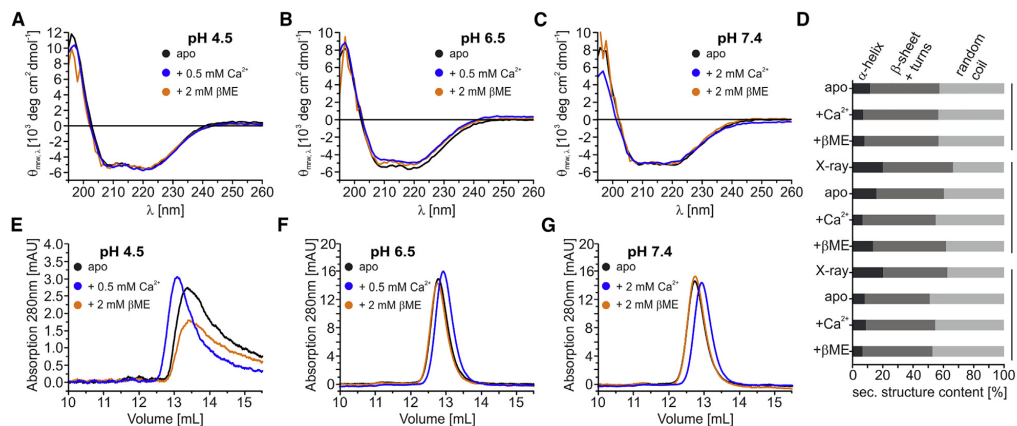


Figure 6. Role of pH and Ca²⁺ for Human TRPML2 ELD Secondary Structure

(A–C) CD spectra of human TRPML2 ELD at different pH values in the absence (black) or presence of Ca²⁺ (blue) or β-mercaptoethanol (β-ME, orange) demonstrate that these factors do not affect ELD secondary structure.

(D) Secondary structure content based on CD spectra shown in (A–C) and our X-ray structures (PDB: 6HRR and 6HRS). CD-based secondary structure prediction was carried out with the BestSEI server (Micsonai et al., 2018).

(E–G) SEC of human TRPML2 ELD at different pH values in the absence (black) or presence of either Ca²⁺ (blue) or β-mercaptoethanol (β-ME, orange) indicates that disruption of disulfide bridges does not affect quaternary structure assembly.

particles corresponding to the dimensions of an octamer is observed (Figure 7B; Table S1).

For native MS, the sample is transferred into a vacuum and desolvated by a mid-IR laser (Morgner et al., 2007). This has been successfully used to analyze the oligomeric state of large noncovalent protein complexes based on their disintegration pattern (Morgner et al., 2008; Peetz et al., 2018). In the MS spectra of the TRPML2 ELD, tetramer, dimer, and monomer, and, to a lesser extent, trimer species are observed (Figure 7D). The low amounts of trimer in all spectra may indicate that tetramers are formed and broken down via dimers rather than by incorporation/release of individual subunits. At pH 7.4 there is a clear correlation between tetramer stability and Ca²⁺. Since TRPML channels operate as tetramers, this is presumably a further demonstration of Ca²⁺ binding at higher pH (Figure 3) rather than a means of functional channel regulation through oligomerization. In the presence of Ca²⁺, both tetramer and dimers are observed, while, in the absence of Ca²⁺, the dimer is the dominant species. At pH 6.5, the overall amounts of tetramer and dimer do not change dramatically with and without Ca²⁺; however, the increase in the monomer peak in the absence of Ca²⁺ also indicates a small stabilizing effect of the metal under these conditions, in agreement with very weak Ca²⁺ binding at pH 6.5 in our ITC data (Figure 3). At low pH, no stabilizing effect of Ca²⁺ is apparent on lower oligomers, but, regardless of whether Ca²⁺ is present, octamers form.

Octamers, as also seen in SAXS, are not directly obvious from the SEC run at pH 4.5, although a shift to earlier elution volumes is observed (Figure 6E). In addition, in the crystal structures at pH 4.5 with the two tetramers present in the P2₁ asymmetric unit, a closely packed octamer is also seen (Figure S1). At pH 4.5, the TRPML2 ELD thus has a strong propensity to form an octamer

composed of two tetrameric rings. However, since the face of the ELD connecting to the S1 and S2 helices is buried in the tetramer-tetramer interface (Figure S1), this arrangement cannot represent a physiologically relevant interaction. It does nonetheless highlight the electrostatic properties of this face of the ELD which could be important for lipid- or pH-dependent channel gating as was recently suggested for the TRPML3 channel (Zhou et al., 2017). The SAXS envelopes for the octamers are also best fitted with two tetramers burying the membrane-facing sides between them (Figure 7B). In the 1422 cell, obtained at pH 6.5, monomer A forms an equivalent octamer via the crystallographic 422 symmetry, while monomer B is arranged into two tetramers which do not assemble into an octamer (Figure S1).

In summary, with our TRPML2 ELD X-ray structures, we complete the collection of high-resolution views of human TRPML channel ELDs. This tetrameric ring formed on top of the transmembrane ion channel pore represents a stable assembly in solution, but Ca²⁺ and pH influence ELD tetramer stability. This highlights a role of these factors in TRPML channel function as the TRP channel traverses through the endolysosomal pathways of the cell. Our data indicate that the TRPML2 ELD is structurally and potentially also functionally more closely related to ML1 than ML3 with regard to the pre-pore loop architecture. A pH-dependent Ca²⁺ binding mechanism hinging on the acidic residues of the pre-pore loop could be demonstrated for TRPML2 similar to that proposed for ML1 (Li et al., 2017) and thus may present a general means to TRPML channel regulation. Intriguingly, there are pronounced differences in the electrostatic surface and pore loop architecture between the three human TRPML channels. This presumably has important implications for how the ELD interacts with the remainder of the channel and potentially

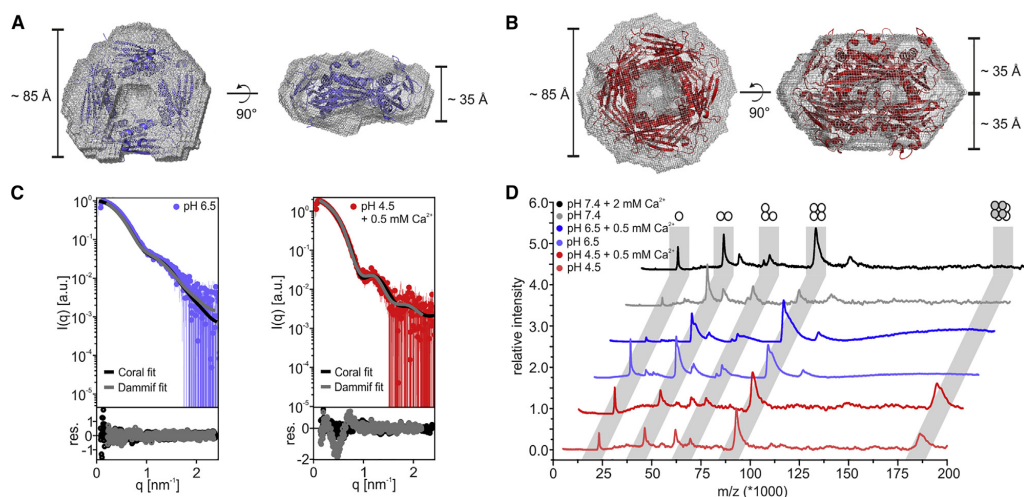


Figure 7. Role of pH and Ca^{2+} for Oligomeric stability of Human TRPML2 Extracytosolic/Luminal Domain in Solution

(A) SAXS envelopes based on *ab initio* modeling of TRPML2 ELD at pH 6.5 without Ca^{2+} shows good agreement with the crystal structure (shown as blue cartoon). Results at pH 6.5 with Ca^{2+} and at pH 7.4 ($\pm \text{Ca}^{2+}$) are essentially the same as for pH 6.5 (Figure S7).

(B) In agreement with native mass spectrometry, at pH 4.5 (crystal structure shown as red cartoon, compare Figure S1) octamers are observed. Data without Ca^{2+} are essentially the same (Figure S7).

(C) Coral and Dammif fits of the SAXS data corresponding to the models shown in (A) and (B).

(D) Native mass spectrometry of human TRPML2 ELD shows formation of octamers at low pH and a decrease in the fraction of tetramers in the absence of Ca^{2+} , especially at higher pH values.

Associated with Tables S1 and S2 and Figure S7.

other regulators including proteins and lipids, contributes to ion selectivity or pH sensitivity and ultimately influences the function and regulation of the entire channel throughout the endolysosomal vesicle system.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.str.2019.04.016>.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by the Carl Zeiss Foundation and a Mainz University, Stufe I grant (to U.A.H.), and the Center of Biomolecular Magnetic Resonance (BMRZ) funded by the state of Hesse. H.S. acknowledges financial support from the Rudolf Virchow Center for Experimental Biomedicine. N.M. received funding from the European Research Council (FP7/2007-2013)/ERC Grant agreement no. 337567 and from the Cluster of Excellence Frankfurt (Macromolecular Complexes). Funding for the ITC instrument in the framework of the Major Research Instrumentation Program of the DFG is acknowledged (INST 247/921-1 FUGG to T.S.). We thank the Schneider group, Biochemistry, Mainz, Nina Glogowski, Christian Kersten, and Anja Kanarek-Ly for helpful discussions and technical support and the ESRF (beamlines ID30A-3 and BM29) for synchrotron radiation facility and beamline staff for excellent technical assistance.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Experiment Design, U.A.H.; Protein Cloning and Purification, K.K.V. and A.W.; X-ray Structure Determination, A.W., N.B., and H.S.; CD, SEC, and ITC, K.K.V.; SAXS, A.W., K.K.V., and M.B.; Native MS, K.K.V., N.H., and N.M.; Data Analysis and Interpretation, K.K.V., K.S., H.S., and U.A.H.; Writing of the Paper, K.K.V., A.W., K.S., H.S., and U.A.H., with contributions from all authors; Study Supervision, T.S., H.S., and U.A.H.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- CONTACT FOR REAGENT AND RESOURCE SHARING
- EXPERIMENTAL MODELS AND SUBJECT DETAILS
- METHOD DETAILS
 - Cloning of Constructs
 - Protein Expression and Purification
 - X-Ray Crystallography
 - Data Analysis and Comparison with Other TRPML Channels
 - Small Angle X-ray Scattering
 - Native Mass Spectrometry/LILBID-MS (Laser Induced Liquid Bead Ion Desorption Mass Spectrometry)
 - LILBID Settings
 - Isothermal Titration Calorimetry (ITC)
 - Analytical Size Exclusion Chromatography
 - CD Spectroscopy
- QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS
- DATA AND SOFTWARE AVAILABILITY

Structure 27, 1246–1257, August 6, 2019 1255

Received: November 6, 2018
 Revised: April 16, 2019
 Accepted: April 29, 2019
 Published: June 6, 2019

REFERENCES

- Brennich, M.E., Kieffer, J., Bonamis, G., Antolinos, M., de, A., Hutin, S., Pernot, P., and Round, A. (2016). Online data analysis at the ESRF bioSAXS beamline, BM29. *J. Appl. Crystallogr.* **49**, 203–212.
- Bricogne, G., Blanc, E., Brandl, M., Flensburg, C., Keller, P., Paciorek, W., Roversi, P., Sharff, A., Smart, O.S., Vornrhein, C., et al. (2017). BUSTER version 2.10.3 (Global Phasing Ltd).
- Chen, Q., She, J., Zeng, W., Guo, J., Xu, H., Bai, X.-c., and Jiang, Y. (2017). Structure of mammalian endolysosomal TRPML1 channel in nanodiscs. *Nature* **550**, 415–418.
- Cheng, X., Shen, D., Samie, M., and Xu, H. (2010). Mucolipins: intracellular TRPML1-3 channels. *FEBS Lett.* **584**, 2013–2021.
- Dong, X.-P., Shen, D., Wang, X., Dawson, T., Li, X., Zhang, Q., Cheng, X., Zhang, Y., Weisman, L.S., Delling, M., et al. (2010a). PI(3,5)P(2) controls membrane trafficking by direct activation of mucolipin Ca(2+) release channels in the endolysosome. *Nat. Commun.* **1**, 38.
- Dong, X.-P., Wang, X., and Xu, H. (2010b). TRP channels of intracellular membranes. *J. Neurochem.* **113**, 313–328.
- Dolinsky, T.J., Nielsen, J.E., McCammon, J.A., and Baker, N.A. (2004). PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Res.* **32**, W665–W667.
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G., and Cowtan, K. (2010). Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 486–501.
- Evans, P.R., and Murshudov, G.N. (2013). How good are my data and what is the resolution? *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **69**, 1204–1214.
- Fine, M., Schmiege, P., and Li, X. (2018). Structural basis for PtdInsP2-mediated human TRPML1 regulation. *Nat. Commun.* **9**, 4192.
- Flocco, M.M., and Mowbray, S.L. (1995). Strange bedfellows: interactions between acidic side-chains in proteins. *J. Mol. Biol.* **254**, 96–105.
- Franke, D., Jeffries, C.M., and Svergun, D.I. (2015). Correlation Map, a goodness-of-fit test for one-dimensional X-ray scattering spectra. *Nat. Methods* **12**, 419–422.
- Franke, D., Petoukhov, M.V., Konarev, P.V., Panjkovich, A., Tuukkanen, A., Mertens, H.D.T., Kikhney, A.G., Hajizadeh, N.R., Franklin, J.M., Jeffries, C.M., et al. (2017). ATSAS 2.8: a comprehensive data analysis suite for small-angle scattering from macromolecular solutions. *J. Appl. Crystallogr.* **50**, 1212–1225.
- Franke, D., and Svergun, D.I. (2009). DAMMIF, a program for rapid ab-initio shape determination in small-angle scattering. *J. Appl. Crystallogr.* **42**, 342–346.
- García-Añoveros, J., and Wiwatpanit, T. (2014). TRPML2 and mucolipin evolution. In *Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels*, B. Nilius and V. Flockerzi, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 647–658.
- Goretzki, B., Glogowski, N.A., Diehl, E., Duchardt-Ferner, E., Hacker, C., Gaudet, R., and Hellmich, U.A. (2018). Structural basis of TRPV4 N terminus interaction with syndapin/PACSIN1-3 and PIP2. *Structure* **26**, 1–11.
- Grieben, M., Pike, A.C.W., Shintre, C.A., Venturi, E., El-Ajouz, S., Tessitore, A., Shrestha, L., Mukhopadhyay, S., Mahajan, P., Chalk, R., et al. (2017). Structure of the polycystic kidney disease TRP channel Polycystin-2 (PC2). *Nat. Struct. Mol. Biol.* **24**, 114–122.
- Grimm, C., Barthmes, M., and Wahl-Schott, C. (2014). TRPML3. *Handb. Exp. Pharmacol.* **222**, 659–674.
- Hellmich, U.A., and Gaudet, R. (2014). Structural biology of TRP channels. *Handb. Exp. Pharmacol.* **223**, 963–990.
- Hirsch, M., Herzik, M.A., Jr., Wie, J., Suo, Y., Borschel, W.F., Ren, D., Lander, G.C., and Lee, S.-Y. (2017). Cryo-electron microscopy structure of the lysosomal calcium-permeable channel TRPML3. *Nature* **550**, 411–414.
- Hornbeck, P.V., Zhang, B., Murray, B., Kornhauser, J.M., Latham, V., and Skrzypek, E. (2015). PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations. *Nucleic Acids Res.* **43**, D512–D520.
- Humphrey, W., Dalke, A., and Schulten, K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph* **14**, 33–38, 27–8.
- Kabsch, W. (2010). XDS. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 125–132.
- Karacsonyi, C., Miguel, A.S., and Puertollano, R. (2007). Mucolipin-2 localizes to the Arf6-associated pathway and regulates recycling of GPI-APs. *Traffic* **8**, 1404–1414.
- Kim, H.J., Li, Q., Tjon-Kon-Sang, S., So, I., Kiselyov, K., Soyombo, A.A., and Muallem, S. (2008). A novel mode of TRPML3 regulation by extracytosolic pH absent in the varitint-waddler phenotype. *EMBO J.* **27**, 1197–1205.
- Lerner, M.G., and Carlson, H.A. (2006). APBS Plugin for PyMOL (University of Michigan).
- Lev, S., Zeevi, D.A., Frumkin, A., Offen-Glasner, V., Bach, G., and Minke, B. (2010). Constitutive activity of the human TRPML2 channel induces cell degeneration. *J. Biol. Chem.* **285**, 2771–2782.
- Li, M., Zhang, W.K., Benvin, N.M., Zhou, X., Su, D., Li, H., Wang, S., Michailidis, I.E., Tong, L., Li, X., et al. (2017). Structural basis of dual Ca²⁺/pH regulation of the endolysosomal TRPML1 channel. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **24**, 205–213.
- McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C., and Read, R.J. (2007). Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* **40**, 658–674.
- McKemy, D.D., Neuhauser, W.M., and Julius, D. (2002). Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* **416**, 52–58.
- Micsonai, A., Wien, F., Bulyáki, É., Kun, J., Moussong, É., Lee, Y.-H., Goto, Y., Réfrégiers, M., and Kardos, J. (2018). BeStSel: a web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra. *Nucleic Acids Res.* **46**, W315–W322.
- Morgner, N., Hoffmann, J., Barth, H.-D., Meier, T., and Brutschy, B. (2008). LILBID-mass spectrometry applied to the mass analysis of RNA polymerase II and an F1Fo-ATP synthase. *Int. J. Mass Spectrom.* **277**, 309–313.
- Morgner, N., Kleinschroth, T., Barth, H.-D., Ludwig, B., and Brutschy, B. (2007). A novel approach to analyze membrane proteins by laser mass spectrometry: from protein subunits to the integral complex. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **18**, 1429–1438.
- Morgner, N., and Robinson, C.V. (2012). Massign: an assignment strategy for maximizing information from the mass spectra of heterogeneous protein assemblies. *Anal. Chem.* **84**, 2939–2948.
- Panjkovich, A., and Svergun, D.I. (2018). CHROMIXS: automatic and interactive analysis of chromatography-coupled small-angle X-ray scattering data. *Bioinformatics* **34**, 1944–1946.
- Peez, O., Hellwig, N., Henrich, E., Mezhyrova, J., Dötsch, V., Bernhard, F., and Morgner, N. (2018). LILBID and nESI: different native mass spectrometry techniques as tools in structural biology. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **30**, 181–191.
- Pernot, P., Round, A., Barrett, R., Antolinos, Maria, de, A., Gobbo, A., Gordon, E., Huet, J., Kieffer, J., Lentini, M., et al. (2013). Upgraded ESRF BM29 beamline for SAXS on macromolecules in solution. *J. Synchrotron Radiat.* **20**, 660–664.
- Petoukhov, M.V., and Svergun, D.I. (2005). Global rigid body modeling of macromolecular complexes against small-angle scattering data. *Biophys. J.* **89**, 1237–1250.
- Plesch, E., Chen, C.-C., Butz, E., Scotto Rosato, A., Krogsaeter, E.K., Yinan, H., Bartel, K., Keller, M., Robaa, D., Teupser, D., et al. (2018). Selective agonist of TRPML2 reveals direct role in chemokine release from innate immune cells. *Elife* **7**, e39720.
- Rinkenberger, N., and Schoggins, J.W. (2018). Mucolipin-2 cation channel increases trafficking efficiency of endocytosed viruses. *mBio* **9**, e02314–e02317.
- Schmiege, P., Fine, M., Blobel, G., and Li, X. (2017). Human TRPML1 channel structures in open and closed conformations. *Nature* **550**, 366–370.

1256 Structure 27, 1246–1257, August 6, 2019

- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., et al. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* *7*, 539.
- Smart, O.S., Neduvellil, J.G., Wang, X., Wallace, B.A., and Sansom, M.S. (1996). HOLE: a program for the analysis of the pore dimensions of ion channel structural models. *J. Mol. Graph* *14*, 354–360, 376.
- Smart, O.S., Womack, T.O., Flensburg, C., Keller, P., Paciorek, W., Sharff, A., Vonrhein, C., and Bricogne, G. (2012). Exploiting structure similarity in refinement: automated NCS and target-structure restraints in BUSTER. *Acta Crystallogr. Biol. Crystallogr.* *68*, 368–380.
- Song, Y., Dayalu, R., Matthews, S.A., and Scharenberg, A.M. (2006). TRPML cation channels regulate the specialized lysosomal compartment of vertebrate B-lymphocytes. *Eur. J. Cell Biol.* *85*, 1253–1264.
- Sun, L., Hua, Y., Vergarajauregui, S., Diab, H.I., and Puertollano, R. (2015). Novel role of TRPML2 in the regulation of the innate immune response. *J. Immunol.* *195*, 4922–4932.
- Sun, M., Goldin, E., Stahl, S., Falardeau, J.L., Kennedy, J.C., Acierno, J.S., Bove, C., Kaneski, C.R., Nagle, J., Bromley, M.C., et al. (2000). Mucopolipidosis type IV is caused by mutations in a gene encoding a novel transient receptor potential channel. *Hum. Mol. Genet.* *9*, 2471–2478.
- Svergun, D.I. (1992). Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *J. Appl. Crystallogr.* *25*, 495–503.
- Venkatachalam, K., and Montell, C. (2007). TRP channels. *Annu. Rev. Biochem.* *76*, 387–417.
- Venkatachalam, K., Wong, C.-O., and Zhu, M.X. (2015). The role of TRPMLs in endolysosomal trafficking and function. *Cell Calcium* *58*, 48–56.
- Wakabayashi, K., Gustafson, A.M., Sidransky, E., and Goldin, E. (2011). Mucopolipidosis type IV: an update. *Mol. Genet. Metab.* *104*, 206–213.
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F.T., de Beer, T.A.P., Rempfer, C., Bordoli, L., et al. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* *46*, W296–W303.
- Whitten, A.E., Cai, S., and Trewthella, J. (2008). MULCh: modules for the analysis of small-angle neutron contrast variation data from biomolecular assemblies. *J. Appl. Crystallogr.* *41*, 222–226.
- Wilkes, M., Madej, M.G., Kreuter, L., Rhinow, D., Heinz, V., de Sanctis, S., Ruppel, S., Richter, R.M., Joos, F., Grieben, M., et al. (2017). Molecular insights into lipid-assisted Ca²⁺ regulation of the TRP channel Polycystin-2. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *24*, 123–130.
- Zhang, S., Li, N., Zeng, W., Gao, N., and Yang, M. (2017). Cryo-EM structures of the mammalian endo-lysosomal TRPML1 channel elucidate the combined regulation mechanism. *Protein Cell* *8*, 834–847.
- Zhang, Y., Hoon, M.A., Chandrashekar, J., Mueller, K.L., Cook, B., Wu, D., Zuker, C.S., and Ryba, N.J.P. (2003). Coding of sweet, bitter, and umami tastes. *Cell* *112*, 293–301.
- Zhou, X., Li, M., Su, D., Jia, Q., Li, H., Li, X., and Yang, J. (2017). Cryo-EM structures of the human endolysosomal TRPML3 channel in three distinct states. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *24*, 1146–1154.

STAR★METHODS

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Bacterial and Virus Strains		
<i>Escherichia coli</i> Rosetta-gami TM 2(DE3)	Novagen	Cat# 71351
Deposited Data		
Crystal structure of human TRPML2 ELD at pH 4.5	This paper	PDB: 6HRS
Crystal structure of human TRPML2 ELD at pH 6.5	This paper	PDB: 6HRR
SAXS data of human TRPML2 ELD at pH 4.5	This paper	SASBDB: SASDEG7
SAXS data of human TRPML2 ELD at pH 4.5 and 0.5 mM Ca ²⁺	This paper	SASBDB: SASDEH7
SAXS data of human TRPML2 ELD at pH 6.5	This paper	SASBDB: SASDEF7
SAXS data of human TRPML2 ELD at pH 6.5 and 0.5 mM Ca ²⁺	This paper	SASBDB: SASDEE7
SAXS data of human TRPML2 ELD at pH 7.4	This paper	SASBDB: SASDEC7
SAXS data of human TRPML2 ELD at pH 7.4 and 2 mM Ca ²⁺	This paper	SASBDB: SASDED7
Crystal structures of human TRPML1 ELD	Li et al., 2017	PDB: 5TJA (pH 6.0) PDB: 5TJB (pH 4.5) PDB: 5TJC (pH 7.5)
CryoEM structure of human TRPML1	Schmiege et al., 2017	PDB: 5WJ5 (pH 7.0)
CryoEM structures of human TRPML3	Zhou et al., 2017	PDB: 6AYG (pH 4.8) PDB: 6AYE (pH 7.4)
CryoEM structure of common marmoset TRPML3	Hirschi et al., 2017	PDB: 5W3S (pH 7.5)
Chemicals, Peptides and Recombinant Proteins		
TRPML2 ELD (human), residue G84-K285	This paper	N/A
TRPML2 ELD (human), residue G84-V290	This paper	N/A
TRPML2 ELD (human), residue A92-K285	This paper	N/A
TRPML2 ELD (human), residue K94-V290	This paper	N/A
TRPML2 ELD D113A (human), residue A92-K285	This paper	N/A
TRPML2 ELD D113N (human), residue A92-K285	This paper	N/A
TRPML2 ELD E114A (human), residue A92-K285	This paper	N/A
TRPML2 ELD D115A (human), residue A92-K285	This paper	N/A
TRPML2 ELD E114A/D115A (human), residue A92-K285	This paper	N/A
TRPML2 ELD D116A (human), residue A92-K285	This paper	N/A
NINTA agarose beads	Qiagen	Cat#30210
Bio SEC-3 (bead size 300 μm, Ø 4.6 mm, length 300 mm)	Agilent	Cat#5190-2513
HiLoad prep grade 16/60 Superdex 200	GE Healthcare	Cat#28-9893-35
ENrich SEC 650 10 x 300	Bio-Rad	Cat#7801650
4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)	Fisher BioReagents	Cat#BP310-1
Sigmafast protease inhibitor tablets	Sigma-Aldrich	Cat#S8820
Calcium chloride dihydrate	Carl Roth	Cat#T885.2
Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)	Fisher BioReagents	Cat#BP152-5
β-Mercaptoethanol	Carl Roth	Cat#4227.3
Sodium chloride	Carl Roth	Cat#10112640
RNase	Sigma-Aldrich	Cat#5503-500MG
Benzamide hydrochloride	Sigma-Aldrich	Cat#B6506-100G
Monosodium phosphate (NaH ₂ PO ₄)	Carl Roth	Cat#K300.3
Lysozyme	Sigma-Aldrich	Cat#L6876-10G
Imidazole	Carl Roth	Cat#998.4

(Continued on next page)

Continued

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Glycerol, 99+%	Fisher Chemical	Cat#12666707
KAPA HiFi PCR Kit	Kapa Biosystems	KR0368 – v11.17
DNase I	AppliChem GmbH	Cat#A3778
Disodium phosphate (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth	Cat#P030.3
Oligonucleotides		
For a complete list of oligonucleotides, see Table S3		
A92-K285 D113A fwd 5'gggcacggcgaagacgattac3'	Sigma Aldrich	N/A
A92-K285 D113A rev 5'cttcggccgtgccgagtag3'	Sigma Aldrich	N/A
A92-K285 E114A fwd 5'cacggacgcagacgattactcc3'	Sigma Aldrich	N/A
A92-K285 E114A rev 5'gtctcgtccgtgcccgag3'	Sigma Aldrich	N/A
A92-K285 D115A fwd 5'ggcgaagccgattactcctgc3'	Sigma Aldrich	N/A
A92-K285 D115A rev 5'gtaatcggcttctcgtgcc3'	Sigma Aldrich	N/A
A92-K285 D116A fwd 5'cgaagacgttactcctcgtcag3'	Sigma Aldrich	N/A
A92-K285 D116A rev 5'gagtaagcgtctcgtcgtgc3'	Sigma Aldrich	N/A
A92-K285 E114A/D115A fwd 5'cacggacgcagccgattactcc3'	Sigma Aldrich	N/A
A92-K285 E114A/D115A rev 5'cggctcgtccgtgcccg3'	Sigma Aldrich	N/A
Recombinant DNA		
pET11a TRPML2 ELD K94-V290	This paper	N/A
pET11a TRPML2 ELD G84-V290	This paper	N/A
pET11a TRPML2 ELD A92-K285	This paper	N/A
pET11a TRPML2 ELD G84-K285	This paper	N/A
pET11a TRPML2 ELD D113A A92-K285	This paper	N/A
pET11a TRPML2 ELD D113N A92-K285	This paper	N/A
pET11a TRPML2 ELD E114A A92-K285	This paper	N/A
pET11a TRPML2 ELD D115A A92-K285	This paper	N/A
pET11a TRPML2 ELD E114A/D115A A92-K285	This paper	N/A
pET11a TRPML2 ELD D116A A92-K285	This paper	N/A
Software and Algorithms		
ClustalOmega	Sievers et al., 2011	https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/
XDS	Kabsch, 2010	
Aimless	Evans and Murshudov, 2013	
Phaser	McCoy et al., 2007	
Buster	Bricogne et al., 2017	
COOT	Emsley et al., 2010	
MicroCal PEAQ-ITC Analysis Software	Malvern Panalytical	https://www.malvernpanalytical.com/
HOLE	Smart et al., 1996	http://www.holeprogram.org
VMD 1.9.1	Humphrey et al., 1996	http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/
Pymol	Schrodinger LLC	https://www.pymol.org/
APBS plugin for PyMOL	Lerner and Carlson, 2006	
Molecular Operating Environment (MOE 2015.10)	Chemical Computing Group, 2010	https://www.chemcomp.com/Products.htm
SWISS-MODEL	Waterhouse et al., 2018	https://swissmodel.expasy.org/
CORMAP	Franke et al., 2015	
GNOM	Svergun, D. I., 1992	
DAMMIF	Franke and Svergun, 2009	
CRY SOL 3	Franke et al., 2017	
MULCh 1.1.1	Whitten et al., 2008	
SASREF	Petoukhov and Svergun, 2005	

(Continued on next page)

Continued		
REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Massign	Morgner and Robinson, 2012	http://massign.chem.ox.ac.uk/
LabVIEW	National Instruments	https://www.ni.com/labview
BeStSel	Micsonai et al., 2018	http://bestsel.elte.hu/index.php
Origin 7.5	OriginLab	https://www.originlab.com/
CorelDrawX7	COREL	https://www.coreldraw.com/

CONTACT FOR REAGENT AND RESOURCE SHARING

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact, Ute Hellmich (u.hellmich@uni-mainz.de).

EXPERIMENTAL MODELS AND SUBJECT DETAILS

E. coli Rosetta-gamiTM 2(DE3) cells were used for recombinant expression of His₆SUMO-tagged TRPML2 ELD. The cells were cultured using standard protocols in lysogeny broth (LB) medium.

METHOD DETAILS

Cloning of Constructs

A gene fragment encoding human TRPML2 ELD (residue K94-V290) was ordered from GenScript and cloned into the pET11a-vector. The ELD construct was subsequently optimized for crystallization by modifying the N- and C-termini to yield final constructs G84-V290, G84-K285 and A92-K285. These were cloned by Quick change PCR with the Kapa HiFi PCR Kit. Final plasmids were sequenced to ensure sequence identity with databases (Uniprot accession nr Q8IZK6). TRPML2 ELD ¹¹³DEDD¹¹⁶ motif mutants were cloned in the A92-K285 background. Our ELD constructs were tagged with an N-terminal hexahistidine sequence for purification and a SUMO protein tag to enhance protein solubility.

Protein Expression and Purification

TRPML2 ELD construct purification follows the protocol by Li et al. (Li et al., 2017). ELD containing plasmids were transformed into Rosetta-gamiTM 2(DE3) cells. Cells were grown at 37°C in LB medium with 100 µg/mL ampicillin to an OD₆₀₀ of 1.0. After cooling the cell suspension to 22°C, expression was induced with 100 µM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) and cells were grown for another 15 h before being harvested by centrifugation (6200 g, 10 min, 4°C). Cell pellets were resuspended in lysis buffer (50 mM NaP_i (pH 8.0), 300 mM NaCl, 2.5% glycerol, 5 mM imidazole (solution I) before adding lysozyme, RNase, DNase, 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM benzamidine and one SIGMAFASTTM Protease Inhibitor Cocktail tablet). Cells were lysed by sonication and the lysate cleared by centrifugation (1 h, 48,384 g, 4°C). All purification steps were carried out at 4°C. The supernatant was loaded onto a Ni-NTA column and the flow through was discarded. The column was extensively washed with solution I, and the protein was subsequently eluted with solution II (50 mM NaP_i (pH 8.0), 300 mM NaCl, 2.5% glycerol, 500 mM imidazole). Ulp1 protease was added to the eluted protein in a 1:15 molar ratio to cleave off the His-SUMO-tag. The mixture was dialyzed overnight against 50 mM NaP_i (pH 8.0), 150 mM NaCl and 2.5% glycerol. After dialysis, a reverse IMAC was used to separate His-tagged Ulp1, cleaved His-SUMO-tag and uncleaved TRPML2 ELD from cleaved ELD. ELD containing fractions were identified using a 15% SDS-PAGE, concentrated and purified on a Superdex 200 column (GE Healthcare) (10 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl). Peak fractions containing pure ELD were collected, concentrated and stored at -20°C until further use.

X-Ray Crystallography

The TRPML2 construct encompassing residues 92-285 was crystallized at a concentration of 10 mg/mL in 10 mM HEPES pH 7.5 and 150 mM NaCl against a reservoir solution containing 30% Jeffamine M-600 with 50 mM CsCl in 0.1 M MES puffer pH 6.5 and directly cryopreserved by rapidly transferring the crystals into liquid nitrogen. The longer construct (residues 84-285) was equilibrated against 25% PEG 550 MME in 0.1 M Na-acetate pH 4.5 and the resulting crystals were soaked in mother liquor containing 20% glycerol prior to transferring them into liquid nitrogen to allow cryopreservation of the crystals. Diffraction data were collected on beamline ID30A-3 at the ESRF on a Dectris Pilatus 6M detector at 100 K and a wavelength of 0.9677 Å. Data were processed with XDS (Kabsch, 2010) and scaled and merged with Aimless (Evans and Murshudov, 2013). The high pH structure was solved by molecular replacement with Phaser (McCoy et al., 2007) searching for the two protomers present in the asymmetric unit using a monomer of the TRPML1 ELD structure (PDB: 5TJA) as search model while a preliminarily refined monomer derived from the high pH form was used as search model to phase the low pH structure by finding all eight monomers present in the asymmetric unit. Structures were refined at 2.0 Å (pH 6.5) and 2.95 Å (pH 4.5) with Buster to R-factors (R_{free}) of 0.185 (0.216) for the 2.0 Å structure and 0.18 (0.22) for the

e3 Structure 27, 1246–1257.e1–e5, August 6, 2019

2.95 Å structure employing loose and tight ncs restraints, respectively, and model building was carried out with Coot (Emsley et al., 2010).

Data Analysis and Comparison with Other TRPML Channels

Pore size profiles of different TRPML ELDs were calculated using the HOLE program (Smart et al., 1996). 15 Å was set as the maximum radius to be considered for the calculation. The origin of the pore axis was set at the center point of the four α -helices and the relative center was adjusted to the TRPML2 constriction. Visualization and analysis of HOLE results were conducted using Visual Molecular Dynamics (VMD) (Humphrey et al., 1996). Images were rendered and generated using the Tachyon ray tracer (for VMD) or in PyMOL. Electrostatic potential surfaces (EPSs) were calculated with the APBS plugin for PyMOL (Lerner and Carlson, 2006) after conversion of the downloaded PDB files to PQR files using PDB2PQR (Dolinsky et al., 2004). Since the TRPML3 structure at pH 4.8 (PDB: 6AYG; 4.65 Å resolution) (Zhou et al., 2017) is missing too many heavy atoms for accurate electrostatic calculations, a complete model was built with SWISS-MODEL (Waterhouse et al., 2018) using the TRPML3 FASTA-sequence corresponding to 6AYG and the original PDB file as a template. The TRPML2 homology model was built with Molecular Operating Environment (MOE 2015.10, <https://www.chemcomp.com/Products.htm>) using the cryo-electron microscopy structure of TRPML3 from common marmoset (PDB: 5W3S; 2.94 Å resolution) as the template (Hirschi et al., 2017), since this structure has the highest currently available resolution for a TRPML3 channel and TRPML2 shares higher overall sequence identity/similarity to TRPML3 compared to TRPML1.

Small Angle X-ray Scattering

SAXS data were collected at ESRF BM29 (Pernot et al., 2013) at 12.5 keV and a detector distance of 2.869 m, using the online liquid chromatography set-up. Detailed acquisition parameters are shown in Table S1. Construct TRPML2 ELD G84-K285 (10 mg/mL) was prepared in 10 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl and 20 μ L each loaded onto a BioSEC 3 column (bead size 300 μ m, \varnothing 4.6 mm, length 300 mm Agilent) column equilibrated in the appropriate buffer. All images were automatically processed using the beamline pipeline (Brennich et al., 2016) for identification of the elution peaks. Frames from the center of the peaks were compared for statistical consistency using CORMAP (Franke et al., 2015) and averaged to create idealized SAXS curves using Chromixs (Panjkovich and Svergun, 2018).

For each idealized curve, radii of gyration were determined via the Guinier approximation and pair distance distribution functions were calculated using GNOM (Svergun, 1992). Bead modeling was performed with DAMMIF (Franke and Svergun, 2009) in C1 symmetry for all datasets with oblate anisometry and for datasets collected at pH 4.5 additionally in C₄. Known crystal structures and atomistic models were compared to the experimental data with CRY SOL 3 (Franke et al., 2017) using default parameters. For building atomistic models of the octamer at pH 4.5, SASREF was used in C2 symmetry (Petoukhov and Svergun, 2005).

Native Mass Spectrometry/LILBID-MS (Laser Induced Liquid Bead Ion Desorption Mass Spectrometry)

A piezo-driven droplet generator (MD-K-130 from Microdrop Technologies GmbH, Norderstedt, Germany) was used to produce droplets of 30 μ m diameter with a frequency of 10 Hz at a pressure of 100 mbar. Samples were loaded directly into the droplet generator and the generated droplets were subsequently transferred to high vacuum and irradiated by a mid-IR laser directly in the ion source. The pulse length was 6 ns with a maximum energy of 23 mJ. The laser employed was a Nd:YAG laser operating at 10 Hz, the wavelength being tuned by a LiNbO₃ optical parametric oscillator to 2.94 μ m \pm 5 nm, the absorbing wavelength of the symmetric and asymmetric O-H stretching vibration of water. The laser power was measured by an optical power meter (PM100D, Thorlabs, Munich, Germany).

Droplet irradiation leads to an explosive expansion of the droplet containing the sample and solvated ions are released and analyzed in a homebuilt time-of-flight setup including a reflectron, operating at 10⁻⁶ mbar. The ion source is based on a Wiley-McLaren type design. The ions are accelerated into the grounded flight tube and guided towards the detector via a reflectron. The detector setup is based on a Daly-type detector optimized for the detection of high m/z ions. Both ion modes can be used, however, for this work ion detection was carried out in the negative mode. Spectra processing was done by using the software Massign (Morgner and Robinson, 2012) based on LabVIEW. LILBID was carried out on human TRPML2 ELD residue G84-V290 in a 50 mM Tris buffer at 12 μ M final concentration. The respective pH was adjusted by dialyzing the sample *o*N.

LILBID Settings

The voltage of the first (repeller) and second plate was set to -4 kV in the ion source. The third plate was grounded. The repeller was pulsed to -6.6 kV for 370 μ s after droplet irradiation. The pulse was applied between 2-20 μ s after the droplet irradiation (delayed extraction time). The einzel lenses were set to -3.0 kV. The reflectron was set to -7.2 kV. Post-acceleration was set to +17 kV at the MCP impact surface.

Isothermal Titration Calorimetry (ITC)

ITC measurements were carried out at 25°C using a MicroCal PEAQ-ITC Automated instrument (Malvern Panalytical, Malvern, UK). For each measurement, purified protein from a 4L LB culture was dialyzed overnight into a buffer (10 mM HEPES, 15 mM NaCl) with the desired pH value (pH 7.4, 6.5 and 4.5). For ITC measurements, protein concentrations were adjusted to 400 μ M (330 μ M for TRPML2 ELD E114A due to lower protein yields). After an initial delay of 60 s, 19 serial injections of 2 μ L (from a 15 mM CaCl₂ stock) every 150 s were carried out (first injection: 0.4 μ L). The reference power was set to 10 μ cal/s and stirring speed to 750 rpm. For each

Structure 27, 1246–1257.e1–e5, August 6, 2019 e4

condition, two independent measurements were performed. As control experiments, CaCl_2 was titrated into the respective buffers without protein. The thermograms of two independent measurements were processed using the MicroCal PEAQ-ITC Analysis Software assuming a “one set of sites” model and errors presented as standard deviations. Analysis of ΔH , $T\Delta S$ and N were not carried out due to the observed low Ca^{2+} affinities.

Analytical Size Exclusion Chromatography

Analytical SEC was performed with an ENrich SEC 650 10 x300 column (Bio-Rad) with 10 mM NaP_i , 15 mM NaCl adjusted to the respective pH value. Purified protein was dialyzed overnight into a buffer with the desired pH value. Protein concentration was 12.5 μM in 200 μL (pH 7.4 and 6.5) and 10.9 μM (pH 4.5), respectively. Before SEC runs, samples were set on ice for 30 min prior to measurement and (where applicable) incubated with 2 mM CaCl_2 or 2 mM β -mercaptoethanol.

CD Spectroscopy

CD measurements were carried out on a Jasco-815 CD spectrometer (Jasco, Gross-Umstadt, Germany) with a 1 mm quartz cuvette. Purified protein was dialyzed overnight into a buffer with the desired pH value. Protein concentrations were adjusted to 5 μM in 10 mM NaP_i , 15 mM NaCl set to the respective pH value. CaCl_2 was added from a 100 mM stock solution 30 min before each measurement and samples were incubated on ice. Spectra were recorded at 20°C in a spectral range between 190-260 nm with 1 nm scanning intervals, 5 nm band-width and 50 nm/min scanning speed. All spectra were obtained from the automatic averaging of ten measurements. Spectra were analyzed for secondary structure content using the BeStSel server (Micsonai et al., 2018).

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

Tables 1, S1, and S2 contain quantitative parameters related to data and refinement statistics for X-ray crystallography and SAXS experiments. For evaluation of ITC thermograms, the MicroCal PEAQ-ITC Analysis Software assuming a “one set of sites” model was used. For fitting of experimental data, the heat released from the i^{th} injection ($\Delta Q(i)$) was calculated using the following function:

$$\Delta Q(i) = Q(i) + \frac{dV_i}{V_0} \left[\frac{Q(i) + Q(i-1)}{2} \right] - Q(i-1)$$

Here, V_0 is the active cell volume and dV_i is the i^{th} injection volume. Errors for affinity constants present standard deviations based on two independent measurements. Further details can be found in the materials and STAR Methods section.

DATA AND SOFTWARE AVAILABILITY

Coordinates of the human TRPML ELD described in this article have been deposited in the PDB under the accession numbers 6HRR (pH 6.5) and 6HRS (pH 4.5). SAXS data are available from the SASBDB under the accession numbers: SASDEC7 (pH 7.4), SASDED7 (pH 7.4, 2 mM Ca^{2+}), SASDEE7 (pH 6.5, 0.5 mM Ca^{2+}), SASDEF7 (pH 6.5), SASDEG7 (pH 4.5) and SASDEH7 (pH 4.5, 0.5 mM Ca^{2+}).

Supplemental Information

Structure of the Human TRPML2 Ion

Channel Extracytosolic/Lumenal Domain

Kerstin K. Viet, Annika Wagner, Kevin Schwickert, Nils Hellwig, Martha Brennich, Nicole Bader, Tanja Schirmeister, Nina Morgner, Hermann Schindelin, and Ute A. Hellmich

Table S1: Small angle X-ray scattering (SAXS) parameters for human TRPML2 ELD at pH 4.5, 6.5 and 7.4, with and without Ca²⁺ (associated with Star Methods and Fig. 7)

(a) Sample details						
TRPML2 ELD	pH 7.4	pH 7.4 + Ca ²⁺	pH 6.5	pH 6.5 + Ca ²⁺	pH 4.5	pH 4.5 + Ca ²⁺
Organism	<i>Homo sapiens</i>					
Source	<i>E.coli</i> heterologous expression (see Star Methods)					
Description: sequence (including Uniprot ID + uncleaved tags), bound ligands/modifications, etc.	Q8IZK6, G84-K285					
Extinction coefficient ϵ (at 280 nm in M ⁻¹ cm ⁻¹)	20650					
Partial specific volume \bar{v} (cm ³ g ⁻¹)	0.731					
Mean solute and solvent scattering length densities and mean scattering contrast $\Delta\bar{\rho}$ (cm ⁻²)	2.927 (12.380-9.45) without Ca ²⁺ 2.952 (12.380-9.454) with Ca ²⁺					
Molecular mass M from chemical composition (kDa, monomer)	23.354					
Column type, loading concentration, (mg mL ⁻¹) injection volume (μ L), flow rate (mL min ⁻¹)	Agilent BioSEC 3, 300 μ m, \emptyset 4.6 mm. Length 300 mm, 10 mg/mL, 20 μ L, 0.13 mL/min					
Concentration range measured (mg/mL)	0-0.7	0-0.55	0-0.7	0-0.6	0-0.35	0-0.5
SEC running buffer composition	10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl	10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl ₂	10 mM HEPES pH 6.5, 150 mM NaCl	10 mM HEPES pH 6.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM CaCl ₂	10 mM HEPES pH 4.5, 150 mM NaCl	10 mM HEPES pH 4.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM CaCl ₂
SEC injection buffer composition	10 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl					
(b) SAS data collection parameters						
Source, instrument and description or reference	ESRF BM29 (Pernot et al., 2013)					
Wavelength (\AA)	0.99 \AA					
Beam geometry (size, sample-to-detector distance)	0.7 mm \times 0.7 mm, 2.849 m					
q -measurement range (nm ⁻¹)	0.06 – 4.9					
Absolute scaling method	Scattering intensity of water at 20 °C					
Basis for normalization to constant counts	Transmitted beam intensity measured by beamstop diode					
Method for monitoring radiation damage, X-ray dose where relevant	Stability of concentration corrected signal at small angles					
Exposure time, number of exposures	1 s per frame throughout SEC run					
Sample configuration	1.0 mm flow through capillary					
Sample temperature (°C)	20					

Table S1 continued.

c) Software employed for SAS data reduction, analysis and interpretation						
SAS data reduction to sample-solvent scattering, and extrapolation, merging, desmearing <i>etc.</i> as relevant	BM29 data processing pipeline (Brennich et al., 2016)					
Calculation of $\Delta\bar{\rho}$ and \bar{D} values from chemical composition	MULCh 1.1.1 (Whitten et al., 2008)					
Basic analysis	Chromixs, Primus (ATSAS 2.8) (Franke et al., 2017), ScÅtter					
Shape/bead modelling	DAMMIF (Franke and Svergun, 2009)					
Atomic structure modelling	CORAL					
Molecular graphics	Pymol					
(d) Structural parameters						
Guinier Analysis	pH 7.5	pH 7.5 + Ca ²⁺	pH 6.5	pH 6.5 + Ca ²⁺	pH 4.5	pH 4.5 + Ca ²⁺
$I(0)$ (cm ⁻¹)	0.048	0.037	0.047	0.040	0.060	0.070
R_g (nm)	3.4 ± 0.2	3.4 ± 0.4	3.4±0.35	3.4 ± 0.35	3.7	3.7
$q R_g$ -range	0.55 - 1.29	0.31-1.29	0.27-1.28	0.33-1.29	0.38-1.3	0.51-1.21
Quality-of-fit parameter (AutoRg Fidelity)	0.76	0.61	0.72	0.66	0.59	0.59
M from $I(0)$	n.a.					
$P(r)$ analysis	pH 7.5	pH 7.5 + Ca ²⁺	pH 6.5	pH 6.5 + Ca ²⁺	pH 4.5	pH 4.5 + Ca ²⁺
$I(0)$ (cm ⁻¹)	0.048	0.039	0.047	0.039	0.060	0.070
R_g (nm)	3.35	3.4	3.37	3.37	3.67	3.66
d_{max} (nm)	8.9	8.9	8.9	8.9	10.0	10.0
q -range (nm ⁻¹)	0.22-2.4	0.11-2.4	0.22-2.3	0.096-2.4	0.10-2.1	0.14-2.2
Quality-of-fit parameter (from GNOM)	0.9	0.88	0.91	0.91	0.97	0.92
Volume (nm ³)	135	134	140	135	285	280
Volume Analysis	pH 7.5	pH 7.5 + Calcium	pH 6.5	pH 6.5 + Calcium	pH 4.5	pH 4.5 + Calcium
Porod exponent	3.5	3.4	3.7	3.6	4.0	4.0
Porod volume (nm ³)	220	223	220	216	307	302
Correlated volume (nm ²)	610	590	630	626	904	890
Mass from correlated volume	90	81	95	94	180	170
Size & Shape based mass (kDa)	100	105	102	92	183	201
(e) Shape modelling results (a complete panel for each method)						
DAMMIF	pH 7.5	pH 7.5 + Ca ²⁺	pH 6.5	pH 6.5 + Ca ²⁺	pH 4.5	pH 4.5 + Ca ²⁺
q -range for fitting (nm ⁻¹)	0.22-2.4	0.11-2.4	0.22-2.3	0.096-2.4	0.10-2.1	0.14-2.2
Symmetry/anisotropy assumptions	P1, Oblate	P1, Oblate	P1, Oblate	P1, Oblate	P4 ₂	P4 ₂
χ^2 value	0.971	1.1	1.1	1.1	1.46	4.6
P value	0.0033	0.61	0.35	0	0.0002	0
Model volume and/or M estimate	94	93	94	92	198	182

Table S2: Calculation of SAXS ensemble resolution and NSD (normalized spatial discrepancy) values for Dammif models (associated with Table S1, Fig. 7 and S7)

Sample	Ensemble Resolution [Å]	mean value of NSD (standard deviation)
pH4.5, no Calcium	23 ± 2	0.609(0.183)
pH4.5, 0.5 mM Calcium	30 ± 2	0.799(0.108)
pH6.5, no Calcium	34 ± 3	0.767(0.081)
pH6.5, 0.5 mM Calcium	41 ± 3	0.889(0.067)
pH 7.5, no Calcium	33 ± 3	0.759(0.093)
pH 7.5, 2.0 mM Calcium	43 ± 3	0.957(0.059)

Table S3: Sequences of Oligonucleotides (associated with KEY RESOURCES TABLE)

OLIGONUCLEOTIDES	SOURCE	IDENTIFIER
pET 11a fwd 5'taaggatccggctgctaac3'	Eurofins	N/A
pET11a rev 5'atgtatatctccttcttaagttaacaaaattatttc3'	Eurofins	N/A
hisSUMO fwd 5'ttaagaaggagatatacatatggctagcggctcatccatc3'	Eurofins	N/A
hisSUMO rev 5'gtcttcttaccaccaatctgttcacgatg3'	Eurofins	N/A
K94-V290 fwd 5'tggtggtaagaagacaatacggcgc3'	Eurofins	N/A
K94-V290 rev 5'gcagccggatccttagacatattggcgctttttctg3'	Eurofins	N/A
K285 fwd 5'ggcagcacgcagaaataaggatccggctgctaacaagcccg3'	Sigma Aldrich	N/A
K285 rev 5'gcagccggatccttatttctgcgtgctgccgaagatgttcagatctttac3'	Sigma Aldrich	N/A
G84 fwd 5'gagcaaccagctggtggcgtttaagaagacaatacggcgcatttaaacac3'	Sigma Aldrich	N/A
G84 rev 5'gccaccaccagctggtgctcaggccaccaccaatctgttcacgatgg3'	Sigma Aldrich	N/A
A92 fwd 5'ggtggtgcgtttaagaagacaatacggcgcatttaaacac3'	Sigma Aldrich	N/A
A92 rev 5'cttctttaacgcaccaccaatctgttcacgatgg3'	Sigma Aldrich	N/A
A92-K285 D113N fwd 5'gggcacgaacgaagacgattac3'	Sigma Aldrich	N/A
A92-K285 D113N rev 5'cttcgttcgtgcccgagtag3'	Sigma Aldrich	N/A
A92-K285 D113A fwd 5'gggcacggccgaagacgattac3'	Sigma Aldrich	N/A
A92-K285 D113A rev 5'cttcggccgtgcccgagtag3'	Sigma Aldrich	N/A
A92-K285 E114A fwd 5'cacggacgcagacgattactcc3'	Sigma Aldrich	N/A
A92-K285 E114A rev 5'gtctgcgtccgtgcccgag3'	Sigma Aldrich	N/A
A92-K285 D115A fwd 5'ggacgaagccgattactcctgc3'	Sigma Aldrich	N/A
A92-K285 D115A rev 5'gtaatcggcttcgtccgtgcc3'	Sigma Aldrich	N/A
A92-K285 D116A fwd 5'cgaagacgcttactcctgctcag3'	Sigma Aldrich	N/A
A92-K285 D116A rev 5'gagtaagcgtcttcgtccgtgc3'	Sigma Aldrich	N/A
A92-K285 E114A/D115A fwd 5'cacggacgcagccgattactcc3'	Sigma Aldrich	N/A
A92-K285 E114A/D115A rev 5'cggtgcgtccgtgcccg3'	Sigma Aldrich	N/A

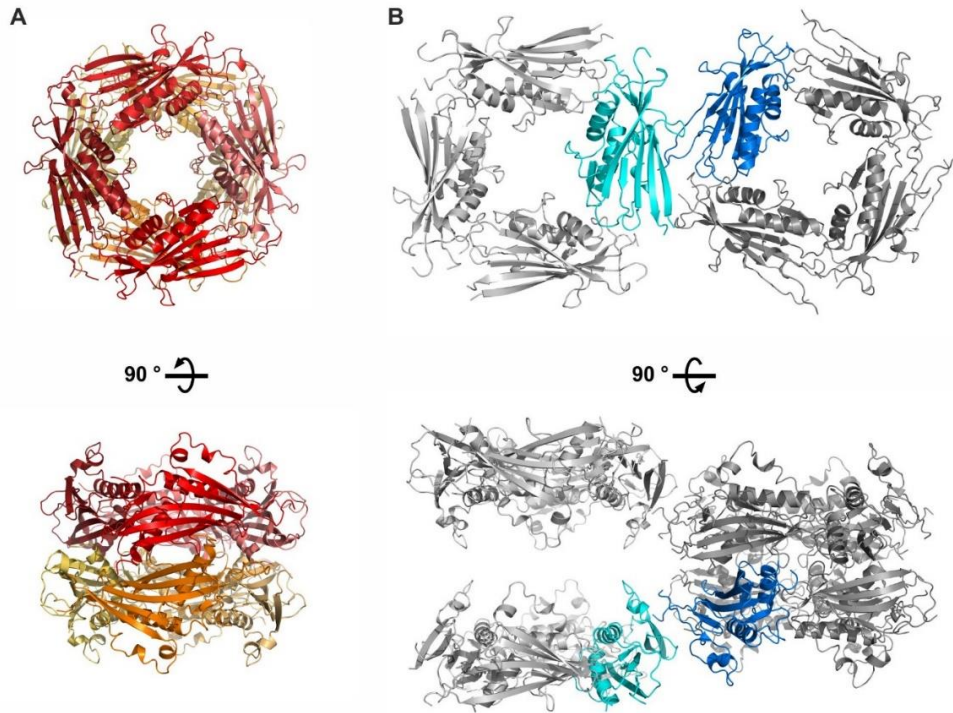


Fig. S1: Unit cell architecture for crystal structures of the human TRPML2 ELD tetramer at pH 4.5 and pH 6.5 at 2.95 Å and 2.0 Å, respectively, related to Fig. 1, Fig. 7 and Table 1. **(A)** The asymmetric unit of the TRPML2 ELD structure at pH 4.5 (space group $P2_1$) consists of two stacked tetrameric rings assembled into an octamer (shown in red and yellow hues). **(B)** The two TRPML2 monomers present in the asymmetric unit of the I422 crystals grown at pH 6.5 are shown as blue and cyan subunits, respectively. Via the crystallographic fourfold axis each assembles into a tetramer (top), the functional unit of TRPML2. Via additional twofold crystallographic symmetry elements one monomer assembles into an octamer (dark blue monomer, right side, bottom), which is equivalent to that formed in the $P2_1$ crystals, while the two tetramers formed for the second monomer (cyan monomer, left side, bottom) do not interact with each other.

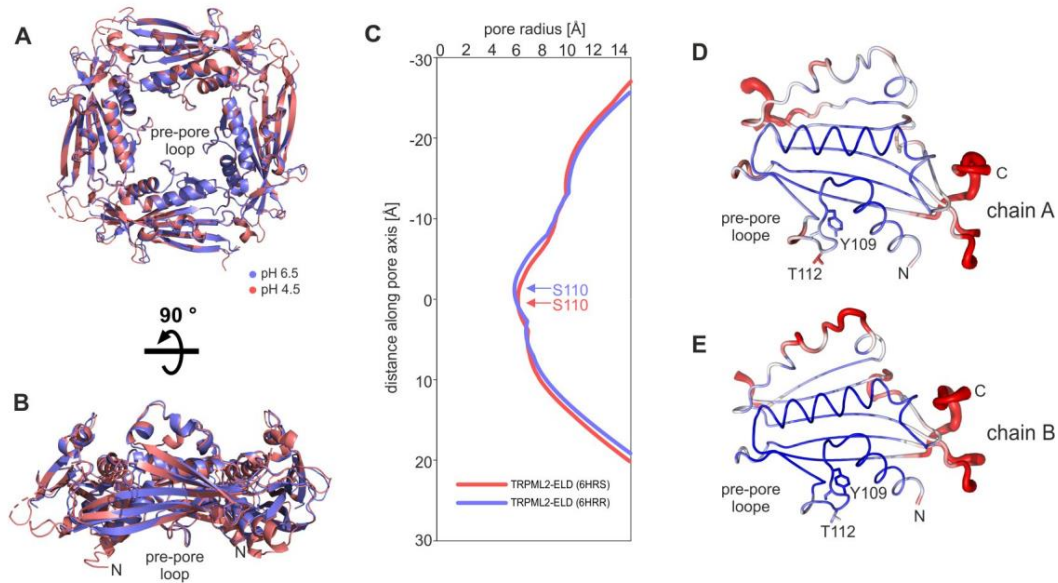


Fig. S2: Comparison of the crystal structures of human TRPML2 ELD at pH 4.5 and pH 6.5, related to Fig. 1, 2, 4 and Table 1. **(A, B)** Overlay of the two tetramers (at 2.0 Å (pH 6.5), blue; at 2.95 Å (pH 4.5), red; overall rmsd of 0.89 Å) shows that pH does not induce major effects on the overall structure. **(C)** Comparison of the pore diameter of TRPML2 ELD at pH 4.5 (red) and pH 6.5 (blue). Pore dimensions were calculated with HOLE (Smart et al., 1996) and the relative center was adjusted to the TRPML2 constriction at pH 4.5 (centered at residue S110). The constriction of TRPML2 ELD at pH 6.5 is displaced by +1.1 Å (i.e. further away from the membrane plane) relative to the TRPML2 ELD at acidic pH. **(D, E)** B-factors in chain A (D) and chain B (E) of the 2.0 Å structure ranging from rigid (blue, B-factors ≤ 40 Å²) to flexible (red, B-factors ≥ 80 Å²). Notably, the ELD monomers are very rigid, including the pre-pore loop and a G/S/T rich stretch preceding the pre-pore loop (¹⁰⁸GYSGT¹¹²). Residues Y109 and T112 are indicated as sticks.

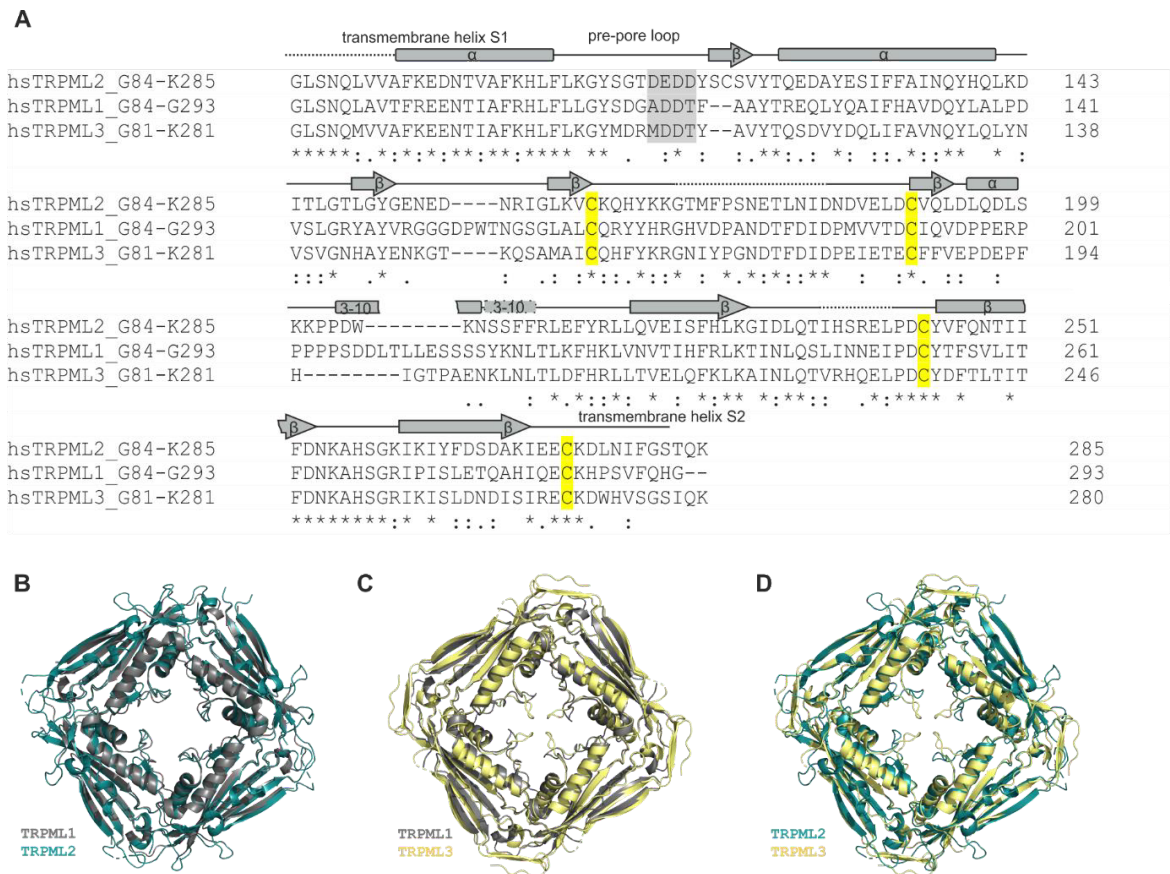


Fig. S3: Comparison of the three human TRPML channel extracytosolic/luminal domains (ELDs), related to STAR Methods, Fig. 2 and 4 (A) Sequence alignment of the ELDs (with Clustal Omega, UniprotKBs: Q9GZU1, Q8IZK6, Q8TDD5). The acidic residues in the pre-pore loop are indicated by the grey box, the cysteine residues forming disulfide bonds (C164/C190 and C243/C274 in TRPML2) are highlighted in yellow. The secondary structure cartoon depiction follows the crystal structures of our TRPML2 ELD, but is highly similar in all three TRPML channels (α -helices are displayed by cylinders, β -sheets by arrows and unresolved regions by dotted lines). Of note, the teepee-shaped extension on top of the ELD containing the 3_{10} - α - 3_{10} helices has to date only been resolved in our structures. Therefore, it is unclear whether a similar architecture is also present in TRPML1 and TRPML3 or whether this region is more mobile in these channels. (B-D) Pairwise structure alignments of the three human TRPML channel ELDs (PDBs: 5TJB (TRMPL1), 6HRS (TRPML2), 6AYG (TRPML3)) demonstrates that the overall ELD structure is highly conserved but displays obvious differences in the central pre-pore loop region.

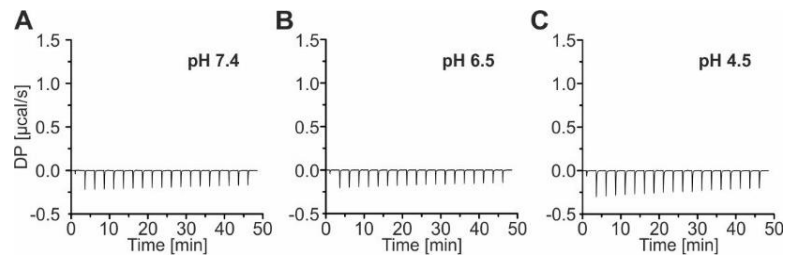


Fig. S4: Controls for Isothermal Titration Calorimetry (ITC) on TRPML2 ELD, related to Fig. 3 (A-C)
Heat signatures of Ca^{2+} titration into buffers with respective pH values.

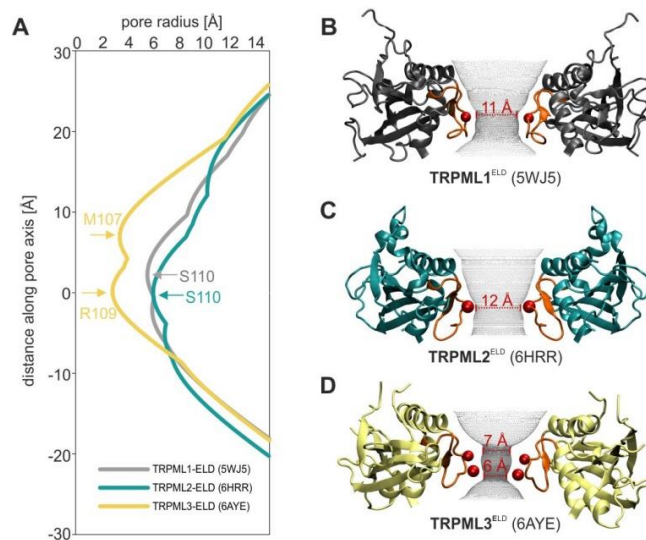


Fig. S5: ELD pore architecture at near-neutral pH, related to Fig. 4 (A) Comparison of ELD pre-pore radii for human TRPML1 (grey; PDB: 5WJ5; pH 7.0), TRPML2 (teal; PDB: 6HRR; pH 6.5) and TRPML3 (yellow, PDB: 6AYE; pH 7.4) ELD at near neutral pH values. Pore dimensions were calculated with HOLE (Smart et al., 1996) and the relative center was adjusted to the TRPML2 constriction (centered at residue S110^{ML2}). The TRPML2 pre-pore diameter at pH 6.5 at the narrowest point is 12.0 Å, whereas the TRPML1 pre-pore diameter is a bit smaller (11.1 Å) and also formed by S110. Interestingly, at pH 7.4, the TRPML3 ELD exhibits two constriction points (6.9 Å/M107 and 5.7 Å/R109), and both are significantly narrower in contrast to TRPML1 and TRPML2. Compared to TRPML2, the TRPML1 and TRPML3 constrictions at near-neutral pH are displaced by +2.2 Å (S110^{ML1}), +0.2 Å (R109^{ML3}) and +6.9 Å (M107^{ML3}) respectively, away from the transmembrane ion channel pore. (B-D) Architecture of the pre-pore funnel. The amino acids at the constriction point are indicated by red spheres (S110^{ML1}, S110^{ML2}, M107/R109^{ML3}, respectively). The front and rear subunits were removed for clarity. (For comparison of channels under acidic conditions, see associated Fig. 4)

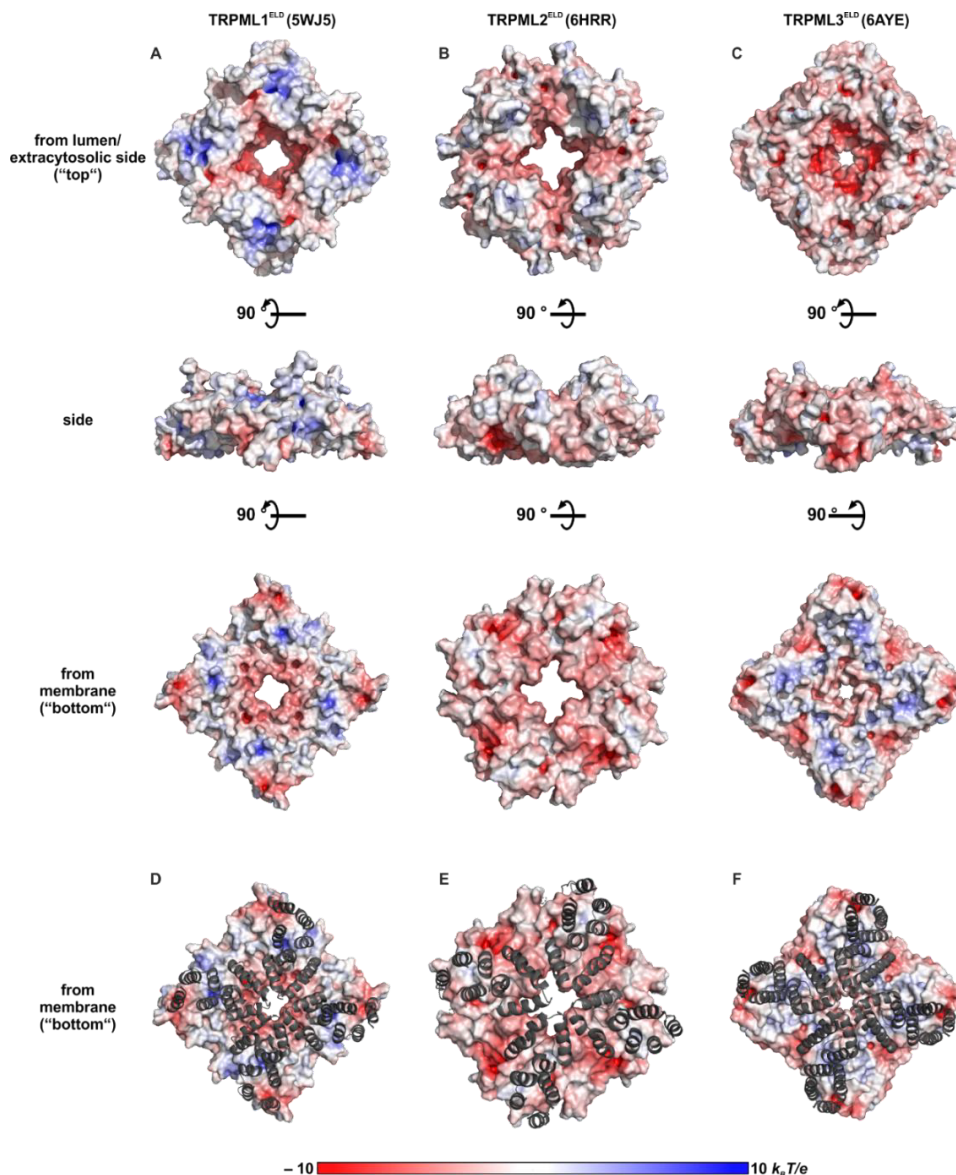


Fig. S6: Comparison of surface electrostatics of the three human TRPML channel ELDs at near neutral pH, related to Fig. 5 and S5. **(A-C)**. The top row shows the ELD as seen from the extracytosolic/luminal side. Note the dramatic differences between pre-pore opening and architecture of the central cavity as well as the pronounced “charge channels” for TRPML2 and to a lesser extent ML1. In contrast, the ML3 channel ELD shows a pronounced electronegative ring around its ELD opening, which is also significantly more closed compared to TRPML1/ML2 (see Fig. S5). The middle row shows side views while the bottom row features views from the membrane. The structures were selected from available structures of human TRPML channels in the absence of agonists at near neutral pH values. **(D-F)** Bottom view of ELD with transmembrane helices shown in grey (the lower part of the TMDs has been removed for clarity). Most of the transmembrane helices are tethered to or around positively or negatively charged regions of the ELDs.

Shown are TRPML1 ELD at pH 7.0 (PDB: 5WJ5), our TRPML2 ELD at pH 6.5 (PDB: 6HRR) and TRPML3 at pH 7.4 (PDB: 6AYE). For the TRPML2 transmembrane domains, a homology model based on the cryo-electron microscopy structure of TRPML3 from common marmoset (PDB: 5W3S) (Hirschi et al., 2017) was created.

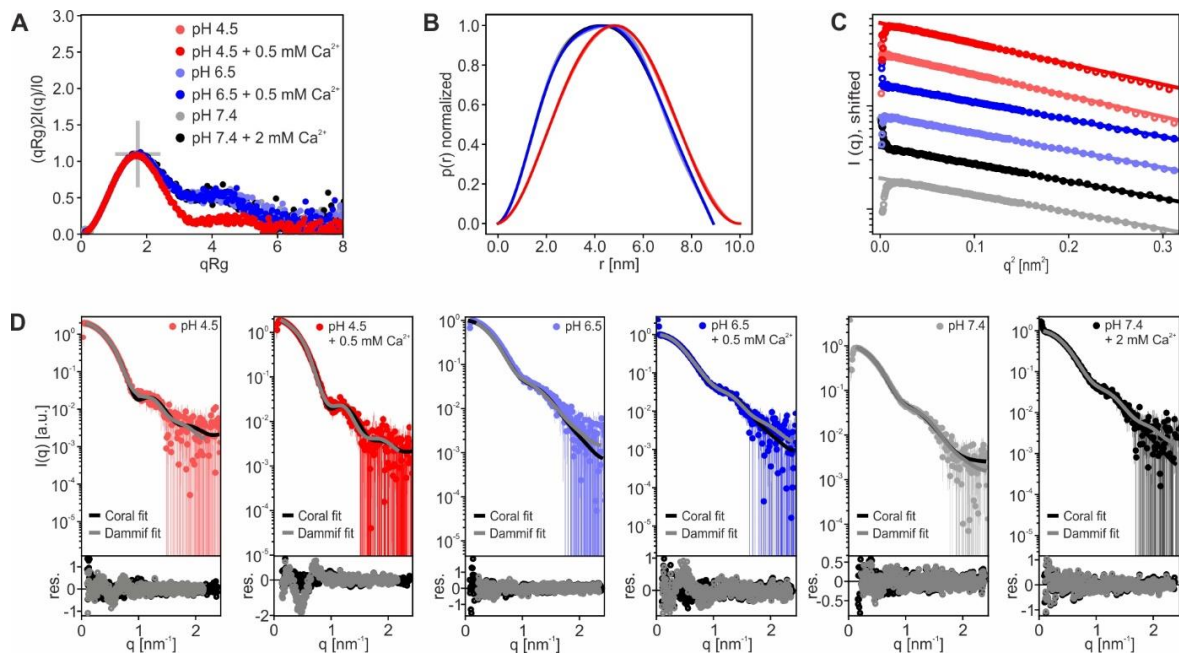


Fig. S7: SAXS data of TRPML2 ELD, related to Fig. 7. **(A)** Normalized Kratky plots of the human TRPML2 ELD under conditions chosen to represent the different endolysosomal compartments. **(B)** Pair distance distribution functions of TRPML2 ELD (color coded as in (A)) **(C)** Guinier approximation for TRPML2 ELD (color coded as in (A)) and offset along the y-axis. Closed symbols mark the region of data used for the fit. Associated with Fig. 6, STAR Methods and Table S1. **(D)** Coral and Dammif fits of the SAXS data of TRPML2 ELD under varying conditions corresponding to the models shown in Fig. 7A, B.

5 Synthese von (potenziellen) TRPML-Aktivatoren

5.1 Einleitung und Zielsetzung

Bei der Erforschung der physiologischen und biophysikalischen Funktionen sowie zur Aufklärung der pathophysiologischen Konsequenzen bei mutierten Isoformen von (TRP(ML))-Ionenkanälen spielen selektive Liganden und Aktivatoren eine essenzielle Rolle.^[85,208-209] Darüber hinaus können synthetische Modulatoren für die Behandlung diverser Krankheiten, deren Ursache in (partiell) defekten Ionenkanälen zu finden ist, möglicherweise von therapeutischem Nutzen sein.^[104,208,210] Die Signifikanz einer solchen Strategie wird am Beispiel der Therapie der Cystischen Fibrose besonders eindrucksvoll demonstriert, bei der genetische Defekte im *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR) zu einer Fehlfunktion eines Chloridionenkanals führen. In diesem Fall wurden niedermolekulare synthetische Liganden entwickelt, um die Ionenleitfähigkeit von CFTR bei der $\Delta F508$ -Mutation wiederherzustellen.^[211-212] In den letzten Jahren wurden zahlreiche Agonisten für TRPML-Ionenkanäle beschrieben, die unterschiedliche chemische Grundgerüste (*scaffolds*), Aktivitätsprofile und Selektivitäten aufweisen.^[85,98,104,213] Grimm *et al.* identifizierten 2010 in einem *High-Throughput-Screening* mit über 217.000 Verbindungen 53 TRPML3-selektive Agonisten, die diversen Chemotypen, darunter sekundäre (Aryl)sulfonamide (**SF-22**-Typ (**60**, $EC_{50} = 0.66 \pm 0.06 \mu M$)), Aminoacetamide (**SF-51**-Typ (**61**, $EC_{50} = 0.93 \pm 0.20 \mu M$)), Isoxazoline (**SN-2**-Typ (**63**, $EC_{50} = 1.13 \pm 0.16 \mu M$)) etc., zugeordnet werden (**Abb. 5.1**).^[85] In der Folge wurden in zusätzlichen Arbeiten chemische Modifikationen zur Verbesserung der Selektivität und Aktivität an diesen Leitstrukturen vorgenommen. Für **SF-22** konnte parallel zum TRPML3-Agonismus eine teilweise Aktivierung des TRPML1-Kanals demonstriert werden, woraus später von Chen *et al.* (2014) der TRPML1-Aktivator **MK6-83** durch Substitution des 5-Chlor-Restes gegen eine Methylgruppe entwickelt wurde ($EC_{50}(\text{TRPML1}) = 0.11 \pm 0.01 \mu M$) (vgl. auch **Kap. 3**).^[104] Bei **ML-SA1** handelt es sich um die hydrierte Variante von **SF-51**, die sich als vergleichsweise potenter gegenüber TRPML1 bei gleichzeitigem TRPML3-Agonismus erwies.^[213] Durch Modifikation des Substitutionsmusters am Phenylrest des Isoxazolins **SN-2** konnten Plesch *et al.* 2018 den ersten TRPML2-selektiven Agonisten generieren (**ML2-SA1**, $EC_{50}(\text{TRPML2}) = 1.24 \pm 0.12 \mu M$). In allen Fällen wurden diese TRPML-Aktivatoren u. a. in zellbasierten Modellen zur Charakterisierung der physiologischen Effekte resultierend aus der TRPML-Aktivierung eingesetzt. Darüber hinaus war es mit dem nicht-selektiven TRPML-Aktivator **ML-SA1** kürzlich möglich, Kryo-EM-Strukturen des humanen TRPML1- und TRPML3-Kanals im Agonist-gebundenen Zustand und somit die zugrundeliegenden regulatorischen Mechanismen hinsichtlich der Öffnung des Ionenkanals aufzudecken.^[111-112,114] **ML-SA1** bindet hierbei innerhalb einer hydrophoben Tasche zwischen der Porenhelix 1 (PH1), den Transmembranhelices S5 und S6 sowie Helix 6 einer benachbarten Untereinheit, wobei eine Dilatation des unteren Selektivitätsfilters induziert wird (**Abb. 5.2**).^[111]

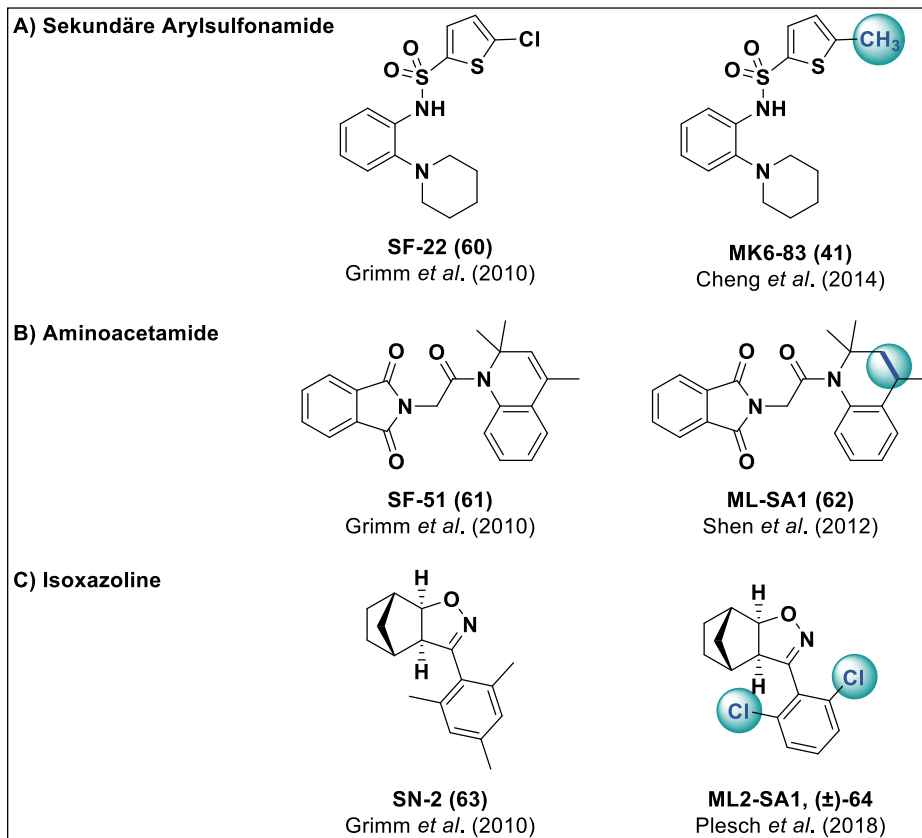


Abb. 5.1: Strukturen ausgewählter TRPML-Aktivatoren, eingeteilt in entsprechende *Scaffolds*. Chemische Modifikationen aus den Präkursormolekülen sind farbig gekennzeichnet.

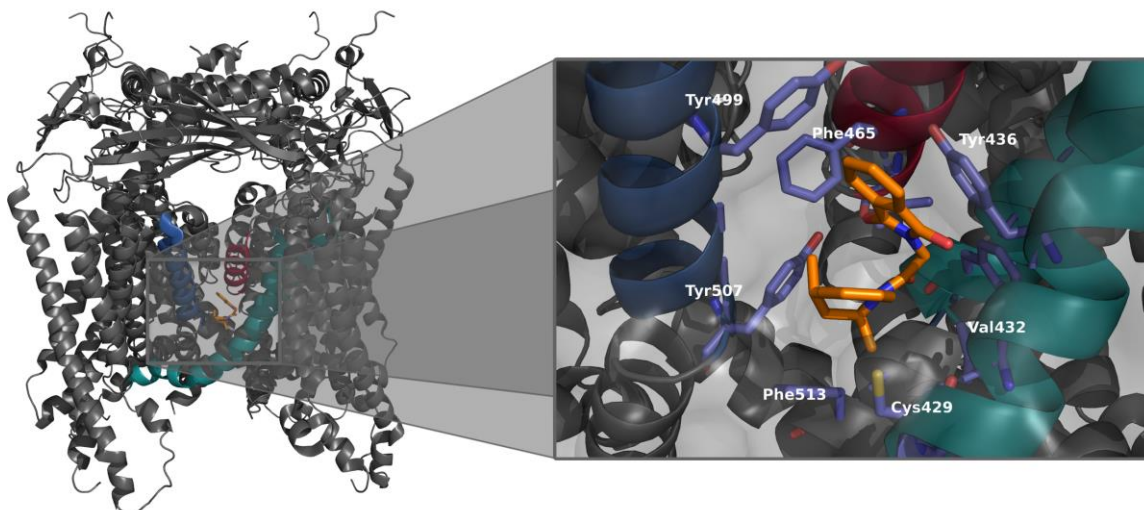


Abb. 5.2: Bindestelle von **ML-SA1** (orange) innerhalb des TRPML1-Ionenkanals (PDB: 5WJ9).^[111] Rot: Porenhelix 1 (PH1); Petrol: Transmembranhelices S5 und S6; Blau: Transmembranhelix S6 der benachbarten Untereinheit.

Da TRPML-Ionenkanäle eine fundamentale Funktion im endolysosomalen System sowie bei der Signaltransduktion einnehmen und somit eine wichtige Rolle für die menschliche Gesundheit spielen, werden diese als attraktive Zielproteine (*Targets*) für die Behandlung lysosomaler Speicherkrankheiten, Autophagie-assoziiierter Störungen und sogar einiger Krebsarten in Betracht

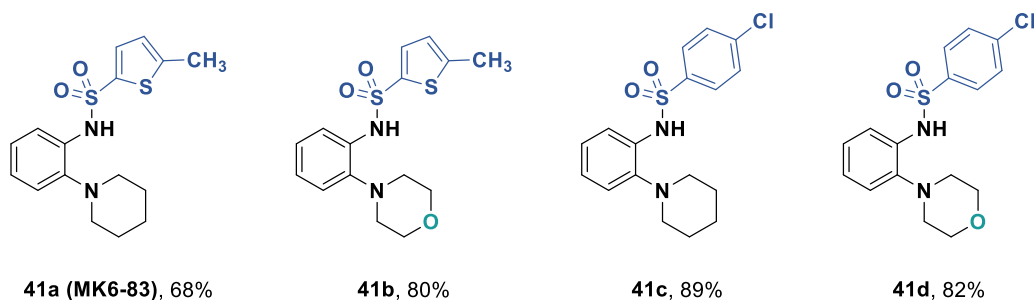
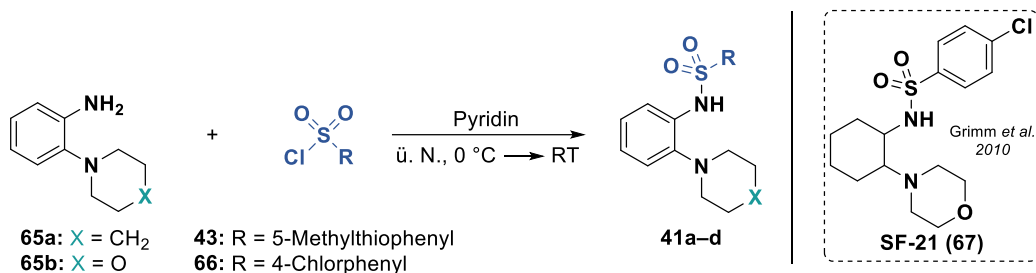
gezogen.^[208,210] Dabei können die bestehenden TRPML-Aktivatoren als Grundlage genutzt werden, um noch potentere und selektivere Agonisten zu entwickeln, welche schließlich bezüglich ihres therapeutischen Nutzens validiert werden können.

Im Rahmen dieses Projektes sollten die TRPML-Aktivatoren **MK6-83** und **SF-51** als Leitstrukturen dienen, um systematische Modifikationen über chemische Derivatisierungen einzuführen. Demnach bestand das Ziel darin, eine repräsentative Substanzbibliothek bereitzustellen, mithilfe derer es zukünftig möglich sein soll, aus den Variationen in den Molekülen und den biologischen Daten Struktur-Wirkungs-Beziehungen abzuleiten und somit Informationen zur Beeinflussung der Affinität und Selektivität zu den TRPML-Proteinen zu gewinnen. Die Zielsetzung umfasste auch die Synthese der bekannten Aktivatoren **MK6-83**, **SF-51** sowie **ML2-SA1** zur Verwendung als Referenzliganden bei der biologischen Evaluierung und als Werkzeuge in zusätzlichen biochemischen Analysen, welche in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von [REDACTED] (Johannes Gutenberg-Universität Mainz) durchgeführt werden sollen.

5.2 Ergebnisse und Diskussion

5.2.1 Synthese der sekundären Arylsulfonamide (MK6-83 und Derivate)

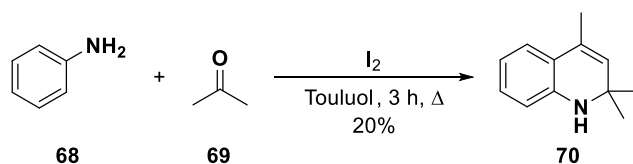
Die Leitstrukturoptimierung von **SF-22** durch Chen *et al.* beinhaltete bereits systematische Modifikationen im Phenyl- und Piperidinring, Thiophenrest und bei der Sulfonamideinheit.^[104] Dabei erwiesen sich die meisten strukturellen Änderungen mit Ausnahme der Einführung der Methylgruppe an der 5-Position des Thiophenbausteins als nachteilig.^[104] Interessanterweise wurde im zuvor von Grimm *et al.* bewerkstelligtem *High-Throughput-Screening* mit **SF-21** (**Schema 5.1**, oben rechts) ein zu **SF-22** analoges Sulfonamid beschrieben, welches parallel zum TRPML3-Agonismus eine Aktivierung des TRPML2-Ionenkanals hervorruft.^[85] Dieses unterscheidet sich von **MK6-83** durch die Anwesenheit eines zentralen Cyclohexyl- anstelle des Phenylrings und weist einen Morphinrest auf, während die Thiopheneinheit durch einen bioisosteren (*p*-Chlor)Phenylrest ersetzt ist. Inspiriert von dieser Struktur wurden sowohl der Morphinrest als auch der *p*-Chlorophenylbaustein genutzt, um den TRPML1-Aktivator **MK6-83** zu derivatisieren. Durch Kombination der o. g. Substituenten ergeben sich zusätzlich zu **MK6-83** drei weitere Analoga, die in Anlehnung an die Vorschrift von Chen *et al.*^[104] aus dem 2-Piperidino- bzw. 2-Morpholinoanilin und dem jeweiligen Sulfonsäurechlorid (**43** und **66**) synthetisiert wurden (**Schema 5.1**). Hierbei handelt es sich um Modifikationen, die nicht Bestandteil der Leitstrukturoptimierung von Chen *et al.* waren. Mithilfe dieser neuen potenziellen TRPML-Modulatoren soll neben ihrem Aktivierungsprofil eruiert werden, ob der von **SF-21** induzierte TRPML2-Agonismus auf einen bzw. beide Einheiten oder doch möglicherweise auf die nicht-planare Konformation des zentralen Cyclohexylrestes zurückzuführen ist.



Schema 5.1: Synthetisierte Arylsulfonamide und Strukturen der TRPML-Aktivatoren **MK6-83 (41a)**, unten links) sowie **SF-21 (67)**, oben rechts). Alle Reaktionen wurden gemäß den Vorschriften in **Kap. 10.7.1** durchgeführt. Die angegebenen Ausbeuten beziehen sich auf die isolierten Verbindungen nach Reinigung.

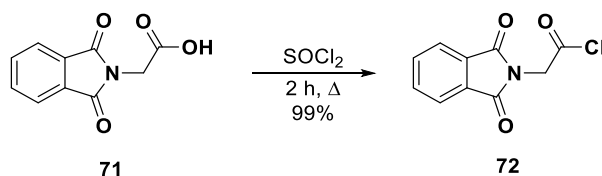
5.2.2 Synthese der *N*-Phthaloylglycine/Aminoacetamide (SF-51 und Derivate)

Die Synthese des TRPML-Aktivators **SF-51** erfolgte in zwei Stufen, wobei der Aminbaustein 2,2,4-Trimethyl-1,2-dihydrochinolin (TMQ, **70**) in einer Iod-katalysierten Kondensationsreaktion (analog zur *Skraup*-Synthese bzw. *Doebner-Miller*-Reaktion) aus Anilin und Aceton dargestellt wurde (**Schema 5.2**).^[214]



Schema 5.2: Darstellung von 2,2,4-Trimethyl-1,2-dihydrochinolin (TMQ, **70**).

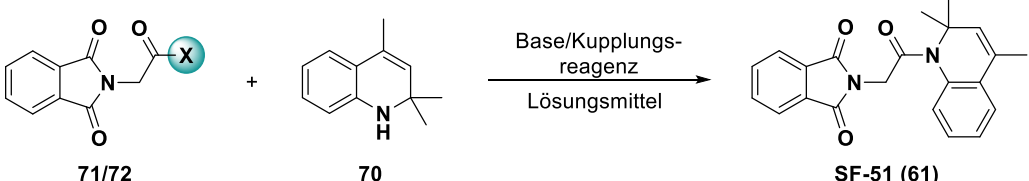
Im nächsten Schritt sollte TMQ schließlich mit 2-(1,3-Dioxisoindolin-2-yl)acetylchlorid (**72**) umgesetzt werden, welches aus der Reaktion von *N*-Phthaloylglycin (**71**) und Thionylchlorid in nahezu quantitativer Ausbeute generiert wurde (**Schema 5.3**).



Schema 5.3: Synthese des Säurechlorids **72** aus *N*-Phthaloylglycin (**71**).

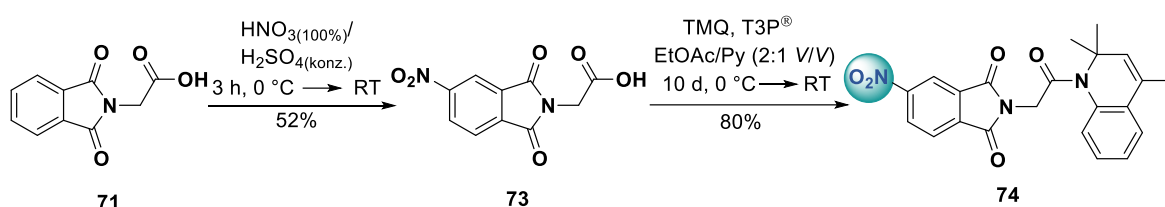
Die anschließende Transformation gelang jedoch nicht ohne weiteres, da unter den initial gewählten Reaktionsbedingungen (Reaktion des Säurechlorids mit dem sekundären Amin TMQ) kein Umsatz festgestellt und lediglich die Edukte reisoliert wurden (Einträge 1–3, **Tab. 5.1**). Um die Bildung eines vermutlich erforderlichen anionischen Nucleophils von TMQ zu erleichtern, wurden starke anorganische Basen (K_2CO_3 bzw. Cs_2CO_3) im polar-aprotischen Lösemittel DMF eingesetzt (Einträge 4 und 5).^[215] Hier konnte das gewünschte Produkt lediglich in 26% Ausbeute bei der Verwendung von K_2CO_3 gewonnen werden; andere Versuche zur Erhöhung der Nucleophilie (siehe auch Eintrag 6) erwiesen sich als gänzlich ungeeignet. Erst nach mehreren Optimierungsansätzen wurden akzeptable Bedingungen gefunden, um einen synthetischen Zugang zu **SF-51** mit moderaten Ausbeuten (hier: 41%) zu erhalten (Eintrag 8). Hierbei wurde ein von Dunetz *et al.* beschriebenes Verfahren zur Knüpfung der Amidbindung zwischen *N*-Phthaloylglycin (**71**) und TMQ in Gegenwart des Kupplungsreagenzes $T_3P^{\text{®}}$ (Propanphosphonsäureanhydrid) in Pyridin angewandt. Unter diesen Voraussetzungen ist es möglich, auch schwach nucleophile und sterisch anspruchsvollere Aminderivate zu einer Reaktion mit der entsprechenden Carbonsäure zu befähigen.^[216]

Tab. 5.1: Optimierungsansätze zur Darstellung von **SF-51**.

#	X	Reaktionsbedingungen	Bemerkung
		 <p style="text-align: center;"> $\text{71/72} + \text{70} \xrightarrow[\text{Lösungsmittel}]{\text{Base/Kupplungsreagenz}}$ </p>	
1	Cl	NEt_3 (1.5 Äquiv.), 1,4-Dioxan, ü. N., RT	kein Umsatz
2	Cl	NEt_3 (1.5 Äquiv.), CH_2Cl_2 , ü. N., RT	kein Umsatz
3	Cl	abs. Pyridin, ü. N., $0\text{ }^{\circ}C \rightarrow RT$	kein Umsatz
4	Cl	Cs_2CO_3 (2.3 Äquiv.), DMF, 8 h, $80\text{--}110\text{ }^{\circ}C$	geringer Umsatz, komplexes Produktgemisch
5	Cl	K_2CO_3 (2.6 Äquiv.), DMF, 72 h, $110\text{ }^{\circ}C$	26%*
6	Cl	$LiHMDS$ (1.0 M in THF, 3.0 Äquiv.), THF, 3 h, $-78\text{ }^{\circ}C \rightarrow RT$	kein Umsatz
7	OH	$T_3P^{\text{®}}$ (50% in EtOAc), NMM, EtOAc, 78 h, $0\text{ }^{\circ}C \rightarrow RT$	komplexes Produktgemisch
8	OH	$T_3P^{\text{®}}$ (50% in EtOAc), Py/EtOAc (1:2 V/V), 78 h, $0\text{ }^{\circ}C \rightarrow RT$	41%*

*Isolierte Ausbeute nach chromatographischer Reinigung.

In Analogie zu **SF-51** wurde zudem ein 5-Nitro-Derivat (**74**) über Nitrierung von *N*-Phthaloylglycin mittels Nitriersäure und anschließender T₃P®-Kupplung generiert (**Schema 5.4**). Sofern bei dieser Modifikation die Aktivität erhalten bleibt und keine Beeinträchtigung durch den zusätzlichen Substituenten zu beobachten ist, könnte eine darauffolgende Reduktion zur Aminogruppe mit anschließender Funktionalisierung genügend Spielraum für weitere Untersuchungen zu Struktur-Wirkungs-Beziehungen bieten.



Schema 5.4: Synthese des 5-Nitro-substituierten **SF-51**-Derivates **74**.

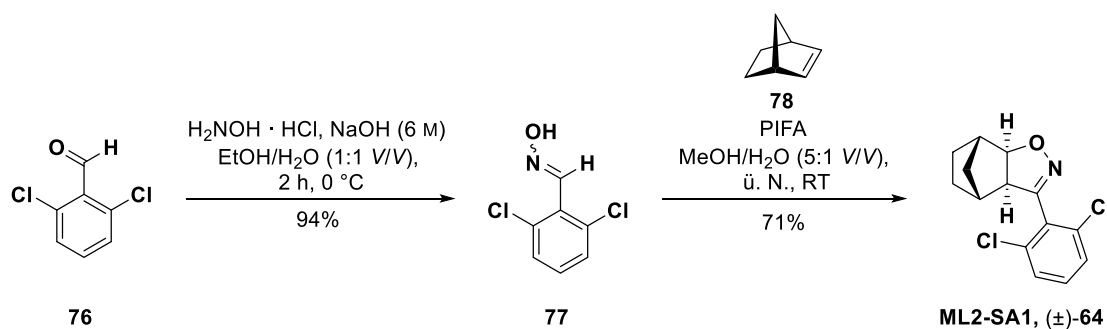
Im Rahmen der Dissertation lag der initiale Fokus zur Analyse der Struktur-Wirkungs-Beziehungen auf der Variation der Aminkomponente, da sich hieraus die Leitstruktur **SF-51** relativ einfach systematisch modifizieren und eine entsprechende Substanzbibliothek mit geringem Zeitaufwand etablieren lässt. Erst in zukünftigen Folgeexperimenten soll anhand der Befunde der Einfluss verschiedener Substituenten in der Phthalimido-Einheit untersucht werden. Zum Zeitpunkt der Bearbeitung dieses Projektes lagen noch keine Informationen zur Bindestelle und den Ligand-Rezeptor-Interaktionen des **SF-51/ML-SA1**-Chemotyps innerhalb des TRPML1- bzw. TRPML3-Ionenkanals vor, weshalb in diesem Fall auch kein strukturbasiertes Design neuer Aktivatoren verfolgt werden konnte. Aus diesem Grund wurde ein kombinatorischer Ansatz zur Erueierung neuer TRPML-Liganden in Betracht gezogen. Bei der Auswahl der Aminkomponente zur Darstellung neuer **SF-51**-Derivate wurden vor allem primäre und sekundäre aromatische Amine mit unterschiedlichem Substitutionsmuster auf Basis der bereits vorhandenen *in-house*-Chemikalienbibliothek berücksichtigt. Die grundlegende hydrophobe Eigenschaft des Aminbausteins analog zum TMQ-Rest der Leitstruktur **SF-51** sollte dabei erhalten bleiben. Die Strukturen sollten lediglich durch kleine Modifikationen moderat variiert werden, mit der Absicht, sich den optimalen physikochemischen Eigenschaften für die TRPML-Aktivierung sukzessive anzunähern.

Erwartungsgemäß konnten die sekundären und tertiären Amide im Vergleich zur Synthese von **SF-51** aufgrund des geringeren sterischen Einflusses der eingesetzten Amine durch Reaktion mit dem Säurechlorid **72** in Gegenwart von Triethylamin bei Raumtemperatur erhalten werden (**Schema 5.5**). Die so generierte Bibliothek umfasste Derivate mit Substituenten unterschiedlicher Größe, Polarität sowie H-Donor- und Akzeptoreigenschaften. Ein Hybridmolekül, in welchem der Phthalimido-Teil von **SF-51** und die 2-Piperidinoanilin-Einheit von **MK6-83** vereint sind (**75j**), soll das Spektrum zusätzlich erweitern.

Substanzbibliothek ist lediglich für **75r-t** (tertiäre Amide) gegeben. Aus den Befunden von Plesch *et al.* geht hervor, dass diese Substanzen in Bezug auf alle drei TRPML-Isoformen ebenfalls keine nennenswerte Aktivität aufweisen.^[98] Im Rahmen dieser Untersuchung sind jedoch keine sekundäre Amide vom Typ **75a-q** evaluiert worden, sodass eine Bestimmung ihres TRPML-Aktivierungsprofils stets von hohem Interesse ist.

5.2.3 Synthese des TRPML2-Aktivators ML2-SA1

Der Referenzligand für die selektive TRPML2-Aktivierung **ML2-SA1** wurde in einer zweistufigen Synthese nach den Vorschriften von McIntosh *et al.* sowie Plesch *et al.* ausgehend von 2,6-Dichlorbenzaldehyd (**76**) dargestellt, wobei zunächst die Umsetzung zum Benzaldoxim **77** in sehr guter Ausbeute (94%) gelang.^[98,217] Das Oxim **77** wurde dann in Anwesenheit von [Bis(trifluoroacetoxy)iod]benzol (PIFA) *in situ* zum entsprechenden Nitriloxid umgewandelt, welches schließlich im nächsten Schritt als 1,3-Dipol in einer [3+2]-Cycloaddition mit dem Dipolarophil Norbornen (**78**) mit hoher Regioselektivität zum Isoxazol (\pm)-**64** (**ML2-SA1**) (71% Ausbeute) reagierte.



Schema 5.6: Darstellung des Isoform-selektiven TRPML2-Agonisten **ML2-SA1**.^[98]

5.3 Resazurin-basierter Zellviabilitätstest

Die Cytotoxizität der synthetisierten Verbindungen sowie ihr Einfluss auf die Zellproliferation wurde in einem Resazurin-basiertem Zellviabilitätstest von [REDACTED] (AG [REDACTED]) evaluiert. Dieser Test beruht auf der Reduktion des zellpermeablen Redoxindikators Resazurin (7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-on-10-oxid) durch metabolisch aktive („lebende“) Zellen, wobei der stark fluoreszierende Farbstoff Resofurin generiert wird und somit eine fluorimetrische Untersuchung der Zellviabilität in Anwesenheit der potenziellen Aktivatoren möglich ist. Dabei ist die Bildung von Resofurin direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen.^[218] Die Experimente erfolgten an HEK293-Zellen (n = 4) mit DMSO als Negativ- und reiner Resazurinlösung (c = 26 μM /Well); ohne Inkubation mit Zellen) als Positivkontrolle (*Blank*), wobei die erhaltenen Resultate nach 24 h Inkubation bei 37 $^\circ\text{C}$ in **Tab. 5.2** aufgeführt sind.

Tab. 5.2: Resultate des Resazurin-basierten Zellviabilitätstests an HEK293-Zellen (n = 4).

Verbindung	IC ₅₀ (µM)	Verbindung	IC ₅₀ (µM)
41a	(>100)	75h	>200*
41b	(102.6)	75i	>100*
41c	(27.4)	75j	(277.2)
41d	(46.1)	75k	>100*
61	(>30)	75l	>300*
74	(150.3)	75m	>100*
75a	>100*	75n	>100*
75b	>100*	75o	>100*
75c	>100*	75p	>30*
75d	>100*	75q	>200*
75e	>200*	75r	n. b.
75f	>100*	75s	>300*
75g	>200*	75t	>100*

Bem.: Oberhalb der angegebenen Konzentrationen ist eine Präzipitation der Substanzen zu beobachten. Werte in Klammern entsprechen daher lediglich ungefähren Angaben. *Nicht toxisch im getesteten Konzentrationsbereich.

Für alle Verbindungen konnte eine Präzipitation ab einer bestimmten Konzentration im Zellmedium beobachtet werden, sodass nicht der vollständige Konzentrationsbereich von $c = 0.001\text{--}1$ mM untersucht werden konnte. Dieser Effekt liefert auch eine rationale Begründung für die beobachtete, moderate Cytotoxizität der Verbindungen **41a–d**, **61**, **74** und **75j**, die vermutlich auf der Bildung von Aggregaten zurückzuführen ist. Generell kann anhand der Befunde demonstriert werden, dass die Verbindungen im getesteten Konzentrationsbereich keine Anzeichen einer signifikanten Cytotoxizität aufweisen. Dementsprechend kann eine Beeinflussung der Zellviabilität durch die synthetisierten Verbindungen im Konzentrationsbereich, der für die zukünftigen biologischen Untersuchungen relevant ist (vgl. auch $EC_{50} = 0.93 \mu\text{M}$ für **SF-51 (61)**^[85] bzw. $EC_{50} = 0.11 \mu\text{M}$ für **MK6-83 (41a)**^[104]), ausgeschlossen werden.

5.4 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieses Design- und Syntheszyklus wurden >20 neue potenzielle TRPML-Aktivatoren entwickelt, die in Folgeexperimenten und zukünftigen Projekten in der Arbeitsgruppe von [REDACTED] (Johannes Gutenberg-Universität Mainz) weiter biologisch evaluiert werden sollen. Anhand der Befunde könnten mögliche Struktur-Wirkungs-Beziehungen abgeleitet und Informationen zur Entwicklung potenterer und selektiverer TRPML-Liganden gewonnen werden. Darüber hinaus sollen die synthetisierten Referenzliganden neben ihrer Funktion als Positivkontrolle auch als Werkzeuge zur Untersuchung weiterer biophysikalischen Mechanismen eingesetzt werden.

6 TRPC6-Aktivatoren

Das in diesem Kapitel beschriebene Projekt basiert auf einer Forschungskooperation mit der Arbeitsgruppe von [REDACTED] (Institut für Pharmazeutische und Biomedizinische Wissenschaften, Johannes Gutenberg-Universität Mainz), die sich unter anderem intensiv mit Fragestellungen auf dem Gebiet der TRPC6-Ionenkanäle beschäftigen.^[219-221] Die hier aufgeführten synthetischen Laborarbeiten wurden in Zusammenarbeit mit [REDACTED] und [REDACTED] bearbeitet, welche Forschungsmodule im Arbeitskreis von [REDACTED] absolvierten. [REDACTED] unterstützte dieses Projekt insbesondere durch die Durchführung zahlreicher zellbasierter Tests.

6.1 Einleitung und Zielsetzung

Im zentralen Nervensystem konnte für TRPC6 eine wichtige Rolle als Mediator bei der neuronalen Entwicklung und der synaptischen Plastizität demonstriert werden.^[125,222-223] Unter den bisher bekannten selektiven TRPC6-Aktivatoren nimmt der Naturstoff Hyperforin (**79**, $EC_{50} = 1.51 \mu\text{M}$; **Abb. 6.1**), dem Hauptwirkstoff des als Antidepressivum eingesetzten Echten Johanniskrauts (*Hypericum perforatum*), eine besondere Rolle ein.^[220,224] In Analogie zu synthetischen Antidepressiva inhibiert Hyperforin die neuronale Serotonin- und Noradrenalinaufnahme, jedoch beruht die Erhöhung der synaptischen Neurotransmitterkonzentration nicht auf der Hemmung der entsprechenden Transporter.^[220] Leuner *et al.* dokumentierten einen indirekten Hyperforin-induzierten Effekt, der auf einem TRPC6-vermittelten Na^+ -Ioneneinstrom zurückzuführen ist. Durch die Erhöhung der intrazellulären Na^+ -Ionenkonzentration wird der Ionengradient entlang der Membran als treibende Kraft der Neurotransmittertransporter verringert, was eine Unterdrückung der neuronalen Monoaminaufnahme zur Folge hat.^[220] Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der aus der TRPC6-Aktivierung resultierende Ca^{2+} -Ioneneinstrom die neurotrophischen Eigenschaften der Nervenwachstumsfaktoren von NGF (*nerve growth factor*) und BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) imitiert. In diesem Zusammenhang konnte zudem ein Hyperforin-vermitteltes Neuritenwachstum in PC12-Zellen sowie eine Modulation der Morphologie von dendritischen Wirtelsäulen in pyramidalen Neuronen des Hippocampus festgestellt werden.^[219,221] Bei Hyperforin handelt es sich um ein polyprenyliertes bicyclisches Acylphloroglucin-Derivat, dessen enolisierendes β -Dicarbonylsystem die Instabilität bei Licht- und Sauerstoffexposition erklärt.^[225] Aus diesem Grund entwickelten Leuner *et al.* stabile synthetische TRPC6-Agonisten basierend auf der Phloroglucinol-Kernstruktur von Hyperforin, um eine potenzielle therapeutische Anwendung durch Aktivierung von TRPC6-Kanälen zugänglich zu machen.^[219] Aus der SAR-Studie verschiedener Hyperforin-Derivate konnte abgeleitet werden, dass insbesondere symmetrische 2,4-Diacylphloroglucine wie z. B. **Hyp1 (80)**, $EC_{50} = 2.71 \mu\text{M}$; **Abb. 6.1**) als relevante Pharmakophore für die TRPC6-Aktivierung fungieren und ein vergleichbares Aktivierungsprofil zu Hyperforin

aufweisen.^[219] Sawamura *et al.* berichteten außerdem über eine TRPC3/6/7-Aktivierung durch Piperazinderivate vom **PPZ1**-Typ und konnten einen neurotrophen Effekt durch Ca²⁺-induziertes Neuritenwachstum aufzeigen.^[226] Im Rahmen des Screenings einer chemischen Bibliothek von über 17000 Substanzen identifizierten Häfner *et al.* 2019 den selektiven allosterischen TRPC6-Modulator **C20** (**83**; EC₅₀(TRPC6) = 2.4 μM), der eine verstärkende Wirkung des agonistischen Effekts von Diacylglycerol (DAG) aufwies.^[227] Erst vor wenigen Monaten wurde erstmals eine Kryo-EM-Struktur des TRPC6-Kanals im Komplex mit einem Agonisten (**AM-0883** (**84**); EC₅₀ = 45.5 ± 10 nM) veröffentlicht, dessen Bindestelle sich an jeder Schnittstelle zwischen zwei Untereinheiten des tetrameren Proteins befindet.^[147] Die Bindestelle von Hyperforin und den 2,4-Diacylphloroglucin-Derivaten ist nach bestem Wissen jedoch bisher nicht bekannt.

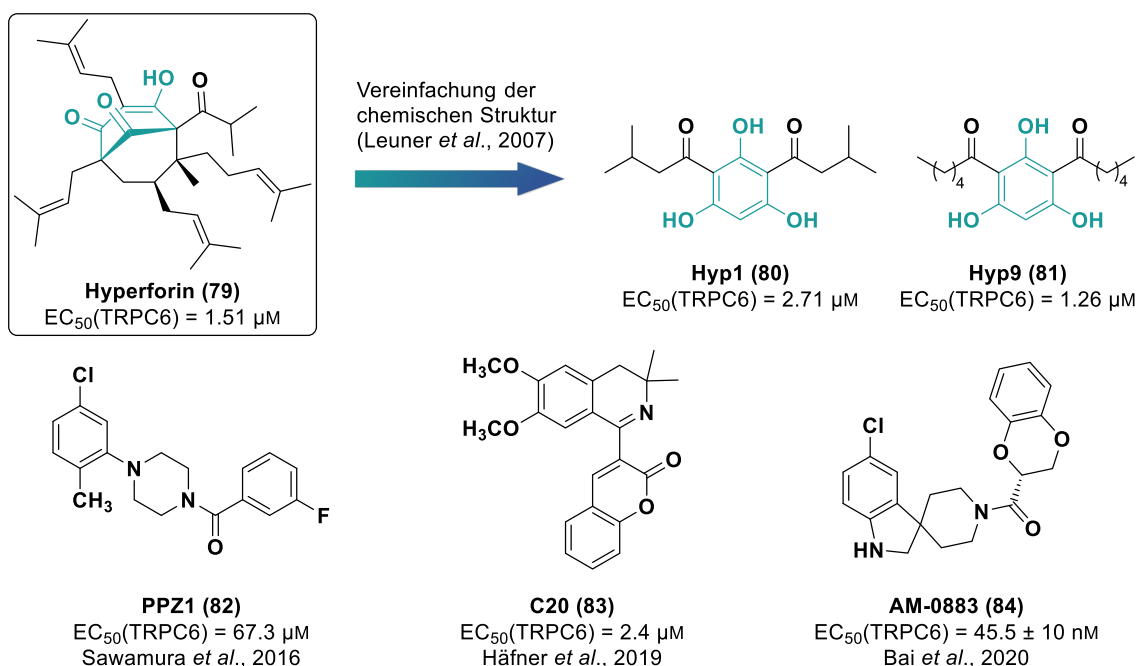
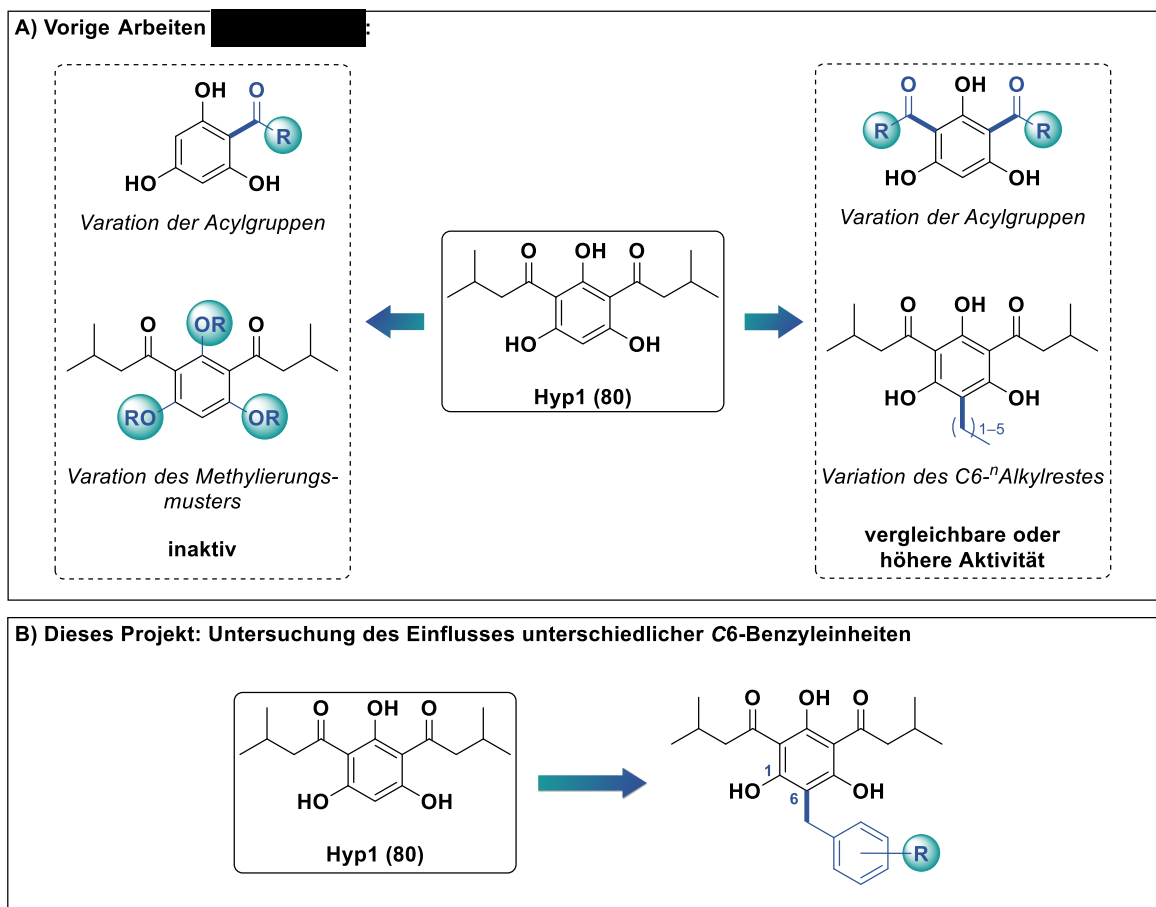


Abb. 6.1: Übersicht über die Strukturen bekannter TRPC6-Aktivatoren mit Angabe ihrer EC₅₀-Werte.

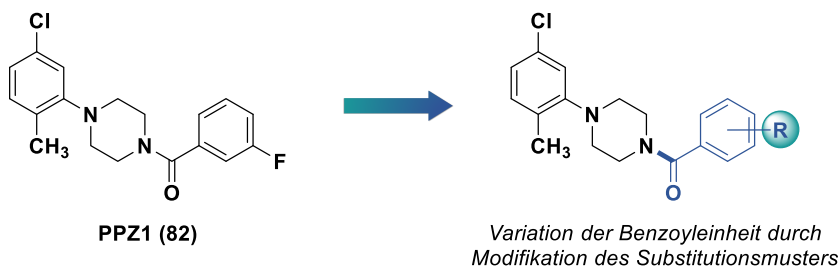
Im Rahmen dieses Projektes sollten die von Leuner *et al.*^[219] und weitere in der Arbeitsgruppe von [REDACTED] durchgeführte SAR-Studien (unveröffentlichte Daten) zu den Phloroglucinderivaten ergänzt werden. Den Befunden entsprechend konnte herausgefunden werden, dass für die Aktivierung von TRPC6-Kanälen ein symmetrisches Acylierungsmuster (2,4-Diacylphloroglucine) erforderlich ist und die Anwesenheit nur einer Acylgruppe nicht ausreicht (**Schema 6.1, A**). In diesem Zusammenhang werden außerdem längere Acylseitenketten (z. B. C15) nicht mehr toleriert, während sich eine Methylierung der Hydroxygruppen gleichermaßen als nachteilig auswirkte, da hierbei ebenfalls inaktive Verbindungen erhalten wurden. Interessanterweise kann durch C-Alkylierung an der freien Position im Aromaten von **Hyp1** eine vergleichbare oder höhere Aktivierung des TRPC6-Kanals erzielt werden. Da bisher lediglich *n*-Alkylreste im Verlauf dieser Studie untersucht wurden, wäre eine weitergehende Analyse unter Berücksichtigung aromatischer Reste mit unterschiedlichem Substitutionsmuster vorteilhaft.

Ziel des hier beschriebenen Forschungsprojektes war daher die Etablierung eines geeigneten Syntheseprotokolls für die (möglichst regioselektive) C-Benzylierung sowie die anschließende biologische Evaluierung der C6-Benzyllderivate von **Hyp1** (Schema 6.1; B).



Schema 6.1: Zielsetzung dieses Projektes (A) und Abgrenzung von bereits geleisteten Vorarbeiten in der AG von [REDACTED] (B).

Des Weiteren sollten die von Sawamura *et al.*^[226] beschriebenen Piperazinderivate (**PPZ1**) durch Variation des 3-Fluorbenzylrestes als Vorlage für eine weitere Leitstrukturoptimierung dienen, um den Einfluss verschiedener Substituenten zu untersuchen und somit ggf. die Aktivität und Selektivität in Bezug auf TRPC6 zu verbessern.

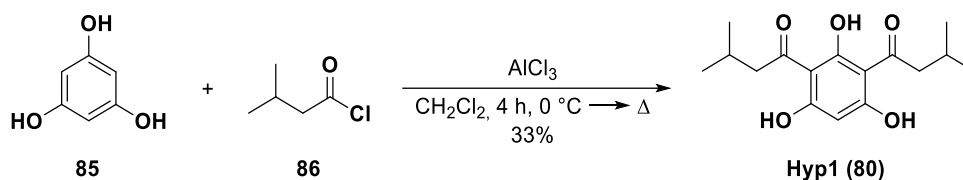


Schema 6.2: Angestrebte Leitstrukturoptimierung von **PPZ1** durch Modifikation des Substitutionsmusters des Benzylrestes.

6.2 Ergebnisse und Diskussion

6.2.1 Synthese der Phloroglucinderivate

Der Grundkörper **Hyp1** (2,4-Bis(isovaleryl)phloroglucin) wurde in einer *Friedel-Crafts*-Acylierung aus Phloroglucin (**85**) und Isovalerylchlorid (**86**) in Gegenwart stöchiometrischer Mengen von Aluminium(III)-chlorid in Anlehnung an modifizierte Vorschriften von Donnelly und Shannon bzw. Meikle und Stevens gewonnen (**Schema 6.3**).^[228-229]



Schema 6.3: Darstellung des TRPC6-Aktivators **Hyp1** über eine *Friedel-Crafts*-Acylierung.

Bei der folgenden Alkylierung bzw. Benzylierung der freien 6-Position im aromatischen Kern von 2,4-Diacylphloroglucin ergeben sich zwangsweise Regioselektivitätsprobleme, da sowohl die freien Hydroxygruppen als auch ein entsprechendes C-Anion zu einem nucleophilen Angriff an das Alkylierungsreagenz befähigt sind.^[230-231] Darüber hinaus ist die *O*-Alkylierung in diesem Fall statistisch wahrscheinlicher, wobei eine Mehrfachalkylierung sich ebenfalls als prekär erweisen kann und dadurch komplexe Produktgemische resultieren können.^[232] Die Umgehung des Selektivitätsproblems durch Verwendung von *O*-Trimethylsilyl- bzw. Methylschutzgruppen war jedoch nicht möglich, da beim darauffolgenden Versuch zur Alkylierung der freien aromatischen Position –vermutlich aus sterischen bzw. elektronischen Gründen– kein Umsatz zu beobachten war. Aus diesem Grund wurde eine direkte Benzylierung von **Hyp1** zu entsprechenden 6-substituierten Derivaten angestrebt, wobei zunächst eine sorgfältige Optimierung der Modellreaktion zwischen Benzylbromid (**87**) und **Hyp1** vorgenommen wurde, um geeignete Reaktionsparameter mit Schwerpunkt auf eine möglichst regioselektive *C*-Monoalkylierung zu eruiieren (**Tab. 6.1**). In diesem Zusammenhang wurde vor allem der Einfluss der eingesetzten Base und des Lösemittels auf das Verhältnis von *C*- zu *O*- bzw. dialkylierten Produkten evaluiert. Die experimentellen Befunde legen nahe, dass die Wahl des Lösemittels und der verwendeten Base eine signifikante Auswirkung auf die Zusammensetzung des Produktgemisches hat. Dies ist im Einklang mit bereits beschriebenen Studien, die deutliche Belege für die Fähigkeit des Lösemittels liefern, den Verlauf einer ambidenten Alkylierungsreaktion von Phenoxiden zu bestimmen.^[233-234] Polar-aprotische Lösemittel mit hohen Dielektrizitätskonstanten (z. B. DMF oder DMSO) sind in der Lage, Kationen in hohem Maße zu solvatisieren und die Entstehung von Ionenpaaren somit zu unterbinden, sodass eine Alkylierung der Sauerstoffatome bevorzugt ist.^[234] Im Gegensatz dazu bilden besonders polar-protische Lösemittel wie Wasser, Methanol oder 2,2,2-Trifluorethanol Wasserstoffbrückenbindungen zu Phenoxid-Anionen aus, sodass eine *O*-Alkylierung erschwert wird und der Anteil *O*- und *C*-alkylierter Produkte

zugunsten der C-Alkylierung verschoben wird (**Abb. 6.2**).^[235] Anhand der erhaltenen Resultate wird deutlich, dass vor allem Natriummethanolat in absolutem Methanol vorrangig C-monobenzylierte Produkte liefert (Eintrag 1), auch wenn sich der Anteil an nachgewiesenem dibenzylierten **Hyp1** als relativ hoch erwies.

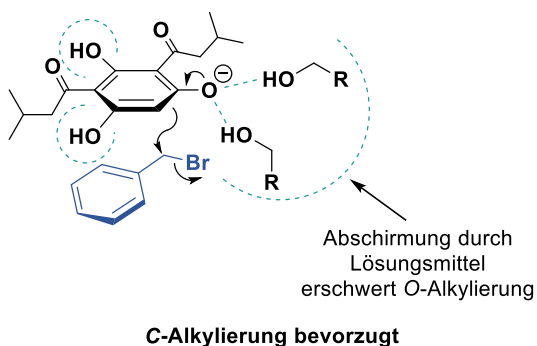
Tab. 6.1: Optimierungsansätze zur Darstellung C-monobenzylierter Phloroglucinderivate.

Hyp1 (80) + **87** $\xrightarrow[\text{Lösungsmittel}]{\text{Base (5.0 Äquiv.)}}$ **88a**

#	Lösemittel	Base	Reaktionsbedingungen	C-/O-/Dialkylierung [†]
1	MeOH	NaOMe	6 h, Δ	20 : 1 : 10
2	MeOH	NaO ^t Bu	6 h, Δ	13 : 1 : 5
3	MeOH	KO ^t Bu	6 h, Δ	11 : 1 : 6
4	MeOH	NEt ₃	6 h, Δ	3 : 1 : 4
5	^t BuOH	NaOMe	6 h, Δ	0 : 0 : 1
6	2,2,2-Trifluorethanol	NaOMe	6 h, Δ	2 : 1 : 4
7	Nitrobenzol	NaOMe	MW (100 W), 120 °C	1 : 1.5 : 1
8	THF	NaOMe	6 h, Δ	0 : 1 : 29
9	Phosphatpuffer*	Na ₂ HPO ₄	6 h, Δ	1 : 4 : 3
10	Phosphatpuffer*	Na ₂ HPO ₄	6 h, RT	2 : 1 : 1

Repräsentative Durchführung: In einem 25 mL-Rundkolben wurde unter Argonatmosphäre Hyp1 in abs. Lösemittel (6 mL) vorgelegt und anschließend mit der Base versetzt und 6 h bei der angegebenen Temperatur gerührt. Es wurde durch Zugabe einer NH₄Cl-Lösung (ges., aq., 10 mL) gequenchet und das Rohprodukt nach extraktiver Aufarbeitung (EtOAc, 3 × 25 mL) mittels HPLC-ESI-MS analysiert. [†]Verhältnisse bestimmt mittels HPLC-MS durch Integration der resultierenden Peakflächen (Detektion bei λ = 254 nm) und anschließender Normierung. Für die Zuordnung der Regioisomere zu den entsprechenden Retentionszeiten wurde exemplarisch ein Reaktionsgemisch chromatographisch aufgereinigt und die Struktur der isolierten Produkte mittels 2D-NMR-Spektroskopie aufgeklärt. *0.2 M, pH 7.8.

A) Polar-protische Lösungsmittel



B) Polar-aprotische Lösungsmittel mit niedriger Dielektrizitätskonstante

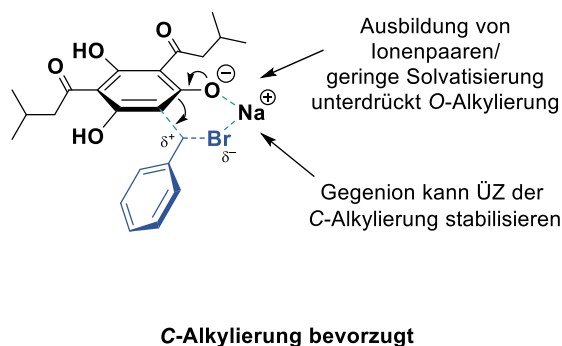
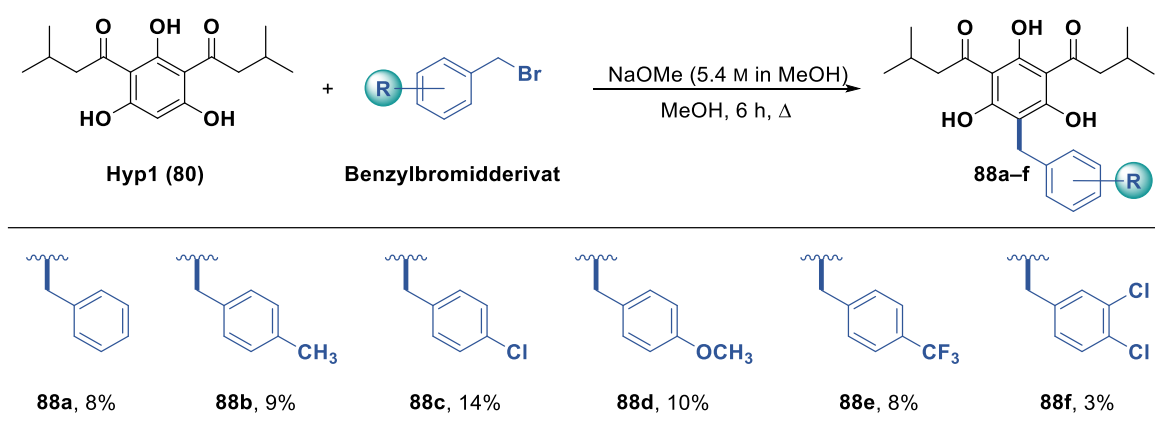


Abb. 6.2: Potenzieller Einfluss des Lösemittels zugunsten der C-Alkylierung am Beispiel von **Hyp1**. In Anlehnung an Kornblum *et al.* und Nogueira *et al.*^[234,236]

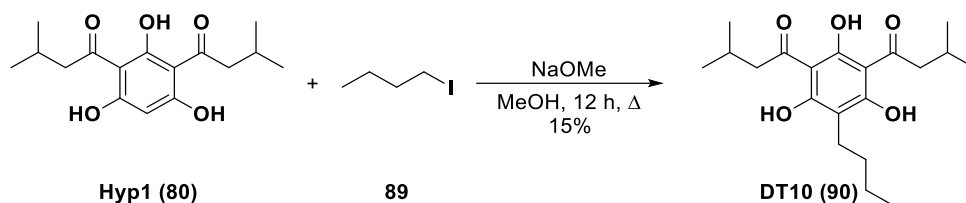
Durch den Einsatz sterisch anspruchsvollerer (Einträge 2 und 3; **Tab. 6.1**) oder organischer Basen (Eintrag 4) konnte das Verhältnis zwischen C-Mono- und -Dialkylierung nicht ausschlaggebend zugunsten der Monoalkylierung moduliert werden. Zeitgleich führte die Variation des Lösemittels und der Einsatz von Mikrowellensynthese ebenfalls zu keiner Verbesserung in Bezug auf die C-Benzilylierung (Einträge 5–7). Zwar gehört Tetrahydrofuran zu den Lösemitteln, die eine C-Alkylierung durch die niedrige Dielektrizitätskonstante und der damit verbundenen Möglichkeit zur Ausbildung von Ionenpaaren fördern (s. o.),^[234] allerdings konnte unter diesen Bedingungen ein großer Anteil an dibenzylierten Produkten nachgewiesen werden (Eintrag 8). Gissot *et al.* demonstrierten einen positiven Einfluss von wässrigen Phosphatpuffersystemen auf die selektive mono-C-Alkylierung von Phloroglucinderivaten.^[230] Die experimentellen Befunde bei der Benzilylierung von **Hyp1** sind mit den Beobachtungen von Gissot *et al.* konsistent, jedoch waren in diesem Fall geringe Umsatzraten zu verzeichnen; eine Erhöhung der Reaktionstemperatur führte allerdings wieder zu einem größeren Anteil an O-benzylierten Nebenprodukten (Einträge 9 und 10). Auf eine weitere Optimierung der Reaktionsparameter wurde verzichtet, da mit dem Natriummethanolat/Methanol-System (Eintrag 1) die gewünschten C-monobenzylierten **Hyp1**-Derivate in zufriedenstellender Weise zugänglich waren. Die dibenzylierten Nebenprodukte wurden hierbei aufgrund der leichteren chromatographischen Trennung toleriert.

Die optimierten Reaktionsbedingungen wurden im nächsten Schritt zur Derivatisierung von **Hyp1** mit verschiedenen Benzylbromiden angewandt. Die Auswahl der Substituenten erfolgte auf Grundlage des *Topliss*-Ansatzes, der sowohl relative elektronische (*Hammett*-Konstante σ), als auch lipophile (Lipophilieparameter π) und sterische Beiträge (*Taft's* Sterikfaktor E_s) der Substituenten im Phenylrest berücksichtigt.^[237-238] In Anlehnung an das *Topliss Batchwise Scheme* wurde initial eine kongenere Serie von sechs phenyl-substituierten Analoga für die Evaluierung an TRPC6-Ionenkanälen in zellbasierten Assays synthetisiert (**Schema 6.4**).



Schema 6.4: Synthetisierte 6-Benzyl-2,4-diacetylphloroglucinderivate. Alle Reaktionen wurden gemäß der allgemeinen Vorschrift in **Kap. 10.8.1** durchgeführt. Die angegebenen Ausbeuten beziehen sich auf die isolierten Verbindungen nach Säulenchromatographie und anschließender Reinigung mittels semi-präparativer HPLC.

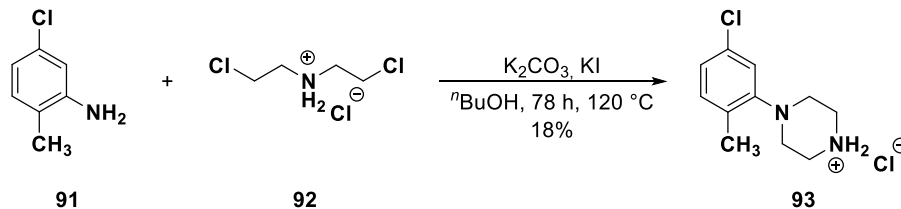
In Ergänzung zu den oben gezeigten Verbindungen erfolgte zudem die Darstellung des analogen 6-*n*-Butylderivates von **Hyp1** (**DT10**; **Schema 6.5**), für welches bereits eine Erhöhung der TRPC6-Ionenleitfähigkeit belegt werden konnte ($EC_{50} = 1 \mu\text{M}$).^[239] Dieses soll als Referenz (Positivkontrolle) sowie als pharmakologisches Werkzeug zur Erforschung der Bindestelle und Interaktionen zwischen den Phloroglucin-Derivaten und TRPC6 eingesetzt werden.



Schema 6.5: Darstellung des **Hyp1**-Kongeners **DT10**.

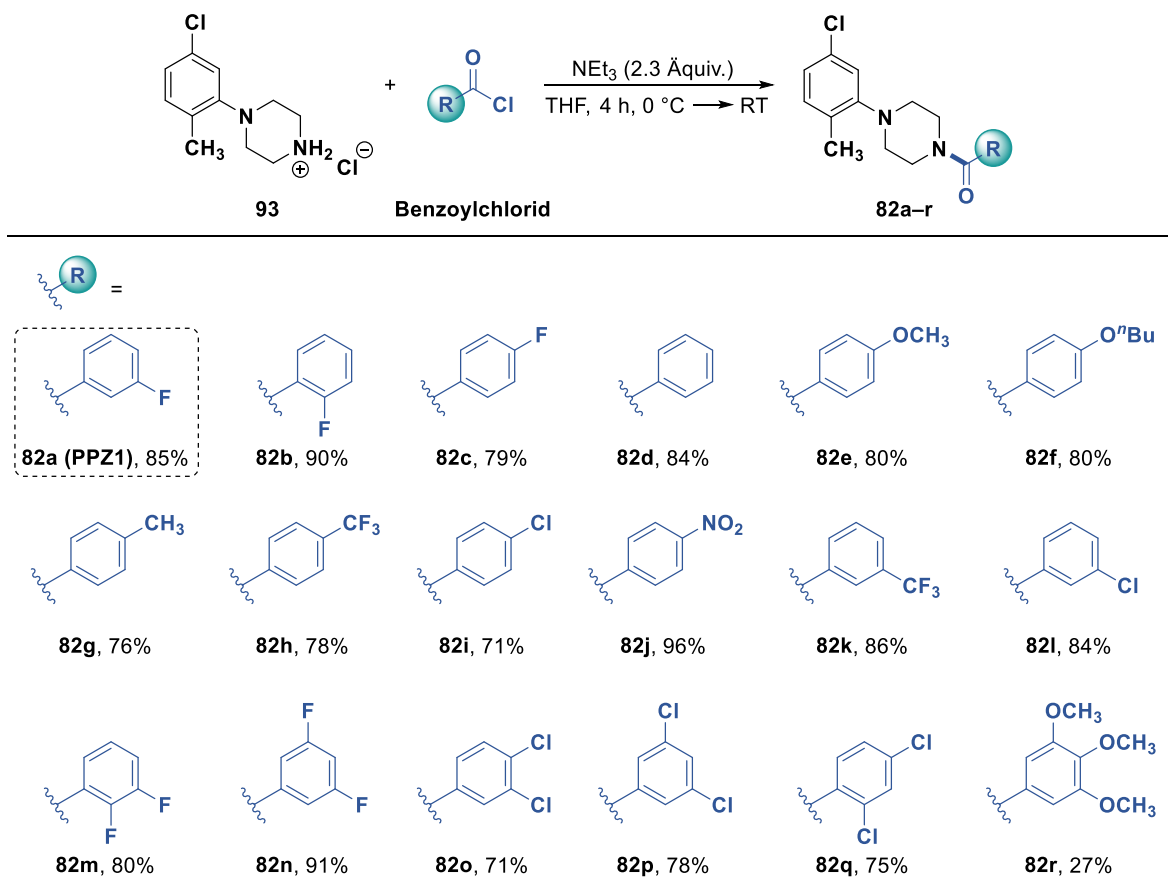
6.2.2 Synthese der PPZ1-Derivate

Die Darstellung der 1-(Benzoyl)piperazin-Substanzbibliothek auf Grundlage des von Sawamura *et al.* beschriebenen TRPC6-Aktivators **PPZ1** (**82**)^[226] erfolgte durch Funktionalisierung von 1-(5-Chlor-2-methylphenyl)piperazin-Hydrochlorid (**93**), welches zuvor aus 5-Chlor-2-methylanilin (**91**) sowie Bis-(2-chlorethyl)amin-Hydrochlorid (**92**) in Gegenwart von Kaliumcarbonat und Kaliumiodid in einer Cyclisierungsreaktion gewonnen wurde (**Schema 6.6**).^[240-241]



Schema 6.6: Synthese von 1-(5-Chlor-2-methylphenyl)piperazin-Hydrochlorid (**93**).

Die Synthese der substituierten 1-(Benzoyl)piperazine gelang in generell hohen Ausbeuten aus der Reaktion von **93** und einer Serie kommerziell erhältlicher Benzoylchloride in Anwesenheit von Triethylamin als Hilfsbase (**Schema 6.7**).^[226] Entsprechend den oben ausgeführten Überlegungen, erfolgte die Wahl der Substituenten im Benzoylbaustein unter anderem in Anlehnung an das *Topliss Batchwise Scheme*, wobei aufgrund der simplen Durchführbarkeit und der Verfügbarkeit der Edukte eine erweiterte Substanzbibliothek für die initialen Aktivitätsanalysen erstellt wurde. Hierdurch bestand unter anderem die Möglichkeit, neben der Untersuchung der stereoelektronischen und lipophilen Substituenteneffekte nach dem klassischen *Topliss*-Schema auch den Einfluss unterschiedlicher Regioisomere (hier im Fall der mono- bzw. difluorierten Aromaten) zu analysieren.



Schema 6.7: Übersicht über die synthetisierten **PPZ1**-Derivate. Alle Reaktionen wurden gemäß der allgemeinen Vorschrift in **Kap. 10.8.2** durchgeführt. Die angegebenen Ausbeuten beziehen sich auf die isolierten Verbindungen nach säulenchromatographischer Aufreinigung.

Bemerkenswerterweise konnten bei der NMR-spektroskopischen Vollcharakterisierung der synthetisierten **PPZ1**-Derivate in den meisten Fällen in den ^1H -NMR-Spektren vier verschiedene Signale (i. d. R. 1:1:1:1) bei Raumtemperatur für die CH_2 -Gruppen des Piperazinrings beobachtet werden (vgl. **Abb. 6.3**). Die beiden Signalsätze lassen sich den zwei CH_2 -Gruppen neben der Amidfunktion und den zwei CH_2 -Gruppen neben dem 5-Chlor-2-methylaromaten zuordnen. Dieses Verhalten ist zum einen auf das Vorhandensein zweier verschiedener Rotamere (Konformere) zurückzuführen, in welchen die Rotation um die C-N-Amidbindung aufgrund des partiellen Doppelbindungscharakters limitiert ist. Durch die eingeschränkte Drehung resultiert für beide Methylengruppen an der Amideinheit jeweils eine unterschiedliche chemische Umgebung, die sich in einer Aufspaltung der NMR-Signale äußert. Zudem lässt sich das beobachtete Verhalten durch eine reduzierte Interkonversion der Piperazin-Sesselkonformation erklären, die hier schon bei Raumtemperatur auftritt. Die beschriebenen Befunde sind mit bereits veröffentlichten NMR-Studien anderer Piperazinamid-Kongeneren konsistent.^[242-243] Die partielle oder vollständige Überlappung der Signale in den ^1H -NMR-Spektren sowie die Linienverbreiterung der entsprechenden C-Atome im ^{13}C -NMR-Spektrum deuten darauf hin, dass sich die Systeme nahe der Koaleszenz befinden, welche stark von den Substituenten im Phenylring beeinflusst wird (siehe Anhang; **Kap. 12.1**).^[242-243]

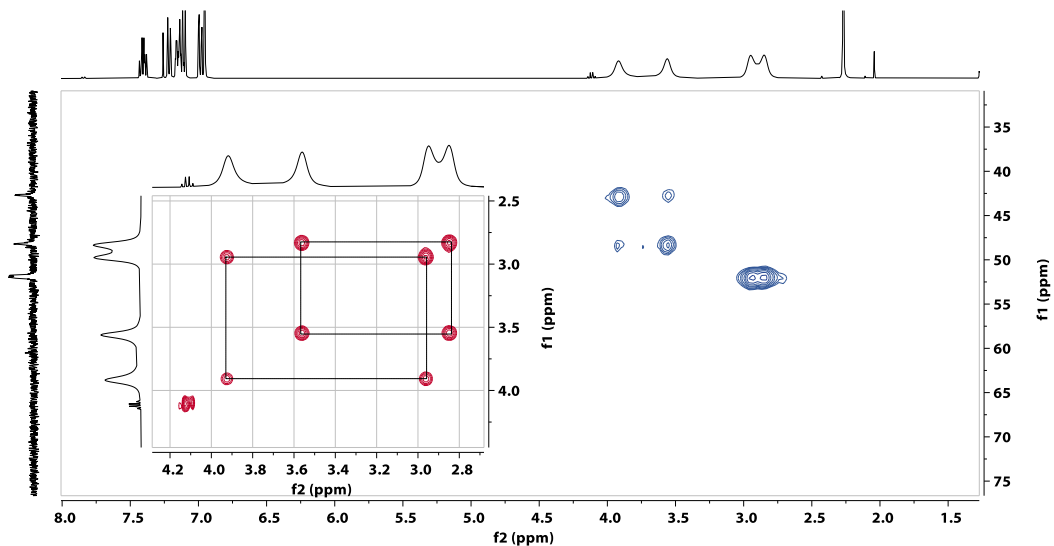
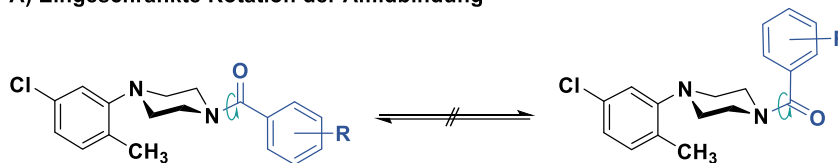
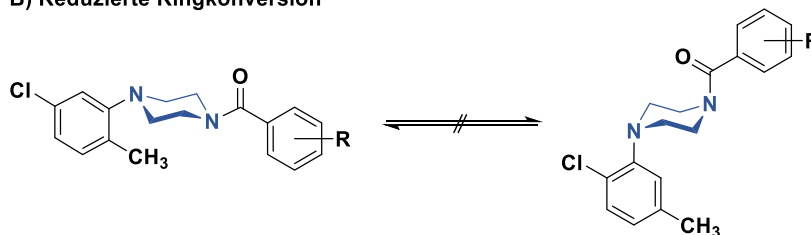


Abb. 6.3: Ausschnitt aus dem ^1H - ^{13}C -HSQC und ^1H - ^1H -COSY (400 MHz, CDCl_3) von **82a**. Die skalare Kopplung zwischen den CH_2 -Gruppen im COSY wird durch gepunktete Linien hervorgehoben.

A) Eingeschränkte Rotation der Amidbindung



B) Reduzierte Ringkonversion



Schema 6.8: Veranschaulichung der Konformationsdynamik benzoylierter Piperazinderivate. In Anlehnung an Wodtke *et al.*^[243]

6.2.3 Ca^{2+} -Influx-Assay zur Evaluierung der TRPC6-Aktivität

Insgesamt wurden >20 neue potenzielle TRPC6-Agonisten (inkl. der Referenzsubstanzen) synthetisiert, deren Fähigkeit zur Erhöhung der Ionenleitung von TRPC6-Kanälen im nächsten Schritt in der Arbeitsgruppe von [REDACTED] von [REDACTED] evaluiert wurde. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte in einem zellbasierten Calcium-Influx-Assay unter Verwendung von PC12-Zellen, welche häufig als Modellsystem für neuronale Zellen in neurobiologischen Studien Anwendung finden.^[244] Die Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Ionenkonzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurde dabei fluorimetrisch mithilfe des FLIPR[®] Calcium Assay Kit (*Molecular Devices*) über Calcium-sensitive Farbindikatoren zeitlich verfolgt.^[245-246] Alle zu testenden Verbindungen wurden jeweils in Konzentrationen von 1 μM , 3 μM , 10 μM und 30 μM eingesetzt. **88a** (6-Benzyl-), **88b** (6-(4'-Methylbenzyl)-) und **88c** (6-(4'-Chlorbenzyl)-) induzieren eine signifikante Erhöhung von

[Ca²⁺]_i vergleichbar zu der von **Hyp1** und Hyperforin, während sich die Aktivität von **88d** (6-(4'-Methoxybenzyl)-), **88e** (6-(4'-(Trifluormethyl)benzyl)-) und **88f** (6-(3',4'-Dichlorbenzyl)-) als minimal geringer erwies. Anhand der Befunde können jedoch keine vollständig präzisen Aussagen zu Struktur-Wirkungsbeziehungen getroffen werden, da es sich lediglich um eine *Screening*-Methode handelt und die Verbindungen ein vergleichbares Aktivierungsprofil aufweisen. Dennoch kann durch die Resultate generell demonstriert werden, dass benzylische Reste in der C6-Position toleriert werden, da relativ zu **Hyp1** kein substanzieller Aktivitätsverlust feststellbar ist. Zudem existiert möglicherweise ein geringfügiger sterischer Einfluss der beiden Chlorsubstituenten in **88f** sowie der Methoxygruppe in **88d**, der den niedrigeren Calcium-bedingten Fluoreszenzanstieg gerade bei einer Konzentration von 10 µM bzw. 30 µM erklärt. Um evidentere Angaben machen zu können, ist eine quantitative Aktivitätsanalyse der synthetisierten Verbindungen in Calcium-Imaging-Experimenten an isolierten Zellen erforderlich.

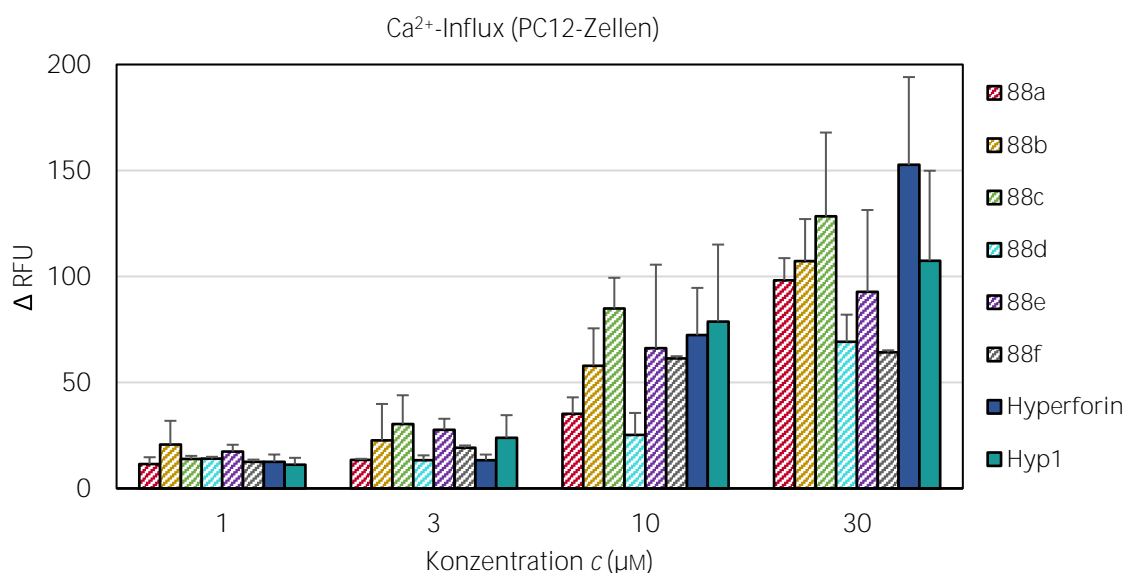


Abb. 6.4: Übersicht über die Effekte der synthetisierten 6-Benzylphloroglucin-Derivate auf die intrazelluläre Ca²⁺-Ionenkonzentration in PC12-Zellen bei verschiedenen Konzentrationen. Die Zellen wurden nach 20 s mit den Verbindungen versetzt und die Änderung der Fluoreszenz 3 min beobachtet, welche mit einem *FlexStation 3* Multimodus-Mikroplatten-Reader unter Verwendung des FLIPR[®] Calcium Assay Kits aufgenommen wurde. n = 3–4.

Interessanterweise konnte entgegen den Erwartungen keine Aktivierung von TRPC6-Ionenkanälen in PC12-Zellen durch die dargestellten 1-Benzylpiperazin-Kongeneren nachgewiesen werden (**Abb. 6.5**). Selbst bei einer Konzentration von 30 µM konnte nach Durchführung mehrerer Replikate und Variation der Assaybedingungen (Puffer, unterschiedliche DMSO-Konzentrationen etc.) der von Sawamura *et al.* beschriebene TRPC6-Agonismus von **PPZ1** nicht reproduziert werden. Ein möglicher Erklärungsansatz könnte bei den verwendeten Zellen zu finden sein, da anstelle der HEK293- entsprechende PC12-Zellen eingesetzt wurden. Dem steht allerdings der von den Positivkontrollen **Hyp1** und Hyperforin beobachtete induzierte Ca²⁺-Einstrom in PC12-Zellen

gegenüber, da hier der Beleg für eine TRPC6-selektive Aktivierung in diesem Zellsystem geliefert wird. In diesem Zusammenhang wäre zur Falsifizierung des Zellsystems als Ursache für die beobachtete Diskrepanz eine Überprüfung mit HEK293-Zellen vorteilhaft; die Transfektion konnte bislang jedoch noch nicht realisiert werden.

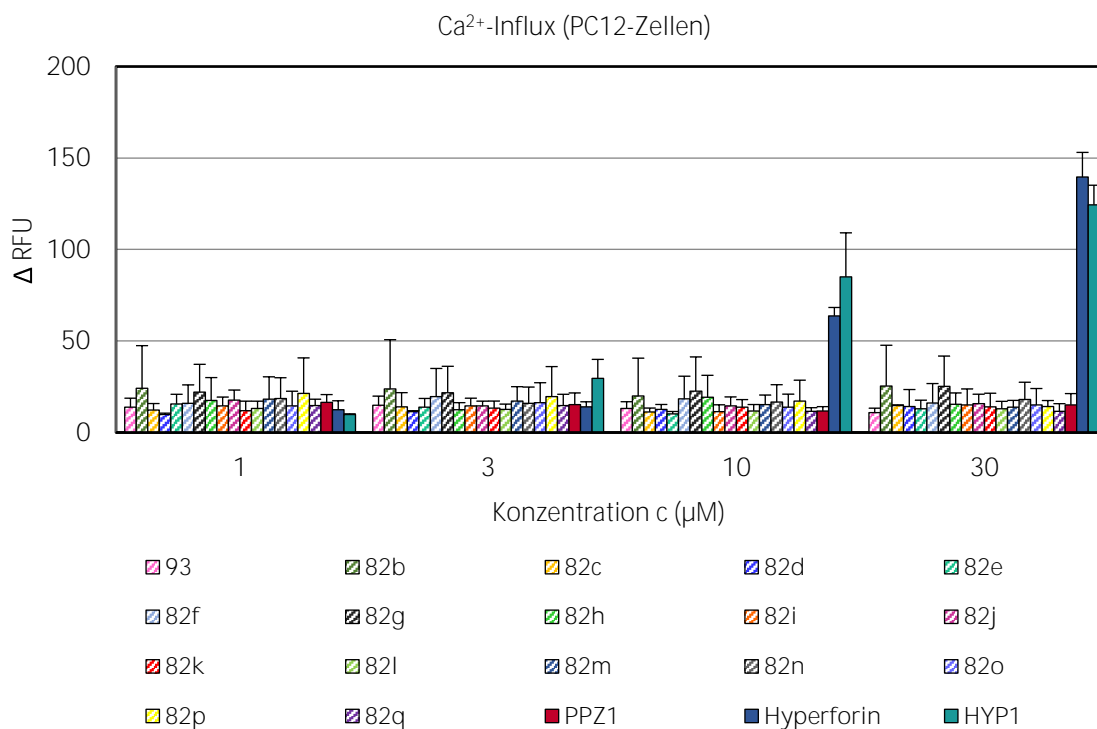


Abb. 6.5: Übersicht über die Effekte der synthetisierten **PPZ1**-Derivate auf die intrazelluläre Ca²⁺-Ionenkonzentration in PC12-Zellen bei verschiedenen Konzentrationen. Die Zellen wurden nach 20 s mit den Verbindungen versetzt und die Änderung der Fluoreszenz 3 min beobachtet, welche mit einem *FlexStation 3* Multimodus-Mikroplatten-Reader unter Verwendung des FLIPR® Calcium Assay Kits aufgenommen wurde. n = 3–4.

6.3 Zusammenfassung und Ausblick

In diesem Forschungsprojekt wurden auf Basis der beiden bekannten TRPC6-Aktivatoren **Hyp1** und **PPZ1** 23 neue potenzielle Agonisten synthetisiert, um mögliche Struktur-Wirkungs-Beziehungen aufzudecken und potentere Moleküle zu identifizieren. Generell konnte nachgewiesen werden, dass eine chemische Modifikation in der 6-Position des 2,4-Diacylphloroglucingrundgerüsts von **Hyp1** durch benzyliche Einheiten toleriert wird und keine substanzielle Reduktion der TRPC6-Aktivierung erzeugt. Von allen Verbindungen ist **88c** der vielversprechendste Kandidat (*p*-Chlorbenzyl-Substitution), da hier der höchste TRPC6-induzierte Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Ionenkonzentration beobachtet wurde, während durch die Anwesenheit von 3,4-Dichlor- bzw. 4-Methoxy-Substituenten (in **88f** und **88d**) eine geringere Aktivierung des Ionenkanals im Vergleich zu **Hyp1** hervorgerufen wird. Sofern die Tendenzen im Screening akkurat widerspiegelt werden, wäre es dem *Topliss*-Schema (rechter Arm) entsprechend sinnvoll, im nächsten Synthesecyclus das



Teil II

Synthese und Reaktivität neuer Bortezomib-Kongenere mit diversen *Warheads* als potenzielle Proteasom-Inhibitoren

7 Synthese und Reaktivität neuer Bortezomib-Kongenere mit diversen *Warheads*

7.1 Einleitung

Die Homöostase zwischen Proteinsynthese -und abbau ist ein substanzieller zellulärer Prozess, in welchen viele präzise und komplexe regulatorische Vorgänge involviert sind.^[247-248] Die strikte Kontrolle der korrekten Proteinfaltung und -halbwertszeit gehört zu den wichtigsten Qualitätskontrollmechanismen der Zelle, ohne die ein gesundes Wachstum, eine adäquate Anpassung auf Umweltbedingungen sowie ein Überleben der Zelle nicht sichergestellt werden kann.^[249-250] Von den vielfältigen Mechanismen zur Regulation der intrazellulären Proteinestabilität und des -abbaus ist das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) das vorherrschende System, welches für die Degradation von ca. 80% aller zellulär vorkommenden Proteine verantwortlich ist.^[251-253] Das UPS nimmt daher zusätzlich eine signifikante Rolle bei der Apoptose, Zellzyklusprogression, DNA-Reparatur und Antigenpräsentation ein und sorgt für eine gerichtete Zerlegung beschädigter bzw. fehlgefalteter Proteine, die sonst eine zunehmende Gefahr für die Zellphysiologie darstellen.^[250,254] Für den gezielten proteasomalen Abbau werden die zu degradierenden Proteine mit Ubiquitin-Polypeptiden markiert (**Abb. 7.1**).^[255]

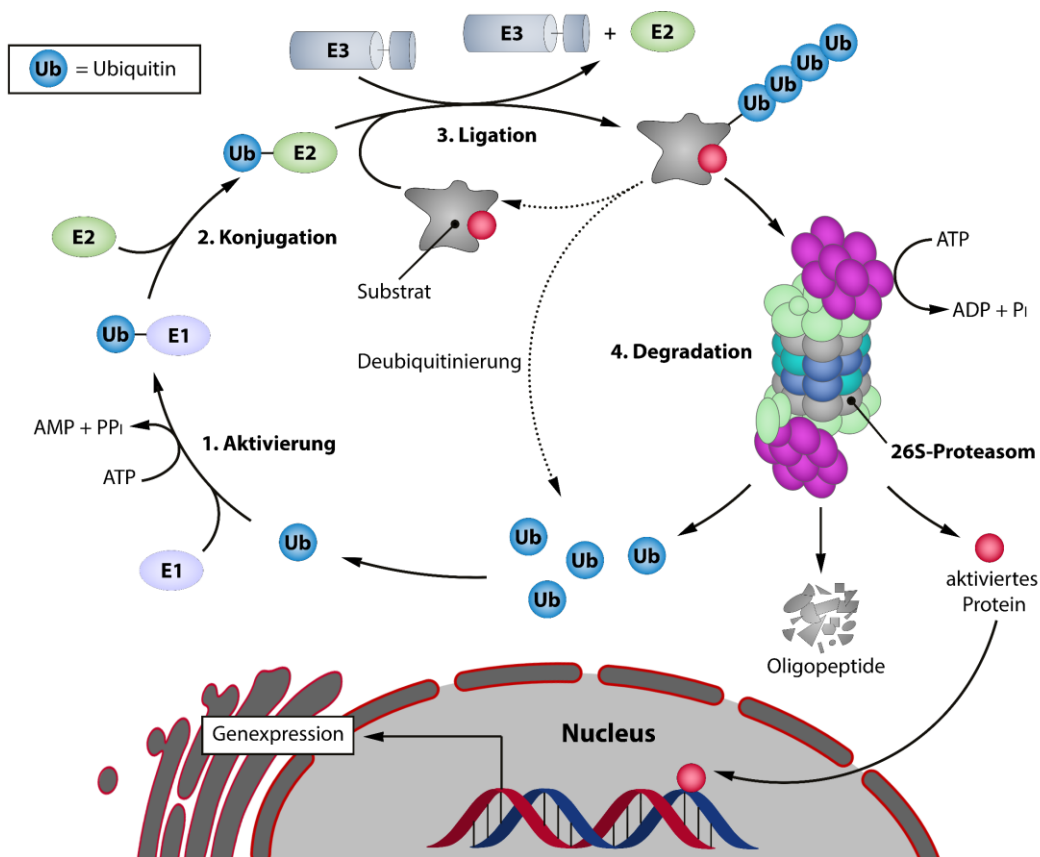


Abb. 7.1: Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) zum Abbau intrazellulärer Proteine.

Die kovalente Konjugation des 8.5 kDa großen Ubiquitins erfolgt an Lysinseitenketten der zellulären Zielproteine in einer dreistufig-koordinierten Sequenz.^[256-257] Im initialen Schritt bindet das Ubiquitin-aktivierende Enzym E1 in Gegenwart von ATP an Ubiquitin, welches daraufhin auf das Ubiquitin-konjugierende Enzym E2 transferiert wird. Spezielle Ubiquitin-Ligasen (E3) katalysieren schließlich die Übertragung von Ubiquitin auf das für die Proteolyse markierte Substrat unter Ausbildung von Isopeptidbindungen an den Lysinseitenketten. Zudem unterstützen diese drei Enzyme die Anlagerung von weiteren Ubiquitin-Polypeptiden, sodass aus diesem Prozess typische Ubiquitinierungs-Muster von mindestens vier Ubiquitin-Untereinheiten für die Erkennung durch das 26S-Proteasom hervorgehen.^[256-258] Da mehrere hundert diverse E3-Ligasen existieren, die an unterschiedliche Proteinsubstrate binden, wird ein substantieller Beitrag zur Substratspezifität des Proteasoms geleistet.^[259] Als zentrale Komponente des Ubiquitin-Proteasom-Systems fungiert das 26S-Proteasom¹, ein sehr großer ATP-abhängiger proteolytischer Komplex mit einem Molekulargewicht von ca. 2.5 MDa, welcher im Cytoplasma und im Zellkern bei eukaryotischen Zellen vorzufinden ist.^[260-263] Die funktionell aktive Form des Proteasoms, bestehend aus etwa 33 diversen Proteinen, ist aus einem zentralen katalytischen, zylindrischen Komplex (20S-Proteasom, *core particle* (CP)) aufgebaut, der an beiden Enden jeweils von einer regulatorischen 19S-Untereinheit flankiert wird (*regulatory particle*, (RP)) (Abb. 7.2).^[264-266]

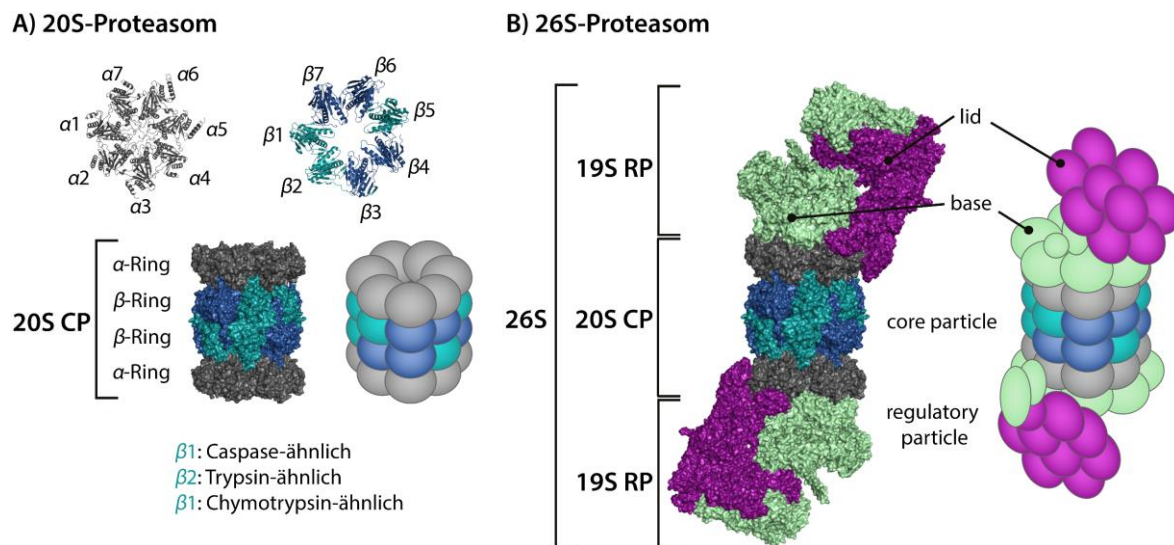


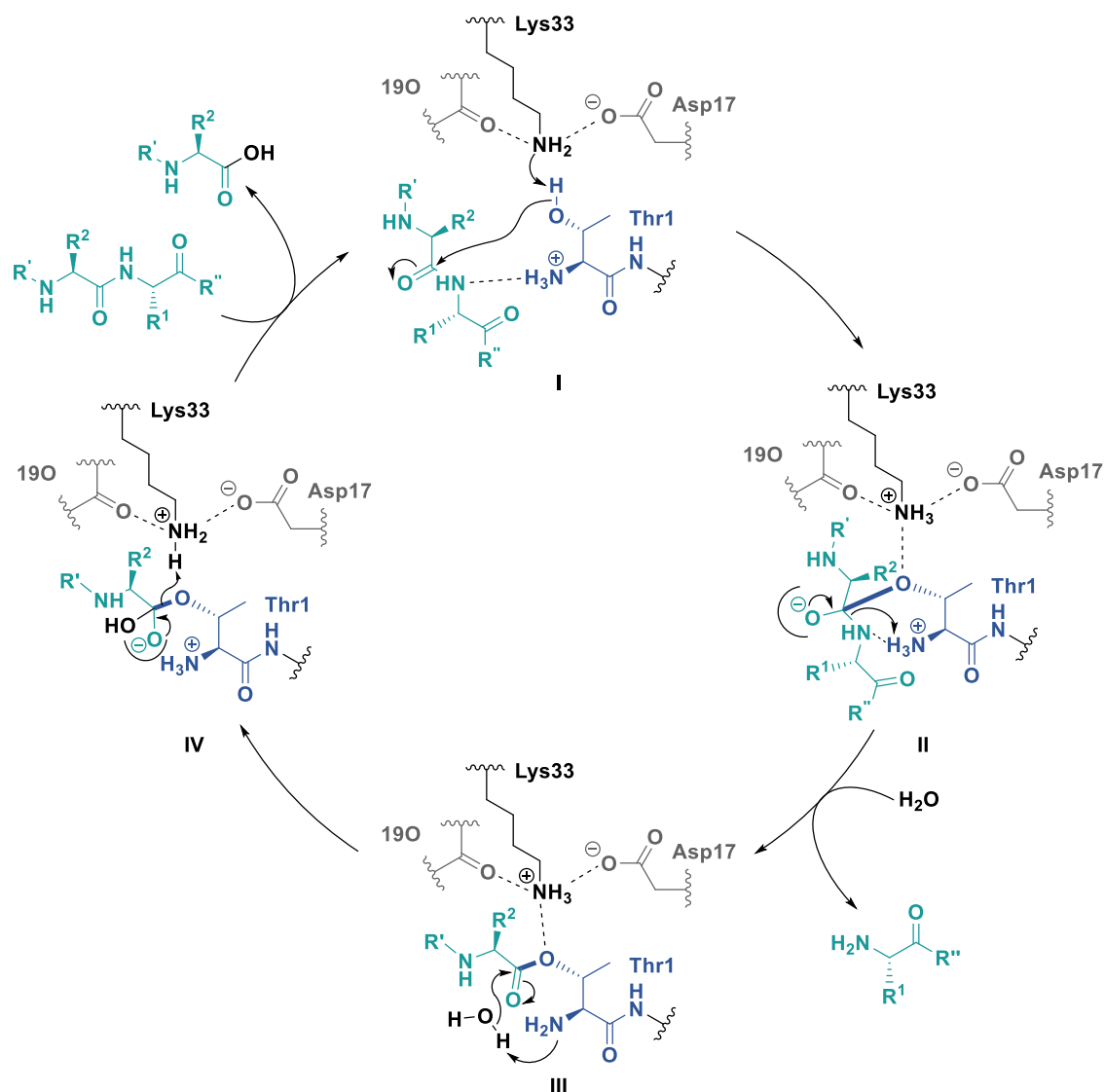
Abb. 7.2: Struktur des humanen 26S-Proteasoms (PDB: 5GJR) (B) sowie des dazugehörigen 20S *core particles* (A) mit den charakteristischen α - und β -Untereinheiten.^[267]

Die multimere und zylindrische Architektur des 20S-Proteasoms (~720 kDa) resultiert aus der axialen Anordnung von vier heteroheptameren Ringen (zwei äußere α - und zwei innere β -Ringe), die jeweils entweder aus sieben strukturell ähnlichen α - oder β -Untereinheiten zusammengesetzt sind.^[268-270] Die inneren β -Ringe bilden die fassförmige proteolytische Einheit und enthalten die

¹Proteasome sind auch in den anderen Domänen der Lebewesen (*Bacteria* und *Archaea*) vorzufinden. Im Rahmen dieser Arbeit werden jedoch lediglich die eukaryotischen Vertreter detailliert diskutiert.

enzymatisch aktiven Positionen des Proteasom-Komplexes, während die äußeren α -Ringe als Pforte für die entfaltenen translozierten Polypeptide dienen und somit eine vermittelnde Funktion zwischen der zentralen Pore sowie der zellulären Umgebung einnehmen.^[259-260,268] Drei der sieben β -Untereinheiten ($\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$) in der zentralen Kavität weisen eine hydrolytische Aktivität zur Spaltung von Peptidbindungen am C-terminalen Ende nach sauren, basischen bzw. hydrophoben Resten auf, sodass insgesamt sechs proteolytische Stellen in einem Komplex resultieren. In Abhängigkeit von ihrer Substratpräferenz werden diese Aktivitäten in *Caspase-ähnlich* ($\beta 1$, Peptidylglutanyl-Peptid-hydrolysierend; bevorzugte Spaltung nach sauren Resten), *Trypsin-ähnlich* ($\beta 2$, Präferenz für positiv geladene Reste wie Arginin oder Lysin) und *Chymotrypsin-ähnlich* ($\beta 5$, bevorzugte Hydrolyse nach hydrophoben Aminosäuren wie Phe und Tyr) kategorisiert.^[271-273] Aufgrund dieser Diversität wird eine Spaltung nach nahezu jeder Aminosäuresequenz ohne besondere Spezifität ermöglicht, sodass eine Vielzahl an Polypeptiden im Rahmen des proteasomalen Abbaus prozessiert werden kann.^[274-275] Dennoch stellen diese enzymatischen Aktivitäten keine Gefahr für essenzielle zelluläre Proteine dar, da die Proteolyse in einer kontrollierten Umgebung erfolgt, in welcher aufgrund der engen Poren am Eingang des *core particles* (CP) lediglich entfaltete Proteine gelangen können.^[266,270] Der Zugang zum zentralen Hohlraum wird durch die quaternäre Struktur und die damit verbundene sterische Kontrolle des Proteasoms eingeschränkt, d. h. die Hüll-Architektur des Proteasoms gewährleistet eine Selbstkompartimentierung.^[263] Darüber hinaus erfolgt die Regulation der proteasomalen Aktivität und die strikte Kontrolle des Zugangs zur Verhinderung des uneingeschränkten Abbaus zellulärer Proteine über weitere multiple Faktoren.^[260] In der Regel liegen die Eingangsporen des *core particle* im geschlossenen Zustand vor und öffnen sich erst durch die Bindung von diversen Aktivatoren bzw. sogenannten Kappen (*caps*).^[251,276-278] Darunter wurden die 11S *cap* (Proteasom-Aktivator 28/PA28) und Bleomycin-sensitive 10 *cap* (Blm10/PA200) identifiziert, die einen proteasomalen Proteinabbau ATP-unabhängig und ohne Ubiquitin-Erkennung ermöglichen. Das 19S regulatorische Partikel (19S RP/PA700; ~900 kDa) ist der am besten charakterisierte Proteasom-Aktivator und wird aus 19 individuellen Untereinheiten zusammengesetzt.^[251,279] Dieser erkennt im Gegensatz zu PA28 und Blm10 Ubiquitin-*Tags* und nutzt die bei der ATP-Hydrolyse freigesetzte Energie zur Entfaltung und Translokation der Substrate in die 20S-Untereinheit (CP).^[260,279] Anhand von Befunden aus biochemischen Experimenten und aus der Strukturaufklärung wird das 19S RP in zwei Subkomplexe („*base*“ und „*lid*“) segmentiert.^[279] Die *base* besteht aus insgesamt zehn Untereinheiten, welche sechs ATPasen (*regulatory particle triple A protein* (Rpt1–6)), zwei organisierende Untereinheiten Rpn1 und Rpn2 (*regulatory particle non-ATPase*) sowie zwei Ubiquitin-Rezeptoren (Rpn10 und Rpn13) enthält. Der *lid*-Komplex umfasst die deubiquitinierende Metalloproteinase Rpn11 sowie acht weitere nicht-katalytische Gerüstproteine (Rpn3, 5–9, 12 und 15).^[279-280]

Das 20S-Proteasom ist eine Threonin-(Endo-)Protease, in welcher als katalytisches Nucleophil die Hydroxylgruppe des *N*-terminalen Threonin-Rests (Thr10^y) im aktiven Zentrum dient.^[281] Die Hydrolyse der Peptidbindungen verläuft in allen drei verschiedenen katalytisch aktiven β -Untereinheiten ungeachtet ihrer chemischen Eigenschaften und Substratpräferenzen nach einem einheitlichen Reaktionsmechanismus (**Schema 7.1**).^[266,281]



Schema 7.1: Vorgeschlagener Proteolysemechanismus des 20S-Proteasoms im aktiven Zentrum. Das katalytisch aktive Thr1 ist blau hervorgehoben und das Peptidsubstrat in Petrol gefärbt. In Anlehnung an Huber *et al.*^[281]

Die Proteolyse des Substrats wird durch den nucleophilen Angriff von Thr1O^y an den Carbonylkohlenstoff der zur spaltenden Bindung initiiert, wobei der positiv geladene Thr1NH₃⁺-Terminus mit dem Amidstickstoff des ankommenden Peptids wechselwirkt, sodass dadurch die Peptidbindung für die Hydrolyse positioniert und aktiviert wird (**Schema 7.1, I**).^[281] Das resultierende tetraedrische Intermediat **II** kollabiert im Anschluss daran unter Freisetzung des ersten Spaltproduktes. Im nächsten Schritt aktiviert die deprotonierte Thr1NH₂-Gruppe ein Wassermolekül

zu Hydrolyse des Acyl-Enzym-Komplexes **III**, sodass schließlich die katalytische Triade bestehend aus Thr1, Lys33 und Asp/Glu17 regeneriert wird und für den folgenden Katalysezyklus erneut zur Verfügung steht.^[281]

Neben dem konstitutiv exprimierten Proteasom (cCP), welches in allen Geweben vorkommt, kodieren Wirbeltiere vier weitere katalytische β -Untereinheiten zur Ausbildung spezieller Isoformen des Proteasoms (**Abb. 7.3**).^[282-283]

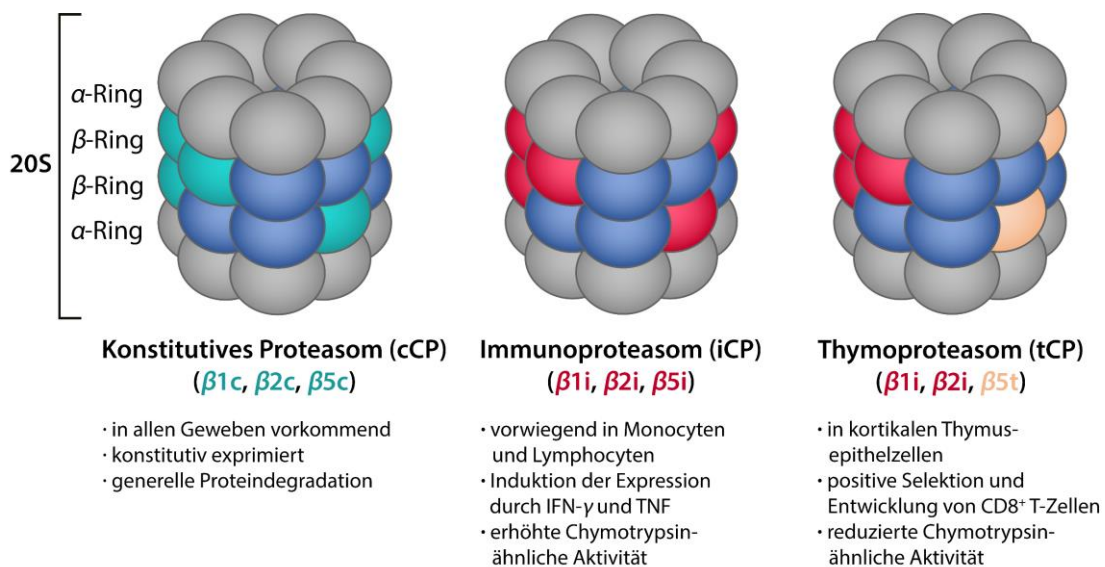


Abb. 7.3: Diversität der proteasomalen CPs und Zusammensetzung der einzelnen Untereinheiten.

Das Immunoproteasom (iCP) ist primär in Zellen des Immunsystems wie Monozyten bzw. Lymphocyten vorzufinden und wird zudem als Antwort auf eine virale Infektion und bei Stimulierung durch pro-inflammatorische Cytokine wie Interferon- γ (IFN- γ) oder Tumornekrosefaktor (TNF) gebildet.^[283-284] IFN- γ und TNF induzieren die Expression der spezialisierten immuno-Untereinheiten $\beta1i$, $\beta2i$ sowie $\beta5i$ mit modifizierten Substratbindetaschen, welche schließlich bei der *de novo*-Synthese des 20S-Proteasoms anstelle der konstitutiven β -Untereinheiten kooperativ und bevorzugt eingebaut werden. Als Resultat des Austauschs von $\beta1c$ durch $\beta1i$ wird beispielsweise die Caspase-ähnliche Aktivität durch eine Chymotrypsin-ähnliche Aktivität ersetzt, sodass präferiert Peptide mit hydrophoben C-terminalen Resten generiert werden, welche als charakteristische Ankermotive für die Bindung an *Major Histocompatibility Complex-I* (MHC-1)-Moleküle fungieren und somit die Antigen-Prozessierung maßgeblich unterstützen.^[285-288] Eine schnelle Reaktion auf immun-basierte und inflammatorische Stimuli wird zudem durch eine schnelle Assemblierungsrate des Immunoproteasoms gewährleistet, welche etwa viermal schneller als die des konstitutiven Proteasoms verläuft.^[289-290] Das Thymoproteasom (tCP) wurde erstmals 2007 beschrieben. Es ist ausschließlich in kortikalen Epithelzellen des Thymus vorzufinden und involviert als katalytisch aktive Untereinheiten $\beta1i$, $\beta2i$ und $\beta5t$.^[290-292] Das tCP besitzt mit der $\beta5t$ -Untereinheit eine im Gegensatz zu $\beta5c$ und $\beta5i$ reduzierte Chymotrypsin-ähnliche Aktivität, da

sich die Substratbindetasche hauptsächlich aus hydrophilen Aminosäuren zusammensetzt.^[291] Infolgedessen kann eine einzigartige Substratspezifität in Thymoproteasomen demonstriert werden, die ein bestimmtes Spektrum von Peptidfragmenten generieren und somit eine signifikante Funktion bei der positiven Selektion und Entwicklung von CD8⁺ T-Zellen im Immunsystem ausüben.^[290-291]

Die obigen Ausführungen demonstrieren, dass das konstitutive 20S-Proteasom für die intrazelluläre Proteinhomeostase von entscheidender Bedeutung ist. Infolgedessen führt die Inhibition des Proteasoms zur Akkumulierung fehlgefalteter Proteine und zur Beeinträchtigung zahlreicher Signaltransduktionswege in der Zelle (**Abb. 7.4**).^[252,259,293-295] Neben der Induktion von oxidativem Stress durch die Anreicherung toxischer reaktiver Sauerstoffspezies bewirken Proteasom-Inhibitoren die Downregulation proinflammatorischer Signalkaskaden wie z. B. die NF- κ B-vermittelte Aktivierung antiapoptotischer Gene.^[295-296] Zudem wird durch die Hemmung der Abbau von Zellzyklus-Proteinen und Tumorsuppressoren wie p53 bzw. des Cyclinkinase-Inhibitors p27 verhindert.^[259,297] Letztlich führt die Proteasom-Inhibition zu einer fortschreitenden Anreicherung proapoptotischer Faktoren und Tumorsuppressor-Proteinen, sodass der Zellzyklusarrest hervorgerufen und die Apoptose induziert wird.^[252,293,295] Aus diesem Grund stellt das 20S-Proteasom ein wertvolles und seit mehreren Jahren etabliertes, antineoplastisches Target für die Behandlung verschiedener Krebserkrankungen dar.^[252,259,293-294]

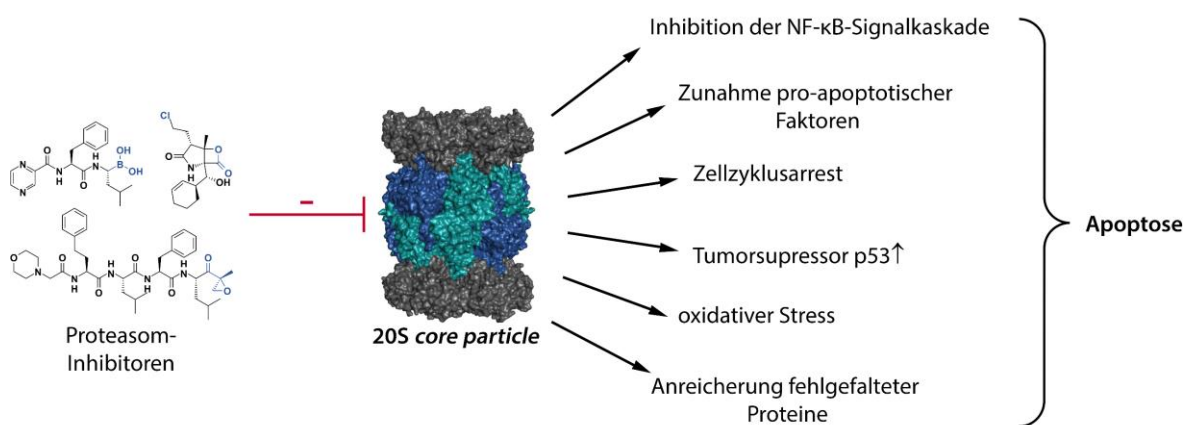


Abb. 7.4: Einfluss der Proteasom-Inhibition auf physiologische Prozesse, welche schließlich zur Apoptose der Tumorzelle führen.

Maligne Zellen erweisen sich aufgrund ihrer hohen Teilungsrate als weitaus anfälliger für die cytotoxischen Effekte einer Proteasom-Inhibition. In diesem Zusammenhang wird die erhöhte Empfindlichkeit von Tumorzellen im Vergleich zu normalen Zellen vor allem auf das Ungleichgewicht zwischen der zellulären Proteasombelastung und der vorhandenen Abbaukapazität in Verbindung gebracht.^[259,295] Krebszellen sind infolge ihres beschleunigten Wachstums und der Chromosomeninstabilität insbesondere vom Proteasom abhängig, um die hohe Konzentration an akkumulierten, fehlgefalteten Proteinen zu bewältigen.^[293,298] Daher erfolgt der induzierte Zelltod durch die Inhibition des 20S-Proteasoms in erster Linie in malignen Tumorzellen, während gesunde

Zellen vergleichsweise in geringerem Umfang beeinträchtigt werden.^[259,293,295] Generell handelt es sich bei Proteasom-Inhibitoren um niedermolekulare, peptidomimetische Verbindungen, in welchen die Seitenketten (P-Stellen) so modifiziert werden, dass sie die S-Taschen innerhalb des Substratkanals möglichst optimal ausfüllen und damit zur Erhöhung der Selektivität in den einzelnen β -Untereinheiten beitragen.^[252,293,299-300] Die Inhibition der Chymotrypsin-ähnlichen (ChTL) β 5-Untereinheit bewirkt die größte Reduktion der Proteolyserate des 20S-Proteasoms in Vergleich zur Hemmung von β 1 und β 2, weshalb die meisten Inhibitoren diese Untereinheit adressieren.^[252,301] Das peptidomimetische Grundgerüst wird zudem zur Inaktivierung der katalytischen Funktion mit einer reaktiven Kopfgruppe (elektrophiler *Warhead*) kombiniert, welche den N-terminalen Thr1-Rest kovalent-reversibel bzw. -irreversibel modifiziert. Die meisten bisher entwickelten Proteasom-Inhibitoren sind daher Peptidylboronate, α',β' -Epoxyketone, β -Lactone, (α -Keto)Aldehyde, Vinylamide und -sulfone (Tab. 1.1 und Abb. 7.5).^[252,293,299-300]

Tab. 7.1: Eigenschaften geläufiger Proteasom-Inhibitoren sowie deren Status in der klinischen Entwicklung.^[302-311]

Inhibitor	chem. Klasse	Affinität (nM)			Status
		β 1c	β 2c	β 5c	
Bortezomib (94)	Boronat	IC ₅₀ = 74	IC ₅₀ = 4200	IC ₅₀ = 7	zugelassen (MM, MCL)
Ixazomib (95)	Boronat	IC ₅₀ = 31	IC ₅₀ = 3500	IC ₅₀ = 3.4	zugelassen (MM, MCL)
Delanzomib (96)	Boronat	n. a.	n. a.	IC ₅₀ = 3.8	Phase II
Carfilzomib (97)	α',β' -Epoxyketon	IC ₅₀ = 2400	IC ₅₀ = 3600	IC ₅₀ = 6	zugelassen (MM, MCL)
Oprozomib (98)	α',β' -Epoxyketon	n. a.	n. a.	IC ₅₀ = 36	Phase IB/II
Omuralid (99)	β -Lacton	n. a.	n. a.	IC ₅₀ = 49	–
Marizomib (100)	β -Lacton	IC ₅₀ = 430	IC ₅₀ = 28	IC ₅₀ = 3.5	Phase I–III (je nach Anwendung)
MG-132 (101)	Aldehyd	IC ₅₀ = 4500	IC ₅₀ = 670	IC ₅₀ = 75	–
102	α -Ketoaldehyd	n. a.	n. a.	K _i ' = 3.1	–
Syringolin A (103)	Vinylamid	n. a.	K _i ' = 6.7	K _i ' = 843	–
104	Vinylsulfon	n. a.	n. a.	n. a.	–

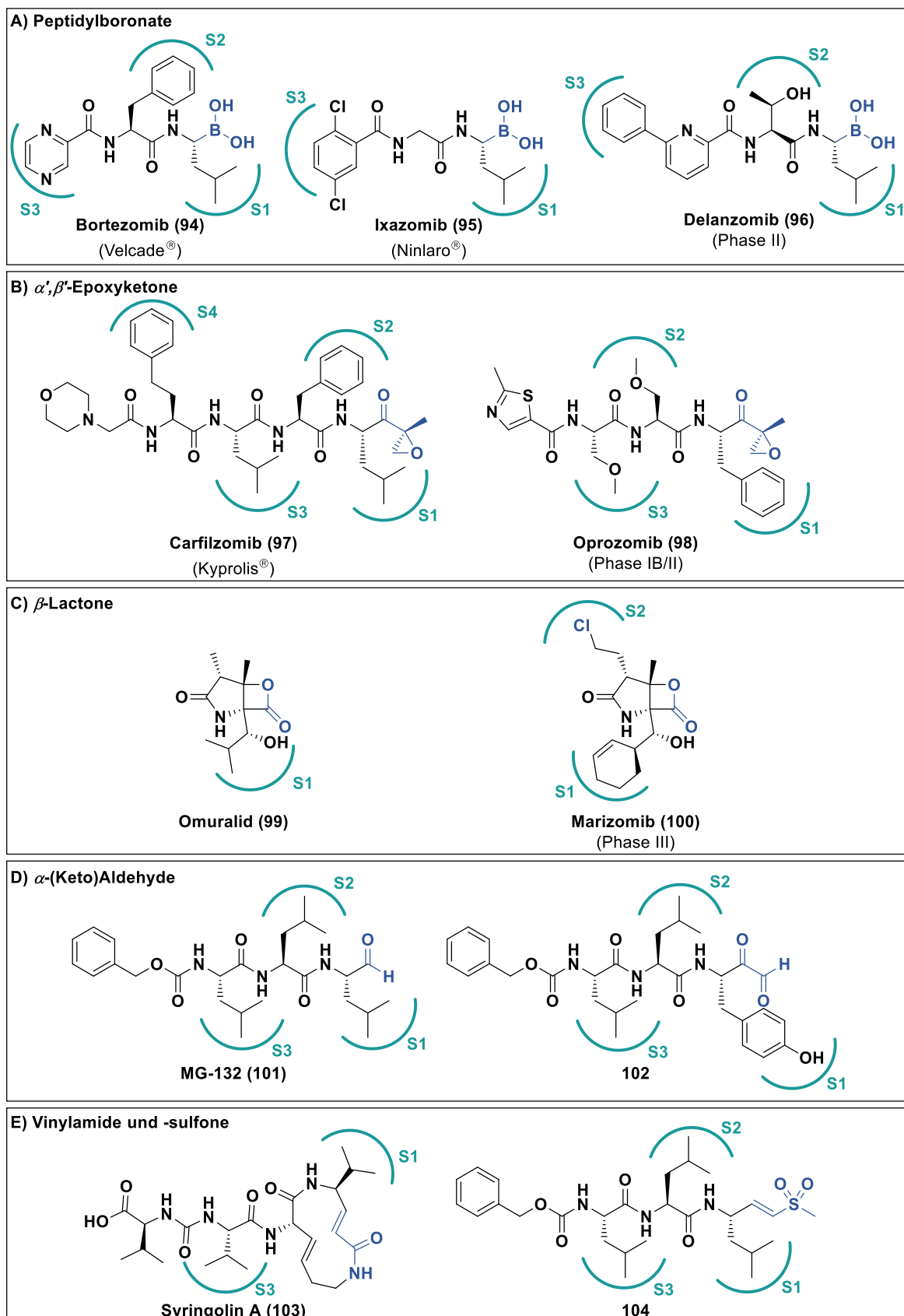
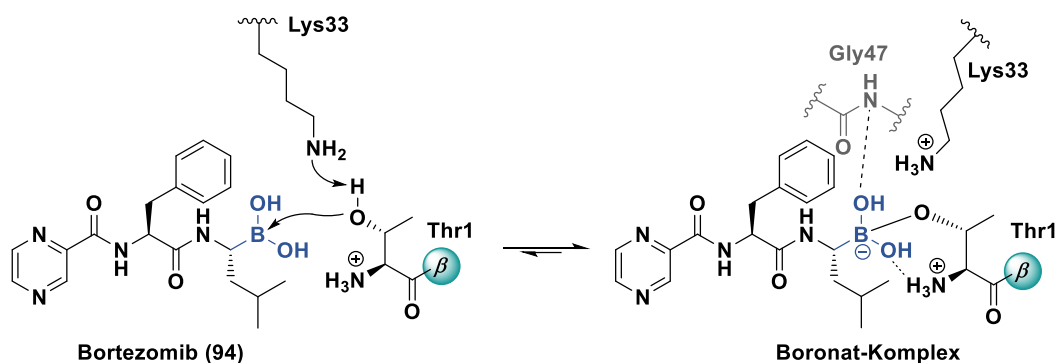


Abb. 7.5: Chemische Strukturen bekannter Proteasom-Inhibitoren (cCP), geordnet nach ihrem Inhibitionsmechanismus. Der elektrophile Warhead ist blau dargestellt und die Selektivitätstaschen (S) des Substratbindungskanals sind entsprechend hervorgehoben sowie nach der Standardnomenklatur bezeichnet. In Anlehnung an Huber bzw. Beck *et al.*^[293,299]

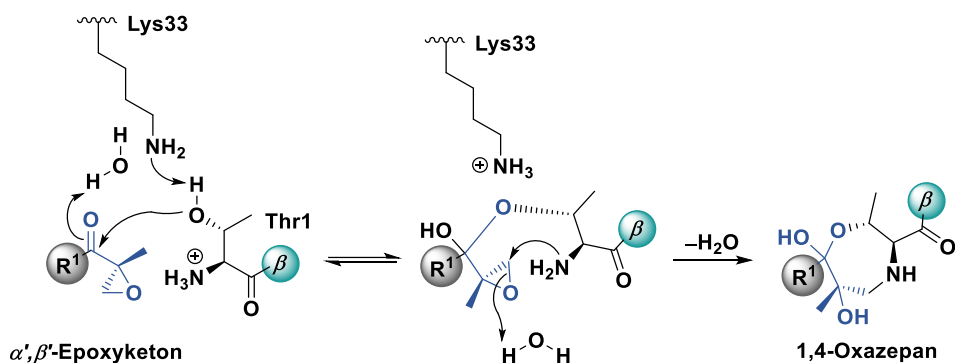
Mit Bortezomib (**94**), Ixazomib (**95**) und Carfilzomib (**97**) befinden sich nach aktuellem Stand drei von der FDA zugelassene Proteasom-Inhibitoren für die Behandlung des Multiplen Myeloms (MM) oder des Mantelzell-Lymphoms (MCL) im Einsatz.^[252,294] Der erste Wirkstoff in klinischer Verwendung war das Boronsäure-Analogon Bortezomib (Velcade®), welcher seit 2003 für die Therapie des MM bzw. MCL eingesetzt wird.^[312-314] Bortezomib ist ein langsam-kovalent-reversibler Inhibitor (IC_{50} für $\beta 5c = 7$ nM)^[302] mit einer elektrophilen Boronsäure als *Warhead*, die mit dem nucleophilen Thr1-Rest (Thr1O^γ) ein tetraedrisches Intermediat bildet (**Schema 7.2**).



Schema 7.2: Inhibitionsmechanismus von Bortezomib mit dem nucleophilen Thr1O^γ der proteolytisch aktiven β -Untereinheiten. Die stabilisierenden Wasserstoffbrückenbindungen des Boronat-Komplexes sind entsprechend dargestellt.

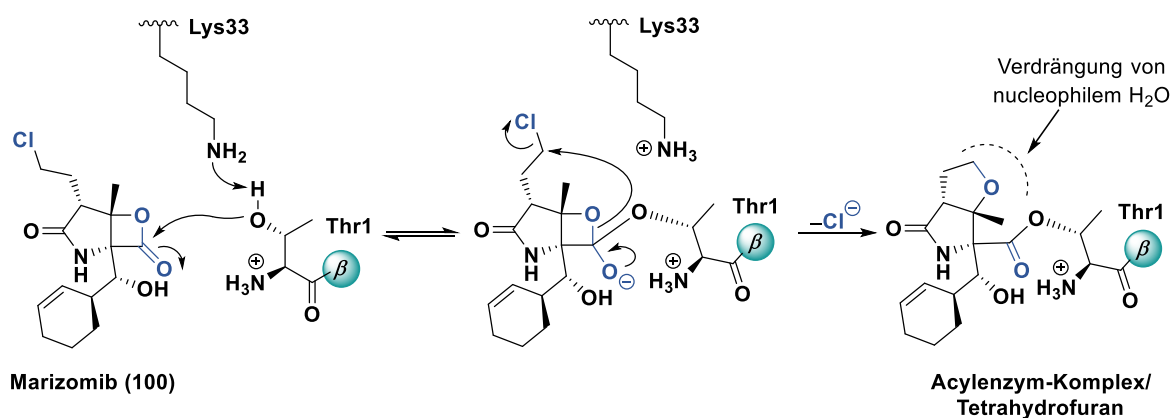
Dieser kovalente Boronsäure-Thr1O^γ-Komplex wird zusätzlich durch wichtige Interaktionen wie Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Boronsäure-Hydroxygruppen und der *N*-terminalen Thr1NH₃⁺-Gruppe bzw. Gly47NH (Oxyanion-hole) stabilisiert, was in Kombination mit dem *Hard and Soft Acids and Bases* (HSAB)-Prinzip eine rationale Erklärung für die erhöhte Affinität der Peptidylboronate **94–96** für *N*-terminale Threoninproteasen gegenüber anderen Proteasen liefert.^[315] Aufgrund diverser Einschränkungen wie die limitierte therapeutische Breite, die Notwendigkeit zur intravenösen Gabe, die geringe Aktivität bei soliden Tumoren sowie erhebliche Nebenwirkungen (periphere Neuropathie, Thrombocytopenie und gastrointestinale Störungen) wurden in der Folge neuere Wirkstoffe zur Umgehung der Defizite von Bortezomib entwickelt.^[295] Zu diesen Inhibitoren zweiter Generation gehört Ixazomib (**95**, Ninlaro®), mit dem 2015 der erste oral bioverfügbare Proteasom-Inhibitor bereitgestellt wurde. Hierbei wird Ixazomibcitrat als Prodrug verabreicht, welches unter physiologischen Bedingungen rasch zur bioaktiven freien Boronsäure (IC_{50} für $\beta 5c = 3.4$ nM) hydrolysiert.^[303] Gegenüber Bortezomib weist Ixazomib eine signifikant geringere Dissoziations-Halbwertszeit ($t_{1/2} = 18$ min vs. $t_{1/2} = 110$ min) und gewährleistet somit eine verbesserte Gewebeverteilung.^[303] Die Inhibition der β -Untereinheit des Proteasoms durch das α',β' -Epoxyketon Carfilzomib (**97**, Kyprolis®, seit 2012 von der FDA zugelassen) verläuft nach einem dualen Wirkmechanismus (IC_{50} für $\beta 5c = 6$ nM).^[302,316] Nach der reversiblen Bildung eines Hemiketals zwischen Thr1O^γ und dem Keton erfolgt ein nucleophiler Angriff der *N*-terminalen Aminogruppe Thr1N an das β -C-Atoms des Epoxids unter irreversibler Ausbildung eines stabilen 1,4-Oxazepan-

Ringsystems (**Schema 7.3**).^[316-318] In früheren Studien wurde an dieser Stelle die Entstehung eines entsprechenden Morpholinrings vermutet.^[293,316-317]



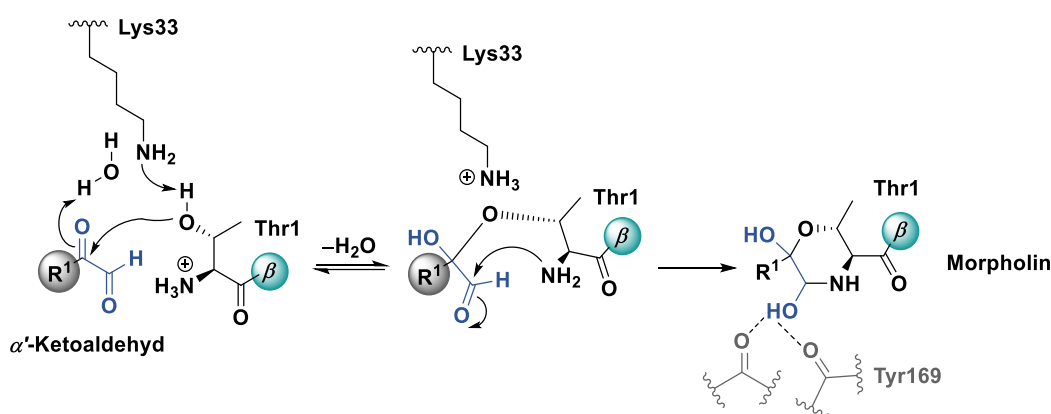
Schema 7.3: Inhibitionsmechanismus von α',β' -Epoxyketonen unter Ausbildung eines 1,4-Oxazepanrings. In Anlehnung an Schrader *et al.*^[318]

Dem breiteren therapeutischen Fenster und der Wirksamkeit auch gegen Bortezomib-resistenzen Zelllinien steht die intravenöse Applikation gegenüber,^[319-320] weshalb das oral bioverfügbare Analogon Oprozomib (**98**, *Onyx Pharmaceuticals*) zur Zeit klinisch evaluiert wird (IC_{50} für $\beta 5c = 36$ nM).^[305,321] Mit dem nicht-peptidischen β -Lacton Marizomib (**100**, IC_{50} für $\beta 5c = 2.5$ nM) befindet sich aktuell ein weiterer vielversprechender Proteasom-Inhibitor in klinischen Studien, welcher auch in der Lage ist, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren.^[307,322-324] Dieser marine Naturstoff besitzt mit seiner bivalenten Kopfgruppe einen bemerkenswerten Inhibitionsmechanismus: Der nucleophile Angriff von Thr1O' an das Lacton führt zur Ringöffnung unter Ausbildung eines Acyl-Enzym-Komplexes, der sich in Gegenwart eines Wassermoleküls langsam hydrolysieren lässt. Allerdings wird diese Reversibilität im Fall von Marizomib unterbunden, da die Chlorethylseitenkette im zweiten Schritt von der entstandenen freien C3-Hydroxygruppe angegriffen wird und durch die resultierende Ausbildung eines Tetrahydrofuranrings nucleophiles Wasser aus der Bindetasche verdrängt und somit die Hydrolyse verhindert wird (**Schema 7.4**).^[325-326]



Schema 7.4: Inaktivierung des katalytischen Zentrums durch das β -Lacton Marizomib (**100**).

Peptidylaldehyde wie **MG132 (101)** waren die ersten entwickelten Proteasom-Inhibitoren. Ihre Hemmung beruht auf der reversiblen Halbacetalbildung durch den nucleophilen Angriff von Thr1O^γ der proteolytischen Untereinheiten an die Aldehydfunktion.^[327] Aufgrund der geringen Stabilität dieser Verbindungen verbunden mit *Off-Target*-Effekten besteht nur eine limitierte therapeutische Anwendung; sie werden jedoch noch häufig in der Forschung als Werkzeug für biologische Analysen eingesetzt.^[328] In Analogie zu α',β' -Epoxyketonen findet die Inaktivierung des *N*-terminalen Threoninrests durch α -Ketoaldehyde wie **102** in zwei sukzessiven Schritten statt.^[329-330] Nach Hemiketalbildung unterliegt Thr1 einer Cyclisierungsreaktion mit reversibler Bildung eines Morpholinrings (**Schema 7.5**).^[318]



Schema 7.5: Mechanismus der Inhibition von Thr1 durch α -Ketoaldehyde. Das Halbaminal wird durch zusätzliche Interaktionen mit dem Peptidrückgrat stabilisiert.^[318]

Neben den oben beschriebenen Inhibitoren und deren Wirkmechanismus sind auch einige wenige Peptidomimetika mit einem α,β -ungesättigten System (Michael-Akzeptor) als *Warhead* zur Adressierung der katalytischen Untereinheit des Proteasoms beschrieben.^[310-311,331] Ihre geringe Spezifität (Hemmung von Cysteinproteasen) führt dazu, dass sie für therapeutische Zwecke eher nicht berücksichtigt werden.^[331]

In den letzten Jahren hat die selektive Inhibition des Immunproteasoms (iCP) signifikant an Bedeutung gewonnen, da diese Isoform des CP mit der Entwicklung und dem Fortschreiten einiger Krebsarten, Autoimmunerkrankungen, Entzündungen sowie neurodegenerativen Krankheiten assoziiert wird.^[284,288,332] Tatsächlich konnte in einigen vielversprechenden Studien gezeigt werden, dass die Inhibition der $\beta 5i$ -Untereinheit des Immunproteasoms die Entwicklung von Arthritis bzw. Darmkrebs unterdrückt.^[333-334] Mithilfe der von Huber *et al.* erhaltenen Kristallstrukturen konnten signifikante Unterschiede in der S1-Tasche des iCP aufgefunden werden, wobei Inhibitoren mit größeren P1-Resten die höhere Selektivität im Vergleich zu $\beta 5c$ bedingen.^[335] Eine selektive Inhibition kann zudem durch Adressierung eines iCP-spezifischen nicht-katalytischen Cystein-Restes erzielt werden.^[336] Nach aktuellem Kenntnisstand sind **ONX-0914** (IC_{50} für $\beta 5i = 39$ nM) und **KZR-616** (IC_{50} für $\beta 5i = 39$ nM) die bisher besten Immunproteasom-Inhibitoren, welche sich durch

eine 10–20-fache Selektivität gegenüber $\beta 5c$ auszeichnen.^[333,337] Aufgrund des breiten Spektrums an Informationen in diesem Forschungszweig sei auf einen kürzlich erschienenen Übersichtsartikel von Zerfas *et al.* verwiesen.^[284]

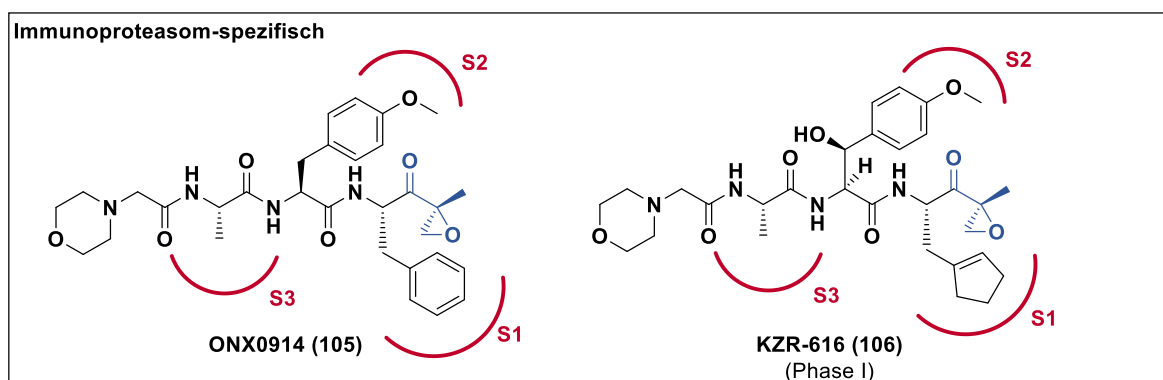


Abb. 7.6: Strukturen ausgewählter Immunoproteasom-selektiver Inhibitoren.

Ein interessanter und neuer Ansatz zur Inhibition der proteasomalen Aktivität wurde 2017 von Li *et al.* beschrieben.^[338] Anstelle der β -Untereinheiten des 20S-cCP wurde in dieser Studie die Metalloisopeptidase Rpn11 im „lid“ des 19S regulatorischen Partikels adressiert. Rpn11 ist im Ubiquitin-Proteasom-System für die Spaltung der Polyubiquitin-Ketten von den Substraten verantwortlich, sodass diese durch den 20S-Kern prozessiert werden können.^[280] Die Inhibition der Deubiquitinase-Aktivität von Rpn11 durch den identifizierten Antagonisten Capzimin (**107**, Abb. 7.7) führte nachweislich zu einer Einschränkung der Proteasomfunktion und somit zur Stimulierung der Apoptose aufgrund der Anreicherung polyubiquitinerter Proteine. Des Weiteren konnte eine Hemmung der Zellproliferation in mehreren (Bortezomib-resistenten) Krebszelllinien beobachtet werden.^[338]

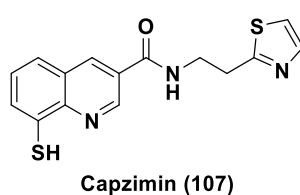


Abb. 7.7: Struktur des Rpn11-Inhibitors Capzimin (**107**).

Obwohl das 20S-Proteasom mittlerweile ein validiertes Drug Target zur Behandlung hämatologischer Tumore darstellt, ist die Anwendung auf nicht-solide Tumoren und zum Teil aufgrund der bestehenden gravierenden Nebenwirkungen limitiert. Das Auftreten von Resistenzen bei Langzeitbehandlung und die beobachteten *Off-Target*-Effekte liefern zusätzliche Argumente, weshalb Proteasom-Inhibitoren nach wie vor im Fokus der Grundlagenforschung und in klinischen Studien stehen.^[252,293,300]

7.2 Motivation und Zielsetzung

Proteasom-Inhibitoren haben sich in den letzten Jahren in der Klinik zur Behandlung verschiedener nicht-solider Tumore wie dem Multiplen Myelom oder dem Mantelzell-Lymphom bewährt. Drei mittlerweile von der *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) zugelassene und zahlreiche in klinischen Studien befindliche Wirkstoffe verdeutlichen, dass sich dieses Konzept der Proteasom-Hemmung als therapeutischer Ansatz bei diversen Krebsarten inzwischen etabliert hat.^[252,294] Obwohl mit diesen Verbindungen bereits hochpotente Hemmstoffe zur Verfügung stehen, ist ihre therapeutische Anwendung aufgrund der Toxizität und der damit verbundenen häufig auftretenden, schwerwiegenden Nebenwirkungen limitiert.^[252,339] Zudem konnte bisher nur eine geringe Wirksamkeit bei soliden Tumoren nachgewiesen werden und es können sich bei der Langzeitbehandlung Resistenzen gegenüber diesen Arzneimitteln entwickeln.^[294,339]

Aus diesen Gründen besteht nach wie vor ein erheblicher Bedarf an der Entwicklung neuartiger und selektiverer Proteasom-Inhibitoren. Um das Wirksamkeits- und Selektivitätsprofil bei der Proteasom-Inhibition zu verbessern, ist beispielsweise eine Modifikation der pharmakologischen Eigenschaften und der damit verbundenen Gewebeverteilung erforderlich.^[339] Dies lässt sich unter anderem durch Veränderung der molekularen Bindungskinetik erzielen, sodass möglicherweise eine optimale Balance zwischen einer ausreichenden Proteasom-Inhibition und der Aufrechterhaltung der Aktivität in den benötigten physiologischen Prozessen gefunden werden kann.^[339-341] Neben der Verbesserung der Selektivität und Affinität durch nicht-kovalente Interaktionen kann das Selektivitätsprofil bei kovalenten Inhibitoren vor allem auch durch sorgfältige Auswahl des elektrophilen *Warheads* moduliert werden. Dabei muss eine angemessene Reaktivität mit dem katalytischen Zentrum sowie räumliche Orientierung innerhalb der Bindetasche berücksichtigt werden.^[342-343] Sie muss ausreichend hoch sein, um eine kovalente Bindung mit dem katalytischen Zentrum auszubilden, jedoch sollte sie sich gleichzeitig auch als unzureichend für eine unspezifische Reaktion mit anderen Proteinen erweisen.^[343] Wie bereits diskutiert, wurden für Proteasom-Inhibitoren bereits unterschiedliche reaktive Kopfgruppen (Boronate, Epoxyketone, β -Lactone etc.) für die kovalente Verknüpfung mit dem *N*-terminalen Threonin-Rest in der Bindetasche berücksichtigt (vgl. **Kap. 7.1**).

Im Rahmen dieses Forschungsprojektes sollten neue elektrophile *Warheads* in Bezug auf ihre Reaktivität gegenüber Thr1 der katalytischen Untereinheiten des 20S-Proteasoms evaluiert werden, die nach bestem Wissen bisher noch nicht in Proteasom-Inhibitoren beschrieben sind. Hierbei sollte das Bortezomib-Grundgerüst (Pyz-Phe-Leu) als peptidomimetische Erkennungseinheit beibehalten werden und die Boronsäure durch andere reaktive Kopfgruppen substituiert werden. Diese sollten vor allem 4-Oxoenoate,^[344] (Fluor)vinylylsulfone,^[345-346] Nitroalkene^[347] und dual-aktivierte Michaelakzeptoren^[348] umfassen, die schon als *Warheads* in Cysteinprotease-Inhibitoren

Anwendung fanden. Darüber hinaus wurde das rationale Design neuartiger und bisher unerforschter elektrophiler Struktur motive für die Adressierung des nucleophilen Zentrums zum Ziel gesetzt.

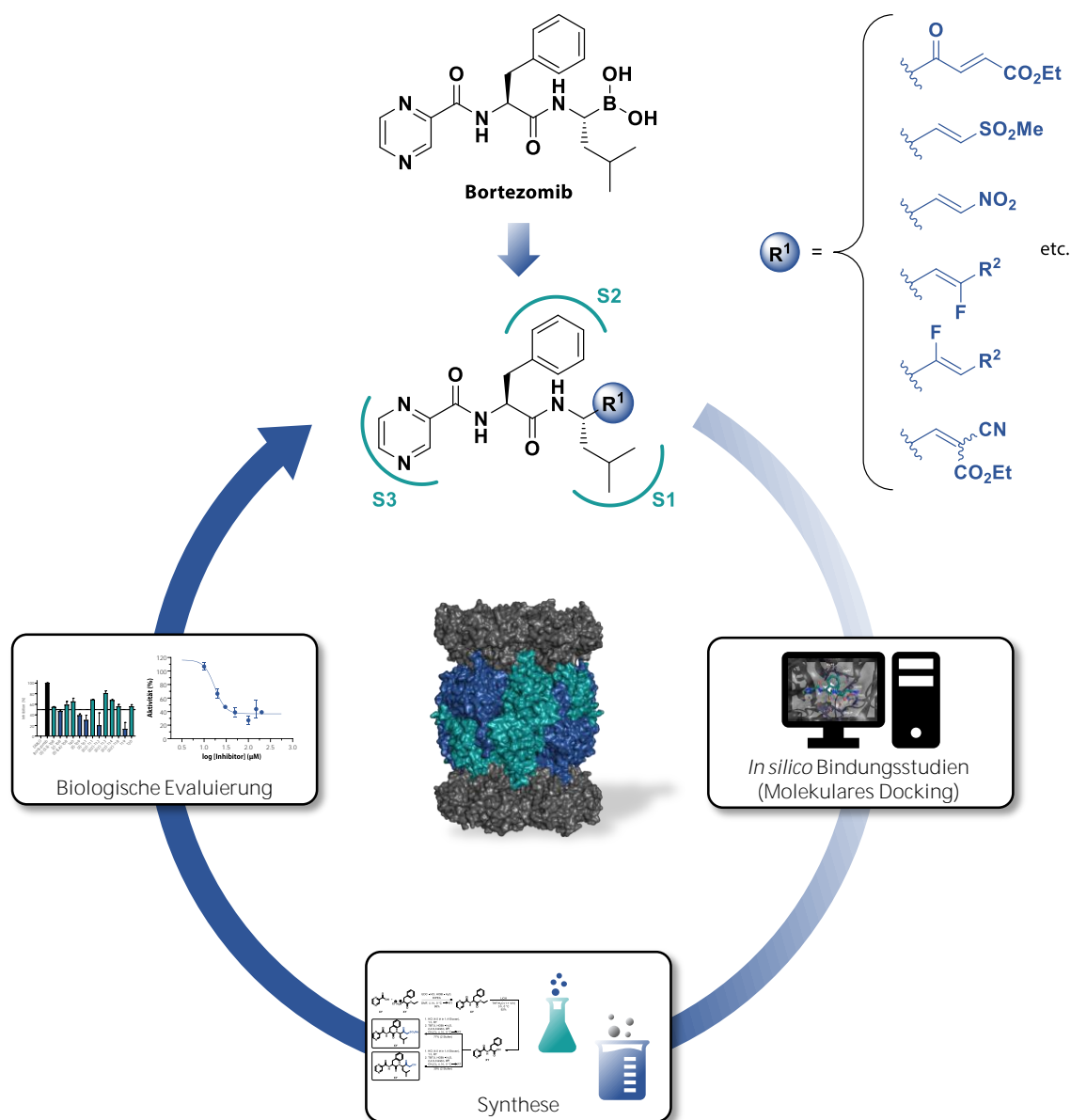


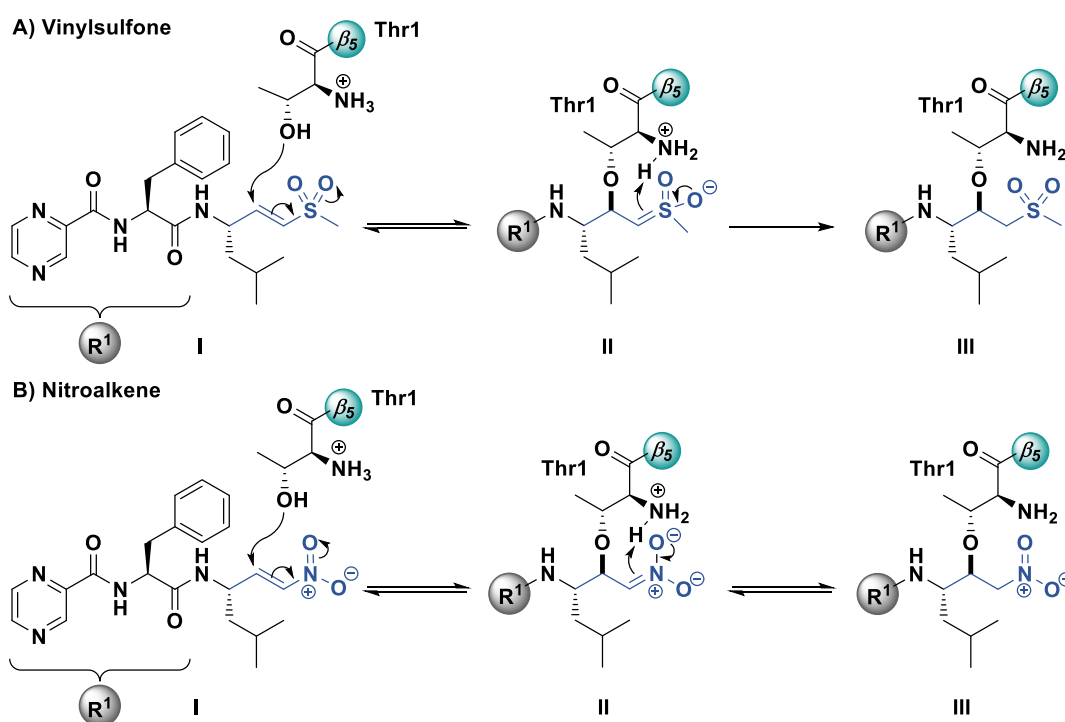
Abb. 7.8: Protokoll für das Design potenzieller Proteasom-Inhibitoren mit diversen *Warheads*.

Neben dem Inhibitor design sollten im Rahmen dieser Arbeit für die oben beschriebenen potenziellen Proteasom-Inhibitoren zunächst computergestützte molekulare Dockingstudien für die prospektive Analyse des entsprechenden Bindemodus durchgeführt werden. Im Anschluss daran sollte ein synthetischer Zugang zu diesen neuen Bortezomib-Derivaten etabliert und die resultierenden Verbindungen strukturell charakterisiert werden. Mithilfe der potenziellen Proteasom-Inhibitoren wurde schließlich beabsichtigt, in ersten biologischen Analysen an der $\beta 5$ -Untereinheit des humanen 20S-Proteasoms die neuen *Warheads* zu bewerten und eine Einordnung ihrer Reaktivität im Vergleich zu Bortezomib zu ermöglichen.

7.3 Ergebnisse und Diskussion

7.3.1 Inhibitor-Design und Molekulares Docking

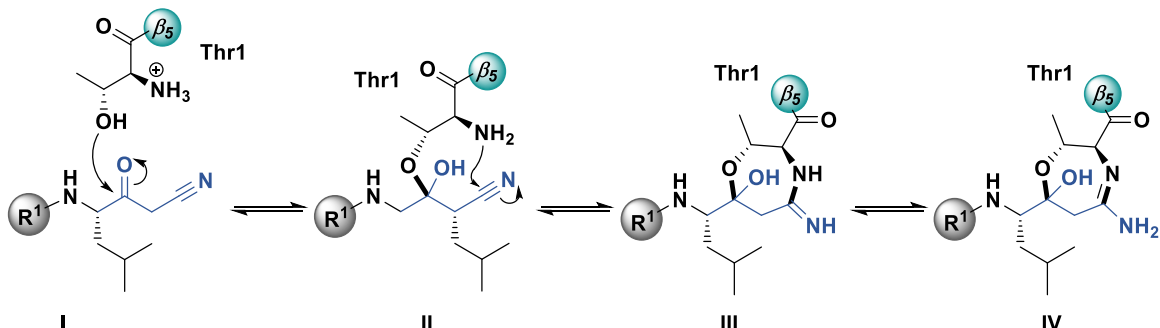
Das peptidomimetische Grundgerüst der neuen potenziellen Proteasom-Inhibitoren sollte dem des bereits etablierten Inhibitors Bortezomib entsprechen, um die S1–S3-Taschen innerhalb der Untereinheiten des Zielproteins zu adressieren. Basierend auf den obigen Überlegungen wurden strukturelle Variationen lediglich in Bezug auf die reaktive Kopfgruppe (*Warhead*) vorgenommen, die die elektrophile Boronsäure-Einheit ersetzt. Der *Warhead* sollte innerhalb des Moleküls so positioniert werden, um eine räumliche Nähe der elektrophilen Position(en) zum aktiven Zentrum zu gewährleisten und somit einen nucleophilen Angriff durch den *N*-terminalen Threoninrest (Thr1O^γ) zu erleichtern. Inspiriert von der Studie von Royo *et al.*, in welcher Dipeptidylenoate als potente und selektive Rhodensain-Inhibitoren fungierten, sollte zunächst eine 4-Oxoenoat-Einheit als *Warhead* implementiert werden.^[344] In diesem Fall stehen durch das symmetrische Michael-Akzeptorsystem mehrere elektrophile Zentren (olefinische β -Positionen sowie die Carbonylgruppen) zur Verfügung. Dieser Sachverhalt sowie mögliche Inhibitionsmechanismen wurden bereits von [REDACTED] im Rahmen seiner Masterarbeit ([REDACTED]; 2017) detailliert diskutiert.^[349] In Analogie dazu war die Integration weiterer α,β -ungesättigter Einheiten wie Vinylsulfone- und Nitroalkene vorgesehen, deren Eignung schon in Cysteinprotease-Inhibitoren wie Rhodensain und Cruzain demonstriert wurde (**Schema 7.6**).^[345,347]



Schema 7.6: Vorgeschlagene Inhibitionsmechanismen der Bortezomib-basierten Vinylsulfone (A) und Nitroalkene (B).

könnte die Reaktion mit Thr1 über die reversible Bildung eines Hemiketals **II** mit folgendem nucleophilen Angriff von Thr1NH₂ an die Nitrilgruppe verlaufen, was in der Bildung eines Oxazepin-Ringsystems (**IV**) resultiert (**Schema 7.11**).

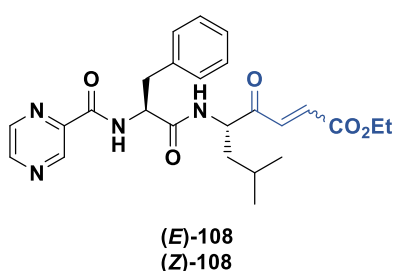
F) β -Ketonitrile/(-sulfone)



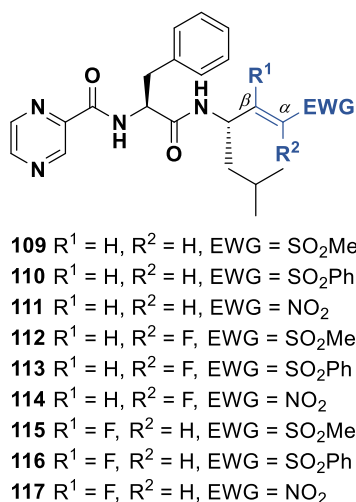
Schema 7.11: Vorgeschlagener Inhibitionsmechanismus der β -Ketoderivate am Beispiel des entsprechenden Nitrils.

Basierend auf den obigen Überlegungen wurde eine virtuelle Bibliothek der modifizierten Bortezomib-Kongenerere generiert (**Abb. 7.9**) und mittels nicht-kovalenter (*FlexX LeadIT 2.3.2*)^[356] und kovalenter Dockingstudien (*MOE 2019.01*)^[357] in die β 5-Untereinheit des humanen 20S-Proteasoms (PDB: 5LF3)^[318] prospektiv evaluiert (Details siehe **Kap. 10.5**).

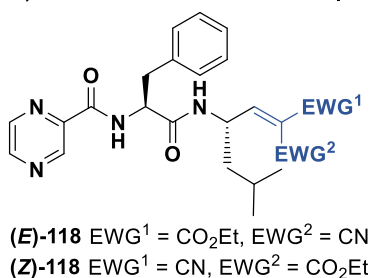
A) 4-Oxoenoate



B) Vinylsulfone und Nitroalkene



C) Dual-aktivierte Michael-Akzeptoren



D) β -Ketoderivate

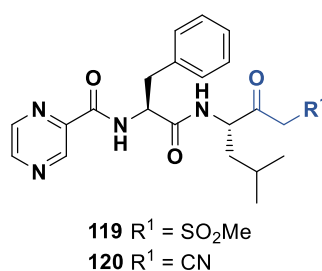


Abb. 7.9: Strukturen der Verbindungen, welche in den initialen molekularen Dockingstudien evaluiert wurden.

Zur Validierung wurden zudem Redocking-Experimente mit dem Referenzliganden Bortezomib durchgeführt, woraus RMSD-Werte von 1.9 Å (nicht-kovalent) bzw. 1.2 Å (kovalent) resultierten, sodass in beiden Fällen nur geringe Abweichungen zum kokristallisierten Liganden zu verzeichnen sind. Für alle Verbindungen konnte *in silico* ein nicht-kovalenter Enzym-Inhibitor-Komplex mit *FlexX/LeadIt* simuliert werden, in welchen die geometrische Orientierung des Liganden jeweils der des Bortezomibs im 20S-Proteasom hinreichend gut angenähert werden konnte (**Abb. 7.10** und **Tab. 7.2**). Die *Scores* dienen als Anhaltspunkt, ob die entworfenen Verbindungen eine verbesserte nichtkovalente Affinität im Vergleich zu Bortezomib aufweisen. Die entwickelten Bortezomib-Derivate besitzen den computergestützten Befunden nach vergleichbare bzw. geringfügig niedrigere *Scores*, was unter anderem auf den größeren sterischen Anspruch des entsprechenden *Warheads* relativ zur Boronsäure-Funktion zurückzuführen ist. Zusätzlich wurde –sofern möglich– der kovalente Komplex mit *MOE* modelliert; in diesem Fall können die *Scores* im Hinblick auf die Stabilität des proteingebundenen Zustands interpretiert werden, wobei ähnliche Trends zum nicht-kovalenten Docking dokumentiert werden können (**Tab. 7.2**).

Tab. 7.2: Scores des nicht-kovalenten (*FlexX/LeadIT* 2.3.2) und des kovalenten Dockings (*MOE* 2019.01).*

Verbindung	Nicht-kovalentes Docking (<i>FlexX</i>)		Kovalentes Docking (<i>MOE</i>)
	<i>FlexX</i> -Score	Hyde Score (kJ · mol ⁻¹)	Docking Score (London dG)
Bortezomib	-30.5 [†]	-30	-13.1 [§]
(E)-108	-25.6	-20	-11.7
(Z)-108	-24.8	-8	-10.9
109	-25.8	-33	-7.6
110	-22.2	-41	-6.8
111	-25.5	-26	n. b.
112	-23.8	-36	-6.5
113	-24.7	-37	-5.4
114	-23.7	-34	n. b.
115	-23.8	-31	n. b.
116	-20.1	-19	n. b.
117	-22.4	-15	n. b.
(Z)-118	-25.1	-21	-11.6
(E)-118	-25.3	-21	-11.4
119	-30.7	-13	-12.2
120	-27.9	-28	-11.9

*Details der *in silico*-Parameter siehe **Kap. 10.5**. [†]RMSD (Redocking) = 1.9 Å. [§]RMSD (Redocking) = 1.2 Å.

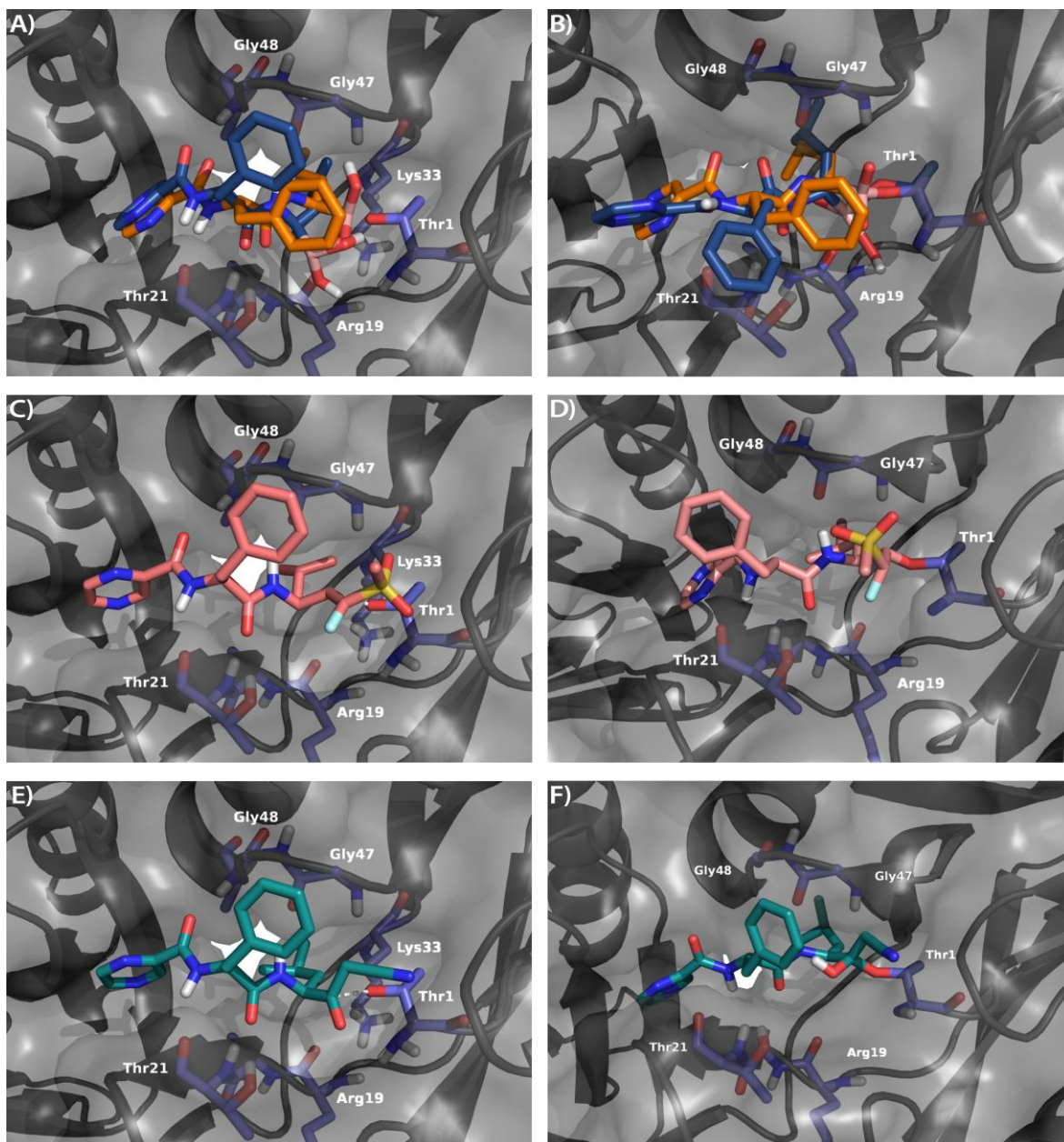


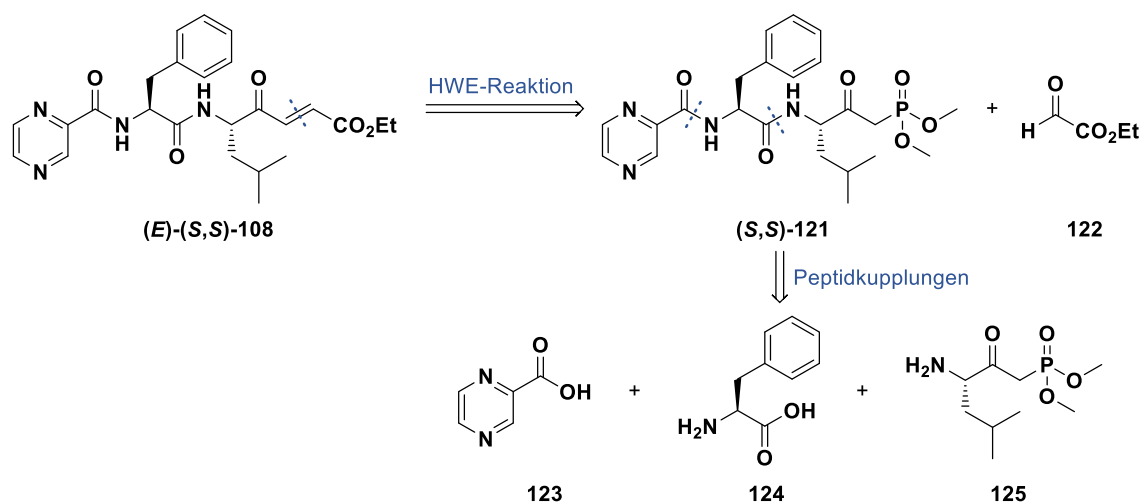
Abb. 7.10: (A) Überlagerung des nicht-kovalenten Bindemodus von Bortezomib resultierend aus dem Redocking (blau) mit dem in der Kristallstruktur (PDB:5LF3) gebundenen Inhibitor (orange). (B) Analoge Geometrie des kalkulierten kovalenten Komplexes von Bortezomib (blau) im 20S Proteasom. (C) Berechneter nicht-kovalenter Bindemodus des α -Fluorvinylsulfons **112**. (D) Resultat der entsprechenden kovalenten Dockingstudie mit **112**. (E) Prognostizierte Geometrie des β -Ketonitrils **120** sowie des möglichen kovalent-gebundenen Komplexes (F).

Bei diesen Resultaten muss vor allem berücksichtigt werden, dass es sich hierbei um eine prospektive Studie handelt und die Tendenzen der Affinität, wie sie in den *Scores* widerspiegelt werden, nicht zwangsläufig der Realität entsprechen. Daher wurden die oben aufgeführten Verbindungen im nächsten Schritt synthetisiert, um ihre Potenz biologisch analysieren zu können und eine Einordnung der Reaktivität im Vergleich zu Bortezomib zu ermöglichen. Außerdem kann mithilfe der experimentell erhaltenen Befunde überprüft werden, ob die biologische Aktivität am Proteasom mit den Resultaten der Dockingstudien konsistent ist.

7.3.2 Synthese der potenziellen Inhibitoren

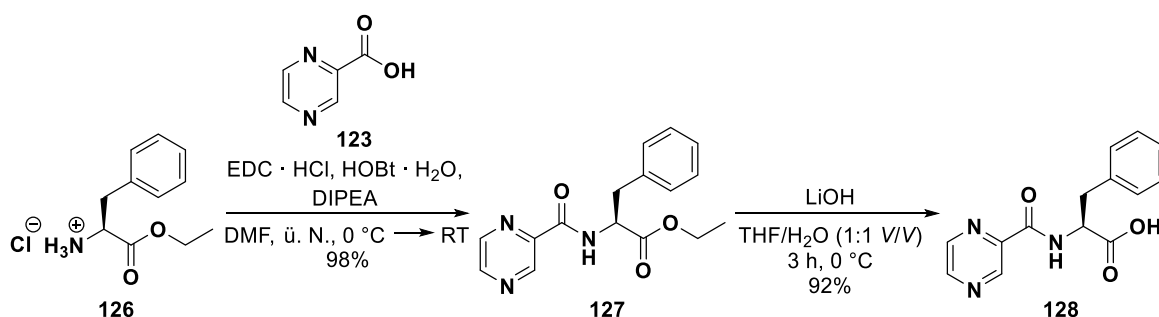
7.3.2.1 Synthese der 4-Oxoenoate

Eine retrosynthetische Betrachtung der geplanten Synthese der 4-oxoenoat-basierten Bortezomib-derivate zeigt, dass das Peptidgrundgerüst aus den entsprechenden Aminosäuren L-Phenylalanin (**124**) und L-Leucin sowie aus Pyrazin-2-carbonsäure (**123**) erhalten werden kann (**Schema 7.12**).



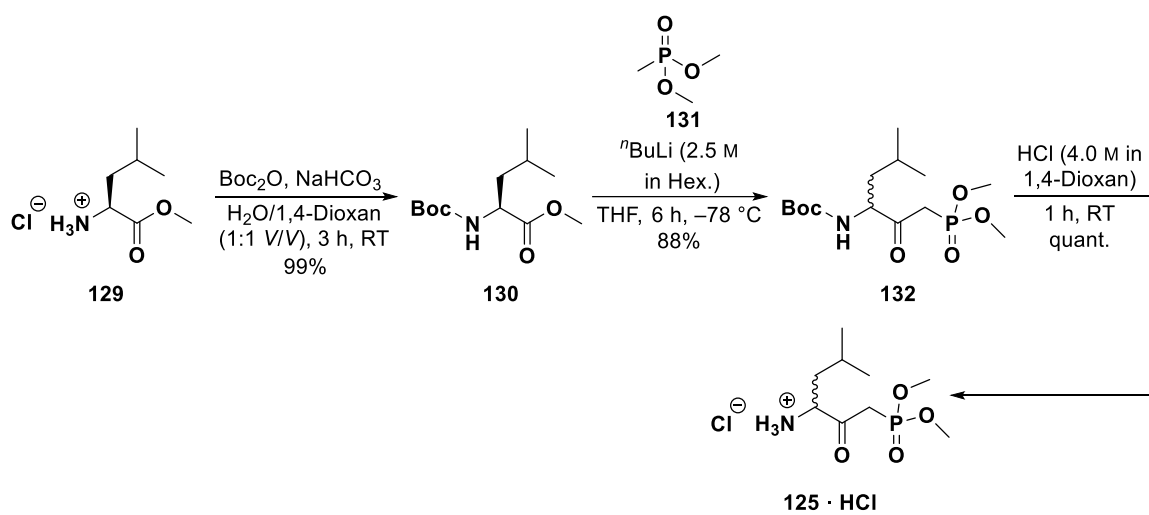
Schema 7.12: Retrosynthetische Analyse der geplanten Synthese von 4-Oxoenoaten.

Der Aufbau der Doppelbindung soll mithilfe einer *Horner-Wadsworth-Emmons* (HWE)-Reaktion realisiert werden, die als Schlüsselschritt dieser Synthese dient. Entsprechend den Überlegungen von [REDACTED] und [REDACTED] im Rahmen ihrer Masterarbeiten ([REDACTED]) sollte das Phosphonat auf der Peptidseite angebracht werden, da sonst die Darstellung eines Oxoaldehyds mithilfe der toxischen und explosiven Reagenzien Diazomethan und Dimethyldioxiran erfolgen müsste.^[349,358] Initial wurde das Peptidgrundgerüst sukzessive ausgehend von L-Phenylalanin-ethylester-Hydrochlorid (**126**) und Pyrazin-2-carbonsäure (**123**) mit anschließender Esterhydrolyse in Anlehnung an eine Vorschrift von Milo *et al.* dargestellt, wobei (Pyrazin-2-carbonyl)-L-phenylalanin (**128**) in sehr hoher Ausbeute gewonnen wurde.^[359]



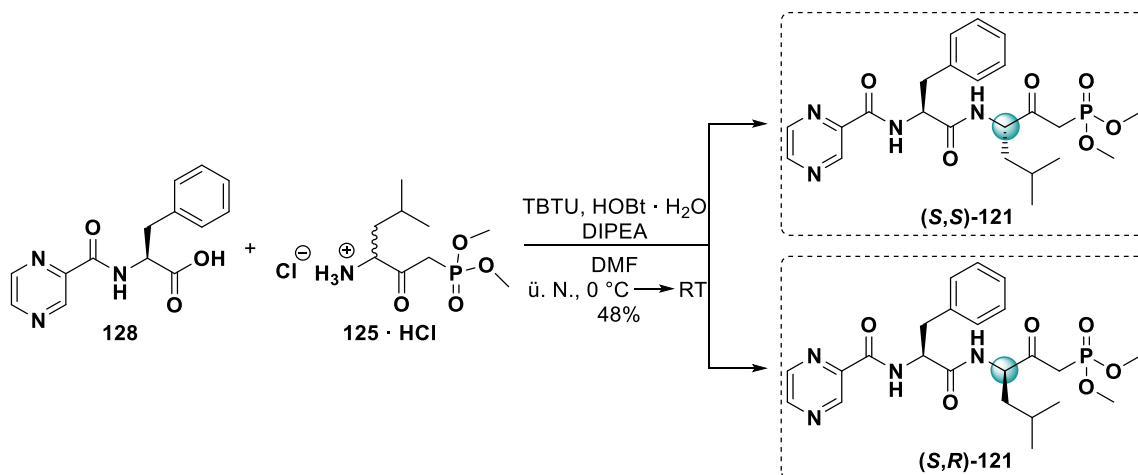
Schema 7.13: Darstellung von (Pyrazin-2-carbonyl)-L-phenylalanin (**128**) in Anlehnung an Milo *et al.*^[359]

Der zweite Teil dieser konvergenten Synthese beinhaltete die Einführung einer *N*-Boc-Schutzgruppe in L-Leucinmethylester-Hydrochlorid (**129**) mittels Di-*tert*-butyldicarbonat in Wasser/1,4-Dioxan (**Schema 7.14**).^[360] *N*-(Boc)-L-leucin-methylester (**130**) wurde dabei in nahezu quantitativer Ausbeute gewonnen. Das Phosphonat **132** war schließlich durch Reaktion des Ethylesters **130** mit Dimethylmethylphosphonat in Gegenwart von *n*-Butyllithium bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ zugänglich,^[361] wobei diese Transformation aufgrund der forcierten (stark basischen) Bedingungen mit einer Racemisierung und Verlust der Stereoinformation einhergeht, wie spätere Röntgenkristallstrukturanalysen belegen (**Abb. 7.11** und **Abb. 7.12**).



Schema 7.14: Synthese des Leucinphosphonat-Bausteins **125 · HCl**.

Nach quantitativer Deblockierung der Aminofunktion in **132** unter Verwendung von HCl (4.0 M in 1,4-Dioxan) erfolgte die Peptidkupplung zwischen der Carbonsäure **128** und der Leucinphosphonat-Einheit **125 · HCl** mittels 2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluoroborat (TBTU) und HOBT in Gegenwart von DIPEA als Base (**Schema 7.15**).



Schema 7.15: Synthese des Phosphonats **121**, welches in Form zweier Diastereomere isoliert wurde.

Das Phosphonat **121** wurde dabei wie erwartet als Gemisch zweier Diastereomere **A** und **B** (ca. 1:1)¹ erhalten, die chromatographisch getrennt werden konnten. Zur Bestimmung der absoluten Konfiguration und Differenzierung beider Diastereomere wurden jeweils die Molekülstrukturen im Festkörper mittels Kristallstrukturanalysen von [REDACTED] (Department Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) analysiert (**Abb. 7.11** und **Abb. 7.12**).

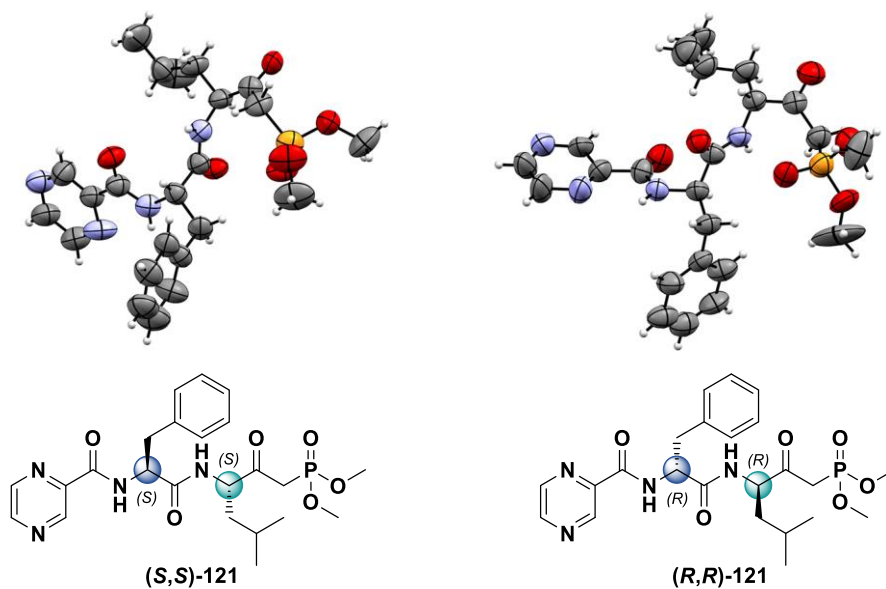


Abb. 7.11: Strukturformeln (unten) und Molekülstrukturen im Festkörper (oben; ORTEP, Ellipsoide dargestellt mit 50% Wahrscheinlichkeit) von (S,S)-121/(R,R)-121. Rot = Sauerstoff, Blau = Stickstoff, Grau = Kohlenstoff, Orange = Phosphor.

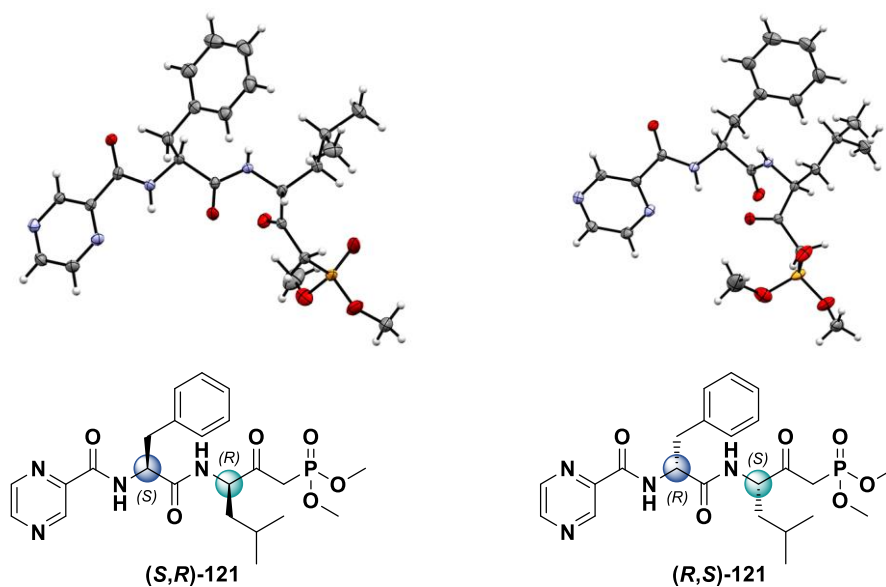
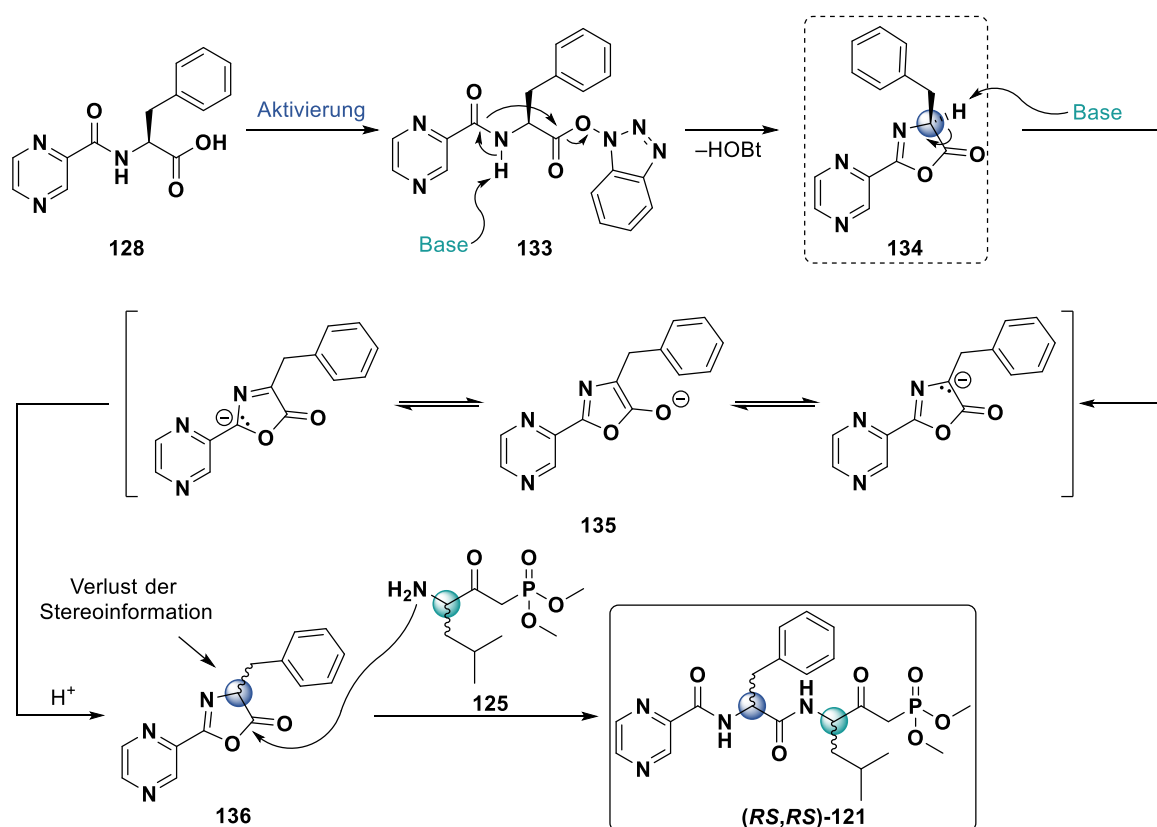


Abb. 7.12: Strukturformeln (unten) und Molekülstrukturen im Festkörper (oben; ORTEP, Ellipsoide dargestellt mit 50% Wahrscheinlichkeit) von (S,R)-121/(R,S)-121. Rot = Sauerstoff, Blau = Stickstoff, Grau = Kohlenstoff, Orange = Phosphor.

¹Verhältnis mittels HPLC-ESI-MS bestimmt durch Integration der resultierenden Peakflächen ($\lambda = 254$ nm).

Detaillierte kristallographische Informationen können den **Kap. 12.2.3** und **Kap. 12.2.4** (Anhang) entnommen werden.

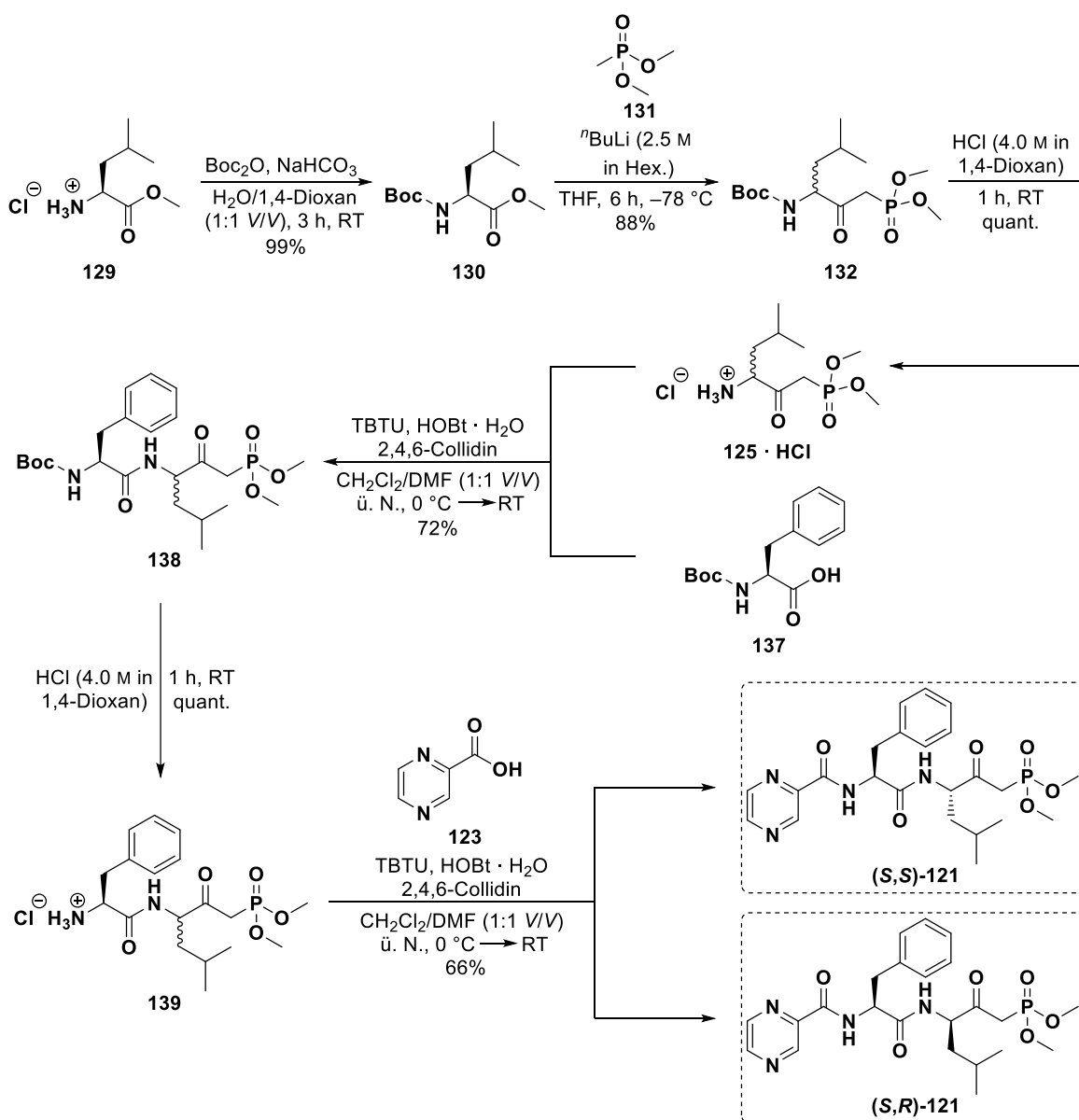
Die experimentellen Befunde der Röntgenstrukturanalyse belegen die Anwesenheit zweier Diastereomere und ermöglichten eine exakte Unterscheidung (in petrol markierte Stereozentren). Interessanterweise konnte zudem nachgewiesen werden, dass die Raumgruppen beider Diastereomere zusätzlich die dazugehörigen Enantiomere beinhalten, d. h. im Laufe der Synthese erfolgte außerdem eine (partielle) Racemisierung des Phenylalaninbausteins (in blau hervorgehobene Stereozentren). Vermutlich ist der in **Schema 7.15** illustrierte Peptidkupplungsschritt für den (teilweisen) Verlust der Stereoinformation im Phenylalaninrest verantwortlich, da der Pyrazinoylsubstituent am N^α der aktivierten Aminosäure **133** die intermediäre Bildung eines Oxazol-5(4*H*)-ons **134** im besonderem Maße induziert (**Schema 7.16**).^[362] Durch basenvermittelte Abstraktion des Protons an C^α (hier Phe) wird das Oxazolon zum entsprechenden resonanzstabilisierten Anion **135** umgewandelt, dessen Protonierung schließlich zur Aufhebung der Chiralität führt.^[362]



Schema 7.16: Mechanismus der (partiellen) Racemisierung durch intermediäre Bildung eines Oxazol-5(4*H*)-ons (**134**). In Anlehnung an Y. Yang.^[363]

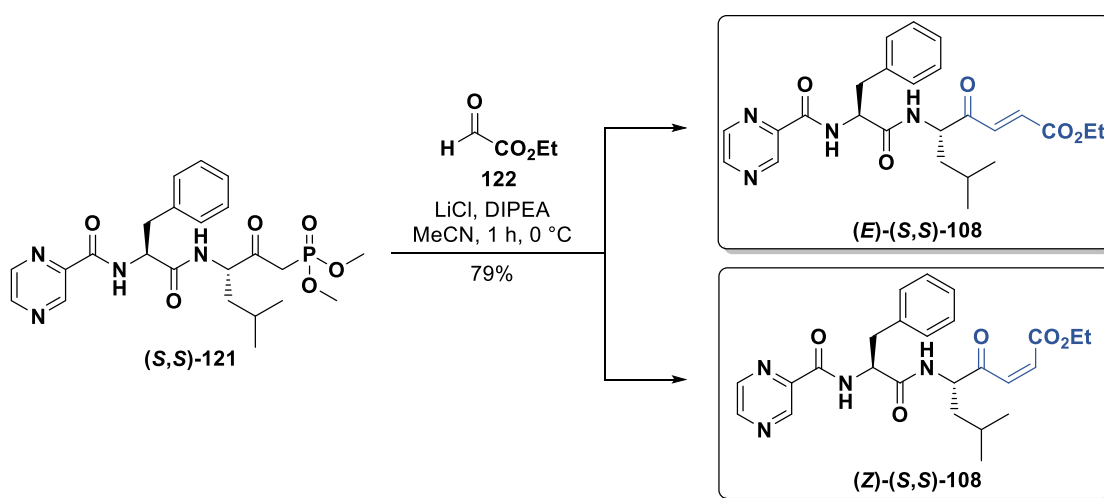
Aus den oben erörterten Gründen wurde das Syntheseprotokoll so variiert, dass die Racemisierung an der Phenylalanineinheit möglichst minimiert wird, was vor allem durch Modulation der eingesetzten Base und Variation der Reihenfolge bei der Synthese realisiert werden sollte. In diesem

Zusammenhang wurde das Peptidgrundgerüst in einer linearen Synthese sukzessive ausgehend vom Phosphonat **125 · HCl** dargestellt, wobei der Pyrazinoylbaustein erst im letzten Kupplungsschritt eingeführt wurde (**Schema 7.17**). Es ist bekannt, dass die Racemisierung vor allem durch Verwendung von *N*^α-Urethanschutzgruppen (hier Boc) unterdrückt wird, da aus sterischen Gründen eine Deprotonierung durch die eingesetzte Base erschwert wird.^[364-365] Darüber hinaus wurde 2,4,6-Collidin anstelle von DIPEA bei der Bildung der Amidbindung eingesetzt, welches aufgrund der geringen Basizität und des sterischen Effektes häufig zur Minimierung der Racemisierung in Peptidkupplungen eingesetzt wird.^[363,366] Der Chiralitätsverlust am Leucinbaustein ist hingegen unumgänglich, sodass stets zwei diastereomere Peptidylphosphonate ((*S,S*)-**121** und (*S,R*)-**121**; *d.r.* ≈ 1:1; **Schema 7.17**) resultieren, die mittels chromatographischer Methoden voneinander getrennt wurden.

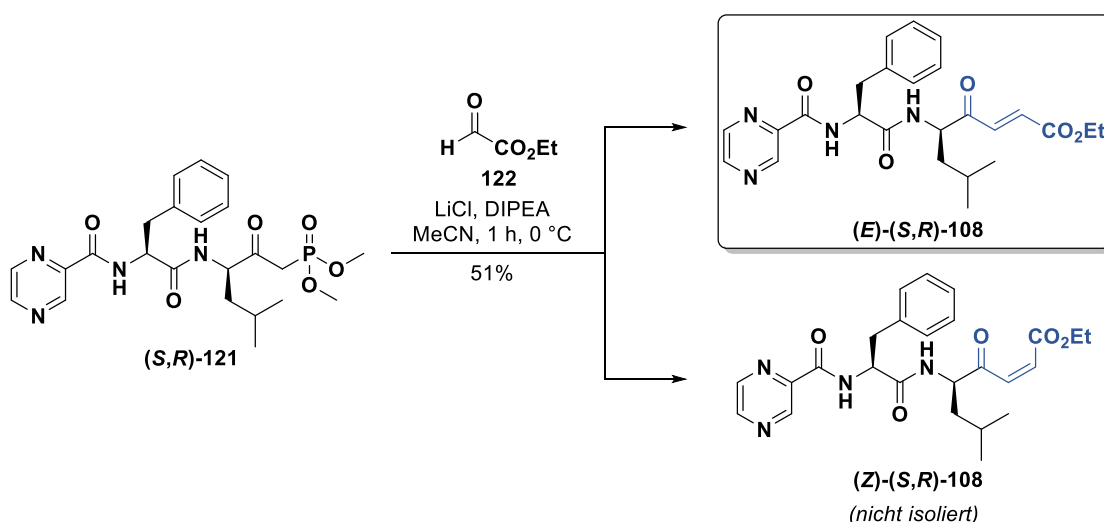


Schema 7.17: Finale Syntheseroute zur Darstellung der diastereomeren Peptidylphosphonate **121**.

Die beiden diastereomeren Dipeptidylphosphonate wurden jeweils separat in einer *Horner-Wadsworth-Emmons*-Reaktion mit Glyoxalsäureethylester (**122**) in Anlehnung an den Vorschriften von Kaobamrung *et al.* bzw. Kobayashi *et al.* umgesetzt.^[367-368] Hierbei wurde ein modifiziertes HWE-Olefinierungsverfahren angewandt, in welchem mithilfe von Lithiumchlorid und DIPEA das Phosphorylid unter milden Bedingungen generiert wird.^[369] Zudem stellte sich heraus, dass die Qualität des eingesetzten Glyoxalsäureethylesters für das Gelingen der Reaktion entscheidend ist. Dieser muss nahezu vollständig in der Monomerform (durch fraktionierte Destillation über P₂O₅) in verdünnter Lösung bei einer Temperatur von 0 °C eingesetzt werden, da die Reaktion sonst mit einer signifikanten Menge an Nebenprodukten einherging.



Schema 7.18: Synthese der (*E*)-(*S,S*)- und (*Z*)-(*S,S*)-4-Oxoenoate durch HWE-Reaktion von Glyoxalsäureethylester und dem Dipeptidylphosphonat (*S,S*)-**121**. *E/Z* ≈ 5:1.



Schema 7.19: Synthese der (*E*)-(*S,R*) und (*Z*)-(*S,R*)-4-Oxoenoate durch HWE-Reaktion von Glyoxalsäureethylester und dem Dipeptidylphosphonat (*S,R*)-**121**. *E/Z* ≈ 8:1.

Die Zielverbindungen (4-Oxoenoate) wurden hierbei jeweils als *E/Z*-Isomerengemisch ($E/Z \approx 5:1$, (*S,S*)-Diastereomer bzw. $E/Z \approx 8:1$, (*S,R*)-Diastereomer)¹ erhalten, deren Trennung mittels semi-präparativer HPLC bzw. selektiver Präzipitation (im Fall von (*S,R*)-**108**) gelang. Die Unterscheidung der (*E*)- und (*Z*)-Isomere erfolgte NMR-spektroskopisch durch Berechnung der vicinalen Kopplungskonstante ($^3J_{(E)} = 15.8$ Hz bzw. $^3J_{(Z)} = 12.0$ Hz) zwischen den beiden Doppelbindungsprotonen.

Bemerkenswerterweise konnte bei der säulenchromatographischen Reinigung des Rohproduktes aus der HWE-Reaktion von (*S,R*)-**121** mit Glyoxalsäureethylester (vgl. **Schema 7.19**) ein Nebenprodukt (5%) isoliert werden, dessen massenspektrometrische Analyse ein Masse-zu-Ladung-Verhältnis von $m/z = 575.6$ ergab. Dies entspricht einer Massendifferenz von ca. $\Delta m/z = 108$ relativ zum 4-Oxoenoat ($m/z = 467.2$), was auf die Anwesenheit einer zusätzlichen Dimethoxyphosphoryl-Einheit hinweist. Die Struktur des Nebenproduktes konnte mittels 2D-NMR-Spektroskopie-Experimenten aufgeklärt werden (**Abb. 7.13**). Aus den Befunden geht hervor, dass lediglich ein olefinisches Proton vorhanden ist, welches eine typische heteronukleare ^1H - ^{31}P -Kopplung (d, $^3J_{\text{H,P}} = 23.0$ Hz) aufweist.^[370] Entsprechende Aufspaltungsmuster (Dubletts mit charakteristischen ^{13}C - ^{31}P -Kopplungen)^[370] im ^{13}C -NMR-Spektrum liefern zusätzliche Hinweise, dass ein Phosphoratom an der Doppelbindung kovalent gebunden vorliegt.

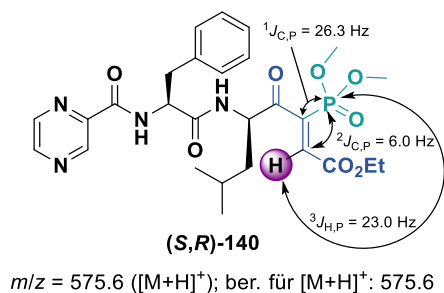
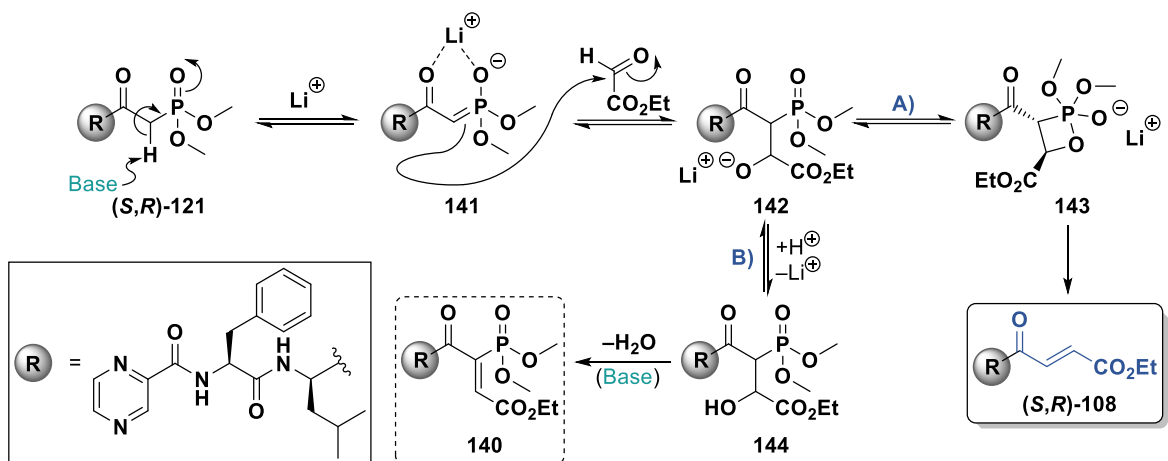


Abb. 7.13: Struktur des isolierten Nebenproduktes sowie die experimentell gefundenen heteronuklearen Kopplungen.

Die Bildung des 3-(Dimethoxyphosphoryl)-4-oxoenoats **140** lässt sich als Nebenreaktion erklären, bei der vermutlich die Bildung des Oxaphosphetans **143** (Weg **A**; **Schema 7.20**) aus **142** in geringem Umfang mit der Entstehung eines sekundären Alkohols **144** konkurriert, aus welchem unter den basischen Reaktionsbedingungen Wasser eliminiert werden kann (Weg **B**). Dieses Nebenprodukt konnte bei der *Horner-Wadsworth-Emmons*-Reaktion aus dem (*S,S*)-Diastereomer nicht beobachtet werden und wurde ebenfalls einer enzymatischen Testung unterzogen (**Kap. 7.3.3**).

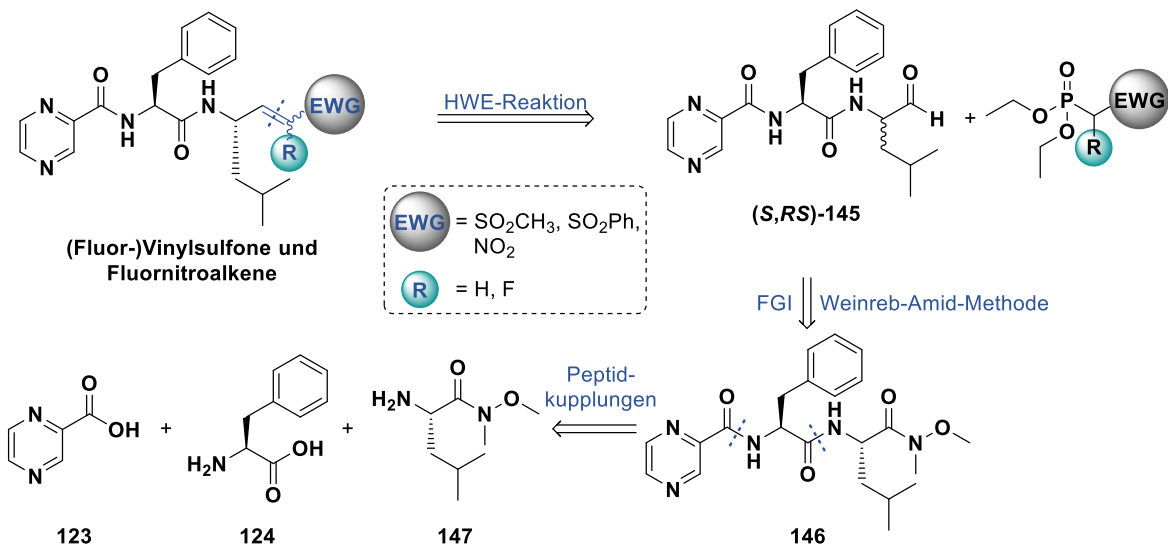
¹Berechnung durch HPLC-Analyse ($\lambda = 254$ nm).



Schema 7.20: Möglicher Mechanismus zur Bildung des Nebenproduktes **140** (Weg B).

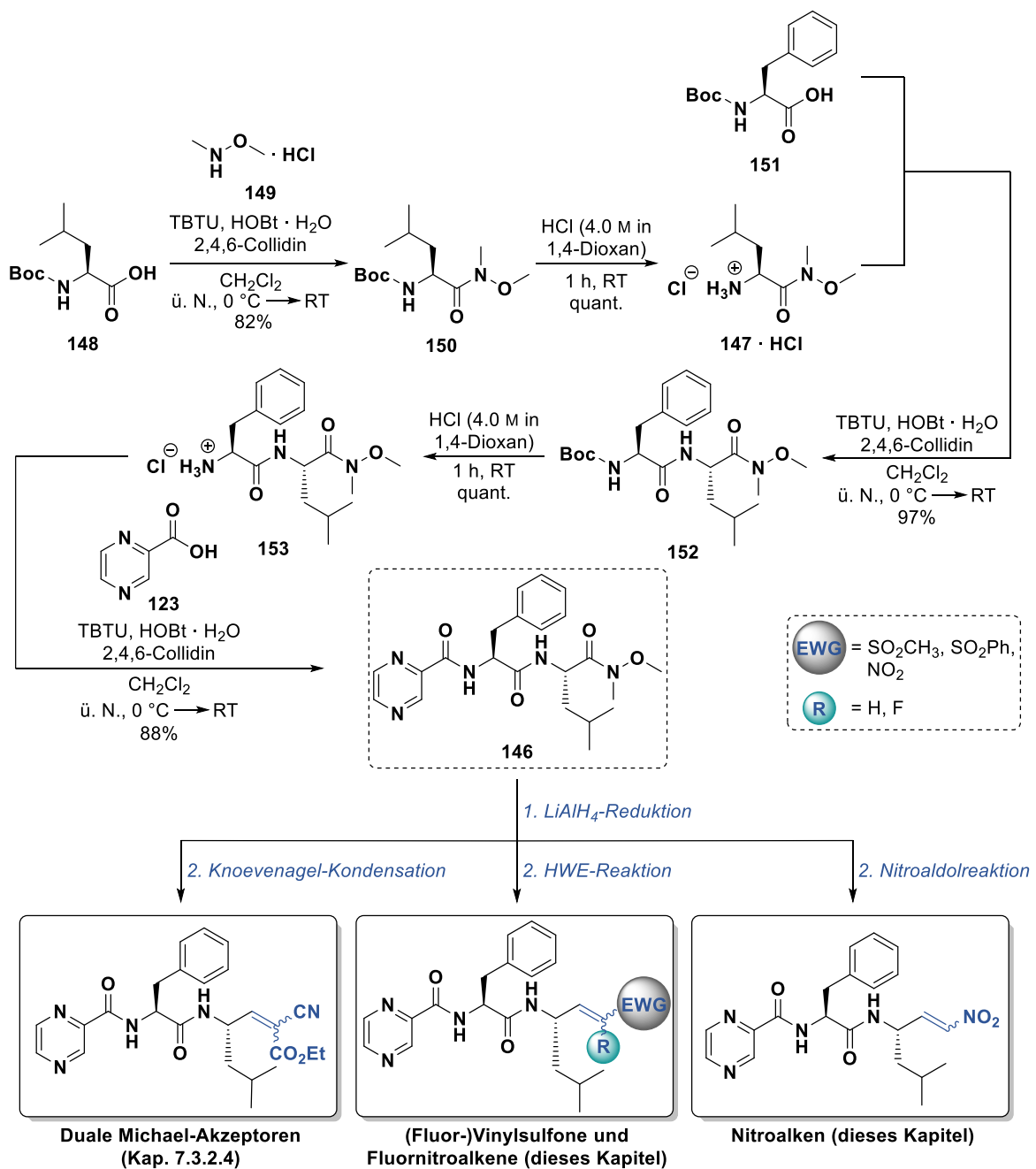
7.3.2.2 Synthese der Vinylsulfone und Nitroalkene

Analog zur Darstellung der Bortezomib-Kongeneren mit 4-Oxoenoat-Warhead (**Kap. 7.3.2.1**) diente die *Horner-Wadsworth-Emmons*-Reaktion als Schlüsselschritt zur Synthese der vinylsulfon- und nitroalkenbasierten Proteosom-Inhibitoren. Die Aldehydkomponente sollte sich in diesem Fall jedoch an der Peptidyleinheit befinden, da keine Bildung eines Oxoaldehyds aus gefährlichen Reagenzien erforderlich war und bereits etablierte Syntheserouten zur Herstellung der entsprechenden (Fluor)Sulfonyl- bzw. (Fluor)Nitrophosphonate existieren (**Schema 7.21**).^[350,371-372]



Schema 7.21: Retrosynthetische Analyse zur Herstellung der Vinylsulfone und Nitroalkene.

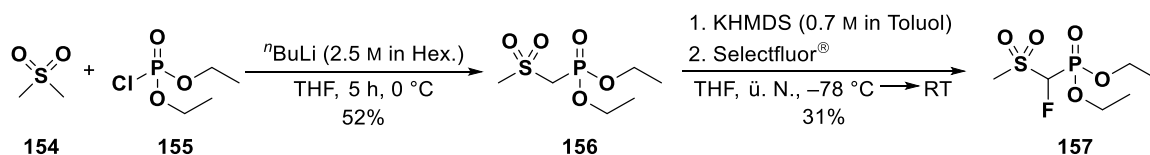
Der Peptidylaldehyd **145** kann den retrosynthetischen Überlegungen zufolge durch selektive Reduktion des korrespondierenden Weinreb-Amids **146** mittels Lithiumaluminiumhydrid zur Verfügung gestellt werden, während der Aufbau des Peptidgrundgerüst gemäß der zuvor konstituierten Syntheseroute (vgl. **Schema 7.17**) realisiert werden sollte. Die finale Synthesesequenz zur Darstellung des Weinreb-Amids **146** als Schlüsselintermediat wird in **Schema 7.22** wiedergegeben.



Schema 7.22: Synthesesequenz zum Aufbau des Weinreb-Amids **146**, welches als Schlüsselintermediat für die weiteren Transformationen fungierte.

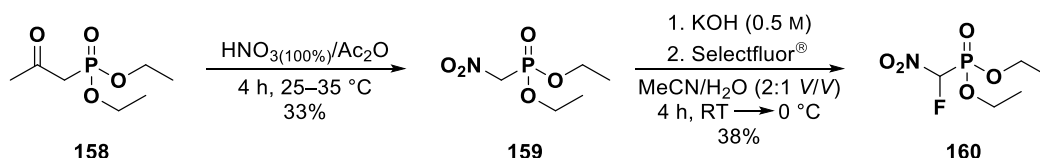
Zunächst wurde *N*-Boc-L-Leucin (**148**) zum entsprechenden Weinreb-Amid **150** nach Xin *et al.* transformiert und das Peptidgrundgerüst in einer Folge aus Deblockierung, Amidknüpfung mit *N*-Boc-L-Phenylalanin (**151**) sukzessive gebildet.^[373] Durch erneutes Entfernen der Schutzgruppe mit HCl (4.0 M in 1,4-Dioxan) und folgender Pyrazinoylierung war **146** schließlich in einer Gesamtausbeute von 70% (über fünf Stufen) zugänglich. Die Synthese lieferte stets hohe bis sehr hohe Ausbeuten und konnte im Multigramm-Maßstab durchgeführt werden. Das Weinreb-Amid **146** wurde anschließend mit Lithiumaluminiumhydrid in Tetrahydrofuran bei 0 °C selektiv zum Aldehyd umgewandelt, welcher aufgrund der partiellen Instabilität ohne Reinigung und Isolierung in der

HWE-Reaktion eingesetzt wurde. Die Herstellung der dafür erforderlichen Sulfonylphosphonate gelang durch Reaktion von Dimethylsulfon (**154**) mit Diethylchlorophosphat (**155**) nach vorausgegangener Deprotonierung mithilfe von ⁿBuLi (2.5 M in Hexan) in Anlehnung an eine Vorschrift von Schirmeister *et al.* (**Schema 7.23**).^[350]



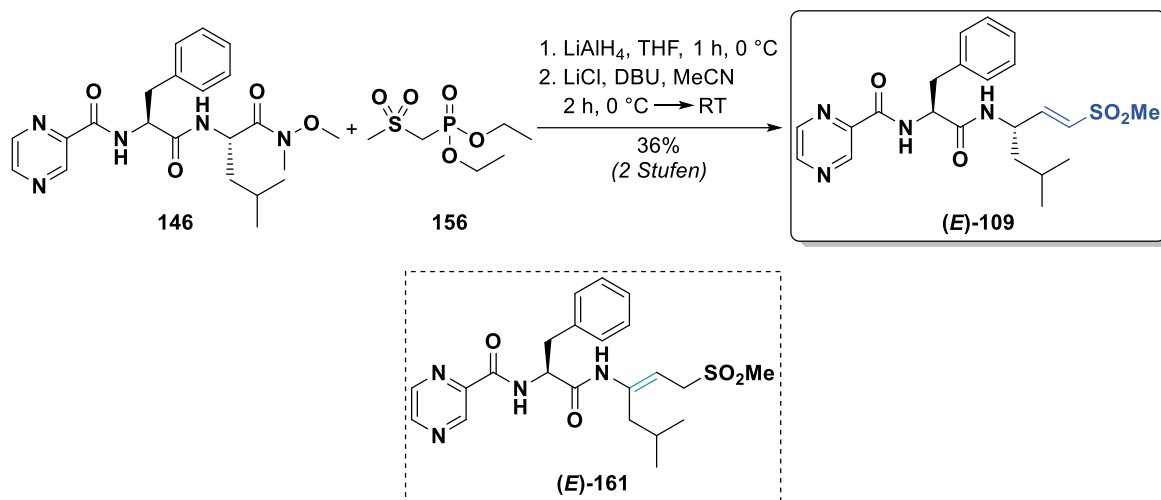
Schema 7.23: Synthese von Diethyl((methylsulfonyl)methyl)phosphonat (**156**) und des fluorierten Analogons **157**.

Die Fluorierung in α -Position beinhaltet die Deprotonierung des CH-aciden Sulfons **156** durch Kaliumhexamethyldisilazid (KHMDS) und Behandlung mit dem elektrophilen Fluorierungsreagenz Selectfluor[®],^[350] wobei beide Phosphonatbausteine in moderaten Ausbeuten erhalten wurden. Für die Synthese des Nitrophosphonats **159** wurde Diethyl(2-oxopropyl)-phosphonat (**158**) vorsichtig mit Acetylnitrat (*in situ* aus rauchender Salpetersäure und Essigsäureanhydrid generiert) unter präziser Temperaturkontrolle (25–35 °C) behandelt (**Schema 7.24**).^[371] Nach einem Protokoll von Opekar *et al.* konnte anschließend die Fluorierung des Nitrophosphonats zu **159** gewährleistet werden, das bei Raumtemperatur nur eine limitierte Stabilität aufweist und daher zeitnah umgesetzt wurde.^[372]



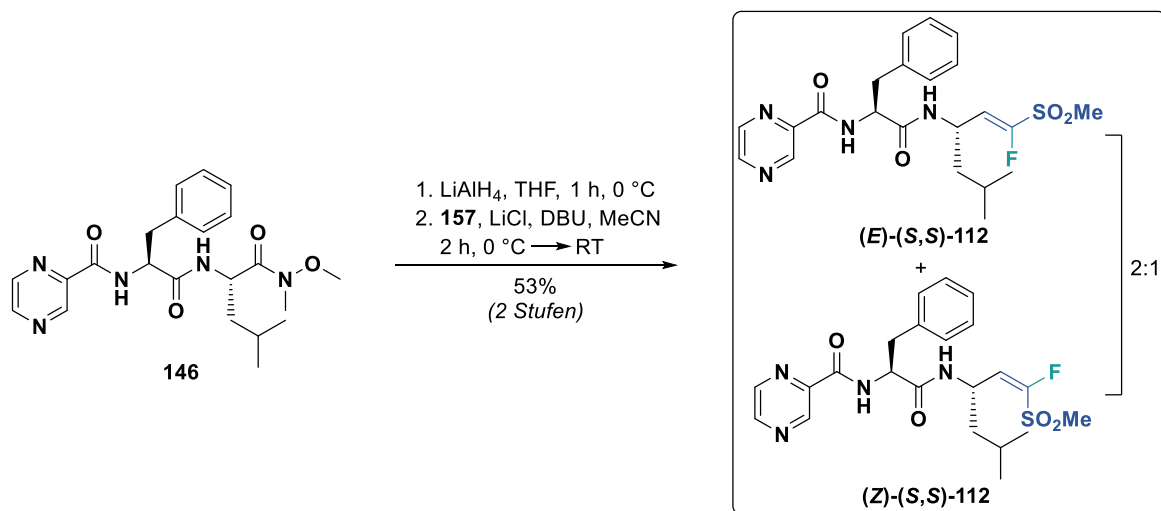
Schema 7.24: Darstellung der Nitrophosphonate **159** sowie **160**.

Die synthetisierten Sulfonyl- und Nitrophosphonate wurden daraufhin separat in einer zweistufigen Sequenz bestehend aus der Reduktion des Weinreb-Amids **146** und der *Horner-Wadsworth-Emmons*-Reaktion in die dazugehörigen Vinylsulfone bzw. Nitroalkene überführt. Für die Olefinierungsreaktion wurde das bereits in **Kap. 7.3.2.1** beschriebene milde Verfahren von Kaeobamrung *et al.* bzw. Kobayashi *et al.* unter Einsatz von Lithiumchlorid und DIPEA angewandt.^[367-368] Die Reaktion von **146** mit Diethyl((methylsulfonyl)methyl)phosphonat (**156**) nach Reduktion lieferte das (*E*)-Methylvinylsulfon **109**, das zusammen mit dem Isomer **161** als Nebenprodukt isoliert wurde (**Schema 7.25**). Die Struktur von **161** wurde mittels NMR-Spektroskopie-Experimenten aufgeklärt, in welchen die Lage der Doppelbindung durch das Fehlen des Protons am α -C vom Leucinrest und den skalaren Kopplungen zwischen der zusätzlichen Methylengruppe und den olefinischen Kohlenstoffatomen im phasensensitiven HSQC eindeutig bestimmt wurde.



Schema 7.25: Synthese des unsubstituierten (*E*)-Vinylsulfons **109** und Struktur des isolierten Nebenproduktes **161** mit einer isomerisierten Doppelbindung (unten).

Auf analoge Weise gelang die Darstellung der α -Fluor(methyl)vinylsulfonderivate (*E*)-**112** und (*Z*)-**112** aus dem fluorierten (Methylsulfonyl)methylphosphonat **158** (**Schema 7.26**). Im vorliegenden Fall wurden sowohl das (*E*)- als auch das (*Z*)-Isomer von **112** erhalten, die als Isomerengemisch (*E/Z* = 2:1) isoliert und evaluiert wurden, da sich die chromatographische Trennung als komplex erwies. Beide Isomere konnten experimentell anhand der heteronuklearen Kopplung in den ^1H - bzw. ^{19}F -NMR-Spektren zwischen dem Fluoratom und dem olefinischen H-Atom ($^3J_{\text{H-2,F}} = 32.4$ Hz ((*E*)-Isomer) bzw. $^3J_{\text{H-2,F}} = 20.1$ Hz ((*Z*)-Isomer)) präzise differenziert werden (siehe auch **Kap. 10.9.2.3**).



Schema 7.26: Darstellung der α -Fluor(methyl)vinylsulfone, die als *E/Z*-Isomerengemisch isoliert wurden.

Darüber hinaus konnten in der HPLC-ESI-MS-Analyse zwei weitere Isomere nachgewiesen werden, die vermutlich den entsprechenden (*S,R*)-Diastereomeren zuzuordnen sind, jedoch aufgrund der geringen Menge nicht isoliert wurden (**Abb. 7.14**).

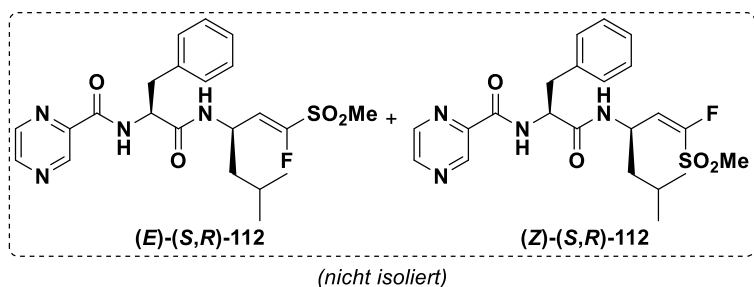
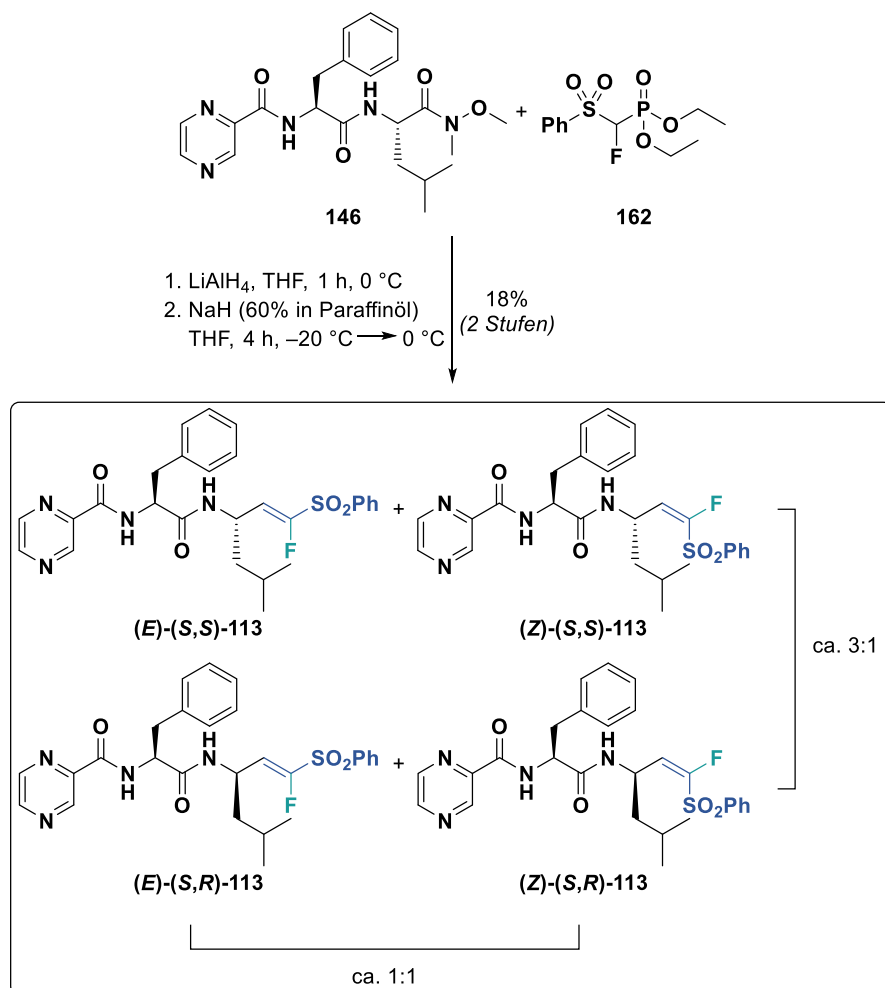


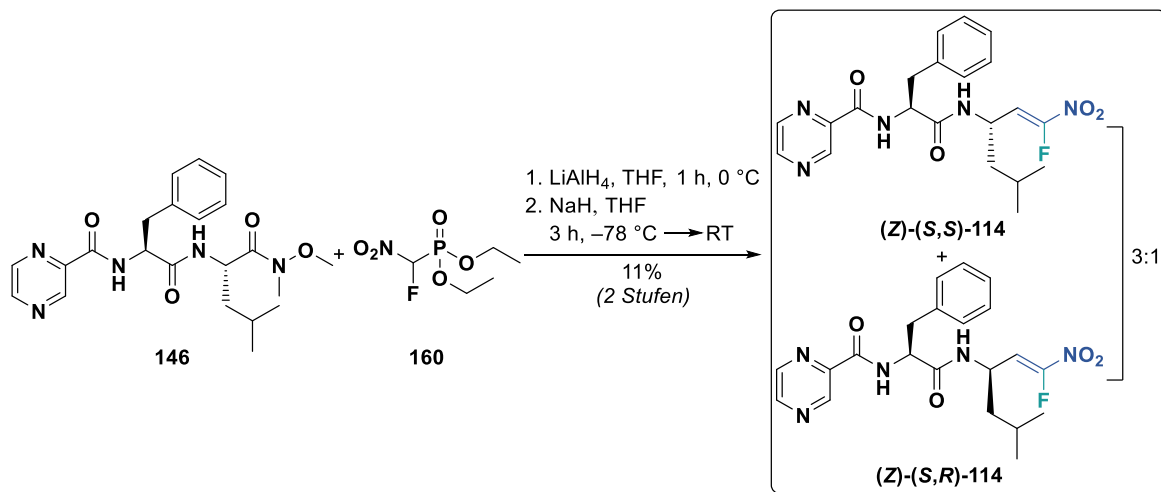
Abb. 7.14: Strukturen der diastereomeren Fluorvinylsulfone, die vermutlich ebenfalls in geringen Mengen anfielen.

Diethyl(fluor(phenylsulfonyl)methyl)phosphonat (**162**) wurde von [REDACTED] ([REDACTED]) zur Verfügung gestellt und ebenfalls nach dem oben beschriebenen Verfahren mit dem Peptidylaldehyd aus **146** umgesetzt, wobei ein Gemisch aus vier Stereoisomeren (zwei Diastereomere mit jeweils (*E*)- und (*Z*)-Isomeren) resultierte, das aufgrund der Komplexität als solches isoliert und enzymatisch getestet wurde (**Schema 7.27**).



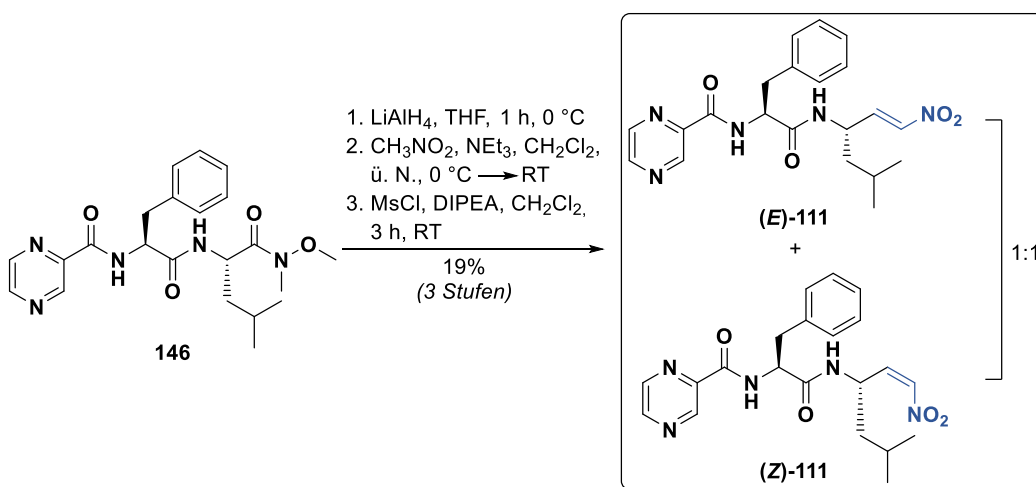
Schema 7.27: Herstellung der α -fluorierten (Phenyl)vinylsulfone, die als Gemisch vierer Stereoisomere erhalten wurden.

Da das Fluornitromethylphosphonat **160** in Gegenwart von Basen wie DBU oder DIPEA einer signifikanten Zersetzung unterliegt, wurde für die HWE-Reaktion das von Opekar *et al.* beschriebene Protokoll unter Verwendung von Natriumhydrid zur Bildung des erforderlichen Phosphoniumylids angewandt (**Schema 7.28**).^[372] Der geringe Ausbeute ist vor allem auf die hohe Labilität des Phosphonats zurückzuführen. Im vorliegenden Fall wurden zwei zueinander diastereomere (*Z*)-Isomere (d. h. mit (*E*)-ständiger Nitrogruppe; *d. r.* ca. 3:1) gewonnen, welche als Gemisch getestet wurden.



Schema 7.28: Synthese des α -Fluornitroalkens, das als Diastereomergemisch erhalten wurde.

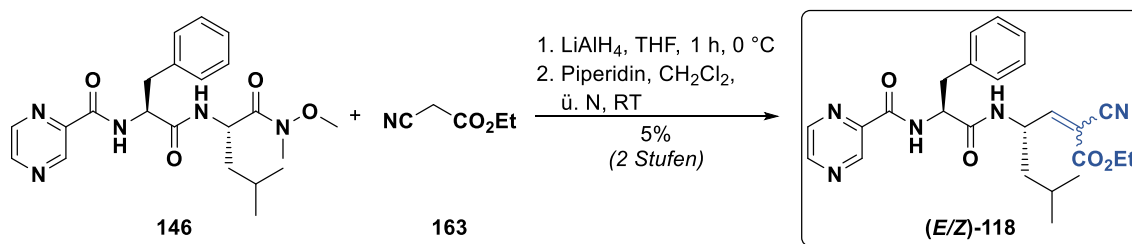
Das HWE-Protokoll konnte nicht zur Darstellung des einfachen Nitroalkens **111** übertragen werden, da das gewünschte Produkt den massenspektrometrischen Befunden zufolge lediglich in Spuren nachgewiesen wurde. Daher wurde entschieden, **111** über den Umweg der Nitroaldolreaktion mit Nitromethan und anschließender Eliminierung in Gegenwart von Methansulfonylchlorid und DIPEA zugänglich zu machen (**Schema 7.29**).^[347]



Schema 7.29: Synthese des einfachen Nitroalkenderivats von Bortezomib in einer Folge aus Reduktion, Nitroaldolreaktion und Eliminierung. Die erhaltenen isomeren Nitroalkene wurden als Gemisch biologisch evaluiert.

7.3.2.3 Synthese des dualen Michael-Akzeptors

Die Darstellung des Bortezomib-Derivats mit Cyanoacrylat-Warhead (**118**) erfolgte in Analogie zum beschriebenen Verfahren für die *Knoevenagel*-Kondensation von Ma *et al.*^[348] In einer zweistufigen Synthese wurde aus dem Weinreb-Amid **146** durch LiAlH₄-Reduktion selektiv der entsprechende Aldehyd generiert,^[374] welcher unmittelbar ohne vorherige Isolierung unter *Knoevenagel*-Bedingungen (Piperidin als Base und Organokatalysator) mit Cyanessigsäureethylester (**163**) als aktive Methylenkomponente umgesetzt wurde (**Schema 7.30**).

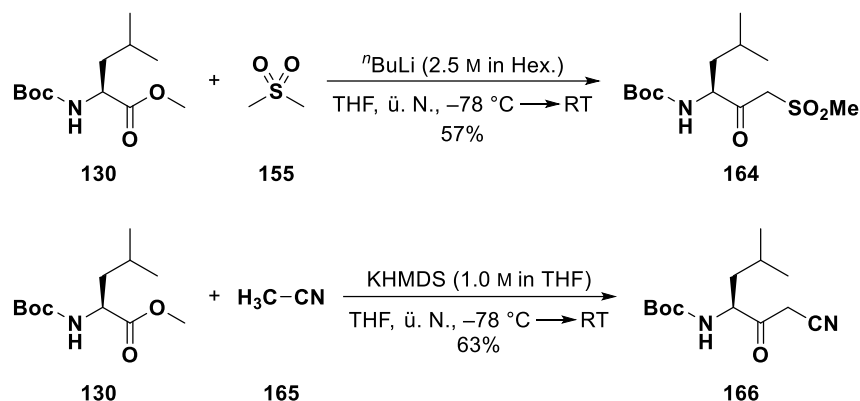


Schema 7.30: Synthese des dualen Michael-Akzeptors auf Basis der Bortezomib-Grundstruktur.

Die gewünschte Zielverbindung (*E/Z* ≈ 2:1) konnte lediglich in geringer Ausbeute von 5% bei gleichzeitiger zufriedenstellender Reinheit erhalten werden, was vor allem auf die Anwesenheit mehrerer Nebenprodukte zurückzuführen war. Hierbei erwies sich vor allem die Reinigung als problematisch, da bei längerer chromatographischer Trennung (vor allem mittels semi-präparativer HPLC und Wasser als Eluent) eine *retro-Knoevenagel*-Reaktion beobachtet wurde, bei der mittels massenspektrometrischer Analyse der korrespondierende Aldehyd von **146** nachweisbar war, der bei der vorherigen Untersuchung des Rohproduktes nicht detektiert wurde. Die potenzielle Instabilität von Cyanoacrylatestern wurde bereits von Miller *et al.* der Entwicklung von Kinaseinhibitoren mit einer ähnlichen reaktiven Kopfgruppe beschrieben.^[375] Die erhaltene Menge des Produktes war dennoch ausreichend, um die Aktivität des dualen Michael-Akzeptor-Derivates am Proteasom zu evaluieren.

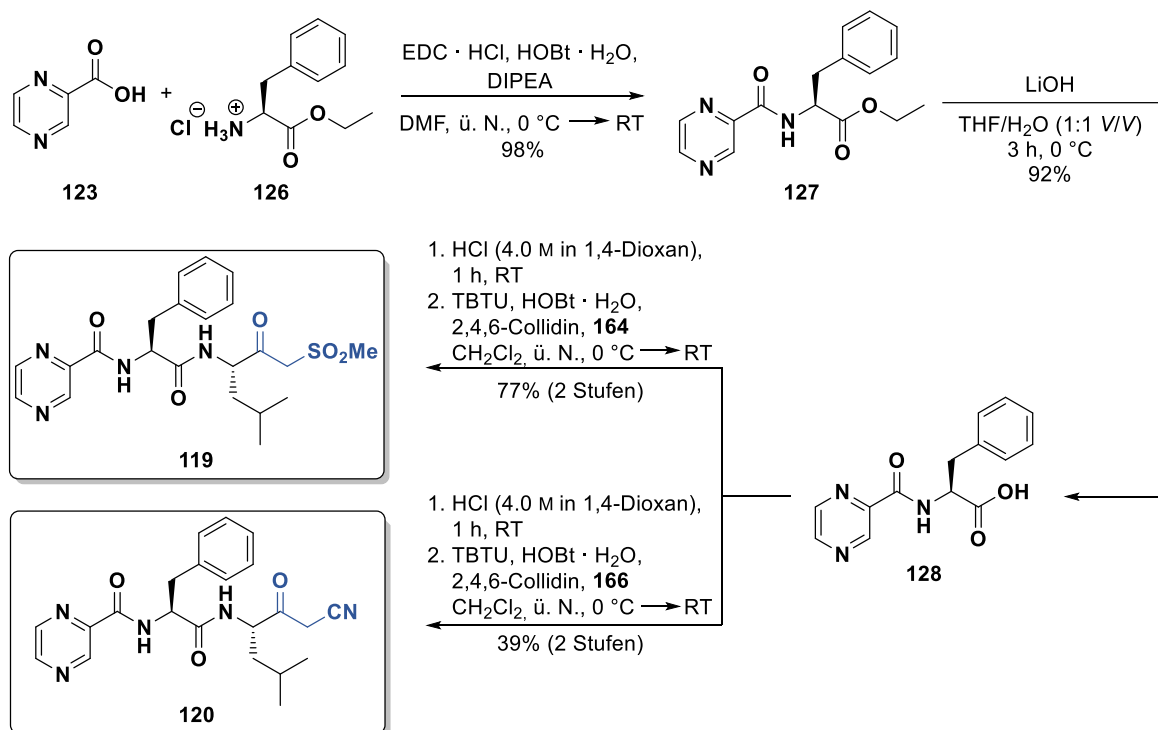
7.3.2.4 Synthese der β -Ketoderivate

Die Synthese des Leucin-basierten β -Ketosulfons **119** und β -Ketonitrils **120** erfolgte in Analogie zur Darstellung des entsprechenden Phosphonats **132** (siehe **Schema 7.14, Kap. 7.3.2.1**) aus *N*-(Boc)-L-Leucin-methylester (**130**), welches mit Dimethylsulfon in Gegenwart von *n*-Butyllithium bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ (**Schema 7.31**, oben) bzw. mit Acetonitril mit KHMDS als Base (unten) umgesetzt wurde.^[376-377]



Schema 7.31: Darstellung der Leucin-abgeleiteten β -Ketoderivate **164** und **166**.

Da nach dem nächsten Reaktionsschritt keine Diastereomere nachgewiesen wurden, gingen diese Reaktionen im Gegensatz zur Phosphonatsynthese vermutlich mit einer vernachlässigbaren Racemisierung einher.



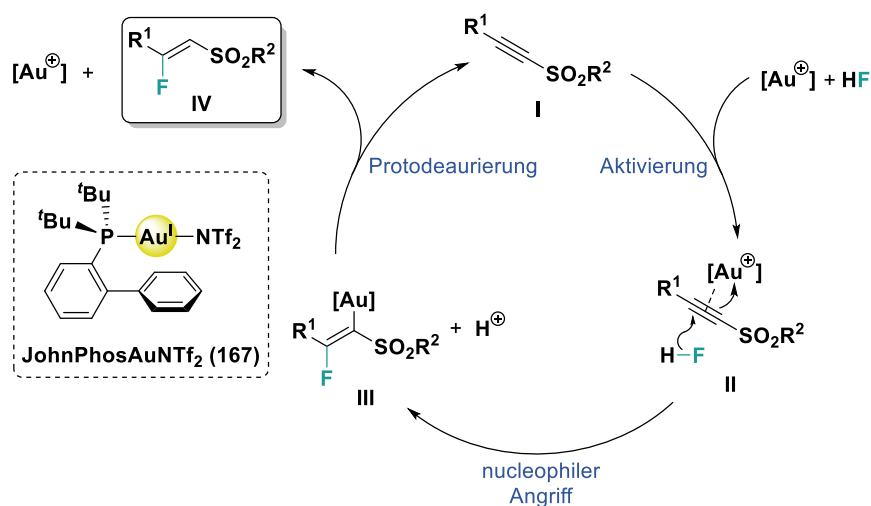
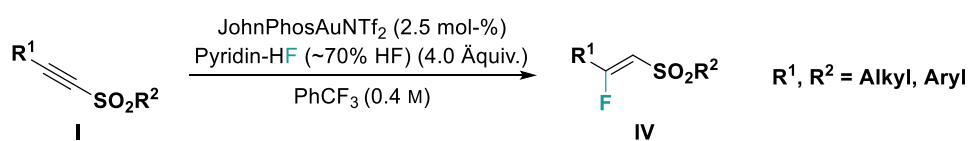
Schema 7.32: Synthese der Bortezomib-Kongenere **119** und **120**, die jeweils eine β -Ketoeinheit als potenziellen *Warhead* aufweisen.

Die finalen β -Ketosulfonderivate **119** sowie **120** von Bortezomib wurden schließlich aus den Leucinbausteinen **164** und **166** nach Deblockierung der Aminofunktion mit HCl (4.0 M in 1,4-Dioxan) und TBTU-Kupplung mit (Pyrazin-2-carbonyl)-L-phenylalanin (**128**) unter Verwendung von 2,4,6-Collidin als Base in zufriedenstellenden Ausbeuten erhalten. Hierbei wurde zugunsten der schnelleren Verfügbarkeit der Endverbindungen die kürzere Syntheseroute mit erhöhter Wahrscheinlichkeit einer partiellen Racemisierung an der Phenylalanin-Einheit (vgl. **Schema 7.16**) gewählt.

7.3.2.5 Versuche zur Synthese des β -Fluorvinylsulfons

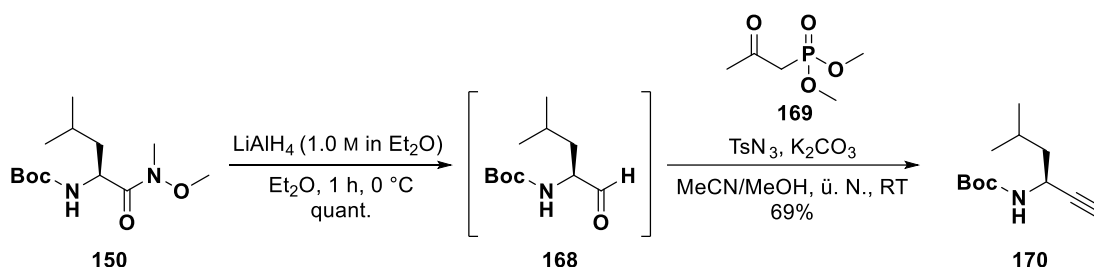
Wie in Abschnitt **7.3.1** und insbesondere anhand von **Schema 7.8** erörtert, könnte sich die Erhöhung der Elektrophilie an der β -Position eines α,β -ungesättigten Systems (z. B. Vinylsulfone und Nitroalkene) für einen nucleophilen Angriff durch Thr10^y als vorteilhaft erweisen. Bis zum Abschluss der Arbeiten an diesem Projekt fand sich in der Literatur nach bestem Wissen bisher kein geeignetes Verfahren zur Darstellung aminosäurebasierter β -Fluorvinylsulfone, weshalb diverse Ansätze zur gezielten Herstellung dieser Derivate überprüft wurden. Zeng *et al.* entwickelten 2017 ein effizientes Protokoll zur Gold-katalysierten Synthese von α - und β -Fluorvinylsulfonen aus den entsprechenden Alkinylsulfonen mit Fluorwasserstoff als F⁻-Quelle (**Schema 7.33**).^[378]

Zeng *et al.* (2017): Gold-katalysierte Synthese von β -Fluorvinylsulfonen



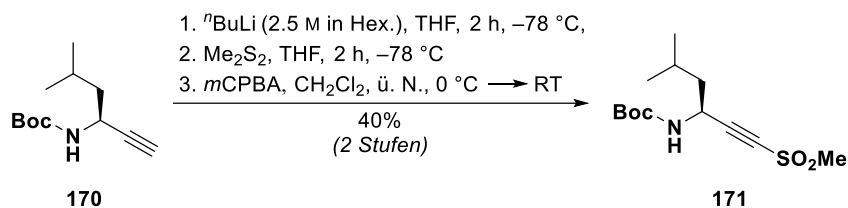
Schema 7.33: Gold-katalysierte Darstellung von β -Fluorvinylsulfonen und vorgeschlagener Katalysemechanismus nach Zeng *et al.*^[378]

Den mechanistischen Überlegungen zufolge führt der nucleophile *Markovnikov*-Angriff von Fluorwasserstoff an den η^2 -aktivierten Gold(I)-Alkin-Komplex **II** zur Bildung eines *trans*-Vinylgold-Intermediats **III**. Bei der anschließenden Protodeaurierung wird das HF-Additionsprodukt **IV** unter Regeneration des Katalysators freigesetzt.^[378] Diese Methode sollte im Rahmen der Untersuchungen auf aminosäurebasierte Substrate übertragen werden, wobei die dafür erforderlichen Alkinylsulfone in einer vierstufigen Sequenz ausgehend vom Weinreb-Amid **150** bereitgestellt wurden. Zunächst erfolgte die Transformation von **150** (Darstellung siehe **Schema 7.22**) zum entsprechenden Alkin **170** in Anlehnung an Ko *et al.*,^[379] wobei die *Ohira-Bestmann*-Methode der *Seyferth-Gilbert*-Homologisierung den entscheidenden Schritt darstellte (**Schema 7.34**).^[380-381] Die Reaktion erwies sich hierbei als gut reproduzierbar und lieferte das gewünschte Produkt **170** stets in guten Ausbeuten.



Schema 7.34: Synthese des Alkins **170** via *Ohira-Bestmann*-Methode der *Seyferth-Gilbert*-Reaktion in Anlehnung an Ko *et al.*^[379]

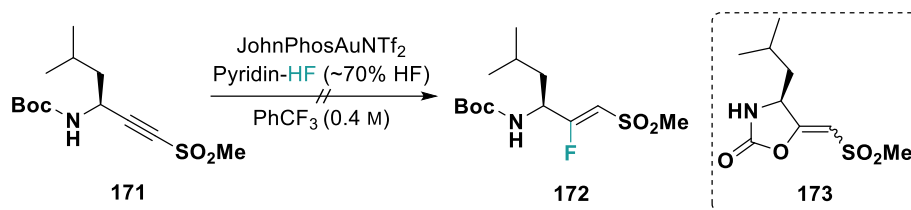
Die Umwandlung des terminalen Alkins **170** in das Sulfon **171** gelang nach einer modifizierten Vorschrift von Zeng *et al.* in einer Folge aus Deprotonierung mit ⁿBuLi, Reaktion durch Zugabe von Dimethyldisulfid sowie Oxidation des intermediär gebildeten Alkinylsulfids mittels *m*CPBA.^[378]



Schema 7.35: Darstellung von *N*-Boc-(*S*)-3-amino-5-methyl-1-(methylsulfonyl)-hex-1-in (**171**).

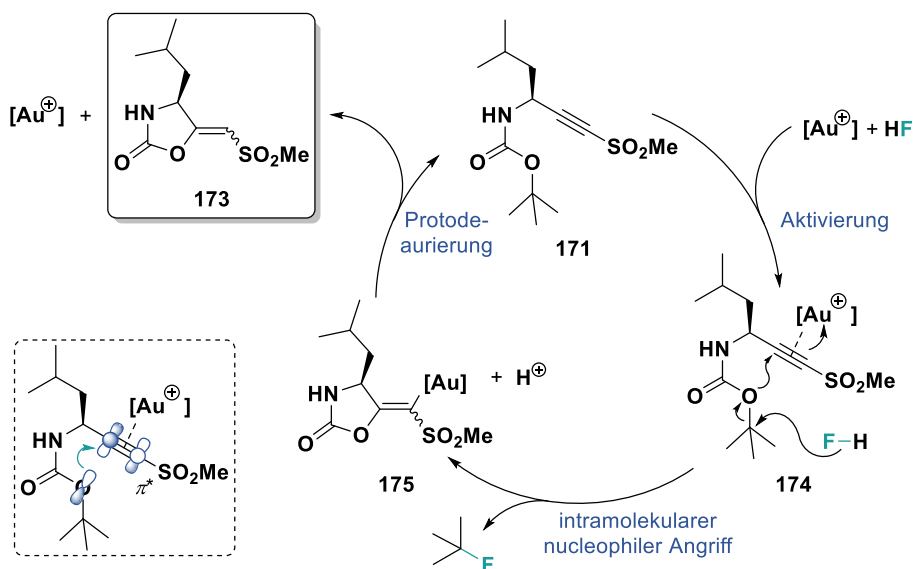
Das so erhaltene *N*-Boc-Leucin-Alkinylsulfon fungierte schließlich als Präkursor für die Versuche zu Gold-katalysierten Fluorierung. Die angewandten Reaktionsparameter entsprachen den von Zeng *et al.* beschriebenen Bedingungen, wobei das Alkin **171** in (Trifluormethyl)benzol mit Pyridin-HF und 2.5 mol-% JohnPhosAuNTf₂ versetzt wurde (**Schema 7.36**). Bei der NMR-spektroskopischen Analyse des Produktes, welches als farbloses Öl erhalten wurde, konnte kein typisches Fluor-Kopplungsmuster (vgl. auch **Kap. 7.3.2.2**) dokumentiert werden, sodass die Einführung eines Fluorsubstituenten ausgeschlossen wurde. Die Strukturaufklärung erbrachte den Nachweis, dass bei der Reaktion ein Gemisch aus mindestens zwei isomeren 1,3-Oxazolidin-2-onen (**173**, **Schema 7.36**

rechts) resultierte. Diese experimentellen Befunde sind mit den Ergebnissen der massenspektrometrischen Analyse konsistent, in welchen eine Differenz des Masse-Ladungs-Verhältnisses von $\Delta m/z = 56$ entsprechend einer ¹Butylgruppe detektiert wurde.



Schema 7.36: Versuch zur β -Fluorierung des Leucin-basierten Alkynylsulfons **171**.

Zur Einordnung des oben beschriebenen Ergebnisses wurde eine mechanistische Überlegung durchgeführt, welche in **Schema 7.37** dargestellt ist. Vermutlich führt die Aktivierung des Alkins **171** durch den Gold(I)-Katalysator in diesem Fall bevorzugt zu einer intramolekularen Addition des Sauerstoffatoms der Boc-Schutzgruppe über einen 5-*exo-dig*-Übergangszustand, der den Baldwin-Regeln entsprechend bevorzugt ist.^[382-383] Nach Abspaltung der *tert*-Butylgruppe (möglicherweise HF-vermittelt) und Protodeaurierung entsteht schließlich das 1,3-Oxazolidin-2-on **173** als Produkt dieser Reaktion.



Schema 7.37: Postulierter Mechanismus zur Bildung des nachgewiesenen 1,3-Oxazolidin-2-ons **173**.

Ähnliche Ringschlüsse wurden bei Gold(I)-vermittelten Propargylester-Umlagerungen (1,2-Migration) bzw. bei der carboxylierenden Cyclisierung von Propargylaminen zu 1,3-Oxazolidin-1,3-onen beobachtet.^[384-386]

Zur Überprüfung des Einflusses der Fluorquelle wurden daraufhin verschiedene Fluoridendonoren evaluiert (**Tab. 7.3**). Neben Pyridin/HF (Eintrag 1) wurde Triethylamin · 3HF^[387] als nucleophile Fluoridionenquelle erprobt, mit dem Ziel, durch die höhere Basizität ($pK_s = 10.7$ vs. $pK_s = 5.2$ in

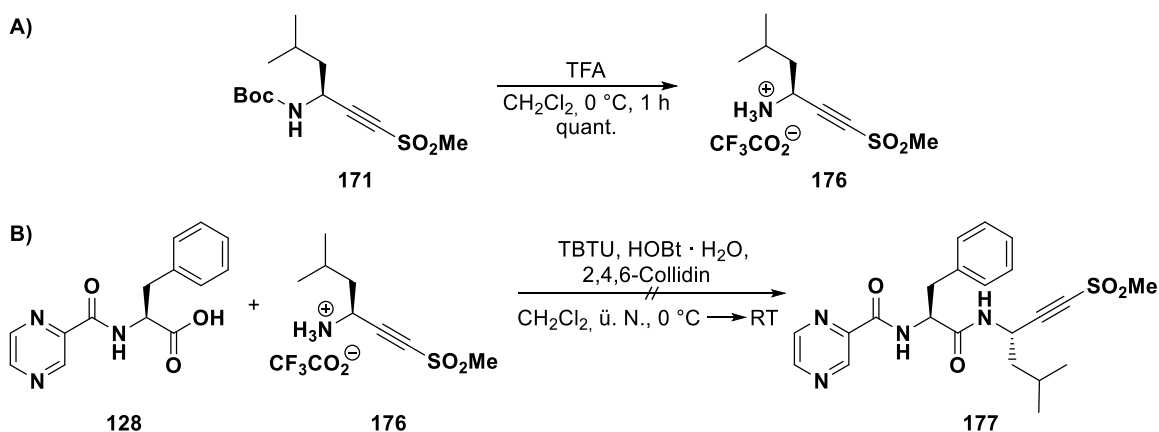
Pyridin)^[388] einer potenziellen säurekatalysierten Abspaltung¹ der *tert*-Butylgruppe und der damit verbundenen intramolekularen Cyclisierung entgegenzuwirken (Eintrag 2). Dies führte jedoch zu keiner Änderung des Reaktionsverlaufs, da auch hier ein Gemisch verschiedener 1,3-Oxazolidin-2-one bzw. ihrer aromatischen Isomere (**173ab**) nachgewiesen wurde; analog dazu verhielt sich Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) (Eintrag 3).

Tab. 7.3: Analyse des Einflusses der Fluorquelle durch Screening verschiedener Fluorid-Donoren.

#	Fluorid-Donor	Resultat
1	Py-HF (~70% HF)	1,3-Oxazolidin-2-on/Oxazol-2(3 <i>H</i>)-on-Bildung (173ab)
2	Et ₃ N · 3HF	1,3-Oxazolidin-2-on/Oxazol-2(3 <i>H</i>)-on-Bildung (173ab)
3	TBAF (1.0 M in THF)	1,3-Oxazolidin-2-on/Oxazol-2(3 <i>H</i>)-on-Bildung (173ab)

Reaktionsbedingungen: **171** (1.0 Äquiv.), Fluorquelle (4.0 Äquiv. Basierend auf F⁻), JohnPhosAuNTf₂ (2.5 mol-%), PhCF₃ (0.4 M), RT.

Zur möglichen Umgehung der intramolekularen Cyclisierung der Boc-Gruppe wurde entschieden, alternativ zuerst das Peptidgrundgerüst aufzubauen und im letzten Schritt eine Gold(I)-katalysierte β -Fluorierung zu testen (**Schema 7.38**).



Schema 7.38: Deblockierung von **171** zu **176** mittels Trifluoressigsäure (**A**) sowie geplante Knüpfung der Amidbindung zwischen der Carbonsäure **128** und dem Alkynylsulfon **176** (**B**).

Es stellte sich heraus, dass sich diese Synthesesequenz ebenfalls als wenig zielführend erwies, da bei der TBTU-Kupplung zwar ein Produkt mit identischem Molekulargewicht von **177** detektiert wurde, jedoch keine alkinischen C-Atome im ¹³C-NMR gefunden werden konnten. Im Zuge der

¹Sofern der in **Schema 7.37** gezeigte Mechanismus alternativ über ein Carboxylat-Anion nach saurer Abspaltung des *tert*-Butylrestes verläuft.

Strukturaufklärung mittels 2D-NMR-Spektroskopie konnte die Anwesenheit einer zusätzlichen CH₂-Gruppe zusammen mit aromatischen C-Atomen bei ca. 130 ppm aufgezeigt werden. Aufgrund des Fehlens eines Amid-H-Atoms und des C^α-H des Leucinrestes sowie der experimentell gefundenen heteronuklearen Kopplungen wurde schließlich die Struktur des 1,3-Oxazols **178** abgeleitet (Abb. 7.15).

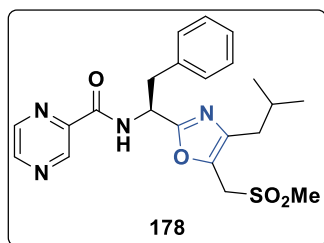
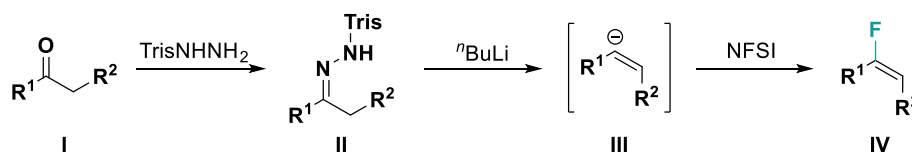


Abb. 7.15: Struktur des nachgewiesenen Produktes der TBTU-Kupplung.

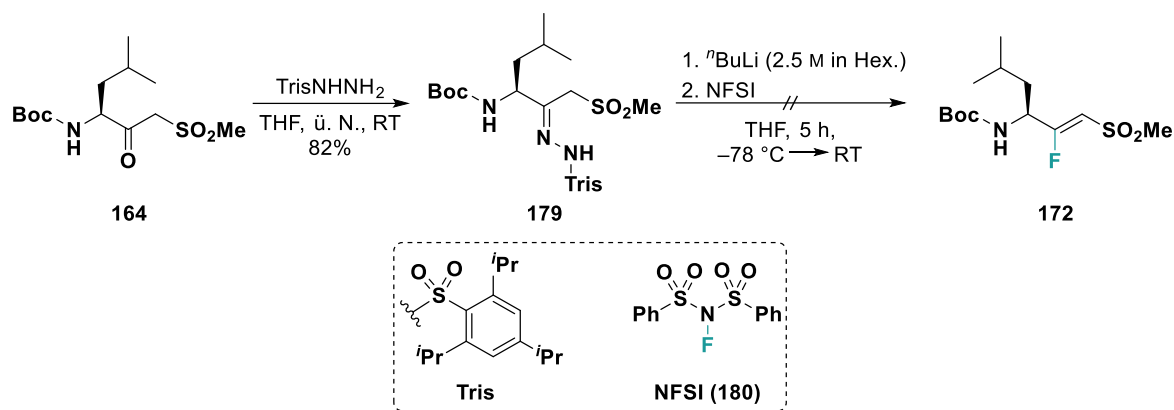
Die Bildung des 1,3-Oxazols lässt sich ebenfalls vermutlich mit einer intramolekularen 5-*exo-dig*-Cyclisierung erklären, wobei hier der Angriff durch das Sauerstoffatom der Amidbindung erfolgt. Ob dieser Ringschluss spontan oder HOBt-vermittelt verläuft, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Angesichts der Befunde wurde die Darstellung der β -Fluorvinylsulfone mittels Gold-Katalyse nicht weiterverfolgt, da sich die von Zeng *et al.* beschriebene Substratspezifität nicht auf aminosäurebasierte Alkynylsulfone übertragen ließ.

Yang *et al.* beschrieben 2013 einen direkten Zugang zu Fluoralkenen über eine modifizierte *Shapiro*-Reaktion.^[389] In einer zweistufigen Sequenz wurden Ketone **I** im ersten Schritt zum 2,4,6-Triisopropylbenzylsulfonyl(Tris)-Hydrazon **II** transformiert und anschließend das Vinylolithium-Intermediat **III** nach Deprotonierung mit ⁿBuLi durch elektrophile Fluorierungsreagenzien wie NFSI abgefangen (Schema 7.39).^[389]



Schema 7.39: Sequenz der von Yang *et al.* entwickelten *Shapiro*-Fluorierung.^[389]

Es wurde versucht, das Protokoll der *Shapiro*-Fluorierung nach Yang *et al.* auf die Synthese von β -Fluorvinylsulfonen anzuwenden (Schema 7.40). Zunächst erfolgte die Umsetzung des β -Ketosulfons **164** (Darstellung siehe Kap. 7.3.2.4) mit 2,4,6-Triisopropylbenzylsulfonylhydrazid zum Hydrazon **179**, welches in hohen Ausbeuten (82%) erhalten wurde. Im nächsten Schritt folgte die Behandlung von **179** mit ⁿButyllithium (2.5 M in Hexan) bei -78 °C und anschließende Zugabe von *N*-Fluorbenzylsulfonylimid (NFSI).



Schema 7.40: Versuch zur Darstellung des β -Fluorvinylsulfons **172** via *Shapiro*-Fluorierung nach Yang *et al.*^[389]

Da bei der Analyse des resultierenden Reaktionsgemisches das gewünschte Produkt **172** selbst in Spuren nicht nachgewiesen werden konnte, wurde dieser Ansatz zur Darstellung entsprechender β -Fluorderivate ebenfalls verworfen. Zudem ergibt sich an dieser Stelle und auf Grundlage der nachgewiesenen cyclischen Produkte die Fragestellung, ob das gewünschte β -Fluorvinylsulfon überhaupt stabil und in Reinform isoliert werden kann, da ein intramolekularer nucleophiler Angriff gerade durch das Einführen des Fluorsubstituenten und der damit verbundenen erhöhten Elektrophilie der β -Position bevorzugt scheint.

7.3.3 Biologische Evaluierung

Die synthetisierten Verbindungen wurden hinsichtlich ihrer inhibitorischen Aktivität an der $\beta 5$ -Untereinheit (ChTL) des humanen 20S-Proteasoms unter Verwendung des entsprechenden fluorogenen Substrats Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC untersucht.^[390] Zunächst erfolgte ein initiales Screening bei einer festen Inhibitorkonzentration von 100 μM , wobei ein äquivalentes Volumen von Dimethylsulfoxid (DMSO) als Negativkontrolle eingesetzt wurde (**Abb. 7.16**). Bortezomib fungierte bei diesen Tests als Positivkontrolle.

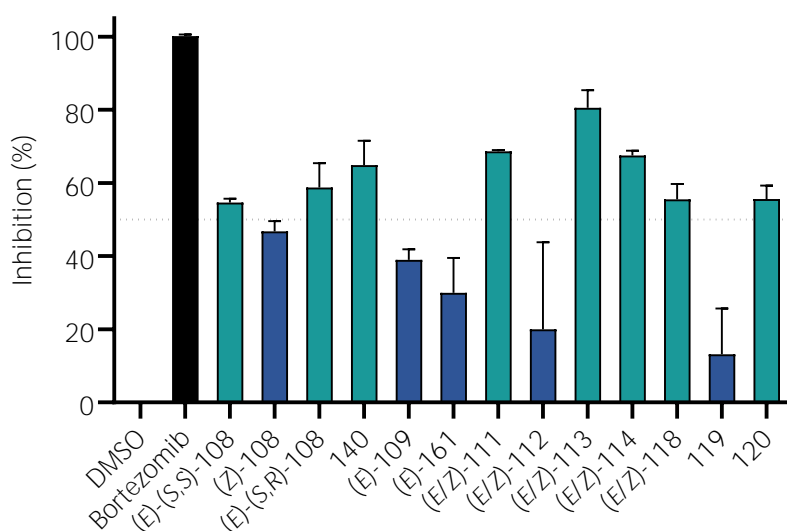


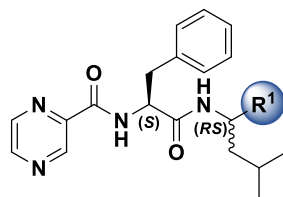
Abb. 7.16: Screening der synthetisierten Verbindungen an der $\beta 5$ -Untereinheit des humanen 20S-Proteasoms ($c = 100 \mu\text{M}$; $n = 2$).

Für Verbindungen, die eine Hemmung von mindestens 50% aufwiesen, wurden Fortschrittskurven (10 min) bei sieben verschiedenen Inhibitorkonzentrationen aufgenommen. IC_{50} -Werte wurden durch nicht-lineare Regression aus der semi-logarithmischen Darstellung der Restenzymaktivität gegen die Inhibitorkonzentration (Dosis-Wirkungs-Kurve) erhalten (Details siehe **Kap. 10.4**).^[353] Unter Berücksichtigung der Substratkonzentration und -affinität wurden die Dissoziationskonstanten K_i durch Korrektur der IC_{50} -Werte gemäß der *Cheng-Prusoff*-Gleichung (**Glg. 1**) kalkuliert.^[391]

$$\text{IC}_{50} = \left(1 + \frac{[S]}{K_m} \right) \cdot K_i \quad (1)$$

Für die Chymotrypsin-ähnliche Untereinheit wurde experimentell eine Michaelis-Menten-Konstante von $K_m = 16.2 \mu\text{M}$ ermittelt (Lit.:^[390] $13 \mu\text{M}$); die eingesetzte Substratkonzentration $[S]$ bei der Analyse der potenziellen Inhibitoren betrug $100 \mu\text{M}$.

Tab. 7.4: Inhibitionsparameter der synthetisierten Verbindungen für die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität ($\beta 5$) des humanen 20S-Proteasoms.*



Verbindung	Warhead R^1	Stereochemie	IC ₅₀ (μM)	K _i (μM)
Bortezomib		(S,S)	0.035 ± 6.9 [#]	0.005 ± 0.001
(E)-(S,S)-108		(S,S)	9.3 ± 1.6	1.3 ± 0.2
(Z)-108		(S,S)	47% [†]	–
(E)-(S,R)-108		(S,R)	17.6 ± 6.9	2.4 ± 1.0
140		(S,R)	n. b. [§]	n. b. [§]
(E)-109		(S,S)	39% [†]	–
(E)-161		(S)	30% [†]	–
(E/Z)-111		(S,S)	27.2 ± 0.9	3.8 ± 0.1
(E/Z)-112		(S,S)	20% [†]	–
(E/Z)-113		(S,RS)	14.0 ± 4.3	1.9 ± 0.6
(E/Z)-114		(S,RS)	20.5 ± 3.0	2.9 ± 0.4
(E/Z)-118		(S,S)	29.7 ± 7.2	2.8 ± 2.1
119		(S,S)	13% [†]	–
120		(S,S)	30.9 ± 6.3	4.3 ± 0.9

*Die Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung aus n = 3 unabhängigen Experimenten, welche in Duplikaten durchgeführt wurden. [#]Lit.: IC₅₀ = 0.007 μM (7 nM).^[302] [†]Prozentuale Inhibition bei c = 100 μM . [§]Substanz verhielt sich unter den Assaybedingungen instabil, weshalb keine reproduzierbaren Resultate erhalten wurden.

Der Vergleich der IC₅₀- bzw. K_i-Werte für die $\beta 5$ -Untereinheit des 20S-Proteasoms von Bortezomib (94, K_i = 5 ± 1 nM) mit den synthetisierten Derivaten zeigt, dass die Substitution des Boronat-Warheads durch die neuen reaktiven Kopfgruppen mit einer Reduktion der Bindungsaffinität einhergeht. In diesem Fall wurden unter Beibehaltung der peptidomimetischen Erkennungseinheit K_i-Werte im niedrigen μM -Bereich ermittelt (K_i = 1.3–4.3 μM). Diese Resultate können nicht mit den Berechnungen aus den molekularen Dockingstudien korreliert werden, da diese generell eine höhere

Affinität für die Verbindungen mit modifiziertem *Warhead* prognostizierten (vgl. **Tab. 7.2**). Diese Diskrepanz kann auf verschiedene Faktoren zurückgeführt werden. In Dockingstudien werden vor allem die Geometrie des Liganden sowie die intermolekularen, nicht-kovalenten Wechselwirkungen zwischen dem Liganden und Rezeptor zur Vorhersage der Bindungsenergie des Ligand-Rezeptor-Komplexes einbezogen.^[392-393] Eine fundamentale Einschränkung der Dockingprogramme besteht jedoch bei der expliziten Handhabung der Ausbildung der kovalenten Bindung zwischen dem elektrophilen Liganden und dem nucleophilen Zentrum des Rezeptors.^[394] Die Thermodynamik und Kinetik des eigentlichen kovalenten Bindungsschritts, d. h. die Energiebeiträge zur Knüpfung der kovalenten Bindung werden in gegenwärtigen Dockingmethoden nicht berücksichtigt.^[394] Die Kenntnis der freien Reaktionsenergie und der Reaktionsbarriere für den kovalenten Schritt ist jedoch essentiell, um verlässlichere Resultate zu erhalten. Die Gründe für die o. g. Abweichung können daher möglicherweise mithilfe anspruchsvollerer Simulationen auf Basis quantenmechanischer (QM/MM)-Berechnungen zur Analyse der Energetik sowie Kinetik der kovalenten Bindung bei verschiedenen *Warheads* evaluiert werden.^[350] Darüber hinaus handelt es sich bei Proteinen um dynamische Systeme, die eine ausgeprägte konformationelle Flexibilität aufweisen. Diese wird jedoch bei den gängigen Docking-Verfahren nicht in die Berechnungen inkludiert, da das Zielprotein als rigide Struktur betrachtet wird. Die Modifikation der reaktiven Kopfgruppe kann somit einen erheblichen sterischen Einfluss haben, sodass vermutlich der Zugang zum aktiven Zentrum behindert wird und mehr Bindungsrotationen für eine optimale Orientierung innerhalb der Bindetasche der proteolytischen Untereinheiten des Proteasoms nötig sind, was sich nachteilig auf die Affinität auswirken kann.^[395] Tatsächlich kann anhand der Bindungsmodi aus den Dockingstudien abgeleitet werden, dass der Rest am *Warhead* in der Regel eine vom nucleophilen Zentrum abgewandte Orientierung einnimmt, sich also „wegdreht“ und somit erst eine Annäherung der elektrophilen Position an Thr10⁹ ermöglicht wird (**Abb. 7.17**).

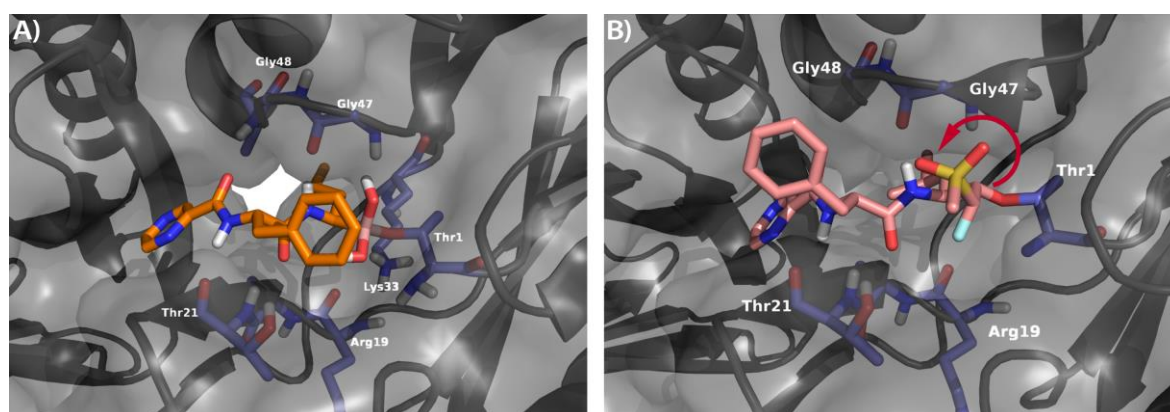


Abb. 7.17: Veranschaulichung der Auswärtsdrehung (roter Pfeil) des *Warheads* am Beispiel des postulierten kovalenten Bindemodus des α -Fluorvinylsulfons **112** (**B**) im Vergleich zu Bortezomib (**A**).

In den bisher bekannten Proteasom-Inhibitoren hingegen sind insbesondere mit Boronsäuren, α',β' -Epoxyketonen und β -Lactonen relativ kompakte elektrophile Struktureinheiten im Molekül implementiert (vgl. **Abb. 7.5**), sodass der Beitrag der Ausrichtung des *Warheads* in der Bindetasche vermutlich geringer ausfällt. Der sterische Einfluss ist für eine rationale Erklärung hinsichtlich der unterschiedlichen Wirksamkeit *in vitro* allein nicht ausreichend; hier muss die intrinsische Reaktivität des jeweiligen Elektrophils gegenüber dem nucleophilen Zentrum (Thr1O^y) ebenfalls berücksichtigt werden. Generell verlaufen kovalente Reaktionen zwischen einem Nucleophil und Elektrophil mit einem signifikanten Grad an Selektivität, die unter anderem mithilfe der HSAB- (*Hard and Soft Acids and Bases*-)Theorie von Pearson beschrieben werden kann.^[396-397] Diesem Konzept zufolge werden Nucleophile und Elektrophile basierend auf ihren elektronischen und strukturellen Eigenschaften (Polarisierbarkeit) in „weich“ (relativ polarisierbar) und „hart“ (relativ unpolarisierbar) klassifiziert.^[396] Darauf aufbauend reagieren weiche Elektrophile bevorzugt mit nucleophilen Resten vergleichbarer Weichheit (z. B. mit Thiol-Gruppen von Cystein-Resten), während harte Elektrophile priorisiert Addukte mit harten Nucleophilen (z. B. Hydroxygruppen von Serin-/Threonin-Resten) bilden.^[397] Dieser Sachverhalt dient als potenzielle Begründung für die beobachteten Reaktivitätsunterschiede der untersuchten *Warheads* am 20S-Proteasom, welches mit den Thr1-Resten eher harte Nucleophile im aktiven Zentrum der β -Untereinheiten beinhaltet. Die hohe Affinität der bereits etablierten Proteasom-Inhibitoren ist unter anderem auf ihre harten, elektrophilen Kopfgruppen (Boronate, Aldehyde, β -Lactone sowie α',β' -Epoxyketone) zurückzuführen, die für einen nucleophilen Angriff durch das harte Sauerstoff-Nucleophil (Thr1O^y) prädestiniert sind.^[293,315] Im Gegensatz dazu handelt es sich bei den dargestellten α,β -ungesättigten Verbindungen grundsätzlich um weichere elektrophile Strukturelemente, welche eher zu einer Reaktion mit Cystein- anstelle von Threonin- bzw. Serinresten tendieren.^[343] Zur Analyse der Reaktivität der synthetisierten Verbindungen gegenüber katalytisch-aktive SH-Gruppen wurden diese daher exemplarisch an den Cysteinproteasen Cathepsin S (Spaltung von Proteinen an der extrazellulären Matrix; Überexpression in soliden Tumoren)^[398] sowie SARS-CoV2 M^{pro} (relevant für die Replikation des COVID-19-verursachenden Coronavirus)^[399] getestet.¹ Aus diesen Screenings konnte eine hohe Aktivität an Cysteinproteasen abgeleitet werden, da viele der Verbindungen, insbesondere die 4-Oxoenoat-Derivate, eine (nahezu) vollständige Inhibition bei einer initialen Konzentration von 20 μ M aufwiesen (**Abb. 12.252**; Anhang). Die hier erhaltenen experimentellen Befunde demonstrieren, dass diese Kopfgruppen eine Präferenz zur Reaktion mit Thiolgruppen aufweisen, was mit bereits beschriebenen Studien zur Charakterisierung der kovalenten Reaktivität dieser *Warheads* konsistent ist.^[343,397,400]

¹Die biologische Evaluierung an Cathepsin S wurde von [REDACTED] durchgeführt, während [REDACTED] die Untersuchung an der SARS-CoV2 M^{pro} realisierte (beide [REDACTED]).

Innerhalb der Reihe der synthetisierten Bortezomib-Derivate zeichnen sich beim Vergleich der ermittelten IC_{50} - bzw. K_i -Werte ebenfalls minimale Tendenzen ab. Dabei erweist sich das (*E*)-konfigurierte 4-Oxoenoat (*E*)-(*S,S*)-**108** am potentesten ($K_i = 1.3 \pm 0.2 \mu\text{M}$), was möglicherweise auf eine erhöhte Elektrophilie der Doppelbindung durch die Anwesenheit der benachbarten γ -Oxofunktion zurückzuführen ist. Eine erhöhte Reaktivität von 4-Oxoenoate im Vergleich zu einfachen α,β -ungesättigten Systemen wurde bereits von LoPachin *et al.* berichtet.^[397] Aus den erhaltenen Daten geht jedoch nicht hervor, ob die erhöhte Potenz im Vergleich zu den anderen untersuchten *Warheads* durch die erhöhte Elektrophilie in β -Position der Doppelbindung abgeleitet werden kann oder die 4-Oxogruppe selbst als elektrophiler Angriffspunkt für Thr10' dient. Hierzu müsste der detaillierte Inhibitionsmechanismus beispielsweise mittels Kristallstrukturen des Inhibitor-Proteasom-Komplexes oder durch fortgeschrittenere NMR-Spektroskopie-Experimente aufgeklärt werden. Im Vergleich zu (*E*)-(*S,S*)-**108** ($K_i = 1.3 \pm 0.2 \mu\text{M}$) zeigt das entsprechende (*Z*)-Isomer (*Z*)-(*S,S*)-**108** (47% Inhibition bei $c = 100 \mu\text{M}$) eine deutlich reduzierte Potenz, was darauf hindeutet, dass die Doppelbindungsgeometrie der 4-Oxoenoate einen signifikanten Einfluss auf die Affinität hat und die (*Z*)-Konfiguration sich nachteilig darauf auswirkt. Dies spiegelt sich auch in den Werten wider, die beim nicht-kovalenten und kovalenten Docking ermittelt wurden (vgl. **Kap. 7.3.1**). In beiden Fällen wurden für das (*E*)-Isomer höhere *Scores* berechnet und somit eine höhere Affinität vorhergesagt. Die Ergebnisse des nicht-kovalenten Dockings deuten darauf hin, dass der Ethylester bei der (*E*)-Konfiguration weiter in die S1'-Tasche hineinreicht und somit zusätzliche polare Wechselwirkungen mit Gly47 im Gegensatz zum (*Z*)-Isomer ermöglicht werden (**Abb. 7.18**).

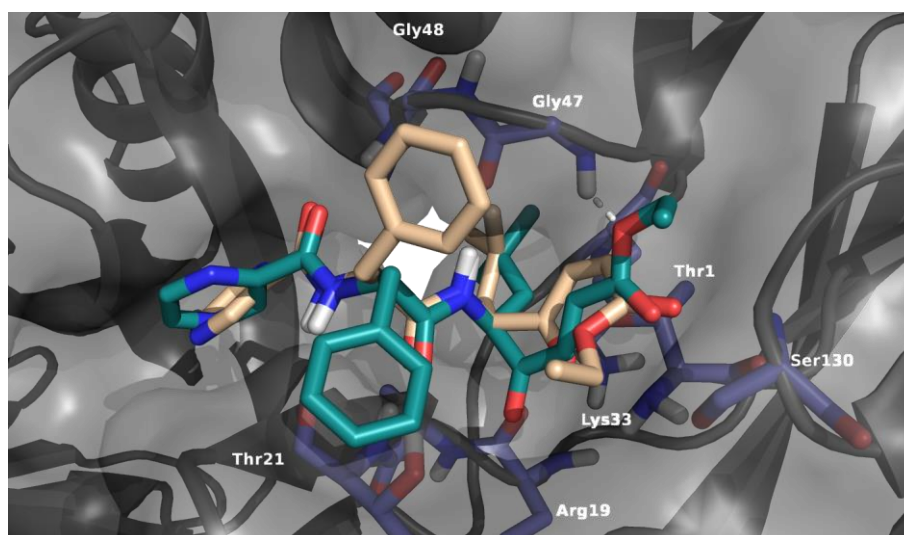


Abb. 7.18: Vergleich der postulierten Bindemodi der konfigurationsisomeren 4-Oxoenoate (*E*)-(*S,S*)-**108** (petrol) und (*Z*)-(*S,S*)-**108** (beige).

Ein analoger Effekt kann auch beim α -Fluor-substituierten Phenylvinylsulfon (*E/Z*)-**113** ($K_i = 14.0 \pm 4.3$) beobachtet werden, welches im Vergleich zum entsprechenden Methylderivat (*E/Z*)-**112** (20% Inhibition bei $c = 100 \mu\text{M}$) eine erheblich höhere Affinität zur $\beta 5$ -Untereinheit des

20S-Proteasoms besitzt. Den Dockingstudien zufolge erstreckt sich der Phenylrest tiefer in die S1'-Tasche und stabilisiert die Bindung durch zusätzliche hydrophobe Wechselwirkungen (**Abb. 7.19**), was eine rationale Begründung für die erhöhte *in vitro*-Potenz von (*E/Z*)-**113** liefert. Allerdings gehen die gefundenen Aktivitätsdifferenzen nicht so prägnant aus den berechneten Docking-Scores hervor.

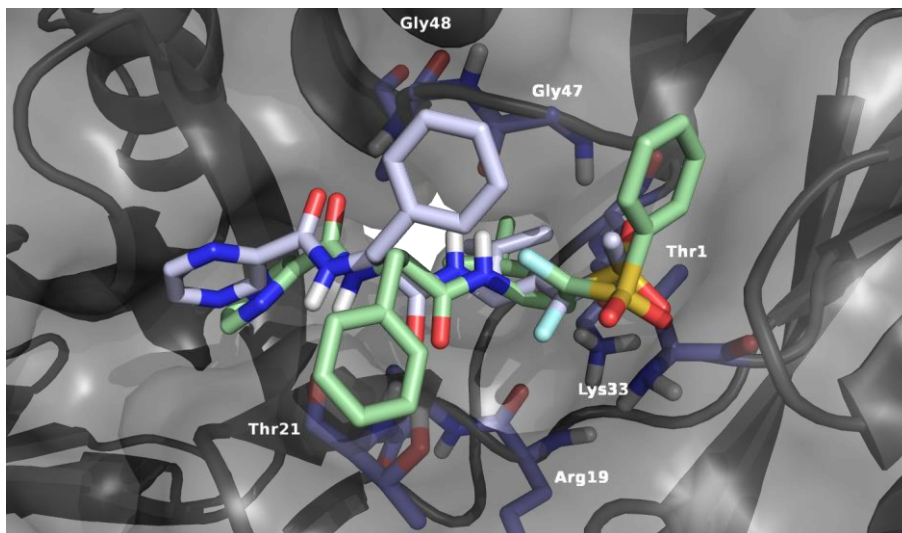


Abb. 7.19: Überlagerung der nicht-kovalenten Docking-Posen von (*E/Z*)-**113** (Phenylvinylsulfon; grün) und (*E/Z*)-**112** (Methylvinylsulfon; blaugrau).

Beim unsubstituierten Vinylsulfon (*E*)-**109** und Nitroalken (*E/Z*)-**111** sowie für die β -Ketoderivate **119** und **120** konnten nur geringe Aktivitäten nachgewiesen werden (s. o.), weshalb diese nicht für eine effektive Inhibition des 20S-Proteasoms geeignet sind. Die höhere Aktivität des β -Ketonitrils **120** gegenüber dem entsprechenden Sulfon **119** lässt sich möglicherweise auf die reaktive Nitrilgruppe zurückführen, die durch ihre Nähe zu Thr1 im aktiven Zentrum ebenfalls ein kovalentes Addukt (Imidat) bilden kann und eine Inhibition hervorruft (vgl. **S. 153**).

Obwohl anhand der erhaltenen Resultate eine hinreichende Einordnung der Reaktivität der untersuchten *Warheads* möglich ist, sind detailliertere Bindungsstudien und quantenmechanische Berechnungen erforderlich, um quantitative und evidentere Aussagen treffen zu können. Dennoch können die hier gezeigten Bortezomib-Kongenere mit den bisher nicht erforschten elektrophilen Kopfgruppen als Grundlage für eine weitere Leitstrukturoptimierung dienen, um die Problematik der hohen Toxizität der bisher bekannten Proteasom-Inhibitoren durch Verbesserung des Wirksamkeits- und Selektivitätsprofil zu adressieren (siehe **Kap. 7.4**).

7.4 Zusammenfassung und Ausblick

Das Proteasom hat sich in den letzten Jahrzehnten zu einem etablierten und validierten *Target* zur Behandlung verschiedener Formen von Blutkrebs entwickelt. Die hohe Wirksamkeit der bisher entwickelten Proteasom-Inhibitoren wurde in zahlreichen klinischen Anwendungen demonstriert und beruht auf der (ir)reversiblen Hemmung der katalytisch aktiven β -Untereinheiten des 20S-Proteasoms (CP). Auf molekularer Ebene basiert das Konzept der Proteasom-Inaktivierung in der Regel auf der kovalenten Vernetzung des elektrophilen *Warheads* mit dem *N*-terminalen Thr1-Rest in der Bindetasche, welches für die Prozessierung der Substrate verantwortlich ist. Aufgrund der hohen Reaktivität der bisher auf dem Markt befindlichen Wirkstoffe und den damit verbundenen schweren Nebenwirkungen, besteht nach wie vor großes Interesse an der Entwicklung neuer und selektiverer Proteasom-Inhibitoren.

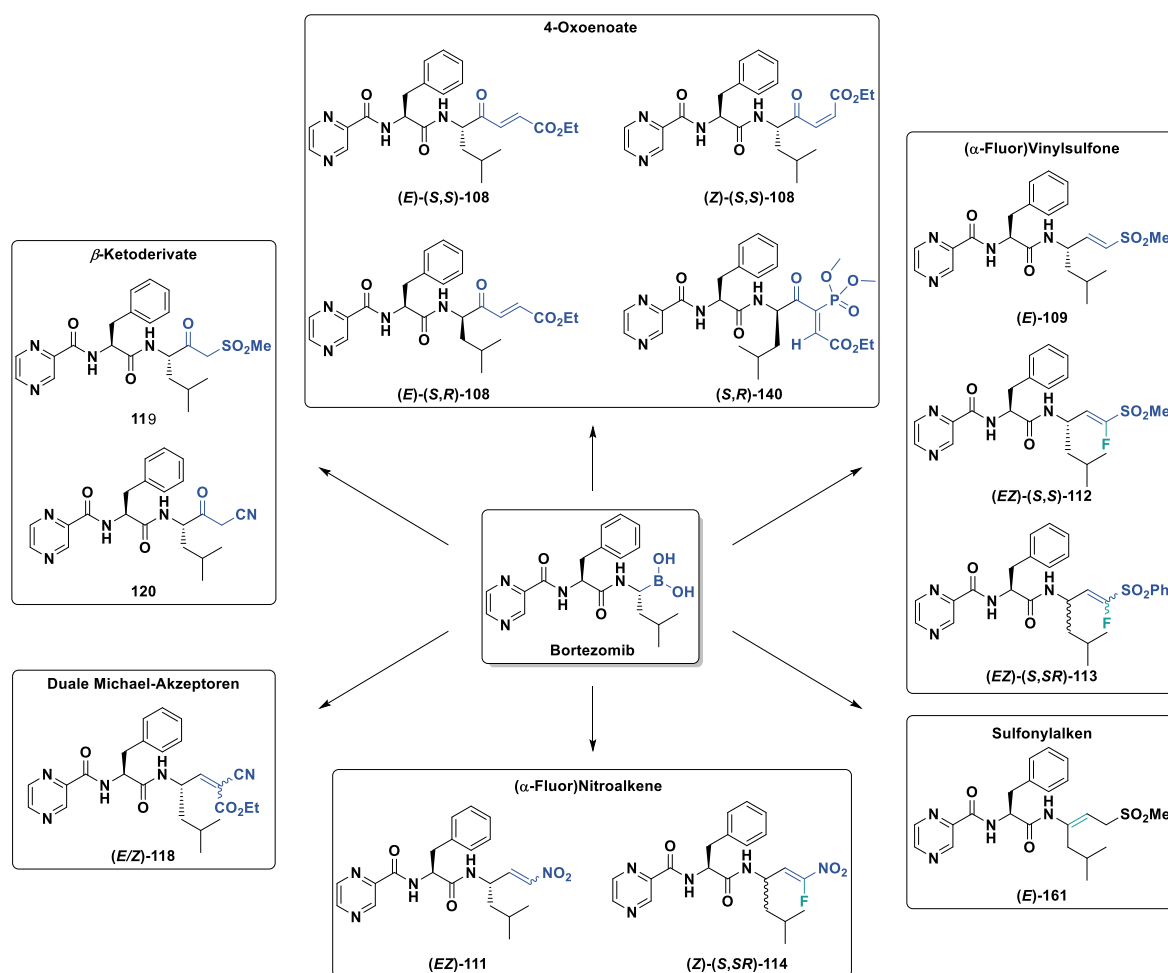


Abb. 7.20: Überblick über die synthetisierten und enzymatisch evaluierten potenziellen Proteasom-Inhibitoren.

Mit dem langfristigen Ziel die Sicherheit von Proteasom-Hemmstoffen zu verbessern und eine spezifischere Inhibition durch Modulation der Reaktivität zu gewährleisten, wurden im Rahmen dieses Forschungsprojektes neuartige Moleküle auf Grundlage des hoch-affinen Proteasom-Inhibitors Bortezomib konzipiert. Es wurden verschiedene elektrophile *Warheads* anstelle der

Boronsäure in das peptidomimetische Grundgerüst integriert, die nach aktuellem Kenntnisstand bisher noch nicht in Proteasom-Inhibitoren beschrieben wurden. Das Inhibitor-Design wurde durch (nicht-)kovalente molekulare Dockingstudien und Analyse der resultierenden Bindemodi unterstützt, in welchen generell eine hinreichende Affinität zum aktiven Zentrum der β 5-Untereinheit vorhergesagt wurde (**Kap. 7.3.1**). Die potenziellen Inhibitoren konnten daraufhin in umfangreichen Synthesen und Analysen erfolgreich und in hoher Reinheit dargestellt werden (**Kap. 7.3.2**) und wurden in ersten biologischen Assays an der Chymotrypsin-ähnlichen Untereinheit des humanen 20S-Proteasoms evaluiert, sodass eine Einordnung ihrer Wirksamkeit im Vergleich zu Bortezomib realisiert werden konnte (**Kap. 7.3.3**).

Für viele der dargestellten Verbindungen konnte eine inhibitorische Aktivität im unteren μ M-Bereich nachgewiesen werden ($K_i = 1.3\text{--}4.3 \mu\text{M}$), wobei die 4-Oxoenoateinheit den potentesten *Warhead* innerhalb der untersuchten Reihe darstellte. Zwar führt die Substitution der Boronsäure in diesem Kontext zu einer Reduktion der Bindungsaffinität im Vergleich zu Bortezomib, dennoch kann sich die verminderte Reaktivität in Bezug auf das Sicherheits- und Selektivitätsprofil als vorteilhaft erweisen. Wie eingangs beschrieben, kann die Balance zwischen einer ausreichenden Inhibition des Proteasoms und der Aufrechterhaltung der biologischen Funktion in essenziellen zellphysiologischen Prozessen durch die Modulation der molekularen Bindungseigenschaften und der damit verbundenen Reaktionskinetik optimiert werden.^[339-341] Aus diesem Grund können die hier kreierte Inhibitoren als Grundlage für die Entwicklung einer neuen Generation von Proteasom-Hemmstoffen dienen. Darauf basierend könnte die Affinität zur Bindetasche der proteolytischen β -Untereinheiten des Proteasoms unter Beibehaltung der hier eingesetzten *Warheads* beispielsweise durch die zusätzliche Adressierung der S'-Taschen (S1', S2', etc.; *primed substrate pockets*) erhöht werden. In den bisher bekannten Proteasom-Inhibitoren sind die peptidomimetischen Erkennungseinheiten so ausgelegt, dass sie optimale Anpassung in die S-Taschen gewährleisten, wobei sich der *Warhead* am C-terminalen Ende des Wirkstoffes befindet.^[252,293] Aus den in diesem Forschungsprojekt erhaltenen Befunden ergeben sich jedoch evidente Hinweise darauf, dass sich nicht-kovalente Wechselwirkungen mit der S1'-Tasche begünstigend auf die Affinität auswirken (vgl. z. B. Phenylvinylsulfon (*E/Z*)-**113** vs. Methylvinylsulfon (*E/Z*)-**112**). Demnach könnte eine neue Klasse von Proteasom-Inhibitoren auf Basis der 4-Oxoenoate oder Phenylvinylsulfone entwickelt werden, in welchen die elektrophile Struktureinheit eine zentrale Orientierung innerhalb des Moleküls einnehmen soll. Die Esterfunktion (in 4-Oxoenoaten) bzw. der Phenylrest (in Vinylsulfonen) bieten dabei genügend Spielraum für eine Leitstrukturoptimierung, indem das entsprechende Substitutionsmuster für eine Adressierung der S'-Tasche(n) angepasst wird. (vgl. **Abb. 7.21**).

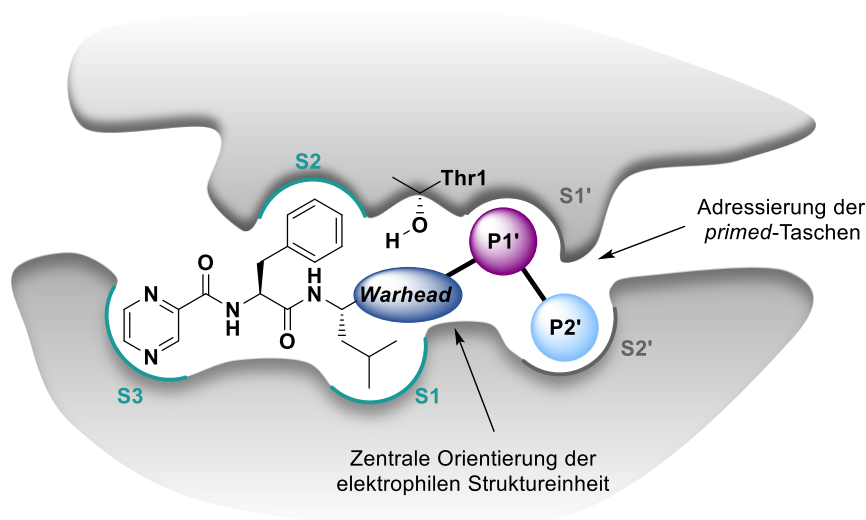


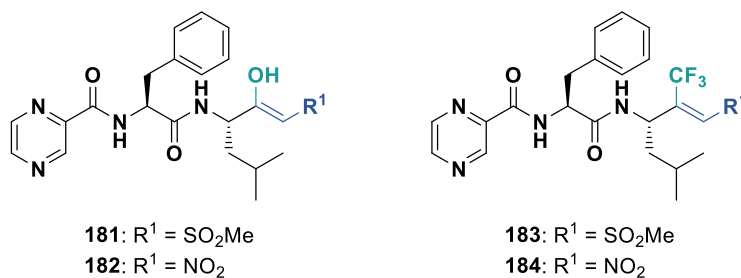
Abb. 7.21: Design potenzieller Proteasom-Inhibitoren mit zentraler elektrophiler Kopfgruppe.

Ein weiterer potenzieller Ansatz zur Erhöhung der Wirksamkeit und Reaktivität besteht in der Funktionalisierung der β -Position der hier besprochenen α,β -ungesättigten Verbindungen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Entwicklung β -fluorierter Vinylsulfone und Nitroalkene in Betracht gezogen, die jedoch ungeachtet umfassender Versuche synthetisch nicht zugänglich waren (vgl. **Kap. 7.3.2.5**). Die Modifikation der β -Position durch den Einbau elektronegativer Substituenten könnte sich für den nucleophilen Angriff des harten Nucleophils Thr1O' an das konjugierte Doppelbindungssystem als vorteilhaft erweisen. Dies könnte zuvor durch quantenmechanische Berechnungen unter Berücksichtigung der Weichheit ($\sigma = 1/\eta$) bzw. Härte ($\eta = [E_{\text{LUMO}} - E_{\text{HOMO}}]/2$) des Elektrophils mithilfe der beteiligten molekularen Grenzorbitale (HOMO-LUMO-Interaktionen) detailliert untersucht werden.^[397] Dementsprechend kann für die Bildung des kovalenten Addukts der sogenannte Elektrophilieindex ω bestimmt werden, dessen Wert die Neigung des Elektrophils zur Bildung einer kovalenten Bindung mit einem bestimmten biologischen Nucleophil (hier Thr1O') wiedergibt (**Glg. 2**; mit dem chemischen Potenzial μ).^[397]

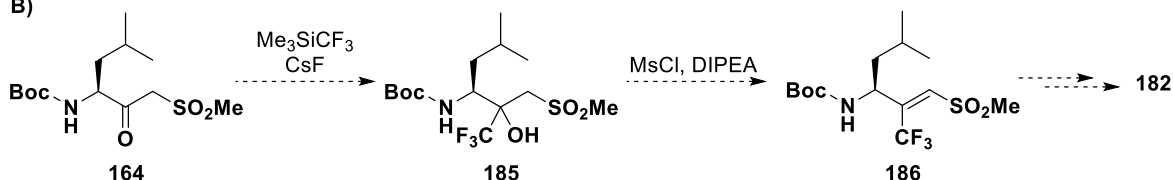
$$\omega = \frac{\mu^2}{2\eta} \quad (2)$$

Als Alternative zu β -Fluorderivaten könnte beispielsweise die Synthese entsprechender β -Hydroxy- oder β -(Trifluormethyl)-substituierter Verbindungen in Betracht gezogen werden zur Erhöhung der Elektrophilie an dieser Position, sofern sich die Intermediate und Produkte bei der Herstellung als stabil erweisen. Letztere könnten möglicherweise aus den dazugehörigen β -Ketosulfonen/-nitroalkenen mithilfe von Trifluormethyltrimethylsilan (Ruppert-Prakash-Reagenz) und anschließender Eliminierung von Wasser dargestellt werden (**Schema 7.41**).^[401-403]

A)



B)



Schema 7.41: A) Strukturen potenzieller Proteasom-Inhibitoren modifizierter β -Position. B) Vorgeschlagene Syntheseroute zur Darstellung der β -Fluorvinylsulfone (bzw. analog dazu die entsprechenden Nitroalkene).

Insgesamt konnten im Verlauf dieser Studie grundlegende Erkenntnisse bei der Darstellung bisher unerforschter elektrophiler Struktureinheiten sowie hinsichtlich der biologischen Aktivität von Bortezomib-Derivaten mit modifizierten *Warheads* gewonnen werden. Basierend auf den Daten und den hier beschriebenen Überlegungen eröffnen sich neue Möglichkeiten für die Entwicklung von Proteasom-Inhibitoren mit einem verbesserten Selektivitäts- und Sicherheitsprofil.



Teil III

Sonstige Projekte

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden zusätzlich weitere Projekte bearbeitet, die nicht Teil der zentralen Aufgabenstellungen waren (vgl. Teil I und Teil II) und nachfolgend jeweils in Kürze vorgestellt werden.

8 Synthese des kovalenten *Cdu1*-Inhibitors HJR108

Das in diesem Kapitel beschriebene Projekt basiert auf einer Forschungs Kooperation mit [REDACTED] ([REDACTED], Rudolf-Virchow-Zentrum; Universität Würzburg) und [REDACTED] (Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Universität Würzburg), die Cyanopyrimidinderivate als erste kovalente Inhibitoren des deubiquitinierenden, deneddylierenden und *trans*-acetylierenden Enzyms ChlaDub1 (*Cdu1*) identifizierten, welches ein essenzielles Enzym für den Krankheitserreger *Chlamydia trachomatis* (CT) und somit ein attraktives Zielprotein für die Behandlung von CT-Infektionen darstellt. Von ihnen durchgeführte kovalente Dockingstudien sowie strukturbasiertes Wirkstoffdesign führten zur Entwicklung des optimierten *Cdu1*-Inhibitors **HJR108**.

Die Planung, Optimierung und Durchführung der Synthese dieses ersten spezifischen kovalent-reversiblen *Cdu1*-Inhibitors erfolgte initial in Zusammenarbeit mit [REDACTED] im Rahmen seiner hilfswissenschaftlichen Tätigkeit im Arbeitskreis von [REDACTED] und wurde im Zuge dieser Promotion schließlich inklusive der vollständigen analytischen Charakterisierung aller Intermediate sowie der Zielverbindung (siehe auch **Kap. 10.10**) finalisiert. Die Identität sowie Reinheit von **HJR108** wurde vor Aushändigung für die biologische Evaluierung und Co-Kristallisierungsexperimente mit *Cdu1* sichergestellt.

8.1 Einleitung

Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation WHO ist ein Großteil der diagnostizierten sexuell übertragbaren Infektionen (*sexual transmitted infections*, STIs) mit einer Prävalenz von bis zu ca. 131 Millionen weltweit auf das humane Pathogen *Chlamydia trachomatis* (CT) zurückzuführen.^[404] Obwohl die meisten Infektionen bei Männern und Frauen asymptomatisch verlaufen, kann dieses intrazellulär auftretende gram-negative Bakterium unbehandelt für eine Vielzahl an schweren Komplikationen verantwortlich sein.^[405] So kann sich eine Chlamydiose bei Frauen in einer Urethritis, Zervizitis und in schwereren Verläufen in einer Unterleibsentzündung (*Pelvic Inflammatory Disease*) manifestieren, während bei Männern neben Urethritis unter anderem eine Epididymitis oder das *Reiter*-Syndrom auftreten können.^[405] Im Verlauf einer Schwangerschaft besteht zudem die Gefahr, das Ungeborene durch eine Übertragung des Pathogens nachhaltig zu beeinträchtigen.^[406] Darüber hinaus kann eine Infektion mit *C. trachomatis* zu einer signifikanten Störung der Sehfunktion (Trachom) bis hin zur Erblindung und zu einem erhöhten HIV1-Erkrankungsrisiko führen.^[407-408] Zur allgemeinen Behandlung einer Chlamydieninfektion empfiehlt die WHO die Gabe von Antibiotika wie Azithromycin (1 g oral als Einzeldosis) oder Doxycyclin (100 mg oral zweimal täglich für 7 Tage) bei unkompliziert verlaufenden genitalen Chlamydiosen. Alternativ können Tetracyclin, Erythromycin (je 500 mg oral viermal täglich für 7 Tage) oder

Ofloxacin (200–400 mg oral zweimal täglich für 7 Tage) appliziert werden (vgl. **Abb. 8.1**).^[409] Dessen ungeachtet können sich unter Umständen Resistenzen gegenüber diesen Antibiotika entwickeln, vor allem, wenn sie in sub-inhibitorischen Konzentrationen eingesetzt werden.^[410]

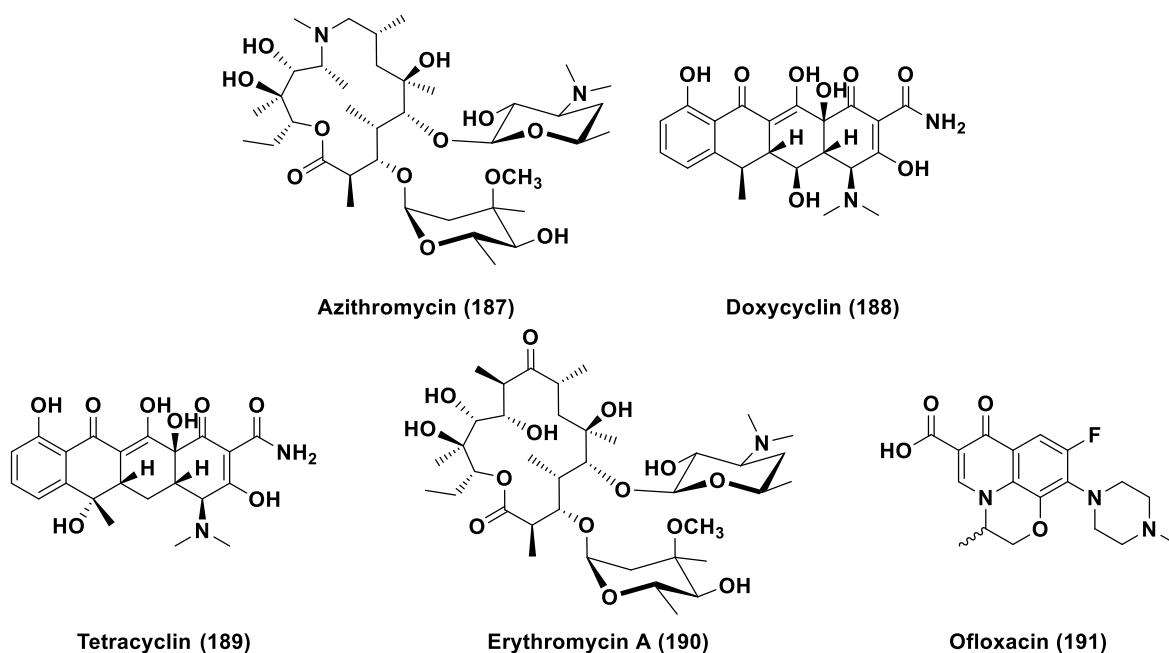


Abb. 8.1: Strukturen der von der WHO empfohlenen Antibiotika bei einer Infektion mit *Chlamydia trachomatis*.^[409]

Auf zellulärer und molekularbiologischer Ebene kann *C. trachomatis* auf verschiedenen Wegen die menschliche Immunantwort umgehen. Eine entscheidende Bedeutung kommt dabei dem bereits in **Kap. 7** detailliert besprochenen Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) zu, welches für die Regulation einer Vielzahl an zellulären Prozessen (Proteindegradation/-stabilität, Signaltransduktion, Transkriptionsregulation, Immunantwort sowie Apoptose) verantwortlich ist.^[411-412] Neuere Untersuchungen ergaben, dass sich *C. trachomatis* vor allem die Effektorproteine ChlaDUB1 (*Chlamydia trachomatis* deubiquitinase1, Cdu1) und ChlaDUB2 (Cdu2) zu Nutze macht, um in das UPS der Wirtszelle zu intervenieren.^[413-415] Es konnte gezeigt werden, dass Cdu1 durch Unterdrückung der NF- κ B-Aktivierung über die Deubiquitinierung der inhibitorischen Untereinheit I κ B α (Verhinderung des proteasomalen Abbaus) es dem pathogenen Erreger ermöglicht, sich der menschlichen (anti-inflammatorischen) Immunantwort zu entziehen und somit ein langfristiges Überleben in Zellen der infizierten Personen sichergestellt werden kann.^[416] Zudem kann durch die Cdu1-Aktivität der programmierte Zelltod verhindert werden, indem der Apoptoseinhibitor Mcl1 spezifisch deubiquitiniert wird.^[415,417] Da Cdu1 für das Überleben des Pathogens essenziell ist und dessen Inhibition die Vermehrung vermutlich stark limitiert, stellt dieses Effektorprotein ein attraktives Angriffsziel für potentielle Wirkstoffe dar.^[415,418]

Bei Cdu1 handelt es sich um eine Cysteinprotease, die dem CE-Clan der Cysteinproteasen angehört und strukturell mit verschiedenen Deubiquitinase-Enzymen (DUBs) verwandt ist.^[419-420] Als charakteristisches Merkmal weist ChlaDub1 zwei variable Regionen (*variable region*, VR-2 und VR-3) auf, die das aktive Zentrum mit der katalytischen Triade (Cys345, His275 und Asp 292) sowie eine strukturell konstante Region (*constant region*, CR) umgeben (**Abb. 8.2, A**).^[414] Diese variablen Regionen dienen Analysen zufolge unter anderem der Substratspezifität bei den einzelnen DUBs aus dem CE-Clan (z. B. der Bindung an Ubiquitin).^[414] Im Vergleich zu anderen DUBs ist eine entsprechende VR-1 bei Cdu1 nicht vorhanden, wobei an dieser Stelle der C-Terminus lokalisiert ist.^[414]

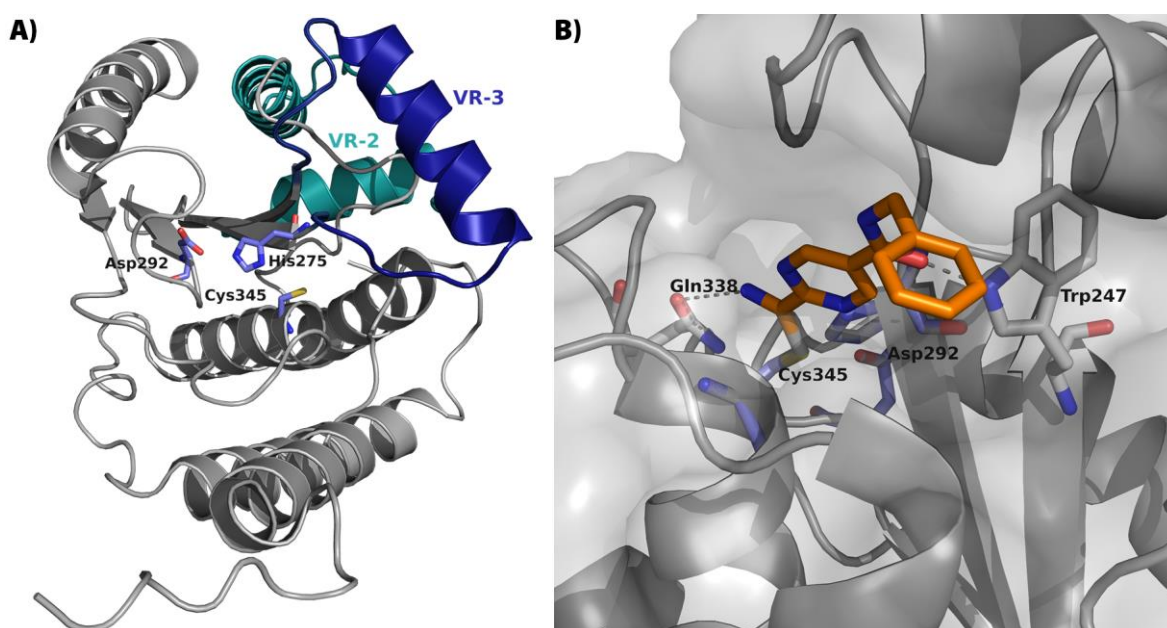


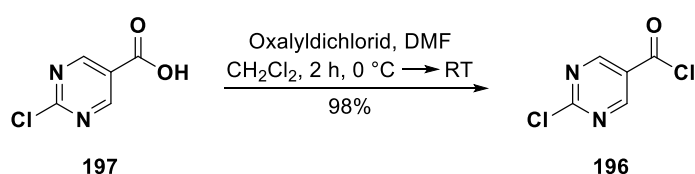
Abb. 8.2: **A)** Kristallstruktur der ChlaDub1 (Cdu1, PDB: 5HAG). VR = variable Region, davon ist VR-3 einzigartiges Merkmal bei der Cdu1; angelehnt an Pruneda *et al.*^[414] **B)** Kristallstruktur der Cdu1 mit kovalent gebundenem Cyanopyridin **192** (PDB: 6FDQ; angelehnt an Ramirez *et al.*).^[415]

8.2 Zusammenfassung und eigener Beitrag

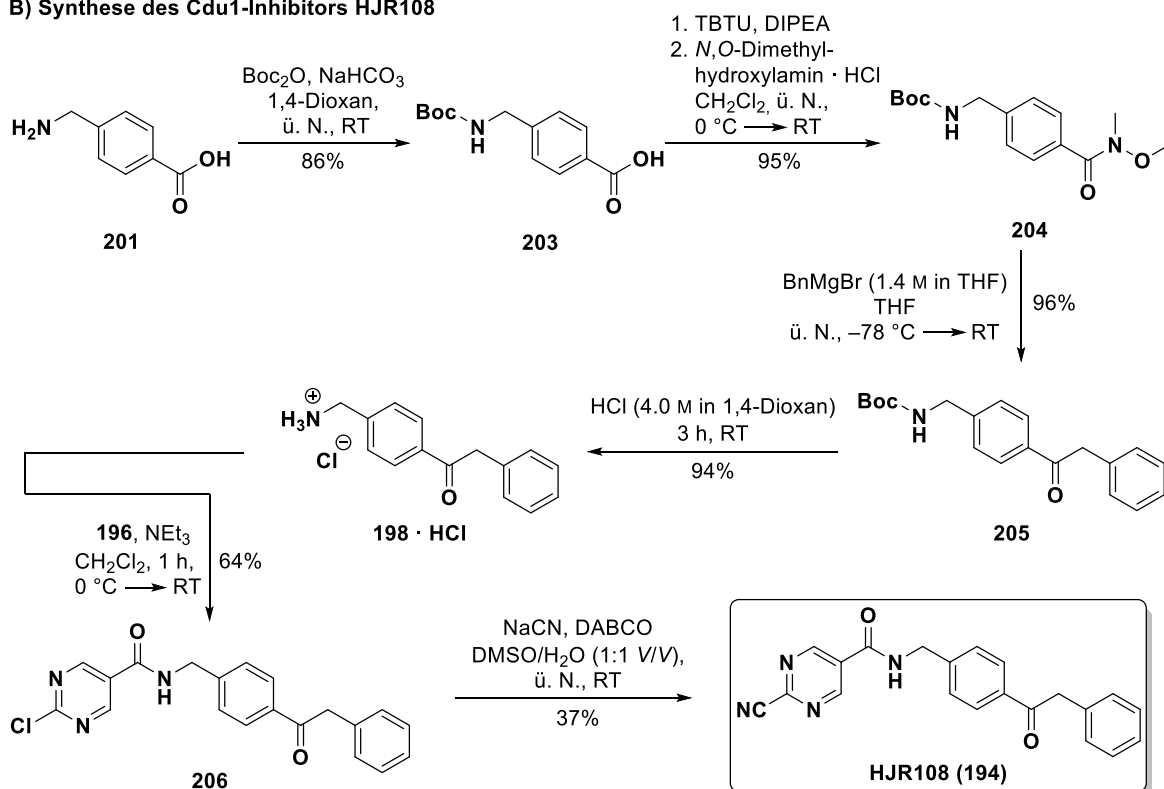
Ramirez *et al.* nutzten die hohe strukturelle Ähnlichkeit der Cdu1 zur Adenoviren-Cysteinprotease Adenain, um bereits erforschte kovalente Adenain-Inhibitoren bezüglich ihrer Aktivität gegen Cdu1 zu testen.^[415,418,421-422] Im Zuge dieses *Target-Hopping*-Ansatzes haben sich die Cyanopyrimidin-derivate **192** ($IC_{50} = 113 \mu M$) und **193** ($IC_{50} = 204 \mu M$) (**Schema 8.1**) als geeignete Leitstrukturen mit einem langsam-reversiblen Bindungsverhalten erwiesen.^[415,418] Dabei bestätigten X-Ray-Cokristallstrukturen (PDB: 6FDU und 6FDQ) die kovalente Bindung der potentiellen Inhibitoren an das katalytisch aktive Cys345 unter Ausbildung eines Thioimidatadduktes und es konnte somit auch der Bindemodus entsprechend aufgeklärt werden, der eine weitere Optimierung dieser Verbindungen ermöglichte (**Abb. 8.2, B**).^[415,418] Umfassende kovalente Dockingstudien unter Zuhilfenahme der Cdu1-Inhibitor-Kristallstrukturen (PDB: 6FDQ und 6FDU) führten schließlich zur Verbindung

Substitution an der 2-Position erhalten werden. Die dazugehörige Aminkomponente **198** sollte über eine Ketonsynthese nach Gilman und van Ess oder über das Weinreb-Amid ausgehend von (4-Aminomethyl)benzoesäure **201** und unter Verwendung von Benzylmagnesium bzw. Benzylmagnesiumbromid zugänglich sein.^[423-424] Beide Bausteine ließen sich letztlich direkt in das finale 2-Cyano-pyrimidin-5-carbonsäureamid **194** (**HJR108**) überführen, dessen Synthese entsprechend den beschriebenen Überlegungen in **Schema 8.2** gezeigt ist. Die Einführung der reaktiven Nitrilgruppe sollte hierbei im letzten Schritt durchgeführt werden, um mögliche Komplikationen z. B. durch Reaktion mit anderen Nucleophilen bzw. eine Umsetzung zum Carbonsäurecyanid aus dem Säurechlorid zu umgehen.

A) Synthese des Chlorpyrimidinbausteins



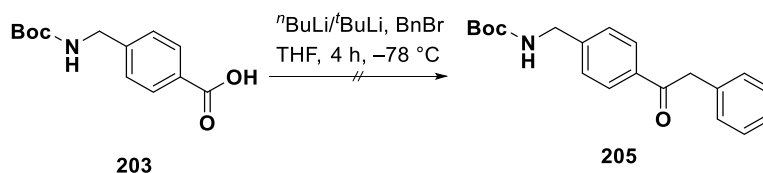
B) Synthese des Cdu1-Inhibitors HJR108



Schema 8.2: Synthese des kovalenten Cdu1-Inhibitors **HJR108** ausgehend von 2-Chlorpyrimidin-5-carbonsäure **197** und (4-Aminomethyl)benzoesäure **201**.

Zunächst erfolgte die Umsetzung von kommerziell erhältlicher 2-Chlorpyrimidin-5-carbonsäure (**197**) mittels Oxalylchlorid bei 0 °C in Gegenwart katalytischer Mengen an *N,N*-Dimethylformamid.^[425] Dabei wurde das entsprechende Säurechlorid **196** in nahezu quantitativer Ausbeute erhalten, welches aufgrund der geringeren Stabilität ohne weitere Reinigung im nächsten

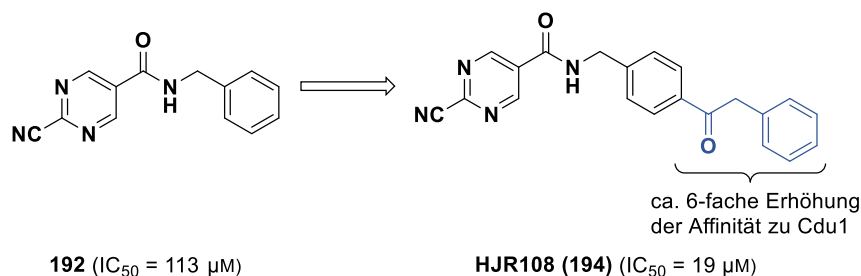
Syntheseschritt eingesetzt wurde (**Schema 8.2, A**). Initial wurde versucht, die direkte Synthese des Ketons **205** nach der von Gilman und van Ess beschriebenen Methode^[423] ausgehend von (4-Aminomethyl)benzoesäure (**201**) mit vorausgehender Einführung einer *N*-Boc-Schutzgruppe und *in situ*-Lithiierung von Benzylbromid zu realisieren (**Schema 8.3**).



Schema 8.3: Versuch zur Synthese des Ketons **205** in Anlehnung an Gilman und van Ess.^[423]

Für die Lithiierungsreaktionen wurden verschiedene stöchiometrische Mengen (2–4 Äquiv.) ⁿBuLi bzw. ^tBuLi erprobt, jedoch konnte in allen Fällen mittels LC-MS-Analysen kein Produkt nachgewiesen werden und es entstanden allenfalls komplexe Produktgemische. Auf eine weitere Optimierung der Reaktionsbedingungen wurde verzichtet, da parallel der Umweg über das entsprechende Weinreb-Amid **204** sowie die anschließende Umsetzung mit Benzylmagnesiumbromid nach einer modifizierten Methode von Buckley *et al.*^[426] zum gewünschten Produkt **205** führte, welches verlässlich in hohen Ausbeuten (bis zu 96%) isoliert werden konnte. Die anschließende Sequenz aus Deblockierung der Aminogruppe mittels HCl (4.0 M in 1,4-Dioxan) und Amidbildung^[425] aus dem resultierenden Hydrochlorid und dem Säurechlorid **196** lieferte den **HJR108**-Präkursor **206** in guten Ausbeuten. Die finale Substitution des Chloratoms in 2-Position der Pyrimidineinheit unter Verwendung von Natriumcyanid in Gegenwart katalytischer Mengen DABCO^[427] ermöglichte schließlich den Zugang zum potenziellen Cdu1-Inhibitor **HJR108**, der in einer Gesamtausbeute von 17% (über sieben Stufen) und nach säulenchromatographischer Reinigung in einer Reinheit von 99% erhalten wurde (**Schema 8.2, B**).

HJR108 wurde schließlich von [REDACTED] an Cdu1 hinsichtlich der Affinität im Vergleich zu den Cyanopyrimidinen **192** und **193** (**Abb. 8.3**) getestet.^[418] Die Bestimmung des dazugehörigen IC₅₀-Wertes von 19 μM erfolgte mittels Aufnahme einer Dosis-Wirkungskurve (**Abb. 8.3, A**). Relativ zum Cyanopyrimidin **192** führte das Einführen der Phenylacetylgruppe in 4-Position somit zu einer ca. sechsfachen Verbesserung der Affinität, sodass sich die von [REDACTED] aufgestellten Überlegungen in den kovalenten Dockingstudien als konsistent erwiesen.^[418] Zudem konnte in Analogie zum Bindungsverhalten von **192** in einem *Rapid Dilution Assay* für **HJR108** ein reversibler Mechanismus dokumentiert werden (**Abb. 8.3, B**).^[418]



Schema 8.4: Entwicklung des kovalenten Cdu1-Inhibitors **HJR108** ausgehend vom Cyanopyrimidin **192**. Die Einführung der Phenylacetylgruppe (in blau hervorgehoben) führte zu einer sechsfachen Erhöhung der Affinität zu Cdu1.^[418]

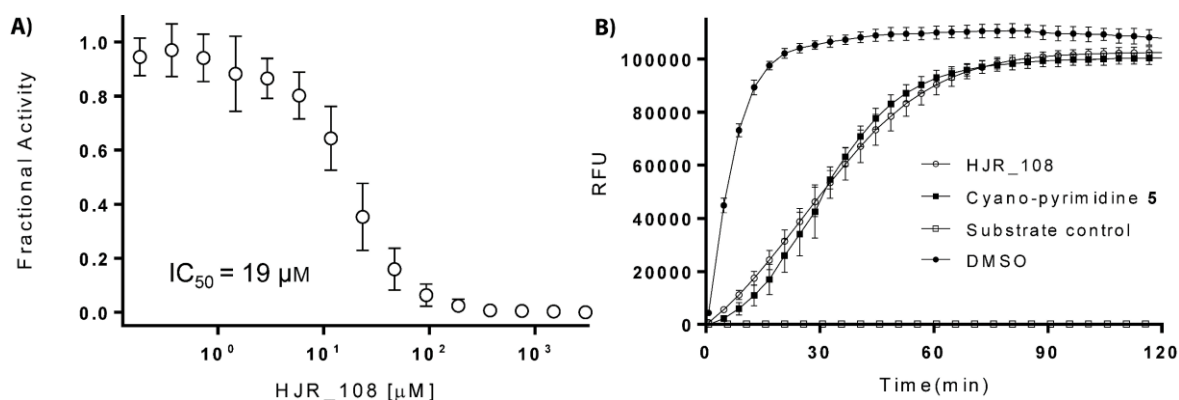


Abb. 8.3: A) Dosis-Wirkungs-Kurve für die Cdu1-Aktivität nach 1 h Inkubation mit **HJR108**. B) *Rapid Dilution Assay*, der den Zeitverlauf der Substrathydrolyse wiedergibt. „Cyano-pyrimidine 5“ entspricht **192**. Entnommen von Ramirez, Dissertation Julius-Maximilians-Universität Würzburg 2019, mit freundlicher Genehmigung.^[418]

Die erfolgreiche Synthese von **HJR108** ermöglichte den experimentellen Vergleich mit den zuvor identifizierten Cyanopyrimidinen^[415] sowie die Verifizierung der Überlegungen, die aus der *in silico*-Optimierung in den kovalenten Dockingstudien hervorgingen.^[418] Infolgedessen konnte mit **HJR108** der erste reversible Cdu1-Inhibitor entwickelt werden, der spezifisch das aktive Zentrum dieses für *C. trachomatis* essenziellen Effektorproteins adressiert.^[418] In Analogie zu den Verbindungen **192** und **193** sollen nun Röntgenstrukturanalysen von Cdu1 im Komplex mit **HJR108** durchgeführt werden, um zum einen die computergestützten Berechnungen experimentell zu bestätigen und zum anderen weitere relevante Ligand-Protein-Interaktionen aufzudecken, mithilfe derer strukturbasierte Optimierungen vorgenommen werden können, die die Entwicklung noch potenterer und spezifischer Cdu1-Inhibitoren ermöglichen. Dabei bietet die etablierte Syntheseroute durch die simplen und zum großen Teil robusten Transformationen genügend Spielraum für Variationen im Substitutionsmuster der einzelnen Komponenten des Aminbausteins.

Eigener Beitrag: Planung, Optimierung und Durchführung der Synthese inkl. vollständige analytische Charakterisierung von **HJR108** sowie aller Intermediate.

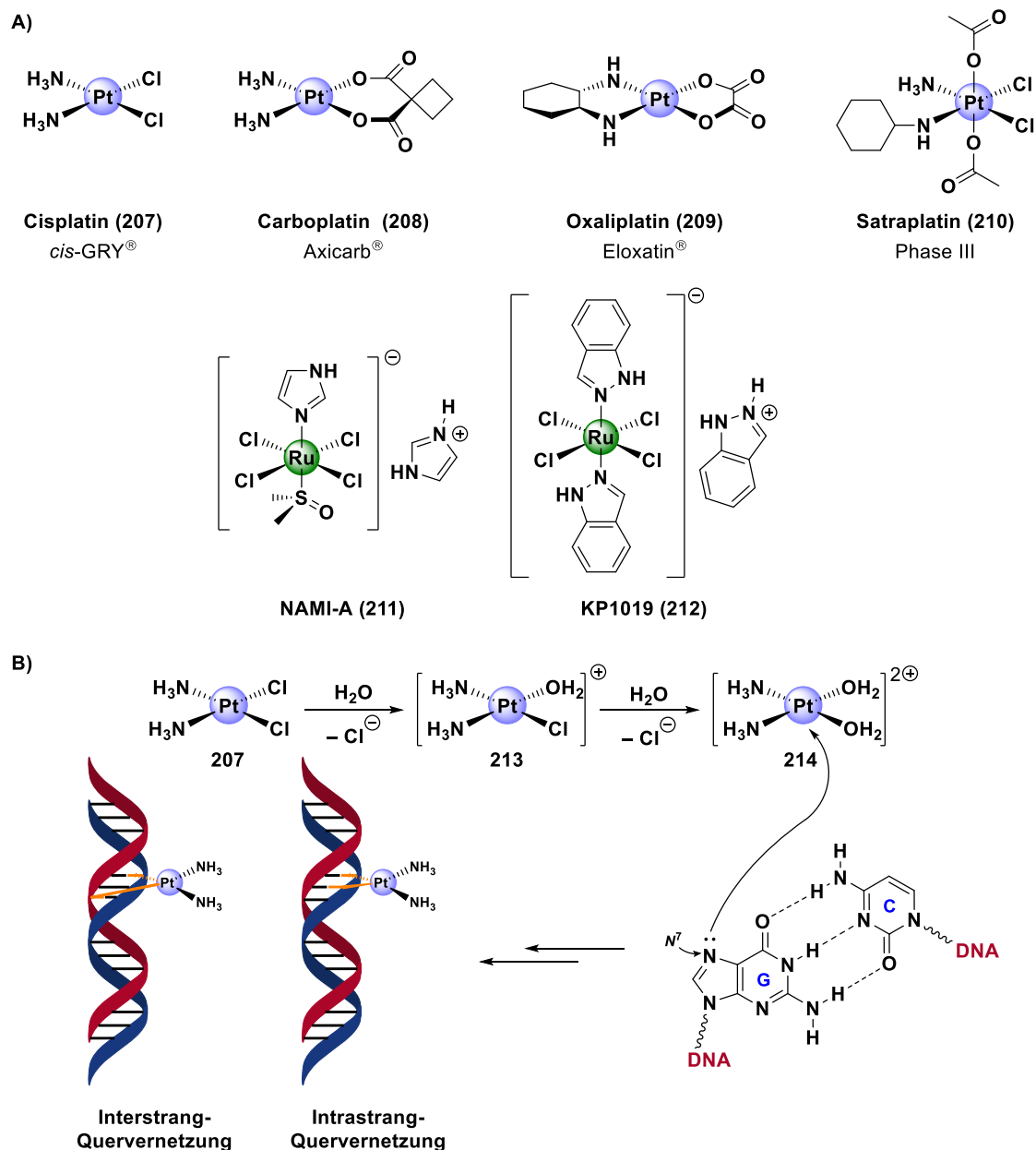
9 Ru(II)- und Pd(II)- homo- und heterobimetallische Komplexe: Synthese, Kristallstrukturen, theoretische Berechnungen und biologische Studien

Das in diesem Kapitel beschriebene Projekt basiert auf einer Kooperation mit den Arbeitsgruppen von [REDACTED] (Department of Chemistry, University of Isfahan, Iran), [REDACTED] und [REDACTED] (Department of Chemical, Biological, Pharmaceutical and Environmental Sciences, University of Messina, Italy) sowie [REDACTED] (Institut für Pharmazeutische und Biomedizinische Wissenschaften, Johannes Gutenberg-Universität Mainz), im Rahmen dessen neue synthetische Ruthenium(II)- und Palladium(II)-basierte Komplexe in Hinblick auf die Struktur im Festkörper sowie deren antiproliferative Aktivität evaluiert wurden.^[428]

9.1 Einleitung

Unter den heute eingesetzten Cytostatika zur Behandlung diverser Karzinome haben sich zunehmend Übergangsmetallkomplex-basierte Verbindungen in den letzten Jahrzehnten etabliert.^[429-430] Populäre Vertreter dieser Wirkstoffe stellen vor allem Cisplatin (**207**) und verwandte Platinkomplexe (z. B. Carboplatin (**208**)^[431-432], Oxaliplatin (**209**)^[433-434], Satraplatin (**210**)^[435-436]; siehe **Schema 9.1**) dar, die zu den potentesten Wirkstoffen mit antitumoraler Aktivität gegen eine Vielzahl an Tumoren (v. a. Hoden- und Ovarialkarzinome) zählen.^[437] Ihr Wirkmechanismus beruht auf der kovalenten Bindung an Purinbasen der DNA (*cross linking*), welche zur Beeinträchtigung der Transkription sowie Replikation der DNA und somit zur zellulären Apoptose führt (**Schema 9.1**).^[437-438] Die hohe Aktivität von Cisplatin geht jedoch mit einer signifikanten Nephro- und Hepatotoxizität einher; darüber hinaus erweisen sich die limitierte Bioverfügbarkeit und häufige Ausbildung von Resistenzen ebenfalls als nachteilig.^[429,439] Dies führte zur Einführung von Carboplatin (geringere Nephrotoxizität)^[431-432], Oxaliplatin (reduzierte Resistenzentwicklung bei manchen Krebszellen und breiteres Spektrum)^[433-434] und Satraplatin (Gewährleistung oraler Bioverfügbarkeit).^[435-436] Alternativ zu Platinverbindungen wurden zunehmend auch Ruthenium(II)- und -(III)-komplexe bezüglich ihrer antiproliferativen und antimetastatischen Eigenschaften gegen verschiedene Tumorarten untersucht, wovon **NAMI-A**^[440] und **KP1019**^[441] sich bereits in klinischen Studien befinden. Eine vielversprechende Weiterentwicklung der übergangsmetallbasierten Wirkstoffe stellen darüber hinaus homo- bzw. heterobimetallische Komplexe zur Verbesserung der physikochemischen und biologischen Parameter dar. Diese sollen sich zudem durch eine höhere Cytotoxizität sowie einen möglichen Synergismus infolge der Adressierung verschiedener biologischer Targets durch die Verknüpfung mehrerer Übergangsmetallzentren auszeichnen.^[442-445] Es wurde bereits eine Vielzahl diverser Kombinationen homo- und heterobimetallischer Komplexe bezüglich ihres biologischen Einflusses untersucht, jedoch existierten bisher keine Publikationen mit Ruthenium- und Palladiummetallzentren, die im selben Komplex integriert sind und hinsichtlich

ihrer antitumoralen Aktivität analysiert wurden.^[428] Zudem erweist sich dabei die generell höhere Wasserlöslichkeit der Pd(II)-Komplexe im Vergleich zu den verwandten Pt(II)-Spezies im Hinblick ihrer Applikation in biologischen Systemen als vielversprechend.^[446-447]



Schema 9.1: **A)** Strukturen Platin-basierter Verbindungen mit antitumoraler Aktivität (oben) sowie der Rutheniumkomplexe **NAMI-A**^[440] und **KP1019**^[441], die sich in klinischen Studien befinden (unten). **B)** Wirkmechanismus der Platincytostatika: Die neutrale Platinspezies wird intrazellulär durch sukzessiven Ligandenaustausch mittels Wassermolekülen aktiviert; dieser elektrophile Aquokomplex fungiert als bioaktive Form und reagiert direkt mit nucleophilen Zentren (v. a. mit N^7 -Positionen der Purinbasen) zu kovalent quervernetzten DNA-Addukten (*cross linking*), wobei generell zwischen Intrastrang- (85–90% aller Addukte) und Interstrang-Addukten (ca. 2% aller Addukte) differenziert wird.^[429,437-438,448]

0.03% SDS) nach Inkubation für 24 h bei Raumtemperatur mittels UV/Vis und HPLC-ESI-MS analysiert. Es konnte ein zeitabhängiger Anstieg des Absorptionsmaximums bei $\lambda = 258$ nm festgestellt werden (**Abb. 9.2**), der vermutlich auf eine Ligandenaustauschreaktion (Substitution der Chloridionen durch Wasser) zurückzuführen ist, die bei ähnlichen Komplexen üblicherweise auftritt.^[449]

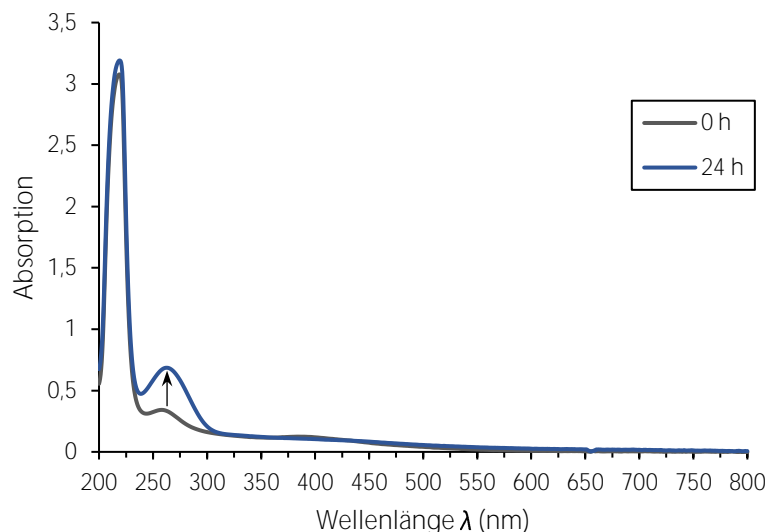


Abb. 9.2: UV/Vis-Absorptionsspektrum von Komplex **215c** ($10 \mu\text{M}$ in 50 mM TRIS-Puffer; $\text{pH } 7.5$, 0.03% SDS) vor und nach 24 h Inkubation bei Raumtemperatur. Der zeitabhängige Anstieg des Absorptionsmaximums bei $\lambda = 258 \text{ nm}$ ist zusätzlich durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Um diese Hypothese des Ligandenaustauschprozesses in wässrigem (biologischem) Medium weiter zu bekräftigen, wurde darüber hinaus eine massenspektrometrische Analyse der Lösung nach 24 h durchgeführt (**Abb. 9.3**), wobei unter anderem (Fragment-)Ionen mit Massen von 366 m/z ($[\text{M}-2\text{Cl}+2\text{H}]^+$), 667 m/z ($[\text{M}-\eta^6\text{p-Cumol}+\text{H}]^+$) und 769 m/z ($[\text{M}-2\text{Cl}+2\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$), die ein charakteristisches Isotopenmuster für Ru/Pd-Verbindungen aufweisen, detektiert wurden.

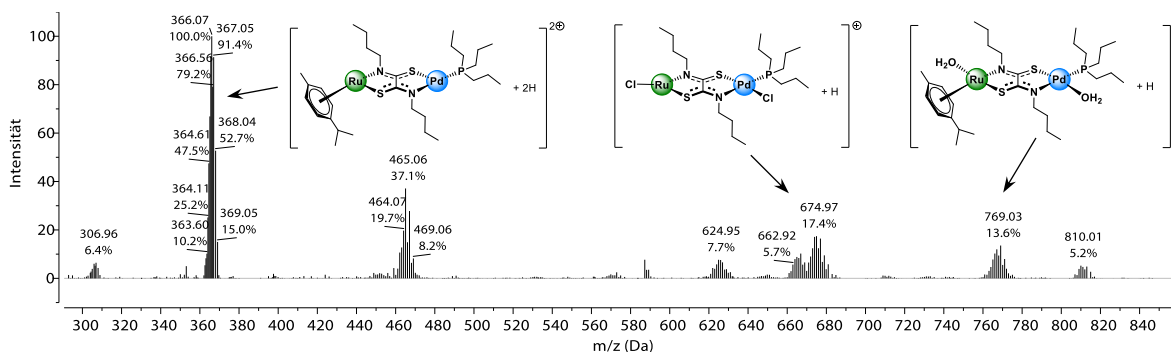


Abb. 9.3: Massenspektrum mit charakteristischem Isotopenmuster des heterobimetallischen Komplexes **215c** nach 24 h Inkubation in 50 mM TRIS-Puffer ($\text{pH } 7.5$, 0.03% SDS) bei Raumtemperatur. Die Strukturen einiger nachgewiesener Fragmente sind an entsprechender Stelle integriert.

Diese Resultate bestätigen die eingangs aufgestellte Vermutung, dass die initialen Chlorokomplexe einer Substitutionsreaktion durch Wasser unterliegen, sobald sie sich in wässriger Umgebung befinden. Wie aus dem Massenspektrum hervorgeht, bleibt die Grundstruktur der bimetallichen Komplexe hingegen selbst nach 24 h erhalten.

Für eine detailliertere Diskussion bezüglich der Synthese, Kristallstrukturanalysen sowie der biologischen Evaluierung der oben beschriebenen neuen homo- und heterobimetallichen Komplexe sei auf die Publikation sowie den betreffenden SI-Part verwiesen (**DOI: 10.1039/c9dt02353d**).^[428]

Eigener Beitrag: Durchführung von Stabilitätsstudien mittels UV/Vis-Spektroskopie und HPLC-ESI-MS sowie Analyse des Fragmentierungsmusters der Massenspektren; Verfassen des entsprechenden Parts des Manuskripts/der *Supplementary Information* (SI).

9.3 Publikation

Reprinted with permission from *Dalton Trans.*, 2019, 48, 15869 © Royal Society of Chemistry.

Dalton Transactions



PAPER

View Article Online
View Journal | View Issue



Cite this: *Dalton Trans.*, 2019, 48, 15869

Ruthenium(II) and palladium(II) homo- and heterobimetallic complexes: synthesis, crystal structures, theoretical calculations and biological studies†

Banafshe Askari,^a Hadi Amiri Rudbari,^{id} *^a Nicola Micale,^{id} *^b Tanja Schirmeister,^{id} ^c Thomas Efferth,^{id} ^d Ean-Jeong Seo,^d Giuseppe Bruno^b and Kevin Schwickert^c

Four Ru–Pd heterobimetallic complexes, each one in two different coordination modes (NNSS and NS) having metals connected by a binucleating dialkyldithiooxamidate [N(R)SC–CS(R)N] [R = methyl, ethyl, *n*-butyl and isopropyl], were prepared by reacting the monochelate [(triⁿpropyl-phosphine)CIPd (HR₂C₂N₂S₂ κ-S,S-Pd)] with [(η⁶-*p*-cymene)RuCl₂]. Furthermore, two palladium homobimetallic complexes having two (triⁿpropyl-phosphine)CIPd moieties joined by a diethyldithiooxamidate in both κ-N,S Pd, κ-N',S' Pd' and κ-N,N' Pd, κ-S,S' Pd' coordination modes were synthesized. For both kinds of complexes, homo- and heterobimetallic, at room temperature and in chloroform solution, the NNSS coordination mode (kinetic compounds) turns out to be unstable and therefore the resulting complexes rearrange into a thermodynamically more stable form (NS coordination mode). The crystal structures of [(triⁿpropyl-phosphine)CIPd]₂[μ-(ethyl)₂-DTO κ-N,S Pd, κ-N',S' Pd'] (**2**) and [(η⁶-*p*-cymene)ClRu][μ-(methyl)₂-DTO κ-N,S Ru, κ-N,S Pd] [(triⁿpropyl-phosphine)CIPd] (**1c**) were determined by solid state X-ray crystallography. Moreover, the higher stability of the thermodynamic species in the heterobimetallic complexes (Ru–Pd) was evaluated by means of computational studies in accordance with the maximum hardness principle. All stable NS complexes (*i.e.* **1c–4c**, **2** and the previously reported homobimetallic Ru complex **3**) were tested against two leukemia cell lines, namely the drug-sensitive CCRF-CEM cell line and its multidrug-resistant sub-cell line CEM/ADR5000 showing anti-proliferative activity in the low micromolar range (~1–5 μM) and micromolar range (~10–25 μM), respectively. In addition, these complexes efficaciously block at least two out of the three proteolytic activities of the tumor target 20S proteasome, with heterobimetallic complex **3c** and homobimetallic complex **3** possessing the best inhibitory profile.

Received 4th June 2019,
Accepted 24th September 2019
DOI: 10.1039/c9dt02353d

rsc.li/dalton

Introduction

Chemotherapy based on transition metals plays a key role in cancer treatment. *cis*-Diamminedichloridoplatinum(II) (cisplatin) was the first clinically successful metal complex that was used as an anticancer drug. Cisplatin as well as various other

Pt(II)-based analogues bind to cellular DNA, halt replication and induce apoptosis.¹ However, these compounds have several drawbacks, such as limited solubility,² severely dose-limiting side effects (*e.g.* nausea, neurotoxicity and nephrotoxicity),³ and intrinsic or acquired resistance in some cancer types.⁴

Among the other transition metals (the so-called “platinum group”, *i.e.* rhodium, copper, palladium, ruthenium, gold, titanium, and iron),⁵ ruthenium turns out to be the most promising candidate for replacing platinum in future cancer therapy. Ruthenium has a low systemic toxicity, and most Ru(II) and Ru(III) complexes exhibit slow ligand exchange kinetics, similar to those of platinum(II) complexes, which seems to be essential for anticancer activity. Moreover, ruthenium better accumulates in cancer cells than platinum due to its similarity with iron and the consequent use of the transferrin-receptor system for internalization.⁶

Over the past few decades, several ruthenium (Ru(II) and Ru(III)) complexes were developed and studied for their anti-

^aDepartment of Chemistry, University of Isfahan, Isfahan 81746-73441, Iran.
E-mail: h.a.rudbari@sci.ui.ac.ir, hamiri1358@gmail.com

^bDepartment of Chemical, Biological, Pharmaceutical and Environmental Sciences, University of Messina, Viale Ferdinando Stagno D'Alcontres 31, I-98166 Messina, Italy. E-mail: nmicale@unime.it

^cInstitute of Pharmacy and Biochemistry, Johannes Gutenberg-University, Staudingerweg 5, 55128 Mainz, Germany

^dDepartment of Pharmaceutical Biology, Institute of Pharmacy and Biochemistry, Johannes Gutenberg-University, Staudingerweg 5, 55128 Mainz, Germany

†Electronic supplementary information (ESI) available. CCDC 1920565 and 1920566. For ESI and crystallographic data in CIF or other electronic format see DOI: 10.1039/C9DT02353D

proliferative activities against various tumor models, but a real breakthrough came from the discovery of NAMI-A⁷ and KP1019⁸ ruthenium compounds, which are now in clinical trials. Although these two Ru(III)-based complexes are structurally related, they have different cytotoxic profiles towards tumor cells. NAMI-A is currently classified as a potential anticancer drug with negligible effects on primary tumors, but a pronounced ability to affect metastases, whereas KP1019 is mainly considered a cytotoxic drug for the treatment of platinum-resistant colorectal cancers.⁹ In this context, organometallic Ru-arene complexes have recently attracted increasing attention.¹⁰ In particular, RAPTA-type¹¹ and RAED-type¹² compounds are the most intensively investigated organoruthenium complexes for the development of potential drugs. They are effective against resistant tumors and for some of them phase I and II clinical trials have been already completed.

To date, various strategies and new approaches have been employed to improve the physicochemical and biological properties of metal complexes. One of them entails the development of multinuclear complexes, either homo- or heterometallic, with the heterometallic types being considered worthy of more attention. The assumption is that the incorporation of two or more different cytotoxic metals in the same complex might increase the biological activity of itself as an antitumor agent due to the possible interaction with multiple targets or improve the chemico-physical properties of the resulting heterometallic compound. A number of different heterobimetallic complexes, such as Ti(IV)-Pd(II),¹³ Ti(IV)-Au(I),^{13,14} Ti(IV)-Pt(II),¹³ Re(I)-Au(I),¹⁵ Eu(III)-Pt(II),¹⁶ Fe(II)-Au(III),¹⁷ Fe(II)-Pd(II),¹⁷ Fe(II)-Au(I),¹⁸ Cu(II)-Au(I)¹⁹ and Pt(II)-Au(I)²⁰ compounds have been developed and biologically investigated. Regarding the ruthenium-containing compounds, heterobinuclear complexes such as Ru(II)-Fe(II),²¹ Ru(II)-Au(I),²² Ru(II)-Ti(IV),²³ Ru(III)-Pt(II),²⁴ Ru(II)-Pt(IV),²⁵ Ru(II)-Pt(II)²⁶ and Ru(II)-Ir(III)²⁷ showed a variety of significant biological effects. For example, ruthenium-gold and ruthenium-platinum species possess cytotoxicity comparable to that of cisplatin towards HeLa cells^{22f} and a ruthenium(II)-platinum(IV) prodrug with high cytotoxicity against cisplatin-resistant cells also inhibited cell migration.²⁵

However, up to now, there are no reports wherein both ruthenium and palladium have been incorporated into the same complex, which has been eventually investigated for its anticancer activity. Pd(II) received much attention as an alternative to platinum in search of new cisplatin analogues for antitumor treatment. Pd(II) displays many chemical similarities to Pt(II) from many points of view. However, a significant difference between them is represented by the high kinetic lability of Pd(II) complexes compared to that of Pt(II) complexes. Moreover, Pd(II) complexes are usually more water-soluble than Pt(II) complexes, a fact that makes Pd(II) complexes more attractive in the context of drug design of metal-based compounds.

According to the above issues, we herein report the biological investigation of homobimetallic Pd-Pd (2) and Ru-Ru (3) complexes and the comparison with their heterobimetallic

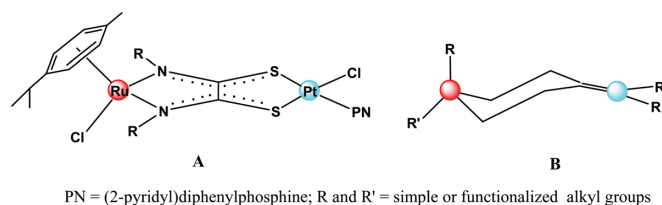
Ru-Pd (1c-4c) analogues, all in their NS stable forms. Specifically, these complexes were first evaluated for their anti-proliferative activity against the drug-sensitive CCRF-CEM leukemia cell line and its multidrug-resistant P-glycoprotein-over-expressing sub-cell line CEM/ADR5000. Afterwards, compounds, which showed notable cytotoxicity against the selected tumor cell lines, were investigated for one of the most appealing and highly relevant intracellular targets within the anticancer drug discovery, *i.e.* the human 20S proteasome. It is now well established that this enzyme represents the most abundant and ubiquitous multi-catalytic complex that plays a key role in many regulatory pathways, including proliferation and apoptosis. Cancer cells are more sensitive to proteasome inhibition than normal cells, as unusual high levels of activity of this enzyme have been detected in several different types of cancer, likely to provide protection against apoptosis and to prevent accumulation of incompatible regulatory proteins. Beyond that, it is also well-known that proteasome inhibition further increases the oxidative stress present in cancer cells caused by their uncontrolled proliferation.²⁸

Results and discussion

Synthesis, stereochemistry and NMR studies

Lanza *et al.* have already reported a heterobimetallic complex, in which a *C_s* symmetric [ruthenium(II)(η⁶-*p*-cymene)Cl]⁺ fragment is linked to a [Pt(phosphine)Cl]⁺ moiety through a secondary dithiooxamidate dianion in the κ-N,N Ru κ-S,S Pt coordination mode (Chart 1A).²⁹ The referred bimetallic complex is asymmetric albeit devoid of chiral centers. Actually, in the aforementioned bimetallic compound both metals are stereocenters wherein the permutation of ligands in any one of them gives rise to the same enantiomer. This happens because the source of asymmetry in this compound is the chiral axis passing through the two metals. This 'bimetallic' chiral axis closely resembles that long since envisaged in alkylidene-cycloalkanes (Chart 1B).

In Ru-Pt complexes like those depicted in Chart 1, the topological array reached by the binucleating ligand is indefinitely stable because of highly favourable interactions of soft sulphur donors with soft platinum, as well as of hard nitrogen donors with quite hard ruthenium. However, we have already observed that the hard-soft character of both coordinated metals and ligand donor sites, as well as the bulkiness of alkyl substituents, can direct a secondary dithiooxamide toward κ-N,N' M, κ-S,S' M' or κ-N,S M, κ-N',S' M' binucleation mode either during the formation of bimetallic compounds,^{30,31} or during the spontaneous change in solution of the less stable isomeric form κ-N,N' M, κ-S,S' M' into the more stable form κ-N,S M, κ-N',S' M'.³² From this point of view, a secondary dithiooxamide, which is constituted of two (R)NCS⁻ fragments connected to each other through a C-C single bond, could play the same role of the ambient NCS⁻ ligand in the formation of polymeric assemblies. This was widely exploited for testing



PN = (2-pyridyl)diphenylphosphine; R and R' = simple or functionalized alkyl groups

Chart 1 Asymmetry of the heterobimetallic Ru–Pt complex obtained by Lanza *et al.*²⁹

the local HSAB principle in the synthesis of metal complexes,³³ once the effect of R group was taken into account.

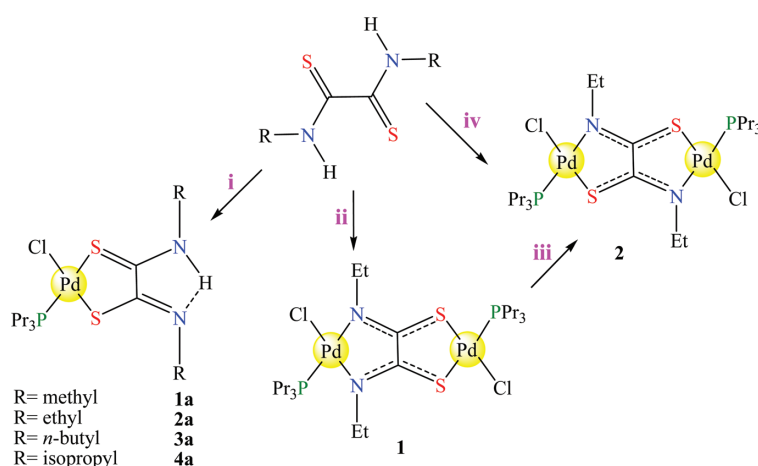
In this context, considering the importance of homo- and heterobimetallic complexes in chemotherapies, especially the above-mentioned ones with a Ru–arene motif, we sought to join a ruthenium(II)-*p*-cymene chloride frame to a palladium(II) trialkylphosphine chloride moiety through a bridging dithiooxamidate ligand, in the hope that the lower softness of the palladium could change the coordination mode of the binucleating ligand. The main interest of this design lies in the fact that a $[\text{Ru}(p\text{-cymene})\text{Cl}]^+$ fragment linked to a $[\text{Pd}(\text{phosphine})\text{Cl}]^+$ moiety through a secondary dithiooxamide in a $\kappa\text{-N,S Ru } \kappa\text{-N',S' Pd}$ binucleation mode should exhibit the two metals as stereocenters no more connected in a chiral axis, in such a way that one of them (ruthenium) should be a chiral center. Beyond that, the presence of the two selected metals should offer more and new perspectives in terms of biological activity.

The reaction of $\text{H}_2(\text{R})_2\text{DTO}$ (R: methyl, ethyl, butyl and isopropyl) with a half-molar quantity of $[\text{PdP}(\text{tri}^i\text{propyl})_3\text{Cl}_2]_2$ in the presence of sodium bicarbonate afforded $[(\text{H}(\text{R})_2\text{DTO } \kappa\text{-S, S Pd})\text{Pd}(\text{P}(\text{tri}^i\text{propyl})_3\text{Cl})]$ (R: methyl (**1a**), ethyl (**2a**), butyl (**3a**)

and isopropyl (**4a**)) metalloligands in high yields. As shown in Scheme 1, the symmetry of the ligand is broken, and the $^1\text{H-NMR}$ spectra of **1a–4a** exhibit two sets of signals for the alkyl substituents of dithiooxamide. For example, in **2a**, $\text{N-CH}_2\text{-CH}_3$ and $\text{N-CH}_2\text{-CH}_3$ proton signals appear as two quartets and two triplets, respectively (Fig. 1a).

The reaction of one mole of metalloligands, **1a–4a**, with a half-molar quantity of $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{RuCl}(\mu\text{-Cl})_2]$ in chloroform afforded ruthenium(II) and palladium(II) homo- and heterobimetallic complexes in both NS and NNSS coordination modes. Separation by column chromatography of the three different homo- and heterobimetallic complexes in each form (Scheme S1†) was very easy due to the difference in their colors (Pd–Pd homobimetallic complexes in both NNSS and NS coordination modes: yellow; Ru–Pd heterobimetallic complexes in both NNSS and NS coordination modes: red; and Ru–Ru homobimetallic complexes in both NNSS and NS coordination modes: dark red).

Of the six different compounds, Ru–Pd complexes were obtained in good yields in both NNSS (**1b–4b**) and NS (**1c–4c**) coordination modes, whereas homobimetallic Pd–Pd and Ru–Ru complexes were obtained in low yields. For comparative



Scheme 1 Synthetic route of Pd complexes as mononuclear and binuclear compounds in NNSS and NS coordination modes. (i) $\text{tri}^i\text{propyl-phosphine palladium(II) chloride dimer}$, CHCl_3 , NaHCO_3 , r.t., 1 h; (ii) $\text{tri}^i\text{propyl-phosphine palladium(II) chloride dimer}$, CHCl_3 , NaHCO_3 , r.t., 0.5 h; (iii) Remaining compound in solution for 3 days, r.t.; (iv) $\text{tri}^i\text{propyl-phosphine palladium(II) chloride dimer}$, CHCl_3 , 50 °C, 24 h; see the synthesis details in the experimental part.

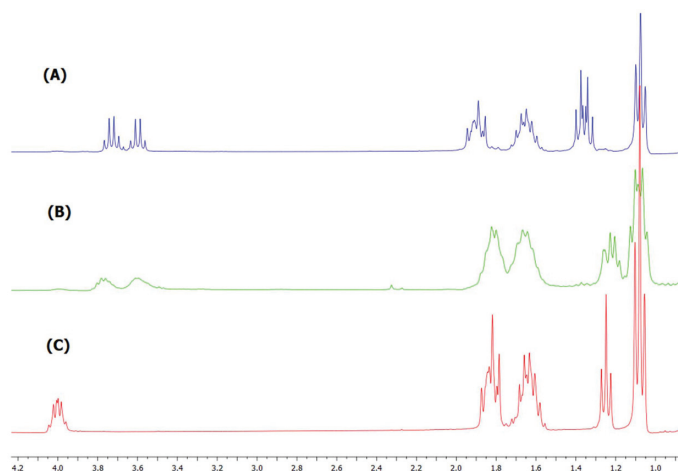


Fig. 1 Part of ^1H -NMR spectra of (A) complex (2a); (B) complex (1) and (C) complex (2).

biological assays, we synthesized the compound $[(\text{tri}^n\text{propylphosphine})\text{ClPd}]_2[\mu\text{-(ethyl)}_2\text{-DTO } \kappa\text{-N,S Pd, } \kappa\text{-N',S' Pd'} (2)$ by means of other procedures directly by the reaction of monomeric $\text{H}_2(\text{ethyl})_2\text{DTO}$ with $\text{tri}^n\text{propylphosphine palladium(II) chloride dimer}$.³² The reaction of $\text{H}_2(\text{ethyl})_2\text{DTO}$ with $\text{tri}^n\text{propylphosphine}$ in a 1 : 1 ratio performed in chloroform at 20 °C for 0.5 h gave dimers in high yield, where two $\text{tri}^n\text{propylphosphine palladium(II)}$ fragments were connected to each other by a binucleating dithiooxamidate frame in the NNSS coordination mode $[(\text{tri}^n\text{propylphosphine})\text{ClPd}]_2[\mu\text{-(ethyl)}_2\text{-DTO } \kappa\text{-N, N' Pd, } \kappa\text{-S,S' Pd'} (1)$ (Scheme 1), which in solution slowly changes into the corresponding $\kappa\text{-N,S Pd, } \kappa\text{-N',S' Pd'} (2)$ isomer presumably after breaking of the Pd–S bond in the $(\text{tri}^n\text{propylphosphine})\text{Cl (S}^{\wedge}\text{S)}$ frame (Scheme 1). This process shows a half-life of about 3 days at room temperature. Compound 2 can be also prepared directly by the reaction of $\text{H}_2(\text{ethyl})_2\text{DTO}$ with $\text{tri}^n\text{propylphosphine palladium(II) chloride dimer}$ in a 1 : 1 ratio at a higher temperature and for a longer time (50 °C, 24 h) in chloroform (Scheme 1).³²

As shown in Fig. 2, NNSS Pd–Pd compound (1) is not chiral and exists as a mixture of diastereomers in *cis* and *trans* configurations, established by the reciprocal position of the chloride ions or the two phosphines.

The coexistence of the two diastereomers in equimolar quantities in solution generally produces double signals in the

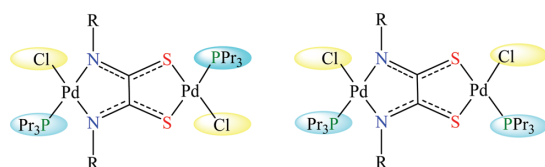


Fig. 2 Reciprocal position of the chloride ions or the two phosphines in $[(\text{tri}^n\text{propylphosphine})\text{ClPd}]_2[\mu\text{-(ethyl)}_2\text{-DTO } \kappa\text{-N,N' Pd, } \kappa\text{-S,S' Pd'} (1)$.

^1H -NMR spectrum at least for the $\text{N-CH}_2\text{-CH}_3$ protons, which allows us to distinguish the diastereomers from one another. Then, four sets of signals are expected for the $\text{N-CH}_2\text{-CH}_3$ protons of the two diastereomers. However, the ^1H -NMR spectrum of 1 displayed only two sets of signals for the $\text{N-CH}_2\text{-CH}_3$ protons, as shown in Fig. 1b. Also, the ^1H -NMR spectrum showed $\text{N-CH}_2\text{-CH}_3$ and $\text{P-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$ protons as two triplets instead of four triplets. Thus, it seems that the formation of only one diastereomer in the NNSS coordination mode is possible and the reaction is totally stereoselective. In any case, further studies of 1 for understanding the favorable structure were not possible due to the lack of stability in the solution and its conversion into the NS coordination mode. Nevertheless, such stereospecific structures with secondary chiral dithiooxamidates were observed by our group and Lanza's group during the synthesis of homo- and heterotrimetallic complexes.^{34,35}

The change in the coordination mode from NNSS to NS in homobimetallic complexes (1 to 2) was not surprising as it has already been observed in our previous work.³² This change is mainly ruled by the stability of thermodynamic compounds with respect to kinetic ones.³²

We expected the formation of two diastereomers after a change in the coordination mode from NNSS to NS (1 to 2) (Fig. 3). However, complex A shown in Fig. 3 was not obtained because of steric congestion due to the close proximity of the alkyl groups attached to phosphorous and nitrogen. The formation of structure B and the lack of formation of A were proved by X-ray analysis. Moreover, both ^1H - and ^{13}C -NMR spectra show resonances corresponding to the presence of structure B in solution. As shown in Fig. 3, structure B has C_i symmetry. As a result, the ^1H -NMR spectrum of 2 shows only one set of signals for each proton (Fig. 1c).

Heterobimetallic NNSS Ru–Pd complexes, 1b–4b, analogously to homobimetallic NNSS Pd–Pd and NNSS Ru–Ru complexes are unstable in solution. In these complexes, the

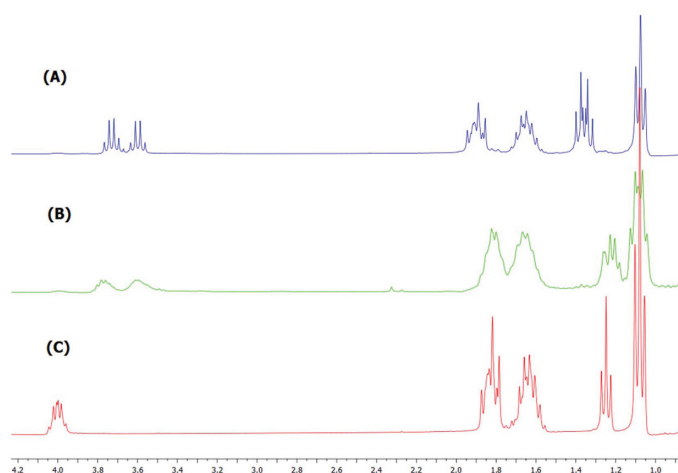


Fig. 1 Part of ^1H -NMR spectra of (A) complex (2a); (B) complex (1) and (C) complex (2).

biological assays, we synthesized the compound $[(\text{tri}^n\text{propylphosphine})\text{ClPd}]_2[\mu\text{-(ethyl)}_2\text{-DTO } \kappa\text{-N,S Pd, } \kappa\text{-N',S' Pd'} (2)$ by means of other procedures directly by the reaction of monomeric $\text{H}_2(\text{ethyl})_2\text{DTO}$ with $\text{tri}^n\text{propylphosphine palladium(II) chloride dimer}$.³² The reaction of $\text{H}_2(\text{ethyl})_2\text{DTO}$ with $\text{tri}^n\text{propylphosphine}$ in a 1 : 1 ratio performed in chloroform at 20 °C for 0.5 h gave dimers in high yield, where two $\text{tri}^n\text{propylphosphine palladium(II)}$ fragments were connected to each other by a binucleating dithiooxamidate frame in the NNSS coordination mode $[(\text{tri}^n\text{propylphosphine})\text{ClPd}]_2[\mu\text{-(ethyl)}_2\text{-DTO } \kappa\text{-N, N' Pd, } \kappa\text{-S,S' Pd'} (1)$ (Scheme 1), which in solution slowly changes into the corresponding $\kappa\text{-N,S Pd, } \kappa\text{-N',S' Pd' (2)$ isomer presumably after breaking of the Pd–S bond in the $(\text{tri}^n\text{propylphosphine})\text{Cl (S^*S)}$ frame (Scheme 1). This process shows a half-life of about 3 days at room temperature. Compound 2 can be also prepared directly by the reaction of $\text{H}_2(\text{ethyl})_2\text{DTO}$ with $\text{tri}^n\text{propylphosphine palladium(II) chloride dimer}$ in a 1 : 1 ratio at a higher temperature and for a longer time (50 °C, 24 h) in chloroform (Scheme 1).³²

As shown in Fig. 2, NNSS Pd–Pd compound (1) is not chiral and exists as a mixture of diastereomers in *cis* and *trans* configurations, established by the reciprocal position of the chloride ions or the two phosphines.

The coexistence of the two diastereomers in equimolar quantities in solution generally produces double signals in the

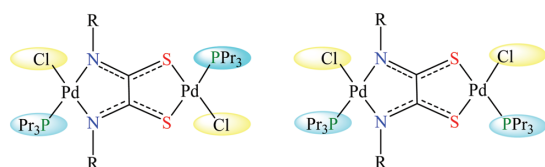


Fig. 2 Reciprocal position of the chloride ions or the two phosphines in $[(\text{tri}^n\text{propylphosphine})\text{ClPd}]_2[\mu\text{-(ethyl)}_2\text{-DTO } \kappa\text{-N,N' Pd, } \kappa\text{-S,S' Pd'} (1)$.

^1H -NMR spectrum at least for the $\text{N-CH}_2\text{-CH}_3$ protons, which allows us to distinguish the diastereomers from one another. Then, four sets of signals are expected for the $\text{N-CH}_2\text{-CH}_3$ protons of the two diastereomers. However, the ^1H -NMR spectrum of 1 displayed only two sets of signals for the $\text{N-CH}_2\text{-CH}_3$ protons, as shown in Fig. 1b. Also, the ^1H -NMR spectrum showed $\text{N-CH}_2\text{-CH}_3$ and $\text{P-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$ protons as two triplets instead of four triplets. Thus, it seems that the formation of only one diastereomer in the NNSS coordination mode is possible and the reaction is totally stereoselective. In any case, further studies of 1 for understanding the favorable structure were not possible due to the lack of stability in the solution and its conversion into the NS coordination mode. Nevertheless, such stereospecific structures with secondary chiral dithiooxamidates were observed by our group and Lanza's group during the synthesis of homo- and heterotrimetallic complexes.^{34,35}

The change in the coordination mode from NNSS to NS in homobimetallic complexes (1 to 2) was not surprising as it has already been observed in our previous work.³² This change is mainly ruled by the stability of thermodynamic compounds with respect to kinetic ones.³²

We expected the formation of two diastereomers after a change in the coordination mode from NNSS to NS (1 to 2) (Fig. 3). However, complex A shown in Fig. 3 was not obtained because of steric congestion due to the close proximity of the alkyl groups attached to phosphorous and nitrogen. The formation of structure B and the lack of formation of A were proved by X-ray analysis. Moreover, both ^1H - and ^{13}C -NMR spectra show resonances corresponding to the presence of structure B in solution. As shown in Fig. 3, structure B has C_i symmetry. As a result, the ^1H -NMR spectrum of 2 shows only one set of signals for each proton (Fig. 1c).

Heterobimetallic NNSS Ru–Pd complexes, 1b–4b, analogously to homobimetallic NNSS Pd–Pd and NNSS Ru–Ru complexes are unstable in solution. In these complexes, the

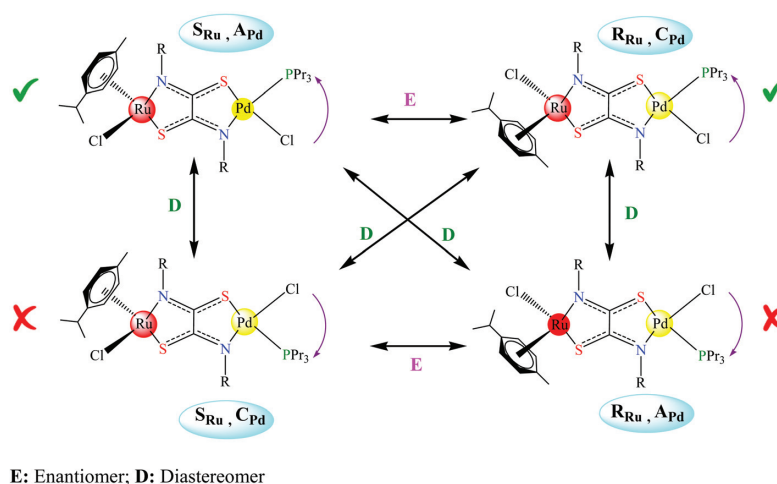


Chart 2 Stereoisomers of $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{ClRu}][\mu\text{-}(\text{R})_2\text{-DTO } \kappa\text{-N,S Ru, } \kappa\text{-N,S Pd}][(\text{tri}^i\text{propyl-phosphine})\text{ClPd}]$ (R: methyl (**1c**), ethyl (**2c**), isopropyl (**3c**) and butyl (**4c**)) with their stereochemical descriptors.

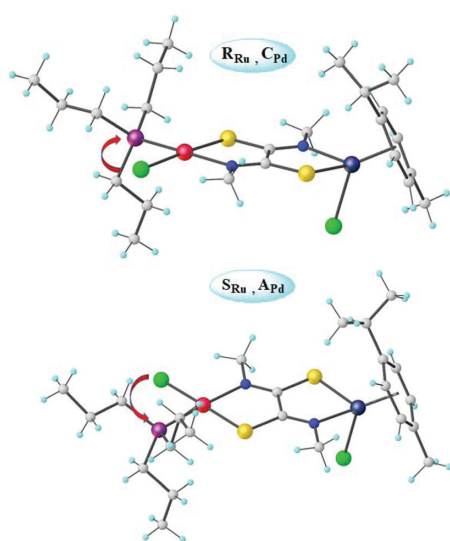


Fig. 6 Configuration of heterobimetallic Ru–Pd complexes in the NS coordination mode.

metry around the palladium center is distorted square-planar with the coordination of one phosphorus atom, one chlorine atom and one N,S-chelate DTO ligand.

The binucleating dithioxamide ligand shows the usual flat conformation generally observed in either NN,SS or NS, NS coordination mode.^{31,32,37} Its bond lengths (Table 2) are consistent with the single-bond character of the central C1–C1' bond and the π -electron delocalization in both NCS frames.

Molecular structure of **1c**

The structure of the typical complex **1c** was further confirmed by using the X-ray technique. The red crystals having appropriate X-ray diffraction quality were obtained from the chloroform solution by slow evaporation. A perspective view of the structure of this complex is shown in Fig. 9 and the crystallographic data and selected bond lengths and angles are listed in Tables 1 and 2, respectively. The complex crystallizes in a monoclinic system with the $P2_1/c$ space group and the asymmetric crystallographic unit contains one discrete molecule. It should be noted that the structure of **1c** is the first structure of a heterobimetallic complex with dithioxamide ligands in the NS coordination mode. All reported structures for dithioxamide ligands as homo- or heterobimetallic complexes are in the NSSS coordination mode. The coordination geometry around the palladium center is a distorted square-planar with the coordination of one phosphorus atom, one chlorine atom and one N,S-chelate DTO ligand. As shown in Fig. 9, Ru(II) is also surrounded by one chlorine atom, one nitrogen atom and one sulphur atom from the dithioxamide ligand and one of the *p*-cymene ring. The ruthenium centers have six-coordinate geometry assuming that the *p*-cymene ring serves as a three-coordinated ligand. By considering the $(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})$ ligand as a unique coordination site represented by the center of the benzene ring, the ruthenium geometry might be described as a significantly distorted tetrahedron, which is common for half-sandwich “piano-stool” structures. In this case, the tetrahedral Ru(II) center is surrounded by different groups. It is a chiral center and can exist in a pair of enantiomers. The Ru–C_{cym} bond lengths shift from 2.166(6) for C(19) to 2.244(6) Å for C(17) with an average value of 2.200 Å. The metal distance from the benzene center is 1.691 Å. The Ru–Cl, Ru–N and Ru–N distances (2.0617(15), 2.0617(15) and 2.0617(15) Å,

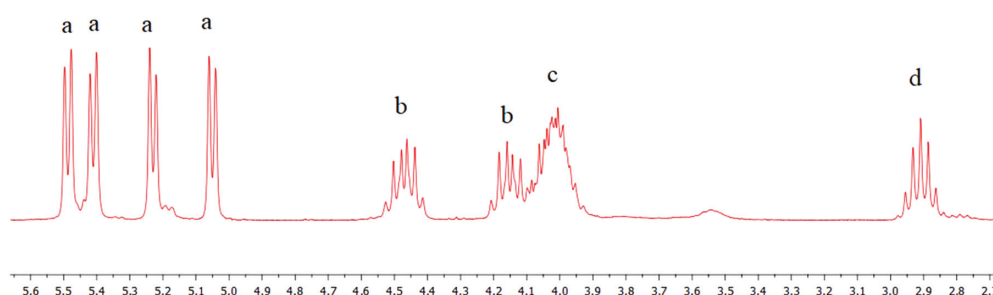


Fig. 7 Part of the $^1\text{H-NMR}$ spectrum of (**2c**). a = *p*-cymene protons; b = N- CH_2 protons (*cis* to P); c = N- CH_2 protons (*trans* to P); and d = $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ of *p*-cymene.

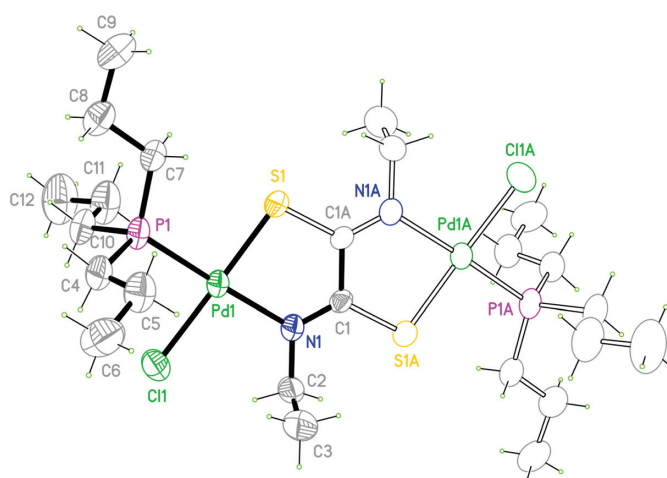


Fig. 8 Perspective view of compound **2** showing its asymmetric unit (filled drawings) with the numbering scheme and its centrosymmetric equivalent (empty drawings). Thermal ellipsoids are drawn at the 50% probability level, whereas the hydrogen size is arbitrary.

respectively) are comparable to those of previously reported ruthenium complex with dithiooxamide ligand.^{31,38}

The binucleating dithiooxamide ligand shows the flat conformation generally observed in either NN,SS or NS,NS coordination mode.^{29,31,32,39,40} The Ru atom is 0.116(1) Å out of the mean plane of the perfectly planar NSC-CSN fragment, toward Cl atom to minimize the hindrance with the ruthenium bonded *p*-cymene. The bond lengths of the dithiooxamide ligand are consistent with the single-bond character of the central C-C bond (C1-C2 = 1.40 Å) and the π -electron delocalization in both NCS frames (C1-N1 = 1.40 Å, C2-N2 = 1.40 Å, C1-S1 = 1.40 Å and C1-S2 = 1.40 Å). As mentioned above, the crystal packing is centrosymmetric, and therefore the crystallized compound is a racemic mixture of two enantiomers S_{Ru} , A_{Pd} and R_{Ru} , C_{Pd} (Fig. 10). As shown in Fig. 10, there is a pair of enantiomers in a unit cell.

Hirshfeld surface analysis

Hirshfeld surface (HS) analysis (including fingerprint plot) was performed for a better understanding of interactions involved

in the crystal packing of structures **2** and **1c**. Hirshfeld surfaces and their associated fingerprint plots for both complexes were calculated using CrystalExplorer 17.5 (see the Hirshfeld surface analysis part in the ESI†). FPs indicate that most of the contributions over the Hirshfeld surface are due to H...H contacts (82.5 and 72.9% for complexes **2** and **1c**, respectively) as the molecular surface is full of H atoms (Fig. S1-S4†).

Computational results

Theoretical calculations were made in order to understand the nature of the solid state conformation of compound **D** and the thermodynamic stability of all possible isomers (A-D depicted in Chart 3). It was found that the computed structural data for compound **D** are in agreement with the experimental data.

It is well known that the thermodynamic stability of metal-ligand interactions is principally governed by the chemical hardness principle (HSAB).⁴¹ The maximum hardness principle indicates the molecular stability, for the HSAB states that molecules arrange themselves to be as hard as possible.⁴²

Table 1 Crystallographic data for **2** and **1c**

	2	1c
Empirical formula	C ₂₄ H ₅₂ Cl ₂ N ₂ P ₂ Pd ₂ S ₂	C ₂₃ H ₄₁ Cl ₂ N ₂ PPdRuS ₂
Formula weight	778.43	719.04
Temperature (K)	298(2)	298(2)
Wavelength (Å)	0.71073	0.71073
Crystal system	Monoclinic	Monoclinic
Space group	<i>P</i> 2 ₁ / <i>n</i>	<i>P</i> 2 ₁ / <i>c</i>
Unit cell dimensions		
<i>a</i> (Å)	9.7730(17)	18.7688(17)
<i>b</i> (Å)	14.705(2)	8.7665(8)
<i>c</i> (Å)	11.9647(17)	18.4286(16)
α°		
β°	98.419(12)	91.410(7)
γ°		
Volume (Å ³)	1700.9(4)	3031.3(5)
<i>Z</i>	2	4
Calculated density (g cm ⁻³)	1.520	1.576
Absorption coefficient (mm ⁻¹)	1.447	1.473
<i>F</i> (000)	796	1456
θ range (°)	2.209–24.987	2.211–26.494
Limiting indices	–11 ≤ <i>h</i> ≤ 0 –17 ≤ <i>k</i> ≤ 0 –14 ≤ <i>l</i> ≤ 14	–23 ≤ <i>h</i> ≤ 23 –1 ≤ <i>k</i> ≤ 10 –1 ≤ <i>l</i> ≤ 23
Reflections collected/unique	3207/2991	7755/6252
Refinement method	[<i>R</i> _(int) = 0.0282]	[<i>R</i> _(int) = 0.0317]
Data/restraints/parameters	Full-matrix least-squares on <i>F</i> ²	Full-matrix least-squares on <i>F</i> ²
Goodness-of-fit on <i>F</i> ²	2991/0/158	6252/12/291
Final <i>R</i> indices [<i>I</i> > 2σ(<i>I</i>)]	0.862	1.009
<i>R</i> indices (all data)	<i>R</i> ₁ = 0.0329 <i>wR</i> ₂ = 0.0668	<i>R</i> ₁ = 0.0424 <i>wR</i> ₂ = 0.0781
Largest diff. peak and hole (e Å ⁻³)	<i>R</i> ₁ = 0.0504 <i>wR</i> ₂ = 0.0694	<i>R</i> ₁ = 0.0838 <i>wR</i> ₂ = 0.0936
CCDC number	0.532 and –0.385	0.545 and –0.389
	1920566	1920565

In Fig. 11 we report the optimized geometries, HOMO and LUMO molecular orbitals, together with energy differences (LUMO–HOMO) and the relative energies (in kcal) of the four isomers, the most stable isomer (B) assumed as zero. The selected structural parameters together with the corresponding experimental data of the D isomer are reported in Table S1.† In contrast to what the thermodynamic stability and the maximum hardness indicate, in the solid state we found that the D isomer differs by only 0.56 kcal from the B isomer.

All optimized geometries are reported in Fig. 11, arranged also by the chemical hardness η [$\eta = (\text{ELUMO} - \text{EHOMO})/2$]. In complexes A–D we found that the chemical hardness η range from 1.86 eV to 1.78 eV. The C isomer has a high value of η almost equal to the value of the D isomer and a decidedly lower thermodynamic stability as the difference in energy between the two isomers is 10.36 kcal. This difference depends on the *trans* effect of phosphine. As shown in Chart 3, the D and C isomers are both NS coordinated to the metal centers. In the D isomer the tripropylphosphine is in *trans* position with respect to the nitrogen atom. The *trans*

Table 2 Selected bond lengths (Å) and angles (°) for complexes **2** and **1c**

2		1c	
Pd(1)–N(1)	2.097(3)	Pd(1)–N(1)	2.082(4)
Pd(1)–P(1)	2.2531(12)	Pd(1)–P(1)	2.2477(14)
Pd(1)–S(1)	2.2649(12)	Pd(1)–S(2)	2.2625(13)
Pd(1)–Cl(1)	2.3299(12)	Pd(1)–Cl(1)	2.3158(15)
S(1)–C(1)	1.740(4)	Ru(1)–N(2)	2.095(4)
N(1)–C(1) ^{#1}	1.291(5)	Ru(1)–S(1)	2.3475(13)
C(1)–C(1) ^{#1}	1.484(7)	Ru(1)–Cl(2)	2.4183(16)
		Ru(1)–Xcy	1.691
N(1)–Pd(1)–P(1)	175.57(9)	S(1)–C(1)	1.719(5)
N(1)–Pd(1)–S(1)	83.95(9)	S(2)–C(2)	1.734(5)
P(1)–Pd(1)–S(1)	94.04(4)	N(1)–C(1)	1.290(6)
N(1)–Pd(1)–Cl(1)	95.99(9)	N(2)–C(2)	1.289(5)
P(1)–Pd(1)–Cl(1)	86.25(4)	C(1)–C(2)	1.485(6)
S(1)–Pd(1)–Cl(1)	176.53(5)		
C(1)–S(1)–Pd(1)	99.80(13)	N(1)–Pd(1)–P(1)	177.05(11)
C(1) ^{#1} –N(1)–Pd(1)	120.2(3)	N(1)–Pd(1)–S(2)	84.29(11)
C(1)–S(1)–Pd(1)	99.80(13)	P(1)–Pd(1)–S(2)	93.13(5)
		N(1)–Pd(1)–Cl(1)	94.48(11)
		P(1)–Pd(1)–Cl(1)	88.03(6)
		S(2)–Pd(1)–Cl(1)	177.00(7)
		N(2)–Ru(1)–C(19)	94.44(19)
		N(2)–Ru(1)–C(15)	150.22(19)
		N(2)–Ru(1)–S(1)	81.10(10)
		N(2)–Ru(1)–Cl(2)	83.58(12)
		S(1)–Ru(1)–Cl(2)	87.96(5)
		S(1)–Ru(1)–Xcy	127.10
		N(2)–Ru(1)–Xcy	133.07
		Cl(2)–Ru(1)–Xcy	127.69

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms for **2**: #1 –*x* + 2, –*y*, –*z* + 1.

effect of the groups can be directly observed from the dramatic calculated difference in the binding distances Pd(1)–P(1) which in the C isomer is 2.4346 Å and in B is 2.3674 Å, whereas between the B and D isomers a difference of only 0.008 Å is observed.

Biological activity

All NS complexes (*i.e.* **1c–4c**, **2** and **3**; Chart 4) were tested for their cytotoxicity effects against two leukemia cell lines, *i.e.* the drug-sensitive CCRF-CEM cell line and its multidrug-resistant sub-cell line CEM/ADR5000. The Ru-based compound **NAMI-A** was used as the positive control. All complexes underwent a preliminary screening (resazurin assay; Fig. 12) at 10 μM concentration using DMSO as a solvent. All tested compounds showed a remarkable anti-proliferative effect (85–100%) towards the drug-sensitive CCRF-CEM except Pd–Pd homobimetallic complex **2**. Complex **2** is the sole compound of this series that does not contain ruthenium, and showed approximately 30% inhibition and was actually screened at 5 μM concentration due to solubility issues. This first outcome can be taken as evidence for the importance of ruthenium for anti-cancer activity and its better biocompatibility with respect to other transition metals, as previously stated. The reference compound instead showed only negligible inhibition towards these leukemia cell lines (20% of CEM-ADR5000 and 15% of CCRF-CEM with 10 μM) (Fig. 12).

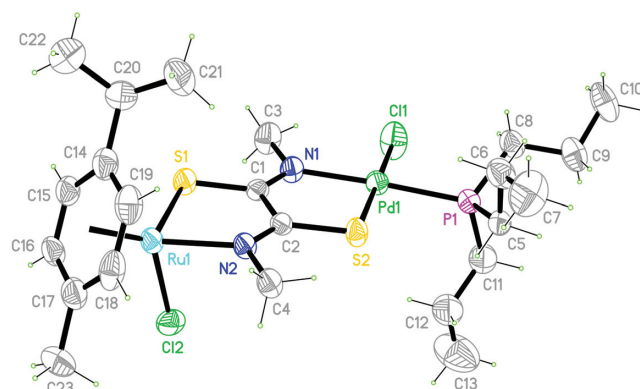


Fig. 9 Perspective view of compound **1c** showing its asymmetric unit with the numbering scheme. Thermal ellipsoids are drawn at the 50% probability level, whereas the hydrogen size is arbitrary.

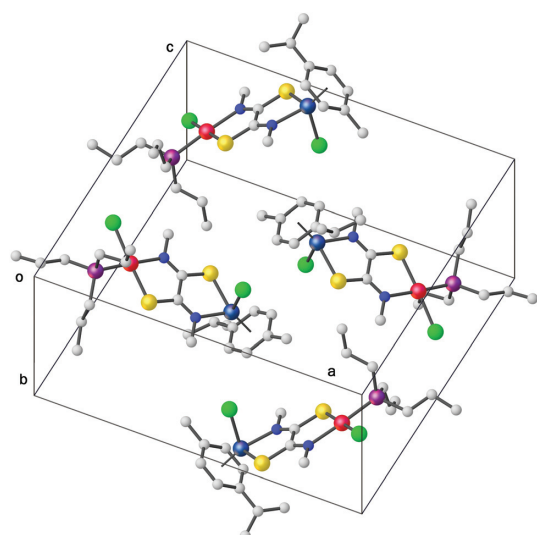


Fig. 10 Unit cell of **1c** showing the racemate mixture S_{Ru} , A_{Pd} and R_{Ru} , C_{Pd} .

More specifically, this preliminary screening underlined the importance of the Ru(II)-arene component [in this case, Ru(η^6 -*p*-cymene)] of the complex in determining the cytotoxic effects towards tumor cell lines in accordance with monometallic parent compounds of the RAPTA and RAED series. Much lower antiproliferative effects (25–35%) were detected towards the drug-resistant CEM/ADR5000 cell line for all binuclear complexes, whereas **NAMI-A** showed an anti-proliferative effect slightly superior (20%) compared to that detected towards CCRF-CEM cells. Therefore, the five complexes containing ruthenium, *i.e.* **1c–4c** and **3**, were selected for further testing (concentration–response curves; Fig. 13) and their IC_{50} values are given in Table 3 together with the degree of resistance.

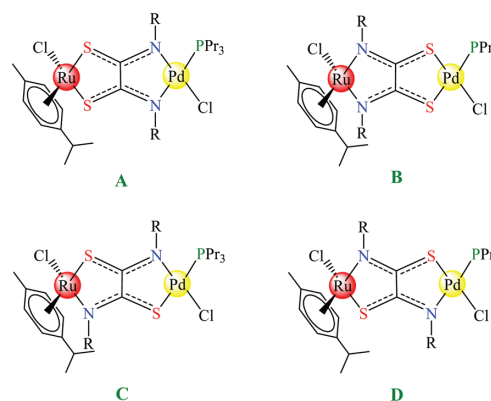


Chart 3 The four expected isomers in Ru–Pd heterobimetallic complexes.

All ruthenium complexes turned out to be highly cytotoxic to both CCRF-CEM cells and CEM/ADR5000 with IC_{50} values in the range of ~ 1 – $5 \mu M$ and ~ 10 – $25 \mu M$, respectively. They show low cross-resistances (3.52–13.38), which means they can efficiently target not only drug-sensitive but also drug-resistant cells. The detected trend of activity within the four heterobimetallic (Ru–Pd) complexes towards the drug-sensitive CCRF-CEM cells was **3c** > **1c** > **4c** > **2c** (Table 3), with unremarkable differences as expected due to the similarity of their chemical structures which differ only in the pattern of alkyl substitution at the nitrogen atoms of the bicyclic organic core. The IC_{50} value of homobimetallic (Ru–Ru) derivative **3** (*i.e.* $3.18 \mu M$) turned out to be intermediate among those of the heterobimetallic complexes indicating that the second [Ru(η^6 -*p*-cymene)]Cl⁺ fragment of the complex can be smoothly substituted with the [Pd(triⁿpropyl-phosphine)Cl]⁺ moiety to achieve anti-proliferative effects. The same trend of activity was detected towards the drug-resistant CEM/ADR5000 cells with

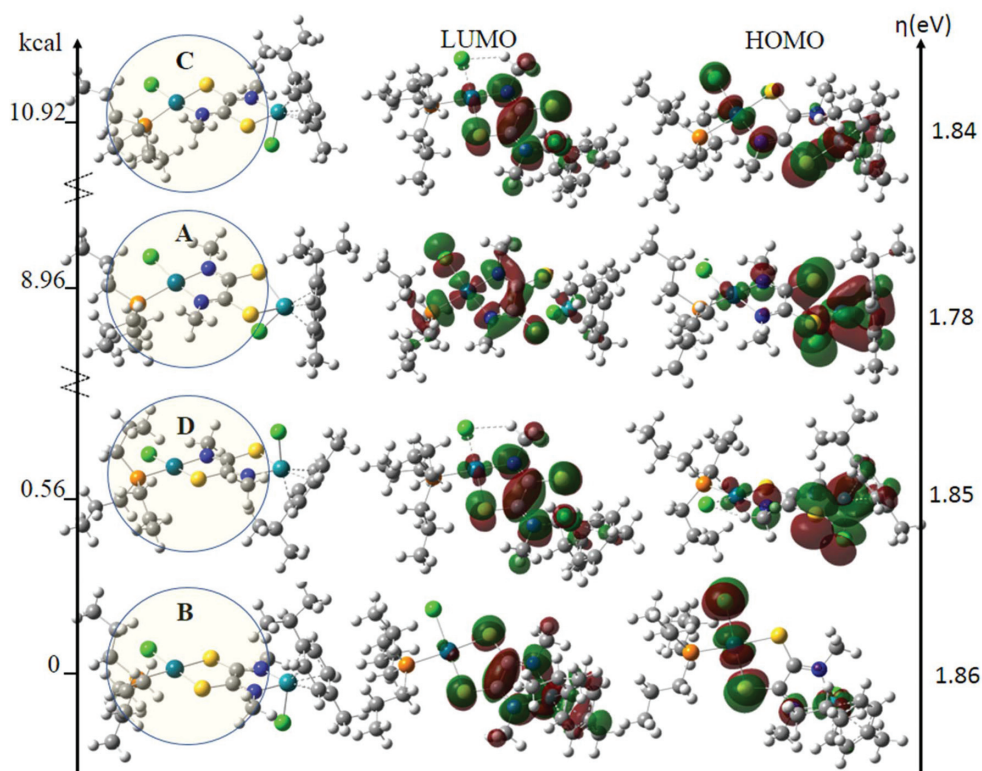


Fig. 11 Optimized molecular geometries of A–D isomers arranged by decreasing stability, corresponding LUMO and HOMO pictures and their computed chemical hardness.

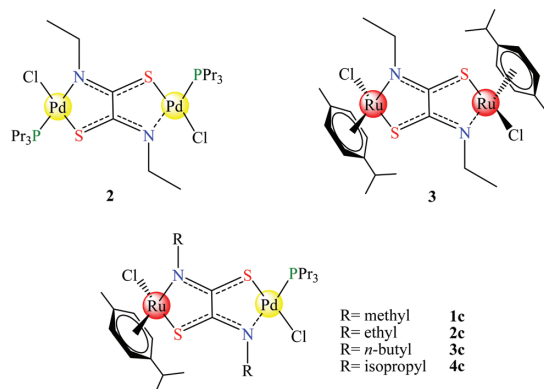


Chart 4 Homo- and heterobimetallic complexes in their NS stable form used for biological assays.

the exception of **3c** and **4c** that switched their positions in the sequence (Table 3). Since the IC_{50} values against the drug-sensitive CCRF-CEM leukemia cells are below $10 \mu\text{M}$, these complexes can be considered promising cytotoxic agents for the

treatment of this group of blood cancers. All ruthenium complexes (**1c–4c**) and homobimetallic (Ru–Ru) derivative **3** inhibited the human peripheral mononuclear cells (PMNCs) in the range of $0.2\text{--}1.1 \mu\text{M}$. **3c** showed a similar inhibition against CCRF-CEM cells and PMNCs. A myriad of other Ru(II)–arene complexes have been already synthesized and tested against several other types of tumor cell lines (mainly ovarian cancer cell lines such as A2780 and SKOV3, human lung cancer cell lines such as LCLC-103H and A549, and mouse mammary adenocarcinoma cell line such as TS/A). However, in most cases they are monometallic derivatives with the basic RAPTA or RAED structure and the recorded IC_{50} values are in the high micromolar range with only a few exceptions of activity in the low micromolar range.¹¹ Regarding the Ru(II)–heterobimetallic complexes, comparable IC_{50} values have been obtained only in the case of Ru(II)–Au(I) derivatives,^{22a,c,e} albeit not against leukemia cells. So, this is the first report dealing with Ru(II) and Pd(II) homo- and heterobimetallic complexes and their biological studies against leukemia cells. Moreover, to date there are no reports on homobimetallic Ru(II)–complexes related to anti-cancer activity.

Several computational and mechanistic studies have already demonstrated that at the intracellular level the DNA

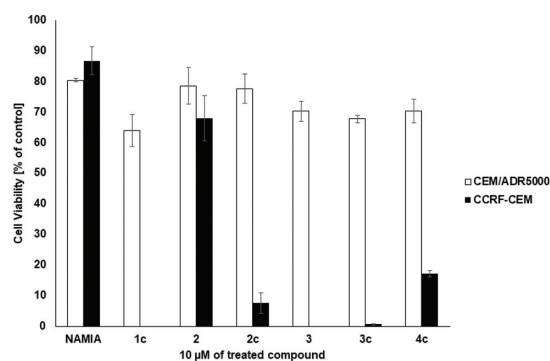


Fig. 12 Cytotoxic effects of NS complexes (*i.e.* 1c–4c, 2 and 3) and NAMI-A at 10 μM for 72 h, at 37 $^{\circ}\text{C}$ against two leukemia cell lines, *i.e.* the drug-sensitive CCRF-CEM cell line and its multidrug-resistant sub-cell line CEM/ADR5000.

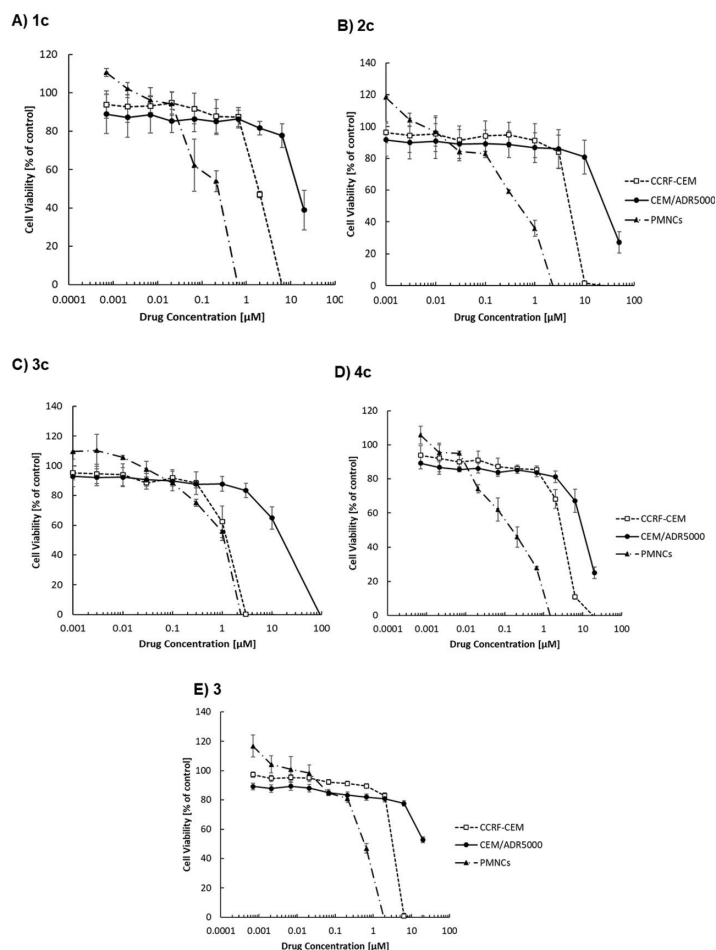


Fig. 13 Concentration–response curves of compounds 1c–4c and 3 towards PMNCs, CCRF-CEM and CEM/ADR5000 cells. Resazurin assays were performed three times at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 72 h.

Table 3 Cytotoxicity (IC₅₀ values) of compounds **1–4c** and **3** towards sensitive CCRF-CEM and multi-drug resistant CEM/ADR5000 leukemia cell lines

Compound	CCRF-CEM IC ₅₀ [μM]	CEM/ADR5000 IC ₅₀ [μM]	Degree of resistance ^a
1c	1.63 ± 0.38	15.10 ± 2.44	9.26
2c	4.91 ± 0.49	25.14 ± 4.77	5.12
3c	1.25 ± 0.21	16.71 ± 3.41	13.38
4c	2.88 ± 0.20	10.14 ± 1.39	3.52
3	3.18 ± 0.04	17.63 ± 2.19	5.54

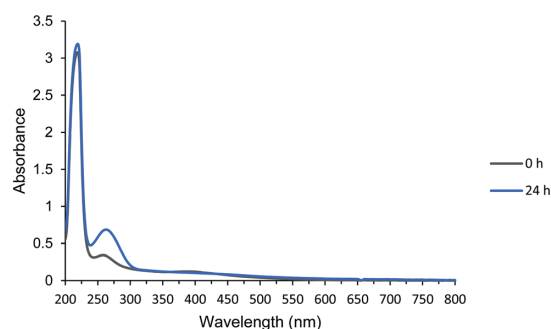
^a The degree of resistance was determined as the ratio of IC₅₀ value of multi-drug resistant CEM/ADR5000 cells to IC₅₀ value of sensitive CCRF-CEM.

represents the main target of Ru(II)-arene complexes for anticancer activity, with the Ru(II)-arene fragment playing a key role in the interaction (π -stacking) and distortion of DNA oligonucleotides. However, the relevant anti-proliferative activity shown by our Ru-containing complexes **1c–4c** and **3** against the drug-sensitive CCRF-CEM cells prompted us to further investigate these compounds for other potential intracellular targets. Therefore, they were screened at 10 μM concentration towards the three proteolytic activities of the human 20S proteasome, the main eukaryotic multicatalytic complex involved in the intracellular turnover of proteins, and one of the most exploited targets in anticancer drug design. Likewise to the cell-based assays, **NAMI-A** was used as the reference compound. As can be seen from the data reported in Table 4, these bimetallic complexes overall efficiently inhibit the activity of the enzyme. The best inhibitory profile for anticancer activity has been recorded for Ru–Pd heterobimetallic derivative **3c** and Ru–Ru homobimetallic derivative **3** since two out of the three proteolytic activities of the proteasome have been consistently inhibited (*i.e.* PGPH and ChT-L), whereas the third one (*i.e.* T-L) has been slightly affected (~28%). This observation arises from the fact that a substantial inhibition of all three catalytic subunits of the proteasome may result in cytotoxicity also to non-cancerous cells and that the co-inhibition of the β 5-subunit (the one which exerts the ChT-L activity, known as

Table 4 Screening at 10 μM of compounds **1c–4c**, **3** and **NAMI-A** for inhibition of the chymotrypsin-like (ChT-L), trypsin-like (T-L) and peptidyl-glutamyl peptide-hydrolyzing (PGPH) activities of human 20S proteasome. % of inhibition includes standard deviation from three independent experiments, each performed in duplicate

Compound	(% inhibition at 10 μM)		
	ChT-L	T-L	PGPH
1c	n.i. ^a	47 ± 0.5	55 ± 12
2c	n.i.	28 ± 6	62 ± 2.1
3c	53 ± 1.0	28 ± 5	88 ± 9
4c	22 ± 5	39 ± 1.6	n.i.
3	40 ± 6	28 ± 5	69 ± 4
NAMI-A	22 ± 3	n.i.	28 ± 1.3

^a n.i. = no inhibition.

**Fig. 14** UV-vis absorption spectra of a 10 μM solution of **3c** in 50 μM TRIS-buffer (pH 7.5, 0.03% SDS) after different incubation times.

the primary target) with a second catalytic subunit of the proteasome is essential for the achievement of good anticancer activity.⁴³ This ideal pattern of inhibition is also exerted by Ru–Pd heterobimetallic derivative **4c** and the reference compound **NAMI-A** though at a moderate level. Compounds **1c** and **2c** instead inhibited the other two catalytic subunits of the target (*i.e.* PGPH and T-L).

Analysis of the stability of complex **3c**

In order to investigate the stability of the Ru–Pd heterobimetallic complexes in a biological medium, a 10 μM solution of **3c** in 50 mM TRIS-buffer (pH = 7.5) containing 0.03% SDS was analyzed using UV-vis spectroscopy after incubation for 24 h at room temperature (Fig. 14). Over time, an increase in the absorption maximum at $\lambda = 258$ nm was observed, presumably due to the ligand exchange reaction of replacement of chlorine ions by water which has also been observed for similar complexes.⁴⁴ LC-MS analysis of the solution after incubation for 24 h support this hypothesis, as ions with masses of 769 ($[M - 2Cl^- + 2H_2O] + H^+$), 667 ($[M - (\eta^6-p\text{-cymene})] + H^+$), and 366 ($[M - 2Cl^-] + 2H^+$) m/z showing the characteristic isotopic pattern for Ru/Pd-containing compounds were detected (Fig. S5†).

Conclusion

In this study, four Ru–Pd heterobimetallic complexes in two different coordination modes (NNSS and NS), having metals connected by a binucleating dialkyldithiooxamidate $[N(R)SC-S(R)N]$ [$R = \text{methyl, ethyl, } n\text{-butyl and isopropyl}$], were prepared by reacting the monochelate $[(\text{tri}^n\text{propyl-phosphine})ClPd(HR_2C_2N_2S_2 \kappa\text{-S,S-Pd})]$ with $[(\eta^6-p\text{-cymene})RuCl_2]_2$. For the first time, similar to homobimetallic complexes, a change in the coordination mode from NNSS to NS in heterobimetallic complexes was observed because of the similarity of the hard-soft character of the two coordinated metals.

In addition, for comparative biological and structural studies, a palladium homobimetallic complex having two $(\text{tri}^n\text{propyl-phosphine})ClPd$ moieties joined by a diethyl-

dithiooxamidate in both κ -N,S Pd, κ -N',S' Pd' and κ -N,N' Pd, κ -S,S' Pd' coordination modes was synthesized.

Similar to heterobimetallic complexes and the reported Ru–Ru homobimetallic complexes, at room temperature and in chloroform solution, κ -N,N' Pd, κ -S,S' Pd' complex (kinetic compound) slowly changed into the corresponding κ -N,S Pd, κ -N',S' Pd' isomer (thermodynamic compound). All binuclear complexes in their stable NS form were tested for their anti-proliferative effects against two leukemia cell lines. The Ru-containing compounds showed activity in the low micromolar (\sim 1–5 μ M) and micromolar (\sim 10–25 μ M) ranges towards the drug-sensitive CCRF-CEM cell line and its multidrug-resistant sub-cell line CEM/ADR5000, respectively. The Pd–Pd binuclear complex instead didn't show any significant activity in the screening test and wasn't taken into account for further evaluations. This outcome underlines the key role of ruthenium in determining the biological activity for this class of compounds and the overall importance of Ru-based compounds in the future drug design of anticancer agents. Besides, the idea of joining ruthenium with a second metal such as palladium to afford complexes with a higher kinetic lability with respect to platinum-based complexes turned out to be successful. Moreover, in view of the intriguing profile of Ru-based compounds in terms of mode of action, in particular Ru–arene complexes, we explored this class of derivatives towards an alternative and topical target for anticancer therapy, namely the 20S proteasome. All the Ru-containing complexes efficaciously inhibited at least two out of the three proteolytic activities of the enzyme, with heterobimetallic complex **3c** and homobimetallic complex **3** showing the best inhibitory profile as they hinder the ChT-L activity of the target.

Experimental section

General

All chemicals were of standard reagent grade and were used without further purification. Column chromatography was conducted on aluminum oxide (activated, neutral, Brockman grade I).

^1H , ^{13}C and ^{31}P NMR spectra were recorded with a Bruker Avance 400 MHz Fourier-transform spectrometer. The methyl and isopropyl dithiooxamides (Me-DTO and isoPr-DTO)⁴⁵ and the starting complex $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{RuCl}_2]_2$ were prepared according to known procedures.⁴⁶ Ethyl and butyl dithiooxamides (Et-DTO and Bu-DTO) which are already known⁴⁵ were prepared according to the following improved procedure: $\text{H}_4\text{N}_2\text{C}_2\text{S}_2$ (1 g, 8.32 mmol) was suspended in 50 mL of water and six-fold excess (49.9 mmol) of the corresponding amine was added to the mixture. Upon stirring, yellow micro crystals of the product separated in a highly pure form. $[\text{Pd}(\text{tri}^i\text{propylphosphine})\text{Cl}_2]_2$ ⁴⁷ and homobimetallic Ru–Ru complex **3**³⁸ were prepared following published methods.

LC-MS analysis was performed using an HP Agilent 1100 Series HPLC coupled to an Agilent LC/MSD Ion Trap with 45% H_2O (+0.1% formic acid) and 55% MeCN at a flow rate of

0.6 mL min^{-1} as eluent. The following column was used: Agilent® Poroshell 120 EC-C18 (150 \times 2.10 mm/4 μ m pore size), and column temp.: 40 °C.

X-ray crystal structure determination of **2** and **1c**

Suitable X-ray quality orange crystals of both complexes were selected from those crystallized from chloroform/petroleum ether solutions of both **2** and **1c**. Data were collected at room temperature with a Bruker APEX II CCD area-detector diffractometer using a Mo-K α radiation source (λ = 0.71073 Å). Data collection, cell refinement, data reduction and absorption correction were performed by multi-scan methods using the Bruker software.⁴⁸ The structures were solved by direct methods using SIR2004.⁴⁹ The non-hydrogen atoms were refined anisotropically by the full-matrix least-squares method on F^2 using SHELXL.⁵⁰ All the H atoms were introduced in calculated positions and constrained to ride on their parent atoms. The crystallographic data for the complexes are reported in Table 1. The selected bond distances and angles are given in Table 2, while the molecular structures are shown in Fig. 8 and 9.

Theoretical calculations

All DFT calculations were performed by using the Gaussian 03 program package⁵¹ on i7 processor personal computer. Geometry optimizations were carried out at the DFT level. The effect of electron correlation on the molecular geometry was taken into account by using Becke's three-parameter hybrid, and the gradient corrected LeeYangeParr correlation functional (B3LYP)⁵² employing the quasi-relativistic effective core potential (RECP) SDD for all atoms and valence basis sets recommended by the Stuttgart group.⁵³ B3LYP and several other functionals such as CAM-B3LYP,⁵⁴ HSE1PBE,⁵⁵ PBEPBE,⁵² and TPSS⁵⁶ were used in conjunction with the standard basis sets (SDD) in order to test their ability to reproduce the experimental X-ray data. Gas phase minimum molecular geometries of A–D complexes, reported in Chart 3, were also optimized at various levels using several basis sets. All the tested functionals discreetly reproduce the experimental X-ray molecular geometries. Among those, PBE1PBE seems to be the best in simulating X-ray structural parameters in conjunction with SDD basis sets and AUTO fitting set. However, among the various functionals used B3LYP seems not to be able to well reproduce the RX data, and for this reason the corresponding data are not reported in Table S1.†

Hirshfeld surface analysis

Hirshfeld surface analyses were performed with CrystalExplorer (Version 17.5)⁵⁷ to further understand the relative contributions to intermolecular interactions by various molecular contacts in complexes **2** and **1c**. This program was also used for mapping 2D fingerprint plots 79–80 to help with evaluating the contribution of different intermolecular interactions present in a molecule in a crystalline environment.^{58,59}

General procedure for the preparation of mononuclear palladium complexes [(triⁿpropyl-phosphine)ClPd(HR₂C₂N₂S₂ κ-S,S-Pd)]
[R = methyl (1a), ethyl (2a), *n*-butyl (3a), and isopropyl (4a)]

A total of 1 mmol (675.13 mg) triⁿpropyl-phosphine palladium(II) chloride dimer was dissolved in chloroform (100 mL) and then reacted with 2 mol equiv. of the selected H₂R₂DTO species. The solution turned dark yellow and was left to stand for 1 h at room temperature. The resulting solutions were treated with sodium hydrogen carbonate (2 g). The mixtures soon turned light yellow and were left stirring for 10 min. Then sodium bicarbonate was removed by filtration and the solutions were concentrated to a small volume (10 mL). Afterwards, petroleum ether was added and the products were collected as yellow powders.

[(Triⁿpropyl-phosphine)ClPd(HR₂C₂N₂S₂ κ-S,S-Pd)] (H₂R₂C₂N₂S₂ = *N,N*-di-methyldithiooxamide) (1a). Yield: 89%. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 10.39 (s, 1H, NH), 3.47 and 3.32 (2d, 6H, N-CH₃, *J*_{HH} = 3.2 and 5.2 Hz), 1.90–1.56 (m, 12H, CH₃-CH₂-CH₂-P), 1.08 (t, 9H, CH₃-CH₂-CH₂-P, *J*_{HH} = 7.2 Hz). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 191.34 (s, CS), 39.19 (s, N-CH₃, *cis* to P), 32.57 (d, N-CH₃, *trans* to P, *J*_{PC} = 2.5 Hz), 25.37 (d, CH₃-CH₂-CH₂-P, *J*_{PC} = 27.9), 18.04 (d, CH₃-CH₂-CH₂-P, *J*_{PC} = 1.5 Hz), 15.95 (d, CH₃-CH₂-CH₂-P, *J*_{PC} = 14.7 Hz). ³¹P NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 21.18 ppm. Anal. calc. for C₁₃H₂₈N₂S₂ClPPd: C 34.75, H 6.28, N 6.23; Found: C 34.72, H 6.30, N 6.21.

[(Triⁿpropyl-phosphine)ClPd(HR₂C₂N₂S₂ κ-S,S-Pd)] (H₂R₂C₂N₂S₂ = *N,N*-di-ethylthiooxamide) (2a). Yield: 85%. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 3.73 and 3.60 (2q, 4H, N-CH₂, *J*_{HH} = 7.5 Hz), 1.96–1.83 (m, 6H, CH₃-CH₂-CH₂-P), 1.73–1.56 (m, 6H, CH₃-CH₂-CH₂-P), 1.37 and 1.34 (2t, 6H, N-CH₂-CH₃, *J*_{HH} = 7.5 Hz), 1.07 (t, 9H, CH₃-CH₂-CH₂-P, *J*_{HH} = 7.2 Hz). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 190.15 (d, CS, *J*_{PC} = 4.4 Hz), 46.28 (s, N-CH₂, *cis* to P), 40.62 (d, N-CH₂, *trans* to P, *J*_{PC} = 3.0 Hz), 25.38 (d, CH₃-CH₂-CH₂-P, *J*_{PC} = 27.9 Hz), 18.06 (d, CH₃-CH₂-CH₂-P, *J*_{PC} = 1.4 Hz), 16.00 (d, CH₃-CH₂-CH₂-P, *J*_{PC} = 14.7 Hz), 15.32 and 12.98 (2s, N-CH₂CH₃). ³¹P NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 20.36 ppm. Anal. calc. for C₁₅H₃₂N₂S₂ClPPd: C 37.74, H 6.76, N 5.87; Found: C 37.73, H 6.75, N 5.88.

[(Triⁿpropyl-phosphine)ClPd(HR₂C₂N₂S₂ κ-S,S-Pd)] (H₂R₂C₂N₂S₂ = *N,N*-di-*n*-butylthiooxamide) (3a). Yield: 84%. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 11.85 (s, NH), 3.64 and 3.57 (2t, 4H, N-CH₂, *J*_{HH} = 7.2 Hz), 2.11–1.63 (m, 16H, CH₃-CH₂-CH₂-P and N-CH₂-CH₂-), 1.45 (m, 4H, N-CH₂-CH₂-CH₂-), 0.98 (t, 9H, CH₃-CH₂-CH₂-P, *J*_{HH} = 7.2 Hz), 0.95 and 0.84 (2t, 6H, N-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃, *J*_{HH} = 7.2 Hz). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 184.56 (d, CS, *J*_{PC} = 3.0 Hz), 47.24 (N-CH₂-), 25.76 (N-CH₂-CH₂-), 25.86 (d, CH₃-CH₂-CH₂-P, *J*_{PC} = 28.4 Hz), 21.29 (N-CH₂-CH₂-CH₂-), 17.92 (d, CH₃-CH₂-CH₂-P, *J*_{PC} = 2.2 Hz), 15.36 (d, CH₃-CH₂-CH₂-P, *J*_{PC} = 14.7 Hz), 13.44 (N-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃). ³¹P NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 21.43 ppm. Anal. calc. for C₁₉H₄₀N₂S₂ClPPd: C 42.77, H 7.56, N 5.25; Found: C 42.79, H 7.54, N 5.25.

[(Triⁿpropyl-phosphine)ClPd(HR₂C₂N₂S₂ κ-S,S-Pd)] (H₂R₂C₂N₂S₂ = *N,N*-di-isopropylthiooxamide) (4a). Yield: 86%. ¹H NMR

(400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 4.37 and 4.14 (2sep, 2H, N-CH-(CH₃)₂), 1.86–1.73 (m, 6H, CH₃-CH₂-CH₂-P), 1.63–1.50 (m, 6H, CH₃-CH₂-CH₂-P), 1.27 and 1.13 (2d, 12H, N-CH-(CH₃)₂, *J*_{HH} = 6.4 Hz), 0.99 (t, 9H, CH₃-CH₂-CH₂-P, *J*_{HH} = 7.0 Hz). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 188.93 and 168.26 (2d, CS, *J*_{PC} = 3.6 Hz and *J*_{PC} = 11.9 Hz), 51.41 and 47.83 (N-CH-(CH₃)₂), 25.32 (d, CH₃-CH₂-CH₂-P, *J*_{PC} = 27.9 Hz), 22.51 and 21.18 (N-CH-(CH₃)₂), 18.04 (d, CH₃-CH₂-CH₂-P, *J*_{PC} = 1.3 Hz), 15.99 (d, CH₃-CH₂-CH₂-P, *J*_{PC} = 14.7 Hz). ³¹P NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 21.06 ppm. Anal. calc. for C₁₇H₃₆N₂S₂ClPPd: C 40.40, H 7.18, N 5.54; Found: C 40.39, H 7.19, N 5.55.

Procedure for the preparation of homobinuclear Pd complexes 1 and 2. 1 mmol (675.13 mg) triⁿpropyl-phosphine palladium(II) chloride dimer was dissolved in chloroform (100 mL) and reacted with 1 mmol (176.3 mg) ethyl dithiooxamide. The solution turned dark yellow and was left to stand for 0.5 h at room temperature. Then sodium hydrogen carbonate (2 g) was added and the yellow mixture was left stirring for 10 min. After removing sodium bicarbonate by filtration, the solution was concentrated to a small volume (*ca.* 10 mL) and compound 1 was collected by adding petroleum ether. To obtain compound 2, compound 1 was left in the solution for at least 3 days to change the coordination mode from κ-N,N' Pd, κ-S,S' Pd' to κ-N,N,S Pd.

[(Triⁿpropyl-phosphine)ClPd]₂[μ-(ethyl)₂-DTO κ-N,N' Pd, κ-S, S' Pd'] (1). Yield: 83%. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 3.77 and 3.60 (2m, 4H, N-CH₂), 1.90–1.75 (m, 12H, CH₃-CH₂-CH₂-P), 1.74–1.57 (m, 12H, CH₃-CH₂-CH₂-P), 1.23 and 1.20 (2t, 6H, N-CH₂-CH₃, *J*_{HH} = 7.2 and 7.2 Hz), 1.10 and 1.06 (2t, 18H, CH₃-CH₂-CH₂-P, *J*_{HH} = 7.2 and 6.9 Hz). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 197.42 and 197.38 (2d, CS, *J*_{PC} = 3.0 and *J*_{PC} = 2.8 Hz), 51.41 (1t, N-CH₂, *J*_{PC} = 2.9 Hz), 48.47 and 46.58 (2s, N-CH₂), 25.96, 25.73 and 24.94 (3d, CH₃-CH₂-CH₂-P, *J*_{PC} = 30.8, 28.8 and 26.9 Hz), 18.33 and 17.93 (2s, CH₃-CH₂-CH₂-P), 15.93 and 15.80 (d, CH₃-CH₂-CH₂-P, *J*_{PC} = 14.7 and 14.8 Hz), 12.92, 12.62 and 12.21 (3s, N-CH₂-CH₃). ³¹P NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 22.09 ppm. Anal. calc. for C₂₄H₅₂N₂S₂Cl₂P₂Pd₂: 37.03, H 6.73, N 3.60; Found: C 37.10, H 6.75, N 3.64.

[(Triⁿpropyl-phosphine)ClPd]₂[μ-(ethyl)₂-DTO κ-N,N,S Pd, κ-N', S' Pd'] (2). The complex was then crystallized from a chloroform solution to obtain crystals suitable for X-ray diffraction studies. Yield: 86%. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 4.00 (m, 4H, N-CH₂-CH₃), 1.89–1.76 (m, 12H, CH₃-CH₂-CH₂-P), 1.72–1.55 (m, 12H, CH₃-CH₂-CH₂-P), 1.25 (t, 6H, N-CH₂-CH₃, *J*_{HH} = 7.0 Hz), 1.08 (t, 18H, CH₃-CH₂-CH₂-P, *J*_{HH} = 7.0 Hz). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 190.20 and 190.14 (2d, CS, *J*_{PC} = 3.0 and *J*_{PC} = 3.2 Hz), 48.63 (s, N-CH₂CH₃), 26.04 (d, CH₃-CH₂-CH₂-P, *J*_{PC} = 30.8 Hz), 18.10 (d, CH₃-CH₂-CH₂-P, *J*_{PC} = 1.9 Hz), 15.95 (d, CH₃-CH₂-CH₂-P, *J*_{PC} = 14.9 Hz), 13.05 (s, N-CH₂CH₃).

³¹P NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 21.86 ppm. Anal. calc. for C₂₄H₅₂N₂S₂Cl₂P₂Pd₂: 37.03, H 6.73, N 3.60; Found: C 37.06, H 6.71, N 3.58.

General procedure for the preparation of heterobinuclear Ru–Pd complexes with κ -N,N' Ru, κ -S,S' Pd coordination mode (1b, 2b, 3b and 4b) and κ -N,S Ru, κ -N,S Pd coordination mode (1c, 2c, 3c and 4c)

All complexes were synthesized under identical reaction conditions. Therefore, only the synthesis of complexes with **1a** will be described in detail. A 1 mmol sample of **1a** was dissolved in about 10 mL of chloroform and reacted with a half molar quantity of $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{RuCl}_2]_2$ complexes. The solution, which turned deep red, was allowed to stand for 2 h at room temperature. Then, the solution was placed on an alumina column. By adding petroleum ether (~50 mL) as eluent, yellow homobimetallic complexes were eluted from the column. For removing heterobimetallic complexes from the column, a mixture of chloroform/methanol (9/1 v/v) was used as the eluent. Homo and heterobimetallic complexes were eluted from the alumina column according to the order shown in Scheme S1† with different colors.

$[(\eta^6\text{-}p\text{-Cymene})\text{ClRu}][\mu\text{-}(\text{methyl})_2\text{-DIO } \kappa\text{-N,N' Ru, } \kappa\text{-S,S' Pd}][(\text{tri}^i\text{propyl-phosphine})\text{ClPd}]$ (1b**). Yield: 85%. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 5.47, 5.43, 5.13 and 5.11 (4d, 4H, $\text{H}_{2,3,5,6}$ of cymene ring, $^3J_{\text{HH}} = 4.8$ Hz), 3.72 (d, 6H, N- CH_3), 2.72 (sl, 1H, CH, cymene), 2.22 (s, 3H, CH_3 , cymene), 1.75 (m, 6H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-P}$), 1.58 (m, 6H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-P}$), 1.20 (2d, 6H, CH(CH_3), cymene, $J = 6.76$ Hz), 1.01 (t, 9H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-P}$, $J_{\text{HH}} = 6.98$ Hz). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 106.08 and 97.41 (2s, $\text{C}_{1,4}$ of cymene ring), 90.23, 84.65, 79.55 and 77.73 (4s, $\text{C}_{2,3,5,6}$ of cymene ring), 52.19 and 45.25 (N- CH_3), 31.22 and 30.07 (cymene CH-(CH_3)), 26.34 and 26.13 (2d, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-P}$, $^1J_{\text{PC}} = 24.2$ Hz), 22.14, 21.95, 21.53 and 20.87 (4s, cymene CH-(CH_3)), 18.73 (s, cymene CH_3), 18.75 and 17.84 (2d, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-P}$, $^3J_{\text{PC}} = 1.8$ Hz), 17.05 and 16.22 (2d, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-P}$, $^2J_{\text{PC}} = 14.2$ Hz). $^{31}\text{P NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 16.80 ppm. Anal. calc. for $\text{C}_{23}\text{H}_{41}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{P}_2\text{Ru}_2\text{S}_2$: 38.42, H 5.75, N 3.90; Found: C 38.47, H 5.72, N 3.94.**

$[(\eta^6\text{-}p\text{-Cymene})\text{ClRu}][\mu\text{-}(\text{ethyl})_2\text{-DIO } \kappa\text{-N,N' Ru, } \kappa\text{-S,S' Pd}][(\text{tri}^i\text{propyl-phosphine})\text{ClPd}]$ (2b**). Yield: 87%. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 5.44 and 5.12 (2d, 4H, $\text{H}_{2,3,5,6}$ of cymene ring, $^3J_{\text{HH}} = 5.86$ and 6.60 Hz), 4.51 (m, 2H, N- CH_2CH_3 , *cis* to P), 3.96 (m, 2H, N- CH_2CH_3 , *trans* to P), 2.79 (seven lines, 1H, CH(CH_3), cymene, $^3J_{\text{HH}} = 6.78$ Hz), 2.28 (s, 3H, CH_3 , cymene), 1.80 (m, 6H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-P}$), 1.63 (m, 6H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-P}$), 1.46 and 1.42 (2t, 6H, N- CH_2CH_3 , $J = 7.14$ Hz), 1.22 (d, 6H, CH(CH_3), cymene, $J = 6.78$ Hz), 1.04 (t, 9H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-P}$, $J_{\text{HH}} = 6.96$ Hz). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 104.25 and 97.45 (2s, $\text{C}_{1,4}$ of cymene ring), 89.46, 85.71, 81.86 and 78.34 (4s, $\text{C}_{2,3,5,6}$ of cymene ring), 56.67 and 50.12 (2s, N- $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 32.78 and 31.05 (cymene CH-(CH_3)), 25.73 and 25.36 (2d, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-P}$, $^1J_{\text{PC}} = 26.4$ Hz), 24.04, 23.86, 23.47 and 22.73 (4s, cymene CH-(CH_3)), 18.45 (s, cymene CH_3), 18.86 and 17.95 (2d, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-P}$, $^3J_{\text{PC}} = 1.6$ Hz), 16.47 and 16.11 (2d, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-P}$, $^2J_{\text{PC}} = 12.4$ Hz), 12.68 and 12.27 (2s, N- $\text{CH}_2\text{-CH}_3$). $^{31}\text{P NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 16.21 ppm. Anal. calc. for $\text{C}_{25}\text{H}_{45}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{P}_2\text{Ru}_2\text{S}_2$: 40.19, H 6.07, N 3.75; Found: C 40.21, H 6.03, N 3.77.**

$[(\eta^6\text{-}p\text{-Cymene})\text{ClRu}][\mu\text{-}(\text{butyl})_2\text{-DIO } \kappa\text{-N,N' Ru, } \kappa\text{-S,S' Pd}][(\text{tri}^i\text{propyl-phosphine})\text{ClPd}]$ (3b**). Yield: 84%. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 5.52, 5.33, 5.08 and 4.97 (4d, 4H, $\text{H}_{2,3,5,6}$ of cymene ring, $^3J_{\text{HH}} = 3.8$ Hz), 4.25 and 3.94 (2m, 4H, N- CH_2), 2.75 (seven lines, 1H, CH(CH_3), cymene, $^3J_{\text{HH}} = 5.6$ Hz), 2.41 (s, 3H, CH_3 , cymene), 1.85–1.54 (m, 16H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-P}$ and N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 1.48 (m, 4H, N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 1.32 and 1.21 (2d, 6H, cymene CH-(CH_3)), $^3J_{\text{HH}} = 5.6$ Hz), 1.05 (t, 9H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-P}$, $J_{\text{HH}} = 5.8$ Hz), 1.02 and 0.97 (2t, 6H, N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$, $J_{\text{HH}} = 5.8$ Hz). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 105.74 and 95.36 (2s, $\text{C}_{1,4}$ of cymene ring), 86.76, 82.87, 79.84 and 75.61 (4s, $\text{C}_{2,3,5,6}$ of cymene ring), 66.31 and 57.66 (2s, N- $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 33.19 and 31.26 (cymene CH-(CH_3)), 29.81 and 29.25 (N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 26.95 and 26.57 (2d, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-P}$, $^1J_{\text{PC}} = 24.6$ Hz), 22.85, 22.46, 21.79 and 21.17 (4s, cymene CH-(CH_3)), 21.03 and 20.78 (2s, N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 18.73 (s, cymene CH_3), 18.88 and 18.13 (2d, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-P}$, $^3J_{\text{PC}} = 1.8$ Hz), 16.77 and 15.96 (2d, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-P}$, $^2J_{\text{PC}} = 12.4$ Hz). $^{31}\text{P NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 16.39 ppm. Anal. calc. for $\text{C}_{29}\text{H}_{53}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{P}_2\text{Ru}_2\text{S}_2$: C 43.36, H 6.65, N 3.49; Found: C 43.38, H 6.67, N 3.52.**

$[(\eta^6\text{-}p\text{-Cymene})\text{ClRu}][\mu\text{-}(\text{isopropyl})_2\text{-DIO } \kappa\text{-N,N' Ru, } \kappa\text{-S,S' Pd}][(\text{tri}^i\text{propyl-phosphine})\text{ClPd}]$ (4b**). Yield: 87%. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 5.57, 5.45, 5.26 and 5.11 (4d, 4H, $\text{H}_{2,3,5,6}$ of cymene ring, $^3J_{\text{HH}} = 4.6$ Hz), 4.87 and 4.59 (2m, 2H, N- $\text{CH}(\text{CH}_3)$), 2.78 (sep, 1H, CH(CH_3), cymene), 2.35 and 2.27 (2s, 3H, CH_3 , cymene), 1.88–1.55 (m, 12H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-P}$), 1.54–1.09 (6d, 18H, cymene CH-(CH_3) and N- $\text{CH}(\text{CH}_3)$), $^3J_{\text{HH}} = 5.6$ Hz), 1.04 (t, 9H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-P}$, $J_{\text{HH}} = 5.6$ Hz). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 103.16 and 95.66 (2s, $\text{C}_{1,4}$ of cymene ring), 87.36, 83.55, 78.76 and 76.69 (4s, $\text{C}_{2,3,5,6}$ of cymene ring), 56.17 and 50.23 (2s, N- $\text{CH}(\text{CH}_3)$), 32.12 and 30.45 (cymene CH-(CH_3)), 26.15 and 26.06 (2d, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-P}$, $^1J_{\text{PC}} = 24.6$ Hz), 23.14, 22.66, 21.83 and 21.47 (4s, cymene CH-(CH_3)), 21.35 and 20.27 (2s, N- $\text{CH}(\text{CH}_3)$), 18.24 (s, cymene CH_3), 18.15 and 17.94 (2d, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-P}$, $^3J_{\text{PC}} = 1.6$ Hz), 16.07 and 15.98 (2d, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-P}$, $^2J_{\text{PC}} = 12.2$ Hz). $^{31}\text{P NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 16.11 ppm. Anal. calc. for $\text{C}_{27}\text{H}_{49}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{P}_2\text{Ru}_2\text{S}_2$: 41.83, H 6.37, N 3.61; Found: C 41.85, H 6.39, N 3.58.**

$[(\eta^6\text{-}p\text{-Cymene})\text{ClRu}][\mu\text{-}(\text{methyl})_2\text{-DIO } \kappa\text{-N,S Ru, } \kappa\text{-N,S Pd}][(\text{tri}^i\text{propyl-phosphine})\text{ClPd}]$ (1c**). The complex was then crystallized from a chloroform solution to obtain crystals suitable for X-ray diffraction studies. Yield: 86%. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 5.47(d), 5.34(q), 5.11(d) (4H, $\text{H}_{2,3,5,6}$, cymene, $J = 4.8$ Hz), 3.81 (s, 3H, N- CH_3 , *cis* to P), 3.54 (d, 3H, N- CH_3 , *trans* to P, $J_{\text{H-P}} = 3.67$ Hz), 2.84 (sl, 1H, CH, cymene, $J = 6.98$ Hz), 2.22 (s, 3H, CH_3 , cymene), 1.78 (m, 6H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-P}$), 1.60 (m, 6H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-P}$), 1.27 and 1.17 (2d, 6H, CH(CH_3), cymene, $J = 6.8$ Hz), 1.01 (t, 9H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-P}$, $J = 6.4$ Hz). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 191.65 and 187.80 (2d, CS, $J_{\text{P-C}} = 3.52$ Hz and $J_{\text{P-C}} = 5.87$ Hz), 104.17 and 100.87 ($\text{C}_{1,4}$, cymene), 92.07, 86.49, 86.32, 81.76 and 81.37 ($\text{C}_{2,3,5,6}$, cymene), 50.79 and 41.48 (N- CH_3), 30.93 (CH, cymene), 25.91 (d, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-P}$, $^1J_{\text{P-C}} = 30.51$ Hz), 22.78 and 21.82 (CH(CH_3), cymene), 18.80 (CH_3 , cymene), 17.83 (d, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-P}$,**

$^3J_{P-C} = 2.34$ Hz), 15.74 (d, $CH_3-CH_2-CH_2-P$, $^2J_{P-C} = 14.08$ Hz). ^{31}P NMR (400 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 22.02 ppm. Anal. calc. for $C_{23}H_{41}Cl_2N_2PPdRuS_2$: 38.42, H 5.75, N 3.90; Found: C 38.39, H 5.76, N 3.92.

[[η^6 -*p*-Cymene]ClRu][μ -(ethyl) $_2$ -DTO κ -N,S Ru, κ -N,S Pd] [(tri n propyl-phosphine)ClPd] (2c). Yield: 85%. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 5.49, 5.41, 5.23 and 5.05 (4d, 4H, $H_{2,3,5,6}$, $J = 5.86$ Hz), 4.47 and 4.41 (2 m, 2H, N- CH_2CH_3 , *cis* to P), 4.01 (m, 2H, N- CH_2CH_3 , *trans* to P), 2.90 (seven lines, 1H, $CH(CH_3)_2$, cymene, $J = 6.8$ Hz), 2.27 (s, 3H, CH_3 , cymene), 1.78 (m, 6H, $CH_3-CH_2-CH_2-P$), 1.62 (m, 6H, $CH_3-CH_2-CH_2-P$), 1.51 and 1.22 (2t, 6H, N- CH_2CH_3 , $J = 7.2$ Hz), 1.29 and 1.19 (2d, 6H, $CH(CH_3)_2$, cymene, $J = 6.9$ Hz), 1.07 (t, 9H, $CH_3-CH_2-CH_2-P$, $J = 7.3$ Hz). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 104.73 and 101.17 (2s, $C_{1,4}$, cymene), 87.37, 85.51, 81.64 and 80.47 (4s, $C_{2,3,5,6}$, cymene), 58.81 and 48.52 (2s, N- CH_2-CH_3), 30.90 (s, CH , cymene), 25.94 (d, $CH_3-CH_2-CH_2-P$, $^1J_{P-C} = 30.4$ Hz), 22.88 and 21.68 (2s, $CH(CH_3)_2$, cymene), 18.80 (s, CH_3 , cymene), 17.88 (d, $CH_3-CH_2-CH_2-P$, $^2J_{P-C} = 2.0$ Hz), 15.75 (d, $CH_3-CH_2-CH_2-P$, $^3J_{P-C} = 14.9$ Hz), 12.76 and 12.34 (2s, N- CH_2-CH_3). ^{31}P NMR (400 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 20.94 ppm. Anal. calc. for $C_{25}H_{45}Cl_2N_2PPdRuS_2$: 40.19, H 6.07, N 3.75; Found: C 40.19, H 6.08, N 3.76.

[[η^6 -*p*-Cymene]ClRu][μ -(butyl) $_2$ -DTO κ -N,S Ru, κ -N,S Pd] [(tri n propyl-phosphine)ClPd] (3c). Yield: 84%. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 5.45, 5.36, 5.19 and 5.01 (4d, 4H, $H_{2,3,5,6}$ of cymene ring, $^3J_{HH} = 3.6$ Hz), 4.36 and 4.02 (2 m, 2H, N- CH_2 , *trans* to P), 3.98 and 3.89 (2 m, 2H, N- CH_2 , *cis* to P), 2.89 (seven lines, 1H, $CH(CH_3)_2$ cymene, $^3J_{HH} = 5.6$ Hz), 2.25 (s, 3H, CH_3 , cymene), 1.87–1.57 (m, 16H, $CH_3-CH_2-CH_2-P$ and N- CH_2-CH_2), 1.45 and 1.40 (2 m, 4H, N- $CH_2-CH_2-CH_2$), 1.28 and 1.18 (2d, 6H, cymene $CH-(CH_3)_2$, $^3J_{HH} = 5.6$ Hz), 1.02 (t, 9H, $CH_3-CH_2-CH_2-P$, $J_{HH} = 5.8$ Hz), 1.01 and 0.94 (2t, 6H, N- $CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$, $J_{HH} = 5.8$ Hz). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 190.72 and 188.40 (2d, CS, $^3J_{PC} = 2.4$ and $^3J_{PC} = 5.1$ Hz), 104.92 and 101.23 (2s, $C_{1,4}$ of cymene ring), 87.64, 85.62, 81.75 and 80.64 (4s, $C_{2,3,5,6}$ of cymene ring), 64.32 and 54.14 (2s, N- CH_2-CH_2), 31.08 (cymene $CH-(CH_3)_2$), 29.71 and 29.06 (N- CH_2-CH_2), 26.32 (d, $CH_3-CH_2-CH_2-P$, $^1J_{PC} = 24.3$ Hz), 23.07 and 21.82 (2s, cymene $CH-(CH_3)_2$), 21.12 and 20.75 (2s, N- $CH_2-CH_2-CH_2$), 18.97 (s, cymene CH_3), 18.15 (d, $CH_3-CH_2-CH_2-P$, $^3J_{PC} = 1.6$ Hz), 15.96 (d, $CH_3-CH_2-CH_2-P$, $^2J_{PC} = 12.0$ Hz), 14.27 and 14.08 (2s, N- $CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$). ^{31}P NMR (400 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 21.18 ppm. Anal. calc. for $C_{25}H_{53}Cl_2N_2PPdRuS_2$: C 43.36, H 6.65, N 3.49; Found: C 43.33, H 6.62, N 3.48.

[[η^6 -*p*-Cymene]ClRu][μ -(isopropyl) $_2$ -DTO κ -N,S Ru, κ -N,S Pd] [(tri n propyl-phosphine)ClPd] (4c). Yield: 86%. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 5.55, 5.50, 5.48, 5.31, 5.28 and 5.02 (6d, 4H, $H_{2,3,5,6}$ of cymene ring, $^3J_{HH} = 4.6$ Hz), 4.94, 4.82, 4.67 and 4.44 (4 m, 2H, N- $CH-(CH_3)_2$), 2.92 and 2.84 (2 m, 1H, $CH(CH_3)_2$ cymene), 2.34, 2.31 and 2.29 (3s, 3H, CH_3 , cymene), 1.90–1.57 (m, 12H, $CH_3-CH_2-CH_2-P$), 1.56–1.13 (8d, 18H, cymene $CH-(CH_3)_2$ and N- $CH-(CH_3)_2$, $^3J_{HH} = 5.6$ Hz), 1.06 (t, 9H, $CH_3-CH_2-CH_2-P$, $J_{HH} = 5.6$ Hz). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 102.26 and 96.16 (2s, $C_{1,4}$ of cymene ring),

88.64, 86.71, 83.89, 83.41, 79.16 and 78.08 (6s, $C_{2,3,5,6}$ of cymene ring), 58.07 and 49.71 (2s, N- $CH-(CH_3)_2$), 31.24 and 30.87 (cymene $CH-(CH_3)_2$), 25.88 and 25.75 (2d, $CH_3-CH_2-CH_2-P$, $^1J_{PC} = 24.8$ Hz), 23.35, 23.05, 22.54, 21.75, 21.57 and 21.30 (6s, cymene $CH-(CH_3)_2$), 21.02 and 20.50 (2s, N- $CH-(CH_3)_2$), 18.90 and 17.73 (2s, cymene CH_3), 18.12 and 17.98 (2d, $CH_3-CH_2-CH_2-P$, $^3J_{PC} = 1.6$ Hz), 15.98 and 15.97 (2d, $CH_3-CH_2-CH_2-P$, $^2J_{PC} = 11.8$ Hz). ^{31}P NMR (400 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 21.39 ppm. Anal. calc. for $C_{27}H_{49}Cl_2N_2PPdRuS_2$: 41.83, H 6.37, N 3.61; Found: C 41.80, H 6.34, N 3.59.

Cell culture

The drug-sensitive CCRF-CEM and multi-drug resistant (MDR) P-glycoprotein (P-gp)-over-expressing CEM/ADR5000 leukemic cells were kindly offered by Prof. Axel Sauerbrey (Department of Pediatrics, University of Jena, Germany). Cells were cultured in RPMA1640 medium including 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin ($1000 U mL^{-1}$)/streptomycin ($100 \mu g mL^{-1}$) (Life Technologies, Darmstadt, Germany). Doxorubicin ($5000 ng mL^{-1}$) was supplemented to maintain overexpression of P-gp (MDR1 and ABCB1) in CEM/ADR5000 cells.⁶⁰

The human peripheral mononuclear cells (PMNCs) were isolated by Histopaque® (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) from fresh blood samples of a healthy donor. Briefly, three mL of blood was layered onto three mL of Histopaque®. After centrifugation at 400g for 30 min, at 20 °C, the buffy coat interface including lymphocytes and other mononuclear cells was isolated into a new tube and washed with isotonic phosphate buffered saline several times. The obtained PMNCs were maintained in Panserin 413 medium (PAN-Biotech, Aidenbach, Germany) containing 2% phytohemagglutinin M (PHA-M, Life Technologies, Darmstadt, Germany).

Cytotoxicity assay

The cytotoxic effects of compounds **1c–4c** and **3** solubilized in DMSO were tested by using the resazurin assay.⁶¹ NAMI-A (Sigma-Aldrich, Milan, Italy) was employed as the reference compound, along with the control (untreated cells) and the solvent control (DMSO 0.1%). This assay is based on reduction of the indicator dye, resazurin, to highly fluorescent resorufin by viable cells. The aliquot of 10 000 cells per 100 μL cells was placed into 96-well plates and immediately treated with various concentrations of each compound. After 72 h of incubation at 37 °C, 20 μL of resazurin 0.01% w/v solution was added to each well, and the plates were maintained at 37 °C for 4 h. Fluorescence was measured using an Infinite M2000 Proplate reader (Tecan, Crailsheim, Germany) at an excitation wavelength of 544 nm and an emission wavelength of 590 nm. Each experiment was done at least three times with six replicates each. The viability was analyzed in comparison with the untreated cells. Fifty percent inhibition (IC_{50}) values indicate the drug concentrations required to inhibit 50% of cell proliferation and were calculated from a calibration curve by linear regression using Microsoft Excel.^{62,63}

In vitro 20S proteasome inhibition assays

The inhibitory properties of compounds **1c–4c** and **3** were tested by a standard fluorometric method. Human 20S proteasome was obtained from a commercial source (Biomol GmbH, Hamburg, Germany), as well as the peptidic substrates (Bachem, Bubendorf, Switzerland) Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC, Boc-Leu-Arg-Arg-AMC and Cbz-Leu-Leu-Glu-AMC for chymotrypsin-like (ChT-L), trypsin-like (T-L) and peptidylglutamyl peptide hydrolyzing-like (PGPH; also named caspase-like) activities of the enzyme, respectively. The three distinct proteolytic activities of the 20S proteasome were measured by monitoring the hydrolysis of the substrates by detecting the fluorescence of the common product released, 7-amino-4-methyl coumarin (7-AMC), by means of an Infinite 200 PRO microplate reader (Tecan, Männedorf, Switzerland) at 30 °C with a 380 nm excitation filter and a 460 nm emission filter. Compounds **1c–4c** and **3** were screened against the three proteolytic activities of the 20S proteasome at 10 μM concentrations using an equivalent amount of DMSO as a negative control and the Ru-based compound **NAMI-A** as the gold standard. Experimental protocols for the assays against each proteolytic activity of the 20S proteasome are already reported elsewhere.⁶⁴

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Research Council of the University of Isfahan (Iran) for financial support of this work. We would like to thank the Universities of Messina (Italy) and Mainz (Germany) for technical assistance in crystallography and biological tests.

References

- (a) B. A. Chabner and T. G. Roberts, *Nat. Rev. Cancer*, 2005, **5**, 65–72; (b) J. Bernier, E. J. Hall and A. Giaccia, *Nat. Rev. Cancer*, 2004, **4**, 737–747; (c) A. Casini, C. G. Hartinger, A. A. Nazarov and P. J. Dyson, *Top. Organomet. Chem.*, 2010, **32**, 57–80; (d) I. Kostova, *Curr. Med. Chem.*, 2006, **13**, 1085–1107; (e) E. Antonarakis and A. Emadi, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2010, **66**, 1–9; (f) E. Alessio, *Chem. Rev.*, 2004, **104**, 4203–4242; (g) A. M. Thayer, *Chem. Eng. News*, 2010, **88**, 24–28; (h) P. J. Dyson and G. Sava, *Dalton Trans.*, 2006, 1929–1933.
- Y. Wang, J. Zhou, L. Qiu, X. Wang, L. Chen, T. Liu and W. Di, *Biomaterials*, 2014, **35**, 4297–4309.
- (a) B. A. Chabner, C. J. Allegra, G. A. Curt and P. Calabresi, in *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, ed. J. G. Hardman, L. E. Limbird and A. G. Gilman, McGraw-Hill, New York, 9th Intern. edn, 1996; (b) P. J. Loehrer and L. H. Einhorn, *Ann. Intern. Med.*, 1984, **100**, 704–713; (c) L. Kelland, *Nat. Rev. Cancer*, 2007, **7**, 573–584.
- (a) E. R. Jamieson and S. J. Lippard, *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 2467–2498; (b) Y. Qu, H. Rauter, A. P. Soares Fontes, R. Bandarage, L. R. Kelland and N. Farrell, *J. Med. Chem.*, 2000, **43**, 3189–3192.
- (a) B. J. Pages, D. L. Ang, E. P. Wright and J. R. Aldrich-Wright, *Dalton Trans.*, 2015, **44**, 3505–3526; (b) P. Heffeter, U. Jungwirth, M. Jakupec, C. Hartinger, M. Galanski, L. Elbling, M. Micksche, B. Keppler and W. Berger, *Drug Resist. Updates*, 2008, **11**, 1–16; (c) C. G. Hartinger, M. A. Jakupec, S. Zorbas-Seifried, M. Groessl, A. Egger, W. Berger, H. Zorbas, P. J. Dyson and B. K. Keppler, *Chem. Biodiversity*, 2008, **5**, 2140–2155; (d) J. Maksimoska, L. Feng, K. Harms, C. Yi, J. Kissil, R. Marmorstein and E. Meggers, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 15764–15765; (e) M. Kelly, A. Dietrich and S. Gomez-Ruiz, *Organometallics*, 2008, **27**, 4917–4927; (f) T. S. Morais, A. Valente, A. I. Tomaz, F. Marques and M. H. Garcia, *Future Med. Chem.*, 2016, **8**, 527–544; (g) S. Thota, D. A. Rodrigues, D. C. Crans and E. J. Barreiro, *J. Med. Chem.*, 2018, **61**, 5805–5821; (h) S. Petanidis, E. Kioseoglou and A. Salifoglou, *Curr. Med. Chem.*, 2019, **26**, 607–623; (i) M. Zaki, S. Hairat and E. S. Aazam, *RSC Adv.*, 2019, **9**, 3239–3278; (j) N. Muhammad and Z. Gou, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2014, **19**, 144–153; (k) R. G. Kenny and C. J. Marmion, *Chem. Rev.*, 2019, **119**, 1058–1137; (l) A. Casini, C. G. Hartinger, C. Gabbiani, E. Mini, P. J. Dyson, B. K. Keppler and L. Messori, *Inorg. Biochem.*, 2008, **102**, 564–575; (m) M. J. Hannon, *Pure Appl. Chem.*, 2007, **79**, 2243–2261.
- L. Zeng, P. Gupta, Y. Chen, E. Wang, L. Ji, H. Chao and Z.-S. Chen, *Chem. Soc. Rev.*, 2017, **46**, 5771–5804.
- J. M. Rademaker-Lakhai, D. van den Bongard, D. Pluim, J. H. Beijnen and J. H. M. Schellens, *Clin. Cancer Res.*, 2004, **10**, 3717–3727.
- C. G. Hartinger, M. A. Jakupec, S. Zorbas-Seifried, M. Groessl, A. Egger, W. Berger, H. Zorbas, P. J. Dyson and B. K. Keppler, *Chem. Biodiversity*, 2008, **5**, 2140–2155.
- E. Alessio and L. Messori, *Met. Ions Life Sci.*, 2018, **18**, 141–170.
- (a) R. R. Kumar, R. Ramesh and J. G. Malecki, *J. Organomet. Chem.*, 2018, **862**, 95–104; (b) M. K. Mohamed Subarkhan, L. Ren, B. Xie, C. Chen, Y. Wang and H. Wang, *Eur. J. Med. Chem.*, 2019, **179**, 246–256; (c) M. Muralisankar, R. Dheepika, J. Haribabu, C. Balachandran, S. Aoki, N. S. P. Bhuvanesh and S. Nagarajan, *ACS Omega*, 2019, **4**, 11712–11723; (d) L. A. Hager, S. Mokesch, C. Kieler, S. Alonso-de Castro, D. Baier, A. Roller, W. Kandlioller, B. K. Keppler, W. Berger, L. Salassa and A. Terenzi, *Dalton Trans.*, 2019, **48**, 12040–12049; (e) O. Dömötör and É. A. Enyedy, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2019, **24**, 703–719.
- B. S. Murray, M. V. Babak, C. G. Hartinger and P. J. Dyson, *Coord. Chem. Rev.*, 2016, **306**, 86–114.

- 12 R. E. Aird, J. Cummings, A. A. Ritchie, M. Muir, R. E. Morris, H. Chen, P. J. Sadler and D. I. Jodrell, *Br. J. Cancer*, 2002, **86**, 1652–1657.
- 13 J. F. González-Pantoja, M. Stern, A. A. Jarzecki, E. Royo, E. Robles-Escajeda, A. Varela-Ramirez, R. J. Aguilera and M. Contel, *Inorg. Chem.*, 2011, **50**, 11099–11110.
- 14 (a) Y. F. Mui, J. Fernández-Gallardo, T. B. Elie, A. Gubran, I. Maluenda, M. Sanaú, O. Navarro and M. Contel, *Organometallics*, 2016, **35**, 1218–1227; (b) J. Fernández-Gallardo, B. T. Elie, T. Sadhukha, S. Prabha, M. Sanaú, S. A. Rotenberg, J. W. Ramos and M. Contel, *Chem. Sci.*, 2015, **6**, 5269–5283; (c) M. Wenzel, B. Bertrand, M.-J. Eymín, V. Comte, J. A. Harvey, P. Richard, M. Groessl, O. Zava, H. Amrouche, P. D. Harvey, P. Le Gendre, M. Picquet and A. Casini, *Inorg. Chem.*, 2011, **50**, 9472–9480; (d) J. Fernandez-Gallardo, B. T. Elie, F. Sulzmaier, M. Sanaú, J. W. Ramos and M. Contel, *Organometallics*, 2014, **33**, 6669–6681; (e) L. Boselli, M. Carraz, S. Mazerés, L. Paloque, G. Gonzalez, F. Benoit-Vical, A. Valentin, C. Hemmert and H. Gornitzka, *Organometallics*, 2015, **34**, 1046–1055.
- 15 (a) V. Fernandez-Moreira, I. Marzo and C. Gimeno, *Chem. Sci.*, 2014, **5**, 4434–4446; (b) A. Luengo, V. Fernández-Moreira, I. Marzo and M. C. Gimeno, *Inorg. Chem.*, 2017, **56**, 15159–15170; (c) A. Luengo, V. Fernández-Moreira, I. Marzo and M. C. Gimeno, *Organometallics*, 2018, **37**, 3993–4001.
- 16 H. Li, R. Lan, C.-F. Chan, L. Jiang, L. Dai, D. W. J. Kwong, M. H.-W. Lam and K.-L. Wong, *Chem. Commun.*, 2015, **51**, 14022–14025.
- 17 N. Lease, V. Vasilevski, M. Carreira, A. D. Almeida, M. Sanaú, P. Hirva, A. Casini and A. Contel, *J. Med. Chem.*, 2013, **56**, 5806–5818.
- 18 H. Goitia, Y. Nieto, M. D. Villacampa, C. Kasper, A. Laguna and M. C. Gimeno, *Organometallics*, 2013, **32**, 6069–6078.
- 19 B. Bertrand, A. Citta, I. L. Franken, M. Picquet, A. Folda, V. Scalcon, M. P. Rigobello, P. Le Gendre, A. Casini and E. Bodio, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2015, **20**, 1005–1020.
- 20 M. Wenzel, E. Bigaeva, P. Richard, P. Le Gendre, M. Picquet, A. Casini and E. Bodio, *J. Inorg. Biochem.*, 2014, **141**, 10–16.
- 21 P. Govender, H. Lemmerhirt, A. T. Hutton, B. Therrien, P. J. Bednarski and G. S. Smith, *Organometallics*, 2014, **33**, 5535–5545.
- 22 (a) M. Wenzel, A. D. Almeida, E. Bigaeva, P. Kavanagh, M. Picquet, P. L. Gendre, E. Bodio and A. Casini, *Inorg. Chem.*, 2016, **55**, 2544–2557; (b) L. K. Batchelor, D. Ortiz and P. J. Dyson, *Inorg. Chem.*, 2019, **58**, 2501–2513; (c) L. Boselli, M. Carraz, S. Mazerés, L. Paloque, G. Gonzalez, F. Benoit-Vical, A. Valentin, C. Hemmert and H. Gornitzka, *Organometallics*, 2015, **34**, 1046–1055; (d) B. Bertrand, A. Citta, I. L. Franken, M. Picquet, A. Folda, V. Scalcon, M. P. Rigobello, P. Le Gendre, A. Casini and E. Bodio, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2015, **20**, 1005–1020; (e) L. Massai, J. Fernandez-Gallardo, A. Guerri, A. Arcangeli, S. Pillozzi, M. Contel and L. Messori, *Dalton Trans.*, 2015, **44**, 11067–11076; (f) H. Bjelosevic, I. A. Guzei, L. C. Spencer, T. Persson, F. H. Kriel, R. Hewer, M. J. Nell, J. Gut, C. E. J. van Resburg, P. Rosenthal, J. Coates, J. Darkwa and S. K. C. Elmroth, *J. Organomet. Chem.*, 2012, **720**, 52–59.
- 23 F. Pelletier, V. Comte, M. Massard, M. Wenzel, S. Toulot, P. Richard, M. Picquet, P. Le Gendre, O. Zava, F. Edafe, A. Casini and P. J. Dyson, *J. Med. Chem.*, 2010, **53**, 6923–6933.
- 24 (a) C. M. Anderson, I. R. Taylor, M. F. Tibbetts, J. Philpott, Y. Hu, M. Joseph and J. M. Tanski, *Inorg. Chem.*, 2012, **51**, 12917–12924; (b) A. Herman, J. M. Tanski, M. F. Tibbetts and C. M. Anderson, *Inorg. Chem.*, 2008, **47**, 274–280.
- 25 L. Ma, R. Ma, Z. Wang, S.-M. Yiu and G. Zhu, *Chem. Commun.*, 2016, **52**, 10735–10738.
- 26 C. M. Anderson, I. R. Taylor, M. F. Tibbetts, J. Philpott, Y. Hu and J. M. Tanski, *Inorg. Chem.*, 2012, **51**, 12917–12924.
- 27 S. K. Tripathy, U. De, N. Dehury, S. Pal, H. S. Kim and S. Patra, *Dalton Trans.*, 2014, **43**, 14546–14549.
- 28 C. L. Soave, T. Guerin, J. Liu and Q. P. Dou, *Cancer Metastasis Rev.*, 2017, **36**, 717–736.
- 29 S. Lanza, G. Bruno, F. Nicolò and R. Scopelliti, *Tetrahedron: Asymmetry*, 1996, **7**, 3347–3350.
- 30 S. Lanza, A. Giannetto, G. Bruno, F. Nicolò and G. Tresoldi, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2009, 2647–2654.
- 31 S. Lanza, F. Nicolò, G. Cafeo, H. Amiri Rudbari and G. Bruno, *Inorg. Chem.*, 2010, **49**, 9236–9246.
- 32 S. Lanza, F. Nicolò, H. Amiri Rudbari, M. R. Plutino and G. Bruno, *Inorg. Chem.*, 2011, **50**, 11653–11666.
- 33 (a) R. G. Pearson, *Inorg. Chem.*, 1973, **12**, 712–713; (b) N. J. DeStefano and J. Burmeister, *Inorg. Chem.*, 1971, **10**, 998–1003; (c) J. L. Burmeister, *Coord. Chem. Rev.*, 1968, **3**, 225–245; (d) G. R. Clark and G. J. Palenik, *Inorg. Chem.*, 1970, **9**, 2754–2760; (e) A. Turco and C. Pecile, *Nature*, 1961, **191**, 66–67.
- 34 B. Askari, H. Amiri Rudbari, N. Micale, T. Schirmeister, A. Giannetto, S. Lanza, G. Bruno and V. Mirkhani, *Polyhedron*, 2019, **164**, 195–201.
- 35 S. Lanza, G. Bruno, F. Nicolò, G. Callipari and G. Tresoldi, *Inorg. Chem.*, 2003, **42**, 4545–4552.
- 36 P. K. Chattaraj, H. Lee and R. G. Parr, *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, **113**, 1855–1856.
- 37 G. Bruno, S. Lanza, F. Nicolò, G. Tresoldi and G. Rosace, *Acta Crystallogr., Sect. C: Cryst. Struct. Commun.*, 2002, **58**, m316–m318.
- 38 S. Lanza, G. Bruno, F. Nicolò, A. Rotondo and G. Tresoldi, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2002, 65–72.
- 39 G. Bruno, A. Sacca, S. Lanza, A. Giannetto and H. Amiri Rudbari, *Acta Crystallogr., Sect. E: Crystallogr. Commun.*, 2015, **E71**, m40–m41.
- 40 S. Lanza, G. Bruno, A. Rotondo, R. Scopelliti and E. Rotondo, *Organometallics*, 2000, **19**, 2462–2469.
- 41 R. G. Pearson, *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, **85**, 3533–3539.
- 42 (a) R. G. Pearson, *Acc. Chem. Res.*, 1993, **26**, 250–255; (b) R. G. Pearson, *J. Chem. Educ.*, 1999, **76**, 267–275.

- 43 A. F. Kisselev, A. Callard and A. L. Goldberg, *J. Biol. Chem.*, 2006, **281**, 8582–8590.
- 44 S. Parveen, F. Arjmand and S. Tabassum, *Eur. J. Med. Chem.*, 2019, **175**, 269–286.
- 45 R. N. Hurd, G. De La Mater, G. C. McElheny, R. J. Tuner and V. H. Wallingford, *J. Org. Chem.*, 1961, **26**, 3980–3987.
- 46 (a) M. A. Bennett and A. K. Smith, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1974, 233; (b) R. A. Zelonka and M. C. Baird, *Can. J. Chem.*, 1972, **50**, 3063–3072.
- 47 R. J. Goodfellow, P. L. Goggin and L. M. Venanzi, *J. Chem. Soc. A*, 1967, 1897–1900.
- 48 Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA, ©2005, COSMO (Version 1.60), SAINT (Version 7.06A), SADABS (Version 2.10).
- 49 M. C. Burla, R. Caliandro, M. Camalli, B. Carrozzini, G. L. Casciaro, L. De Caro, C. Giacovazzo, G. Polidori and R. Spagna, SIR2004, *J. Appl. Crystallogr.*, 2005, **38**, 381–388.
- 50 G. M. Sheldrick, *SHELXL97*, University of Göttingen, Germany, 1997.
- 51 M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski and D. J. Fox, *Gaussian 09, revision D.01*, Gaussian, Wallingford, CT, 2009.
- 52 A. Becke, *J. Chem. Phys.*, 1993, **98**, 5648–5652.
- 53 D. Andrae, U. Haeussermann, M. Dolg, H. Stoll and H. Preuss, *Theor. Chim. Acta*, 1990, **77**, 123–141.
- 54 T. Yanai, D. P. Tew and N. C. Handy, *Chem. Phys. Lett.*, 2004, **393**, 51–57.
- 55 J. Heyd, G. E. Scuseria and M. Ernzerhof, *J. Chem. Phys.*, 2003, **118**, 8207–8215.
- 56 J. Tao, J. P. Perdew, V. N. Staroverov and G. E. Scuseria, *Phys. Rev. Lett.*, 2003, **91**, 146401–146404.
- 57 M. J. Turner, J. J. McKinnon, S. K. Wolff, D. J. Grimwood, P. R. Spackman, D. Jayatilaka and M. A. Spackman, *CrystalExplorer17*, University of Western Australia, 2017. <http://hirshfeldsurface.net>.
- 58 M. A. Spackman and J. J. McKinnon, *CrystEngComm*, 2002, **4**, 378–392.
- 59 J. J. McKinnon, D. Jayatilaka and M. A. Spackman, *Chem. Commun.*, 2007, 3814–3816.
- 60 A. Kimmig, V. Gekeler, M. Neumann, G. Frese, R. Handgretinger, G. Kardos, H. Diddens and D. Niethammer, *Cancer Res.*, 1990, **50**, 6793–6799.
- 61 J. O'Brien, I. Wilson, T. Orton and F. Pognan, *Eur. J. Biochem.*, 2000, **267**, 5421–5426.
- 62 V. Kuete, J. K. Dzotam, I. K. Voukeng, A. G. Fankam and T. Efferth, *SpringerPlus*, 2016, **5**, 1666–1677.
- 63 V. Kuete, C. F. Tchinda, F. T. Mambe, V. P. Beng and T. Efferth, *BMC Complementary Altern. Med.*, 2016, **16**, 267–278.
- 64 M. Mihoubi, N. Micale, A. Scala, R. M. Jarraya, A. Bouaziz, T. Schirmeister, F. Risitano, A. Piperno and G. Grassi, *Molecules*, 2015, **20**, 14902–14914.



Teil IV

Experimenteller Teil und Anhang

10 Experimenteller Teil

10.1 Allgemeine Methoden und Messgeräte

10.1.1 Chemikalien und Lösemittel

Alle eingesetzten Chemikalien sowie Lösemittel wurden von kommerziellen Anbietern (*Acros Organics, Alfa Aesar, Apollo Scientific, Carbolution, Chempur, Sigma-Aldrich, TCI*) bezogen und, sofern nicht anders angegeben, ohne vorherige Reinigung bzw. Trocknung eingesetzt. Zur Absolutierung von Diethylether, Tetrahydrofuran, 1,4-Dioxan sowie Methyl-*tert*-butylether wurden diese jeweils in Gegenwart von Benzophenon als Indikator bis zur Blaufärbung über Natrium unter Rückfluss und Argonatmosphäre erhitzt und unmittelbar vor Verwendung destilliert. Dichlormethan wurde analog über Calciumhydrid ohne Einsatz eines Indikators unter Argonatmosphäre getrocknet (Erhitzen unter Rückfluss für 2–4 h) und anschließend destilliert. Cyclohexan und Essigsäureethylester für die Säulenchromatographie sowie Lösemittel für Extraktionen wurden in technischer Qualität bezogen und vor ihrer Verwendung destillativ aufgereinigt. Wasserfreies Acetonitril, *N,N*-Dimethylformamid, Methanol und Pyridin wurden in *AcroSeal*[®]-Gebinden über Molekularsieb von *Acros Organics* erworben und ohne weitere Reinigung eingesetzt. Die in der semipräparativen HPLC eingesetzten Lösemittel Acetonitril (HPLC *gradient grade*) und MilliQ[®]-Wasser wurden vor ihrer Verwendung 30 min im Ultraschallbad entgast. HPLC *gradient grade*-Acetonitril (*Chromasolv*[™]) sowie die Lösemittel für HPLC-ESI-MS-Messungen (Acetonitril, Ameisensäure; *Optima*[™] *LC/MS grade*) wurden von der Firma *Fisher Scientific* erhalten. MilliQ[®]-Wasser (entionisiert) wurde mithilfe eines Wasseraufbereitungssystems *Direct-Q*[®] *5 UV* von *Merck* generiert. Deuterierte Lösemittel (CDCl_3 (99.8%), $\text{DMSO-}d_6$ (99.8%), $\text{Aceton-}d_6$ (99.8%), $\text{Methanol-}d_4$ (99.8%), ${}^6\text{Hex-}d_{12}$ (99.5%), D_2O (99.9%)) für die NMR-Spektroskopie wurden von *Deutero* bzw. *Sigma-Aldrich* (D_2O) erworben.

10.1.2 Entfernen von Lösemitteln und Trocknung der erhaltenen Produkte

Das Entfernen von Lösemitteln unter reduziertem Druck erfolgte mithilfe eines Rotationsverdampfers (*Büchi Rotavapor R-210*) mit angeschlossener Membranpumpe bei einer Wasserbadtemperatur von 40–50 °C. Die synthetisierten Reinprodukte (Feststoffe sowie hochsiedende Flüssigkeiten/Öle) wurden durch Trocknung im Feinvakuum (10^{-2} – 10^{-3} mbar) über mehrere Stunden mit einer Drehschieber-Vakuumpumpe (*Pfeiffer Vacuum DUO 10*) von Lösemittelresten befreit. Wasser bzw. Wasser/Acetonitril-Gemische, die insbesondere bei Aufreinigungen an C_{18} -Umkehrphasen (semipräparative HPLC) entstanden, wurden durch Lyophilisierung an einer *ALPHA 2–4 LDplus*-Gefriertrocknungsanlage der Firma *Christ* entfernt.

10.1.3 Reaktionsbedingungen und Lagerung der Produkte

10.1.3.1 Reaktionstemperaturen

Die angegebenen Reaktionstemperaturen beziehen sich, sofern nicht anders angegeben, auf die Temperatur des jeweiligen Heiz- bzw. Kältebades. Folgende Kältemischungen wurden erzeugt, um die erforderlichen Temperaturen zu erreichen (**Tab. 10.1**):

Tab. 10.1: Zusammensetzung der Kältemischungen.

T (°C)[†]	Zusammensetzung der Kältemischung
0–5	Wasser/Eis (ca. 1:1)
–21	Eis/Natriumchlorid (ca. 3:1)
–78	Aceton/CO _{2(s)}

[†]**Bem.:** die angegebenen Temperaturen entsprechen lediglich ungefähren Werten. Der exakte Wert kann je nach Mischungsverhältnis variieren.

10.1.3.2 Reaktionsführung unter Schutzgasatmosphäre

Reaktionen unter Luft- und Feuchtigkeitsausschluss wurden unter Argonatmosphäre in sekurierten Glasgeräten (Schlenk-Rohre bzw. -Kolben) durchgeführt. Dazu wurden die Glasgeräte unter Zuhilfenahme einer Schlenk-Linie alternierend jeweils dreimal im Feinvakuum ausgeheizt (Heißluftgebläse) und wieder mit Inertgas (Argon) geflutet. Die entsprechenden Reaktionen wurden unter Einsatz absolutierter Lösemittel durchgeführt und die Reagenzien entweder mittels (Transfer)Kanüle über ein Septum oder im Argon-Gegenstrom zugegeben.

10.1.3.3 Reaktionsführung bei der Synthese photolabiler Substanzen

Die Synthese und Umsetzung photolabiler Substanzen ((Trifluormethyl)diazirinderivate) erfolgte unter Lichtausschluss, welcher durch Ummantelung der Reaktionsgefäße, der Chromatographiesäulen sowie des Heizbades am Rotationsverdampfer mit Aluminiumfolie gewährleistet wurde. Auf eine Beleuchtung des Digestoriums wurde bei Arbeiten mit diesen Substanzen –sofern möglich– weitestgehend verzichtet.

10.1.3.4 Lagerung der Produkte

Alle isolierten Rein-, Zwischen- und Rohprodukte wurden, sofern nicht anders angegeben, in Rundkolben oder Schraubdeckelgläschen unter Argonatmosphäre bei –21 °C im Gefrierschrank gelagert. Um eine partielle Zersetzung photolabiler Substanzen zu vermeiden, wurden die Gefäße derselben zusätzlich in Aluminiumfolie eingehüllt.

10.1.4 Gaseinleitung zur Verflüssigung von Ammoniak

Zur Synthese der Diaziridinbausteine im Labormaßstab wurde Ammoniak 3.8 W (Westfalen, Reinheit: ≥ 99.98 Vol.-%) mithilfe einer Gaseinleitungsapparatur (**Abb. 10.1**) verflüssigt. Das kommerziell erhältliche Gas wurde unter Verwendung eines mit Kaliumhydroxid-Pellets gefüllten Chlorcalciumzylinders (Witeg Labortechnik GmbH) getrocknet und im Anschluss durch eine Kühlfalle mit Hahn (Dewar-Kühler für Innenkühlung, vollständig mit Aceton/Trockeneis-Bad ($T = -78$ °C) gefüllt, Witeg Labortechnik GmbH) geleitet. Das kondensierte Gas wurde anschließend bei Bedarf über den Hahn in den Reaktionskolben (Schlenk-Kolben mit Ar-Ballon) bei einer Temperatur von -78 °C überführt.

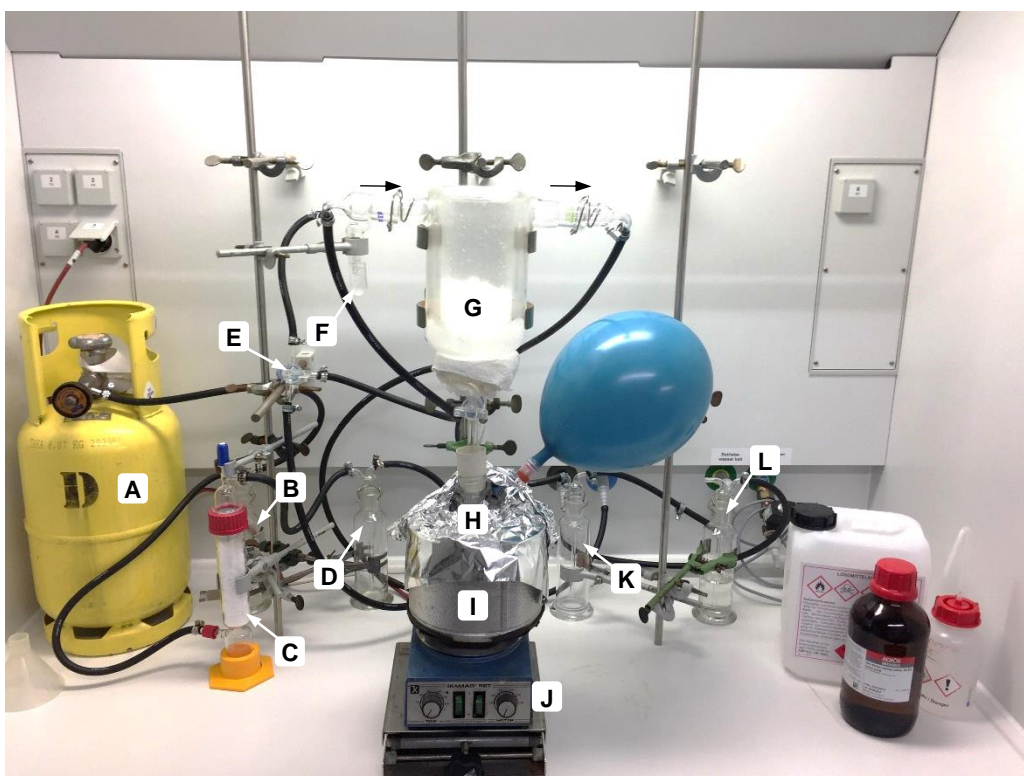


Abb. 10.1: Equipment für die Verflüssigung von Ammoniak im Labormaßstab bei der Diaziridinsynthese. **A)** Ammoniak-Niederdruckstahlflasche (Ammoniak 3.8 W, 12 L), **B)** Gaswaschflasche 1, **C)** Chlorcalciumzylinder, gefüllt mit KOH-Pellets zur Gastrocknung (Witeg Labortechnik GmbH), **D)** Gaswaschflasche 2, **E)** Dreiwege-Hahn, **F)** Blasenähler zur Einstellung des Gastroms, **G)** Kühlfalle mit Hahn (Dewar-Kühler für Innenkühlung mit Aceton/ $\text{CO}_2(\text{s})$ -Bad ($T = -78$ °C), Witeg Labortechnik GmbH), **H)** Reaktionsgefäß (Schlenk-Kolben mit Ar-Ballon), **I)** Dewar mit Aceton/ $\text{CO}_2(\text{s})$ -Bad ($T = -78$ °C) sowie Aluminiumfolie zum Ausschluss von Licht, **J)** Magnetrührer, **K)** Gaswaschflasche 3, **L)** Gaswaschflasche 4.

10.1.5 Chromatographie

10.1.5.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

Die dünn-schichtchromatographischen Analysen zur Kontrolle des Reaktionsverlaufs, des Extraktionsfortschritts, der säulenchromatographischen Trennungen sowie der Reinheit der Produkte erfolgten mit DC-Aluminiumfolien (Kieselgel, ALUGRAM® Xtra SIL G UV₂₅₄ der Firma *Macherey-Nagel*; mit Fluoreszenzindikator). Zur Charakterisierung einiger polarer Substanzen wurden zudem RP-modifizierte Kieselgelplatten (C₁₈, ALUGRAM® RP-18W/UV₂₅₄ der Firma *Macherey-Nagel*; mit Fluoreszenzindikator) eingesetzt. Die Laufmittelgemische sind als Verhältnisse der Volumina der Einzelkomponenten (V/V) angegeben. Die Detektion der Substanzflecken erfolgte durch UV-Licht ($\lambda = 254$ nm bzw. $\lambda = 360$ nm) sowie durch Visualisierung mittels nachfolgend beschriebener Färbereagenzien (**Tab. 10.2**).

Tab. 10.2: Zusammensetzung der eingesetzten Anfärbereagenzien zur Detektion organischer Substanzen in der Dünnschichtchromatographie.

Anfärbereagenz [†]	Zusammensetzung
Ninhydrin-Reagenz	Ninhydrin (0.6 g), Eisessig (6 mL) in Ethanol (200 mL)
Vanillin/H ₂ SO ₄	Vanillin (8.6 g), konz. H ₂ SO _{4(aq)} (2.5 mL) in Ethanol (200 mL)
<i>p</i> -Anisaldehydlösung	<i>p</i> -Anisaldehyd (1.8 mL), Eisessig (0.75 mL), konz. H ₂ SO _{4(aq)} (2.5 mL) in Ethanol (200 mL)
<i>Ehrlichs</i> -Reagenz	4-(<i>N,N</i> -Dimethylamino)benzaldehyd (1.6 g), konz. HCl _(aq) (80 mL) in Methanol (120 mL)
KMnO ₄ -Reagenz	KMnO ₄ (2.5 g), NaOH _(s) (5.5 g) in Wasser (250 mL)
<i>Dragendorff</i> -Reagenz [‡]	<i>Lösung 1</i> : Bi(NO ₃) ₃ (0.85 g) in Eisessig (10 mL) und Wasser (40 mL) <i>Lösung 2</i> : KI (8.0 g) in Wasser (20 mL)
<i>Seebach</i> -Reagenz	Ce(SO ₄) ₂ ·4 H ₂ O (2.0 g), Molybdätosphorsäure (5.0 g), konz. H ₂ SO ₄ (8 mL) in Wasser (200 mL)

[†]**Bem.:** Die DC-Platten wurden in die entsprechende Färbelösung eingetaucht und anschließend mit einem Heißluftgebläse oder bei Raumtemperatur (*Dragendorff*-Reagenz) entwickelt. [‡]*Lösungen 1* und *2* werden vereinigt, 15 min gerührt und der Feststoff abfiltriert.

10.1.5.2 Säulenchromatographie (SC)

Die säulenchromatographische Reinigung von Rohprodukten erfolgte an Kieselgel 60 M (0.015–0.040 mm Partikelgröße) der Firma *Macherey-Nagel* als stationäre Phase. Die in den Versuchsvorschriften angegebenen Laufmittelverhältnisse sind als Volumenverhältnisse angegeben. Die Länge und der Durchmesser der Chromatographiesäulen wurden der entsprechenden Trennproblematik angepasst.

10.1.5.3 Analytische HPLC

Analytische HPLC-Untersuchungen sowie die Vorbereitung der zu analysierenden Proben zur Reinheitsbestimmung von Produkten wurden mit dem in Kapitel 10.1.8 beschriebenen HPLC-System durchgeführt.

10.1.5.4 Semipräparative HPLC

Semipräparative HPLC-Trennungen wurden mit einem *Varian PrepStar*-System (3 × *Varian PrepStar* Solvent Delivery Module 218, *Varian ProStar* 325 UV/Vis-Detector, *Varian ProStar* Fraction Collector Model 701) realisiert. Als stationäre Phase wurde eine *Agilent Zorbax PrepHT XDB C₁₈* (150 mm × 21.2 mm, 5 μm)-Säule bei Raumtemperatur eingesetzt, wobei die Detektion der Substanzen bei einer Wellenlänge von $\lambda = 254$ nm erfolgte. Als mobile Phase dienten Acetonitril/MilliQ®-Wasser-Gemische mit einer Flussrate von 10–20 mL · min⁻¹. Die Injektion der in Acetonitril/Wasser-Mischungen gelösten Proben (10–100 mg in 1–5 mL) erfolgte manuell über eine Probenschleife (10 mL).

10.1.6 Parallelsynthese

Zur Realisierung kombinatorischer Synthesen und zum Screening von Reaktionsbedingungen wurde teilweise ein Parallelsynthese-Reaktor (Typ: *Synthesis 1*) von *Heidolph Instruments* eingesetzt. Die angewandten Reaktionsbedingungen sind an den entsprechenden Stellen kenntlich gemacht.

10.1.7 NMR-Spektroskopie

Alle NMR-Spektren wurden an einem der folgenden Geräte der Firma *Bruker* unter Verwendung von Standardpulssequenzen bei 23 °C aufgenommen:

- *Fourier 300*: für 300 MHz ¹H-NMR, 75.5 MHz ¹³C-NMR sowie 2D-NMR-Spektroskopie-Methoden (COSY, HSQC, HMBC, NOESY)
- *Avance III HD 300*: für 300 MHz ¹H-NMR, 75.5 MHz ¹³C-NMR, 282 MHz ¹⁹F-NMR sowie 2D-NMR-Spektroskopie-Methoden (COSY, HSQC, HMBC, NOESY); mit 5 mm BBFO-Kopf mit *z*-Gradient und ATM sowie *BACS 60* Probenwechsler
- *Avance II 400*: für 400 MHz ¹H-NMR, 100.6 MHz ¹³C-NMR, 376.5 MHz ¹⁹F-NMR sowie 2D-NMR-Spektroskopie-Methoden (COSY, HSQC, HMBC, NOESY); mit 5 mm BBFO-Kopf mit *z*-Gradient und ATM sowie *SampleXPress 60* Probenwechsler

Bei den ¹³C-NMR-Spektren wurde eine ¹H-Breitbandentkopplung vorgenommen und die *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (HSQC)-Experimente wurden phasensensitiv durchgeführt (CH und CH₃ positiv, CH₂ negativ). Zur Strukturaufklärung und Zuordnung der H- sowie C-Atome der einzelnen Verbindungen wurden nach Bedarf zweidimensionale NMR-Spektroskopie-Experimente (¹H,¹H-COSY, ¹H,¹³C-HSQC, ¹H,¹³C-HMBC sowie ¹H,¹H-NOESY) ausgeführt. Die chemischen Verschiebungen (δ [ppm]) der NMR-Signale wurden auf das

entsprechende deuterierte Lösemittel referenziert (Restsignal, vgl. **Tab. 10.3**) und sind relativ zu Tetramethylsilan (TMS, 0 ppm) angegeben.^[450-452] Chemische Verschiebungen der ¹⁹F-NMR-Spektren sind relativ zu C(³⁵Cl)₂(³⁷Cl)F angegeben, wobei für diese Experimente das Spektrometer mit Trifluormethylbenzol in CDCl₃ (–63.9 ppm) kalibriert wurde. Zur Auswertung der NMR-Spektren wurde die Software *MestReNova* (Version 14.1.0) der Firma *Mestrelab Research* eingesetzt.

Tab. 10.3: Chemische Verschiebungen δ der Lösemittelsignale mit Angabe der entsprechenden Multiplizitäten.

Solvens	δ_{H} (ppm)		δ_{C} (ppm)	
CDCl ₃	7.26	s	77.16	t
DMSO- <i>d</i> ₆	2.50	quin.	39.52	sept.
Methanol- <i>d</i> ₄	3.31	quin.	49.00	sept.
⁶ Hex- <i>d</i> ₁₂	1.38	s	26.43	quin.
D ₂ O	4.79	s	–	–

Lichtempfindliche Proben wurden in 5 mm NMR-Braunglasröhrchen (Typ: 507-HP-AT-7 von *Norell*) vermessen.

10.1.8 Massenspektrometrie (HPLC-ESI-MS)

HPLC-ESI-MS-Analysen von Reaktionsmischungen, isolierten Reinsubstanzen sowie bei den Kinetikstudien der Diazirinphotolyse wurden unter Verwendung einer *HP Agilent 1100 series* HPLC-Anlage mit binärem Pumpensystem, Autosampler und Dioden-Array-Detektor mit angeschlossenem *Agilent 1100 series LC/MSD Ion Trap* Massenspektrometer durchgeführt. Die Ionisierung der Proben erfolgte über eine Elektrosprayionisations-(ESI-)Quelle im positiven bzw. ggf. im negativen Modus (Trockengastemperatur: 350 °C, Zerstäubendruck: 70 psi, Kapillarspannung: 3500 V, Flussrate des Trockengases (N₂): 12 L · min^{–1}). Als stationäre Phase diente eine auf 40 °C (Säulenofen) temperierte *Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈* (150 mm × 2.10 mm, 4 µm)-Säule. Als Laufmittel wurden Gemische aus Acetonitril und MilliQ[®]-Wasser (+0.1% Ameisensäure) mit einer Flussrate von 0.5–0.7 mL · min^{–1} verwendet. Die zu analysierenden Proben wurden in Acetonitril bzw. Acetonitril/Wasser (1:1 V/V) mit einer Massenkonzentration von $\beta \leq 0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ gelöst, über einen PTFE-Spritzenfilter ($d = 13 \text{ mm}$, 0.2 µm Porengröße) filtriert und anschließend injiziert (Injektionsvolumen: 1.0–10.0 µL). Die Angaben der Signalintensitäten beziehen sich prozentual auf das jeweils intensivste Signal. Die Reinheit der finalen Substanzen wurde aus den Signalflächenverhältnissen ([mAU · s]) bei einer Detektionswellenlänge von $\lambda = 254 \text{ nm}$ ermittelt.

10.1.9 IR-Spektroskopie

Infrarotspektren wurden an einem FT-IR-Spektrometer *Avatar 300* der Firma *Thermo-Nicolet* mit einer ATR-Korrektur aufgenommen und mithilfe der Software *EZ OMNIC* von *Thermo Fisher Scientific* ausgewertet. Es wird jeweils eine Auswahl der intensivsten Banden ($\bar{\nu}$ [cm^{-1}]) angegeben.

10.1.10 Polarimetrie

Spezifische Drehwerte $[\alpha]_{\text{D}}^{\text{T}}$ optisch aktiver Substanzen wurden mit einem Polarimeter *P3000* der Firma *Krüss* bei $\lambda = 589$ nm (Na-Lampe) unter Verwendung einer Quarz-Küvette (Länge: 10 cm) bestimmt. Das verwendete Lösemittel, die Temperatur sowie die Konzentration der vermessenen Probe (in g/100 mL) sind an entsprechender Stelle angegeben.

10.1.11 UV/Vis-Spektroskopie

UV-Vis-Spektren wurden an einem *Jasco V-650* Spektrophotometer mit einer Scan-Geschwindigkeit von $200 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$ und einer UV-Vis-Bandbreite von 1.0 nm unter Verwendung von Quarz-Küvetten ($d = 10.0$ mm) aufgenommen. Zuvor wurde eine Basislinienkorrektur mit dem entsprechenden Lösemittel als Referenz durchgeführt.

10.1.12 Schmelzbereichsbestimmung

Die Bestimmung der Schmelzbereiche erfolgte an einem Schmelzpunktmessgerät der Firma *A. Krüss Optronic* (Modell: *KSPIN*; Heizrate: $1 \text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$) unter Verwendung von halboffenen Kapillaren.

10.1.13 Kristallstrukturanalysen

Kristallstrukturanalysen wurden in der Abteilung für Kristallstrukturanalyse des Department Chemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz von [REDACTED] bzw. von [REDACTED] ([REDACTED]), Department Chemie und Biochemie, Universität Bern) durchgeführt. Für die Messungen wurde ein *IPDS-2T*-Diffraktometer der Firma *STOE* bzw. ein bzw. *Rigaku SuperNova*-Diffraktometer mit Mo-K-Graphitmonochromator eingesetzt. Die dreidimensionale Visualisierung der Molekülstrukturen im Festkörper wurde durch die Software *Mercury* (*The Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC)*) realisiert. Für die Kristallstrukturanalyse geeignete Kristalle wurden wie folgt erhalten: Die entsprechende Verbindung wurde in EtOAc oder CH_2Cl_2 (ca. 10 mg in 100–200 μL) in einem LC-MS-Vial (1 mL) gelöst, welches offen in ein mit Petrolether gefülltes Schnappdeckelglas (5 mL) gestellt wurde. Durch sukzessive Diffusion des apolaren Lösemittels in die Lösung der Substanz konnte eine langsame Kristallisation gewährleistet werden.

10.2 Kinetische Analysen der Diazirinphotolyse

Die Photoaktivierungsstudien erfolgten in Anlehnung an Verfahren von Brunner *et al.* und Seifert *et al.*^[174,205] Alle photochemischen Reaktionen (kinetische Analysen und Photoaffinitätsmarkierungsexperimente) wurden unter Verwendung einer *High-Power UV-LED* ($\lambda_{\max} = 365 \text{ nm}$; *UV LED smart*; *Opsytec Dr. Gröbel GmbH*) mit „Standard“-Optik für einen kleinen Strahldurchmesser und ein fokussiertes Strahlprofil durchgeführt. Detailliertere Informationen sowie Spezifikationen dieser Lichtquelle können der Homepage und dem entsprechenden Datenblatt des Lieferanten (<https://www.opsytec.com/products/uv-led-light-sources>; Stand August 2020) entnommen werden.

Die zeitliche Verfolgung des photolytischen Zerfalls der (Trifluormethyl)diazirin-Derivate wurde in einem gut belüfteten Abzug in Quartzküvetten ($d = 10 \text{ mm}$) mit einem kleinen magnetischen Rührstab in einem Abstand von 2 cm von der Lichtquelle für eine effektive Photoaktivierung durchgeführt. Unter diesen Bedingungen war keine weitere Kühlung zur Aufrechterhaltung der Umgebungstemperatur erforderlich, da die Wärmeentwicklung durch die LED-Lichtquelle vernachlässigbar ist. Ein typischer experimenteller Aufbau ist in **Abb. 10.1** dargestellt.

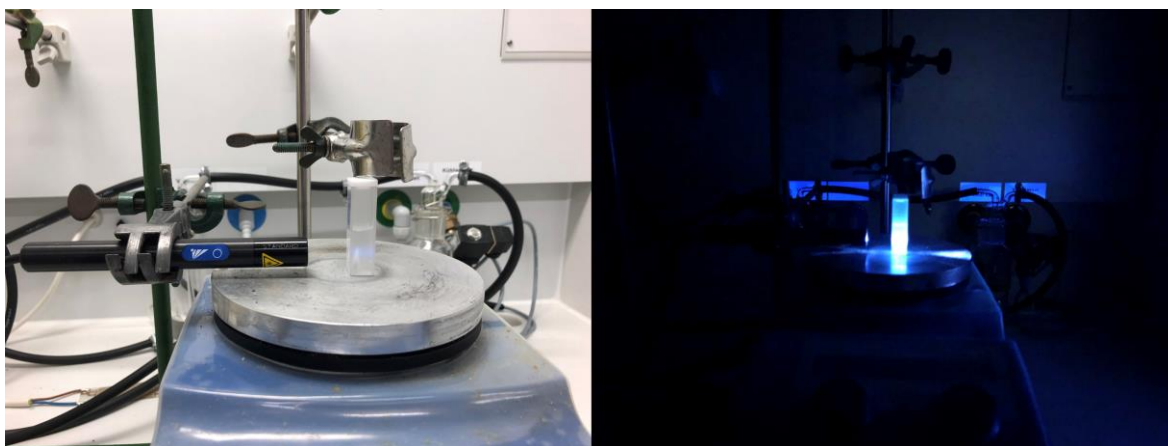


Abb. 10.1: Experimenteller Aufbau für die Belichtung mit der *High Power UV LED* (*Opsytec Dr. Gröbel GmbH*).

Für die zeitliche Verfolgung des photolytischen Zerfalls über ^{19}F -NMR-Spektroskopie wurden die Diazirine in Methanol- d_4 oder Cyclohexan- d_{12} ($c = 5 \text{ mM}$) gelöst, die Proben nach jedem festgelegten Belichtungsintervall in 5 mm NMR-Braunglasröhrchen (Typ: 507-HP-AT-7 von *Norell*) überführt und vor der nächsten Periode vermessen. In HPLC-ESI-MS-Photolyseexperimenten wurden Aliquots von 50 μL aus den Proben der Diazirine in ausgewählten Lösemittel (HPLC-MS-grade; $c = 2 \text{ mM}$ (Methanol und Cyclohexan) oder $c = 50 \mu\text{M}$ (wässriger Puffer)¹⁾ entnommen, mit Acetonitril/MilliQ®-Wasser (1:1 V/V) verdünnt (1:10 V/V), durch PTFE-Spritzenfilter ($d = 13 \text{ mm}$, 0.2 μm Porengröße) filtriert und anschließend in das in **Kap. 10.1.8** beschriebene HPLC-ESI-MS-System injiziert (Injektionsvolumen: 5–10 μL). Die resultierenden Peakflächen (UV-Detektion bei

¹⁾50 mM TRIS, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 5 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 4 mM EDTA und 250 mM Saccharose.

$\lambda = 254 \text{ nm}$) des entsprechenden Diazirins, des linearen Diazoisomers sowie des Insertionsproduktes im Chromatogramm wurden integriert und nach Normierung gegen die Belichtungszeit graphisch aufgetragen. Sowohl der Diazirinzerfall als auch die Bildung des Insertionsproduktes können durch Exponentialfunktionen erster Ordnung angepasst werden, während die Entstehung und der nachfolgende Zerfall des linearen Diazo-Isomers durch einen biexponentiellen Trend beschrieben werden kann. Für die graphische Visualisierung und die Durchführung der nicht-linearen Regressionen wurde die Software *GraphPad Prism* (Version 9.0.0; *GraphPad Software, LLC*) eingesetzt.

10.3 Photoaffinitätsmarkierung

Die humane TRPML1-ELD wurde von [REDACTED] (AG [REDACTED]) exprimiert und zur Verfügung gestellt. Für die *Cross-Linking*-Reaktionen wurden die hTRPML1-ELD (finale Konz. $c_{final} = 2 \mu\text{M}$), das Diazirin **KS239 (42a)** bzw. **KS249 (42b)** in DMSO ($100 \mu\text{M}$, $25 \mu\text{L} \rightarrow$ finale Konz. $c_{final} = 5 \mu\text{M}$, $V_{ges} = 500 \mu\text{L}$) in Puffer (50 mM TRIS , 150 mM NaCl , 2 mM CaCl_2 , 5 mM KCl , 5 mM MgCl_2 , 4 mM EDTA und $250 \text{ mM Saccharose}$) vorgelegt und jeweils 10 min unter Lichtausschluss bei $0\text{--}5 \text{ }^\circ\text{C}$ präinkubiert. Nach Inkubation wurden die Proben in eine Quartz-Küvette ($d = 10 \text{ mm}$) mit einem kleinen Rührkern überführt und in einem Abstand von 2 cm mit einer High Power UV-LED bei einer Wellenlänge von $\lambda = 365 \text{ nm}$ 15 min unter Rühren bestrahlt. Nach Beendigung der Belichtungsperiode wurden die Proben in flüssigem Stickstoff bei $-196 \text{ }^\circ\text{C}$ schockgefrostet und bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ bis zur Durchführung des tryptischen Verdau und der massenspektrometrischen Analyse der Proteinfragmente (durchgeführt von [REDACTED] und [REDACTED], [REDACTED], Institut für Immunologie, Universitätsmedizin Mainz) gelagert.

10.4 Fluorimetrische Assays

Die inhibitorische Aktivität ausgewählter synthetisierter Verbindungen wurde in fluorimetrischen Assays evaluiert, wobei weiße 96-Well-Microplatten von *Greiner Bio-One* eingesetzt wurden. Der zeitabhängige Fluoreszenzanstieg bei der Spaltung der fluorogenen Substrate wurde mithilfe eines *Infinite F200 PRO*- bzw. *Spark 10 M*-Multiplatten-Lesers der Firma *Tecan* verfolgt. Die entsprechenden Peptidsubstrate und Verdünnungsreihen der Inhibitoren wurden als DMSO-Stammlösungen vorbereitet. Generell wurden jeweils drei technische Replikate in $200 \mu\text{L/Well}$ ($180 \mu\text{L}$ Assay-Puffer, $5 \mu\text{L}$ Protease in Enzympuffer, $10 \mu\text{L}$ DMSO (Negativkontrolle) oder $10 \mu\text{L}$ Inhibitorlösung und $5 \mu\text{L}$ der Substratlösung) durchgeführt, wobei jede Reaktion als Doppelbestimmung erfolgte. Zunächst wurde die prozentuale Inhibition der zu untersuchenden Verbindungen bei einer fixen Konzentration von $20 \mu\text{M}$ bzw. $100 \mu\text{M}$ (20S-Proteasom) ermittelt, für aktive Verbindungen ($\geq 50\%$ Inhibition) wurden zur Bestimmung der IC_{50} -Werte Verdünnungsreihen mit mindestens sieben verschiedenen Konzentrationen in DMSO erstellt.

Die Analyse der erhaltenen Daten erfolgte mithilfe der Software *GraFit*[®] (Version 5.0.13) von *Erithacus Software Ltd.* bzw. *GraphPad Prism* (Version 9.0.0; *GraphPad Software, LLC*), wobei die Restenzymaktivität gegen die InhibitorKonzentration in einer Dosis-Wirkungskurve graphisch visualisiert wurde. Durch nicht-lineare Regression unter Anwendung der Vier-Parameter-Hill-Gleichung

$$y = \frac{y_{\max} - y_{\min}}{1 + \left(\frac{[I]}{IC_{50}}\right)^S} + y_{\min} \quad (3)$$

(mit y [$\Delta F \cdot \text{min}^{-1}$] = Substrathydrolyserate; $[I]$ = InhibitorKonzentration; S = Hill-Koeffizient; y_{\max} = max. Wert der Dosis-Wirkungskurve bei kleinen InhibitorKonz.; y_{\min} = min. Wert der Dosis-Wirkungskurve bei großen InhibitorKonz.) wurden die IC_{50} -Werte der einzelnen Verbindungen berechnet (3).^[353]

Die Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante K_M erfolgte durch Inkubation des entsprechenden Enzyms bei verschiedenen Substratkonzentrationen (10–1000 μM) und zeitliche Verfolgung des Fluoreszenzanstiegs bedingt durch die Substrathydrolyse (s. o.). Nach der graphischen Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit (Enzymaktivität) gegen die Substratkonzentration wurde der K_M -Wert mittels nicht-linearer Regression (Michaelis-Menten-Gleichung; (Glg. 4)) ermittelt.

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (4)$$

10.4.1 20S-Proteasom

Humanes 20S-Proteasom wurde von *Enzo Life Sciences* (1.0 mg · mL⁻¹; Art.-Nr.: BML-PW8720-0050) erworben und erst unmittelbar vor Verwendung aufgetaut sowie mit dem Faktor¹ 1:50 bzw. 1:30 in Puffer (50 mM TRIS, 25 mM KCl, 10 mM NaCl, 1 mM MgCl₂ · 6 H₂O; pH 7.5, 0.03% SDS) verdünnt. Für die fluorimetrische Aktivitätsbestimmung der Chymotrypsin-ähnlichen Untereinheit wurde Succ-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (Art.-Nr. 4011369; *Bachem*) als Substrat eingesetzt. Bortezomib (99%, *Alfa Aesar*; Art.-Nr.: J60378) wurde als Referenzinhibitor in Positivkontrollen eingesetzt. Folgende Einstellungen wurden zur Messung des Fluoreszenzanstiegs am Multiplattenleser vorgenommen (**Tab. 10.4**):

¹Die Wahl des Verdünnungsfaktors richtet sich nach der Aktivität des Proteasoms, die vor jeder Messreihe erneut bestimmt wurde.

Tab. 10.4: Angewandte Geräteparameter des Multiplattenlesers für die fluorimetrischen Aktivitätsbestimmungen beim humanen 20S Proteasom.

Parameter	Wert
Anregungswellenlänge λ_{ex}	380 nm
Detektionswellenlänge λ_{em}	465 nm
Temperatur	30 °C
manuelle Verstärkung	70
Kinetische Verzögerung	0 μ s
Integrationszeit	40 μ s

10.4.2 Cathepsin B, Cathepsin L und Cathepsin S

Cathepsin B (human liver, Art.-Nr.: 219364), Cathepsin L (human liver, Art.-Nr.: 219402) sowie Cathepsin S (human, recombinant, *E. Coli*, Art.-Nr.: 219402) wurden von *Merck Millipore* erworben und erst unmittelbar vor Verwendung aufgetaut sowie mit dem Faktor¹ 1:125 (Cat-B), 1:50 (Cat-L) bzw. 1:30 (Cat-S) in Puffer (50 mM TRIS, 2 mM DTT, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl; pH 6.5) verdünnt. Folgende Substrate wurden für die fluorimetrischen Aktivitätsbestimmungen der Cathepsine eingesetzt (**Tab. 10.5**):

Tab. 10.5: Eingesetzte Substrate für die fluorimetrische Aktivitätsbestimmung der Cathepsine.

Enzym	Substrat	Art.-Nr. (Firma)
Cathepsin B	Z-Phe-Arg-AMC · HCl	4003379 (<i>Bachem</i>)
Cathepsin L	Z-Phe-Arg-AMC · HCl	4003379 (<i>Bachem</i>)
Cathepsin S	Z-Val-Val-Arg-AMC · HCl	4016422 (<i>Bachem</i>)

Aktivitätsbestimmungen an Cathepsin S wurden von [REDACTED] ([REDACTED]) durchgeführt. Folgende Einstellungen wurden zur Messung des Fluoreszenzanstiegs am Multiplattenleser vorgenommen (**Tab. 10.6**):

Tab. 10.6: Angewandte Geräteparameter des Multiplattenlesers für die fluorimetrischen Aktivitätsbestimmungen der Cathepsine.

Parameter	Wert
Anregungswellenlänge λ_{ex}	380 nm
Detektionswellenlänge λ_{em}	460 nm
Temperatur	25 °C
manuelle Verstärkung	60

¹Die Wahl des Verdünnungsfaktors richtet sich nach der Aktivität des jeweiligen Enzyms, die vor jeder Messreihe erneut bestimmt wurde.

10.4.3 SARS-CoV2 M^{pro}

Die Expression der Coronavirus-2-Protease SARS-CoV2 M^{pro} wurde in einem Gemeinschaftsprojekt von [REDACTED] und [REDACTED] ([REDACTED]) realisiert. Für die fluorimetrische Aktivitätsbestimmung wurde das Enzym in Puffer abhängig von der zuvor bestimmten Aktivität in Puffer (20 mM TRIS, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 200 mM NaCl; pH 7.5) verdünnt und Dabcyl-KTSAVLQSGFRKME-Edans (TFA-Salz; *GenScript*) als Substrat eingesetzt. Die Aktivitätsbestimmung an SARS-CoV2 M^{pro} wurde von [REDACTED] ([REDACTED]) durchgeführt. Folgende Einstellungen wurden zur Messung des Fluoreszenzanstiegs am Multiplattenleser vorgenommen (**Tab. 10.7**):

Tab. 10.7: Angewandte Geräteparameter des Multiplattenlesers für die fluorimetrischen Aktivitätsbestimmungen an SARS-CoV2 M^{pro}.

Parameter	Wert
Anregungswellenlänge λ_{ex}	335 nm
Detektionswellenlänge λ_{em}	493 nm
Temperatur	25 °C
manuelle Verstärkung	60
Kinetische Verzögerung	0 μs
Integrationszeit	40 μs

10.5 Computergestützte Datenanalyse/Docking

10.5.1 Nicht-kovalentes Docking

Nicht-kovalente Dockingstudien wurden unter Verwendung der Kristallstruktur des humanen 20S-Proteasoms im Komplex mit Bortezomib (PDB: 5LF3)^[318] mit *FlexX/LeadIT* (Version 2.3.2)^[356] durchgeführt, wobei die kovalente Knüpfung von Bortezomib zum Thr10⁷ *in silico* getrennt wurde. Nach Extraktion der β_5 -Untereinheit wurde die Bindetasche als 8 Å-Sphäre um den Referenzliganden definiert und Wassermoleküle aus der Kalkulation ausgeschlossen. Die Erstellung der 3D-Koordinaten sowie die Energieminimierung der Liganden erfolgte mit *Molecular Operating Environment* (MOE 2019.01) im *MMFF94x*-Kraftfeld.^[357] Für die Dockingstudien mit der generierten Substanzbibliothek wurde zudem die Bedingung gewählt, dass sich die elektrophile β -Position des *Warheads* in einem Sphärenradius von 2 Å (SMARTS-Code $[(C=C)]$ bzw. $[(CC=O)]$) des ursprünglichen Bor-Atoms von **94** befinden soll. Der sterische *Clash* (*maximum overlapped volume*) wurde auf 5 Å³ gesetzt; alle weiteren Parameter entsprachen den Voreinstellungen des Software-Pakets.

10.5.2 Kovalentes Docking

Die kovalenten Dockingstudien erfolgten mithilfe von *MOE* 2019.01^[357], wobei der Rezeptor analog zu den nicht-kovalenten *in silico*-Berechnungen präpariert wurde (s. o.). Mithilfe des *MMFF94x*-Kraftfeldes wurden die 3D-Koordinaten der Liganden im energieminierten Zustand generiert und die kovalenten Dockingstudien gemäß des Standardprotokolls von *MOE* durchgeführt.^[357] Hierbei wurde Thr10^y als reaktives Zentrum (*reactive site*) selektiert, wobei keine Pharmakophor-Restriktionen angewandt wurden. Für den Pharmakophor-basierten Dockingschritt wurde das *Amber10:EHT*-Kraftfeld verwendet und die Resultate mithilfe der implementierten *London dG*-Scoringfunktion neu bewertet, wobei der Rezeptor als rigide festgelegt wurde.

10.5.3 Datenanalyse der TRPML-Strukturen

Die Profile der Porengröße verschiedener TRPML-ELDs (**Kap. 4**) wurden unter Zuhilfenahme des Programmes HOLE (Smart *et al.*)^[207] berechnet, wobei als maximaler Radius für die Kalkulation 15 Å festgelegt wurde. Der Ursprung der Porenachse wurde auf den Mittelpunkt der vier α 2-Helices und der relative Mittelpunkt an die TRPML2-Verengung angeglichen. Die Visualisierung und Analyse der Ergebnisse aus HOLE erfolgte mit *Visual Molecular Dynamics* (VMD, Humphrey *et al.*)^[453] und entsprechende Abbildungen wurden mit dem *Tachyon ray tracer* (für VMD) oder in PyMOL generiert. Die Berechnung der elektrostatischen Potentialoberflächen (EPSs) wurden mit dem APBS-Plugin (Lerner und Carlson, University of Michigan)^[454] für PyMOL durchgeführt, nachdem die PDB- Dateien über PDB2PQR (Dolinsky *et al.*)^[455] in das dazugehörige PQR-Format konvertiert wurden. Da bei der TRPML3-Struktur bei pH 4.8 (PDB: 6AYG, $d = 4.95$ Å)^[112] zu viele Schweratome für exakte elektrostatische Berechnungen fehlten, wurde zuvor ein vollständiges Modell mit SWISS-MODEL^[456] unter Verwendung der TRPML3-FASTA-Sequenz von 6AYG und der Original-PDB-Datei erstellt.

10.5.4 TRPML2-Homologiemodell

Das TRPML2-Homologiemodell wurde mithilfe der Software *Molecular Operating Environment* (*MOE* 2015.10; *Chemical Computing Group*, <https://www.chemcomp.com/Products.htm>) unter Verwendung der Kryo-Elektronenmikroskopie-Struktur des Seidenäffchen-TRPML3-Ionenkanals (PDB: 5W3S, $d = 2.94$ Å) als Template erstellt (**Kap. 4**).^[109] Die Auswahl dieser Struktur als Matrix für das Homologiemodell erfolgte auf Basis der höchsten zum Zeitpunkt der Bearbeitung des Projektes verfügbaren Auflösung einer TRPML3-Struktur. Zudem weist TRPML2 eine höhere Sequenzidentität/-ähnlichkeit zu TRPML3 im Vergleich zu TRPML1 auf.

sowie Wasser (100 mL) aufgenommen. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3 × 100 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit Na₂SO₄ getrocknet und unter reduziertem Druck eingeeengt. Die Titelverbindung wurde als oranger Feststoff (10.29 g, 36.09 mmol, 99%) erhalten.

R_f: 0.65 (SiO₂, ^oHex/EtOAc 10:1).

Smb.: 60–61 °C (EtOAc).

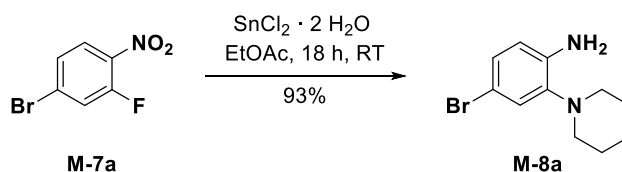
¹H-NMR, COSY (300 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 7.63 (d, ³J = 8.7 Hz, 1H, *H*-3^{Ph}), 7.22 (d, ⁴J = 2.0 Hz, 1H, *H*-6^{Ph}), 7.03 (dd, ³J = 8.7 Hz, ⁴J = 2.0 Hz, 1H, *H*-4^{Ph}), 3.06–2.97 (m, 4H, 2 × *H*-2^{Pip} und 2 × *H*-6^{Pip}), 1.76–1.65 (m, 4H, 2 × *H*-3^{Pip} und 2 × *H*-5^{Pip}), 1.65–1.53 (m, 2H, 2 × *H*-4^{Pip}).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 147.8 (*C*-1^{Ph}), 140.7 (*C*-2^{Ph}), 128.1 (*C*-5^{Ph}), 127.7 (*C*-3^{Ph}), 123.9 (*C*-6^{Ph}), 123.3 (*C*-4^{Ph}), 52.8 (*C*-2^{Pip} und *C*-6^{Pip}), 25.8 (*C*-3^{Pip} und *C*-5^{Pip}), 23.9 (*C*-4^{Pip}).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2934, 2852, 1591, 1548, 1498, 1332, 1295, 1231, 1135, 1033.

ESI-MS (pos.): *m/z* = 285.2 (90%, [M+H]⁺)/287.0 (100%, [M+H]⁺); *m/z* ber. für [C₁₁H₁₃BrN₂O₂+H]⁺ ([M+H]⁺): 285.0/287.0.

4-Brom-2-(piperidin-1-yl)anilin (M-8a)



Die Synthese wurde in Anlehnung an eine modifizierte Vorschrift von Yin *et al.* durchgeführt.^[194] Zu einer Lösung von **M-7a** (9.24 g, 32.40 mmol, 1.00 Äquiv.) in EtOAc (250 mL) wurde SnCl₂ · 2 H₂O (24.80 g, 97.20 mmol, 3.00 Äquiv.) portionsweise zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde durch Zugabe einer KF-Lösung (1 M, aq., 100 mL) gequench und weitere 30 min gerührt. Die Mischung wurde mit EtOAc (2 × 250 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit einer KF-Lösung (1 M, aq., 1 × 100 mL) sowie mit einer NaCl-Lösung (ges., aq., 2 × 100 mL) gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Die Titelverbindung wurde als gelb-brauner Feststoff (7.65 g, 29.98 mmol, 93%) erhalten, welcher ohne weitere Reinigung eingesetzt werden konnte.

R_f: 0.50 (SiO₂, ^oHex/EtOAc 5:1).

Smb.: 40–41 °C (EtOAc).

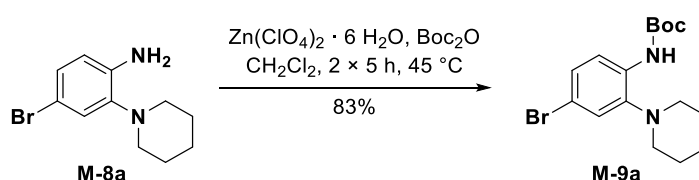
¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ /ppm = 6.98–6.89 (m, 2H, *H*-3^{Ph} und *H*-5^{Ph}), 6.70–6.60 (m, 1H, *H*-6^{Ph}), 4.91 (s (br), 2H, NH₂), 2.76–2.67 (m, 4H, 2 × *H*-2^{Pip} und 2 × *H*-6^{Pip}), 1.70–1.57 (m, 4H, 2 × *H*-3^{Pip} und 2 × *H*-5^{Pip}), 1.56–1.44 (m, 2H, 2 × *H*-4^{Pip}).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ /ppm = 141.6 (*C*-2^{Ph}), 139.9 (*C*-1^{Ph}), 126.1 (*C*-5^{Ph}), 121.9 (*C*-3^{Ph}), 115.7 (*C*-6^{Ph}), 107.0 (*C*-4^{Ph}), 51.6 (*C*-2^{Pip} und *C*-6^{Pip}), 26.0 (*C*-3^{Pip} und *C*-5^{Pip}), 23.8 (*C*-4^{Pip}).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3423, 3330, 2936, 1601, 1487, 1438, 1272, 1226, 1029, 929, 805.

ESI-MS (pos.): m/z = 255.2 (95%, [M+H]⁺)/257.0 (100%, [M+H]⁺); m/z ber. für [C₁₁H₁₅BrN₂+H]⁺ ([M+H]⁺): 255.0/257.0.

tert-Butyl-(4-brom-2-(piperidin-1-yl)phenyl)carbamat (M-9a)



Die Synthese erfolgte in Anlehnung an eine Vorschrift Bartoli *et al.*^[458] Zu einer Lösung aus 4-Brom-2-(piperidin-1-yl)anilin (**M-8a**, 6.79 g, 26.61 mmol, 1.00 Äquiv.) in CH₂Cl₂ (50 mL) wurden Boc₂O (8.71 g, 39.91 mmol, 1.50 Äquiv.) und Zn(ClO₄)₂ · 6 H₂O (496 mg, 1.33 mmol, 0.05 Äquiv.) hinzugefügt. Die Mischung wurde 5 h bei 45 °C gerührt, anschließend mit einer weiteren Portion Boc₂O (8.71 g, 39.91 mmol, 1.50 Äquiv.) versetzt und weitere 5 h bei 45 °C sowie 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde Wasser (100 mL) hinzugefügt und die wässrige Phase mit CH₂Cl₂ (3 × 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Hex/EtOAc 80:1) wurde die Titelverbindung als hellgelber Feststoff (7.85 g, 22.10 mmol, 83%) erhalten.

R_f: 0.53 (SiO₂, Hex/EtOAc 25:1).

Smb.: 89–91 °C (Hex/EtOAc).

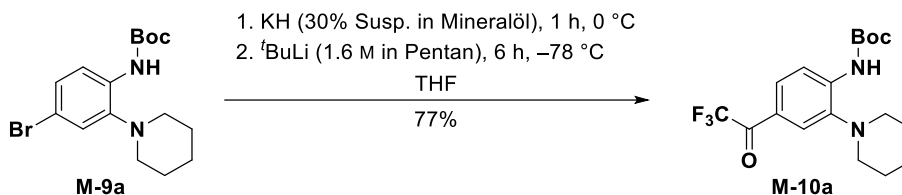
¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ /ppm = 7.74 (d, ³*J* = 8.6 Hz, 1H, *H*-6^{Ph}), 7.72 (s, 1H, NH), 7.28–7.17 (m, 2H, *H*-3^{Ph} und *H*-5^{Ph}), 2.72 (*pseudo-t*, *J* ≈ 5.2 Hz, 4H, 2 × *H*-2^{Pip} und 2 × *H*-6^{Pip}), 1.74–1.58 (m, 4H, 2 × *H*-3^{Pip} und 2 × *H*-5^{Pip}), 1.58–1.49 (m, 2H, 2 × *H*-4^{Pip}), 1.46 (s, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ /ppm = 152.3 (C=O), 144.7 (*C*-2^{Ph}), 132.4 (*C*-1^{Ph}), 126.8 (*C*-5^{Ph}), 123.5 (*C*-3^{Ph}), 120.7 (*C*-6^{Ph}), 114.7 (*C*-4^{Ph}), 79.8 (C(CH₃)₃), 52.6 (*C*-2^{Pip} und *C*-6^{Pip}), 27.9 (C(CH₃)₃), 26.0 (*C*-3^{Pip} und *C*-5^{Pip}), 23.4 (*C*-4^{Pip}).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3360, 2934, 1714, 1502, 1446, 1396, 1245, 1146, 1022, 925, 833.

ESI-MS (pos.): $m/z = 355.2$ (100%, $[M+H]^+$)/357.1 (96%, $[M+H]^+$) und 299.2 (21%, $[M-tBu+H]^+$)/301.1 (26%, $[M-tBu+H]^+$); m/z ber. für $[C_{16}H_{23}BrN_2O_2+H]^+$ ($[M+H]^+$): 355.1/357.1.

tert-Butyl-(2-(piperidin-1-yl)-4-(2,2,2-trifluoroacetyl)phenyl)carbamate (M-10a)



In einem ausgeheizten Schlenk-Kolben wurde unter Argonatmosphäre eine Lösung von **M-9a** (4.69 g, 13.20 mmol, 1.00 Äquiv.) in absolutem THF (25 mL) bei 0 °C langsam zu einer Suspension von KH (30% Suspension in Mineralöl, 2.64 g, 19.80 mmol, 1.50 Äquiv.) in absolutem THF (75 mL) getropft. Es wurde 1 h bei 0 °C gerührt, die Reaktionsmischung anschließend auf –78 °C gekühlt und eine Lösung von ^tBuLi (1.6 M in Pentan, 17.3 mL, 27.72 mmol, 2.10 Äquiv.) tropfenweise über eine Kanüle zugegeben. Nach 45 min wurde 2,2,2-Trifluor-*N*-methoxy-*N*-methylacetamid (**M-5**, 4.15 g, 26.40 mmol, 2.00 Äquiv.) hinzugegeben und weitere 6 h bei –78 °C gerührt. Die Mischung wurde vorsichtig mit einer NH₄Cl-Lösung (ges., aq., 20 mL) gequenchet. Es wurden Wasser (50 mL) sowie EtOAc (100 mL) zugegeben, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit EtOAc (3 × 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Nach flashchromatographischer Reinigung an Kieselgel (^cHex/EtOAc 80:1) wurde die Titelverbindung als gelber Feststoff (3.78 g, 10.15 mmol, 77%) erhalten.

R_f: 0.42 (SiO₂, ^cHex/EtOAc 10:1).

Smb.: 110–111 °C (^cHex/EtOAc).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ /ppm = 8.19 (d, ³*J* = 8.7 Hz, 1H, *H*-6^{Ph}), 8.05 (s, 1H, *NH*), 7.80–7.72 (m, 2H, *H*-3^{Ph} und *H*-5^{Ph}), 2.76 (*pseudo-t*, *J* ≈ 5.2 Hz, 4H, 2 × *H*-2^{Pip} und 2 × *H*-6^{Pip}), 1.82–1.64 (m, 4H, 2 × *H*-3^{Pip} und 2 × *H*-5^{Pip}), 1.64–1.53 (m, 2H, 2 × *H*-4^{Pip}), 1.50 (s, 9H, C(CH₃)₃).

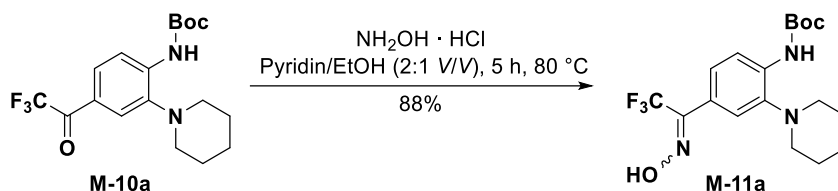
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ /ppm = 177.4 (q, ²*J*_{CF} = 34.0 Hz, CF₃C(O)), 151.3 (C=O), 141.8 (*C*-2^{Ph}), 140.8 (*C*-1^{Ph}), 127.8 (*C*-5^{Ph}), 122.7 (*C*-4^{Ph}), 121.8 (*C*-3^{Ph}), 116.4 (q, ¹*J*_{CF} = 292.1 Hz, CF₃), 116.3 (*C*-6^{Ph}), 80.7 (C(CH₃)₃), 52.8 (*C*-2^{Pip} und *C*-6^{Pip}), 27.7 (C(CH₃)₃), 26.0 (*C*-3^{Pip} und *C*-5^{Pip}), 23.2 (*C*-4^{Pip}).

¹⁹F-NMR (376 MHz, DMSO-*d*₆): δ /ppm = –71.12 (s, CF₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2936, 2359, 1738, 1697, 1593, 1519, 1442, 1223, 1190, 1127, 1051, 908.

ESI-MS (pos.): $m/z = 373.2$ (100%, $[M+H]^+$) und 317.2 (35%, $[M-tBu+H]^+$); m/z ber. für $[C_{18}H_{23}F_3N_2O_3+H]^+$ ($[M+H]^+$): 373.2.

tert-Butyl-(*E/Z*)-(2-(piperidin-1-yl)-4-(2,2,2-trifluor-1-(hydroxyimino)ethyl)phenyl)-carbamate (M-11a)



Eine Lösung von **M-10a** (2.00 g, 5.37 mmol, 1.00 Äquiv.) in Pyridin/EtOH (37.5 mL, 2:1 V/V) wurde mit Hydroxylamin-Hydrochlorid (448 mg, 6.44 mmol, 1.20 Äquiv.) versetzt und 5 h bei 80 °C gerührt. Nach vollständigem Umsatz (DC-Kontrolle) wurde die Mischung auf Raumtemperatur abgekühlt und das Lösemittel unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Der Rückstand wurde in EtOAc (100 mL) aufgenommen und mit Wasser (2 × 50 mL) sowie einer NaCl-Lösung (ges., aq., 2 × 50 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach flashchromatographischer Reinigung an Kieselgel (^cHex/EtOAc 8:1) wurde die Titelverbindung als farbloser Feststoff (1.84 g, 4.75 mmol, 88%) erhalten. Das Produkt lag als (*E/Z*)-Diastereomergemisch vor, wobei sich die Isomere anhand einiger Signale in den ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren unterscheiden ließen.

R_f: 0.33 und 0.36 (SiO₂, ^cHex/EtOAc 5:1).

Smb.: 143–144 °C (^cHex/EtOAc).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ /ppm = 12.90 und 12.66 (2 × s, 1H, NOH, beide Isomere), 7.95 und 7.93 (2 × d, ³J = 8.5 Hz, 1H, *H*-6^{Ph}, beide Isomere), 7.88 und 7.85 (2 × s, 1H, NH, beide Isomere), 7.32–7.14 (m, 2H, *H*-3^{Ph} und *H*-5^{Ph}), 2.73 (*pseudo*-q, *J* ≈ 4.9 Hz, 4H, 2 × *H*-2^{Pip} und 2 × *H*-6^{Pip}), 1.73–1.60 (m, 4H, 2 × *H*-3^{Pip} und 2 × *H*-5^{Pip}), 1.60–1.50 (m, 2H, 2 × *H*-4^{Pip}), 1.48 (s, 9H, C(CH₃)₃).

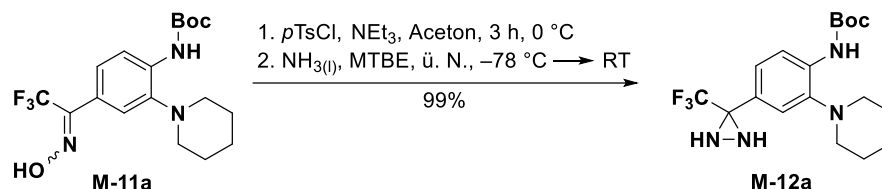
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ /ppm = 152.2 (C=O), 144.3 (q, ²J_{CF} = 28.1 Hz, CF₃C=NOH, ein Isomer), 144.0 (q, ²J_{CF} = 30.8 Hz, CF₃C=NOH, anderes Isomer) 142.4 und 142.2 (C-2^{Ph}, beide Isomere), 134.80 und 134.76 (C-1^{Ph}, beide Isomere), 124.9 (C-5^{Ph}, ein Isomer), 124.7 (C-4^{Ph}, ein Isomer), 124.5 (C-5^{Ph}, anderes Isomer), 121.3 (q, ¹J_{CF} = 274.0 Hz, CF₃, ein Isomer), 120.9 (C-3^{Ph}, ein Isomer), 120.7 (C-4^{Ph}, anderes Isomer), 120.4 (C-3^{Ph}, anderes Isomer), 118.6 (q, ¹J_{CF} = 283.0 Hz, CF₃, anderes Isomer), 117.9 (C-6^{Ph}), 80.04 und 80.00 (C(CH₃)₃, beide Isomere), 52.9 (C-2^{Pip} und C-6^{Pip}), 27.9 (C(C(CH₃)₃)), 26.2 (C-3^{Pip} und C-5^{Pip}), 23.4 (C-4^{Pip}).

¹⁹F-NMR (376 MHz, DMSO-*d*₆): δ /ppm = –62.80 und –65.58 (s, CF₃, beide Isomere).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3346, 2940, 2360, 1720, 1701, 1523, 1369, 1238, 1192, 1153, 1023, 964.

ESI-MS (pos.): m/z = 388.3 (100%, [M+H]⁺), 410.2 (5%, [M+Na]⁺) und 332.3 (9%, [M⁻Bu+H]⁺);
 m/z ber. für [C₁₈H₂₄F₃N₃O₃+H]⁺ ([M+H]⁺): 388.2.

tert-Butyl-(2-(piperidin-1-yl)-4-(3-(trifluormethyl)diaziridin-3-yl)phenyl)carbamate (M-12a)



Teil 1. Unter Argonatmosphäre wurde eine Lösung des Oxims **M-11a** (1.22 g, 3.14 mmol, 1.00 Äquiv.) in Aceton (50 mL) mit Triethylamin (1.3 mL, 9.42 mmol, 3.00 Äquiv.) bei 0 °C tropfenweise mit einer Lösung von *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (658 mg, 3.45 mmol, 1.10 Äquiv.) in Aceton (5 mL) versetzt. Es wurde 3 h bei 0 °C gerührt und das Lösemittel anschließend unter reduziertem Druck destillativ entfernt (kein Wärmebad!). Das rohe *O*-Tosyloxim wurde als gelber Feststoff erhalten, welcher direkt ohne weitere Reinigung im nächsten Schritt (**Teil 2**) eingesetzt wurde.¹

Teil 2.² In einen auf -78 °C temperierten Schlenk-Kolben mit flüssigem Ammoniak (ca. 50 mL) wurde unter Argonatmosphäre eine Suspension des *O*-Tosyloxims aus **Teil 1** in absolutem MTBE (25 mL) bei -78 °C tropfenweise zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 5 h bei -78 °C gerührt und über Nacht langsam auf Raumtemperatur erwärmt (der Argonballon wurde entfernt und der Seitenhahn des Schlenk-Kolbens offengelassen, um ein langsames Verdampfen des Ammoniaks zu gewährleisten). Die resultierende Suspension wurde mit MTBE (50 mL) sowie Wasser (50 mL) verdünnt und die wässrige Phase mit MTBE (3 × 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Die Titelverbindung **M-12a** wurde als farbloser Feststoff (1.21 g, 3.13 mmol, 99%) erhalten.

R_f: 0.38 (SiO₂, ^cHex/EtOAc 5:1).

Smb.: 123–125 °C (^cHex/EtOAc).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ /ppm = 7.87 (d, 1H, J = 8.3 Hz, H -6^{Ph}), 7.81 (s, 1H, NH), 7.30–7.21 (m, 2H, H -3^{Ph} und H -5^{Ph}), 4.02 (d, ³ J = 8.3 Hz, 1H, NH^{Diaziridin}), 3.89 (d, ³ J = 8.3 Hz, 1H, NH^{Diaziridin}), 2.79–2.68 (m, 4H, 2 × H -2^{Pip} und 2 × H -6^{Pip}), 1.74–1.60 (m, 4H, 2 × H -3^{Pip} und 2 × H -5^{Pip}), 1.59–1.50 (m, 2H, 2 × H -4^{Pip}), 1.48 (s, 9H, C(CH₃)₃).

¹Das Produkt erwies sich bei Erwärmen und auf Kieselgel als instabil, weshalb auf eine weitere Reinigung mittels Säulenchromatographie und das Verwenden des Wärmebads bei der Destillation des Lösemittels verzichtet werden sollte, um höhere Ausbeuten zu erzielen.

²Apparativer Aufbau: siehe Kap. 10.1.4.

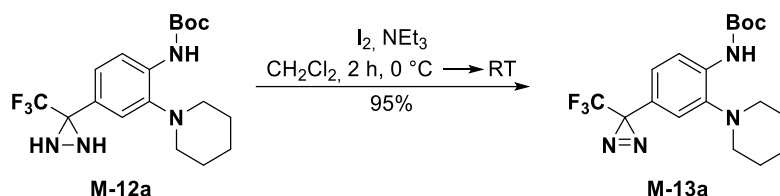
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ/ppm = 152.3 (C=O), 142.4 (C-2^{Ph}), 134.1 (C-1^{Ph}), 126.4 (C-4^{Ph}), 124.6 (C-5^{Ph}), 124.2 (q, ¹J_{CF} = 278.4 Hz, CF₃), 120.5 (C-3^{Ph}), 118.2 (C-6^{Ph}), 79.9 (C(CH₃)₃), 57.1 (q, ²J_{CF} = 34.8 Hz, C_q^{Diaziridin}), 52.9 (C-2^{Pip} und C-6^{Pip}), 27.9 (C(CH₃)₃), 26.1 (C-3^{Pip} und C-5^{Pip}), 23.5 (C-4^{Pip}).

¹⁹F-NMR (376 MHz, DMSO-*d*₆): δ/ppm = -74.98 (s, CF₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3367, 2937, 2359, 1722, 1522, 1464, 1420, 1371, 1215, 1146, 1095, 1027, 948, 831.

ESI-MS (pos.): *m/z* = 387.3 (100%, [M+H]⁺), 409.2 (3%, [M+Na]⁺) und 331.3 (9%, [M-^tBu+H]⁺); *m/z* ber. für [C₁₈H₂₅F₃N₄O₂+H]⁺ ([M+H]⁺): 387.2.

tert-Butyl-(2-(piperidin-1-yl)-4-(3-(trifluormethyl)-3*H*-diazirin-3-yl)phenyl)carbamat (M-13a)



Bem.: Diese Reaktion wurde zur Vermeidung einer partiellen Photolyse des Produktes unter Lichtausschluss durchgeführt (Aluminiumfolie wurde zur Ummantelung der eingesetzten Glasgeräte verwendet; vgl. auch Kap. 10.1.3.3 → „Reaktionsführung bei der Synthese photolabiler Substanzen“).

Zu einer Lösung des Diaziridins **M-12a** (1.00 g, 2.59 mmol, 1.00 Äquiv.) in wasserfreiem CH₂Cl₂ (25 mL) wurden Triethylamin (897 μ L, 6.47 mmol, 2.50 Äquiv.) und Iod (980 mg, 3.89 mmol, 1.50 Äquiv.) bei 0 °C hinzugefügt und 1 h bei 0 °C sowie 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem Umsatz des Startmaterials wurde die Reaktion durch Zugabe einer Na₂S₂O₃-Lösung (1 M, aq., 50 mL) gequenchet und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde mit CH₂Cl₂ (3 \times 50 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Extrakte mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (^cHex/EtOAc 50:1) wurde die Titelverbindung als farbloser Feststoff (948 mg, 2.47 mmol, 95%) erhalten.

R_f: 0.20 (SiO₂, ^cHex/EtOAc 50:1).

Smb.: 46–48 °C (^cHex/EtOAc).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ/ppm = 7.94 (d, ³J = 8.5 Hz, 1H, H-6^{Ph}), 7.85 (s, 1H, NH), 7.02 (dd, ³J = 8.5 Hz, ⁴J = 1.8 Hz, 1H, H-5^{Ph}), 6.92 (d, ⁴J = 1.8 Hz, 1H, H-3^{Ph}), 2.76–2.67 (m,

4H, $2 \times H-2^{Pip}$ und $2 \times H-6^{Pip}$), 1.72–1.59 (m, 4H, $2 \times H-3^{Pip}$ und $2 \times H-5^{Pip}$), 1.57–1.49 (m, 2H, $2 \times H-4^{Pip}$), 1.47 (s, 9H, $C(CH_3)_3$).

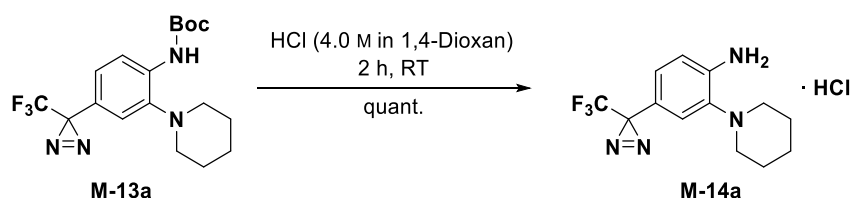
^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO- d_6): δ /ppm = 152.2 (C=O), 143.3 ($C-2^{Ph}$), 135.0 ($C-1^{Ph}$), 122.8 ($C-5^{Ph}$), 122.0 (q, $^1J_{CF} = 274.8$ Hz, CF_3), 121.6 ($C-4^{Ph}$), 119.1 ($C-6^{Ph}$), 118.4 ($C-3^{Ph}$), 80.2 ($C(CH_3)_3$), 52.6 ($C-2^{Pip}$ und $C-6^{Pip}$), 28.0 (q, $^2J_{CF} = 39.8$ Hz, $C_q^{Diazirin}$), 27.9 ($C(CH_3)_3$), 26.1 ($C-3^{Pip}$ und $C-5^{Pip}$), 23.4 ($C-4^{Pip}$).

^{19}F -NMR (282 MHz, DMSO- d_6): δ /ppm = –65.88 (s, CF_3).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3357, 2932, 1723, 1584, 1523, 1421, 1364, 1245, 1143, 1046, 979, 830.

ESI-MS (pos.): m/z = 385.3 (100%, $[M+H]^+$), 329.2 (17%, $[M-^tBu+H]^+$) und 301.2 (2%, $[M-^tBu-N_2]^+$); m/z ber. für $[C_{18}H_{23}F_3N_4O_2+H]^+$ ($[M+H]^+$): 385.2.

2-(Piperidin-1-yl)-4-(3-(trifluormethyl)-3H-diazirin-3-yl)anilin-Hydrochlorid (M-14a)



Bem.: Diese Reaktion wurde zur Vermeidung einer partiellen Photolyse des Produktes unter Lichtausschluss durchgeführt (Aluminiumfolie wurde zur Ummantelung der eingesetzten Glasgeräte verwendet; vgl. auch Kap. 10.1.3.3 → „Reaktionsführung bei der Synthese photolabiler Substanzen“).

Unter Argonatmosphäre wurde das Diazirin **M-13a** (1.20 g, 3.12 mmol, 1.00 Äquiv.) in einem 50 mL-Rundkolben vorgelegt und bei Raumtemperatur mit einer HCl-Lösung (4.0 M in 1,4-Dioxan, 15 mL) versetzt. Es wurde 2 h bei Raumtemperatur gerührt und das Lösemittel anschließend unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Der Rückstand wurde im Feinvakuum getrocknet, sodass die Titelverbindung als farbloser Feststoff (998 mg, 3.11 mmol, quant.) erhalten wurde, welcher ohne weitere Reinigung umgesetzt wurde.

R_f: 0.41 (SiO₂, $^{\circ}$ Hex/EtOAc 10:1).

Smb.: Zersetzung ≥ 200 °C ($^{\circ}$ Hex/EtOAc).

1H -NMR, COSY (300 MHz, Methanol- d_4): δ /ppm = 7.34–7.26 (m, 2H, $H-3^{Ph}$ und $H-5^{Ph}$), 7.14 (d, $^3J = 8.3$ Hz, 1H, $H-6^{Ph}$), 3.54 (pseudo-t, $J \approx 5.6$ Hz, 4H, $2 \times H-2^{Pip}$ und $2 \times H-6^{Pip}$), 2.20–2.05 (m, 4H, $2 \times H-3^{Pip}$ und $2 \times H-5^{Pip}$), 1.86–1.70 (m, 2H, $2 \times H-4^{Pip}$).

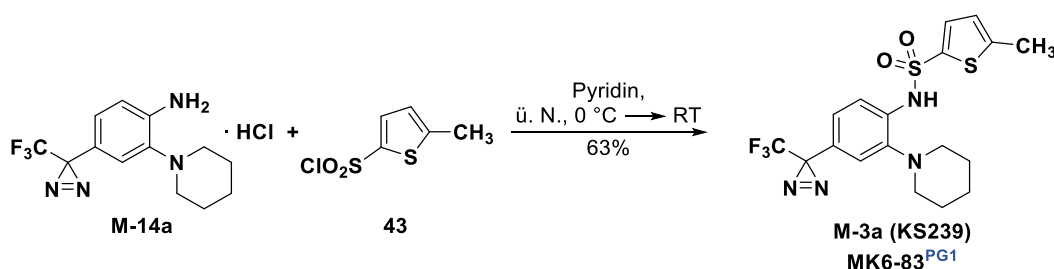
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, Methanol-*d*₄): δ/ppm = 141.5 (C-1^{Ph}), 132.0 (C-2^{Ph}), 129.8 (C-5^{Ph}), 123.5 (q, ¹J_{CF} = 273.7 Hz, CF₃), 121.8 (C-3^{Ph}), 121.3 (C-6^{Ph}), 121.2 (C-4^{Ph}), 56.3 (C-2^{Pip} und C-6^{Pip}), 29.2 (q, ²J_{CF} = 40.6 Hz, C_q^{Diazirin}), 24.8 (C-3^{Pip} und C-5^{Pip}), 22.6 (C-4^{Pip}).

¹⁹F-NMR (376 MHz, Methanol-*d*₄): δ/ppm = -68.72 (s, CF₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3418, 3154, 2400, 1655, 1524, 1317, 1244, 1148, 1137, 997, 820.

ESI-MS (pos.): *m/z* = 285.1 (100%, [M+H]⁺), 257.2 (18%, [M-N₂]⁺) und 172.1 (7%, [M-Pip-N₂]⁺); *m/z* ber. für [C₁₃H₁₅F₃N₄+H]⁺ ([M+H]⁺): 285.1.

5-Methyl-*N*-(2'-(piperidin-1-yl)-4'-(3-(trifluormethyl)-3*H*-diazirin-3-yl)phenyl)thio-phen-2-sulfonamid (MK6-83^{PG1}, M-3a, KS239)



Bem.: Diese Reaktion wurde zur Vermeidung einer partiellen Photolyse des Produktes unter Lichtausschluss durchgeführt (Aluminiumfolie wurde zur Ummantelung der eingesetzten Glasgeräte verwendet; vgl. auch Kap. 10.1.3.3 → „Reaktionsführung bei der Synthese photolabiler Substanzen“).

In einem ausgeheizten Schlenk-Kolben wurde unter Argonatmosphäre 5-Methylthiophen-2-sulfonylchlorid (574 mg, 2.92 mmol, 1.00 Äquiv.) bei 0 °C zu einer Lösung des Hydrochlorids **M-14a** (935 mg, 2.95 mmol, 1.00 Äquiv.) in trockenem Pyridin (10 mL) getropft. Die Mischung wurde 1 h bei 0 °C sowie über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und das Lösemittel anschließend unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Der Rückstand wurde in EtOAc (100 mL) aufgenommen, mit einer NH₄Cl-Lösung (ges., aq., 1 × 50 mL) und einer NaCl-Lösung (ges., aq., 2 × 50 mL) gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und unter vermindertem Druck eingeeengt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Hex/EtOAc 30:1) wurde die Titelverbindung als hellgelber Feststoff (824 mg, 1.85 mmol, 63%) erhalten.¹ Die Struktur von **KS239** wurde mittels Kristallstrukturanalysen (siehe **Kap. 3.2** und **Kap. 12.2.1**) bestätigt.

R_f: 0.15 (SiO₂, ^cHex/EtOAc 20:1).

¹In der Regel ist keine weitere Reinigung erforderlich, da Reinheiten ≥95% erzielt werden. Falls nötig, kann zusätzlich eine (semi-)präparative HPLC (C₁₈, Acetonitril/MilliQ®-Wasser 80:20 (isokratisch) über 90 min, Flussrate: 12.5 mL · min⁻¹, Detektion: 254 nm) durchgeführt werden.

Smb.: 92–94 °C (Hex/EtOAc).

¹H-NMR, COSY (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ/ppm = 9.07 (s, 1H, NH), 7.47 (d, ³J = 8.6 Hz, 1H, *H*-6^{Ph})¹, 7.47 (d, ³J = 3.7 Hz, 1H, *H*-3^{Thio})¹, 7.03 (ddd, ³J = 8.6 Hz, ⁴J = 2.2 Hz, *J* = 1.0 Hz, 1H, *H*-5^{Ph}), 6.89 (d, ⁴J = 2.2 Hz, 1H, *H*-3^{Ph}), 6.86 (dd, ³J = 3.7 Hz, ⁴J = 1.1 Hz, 1H, *H*-4^{Thio}), 2.59–2.52 (m, 4H, 2 × *H*-2^{Pip} und 2 × *H*-6^{Pip}), 2.45 (d, ⁴J = 1.1 Hz, 3H, CH₃), 1.67–1.57 (m, 4H, 2 × *H*-3^{Pip} und 2 × *H*-5^{Pip}), 1.52–1.42 (m, 2H, 2 × *H*-4^{Pip}).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (100.6 MHz, DMSO-*d*₆): δ/ppm = 148.1 (*C*-2^{Thio}), 145.6 (*C*-2^{Ph}), 136.9 (*C*-5^{Thio}), 133.8 (*C*-1^{Ph}), 133.1 (*C*-3^{Thio}), 126.4 (*C*-4^{Thio}), 123.8 (*C*-4^{Ph}), 122.8 (*C*-5^{Ph}), 121.9 (q, ¹J_{CF} = 274.8 Hz, CF₃), 120.7 (*C*-6^{Ph}), 119.2 (*C*-3^{Ph}), 52.8 (*C*-2^{Pip} und *C*-6^{Pip}), 27.9 (q, ²J_{CF} = 39.9 Hz, C_q^{Diazirin}), 25.6 (*C*-3^{Pip} und *C*-5^{Pip}), 23.4 (*C*-4^{Pip}), 15.1 (CH₃).

¹⁹F-NMR (376 MHz, DMSO-*d*₆): δ/ppm = –65.79 (s, CF₃).

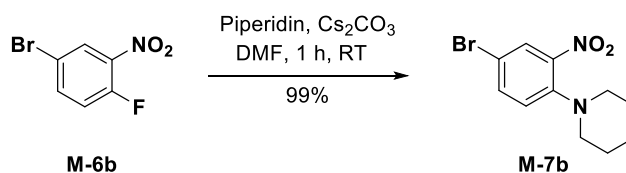
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2938, 2855, 1505, 1440, 1342, 1245, 1153, 1123, 1022, 905, 823.

ESI-MS (pos.): *m/z* = 445.2 (100%, [M+H]⁺), 467.1 (3%, [M+Na]⁺) und 417.2 (4%, [M–N₂]⁺); *m/z* ber. für [C₁₈H₁₉F₃N₄O₂S₂+H]⁺ ([M+H]⁺): 445.1.

HPLC-Analyse (C₁₈): *t*_R = 2.51 min, Peakfläche: 99.80% (Acetonitril/MilliQ®-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 80:20 über 8 min, Flussrate: 0.7 mL · min⁻¹, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 μL, Säulenofentemperatur: 40 °C).

10.6.2 Synthese des modifizierten TRPML1-Aktivators MK6-83^{PG2}

1-(4-Brom-2-nitrophenyl)piperidin (M-7b)



Die Synthese erfolgte in Anlehnung an eine modifizierte Vorschrift von Yin *et al.*^[194] Zu einer Suspension aus 4-Brom-1-fluor-2-nitrobenzol (20.00 g, 90.91 mmol, 1.00 Äquiv.) und Cs₂CO₃ (44.43 g, 136.37 mmol, 1.50 Äquiv.) in DMF (200 mL) wurde Piperidin (9.4 mL, 95.45 mmol, 1.05 Äquiv.) bei Raumtemperatur zugegeben und die Mischung 1 h gerührt. Das Lösemittel wurde anschließend unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand in EtOAc (200 mL) sowie in einer NaCl-Lösung (ges., aq., 200 mL) aufgenommen. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3 × 200 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit einer NaCl-Lösung (ges., aq., 1 × 200 mL) gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und unter reduziertem Druck eingeeengt. Die Titelverbindung

¹überlappende Signale

wurde als leuchtend-rotes Öl (25.80 g, 90.87 mmol, 99%) erhalten, welches beim Einfrieren rote Kristalle ergab.

R_f: 0.49 (SiO₂, ^cHex/EtOAc 20:1).

Smb.: 51–52 °C (EtOAc).

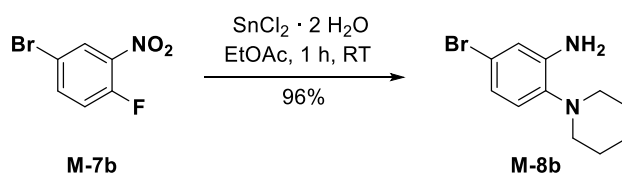
¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ/ppm = 7.98 (d, ⁴J = 2.5 Hz, 1H, *H*-3^{Ph}), 7.69 (dd, ³J = 8.9 Hz, ⁴J = 2.5 Hz, 1H, *H*-5^{Ph}), 7.23 (d, ³J = 8.9 Hz, 1H, *H*-6^{Ph}), 3.01–2.89 (m, 4H, 2 × *H*-2^{Pip} und 2 × *H*-6^{Pip}), 1.65–1.45 (m, 6H, 2 × *H*-3^{Pip}, 2 × *H*-5^{Pip} und 2 × *H*-4^{Pip}).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ/ppm = 145.2 (*C*-1^{Ph}), 142.5 (*C*-2^{Ph}), 136.1 (*C*-5^{Ph}), 127.6 (*C*-3^{Ph}), 123.3 (*C*-6^{Ph}), 111.4 (*C*-4^{Ph}), 52.1 (*C*-2^{Pip} und *C*-6^{Pip}), 25.4 (*C*-3^{Pip} und *C*-5^{Pip}), 23.3 (*C*-4^{Pip}).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2933, 2814, 1598, 1506, 1448, 1324, 1281, 1224, 1127, 1022, 828.

ESI-MS (pos.): *m/z* = 285.1 (87%, [M+H]⁺)/287.0 (100%, [M+H]⁺); *m/z* ber. für [C₁₁H₁₃BrN₂O₂+H]⁺ ([M+H]⁺): 285.0/287.0.

5-Brom-2-(piperidin-1-yl)anilin (M-8b)



Die Synthese wurde in Anlehnung an eine modifizierte Vorschrift von Yin *et al.* durchgeführt.^[194] Zu einer Lösung von **M-7b** (10.00 g, 35.21 mmol, 1.00 Äquiv.) in EtOAc (250 mL) wurde SnCl₂ · 2 H₂O (27.00 g, 105.63 mmol, 3.00 Äquiv.) portionsweise zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde durch Zugabe von einer KF-Lösung (2 M, aq., 200 mL) gequenchet und weitere 30 min gerührt. Die wässrige Phase wurde anschließend mit EtOAc (3 × 100 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Extrakte mit einer KF-Lösung (1 M, aq., 1 × 100 mL) sowie mit einer NaCl-Lösung (ges., aq., 2 × 100 mL) gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Die Titelverbindung wurde als gelber Feststoff (8.64 g, 33.86 mmol, 96%) erhalten, welcher ohne weitere Reinigung eingesetzt werden konnte.

R_f: 0.43 (SiO₂, ^cHex/EtOAc 20:1).

Smb.: 71–73 °C (EtOAc).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ/ppm = 6.82 (d, ⁴J = 2.3 Hz, 1H, *H*-6^{Ph}), 6.76 (d, ³J = 8.3 Hz, 1H, *H*-3^{Ph}), 6.63 (dd, ³J = 8.3, ⁴J = 2.4 Hz, 1H, *H*-4^{Ph}), 4.96 (s (br), 2H, NH₂), 2.69 (*pseudo-t*,

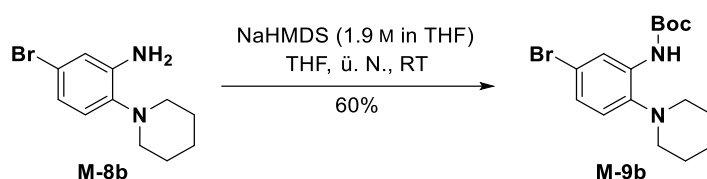
$J \approx 5.1$ Hz, 4H, $2 \times H-2^{Pip}$ und $2 \times H-6^{Pip}$), 1.63 (*pseudo-p*, $J \approx 5.5$ Hz, 4H, $2 \times H-3^{Pip}$ und $2 \times H-5^{Pip}$), 1.55–1.43 (m, 2H, $2 \times H-4^{Pip}$).

$^{13}\text{C-NMR}$, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO- d_6): $\delta/\text{ppm} = 144.3$ ($C-1^{Ph}$), 138.6 ($C-2^{Ph}$), 121.0 ($C-3^{Ph}$), 118.5 ($C-4^{Ph}$), 116.0 ($C-5^{Ph}$ und $C-6^{Ph}$), 51.7 ($C-2^{Pip}$ und $C-6^{Pip}$), 26.1 ($C-3^{Pip}$ und $C-5^{Pip}$), 23.9 ($C-4^{Pip}$).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3443, 3343, 2932, 2794, 1593, 1495, 1379, 1229, 1200, 843, 795.

ESI-MS (pos.): $m/z = 255.2$ (96%, $[\text{M}+\text{H}]^+$)/257.0 (100%, $[\text{M}+\text{H}]^+$); m/z ber. für $[\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{BrN}_2+\text{H}]^+$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 255.0/257.0.

tert-Butyl-(5-brom-2-(piperidin-1-yl)phenyl)carbamate (M-9b)



Die Synthese erfolgte in Anlehnung an eine Vorschrift Kelly *et al.*^[459] In einem ausgeheizten Schlenk-Kolben wurde unter Argonatmosphäre eine Lösung von NaHMDS (1.9 M in THF, 25.0 mL, 47.02 mmol, 2.00 Äquiv.) bei Raumtemperatur langsam in eine Lösung des Anilins **M-8b** (6.00 g, 23.51 mmol, 1.00 Äquiv.) in absolutem THF (25 mL) getropft. Nach 15 min wurde eine Lösung von Boc₂O (5.13 g, 23.51 mmol, 1.00 Äquiv.) in absolutem THF (5 mL) hinzugefügt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe einer NH₄Cl-Lösung (ges., aq., 20 mL) gequenchet und das Lösemittel unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3 × 100 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Extrakte mit Na₂SO₄ getrocknet sowie unter vermindertem Druck eingengt. Nach flashchromatographischer Reinigung an Kieselgel (^cHex/EtOAc 80:1) wurde die Titelverbindung als rotes Öl (5.04 g, 14.19 mmol, 60%) erhalten, welches beim Einfrieren kristallisierte.

R_f: 0.53 (SiO₂, ^cHex/EtOAc 20:1).

Smb.: 83–85 °C (^cHex/EtOAc).

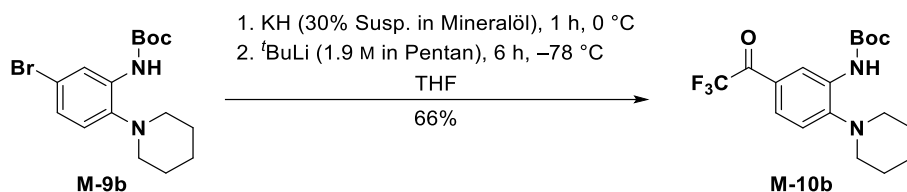
$^1\text{H-NMR}$, COSY (300 MHz, DMSO- d_6): $\delta/\text{ppm} = 8.03$ (d, $^4J = 2.3$ Hz, 1H, $H-6^{Ph}$), 7.80 (s, 1H, NH), 7.16 (dd, $^3J = 8.5$ Hz, $^4J = 2.3$ Hz, 1H, $H-4^{Ph}$), 7.10 (d, $^3J = 8.5$ Hz, 1H, $H-3^{Ph}$), 2.69 (*pseudo-t*, $J \approx 5.2$ Hz, 4H, $2 \times H-2^{Pip}$ und $2 \times H-6^{Pip}$), 1.71–1.58 (m, 4H, $2 \times H-3^{Pip}$ und $2 \times H-5^{Pip}$), 1.58–1.48 (m, 2H, $2 \times H-4^{Pip}$), 1.47 (s, 9H, (C(CH₃)₃)).

$^{13}\text{C-NMR}$, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO- d_6): $\delta/\text{ppm} = 152.2$ (C=O), 141.8 ($C-2^{Ph}$), 134.6 ($C-1^{Ph}$), 125.3 ($C-4^{Ph}$), 122.7 ($C-3^{Ph}$), 120.6 ($C-6^{Ph}$), 116.5 ($C-5^{Ph}$), 80.2 (C(CH₃)₃), 52.8 ($C-2^{Pip}$ und $C-6^{Pip}$), 27.9 (C(CH₃)₃), 26.1 ($C-3^{Pip}$ und $C-5^{Pip}$), 23.4 ($C-4^{Pip}$).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3443, 3343, 2932, 2814, 2358, 1718, 1593, 1495, 1437, 1228, 1026, 843, 796.

ESI-MS (pos.): m/z = 355.2 (100%, [M+H]⁺)/357.1 (91%, [M+H]⁺) und 299.2 (24%, [M-^tBu+H]⁺)/301.1 (23%, [M-^tBu+H]⁺); m/z ber. für [C₁₆H₂₃BrN₂O₂+H]⁺ ([M+H]⁺): 355.1/357.1.

tert-Butyl-(2-(piperidin-1-yl)-5-(2,2,2-trifluoroacetyl)phenyl)carbamate (M-10b)



In einem ausgeheizten Schlenk-Kolben wurde unter Argonatmosphäre eine Lösung von **M-9b** (4.74 g, 13.34 mmol, 1.00 Äquiv.) in absolutem THF (25 mL) bei 0 °C langsam zu einer Suspension von KH (30% Suspension in Mineralöl, 2.68 g, 20.01 mmol, 1.50 Äquiv.) in absolutem THF (100 mL) getropft. Es wurde 1 h bei 0 °C gerührt, die Reaktionsmischung anschließend auf -78 °C gekühlt und eine Lösung von ^tBuLi (1.9 M in Pentan, 14.7 mL, 28.01 mmol, 2.10 Äquiv.) tropfenweise über eine Kanüle zugegeben. Nach 1 h wurde 2,2,2-Trifluor-*N*-methoxy-*N*-methylacetamid (**M-5**, 4.19 g, 26.68 mmol, 2.00 Äquiv.) hinzugegeben und weitere 6 h bei -78 °C gerührt. Die Mischung wurde vorsichtig mit einer NH₄Cl-Lösung (ges., aq., 25 mL) gequenchet. Es wurden Wasser (50 mL) sowie EtOAc (100 mL) zugegeben, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit EtOAc (3 × 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Nach flashchromatographischer Reinigung an Kieselgel (°Hex/EtOAc 30:1) wurde die Titelverbindung als hellgelber Feststoff (3.26 g, 8.76 mmol, 66%) erhalten.

R_f: 0.18 (SiO₂, °Hex/EtOAc 20:1).

Smb.: 106–107 °C (°Hex/EtOAc).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ /ppm = 8.21 (d, ⁴*J* = 2.3 Hz, 1H, *H*-6^{Ph}), 8.04 (s, 1H, *NH*), 7.73 (ddq, ³*J* = 8.6 Hz, ⁴*J* = 2.3 Hz, *J* = 1.4 Hz, 1H, *H*-4^{Ph}), 7.22 (d, ³*J* = 8.6 Hz, 1H, *H*-3^{Ph}), 3.03–2.93 (m, 4H, 2 × *H*-2^{Pip} und 2 × *H*-6^{Pip}), 1.80–1.62 (m, 4H, 2 × *H*-3^{Pip} und 2 × *H*-5^{Pip}), 1.62–1.52 (m, 2H, 2 × *H*-4^{Pip}), 1.47 (s, 9H, C(CH₃)₃).

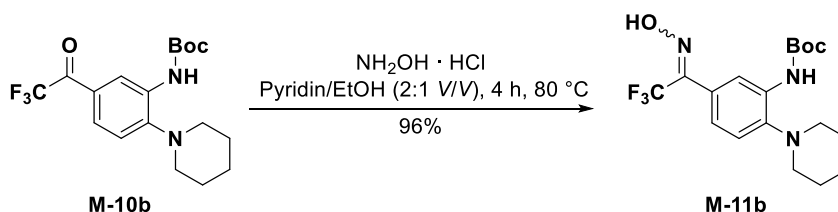
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ /ppm = 178.0 (q, ²*J*_{CF} = 33.5 Hz, CF₃C(O)), 152.8 (C=O), 152.0 (C-2^{Ph}), 131.4 (C-1^{Ph}), 127.0 (C-4^{Ph}), 123.9 (C-6^{Ph}), 122.4 (C-5^{Ph}), 119.8 (C-3^{Ph}), 116.7 (q, ¹*J*_{CF} = 292.0 Hz, CF₃), 79.8 (C(CH₃)₃), 51.3 (C-2^{Pip} und C-6^{Pip}), 28.0 (C(CH₃)₃), 25.5 (C-3^{Pip} und C-5^{Pip}), 23.6 (C-4^{Pip}).

¹⁹F-NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆): δ /ppm = -71.13 (s, CF₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2945, 1731, 1699, 1599, 1527, 1442, 1239, 1138, 1127, 1103, 917, 767, 734, 657.

ESI-MS (pos.): m/z = 373.2 (100%, [M+H]⁺) und 317.2 (30%, [M-^tBu+H]⁺); m/z ber. für [C₁₈H₂₃F₃N₂O₃+H]⁺ ([M+H]⁺): 373.2.

tert-Butyl-(*E/Z*)-(2-(piperidin-1-yl)-5-(2,2,2-trifluor-1-(hydroxyimino)ethyl)phenyl)-carbamate (M-11b)



Eine Lösung aus **M-10b** (3.06 g, 8.22 mmol, 1.00 Äquiv.) in Pyridin/EtOH (60 mL, 2:1 V/V) wurde mit Hydroxylamin-Hydrochlorid (685 mg, 9.86 mmol, 1.20 Äquiv.) versetzt und 4 h bei 80 °C gerührt. Nach vollständigem Umsatz (DC-Kontrolle) wurde die Mischung auf Raumtemperatur abgekühlt und das Lösemittel unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Der Rückstand wurde in EtOAc (100 mL) aufgenommen und mit einer NH₄Cl-Lösung (ges., aq., 1 × 50 mL) sowie einer NaCl-Lösung (ges., aq., 1 × 50 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck destillativ entfernt. Die Titelverbindung wurde als farbloser Feststoff (3.07 g, 7.92 mmol, 96%) erhalten, wobei das Produkt als (*E/Z*)-Diastereomerenmisch vorlag, dessen Isomere sich anhand einiger Signale in den ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren unterscheiden ließen.

R_f: 0.32 (SiO₂, ^cHex/EtOAc 5:1).

Smb.: 69–72 °C (^cHex/EtOAc).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ /ppm = 12.95 und 12.67 (2 × s, 1H, NOH, beide Isomere), 7.98 und 7.95 (2 × d, ⁴J = 2.0 Hz, 1H, *H*-6^{Ph}, beide Isomere), 7.77 und 7.75 (2 × s, 1H, NH, beide Isomere), 7.21 und 7.18 (2 × d, ³J = 8.2 Hz, 1H, *H*-3^{Ph}, beide Isomere), 7.15–7.08 (m, 1H, *H*-4^{Ph}), 2.76 (*pseudo*-q, *J* ≈ 4.8 Hz, 4H, 2 × *H*-2^{Pip} und 2 × *H*-6^{Pip}), 1.73–1.59 (m, 4H, 2 × *H*-3^{Pip} und 2 × *H*-5^{Pip}), 1.59–1.48 (m, 2H, 2 × *H*-4^{Pip}), 1.46 (2 × s, 9H, C(CH₃)₃, beide Isomere).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ /ppm = 152.4 (C=O), 144.49 und 144.36 (C-2^{Ph}, beide Isomere), 144.41 (q, ²J_{CF} = 28.1 Hz, CF₃CNOH, ein Isomer) und 144.40 (q, ²J_{CF} = 31.0 Hz, CF₃CNOH, anderes Isomer), 132.8 und 132.7 (C-1^{Ph}, beide Isomere), 126.0 (C-5^{Ph}, ein Isomer), 123.5 und 122.9 (C-4^{Ph}, beide Isomere), 122.0 (C-5^{Ph}, anderes Isomer), 121.2 (q, ¹J_{CF} = 274.2 Hz, CF₃, ein Isomer), 120.34 und 120.31 (C-3^{Ph}, beide Isomere), 119.2 und 118.58 (C-6^{Ph}, beide Isomere), 118.56 (q, ¹J_{CF} = 283.0 Hz, CF₃, anderes Isomer), 79.9 und 79.8 (C(CH₃)₃, beide

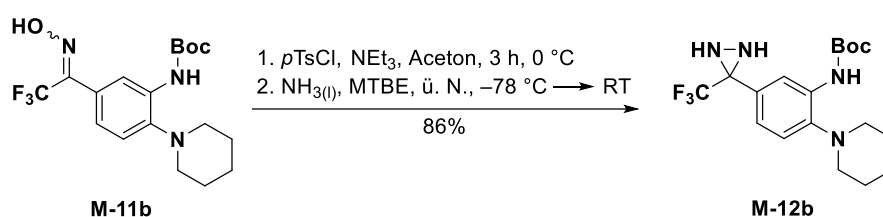
Isomere), 52.6 und 52.5 ($C\text{-}2^{Pip}$ und $C\text{-}6^{Pip}$, beide Isomere), 27.9 ($C(\underline{C}H_3)_3$), 26.0 ($C\text{-}3^{Pip}$ und $C\text{-}5^{Pip}$), 23.5 ($C\text{-}4^{Pip}$).

$^{19}F\text{-NMR}$ (376 MHz, DMSO- d_6): $\delta/\text{ppm} = -62.78$ und -65.86 (s, CF_3 , beide Isomere).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3331, 2938, 1681, 1522, 1444, 1369, 1235, 1150, 1128, 1105, 1023, 978, 821, 719.

ESI-MS (pos.): $m/z = 388.3$ (100%, $[M+H]^+$) und 332.2 (20%, $[M\text{-}^t\text{Bu}+H]^+$); m/z ber. für $[C_{18}H_{24}F_3N_3O_3+H]^+$ ($[M+H]^+$): 388.2.

tert-Butyl-(2-(piperidin-1-yl)-5-(3-(trifluormethyl)diaziridin-3-yl)phenyl)carbamate (M-12b)



Teil 1. Unter Argonatmosphäre wurde eine Lösung des Oxims **M-11b** (3.05 g, 7.87 mmol, 1.00 Äquiv.) in Aceton (80 mL) mit Triethylamin (3.3 mL, 23.61 mmol, 3.00 Äquiv.) bei 0 °C tropfenweise mit einer Lösung von *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (1.65 g, 8.66 mmol, 1.10 Äquiv.) in Aceton (10 mL) versetzt. Es wurde 3 h bei 0 °C gerührt und das Lösemittel anschließend unter reduziertem Druck destillativ entfernt (kein Wärmebad!). Das rohe *O*-Tosyloxim wurde als gelber Feststoff erhalten, welcher direkt ohne weitere Reinigung im nächsten Schritt (**Teil 2**) eingesetzt wurde.¹

Teil 2.² In einen auf -78 °C temperierten Schlenk-Kolben mit flüssigem Ammoniak (ca. 100 mL) wurde unter Argonatmosphäre eine Suspension des *O*-Tosyloxims aus **Teil 1** in absolutem MTBE (75 mL) bei -78 °C tropfenweise zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 6 h bei -78 °C gerührt und über Nacht langsam auf Raumtemperatur erwärmt (der Argonballon wurde entfernt und der Seitenhahn des Schlenk-Kolbens offengelassen, um ein langsames Verdampfen des Ammoniaks zu gewährleisten). Die resultierende Suspension wurde mit MTBE (100 mL) sowie Wasser (100 mL) verdünnt und die wässrige Phase mit MTBE (3 × 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Hex/EtOAc 12:1) wurde die Titelverbindung **M-12b** als farbloser, amorpher Feststoff (2.61 g, 6.75 mmol, 86%) erhalten.

¹Das Produkt erwies sich bei Erwärmen und auf Kieselgel als instabil, weshalb auf eine weitere Reinigung mittels Säulenchromatographie und das Verwenden des Wärmebads bei der Destillation des Lösemittels verzichtet werden sollte, um höhere Ausbeuten zu erzielen.

²Apparativer Aufbau: siehe Kap. 10.1.4.

R_f: 0.33 (SiO₂, ^cHex/EtOAc 5:1).

Smb.: – (amorph).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ/ppm = 8.10 (d, ⁴J = 1.8 Hz, 1H, H-6^{Ph}), 7.77 (s, 1H, NH), 7.25–7.12 (m, 2H, H-3^{Ph} und H-4^{Ph}), 4.02 (d, ³J = 8.2 Hz, 1H, NH^{Diaziridin}), 3.88 (d, ³J = 8.2 Hz, 1H, NH^{Diaziridin}), 2.73 (pseudo-t, J ≈ 5.2 Hz, 4H, 2 × H-2^{Pip} und 2 × H-6^{Pip}), 1.73–1.60 (m, 4H, 2 × H-3^{Pip} und 2 × H-5^{Pip}), 1.60–1.49 (m, 2H, 2 × H-4^{Pip}), 1.48 (s, 9H, C(CH₃)₃).

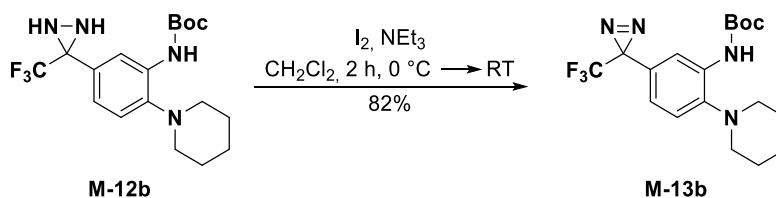
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ/ppm = 152.3 (C=O), 143.7 (C-2^{Ph}), 132.8 (C-1^{Ph}), 127.9 (C-5^{Ph}), 124.2 (q, ¹J_{CF} = 278.6 Hz, CF₃), 123.1 (C-4^{Ph}), 120.3 (C-3^{Ph}), 118.6 (C-6^{Ph}), 79.8 (C(CH₃)₃), 57.3 (q, ²J_{CF} = 34.8 Hz, C_q^{Diaziridin}), 52.7 (C-2^{Pip} und C-6^{Pip}), 27.9 (C(CH₃)₃), 26.1 (C-3^{Pip} und C-5^{Pip}), 23.5 (C-4^{Pip}).

¹⁹F-NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆): δ/ppm = –74.98 (s, CF₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3258, 2936, 1725, 1581, 1524, 1443, 1368, 1231, 1211, 1140, 1104, 1049, 1024, 819, 709.

ESI-MS (pos.): *m/z* = 387.3 (100%, [M+H]⁺), und 331.3 (17%, [M-^tBu+H]⁺); *m/z* ber. für [C₁₈H₂₅F₃N₄O₂+H]⁺ ([M+H]⁺): 387.2.

tert-Butyl-(2-(piperidin-1-yl)-5-(3-(trifluormethyl)-3*H*-diazirin-3-yl)phenyl)carbamate (M-13b)



Bem.: Diese Reaktion wurde zur Vermeidung einer partiellen Photolyse des Produktes unter Lichtausschluss durchgeführt (Aluminiumfolie wurde zur Ummantelung der eingesetzten Glasgeräte verwendet; vgl. auch Kap. 10.1.3.3 → „Reaktionsführung bei der Synthese photolabiler Substanzen“).

Zu einer Lösung des Diaziridins **M-12b** (2.44 g, 6.31 mmol, 1.00 Äquiv.) in wasserfreiem CH₂Cl₂ (70 mL) wurden Triethylamin (2.2 mL, 15.79 mmol, 2.50 Äquiv.) und Iod (2.39 g, 9.47 mmol, 1.50 Äquiv.) bei 0 °C hinzugefügt und 1 h bei 0 °C sowie 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem Umsatz des Startmaterials wurde die Reaktion durch Zugabe einer Na₂S₂O₃-Lösung (1 M, aq., 50 mL) gequencht und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde mit CH₂Cl₂ (3 × 100 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Extrakte mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an

Kieselgel (^cHex/EtOAc 100:1) wurde die Titelverbindung als leuchtend-gelber Feststoff (2.00 g, 5.20 mmol, 82%) erhalten.

R_f: 0.33 (SiO₂, ^cHex/EtOAc 50:1).

Smb.: 56–58 °C (^cHex/EtOAc).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ/ppm = 7.82–7.74 (m, 2H, *H*-6^{Ph} und *NH*), 7.22 (d, ³*J* = 8.4 Hz, 1H, *H*-3^{Ph}), 6.86 (dd, ³*J* = 8.3, ⁴*J* = 2.4 Hz, 1H, *H*-4^{Ph}), 2.72 (*pseudo-t*, *J* ≈ 5.2 Hz, 4H, 2 × *H*-2^{Pip} und 2 × *H*-6^{Pip}), 1.71–1.58 (m, 4H, 2 × *H*-3^{Pip} und 2 × *H*-5^{Pip}), 1.58–1.49 (m, 2H, 2 × *H*-4^{Pip}), 1.47 (s, 9H, C(CH₃)₃).

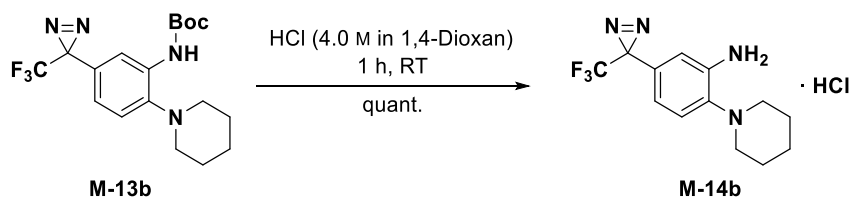
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ/ppm = 152.3 (C=O), 144.5 (C-2^{Ph}), 133.6 (C-1^{Ph}), 123.0 (C-5^{Ph}), 122.0 (q, ¹*J*_{CF} = 274.8 Hz, CF₃), 121.3 (C-3^{Ph}), 121.1 (C-4^{Ph}), 116.2 (C-6^{Ph}), 80.2 (C(CH₃)₃), 52.5 (C-2^{Pip} und C-6^{Pip}), 28.1 (q, ²*J*_{CF} = 39.9 Hz, C_q^{Diazirin}), 27.9 (C(CH₃)₃), 26.0 (C-3^{Pip} und C-5^{Pip}), 23.5 (C-4^{Pip}).

¹⁹F-NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆): δ/ppm = –65.85 (s, CF₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3356, 2940, 1729, 1525, 1440, 1366, 1252, 1148, 1106, 1049, 989, 894, 806.

ESI-MS (pos.): *m/z* = 385.2 (100%, [M+H]⁺), 329.2 (54%, [M-^tBu+H]⁺), 301.2 (17%, [M-^tBu-N₂]⁺) und 257.2 (9%, [M-Boc-N₂]⁺); *m/z* ber. für [C₁₈H₂₃F₃N₄O₂+H]⁺ ([M+H]⁺): 385.2.

2-(Piperidin-1-yl)-5-(3-(trifluormethyl)-3*H*-diazirin-3-yl)anilin-Hydrochlorid (M-14b)



Bem.: Diese Reaktion wurde zur Vermeidung einer partiellen Photolyse des Produktes unter Lichtausschluss durchgeführt (Aluminiumfolie wurde zur Ummantelung der eingesetzten Glasgeräte verwendet; vgl. auch Kap. 10.1.3.3 → „Reaktionsführung bei der Synthese photolabiler Substanzen“).

Unter Argonatmosphäre wurde das Diazirin **M-13b** (1.20 g, 3.12 mmol, 1.00 Äquiv.) in einem 50 mL-Rundkolben vorgelegt und bei Raumtemperatur mit einer HCl-Lösung (4.0 M in 1,4-Dioxan, 15 mL) versetzt. Es wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt und das Lösemittel anschließend unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Der Rückstand wurde im Feinvakuum getrocknet, sodass die Titelverbindung als gelbes Öl (1.00 g, 3.12 mmol, quant.) erhalten wurde, welches ohne weitere Reinigung im nächsten Schritt eingesetzt wurde.

R_f: 0.59 (SiO₂, ^cHex/EtOAc 10:1).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, Methanol-*d*₄): δ /ppm = 7.58 (d, ³*J* = 8.7 Hz, 1H, *H*-3^{Ph}), 6.94 (d, ⁴*J* = 2.2 Hz, 1H, *H*-6^{Ph}), 6.80 (dd, ³*J* = 8.7 Hz, ⁴*J* = 2.2 Hz, 1H, *H*-4^{Ph}), 3.52–3.43 (m, 4H, 2 × *H*-2^{Pip} und 2 × *H*-6^{Pip}), 2.15–2.01 (m, 4H, 2 × *H*-3^{Pip} und 2 × *H*-5^{Pip}), 1.83–1.69 (m, 2H, 2 × *H*-4^{Pip}).

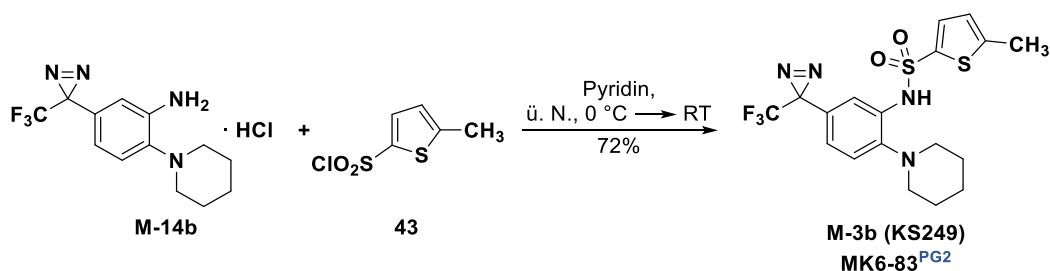
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, Methanol-*d*₄): δ /ppm = 139.9 (*C*-1^{Ph}), 134.6 (*C*-2^{Ph}), 131.1 (*C*-5^{Ph}), 123.4 (q, ¹*J*_{CF} = 274.0 Hz, CF₃), 123.4 (*C*-3^{Ph}), 119.7 (*C*-4^{Ph}), 118.8 (*C*-6^{Ph}), 56.2 (*C*-2^{Pip} und *C*-6^{Pip}), 29.1 (q, ²*J*_{CF} = 40.6 Hz, C_q^{Diazirin}), 25.1 (*C*-3^{Pip} und *C*-5^{Pip}), 23.0 (*C*-4^{Pip}).

¹⁹F-NMR (282 MHz, Methanol-*d*₄): δ /ppm = –68.06 (s, CF₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3323, 3191, 1955, 1609, 1519, 1441, 1286, 1220, 1151, 1120, 1012, 872, 854, 723.

ESI-MS (pos.): *m/z* = 285.1 (100%, [M+H]⁺), 257.2 (10%, [M–N₂]⁺) und 172.1 (7%, [M–Pip–N₂]⁺); *m/z* ber. für [C₁₃H₁₅F₃N₄+H]⁺ ([M+H]⁺): 285.1.

5-Methyl-*N*-(2'-(piperidin-1-yl)-5'-(3-(trifluormethyl)-3*H*-diazirin-3-yl)phenyl)thio-phen-2-sulfonamid (MK6-83^{PG2}, M-3b, KS249)



Bem.: Diese Reaktion wurde zur Vermeidung einer partiellen Photolyse des Produktes unter Lichtausschluss durchgeführt (Aluminiumfolie wurde zur Ummantelung der eingesetzten Glasgeräte verwendet; vgl. auch Kap. 10.1.3.3 → „Reaktionsführung bei der Synthese photolabiler Substanzen“).

In einem ausgeheizten Schlenk-Kolben wurde unter Argonatmosphäre 5-Methylthiophen-2-sulfonylchlorid (610 mg, 3.10 mmol, 1.00 Äquiv.) bei 0 °C zu einer Lösung des Hydrochlorids **M-14b** (994 mg, 3.10 mmol, 1.00 Äquiv.) in trockenem Pyridin (25 mL) zugetropft. Die Mischung wurde 1 h bei 0 °C sowie über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und das Lösemittel anschließend unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Der Rückstand wurde in EtOAc (100 mL) aufgenommen, mit einer NH₄Cl-Lösung (ges., aq., 2 × 100 mL) und einer NaCl-Lösung (ges., aq., 1 × 100 mL) gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und unter vermindertem Druck eingengt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (^cHex/EtOAc 30:1) wurde die Titelverbindung

als hellgelber Feststoff (991 mg, 2.23 mmol, 72%) erhalten.¹ Die Struktur von **KS249** wurde mittels Kristallstrukturanalysen (siehe **Kap. 3.2** und **Kap. 12.2.2**) bestätigt.

R_f: 0.21 (SiO₂, ^cHex/EtOAc 10:1).

Smb.: 107–109 °C (^cHex/EtOAc).

¹H-NMR, COSY (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ /ppm = 9.15 (s, 1H, NH), 7.39 (d, ³J = 3.8 Hz, 1H, H-3^{Thio}), 7.19 (d, ³J = 8.4 Hz, 1H, H-3^{Ph})², 7.19 (dd, ⁴J = 2.3 Hz, J = 0.8 Hz, 1H, H-6^{Ph})², 6.89 (dd, ³J = 8.4 Hz, ⁴J = 2.3 Hz, 1H, H-4^{Ph}), 6.88 (dd, ³J = 3.8 Hz, ⁴J = 1.4 Hz, 1H, H-4^{Thio}), 2.66–2.59 (m, 4H, 2 × H-2^{Pip} und 2 × H-6^{Pip}), 2.47 (d, ⁴J = 1.1 Hz, 3H, CH₃), 1.66–1.56 (m, 4H, 2 × H-3^{Pip} und 2 × H-5^{Pip}), 1.52–1.42 (m, 2H, 2 × H-4^{Pip}).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (100.6 MHz, DMSO-*d*₆): δ /ppm = 148.0 (C-2^{Thio}), 147.1 (C-2^{Ph}), 137.0 (C-5^{Thio}), 132.9 (C-3^{Thio}), 131.8 (C-1^{Ph}), 126.3 (C-4^{Thio}), 123.5 (C-4^{Ph}), 122.4 (C-5^{Ph}), 122.1 (C-3^{Ph}), 121.8 (q, ¹J_{CF} = 274.9 Hz, CF₃), 119.3 (C-6^{Ph}), 52.5 (C-2^{Pip} und C-6^{Pip}), 27.8 (q, ²J_{CF} = 39.9 Hz, C_q^{Diazirin}), 25.5 (C-3^{Pip} und C-5^{Pip}), 23.5 (C-4^{Pip}), 15.1 (CH₃).

¹⁹F-NMR (376 MHz, DMSO-*d*₆): δ /ppm = –65.81 (s, CF₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3245, 2947, 2811, 1515, 1436, 1337, 1228, 1144, 1021, 921, 906, 822, 806, 721.

ESI-MS (pos.): m/z = 445.2 (100%, [M+H]⁺), 467.1 (4%, [M+Na]⁺) und 417.2 (6%, [M–N₂]⁺); m/z ber. für [C₁₈H₁₉F₃N₄O₂S₂+H]⁺ ([M+H]⁺): 445.1.

HPLC-Analyse (C₁₈): t_R = 4.87 min, Peakfläche: 99.60% (Acetonitril/MilliQ®-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 70:30 über 8 min, Flussrate: 0.7 mL · min⁻¹, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 μ L, Säulenofentemperatur: 40 °C).

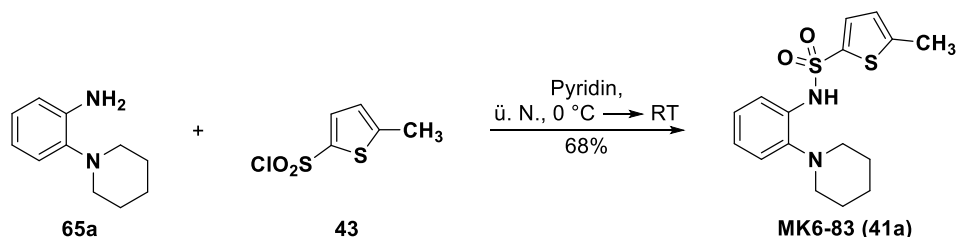
¹In der Regel ist keine weitere Reinigung erforderlich, da Reinheiten $\geq 95\%$ erzielt werden. Falls nötig, kann zusätzlich eine (semi-)präparative HPLC (C₁₈, Acetonitril/MilliQ®-Wasser 70:30 (isokratisch) über 90 min, Flussrate: 12.5 mL · min⁻¹, Detektion: 254 nm) durchgeführt werden.

²überlappende Signale

10.7 Versuchsvorschriften zu Kapitel 5

10.7.1 Synthese der sekundären Arylsulfonamide

5-Methyl-*N*-(2-(piperidin-1-yl)phenyl)thiophen-2-sulfonamid (MK6-83, 41a)



Die Synthese erfolgte in Anlehnung an eine Vorschrift von Chen *et al.*^[104] Unter Argonatmosphäre wurde 5-Methylthiophen-2-sulfonylchlorid (223 mg, 1.14 mmol, 1.00 Äquiv.) tropfenweise zu einer Lösung von 2-(Piperidin-1-yl)anilin (201 mg, 1.14 mmol, 1.00 Äquiv.) in trockenem Pyridin (5 mL) bei 0 °C gegeben. Die Mischung wurde 15 min bei 0 °C sowie über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und das Lösemittel anschließend unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Der Rückstand wurde in EtOAc (25 mL) aufgenommen, mit einer NaCl-Lösung (ges., aq., 2 × 20 mL) gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und unter vermindertem Druck eingeeengt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (^cHex/EtOAc 30:1) wurde die Titelverbindung als farbloser Feststoff (261 mg, 0.78 mmol, 68%) erhalten.

R_f: 0.54 (SiO₂, ^cHex/EtOAc 3:1).

Smb.: 119–121 °C (^cHex/EtOAc); Lit.:^[104] 119–120 °C (CH₂Cl₂).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 8.17 (s, 1H, NH), 7.62 (dd, ³J = 8.2 Hz, ⁴J = 1.6 Hz, 1H, H-6^{Ph}), 7.34 (d, ³J = 3.8 Hz, 1H, H-3^{Thio}), 7.18–6.99 (m, 3H, H-3^{Ph}–H-5^{Ph}), 6.63 (dd, ³J = 3.8 Hz, ⁴J = 1.1 Hz, 1H, H-4^{Thio}), 2.60–2.48 (m, 4H, 2 × H-2^{Pip} und 2 × H-6^{Pip}), 2.43 (d, ⁴J = 1.1 Hz, 3H, CH₃), 1.73–1.61 (m, 4H, 2 × H-3^{Pip} und 2 × H-5^{Pip}), 1.59–1.46 (m, 2H, 2 × H-4^{Pip}).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 147.9 (C-2^{Thio}), 143.5 (C-2^{Ph}), 137.0 (C-5^{Thio}), 133.1 (C-1^{Ph}), 132.8 (C-3^{Thio}), 125.8 (C-5^{Ph}), 125.7 (C-4^{Thio}), 124.5 (C-4^{Ph}), 121.9 (C-3^{Ph}), 118.4 (C-6^{Ph}), 54.2 (C-2^{Pip} und C-6^{Pip}), 25.1 (C-3^{Pip} und C-5^{Pip}), 23.9 (C-4^{Pip}), 15.6 (CH₃).

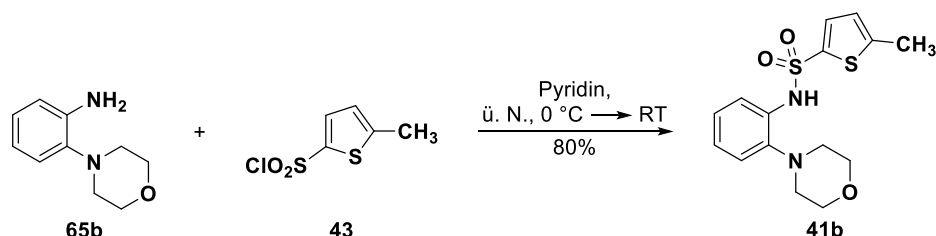
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3236, 2931, 1596, 1496, 1435, 1359, 1324, 1291, 1229, 1154, 1085, 1021, 931, 758.

ESI-MS (pos.): m/z = 337.2 (100%, [M+H]⁺) und 359.1 (3%, [M+Na]⁺); m/z ber. für [C₁₆H₂₀N₂O₂S₂+H]⁺ ([M+H]⁺): 337.1.

HPLC-Analyse (C₁₈): $t_R = 2.17$ min, Peakfläche: 99.30% (Acetonitril/MilliQ[®]-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 70:30 über 8 min, Flussrate: $0.7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: $5 \mu\text{L}$, Säulenofentemperatur: $40 \text{ }^\circ\text{C}$).

Die analytischen Daten stimmen mit denen aus der Literatur überein.^[104]

5-Methyl-*N*-(2-morpholinophenyl)thiophen-2-sulfonamid (41b)



Die Synthese erfolgte in Anlehnung an eine modifizierte Vorschrift von Chen *et al.*^[104] Unter Argonatmosphäre wurde 5-Methylthiophen-2-sulfonylchlorid (110 mg, 0.56 mmol, 1.00 Äquiv.) tropfenweise zu einer Lösung von 2-Morpholinoanilin (100 mg, 0.56 mmol, 1.00 Äquiv.) in absolutem Pyridin (5 mL) bei $0 \text{ }^\circ\text{C}$ gegeben. Die Mischung wurde 15 min bei $0 \text{ }^\circ\text{C}$ sowie über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und das Lösemittel anschließend unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Der Rückstand wurde in EtOAc (100 mL) aufgenommen, mit Wasser ($2 \times 50 \text{ mL}$) sowie mit einer NaCl-Lösung (ges., aq., $2 \times 50 \text{ mL}$) gewaschen, mit MgSO_4 getrocknet und unter vermindertem Druck eingeeengt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (${}^c\text{Hex}/\text{EtOAc}$ 4:1) wurde die Titelverbindung als beiger Feststoff (152 mg, 0.45 mmol, 80%) erhalten.

R_f: 0.21 (SiO_2 , ${}^c\text{Hex}/\text{EtOAc}$ 3:1).

Smb.: $137\text{--}139 \text{ }^\circ\text{C}$ (${}^c\text{Hex}/\text{EtOAc}$).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, CDCl₃): $\delta/\text{ppm} = 8.39$ (s, 1H, NH), 7.62 (dd, ${}^3J = 8.3 \text{ Hz}$, ${}^4J = 1.5 \text{ Hz}$, 1H, *H*-6^{Ph}), 7.37 (d, ${}^3J = 3.7 \text{ Hz}$, 1H, *H*-3^{Thio}), 7.23–7.07 (m, 3H, *H*-3^{Ph}–*H*-5^{Ph}), 6.65 (dd, ${}^3J = 3.7 \text{ Hz}$, ${}^4J = 1.1 \text{ Hz}$, 1H, *H*-4^{Thio}), 3.85 (*pseudo-t*, $J \approx 4.6 \text{ Hz}$, 4H, $2 \times$ *H*-2^{Mor} und $2 \times$ *H*-6^{Mor}), 2.81–2.61 (m, 4H, $2 \times$ *H*-3^{Mor} und $2 \times$ *H*-5^{Mor}), 2.45 (d, ${}^4J = 1.1 \text{ Hz}$, 3H, CH₃).

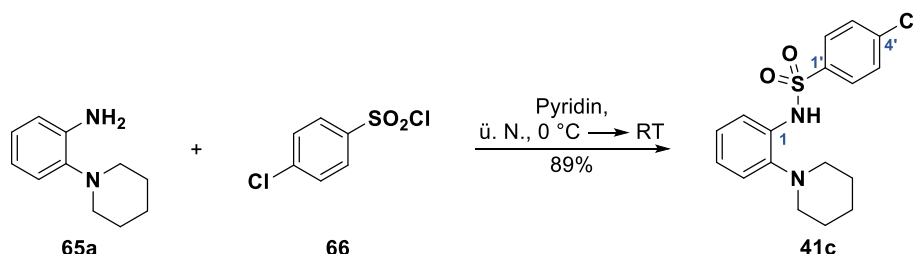
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, CDCl₃): $\delta/\text{ppm} = 148.2$ (*C*-2^{Thio}), 141.0 (*C*-2^{Ph}), 137.0 (*C*-5^{Thio}), 133.1 (*C*-3^{Thio}), 133.0 (*C*-1^{Ph}), 127.0 (*C*-5^{Ph}), 125.8 (*C*-4^{Thio}), 125.0 (*C*-4^{Ph}), 122.0 (*C*-3^{Ph}), 119.6 (*C*-6^{Ph}), 67.1 (*C*-2^{Mor} und *C*-6^{Mor}), 53.2 (*C*-3^{Mor} und *C*-5^{Mor}), 15.7 (CH₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu} [\text{cm}^{-1}] = 3215, 1717, 1677, 1491, 1420, 1385, 1341, 1230, 1161, 1109, 1019, 940, 910, 820, 751, 683.$

ESI-MS (pos.): $m/z = 339.1$ (100%, $[\text{M}+\text{H}]^+$); m/z ber. für $[\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}_2+\text{H}]^+$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 339.1.

HPLC-Analyse (C₁₈): $t_R = 1.59$ min, Peakfläche: 97.13% (Acetonitril/MilliQ[®]-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 65:35 über 8 min, Flussrate: 0.7 mL · min⁻¹, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 µL, Säulenofentemperatur: 40 °C).

4'-Chlor-*N*-(2-(piperidin-1-yl)phenyl)benzoesulfonamid (41c)



Die Synthese erfolgte in Anlehnung an eine modifizierte Vorschrift von Chen *et al.*^[104] Unter Argonatmosphäre wurde 4-Chlorbenzoesulfonylchlorid (422 mg, 2.00 mmol, 1.00 Äquiv.) tropfenweise zu einer Lösung von 2-(Piperidin-1-yl)anilin (353 mg, 2.00 mmol, 1.00 Äquiv.) in trockenem Pyridin (10 mL) bei 0 °C gegeben. Die Mischung wurde 15 min bei 0 °C sowie über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und das Lösemittel anschließend unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Der Rückstand wurde in EtOAc (100 mL) aufgenommen, mit Wasser (2 × 50 mL) sowie mit einer NaCl-Lösung (ges., aq., 2 × 50 mL) gewaschen, mit MgSO₄ getrocknet und unter vermindertem Druck eingeeengt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (°Hex/EtOAc 5:1) wurde die Titelverbindung als brauner Feststoff (628 mg, 1.79 mmol, 89%) erhalten.

R_f: 0.68 (SiO₂, °Hex/EtOAc 3:1).

Smb.: 118–120 °C (°Hex/EtOAc).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 8.06 (s, 1H, NH), 7.79–7.69 (m, 2H, *H*-2'^{Ph} und *H*-6'^{Ph}), 7.57 (dd, ³*J* = 8.2 Hz, ⁴*J* = 1.7 Hz, 1H, *H*-6^{Ph}), 7.42–7.32 (m, 2H, *H*-3'^{Ph} und *H*-5'^{Ph}), 7.14–6.96 (m, 3H, *H*-3^{Ph}–*H*-5^{Ph}), 2.46 (*pseudo-t*, *J* ≈ 5.2 Hz, 4H, 2 × *H*-2^{Pip} und 2 × *H*-6^{Pip}), 1.69–1.57 (m, 4H, 2 × *H*-3^{Pip} und 2 × *H*-5^{Pip}), 1.57–1.45 (m, 2H, 2 × *H*-4^{Pip}).

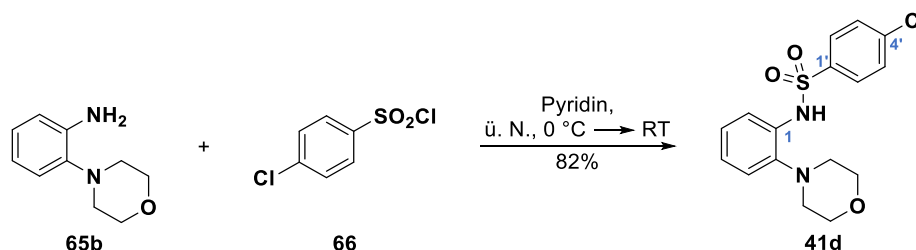
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 143.5 (*C*-2^{Ph}), 139.4 (*C*-4'^{Ph}), 138.2 (*C*-1'^{Ph}), 132.7 (*C*-1^{Ph}), 129.3 (*C*-3'^{Ph} und *C*-5'^{Ph}), 128.5 (*C*-2'^{Ph} und *C*-6'^{Ph}), 125.8 (*C*-5^{Ph}), 124.7 (*C*-4^{Ph}), 122.0 (*C*-3^{Ph}), 118.5 (*C*-6^{Ph}), 54.2 (*C*-2^{Pip} und *C*-6^{Pip}), 26.7 (*C*-3^{Pip} und *C*-5^{Pip}), 23.8 (*C*-4^{Pip}).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3256, 2939, 2813, 1492, 1357, 1332, 1232, 1157, 1095, 937, 828, 750.

ESI-MS (pos.): $m/z = 351.2$ (100%, [M+H]⁺)/353.1 (39%, [M+H]⁺) und 373.1 (4%, [M+Na]⁺); m/z ber. für [C₁₇H₁₉ClN₂O₂S+H]⁺ ([M+H]⁺): 351.1/353.1.

HPLC-Analyse (C₁₈): $t_R = 5.26$ min, Peakfläche: 98.16% (Acetonitril/MilliQ[®]-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 65:35 über 8 min, Flussrate: $0.7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: $5 \mu\text{L}$, Säulenofentemperatur: $40 \text{ }^\circ\text{C}$).

4'-Chlor-*N*-(2-morpholinophenyl)benzonsulfonamid (41d)



Die Synthese erfolgte in Anlehnung an eine modifizierte Vorschrift von Chen *et al.*^[104] Unter Argonatmosphäre wurde 4-Chlorbenzonsulfonylchlorid (422 mg, 2.00 mmol, 1.00 Äquiv.) tropfenweise zu einer Lösung von 2-Morpholinoanilin (357 mg, 2.00 mmol, 1.00 Äquiv.) in trockenem Pyridin (10 mL) bei $0 \text{ }^\circ\text{C}$ gegeben. Die Mischung wurde 15 min bei $0 \text{ }^\circ\text{C}$ sowie über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und das Lösemittel anschließend unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Der Rückstand wurde in EtOAc (100 mL) aufgenommen, mit Wasser ($2 \times 50 \text{ mL}$) sowie mit einer NaCl-Lösung (ges., aq., $2 \times 50 \text{ mL}$) gewaschen, mit MgSO_4 getrocknet und unter vermindertem Druck eingeeengt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (${}^c\text{Hex}/\text{EtOAc}$ 5:1) wurde die Titelverbindung in Form beiger Kristalle (575 mg, 1.63 mmol, 82%) erhalten.

R_f: 0.34 (SiO_2 , ${}^c\text{Hex}/\text{EtOAc}$ 3:1).

Smb.: $168\text{--}170 \text{ }^\circ\text{C}$ (${}^c\text{Hex}/\text{EtOAc}$).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, CDCl₃): $\delta/\text{ppm} = 8.08$ (s, 1H, NH), 7.81–7.70 (m, 2H, $H\text{-}2^{Ph}$ und $H\text{-}6^{Ph}$), 7.55 (dd, ${}^3J = 8.2 \text{ Hz}$, ${}^4J = 1.7 \text{ Hz}$, 1H, $H\text{-}6^{Ph}$), 7.45–7.34 (m, 2H, $H\text{-}3^{Ph}$ und $H\text{-}5^{Ph}$), 7.19–7.02 (m, 3H, $H\text{-}3^{Ph}\text{-}H\text{-}5^{Ph}$), 3.82–3.73 (m, 4H, $2 \times H\text{-}2^{Mor}$ und $2 \times H\text{-}6^{Mor}$), 2.58 (pseudo-t, $J \approx 4.6 \text{ Hz}$, 4H, $2 \times H\text{-}3^{Mor}$ und $2 \times H\text{-}5^{Mor}$).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, CDCl₃): $\delta/\text{ppm} = 141.4$ ($C\text{-}2^{Ph}$), 139.7 ($C\text{-}4^{Ph}$), 138.3 ($C\text{-}1^{Ph}$), 132.8 ($C\text{-}1^{Ph}$), 129.5 ($C\text{-}3^{Ph}$ und $C\text{-}5^{Ph}$), 128.5 ($C\text{-}2^{Ph}$ und $C\text{-}6^{Ph}$), 126.8 ($C\text{-}5^{Ph}$), 125.1 ($C\text{-}4^{Ph}$), 122.2 ($C\text{-}3^{Ph}$), 119.2 ($C\text{-}6^{Ph}$), 67.3 ($C\text{-}2^{Mor}$ und $C\text{-}6^{Mor}$), 53.1 ($C\text{-}3^{Mor}$ und $C\text{-}5^{Mor}$).

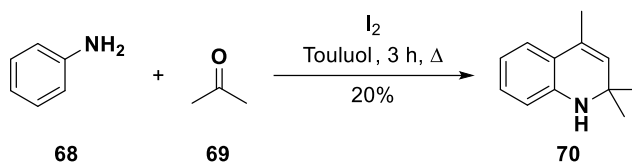
IR (ATR): $\tilde{\nu} [\text{cm}^{-1}] = 3217, 2810, 1584, 1492, 1385, 1339, 1230, 1168, 1109, 1093, 1068, 943, 836, 755, 738$.

ESI-MS (pos.): $m/z = 353.1$ (100%, $[\text{M}+\text{H}]^+$)/355.1 (39%, $[\text{M}+\text{H}]^+$); m/z ber. für $[\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{ClN}_2\text{O}_3\text{S}+\text{H}]^+$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 353.1/355.1.

HPLC-Analyse (C₁₈): $t_R = 2.45$ min, Peakfläche: 99.26% (Acetonitril/MilliQ[®]-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 60:40 über 8 min, Flussrate: $0.7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: $5 \mu\text{L}$, Säulenofentemperatur: $40 \text{ }^\circ\text{C}$).

10.7.2 Synthese der *N*-Phthaloylglycin-Derivate

2,2,4-Trimethyl-1,2-dihydrochinolin (TMQ, 70)



Die Synthese erfolgte in Anlehnung an eine Vorschrift von Fotie *et al.*^[214] In einem 250 mL-Dreihalsrundkolben mit Tropftrichter, Rückflusskühler und Wasserabscheider wurde Aceton (19.7 mL, 268.45 mmol, 5.00 Äquiv.) tropfenweise zu einer Lösung aus Anilin (**68**, 4.9 mL, 53.69 mmol, 1.00 Äquiv.) und Iod (676 mg, 2.68 mmol, 0.05 Äquiv.) in Toluol (100 mL) bei $120 \text{ }^\circ\text{C}$ gegeben. Es wurde 3 h bei $120 \text{ }^\circ\text{C}$ sowie anschließend über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, erneut Aceton (19.7 mL, 268.45 mmol, 5.00 Äquiv.) zugegeben und weitere 8 h unter Rückfluss erhitzt. Das Lösemittel wurde unter reduziertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (Hex/EtOAc 100:1) gereinigt. Die Titelverbindung **70** wurde als gelbliches Öl (1.83 g, 10.56 mmol, 20%; Lit.:^[214] 48%) erhalten.

R_f: 0.26 (SiO₂, Hex/EtOAc 20:1).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, CDCl₃): $\delta/\text{ppm} = 7.09$ (dd, $^3J = 7.6 \text{ Hz}$, $^4J = 1.2 \text{ Hz}$, 1H, *H*-5^{TMQ}), 7.01 (td, $^3J = 7.6$, $^4J = 1.2 \text{ Hz}$, 1H, *H*-7^{TMQ}), 6.66 (td, $^3J = 7.6 \text{ Hz}$, $^4J = 1.2 \text{ Hz}$, 1H, *H*-6^{TMQ}), 6.46 (dd, $^3J = 7.6 \text{ Hz}$, $^4J = 1.2 \text{ Hz}$, 1H, *H*-8^{TMQ}), 5.33 (d, $^4J = 1.5 \text{ Hz}$, 1H, *H*-3^{TMQ}), 2.02 (d, $^4J = 1.5 \text{ Hz}$, 3H, C-4^{TMQ}CH₃), 1.30 (s, 6H, C-2^{TMQ}(CH₃)₂).

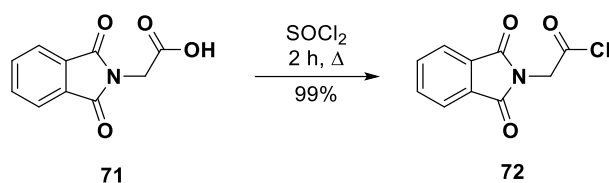
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, CDCl₃): $\delta/\text{ppm} = 143.3$ (C-8a^{TMQ}), 128.6 (C-4^{TMQ}), 128.5 (C-3^{TMQ} und C-7^{TMQ}), 123.7 (C-5^{TMQ}), 121.7 (C-4a^{TMQ}), 117.3 (C-6^{TMQ}), 113.1 (C-8^{TMQ}), 51.9 (C-2^{TMQ}), 31.1 (C-2^{TMQ}(CH₃)₂), 18.7 (C-4^{TMQ}CH₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu} [\text{cm}^{-1}] = 3235, 2931, 1434, 1313, 1293, 1156, 1085, 1021, 987, 930, 779, 743$.

ESI-MS (pos.): $m/z = 174.3$ (100%, [M+H]⁺); m/z ber. für [C₁₂H₁₅N+H]⁺ ([M+H]⁺): 174.1.

Die analytischen Daten stimmen mit denen aus der Literatur überein.^[214]

2-(1,3-Dioxisoindolin-2-yl)acetylchlorid (72)



Unter Argonatmosphäre wurde 2-(1,3-Dioxisoindolin-2-yl)essigsäure (**71**, 4.00 g, 19.50 mmol, 1.00 Äquiv.) in Thionylchlorid (25 mL) vorgelegt und die Reaktionsmischung 2 h unter Rückfluss erhitzt. Überschüssiges Thionylchlorid wurde destillativ entfernt und der Rückstand im Feinvakuum getrocknet, sodass die Titelverbindung **72** (4.33 g, 19.36 mmol, 99%) als gelber Feststoff erhalten wurde.

R_f: 0.60 (SiO₂, EA/DMF 10:1).

Smb.: 85–86 °C (°Hex/EtOAc).

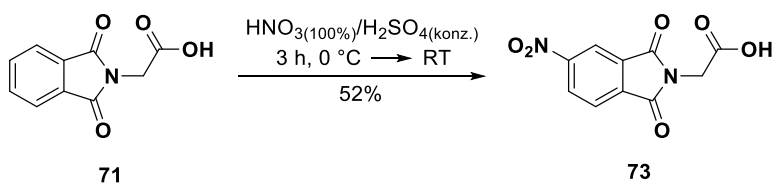
¹H-NMR, COSY (300 MHz, CDCl₃): δ /ppm = 7.91–7.82 (m, 2H, *H*-4^{Philm} und *H*-7^{Philm}), 7.79–7.71 (m, 2H, *H*-5^{Philm} und *H*-6^{Philm}), 4.80 (s, 2H, CH₂).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, CDCl₃): δ /ppm = 169.2 (COCl), 166.6 (*C*-1^{Philm} und *C*-3^{Philm}), 134.7 (*C*-5^{Philm} und *C*-6^{Philm}), 131.6 (*C*-3a^{Philm} und *C*-7a^{Philm}), 124.0 (*C*-4^{Philm} und *C*-7^{Philm}), 47.6 (CH₂).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2979, 2937, 1801, 1768, 1708, 1608, 1467, 1399, 1375, 1311, 1195, 1107, 997, 955, 932, 805, 777, 708.

ESI-MS (pos.): m/z = 160.2 (100%, [M–COCl]⁺); m/z ber. für [C₁₀H₆ClNO₃–COCl]⁺ ([M–COCl]⁺): 160.0.

2-(5-Nitro-1,3-dioxisoindolin-2-yl)essigsäure (73)



In einem 50 mL-Rundkolben wurde Salpetersäure (rauchend, 100%, 3 mL) vorgelegt und bei 0 °C Schwefelsäure (konz., 17.5 mL) langsam zugetropft. Nach 10 min bei 0 °C wurde 2-(1,3-Dioxisoindolin-2-yl)essigsäure (**71**, 3.50 g, 17.06 mmol, 1.00 Äquiv.) portionsweise zugegeben.¹ Es wurde 1 h bei 0 °C sowie 2 h bei Raumtemperatur gerührt und die Reaktionsmischung anschließend vorsichtig auf ca. 100 g Eis/Wasser gegossen. Das Präzipitat wurde abgesaugt und aus

¹Es wurde stets bis zur vollständigen Lösung des Eduktes gewartet, bevor eine weitere Portion zugegeben wurde.

Wasser/EtOH (150 mL, 2:1 V/V) umkristallisiert, sodass die Titelverbindung **73** (2.23 g, 8.91 mmol, 52%) in Form farbloser Nadeln erhalten wurde.

R_f: 0.27 (SiO₂, EtOAc +0.1% TFA).

Smb.: 198–200 °C (°Hex/EtOAc).

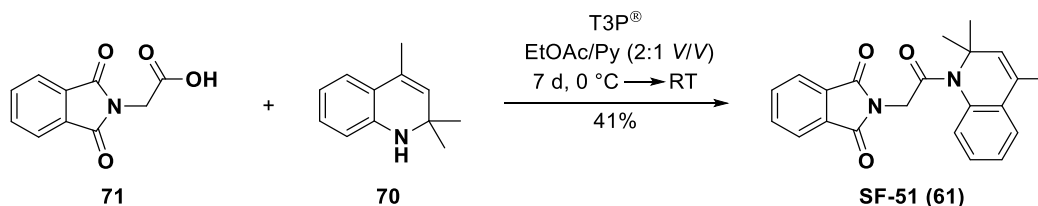
¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ/ppm = 13.38 (s, 1H, COOH), 8.67 (dd, ³J = 8.2 Hz, ⁴J = 2.0 Hz, 1H, H-6^{Philm}), 8.56 (dd, ⁴J = 2.0 Hz, ⁵J = 0.7 Hz, 1H, H-4^{Philm}), 8.19 (dd, ³J = 8.2 Hz, ⁵J = 0.7 Hz, 1H, H-7^{Philm}), 4.38 (s, 2H, CH₂).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ/ppm = 168.6 (COOH), 165.6 (C-1^{Philm}), 165.4 (C-3^{Philm}), 151.7 (C-5^{Philm}), 135.9 (C-7a^{Philm}), 132.7 (C-3a^{Philm}), 130.1 (C-6^{Philm}), 125.0 (C-7^{Philm}), 118.4 (C-4^{Philm}), 39.4 (CH₂).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3046, 1706, 1560, 1409, 1349, 1316, 1243, 1202, 1121, 1109, 962, 862, 719.

ESI-MS (pos.): *m/z* = 205.1 (100%, [M-NO₂+H]⁺), 251.0 (10%, [M+H]⁺) und 273.0 (34%, [M+Na]⁺); *m/z* ber. für [C₁₀H₆N₂O₆+H]⁺ ([M+H]⁺): 251.1.

2-[2-Oxo-2-(2,2,4-trimethylchinolin-1-yl)ethyl]isoindolin-1,3-dion (SF-51, **61**)



Die Synthese wurde in Anlehnung an eine modifizierte Vorschrift von Dunetz *et al.* durchgeführt.^[216] Unter Argonatmosphäre wurde eine Lösung von T3P® (50% in EtOAc, 7.0 mL, 11.85 mmol, 7.50 Äquiv.) bei 0 °C zu einer Lösung von 2-(1,3-Dioxoisoindolin-2-yl)essigsäure (**71**, 324 mg, 1.58 mmol, 1.00 Äquiv.) und TMQ (**70**, 300 mg, 1.74 mmol, 1.00 Äquiv.) in EtOAc/Py (22.5 mL, 2:1 V/V) getropft. Es wurde 30 min bei 0 °C sowie 7 d bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit EtOAc (150 mL) versetzt, mit einer NaHCO₃-Lösung (ges., aq., 1 × 50 mL), einer NH₄Cl-Lösung (ges., aq., 1 × 50 mL) sowie einer NaCl-Lösung (ges., aq., 1 × 50 mL) gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck destillativ entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (°Hex/EtOAc 10:1) wurde die Titelverbindung **61** (230 mg, 0.64 mmol, 41%) in Form farbloser Kristalle erhalten.

R_f: 0.26 (SiO₂, °Hex/EtOAc 5:1).

Smb.: 140–142 °C (°Hex/EtOAc).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ /ppm = 7.89–7.79 (m, 2H, *H*-4^{Philm} und *H*-7^{Philm}), 7.77–7.65 (m, 2H, *H*-5^{Philm} und *H*-6^{Philm}), 7.36 (dd, ³*J* = 7.8 Hz, ⁴*J* = 1.3 Hz, 1H, *H*-5^{TMQ}), 7.29–7.13 (m, 3H, *H*-6^{TMQ}–*H*-8^{TMQ}), 5.33 (d, ⁴*J* = 1.5 Hz, 1H, *H*-3^{TMQ}), 4.38 (s, 2H, CH₂), 2.02 (d, ⁴*J* = 1.5 Hz, 3H, C-4^{TMQ}CH₃), 1.49 (s, 6H, C-2^{TMQ}(CH₃)₂).

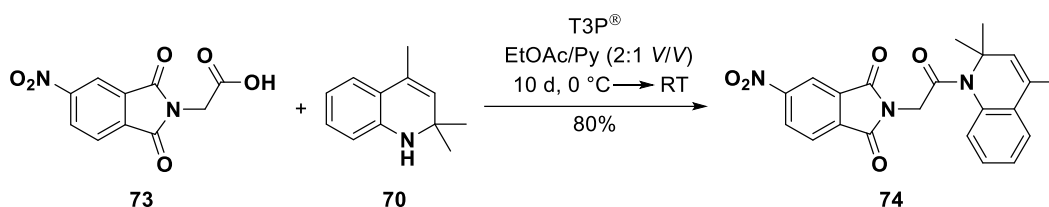
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ /ppm = 168.0 (C-1^{Philm} und C-3^{Philm}), 167.9 (CON^{TMQ}), 136.4 (C-3^{TMQ}), 135.7 (C-8a^{TMQ}), 134.1 (C-5^{Philm} und C-6^{Philm}), 132.3 (C-4a^{Philm} und C-7a^{Philm}), 130.2 (C-4a^{TMQ}), 128.0 (C-4^{TMQ}), 127.8 (C-7^{TMQ}), 125.7 (C-6^{TMQ}), 124.5 (C-5^{TMQ}), 123.5 (C-4^{Philm} und C-7^{Philm}), 123.4 (C-8^{TMQ}), 59.0 (C-2^{TMQ}), 42.7 (CH₂), 26.5 (C-2^{TMQ}(CH₃)₂), 17.9 (C-4^{TMQ}CH₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2969, 1772, 1712, 1672, 1487, 1413, 1392, 1299, 1237, 1195, 1106, 954, 758, 720.

ESI-MS (pos.): *m/z* = 361.2 (100%, [M+H]⁺) und 383.1 (7%, [M+Na]⁺); *m/z* ber. für [C₂₂H₂₀N₂O₃+H]⁺ ([M+H]⁺): 361.2.

HPLC-Analyse (C₁₈): *t*_R = 1.50 min, Peakfläche: 99.79% (Acetonitril/MilliQ[®]-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 70:30 über 8 min, Flussrate: 0.7 mL · min⁻¹, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 μ L, Säulenofentemperatur: 40 °C).

5-Nitro-2-[2-oxo-2-(2,2,4-trimethylchinolin-1-yl)ethyl]isoindolin-1,3-dion (74)



Die Synthese wurde in Anlehnung an eine modifizierte Vorschrift von Dunetz *et al.* durchgeführt.^[216] Unter Argonatmosphäre wurde eine Lösung von T3P[®] (50% in EtOAc, 7.0 mL, 11.85 mmol, 7.50 Äquiv.) bei 0 °C zu einer Lösung von 2-(5-Nitro-1,3-dioxisoindolin-2-yl)essigsäure (**73**, 396 mg, 1.58 mmol, 1.00 Äquiv.) und TMQ (**70**, 300 mg, 1.74 mmol, 1.00 Äquiv.) in EtOAc/Py (22.5 mL, 2:1 V/V) getropft. Es wurde 30 min bei 0 °C sowie 10 d bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit EtOAc (150 mL) versetzt, mit einer NaHCO₃-Lösung (ges., aq., 1 × 50 mL), einer NH₄Cl-Lösung (ges., aq., 1 × 50 mL) sowie einer NaCl-Lösung (ges., aq., 1 × 50 mL) gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck destillativ entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (^cHex/EtOAc 10:1) wurde die Titelverbindung **74** (511 mg, 1.26 mmol, 80%) in Form gelber Kristalle erhalten.

R_f: 0.21 (SiO₂, ^cHex/EtOAc 5:1).

Smb.: 171–173 °C (^cHex/EtOAc).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ /ppm = 8.64 (dd, ³*J* = 8.2 Hz, ⁴*J* = 2.1 Hz, 1H, H-4^{Philm}), 8.49 (dd, ⁴*J* = 2.1 Hz, ⁵*J* = 0.6 Hz, 1H, H-6^{Philm}), 8.13 (dd, ³*J* = 8.2 Hz, ⁵*J* = 0.6 Hz, 1H, H-7^{Philm}), 7.43–7.34 (m, 1H, H-5^{TMQ}), 7.32–7.13 (m, 3H, H-6^{TMQ}–H-8^{TMQ}), 5.67 (d, ⁴*J* = 1.5 Hz, 1H, H-3^{TMQ}), 4.51 (s, 2H, CH₂), 1.93 (d, ⁴*J* = 1.5 Hz, 3H, C-4^{TMQ}CH₃), 1.41 (s, 6H, C-2^{TMQ}(CH₃)₂).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ /ppm = 167.4 (CON^{TMQ}), 165.5 und 165.2 (C-1^{Philm} und C-3^{Philm}), 151.6 (C-5^{Philm}), 135.8 (C-7a^{Philm}), 135.7 (C-3^{TMQ}), 134.9 (C-8a^{TMQ}), 132.6 (C-4a^{Philm}), 129.9 (C-6^{Philm}), 128.8 (C-4^{TMQ}), 128.0 (C-7^{TMQ}), 127.3 (C-4a^{TMQ}), 125.5 (C-6^{TMQ}), 124.8 (C-7^{Philm}), 123.7 (C-5^{TMQ}), 123.2 (C-8^{TMQ}), 118.1 (C-4^{Philm}), 58.1 (C-2^{TMQ}), 42.9 (CH₂), 26.0 (C-2^{TMQ}(CH₃)₂), 17.3 (C-4^{TMQ}CH₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3030, 2965, 1719, 1669, 1536, 1489, 1397, 1347, 1301, 1240, 1114, 1107, 969, 953, 823, 756, 718.

ESI-MS (pos.): *m/z* = 406.2 (100%, [M+H]⁺) und 428.2 (14%, [M+Na]⁺); *m/z* ber. für [C₂₂H₁₉N₃O₅₃+H]⁺ ([M+H]⁺): 406.1.

HPLC-Analyse (C₁₈): *t_R* = 2.94 min, Peakfläche: 98.52% (Acetonitril/MilliQ®-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 65:35 über 8 min, Flussrate: 0.7 mL · min⁻¹, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 μ L, Säulenofentemperatur: 40 °C).

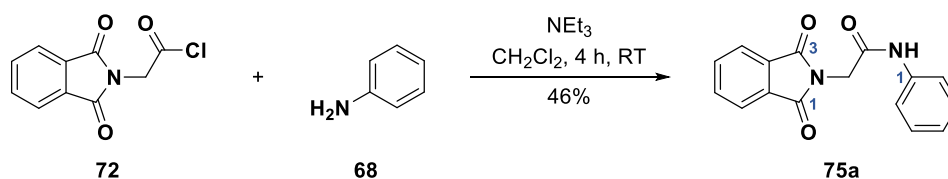
Allgemeine Vorschrift zur Synthese der *N*-Phthaloylglycin-Derivate aus dem Säurechlorid 72

Unter Argonatmosphäre wurden das entsprechende Amin (0.89 mmol, 1.0 Äquiv.) sowie Triethylamin (186 μ L, 1.34 mmol, 1.50 Äquiv.) in CH₂Cl₂ (10 mL) gelöst und bei 15 °C 2-(1,3-Dioxisoindolin-2-yl)acetylchlorid (**72**; 200 mg, 0.89 mmol, 1.00 Äquiv.) zugegeben. Es wurde 1–18 h bei Raumtemperatur gerührt und, sofern nicht anders angegeben, mittels nachfolgend beschriebener Methoden aufgearbeitet.

Methode A: Das während der Reaktion entstandene Präzipitat wurde abgesaugt, mit wenig CH₂Cl₂ gewaschen und im Feinvakuum getrocknet. Da Reinheiten \geq 95% erzielt wurden, war, sofern nicht anders angegeben, keine weitere Reinigung mittels Säulenchromatographie oder HPLC erforderlich.

Methode B: Die Reaktionsmischung wurde unter vermindertem Druck eingengt und der Rückstand in EtOAc (100 mL) aufgenommen. Die organische Phase wurde mit Wasser (1 \times 50 mL), einer NH₄Cl-Lösung (ges., aq., 1 \times 50 mL) und einer NaCl-Lösung (ges., aq., 1 \times 50 mL) gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Da Reinheiten \geq 95% erzielt wurden, war, sofern nicht anders angegeben, keine weitere Reinigung mittels Säulenchromatographie oder HPLC erforderlich.

N-(Phenyl)-2-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)acetamid (75a)



Die Synthese erfolgte gemäß der allgemeinen Vorschrift unter Verwendung von Anilin (82 μL , 0.89 mmol, 1.00 Äquiv.) mit einer Reaktionszeit von 4 h. Nach Aufarbeitung (Methode **B**) wurde die Titelverbindung **75a** als farbloser Feststoff (114 mg, 0.41 mmol, 46%) erhalten.

R_f: 0.25 (SiO₂, ^cHex/EtOAc 2:1).

Smb.: 231–232 °C (EtOAc).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ /ppm = 10.33 (s, 1H, NH), 8.00–7.82 (m, 4H, *H*-4^{Philm}–*H*-7^{Philm}), 7.61–7.50 (m, 2H, *H*-2^{Ph} und *H*-6^{Ph}), 7.38–7.25 (m, 2H, *H*-3^{Ph} und *H*-5^{Ph}), 7.07 (td, ³*J* = 7.3 Hz, ⁴*J* = 1.2 Hz, *H*-4^{Ph}), 4.45 (s, 2H, CH₂).

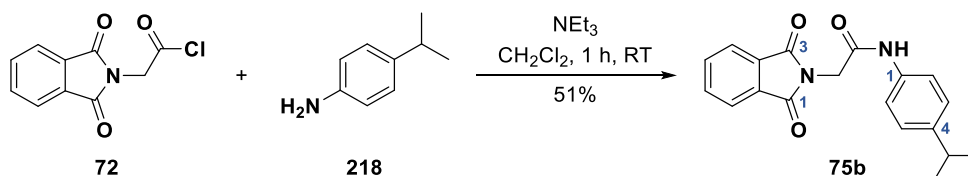
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ /ppm = 167.6 (*C*-1^{Philm} und *C*-3^{Philm}), 164.8 (CONH), 138.5 (*C*-1^{Ph}), 134.7 (*C*-5^{Philm} und *C*-6^{Philm}), 131.6 (*C*-3a^{Philm} und *C*-7a^{Philm}), 128.8 (*C*-3^{Ph} und *C*-5^{Ph}), 123.6 (*C*-4^{Ph}), 123.3 (*C*-4^{Philm} und *C*-7^{Philm}), 119.2 (*C*-2^{Ph} und *C*-6^{Ph}), 40.7 (CH₂).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3276, 1721, 1664, 1600, 1544, 1410, 1387, 1312, 1251, 1192, 1115, 950, 763, 715, 695.

ESI-MS (pos.): *m/z* = 281.1 (100%, [M+H]⁺); *m/z* ber. für [C₁₆H₁₂N₂O₃+H]⁺ ([M+H]⁺): 281.1.

HPLC-Analyse (C₁₈): *t_R* = 1.14 min, Peakfläche: 97.41% (Acetonitril/MilliQ[®]-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 60:40 über 8 min, Flussrate: 0.7 mL · min⁻¹, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 μL , Säulenofentemperatur: 40 °C).

N-(4-Isopropylphenyl)-2-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)acetamid (75b)



Die Synthese erfolgte gemäß der allgemeinen Vorschrift unter Verwendung von 4-Isopropylanilin (120 mg, 0.89 mmol, 1.00 Äquiv.) mit einer Reaktionszeit von 1 h. Nach Aufarbeitung (Methode **A**) wurde die Titelverbindung **75b** als farbloser Feststoff (144 mg, 0.45 mmol, 51%) erhalten.

R_f: 0.38 (SiO₂, ^cHex/EtOAc 1:1).

Smb.: 235–236 °C (CH₂Cl₂).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ/ppm = 10.25 (s, 1H, NH), 8.00–7.83 (m, 4H, H-4^{Philm}–H-7^{Philm}), 7.46 (d, ³J = 8.6 Hz, 2H, H-2^{Ph} und H-6^{Ph}), 7.18 (d, ³J = 8.6 Hz, 2H, H-3^{Ph} und H-5^{Ph}), 4.42 (s, 2H, CH₂), 2.83 (hept, ³J = 6.9 Hz, 1H, CH(CH₃)₂), 1.17 (d, ³J = 6.9 Hz, 6H, CH(CH₃)₂).

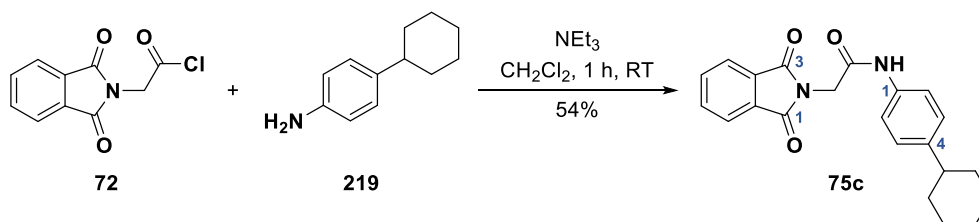
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ/ppm = 167.6 (C-1^{Philm} und C-3^{Philm}), 164.5 (CONH), 143.7 (C-4^{Ph}), 136.3 (C-1^{Ph}), 134.7 (C-5^{Philm} und C-6^{Philm}), 131.7 (C-3a^{Philm} und C-7a^{Philm}), 126.5 (C-3^{Ph} und C-5^{Ph}), 123.3 (C-4^{Philm} und C-7^{Philm}), 119.3 (C-2^{Ph} und C-6^{Ph}), 40.7 (CH₂), 32.8 (CH(CH₃)₂), 23.9 (CH(CH₃)₂).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3327, 2956, 1720, 1682, 1541, 1419, 1395, 1304, 1254, 1121, 952, 825, 713.

ESI-MS (pos.): *m/z* = 323.2 (100%, [M+H]⁺); *m/z* ber. für [C₁₉H₁₈N₂O₃+H]⁺ ([M+H]⁺): 323.1.

HPLC-Analyse (C₁₈): *t_R* = 1.95 min, Peakfläche: 99.48% (Acetonitril/MilliQ®-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 60:40 über 8 min, Flussrate: 0.7 mL · min⁻¹, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 μL, Säulenofentemperatur: 40 °C).

N-(4-Cyclohexylphenyl)-2-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)acetamid (75c)



Die Synthese erfolgte gemäß der allgemeinen Vorschrift unter Verwendung von 4-Cyclohexylanilin (156 mg, 0.89 mmol, 1.00 Äquiv.) mit einer Reaktionszeit von 1 h. Nach Aufarbeitung (Methode A) wurde die Titelverbindung **75c** als farbloser Feststoff (173 mg, 0.48 mmol, 54%) erhalten.

R_f: 0.58 (SiO₂, ^cHex/EtOAc 1:1).

Smb.: 280–282 °C (CH₂Cl₂).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ/ppm = 10.24 (s, 1H, NH), 8.00–7.82 (m, 4H, H-4^{Philm}–H-7^{Philm}), 7.45 (d, ³J = 8.5 Hz, 2H, H-2^{Ph} und H-6^{Ph}), 7.15 (d, ³J = 8.5 Hz, 2H, H-3^{Ph} und H-5^{Ph}), 4.42 (s, 2H, CH₂), 2.48–2.34 (m, 1H, CH^{cHex}), 1.88–1.52 (m, 5H, CH^{cHex}), 1.49–1.00 (m, 5H, CH^{cHex}).

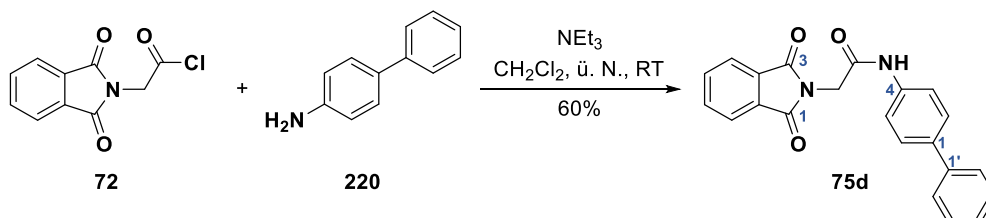
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ/ppm = 167.6 (C-1^{Philm} und C-3^{Philm}), 164.5 (CONH), 142.9 (C-4^{Ph}), 136.3 (C-1^{Ph}), 134.7 (C-5^{Philm} und C-6^{Philm}), 131.7 (C-3a^{Philm} und C-7a^{Philm}), 126.9 (C-3^{Ph} und C-5^{Ph}), 123.3 (C-4^{Philm} und C-7^{Philm}), 119.3 (C-2^{Ph} und C-6^{Ph}), 43.2 (CH^{cHex}), 40.7 (CH₂), 34.0 (2 × CH₂^{cHex}), 26.4 (2 × CH₂^{cHex}), 25.6 (CH₂^{cHex}).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3324, 2920, 1719, 1684, 1540, 1420, 1397, 1307, 1192, 1119, 1088, 953, 820, 713.

ESI-MS (pos.): $m/z = 363.2$ (100%, $[M+H]^+$); m/z ber. für $[C_{22}H_{22}N_2O_3+H]^+$ ($[M+H]^+$): 323.2.

HPLC-Analyse (C₁₈): $t_R = 4.03$ min, Peakfläche: 96.94% (Acetonitril/MilliQ®-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 60:40 über 8 min, Flussrate: $0.7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: $5 \mu\text{L}$, Säulenofentemperatur: $40 \text{ }^\circ\text{C}$).

N-([1,1'-Biphenyl]-4-yl)-2-(1,3-dioxoisindolin-2-yl)acetamid (75d)



Die Synthese erfolgte gemäß der allgemeinen Vorschrift unter Verwendung von 4-Aminobiphenyl (151 mg, 0.89 mmol, 1.00 Äquiv.), wobei über Nacht bei Raumtemperatur gerührt wurde. Nach Aufarbeitung (Methode A) wurde die Titelverbindung **75d** als farbloser Feststoff (188 mg, 0.53 mmol, 60%) erhalten.

R_f: 0.49 (SiO₂, ^cHex/EtOAc 1:1).

Smb.: 256–258°C (CH₂Cl₂).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta/\text{ppm} = 10.45$ (s, 1H, NH), 8.00–7.84 (m, 4H, *H*-4^{Ph₁lm}–*H*-7^{Ph₁lm}), 7.72–7.60 (m, 6H, *H*-2^{Ph}, *H*-3^{Ph}, *H*-5^{Ph}, *H*-6^{Ph}, *H*-2^{Ph} und *H*-6^{Ph}), 7.49–7.38 (m, 2H, *H*-3^{Ph} und *H*-5^{Ph}), 7.37–7.27 (m, 1H, *H*-4^{Ph}), 4.48 (s, 2H, CH₂).

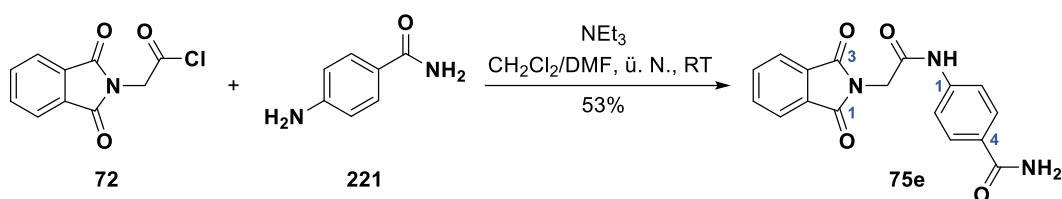
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta/\text{ppm} = 167.6$ (C-1^{Ph₁lm} und C-3^{Ph₁lm}), 164.9 (CONH), 139.6 (C-1^{Ph}), 138.0 (C-4^{Ph}), 135.3 (C-1^{Ph}), 134.7 (C-5^{Ph₁lm} und C-6^{Ph₁lm}), 131.7 (C-3a^{Ph₁lm} und C-7a^{Ph₁lm}), 128.9 (C-3^{Ph} und C-5^{Ph}), 127.1 (C-4^{Ph}), 127.0 (C-3^{Ph} und C-5^{Ph}), 126.3 (C-2^{Ph} und C-6^{Ph}), 123.3 (C-4^{Ph₁lm} und C-7^{Ph₁lm}), 119.6 (C-2^{Ph} und C-6^{Ph}), 40.8 (CH₂).

IR (ATR): $\tilde{\nu} [\text{cm}^{-1}] = 3300, 1779, 1719, 1681, 1597, 1536, 1420, 1396, 1310, 1192, 953, 763, 713, 697$.

ESI-MS (pos.): $m/z = 357.2$ (100%, $[M+H]^+$); m/z ber. für $[C_{22}H_{16}N_2O_3+H]^+$ ($[M+H]^+$): 357.1.

HPLC-Analyse (C₁₈): $t_R = 2.06$ min, Peakfläche: 99.37% (Acetonitril/MilliQ®-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 60:40 über 8 min, Flussrate: $0.7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: $5 \mu\text{L}$, Säulenofentemperatur: $40 \text{ }^\circ\text{C}$).

N-(4-(Aminocarbonyl)phenyl)-2-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)acetamid (75e)



Die Synthese erfolgte gemäß der allgemeinen Vorschrift unter Verwendung von 4-Aminobenzamid (121 mg, 0.89 mmol, 1.00 Äquiv.) in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$ (15 mL, 3:1 V/V), wobei über Nacht bei Raumtemperatur gerührt wurde. Nach Aufarbeitung (Methode A) wurde die Titelverbindung **75e** als farbloser Feststoff (152 mg, 0.47 mmol, 53%) erhalten.

R_f: 0.43 (SiO_2 , EtOAc).

Smb.: Zersetzung ab 323–325 °C (CH_2Cl_2).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ/ppm = 10.56 (s, 1H, NH), 8.00–7.80 (m, 5H, *H*-4^{Philm}–*H*-7^{Philm} sowie $\frac{1}{2} \times \text{NH}_2$), 7.85 (d, ³*J* = 8.6 Hz, 2H, *H*-3^{Ph} und *H*-5^{Ph}), 7.62 (d, ³*J* = 8.6 Hz, 2H, *H*-2^{Ph} und *H*-6^{Ph}), 7.26 (s, 1H, $\frac{1}{2} \times \text{NH}_2$), 4.48 (s, 2H, CH₂).

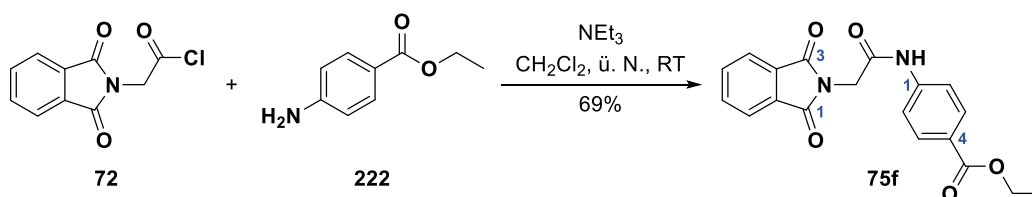
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ/ppm = 167.5 (*C*-1^{Philm} und *C*-3^{Philm}), 167.3 (CONH₂), 165.2 (CONH), 141.0 (*C*-1^{Ph}), 134.7 (*C*-5^{Philm} und *C*-6^{Philm}), 131.6 (*C*-3a^{Philm} und *C*-7a^{Philm}), 129.2 (*C*-4^{Ph}), 128.5 (*C*-3^{Ph} und *C*-5^{Ph}), 123.3 (*C*-4^{Philm} und *C*-7^{Philm}), 118.3 (*C*-2^{Ph} und *C*-6^{Ph}), 40.8 (CH₂).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3347, 3173, 1776, 1719, 1686, 1648, 1595, 1540, 1413, 1393, 1307, 1261, 1203, 1113, 948, 851, 797, 712.

ESI-MS (pos.): m/z = 324.1 (100%, $[\text{M}+\text{H}]^+$); m/z ber. für $[\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_4+\text{H}]^+$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 324.1.

HPLC-Analyse (C₁₈): t_R = 1.57 min, Peakfläche: 97.86% (Acetonitril/MilliQ®-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 30:70 über 8 min, Flussrate: 0.7 mL · min⁻¹, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 μL , Säulenofentemperatur: 40 °C).

N-(4-(Ethylcarboxy)phenyl)-2-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)acetamid (75f)



Die Synthese erfolgte gemäß der allgemeinen Vorschrift unter Verwendung von 4-Aminobenzoesäureethylester (147 mg, 0.89 mmol, 1.00 Äquiv.), wobei über Nacht bei Raumtemperatur gerührt

wurde. Nach Aufarbeitung (Methode **B**) und Umkristallisation aus ^cHex/EtOAc (1:1 V/V) wurde die Titelverbindung **75f** in Form gelber Kristalle (216 mg, 0.61 mmol, 69%) erhalten.

R_f: 0.38 (SiO₂, ^cHex/EtOAc 1:1).

Smb.: 212–214 °C (^cHex/EtOAc).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ/ppm = 10.81 (s, 1H, NH), 8.00–7.83 (m, 6H, H-4^{Philm}–H-7^{Philm} sowie H-3^{Ph} und H-5^{Ph}), 7.71 (d, ³J = 8.8 Hz, 2H, H-2^{Ph} und H-6^{Ph}), 4.50 (s, 2H, CH₂), 4.27 (q, ³J = 7.1 Hz, 2H CH₂CH₃), 1.30 (t, ³J = 7.1 Hz, 3H, CH₂CH₃).

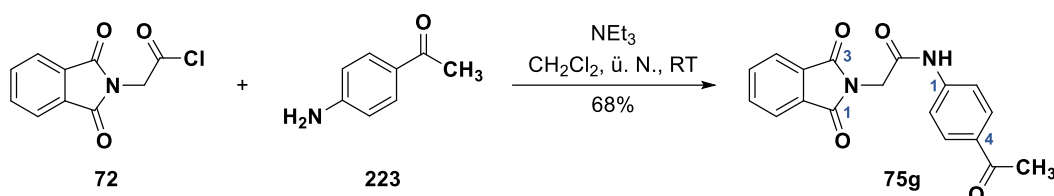
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ/ppm = 167.5 (C-1^{Philm} und C-3^{Philm}), 165.5 (CONH oder CO₂Et)¹, 165.3 (CONH oder CO₂Et)²⁵, 142.8 (C-1^{Ph}), 134.7 (C-5^{Philm} und C-6^{Philm}), 131.6 (C-3a^{Philm} und C-7a^{Philm}), 130.3 (C-3^{Ph} und C-5^{Ph}), 124.6 (C-4^{Ph}), 123.3 (C-4^{Philm} und C-7^{Philm}), 118.1 (C-2^{Ph} und C-6^{Ph}), 60.5 (CH₂CH₃), 40.9 (CH₂), 14.2 (CH₂CH₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3255, 3064, 1771, 1714, 1681, 1599, 1544, 1411, 1393, 1285, 1255, 1175, 1108, 948, 770, 712.

ESI-MS (pos.): *m/z* = 353.1 (100%, [M+H]⁺); *m/z* ber. für [C₁₉H₁₆N₂O₅+H]⁺ ([M+H]⁺): 353.1.

HPLC-Analyse (C₁₈): *t_R* = 1.38 min, Peakfläche: 99.63% (Acetonitril/MilliQ[®]-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 60:40 über 8 min, Flussrate: 0.7 mL · min⁻¹, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 μL, Säulenofentemperatur: 40 °C).

N-(4-Acetylphenyl)-2-(1,3-dioxoisoindolin-2-yl)acetamid (75g)



Die Synthese erfolgte gemäß der allgemeinen Vorschrift unter Verwendung von 4-Aminoacetophenon (120 mg, 0.89 mmol, 1.00 Äquiv.) in CH₂Cl₂, wobei über Nacht bei Raumtemperatur gerührt wurde. Nach Aufarbeitung (Methode **B**) und Präzipitation durch Zugabe von ^cHex (5 mL) zum Rückstand wurde die Titelverbindung **75g** als leicht gelblicher Feststoff (194 mg, 0.60 mmol, 68%) erhalten.

R_f: 0.30 (SiO₂, ^cHex/EtOAc 1:1).

Smb.: 198–200 °C (^cHex).

¹Eine exakte Zuordnung der C-Atome ist aufgrund der eng beieinander liegenden ¹³C-NMR-Signale nicht möglich.

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ /ppm = 10.69 (s, 1H, NH), 8.00–7.80 (m, 6H, *H*-4^{Ph_{tlm}–*H*-7^{Ph_{tlm} sowie *H*-3^{Ph} und *H*-5^{Ph}), 7.69 (d, ³*J* = 8.8 Hz, 2H, *H*-2^{Ph} und *H*-6^{Ph}), 4.50 (s, 2H, CH₂), 2.52 (s, 3H, CH₃).}}

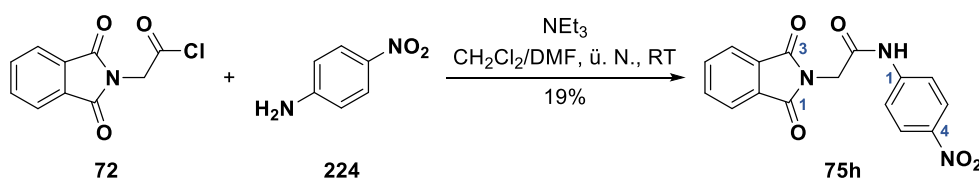
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ /ppm = 196.5 (C=O), 167.5 (C-1^{Ph_{tlm} und C-3^{Ph_{tlm}), 165.5 (CONH), 142.7 (C-1^{Ph}), 134.7 (C-5^{Ph_{tlm} und C-6^{Ph_{tlm}), 132.1 (C-4^{Ph}), 131.6 (C-3a^{Ph_{tlm} und C-7a^{Ph_{tlm}), 129.0 (C-3^{Ph} und C-5^{Ph}), 123.4 (C-4^{Ph_{tlm} und C-7^{Ph_{tlm}), 118.5 (C-2^{Ph} und C-6^{Ph}), 40.9 (CH₂), 26.4 (CH₃).}}}}}}}}

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3354, 1773, 1709, 1674, 1589, 1522, 1405, 1270, 1178, 1270, 1101, 949, 832, 715.

ESI-MS (pos.): *m/z* = 323.1 (100%, [M+H]⁺); *m/z* ber. für [C₁₈H₁₄N₂O₄+H]⁺ ([M+H]⁺): 323.1.

HPLC-Analyse (C₁₈): *t_R* = 1.01 min, Peakfläche: 99.71% (Acetonitril/MilliQ®-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 60:40 über 8 min, Flussrate: 0.7 mL · min⁻¹, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 μ L, Säulenofentemperatur: 40 °C).

N-(4-Nitrophenyl)-2-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)acetamid (75h)



Die Synthese erfolgte gemäß der allgemeinen Vorschrift unter Verwendung von 4-Nitroanilin (132 mg, 0.89 mmol, 1.00 Äquiv.) in CH₂Cl₂/DMF (12 mL, 5:1 V/V), wobei über Nacht bei Raumtemperatur gerührt wurde. Nach Aufarbeitung (Methode **B**) und Umkristallisation aus ^cHex/EtOAc (1:1 V/V) wurde die Titelverbindung **75h** in Form gelber Kristalle (56 mg, 0.17 mmol, 19%) erhalten.

R_f: 0.34 (SiO₂, ^cHex/EtOAc 1:1).

Smb.: 264–265 °C (^cHex/EtOAc).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ /ppm = 10.96 (s, 1H, NH), 8.23 (d, ³*J* = 9.2 Hz, 2H, *H*-3^{Ph} und *H*-5^{Ph}), 8.01–7.85 (m, 4H, *H*-4^{Ph_{tlm}–*H*-7^{Ph_{tlm}), 7.80 (d, ³*J* = 9.2 Hz, 2H, *H*-2^{Ph} und *H*-6^{Ph}), 4.53 (s, 2H, CH₂).}}

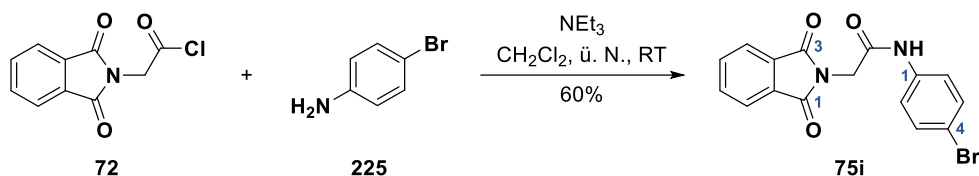
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ /ppm = 167.5 (C-1^{Ph_{tlm} und C-3^{Ph_{tlm}), 165.9 (CONH), 144.5 (C-1^{Ph}), 142.5 (C-4^{Ph}), 134.8 (C-5^{Ph_{tlm} und C-6^{Ph_{tlm}), 131.6 (C-3a^{Ph_{tlm} und C-7a^{Ph_{tlm}), 125.1 (C-3^{Ph} und C-5^{Ph}), 123.4 (C-4^{Ph_{tlm} und C-7^{Ph_{tlm}), 119.0 (C-2^{Ph} und C-6^{Ph}), 40.9 (CH₂).}}}}}}}}

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3275, 1772, 1707, 1674, 1507, 1407, 1394, 1340, 1110, 1087, 945, 863, 713.

ESI-MS (pos.): $m/z = 326.1$ (100%, $[M+H]^+$); m/z ber. für $[C_{16}H_{11}N_3O_5+H]^+$ ($[M+H]^+$): 326.1.

HPLC-Analyse (C₁₈): $t_R = 1.23$ min, Peakfläche: 98.80% (Acetonitril/MilliQ®-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 60:40 über 8 min, Flussrate: $0.7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: $5 \mu\text{L}$, Säulenofentemperatur: $40 \text{ }^\circ\text{C}$).

N-(4-Bromphenyl)-2-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)acetamid (75i)



Die Synthese erfolgte gemäß der allgemeinen Vorschrift unter Verwendung von 4-Bromanilin (153 mg, 0.89 mmol, 1.00 Äquiv.) in CH_2Cl_2 , wobei über Nacht bei Raumtemperatur gerührt wurde. Nach Aufarbeitung (Methode A) wurde die Titelverbindung **75i** als farbloser Feststoff (189 mg, 0.53 mmol, 60%) erhalten.

R_f: 0.48 (SiO_2 , $^c\text{Hex}/\text{EtOAc}$ 1:1).

Smb.: $267\text{--}269 \text{ }^\circ\text{C}$ (CH_2Cl_2).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta/\text{ppm} = 10.47$ (s, 1H, NH), 8.00–7.82 (m, 4H, *H*-4^{Philm}–*H*-7^{Philm}), 7.58–7.44 (m, 4H, *H*-2^{Ph}, *H*-3^{Ph}, *H*-5^{Ph} und *H*-6^{Ph}), 4.45 (s, 2H, CH₂).

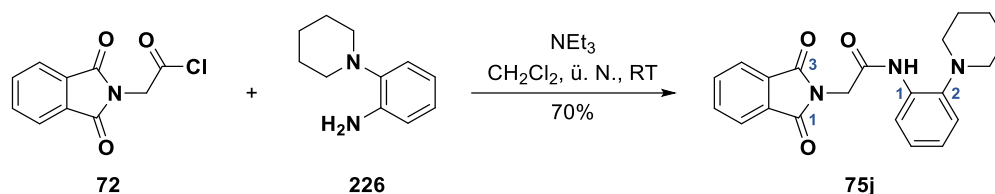
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta/\text{ppm} = 167.5$ (*C*-1^{Philm} und *C*-3^{Philm}), 164.3 (CONH), 137.8 (*C*-1^{Ph}), 134.7 (*C*-5^{Philm} und *C*-6^{Philm}), 131.7 (*C*-3^{Ph} und *C*-5^{Ph}), 131.6 (*C*-3a^{Philm} und *C*-7a^{Philm}), 123.4 (*C*-4^{Philm} und *C*-7^{Philm}), 121.2 (*C*-2^{Ph} und *C*-6^{Ph}), 115.2 (*C*-4^{Ph}), 40.8 (CH₂).

IR (ATR): $\tilde{\nu} [\text{cm}^{-1}] = 3258, 1773, 1720, 1665, 1542, 1484, 1411, 1396, 1296, 1252, 1192, 1114, 1072, 947, 820, 714$.

ESI-MS (pos.): $m/z = 359.1$ (100%, $[M+H]^+$)/361.0 (92%, $[M+H]^+$); m/z ber. für $[C_{16}H_{11}\text{Br}N_2O_3+H]^+$ ($[M+H]^+$): 359.0/361.0

HPLC-Analyse (C₁₈): $t_R = 1.57$ min, Peakfläche: 99.72% (Acetonitril/MilliQ®-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 60:40 über 8 min, Flussrate: $0.7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: $5 \mu\text{L}$, Säulenofentemperatur: $40 \text{ }^\circ\text{C}$).

N-(2-Piperidin-1-yl)phenyl)-2-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)acetamid (75j)



Die Synthese erfolgte gemäß der allgemeinen Vorschrift unter Verwendung von 2-(Piperidin-1-yl)-anilin (153 mg, 0.89 mmol, 1.00 Äquiv.) in CH_2Cl_2 , wobei über Nacht bei Raumtemperatur gerührt wurde. Nach Aufarbeitung (Methode **B**) und säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (${}^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc} = 3:1$) wurde die Titelverbindung **75j** als farbloser Feststoff (225 mg, 0.62 mmol, 70%) erhalten.

R_f: 0.25 (SiO_2 , ${}^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc} 3:1$).

Smb.: 136–138 °C (${}^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$).

${}^1\text{H-NMR}$, COSY (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta/\text{ppm} = 9.30$ (s, 1H, NH), 8.01–7.80 (m, 5H, $H\text{-}4^{\text{Philm}}$ – $H\text{-}7^{\text{Philm}}$ sowie $H\text{-}6^{\text{Ph}}$), 7.19–6.97 (m, 3H, $H\text{-}3^{\text{Ph}}$ – $H\text{-}5^{\text{Ph}}$), 4.53 (s, 2H, CH_2), 2.73 (*pseudo-t*, $J \approx 5.1$ Hz, 4H, $2 \times H\text{-}2^{\text{Pip}}$ und $2 \times H\text{-}6^{\text{Pip}}$), 1.69–1.56 (m, 4H, $2 \times H\text{-}3^{\text{Pip}}$ und $2 \times H\text{-}5^{\text{Pip}}$), 1.52–1.40 (m, 2H, $2 \times H\text{-}4^{\text{Pip}}$).

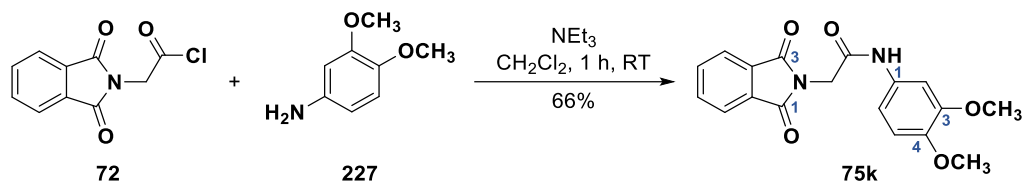
${}^{13}\text{C-NMR}$, HSQC, HMBC (75.5 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta/\text{ppm} = 167.5$ ($C\text{-}1^{\text{Philm}}$ und $C\text{-}3^{\text{Philm}}$), 164.8 (CONH), 144.5 ($C\text{-}2^{\text{Ph}}$), 134.8 ($C\text{-}5^{\text{Philm}}$ und $C\text{-}6^{\text{Philm}}$), 131.8 ($C\text{-}1^{\text{Ph}}$), 131.6 ($C\text{-}3a^{\text{Philm}}$ und $C\text{-}7a^{\text{Philm}}$), 124.7 ($C\text{-}3^{\text{Ph}}$), 123.6 ($C\text{-}5^{\text{Ph}}$), 123.4 ($C\text{-}4^{\text{Philm}}$ und $C\text{-}7^{\text{Philm}}$), 121.5 ($C\text{-}6^{\text{Ph}}$), 120.2 ($C\text{-}3^{\text{Ph}}$), 52.9 ($C\text{-}2^{\text{Pip}}$ und $C\text{-}6^{\text{Pip}}$), 41.1 (CH_2), 25.7 ($C\text{-}3^{\text{Pip}}$ und $C\text{-}5^{\text{Pip}}$), 23.7 ($C\text{-}4^{\text{Pip}}$).

IR (ATR): $\tilde{\nu} [\text{cm}^{-1}] = 3281, 2938, 2812, 1767, 1714, 1698, 1587, 1512, 1444, 1412, 1384, 1316, 1234, 1095, 949, 918, 752, 712$.

ESI-MS (pos.): $m/z = 364.2$ (100%, $[\text{M}+\text{H}]^+$)/361.0 (92%, $[\text{M}+\text{H}]^+$); m/z ber. für $[\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_3+\text{H}]^+$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 364.2.

HPLC-Analyse (C₁₈): $t_R = 3.00$ min, Peakfläche: 99.35% (Acetonitril/MilliQ®-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 60:40 über 8 min, Flussrate: $0.7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: $5 \mu\text{L}$, Säulenofentemperatur: 40 °C).

N-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)acetamid (75k)



Die Synthese erfolgte gemäß der allgemeinen Vorschrift unter Verwendung von 3,4-Dimethoxyanilin (136 mg, 0.89 mmol, 1.00 Äquiv.) mit einer Reaktionszeit von 1 h. Nach Aufarbeitung (Methode **A**) wurde die Titelverbindung **75k** als farbloser Feststoff (200 mg, 0.59 mmol, 66%) erhalten.

R_f: 0.22 (SiO₂, ^cHex/EtOAc 1:1).

Smb.: 258–260 °C (CH₂Cl₂).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ/ppm = 10.20 (s, 1H, NH), 8.00–7.82 (m, 4H, *H*-4^{Ph_{tlm}–*H*-7^{Ph_{tlm}), 7.28 (d, ⁴*J* = 2.4 Hz, 1H, *H*-2^{Ph}), 7.02 (dd, ³*J* = 8.7 Hz, ⁴*J* = 2.4 Hz, 1H, *H*-6^{Ph}), 6.89 (d, ³*J* = 8.7 Hz, 1H, *H*-5^{Ph}), 4.41 (s, 2H, CH₂), 3.71 (s, 3H, OCH₃)¹, 3.70 (s, 3H, OCH₃)²⁶.}}

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ/ppm = 167.6 (*C*-1^{Ph_{tlm} und *C*-3^{Ph_{tlm}), 164.3 (CONH), 148.5 (*C*-3^{Ph}), 145.0 (*C*-4^{Ph}), 134.7 (*C*-5^{Ph_{tlm} und *C*-6^{Ph_{tlm}), 132.1 (*C*-1^{Ph}), 131.7 (*C*-3a^{Ph_{tlm} und *C*-7a^{Ph_{tlm}), 123.3 (*C*-4^{Ph_{tlm} und *C*-7^{Ph_{tlm}), 112.0 (*C*-5^{Ph}), 111.1 (*C*-6^{Ph}), 104.3 (*C*-2^{Ph}), 55.7 (OCH₃)²⁶, 55.3 (OCH₃)²⁶, 40.7 (CH₂).}}}}}}}}

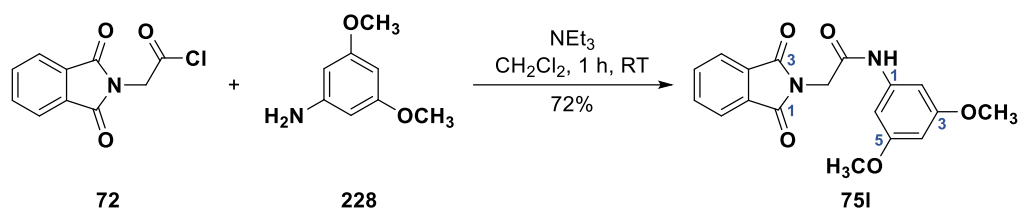
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3317, 1777, 1717, 1678, 1607, 1560, 1517, 1419, 1396, 1235, 1131, 1022, 950, 837, 820, 714.

ESI-MS (pos.): *m/z* = 341.2 (100%, [M+H]⁺) und 363.2 (3%, [M+Na]⁺); *m/z* ber. für [C₁₈H₁₆N₂O₅+H]⁺ ([M+H]⁺): 341.1.

HPLC-Analyse (C₁₈): *t_R* = 3.97 min, Peakfläche: 95.14% (Acetonitril/MilliQ[®]-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 30:70 über 8 min, Flussrate: 0.7 mL · min⁻¹, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 μL, Säulenofentemperatur: 40 °C).

¹Eine exakte Zuordnung der H- und C-Atome ist aufgrund der eng beieinander liegenden Signale nicht möglich.

N-(3,5-Dimethoxyphenyl)-2-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)acetamid (75l)



Die Synthese erfolgte gemäß der allgemeinen Vorschrift unter Verwendung von 3,5-Dimethoxyanilin (136 mg, 0.89 mmol, 1.00 Äquiv.) mit einer Reaktionszeit von 1 h. Nach Aufarbeitung (Methode A) wurde die Titelverbindung **75l** als farbloser Feststoff (217 mg, 0.64 mmol, 72%) erhalten.

R_f: 0.38 (SiO₂, ^oHex/EtOAc 1:1).

Smb.: 218–219 °C (CH₂Cl₂).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ /ppm = 10.31 (s, 1H, NH), 8.00–7.83 (m, 4H, *H*-4^{Ph_{tlm}–*H*-7^{Ph_{tlm}), 6.79 (d, ⁴*J* = 2.3 Hz, 2H, *H*-2^{Ph} und *H*-6^{Ph}), 6.23 (d, ⁴*J* = 2.3 Hz, 1H, *H*-4^{Ph}), 4.42 (s, 2H, CH₂), 3.70 (s, 3H, 2 × OCH₃).}}

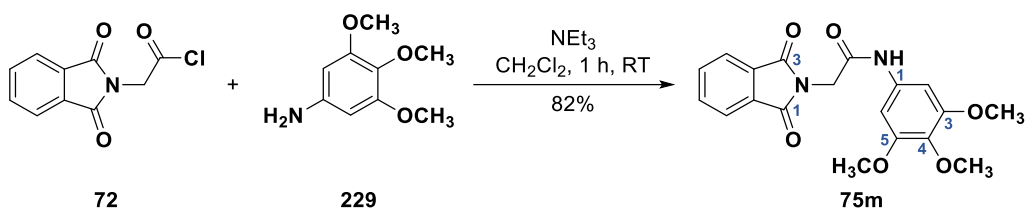
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ /ppm = 167.6 (C-1^{Ph_{tlm} und C-3^{Ph_{tlm}), 164.9 (CONH), 160.5 (C-3^{Ph} und C-5^{Ph}), 140.2 (C-1^{Ph}), 134.8 (C-5^{Ph_{tlm} und C-6^{Ph_{tlm}), 131.6 (C-3a^{Ph_{tlm} und C-7a^{Ph_{tlm}), 123.3 (C-4^{Ph_{tlm} und C-7^{Ph_{tlm}), 97.4 (C-2^{Ph} und C-6^{Ph}), 95.7 (C-4^{Ph}), 55.1 (2 × OCH₃), 40.8 (CH₂).}}}}}}}}

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3263, 1774, 1722, 1665, 1617, 1599, 1467, 1417, 1255, 1208, 1158, 1055, 950, 824, 712.

ESI-MS (pos.): *m/z* = 341.2 (100%, [M+H]⁺); *m/z* ber. für [C₁₈H₁₆N₂O₅+H]⁺ ([M+H]⁺): 341.1.

HPLC-Analyse (C₁₈): *t_R* = 1.19 min, Peakfläche: 99.51% (Acetonitril/MilliQ[®]-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 60:40 über 8 min, Flussrate: 0.7 mL · min⁻¹, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 μ L, Säulenofentemperatur: 40 °C).

N-(3,4,5-Trimethoxyphenyl)-2-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)acetamid (75m)



Die Synthese erfolgte gemäß der allgemeinen Vorschrift unter Verwendung von 3,4,5-Trimethoxyanilin (163 mg, 0.89 mmol, 1.00 Äquiv.) mit einer Reaktionszeit von 1 h. Nach Aufarbeitung

(Methode A) wurde die Titelverbindung **75m** als leicht gelblicher Feststoff (272 mg, 0.73 mmol, 82%) erhalten.

R_f: 0.21 (SiO₂, ^cHex/EtOAc 1:1).

Smb.: 254–256 °C (CH₂Cl₂).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ/ppm = 10.30 (s, 1H, NH), 7.99–7.85 (m, 4H, *H*-4^{Ph₁lm}–*H*-7^{Ph₁lm}), 6.93 (s, 2H, *H*-2^{Ph} und *H*-6^{Ph}), 4.42 (s, 2H, CH₂), 3.72 (s, 6H, C-3^{Ph}OCH₃ und C-5^{Ph}OCH₃), 3.61 (s, 3H C-4^{Ph}OCH₃).

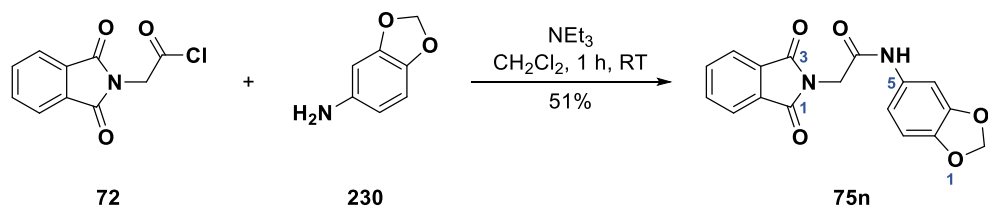
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ/ppm = 167.6 (C-1^{Ph₁lm} und C-3^{Ph₁lm}), 164.6 (CONH), 152.8 (C-3^{Ph} und C-5^{Ph}), 134.7 (C-5^{Ph₁lm} und C-6^{Ph₁lm}), 134.6 (C-1^{Ph}), 133.6 (C-4^{Ph}), 131.6 (C-3a^{Ph₁lm} und C-7a^{Ph₁lm}), 123.3 (C-4^{Ph₁lm} und C-7^{Ph₁lm}), 96.8 (C-2^{Ph} und C-6^{Ph}), 60.1 (C-4^{Ph}OCH₃), 55.7 (C-3^{Ph}OCH₃ und C-5^{Ph}OCH₃), 40.8 (CH₂).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3262, 1774, 1721, 1664, 1607, 1417, 1391, 1233, 1129, 950, 826, 712.

ESI-MS (pos.): *m/z* = 371.2 (100%, [M+H]⁺); *m/z* ber. für [C₁₉H₁₈N₂O₆+H]⁺ ([M+H]⁺): 371.1.

HPLC-Analyse (C₁₈): *t_R* = 5.16 min, Peakfläche: 99.48% (Acetonitril/MilliQ[®]-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 30:70 über 8 min, Flussrate: 0.7 mL · min⁻¹, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 μL, Säulenofentemperatur: 40 °C).

N-(Benzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)-2-(1,3-dioxoisindolin-2-yl)acetamid (**75n**)



Die Synthese erfolgte gemäß der allgemeinen Vorschrift unter Verwendung von 5-Amino-benzo[*d*][1,3]dioxol (122 mg, 0.89 mmol, 1.00 Äquiv.) mit einer Reaktionszeit von 1 h. Nach Aufarbeitung (Methode A) wurde die Titelverbindung **75n** als farbloser Feststoff (122 mg, 0.45 mmol, 51%) erhalten.

R_f: 0.42 (SiO₂, ^cHex/EtOAc 1:1).

Smb.: 242–244 °C (CH₂Cl₂).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ/ppm = 10.24 (s, 1H, NH), 7.98–7.84 (m, 4H, *H*-4^{Ph₁lm}–*H*-7^{Ph₁lm}), 7.23 (d, ⁴*J* = 2.0 Hz, 1H, *H*-4^{Ph}), 6.93 (dd, ³*J* = 8.5 Hz, ⁴*J* = 2.0 Hz, 1H, *H*-6^{Ph}), 6.86 (d, ³*J* = 8.5 Hz, 1H, *H*-7^{Ph}), 5.98 (s, 2H C-2H₂), 4.40 (s, 2H, CH₂).

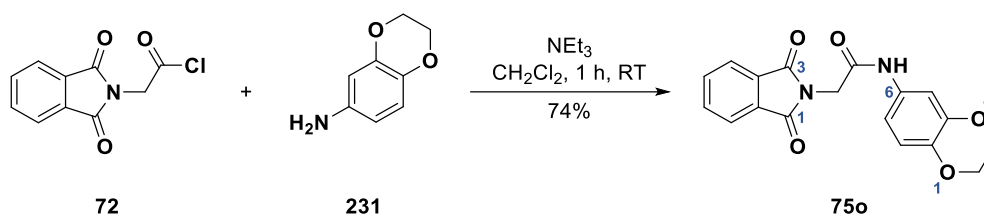
^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO- d_6): $\delta/\text{ppm} = 167.6$ ($\text{C-1}^{\text{Philm}}$ und $\text{C-3}^{\text{Philm}}$), 164.6 (CONH), 147.1 (C-3a^{Ph}), 143.2 (C-7a^{Ph}), 134.7 ($\text{C-5}^{\text{Philm}}$ und $\text{C-6}^{\text{Philm}}$), 132.8 (C-5^{Ph}), 131.6 ($\text{C-3a}^{\text{Philm}}$ und $\text{C-7a}^{\text{Philm}}$), 123.3 ($\text{C-4}^{\text{Philm}}$ und $\text{C-7}^{\text{Philm}}$), 112.1 (C-6^{Ph}), 108.1 (C-7^{Ph}), 101.4 (C-4^{Ph}), 101.0 (C-2), 40.6 (CH_2).

IR (ATR): $\tilde{\nu} [\text{cm}^{-1}] = 3259, 1775, 1717, 1681, 1502, 1417, 1396, 1316, 1226, 1192, 1115, 1035, 952, 809, 711$.

ESI-MS (pos.): $m/z = 325.1$ (100%, $[\text{M}+\text{H}]^+$) und 347.1 (5%, $[\text{M}+\text{Na}]^+$); m/z ber. für $[\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_5+\text{H}]^+$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 325.1.

HPLC-Analyse (C₁₈): $t_R = 5.54$ min, Peakfläche: 98.31% (Acetonitril/MilliQ®-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 30:70 über 8 min, Flussrate: $0.7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 μL , Säulenofentemperatur: $40 \text{ }^\circ\text{C}$).

N-(Benzo[*b*][1,4]dioxan-6-yl)-2-(1,3-dioxoisindolin-2-yl)acetamid (75o)



Die Synthese erfolgte gemäß der allgemeinen Vorschrift unter Verwendung von 6-Amino-benzo[*b*][1,4]dioxan (135 mg, 0.89 mmol, 1.00 Äquiv.) mit einer Reaktionszeit von 1 h. Nach Aufarbeitung (Methode A) wurde die Titelverbindung **75o** als farbloser Feststoff (222 mg, 0.66 mmol, 74%) erhalten.

R_f: 0.38 (SiO₂, ^cHex/EtOAc 1:1).

Smb.: 279–281 °C (CH₂Cl₂).

^1H -NMR, COSY (300 MHz, DMSO- d_6): $\delta/\text{ppm} = 10.17$ (s, 1H, NH), 8.03–7.76 (m, 4H, $\text{H-4}^{\text{Philm}}$ – $\text{H-7}^{\text{Philm}}$), 7.17 (d, $^4J = 2.5$ Hz, 1H, H-5^{Ph}), 6.94 (dd, $^3J = 8.8$ Hz, $^4J = 2.5$ Hz, 1H, H-7^{Ph}), 6.79 (d, $^3J = 8.8$ Hz, 1H, H-8^{Ph}), 4.40 (s, 2H, CH₂), 4.20 (s, 4H, (CH₂)₂).

^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO- d_6): $\delta/\text{ppm} = 167.6$ ($\text{C-1}^{\text{Philm}}$ und $\text{C-3}^{\text{Philm}}$), 164.3 (CONH), 143.0 (C-4a^{Ph}), 139.6 (C-8a^{Ph}), 134.7 ($\text{C-5}^{\text{Philm}}$ und $\text{C-6}^{\text{Philm}}$), 132.2 (C-6^{Ph}), 131.7 ($\text{C-3a}^{\text{Philm}}$ und $\text{C-7a}^{\text{Philm}}$), 123.3 ($\text{C-4}^{\text{Philm}}$ und $\text{C-7}^{\text{Philm}}$), 116.9 (C-8^{Ph}), 112.4 (C-7^{Ph}), 108.4 (C-5^{Ph}), 64.2 (C-2 oder C-3)¹, 63.9 (C-2 oder C-3)²⁷, 40.6 (CH₂).

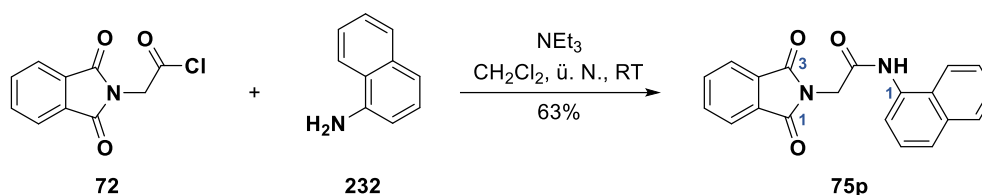
¹Eine exakte Zuordnung der C-Atome ist aufgrund der eng beieinander liegenden Signale nicht möglich.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3251, 1717, 1656, 1601, 1509, 1412, 1384, 1305, 1276, 1232, 1117, 1068, 948, 924, 869, 714.

ESI-MS (pos.): m/z = 339.1 (100%, $[\text{M}+\text{H}]^+$); m/z ber. für $[\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_5+\text{H}]^+$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 339.1.

HPLC-Analyse (C₁₈): t_R = 5.38 min, Peakfläche: 99.84% (Acetonitril/MilliQ[®]-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 30:70 über 8 min, Flussrate: 0.7 mL · min⁻¹, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 μL , Säulenofentemperatur: 40 °C).

N-(Naphthalen-1-yl)-2-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)acetamid (75p)



Die Synthese erfolgte gemäß der allgemeinen Vorschrift unter Verwendung von 1-Naphthylamin (127 mg, 0.89 mmol, 1.00 Äquiv.), wobei über Nacht bei Raumtemperatur gerührt wurde. Nach Aufarbeitung (Methode A) wurde die Titelverbindung **75p** als farbloser Feststoff (186 mg, 0.56 mmol, 63%) erhalten.

R_f: 0.71 (SiO_2 , $^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$ 1:1).

Smb.: 301–303 °C (CH_2Cl_2).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆):¹ δ/ppm = 10.35 (s, 1H, NH), 8.12 (d, 3J = 8.0 Hz, $H\text{-}2^{\text{Ph}}$), 8.03–7.73 (m, 6H, $H\text{-}4^{\text{Philm}}$ – $H\text{-}7^{\text{Philm}}$, $2 \times H_{\text{Ar}}$), 7.71–7.34 (m, 4H, $4 \times H_{\text{Ar}}$), 4.64 (s, 2H, CH_2).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆):²⁸ δ/ppm = 167.7 ($C\text{-}1^{\text{Philm}}$ und $C\text{-}3^{\text{Philm}}$), 165.9 (CONH), 134.7 ($C\text{-}5^{\text{Philm}}$ und $C\text{-}6^{\text{Philm}}$), 133.7 ($C\text{-}1^{\text{Ph}}$), 132.9 (C_{Ar}), 131.8 ($C\text{-}3a^{\text{Philm}}$ und $C\text{-}7a^{\text{Philm}}$), 128.2 (C_{Ar}), 127.9 (C_{Ar}), 126.2 (C_{Ar}), 126.3 (C_{Ar}), 125.8 (C_{Ar}), 125.6 (C_{Ar}), 123.3 ($C\text{-}4^{\text{Philm}}$ und $C\text{-}7^{\text{Philm}}$), 122.7 ($C\text{-}2^{\text{Ph}}$), 121.9 (C_{Ar}), 40.7 (CH_2).

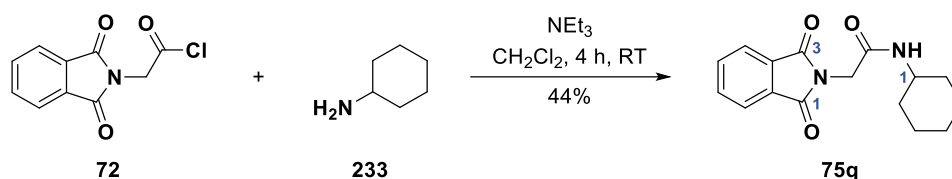
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3247, 1779, 1717, 1658, 1548, 1416, 1394, 1318, 1194, 1113, 949, 777, 713.

ESI-MS (pos.): m/z = 331.1 (100%, $[\text{M}+\text{H}]^+$) und 353.1 (3%, $[\text{M}+\text{Na}]^+$); m/z ber. für $[\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3+\text{H}]^+$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 331.1.

HPLC-Analyse (C₁₈): t_R = 1.32 min, Peakfläche: 95.54% (Acetonitril/MilliQ[®]-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 60:40 über 8 min, Flussrate: 0.7 mL · min⁻¹, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 μL , Säulenofentemperatur: 40 °C).

¹Eine exakte Zuordnung der H- und C-Atome ist aufgrund der geringen Auflösung in den (2D)-NMR-Spektren nicht möglich.

N-Cyclohexyl-2-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)acetamid (75q)



Die Synthese erfolgte gemäß der allgemeinen Vorschrift unter Verwendung von Cyclohexylamin (103 μL , 0.89 mmol, 1.00 Äquiv.) mit einer Reaktionszeit von 4 h. Nach Aufarbeitung (Methode **B**) wurde die Titelverbindung **75q** als farbloser Feststoff (113 mg, 0.39 mmol, 44%) erhalten.

R_f: 0.23 (SiO₂, ^cHex/EtOAc 2:1).

Smb.: 240–242 °C (EtOAc).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ /ppm = 8.08 (d, ³*J* = 7.8 Hz, 1H, NH), 7.96–7.80 (m, 4H, H-4^{Philm}–H-7^{Philm}), 4.16 (s, 2H, CH₂), 3.59–3.42 (m, 1H, CH^{cHex}), 1.78–1.61 (m, 4H, CH^{cHex}), 1.59–1.49 (m, 1H, CH^{cHex}), 1.34–1.02 (m, 5H, CH^{cHex}).

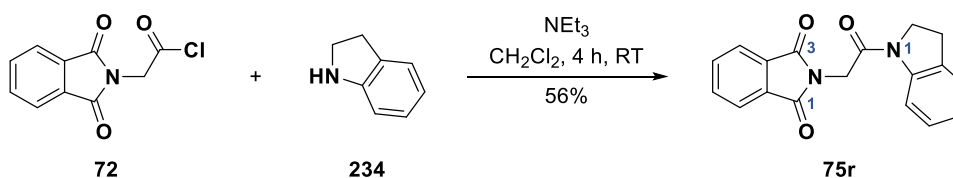
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ /ppm = 167.6 (C-1^{Philm} und C-3^{Philm}), 164.8 (CONH), 134.5 (C-5^{Philm} und C-6^{Philm}), 131.7 (C-3a^{Philm} und C-7a^{Philm}), 123.3 (C-4^{Philm} und C-7^{Philm}), 47.9 (CH^{cHex}), 40.1 (CH₂)¹, 32.3 (2 \times CH₂^{cHex}), 25.2 (CH₂^{cHex}), 24.5 (2 \times CH₂^{cHex}).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3297, 2924, 2851, 1725, 1662, 1556, 1419, 1392, 1319, 1254, 1117, 952, 889, 742, 715.

ESI-MS (pos.): *m/z* = 287.2 (100%, [M+H]⁺); *m/z* ber. für [C₁₆H₁₈N₂O₃+H]⁺ ([M+H]⁺): 287.1.

HPLC-Analyse (C₁₈): *t_R* = 1.18 min, Peakfläche: 98.26% (Acetonitril/MilliQ[®]-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 60:40 über 8 min, Flussrate: 0.7 mL \cdot min⁻¹, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 μL , Säulenofentemperatur: 40 °C).

2-(2-(Indolin-1-yl)-2-oxoethyl)-1,3-dioxisoindolin (75r)



Die Synthese erfolgte gemäß der allgemeinen Vorschrift unter Verwendung von 2,3-Dihydro-1*H*-indol (100 μL , 0.89 mmol, 1.00 Äquiv.) mit einer Reaktionszeit von 4 h. Nach Aufarbeitung (Methode **B**) wurde die Titelverbindung **75r** als farbloser Feststoff (154 mg, 0.50 mmol, 56%) erhalten.

¹Indirekt mittels ¹H-¹³C-HSQC aufgrund der Überlagerung durch Lösemittelsignal (DMSO-*d*₆) bestimmt.

R_f: 0.30 (SiO₂, ^cHex/EtOAc 2:1).

Smb.: 252–254 °C (EtOAc).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ/ppm = 8.02–7.84 (m, 5H, *H*-4^{Philm}–*H*-7^{Philm} und *H*-8^{Ind}), 7.28 (d, ³*J* = 7.3 Hz, 1H, *H*-4^{Ind}), 7.21–7.08 (m, 1H, *H*-6^{Ind}), 7.02 (td, ³*J* = 7.3 Hz, ⁴*J* = 1.2 Hz, *H*-5^{Ind}), 4.65 (s, 2H, CH₂), 4.29 (t, ³*J* = 8.4 Hz, 2H, C-2^{Ind}H₂), 3.22 (t, ³*J* = 8.4 Hz, 2H, C-3^{Ind}H₂).

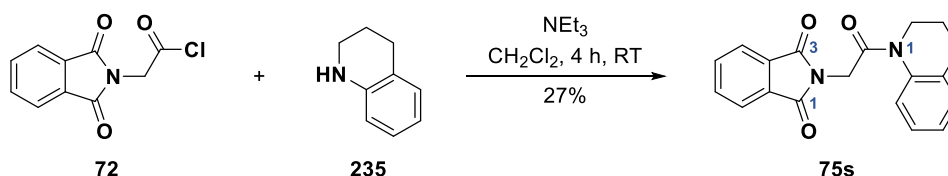
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ/ppm = 168.1 (C-1^{Philm} und C-3^{Philm}), 164.5 (CON), 135.3 (C-5^{Philm} und C-6^{Philm}), 132.3 (C-3a^{Ind} und C-7a^{Ind}), 132.1 (C-3a^{Philm} und C-7a^{Philm}), 127.5 (C-6^{Ind}), 125.5 (C-4^{Ind}), 124.3 (C-5^{Ind}), 123.9 (C-4^{Philm} und C-7^{Philm}), 116.2 (C-7^{Ind}), 46.9 (C-2^{Ind}), 41.1 (CH₂), 28.1 (C-3^{Ind}).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2939, 1705, 1666, 1484, 1426, 1389, 1305, 1289, 1110, 954, 760, 723, 714.

ESI-MS (pos.): *m/z* = 307.2 (100%, [M+H]⁺); *m/z* ber. für [C₁₈H₁₄N₂O₃+H]⁺ ([M+H]⁺): 307.1.

HPLC-Analyse (C₁₈): *t_R* = 1.48 min, Peakfläche: 98.50% (Acetonitril/MilliQ[®]-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 60:40 über 8 min, Flussrate: 0.7 mL · min⁻¹, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 μL, Säulenofentemperatur: 40 °C).

2-(2-(3,4-Dihydrochinolin-1(2*H*)-yl)-2-oxoethyl)-1,3-dioxisoindolin (75s)



Die Synthese erfolgte gemäß der allgemeinen Vorschrift unter Verwendung von 1,2,3,4-Tetrahydrochinolin (112 μL, 0.89 mmol, 1.00 Äquiv.) mit einer Reaktionszeit von 4 h. Nach Aufarbeitung (Methode B) wurde die Titelverbindung **75s** als farbloser Feststoff (77 mg, 0.24 mmol, 27%) erhalten.

R_f: 0.35 (SiO₂, ^cHex/EtOAc 2:1).

Smb.: 193–195 °C (EtOAc).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ/ppm = 7.98–7.82 (m, 4H, *H*-4^{Philm}–*H*-7^{Philm}), 7.62 (d, ³*J* = 7.9 Hz, 1H, *H*-8^{DQ}), 7.27–7.04 (m, 3H, *H*-5^{DQ}–*H*-7^{DQ}), 4.63 (s, 2H, CH₂), 3.77 (*pseudo-t*, *J* ≈ 6.3 Hz, 2H, C-2^{DQ}H₂), 2.76 (t, ³*J* = 6.6 Hz, 2H, C-4^{DQ}H₂), 1.92 (p, ³*J* = 6.6 Hz, 2H, C-3^{DQ}H₂).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆):¹ δ/ppm = 167.4 (C-1^{Philm} und C-3^{Philm}), 165.4 (CON), 137.6 (C-8a^{DQ}), 134.6 (C-5^{Philm} und C-6^{Philm}), 131.5 (C-3a^{Philm} und C-7a^{Philm}), 128.6 (C-5^{DQ}),

¹Bem.: C-4a^{DQ} konnte in diesen Experimenten aufgrund der geringen Signalintensität/Linienverbreiterung nicht bestimmt werden.

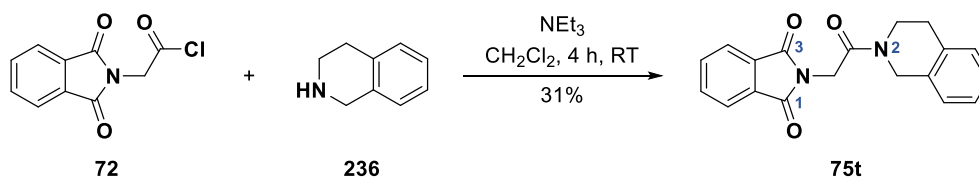
125.8 (C-6^{DQ} oder C-7^{DQ})¹, 125.0 (C-6^{DQ} oder C-7^{DQ})³¹, 124.2 (C-8^{DQ}), 123.2 (C-4^{Philm} und C-7^{Philm}), 43.3 (C-2^{DQ})², 39.9 (CH₂)³², 26.1 (C-4^{DQ}), 23.3 (C-3^{DQ}).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2950, 1769, 1717, 1645, 1493, 1421, 1386, 1330, 1253, 1115, 958, 756, 709.

ESI-MS (pos.): m/z = 321.2 (100%, [M+H]⁺); m/z ber. für [C₁₉H₁₆N₂O₃+H]⁺ ([M+H]⁺): 321.1.

HPLC-Analyse (C₁₈): t_R = 1.68 min, Peakfläche: 99.75% (Acetonitril/MilliQ®-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 60:40 über 8 min, Flussrate: 0.7 mL · min⁻¹, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 µL, Säulenofentemperatur: 40 °C).

2-(2-(3,4-Dihydroisochinolin-2(1*H*)-yl)-2-oxoethyl)-1,3-dioxoisindolin (75t)



Die Synthese erfolgte gemäß der allgemeinen Vorschrift unter Verwendung von 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin (113 µL, 0.89 mmol, 1.00 Äquiv.) mit einer Reaktionszeit von 4 h. Nach Aufarbeitung (Methode B) wurde die Titelverbindung **75t** als farbloser Feststoff (81 mg, 0.27 mmol, 31%) erhalten. Das Produkt lag als Gemisch zweier Rotamere (A/B \approx 1.3:1) vor, welche sich in ausgewählten Signalen in den ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren unterscheiden ließen.

R_f: 0.24 (SiO₂, ^cHex/EtOAc 2:1).

Smb.: 209–211 °C (EtOAc).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ /ppm = 7.98–7.82 (m, 4H, H-4^{Philm}–H-7^{Philm}), 7.26–7.15 (m, 5H, H-5^{DⁱQ}–H-8^{DⁱQ}), 4.81 (s, 2H, C-1^{DⁱQ}H₂, Rotamer B), 4.65 (s, 2H, CH₂, Rotamer B), 4.63 (s, CH₂, Rotamer A), 4.58 (s, 2H, C-1^{DⁱQ}H₂, Rotamer A), 3.80 (t, ³J = 6.0 Hz, 2H, C-3^{DⁱQ}H₂, Rotamer A), 3.66 (t, ³J = 6.0 Hz, 2H, C-3^{DⁱQ}H₂, Rotamer B), 2.95 (t, ³J = 6.0 Hz, 2H, C-4^{DⁱQ}H₂, Rotamer A), 2.79 (t, ³J = 6.0 Hz, 2H, C-4^{DⁱQ}H₂, Rotamer B).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ /ppm = 167.6 (C-1^{Philm} und C-3^{Philm}), 164.6 (CON, Rotamer A), 164.5 (CON, Rotamer B), 134.7 (C-5^{Philm} und C-6^{Philm}), 134.6 (C-8a^{DⁱQ}, ein Rotamer), 134.4 (C-8a^{DⁱQ}, anderes Rotamer), 133.1 (C-4a^{DⁱQ}, Rotamer A), 132.8 (C-4a^{DⁱQ}, Rotamer B), 131.7 (C-3a^{Philm} und C-7a^{Philm}), 128.5 (C-5^{DⁱQ}, Rotamer B), 128.4 (C-5^{DⁱQ}, Rotamer A), 126.63 (C-8^{DⁱQ}, Rotamer B), 126.55 (C-8^{DⁱQ}, Rotamer A), 126.4 (C-6^{DⁱQ}, Rotamer A und B), 126.3 (C-7^{DⁱQ}, Rotamer A), 126.2 (C-7^{DⁱQ}, Rotamer B), 123.3 (C-4^{Philm} und C-7^{Philm}), 45.3 (C-1^{DⁱQ}, Rotamer B), 43.9

¹Indirekt mittels ¹H-¹³C-HSQC aufgrund Linienerweiterung bestimmt.

²Indirekt mittels ¹H-¹³C-HSQC aufgrund der Überlagerung durch Lösemittelsignal (DMSO-*d*₆) bestimmt.

(C-1^{DiQ}, Rotamer A), 41.8 (C-3^{DiQ}, Rotamer A), 39.8 (C-3^{DiQ}, Rotamer B)¹, 39.3 (CH₂, Rotamer A und B)¹, 28.5 (C-4^{DiQ}, Rotamer A), 27.8 (C-4^{DiQ}, Rotamer B).

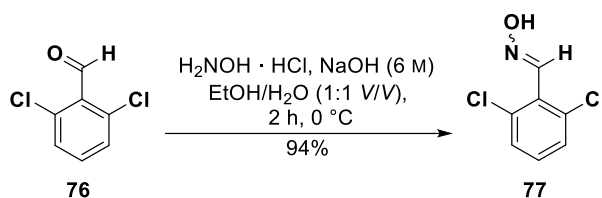
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2937, 1705, 1656, 1470, 1448, 1424, 1394, 1231, 1111, 953, 755, 719.

ESI-MS (pos.): m/z = 321.2 (100%, [M+H]⁺); m/z ber. für [C₁₉H₁₆N₂O₃+H]⁺ ([M+H]⁺): 321.1.

HPLC-Analyse (C₁₈): t_R = 1.37 min, Peakfläche: 96.45% (Acetonitril/MilliQ®-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 60:40 über 8 min, Flussrate: 0.7 mL · min⁻¹, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 µL, Säulenofentemperatur: 40 °C).

10.7.3 Synthese des TRPML2-Aktivators ML2-SA1

2,6-Dichlorbenzaloxim (77)



Die Synthese wurde in Anlehnung an eine Vorschrift von McIntosh *et al.* durchgeführt.^[217] Eine Suspension von 2,6-Dichlorbenzaldehyd (5.00 g, 28.57 mmol, 1.00 Äquiv.) in EtOH/H₂O (40 mL, 1:1 V/V) wurde bei 0 °C mit Hydroxylamin-Hydrochlorid (2.98 g, 42.85 mmol, 1.50 Äquiv.) sowie tropfenweise mit einer NaOH-Lösung (6 M, aq., 11.7 mL, 70.00 mmol, 2.45 Äquiv.) versetzt. Es wurde 2 h bei 0 °C gerührt und anschließend durch Zugabe einer HCl-Lösung (1 M, aq., 20 mL) gequenchet. Das Präzipitat wurde abgesaugt, gründlich mit Wasser gewaschen und im Feinvakuum getrocknet, sodass die Titelverbindung **77** als farbloses Pulver (5.08 g, 26.74 mmol, 94%) erhalten wurde.

R_f: 0.45 (SiO₂, ^cHex/EtOAc 4:1).

Smb.: 144–147 °C (EtOH/H₂O).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ /ppm = 11.79 (s, 1H, NOH), 8.21 (s, 1H, CH(NOH)), 7.57–7.48 (m, 2H, H-3^{Ph} und H-5^{Ph}), 7.40 (dd, J = 9.0, 7.1 Hz, 1H, H-4^{Ph}).

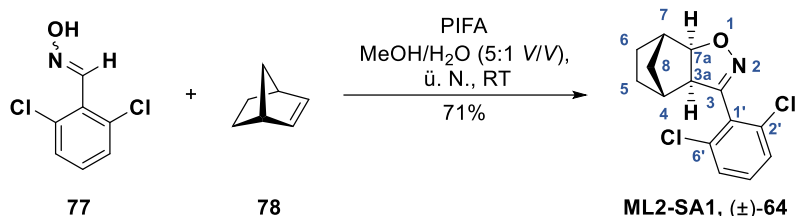
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ /ppm = 143.8 (CH(NOH)), 133.9 (C-2^{Ph} und C-6^{Ph}), 130.9 (C-4^{Ph}), 129.4 (C-1^{Ph}), 128.9 (C-3^{Ph} und C-5^{Ph}).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3279, 1583, 1559, 1438, 1418, 1299, 1187, 1095, 982, 918, 879, 777, 770, 717, 679.

¹Indirekt mittels ¹H-¹³C-HSQC aufgrund der Überlagerung durch Lösemittelsignal (DMSO-*d*₆) bestimmt.

ESI-MS (pos.): $m/z = 190.1$ (100%, $[M+H]^+$)/ 192.1 (67%, $[M+H]^+$); m/z ber. für $[C_7H_5Cl_2NO+H]^+$ ($[M+H]^+$): 190.0/192.0.

(3a*RS*,4*RS*,7*SR*,7a*RS*)-3-(2,6-Dichlorophenyl)-3a,4,5,6,7,7a-hexahydro-4,7-methanobenzo[*d*]isoxazol (ML2-SA1, (±)-64)



Die Synthese erfolgte in Anlehnung an eine Vorschrift von Plesch *et al.*^[98] Zu einer Lösung des Aldoxims **77** (1.00 g, 5.26 mmol, 1.00 Äquiv.) und Norbornen (**78**, 743 mg, 7.89 mmol, 1.50 Äquiv.) in MeOH/Wasser (5:1 V/V) wurde [Bis(trifluoracetoxy)iod]benzol (PIFA, 2.72 g, 6.32 mmol, 1.20 Äquiv.) portionsweise zugegeben. Es wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, die Reaktionsmischung mit einer NaCl-Lösung (ges., aq., 50 mL) versetzt und mit EtOAc (3 × 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (^cHex/EtOAc 40:1) wurde die Titelverbindung in Form farbloser Kristalle (1.06 g, 3.76 mmol, 71%; Lit.:^[98] 68%) erhalten.

R_f: 0.23 (SiO₂, ^cHex/EtOAc 20:1).

Smb.: 114–115 °C (^cHex/EtOAc); Lit.:^[98] 116 °C.

¹H-NMR, COSY (300 MHz, CDCl₃): δ /ppm = 7.52–7.20 (m, 3H, $H-3^{Ph}-H-5^{Ph}$), 4.74 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, $H-7a$), 3.54 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, $H-3a$), 2.69 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H, $H-7$), 2.35 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H, $H-4$), 1.98 (d, $J = 10.6$ Hz, 1H, H_a-8), 1.69–1.43 (m, 2H, H_a-5 und H_a-6), 1.31 (d, $J = 10.6$ Hz, 1H, H_b-8), 1.25–1.07 (m, 2H, H_b-5 und H_b-6).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, CDCl₃): δ /ppm = 154.7 ($C-3$), 135.3 ($C-2^{Ph}$ und $C-6^{Ph}$), 130.9 ($C-4^{Ph}$), 129.2 ($C-1^{Ph}$), 128.4 ($C-3^{Ph}$ und $C-5^{Ph}$), 89.0 ($C-7a$), 60.0 ($C-3a$), 42.6 ($C-7$), 39.1 ($C-4$), 33.1 ($C-8$), 27.4 ($C-5$), 23.0 ($C-6$).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2957, 2933, 1581, 1557, 1431, 1327, 1313, 1194, 1159, 1109, 980, 920, 873, 866, 784, 727.

ESI-MS (pos.): $m/z = 282.1$ (100%, $[M+H]^+$)/ 284.1 (68%, $[M+H]^+$); m/z ber. für $[C_{14}H_{13}Cl_2NO+H]^+$ ($[M+H]^+$): 282.0/284.0.

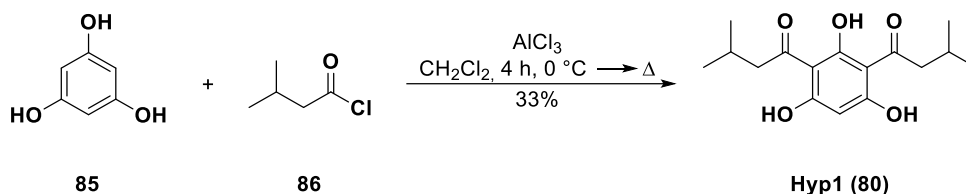
HPLC-Analyse (C₁₈): $t_R = 4.23$ min, Peakfläche: 99.73% (Acetonitril/MilliQ[®]-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 55:45 über 8 min, Flussrate: $0.7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 μL , Säulenofentemperatur: 40 °C).

Die analytischen Daten stimmen mit denen aus der Literatur überein.^[98]

10.8 Versuchsvorschriften zu Kapitel 6

10.8.1 Synthese der Phloroglucinderivate

2,4-Bis(isovaleryl)phloroglucin (Hyp1, 80)



Die Synthese wurde in Anlehnung an den modifizierten Vorschriften von Donnelly und Shannon bzw. Meikle und Stevens durchgeführt.^[228-229] Unter Argonatmosphäre wurde zu einer Suspension aus Phloroglucin (7.19 g, 57.01 mmol, 1.00 Äquiv.) sowie Aluminiumchlorid (30.41 g, 228.05 mmol, 4.00 Äquiv.) in absolutem Dichlormethan (250 mL) Isovalerylchlorid (21 mL, 171.03 mmol, 3.00 Äquiv.) bei 0°C zugetropft. Es wurde 4 h unter Rückfluss erhitzt und die abgekühlte Reaktionsmischung anschließend vorsichtig auf ca. 200 g Eis gegossen. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase mit EtOAc (10×100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel ($^c\text{Hex}/\text{EtOAc}$ 7:1 + 1% TFA) wurde die Titelverbindung (5.50 g, 18.69 mmol, 33%, Lit.:^[229] 32%) als farbloser Feststoff erhalten.

R_f: 0.50 (SiO_2 , $^c\text{Hex}/\text{EtOAc}$ 3:1).

Smb.: 115–116 $^\circ\text{C}$ ($^c\text{Hex}/\text{EtOAc}$); Lit.:^[229] 117–118 $^\circ\text{C}$ (^cHex).

$^1\text{H-NMR}$, COSY (300 MHz, CDCl_3): δ/ppm = 5.86 (s, 1H, $H-4^{Ph}$), 2.97 (d, J = 6.7 Hz, 4H, $2 \times \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2.25 (dh, J = 13.8, 6.7 Hz, 2H, $2 \times \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.98 (d, J = 6.7 Hz, 12H, $2 \times \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$).

$^{13}\text{C-NMR}$, HSQC, HMBC (75.5 MHz, CDCl_3): δ/ppm = 207.1 ($2 \times \text{C}=\text{O}$), 172.4 ($C-1^{Ph}$, $C-3^{Ph}$ und $C-5^{Ph}$), 104.5 ($C-2^{Ph}$ und $C-6^{Ph}$)¹, 95.6 ($C-4^{Ph}$), 52.9 ($2 \times \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 25.5 ($2 \times \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 22.9 ($2 \times \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2958, 2870, 1602, 1503, 1411, 1366, 1298, 1192, 1115, 1049, 945, 827.

ESI-MS (pos.): m/z = 295.2 (100%, $[\text{M}+\text{H}]^+$); m/z ber. für $[\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_5+\text{H}]^+$: 295.2.

HPLC-Analyse (C_{18}): t_R = 2.03 min, Peakfläche: 97.66% (Acetonitril/MilliQ®-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 80:20 über 15 min, Flussrate: $0.7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 μL , Säulenofentemperatur: 40°C).

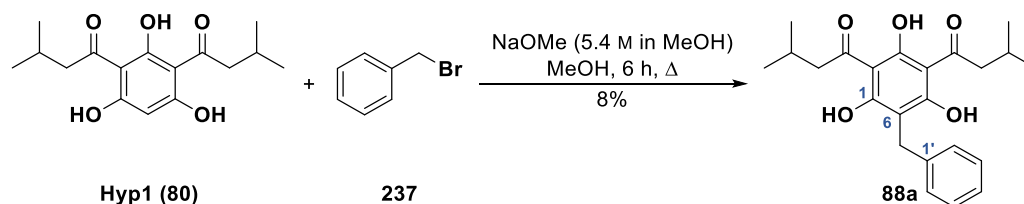
¹Aufgrund der Linienverbreiterung indirekt mittels ^1H - ^{13}C -HMBC bestimmt.

Die analytischen Daten stimmen mit denen aus der Literatur überein.^[229]

Allgemeine Vorschrift zur Darstellung der 6-Benzyl-2,4-bis(isovaleryl)phloroglucin-derivate

Unter Argonatmosphäre wurde eine Lösung von 2,4-Bis(isovaleryl)phloroglucin (**80**, 500 mg, 1.70 mmol, 1.00 Äquiv.) in absolutem Methanol (15 mL) mit einer Lösung aus Natriummethanolat (5.4 M in Methanol, 1.57 mL, 8.50 mmol, 5.00 Äquiv.) bei Raumtemperatur tropfenweise versetzt und anschließend das entsprechende Benzylbromid (2.55 mmol, 1.50 Äquiv.) hinzugefügt. Es wurde 6 h unter Rückfluss erhitzt und durch Zugabe einer NH₄Cl-Lösung (ges., aq., 30 mL) gequencht. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3 × 50 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck destillativ entfernt. Die Rohprodukte wurden säulenchromatographisch an Kieselgel (Laufmittelgemische aus ^cHex/EtOAc) und mittels anschließender semi-präparativer HPLC (C₁₈, Acetonitril/MilliQ®-Wasser 80:20 (isokratisch) über 90 min, Flussrate: 10.0 mL · min⁻¹, Detektion: 254 nm) gereinigt.

6-Benzyl-2,4-bis(isovaleryl)phloroglucin (88a)



Die Synthese erfolgte gemäß der allgemeinen Vorschrift unter Verwendung von Benzylbromid (303 μL, 2.55 mmol, 1.50 Äquiv.). Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (^cHex/EtOAc 40:1 + 1% TFA) und semi-präparativer HPLC wurde die Titelverbindung als farbloses Öl (50 mg, 0.13 mmol, 8%) erhalten.

R_f: 0.32 (SiO₂, ^cHex/EtOAc 5:1 + % TFA).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 16.21 (s, 1H, OH), 7.39–7.21 (m, 5H, H-2^{Ph}–H-6^{Ph}), 4.03 (s, 2H, CH₂), 2.96 (d, *J* = 6.7 Hz, 4H, 2 × CH₂CH(CH₃)₂), 2.24 (dh, *J* = 13.3, 6.7 Hz, 2H, 2 × CH₂CH(CH₃)₂), 0.97 (d, *J* = 6.7 Hz, 12H, 2 × CH₂CH(CH₃)₂).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 206.8 (2 × C=O), 170.4 (C-3^{Ph}), 166.0 (C-1^{Ph} und C-5^{Ph})¹, 137.9 (C-1^{Ph}), 129.4 (C-3^{Ph} und C-5^{Ph}), 128.1 (C-2^{Ph} und C-6^{Ph}), 127.4 (C-4^{Ph}), 104.6 (C-6^{Ph}), 104.4 (C-2^{Ph} und C-4^{Ph}), 53.1 (2 × CH₂CH(CH₃)₂), 27.7 (CH₂), 25.2 (2 × CH₂CH(CH₃)₂), 22.9 (2 × CH₂CH(CH₃)₂).

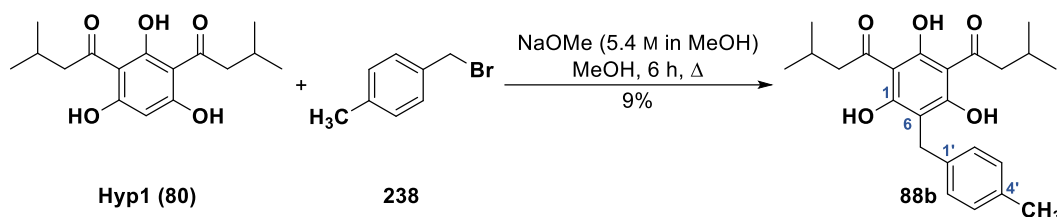
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3467, 2957, 2870, 1611, 1464, 1302, 1207, 1163, 1119, 904.

¹Aufgrund der Linienverbreiterung indirekt mittels ¹H-¹³C-HMBC bestimmt.

ESI-MS (pos.): $m/z = 385.2$ (100%, $[M+H]^+$) und 407.1 (8%, $[M+Na]^+$); m/z ber. für $[C_{23}H_{28}O_5+H]^+$ ($[M+H]^+$): 385.2.

HPLC-Analyse (C₁₈): $t_R = 4.25$ min, Peakfläche: 98.26% (Acetonitril/MilliQ®-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 80:20 über 15 min, Flussrate: $0.7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 μL , Säulenofentemperatur: 40 °C).

6-(4'-Methylbenzyl)-2,4-bis(isovaleryl)phloroglucin (88b)



Die Synthese erfolgte gemäß der allgemeinen Vorschrift unter Verwendung von 4-Methylbenzylbromid (472 mg, 2.55 mmol, 1.50 Äquiv.). Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (°Hex/EtOAc 40:1 + 1% TFA) und semi-präparativer HPLC wurde die Titelverbindung als farbloser Feststoff (60 mg, 0.15 mmol, 9%) erhalten.

R_f: 0.64 (SiO₂, °Hex/EtOAc 5:1 + 1% TFA).

Smb.: 94–96 °C (°Hex/EtOAc).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, CDCl₃): $\delta/\text{ppm} = 16.21$ (s, 1H, OH), 7.14 (s, 4H, $H-2'^{Ph}$, $H-3'^{Ph}$, $H-5'^{Ph}$ und $H-6'^{Ph}$), 3.99 (s, 2H, CH₂), 2.96 (d, $J = 6.7$ Hz, 4H, $2 \times \underline{\text{CH}}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2.33 (s, 3H, CH₃), 2.24 (dh, $J = 13.3, 6.7$ Hz, 2H, $2 \times \underline{\text{CH}}_2\text{CH}(\underline{\text{CH}}_3)_2$), 0.97 (d, $J = 6.7$ Hz, 12H, $2 \times \text{CH}_2\text{CH}(\underline{\text{CH}}_3)_2$).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, CDCl₃): $\delta/\text{ppm} = 206.8$ ($2 \times \text{C}=\text{O}$), 170.4 ($\text{C}-3'^{Ph}$), 165.7 ($\text{C}-1'^{Ph}$ und $\text{C}-5'^{Ph}$)¹, 137.1 ($\text{C}-4'^{Ph}$), 134.7 ($\text{C}-1'^{Ph}$), 130.1 ($\text{C}-3'^{Ph}$ und $\text{C}-5'^{Ph}$), 128.0 ($\text{C}-2'^{Ph}$ und $\text{C}-6'^{Ph}$), 104.8 ($\text{C}-6'^{Ph}$), 104.4 ($\text{C}-2'^{Ph}$ und $\text{C}-4'^{Ph}$), 53.1 ($2 \times \underline{\text{CH}}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 27.3 (CH₂), 25.2 ($2 \times \text{CH}_2\text{CH}(\underline{\text{CH}}_3)_2$), 22.9 ($2 \times \text{CH}_2\text{CH}(\underline{\text{CH}}_3)_2$), 21.2 (CH₃).

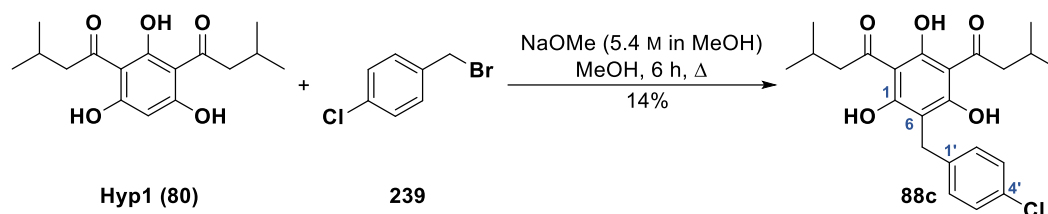
IR (ATR): $\tilde{\nu} [\text{cm}^{-1}] = 2958, 2870, 2359, 1613, 1511, 1463, 1301, 1201, 1164, 1120, 920.$

ESI-MS (pos.): $m/z = 399.2$ (100%, $[M+H]^+$) und 421.1 (8%, $[M+Na]^+$); m/z ber. für $[C_{24}H_{30}O_5+H]^+$ ($[M+H]^+$): 399.2.

HPLC-Analyse (C₁₈): $t_R = 5.48$ min, Peakfläche: 87.09% (Acetonitril/MilliQ®-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 80:20 über 15 min, Flussrate: $0.7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 μL , Säulenofentemperatur: 40 °C).

¹Aufgrund der Linienverbreiterung indirekt mittels ¹H-¹³C-HMBC bestimmt.

6-(4'-Chlorbenzyl)-2,4-bis(isovaleryl)phloroglucin (88c)



Die Synthese erfolgte gemäß der allgemeinen Vorschrift unter Verwendung von 4-Chlorbenzylbromid (524 mg, 2.55 mmol, 1.50 Äquiv.). Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (c Hex/EtOAc 40:1 + 1% TFA) und semi-präparativer HPLC wurde die Titelverbindung als farbloses Öl (100 mg, 0.24 mmol, 14%) erhalten.

R_f: 0.36 (SiO₂, c Hex/EtOAc 5:1 + 1% TFA).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, CDCl₃): δ /ppm = 16.19 (s, 1H, OH), 7.28 (d, ³J = 8.5 Hz, 2H, H-3^{Ph} und H-5^{Ph}), 7.16 (d, ³J = 8.5 Hz, 2H, H-2^{Ph} und H-6^{Ph}), 3.98 (s, 2H, CH₂), 2.96 (d, J = 6.7 Hz, 4H, 2 × CH₂CH(CH₃)₂), 2.23 (dh, J = 13.6, 6.7 Hz, 2H, 2 × CH₂CH(CH₃)₂), 0.97 (d, J = 6.7 Hz, 12H, 2 × CH₂CH(CH₃)₂).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, CDCl₃): δ /ppm = 206.8 (2 × C=O), 170.5 (C-3^{Ph}), 165.7 (C-1^{Ph} und C-5^{Ph})¹, 136.5 (C-1^{Ph}), 133.1 (C-4^{Ph}), 129.42 und 129.40 (C-2^{Ph} und C-6^{Ph} sowie C-3^{Ph} und C-5^{Ph})², 104.4 (C-2^{Ph} und C-4^{Ph}), 104.1 (C-6^{Ph}), 53.2 (2 × CH₂CH(CH₃)₂), 27.0 (CH₂), 25.2 (2 × CH₂CH(CH₃)₂), 22.9 (2 × CH₂CH(CH₃)₂).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2957, 2870, 1607, 1464, 1415, 1367, 1302, 1163, 1119, 1015, 921, 801.

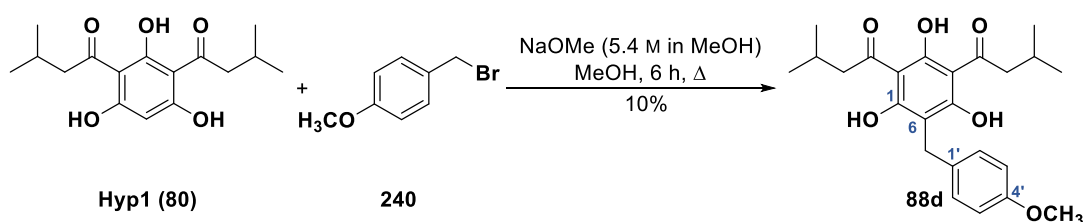
ESI-MS (pos.): m/z = 419.2 (100%, [M+H]⁺)/421.1 (39%, [M+H]⁺); m/z ber. für [C₂₃H₂₇ClO₅+H]⁺ ([M+H]⁺): 419.2/421.2.

HPLC-Analyse (C₁₈): t_R = 5.76 min, Peakfläche: 99.99% (Acetonitril/MilliQ[®]-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 80:20 über 15 min, Flussrate: 0.7 mL · min⁻¹, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 μ L, Säulenofentemperatur: 40 °C).

¹Aufgrund der Linienverbreiterung indirekt mittels ¹H-¹³C-HMBC bestimmt.

²Eine exakte Zuordnung der C-Atome ist aufgrund der eng beieinander liegenden Signale nicht möglich.

6-(4'-Methoxybenzyl)-2,4-bis(isovaleryl)phloroglucin (88d)



Die Synthese erfolgte gemäß der allgemeinen Vorschrift unter Verwendung von 4-Methoxybenzylbromid (366 μL , 2.55 mmol, 1.50 Äquiv.). Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$ 40:1 + 1% TFA) und semi-präparativer HPLC wurde die Titelverbindung als farbloser amorpher Feststoff (70 mg, 0.17 mmol, 10%) erhalten.

R_f: 0.28 (SiO_2 , $^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$ 5:1 + 1% TFA).

Smb.: – (amorph).

$^1\text{H-NMR}$, COSY (300 MHz, CDCl_3): δ/ppm = 16.21 (s, 1H, OH), 7.17 (d, 3J = 8.6 Hz, 2H, $H\text{-}2'^{\text{Ph}}$ und $H\text{-}6'^{\text{Ph}}$), 6.86 (d, 3J = 8.6 Hz, 2H, $H\text{-}3'^{\text{Ph}}$ und $H\text{-}5'^{\text{Ph}}$), 3.96 (s, 2H, CH_2), 3.78 (s, 3H, OCH_3), 2.95 (d, J = 6.7 Hz, 4H, $2 \times \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2.25 (dh, J = 13.3, 6.7 Hz, 2H, $2 \times \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.97 (d, J = 6.7 Hz, 12H, $2 \times \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$).

$^{13}\text{C-NMR}$, HSQC, HMBC (75.5 MHz, CDCl_3): δ/ppm = 206.8 ($2 \times \text{C}=\text{O}$), 170.4 ($\text{C-}3'^{\text{Ph}}$), 166.3 ($\text{C-}1'^{\text{Ph}}$ und $\text{C-}5'^{\text{Ph}}$)¹, 159.0 ($\text{C-}4'^{\text{Ph}}$), 129.5 ($\text{C-}1'^{\text{Ph}}$), 129.2 ($\text{C-}2'^{\text{Ph}}$ und $\text{C-}6'^{\text{Ph}}$), 114.8 ($\text{C-}3'^{\text{Ph}}$ und $\text{C-}5'^{\text{Ph}}$), 104.9 ($\text{C-}6'^{\text{Ph}}$), 104.4 ($\text{C-}2'^{\text{Ph}}$ und $\text{C-}4'^{\text{Ph}}$), 55.4 (OCH_3), 53.1 ($2 \times \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 26.8 (CH_2), 25.2 ($2 \times \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 22.9 ($2 \times \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$).

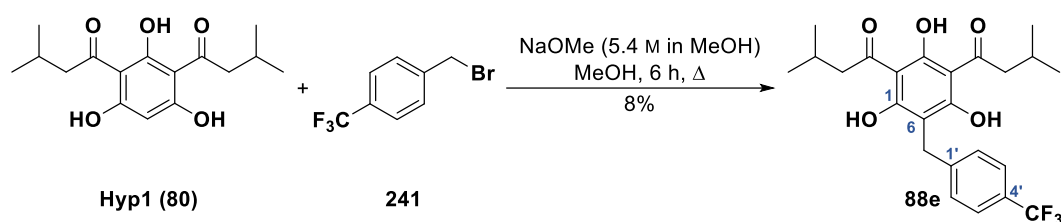
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3435, 2957, 2870, 1612, 1510, 1464, 1417, 1368, 1302, 1247, 1175, 1120, 1039, 915.

ESI-MS (pos.): m/z = 415.1 (100%, $[\text{M}+\text{H}]^+$), 437.1 (14%, $[\text{M}+\text{Na}]^+$) und 307.1 (15%, $[\text{M}-p\text{-Methoxyphenyl}]^+$); m/z ber. für $[\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{ClO}_5+\text{H}]^+$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 415.2.

HPLC-Analyse (C_{18}): t_{R} = 3.87 min, Peakfläche: 99.01% (Acetonitril/MilliQ®-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 80:20 über 15 min, Flussrate: $0.7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 μL , Säulenofentemperatur: 40 °C).

¹Aufgrund der Linienverbreiterung indirekt mittels $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ -HMBC bestimmt.

6-(4'-(Trifluormethyl)benzyl)-2,4-bis(isovaleryl)phloroglucin (88e)



Die Synthese erfolgte gemäß der allgemeinen Vorschrift unter Verwendung von 4-(Trifluormethyl)-benzylbromid (610 mg, 2.55 mmol, 1.50 Äquiv.). Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (c Hex/EtOAc 20:1 + 1% TFA) und semi-präparativer HPLC wurde die Titelverbindung als farbloses Öl (60 mg, 0.13 mmol, 8%) erhalten.

R_f: 0.40 (SiO₂, c Hex/EtOAc 20:1).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, CDCl₃): δ /ppm = 16.18 (s, 1H, OH), 7.57 (d, $^3J = 8.0$ Hz, 2H, *H*-3'^{Ph} und *H*-5'^{Ph}), 7.35 (d, $^3J = 8.0$ Hz, 2H, *H*-2'^{Ph} und *H*-6'^{Ph}), 4.07 (s, 2H, CH₂), 2.97 (d, $J = 6.6$ Hz, 4H, 2 \times CH₂CH(CH₃)₂), 2.24 (dh, $J = 13.3, 6.6$ Hz, 2H, 2 \times CH₂CH(CH₃)₂), 0.97 (d, $J = 6.6$ Hz, 12H, 2 \times CH₂CH(CH₃)₂).

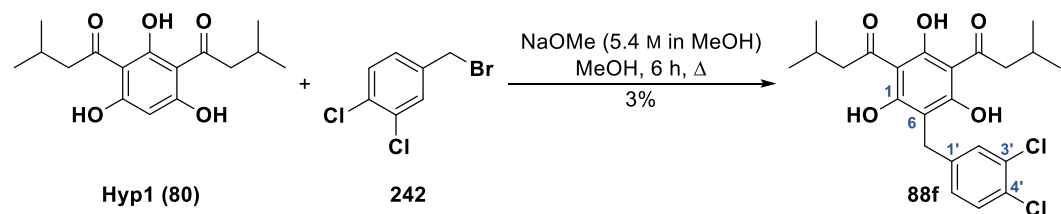
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, CDCl₃): δ /ppm = 206.8 (2 \times C=O), 170.5 (C-3'^{Ph}), 165.9 (C-1'^{Ph} und C-5'^{Ph}), 142.4 (C-1'^{Ph}), 129.6 (q, $^2J_{CF} = 32.5$ Hz, C-4'^{Ph}), 128.4 (C-2'^{Ph} und C-6'^{Ph}), 126.1 (q, $^3J_{CF} = 3.9$ Hz, C-3'^{Ph} und C-5'^{Ph}), 124.2 (q, $^1J_{CF} = 271.9$ Hz, CF₃), 104.5 (C-2'^{Ph} und C-4'^{Ph}), 103.7 (C-6'^{Ph}), 53.2 (2 \times CH₂CH(CH₃)₂), 27.5 (CH₂), 25.2 (2 \times CH₂CH(CH₃)₂), 22.9 (2 \times CH₂CH(CH₃)₂).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3404, 2959, 2871, 1611, 1465, 1417, 1325, 1163, 1123, 1067, 1018, 925, 815.

ESI-MS (pos.): $m/z = 453.2$ (100%, [M+H]⁺); m/z ber. für [C₂₄H₂₇F₃O₅+H]⁺ ([M+H]⁺): 453.2.

HPLC-Analyse (C₁₈): $t_R = 5.92$ min, Peakfläche: 99.36% (Acetonitril/MilliQ[®]-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 80:20 über 15 min, Flussrate: 0.7 mL \cdot min⁻¹, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 μ L, Säulenofentemperatur: 40 °C).

6-(3',4'-Dichlorbenzyl)-2,4-bis(isovaleryl)phloroglucin (88f)



Die Synthese erfolgte gemäß der allgemeinen Vorschrift unter Verwendung von 3,4-Dichlorbenzylbromid (371 μ L, 2.55 mmol, 1.50 Äquiv.). Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (c Hex/EtOAc 40:1 + 1% TFA) und semi-präparativer HPLC wurde die Titelverbindung als farbloses Öl (20 mg, 0.04 mmol, 3%) erhalten.

R_f: 0.50 (SiO₂, ^cHex/EtOAc 5:1 + 1% TFA).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 16.16 (s, 1H, OH), 7.37 (d, ³J = 8.3 Hz, 1H, H-5^{Ph}), 7.30 (d, ⁴J = 2.1 Hz, 1H, H-2^{Ph}), 7.07 (dd, ³J = 8.3 Hz, ⁴J = 2.1 Hz, 1H, H-6^{Ph}), 3.96 (s, 2H, CH₂), 2.97 (d, J = 6.7 Hz, 4H, 2 × CH₂CH(CH₃)₂), 2.24 (dh, J = 13.4, 6.7 Hz, 2H, 2 × CH₂CH(CH₃)₂), 0.98 (d, J = 6.7 Hz, 12H, 2 × CH₂CH(CH₃)₂).

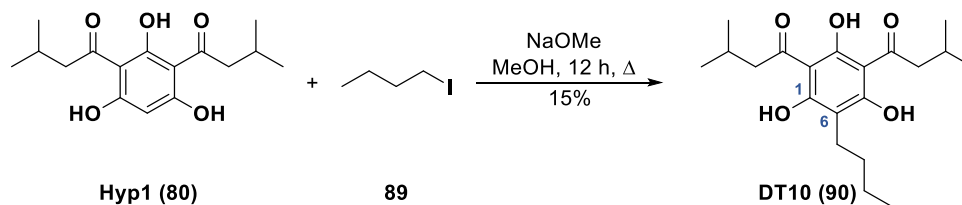
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 206.8 (2 × C=O), 170.5 (C-3^{Ph}), 165.9 (C-1^{Ph} und C-5^{Ph})¹, 138.5 (C-1^{Ph}), 133.3 (C-3^{Ph}), 131.3 (C-4^{Ph}), 131.1 (C-5^{Ph}), 130.0 (C-2^{Ph}), 127.5 (C-6^{Ph}), 104.5 (C-2^{Ph} und C-4^{Ph}), 103.5 (C-6^{Ph}), 53.2 (2 × CH₂CH(CH₃)₂), 26.9 (CH₂), 25.2 (2 × CH₂CH(CH₃)₂), 22.9 (2 × CH₂CH(CH₃)₂).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3434, 2958, 2870, 1609, 1469, 1416, 1368, 1302, 1165, 1119, 1031, 909, 810.

ESI-MS (pos.): *m/z* = 453.1 (100%, [M+H]⁺)/454.1 (24%, [M+H]⁺)/455.1 (65%, [M+H]⁺)/456.1 (14%, [M+H]⁺)/457.1 (13%, [M+H]⁺); *m/z* ber. für [C₂₃H₂₆Cl₂O₅+H]⁺ ([M+H]⁺): 453.1/455.1.

HPLC-Analyse (C₁₈): *t_R* = 7.92 min, Peakfläche: 99.34% (Acetonitril/MilliQ[®]-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 80:20 über 15 min, Flussrate: 0.7 mL · min⁻¹, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 μL, Säulenofentemperatur: 40 °C).

6-(ⁿButyl)-2,4-bis(isovaleryl)phloroglucin (DT10, 90)



Unter Argonatmosphäre wurde eine Lösung 2,6-Bis(isovaleryl)phloroglucin (**80**, 200 mg, 0.68 mmol, 1.00 Äquiv.) in absolutem Methanol (15 mL) mit Natriummethanolat (184 mg, 3.40 mmol, 5.00 Äquiv.) versetzt und anschließend 1-Iodbutan (116 μL, 1.02 mmol, 1.50 Äquiv.) hinzugefügt. Es wurde 6 h unter Rückfluss erhitzt, erneut 1-Iodbutan (270 μL, 2.38 mmol, 3.50 Äquiv.) und Natriummethanolat (184 mg, 3.40 mmol, 5.00 Äquiv.) zugegeben sowie weitere 6 h unter Rückfluss gerührt. Es wurde durch Zugabe von Wasser (50 mL) gequench und die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3 × 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck destillativ entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (^cHex/EtOAc 50:1) wurde die Titelverbindung als farbloses Öl (35 mg, 0.10 mmol, 15%) erhalten.

R_f: 0.32 (SiO₂, ^cHex/EtOAc 20:1).

¹Aufgrund der Linienverbreiterung indirekt mittels ¹H-¹³C-HMBC bestimmt.

¹H-NMR, COSY (300 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 2.98 (d, *J* = 6.7 Hz, 4H, 2 × CH₂CH(CH₃)₂), 2.58–2.51 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂CH₃), 2.25 (dh, *J* = 13.4, 6.7 Hz, 2H, 2 × CH₂CH(CH₃)₂), 1.54–1.43 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂CH₃), 1.43–1.33 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂CH₃), 0.98 (d, *J* = 6.7 Hz, 12H, 2 × CH₂CH(CH₃)₂), 0.95 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH₂CH₂CH₂CH₃).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 206.8 (2 × C=O), 170.0 (C-3^{Ph}), 105.7 (C-1^{Ph}, C-2^{Ph}, C-4^{Ph} und C-6^{Ph}), 53.2 (2 × CH₂CH(CH₃)₂), 31.0 (CH₂CH₂CH₂CH₃), 25.3 (2 × CH₂CH(CH₃)₂), 23.0 (2 × CH₂CH(CH₃)₂), 22.9 (CH₂CH₂CH₂CH₃), 21.8 (CH₂CH₂CH₂CH₃), 14.1 (CH₂CH₂CH₂CH₃).

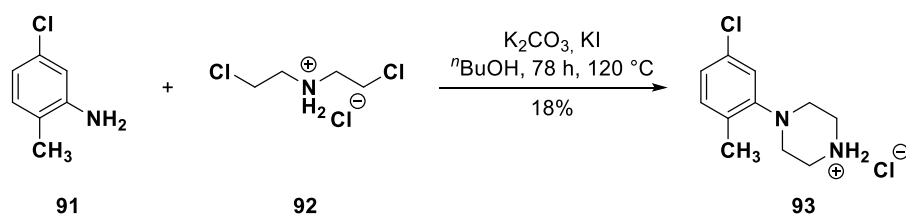
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2958, 2932, 2871, 2362, 1614, 1463, 1367, 1303, 1168, 1101, 1047, 906.

ESI-MS (pos.): *m/z* = 351.3 (100%, [M+H]⁺); *m/z* ber. für [C₂₀H₃₀O₅+H]⁺ ([M+H]⁺): 351.2.

HPLC-Analyse (C₁₈): *t_R* = 6.39 min, Peakfläche: 99.17% (Acetonitril/MilliQ®-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 80:20 über 15 min, Flussrate: 0.7 mL · min⁻¹, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 μL, Säulenofentemperatur: 40 °C).

10.8.2 Synthese der PPZ1-Derivate

1-(5-Chlor-2-methylphenyl)piperazin-Hydrochlorid (93)



Die Synthese erfolgte in Anlehnung an eine modifizierte Patentvorschrift bzw. an eine Vorschrift von Zhou *et al.*^[240-241] Eine Mischung aus 5-Chlor-2-methylanilin (15.0 g, 105.93 mmol, 1.00 Äquiv.), Bis-(2-chlorethyl)amin-Hydrochlorid (18.9 g, 105.93 mmol, 1.00 Äquiv.), K₂CO₃ (14.64 g, 105.93 mmol, 1.00 Äquiv.) und KI (8.79 g, 52.97 mmol, 0.50 Äquiv.) wurde in ⁿBuOH (70 mL) 72 h unter Rückfluss erhitzt. Es wurde heiß filtriert und das Filtrat über Nacht bei 5 °C gelagert. Das resultierende Präzipitat wurde abgesaugt, mit wenig kaltem ⁿBuOH gewaschen und aus ⁿBuOH umkristallisiert, woraufhin die Titelverbindung (4.67 g, 18.89 mmol 18%; Lit.:^[241] 47%) in Form gelber Kristalle erhalten wurde.

R_f: 0.22 (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 5:1).

Smb.: Zersetzung ≥ 271 °C (ⁿBuOH).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ/ppm = 9.49 (s, 2H, NH₂⁺), 7.21 (d, ³*J* = 8.0 Hz, H-3^{Ph}), 7.05 (dd, ³*J* = 8.0 Hz, ⁴*J* = 2.2 Hz, 1H, H-4^{Ph}), 7.02 (d, ⁴*J* = 2.2 Hz, 1H, H-6^{Ph}), 3.20 (m, 4H, 2 × H-2^{Ppz} und 2 × H-6^{Ppz}), 3.07 (m, 4H, 2 × H-3^{Ppz} und 2 × H-5^{Ppz}), 2.22 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ /ppm = 151.6 (C-1^{Ph}), 132.4 (C-3^{Ph}), 130.9 (C-2^{Ph} oder C-5^{Ph})¹, 130.7 (C-2^{Ph} oder C-5^{Ph})¹, 123.3 (C-4^{Ph}), 119.1 (C-6^{Ph}), 48.0 (C-3^{Ppz} und C-5^{Ppz}), 43.1 (C-2^{Ppz} und C-6^{Ppz}), 17.1 (CH₃).

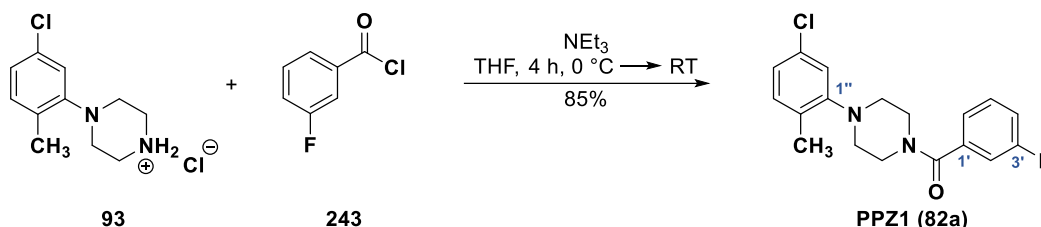
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2932, 2807, 2494, 1592, 1487, 1442, 1397, 1312, 1231, 1150, 1048, 942, 912, 801.

ESI-MS (pos.): m/z = 211.0 (100%, [M-HCl+H]⁺); m/z ber. für [C₁₁H₁₅ClN₂+H]⁺ ([M-HCl+H]⁺): 211.1.

Allgemeine Vorschrift zur Darstellung der Piperazinylderivate (PPZ-Derivate)

Die Synthese der Piperazinylderivate erfolgte in Anlehnung an eine Vorschrift von Sawamura *et al.*^[226] Zu einer Lösung von 1-(5-Chlor-2-methylphenyl)piperazin-Hydrochlorid (**93**, 1.00 Äquiv.) und Triethylamin (2.30 Äquiv.) in wasserfreiem THF (5–20 mL) wurde bei 0 °C unter Argonatmosphäre das entsprechende Benzoylchlorid (1.00 Äquiv.) tropfen- bzw. portionsweise zugegeben und 3 h bei 0 °C sowie 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit Wasser (50 mL) und EtOAc (50 mL) versetzt und mit EtOAc (3 × 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurde mit einer NaCl-Lösung (ges., aq., 1 × 50 mL) gewaschen, mit MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Die Rohprodukte wurden säulenchromatographisch an Kieselgel (Laufmittelgemische aus ^cHex/EtOAc) gereinigt.

1-(3'-Fluorbenzoyl)-4-(5''-chlor-2''-methylphenyl)piperazin (PPZ1, 82a)



Die Synthese erfolgte gemäß der allgemeinen Vorschrift unter Verwendung von 1-(5-Chlor-2-methylphenyl)piperazin-Hydrochlorid (**93**, 413 mg, 1.67 mmol, 1.00 Äquiv.), Triethylamin (532 μ L, 3.84 mmol, 2.30 Äquiv.) sowie 3-Fluorbenzoylchlorid (200 μ L, 1.67 mmol, 1.00 Äquiv.) in wasserfreiem THF (20 mL). Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (^cHex/EtOAc 5:1) wurde die Titelverbindung als farbloser Feststoff (475 mg, 1.43 mmol, 85%; Lit.:^[226] 83%) erhalten. Das Produkt lag als Gemisch zweier Rotamere (**A/B** \approx 1:1) vor, welche sich in ausgewählten Signalen in den ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren unterscheiden ließen.

R_f: 0.17 (SiO₂, ^cHex/EtOAc 5:1).

¹Eine exakte Zuordnung der C-Atome ist aufgrund der eng beieinander liegenden Signale nicht möglich.

Smb.: 125–127 °C (°Hex/EtOAc).

¹H-NMR, COSY (400 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 7.47–7.35 (m, 1H, *H*-5''^{Ph}), 7.22 (dt, *J* = 7.6, 1.2 Hz, 1H, *H*-6''^{Ph}), 7.19–7.11 (m, 2H, *H*-2''^{Ph} und *H*-4''^{Ph}), 7.11 (d, ³*J* = 8.1 Hz, 1H, *H*-3''^{Ph}), 6.99 (dd, ³*J* = 8.1 Hz, ⁴*J* = 2.1 Hz, 1H, *H*-4''^{Ph}), 6.95 (d, ⁴*J* = 2.1 Hz, 1H, *H*-6''^{Ph}), 3.92 (s (br), 2H, *H*-2^{Ppz} und *H*-6^{Ppz}, Rotamer **A**), 3.56 (s (br), 2H, *H*-2^{Ppz} und *H*-6^{Ppz}, Rotamer **B**), 2.95 (s (br), 2H, *H*-3^{Ppz} und *H*-5^{Ppz}, Rotamer **A**), 2.85 (s (br), 2H, *H*-3^{Ppz} und *H*-5^{Ppz}, Rotamer **B**), 2.27 (s, 3H, CH₃).

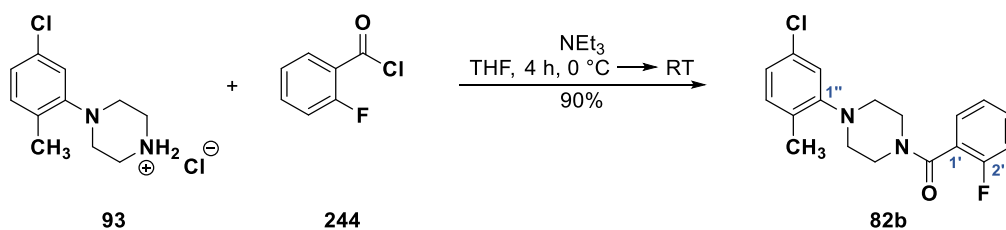
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (100.6 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 169.13 (C=O, ein Rotamer), 169.11 (C=O, anderes Rotamer), 162.7 (d, ¹*J*_{CF} = 248.4 Hz, C-3''^{Ph}), 151.9 (C-1''^{Ph}), 137.8 (d, ³*J*_{CF} = 6.9 Hz, C-1''^{Ph}), 132.2 (C-3''^{Ph}), 132.0 (C-5''^{Ph}), 131.1 (C-2''^{Ph}), 130.5 (d, ³*J*_{CF} = 8.0 Hz, C-5''^{Ph}), 123.9 (C-4''^{Ph}), 122.9 (d, ⁴*J*_{CF} = 3.0 Hz, C-6''^{Ph}), 119.9 (C-6''^{Ph}), 117.0 (d, ²*J*_{CF} = 21.1 Hz, C-4''^{Ph}), 114.5 (d, ²*J*_{CF} = 22.8 Hz, C-2''^{Ph}), 51.9 (s (br), C-3^{Ppz} und C-5^{Ppz}, Rotamer **A** und **B**), 48.2 (s (br), C-2^{Ppz} und C-6^{Ppz}, Rotamer **B**), 42.7 (s (br), C-2^{Ppz} und C-6^{Ppz}, Rotamer **A**), 17.5 (CH₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2808, 1621, 1581, 1491, 1439, 1365, 1280, 1215, 1146, 1020, 924, 814, 742.

ESI-MS (pos.): *m/z* = 333.2 (100%, [M+H]⁺)/335.1 (36%, [M+H]⁺); *m/z* ber. für [C₁₈H₁₈ClFN₂O+H]⁺ ([M+H]⁺): 333.1/335.1.

HPLC-Analyse (C₁₈): *t_R* = 0.99 min, Peakfläche: 97.63% (Acetonitril/MilliQ[®]-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 80:20 über 8 min, Flussrate: 0.7 mL · min⁻¹, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 µL, Säulenofentemperatur: 40 °C).

1-(2'-Fluorbenzoyl)-4-(5''-chlor-2''-methylphenyl)piperazin (82b)



Die Synthese erfolgte gemäß der allgemeinen Vorschrift unter Verwendung von 1-(5-Chlor-2-methylphenyl)piperazin-Hydrochlorid (**93**, 100 mg, 0.41 mmol, 1.00 Äquiv.), Triethylamin (129 µL, 0.93 mmol, 2.30 Äquiv.) sowie 2-Fluorbenzoylchlorid (49 µL, 0.41 mmol, 1.00 Äquiv.) in wasserfreiem THF (5 mL). Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (°Hex/EtOAc 3:1) wurde die Titelverbindung als farbloser Feststoff (122 mg, 0.37 mmol, 90%) erhalten. Das Produkt lag als Gemisch zweier Rotamere (**A/B** ≈ 1:1) vor, welche sich nur in einigen Signalen in den ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren unterscheiden ließen.

R_f: 0.29 (SiO₂, °Hex/EtOAc 3:1).

Smb.: 100–102 °C (°Hex/EtOAc).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 7.48–7.34 (m, 2H, H-4^{Ph} und H-6^{Ph}), 7.23 (td, *J* = 7.4, 1.2 Hz, 1H, H-5^{Ph}), 7.17–7.05 (m, 2H, H-3^{Ph} und H-3^{Ph}), 6.98 (dd, ³*J* = 8.0 Hz, ⁴*J* = 2.1 Hz, 1H, H-4^{Ph}), 6.95 (d, ⁴*J* = 2.1 Hz, 1H, H-6^{Ph}), 3.96 (*pseudo-t*, *J* ≈ 5.0 Hz, 2H, H-2^{Ppz} und H-6^{Ppz}, Rotamer **A**), 3.48 (s (br), 2H, H-2^{Ppz} und H-6^{Ppz}, Rotamer **B**), 2.96 (*pseudo-t*, *J* ≈ 5.0 Hz, 2H, H-3^{Ppz} und H-5^{Ppz}, Rotamer **A**), 2.85 (s (br), 2H, H-3^{Ppz} und H-5^{Ppz}, Rotamer **B**), 2.27 (s, 3H, CH₃).

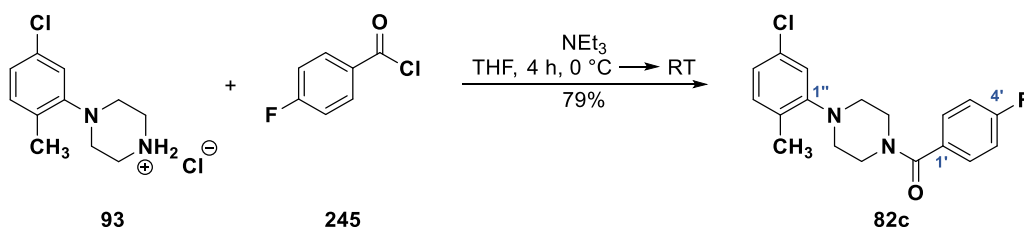
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 165.5 (C=O), 158.2 (d, ¹*J*_{CF} = 248.4 Hz, C-2^{Ph}), 152.0 (C-1^{Ph}), 132.2 (C-3^{Ph}), 132.0 (C-5^{Ph}), 131.5 (d, ³*J*_{CF} = 8.0 Hz, C-4^{Ph}), 131.1 (C-2^{Ph}), 129.3 (d, ³*J*_{CF} = 3.7 Hz, C-6^{Ph}), 124.9 (d, ⁴*J*_{CF} = 3.4 Hz, C-5^{Ph}), 124.1 (d, ²*J*_{CF} = 17.8 Hz, C-1^{Ph}), 123.8 (C-4^{Ph}), 120.0 (C-6^{Ph}), 115.9 (d, ²*J*_{CF} = 21.3 Hz, C-3^{Ph}), 52.0 (C-3^{Ppz} und C-5^{Ppz}, Rotamer **B**), 51.7 (C-3^{Ppz} und C-5^{Ppz}, Rotamer **A**), 47.6 (C-2^{Ppz} und C-6^{Ppz}, Rotamer **B**), 42.5 (C-2^{Ppz} und C-6^{Ppz}, Rotamer **A**), 17.5 (CH₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2818, 2362, 1636, 2614, 1489, 1431, 1285, 1224, 1149, 1014, 947, 813, 754.

ESI-MS (pos.): *m/z* = 333.2 (100%, [M+H]⁺)/335.1 (39%, [M+H]⁺) und 355.1 (4%, [M+Na]⁺); *m/z* ber. für [C₁₈H₁₈ClFN₂O+H]⁺ ([M+H]⁺): 333.1/335.1.

HPLC-Analyse (C₁₈): *t_R* = 1.98 min, Peakfläche: 99.99% (Acetonitril/MilliQ[®]-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 65:35 über 8 min, Flussrate: 0.7 mL · min⁻¹, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 μL, Säulenofentemperatur: 40 °C).

1-(4'-Fluorbenzoyl)-4-(5''-chlor-2''-methylphenyl)piperazin (82c)



Die Synthese erfolgte gemäß der allgemeinen Vorschrift unter Verwendung von 1-(5-Chlor-2-methylphenyl)piperazin-Hydrochlorid (**93**, 100 mg, 0.41 mmol, 1.00 Äquiv.), Triethylamin (129 μL, 0.93 mmol, 2.30 Äquiv.) sowie 4-Fluorbenzoylchlorid (48 μL, 0.41 mmol, 1.00 Äquiv.) in wasserfreiem THF (5 mL). Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (°Hex/EtOAc 3:1) wurde die Titelverbindung als farbloser Feststoff (122 mg, 0.37 mmol, 90%) erhalten. Das Produkt lag als Gemisch zweier Rotamere (**A/B** ≈ 1:1) vor, welche sich nur in einigen Signalen in den ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren unterscheiden ließen.

R_f: 0.29 (SiO₂, °Hex/EtOAc 3:1).

Smb.: 128–130 °C (°Hex/EtOAc).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 7.51–7.39 (m, 2H, *H*-2'^{Ph} und *H*-6'^{Ph}), 7.17–7.06 (m, 3H, *H*-3''^{Ph}, *H*-3'^{Ph} und *H*-5'^{Ph}), 6.99 (dd, ³*J* = 8.0 Hz, ⁴*J* = 2.1 Hz, 1H, *H*-4''^{Ph}), 6.95 (d, ⁴*J* = 2.1 Hz, 1H, *H*-6''^{Ph}), 3.84 (s (br), 2H, *H*-2^{Ppz} und *H*-6^{Ppz}, Rotamer **A**), 3.64 (s (br), 2H, *H*-2^{Ppz} und *H*-6^{Ppz}, Rotamer **B**), 2.90 (s (br), 4H, 2 × *H*-3^{Ppz} und 2 × *H*-5^{Ppz}, Rotamer **A** und **B**), 2.27 (s, 3H, CH₃).

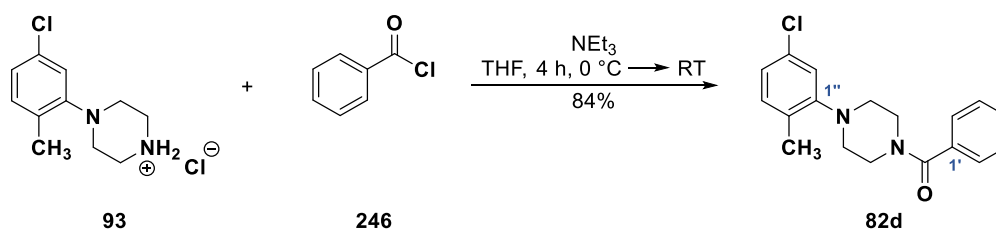
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 169.7 (C=O), 163.6 (d, ¹*J*_{CF} = 249.9 Hz, C-4'^{Ph}), 151.9 (C-1''^{Ph}), 132.2 (C-3''^{Ph}), 132.0 (C-5''^{Ph}), 131.8 (d, ⁴*J*_{CF} = 3.5 Hz, C-1'^{Ph}), 131.0 (C-2''^{Ph}), 129.6 (d, ³*J*_{CF} = 8.4 Hz, C-2'^{Ph} und C-6'^{Ph}), 123.9 (C-4''^{Ph}), 119.9 (C-6''^{Ph}), 115.9 (d, ²*J*_{CF} = 21.3 Hz, C-3'^{Ph} und C-5'^{Ph}), 51.9 (C-3^{Ppz} und C-5^{Ppz}, Rotamer **A** und **B**), 48.5 (C-2^{Ppz} und C-6^{Ppz}, Rotamer **B**)¹, 43.0 (C-2^{Ppz} und C-6^{Ppz}, Rotamer **A**)¹, 17.5 (CH₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2918, 2817, 1633, 1592, 1489, 1429, 1223, 1150, 1097, 1012, 947, 845, 809, 759.

ESI-MS (pos.): *m/z* = 333.2 (100%, [M+H]⁺)/335.1 (33%, [M+H]⁺) und 355.1 (7%, [M+Na]⁺); *m/z* ber. für [C₁₈H₁₈ClFN₂O+H]⁺ ([M+H]⁺): 333.1/335.1.

HPLC-Analyse (C₁₈): *t_R* = 1.97 min, Peakfläche: 99.99% (Acetonitril/MilliQ[®]-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 65:35 über 8 min, Flussrate: 0.7 mL · min⁻¹, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 μL, Säulenofentemperatur: 40 °C).

1-Benzoyl-4-(5''-chlor-2''-methylphenyl)piperazin (82d)



Die Synthese erfolgte gemäß der allgemeinen Vorschrift unter Verwendung von 1-(5-Chlor-2-methylphenyl)piperazin-Hydrochlorid (**93**, 100 mg, 0.41 mmol, 1.00 Äquiv.), Triethylamin (129 μL, 0.93 mmol, 2.30 Äquiv.) sowie Benzoylchlorid (47 μL, 0.41 mmol, 1.00 Äquiv.) in wasserfreiem THF (5 mL). Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Hex/EtOAc 4:1) wurde die Titelverbindung in Form farbloser Kristalle (108 mg, 0.34 mmol, 84%) erhalten. Das Produkt lag als Gemisch zweier Rotamere (**A/B** ≈ 1:1) vor, welche sich nur in einigen Signalen in den ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren unterscheiden ließen.

R_f: 0.61 (SiO₂, Hex/EtOAc 1:1).

¹Signale weisen im ¹³C-NMR eine sehr geringe Intensität auf, da ein rotamerer System nahe der Koaleszenz vorliegt. Die Bestimmung der chemischen Verschiebung und eindeutige Zuordnung der C-Atome erfolgte in diesem Fall aufgrund der Linienverbreiterung indirekt mittels ¹H-¹³C-HSQC/HMBC.

Smb.: 108–110 °C (°Hex/EtOAc).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 7.49–7.37 (m, 5H, *H*-2^{Ph}–*H*-6^{Ph}), 7.10 (d, ³*J* = 7.9 Hz, 1H, *H*-3^{Ph}), 7.02–6.92 (m, 2H, *H*-4^{Ph} und *H*-6^{Ph}), 3.92 (s (br), 2H, *H*-2^{Ppz} und *H*-6^{Ppz}, Rotamer A) 3.58 (s (br), 2H, *H*-2^{Ppz} und *H*-6^{Ppz}, Rotamer B), 2.91 (s (br), 2H, *H*-3^{Ppz} und *H*-5^{Ppz}, Rotamer A), 2.86 (s (br), 2H, *H*-3^{Ppz} und *H*-5^{Ppz}, Rotamer B), 2.27 (s, 3H, CH₃).

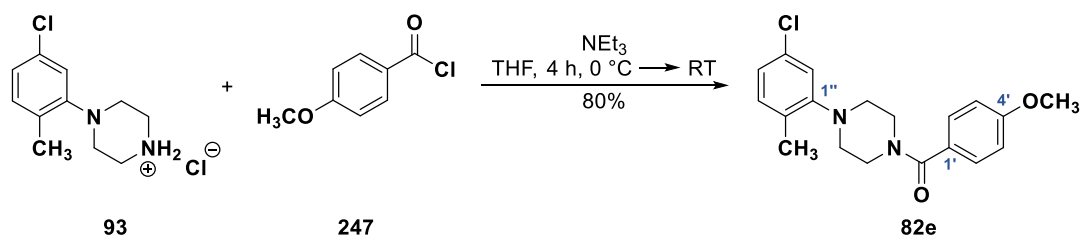
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 170.6 (C=O), 151.9 (C-1^{Ph}), 135.8 (C-1^{Ph}), 132.2 (C-3^{Ph}), 131.9 (C-5^{Ph}), 131.0 (C-2^{Ph}), 129.8 (C-4^{Ph}), 128.6 und 127.1 (C-2^{Ph} und C-6^{Ph} sowie C-3^{Ph} und C-5^{Ph}), 123.7 (C-4^{Ph}), 119.8 (C-6^{Ph}), 51.9 (s (br), C-3^{Ppz} und C-5^{Ppz}, Rotamer A und B), 48.2 (s (br), C-2^{Ppz} und C-6^{Ppz}, Rotamer B), 42.6 (s (br), C-2^{Ppz} und C-6^{Ppz}, Rotamer A), 17.5 (CH₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2980, 2364, 1630, 1592, 1489, 1428, 1272, 1225, 1149, 1014, 945, 720, 708.

ESI-MS (pos.): *m/z* = 315.2 (100%, [M+H]⁺)/317.1 (30%, [M+H]⁺) und 337.1 (7%, [M+Na]⁺); *m/z* ber. für [C₁₈H₁₉ClN₂O+H]⁺ ([M+H]⁺): 315.1/317.1.

HPLC-Analyse (C₁₈): *t_R* = 1.79 min, Peakfläche: 99.99% (Acetonitril/MilliQ®-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 65:35 über 8 min, Flussrate: 0.7 mL · min⁻¹, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 µL, Säulenofentemperatur: 40 °C).

1-(4'-Methoxybenzoyl)-4-(5''-chlor-2''-methylphenyl)piperazin (82e)



Die Synthese erfolgte gemäß der allgemeinen Vorschrift unter Verwendung von 1-(5-Chlor-2-methylphenyl)piperazin-Hydrochlorid (**93**, 100 mg, 0.41 mmol, 1.00 Äquiv.), Triethylamin (129 µL, 0.93 mmol, 2.30 Äquiv.) sowie 4-Methoxybenzoylchlorid (55 µL, 0.41 mmol, 1.00 Äquiv.) in wasserfreiem THF (5 mL). Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (°Hex/EtOAc 3:1) wurde die Titelverbindung als farbloser Feststoff (112 mg, 0.33 mmol, 80%) erhalten. Das Produkt lag als Gemisch zweier Rotamere (A/B ≈ 1:1) vor, welche sich nur in einigen Signalen in den ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren unterscheiden ließen.

R_f: 0.34 (SiO₂, °Hex/EtOAc 3:2).

Smb.: 143–144 °C (°Hex/EtOAc).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 7.42 (d, ³J = 8.7 Hz, 2H, H-2'^{Ph} und H-6'^{Ph}), 7.10 (d, ³J = 7.9 Hz, 1H, H-3''^{Ph}), 7.02–6.93 (m, 2H, H-4''^{Ph} und H-6''^{Ph}), 6.93 (d, ³J = 8.7 Hz, 1H, H-3'^{Ph} und H-5'^{Ph}), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 3.77 (s (br), 4H, 2 × H-2^{Ppz} und 2 × H-6^{Ppz}, Rotamer A und B), 2.89 (s (br), 4H, 2 × H-3^{Ppz} und 2 × H-5^{Ppz}, Rotamer A und B), 2.27 (s, 3H, CH₃).

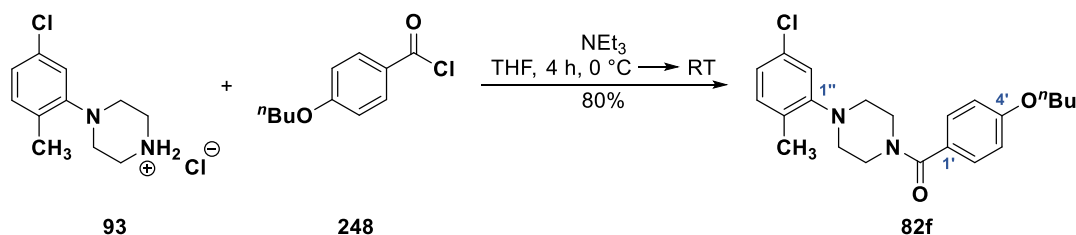
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 170.6 (C=O), 160.9 (C-4'^{Ph}), 152.0 (C-1''^{Ph}), 132.2 (C-3''^{Ph}), 131.9 (C-5''^{Ph}), 131.1 (C-2''^{Ph}), 129.3 (C-2'^{Ph} und C-6'^{Ph}), 127.8 (C-1'^{Ph}), 123.7 (C-4''^{Ph}), 119.9 (C-6''^{Ph}), 113.9 (C-3'^{Ph} und C-5'^{Ph}), 55.5 (OCH₃), 51.9 (C-3^{Ppz} und C-5^{Ppz}, Rotamer A und B), 48.6 (s (br), C-2^{Ppz} und C-6^{Ppz}, Rotamer A und B)¹, 17.5 (CH₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2980, 2364, 1628, 1608, 1426, 1247, 1172, 1018, 1007, 839, 727.

ESI-MS (pos.): *m/z* = 345.2 (100%, [M+H]⁺)/347.1 (38%, [M+H]⁺) und 367.2 (2%, [M+Na]⁺); *m/z* ber. für [C₁₉H₂₁ClN₂O₂+H]⁺ ([M+H]⁺): 345.1/347.1.

HPLC-Analyse (C₁₈): *t_R* = 1.88 min, Peakfläche: 99.35% (Acetonitril/MilliQ[®]-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 65:35 über 8 min, Flussrate: 0.7 mL · min⁻¹, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 μL, Säulenofentemperatur: 40 °C).

1-(4'-Butoxybenzoyl)-4-(5''-chlor-2''-methylphenyl)piperazin (82f)



Die Synthese erfolgte gemäß der allgemeinen Vorschrift unter Verwendung von 1-(5-Chlor-2-methylphenyl)piperazin-Hydrochlorid (**93**, 200 mg, 0.81 mmol, 1.00 Äquiv.), Triethylamin (258 μL, 1.86 mmol, 2.30 Äquiv.) sowie 4-Butoxybenzoylchlorid (141 μL, 0.81 mmol, 1.00 Äquiv.) in wasserfreiem THF (10 mL). Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel ^cHex/EtOAc 3:1) wurde die Titelverbindung als farbloser Feststoff (250 mg, 0.65 mmol, 80%) erhalten.

R_f: 0.28 (SiO₂, ^cHex/EtOAc 3:1).

Smb.: 85–86 °C (^cHex/EtOAc).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 7.40 (d, ³J = 8.7 Hz, 2H, H-2'^{Ph} und H-6'^{Ph}), 7.10 (d, ³J = 7.9 Hz, 1H, H-3''^{Ph}), 7.01–6.93 (m, 2H, H-4''^{Ph} und H-6''^{Ph}), 6.91 (d, ³J = 8.7 Hz, 1H, H-3'^{Ph} und H-5'^{Ph}), 3.99 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, OCH₂), 3.76 (s (br), 4H, 2 × H-2^{Ppz} und 2 × H-6^{Ppz}, Rotamer A und B).

¹Signale weisen im ¹³C-NMR eine sehr geringe Intensität auf, da ein rotamer System nahe der Koaleszenz vorliegt. Die Bestimmung der chemischen Verschiebung und eindeutige Zuordnung der C-Atome erfolgte in diesem Fall aufgrund der Linienverbreiterung indirekt mittels ¹H-¹³C-HSQC/HMBC.

B), 2.89 (s (br), 4H, $2 \times H-3^{Ppz}$ und $2 \times H-5^{Ppz}$, Rotamer **A** und **B**), 2.27 (s, 3H, $C-2^{Ph}CH_3$), 1.78 (dq, $J = 8.5, 6.5$ Hz, 2H, OCH_2CH_2), 1.50 (m, 2H, CH_2CH_3), 0.98 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, CH_2CH_3).

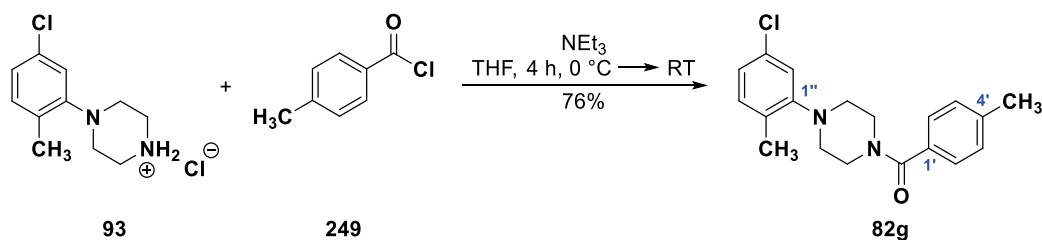
^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, $CDCl_3$): $\delta/ppm = 170.7$ ($C=O$), 160.6 ($C-4^{Ph}$), 152.1 ($C-1^{Ph}$), 132.2 ($C-3^{Ph}$), 132.0 ($C-5^{Ph}$), 131.1 ($C-2^{Ph}$), 129.3 ($C-2^{Ph}$ und $C-6^{Ph}$), 127.6 ($C-1^{Ph}$), 123.7 ($C-4^{Ph}$), 119.9 ($C-6^{Ph}$), 114.4 ($C-3^{Ph}$ und $C-5^{Ph}$), 67.9 (OCH_2), 52.0 ($C-3^{Ppz}$ und $C-5^{Ppz}$, Rotamer **A** und **B**)¹, 31.3 (OCH_2CH_2), 19.3 (CH_2CH_3), 17.6 ($C-1^{Ph}CH_3$), 14.0 (CH_2CH_3).

IR (ATR): $\tilde{\nu} [cm^{-1}] = 2956, 2871, 1631, 1606, 1489, 1425, 1245, 1225, 1173, 1020, 1006, 947, 840$.

ESI-MS (pos.): $m/z = 387.2$ (100%, $[M+H]^+$)/389.2 (35%, $[M+H]^+$) und 409.2 (2%, $[M+Na]^+$); m/z ber. für $[C_{22}H_{27}ClN_2O_2+H]^+$ ($[M+H]^+$): 387.2/389.2.

HPLC-Analyse (C₁₈): $t_R = 5.46$ min, Peakfläche: 99.99% (Acetonitril/MilliQ®-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 65:35 über 8 min, Flussrate: $0.7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 μL , Säulenofentemperatur: 40 °C).

1-(4'-Methylbenzoyl)-4-(5''-chlor-2''-methylphenyl)piperazin (82g)



Die Synthese erfolgte gemäß der allgemeinen Vorschrift unter Verwendung von 1-(5-Chlor-2-methylphenyl)piperazin-Hydrochlorid (**93**, 100 mg, 0.41 mmol, 1.00 Äquiv.), Triethylamin (129 μL , 0.93 mmol, 2.30 Äquiv.) sowie 4-Methylbenzoylchlorid (54 μL , 0.41 mmol, 1.00 Äquiv.) in wasserfreiem THF (5 mL). Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel ($^c\text{Hex}/\text{EtOAc}$ 3:1) wurde die Titelverbindung als farbloser Feststoff (107 mg, 0.31 mmol, 76%) erhalten. Das Produkt lag als Gemisch zweier Rotamere (**A/B** \approx 1:1) vor, welche sich nur in einigen Signalen in den ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren unterscheiden ließen.

R_f: 0.23 (SiO_2 , $^c\text{Hex}/\text{EtOAc}$ 3:1).

Smb.: 138–139 °C ($^c\text{Hex}/\text{EtOAc}$).

^1H -NMR, COSY (300 MHz, $CDCl_3$): $\delta/ppm = 7.34$ (d, $^3J = 8.0$ Hz, 2H, $H-2^{Ph}$ und $H-6^{Ph}$), 7.22 (d, $^3J = 8.0$ Hz, 2H, $H-3^{Ph}$ und $H-5^{Ph}$), 7.10 (d, $^3J = 7.9$ Hz, 1H, $H-3^{Ph}$), 7.03–6.92 (m, 2H, $H-4^{Ph}$ und $H-6^{Ph}$), 3.87 (s (br), 2H, $H-2^{Ppz}$ und $H-6^{Ppz}$, Rotamer **A**), 3.63 (s (br), 2H, $H-2^{Ppz}$ und $H-6^{Ppz}$,

¹Bem.: für $C-2^{Ppz}$ und $C-6^{Ppz}$ (beide Rotamere) konnte kein C-Atom identifiziert werden. Eine indirekte Bestimmung mittels ^1H - ^{13}C -HSQC/HMBC war in diesem Fall auch nicht möglich.

Rotamer **B**), 2.89 (s (br), 4H, $2 \times H-3^{Ppz}$ und $2 \times H-5^{Ppz}$, Rotamer **A** und **B**), 2.39 (s, 3H, $C-4^{Ph}CH_3$), 2.27 (s, 3H, $C-2^{Ph}CH_3$).

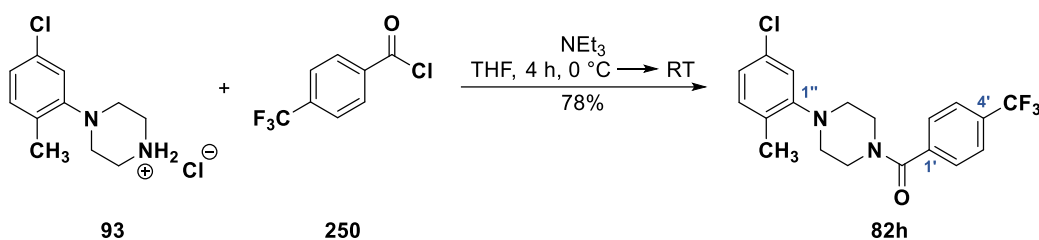
^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, $CDCl_3$): $\delta/ppm = 170.8$ ($C=O$), 152.0 ($C-1''^{Ph}$), 140.1 ($C-4'^{Ph}$), 132.8 ($C-3''^{Ph}$), 131.9 ($C-5''^{Ph}$), 131.1 ($C-2''^{Ph}$), 129.2 ($C-3'^{Ph}$ und $C-5'^{Ph}$), 127.3 ($C-2'^{Ph}$ und $C-6'^{Ph}$), 123.7 ($C-4'^{Ph}$), 119.9 ($C-6''^{Ph}$), 51.9 ($C-3^{Ppz}$ und $C-5^{Ppz}$, Rotamer **A** und **B**), 48.8 (s (br), $C-2^{Ppz}$ und $C-6^{Ppz}$, Rotamer **B**)¹, 42.4 (s (br), $C-2^{Ppz}$ und $C-6^{Ppz}$, Rotamer **A**)¹, 21.5 ($C-4^{Ph}CH_3$), 17.5 ($C-2^{Ph}CH_3$).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2980, 2919, 1632, 1592, 1489, 1427, 1427, 1272, 1225, 1149, 1013, 945, 728.

ESI-MS (pos.): $m/z = 329.2$ (100%, $[M+H]^+$)/331.2 (40%, $[M+H]^+$) und 351.1 (2%, $[M+Na]^+$); m/z ber. für $[C_{19}H_{21}ClN_2O+H]^+$ ($[M+H]^+$): 329.1/331.1.

HPLC-Analyse (C_{18}): $t_R = 2.51$ min, Peakfläche: 99.99% (Acetonitril/MilliQ®-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 65:35 über 8 min, Flussrate: $0.7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 μL , Säulenofentemperatur: 40 °C).

1-(4'-(Trifluormethyl)benzoyl)-4-(5''-chlor-2''-methylphenyl)piperazin (82h)



Die Synthese erfolgte gemäß der allgemeinen Vorschrift unter Verwendung von 1-(5-Chlor-2-methylphenyl)piperazin-Hydrochlorid (**93**, 100 mg, 0.41 mmol, 1.00 Äquiv.), Triethylamin (129 μL , 0.93 mmol, 2.30 Äquiv.) sowie 4-(Trifluormethyl)benzoylchlorid (60 μL , 0.41 mmol, 1.00 Äquiv.) in wasserfreiem THF (5 mL). Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel ($^c\text{Hex}/\text{EtOAc}$ 3:1) wurde die Titelverbindung als farbloser Feststoff (121 mg, 0.32 mmol, 78%) erhalten. Das Produkt lag als Gemisch zweier Rotamere (**A/B** \approx 1:1) vor, welche sich nur in einigen Signalen in den ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren unterscheiden ließen.

R_f: 0.29 (SiO_2 , $^c\text{Hex}/\text{EtOAc}$ 3:1).

Smb.: 127–129 °C ($^c\text{Hex}/\text{EtOAc}$).

^1H -NMR, COSY (300 MHz, $CDCl_3$): $\delta/ppm = 7.71$ (d, $^3J = 8.2$ Hz, 2H, $H-3'^{Ph}$ und $H-5'^{Ph}$), 7.56 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 2H, $H-2'^{Ph}$ und $H-6'^{Ph}$), 7.11 (d, $^3J = 8.0$ Hz, 1H, $H-3''^{Ph}$), 7.00 (dd, $^3J = 8.0$ Hz, $^4J = 2.1$

¹Signale weisen im ^{13}C -NMR eine sehr geringe Intensität auf, da ein rotamer System nahe der Koaleszenz vorliegt. Die Bestimmung der chemischen Verschiebung und eindeutige Zuordnung der C-Atome erfolgte in diesem Fall aufgrund der Linienverbreiterung indirekt mittels ^1H - ^{13}C -HSQC/HMBC.

Hz, 1H, $H-4''^{Ph}$), 6.96 (d, $^4J = 2.1$ Hz, 1H, $H-6''^{Ph}$), 3.94 (s (br), 2H, $H-2^{Ppz}$ und $H-6^{Ppz}$, Rotamer **A**), 3.53 (s (br), 2H, $H-2^{Ppz}$ und $H-6^{Ppz}$, Rotamer **B**), 2.97 (s (br), 2H, $H-3^{Ppz}$ und $H-5^{Ppz}$, Rotamer **A**), 2.85 (s (br), 2H, $H-3^{Ppz}$ und $H-5^{Ppz}$, Rotamer **B**), 2.27 (s, 3H, CH_3).

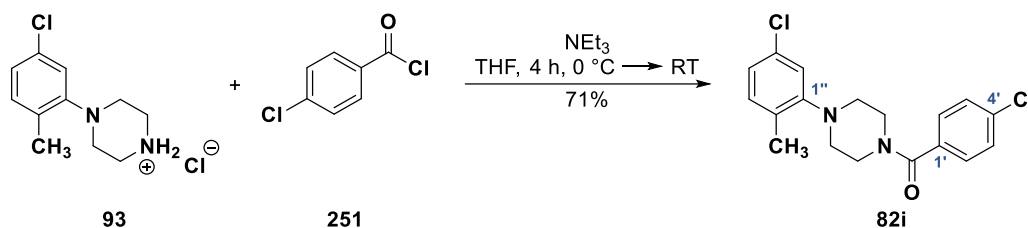
^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, $CDCl_3$): $\delta/ppm = 169.1$ ($C=O$), 151.8 ($C-1''^{Ph}$), 139.4 ($C-1'^{Ph}$), 132.3 ($C-3''^{Ph}$), 132.0 ($C-5''^{Ph}$), 131.9 (q, $^2J_{CF} = 32.8$ Hz, $C-4''^{Ph}$), 131.1 ($C-2''^{Ph}$), 127.6 ($C-2'^{Ph}$ und $C-6'^{Ph}$), 125.8 (q, $^3J_{CF} = 3.7$ Hz, $C-3'^{Ph}$ und $C-5'^{Ph}$), 124.0 ($C-4'^{Ph}$), 123.8 (q, $^1J_{CF} = 272.6$ Hz, CF_3), 120.0 ($C-6''^{Ph}$), 51.7 ($C-3^{Ppz}$ und $C-5^{Ppz}$, Rotamer **A** und **B**), 48.0 (s (br), $C-2^{Ppz}$ und $C-6^{Ppz}$, Rotamer **B**), 42.6 (s (br), $C-2^{Ppz}$ und $C-6^{Ppz}$, Rotamer **A**), 17.5 (CH_3).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2980, 2363, 1639, 1593, 1489, 1435, 1323, 1165, 1125, 1065, 1013, 946, 851.

ESI-MS (pos.): $m/z = 383.1$ (100%, $[M+H]^+$)/385.1 (36%, $[M+H]^+$) und 405.1 (9%, $[M+Na]^+$); m/z ber. für $[C_{19}H_{18}ClF_3N_2O+H]^+$ ($[M+H]^+$): 383.1/385.1.

HPLC-Analyse (C_{18}): $t_R = 3.02$ min, Peakfläche: 99.99% (Acetonitril/MilliQ[®]-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 65:35 über 8 min, Flussrate: 0.7 mL \cdot min⁻¹, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 μ L, Säulenofentemperatur: 40 $^{\circ}C$).

1-(4'-Chlorbenzoyl)-4-(5''-chlor-2''-methylphenyl)piperazin (82i)



Die Synthese erfolgte gemäß der allgemeinen Vorschrift unter Verwendung von 1-(5-Chlor-2-methylphenyl)piperazin-Hydrochlorid (**93**, 100 mg, 0.41 mmol, 1.00 Äquiv.), Triethylamin (129 μ L, 0.93 mmol, 2.30 Äquiv.) sowie 4-Chlorbenzoylchlorid (52 μ L, 0.41 mmol, 1.00 Äquiv.) in wasserfreiem THF (5 mL). Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel ($^{\circ}Hex/EtOAc$ 5:1) wurde die Titelverbindung als farbloser Feststoff (101 mg, 0.29 mmol, 71%) erhalten. Das Produkt lag als Gemisch zweier Rotamere (**A/B** \approx 1:1) vor, welche sich nur in einigen Signalen in den 1H - und ^{13}C -NMR-Spektren unterscheiden ließen.

R_f: 0.71 (SiO_2 , $^{\circ}Hex/EtOAc$ 1:1).

Smb.: 152–154 $^{\circ}C$ ($^{\circ}Hex/EtOAc$).

1H -NMR, COSY (300 MHz, $CDCl_3$): $\delta/ppm = 7.48$ –7.33 (m, 4H, $H-2'^{Ph}$, $H-3'^{Ph}$, $H-5'^{Ph}$ und $H-6'^{Ph}$), 7.10 (d, $^3J = 8.0$ Hz, 1H, $H-3''^{Ph}$), 6.98 (dd, $^3J = 8.0$ Hz, $^4J = 2.1$ Hz, 1H, $H-4''^{Ph}$) 6.95 (d, $^4J = 2.1$ Hz, 1H, $H-6''^{Ph}$), 3.89 (s (br), 2H, $H-2^{Ppz}$ und $H-6^{Ppz}$, Rotamer **A**) 3.58 (s (br), 2H, $H-2^{Ppz}$ und $H-6^{Ppz}$, Rotamer **B**), 2.89 (s (br), 4H, $2 \times H-3^{Ppz}$ und $2 \times H-5^{Ppz}$, Rotamer **A** und **B**), 2.27 (s, 3H, CH_3).

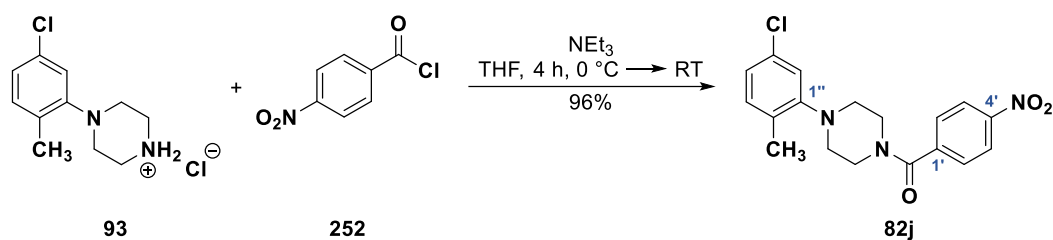
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, CDCl₃): δ /ppm = 169.5 (C=O), 151.9 (C-1''^{Ph}), 136.0 (C-4'^{Ph}), 134.1 (C-1'^{Ph}), 132.2 (C-3''^{Ph}), 132.0 (C-5''^{Ph}), 131.1 (C-2''^{Ph}), 128.9 und 128.8 (C-2'^{Ph} und C-6'^{Ph} sowie C-3'^{Ph} und C-5'^{Ph}), 123.8 (C-4''^{Ph}), 119.9 (C-6''^{Ph}), 51.9 (s (br), C-3^{Ppz} und C-5^{Ppz}, Rotamer A und B), 48.2 (s (br), C-2^{Ppz} und C-6^{Ppz}, Rotamer B), 42.8 (s (br), C-2^{Ppz} und C-6^{Ppz}, Rotamer A), 17.5 (CH₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2817, 1633, 1592, 1489, 1429, 1273, 1225, 1149, 1091, 1011, 945, 837, 731.

ESI-MS (pos.): m/z = 349.2 (100%, [M+H]⁺)/351.1 (68%, [M+H]⁺); m/z ber. für [C₁₈H₁₈Cl₂N₂O+H]⁺ ([M+H]⁺): 349.1/351.1.

HPLC-Analyse (C₁₈): t_R = 2.72 min, Peakfläche: 99.99% (Acetonitril/MilliQ[®]-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 65:35 über 8 min, Flussrate: 0.7 mL · min⁻¹, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 μ L, Säulenofentemperatur: 40 °C).

1-(4'-Nitrobenzoyl)-4-(5''-chlor-2''-methylphenyl)piperazin (82j)



Die Synthese erfolgte gemäß der allgemeinen Vorschrift unter Verwendung von 1-(5-Chlor-2-methylphenyl)piperazin-Hydrochlorid (**93**, 100 mg, 0.41 mmol, 1.00 Äquiv.), Triethylamin (129 μ L, 0.93 mmol, 2.30 Äquiv.) sowie 4-Nitrobenzoylchlorid (75 mg, 0.41 mmol, 1.00 Äquiv.) in wasserfreiem THF (5 mL). Nach extraktiver Aufarbeitung wurde die Titelverbindung in Form gelber Kristalle (142 mg, 0.39 mmol, 96%) erhalten. Das Produkt lag als Gemisch zweier Rotamere (A/B \approx 1:1) vor, welche sich nur in einigen Signalen in den ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren unterscheiden ließen.

R_f: 0.42 (SiO₂, ^cHex/EtOAc 3:2).

Smb.: 163–166 °C (^cHex/EtOAc).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, CDCl₃): δ /ppm = 8.30 (d, ³J = 8.7 Hz, 2H, H-3'^{Ph} und H-5'^{Ph}), 7.62 (d, ³J = 8.7 Hz, 2H, H-2'^{Ph} und H-6'^{Ph}), 7.11 (d, ³J = 8.0 Hz, 1H, H-3''^{Ph}), 7.00 (dd, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 2.1 Hz, 1H, H-4''^{Ph}), 6.95 (d, ⁴J = 2.1 Hz, 1H, H-6''^{Ph}), 3.95 (s (br), 2H, H-2^{Ppz} und H-6^{Ppz}, Rotamer A) 3.52 (s (br), 2H, H-2^{Ppz} und H-6^{Ppz}, Rotamer B), 2.98 (s (br), 2H, H-3^{Ppz} und H-5^{Ppz}, Rotamer A), 2.86 (s (br), 2H, H-3^{Ppz} und H-5^{Ppz}, Rotamer B), 2.27 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, CDCl₃): δ /ppm = 168.3 (C=O), 151.7 (C-1''^{Ph}), 148.5 (C-4'^{Ph}), 141.9 (C-1'^{Ph}), 132.3 (C-3''^{Ph}), 132.0 (C-5''^{Ph}), 131.1 (C-2''^{Ph}), 128.2 (C-2'^{Ph} und C-6'^{Ph}),

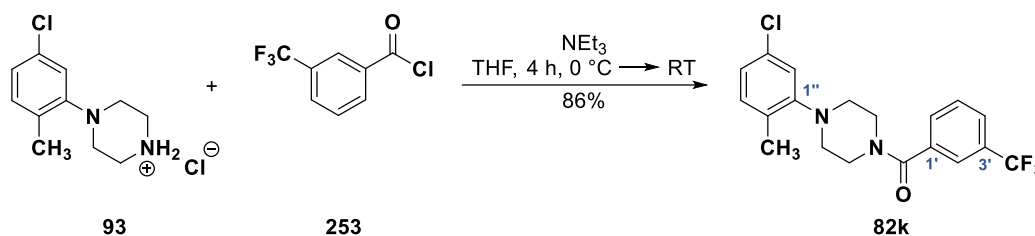
124.1 ($C-3^{Ph}$ und $C-5^{Ph}$), 124.0 ($C-4^{Ph}$), 119.9 ($C-6^{Ph}$), 51.6 (s (br), $C-3^{Ppz}$ und $C-5^{Ppz}$, Rotamer **A** und **B**), 48.2 (s (br), $C-2^{Ppz}$ und $C-6^{Ppz}$, Rotamer **B**), 42.8 (s (br), $C-2^{Ppz}$ und $C-6^{Ppz}$, Rotamer **A**), 17.5 (CH_3).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2823, 1621, 1599, 1490, 1440, 1349, 1275, 1146, 1021, 941, 866, 914, 743, 720.

ESI-MS (pos.): m/z = 360.1 (100%, $[M+H]^+$)/362.1 (36%, $[M+H]^+$) und 382.1 (20%, $[M+Na]^+$); m/z ber. für $[C_{18}H_{18}ClN_3O_3+H]^+$ ($[M+H]^+$): 360.1/362.1.

HPLC-Analyse (C_{18}): t_R = 1.79 min, Peakfläche: 96.22% (Acetonitril/MilliQ®-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 65:35 über 8 min, Flussrate: 0.7 mL · min⁻¹, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 μ L, Säulenofentemperatur: 40 °C).

1-(3'-(Trifluormethyl)benzoyl)-4-(5''-chlor-2''-methylphenyl)piperazin (82k)



Die Synthese erfolgte gemäß der allgemeinen Vorschrift unter Verwendung von 1-(5-Chlor-2-methylphenyl)piperazin-Hydrochlorid (**93**, 100 mg, 0.41 mmol, 1.00 Äquiv.), Triethylamin (129 μ L, 0.93 mmol, 2.30 Äquiv.) sowie 3-(Trifluormethyl)benzoylchlorid (61 μ L, 0.41 mmol, 1.00 Äquiv.) in wasserfreiem THF (5 mL). Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (^cHex/EtOAc 3:1) wurde die Titelverbindung als farbloses Öl (133 mg, 0.35 mmol, 86%) erhalten. Das Produkt lag als Gemisch zweier Rotamere (**A/B** \approx 1:1) vor, welche sich nur in einigen Signalen in den ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren unterscheiden ließen.

R_f: 0.24 (SiO₂, ^cHex/EtOAc 3:1).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, CDCl₃): δ /ppm = 7.75–7.51 (m, 4H, $H-2^{Ph}$ und $H-4^{Ph}$ – $H-6^{Ph}$), 7.11 (d, ³ J = 8.0 Hz, 1H, $H-3^{Ph}$), 6.99 (dd, ³ J = 8.0 Hz, ⁴ J = 2.1 Hz, 1H, $H-4^{Ph}$), 6.96 (d, ⁴ J = 2.1 Hz, 1H, $H-6^{Ph}$), 3.94 (s (br), 2H, $H-2^{Ppz}$ und $H-6^{Ppz}$, Rotamer **A**), 3.56 (s (br), 2H, $H-2^{Ppz}$ und $H-6^{Ppz}$, Rotamer **B**), 2.94 (s (br), 2H, $H-3^{Ppz}$ und $H-5^{Ppz}$, Rotamer **A**), 2.89 (s (br), 2H, $H-3^{Ppz}$ und $H-5^{Ppz}$, Rotamer **B**), 2.28 (s, 3H, CH_3).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, CDCl₃): δ /ppm = 169.0 (C=O), 151.8 ($C-1^{Ph}$), 136.6 ($C-1^{Ph}$), 132.3 ($C-3^{Ph}$), 132.0 ($C-5^{Ph}$), 131.3 (q, ² J_{CF} = 32.8 Hz, $C-3^{Ph}$), 131.1 ($C-2^{Ph}$), 130.5 ($C-6^{Ph}$), 129.3 ($C-5^{Ph}$), 126.7 (q, ³ J_{CF} = 3.8 Hz, $C-4^{Ph}$), 124.3 (q, ³ J_{CF} = 3.8 Hz, $C-2^{Ph}$), 124.0 ($C-4^{Ph}$), 123.8 (q, ¹ J_{CF} = 272.6 Hz, CF_3), 120.0 ($C-6^{Ph}$), 51.9 ($C-3^{Ppz}$ und $C-5^{Ppz}$, Rotamer **A** und

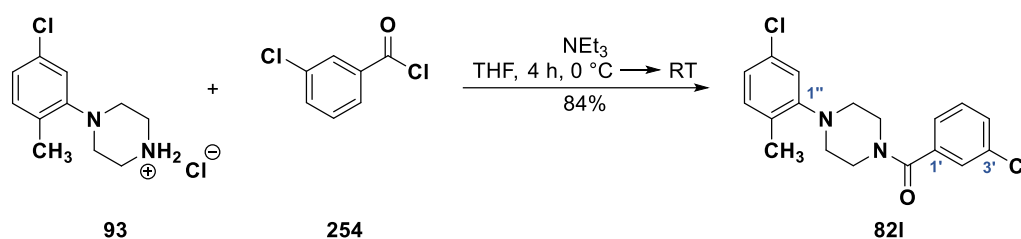
B), 48.0 (s (br), $C-2^{Ppz}$ und $C-6^{Ppz}$, Rotamer **B**), 42.6 (s (br), $C-2^{Ppz}$ und $C-6^{Ppz}$, Rotamer **A**), 17.5 (CH_3).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2817, 1638, 1592, 1489, 1425, 1331, 1252, 1125, 1072, 1021, 948, 814, 702.

ESI-MS (pos.): m/z = 383.2 (100%, $[M+H]^+$)/385.1 (35%, $[M+H]^+$) und 405.1 (10%, $[M+Na]^+$); m/z ber. für $[C_{19}H_{18}ClF_3N_2O+H]^+$ ($[M+H]^+$): 383.1/385.1.

HPLC-Analyse (C_{18}): t_R = 2.95 min, Peakfläche: 99.99% (Acetonitril/MilliQ[®]-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 65:35 über 8 min, Flussrate: $0.7\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: $5\ \mu\text{L}$, Säulenofentemperatur: $40\ ^\circ\text{C}$).

1-(3'-Chlorbenzoyl)-4-(5''-chlor-2''-methylphenyl)piperazin (821)



Die Synthese erfolgte gemäß der allgemeinen Vorschrift unter Verwendung von 1-(5-Chlor-2-methylphenyl)piperazin-Hydrochlorid (**93**, 200 mg, 0.81 mmol, 1.00 Äquiv.), Triethylamin (258 μL , 1.86 mmol, 2.30 Äquiv.) sowie 3-Chlorbenzoylchlorid (103 μL , 0.81 mmol, 1.00 Äquiv.) in wasserfreiem THF (10 mL). Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (^cHex/EtOAc 4:1) wurde die Titelverbindung als farbloser Feststoff (237 mg, 0.68 mmol, 84%) erhalten. Das Produkt lag als Gemisch zweier Rotamere (**A/B** \approx 1:1) vor, welche sich nur in einigen Signalen in den ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren unterscheiden ließen.

R_f: 0.32 (SiO₂, ^cHex/EtOAc 3:1).

Smb.: 110–112 $^\circ\text{C}$ (^cHex/EtOAc).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 7.47–7.26 (m, 4H, $H-2^{Ph}$ und $H-4^{Ph}$ – $H-6^{Ph}$), 7.11 (d, $^3J = 8.0\text{ Hz}$, 1H, $H-3^{Ph}$), 6.99 (dd, $^3J = 8.0\text{ Hz}$, $^4J = 2.1\text{ Hz}$, 1H, $H-4''^{Ph}$), 6.95 (d, $^4J = 2.1\text{ Hz}$, 1H, $H-6''^{Ph}$), 3.91 (s (br), 2H, $H-2^{Ppz}$ und $H-6^{Ppz}$, Rotamer **A**), 3.56 (s (br), 2H, $H-2^{Ppz}$ und $H-6^{Ppz}$, Rotamer **B**), 2.92 (s (br), 2H, $H-3^{Ppz}$ und $H-5^{Ppz}$, Rotamer **A**), 2.88 (s (br), 2H, $H-3^{Ppz}$ und $H-5^{Ppz}$, Rotamer **B**), 2.27 (s, 3H, CH_3).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 169.0 ($C=O$), 151.8 ($C-1''^{Ph}$), 137.5 ($C-1^{Ph}$), 134.8 ($C-3^{Ph}$), 132.2 ($C-3''^{Ph}$), 132.0 ($C-5''^{Ph}$), 131.1 ($C-2''^{Ph}$), 130.08 ($C-4^{Ph}$ oder $C-5^{Ph}$)¹, 130.05 ($C-4^{Ph}$ oder $C-5^{Ph}$)¹, 127.4 ($C-2^{Ph}$), 125.3 ($C-6^{Ph}$), 123.9 ($C-4''^{Ph}$), 119.9 ($C-6''^{Ph}$), 51.9

¹Eine exakte Zuordnung der C-Atome ist aufgrund der eng beieinander liegenden Signale nicht möglich.

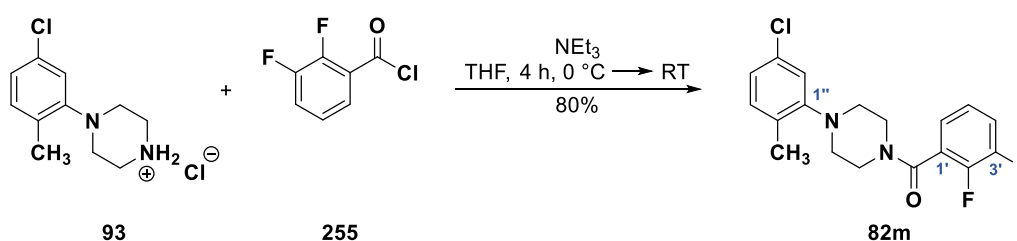
(C-3^{Ppz} und C-5^{Ppz}, Rotamer **A** und **B**), 48.5 (s (br), C-2^{Ppz} und C-6^{Ppz}, Rotamer **B**), 42.4 (s (br), C-2^{Ppz} und C-6^{Ppz}, Rotamer **A**), 17.5 (CH₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2917, 2816, 1635, 1592, 1489, 1433, 1284, 1225, 1149, 1097, 1020, 947, 801, 763, 739.

ESI-MS (pos.): m/z = 349.2 (100%, [M+H]⁺)/351.1 (64%, [M+H]⁺); m/z ber. für [C₁₈H₁₈Cl₂N₂O+H]⁺ ([M+H]⁺): 349.1/351.1.

HPLC-Analyse (C₁₈): t_R = 2.85 min, Peakfläche: 99.99% (Acetonitril/MilliQ[®]-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 65:35 über 8 min, Flussrate: 0.7 mL · min⁻¹, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 µL, Säulenofentemperatur: 40 °C).

1-(2',3'-Difluorbenzoyl)-4-(5''-chlor-2''-methylphenyl)piperazin (82m)



Die Synthese erfolgte gemäß der allgemeinen Vorschrift unter Verwendung von 1-(5-Chlor-2-methylphenyl)piperazin-Hydrochlorid (**93**, 100 mg, 0.41 mmol, 1.00 Äquiv.), Triethylamin (129 µL, 0.93 mmol, 2.30 Äquiv.) sowie 2,3-Difluorbenzoylchlorid (51 µL, 0.41 mmol, 1.00 Äquiv.) in wasserfreiem THF (5 mL). Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Hex/EtOAc 3:1) wurde die Titelverbindung als farbloser Feststoff (114 mg, 0.33 mmol, 80%) erhalten. Das Produkt lag als Gemisch zweier Rotamere (**A/B** ≈ 1:1) vor, welche sich nur in einigen Signalen in den ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren unterscheiden ließen.

R_f: 0.19 (SiO₂, Hex/EtOAc 3:1).

Smb.: 146–148 °C (Hex/EtOAc).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, CDCl₃): δ /ppm = 7.29–7.13 (m, 3H, H4^{Ph}–H6^{Ph}), 7.10 (d, ³J = 8.0 Hz, 1H, H-3^{Ph}), 6.98 (dd, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 2.1 Hz, 1H, H-4^{Ph}), 6.95 (d, ⁴J = 2.1 Hz, 1H, H-6^{Ph}), 3.95 (pseudo-t, $J \approx 5.0$ Hz, 2H, H-2^{Ppz} und H-6^{Ppz}, Rotamer **A**), 3.49 (s (br), 2H, H-2^{Ppz} und H-6^{Ppz}, Rotamer **B**), 2.96 (pseudo-t, $J \approx 5.0$ Hz, 2H, H-3^{Ppz} und H-5^{Ppz}, Rotamer **A**), 2.86 (s (br), 2H, H-3^{Ppz} und H-5^{Ppz}, Rotamer **B**), 2.27 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, CDCl₃): δ /ppm = 164.04 (C=O, ein Rotamer), 164.00 (C=O, anderes Rotamer), 151.7 (C-1^{Ph}), 150.4 (dd, ¹J_{C-3'F-3'} = 250.7 Hz, ²J_{C-3'F-2'} = 12.7 Hz, C-3^{Ph}), 146.5 (dd, ¹J_{C-2'F-2'} = 250.0 Hz, ²J_{C-2'F-3'} = 13.8 Hz, C-2^{Ph}), 132.2 (C-3^{Ph}), 132.0 (C-5^{Ph}), 131.1 (C-2^{Ph}), 126.2 (d, ²J_{CF} = 14.5 Hz, C-1^{Ph}), 125.3 (dd, ³J_{CF} = 6.6 Hz, ⁴J_{CF} = 4.4 Hz, C-5^{Ph}), 123.91 (C-4^{Ph}),

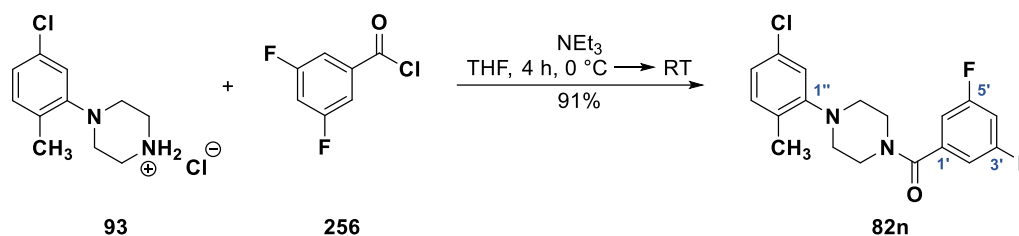
123.85 (d, $^3J_{CF} = 6.0$ Hz, C-6^{Ph}), 119.9 (C-6^{Ph}), 118.6 (d, $^2J_{CF} = 17.1$ Hz, C-4^{Ph}), 52.0 (C-3^{Ppz} und C-5^{Ppz}, Rotamer **B**), 51.6 (C-3^{Ppz} und C-5^{Ppz}, Rotamer **A**), 47.5 (C-2^{Ppz} und C-6^{Ppz}, Rotamer **B**), 42.5 (C-2^{Ppz} und C-6^{Ppz}, Rotamer **A**), 17.5 (CH₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2980, 2818, 2363, 2340, 1642, 1592, 1481, 1435, 1270, 1226, 1150, 1037, 854.

ESI-MS (pos.): $m/z = 351.2$ (100%, [M+H]⁺)/353.1 (36%, [M+H]⁺) und 373.1 (7%, [M+Na]⁺); m/z ber. für [C₁₈H₁₇ClF₂N₂O + H]⁺ ([M+H]⁺): 351.1/353.1.

HPLC-Analyse (C₁₈): $t_R = 2.24$ min, Peakfläche: 99.99% (Acetonitril/MilliQ[®]-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 65:35 über 8 min, Flussrate: 0.7 mL · min⁻¹, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 μ L, Säulenofentemperatur: 40 °C).

1-(3',5'-Difluorbenzoyl)-4-(5''-chlor-2''-methylphenyl)piperazin (82n)



Die Synthese erfolgte gemäß der allgemeinen Vorschrift unter Verwendung von 1-(5-Chlor-2-methylphenyl)piperazin-Hydrochlorid (**93**, 200 mg, 0.81 mmol, 1.00 Äquiv.), Triethylamin (258 μ L, 1.86 mmol, 2.30 Äquiv.) sowie 3,5-Difluorbenzoylchlorid (101 μ L, 0.81 mmol, 1.00 Äquiv.) in wasserfreiem THF (10 mL). Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (^cHex/EtOAc 5:1) wurde die Titelverbindung als farbloser Feststoff (259 mg, 0.74 mmol, 91%) erhalten. Das Produkt lag als Gemisch zweier Rotamere (**A/B** \approx 1:1) vor, welche sich nur in einigen Signalen in den ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren unterscheiden ließen.

R_f: 0.23 (SiO₂, ^cHex/EtOAc 5:1).

Smb.: 114–115 °C (^cHex/EtOAc).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, CDCl₃): δ /ppm = 7.11 (d, $^3J = 8.0$ Hz, 1H, H-3^{Ph}), 7.01–6.93 (m, 2H, H-2^{Ph} und H-6^{Ph})¹, 6.99 (dd, $^3J = 8.0$ Hz, $^4J = 2.1$ Hz, 1H, H-4^{Ph})¹, 6.96 (d, $^4J = 2.1$ Hz, 1H, H-6^{Ph})¹, 6.89 (tt, $J = 8.8, 2.3$ Hz, 1H, H-4^{Ph}), 3.90 (s (br), 2H, H-2^{Ppz} und H-6^{Ppz}, Rotamer **A**), 3.56 (s (br), 2H, H-2^{Ppz} und H-6^{Ppz}, Rotamer **B**), 2.92 (s (br), 2H, H-3^{Ppz} und H-5^{Ppz}, Rotamer **A**), 2.89 (s (br), 2H, H-3^{Ppz} und H-5^{Ppz}, Rotamer **B**), 2.27 (s, 3H, CH₃).

¹Überlappende Signale, deren Zuordnung indirekt mittels ¹H-¹³C-HSQC erfolgte.

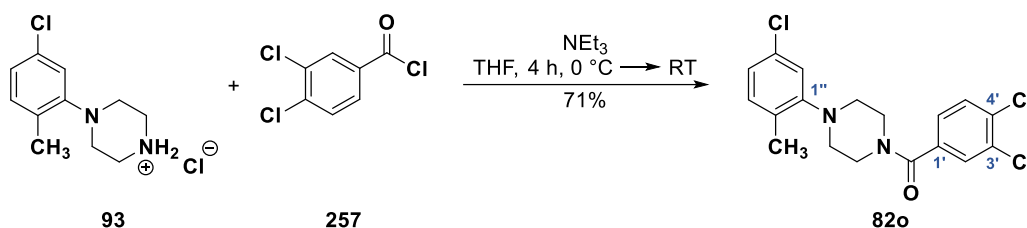
^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, CDCl_3): δ/ppm = 167.8 (t, $^4J_{\text{CF}} = 2.7$ Hz, C=O), 163.1 (dd, $^1J_{\text{CF}} = 251.5$ Hz, $^2J_{\text{CF}} = 12.2$ Hz, C-3 $^{\text{Ph}}$ und C-5 $^{\text{Ph}}$), 151.7 (C-1 $^{\text{Ph}}$), 138.9 (t, $^3J_{\text{CF}} = 8.5$ Hz, C-1 $^{\text{Ph}}$), 132.3 (C-3 $^{\text{Ph}}$), 132.0 (C-5 $^{\text{Ph}}$), 131.1 (C-2 $^{\text{Ph}}$), 124.0 (C-4 $^{\text{Ph}}$), 120.0 (C-6 $^{\text{Ph}}$), 110.5 (dd, $^2J_{\text{CF}} = 17.7$ Hz, $^4J_{\text{CF}} = 8.7$ Hz, C-2 $^{\text{Ph}}$ und C-6 $^{\text{Ph}}$), 105.4 (t, $^2J_{\text{CF}} = 25.1$ Hz, C-4 $^{\text{Ph}}$), 51.8 (C-3 $^{\text{Ppz}}$ und C-5 $^{\text{Ppz}}$, Rotamer **A** und **B**), 48.2 (C-2 $^{\text{Ppz}}$ und C-6 $^{\text{Ppz}}$, Rotamer **B**), 42.7 (C-2 $^{\text{Ppz}}$ und C-6 $^{\text{Ppz}}$, Rotamer **A**), 17.5 (CH_3).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2980, 2817, 2362, 1640, 1591, 1489, 1433, 1318, 1226, 1121, 988, 867, 805.

ESI-MS (pos.): m/z = 351.2 (100%, $[\text{M}+\text{H}]^+$)/353.1 (38%, $[\text{M}+\text{H}]^+$) und 373.1 (11%, $[\text{M}+\text{Na}]^+$); m/z ber. für $[\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{ClF}_2\text{N}_2\text{O} + \text{H}]^+$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 351.1/353.1.

HPLC-Analyse (C₁₈): t_{R} = 2.26 min, Peakfläche: 98.13% (Acetonitril/MilliQ®-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 65:35 über 8 min, Flussrate: 0.7 mL · min⁻¹, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 μL , Säulenofentemperatur: 40 °C).

1-(3',4'-Dichlorbenzoyl)-4-(5''-chlor-2''-methylphenyl)piperazin (82o)



Die Synthese erfolgte gemäß der allgemeinen Vorschrift unter Verwendung von 1-(5-Chlor-2-methylphenyl)piperazin-Hydrochlorid (**93**, 200 mg, 0.81 mmol, 1.00 Äquiv.), Triethylamin (258 μL , 1.86 mmol, 2.30 Äquiv.) sowie 3,4-Dichlorbenzoylchlorid (170 mg, 0.81 mmol, 1.00 Äquiv.) in wasserfreiem THF (10 mL). Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$ 3:1) wurde die Titelverbindung als farbloser Feststoff (222 mg, 0.58 mmol, 71%) erhalten. Das Produkt lag als Gemisch zweier Rotamere (**A/B** \approx 1:1) vor, welche sich nur in einigen Signalen in den ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren unterscheiden ließen.

R_f: 0.29 (SiO_2 , $^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$ 3:1).

Smb.: 96–98 °C ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$).

^1H -NMR, COSY (300 MHz, CDCl_3): δ/ppm = 7.55 (d, $^4J = 1.9$ Hz, 1H, H-2 $^{\text{Ph}}$), 7.51 (d, $^3J = 8.3$ Hz, 1H, H-5 $^{\text{Ph}}$), 7.28 (ddd, $^3J = 8.3$ Hz, $^4J = 1.9$ Hz, $J = 0.8$ Hz, 1H, H-6 $^{\text{Ph}}$), 7.11 (d, $^3J = 8.0$ Hz, 1H, H-3 $^{\text{Ph}}$), 6.99 (dd, $^3J = 8.0$ Hz, $^4J = 2.1$ Hz, 1H, H-4 $^{\text{Ph}}$), 6.95 (d, $^4J = 2.1$ Hz, 1H, H-6 $^{\text{Ph}}$), 3.89 (s (br), 2H, H-2 $^{\text{Ppz}}$ und H-6 $^{\text{Ppz}}$, Rotamer **A**) 3.58 (s (br), 2H, H-2 $^{\text{Ppz}}$ und H-6 $^{\text{Ppz}}$, Rotamer **B**), 2.90 (s (br), 4H, 2 \times H-3 $^{\text{Ppz}}$ und 2 \times H-5 $^{\text{Ppz}}$, Rotamer **A** und **B**), 2.27 (s, 3H, CH_3).

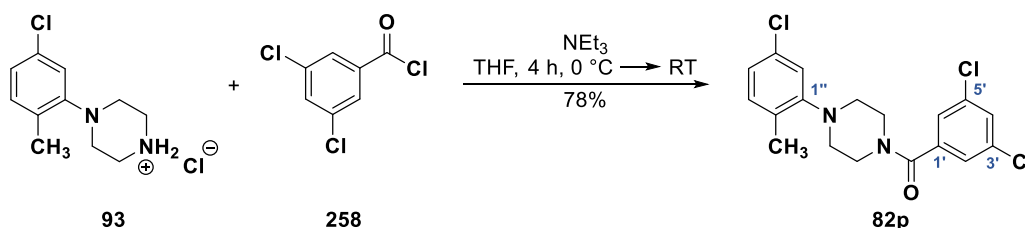
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 168.1 (C=O), 151.8 (C-1''^{Ph}), 135.5 (C-1'^{Ph}), 134.3 (C-4'^{Ph}), 133.2 (C-3'^{Ph}), 132.3 (C-3''^{Ph}), 132.0 (C-5''^{Ph}), 131.1 (C-2''^{Ph}), 130.8 (C-5'^{Ph}), 129.4 (C-2'^{Ph}), 126.6 (C-6'^{Ph}), 124.0 (C-4''^{Ph}), 119.9 (C-6''^{Ph}), 51.9 (s (br), C-3^{Ppz} und C-5^{Ppz}, Rotamer A und B), 48.2 (s (br), C-2^{Ppz} und C-6^{Ppz}, Rotamer B), 42.6 (s (br), C-2^{Ppz} und C-6^{Ppz}, Rotamer A)¹, 17.5 (CH₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2818, 1636, 1591, 1489, 1431, 1276, 1245, 1127, 1021, 947, 908, 731.

ESI-MS (pos.): *m/z* = 383.1 (100%, [M+H]⁺)/384.1 (20%, [M+H]⁺)/385.1 (99%, [M+H]⁺)/386.0 (18%, [M+H]⁺)/387.1 (36%, [M+H]⁺) und 405.0 (15%, [M+Na]⁺)/407.0 (13%, [M+Na]⁺); *m/z* ber. für [C₁₈H₁₇Cl₃N₂O+H]⁺ ([M+H]⁺): 383.1/385.1.

HPLC-Analyse (C₁₈): *t_R* = 3.95 min, Peakfläche: 99.99% (Acetonitril/MilliQ[®]-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 65:35 über 8 min, Flussrate: 0.7 mL · min⁻¹, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 μL, Säulenofentemperatur: 40 °C).

1-(3',5'-Dichlorbenzoyl)-4-(5''-chlor-2''-methylphenyl)piperazin (82p)



Die Synthese erfolgte gemäß der allgemeinen Vorschrift unter Verwendung von 1-(5-Chlor-2-methylphenyl)piperazin-Hydrochlorid (**93**, 200 mg, 0.81 mmol, 1.00 Äquiv.), Triethylamin (258 μL, 1.86 mmol, 2.30 Äquiv.) sowie 3,5-Dichlorbenzoylchlorid (170 mg, 0.81 mmol, 1.00 Äquiv.) in wasserfreiem THF (10 mL). Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (°Hex/EtOAc 3:1) wurde die Titelverbindung als farbloser Feststoff (242 mg, 0.63 mmol, 78%) erhalten. Das Produkt lag als Gemisch zweier Rotamere (**A/B** ≈ 1:1) vor, welche sich nur in einigen Signalen in den ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren unterscheiden ließen.

R_f: 0.52 (SiO₂, °Hex/EtOAc 3:1).

Smb.: 164–166 °C (°Hex/EtOAc).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 7.42 (t, ⁴J = 1.9 Hz, 1H, H-4'^{Ph}), 7.31 (d, ⁴J = 1.9 Hz, 2H, H-2'^{Ph} und H-6'^{Ph}), 7.11 (d, ³J = 8.0 Hz, 1H, H-3''^{Ph}), 6.99 (dd, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 2.1 Hz, 1H, H-4''^{Ph}), 6.95 (d, ⁴J = 2.1 Hz, 1H, H-6''^{Ph}), 3.89 (s (br), 2H, H-2^{Ppz} und H-6^{Ppz}, Rotamer A) 3.55 (s

¹Signale weisen im ¹³C-NMR eine sehr geringe Intensität auf, da ein rotamerer System nahe der Koaleszenz vorliegt. Die Bestimmung der chemischen Verschiebung und eindeutige Zuordnung der C-Atome erfolgte in diesem Fall aufgrund der Linienverbreiterung indirekt mittels ¹H-¹³C-HSQC/HMBC.

(br), 2H, $H-2^{Ppz}$ und $H-6^{Ppz}$, Rotamer **B**), 2.92 (s (br), 2H, $H-3^{Ppz}$ und $H-5^{Ppz}$, Rotamer **A**), 2.89 (s (br), 2H, $H-3^{Ppz}$ und $H-5^{Ppz}$, Rotamer **B**), 2.27 (s, 3H, CH_3).

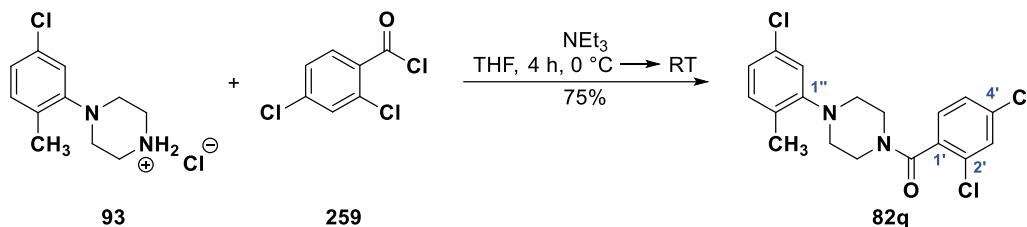
^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, $CDCl_3$): $\delta/ppm = 167.5$ ($C=O$), 151.7 ($C-1''^{Ph}$), 138.6 ($C-1'^{Ph}$), 135.6 ($C-3'^{Ph}$ und $C-5'^{Ph}$), 132.2 ($C-3''^{Ph}$), 132.0 ($C-5''^{Ph}$), 131.1 ($C-2''^{Ph}$), 130.0 ($C-4'^{Ph}$), 125.6 ($C-2'^{Ph}$ und $C-6'^{Ph}$), 124.0 ($C-4''^{Ph}$), 119.9 ($C-6''^{Ph}$), 51.8 (s (br), $C-3^{Ppz}$ und $C-5^{Ppz}$, Rotamer **A** und **B**), 48.2 (s (br), $C-2^{Ppz}$ und $C-6^{Ppz}$, Rotamer **B**), 42.8 (s (br), $C-2^{Ppz}$ und $C-6^{Ppz}$, Rotamer **A**), 17.5 (CH_3).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2816, 2357, 1636, 1561, 1489, 1414, 1271, 1225, 1099, 1027, 948, 863, 808, 731.

ESI-MS (pos.): $m/z = 383.1$ (95%, $[M+H]^+$)/384.1 (18%, $[M+H]^+$)/385.1 (100%, $[M+H]^+$)/386.0 (20%, $[M+H]^+$)/387.1 (30%, $[M+H]^+$) und 405.0 (16%, $[M+Na]^+$)/407.0 (17%, $[M+Na]^+$); m/z ber. für $[C_{18}H_{17}Cl_3N_2O+H]^+$ ($[M+H]^+$): 383.1/385.1.

HPLC-Analyse (C_{18}): $t_R = 4.50$ min, Peakfläche: 99.92% (Acetonitril/MilliQ®-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 65:35 über 8 min, Flussrate: $0.7\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: $5\ \mu\text{L}$, Säulenofentemperatur: $40\ ^\circ\text{C}$).

1-(2',4'-Dichlorbenzoyl)-4-(5''-chlor-2''-methylphenyl)piperazin (82q)



Die Synthese erfolgte gemäß der allgemeinen Vorschrift unter Verwendung von 1-(5-Chlor-2-methylphenyl)piperazin-Hydrochlorid (**93**, 200 mg, 0.81 mmol, 1.00 Äquiv.), Triethylamin (258 μL , 1.86 mmol, 2.30 Äquiv.) sowie 2,4-Dichlorbenzoylchlorid (114 μL , 0.81 mmol, 1.00 Äquiv.) in wasserfreiem THF (10 mL). Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$ 4:1) wurde die Titelverbindung als farbloser Feststoff (234 mg, 0.61 mmol, 75%) erhalten. Das Produkt lag als Gemisch zweier Rotamere (**A/B** \approx 1:1) vor, welche sich nur in einigen Signalen in den ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren unterscheiden ließen.

R_f: 0.37 (SiO_2 , $^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$ 3:1).

Smb.: 134–136 $^\circ\text{C}$ ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$).

^1H -NMR, COSY (300 MHz, $CDCl_3$): $\delta/ppm = 7.45$ (d, $^4J = 1.9$ Hz, 1H, $H-3'^{Ph}$), 7.33 (dd, $^3J = 8.2$ Hz, $^4J = 1.9$ Hz, 1H, $H-5'^{Ph}$), 7.27 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 1H, $H-6'^{Ph}$), 7.10 (d, $^3J = 8.0$ Hz, 1H, $H-3''^{Ph}$), 6.99 (dd, $^3J = 8.0$ Hz, $^4J = 2.1$ Hz, 1H, $H-4''^{Ph}$), 6.94 (d, $^4J = 2.1$ Hz, 1H, $H-6''^{Ph}$), 3.95 (pseudo-t,

$J \approx 5.0$ Hz, 2H, $H-2^{Ppz}$ und $H-6^{Ppz}$, Rotamer **A**) 3.39 (qdd, $J = 13.0, 6.6, 3.3$ Hz, 2H, $H-2^{Ppz}$ und $H-6^{Ppz}$, Rotamer **B**), 2.96 (*pseudo*-q, $J \approx 5.0$ Hz, 2H, $H-3^{Ppz}$ und $H-5^{Ppz}$, Rotamer **A**), 3.05–2.67 (m, 2H, $H-3^{Ppz}$ und $H-5^{Ppz}$, Rotamer **B**), 2.26 (s, 3H, CH_3).

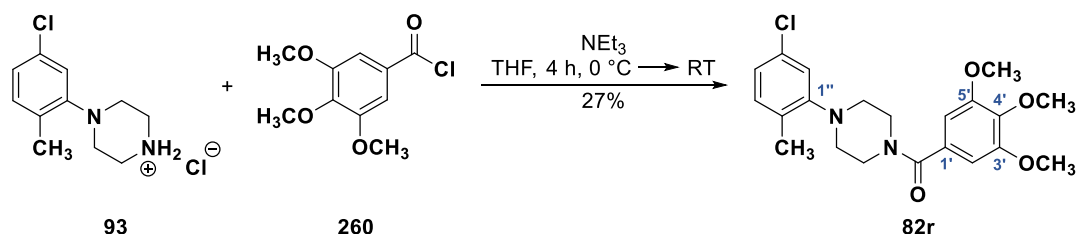
^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, $CDCl_3$): $\delta/ppm = 166.2$ (C=O), 151.8 ($C-1''^{Ph}$), 135.8 ($C-2''^{Ph}$ oder $C-4''^{Ph}$)¹, 134.3 ($C-1''^{Ph}$), 132.3 ($C-3''^{Ph}$), 132.0 ($C-5''^{Ph}$), 131.4 ($C-2''^{Ph}$ oder $C-4''^{Ph}$)¹, 131.1 ($C-2''^{Ph}$), 129.8 ($C-3''^{Ph}$), 128.9 ($C-6''^{Ph}$), 127.8 ($C-5''^{Ph}$), 123.9 ($C-4''^{Ph}$), 119.9 ($C-6''^{Ph}$), 52.4 ($C-3^{Ppz}$ und $C-5^{Ppz}$, Rotamer **B**), 51.6 ($C-3^{Ppz}$ und $C-5^{Ppz}$, Rotamer **A**), 47.3 ($C-2^{Ppz}$ und $C-6^{Ppz}$, Rotamer **B**), 42.2 ($C-2^{Ppz}$ und $C-6^{Ppz}$, Rotamer **A**), 17.5 (CH_3).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2914, 2819, 1640, 1589, 1488, 1434, 1276, 1225, 1100, 1013, 946, 797, 729.

ESI-MS (pos.): $m/z = 383.1$ (100%, $[M+H]^+$)/384.1 (19%, $[M+H]^+$)/385.1 (99%, $[M+H]^+$)/386.0 (19%, $[M+H]^+$)/387.1 (32%, $[M+H]^+$) und 405.0 (13%, $[M+Na]^+$)/407.0 (10%, $[M+Na]^+$); m/z ber. für $[C_{18}H_{17}Cl_3N_2O+H]^+$ ($[M+H]^+$): 383.1/385.1.

HPLC-Analyse (C_{18}): $t_R = 3.81$ min, Peakfläche: 98.28% (Acetonitril/MilliQ®-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 65:35 über 8 min, Flussrate: 0.7 mL \cdot min⁻¹, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 μ L, Säulenofentemperatur: 40 °C).

1-(3',4'-5'-Trimethoxybenzoyl)-4-(5''-chlor-2''-methylphenyl)piperazin (82r)



Die Synthese erfolgte gemäß der allgemeinen Vorschrift unter Verwendung von 1-(5-Chlor-2-methylphenyl)piperazin-Hydrochlorid (**93**, 200 mg, 0.81 mmol, 1.00 Äquiv.), Triethylamin (258 μ L, 1.86 mmol, 2.30 Äquiv.) sowie 3,4,5-Trimethoxybenzoylchlorid (187 mg, 0.81 mmol, 1.00 Äquiv.) in wasserfreiem THF (10 mL). Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (c Hex/EtOAc 1:1) wurde die Titelverbindung als farbloses Öl (88 mg, 0.22 mmol, 27%) erhalten. Das Produkt lag als Gemisch zweier Rotamere (**A/B** \approx 1:1) vor, welche sich nur in einigen Signalen in den 1H - und ^{13}C -NMR-Spektren unterscheiden ließen.

R_f: 0.29 (SiO_2 , c Hex/EtOAc 1:1).

1H -NMR, COSY (300 MHz, $CDCl_3$): $\delta/ppm = 7.08$ (d, $^3J = 7.9$ Hz, 1H, $H-3''^{Ph}$), 7.00–6.90 (m, 2H, $H-4''^{Ph}$ und $H-6''^{Ph}$), 6.64 (s, 2H, $H-2''^{Ph}$ und $H-6''^{Ph}$), 3.99–3.52 (m, 4H, 4H, $2 \times H-2^{Ppz}$ und $2 \times H-6^{Ppz}$,

¹Eine exakte Zuordnung der C-Atome war aufgrund der geringen Auflösung im 1H - ^{13}C -HMBC nicht möglich.

Rotamer **A** und **B**), 3.86 (s, 6H, C-3^{Ph}OCH₃ und C-5^{Ph}OCH₃), 3.84 (s, 3H, C-4^{Ph}OCH₃), 2.88 (s (br), 4H, 2 × H-3^{Ppz} und 2 × H-5^{Ppz}, Rotamer **A** und **B**), 2.25 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 170.3 (C=O), 153.4 (C-3^{Ph} und C-5^{Ph}), 151.9 (C-1^{Ph}), 139.2 (C-4^{Ph}), 132.2 (C-3^{Ph}), 131.8 (C-5^{Ph}), 131.1 (C-2^{Ph}), 131.0 (C-1^{Ph}), 123.7 (C-4^{Ph}), 119.1 (C-6^{Ph}), 104.3 (C-2^{Ph} und C-6^{Ph}), 60.9 (C-4^{Ph}OCH₃), 56.3 (C-3^{Ph}OCH₃ und C-5^{Ph}OCH₃), 51.9 (C-3^{Ppz} und C-5^{Ppz}, Rotamer **A** und **B**), 48.0 (C-2^{Ppz} und C-6^{Ppz}, Rotamer **B**)¹, 43.2 (C-2^{Ppz} und C-6^{Ppz}, Rotamer **A**)¹, 17.4 (CH₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2980, 2362, 1628, 1583, 1412, 1328, 1226, 1124, 1003, 909, 811, 726.

ESI-MS (pos.): *m/z* = 405.1 (100%, [M+H]⁺)/407.1 (34%, [M+H]⁺) und 427.1 (3%, [M+Na]⁺); *m/z* ber. für [C₂₁H₂₅ClN₂O₄+H]⁺ ([M+H]⁺): 405.2/407.2.

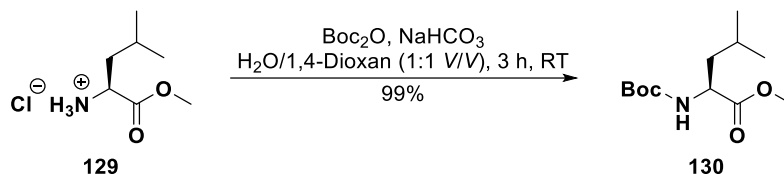
HPLC-Analyse (C₁₈): *t_R* = 1.61 min, Peakfläche: 98.41% (Acetonitril/MilliQ[®]-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 65:35 über 8 min, Flussrate: 0.7 mL · min⁻¹, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 μL, Säulenofentemperatur: 40 °C).

¹Signale weisen im ¹³C-NMR eine sehr geringe Intensität auf, da ein rotamer System nahe der Koaleszenz vorliegt. Die Bestimmung der chemischen Verschiebung und eindeutige Zuordnung der C-Atome erfolgte in diesem Fall aufgrund der Linienverbreiterung indirekt mittels ¹H-¹³C-HSQC/HMBC.

10.9 Versuchsvorschriften zu Kapitel 7

10.9.1 Synthese der 4-Oxoenoate

N-(Boc)-L-leucin-methylester (130)



Es wurde nach einer Vorschrift von Spina *et al.* verfahren.^[360] L-Leucinmethylester-Hydrochlorid (10.00 g, 55.05 mmol, 1.00 Äquiv.) wurde zu einer Lösung von NaHCO₃ (9.25 g, 110.10 mmol, 2.00 Äquiv.) in Wasser (100 mL) gegeben und bei Raumtemperatur tropfenweise mit einer Lösung von Boc₂O (13.22 g, 60.56 mmol, 1.10 Äquiv.) in 1,4-Dioxan (100 mL) versetzt. Es wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt und das organische Lösemittel anschließend unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3 × 100 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Extrakte mit Na₂SO₄ getrocknet und eingengt. Die Titelverbindung **130** wurde als farbloses Öl (13.50 g, 55.03 mmol, 99%; Lit.:^[360] 95%) erhalten.

R_f: 0.40 (SiO₂, ^cHex/EtOAc 5:1).

[α]_D²⁴: -4.0° (c = 1.0, CHCl₃); Lit.:^[460] **[α]_D²⁵**: -4.2° (c = 1.5, CHCl₃).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 4.96 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, NH), 4.33–4.15 (m, 1H, α-CH^{Leu}), 3.66 (s, 3H, OCH₃), 1.77–1.40 (m, 3H, CH₂^{Leu} und CH^{Leu}), 1.37 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.88 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH₃^{Leu}), 0.87 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH₃^{Leu}).

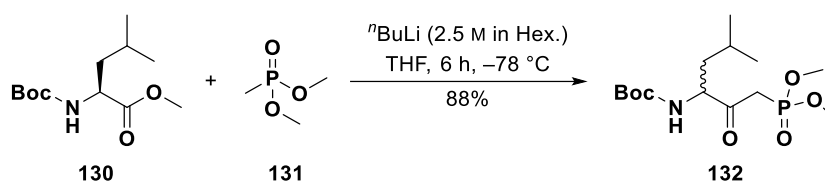
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 174.0 (CO₂Me), 155.5 (CONH), 79.7 (C(CH₃)₃), 52.1 (2C, α-CH^{Leu} und OCH₃), 41.8 (CH₂^{Leu}), 28.3 (C(CH₃)₃), 24.8 (CH^{Leu}), 22.8 (2 × CH₃^{Leu}).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3362, 2958, 2359, 1714, 1510, 1437, 1366, 1249, 1160, 1047, 1019, 780.

ESI-MS (pos.): *m/z* = 146.3 (100%, [M-Boc+H]⁺), 268.2 (40%, [M+Na]⁺) und 513.1 (49%, [2M+Na]⁺); *m/z* ber. für [C₁₂H₂₃NO₄+H]⁺ ([M+H]⁺): 246.2.

Die analytischen Daten stimmen mit denen aus der Literatur überein.^[360,460]

N-Boc-dimethyl-(*RS*)-(3-amino-5-methyl-2-oxohexyl)phosphonat (**132**)



Die Synthese wurde in Anlehnung an eine Vorschrift von Ho *et al.* durchgeführt.^[361] In einem ausgeheizten Schlenk-Kolben wurde unter Argonatmosphäre zu einer Lösung von Dimethylmethylphosphonat (14.8 mL, 138.60 mmol, 4.00 Äquiv.) in absolutem THF (200 mL) bei -78 °C eine Lösung von $n\text{BuLi}$ (2.5 M in Hexan, 55.4 mL, 138.60 mmol, 4.00 Äquiv.) langsam zugetropft. Es wurde 1 h bei -78 °C gerührt und anschließend eine Lösung von *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-L-leucin-methylester (**130**, 8.50 g, 34.65 mmol, 1.00 Äquiv.) in absolutem THF (25 mL) tropfenweise zugegeben und weitere 5 h bei -78 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde durch Zugabe von Wasser (50 mL) gequench und mit EtOAc ($3 \times 200\text{ mL}$) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (${}^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$ 1:1 \rightarrow 1:2) wurde die Titelverbindung¹ **132** als farbloses Öl (10.24 g, 30.35 mmol, 88%; Lit.:^[361] 93%) erhalten.

R_f: 0.17 (SiO_2 , ${}^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$ 1:2).

$[\alpha]_{\text{D}}^{24}$: -41.0° ($c = 1.0$, MeOH); Lit.:^[461] $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -49.4° ($c = 1.0$, MeOH).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, CDCl₃): $\delta/\text{ppm} = 5.25$ (d, $J = 8.5\text{ Hz}$, 1H, NH), 4.35–4.21 (m, 1H, $\alpha\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 3.75 (d, ${}^3J_{\text{HP}} = 11.2\text{ Hz}$, 3H, (PO)OCH₃), 3.74 (d, ${}^3J_{\text{HP}} = 11.2\text{ Hz}$, 3H, (PO)OCH₃), 3.28 (dd, ${}^2J_{\text{HP}} = 22.5\text{ Hz}$, ${}^2J_{\text{HH}} = 14.2\text{ Hz}$, 1H, $\text{CH}_a\text{H}_b(\text{PO})$), 3.06 (dd, ${}^2J_{\text{HP}} = 22.0\text{ Hz}$, ${}^2J_{\text{HH}} = 14.2\text{ Hz}$, 1H, $\text{CH}_a\text{H}_b(\text{PO})$), 1.76–1.47 (m, 2H, $\text{CH}_a\text{H}_b^{\text{Leu}}$ und CH^{Leu}), 1.39 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.37–1.30 (m, 1H, $\text{CH}_a\text{H}_b^{\text{Leu}}$), 0.90 (d, $J = 6.3\text{ Hz}$, 3H, CH_3^{Leu}), 0.89 (d, $J = 6.3\text{ Hz}$, 3H, CH_3^{Leu}).

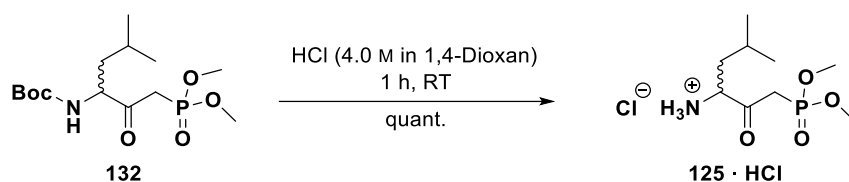
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, CDCl₃): $\delta/\text{ppm} = 202.5$ (d, ${}^2J_{\text{CP}} = 6.7\text{ Hz}$, C=O), 155.7 (CONH), 80.0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 58.9 ($\alpha\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 53.1 (d, ${}^2J_{\text{CP}} = 6.5\text{ Hz}$, $2 \times (\text{PO})\text{OCH}_3$), 39.8 ($\text{CH}_a\text{H}_b^{\text{Leu}}$), 38.0 (d, ${}^1J_{\text{CP}} = 130.4\text{ Hz}$, $\text{CH}_2(\text{PO})$), 28.3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 24.8 (CH^{Leu}), 23.7 (CH_3^{Leu}), 21.6 (CH_3^{Leu}).

IR (ATR): $\tilde{\nu} [\text{cm}^{-1}] = 3236, 2955, 1724, 1698, 1536, 1364, 1298, 1276, 1238, 1166, 1059, 1032, 854, 824$.

ESI-MS (pos.): $m/z = 238.2$ (100%, $[\text{M}-\text{Boc}+\text{H}]^+$), 360.2 (20%, $[\text{M}+\text{Na}]^+$) und 696.8 (7%, $[\text{2M}+\text{Na}]^+$); m/z ber. für $[\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{NO}_6\text{P}+\text{H}]^+$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 338.2.

¹Bem.: Die Zielverbindung wird nicht vollständig enantiomerenrein erhalten, was durch das Auftreten von Diastereomeren im Verlauf der weiteren Synthesesequenz belegt wird (siehe **Kap. 7.3.2**).

Dimethyl-(*RS*)-(3-amino-5-methyl-2-oxohexyl)phosphonat-Hydrochlorid (125 · HCl)



In einem 50 mL-Rundkolben wurde das Phosphonat **132** (6.00 g, 17.79 mmol, 1.00 Äquiv.) vorgelegt und bei Raumtemperatur mit einer HCl-Lösung (4.0 M in 1,4-Dioxan, 35 mL) versetzt. Es wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt und das Lösemittel anschließend unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Der Rückstand wurde im Feinvakuum getrocknet, woraufhin die Titelverbindung **125 · HCl** als farbloser amorpher Feststoff (4.86 g, 17.76 mmol, quant.) erhalten wurde.

R_f: 0.54 (SiO₂, EtOAc/MeOH 2:1 + 1% NEt₃).

Smb.: – (amorph).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: +63.0° (c = 1.0, MeOH).

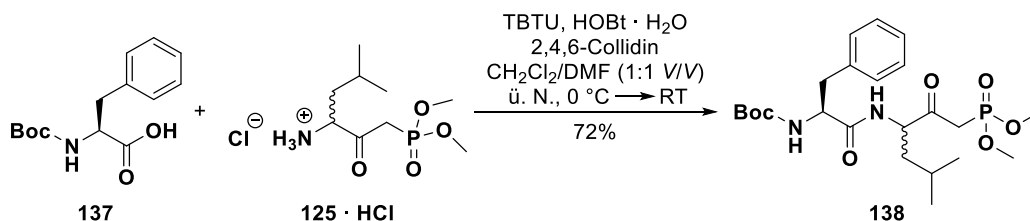
¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ /ppm = 8.56 (s (br), 3H, NH₃⁺), 4.14–4.01 (m, 1H, α -CH^{Leu}), 3.78–3.45 (m, 2H, CH_aH_b(PO)), 3.68 (d, ³J_{HP} = 11.2 Hz, 3H, (PO)OCH₃), 3.67 (d, ³J_{HP} = 11.2 Hz, 3H, (PO)OCH₃), 1.93–1.68 (m, 2H, CH_aH_b^{Leu} und CH^{Leu}), 1.61–1.46 (m, 1H, CH_aH_b^{Leu}), 0.92 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H, CH₃^{Leu}), 0.88 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H, CH₃^{Leu}).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ /ppm = 199.1 (d, ²J_{CP} = 6.4 Hz, C=O), 57.3 (d, ³J_{CP} = 4.9 Hz, α -CH^{Leu}), 52.9 (d, ²J_{CP} = 6.0 Hz, 2 × (PO)OCH₃), 37.2 (CH_aH_b^{Leu}), 36.9 (d, ¹J_{CP} = 130.5 Hz, CH₂(PO)), 23.7 (CH^{Leu}), 23.0 (CH₃^{Leu}), 21.1 (CH₃^{Leu}).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3336, 2965, 1717, 1663, 1532, 1464, 1292, 1232, 1176, 1051, 1021, 981, 863.

ESI-MS (pos.): *m/z* = 238.1 (100%, [M–HCl+H]⁺) und 220.1 (41%, [M–NH₂–HCl]⁺); *m/z* ber. für [C₉H₂₀NO₄P+H]⁺ ([M–HCl+H]⁺): 238.1.

N-(Boc-L-phenylalanyl)-dimethyl-(*RS*)-(3-amino-5-methyl-2-oxohexyl)phosphonat (138)



Zu einer Lösung von Boc-L-phenylalanin (1.32 g, 4.98 mmol, 1.00 Äquiv.) in CH₂Cl₂/DMF (50 mL, 1:1 V/V) wurden bei 0 °C HOBT · H₂O (753 mg, 4.98 mmol, 1.00 Äquiv.), TBTU (1.60 g, 4.98 mmol, 1.00 Äquiv.) sowie 2,4,6-Collidin (1.32 mL, 9.96 mmol, 2.00 Äquiv.) gegeben und 5 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde eine Lösung des Hydrochlorids **125 · HCl** (1.50 g, 5.48 mmol,

1.10 Äquiv.) in CH₂Cl₂ (10 mL) tropfenweise zugegeben und 3 h bei 0 °C sowie über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit einer NaCl-Lösung (ges., aq. 50 mL) versetzt und mit CH₂Cl₂ (3 × 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden sukzessive mit einer NH₄Cl-Lösung (ges., aq., 2 × 50 mL), einer NaHCO₃-Lösung (ges., aq., 1 × 50 mL) sowie mit einer NaCl-Lösung (ges., aq., 1 × 100 mL) gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck destillativ entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH 50:1) wurde die Titelverbindung als farbloser Feststoff (1.73 g, 3.58 mmol, 72%) erhalten. Das Produkt lag als Gemisch zweier Diastereomere (**A/B** ≈ 5:1)¹ vor, welche sich in einigen Signalen in den ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren unterscheiden ließen.

R_f: 0.34 (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 30:1).

Smb.: 106–108 °C (CH₂Cl₂/MeOH).

[α]_D²⁵: –22.0° (c = 1.0, CHCl₃).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 7.28–7.08 (m, 5H, H_{Ar}^{Phe}), 6.86 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, NH^{Leu}, Diastereomer **B**), 6.78 (d, *J* = 8.5 Hz, NH^{Leu}, Diastereomer **A**), 5.08 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, BocNH^{Phe}, Diastereomer **B**), 4.93 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, BocNH^{Phe}, Diastereomer **A**), 4.63–4.43 (m, 1H, α-CH^{Leu}), 4.40–4.21 (m, 1H, α-CH^{Phe}), 3.69 (d, ³*J*_{HP} = 11.2 Hz, 3H, (PO)OCH₃), 3.68 (d, ³*J*_{HP} = 11.2 Hz, 3H, (PO)OCH₃), 3.13–2.79 (m, 4H, CH₂^{Phe} und CH₂(PO)), 1.63–1.10 (m, 3H, CH₂^{Leu} und CH^{Leu}), 1.34 (s, 9H, C(CH₃)₃, Diastereomer **A**), 1.32 (s, 9H, C(CH₃)₃, Diastereomer **B**), 0.88–0.79 (m, 6H, CH₃^{Leu}, Diastereomer **A**), 0.79–0.71 (m, 6H, CH₃^{Leu}, Diastereomer **B**).

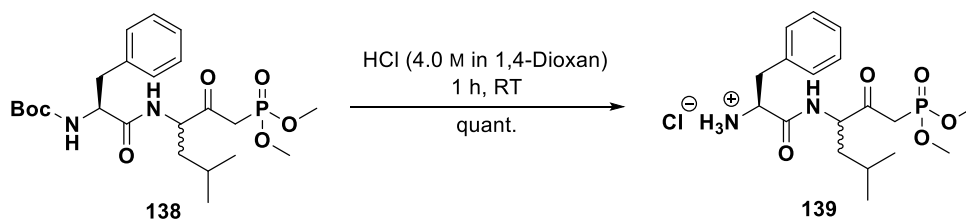
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 201.4 (d, ²*J*_{CP} = 6.8 Hz, C=O), 171.8 (CO^{Phe}NH, Diastereomer **B**), 171.5 (CO^{Phe}NH, Diastereomer **A**), 154.8 (CO^{Boc}NH), 136.6 (C-1_{Ar}^{Phe}), 129.5 (C-2_{Ar}^{Phe} und C-6_{Ar}^{Phe}, Diastereomer **A**), 129.4 (C-2_{Ar}^{Phe} und C-6_{Ar}^{Phe}, Diastereomer **B**), 128.8 (C-3_{Ar}^{Phe} und C-5_{Ar}^{Phe}), 127.1 (C-4_{Ar}^{Phe}), 80.4 (C(CH₃)₃), 57.5 (d, ³*J*_{CP} = 1.9 Hz, α-CH^{Leu}), 55.9 (α-CH^{Phe}), 53.3 (d, ²*J*_{CP} = 6.7 Hz, 2 × (PO)OCH₃, ein Diastereomer), 53.2 (d, ²*J*_{CP} = 6.0 Hz, 2 × (PO)OCH₃, anderes Diastereomer), 39.8 (CH₂^{Leu}), 38.3 (d, ¹*J*_{CP} = 129.4 Hz, CH₂(PO)), 38.0 (CH₂^{Phe}), 28.3 (C(CH₃)₃), 24.7 (CH^{Leu}), 23.3 (CH₃^{Leu}), 21.5 (CH₃^{Leu}).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3289, 2957, 1716, 1662, 1521, 1455, 1366, 1246, 1170, 1029, 816, 750, 700.

ESI-MS (pos.): *m/z* = 507.2 (100%, [M+Na]⁺) und 367.3 (67%, [M–Boc–NH₂]⁺); *m/z* ber. für [C₂₃H₃₇N₂O₇P+Na]⁺ ([M+Na]⁺): 507.2.

¹Das Diastereomerenverhältnis wurde mittels ¹H-NMR bestimmt und variierte je nach Ansatz.

N-(*L*-Phenylalanyl)-dimethyl-(*RS*)-(3-amino-5-methyl-2-oxohexyl)phosphonat-Hydrochlorid (**139**)



In einem 50 mL-Rundkolben wurde Phosphonat **138** (1.56 g, 3.22 mmol, 1.00 Äquiv.) vorgelegt und bei Raumtemperatur mit einer HCl-Lösung (4.0 M in 1,4-Dioxan, 10 mL) versetzt. Es wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt und das Lösemittel anschließend unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Der Rückstand wurde im Feinvakuum getrocknet, woraufhin die Titelverbindung **139** als gelbliches Öl (1.35 g, 3.21 mmol, quant.) erhalten wurde. Das Produkt lag als Gemisch zweier Diastereomere (**A/B** \approx 3:1)¹ vor, welche sich in einigen Signalen in den ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren unterscheiden ließen.

R_f: 0.55 (SiO₂, EtOAc/MeOH 3:1 + 1% NEt₃).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: +18.0° (c = 1.0, MeOH).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, CDCl₃): δ /ppm = 9.22 (d, J = 7.6 Hz, 1H, NH, Diastereomer **A**), 9.01 (d, J = 7.9 Hz, 1H, NH, Diastereomer **B**), 8.66–8.35 (m, 3H, NH₃⁺), 7.37–7.12 (m, 5H, H_{Ar}^{Phe}), 4.42–4.27 (m, 1H, α -CH^{Leu}), 4.22–4.05 (m, 1H, α -CH^{Phe}), 3.65 (d, J = 11.2 Hz, 6H, 2 \times (PO)OCH₃), 3.45–2.95 (m, 4H, CH₂^{Phe} und CH₂(PO)), 1.68–1.00 (m, 3H, CH₂^{Leu} und CH^{Leu}), 0.85 (*pseudo-t*, $J \approx$ 6.7 Hz, 6H, 2 \times CH₃^{Leu}, Diastereomer **A**), 0.75 (d, J = 6.6 Hz, 3H, CH₃^{Leu}, Diastereomer **B**), 0.68 (d, J = 6.4 Hz, CH₃^{Leu}, Diastereomer **B**).

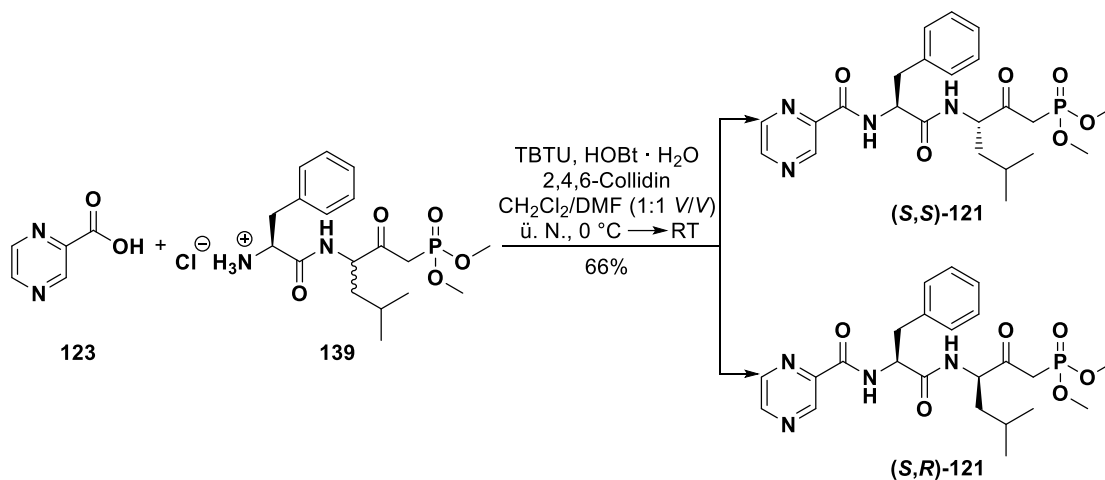
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, CDCl₃): δ /ppm = 200.6 (d, ²J_{CP} = 6.3 Hz, C=O), 168.1 (CO^{Phe}NH), 135.0 (C-1_{Ar}^{Phe}), 129.6 (C-2_{Ar}^{Phe} und C-6_{Ar}^{Phe}), 128.5 (C-3_{Ar}^{Phe} und C-5_{Ar}^{Phe}, Diastereomer **A**), 128.4 (C-3_{Ar}^{Phe} und C-5_{Ar}^{Phe}, Diastereomer **B**), 127.1 (C-4_{Ar}^{Phe}, Diastereomer **A**), 127.0 (C-4_{Ar}^{Phe}, Diastereomer **B**), 57.4 (d, ³J_{CP} = 3.5 Hz, α -CH^{Leu}), 53.2 (α -CH^{Phe}), 53.3 (d, ²J_{CP} = 5.3 Hz, 2 \times (PO)OCH₃), 37.5 (CH₂^{Leu}), 36.8 (CH₂^{Phe}), 36.4 (d, ¹J_{CP} = 129.7 Hz, CH₂(PO)), 23.9 (CH^{Leu}), 23.1 (CH₃^{Leu}, Diastereomer **A**), 23.0 (CH₃^{Leu}, Diastereomer **B**), 21.2 (CH₃^{Leu}, Diastereomer **A**), 21.1 (CH₃^{Leu}, Diastereomer **B**).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2956, 1721, 1681, 1497, 1456, 1234, 1120, 1029, 871, 817, 747, 699.

ESI-MS (pos.): m/z = 385.1 (100%, [M–HCl+H]⁺) und 407.3 (50%, [M–HCl+Na]⁺); m/z ber. für [C₁₈H₂₉N₂O₅P+H]⁺ ([M–HCl+H]⁺): 385.2.

¹Das Diastereomerenverhältnis wurde mittels ¹H-NMR bestimmt und variierte je nach Ansatz.

N-(Pyrazinoyl-*L*-phenylalanyl)-dimethyl-*(RS)*-(3-amino-5-methyl-2-oxohexyl)-phosphonat
 ((*S,S*)-121)



Zu einer Lösung von Pyrazin-2-carbonsäure (341 mg, 2.75 mmol, 1.00 Äquiv.) in CH₂Cl₂/DMF (30 mL, 1:1 V/V) wurden bei 0 °C HOBT · H₂O (416 mg, 2.75 mmol, 1.00 Äquiv.), TBTU (883 mg, 2.75 mmol, 1.00 Äquiv.) sowie 2,4,6-Collidin (730 µL, 5.50 mmol, 2.00 Äquiv.) gegeben und 30 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde eine Lösung des Hydrochlorids **139** (1.27 g, 3.03 mmol, 1.10 Äquiv.) in CH₂Cl₂ (5 mL) tropfenweise zugegeben und 6 h bei 0 °C sowie über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit Wasser (100 mL) versetzt und mit EtOAc (3 × 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden sukzessive mit einer NH₄Cl-Lösung (ges., aq., 1 × 100 mL), mit Wasser (2 × 100 mL) sowie mit einer NaCl-Lösung (ges., aq., 1 × 100 mL) gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck destillativ entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (CHCl₃/MeOH 100:1) wurden die Titelverbindungen jeweils als farblose bis leicht gelbliche Öle (Σ = 888 mg, 1.81 mmol, 66%) erhalten. Die Strukturen der beiden isolierten Diastereomere ((*S,S*)-121/*(S,R)*-121 ≈ 1:1.4)¹ wurden durch Kristallstrukturanalysen (siehe **Kap. 7.3.2.1** und **Kap. 12.2.3**) bestätigt.

(*S,S*)-121:

R_f: 0.58 (SiO₂, CHCl₃/MeOH 20:1).

[α]_D²⁵: -27.0° (c = 1.0, CHCl₃).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ/ppm = 9.11 (d, ⁴*J* = 1.5 Hz, 1H, *H*-3^{Pyz}), 8.87 (d, ³*J* = 2.5 Hz, 1H, *H*-6^{Pyz}), 8.76 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, PyzNH^{Phē}), 8.73 (dd, ³*J* = 2.5 Hz, ⁴*J* = 1.5 Hz, 1H, *H*-5^{Pyz}), 8.57 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, NH^{Leu}), 7.32–7.10 (m, 5H, *H*_{Ar}^{Phē}), 4.83 (td, *J* = 8.6, 5.0 Hz, 1H, α-CH^{Phē}), 4.40 (ddd, *J* = 9.9, 7.7, 3.6 Hz, 1H, α-CH^{Leu}), 3.65 (d, ³*J*_{HP} = 11.2 Hz, 3H, (PO)OCH₃), 3.64 (d, ³*J*_{HP} = 11.2 Hz, 3H, (PO)OCH₃), 3.27 (d, ²*J*_{HP} = 21.4 Hz, 2H, CH₂(PO)), 3.23–3.06 (m, 2H,

¹Das Diastereomerenverhältnis wurde anhand der isolierten Ausbeuten bestimmt und variierte je nach Ansatz leicht.

CH_2^{Phe} , 1.69–1.34 (m, 3H, CH_2^{Leu} und CH^{Leu}), 0.88 (d, $J = 5.9$ Hz, 3H, CH_3^{Leu}), 0.83 (d, $J = 5.9$ Hz, 3H, CH_3^{Leu}).

^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO- d_6): $\delta/\text{ppm} = 201.4$ (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.4$ Hz, C=O), 170.7 ($\text{CO}^{\text{Phe}}\text{NH}$), 162.6 (PyzCONH), 147.8 (C-6^{Pyz}), 144.1 (C-2^{Pyz}), 143.5 (C-3^{Pyz} oder C-5^{Pyz})¹, 143.4 (C-3^{Pyz} oder C-5^{Pyz})¹, 137.4 (C-1_{Ar}^{Phe}), 129.2 (C-2_{Ar}^{Phe} und C-6_{Ar}^{Phe}), 128.2 (C-3_{Ar}^{Phe} und C-5_{Ar}^{Phe}), 126.5 (C-4_{Ar}^{Phe}), 57.2 (d, $^3J_{\text{CP}} = 3.6$ Hz, $\alpha\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 54.1 ($\alpha\text{-CH}^{\text{Phe}}$), 52.61 und 52.58 (2 \times d, $^2J_{\text{CP}} = 6.3$ Hz, 2 \times (PO)OCH₃), 37.7 (CH_2^{Leu}), 37.3 (CH_2^{Phe}), 36.3 (d, $^1J_{\text{CP}} = 129.7$ Hz, $\text{CH}_2(\text{PO})$), 24.2 (CH^{Leu}), 23.1 (CH_3^{Leu}), 21.2 (CH_3^{Leu}).

IR (ATR): $\tilde{\nu} [\text{cm}^{-1}] = 3290, 2957, 1723, 1660, 1519, 1467, 1401, 1243, 1184, 1030, 1020, 815, 749$.

ESI-MS (pos.): $m/z = 491.3$ (100%, $[\text{M}+\text{H}]^+$) und 513.3 (16%, $[\text{M}+\text{Na}]^+$), m/z ber. für $[\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{N}_4\text{O}_6\text{P}+\text{H}]^+$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 491.2.

HPLC-Analyse (C₁₈): $t_{\text{R}} = 2.41$ min, Peakfläche: 99.22% (Acetonitril/MilliQ[®]-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 35:65 über 8 min, Flussrate: 0.7 mL \cdot min⁻¹, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 μL , Säulenofentemperatur: 40 $^{\circ}\text{C}$).

(S,R)-121:

R_f: 0.51 (SiO₂, CHCl₃/MeOH 20:1).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: +16.5 $^{\circ}$ (c = 1.0, CHCl₃).

^1H -NMR, COSY (300 MHz, DMSO- d_6): $\delta/\text{ppm} = 9.12$ (d, $^4J = 1.5$ Hz, 1H, H-3^{Pyz}), 8.88 (d, $^3J = 2.5$ Hz, 1H, H-6^{Pyz}), 8.79–8.70 (m, 2H, PyzNH^{Phe} und H-5^{Pyz}), 8.59 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, NH^{Leu}), 7.29–7.11 (m, 5H, H_{Ar}^{Phe}), 4.84 (q, $J = 7.4$ Hz, 1H, $\alpha\text{-CH}^{\text{Phe}}$), 4.40–4.26 (m, 1H, $\alpha\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 3.62 (d, $^3J_{\text{HP}} = 11.2$ Hz, 6H, 2 \times (PO)OCH₃), 3.42–3.27 (d, $^2J_{\text{HP}} = 21.4$ Hz, 2H, $\text{CH}_2(\text{PO})$), 3.18–3.03 (m, 2H, CH_2^{Phe}), 1.55–1.32 (m, 3H, CH_2^{Leu} und CH^{Leu}), 0.84 (d, $J = 5.8$ Hz, 3H, CH_3^{Leu}), 0.80 (d, $J = 5.8$ Hz, 3H, CH_3^{Leu}).

^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO- d_6): $\delta/\text{ppm} = 201.7$ (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.4$ Hz, C=O), 170.7 ($\text{CO}^{\text{Phe}}\text{NH}$), 162.5 (PyzCONH), 147.8 (C-6^{Pyz}), 144.1 (C-2^{Pyz}), 143.5 (C-3^{Pyz} oder C-5^{Pyz})¹, 143.4 (C-3^{Pyz} oder C-5^{Pyz})¹, 137.2 (C-1_{Ar}^{Phe}), 129.2 (C-2_{Ar}^{Phe} und C-6_{Ar}^{Phe}), 128.2 (C-3_{Ar}^{Phe} und C-5_{Ar}^{Phe}), 126.5 (C-4_{Ar}^{Phe}), 57.3 (d, $^3J_{\text{CP}} = 3.8$ Hz, $\alpha\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 54.1 ($\alpha\text{-CH}^{\text{Phe}}$), 52.58 und 52.55 (2 \times d, $^2J_{\text{CP}} = 6.3$ Hz, 2 \times (PO)OCH₃), 37.6 (2C, CH_2^{Phe} und CH_2^{Leu}), 36.1 (d, $^1J_{\text{CP}} = 130.3$ Hz, $\text{CH}_2(\text{PO})$), 24.1 (CH^{Leu}), 23.1 (CH_3^{Leu}), 21.1 (CH_3^{Leu}).

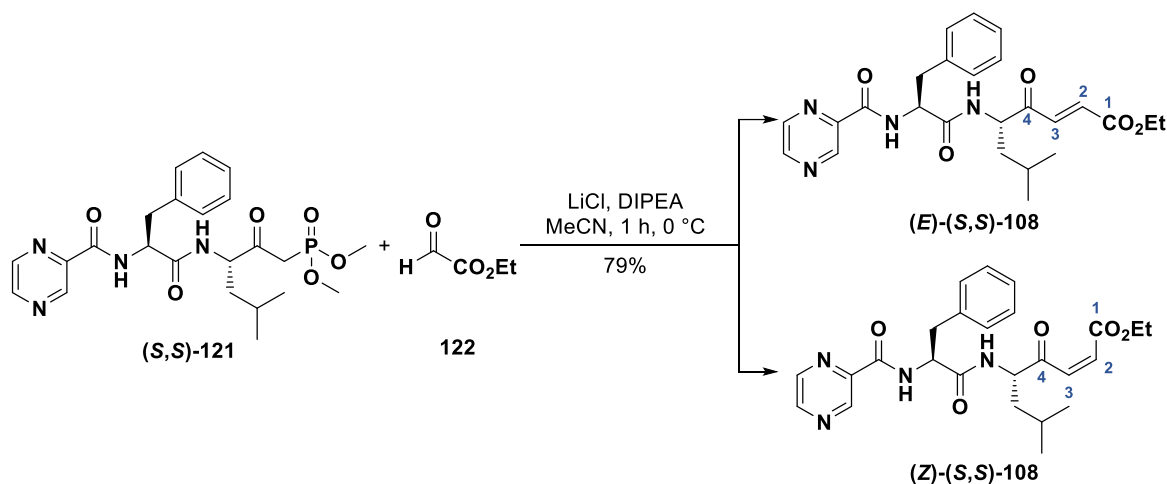
IR (ATR): $\tilde{\nu} [\text{cm}^{-1}] = 2957, 2360, 1718, 1654, 1517, 1466, 1242, 1029, 851, 816, 748, 699$.

¹Eine exakte Zuordnung der C-Atome war aufgrund der eng beieinander liegenden ^{13}C -NMR-Signale nicht möglich.

ESI-MS (pos.): $m/z = 491.3$ (100%, $[M+H]^+$) und 513.3 (12%, $[M+Na]^+$); m/z ber. für $[C_{23}H_{31}N_4O_6P+H]^+$ ($[M+H]^+$): 491.2.

HPLC-Analyse (C₁₈): $t_R = 2.93$ min, Peakfläche: 96.70% (Acetonitril/MilliQ®-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 35:65 über 8 min, Flussrate: $0.7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 μL , Säulenofentemperatur: 40 °C).

(*E/Z*)-(*S*)-7-Methyl-4-oxo-5-((*N*-pyrazinoyl-*L*-phenylalanyl)amino)oct-2-ensäure-ethylester
 ((*E/Z*)-(*S,S*)-108)



Die Synthese erfolgte in Anlehnung an eine modifizierte Vorschrift von Kaeobamrung *et al.* bzw. Kobayashi *et al.*^[367-368]

Bem.: Die Qualität des eingesetzten Glyoxalsäureethylesters ist für das Gelingen der Reaktion entscheidend. Letzterer muss nahezu vollständig in der Monomerform eingesetzt werden, um hohe Ausbeuten zu erzielen. Zu diesem Zweck wurde eine Lösung von Glyoxalsäureethylester (ca. 50% in Toluol; kommerziell erhältlich) vor Verwendung stets frisch über Phosphorpentoxid fraktioniert destilliert.^[462] Zunächst wurde Toluol unter reduziertem Druck bei 45 °C destillativ entfernt und der Rückstand mit Phosphorpentoxid (ca. 100 mg P_2O_5 /2 g Rückstand) versetzt und einer fraktionierten Destillation unterworfen (Crigée-Apparatur mit kurzer Vigreux-Kolonnen ($l = 5 \text{ cm}$)). Der monomere Glyoxalsäureethylester wurde als leicht gelbliche Flüssigkeit (ca. 98% Monomer-Form;¹ Sdp.: 75–80 °C bei $p = 170\text{--}180$ mbar; Lit.:^[463] 80 °C bei $p = 200$ mbar) erhalten und unmittelbar als Lösung in Acetonitril (1:10 V/V) in der HWE-Reaktion eingesetzt.

In einem ausgeheizten 50 mL-Schlenk-Kolben wurde unter Argonatmosphäre wasserfreies $LiCl^2$ (25 mg, 0.58 mmol, 1.20 Äquiv.) zu einer Lösung des Phosphonats (*S,S*)-**121** (235 mg, 0.48 mmol, 1.00 Äquiv.) in absolutem MeCN (10 mL) gegeben und bei 0 °C DIPEA (82 μL , 0.48 mmol, 1.00 Äquiv.) hinzugefügt. Nach 15 min bei 0 °C wurde eine Lösung des frisch destillierten

¹Mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt.

²Zuvor über Nacht bei 150 °C im Trockenschrank getrocknet und direkt verwendet.

Glyoxalsäureethylesters (980 μL , 1:10 V/V in MeCN, 0.96 mmol, 2.00 Äquiv.) langsam zugetropft und 1 h bei 0 °C gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe einer Citronensäurelösung (10%, aq., 2 mL) gequencht, die Mischung mit einer NaCl-Lösung (ges., aq., 15 mL) versetzt und mit EtOAc (3×50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 100:1) wurden die Titelverbindungen als *E/Z*-Isomerengemisch (*E/Z* \approx 5:1)¹ (Σ = 177 mg, 0.38 mmol, 79%) erhalten. Die entsprechenden Isomere konnten mittels semi-präparativer HPLC (C_{18} , Acetonitril/MilliQ®-Wasser 30:70 (isokratisch) über 120 min, Flussrate: 13.0 mL \cdot min⁻¹, Detektion: 254 nm) voneinander getrennt werden.

(E)-(S,S)-108 (farbloses Öl):

R_f: 0.25 (SiO_2 , $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 50:1).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: -39.0° (c = 0.5, CHCl_3).

¹H-NMR, COSY (400 MHz, CDCl_3): δ/ppm = 9.34 (d, ⁴*J* = 1.5 Hz, 1H, *H*-3^{Pyz}), 8.74 (d, ³*J* = 2.5 Hz, 1H, *H*-6^{Pyz}), 8.52 (dd, ³*J* = 2.5 Hz, ⁴*J* = 1.5 Hz, 1H, *H*-5^{Pyz}), 8.37 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, $\text{PyzNH}^{\text{Phe}}$), 7.27–7.17 (m, 5H, $H_{\text{Ar}}^{\text{Phe}}$), 7.13 (d, ³*J*_(E) = 15.8 Hz, 1H, *H*-3), 6.79 (d, ³*J*_(E) = 15.8 Hz, 1H, *H*-2), 6.65–6.56 (m, 1H, NH^{Leu}), 4.98–4.88 (m, 1H, $\alpha\text{-CH}^{\text{Phe}}$), 4.85–4.75 (m, 1H, $\alpha\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 4.27 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, OCH_2CH_3), 3.26–3.12 (m, 2H, CH_2^{Phe}), 1.60–1.45 (m, 2H, $\text{CH}_a\text{H}_b^{\text{Leu}}$ und CH^{Leu}), 1.42–1.20 (m, 1H, $\text{CH}_a\text{H}_b^{\text{Leu}}$), 1.32 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, OCH_2CH_3), 0.88 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, CH_3^{Leu}), 0.81 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, CH_3^{Leu}).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (100.6 MHz, CDCl_3): δ/ppm = 197.2 (C=O), 169.7 ($\text{CO}^{\text{Phe}}\text{NH}$), 165.2 (CO_2Et), 163.1 (PyzCONH), 147.7 (C-6^{Pyz}), 144.5 (C-3^{Pyz}), 144.0 (C-2^{Pyz}), 142.9 (C-5^{Pyz}), 136.4 (C(O)C-3), 136.3 (C-1_{Ar}^{Phe}), 132.7 ($\underline{\text{C}}\text{-2CO}_2\text{Et}$), 129.4 (C-2_{Ar}^{Phe} und C-6_{Ar}^{Phe}), 128.8 (C-3_{Ar}^{Phe} und C-5_{Ar}^{Phe}), 127.3 (C-4_{Ar}^{Phe}), 61.7 (OCH_2CH_3), 56.1 ($\alpha\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 54.6 ($\alpha\text{-CH}^{\text{Phe}}$), 40.3 (CH_2^{Leu}), 38.5 (CH_2^{Phe}), 25.0 (CH^{Leu}), 23.2 (CH_3^{Leu}), 21.9 (CH_3^{Leu}), 14.2 (OCH_2CH_3).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2960, 2365, 2160, 1722, 1704, 1658, 1521, 1466, 1368, 1301, 1187, 1020, 875, 698.

ESI-MS (pos.): *m/z* = 467.3 (100%, $[\text{M}+\text{H}]^+$) und 489.3 (9%, $[\text{M}+\text{Na}]^+$), *m/z* ber. für $[\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_5+\text{H}]^+$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 476.2.

HPLC-Analyse (C_{18}): *t_R* = 15.86 min, Peakfläche: 99.99% (Acetonitril/MilliQ®-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 35:65 über 25 min, Flussrate: 0.7 mL \cdot min⁻¹, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 μL , Säulenofentemperatur: 40 °C).

¹Berechnung durch HPLC-Analyse (λ = 254 nm).

(Z)-(S,S)-108 (farbloses Öl):

R_f: 0.22 (SiO₂, CHCl₃/MeOH 50:1).

[α]_D²⁵: -8.0° (c = 1.0, CHCl₃).

¹H-NMR, COSY (400 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 9.33 (d, ⁴J = 1.5 Hz, 1H, H-3^{Pyz}), 8.76 (d, ³J = 2.5 Hz, 1H, H-6^{Pyz}), 8.54 (dd, ³J = 2.5 Hz, ⁴J = 1.5 Hz, 1H, H-5^{Pyz}), 8.25 (d, J = 8.3 Hz, 1H, PyzNH^{Phe}), 7.33–7.19 (m, 5H, H_{Ar}^{Phe}), 6.53 (d, J = 8.6 Hz, 1H, NH^{Leu}), 6.38 (d, ³J_(Z) = 12.0 Hz, 1H, H-3), 5.98 (d, ³J_(Z) = 12.0 Hz, 1H, H-2), 4.88 (dt, J = 8.4, 6.8 Hz, 1H, α-CH^{Phe}), 4.74 (ddd, J = 9.6, 8.5, 4.0 Hz, 1H, α-CH^{Leu}), 4.19–4.00 (m, 2H, OCH₂CH₃), 3.28–3.15 (m, 2H, CH₂^{Phe}), 1.74 (ddd, J = 13.7, 9.1, 4.0 Hz, 1H, CH_aH_b^{Leu}), 1.57–1.39 (m, 2H, CH_aH_b^{Leu} und CH^{Leu}), 1.25 (t, J = 7.1 Hz, 3H, OCH₂CH₃), 0.86 (d, J = 6.5 Hz, 3H, CH₃^{Leu}), 0.84 (d, J = 6.5 Hz, 3H, CH₃^{Leu}).

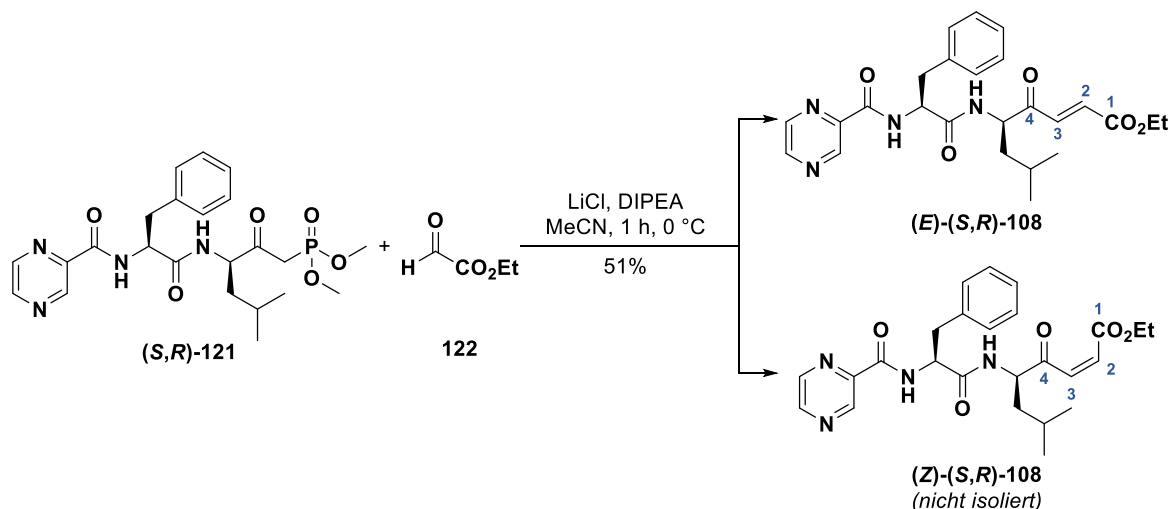
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (100.6 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 202.3 (C=O), 170.4 (CO^{Phe}NH), 165.8 (CO₂Et), 163.1 (PyzCONH), 147.8 (C-6^{Pyz}), 144.4 (C-3^{Pyz}), 143.9 (C-2^{Pyz}), 143.0 (C-5^{Pyz}), 139.8 (C(O)C-3), 136.2 (C-1_{Ar}^{Phe}), 129.5 (C-2_{Ar}^{Phe} und C-6_{Ar}^{Phe}), 128.9 (C-3_{Ar}^{Phe} und C-5_{Ar}^{Phe}), 127.3 (C-4_{Ar}^{Phe}), 126.8 (C-2CO₂Et), 61.5 (OCH₂CH₃), 56.8 (α-CH^{Leu}), 54.7 (α-CH^{Phe}), 39.7 (CH₂^{Leu}), 38.0 (CH₂^{Phe}), 24.8 (CH^{Leu}), 23.3 (CH₃^{Leu}), 21.7 (CH₃^{Leu}), 14.1 (OCH₂CH₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2960, 2365, 2160, 1722, 1704, 1658, 1521, 1466, 1368, 1301, 1187, 1020, 875, 698.

ESI-MS (pos.): m/z = 467.2 (100%, [M+H]⁺) und 489.3 (14%, [M+Na]⁺); m/z ber. für [C₂₅H₃₀N₄O₅+H]⁺ ([M+H]⁺): 476.2.

HPLC-Analyse (C₁₈): t_R = 10.55 min, Peakfläche: 96.16% (Acetonitril/MilliQ®-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 35:65 über 25 min, Flussrate: 0.7 mL · min⁻¹, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 μL, Säulenofentemperatur: 40 °C).

(*E/Z*)-(*R*)-7-Methyl-4-oxo-5-((*N*-pyrazinoyl-*L*-phenylalanyl)amino)oct-2-ensäure-ethylester
 ((*E/Z*)-(*S,R*)-108)



Die Synthese erfolgte in Anlehnung an eine modifizierte Vorschrift von Kaeobamrung *et al.* bzw. Kobayashi *et al.*^[367-368]

Bem.: Die Qualität des eingesetzten Glyoxalsäureethylesters ist für das Gelingen der Reaktion entscheidend. Letzterer muss nahezu vollständig in der Monomerform eingesetzt werden, um hohe Ausbeuten zu erzielen. Zu diesem Zweck wurde eine Lösung von Glyoxalsäureethylester (ca. 50% in Toluol; kommerziell erhältlich) vor Verwendung stets frisch über Phosphorpentoxid fraktioniert destilliert.^[462] Zunächst wurde Toluol unter reduziertem Druck bei 45 °C destillativ entfernt und der Rückstand mit Phosphorpentoxid (ca. 100 mg P₂O₅/2 g Rückstand) versetzt und einer fraktionierten Destillation unterworfen (Crigée-Apparatur mit kurzer Vigreux-Kolonnen (*l* = 5 cm)). Der monomere Glyoxalsäureethylester wurde als leicht gelbliche Flüssigkeit (ca. 98% Monomer-Form;¹ Sdp.: 75–80 °C bei *p* = 170–180 mbar; Lit.:^[463] 80 °C bei *p* = 200 mbar) erhalten und unmittelbar als Lösung in Acetonitril (1:10 V/V) in der HWE-Reaktion eingesetzt.

In einem ausgeheizten 50 mL-Schlenk-Kolben wurde unter Argonatmosphäre wasserfreies LiCl² (39 mg, 0.92 mmol, 1.20 Äquiv.) zu einer Lösung des Phosphonats (**(*S,R*)-121**) (378 mg, 0.77 mmol, 1.00 Äquiv.) in absolutem MeCN (15 mL) gegeben und bei 0 °C DIPEA (131 µL, 0.77 mmol, 1.00 Äquiv.) hinzugefügt. Nach 15 min bei 0 °C wurde eine Lösung des frisch destillierten Glyoxalsäureethylesters (1570 µL, 1:10 v/v in MeCN, 1.54 mmol, 2.00 Äquiv.) langsam zugetropft und 1.5 h bei 0 °C gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe einer Citronensäurelösung (10%, aq., 2 mL) gequencht, die Mischung mit einer NaCl-Lösung (ges., aq., 15 mL) versetzt und mit EtOAc (3 × 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung

¹Mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt.

²Zuvor über Nacht bei 150 °C im Trockenschrank getrocknet und direkt verwendet.

an Kieselgel (CHCl₃/MeOH 100:1) wurden die Titelverbindungen als *E/Z*-Isomerengemisch (*E/Z* ≈ 8:1)¹ (Σ = 185 mg, 0.40 mmol, 51%) erhalten. Durch Lösen der Mischung in MeCN (4 mL) und tropfenweise Zugabe von Wasser konnte das (*E*)-Isomer (farblose Nadeln, 107 mg) selektiv präzipitiert werden.

(*E*)-(S,R)-108:

R_f: 0.29 (SiO₂, CHCl₃/MeOH 20:1).

Smb.: 152–154 °C (H₂O/MeCN).

[α]_D²⁵: –33.5° (c = 1.0, CHCl₃).

¹H-NMR, COSY (400 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 9.33 (d, ⁴J = 1.5 Hz, 1H, *H*-3^{Pyz}), 8.74 (d, ³J = 2.5 Hz, 1H, *H*-6^{Pyz}), 8.52 (dd, ³J = 2.5 Hz, ⁴J = 1.5 Hz, 1H, *H*-5^{Pyz}), 8.36 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, PyzNH^{Phe}), 7.32–7.17 (m, 5H, *H*_{Ar}^{Phe}), 7.10 (d, ³J_(*E*) = 15.8 Hz, 1H, *H*-3), 6.73 (d, ³J_(*E*) = 15.8 Hz, 1H, *H*-2), 6.47 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, NH^{Leu}), 4.93 (td, *J* = 8.3, 6.4 Hz, 1H, α-CH^{Phe}), 4.78 (ddd, *J* = 9.8, 7.8, 4.0 Hz, 1H, α-CH^{Leu}), 4.21 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 3.20 (qd, *J* = 13.7, 7.4 Hz, 2H, CH₂^{Phe}), 1.45 (ddd, *J* = 13.5, 9.2, 4.0 Hz, 1H, CH_aH_b^{Leu}), 1.41–1.17 (m, 2H, CH_aH_b^{Leu} und CH^{Leu}), 1.28 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, OCH₂CH₃), 0.89 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH₃^{Leu}), 0.82 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH₃^{Leu}).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (100.6 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 197.5 (C=O), 170.4 (CO^{Phe}NH), 165.1 (CO₂Et), 162.7 (PyzCONH), 147.7 (C-6^{Pyz}), 144.5 (C-3^{Pyz}), 144.0 (C-2^{Pyz}), 142.9 (C-5^{Pyz}), 136.4 (C-1_{Ar}^{Phe}), 136.2 (C(O)C-3), 132.7 (C-2CO₂Et), 129.4 (C-2_{Ar}^{Phe} und C-6_{Ar}^{Phe}), 128.9 (C-3_{Ar}^{Phe} und C-5_{Ar}^{Phe}), 127.2 (C-4_{Ar}^{Phe}), 61.6 (OCH₂CH₃), 56.1 (α-CH^{Leu}), 54.8 (α-CH^{Phe}), 40.3 (CH₂^{Leu}), 38.6 (CH₂^{Phe}), 24.8 (CH^{Leu}), 23.3 (CH₃^{Leu}), 21.7 (CH₃^{Leu}), 14.2 (OCH₂CH₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3277, 1716, 1701, 1665, 1649, 1522, 1493, 1471, 1365, 1305, 1291, 1255, 1198, 1158, 1019, 980, 697.

ESI-MS (pos.): *m/z* = 467.2 (100%, [M+H]⁺); *m/z* ber. für [C₂₅H₃₀N₄O₅+H]⁺ ([M+H]⁺): 476.2.

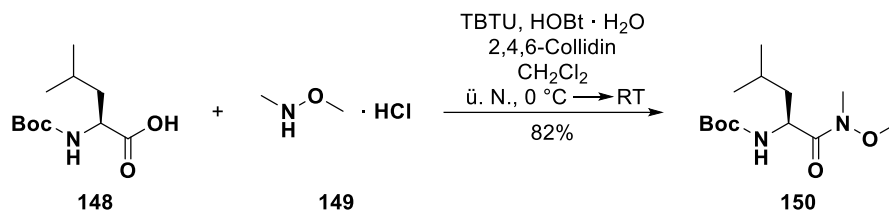
HPLC-Analyse (C₁₈): *t_R* = 18.23 min, Peakfläche: 99.99% (Acetonitril/MilliQ®-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 35:65 über 25 min, Flussrate: 0.7 mL · min⁻¹, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 μL, Säulenofentemperatur: 40 °C).

¹Berechnung anhand HPLC-Analyse (λ = 254 nm).

10.9.2 Synthese der Vinylsulfon- und Nitroalkenderivate

10.9.2.1 Synthese des Peptid-Grundgerüsts

N-(Boc)-L-leucin-*N'*-methoxy-*N'*-methylanid (150)



Es wurde in Anlehnung an eine modifizierte Vorschrift von Xin *et al.* verfahren.^[373] Zu einer Lösung von Boc-L-leucin (11.56 g, 50.00 mmol, 1.00 Äquiv.) in CH₂Cl₂ (250 mL) wurden bei 0 °C HOBt · H₂O (7.56 g, 50.00 mmol, 1.00 Äquiv.) sowie 2,4,6-Collidin (13.3 mL, 100.00 mmol, 2.00 Äquiv.) gegeben und 30 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde TBTU (16.05 g, 50.00 mmol, 1.00 Äquiv.) zugegeben, weitere 30 min bei 0 °C gerührt, die Reaktionsmischung mit *N,O*-Dimethylhydroxylamin-Hydrochlorid (4.88 g, 50.00 mmol, 1.00 Äquiv.) versetzt und 3 h bei 0 °C sowie über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wurde unter reduziertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand in EtOAc (300 mL) suspendiert. Es wurde filtriert, der Filterkuchen (bestehend aus HOBt) gründlich mit EtOAc gewaschen und das Filtrat sukzessive mit einer NaCl-Lösung (ges., aq., 2 × 100 mL), einer NaHCO₃-Lösung (ges., aq., 2 × 100 mL), einer NH₄Cl-Lösung (ges., aq., 2 × 100 mL) sowie erneut mit einer NaCl-Lösung (ges., aq., 2 × 100 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (°Hex/EtOAc 4:1) wurde die Titelverbindung **150** als farbloses Öl (11.30 g, 41.19 mmol, 82 %; Lit.:^[373] 83%) erhalten.

R_f: 0.39 (SiO₂, °Hex/EtOAc 2:1).

$[\alpha]_{\text{D}}^{24}$: -8.0° (c = 1.0, CHCl₃); Lit.:^[464] $[\alpha]_{\text{D}}^{21}$: -5.0° (c = 0.46, CH₂Cl₂).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ/ppm = 6.95 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, NH), 4.33 (ddd, *J* = 10.9, 8.6, 3.5 Hz, 1H, α-CH^{Leu}), 3.72 (s, 3H, OCH₃), 3.08 (s, 3H, NCH₃), 1.75–1.52 (m, 1H, CH^{Leu}), 1.45 (ddd, *J* = 13.4, 10.6, 4.3 Hz, 1H, CH_aH_b^{Leu}), 1.36 (s, 9H, (C(CH₃)₃)), 1.24 (ddd, *J* = 13.4, 9.4, 3.5 Hz, 1H, CH_aCH_b^{Leu}), 0.86 (2 × d, *J* = 6.5 Hz, 2 × 3H, 2 × CH₃^{Leu}).

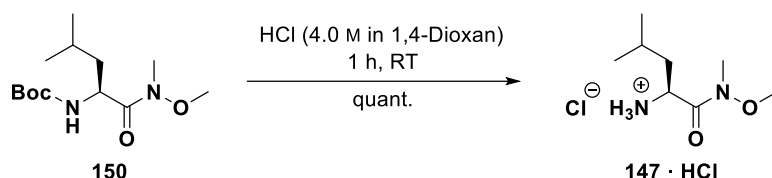
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ/ppm = 173.4 (C(=O)N(OCH₃)CH₃), 155.5 (CONH), 77.8 (C(CH₃)₃), 61.0 (OCH₃), 49.0 (α-CH^{Leu}), 39.6 (CH₂^{Leu}), 31.9 (NCH₃), 28.2 (C(CH₃)₃), 24.3 (CH^{Leu}), 23.1 (CH₃^{Leu}), 21.1 (CH₃^{Leu}).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2958, 1709, 1658, 1503, 1389, 1366, 1250, 1165, 1119, 1045, 1017, 989, 876.

ESI-MS (pos.): $m/z = 174.9$ (100%, $[M-\text{Boc}+\text{H}]^+$) und 297.1 (67%, $[M+\text{Na}]^+$); m/z ber. für $[\text{C}_{13}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_4+\text{H}]^+$ ($[M+\text{H}]^+$): 275.2.

Die analytischen Daten stimmen mit denen aus der Literatur überein.^[373,464]

L-Leucin-*N'*-methoxy-*N'*-methyamid-Hydrochlorid (147 · HCl)



In einem 100 mL-Rundkolben wurde Weinreb-Amid **150** (15.74 g, 57.37 mmol, 1.00 Äquiv.) vorgelegt und bei Raumtemperatur mit einer HCl-Lösung (4.0 M in 1,4-Dioxan, 50 mL) versetzt. Es wurde 4 h bei Raumtemperatur gerührt und das Lösemittel anschließend unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Der Rückstand wurde im Feinvakuum getrocknet, sodass die Titelverbindung **147 · HCl** als farbloser Feststoff (12.05 g, 57.17 mmol, quant.) erhalten wurde.

R_f: 0.38 (SiO₂, EtOAc/MeOH 3:1 + 1% NEt₃).

Smb.: 112–115 °C (1,4-Dioxan).

[α]_D²⁵: –20.0° (c = 1.0, CHCl₃).

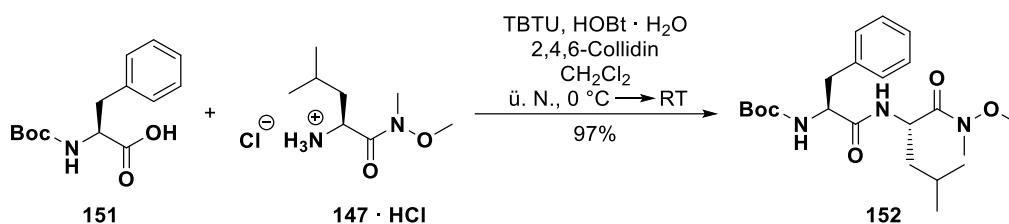
¹H-NMR, COSY (300 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 8.41 (s (br), 3H, NH₃⁺), 4.42 (dd, *J* = 8.8, 4.6 Hz, 1H, α-CH^{Leu}), 3.79 (s, 3H, OCH₃), 3.18 (s, 3H, NCH₃), 2.02–1.78 (m, 2H, CH^{Leu} und CH_aH_b^{Leu}), 1.58 (ddd, *J* = 13.6, 9.4, 4.7 Hz, 1H, CH_aH_b^{Leu}), 0.91 (*pseudo-t*, *J* ≈ 6.4 Hz, 6H, 2 × CH₃^{Leu}).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 169.7 (CON(OCH₃)CH₃), 61.9 (OCH₃), 50.0 (α-CH^{Leu}), 39.7 (CH₂^{Leu}), 32.3 (NCH₃), 24.4 (CH^{Leu}), 23.1 (CH₃^{Leu}), 21.7 (CH₃^{Leu}).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2954, 1664, 1593, 1500, 1466, 1438, 1354, 1176, 1133, 986, 969.

ESI-MS (pos.): $m/z = 175.3$ (100%, $[M-\text{HCl}+\text{H}]^+$); m/z ber. für $[\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2+\text{H}]^+$ ($[M-\text{HCl}+\text{H}]^+$): 175.1.

N-(Boc-L-phenylalanyl)-L-leucin-*N*'-methoxy-*N*'-methylanid (152)



Zu einer Lösung von Boc-L-phenylalanin (14.92 g, 56.24 mmol, 1.00 Äquiv.) in CH₂Cl₂ (500 mL) wurden bei 0 °C HOBT · H₂O (8.50 g, 56.24 mmol, 1.00 Äquiv.) sowie 2,4,6-Collidin (14.9 mL, 112.48 mmol, 2.00 Äquiv.) gegeben und 15 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde TBTU (18.06 g, 56.24 mmol, 1.00 Äquiv.) zugegeben, weitere 30 min bei 0 °C gerührt und schließlich das Hydrochlorid **147 · HCl** (11.85 g, 56.24 mmol, 1.00 Äquiv.) hinzugefügt. Es wurde 3 h bei 0 °C sowie über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wurde anschließend unter reduziertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand in EtOAc (300 mL) suspendiert. Es wurde filtriert, der Filterkuchen (bestehend aus HOBT) gründlich mit EtOAc gewaschen und das Filtrat sukzessive mit einer NaCl-Lösung (ges., aq., 2 × 100 mL), einer NaHCO₃-Lösung (ges., aq., 2 × 100 mL), einer NH₄Cl-Lösung (ges., aq., 2 × 100 mL) sowie erneut mit einer NaCl-Lösung (ges., aq., 1 × 100 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde mit Na₂SO₄ getrocknet, das Lösemittel unter reduziertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand im Feinvakuum getrocknet, woraufhin die Titelverbindung **152** als farbloser Feststoff (22.95 g, 54.45 mmol, 97%) erhalten wurde, welcher ohne weitere Reinigung eingesetzt werden konnte.

R_f: 0.51 (SiO₂, ^cHex/EtOAc 1:1).

Smb.: 165–167 °C (EtOAc).

[α]_D²⁵: –21.0° (c = 1.0, CHCl₃).

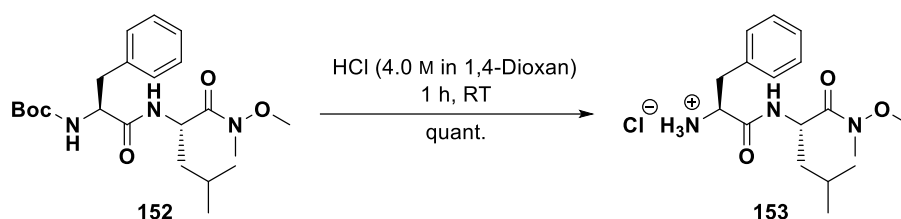
¹H-NMR, COSY (300 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 7.32–7.12 (m, 5H, H_{Ar}^{Phe}), 6.55 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, BocNH^{Phe}), 5.15–4.87 (m, 2H, α-CH^{Leu} und NH^{Leu}), 4.45–4.28 (m, 1H, α-CH^{Phe}), 3.76 (s, 3H, OCH₃), 3.18 (s, 3H, NCH₃), 3.14–2.92 (m, 2H, CH₂^{Phe}), 1.71–1.40 (m, 3H, CH₂^{Leu} und CH^{Leu}), 1.39 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.94 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, CH₃^{Leu}), 0.84 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, CH₃^{Leu}).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 172.8 (C=O(N(OCH₃)CH₃)), 171.1 (CO^{Phe}NH), 155.4 (CO^{Boc}NH), 136.8 (C-1_{Ar}^{Phe}), 129.5 (C-2_{Ar}^{Phe} und C-6_{Ar}^{Phe}), 128.6 (C-3_{Ar}^{Phe} und C-5_{Ar}^{Phe}), 126.9 (C-4_{Ar}^{Phe}), 80.1 (C(CH₃)₃), 61.7 (OCH₃), 55.7 (α-CH^{Phe}), 47.6 (α-CH^{Leu}), 42.0 (CH₂^{Leu}), 38.3 (CH₂^{Phe}), 32.2 (NCH₃), 28.3 (C(CH₃)₃), 24.7 (CH^{Leu}), 23.4 (CH₃^{Leu}), 23.8 (CH₃^{Leu}).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2954, 1662, 1499, 1466, 1438, 1365, 1174, 1133, 986, 701.

ESI-MS (pos.): *m/z* = 305.2 (100%, M-^tBu-N(OCH₃)CH₃)⁺ und 422.3 (61%, [M+H]⁺); *m/z* ber. für [C₂₂H₃₅N₃O₅+H]⁺ ([M+H]⁺): 422.3.

L-Phenylalanyl-L-leucin-*N*'-methoxy-*N*'-methylamid-Hydrochlorid (153)



In einem 250 mL-Rundkolben wurde Weinreb-Amid **152** (22.80 g, 54.09 mmol, 1.00 Äquiv.) vorgelegt und bei Raumtemperatur mit einer HCl-Lösung (4.0 M in 1,4-Dioxan, 70 mL) versetzt. Es wurde 2 h bei Raumtemperatur gerührt und das Lösemittel anschließend unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Der Rückstand wurde im Feinvakuum getrocknet, woraufhin die Titelverbindung **153** als farbloses Öl (19.33 g, 3.21 mmol, quant.) erhalten wurde.

R_f: 0.78 (SiO₂, EtOAc/MeOH 3:1 + 1% NEt₃).

[α]_D²⁵: -4.0° (c = 1.0, CHCl₃).

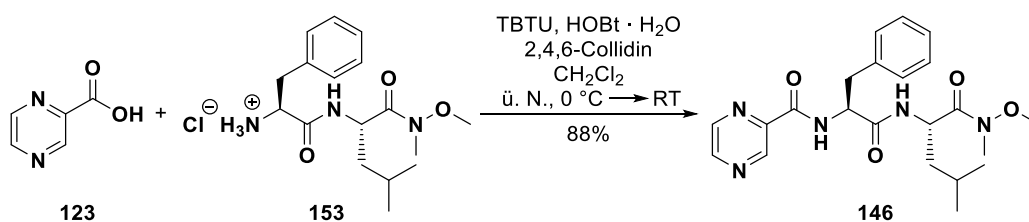
¹H-NMR, COSY (300 MHz, Methanol-*d*₄): δ /ppm = 7.41–7.23 (m, 5H, H_{Ar}^{Phe}), 5.05–4.92 (m, 1H, α -CH^{Leu}), 4.17 (dd, J = 8.6, 5.0 Hz, 1H, α -CH^{Phe}), 3.82 (s, 3H, OCH₃), 3.38–3.26 (m, 1H, $CH_aH_b^{Phe}$), 3.21 (s, 3H, NCH₃), 3.01 (dd, J = 14.4, 8.6 Hz, 1H, $CH_aH_b^{Phe}$), 1.82–1.42 (m, 3H, CH_2^{Leu} und CH^{Leu}), 0.98 (d, J = 6.5 Hz, 3H, CH_3^{Leu}), 0.96 (d, J = 6.5 Hz, 3H, CH_3^{Leu}).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, Methanol-*d*₄): δ /ppm = 174.1 ($\underline{CON(OCH_3)CH_3}$), 169.6 ($CO^{Phe}NH$), 135.5 ($C-1_{Ar}^{Phe}$), 130.6 ($C-2_{Ar}^{Phe}$ und $C-6_{Ar}^{Phe}$), 130.1 ($C-3_{Ar}^{Phe}$ und $C-5_{Ar}^{Phe}$), 128.8 ($C-4_{Ar}^{Phe}$), 62.1 (OCH₃), 55.4 (α -CH^{Phe}), 49.5 (α -CH^{Leu}), 41.5 (CH_2^{Leu}), 38.5 (CH_2^{Phe}), 32.5 (NCH₃), 26.0 (CH^{Leu}), 23.6 (CH_3^{Leu}), 21.7 (CH_3^{Leu}).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2957, 2866, 1645, 1552, 1497, 1455, 1387, 1255, 1119, 1082, 984, 872, 746, 701.

ESI-MS (pos.): m/z = 322.2 (100%, [M-HCl+H]⁺) und 260.9 (41%, [M-HCl-N(OCH₃)CH₃]⁺); m/z ber. für [C₁₇H₂₇N₃O₃+H]⁺ ([M-HCl+H]⁺): 322.2.

N-(Pyrazinoyl-L-phenylalanyl)-L-leucin-*N*'-methoxy-*N*'-methylamid (146)



Zu einer Lösung von Pyrazin-2-carbonsäure (6.60 g, 53.20 mmol, 1.00 Äquiv.) in CH₂Cl₂ (300 mL) wurden bei 0 °C HOBT · H₂O (8.04 g, 53.20 mmol, 1.00 Äquiv.) sowie 2,4,6-Collidin (14.1 mL, 106.40 mmol, 2.00 Äquiv.) gegeben und 15 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde TBTU

(17.08 g, 53.20 mmol, 1.00 Äquiv.) zugegeben, weitere 45 min bei 0 °C gerührt und schließlich das Hydrochlorid **153** (19.04 g, 53.20 mmol, 1.00 Äquiv.) hinzugefügt. Es wurde 3 h bei 0 °C sowie über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wurde anschließend unter reduziertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand in EtOAc (300 mL) suspendiert. Es wurde filtriert, der Filterkuchen (bestehend aus HOBt) mit EtOAc gewaschen und das Filtrat sukzessive mit einer NaCl-Lösung (ges., aq., 2 × 100 mL), einer NaHCO₃-Lösung (ges., aq., 2 × 100 mL), einer NH₄Cl-Lösung (ges., aq., 2 × 100 mL) sowie erneut mit einer NaCl-Lösung (ges., aq., 2 × 100 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde mit Na₂SO₄ getrocknet, das Lösemittel unter reduziertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand im Feinvakuum getrocknet, woraufhin die Titelverbindung **146** als gelblicher Feststoff (20.04 g, 46.88 mmol, 88%) erhalten wurde, welcher ohne weitere Reinigung eingesetzt werden konnte.

R_f: 0.23 (SiO₂, ^cHex/EtOAc 1:1).

Smb.: 62–64 °C (EtOAc).

[α]_D²⁵: –26.0° (c = 1.0, CHCl₃).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 9.36–9.24 (m, 1H, *H*-3^{Pyz}), 8.66 (d, ³*J* = 2.5 Hz, 1H, *H*-6^{Pyz}), 8.47–8.43 (m, 1H, *H*-5^{Pyz}), 8.41 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, PyzNH^{Phe}), 7.35 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, NH^{Leu}), 7.25–7.01 (m, 5H, *H*_{Ar}^{Phe}), 5.18–4.91 (m, 2H, α-CH^{Phe} und α-CH^{Leu}), 3.73 (s, 3H, OCH₃), 3.27–3.01 (m, 5H, NCH₃ und CH₂^{Phe}), 1.68–1.35 (m, 3H, CH₂^{Leu} und CH^{Leu}), 0.84 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, CH₃^{Leu}), 0.79 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, CH₃^{Leu}).

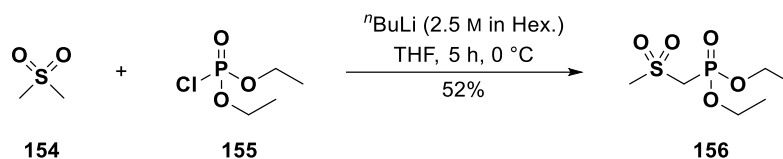
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 172.8 (CON(OCH₃)CH₃), 170.4 (CO^{Phe}NH), 162.7 (PyzCONH), 147.3 (C-6^{Pyz}), 144.3 (C-3^{Pyz}), 144.1 (C-2^{Pyz}), 142.7 (C-5^{Pyz}), 136.3 (C-1_{Ar}^{Phe}), 129.3 (C-2_{Ar}^{Phe} und C-6_{Ar}^{Phe}), 128.3 (C-3_{Ar}^{Phe} und C-5_{Ar}^{Phe}), 126.8 (C-4_{Ar}^{Phe}), 61.6 (OCH₃), 53.9 (α-CH^{Phe}), 47.5 (α-CH^{Leu}), 41.6 (CH₂^{Leu}), 38.8 (CH₂^{Phe}), 32.1 (NCH₃), 24.7 (CH^{Leu}), 23.1 (CH₃^{Leu}), 21.7 (CH₃^{Leu}).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3307, 2956, 1643, 1518, 1465, 1387, 1241, 1168, 1019, 983, 745, 699.

ESI-MS (pos.): *m/z* = 367.1 (100%, [M–N(OCH₃)CH₃]⁺) und 428.2 (15%, [M+H]⁺); *m/z* ber. für [C₂₂H₂₉N₅O₄+H]⁺ ([M+H]⁺): 428.2.

10.9.2.2 Synthese der (Fluor-)Phosphonate

Diethyl((methylsulfonyl)methyl)phosphonat (156)



Die Synthese wurde nach einer modifizierten Vorschrift von Schirmeister *et al.* durchgeführt.^[350] In einem ausgeheizten 250 mL-Schlenk-Kolben wurde unter Argonatmosphäre eine Lösung von Dimethylsulfon (2.35 g, 25.00 mmol, 1.00 Äquiv.) in absolutem THF (100 mL) bei 0 °C tropfenweise mit einer Lösung von ⁿBuLi (2.5 M in Hexan, 25.0 mL, 62.50 mmol, 2.50 Äquiv.) versetzt. Es wurde 1 h bei 0 °C gerührt, anschließend Diethylchlorophosphat (3.6 mL, 25.00 mmol, 1.00 Äquiv.) tropfenweise zugegeben und weitere 4 h bei 0 °C gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe einer NH₄Cl-Lösung (ges., aq., 25 mL) gequencht und mit EtOAc (3 × 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit einer NaCl-Lösung (ges., aq., 1 × 100 mL) gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Der Rückstand wurde mit Toluol (25 mL) versetzt, über Nacht bei 5 °C gelagert und das entstandene Präzipitat abgesaugt sowie mit wenig kaltem Toluol gewaschen, woraufhin die Titelverbindung **156** in Form farbloser Kristalle (2.99 g, 13.00 mmol, 52%) erhalten wurde.

R_f: 0.31 (SiO₂, ⁿHex/EtOAc 1:8).

Smb.: 93–94 °C (Toluol); Lit.:^[465] 95 °C (CH₂Cl₂).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ/ppm = 4.20 (d, ²J_{HP} = 16.7 Hz, 2H, CH₂), 4.09 (dq, J = 8.3, 7.1 Hz, 4H, 2 × OCH₂CH₃), 3.12 (s, 3H, CH₃), 1.25 (t, ³J = 7.1 Hz, 6H, 2 × OCH₂CH₃).

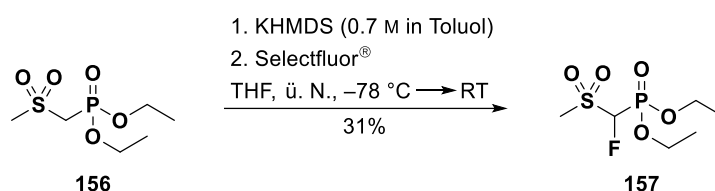
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ/ppm = 62.5 (d, J_{CP} = 6.0 Hz, 2 × OCH₂CH₃), 49.4 (CH₂), 42.4 (CH₃), 16.1 (d, J_{CP} = 6.0 Hz, 2 × OCH₂CH₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3017, 2987, 2955, 2901, 1295, 1245, 1131, 1111, 1011, 977, 960, 935, 842, 802, 790, 763.

ESI-MS (pos.): *m/z* = 231.1 (100%, [M+H]⁺), 175.1 (64%, [M–2Et+H]⁺) und 203.1 (15%, [M–Et+H]⁺); *m/z* ber. für [C₆H₁₅O₅PS+H]⁺ ([M+H]⁺): 231.0.

Die analytischen Daten stimmen mit denen aus der Literatur überein.^[465]

Diethyl(fluor(methylsulfonyl)methyl)phosphonat (157)



Die Synthese wurde nach einer modifizierten Vorschrift von Schirmeister *et al.* durchgeführt.^[350] In einem ausgeheizten 50 mL-Schlenk-Kolben wurde unter Argonatmosphäre eine Lösung von Diethyl-((methylsulfonyl)methyl)phosphonat (**156**, 500 mg, 2.17 mmol, 1.00 Äquiv.) in absolutem THF (20 mL) bei -78°C tropfenweise mit einer Lösung von KHMDS (0.7 M in Toluol, 3.9 mL, 2.71 mmol, 1.25 Äquiv.) versetzt. Es wurde 1 h bei 0°C gerührt, anschließend eine Lösung von Selectfluor[®] (1.15 g, 3.26 mmol, 1.50 Äquiv.) in absolutem DMF (10 mL) zugegeben, weitere 4 h bei -78°C sowie über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe einer NH_4Cl -Lösung (ges., aq., 15 mL) gequencht und mit EtOAc (3×50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Hex/EtOAc 3:2) wurde die Titelverbindung **157** als farbloses Öl (169 mg, 0.68 mmol, 31%) erhalten.

R_f: 0.42 (SiO_2 , Hex/EtOAc 1:2).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta/\text{ppm} = 6.40$ (dd, $^2J_{\text{HF}} = 43.0$ Hz, $^2J_{\text{HP}} = 6.8$ Hz, 2H, CHF), 4.31–4.10 (m, 4H, $2 \times \text{OCH}_2\text{CH}_3$), 3.19 (s, 3H, CH_3), 1.28 (t, $^3J = 7.0$ Hz, 6H, $2 \times \text{OCH}_2\text{CH}_3$).

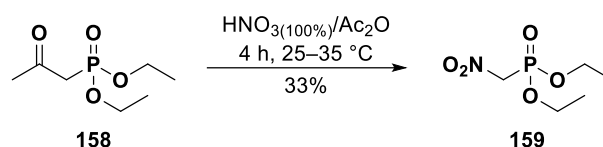
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta/\text{ppm} = 95.8$ (dd, $^1J_{\text{CF}} = 221.6$ Hz, $^1J_{\text{CP}} = 157.1$ Hz, CF(P(O)(OEt)₂), 64.3 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.5$ Hz, OCH_2CH_3), 64.2 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.4$ Hz, OCH_2CH_3), 39.2 (CH_3)¹, 16.13 (d, $^3J_{\text{CP}} = 5.6$ Hz, OCH_2CH_3), 16.10 (d, $^3J_{\text{CP}} = 5.5$ Hz, OCH_2CH_3).

IR (ATR): $\tilde{\nu} [\text{cm}^{-1}] = 2987, 2930, 1328, 1261, 1155, 1139, 1010, 951, 848, 794$.

ESI-MS (pos.): $m/z = 248.9$ (100%, $[\text{M}+\text{H}]^+$); m/z ber. für $[\text{C}_6\text{H}_{14}\text{FO}_5\text{PS}+\text{H}]^+$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 249.0.

¹Aufgrund der Überlagerung mit dem Lösemittelsignal (DMSO-*d*₆) durch ¹H-¹³C-HSQC bestimmt.

Diethyl(nitromethyl)phosphonat (159)



Es wurde nach einer modifizierten Vorschrift von Chemagin *et al.* verfahren.^[371] **Achtung:** Da *in situ* Acetylnitrat (explosiv) generiert wird, sollte eine zusätzliche Schutzscheibe aus Plexiglas eingesetzt und die Reaktionstemperatur ($T < 35\text{ °C}$) mit einem Innenthermometer streng kontrolliert werden. Ein zusätzliches Eis/Wasser-Bad sollte stets bereitgestellt werden und –falls erforderlich– zur Kühlung der Reaktionsmischung verwendet werden.

In einem 25 mL-Zweihalsrundkolben mit Innenthermometer wurde Diethyl(2-oxopropyl)phosphonat (4.83 g, 24.88 mmol, 1.00 Äquiv.) in Ac₂O (5 mL) gelöst und bei Raumtemperatur tropfenweise vorsichtig (!) mit HNO₃ (100%/rauchend, 1.1 mL, 27.36 mmol, 1.10 Äquiv.) versetzt, sodass die Innentemperatur 35 °C nicht überstieg. Es wurde 4 h bei Raumtemperatur gerührt und die Reaktion durch tropfenweise Zugabe von Wasser (5 mL) gequencht. Die Reaktionsmischung wurde mit EtOAc (3 × 25 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit einer NaHCO₃-Lösung (ges., aq., 1 × 50 mL) sowie einer NaCl-Lösung (ges., aq., 1 × 50 mL) gewaschen, mit Na₂SO₄ gewaschen und das Lösemittel unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (^cHex/EtOAc 1:1 → 1:5) wurde die Titelverbindung **159** als gelbliches Öl (1.61 g, 8.15 mmol, 33%; Lit.:^[371] 40%) erhalten.

R_f: 0.45 (SiO₂, ^cHex/EtOAc 1:5).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ/ppm = 5.53 (d, ²J_{HP} = 15.2 Hz, 2H, CH₂), 4.16 (dq, ³J_{HP} = 8.4 Hz, ³J = 7.0 Hz, 4H, 2 × OCH₂CH₃), 1.27 (td, ³J = 7.0 Hz, ⁴J_{HP} = 0.6 Hz, 6H, 2 × OCH₂CH₃).

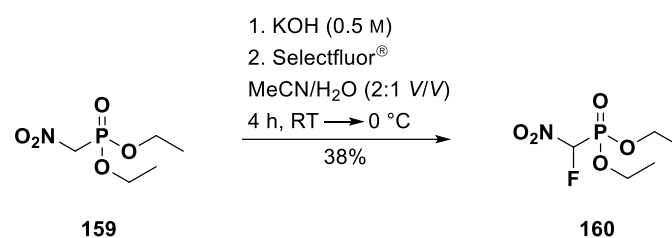
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ/ppm = 71.8 (d, ¹J_{CP} = 137.1 Hz, CH₂), 63.4 (d, ²J_{CP}, 6.1 Hz, 2 × OCH₂CH₃), 16.0 (d, ³J_{CP} = 6.0 Hz, 2 × OCH₂CH₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2987, 1555, 1394, 1370, 1261, 1164, 1012, 979, 920, 834.

ESI-MS (pos.): m/z = 197.9 (100%, [M+H]⁺); m/z ber. für [C₅H₁₂NO₅P+H]⁺ ([M+H]⁺): 198.1.

Die analytischen Daten stimmen mit denen aus der Literatur überein.^[371,466]

Diethyl(fluor(nitro)methyl)phosphonat (160)



Die Synthese wurde nach einer Vorschrift von Opekar *et al.* durchgeführt.^[372] In einem 500 mL-Rundkolben wurde zu einer Lösung von Diethyl(nitromethyl)phosphonat (**159**, 1.60 g, 8.12 mmol, 1.00 Äquiv.) in MeCN/H₂O (200 mL, 2:1 V/V) eine KOH-Lösung (0.5 M, aq., 16.2 mL, 8.12 mmol, 1.00 Äquiv.) bei Raumtemperatur tropfenweise zugegeben. Nach 2 h wurde auf 0 °C gekühlt, die Reaktionsmischung mit Selectfluor[®] (4.07 g, 11.49 mmol, 1.40 Äquiv.) versetzt und weitere 2 h bei 0 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde anschließend mit CH₂Cl₂ (3 × 100 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit einer NaCl-Lösung (1 × 100 mL) gewaschen, mit MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel unter reduziertem Druck destillativ entfernt (Wasserbadtemperatur max. 30–35 °C). Nach flashchromatographischer Reinigung an Kieselgel (^cHex/EtOAc 2:1) wurde die Titelverbindung **160** als gelbliche Flüssigkeit (669 mg, 3.11 mmol, 38%; Lit.:^[372] 48%) erhalten.

R_f: 0.57 (SiO₂, ^cHex/EtOAc 1:2).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ/ppm = 7.14 (d, ²J_{HF} = 43.5 Hz, 1H, CHF), 4.33–4.16 (m, 4H, 2 × OCH₂CH₃), 1.30 (tdd, *J* = 7.0, 2.7, 0.7 Hz, 6H, 2 × OCH₂CH₃).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ/ppm = 105.6 (dd, ¹J_{CF} = 249.1 Hz, ¹J_{CP} = 167.8 Hz, CF(P(O)(OEt)₂), 65.8 (d, ²J_{CP} = 6.0 Hz, OCH₂CH₃), 65.3 (d, ²J_{CP} = 6.5 Hz, OCH₂CH₃), 16.0 (d, ³J_{CP} = 5.5 Hz, OCH₂CH₃), 15.8 (d, ³J_{CP} = 6.1 Hz, OCH₂CH₃).

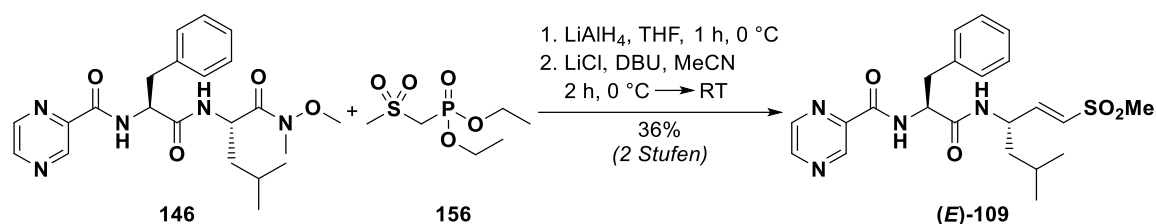
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2987, 2054, 1578, 1370, 1277, 1163, 1129, 1012, 914, 880, 811, 731.

ESI-MS (pos.): *m/z* = 216.0 (100%, [M+H]⁺); *m/z* ber. für [C₅H₁₁FNO₅P+H]⁺ ([M+H]⁺): 216.0.

Die analytischen Daten stimmen mit denen aus der Literatur überein.^[372]

10.9.2.3 Synthese der (Fluor-)Vinylsulfone und (Fluor-)Nitroalkene

(*S,E*)-5-Methyl-3-((*N*-pyrazinoyl-*L*-phenylalanyl)amino)-1-(methylsulfonyl)hex-1-en (**109**)



Teil 1: Reduktion des Weinreb-Amids zum entsprechenden Aldehyd. Die Synthese wurde in Anlehnung an eine allgemeine Vorschrift von Fehrentz *et al.* durchgeführt.^[374] Unter Argonatmosphäre wurde LiAlH_4 (89 mg, 2.34 mmol, 2.00 Äquiv.) bei 0 °C portionsweise zu einer Lösung des Weinreb-Amids **146** (500 mg, 1.17 mmol, 1.00 Äquiv.) in absolutem THF (20 mL) gegeben und 1 h bei 0 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde durch Zugabe einer Citronensäurelösung (10%, aq., 20 mL) gequencht und mit EtOAc (3 \times 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit einer NaHCO_3 -Lösung (ges., aq., 2 \times 50 mL), mit einer NaCl-Lösung (1 \times 100 mL) gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Der in Form eines orangenen Öls erhaltene Peptidylaldehyd wurde ohne weitere Reinigung und vollständige Charakterisierung unmittelbar im nächsten Syntheseschritt eingesetzt.

R_f: 0.41 (SiO_2 , Hex/EtOAc 1:2).

ESI-MS (pos.): $m/z = 369.1$ (100%, $[\text{M}+\text{H}]^+$); m/z ber. für $[\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_3+\text{H}]^+$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 369.2.

Teil 2: HWE-Reaktion. Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an eine allgemeine Vorschrift von Blanchette *et al.*^[369] In einem ausgeheizten 50 mL-Schlenk-Kolben wurde unter Argonatmosphäre wasserfreies LiCl^1 (44 mg, 1.03 mmol, 1.20 Äquiv.) in absolutem MeCN (10 mL) vorgelegt und bei 0 °C das Phosphonat **156** (237 mg, 1.03 mmol, 1.00 Äquiv.) sowie DBU (130 μL , 0.86 mmol, 1.00 Äquiv.) zugegeben. Nach 20 min wurde eine Lösung des Peptidylaldehyds (**Teil 1**, 317 mg, 0.86 mmol, 1.00 Äquiv.) in absolutem MeCN (5 mL) tropfenweise bei 0 °C zugegeben und 1 h bei 0 °C sowie 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde anschließend mit einer Citronensäurelösung (10%, aq., 10 mL) versetzt und mit EtOAc (3 \times 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 50:1) wurde die Titelverbindung **109** als farbloser Feststoff (136 mg, 0.31 mmol, 36% über 2 Stufen) erhalten, welcher mittels semi-präparativer HPLC (C_{18} , Acetonitril/MilliQ®-

¹Zuvor über Nacht bei 150 °C im Trockenschrank getrocknet und direkt verwendet.

Wasser 30:70 (isokratisch) über 90 min, Flussrate: 10.0 mL · min⁻¹, Detektion: 254 nm) weiter gereinigt wurde.

R_f: 0.20 (SiO₂, CHCl₃/MeOH 50:1).

Smb.: 183–185 °C (MeCN/H₂O).

[α]_D²⁵: -23.0° (c = 1.00, CHCl₃).

¹H-NMR, COSY (400 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 9.33 (d, ⁴J = 1.5 Hz, 1H, H-3^{Pyz}), 8.77 (d, ³J = 2.5 Hz, 1H, H-6^{Pyz}), 8.53 (dd, ³J = 2.5 Hz, ⁴J = 1.5 Hz, 1H, H-5^{Pyz}), 8.35 (d, J = 8.1 Hz, 1H, PyzNH^{Phe}), 7.37–7.21 (m, 5H, H_{Ar}^{Phe}), 6.66 (dd, ³J_{(E)}} = 15.1 Hz, ³J_{H-2, α-H} = 5.1 Hz, 1H, H-2), 6.28 (d, J = 8.2 Hz, 1H, NH^{Leu}) 6.09 (dd, ³J_{(E)}} = 15.1 Hz, ⁴J_{H-1, α-H} = 1.6 Hz, 1H, H-1), 4.84 (td, J = 7.9, 6.8 Hz, 1H, α-CH^{Phe}), 4.65 (qdd, J = 7.6, ³J_{α-H, H-2} = 5.1 Hz, ³J_{α-H, H-1} = 1.6 Hz, 1H, α-CH^{Leu}), 3.25–3.16 (m, 2H, CH₂^{Phe}), 2.88 (s, 3H, SO₂CH₃), 1.53 (dp, J = 13.4, 6.7 Hz, 1H, CH^{Leu}), 1.34 (t, J = 7.3 Hz, 2H, CH₂^{Leu}), 0.83 (d, J = 6.7 Hz, 6H, CH₃^{Leu}).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (100.6 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 170.0 (CO^{Phe}NH), 163.3 (PyzCONH), 147.9 (C-6^{Pyz}), 147.1 (C-2), 144.4 (C-3^{Pyz}), 143.8 (C-2^{Pyz}), 142.9 (C-5^{Pyz}), 136.2 (C-1_{Ar}^{Phe}), 129.5 (C-2_{Ar}^{Phe}, C-6_{Ar}^{Phe} und C-1), 129.1 (C-3_{Ar}^{Phe} und C-5_{Ar}^{Phe}), 127.5 (C-4_{Ar}^{Phe}), 55.0 (α-CH^{Phe}), 48.2 (α-CH^{Leu}), 42.90 (CH₂^{Leu} oder SO₂CH₃)¹, 42.87 (CH₂^{Leu} oder SO₂CH₃)¹, 38.3 (CH₂^{Phe}), 24.7 (CH^{Leu}), 22.7 (CH₃^{Leu}), 22.0 (CH₃^{Leu}).

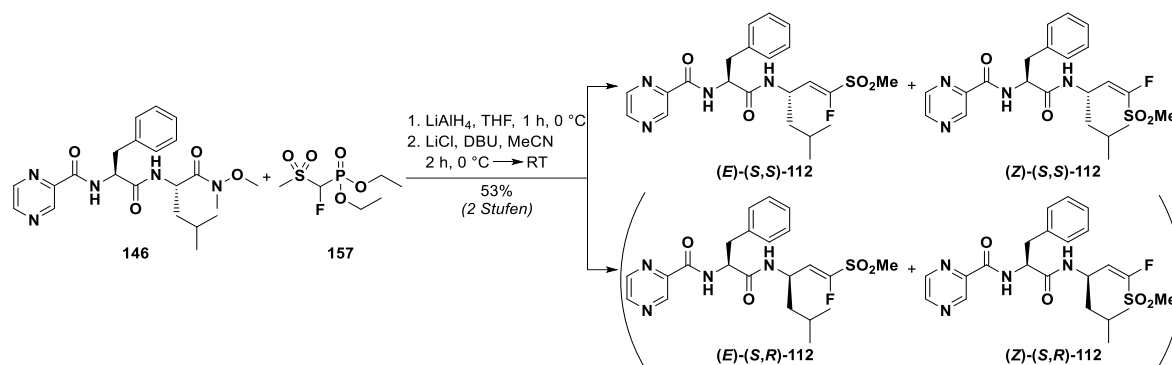
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3306, 2958, 2365, 1658, 1521, 1467, 1307, 1287, 1133, 1020, 967, 832, 751, 701, 667.

ESI-MS (pos.): m/z = 445.1 (100%, [M+H]⁺) und 467.1 (10%, [M+Na]⁺); m/z ber. für [C₂₂H₂₈N₄O₄S+H]⁺ ([M+H]⁺): 445.2.

HPLC-Analyse (C₁₈): t_R = 3.06 min, Peakfläche: 99.44% (Acetonitril/MilliQ®-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 35:65 über 10 min, Flussrate: 0.7 mL · min⁻¹, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 µL, Säulenofentemperatur: 40 °C).

¹ Eine exakte Zuordnung C-Atome ist aufgrund der eng beieinander liegenden Signale nicht möglich.

(*S,E/Z*)-1-Fluor-5-Methyl-3-((*N*-pyrazinoyl-*L*-phenylalanyl)amino)-1-(methylsulfo-nyl)hex-1-en (112)



Teil 1: Reduktion des Weinreb-Amids zum entsprechenden Aldehyd. Die Synthese wurde in Anlehnung an eine allgemeine Vorschrift von Fehrentz *et al.* durchgeführt.^[374] Unter Argonatmosphäre wurde LiAlH₄ (89 mg, 2.34 mmol, 2.00 Äquiv.) bei 0 °C portionsweise zu einer Lösung des Weinreb-Amids **146** (500 mg, 1.17 mmol, 1.00 Äquiv.) in absolutem THF (20 mL) gegeben und 1 h bei 0 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde durch Zugabe einer Citronensäurelösung (10%, aq., 20 mL) gequenchet und mit EtOAc (3 × 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit einer NaHCO₃-Lösung (ges., aq., 2 × 50 mL), mit einer NaCl-Lösung (1 × 100 mL) gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Der in Form eines orangenen Öls erhaltene Peptidylaldehyd wurde ohne weitere Reinigung und vollständige Charakterisierung unmittelbar im nächsten Syntheseschritt eingesetzt.

R_f: 0.41 (SiO₂, ^oHex/EtOAc 1:2).

ESI-MS (pos.): *m/z* = 369.1 (100%, [M+H]⁺); *m/z* ber. für [C₂₀H₂₄N₄O₃+H]⁺ ([M+H]⁺): 369.2.

Teil 2: HWE-Reaktion. Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an eine allgemeine Vorschrift von Blanchette *et al.*^[369] In einem ausgeheizten 50 mL-Schlenk-Kolben wurde unter Argonatmosphäre wasserfreies LiCl¹ (30 mg, 0.71 mmol, 1.20 Äquiv.) in absolutem MeCN (10 mL) vorgelegt und bei 0 °C das Phosphonat **157** (146 mg, 0.59 mmol, 1.00 Äquiv.) sowie DBU (88 µL, 0.59 mmol, 1.00 Äquiv.) zugegeben. Nach 20 min wurde eine Lösung des Peptidylaldehyds (**Teil 1**, 217 mg, 0.59 mmol, 1.00 Äquiv.) in absolutem MeCN (5 mL) tropfenweise bei 0 °C zugegeben und 1 h bei 0 °C sowie 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde anschließend mit einer Citronensäurelösung (10%, aq., 10 mL) versetzt und mit EtOAc (3 × 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel

¹Zuvor über Nacht bei 150 °C im Trockenschrank getrocknet und direkt verwendet.

(CHCl₃/MeOH 80:1) wurden die HWE-Produkte als gelbliches Öl ($\Sigma = 144$ mg, 0.31 mmol, 53% über 2 Stufen) erhalten, welches als *E/Z*-Isomerengemisch zweier Diastereomerenpaare vorlag. Mittels semi-präparativer HPLC (C₁₈, Acetonitril/MilliQ[®]-Wasser 30:70 (isokratisch) über 90 min, Flussrate: 12.0 mL · min⁻¹, Detektion: 254 nm) konnten die Diastereomere voneinander getrennt werden, sodass die Titelverbindung **112** als farbloser amorpher Feststoff erhalten wurde. Das Produkt lag als Gemisch zweier *E/Z*-Isomere (*E/Z* = 2:1)¹ vor, die sich in einigen Signalen in den ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren unterscheiden ließen.

R_f: 0.24 und 0.28 (SiO₂, CHCl₃/MeOH 50:1).

Smb.: – (amorph).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: –11.0° (c = 1.00, CHCl₃).

¹H-NMR, COSY (400 MHz, CDCl₃): (*E*)-Isomer: δ /ppm = 9.35 (d, ⁴*J* = 1.5 Hz, 1H, *H*-3^{Pyz}), 8.77 (d, ³*J* = 2.5 Hz, 1H, *H*-6^{Pyz}), 8.55 (dd, ³*J* = 2.5 Hz, ⁴*J* = 1.5 Hz, 1H, *H*-5^{Pyz}), 8.33 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, PyzNH^{Phe}), 7.37–7.21 (m, 5H, *H*_{Ar}^{Phe}), 5.89 (dd, ³*J*_{H-2,F} = 32.4 Hz, *J* = 8.8 Hz, 1H, *H*-2), 5.86 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, NH^{Leu}), 4.82–4.70 (m, 2H, α -CH^{Phe} und α -CH^{Leu}), 3.31–3.04 (m, 2H, CH₂^{Phe}), 2.99 (s, 3H, SO₂CH₃), 1.40–1.20 (m, 3H, CH^{Leu} und CH₂^{Leu}), 0.90–0.80 (m, 6H, CH₃^{Leu}).

(*Z*)-Isomer: δ /ppm = 9.36 (d, ⁴*J* = 1.5 Hz, 1H, *H*-3^{Pyz}), 8.78 (d, ³*J* = 2.5 Hz, 1H, *H*-6^{Pyz}), 8.55 (dd, ³*J* = 2.5 Hz, ⁴*J* = 1.5 Hz, 1H, *H*-5^{Pyz}), 8.35 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, PyzNH^{Phe}), 7.37–7.21 (m, 5H, *H*_{Ar}^{Phe}), 5.73 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H, NH^{Leu}), 5.30 (dd, ³*J*_{H-2,F} = 20.1 Hz, *J* = 10.4 Hz, 1H, *H*-2), 5.25–5.11 (m, 1H, α -CH^{Leu}), 4.82–4.70 (m, 1H, α -CH^{Phe}), 3.31–3.04 (m, 2H, CH₂^{Phe}), 3.25 (s, 3H, SO₂CH₃), 1.55–1.38 (m, 1H, CH^{Leu}), 1.40–1.20 (m, 2H, CH₂^{Leu}), 0.90–0.80 (m, 6H, CH₃^{Leu}).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (100.6 MHz, CDCl₃):² (*E*)-Isomer: δ /ppm = 169.9 (CO^{Phe}NH), 163.3 (PyzCONH), 147.9 (C-6^{Pyz}), 144.49 (C-3^{Pyz}), 143.9 (C-2^{Pyz}), 143.0 (C-5^{Pyz}), 136.4 (C-1_{Ar}^{Phe}), 129.4 (C-2_{Ar}^{Phe} und C-6_{Ar}^{Phe}), 129.1 (C-3_{Ar}^{Phe} und C-5_{Ar}^{Phe}), 127.4 (C-4_{Ar}^{Phe}), 118.2 (d, ²*J*_{CF} = 4.1 Hz, C-2), 55.0 (α -CH^{Phe}), 43.7 (d, ³*J*_{CF} = 1.9 Hz, α -CH^{Leu}), 43.0 (CH₂^{Leu}), 40.5 (SO₂CH₃), 38.5 (CH₂^{Phe}), 24.6 (CH^{Leu}), 22.5 (CH₃^{Leu}), 22.3 (CH₃^{Leu}).

(*Z*)-Isomer: δ /ppm = 169.9 (CO^{Phe}NH), 163.3 (PyzCONH), 147.9 (C-6^{Pyz}), 144.46 (C-3^{Pyz}), 143.9 (C-2^{Pyz}), 143.0 (C-5^{Pyz}), 136.4 (C-1_{Ar}^{Phe}), 129.5 (C-2_{Ar}^{Phe} und C-6_{Ar}^{Phe}), 129.0 (C-3_{Ar}^{Phe} und C-5_{Ar}^{Phe}), 127.5 (C-4_{Ar}^{Phe}), 120.6 (d, ²*J*_{CF} = 4.1 Hz, C-2)³, 54.9 (α -CH^{Phe}), 43.8 (α -CH^{Leu})², 43.0 (CH₂^{Leu}), 41.6 (SO₂CH₃), 38.6 (CH₂^{Phe}), 24.7 (CH^{Leu}), 22.5 (CH₃^{Leu}), 22.3 (CH₃^{Leu}).

¹⁹F-NMR (376 MHz, CDCl₃): δ /ppm = –116.86 (dd, ³*J*_{F,H-2} = 20.5 Hz, *J* = 2.0 Hz, C-1F, (*Z*)-Isomer), –126.10 (d, ³*J*_{F,H-2} = 32.4 Hz, C-1F, (*E*)-Isomer).

¹Mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt.

²C-1 konnte in diesen Experimenten aufgrund der geringen Signalintensität (CF-Kopplung) nicht bestimmt werden.

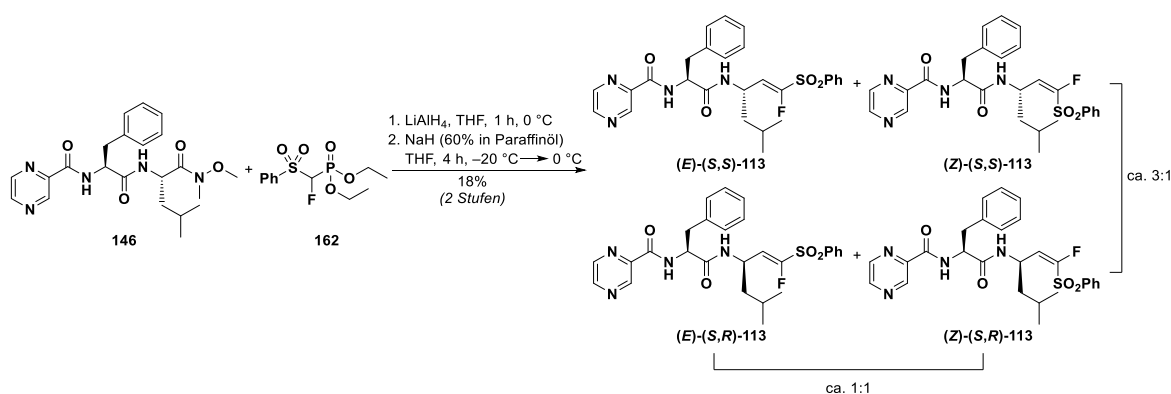
³Indirekt mittels ¹H-¹³C-HSQC aufgrund der zu geringen Signalintensität bestimmt.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3305, 2958, 2917, 1656, 1520, 1466, 1329, 1163, 1138, 1020, 910, 775, 731.

ESI-MS (pos.): m/z = 463.2 (100%, [M+H]⁺); m/z ber. für [C₂₂H₂₇FN₄O₄S+H]⁺ ([M+H]⁺): 463.2.

HPLC-Analyse (C₁₈): t_R = 2.96 min, Peakfläche: 99.75% (Acetonitril/MilliQ®-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 55:45 über 10 min, Flussrate: 0.7 mL · min⁻¹, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 µL, Säulenofentemperatur: 40 °C).

(*RS,E/Z*)-1-Fluor-5-Methyl-3-((*N*-pyrazinoyl-DL-phenylalanyl)amino)-1-(phenylsulfonyl)hex-1-en (113)



Teil 1: Reduktion des Weinreb-Amids zum entsprechenden Aldehyd. Die Synthese wurde in Anlehnung an eine allgemeine Vorschrift von Fehrentz *et al.* durchgeführt.^[374] Unter Argonatmosphäre wurde LiAlH_4 (89 mg, 2.34 mmol, 2.00 Äquiv.) bei 0 °C portionsweise zu einer Lösung des Weinreb-Amids **146** (500 mg, 1.17 mmol, 1.00 Äquiv.) in absolutem THF (20 mL) gegeben und 1 h bei 0 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde durch Zugabe einer Citronensäurelösung (10%, aq., 20 mL) gequencht und mit EtOAc (3 × 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit einer NaHCO_3 -Lösung (ges., aq., 2 × 50 mL), mit einer NaCl -Lösung (1 × 100 mL) gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Der in Form eines orangenen Öls erhaltene Peptidylaldehyd wurde ohne weitere Reinigung und vollständige Charakterisierung unmittelbar im nächsten Syntheseschritt eingesetzt.

R_f: 0.41 (SiO_2 , Hex/EtOAc 1:2).

ESI-MS (pos.): m/z = 369.1 (100%, [M+H]⁺); m/z ber. für [C₂₀H₂₄N₄O₃+H]⁺ ([M+H]⁺): 369.2.

Teil 2: HWE-Reaktion.

Die Synthese wurde nach einer allgemeinen Vorschrift von Opekar *et al.* durchgeführt.^[372] In einem ausgeheizten 50 mL-Schlenk-Kolben wurde unter Argonatmosphäre zu einer Suspension von NaH (60% in Paraffinöl, 45 mg, 1.13 mmol, 1.20 Äquiv.) in absolutem THF (10 mL) bei -20 °C eine

Lösung des Phosphonats **162**¹ (349 mg, 1.12 mmol, 1.20 Äquiv.) in absolutem THF (5 mL) tropfenweise zugegeben. Anschließend wurde eine Lösung des Peptidylaldehyds (**Teil 1**, 401 mg, 0.94 mmol, 1.00 Äquiv.) in absolutem THF (10 mL) zugetropft und 2 h bei –20 °C sowie 2 h bei 0 °C gerührt. Es wurde durch Zugabe einer NH₄Cl-Lösung (ges., aq., 10 mL) gequenchet und mit EtOAc (3 × 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (CHCl₃/MeOH 200:1) wurde die Titelverbindung als farbloser amorpher Feststoff (88 mg, 0.17 mmol, 18%) erhalten. Das Produkt wurde als Gemisch zweier Diastereomere (**A/B** ≈ 3:1)² sowie jeweils als *E/Z*-Isomerengemisch (*E/Z* ≈ 1:1)² erhalten, welche sich nur in einigen Signalen in den ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren unterscheiden ließen.

R_f (Gemisch): 0.21 (SiO₂, CHCl₃/MeOH 50:1).

Smb.: – (amorph).

[α]_D²⁵: –17.0° (c = 0.50, CHCl₃).

¹H-NMR, COSY (400 MHz, CDCl₃):³ δ/ppm = 9.34–9.30 (m, 1H, *H*-3^{Pyz}), 8.79–8.73 (m, 1H, *H*-6^{Pyz}), 8.59–8.51 (m, 1H, *H*-5^{Pyz}), 8.48–8.30 (m, 1H, PyzNH^{Phe}), 8.17–8.07 (m, 1H, *H*_{Ar}), 7.99–7.83 (m, 1H, *H*_{Ar}), 7.76–7.48 (m, 3H, *H*_{Ar}), 7.38–7.07 (m, 5H, *H*_{Ar}^{Phe}), 6.11–5.97 (m, 1H, NH^{Leu}), 6.07 (dd, ³*J*_{H-2,F} = 32.1 Hz, *J* = 8.7 Hz, 1H, *H*-2, Diastereomer **B**, (*E*)-Isomer), 5.91 (dd, ³*J*_{H-2,F} = 31.9 Hz, *J* = 8.9 Hz, 1H, *H*-2, Diastereomer **A**, (*E*)-Isomer), 5.64 (dd, ³*J*_{H-2,F} = 21.0 Hz, *J* = 9.9 Hz, *H*-2, 1H, Diastereomer **B**, (*Z*)-Isomer), 5.58–5.39 (m, 1H, α-CH^{Leu}), 5.24 (dd, ³*J*_{H-2,F} = 21.0 Hz, *J* = 10.1 Hz, 1H, *H*-2, 1H, Diastereomer **A**, (*Z*)-Isomer), 4.85–4.65 (m, 1H, α-CH^{Phe}), 3.32–3.00 (m, 2H, CH₂^{Phe}), 1.56–1.15 (m, 3H, CH^{Leu} und CH₂^{Leu}), 0.95–0.73 (m, 6H, CH₃^{Leu}).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (100.6 MHz, CDCl₃):³ δ/ppm = 169.9, 169.8, 169.77, 163.1, 156.1, 154.0, 153.2, 151.1, 147.8, 144.4, 144.38, 144.35, 144.0, 143.97, 143.9, 143.0, 142.96, 142.9, 137.7, 137.1, 137.0, 136.4, 136.34, 136.30, 134.8, 134.7, 134.67, 129.64, 129.6, 129.53, 129.48, 129.44, 129.40, 129.37, 129.21, 129.16, 129.1, 129.0, 128.83, 128.75, 127.5, 127.33, 127.27, 121.3, 121.2, 120.9, 120.8, 118.0, 117.96, 117.83, 117.78, 55.06, 54.99, 54.9, 44.15, 44.10, 43.76, 43.71, 43.70, 43.61, 43.59, 43.22, 43.17, 38.9, 38.76, 38.74, 38.6, 24.8, 24.6, 23.09, 23.00, 22.5, 22.4, 22.3, 22.2, 21.9.

¹⁹F-NMR (376 MHz, CDCl₃): δ/ppm = –117.55 (d, ³*J*_{F,H-2} = 21.1 Hz, C-1F, Diastereomer **B**, (*Z*)-Isomer), –117.77 (d, ³*J*_{F,H-2} = 21.1 Hz, C-1F, Diastereomer **A**, (*Z*)-Isomer), –125.01 (d, ³*J*_{F,H-2} =

¹Diethyl(fluor(phenylsulfonyl)methyl)phosphonat (**162**) wurde von ██████████ (██████████) synthetisiert und zur Verfügung gestellt.

²Mittels ¹H-NMR- und ¹⁹F-NMR-Spektroskopie bestimmt.

³Aufgrund der Komplexität des Produktgemisches konnte keine vollständige Zuordnung der H- und C-Atome realisiert werden.

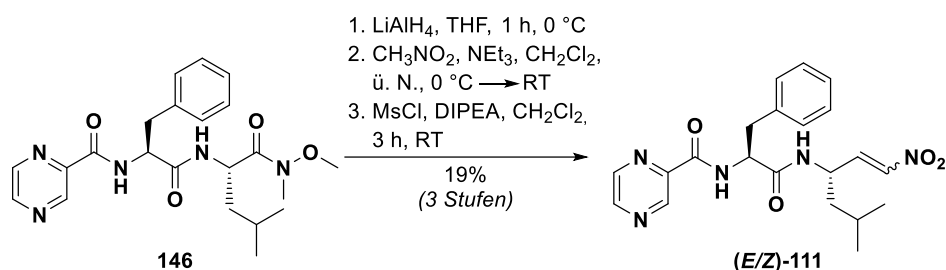
31.9 Hz, C-1F, Diastereomer **A**, (*E*)-Isomer), -125.19 (d, $^3J_{F,H-2} = 321$ Hz, C-1F, Diastereomer **B**, (*E*)-Isomer).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3293, 2958, 1656, 1517, 1447, 1383, 1332, 1165, 1097, 1019, 999, 737, 687.

ESI-MS (pos.): $m/z = 525.2$ (100%, [M+H]⁺); m/z ber. für [C₂₇H₂₉FN₄O₄S+H]⁺ ([M+H]⁺): 525.2.

HPLC-Analyse (C₁₈): $t_R = 1.53$ min und 1.62 min, Peakfläche: 98.43% (Acetonitril/MilliQ®-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 65:35 über 10 min, Flussrate: 0.7 mL · min⁻¹, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 µL, Säulenofentemperatur: 40 °C).

(*S,E/Z*)-5-Methyl-3-((*N*-pyrazinoyl-*L*-phenylalanyl)amino)-1-nitrohex-1-en (111)



Teil 1: Reduktion des Weinreb-Amids zum entsprechenden Aldehyd. Die Synthese wurde in Anlehnung an eine allgemeine Vorschrift von Fehrentz *et al.* durchgeführt.^[374] Unter Argonatmosphäre wurde LiAlH₄ (178 mg, 4.68 mmol, 2.00 Äquiv.) bei 0 °C portionsweise zu einer Lösung des Weinreb-Amids **146** (1.00 g, 2.34 mmol, 1.00 Äquiv.) in absolutem THF (40 mL) gegeben und 1 h bei 0 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde durch Zugabe einer Citronensäurelösung (10%, aq., 20 mL) gequencht und mit EtOAc (3 × 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit einer NaHCO₃-Lösung (ges., aq., 2 × 50 mL), mit einer NaCl-Lösung (1 × 100 mL) gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Der in Form eines orangenen Öls erhaltene Peptidylaldehyd wurde ohne weitere Reinigung und vollständige Charakterisierung unmittelbar im nächsten Syntheseschritt eingesetzt.

R_f: 0.41 (SiO₂, Hex/EtOAc 1:2).

ESI-MS (pos.): $m/z = 369.1$ (100%, [M+H]⁺); m/z ber. für [C₂₀H₂₄N₄O₃+H]⁺ ([M+H]⁺): 369.2.

Teil 2: Nitroaldol-Reaktion. Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an eine modifizierte Vorschrift von Latorre *et al.*^[347] Eine Lösung des Peptidylaldehyds (**Teil 1**, 718 mg, 1.95 mmol, 1.00 Äquiv.) in CH₂Cl₂ (5 mL) wurde bei 0 °C mit Nitromethan (626 µL, 11.70 mmol, 6.00 Äquiv.) sowie NEt₃ (81 µL, 0.59 mmol, 0.30 Äquiv.) versetzt und 1 h bei 0 °C sowie über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde anschließend mit einer NH₄Cl-Lösung (ges., aq., 10 mL) versetzt und mit CH₂Cl₂ (3 × 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit einer NaHCO₃-Lösung (1 × 50 mL) sowie mit einer NaCl-Lösung (ges., aq., 1 × 50 mL)

gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Das erhaltene Nitroaldolprodukt wurde ohne weitere Reinigung und Charakterisierung im nächsten Schritt eingesetzt.

Teil 3: Synthese des Nitroalkens. Zu einer Lösung des obigen Nitroaldols (**Teil 2**, 837 mg, 1.95 mmol, 1.00 Äquiv.) in absolutem CH₂Cl₂ (10 mL) wurden unter Argonatmosphäre DIPEA (1.3 mL, 7.80 mmol, 4.00 Äquiv.) und Methansulfonylchlorid (302 µL, 3.90 mmol, 2.00 Äquiv.) zugegeben und 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde durch Zugabe einer NH₄Cl-Lösung (ges., aq., 10 mL) gequenchet und mit CH₂Cl₂ (3 × 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden sukzessive mit einer HCl-Lösung (1 M, aq., 1 × 50 mL), mit einer NaHCO₃-Lösung (1 × 50 mL) sowie mit einer NaCl-Lösung (1 × 50 mL) gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und eingengt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (CHCl₃/MeOH 200:1) wurde die Titelverbindung als farbloses Öl (149 mg, 0.36 mmol, 19% über drei Stufen) erhalten. Das Produkt wurde als Gemisch zweier *E/Z*-Isomere (*E/Z* ≈ 1:1)¹ erhalten, welche sich in manchen Signalen in den ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren unterscheiden ließen.

R_f: 0.26 (SiO₂, CHCl₃/MeOH 50:1).

[α]_D²⁵: -18.0° (c = 1.00, CHCl₃).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 9.34 (s, 1H, *H*-3^{Pyz}), 8.78 (d, ³*J* = 2.5 Hz, 1H, *H*-6^{Pyz}), 8.60–8.51 (m, 1H, *H*-5^{Pyz}), 8.42–8.30 (m, 1H, PyzNH^{Phe}), 7.37–7.15 (m, 5H, H_{Ar}^{Phe}), 7.04–6.97 (m, 2H, *H*-1 und *H*-2, (*Z*)-Isomer), 6.85 (dd, ³*J*_(*E*) = 13.4 Hz, *J* = 6.3 Hz, 1H, *H*-2, (*E*)-Isomer), 6.69 (dd, ³*J*_(*E*) = 13.4 Hz, ⁴*J* = 1.3 Hz, 1H, *H*-1, (*E*)-Isomer), 6.16 und 6.07 (2 × d, *J* = 8.2 Hz, 2 × 1H, NH^{Leu}, (*E*)- und (*Z*)-Isomer), 4.88–4.73 (m, 1H, α-CH^{Phe}), 4.68–4.57 (m, 2H, α-CH^{Leu}), 3.31–3.08 (m, 2H, CH₂^{Phe}), 1.41–1.20 (m, 3H, CH^{Leu} und CH₂^{Leu}), 0.97–0.72 (m, 6H, CH₃^{Leu}).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, CDCl₃): (*E*)- und (*Z*)-Isomer: δ/ppm = 170.2 und 170.1 (CO^{Phe}NH), 163.6 und 163.3 (PyzCONH), 148.0 und 147.9 (C-6^{Pyz}), 144.5 und 144.4 (C-3^{Pyz}), 143.8 und 143.7 (C-2^{Pyz}), 143.01 und 142.98 (C-5^{Pyz}), 141.4 (C-2, (*Z*)-Isomer), 140.9 (C-2, (*E*)-Isomer), 140.1 (C-1, (*Z*)-Isomer), 140.0 (C-1, (*E*)-Isomer), 136.2 und 136.0 (C-1_{Ar}^{Phe}), 129.4 (C-2_{Ar}^{Phe} und C-6_{Ar}^{Phe}), 129.1 und 129.0 (C-3_{Ar}^{Phe} und C-5_{Ar}^{Phe}), 127.7 und 127.4 (C-4_{Ar}^{Phe}), 55.4 und 55.2 (α-CH^{Phe}), 46.3 und 46.1 (α-CH^{Leu}), 42.9 und 42.8 (CH₂^{Leu}), 38.5 und 38.1 (CH₂^{Phe}), 24.7 und 24.5 (CH^{Leu}), 22.7 und 22.5 (CH₃^{Leu}), 22.1 und 22.0 (CH₃^{Leu}).

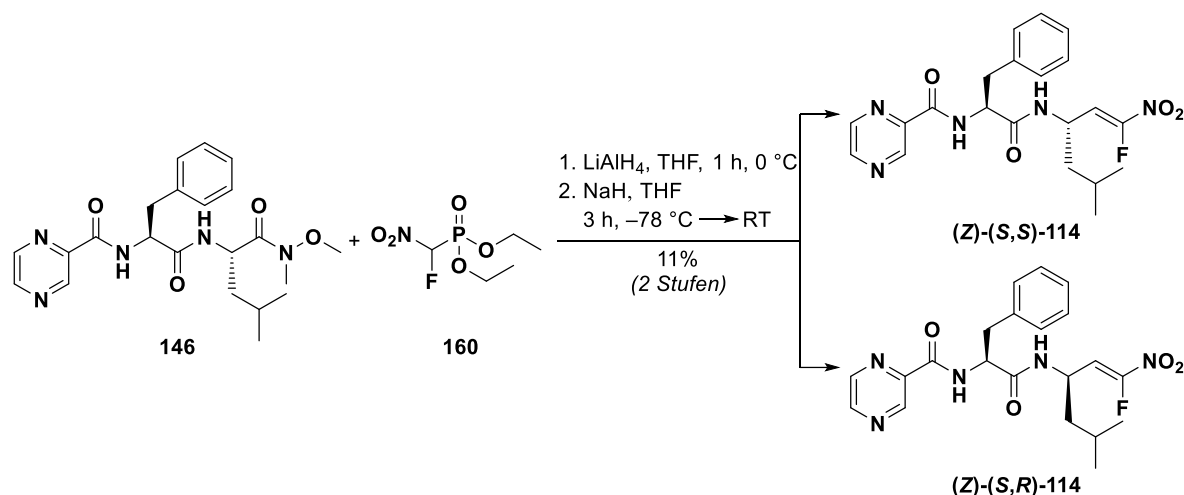
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3288, 2957, 1650, 1518, 1466, 1350, 1240, 1152, 1020, 748, 699.

ESI-MS (pos.): *m/z* = 412.2 (100%, [M+H]⁺) und 434.2 (14%, [M+Na]⁺); *m/z* ber. für [C₂₁H₂₅N₃O₄+H]⁺ ([M+H]⁺): 412.2.

¹Mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt.

HPLC-Analyse (C₁₈): $t_R = 2.92$ und 3.13 min, Peakfläche: 97.05% (Acetonitril/MilliQ®-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 35:65 über 8 min, Flussrate: $0.7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: $5 \mu\text{L}$, Säulenofentemperatur: $40 \text{ }^\circ\text{C}$).

(*S,Z*)-1-Fluor-5-methyl-3-((*N*-pyrazinoyl-*L*-phenylalanyl)amino)-1-nitrohex-1-en (114)



Teil 1: Reduktion des Weinreb-Amids zum entsprechenden Aldehyd. Die Synthese wurde in Anlehnung an eine allgemeine Vorschrift von Fehrentz *et al.* durchgeführt.^[374] Unter Argonatmosphäre wurde LiAlH_4 (178 mg, 4.68 mmol, 2.00 Äquiv.) bei $0 \text{ }^\circ\text{C}$ portionsweise zu einer Lösung des Weinreb-Amids **146** (1.00 g, 2.34 mmol, 1.00 Äquiv.) in absolutem THF (40 mL) gegeben und 1 h bei $0 \text{ }^\circ\text{C}$ gerührt. Die Reaktionsmischung wurde durch Zugabe einer Citronensäurelösung (10%, aq., 20 mL) gequenchet und mit EtOAc ($3 \times 50 \text{ mL}$) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit einer NaHCO_3 -Lösung (ges., aq., $2 \times 50 \text{ mL}$), mit einer NaCl -Lösung ($1 \times 100 \text{ mL}$) gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Der in Form eines orangenen Öls erhaltene Peptidylaldehyd wurde ohne weitere Reinigung und vollständige Charakterisierung unmittelbar im nächsten Syntheseschritt eingesetzt.

Teil 2: HWE-Reaktion. Die Synthese wurde nach einer allgemeinen Vorschrift von Opekar *et al.* durchgeführt.^[372] In einem ausgeheizten 50 mL-Schlenk-Kolben wurde unter Argonatmosphäre zu einer Suspension von NaH (60% in Paraffinöl, 90 mg, 2.25 mmol, 1.50 Äquiv.) in absolutem THF (7.5 mL) bei $-78 \text{ }^\circ\text{C}$ eine Lösung des Phosphonats **160** (484 mg, 2.25 mmol, 1.50 Äquiv.) in absolutem THF (2.5 mL) tropfenweise zugegeben. Anschließend wurde eine Lösung des Peptidylaldehyds (**Teil 1**, 553 mg, 1.50 mmol, 1.00 Äquiv.) in absolutem THF (7.5 mL) zugetropft und 1 h bei $-78 \text{ }^\circ\text{C}$, 1 h bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ sowie 1 h bei $0 \text{ }^\circ\text{C}$ gerührt. Es wurde durch Zugabe einer NH_4Cl -Lösung (ges., aq., 10 mL) gequenchet und mit EtOAc ($3 \times 50 \text{ mL}$) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit MgSO_4 getrocknet und das Lösemittel unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 80:1)

wurde die Titelverbindung als gelblicher Feststoff (70 mg, 0.16 mmol, 11%) erhalten. Das Produkt wurde als Gemisch zweier Diastereomere (**A/B** \approx 3:1)¹ erhalten, welche sich in einigen Signalen in den ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren unterscheiden ließen.

R_f: 0.33 (SiO₂, CHCl₃/MeOH 50:1).

Smb.: 122–124 °C (CHCl₃/MeOH).

[α]_D²⁵: –2.0° (c = 0.25, CHCl₃).

¹H-NMR, COSY (400 MHz, CDCl₃): Diastereomer A: δ /ppm = 9.32 (d, ⁴J = 1.5 Hz, 1H, H-3^{Pyz}), 8.78 (d, ³J = 2.4 Hz, 1H, H-6^{Pyz}), 8.56 (dd, ³J = 2.5 Hz, ⁴J = 1.5 Hz, 1H, H-5^{Pyz}), 8.43 (d, J = 8.2 Hz, 1H, PyzNH^{Phe}), 7.32–7.18 (m, 5H, H_{Ar}^{Phe}), 6.13 (d, J = 8.1 Hz, 1H, NH^{Leu}), 6.00 (dd, ³J_{H-2,F} = 24.1 Hz, J = 9.4 Hz, 1H, H-2), 4.88–4.76 (m, 1H, α -CH^{Phe}), 4.75–4.60 (m, 1H, α -CH^{Leu}), 3.28–3.04 (m, 2H, CH₂^{Phe}), 1.58–1.20 (m, 3H, CH^{Leu} und CH₂^{Leu}), 0.83 (d, J = 6.3 Hz, 6H, CH₃^{Leu}).

Diastereomer B: δ /ppm = 9.31 (d, ⁴J = 1.5 Hz, 1H, H-3^{Pyz}), 8.77 (d, ³J = 2.5 Hz, 1H, H-6^{Pyz}), 8.55 (dd, ³J = 2.5 Hz, ⁴J = 1.5 Hz, 1H, H-5^{Pyz}), 8.38 (d, J = 7.8 Hz, 1H, PyzNH^{Phe}), 7.32–7.18 (m, 5H, H_{Ar}^{Phe}), 6.25 (d, J = 7.0 Hz, 1H, NH^{Leu}), 6.24 (dd, ³J_{H-2,F} = 24.0 Hz, J = 9.1 Hz, 1H, H-2), 4.88–4.76 (m, 1H, α -CH^{Phe}), 4.75–4.60 (m, 1H, α -CH^{Leu}), 3.28–3.04 (m, 2H, CH₂^{Phe}), 1.58–1.20 (m, 3H, CH^{Leu} und CH₂^{Leu}), 0.86 (d, J = 6.5 Hz, 6H, CH₃^{Leu}).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (100.6 MHz, CDCl₃): Diastereomer A: δ /ppm = 170.1 (CO^{Phe}NH), 163.2 (PyzCONH), 153.3 (d, ¹J_{CF} = 289.1 Hz, C-1), 147.9 (C-6^{Pyz}), 144.3 (C-3^{Pyz}), 143.9 (C-2^{Pyz}), 143.03 (C-5^{Pyz}), 136.3 (C-1_{Ar}^{Phe}), 129.42 (C-2_{Ar}^{Phe} und C-6_{Ar}^{Phe}), 128.9 (C-3_{Ar}^{Phe} und C-5_{Ar}^{Phe}), 127.5 (C-4_{Ar}^{Phe}), 110.8 (d, ²J_{CF} = 11.2 Hz, C-2), 55.0 (α -CH^{Phe}), 43.5 (α -CH^{Leu}), 42.0 (CH₂^{Leu}), 38.8 (CH₂^{Phe}), 24.8 (CH^{Leu}), 22.33 (CH₃^{Leu}), 22.29 (CH₃^{Leu}).

Diastereomer B: δ /ppm = 170.2 (CO^{Phe}NH), 163.3 (PyzCONH), 153.3 (d, ¹J_{CF} = 289.1 Hz, C-1), 147.9 (C-6^{Pyz}), 144.4 (C-3^{Pyz}), 143.8 (C-2^{Pyz}), 143.00 (C-5^{Pyz}), 136.3 (C-1_{Ar}^{Phe}), 129.37 (C-2_{Ar}^{Phe} und C-6_{Ar}^{Phe}), 129.0 (C-3_{Ar}^{Phe} und C-5_{Ar}^{Phe}), 127.4 (C-4_{Ar}^{Phe}), 111.1 (d, ²J_{CF} = 10.9 Hz, C-2), 54.9 (α -CH^{Phe}), 43.7 (α -CH^{Leu}), 42.68 (CH₂^{Leu}), 38.6 (CH₂^{Phe}), 24.6 (CH^{Leu}), 22.5 (CH₃^{Leu}), 22.27 (CH₃^{Leu}).

¹⁹F-NMR (376 MHz, CDCl₃): δ /ppm = –113.41 (d, ³J_{F,H-2} = 23.9 Hz, C-1F, Diastereomer A), –113.64 (d, ³J_{F,H-2} = 24.1 Hz, C-1F, Diastereomer B).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3356, 2963, 1667, 1650, 1549, 1506, 1480, 1344, 1293, 1148, 1024, 872, 748, 738, 697.

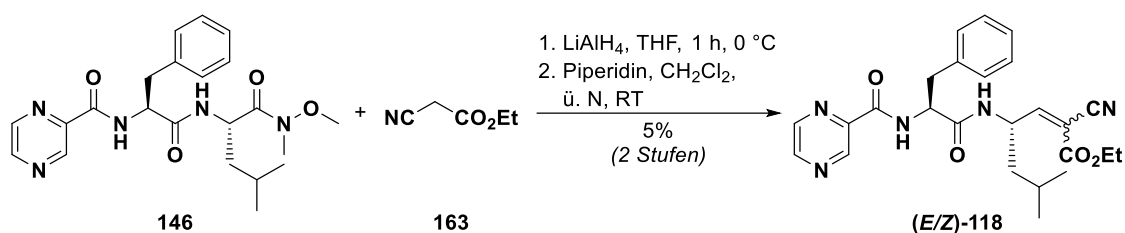
ESI-MS (pos.): m/z = 430.2 (100%, [M+H]⁺); m/z ber. für [C₂₁H₂₄FN₅O₄+H]⁺ ([M+H]⁺): 430.2.

¹Mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt.

HPLC-Analyse (C₁₈): $t_R = 2.62$ min, Peakfläche: 96.50% (Acetonitril/MilliQ[®]-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 55:45 über 10 min, Flussrate: 0.7 mL · min⁻¹, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 µL, Säulenofentemperatur: 40 °C).

10.9.3 Synthese des dualen Michael-Akzeptors

(*S,E/Z*)-2-Cyano-6-methyl-4-((*N*-pyrazinoyl-*L*-phenylalanyl)amino)hept-2-ensäure-methylester (118)



Teil 1: Reduktion des Weinreb-Amids zum entsprechenden Aldehyd. Die Synthese wurde in Anlehnung an eine allgemeine Vorschrift von Fehrentz *et al.* durchgeführt.^[374] Unter Argonatmosphäre wurde LiAlH₄ (178 mg, 4.68 mmol, 2.00 Äquiv.) bei 0 °C portionsweise zu einer Lösung des Weinreb-Amids **146** (1.00 g, 2.34 mmol, 1.00 Äquiv.) in absolutem THF (40 mL) gegeben und 1 h bei 0 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde durch Zugabe einer Citronensäurelösung (10%, aq., 20 mL) gequenchet und mit EtOAc (3 × 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit einer NaHCO₃-Lösung (ges., aq., 2 × 50 mL), mit einer NaCl-Lösung (1 × 100 mL) gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Der in Form eines orangenen Öls erhaltene Peptidylaldehyd wurde ohne weitere Reinigung und vollständige Charakterisierung unmittelbar im nächsten Syntheseschritt eingesetzt.

R_f: 0.41 (SiO₂, °Hex/EtOAc 1:2).

ESI-MS (pos.): $m/z = 369.2$ (100%, [M+H]⁺); m/z ber. für [C₂₀H₂₄N₄O₃+H]⁺ ([M+H]⁺): 369.2.

Teil 2: Knoevenagel-Reaktion. Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an eine allgemeine Vorschrift von Ma *et al.*^[348] Zu einer Lösung des Peptidaldehyds (**Teil 1**; 255 mg, 0.69 mmol, 1.00 Äquiv.) in CH₂Cl₂ (20 mL) wurden Cyanessigsäureethylester (88 µL, 0.83 mmol, 1.20 Äquiv.) sowie Piperidin (13 µL, 0.13 mmol, 0.2 Äquiv.) gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit CH₂Cl₂ (20 mL) verdünnt und sukzessive mit Wasser (1 × 20 mL), einer Citronensäurelösung (10%, aq., 1 × 20 mL), einer NaHCO₃-Lösung (ges., aq., 1 × 20 mL) sowie einer NaCl-Lösung (ges., aq., 1 × 20 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (CHCl₃/MeOH 80:1) wurde die Titelverbindung **118** als gelblicher Feststoff (15 mg, 0.03 mmol, 5% über 2 Stufen) erhalten.

R_f: 0.46 und 0.51 (SiO₂, CHCl₃/MeOH 20:1).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 9.32–9.25 (m, 1H, H-3^{Pyz}), 8.79–8.70 (m, 1H, H-6^{Pyz}), 8.58–8.49 (m, 1H, H-5^{Pyz}), 8.47–8.33 (m, 1H, PyzNH^{Phe}), 7.42–7.07 (m, 6H, H_{Ar}^{Phe} und H-2), 6.47–6.32 (m, 1H, NH^{Leu}), 5.00–4.69 (m, 2H, α-CH^{Phe} und α-CH^{Leu}), 4.39–4.20 (m, 2H, CH₂CH₃), 3.37–3.03 (m, 2H, CH₂^{Phe}), 1.49–1.22 (m, 6H, CH^{Leu}, CH₂^{Leu} und CH₂CH₃), 0.99–0.83 (m, 6H, CH₃^{Leu}).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, CDCl₃):¹ δ/ppm = 170.7 (CO^{Phe}NH), 163.3 (PyzCONH), 147.9 (C-6^{Pyz}), 144.4 (C-3^{Pyz}), 143.9 (C-5^{Pyz}), 143.0 (C-2^{Pyz}), 138.0 (C-1_{Ar}^{Phe}), 129.4 (C-2_{Ar}^{Phe} und C-6_{Ar}^{Phe}), 128.0 (C-3_{Ar}^{Phe} und C-5_{Ar}^{Phe}), 126.5 (C-4_{Ar}^{Phe}), 123.4 (C-2), 64.0 (CH₂CH₃), 55.0 (α-CH^{Phe}), 49.0 (α-CH^{Leu}), 42.1 (CH₂^{Leu}), 38.7 (CH₂^{Phe}), 24.5 (CH^{Leu}), 22.3 (CH₃^{Leu}), 14.0 (CH₂CH₃).

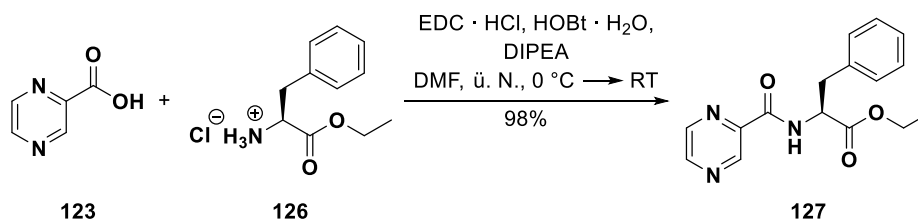
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3306, 2958, 2365, 1658, 1521, 1467, 1307, 1287, 1133, 1020, 967, 832, 751, 701, 667.

ESI-MS (pos.): m/z = 464.0 (100%, [M+H]⁺); m/z ber. für [C₂₅H₂₉N₅O₄S+H]⁺ ([M+H]⁺): 464.2.

HPLC-Analyse (C₁₈): t_R = 5.91 min, Peakfläche: 96.24% (Acetonitril/MilliQ[®]-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 10:90 → 90:10 über 10 min, Flussrate: 0.7 mL · min⁻¹, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 μL, Säulenofentemperatur: 40 °C).

10.9.4 Synthese der β-Ketoderivate

(Pyrazin-2-carbonyl)-L-phenylalaninethylester (127)



Die Synthese erfolgte in Anlehnung an eine Vorschrift von Milo *et al.*^[359] Unter Argonatmosphäre wurde eine Lösung von Pyrazin-2-carbonsäure (4.00 g, 32.23 mmol, 1.00 Äquiv.) in absolutem DMF (100 mL) bei 0 °C mit HOBT · H₂O (6.33 g, 41.90 mmol, 1.30 Äquiv.), EDC · HCl (8.03 g, 41.90 mmol, 1.30 Äquiv.) sowie DIPEA (11.0 mL, 64.46 mmol, 2.00 Äquiv.) versetzt und 30 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde L-Phenylalaninethylester-Hydrochlorid (9.62 g, 41.90 mmol, 1.30 Äquiv.) hinzugegeben, weitere 2 h bei 0 °C sowie über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand mit EtOAc (100 mL) sowie einer HCl-Lösung (1 M, aq., 100 mL) versetzt. Es wurde mit EtOAc (3 × 100 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Extrakte sukzessive mit einer NaCl-Lösung (ges., aq., 100 mL), mit einer NaHCO₃-Lösung (ges., aq., 100 mL) und erneut mit einer NaCl-Lösung (ges.,

¹Aufgrund der geringen Signalintensität können nicht alle C-Atome exakt zugeordnet werden.

aq., 1 × 100 mL) gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (cHex/EtOAc 2:1) wurde die Titelverbindung **127** in Form farbloser Nadeln (9.44 g, 31.54 mmol, 98%; Lit.:^[467] 65%) erhalten.

R_f: 0.41 (SiO₂, cHex/EtOAc 1:1).

Smb.: 75.0–76.5 °C (cHex/EtOAc).

[α]_D²⁴: +16.0° (c = 1.0, THF).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 9.36 (d, ⁴J = 1.5 Hz, 1H, H-3^{Pyz}), 8.73 (d, ³J = 2.5 Hz, 1H, H-6^{Pyz}), 8.51 (dd, ³J = 2.5, ⁴J = 1.5 Hz, 1H, H-5^{Pyz}), 8.23 (d, J = 8.3 Hz, 1H, NH), 7.32–7.11 (m, 5H, H_{Ar}^{Phe}), 5.05 (dt, J = 8.3, 6.1 Hz, 1H, α-CH^{Phe}), 4.19 (q, ³J = 7.1 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 3.33–3.14 (m, 2H, CH₂^{Phe}), 1.23 (t, ³J = 7.1 Hz, 3H, OCH₂CH₃).

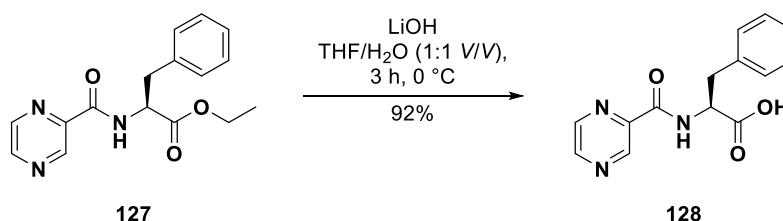
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 171.2 (CO₂Et), 162.7 (PyzCONH), 147.5 (C-6^{Pyz}), 144.4 (C-3^{Pyz}), 144.1 (C-2^{Pyz}), 142.8 (C-5^{Pyz}), 135.9 (C-1_{Ar}^{Phe}), 129.4 (C-2_{Ar}^{Phe} und C-6_{Ar}^{Phe}), 128.7 (C-3_{Ar}^{Phe} und C-5_{Ar}^{Phe}), 127.2 (C-4_{Ar}^{Phe}), 61.7 (OCH₂CH₃), 53.4 (α-CH^{Phe}), 38.3 (CH₂^{Phe}), 14.2 (OCH₂CH₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3337, 1723, 1662, 1524, 1472, 1451, 1341, 1280, 1234, 1188, 1153, 1035, 1021, 863, 754, 701, 686.

ESI-MS (pos.): m/z = 300.2 (100%, [M+H]⁺) und 322.2 (19%, [M+Na]⁺); m/z ber. für [C₁₆H₁₇N₃O₃+H]⁺ ([M+H]⁺): 300.1.

Die analytischen Daten stimmen mit denen aus der Literatur überein.^[467]

(Pyrazin-2-carbonyl)-L-phenylalanin (**128**)



Die Synthese wurde nach einer Vorschrift von Milo *et al.* durchgeführt.^[359] Eine Lösung des (Pyrazin-2-carbonyl)-L-phenylalaninethylesters (**127**, 9.40 g, 31.39 mmol, 1.00 Äquiv.) in THF/H₂O (60 mL, 1:1 V/V) wurde bei 0 °C mit LiOH (1.50 g, 62.78 mmol, 2.00 Äquiv.) versetzt und 3 h bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung mit einer HCl-Lösung (halbkonz., aq.) auf pH 1 eingestellt, das entstandene Präzipitat abgesaugt, mit wenig Wasser gewaschen und im

Feinvakuum getrocknet. Die Titelverbindung wurde in Form farbloser Nadeln (7.87 g, 29.01 mmol, 92%) erhalten.

R_f: 0.28 (SiO₂, ^cHex/EtOAc 1:3 + 1% TFA).

Smb.: 166.5–168.0 °C (THF/H₂O); Lit.:^[468] 166–169 °C (Aceton/H₂O).

[α]_D²⁴: +11.0° (c = 1.0, MeOH); Lit.:^[469] **[α]_D²⁰**: +13.5° (c = 1.0, MeOH).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ/ppm = 13.03 (s, 1H, CO₂H), 9.14 (d, ⁴J = 1.5 Hz, 1H, H-3^{Pyz}), 8.88 (d, ³J = 2.5 Hz, 1H, H-6^{Pyz}), 8.84 (d, J = 8.3 Hz, 1H, NH), 8.73 (dd, ³J = 2.5, ⁴J = 1.5 Hz, 1H, H-5^{Pyz}), 7.32–7.13 (m, 5H, H_{Ar}^{Phe}), 5.75 (dt, J = 8.0, 5.6 Hz, 1H, α-CH^{Phe}), 3.27–3.13 (m, 2H, CH₂^{Phe}).

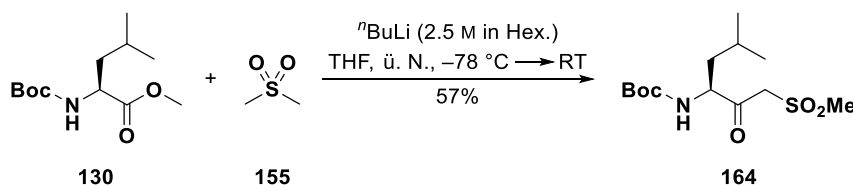
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ/ppm = 172.4 (CO₂H), 162.6 (PyzCONH), 147.8 (C-6^{Pyz}), 144.1 (C-2^{Pyz}), 143.4 (C-3^{Pyz} und C-5^{Pyz}), 137.5 (C-1_{Ar}^{Phe}), 129.1 (C-2_{Ar}^{Phe} und C-6_{Ar}^{Phe}), 128.2 (C-3_{Ar}^{Phe} und C-5_{Ar}^{Phe}), 126.5 (C-4_{Ar}^{Phe}), 53.4 (α-CH^{Phe}), 36.1 (CH₂^{Phe}).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3386, 1713, 1683, 1515, 1394, 1357, 1280, 1174, 1147, 1054, 1022, 873, 763, 705, 677.

ESI-MS (pos.): *m/z* = 272.1 (100%, [M+H]⁺), 226.2 (56%, [M-CO₂+H]⁺) und 294.1 (36%, [M+Na]⁺); *m/z* ber. für [C₁₄H₁₃N₃O₃+H]⁺ ([M+H]⁺): 272.1.

Die analytischen Daten stimmen mit denen aus der Literatur überein.^[469-470]

N-Boc-(*S*)-(3-amino-5-methyl-2-oxohexyl)sulfonylmethan (164)



Die Synthese wurde in Anlehnung an eine modifizierte Vorschrift von Benedetti *et al.* durchgeführt.^[376] In einem ausgeheizten 100 mL-Schlenk-Kolben wurde unter Argonatmosphäre zu einer Suspension von Dimethylsulfon (3.07 g, 32.6 mmol, 4.00 Äquiv.) in absolutem THF (40 mL) eine Lösung von ⁿBuLi (2.5 M in Hexan, 13.0 mL, 32.6 mmol, 4.00 Äquiv.) bei –15 °C tropfenweise zugegeben. Es wurde 1 h bei dieser Temperatur gerührt und die resultierende Lösung anschließend mittels Transferkanüle unter Argonatmosphäre zu einer Lösung von *N*-(Boc)-L-leucin-methylester (130, 2.00 g, 8.15 mmol, 1.00 Äquiv.) in absolutem THF (10 mL; in einem weiteren 100 mL-Schlenk-Kolben vorgelegt) bei –78 °C zugetropft. Es wurde über Nacht langsam auf Raumtemperatur erwärmt und die Reaktion anschließend durch Zugabe einer NH₄Cl-Lösung (ges., aq., 50 mL) gequenchet. Die Reaktionsmischung wurde mit EtOAc (100 mL) verdünnt und die

organische Phase mit einer NaHCO₃-Lösung (1 × 50 mL) sowie einer NaCl-Lösung (ges., aq., 1 × 50 mL) gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Nach Kieselgelfiltration (^cHex/EtOAc 2:1) wurde die Titelverbindung als farbloser Feststoff (1.43 g, 4.65 mmol, 57%) erhalten.

R_f: 0.31 (SiO₂, ^cHex/EtOAc 2:1).

Smb.: 106–108 °C (^cHex/EtOAc).

[α]_D²⁵: –32.0° (c = 1.0, CHCl₃).

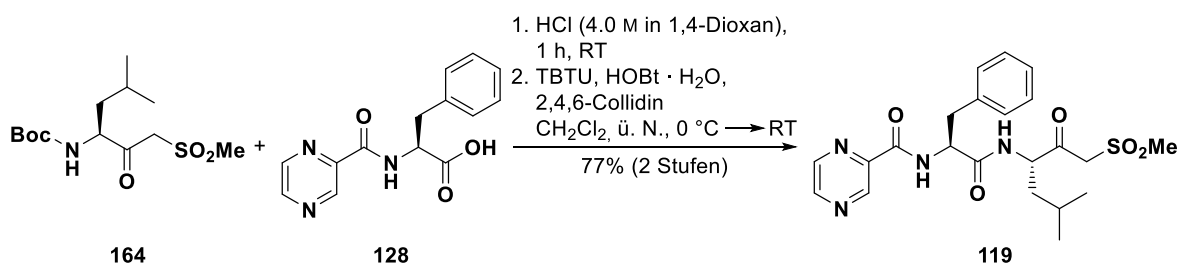
¹H-NMR, COSY (300 MHz, CDCl₃): δ /ppm = 5.04 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, NH), 4.32 (d, ²*J* = 15.1 Hz, 1H, CH_aH_bSO₂CH₃), 4.27–4.14 (m, 1H, α -CH^{Leu}), 4.08 (d, ²*J* = 15.1 Hz, 1H, CH_aH_bSO₂Me), 3.08 (s, 3H, SO₂CH₃), 1.80–1.56 (m, 2H, CH_aH_b^{Leu} und CH^{Leu}), 1.53–1.37 (m, 1H, CH_aH_b^{Leu}), 1.43 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.95 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, CH₃^{Leu}), 0.93 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, CH₃^{Leu}).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, CDCl₃): δ /ppm = 199.9 (C=O), 155.9 (CONH), 80.9 (C(CH₃)₃), 61.6 (CH₂SO₂CH₃), 59.4 (α -CH^{Leu}), 42.1 (SO₂CH₃), 38.7 (CH₂^{Leu}), 28.4 (C(CH₃)₃), 24.9 (CH^{Leu}), 23.2 (CH₃^{Leu}), 21.6 (CH₃^{Leu}).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3369, 2968, 1725, 1680, 1522, 1361, 1309, 1289, 1158, 1111, 1076, 1043, 910, 843, 718.

ESI-MS (pos.): *m/z* = 208.2 (100%, [M–Boc+H]⁺) und 128.3 (73%, [M–Boc–SO₂Me]⁺); *m/z* ber. für [C₁₃H₂₅NO₅S+H]⁺ ([M+H]⁺): 308.2.

N-(Pyrazinoyl-*L*-phenylalanyl)-(*S*)-(3-amino-5-methyl-2-oxohexyl)sulfonylmethan (119)



Teil 1. In einem 50 mL-Rundkolben wurde das Sulfon **164** (200 mg, 0.65 mmol, 1.00 Äquiv.) vorgelegt und bei Raumtemperatur mit einer HCl-Lösung (4.0 M in 1,4-Dioxan, 5 mL) versetzt. Es wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt und das Lösemittel anschließend unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Der Rückstand wurde im Feinvakuum getrocknet, sodass das Hydrochlorid als farbloser Feststoff (158 mg, 0.65 mmol, quant.) erhalten wurde, welcher ohne weitere Charakterisierung weiter umgesetzt wurde.

Teil 2. Zu einer Lösung von (Pyrazin-2-carbonyl)-*L*-phenylalanin (**128**) (176 mg, 0.65 mmol, 1.00 Äquiv.) in CH₂Cl₂ (10 mL) wurden bei 0 °C HOBT · H₂O (98 mg, 0.65 mmol, 1.00 Äquiv.),

TBTU (208 mg, 0.65 mmol, 1.00 Äquiv.) sowie 2,4,6-Collidin (172 μ L, 1.30 mmol, 2.00 Äquiv.) gegeben und 15 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde eine Lösung des Hydrochlorids aus **Teil A** (158 mg, 0.65 mmol, 1.00 Äquiv.) in CH_2Cl_2 (5 mL) tropfenweise zugegeben und 2 h bei 0 °C sowie über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit einer NaCl-Lösung (ges., aq., 50 mL) versetzt und mit EtOAc (3×50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden sukzessive mit einer NH_4Cl -Lösung (ges., aq., 2×50 mL), mit einer NaHCO_3 -Lösung (2×50 mL) sowie mit einer NaCl-Lösung (ges., aq., 1×50 mL) gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck destillativ entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 70:1) wurde die Titelverbindung als beiger Feststoff (229 mg, 0.50 mmol, 77% über zwei Stufen) erhalten.

R_f: 0.45 (SiO_2 , $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 25:1).

Smb.: 153–155 °C ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$).

$[\alpha]_D^{25}$: -32.0° ($c = 1.0$, CHCl_3).

$^1\text{H-NMR}$, COSY (300 MHz, CDCl_3): $\delta/\text{ppm} = 9.32$ (d, $^4J = 1.5$ Hz, 1H, $H\text{-}3^{\text{Pyz}}$), 8.76 (d, $^3J = 2.5$ Hz, 1H, $H\text{-}6^{\text{Pyz}}$), 8.53 (dd, $^3J = 2.5$ Hz, $^4J = 1.5$ Hz, 1H, $H\text{-}5^{\text{Pyz}}$), 8.29 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, $\text{PyzNH}^{\text{Phe}}$), 7.37–7.18 (m, 5H, $H_{\text{Ar}}^{\text{Phe}}$), 6.89 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, NH^{Leu}), 4.96–4.79 (m, 1H, $\alpha\text{-CH}^{\text{Phe}}$), 4.57–4.41 (m, 1H, $\alpha\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 4.26 (dd, $^2J = 14.4$, $^4J = 1.0$ Hz, 1H, $\text{CH}_3\text{H}_b\text{SO}_2\text{CH}_3$), 3.91 (d, $^2J = 14.4$ Hz, 1H, $\text{CH}_3\text{H}_a\text{SO}_2\text{CH}_3$), 3.24 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH_2^{Phe}), 3.01 (s, 3H, SO_2CH_3), 1.72–1.31 (m, 3H, CH_2^{Leu} und CH^{Leu}), 0.85 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, CH_3^{Leu}), 0.84 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, CH_3^{Leu}).

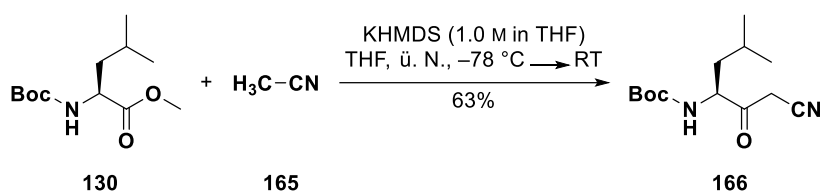
$^{13}\text{C-NMR}$, HSQC, HMBC (75.5 MHz, CDCl_3): $\delta/\text{ppm} = 198.9$ ($\text{C}=\text{O}$), 171.1 ($\text{CO}^{\text{Phe}}\text{NH}$), 163.8 (PyzCONH), 147.8 ($\text{C-}6^{\text{Pyz}}$), 144.5 ($\text{C-}3^{\text{Pyz}}$), 143.8 ($\text{C-}2^{\text{Pyz}}$), 142.9 ($\text{C-}5^{\text{Pyz}}$), 136.1 ($\text{C-}1_{\text{Ar}}^{\text{Phe}}$), 129.4 ($\text{C-}2_{\text{Ar}}^{\text{Phe}}$ und $\text{C-}6_{\text{Ar}}^{\text{Phe}}$), 129.1 ($\text{C-}3_{\text{Ar}}^{\text{Phe}}$ und $\text{C-}5_{\text{Ar}}^{\text{Phe}}$), 127.5 ($\text{C-}4_{\text{Ar}}^{\text{Phe}}$), 61.5 ($\text{CH}_2\text{SO}_2\text{CH}_3$), 58.2 ($\alpha\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 54.8 ($\alpha\text{-CH}^{\text{Phe}}$), 41.9 (SO_2CH_3), 38.8 (CH_2^{Leu}), 37.8 (CH_2^{Phe}), 24.8 (CH^{Leu}), 23.1 (CH_3^{Leu}), 21.5 (CH_3^{Leu}).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3350, 2960, 1731, 1661, 1645, 1511, 1297, 1128, 1021, 978, 869, 749, 698.

ESI-MS (pos.): $m/z = 461.2$ (100%, $[\text{M}+\text{H}]^+$); m/z ber. für $[\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}+\text{H}]^+$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 461.2.

HPLC-Analyse (C_{18}): $t_{\text{R}} = 4.08$ min, Peakfläche: 99.00% (Acetonitril/MilliQ®-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 35:65 über 25 min, Flussrate: $0.7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 μ L, Säulenofentemperatur: 40 °C).

N-Boc-(*S*)-(3-amino-5-methyl-2-oxohexyl)methylnitril (166)



Die Synthese wurde in Anlehnung an eine modifizierte Vorschrift von Yamaguchi-Sasaki *et al.* durchgeführt.^[377] In einem ausgeheizten 50 mL-Schlenk-Kolben wurde unter Argonatmosphäre zu einer Lösung von Acetonitril (644 μL , 12.2 mmol, 3.00 Äquiv.) in absolutem THF (10 mL) eine Lösung von KHMDS (1.0 M in Hexan, 12.2 mL, 12.2 mmol, 3.00 Äquiv.) bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ tropfenweise zugegeben. Es wurde 30 min bei dieser Temperatur gerührt und anschließend eine Lösung von *N*-(Boc)-*L*-Leucin-methylester (**130**, 1.00 g, 4.1 mmol, 1.00 Äquiv.) in absolutem THF (10 mL) zutropft. Es wurde 4 h bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, die Reaktion anschließend durch Zugabe einer NH_4Cl -Lösung (ges., aq., 15 mL) gequencht und die Reaktionsmischung mit EtOAc ($3 \times 100\text{ mL}$) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit einer NaCl -Lösung (ges., aq., $1 \times 100\text{ mL}$) gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Nach Kieselgelfiltration (${}^\circ\text{Hex}/\text{EtOAc}$ 6:1) wurde die Titelverbindung als gelblicher Feststoff (653 mg, 2.57 mmol, 63%) erhalten.

R_f: 0.41 (SiO_2 , ${}^\circ\text{Hex}/\text{EtOAc}$ 3:1).

Smb.: $73\text{--}75\text{ }^\circ\text{C}$ (${}^\circ\text{Hex}/\text{EtOAc}$).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: -42.0° ($c = 1.0$, CHCl_3).

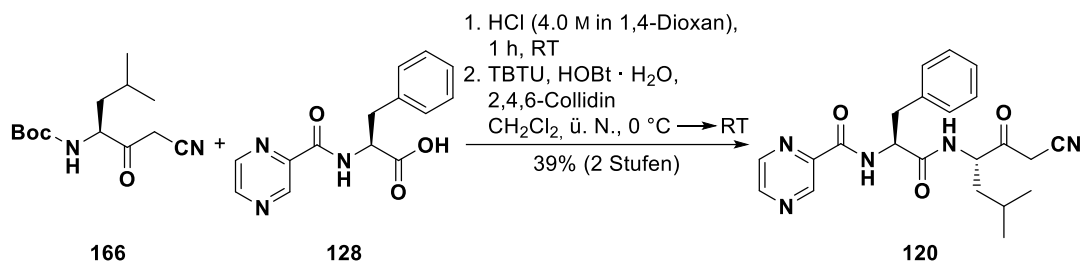
$^1\text{H-NMR}$, COSY (300 MHz, CDCl_3): $\delta/\text{ppm} = 4.96$ (d, $J = 7.1\text{ Hz}$, 1H, NH), 4.35–4.17 (m, 1H, $\alpha\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 3.64 (d, ${}^2J = 12.6\text{ Hz}$, 1H, CH_2CN), 1.82–1.38 (m, 3H, CH_2^{Leu} und CH^{Leu}), 1.43 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 0.95 (d, $J = 6.5\text{ Hz}$, 3H, CH_3^{Leu}), 0.94 (d, $J = 6.5\text{ Hz}$, 3H, CH_3^{Leu}).

$^{13}\text{C-NMR}$, HSQC, HMBC (75.5 MHz, CDCl_3): $\delta/\text{ppm} = 198.9$ ($\text{C}=\text{O}$), 155.8 (CONH), 113.7 (CN), 81.0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 57.9 ($\alpha\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 39.3 (CH_2^{Leu}), 29.6 (CH_2CN), 28.3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 24.9 (CH^{Leu}), 23.2 (CH_3^{Leu}), 21.5 (CH_3^{Leu}).

IR (ATR): $\tilde{\nu} [\text{cm}^{-1}] = 3346, 2960, 1693, 1511, 1470, 1392, 1367, 1318, 1253, 1163, 1045, 1025, 873, 784$.

ESI-MS (pos.): $m/z = 155.3$ (100%, $[\text{M}-\text{Boc}+\text{H}]^+$) und 277.2 (73%, $[\text{M}+\text{Na}]^+$); m/z ber. für $[\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3+\text{H}]^+$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 255.2.

N-(Pyrazinoyl-*L*-phenylalanyl)-(*S*)-(3-amino-5-methyl-2-oxohexyl)methynitril (**120**)



Teil 1. In einem 50 mL-Rundkolben wurde Nitril **166** (104 mg, 0.41 mmol, 1.00 Äquiv.) vorgelegt und bei Raumtemperatur mit einer HCl-Lösung (4.0 M in 1,4-Dioxan, 5 mL) versetzt. Es wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt und das Lösemittel anschließend unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Der Rückstand wurde im Feinvakuum getrocknet, woraufhin das Hydrochlorid als farbloser Feststoff (78 mg, 0.41 mmol, quant.) erhalten wurde, welcher ohne weitere Charakterisierung weiter umgesetzt wurde.

Teil 2. Zu einer Lösung von (Pyrazin-2-carbonyl)-*L*-phenylalanin (**128**) (111 mg, 0.41 mmol, 1.00 Äquiv.) in CH_2Cl_2 (10 mL) wurden bei 0°C HOBt · H_2O (62 mg, 0.41 mmol, 1.00 Äquiv.), TBTU (132 mg, 0.41 mmol, 1.00 Äquiv.) sowie 2,4,6-Collidin (109 μL , 0.82 mmol, 2.00 Äquiv.) gegeben und 15 min bei 0°C gerührt. Anschließend wurde eine Lösung des Hydrochlorids aus **Teil A** (78 mg, 0.41 mmol, 1.00 Äquiv.) in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$ (5 mL, 4:1 V/V) tropfenweise zugegeben und 2 h bei 0°C sowie über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit einer NaCl-Lösung (ges., aq., 50 mL) versetzt und mit EtOAc (3×50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden sukzessive mit einer NH_4Cl -Lösung (ges., aq., 2×50 mL), mit einer NaHCO_3 -Lösung (2×50 mL) sowie mit einer NaCl-Lösung (ges., aq., 1×50 mL) gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck destillativ entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 50:1) wurde die Titelverbindung in Form farbloses Öl (65 mg, 0.16 mmol, 39% über zwei Stufen) erhalten.

R_f : 0.32 (SiO_2 , $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 25:1).

$[\alpha]_D^{25}$: -62.0° ($c = 1.0$, CHCl_3).

$^1\text{H-NMR}$, COSY (300 MHz, CDCl_3): $\delta/\text{ppm} = 9.30$ (s, 1H, $H\text{-}3^{\text{Pyz}}$), 8.79–8.73 (m, 1H, $H\text{-}6^{\text{Pyz}}$), 8.57–8.50 (m, 1H, $H\text{-}5^{\text{Pyz}}$), 8.37 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, $\text{PyzNH}^{\text{Phe}}$), 7.35–7.16 (m, 5H, $H_{\text{Ar}}^{\text{Phe}}$), 7.04 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H, NH^{Leu}), 4.96 (q, $J = 7.6$ Hz, 1H, $\alpha\text{-CH}^{\text{Phe}}$), 4.49–4.36 (m, 1H, $\alpha\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 3.35 (pseudo-q, $^2J \approx 19.8$ Hz, 2H, CH_2CN), 3.31–3.13 (m, 2H, CH_2^{Phe}), 1.65–1.33 (m, 3H, CH_2^{Leu} und CH^{Leu}), 0.83 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H, CH_3^{Leu}), 0.81 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H, CH_3^{Leu}).

$^{13}\text{C-NMR}$, HSQC, HMBC (75.5 MHz, CDCl_3): $\delta/\text{ppm} = 197.2$ (C=O), 171.1 ($\text{CO}^{\text{Phe}}\text{NH}$), 163.4 (PyzCONH), 147.8 ($\text{C-}6^{\text{Pyz}}$), 144.3 ($\text{C-}3^{\text{Pyz}}$), 143.7 ($\text{C-}2^{\text{Pyz}}$), 143.0 ($\text{C-}5^{\text{Pyz}}$), 136.0 ($\text{C-}1_{\text{Ar}}^{\text{Phe}}$), 129.5

(C-2_{Ar}^{Phe} und C-6_{Ar}^{Phe}), 129.0 (C-3_{Ar}^{Phe} und C-5_{Ar}^{Phe}), 127.6 (C-4_{Ar}^{Phe}), 113.8 (CN), 56.8 (α -CH^{Leu}), 54.5 (α -CH^{Phe}), 38.8 (CH₂^{Leu}), 38.1 (CH₂^{Phe}), 29.5 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CN}$), 24.7 (CH^{Leu}), 23.0 (CH₃^{Leu}), 21.5 (CH₃^{Leu}).

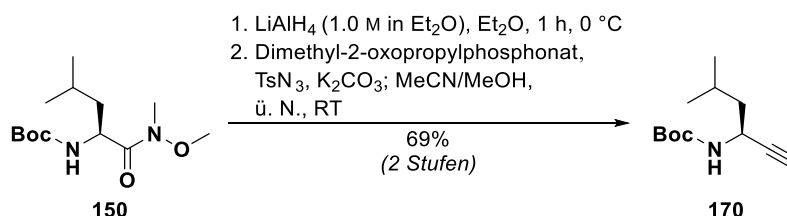
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3295, 2957, 1735, 1655, 1518, 1467, 1455, 1386, 1312, 1152, 1020, 911, 775, 730, 700.

ESI-MS (pos.): m/z = 408.2 (100%, [M+H]⁺); m/z ber. für [C₂₂H₂₅N₅O₃+H]⁺ ([M+H]⁺): 408.2.

HPLC-Analyse (C₁₈): t_R = 1.90 min, Peakfläche: 98.68% (Acetonitril/MilliQ®-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 50:50 über 8 min, Flussrate: 0.7 mL · min⁻¹, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 μ L, Säulenofentemperatur: 40 °C).

10.9.5 Partielle Synthese des Alkynylsulfons

N-Boc-(S)-3-amino-5-methyl-hex-1-in (170)



Teil 1: Reduktion des Weinreb-Amids zum entsprechenden Aldehyd. Die Synthese wurde nach einer Vorschrift von Ko *et al.* durchgeführt.^[379] Unter Argonatmosphäre wurde eine Lösung von LiAlH₄ (1.0 M in Et₂O, 12.0 mL, 12.02 mmol, 1.10 Äquiv.) bei 0 °C tropfenweise zu einer Lösung des Weinreb-Amids **150** (3.00 g, 10.93 mmol, 1.00 Äquiv.) in absolutem Et₂O (700 mL) gegeben und 1 h bei 0 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde durch Zugabe einer KHSO₄-Lsg (5%, aq., 20 mL) gequenchet und mit Et₂O (3 × 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Das in Form eines farblosen Öls (2.35 g, 10.92 mmol, quant.) erhaltene *N*-Boc-L-Leucinal wurde ohne weitere Reinigung und vollständige Charakterisierung unmittelbar im nächsten Syntheseschritt eingesetzt.

R_f: 0.63 (SiO₂, ^oHex/EtOAc 2:1).

ESI-MS (pos.): m/z = 116.2 (100%, [M-Boc+H]⁺); m/z ber. für [C₁₁H₂₁NO₃+H]⁺ ([M+H]⁺): 216.2.

Teil 2: Seyferth-Gilbert-Homologisierung (Ohira-Bestmann-Methode). Die Synthese wurde nach einer Vorschrift von Ko *et al.* durchgeführt.^[379] Unter Argonatmosphäre wurde eine Lösung von TsN₃ (11–15% w/w, 17.2 mL, 8.62 mmol, 1.30 Äquiv.) in absolutem MeCN (86 mL) vorgelegt und bei Raumtemperatur mit K₂CO₃ (2.75 g, 19.89 mmol, 3.00 Äquiv.) sowie Dimethyl-2-oxopropylphosphonat (1.2 mL, 8.86 mmol, 1.30 Äquiv.) versetzt. Es wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend eine Lösung des Aldehyds (**Teil 1**; 1.43 g, 6.63 mmol, 1.00 Äquiv.) in

absolutem MeOH (18 mL) zugegeben. Die resultierende Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und das Lösemittel anschließend unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Der Rückstand wurde in Et₂O (50 mL) und Wasser (50 mL) aufgenommen und mit Et₂O (3 × 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck destillativ entfernt. Nach Kieselgelfiltration (^cHex/EtOAc 10:1) wurde die Titelverbindung **170** als farbloser amorpher Feststoff (882 mg, 3.44 mmol, 69 % über 2 Stufen; Lit.:^[379] 67%) erhalten.

R_f: 0.61 (SiO₂, ^cHex/EtOAc 5:1).

Smb.: – (amorph).

[α]_D²⁴: –35.0° (c = 1.0, CHCl₃).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 4.96 (s, 1H, NH), 4.52–4.29 (m, 1H, α-CH^{Leu}), 2.24 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, CH), 1.87–1.72 (m, 1H, CH^{Leu}), 1.51 (dd, *J* = 7.9, 6.9 Hz, 2H, CH₂^{Leu}), 1.44 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.93 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH₃^{Leu}), 0.92 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH₃^{Leu}).

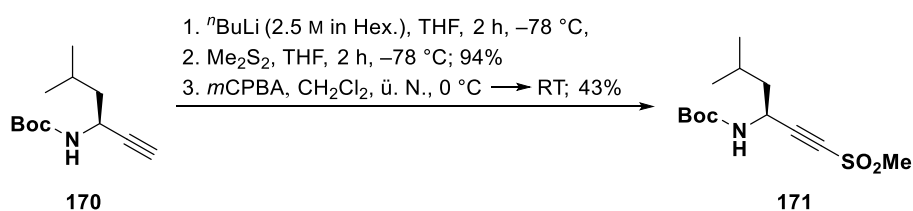
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 154.9 (CONH), 84.0 (C-2), 80.0 (C(CH₃)₃), 70.9 (C-1), 45.3 (CH₂^{Leu}), 41.4 (α-CH^{Leu}), 28.5 (C(CH₃)₃), 25.1 (CH^{Leu}), 22.8 (CH₃^{Leu}), 22.0 (CH₃^{Leu}).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3357, 3282, 2960, 1681, 1512, 1366, 1327, 1282, 1246, 1164, 1119, 1018, 866, 672.

ESI-MS (pos.): *m/z* = 156.1 (100%, [M-^tBu+H]⁺); *m/z* ber. für [C₁₂H₂₁NO₂+H]⁺ ([M+H]⁺): 212.2.

Die analytischen Daten stimmen mit denen aus der Literatur überein.^[379]

N-Boc-(*S*)-3-amino-5-methyl-1-(methylsulfonyl)-hex-1-in (171)



Teil 1: Synthese des Alkinylsulfids. Die Synthese wurde in Anlehnung an eine modifizierte Vorschrift von Zeng *et al.* durchgeführt.^[378] In einem 50 mL-Schlenk-Kolben wurde unter Argonatmosphäre eine Lösung des Alkins **170** (857 mg, 4.06 mmol, 1.00 Äquiv.) in absolutem THF (20 mL) bei –78 °C tropfenweise mit einer Lösung von ⁿBuLi (2.5 M in Hex., 4.1 mL, 10.15 mmol, 2.50 Äquiv.) versetzt und 2 h bei dieser Temperatur gerührt. Anschließend wurde Dimethyldisulfid (361 µL, 4.06 mmol, 1.00 Äquiv.) zugegeben und weitere 2 h bei –78 °C gerührt. Es wurde durch Zugabe einer NH₄Cl-Lösung (ges., aq., 10 mL) gequencht und die Reaktionsmischung mit Et₂O (3 ×

50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit einer NaCl-Lösung (ges., aq., 1 × 50 mL) gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Das in Form eines farblosen Öls (981 mg, 3.81 mmol, 94%) erhaltene Alkinylsulfid wurde ohne weitere Reinigung und vollständige Charakterisierung unmittelbar im nächsten Syntheseschritt eingesetzt.¹

R_f: 0.50 (SiO₂, ^cHex/EtOAc 10:1).

ESI-MS (pos.): $m/z = 202.2$ (100%, [M–Boc+H]⁺) und 280.2 (76%, [M+Na]⁺); m/z ber. für [C₁₃H₂₃NO₂S+H]⁺ ([M+H]⁺): 258.2.

Teil 2: Oxidation des Alkinylsulfids zum entsprechenden Sulfon. Die Synthese wurde in Anlehnung an eine modifizierte Vorschrift von Zeng *et al.* durchgeführt.^[378] Unter Argonatmosphäre wurde zu einer Lösung des Alkinylsulfids (**Teil 1**; 221 mg, 0.86 mmol, 1.00 Äquiv.) in trockenem CH₂Cl₂ (10 mL) bei 0 °C mit *m*CPBA (≤77% w/w, 530 mg, 2.15 mmol, 2.50 Äquiv.) versetzt und 1 h bei 0 °C sowie über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit CH₂Cl₂ (50 mL) verdünnt und die organische Phase mit einer NaHCO₃-Lösung (ges., aq., 3 × 20 mL) gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (^cHex/EtOAc 5:1) wurde die Titelverbindung als farbloses Öl (107 mg, 0.37 mmol, 43%) erhalten.

R_f: 0.53 (SiO₂, ^cHex/EtOAc 2:1).

[α]_D²⁰: –69.0° (c = 1.0, CHCl₃).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, CDCl₃): δ /ppm = 4.85–4.45 (m, 2H, NH und α -CH^{Leu}), 3.19 (s, 3H, SO₂CH₃), 1.85–1.62 (m, 1H, CH^{Leu}), 1.66–1.56 (m, 2H, CH₂^{Leu}), 1.45 (s, 9H, (C(CH₃)₃), 0.94 (d, $J = 6.5$ Hz, 6H, 2 × CH₃^{Leu}).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, CDCl₃): δ /ppm = 154.6 (CONH), 93.0 (C-2), 80.9 (C(CH₃)₃), 78.8 (C-1), 46.8 (SO₂CH₃), 43.8 (CH₂^{Leu}), 41.3 (α -CH^{Leu}), 28.4 (C(CH₃)₃), 25.0 (CH^{Leu}), 22.4 (CH₃^{Leu}), 22.2 (CH₃^{Leu}).

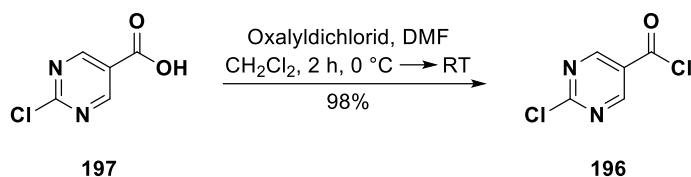
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3367, 2961, 2201, 1693, 1515, 1368, 1327, 1250, 1151, 1016, 871, 775.

ESI-MS (pos.): $m/z = 190.0$ (100%, [M–Boc+H]⁺); m/z ber. für [C₁₃H₂₃NO₄S+H]⁺ ([M+H]⁺): 290.1.

¹Das Alkinylsulfid sollte zeitnah umgesetzt werden, da dieses nur eine bedingte Stabilität aufweist.

10.10 Versuchsvorschriften zu Kapitel 8

2-Chlorpyrimidin-5-carbonsäurechlorid (196)



Die Synthese wurde in Anlehnung an eine Patentvorschrift durchgeführt.^[425] Eine Lösung aus 2-Chlorpyrimidin-5-carbonsäure (5.00 g, 31.54 mmol, 1.00 Äquiv.) und DMF (1.0 mL, 13.00 mmol, 0.41 Äquiv.) in trockenem CH₂Cl₂ (100 mL) wurde bei 0 °C tropfenweise mit Oxalyldichlorid (4.1 mL, 47.31 mmol, 1.50 Äquiv.) versetzt und die Reaktionsmischung 2 h bei 0 °C gerührt. Das Lösemittel wurde anschließend unter reduziertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand im Feinvakuum getrocknet, woraufhin die Titelverbindung **196** als gelber Feststoff (5.45 g, 30.79 mmol, 98%; Lit.:^[425] 99%) erhalten wurde, welcher ohne weitere Reinigung und detaillierte Charakterisierung weiter umgesetzt wurde.

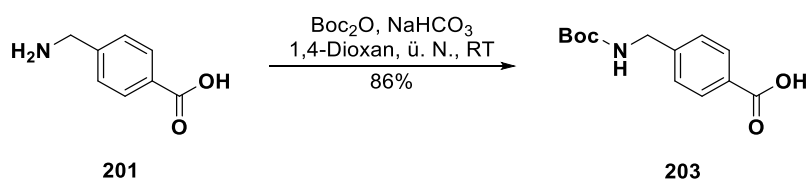
R_f: 0.15 (SiO₂, EtOAc/DMF 5:1 + 1% NEt₃).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ/ppm = 9.08 (s, 2H, *H*-4 und *H*-6).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3024, 1730, 1630, 1580, 1402, 1210, 1154, 1125, 841, 771.

ESI-MS (pos.): m/z = 159.1 (100%, [M-Cl+OH+H]⁺) und 141.2 (5%, [M-Cl]⁺); m/z ber. für [C₅H₂Cl₂N₂O+H]⁺ ([M+H]⁺): 177.0.

4-(*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)aminomethyl)benzoesäure (203)



Die Synthese wurde in Anlehnung an eine modifizierte Patentvorschrift bzw. eine Vorschrift von Buckley *et al.* durchgeführt.^[426,471] Eine Suspension aus (4-Aminomethyl)benzoesäure (6.0 g, 39.69 mmol, 1.00 Äquiv.) und NaHCO₃ (8.00 g, 95.26 mmol, 2.40 Äquiv.) in Wasser (75 mL) wurde tropfenweise mit einer Lösung aus Boc₂O (9.54 g, 43.66 mmol, 1.10 Äquiv.) in 1,4-Dioxan (75 mL) versetzt. Es wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und das organische Lösemittel anschließend unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Die wässrige Lösung wurde durch langsame Zugabe einer HCl-Lösung (1 M, aq.) auf pH 3 eingestellt und das entstandene Präzipitat abgesaugt sowie im Feinvakuum getrocknet. Die Titelverbindung **203** wurde als farbloses Pulver (9.48 g, 37.71 mmol, 95%; Lit.:^[471] 97%) erhalten.

R_f: 0.43 (SiO₂, °Hex/EtOAc 1:1).

Smb.: 169–171 °C (°Hex/EtOAc).

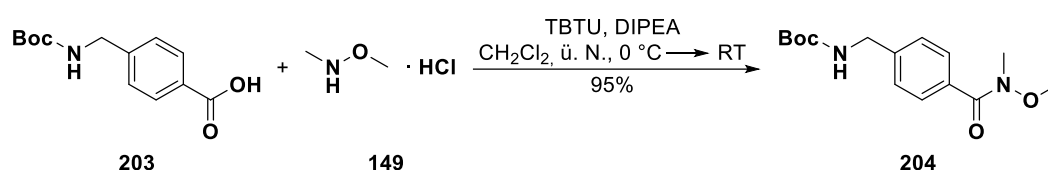
¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ/ppm = 12.87 (s, 1H, CO₂H), 7.89 (d, ³J = 8.1 Hz, 2H, *H*-2^{Ph} und *H*-6^{Ph}), 7.47 (t, ³J = 6.2 Hz, 1H, NH), 7.34 (d, ³J = 8.1 Hz, 2H, *H*-3^{Ph} und *H*-5^{Ph}), 4.19 (d, ³J = 6.2 Hz, 2H, CH₂), 1.39 (s, 9H, (C(CH₃)₃)).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ/ppm = 167.2 (CO₂H), 155.8 (CONH), 145.4 (C-4^{Ph}), 129.4 (C-2^{Ph} und C-6^{Ph}), 129.3 (C-1^{Ph}), 126.9 (C-3^{Ph} und C-5^{Ph}), 78.0 (C(CH₃)₃), 43.2 (CH₂), 28.2 (C(CH₃)₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3353, 2983, 1681, 1612, 1505, 1429, 1291, 1241, 1164, 1121, 1051, 941, 878, 860, 755.

ESI-MS (pos.): *m/z* = 196.1 (100%, [M-^tBu+H]⁺) und 274.1 (65%, [M+Na]⁺); *m/z* ber. für [C₁₃H₁₇NO₄+Na]⁺ ([M+Na]⁺): 274.1.

O-*tert*-Butyl-(4-(methoxy(methyl)carbamoyl)benzyl)carbamate (204)



Die Synthese erfolgte in Anlehnung an eine Vorschrift von Buckley *et al.*^[426] Zu einer Lösung aus **203** (5.0 g, 19.90 mmol, 1.00 Äquiv.) in CH₂Cl₂ (150 mL) wurden bei 0 °C TBTU (7.67 g, 23.88 mmol, 1.20 Äquiv.) sowie DIPEA (11.8 mL, 69.65 mmol, 3.50 Äquiv.) gegeben und 30 min gerührt. Anschließend wurde die Mischung mit *N,O*-Dimethylhydroxylamin-Hydrochlorid (2.14 g, 21.89 mmol, 1.10 Äquiv.) versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde mit einer NaCl-Lösung (ges., aq., 75 mL) versetzt und mit EtOAc (3 × 75 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck destillativ entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (°Hex/EtOAc 5:1) wurde die Titelverbindung **204** als farbloser Feststoff (4.95 g, 19.70 mmol, 99%) erhalten.

R_f: 0.46 (SiO₂, °Hex/EtOAc 1:1).

Smb.: 56–58 °C (°Hex/EtOAc).

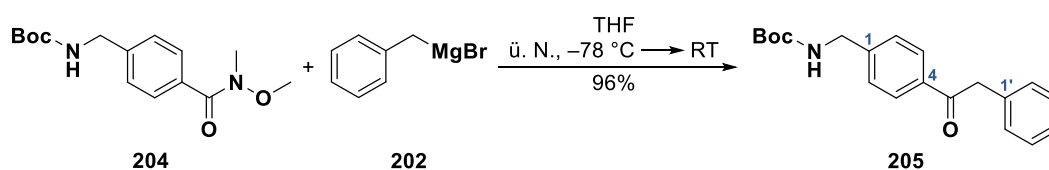
¹H-NMR, COSY (300 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 7.62 (d, ³J = 8.1 Hz, 2H, *H*-3^{Ph} und *H*-5^{Ph}), 7.28 (d, ³J = 8.1 Hz, 2H, *H*-2^{Ph} und *H*-6^{Ph}), 4.32 (s, 2H, CH₂), 3.52 (s, 3H, OCH₃), 3.32 (s, 3H, NCH₃), 1.43 (s, 9H, (C(CH₃)₃)).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 169.7 (C=O(CH₃)), 156.1 (CONH), 141.8 (C-1^{Ph}), 133.0 (C-4^{Ph}), 128.6 (C-3^{Ph} und C-5^{Ph}), 126.9 (C-2^{Ph} und C-6^{Ph}), 79.9 (C(CH₃)₃), 61.1 (OCH₃), 44.5 (CH₂), 33.8 (NCH₃), 28.5 (C(CH₃)₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3357, 2976, 1682, 1650, 1522, 1384, 1364, 1277, 1250, 1165, 1048, 977, 865.

ESI-MS (pos.): m/z = 239.1 (100%, [M-^tBu+H]⁺), 295.2 (8%, [M+H]⁺) und 317.1 (17%, [M+Na]⁺); m/z ber. für [C₁₅H₂₂N₂O₄+H]⁺ ([M+H]⁺): 295.2.

tert-Butyl-(4-(2-phenylacetyl)benzyl)carbammat (205)



Die Synthese wurde nach einer modifizierten Vorschrift von Buckley *et al.* durchgeführt^[426] In einem ausgeheizten Schlenk-Kolben wurde unter Argonatmosphäre eine Lösung des Weinreb-Amids **204** (3.00 g, 10.20 mmol, 100 Äquiv.) in absolutem THF (60 mL) bei -78 °C tropfenweise mit einer Lösung von Benzylmagnesiumbromid (1.4 M in THF, 30.60 mmol, 3.00 Äquiv.) versetzt und 4 h bei -78 °C sowie über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde durch Zugabe einer NH₄Cl-Lösung (ges., aq., 60 mL) gequencht und mit EtOAc (3 × 150 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (°Hex/EtOAc 10:1 → 5:1) wurde die Titelverbindung **205** als farbloser Feststoff (3.19 g, 9.80 mmol, 96%) erhalten.

R_f: 0.30 (SiO₂, °Hex/EtOAc 4:1).

Smb.: 139–140 °C (°Hex/EtOAc).

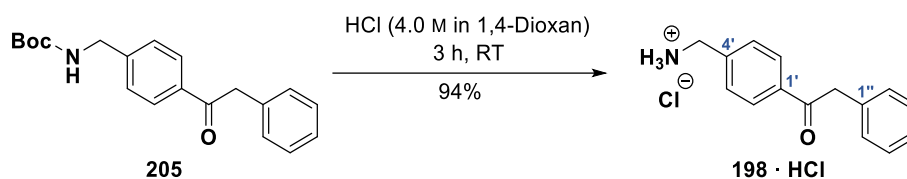
¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ/ppm = 8.01 (d, ³J = 8.2 Hz, 2H, H-3^{Ph} und H-5^{Ph}), 7.49 (t, ³J = 6.2 Hz, 1H, NH), 7.38 (d, ³J = 8.2 Hz, 2H, H-2^{Ph} und H-6^{Ph}), 7.34–7.12 (m, 5H, H-2^{Ph}–H-6^{Ph}), 4.36 (s, 2H, CH₂), 4.20 (d, ³J = 6.2 Hz, 2H, NHCH₂), 1.40 (s, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ/ppm = 197.3 (C=O), 155.9 (CONH), 145.9 (C-1^{Ph}), 135.3 (C-1^{Ph}), 135.0 (C-4^{Ph}), 129.7 (C-2^{Ph} und C-6^{Ph}), 128.6 (C-3^{Ph} und C-5^{Ph}), 128.4 (C-3^{Ph} und C-5^{Ph}), 127.1 (C-2^{Ph} und C-6^{Ph}), 126.5 (C-4^{Ph}), 78.0 (C(CH₃)₃), 44.7 (CH₂), 43.3 (NHCH₂), 28.3 (C(CH₃)₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3316, 1686, 1673, 1536, 1365, 1284, 1218, 1164, 1132, 933, 916, 854, 729.

ESI-MS (pos.): m/z = 270.2 (100%, [M-^tBu+H]⁺), 326.2 (6%, [M+H]⁺) und 348.1 (42%, [M+Na]⁺); m/z ber. für [C₂₀H₂₃NO₃+H]⁺ ([M+H]⁺): 326.2.

1-(4'-(Aminomethyl)phenyl)-2-phenylethan-1-on-Hydrochlorid (198 · HCl)



In einem 50 mL-Rundkolben wurde das Carbamat **205** (350 mg, 1.08 mmol, 1.00 Äquiv.) vorgelegt und bei Raumtemperatur mit einer HCl-Lösung (4.0 M in 1,4-Dioxan, 5 mL) versetzt. Es wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt und das Lösemittel anschließend unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Der Rückstand wurde im Feinvakuum getrocknet, sodass die Titelverbindung **198 · HCl** als farbloser Feststoff (265 mg, 1.01 mmol, 94%) erhalten wurde.

R_f: 0.24 (SiO₂, EtOAc + 1% NEt₃).

Smb.: 207–209 °C (°Hex/EtOAc).

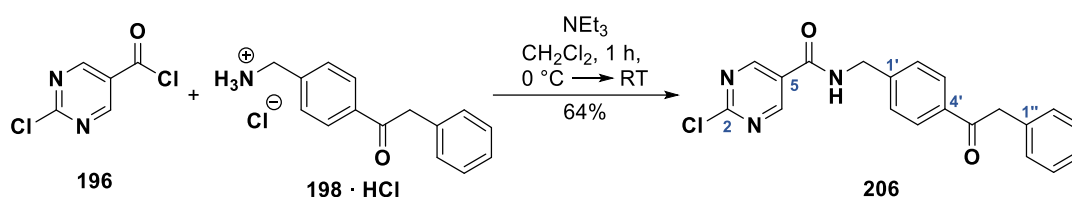
¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ /ppm = 8.74 (s (br), 3H NH₃⁺), 8.07 (d, ³J = 8.2 Hz, 2H, H-2'^{Ph} und H-6'^{Ph}), 7.67 (d, ³J = 8.2 Hz, 2H, H-3'^{Ph} und H-5'^{Ph}), 7.37–7.13 (m, 5H, H-2''^{Ph}–H-6''^{Ph}), 4.39 (s, 2H, CH₂), 4.09 (s, 2H, NHCH₂).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ /ppm = 197.4 (C=O), 139.4 (C-4'^{Ph}), 136.0 (C-1'^{Ph}), 135.0 (C-1''^{Ph}), 129.7 (C-2''^{Ph} und C-6''^{Ph}), 129.2 (C-3'^{Ph} und C-5'^{Ph}), 128.6 (C-2'^{Ph} und C-6'^{Ph}), 128.4 (C-3''^{Ph} und C-5''^{Ph}), 126.4 (C-4''^{Ph}), 44.8 (CH₂), 41.7 (NHCH₂).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2959, 2887, 1683, 1611, 1482, 1338, 1220, 1199, 1117, 993, 973, 825, 719.

ESI-MS (pos.): m/z = 226.2 (46%, [M–HCl+H]⁺) und 451.1 (100%, [2(M–HCl)+H]⁺); m/z ber. für [C₁₅H₁₅NO+H]⁺ ([M–HCl+H]⁺): 226.1.

2-Chlor-N-(4'-(2-phenylacetyl)benzyl)pyrimidin-5-carbonsäureamid (206)



Die Synthese wurde in Anlehnung an eine modifizierte Patentvorschrift durchgeführt.^[425] Eine Lösung des Hydrochlorids **196** (174 mg, 0.67 mmol, 1.00 Äquiv.) und Triethylamin (276 μ L, 1.99 mmol, 1.00 Äquiv.) in trockenem CH₂Cl₂ (5 mL) wurde bei 0 °C portionsweise mit 2-Chlorpyrimidin-5-carbonsäurechlorid (**198 · HCl**, 118 mg, 0.67 mmol, 1.00 Äquiv.) versetzt und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wurde anschließend unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (°Hex/EtOAc 2:1)

gereinigt, woraufhin die Titelverbindung **206** als farbloser Feststoff (156 mg, 0.43 mmol, 64%) erhalten wurde.

R_f: 0.14 (SiO₂, ^cHex/EtOAc 2:1).

Smb.: 174–176 °C (^cHex/EtOAc).

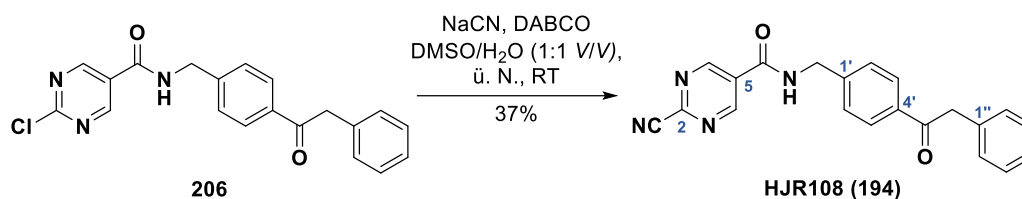
¹H-NMR, COSY (300 MHz, Aceton-*d*₆): δ/ppm = 9.15 (s, 2H, *H*-4^{Pyz} und *H*-6^{Pyz}), 8.69 (s (br), 1H, NH), 8.03 (d, ³*J* = 8.4 Hz, 2H, *H*-3^{Ph} und *H*-5^{Ph}), 7.52 (d, ³*J* = 8.4 Hz, 2H, *H*-2^{Ph} und *H*-6^{Ph}), 7.36–7.17 (m, 5H, *H*-2^{Ph}–*H*-6^{Ph}), 4.69 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H, NHCH₂), 4.35 (s, 2H, CH₂).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, Aceton-*d*₆): δ/ppm = 197.5 (C=O), 163.5 (C-2^{Pyz}), 163.3 (CONH), 159.9 (C-4^{Pyz} und C-6^{Pyz}), 145.0 (C-1^{Ph}), 136.7 (C-4^{Ph}), 136.2 (C-1^{Ph}), 130.5 (C-2^{Ph} und C-6^{Ph}), 129.6 (C-3^{Ph} und C-5^{Ph}), 129.3 (C-3^{Ph} und C-5^{Ph}), 128.7 (C-2^{Ph} und C-6^{Ph}), 127.9 (C-5^{Pyz}), 127.4 (C-4^{Ph}), 45.8 (CH₂), 43.8 (NHCH₂).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3294, 2455, 1679, 1646, 1583, 1549, 1408, 1321, 1252, 1219, 1182, 990, 695.

ESI-MS (pos.): *m/z* = 366.2 (100%, [M+H]⁺) und 388.1 (11%, [M+Na]⁺); *m/z* ber. für [C₂₀H₁₆ClN₃O₂+H]⁺ ([M+H]⁺): 366.1.

2-Cyano-*N*-(4'-(2-phenylacetyl)benzyl)pyrimidin-5-carbonsäureamid (HJR108, 194)



Die Synthese wurde in Anlehnung an eine Vorschrift von Zhang *et al.* durchgeführt.^[427] Zu einer Lösung aus DABCO (7.4 mg, 0.07 mmol, 0.20 Äquiv.) und Natriumcyanid (16 mg, 0.33 mmol, 1.10 Äquiv.) in DMSO/H₂O (2 mL, 1:1 V/V) wurde bei Raumtemperatur eine Lösung von **206** (109 mg, 0.30 mmol, 1.00 Äquiv.) in DMSO (1.5 mL) gegeben und über Nacht gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit EtOAc (50 mL) und Wasser (25 mL) verdünnt und mit einer NaCl-Lösung (ges., aq., 2 × 25 mL), einer NH₄Cl-Lösung (ges., aq., 1 × 25 mL) sowie mit Wasser (1 × 50 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (^cHex/EtOAc 2:1) wurde die Titelverbindung **194** als farbloses Öl (40 mg, 0.11 mmol, 37%) erhalten.

R_f: 0.31 (SiO₂, ^cHex/EtOAc 1:1).

¹H-NMR, COSY (300 MHz, Aceton-*d*₆): δ/ppm = 9.38 (s, 2H, *H*-4^{Pyz} und *H*-6^{Pyz}), 8.85 (s (br), 1H, NH), 8.04 (d, ³*J* = 8.6 Hz, 2H, *H*-3^{Ph} und *H*-5^{Ph}), 7.54 (d, ³*J* = 8.6 Hz, 2H, *H*-2^{Ph} und *H*-6^{Ph}), 7.36–7.16 (m, 5H, *H*-2^{Ph}–*H*-6^{Ph}), 4.72 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H, NHCH₂), 4.35 (s, 2H, CH₂).

^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, Aceton- d_6): δ/ppm = 197.5 (C=O), 163.0 (CONH), 158.2 (C-4^{Pyz} und C-6^{Pyz}), 146.6 (C-2^{Pyz}), 144.8 (C-1^{Ph}), 136.7 (C-4^{Ph}), 136.2 (C-1^{Ph}), 130.7 (C-1^{Pyz}), 130.4 (C-2^{Ph} und C-6^{Ph}), 129.7 (C-3^{Ph} und C-5^{Ph}), 129.3 (C-3^{Ph} und C-5^{Ph}), 128.7 (C-2^{Ph} und C-6^{Ph}), 127.4 (C-4^{Ph}), 116.6 (CN), 45.8 (CH₂), 44.0 (NHCH₂).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3351, 2359, 1653, 1606, 1579, 1537, 1418, 1259, 1012, 796, 733, 700.

ESI-MS (pos.): m/z = 357.2 (46%, [M+H]⁺) und 379.1 (60%, [M+Na]⁺); m/z ber. für [C₂₁H₁₆N₄O₂+H]⁺ ([M+H]⁺): 357.1

HPLC-Analyse (C₁₈): t_R = 7.71 min, Peakfläche: 99.65% (Acetonitril/MilliQ®-Wasser (+0.1% Ameisensäure) 35:65 über 15 min, Flussrate: 0.7 mL · min⁻¹, Detektion: 254 nm, Injektionsvolumen: 5 μL , Säulenofentemperatur: 40 °C).

11 Literaturverzeichnis

- [1] F. M. Ashcroft, *Ion channels and disease*, Academic press, **1999**.
- [2] H. Bertil, *Ion channels of excitable membranes*, 3rd ed., Sunderland, Mass.: Sinauer Associates., **2001**.
- [3] D. E. Clapham, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 342–344.
- [4] D. E. Clapham, *Nature* **2003**, *426*, 517–524.
- [5] M. M. Moran, H. Xu, D. E. Clapham, *Curr. Opin. Neurobiol.* **2004**, *14*, 362–369.
- [6] T. Voets, G. Droogmans, U. Wissenbach, A. Janssens, V. Flockerzi, B. Nilius, *Nature* **2004**, *430*, 748.
- [7] A. Dhaka, V. Viswanath, A. Patapoutian, *Annu. Rev. Neurosci.* **2006**, *29*, 135–161.
- [8] D. E. Clapham, L. W. Runnels, C. Strübing, *Nat. Rev. Neurosci.* **2001**, *2*, 387–396.
- [9] K. Venkatachalam, C. Montell, *Annu. Rev. Biochem.* **2007**, *76*, 387–417.
- [10] C. Montell, L. Birnbaumer, V. Flockerzi, *Cell* **2002**, *108*, 595–598.
- [11] C. Montell, *Science's STKE* **2005**, *2005*, re3–re3.
- [12] I. S. Ramsey, M. Delling, D. E. Clapham, *Annu. Rev. Physiol.* **2006**, *68*, 619–647.
- [13] M. J. Caterina, A. Leffler, A. B. Malmberg, W. J. Martin, J. Trafton, K. R. Petersen-Zeitz, M. Koltzenburg, A. I. Basbaum, D. Julius, *Science* **2000**, *288*, 306–313.
- [14] H.-W. Dong, J. C. Davis, S. Ding, Q. Nai, F.-M. Zhou, M. Ennis, *Neurosci. Lett.* **2012**, *524*, 49–54.
- [15] Y. Ishimaru, H. Matsunami, *J. Dent. Res.* **2009**, *88*, 212–218.
- [16] S.-E. Jordt, D. Julius, *Cell* **2002**, *108*, 421–430.
- [17] Y. Zhang, M. A. Hoon, J. Chandrashekar, K. L. Mueller, B. Cook, D. Wu, C. S. Zuker, N. J. P. Ryba, *Cell* **2003**, *112*, 293–301.
- [18] J. Vriens, H. Watanabe, A. Janssens, G. Droogmans, T. Voets, B. Nilius, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, *101*, 396–401.
- [19] D. J. Cosens, A. Manning, *Nature* **1969**, *224*, 285–287.
- [20] C. Montell, G. M. Rubin, *Neuron* **1989**, *2*, 1313–1323.
- [21] R. C. Hardie, B. Minke, *Neuron* **1992**, *8*, 643–651.
- [22] P. D. Wes, J. Chevesich, A. Jeromin, C. Rosenberg, G. Stetten, C. Montell, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**, *92*, 9652–9656.
- [23] X. Zhu, P. B. Chu, M. Peyton, L. Birnbaumer, *FEBS Lett.* **1995**, *373*, 193–198.
- [24] K. Venkatachalam, D. B. van Rossum, R. L. Patterson, H.-T. Ma, D. L. Gill, *Nat. Cell Biol.* **2002**, *4*, E263–E272.
- [25] M. J. Caterina, M. A. Schumacher, M. Tominaga, T. A. Rosen, J. D. Levine, D. Julius, *Nature* **1997**, *389*, 816–824.

- [26] P. M. Zygmunt, J. Petersson, D. A. Andersson, H.-h. Chuang, M. Sjørgård, V. Di Marzo, D. Julius, E. D. Högestätt, *Nature* **1999**, *400*, 452–457.
- [27] H. Xu, N. T. Blair, D. E. Clapham, *J. Neurosci.* **2005**, *25*, 8924–8937.
- [28] F. N. McNamara, A. Randall, M. J. Gunthorpe, *Br. J. Pharmacol.* **2005**, *144*, 781–790.
- [29] L. J. Macpherson, B. H. Geierstanger, V. Viswanath, M. Bandell, S. R. Eid, S. Hwang, A. Patapoutian, *Curr. Biol.* **2005**, *15*, 929–934.
- [30] S.-E. Jordt, M. Tominaga, D. Julius, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, *97*, 8134–8139.
- [31] M. J. Caterina, T. A. Rosen, M. Tominaga, A. J. Brake, D. Julius, *Nature* **1999**, *398*, 436–441.
- [32] H. Xu, I. S. Ramsey, S. A. Kotecha, M. M. Moran, J. A. Chong, D. Lawson, P. Ge, J. Lilly, I. Silos-Santiago, Y. Xie, P. S. DiStefano, R. Curtis, D. E. Clapham, *Nature* **2002**, *418*, 181–186.
- [33] A. D. Güler, H. Lee, T. Iida, I. Shimizu, M. Tominaga, M. Caterina, *J. Neurosci.* **2002**, *22*, 6408–6414.
- [34] E. den Dekker, J. G. J. Hoenderop, B. Nilius, R. J. M. Bindels, *Cell Calcium* **2003**, *33*, 497–507.
- [35] A. Moqrich, S. W. Hwang, T. J. Earley, M. J. Petrus, A. N. Murray, K. S. R. Spencer, M. Andahazy, G. M. Story, A. Patapoutian, *Science* **2005**, *307*, 1468–1472.
- [36] L. M. Duncan, J. Deeds, J. Hunter, J. Shao, L. M. Holmgren, E. A. Woolf, R. I. Tepper, A. W. Shyjan, *Cancer Res.* **1998**, *58*, 1515–1520.
- [37] C. A. Pérez, L. Huang, M. Rong, J. A. Kozak, A. K. Preuss, H. Zhang, M. Max, R. F. Margolskee, *Nat. Neurosci.* **2002**, *5*, 1169–1176.
- [38] L. W. Runnels, L. Yue, D. E. Clapham, *Science* **2001**, *291*, 1043–1047.
- [39] M. J. S. Nadler, M. C. Hermosura, K. Inabe, A.-L. Perraud, Q. Zhu, A. J. Stokes, T. Kurosaki, J.-P. Kinet, R. Penner, A. M. Scharenberg, A. Fleig, *Nature* **2001**, *411*, 590–595.
- [40] M. Matsushita, J. A. Kozak, Y. Shimizu, D. T. McLachlin, H. Yamaguchi, F.-Y. Wei, K. Tomizawa, H. Matsui, B. T. Chait, M. D. Cahalan, A. C. Nairn, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 20793–20803.
- [41] C. Schmitz, A.-L. Perraud, C. O. Johnson, K. Inabe, M. K. Smith, R. Penner, T. Kurosaki, A. Fleig, A. M. Scharenberg, *Cell* **2003**, *114*, 191–200.
- [42] T. Voets, B. Nilius, S. Hoefs, A. W. C. M. van der Kemp, G. Droogmans, R. J. M. Bindels, J. G. J. Hoenderop, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 19–25.
- [43] A. M. Peier, A. Moqrich, A. C. Hergarden, A. J. Reeve, D. A. Andersson, G. M. Story, T. J. Earley, I. Dragoni, P. McIntyre, S. Bevan, A. Patapoutian, *Cell* **2002**, *108*, 705–715.
- [44] D. D. McKemy, W. M. Neuhausser, D. Julius, *Nature* **2002**, *416*, 52–58.
- [45] A. Patapoutian, A. M. Peier, G. M. Story, V. Viswanath, *Nat. Rev. Neurosci.* **2003**, *4*, 529–539.

- [46] D. Jaquemar, T. Schenker, B. Trueb, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 7325–7333.
- [47] S.-E. Jordt, D. M. Bautista, H.-h. Chuang, D. D. McKemy, P. M. Zygmunt, E. D. Högestätt, I. D. Meng, D. Julius, *Nature* **2004**, *427*, 260–265.
- [48] M. Bandell, G. M. Story, S. W. Hwang, V. Viswanath, S. R. Eid, M. J. Petrus, T. J. Earley, A. Patapoutian, *Neuron* **2004**, *41*, 849–857.
- [49] D. M. Bautista, S.-E. Jordt, T. Nikai, P. R. Tsuruda, A. J. Read, J. Poblete, E. N. Yamoah, A. I. Basbaum, D. Julius, *Cell* **2006**, *124*, 1269–1282.
- [50] R. G. Walker, A. T. Willingham, C. S. Zuker, *Science* **2000**, *287*, 2229–2234.
- [51] S. Sidi, R. W. Friedrich, T. Nicolson, *Science* **2003**, *301*, 96–99.
- [52] T. Mochizuki, G. Wu, T. Hayashi, S. L. Xenophontos, B. Veldhuisen, J. J. Saris, D. M. Reynolds, Y. Cai, P. A. Gabow, A. Pierides, W. J. Kimberling, M. H. Breuning, C. C. Deltas, D. J. M. Peters, S. Somlo, *Science* **1996**, *272*, 1339–1342.
- [53] P. A. Gabow, *N. Engl. J. Med.* **1993**, *329*, 332–342.
- [54] M. Sun, E. Goldin, S. Stahl, J. L. Falardeau, J. C. Kennedy, J. S. Acierno Jr, C. Bove, C. R. Kaneski, J. Nagle, M. C. Bromley, M. Colman, R. Schiffmann, S. A. Slaugenhaupt, *Hum. Mol. Genet.* **2000**, *9*, 2471–2478.
- [55] M. T. Bassi, M. Manzoni, E. Monti, M. T. Pizzo, A. Ballabio, G. Borsani, *The American Journal of Human Genetics* **2000**, *67*, 1110–1120.
- [56] R. Bargal, N. Avidan, E. Ben-Asher, Z. Olender, M. Zeigler, A. Frumkin, A. Raas-Rothschild, G. Glusman, D. Lancet, G. Bach, *Nat. Genet.* **2000**, *26*, 118–122.
- [57] B. Nilius, G. Owsianik, T. Voets, J. A. Peters, *Physiol. Rev.* **2007**, *87*, 165–217.
- [58] B. Nilius, G. Owsianik, *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* **2010**, *460*, 437–450.
- [59] B. Nilius, G. Owsianik, *Genome Biol.* **2011**, *12*, 218.
- [60] M. Möller, N. Silbernagel, E. Wrobel, B. Stallmayer, E. Amedonu, S. Rinné, S. Peischard, S. G. Meuth, B. Wünsch, N. Strutz-Seebohm, N. Decher, E. Schulze-Bahr, G. Seebohm, *Cell. Physiol. Biochem.* **2018**, *49*, 1238–1248.
- [61] K. P. Schlingmann, M. C. Sassen, S. Weber, U. Pechmann, K. Kusch, L. Pelken, D. Lotan, M. Syrrou, J. J. Prebble, D. E. C. Cole, D. L. Metzger, S. Rahman, T. Tajima, S.-G. Shu, S. Waldegger, H. W. Seyberth, M. Konrad, *J. Am. Soc. Nephrol.* **2005**, *16*, 3061–3069.
- [62] R. Y. Walder, D. Landau, P. Meyer, H. Shalev, M. Tsolia, Z. Borochowitz, M. B. Boettger, G. E. Beck, R. K. Englehardt, R. Carmi, V. C. Sheffield, *Nat. Genet.* **2002**, *31*, 171–174.
- [63] W. Kriz, *Trends Mol. Med.* **2005**, *11*, 527–530.
- [64] J. Reiser, K. R. Polu, C. C. Möller, P. Kenlan, M. M. Altintas, C. Wei, C. Faul, S. Herbert, I. Villegas, C. Avila-Casado, M. McGee, H. Sugimoto, D. Brown, R. Kalluri, P. Mundel, P. L. Smith, D. E. Clapham, M. R. Pollak, *Nat. Genet.* **2005**, *37*, 739–744.

- [65] M. P. Winn, P. J. Conlon, K. L. Lynn, M. K. Farrington, T. Creazzo, A. F. Hawkins, N. Daskalakis, S. Y. Kwan, S. Ebersviller, J. L. Burchette, M. A. Pericak-Vance, D. N. Howell, J. M. Vance, P. B. Rosenberg, *Science* **2005**, *308*, 1801–1804.
- [66] J. Rowell, N. Koitabashi, D. A. Kass, *J. Cardiovas. Trans. Res.* **2010**, *3*, 516–524.
- [67] R. Inoue, L.-H. Kurahara, K. Hiraishi, *Seminars in Cell & Developmental Biology* **2018**.
- [68] D. Falcón, I. Galeano-Otero, E. Calderón-Sánchez, R. Del Toro, M. Martín-Bórnez, J. A. Rosado, A. Hmadcha, T. Smani, *Frontiers in Physiology* **2019**, *10*.
- [69] S. Giorgio, F. Valerio, *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets* **2011**, *11*, 54–67.
- [70] G. Santoni, F. Maggi, M. B. Morelli, M. Santoni, O. Marinelli, *Medical Sciences* **2019**, *7*, 108.
- [71] X. Cheng, D. Shen, M. Samie, H. Xu, *FEBS Lett.* **2010**, *584*, 2013–2021.
- [72] G. Bach, *Mol. Genet. Metab.* **2001**, *73*, 197–203.
- [73] K. Venkatachalam, C.-O. Wong, M. X. Zhu, *Cell Calcium* **2015**, *58*, 48–56.
- [74] G. Altarescu, M. Sun, D. F. Moore, J. A. Smith, E. A. Wiggs, B. I. Solomon, N. J. Patronas, K. P. Frei, S. Gupta, C. R. Kaneshki, O. W. Quarrell, S. A. Slaugenhaupt, E. Goldin, R. Schiffmann, *Neurology* **2002**, *59*, 306–313.
- [75] R. Schiffmann, N. K. Dwyer, I. A. Lubensky, M. Tsokos, V. E. Sutliff, J. S. Latimer, K. P. Frei, R. O. Brady, N. W. Barton, E. J. Blanchette-Mackie, E. Goldin, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, *95*, 1207–1212.
- [76] I. A. Lubensky, R. Schiffmann, E. Goldin, M. Tsokos, *The American Journal of Surgical Pathology* **1999**, *23*, 1527.
- [77] R. Bargal, G. Bach, *Journal of Inherited Metabolic Disease* **1997**, *20*, 625–632.
- [78] C.-S. Chen, G. Bach, R. E. Pagano, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, *95*, 6373–6378.
- [79] E. R. Berman, N. Livni, E. Shapira, S. Merin, I. S. Levij, *J. Pediatr.* **1974**, *84*, 519–526.
- [80] R. Puertollano, K. Kiselyov, *Am. J. Physiol.* **2009**, *296*, F1245–F1254.
- [81] J. A. Smith, C.-C. Chan, E. Goldin, R. Schiffmann, *Ophthalmology* **2002**, *109*, 588–594.
- [82] J. Alroy, A. A. Ucci, *Ultrastructural pathology* **2006**, *30*, 489–503.
- [83] K. Wakabayashi, A. M. Gustafson, E. Sidransky, E. Goldin, *Mol. Genet. Metab.* **2011**, *104*, 206–213.
- [84] M. P. Cuajungco, M. A. Samie, *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* **2008**, *457*, 463–473.
- [85] C. Grimm, S. Jörs, S. A. Saldanha, A. G. Obukhov, B. Pan, K. Oshima, M. P. Cuajungco, P. Chase, P. Hodder, S. Heller, *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 135–148.
- [86] F. Di Palma, I. A. Belyantseva, H. J. Kim, T. F. Vogt, B. Kachar, K. Noben-Trauth, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99*, 14994–14999.

- [87] C. Grimm, M. P. Cuajungco, A. F. J. van Aken, M. Schnee, S. Jörs, C. J. Kros, A. J. Ricci, S. Heller, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104*, 19583–19588.
- [88] C. Grimm, S. Jörs, S. Heller, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 13823–13831.
- [89] C. Grimm, E. Butz, C.-C. Chen, C. Wahl-Schott, M. Biel, *Cell Calcium* **2017**, *67*, 148–155.
- [90] D. A. Zeevi, A. Frumkin, V. Offen-Glasner, A. Kogot-Levin, G. Bach, *J. Pathol.* **2009**, *219*, 153–162.
- [91] D. A. Zeevi, A. Frumkin, G. Bach, *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Basis Dis.* **2007**, *1772*, 851–858.
- [92] H. J. Kim, A. A. Soyombo, S. Tjon-Kon-Sang, I. So, S. Muallem, *Traffic* **2009**, *10*, 1157–1167.
- [93] X.-P. Dong, X. Wang, H. Xu, *J. Neurochem.* **2010**, *113*, 313–328.
- [94] X.-P. Dong, X. Cheng, E. Mills, M. Delling, F. Wang, T. Kurz, H. Xu, *Nature* **2008**, *455*, 992–996.
- [95] J. L. Eichelsdoerfer, J. A. Evans, S. A. Slaugenhaupt, M. P. Cuajungco, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 34304–34308.
- [96] M. P. Cuajungco, J. Silva, A. Habibi, J. A. Valadez, *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* **2016**, *468*, 177–192.
- [97] L. Sun, Y. Hua, S. Vergarajauregui, H. I. Diab, R. Puertollano, *J. Immunol.* **2015**, *195*, 4922–4932.
- [98] E. Plesch, C.-C. Chen, E. Butz, A. Scotto Rosato, E. K. Krogsaeter, H. Yinan, K. Bartel, M. Keller, D. Robaa, D. Teupser, L. M. Holdt, A. M. Vollmar, W. Sippl, R. Puertollano, D. Medina, M. Biel, C. Wahl-Schott, F. Bracher, C. Grimm, *eLife* **2018**, *7*, e39720.
- [99] N. Rinkenberger, J. W. Schoggins, *mBio* **2018**, *9*, e02314–02317.
- [100] H. Xu, M. Delling, L. Li, X. Dong, D. E. Clapham, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104*, 18321–18326.
- [101] Y. Miao, G. Li, X. Zhang, H. Xu, Soman N. Abraham, *Cell* **2015**, *161*, 1306–1319.
- [102] X. Zhang, X. Li, H. Xu, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109*, 11384–11389.
- [103] M. Fine, P. Schmiede, X. Li, *Nature Commun.* **2018**, *9*, 4192.
- [104] C.-C. Chen, M. Keller, M. Hess, R. Schiffmann, N. Urban, A. Wolfgardt, M. Schaefer, F. Bracher, M. Biel, C. Wahl-Schott, C. Grimm, *Nature Commun.* **2014**, *5*, 4681.
- [105] M. Samie, X. Wang, X. Zhang, A. Goschka, X. Li, X. Cheng, E. Gregg, M. Azar, Y. Zhuo, Abigail G. Garrity, Q. Gao, S. Slaugenhaupt, J. Pickel, Sergey N. Zolov, Lois S. Weisman, Guy M. Lenk, S. Titus, M. Bryant-Genevier, N. Southall, M. Juan, M. Ferrer, H. Xu, *Dev. Cell* **2013**, *26*, 511–524.
- [106] D. Shen, X. Wang, X. Li, X. Zhang, Z. Yao, S. Dibble, X.-p. Dong, T. Yu, A. P. Lieberman, H. D. Showalter, H. Xu, **2012**, *3*, 731.

- [107] M. Li, W. K. Zhang, N. M. Benveniste, X. Zhou, D. Su, H. Li, S. Wang, I. E. Michailidis, L. Tong, X. Li, J. Yang, *Nat Struct Mol Biol* **2017**, *24*, 205–213.
- [108] S. Zhang, N. Li, W. Zeng, N. Gao, M. Yang, *Protein & Cell* **2017**.
- [109] M. Hirschi, M. A. Herzik Jr, J. Wie, Y. Suo, W. F. Borschel, D. Ren, G. C. Lander, S.-Y. Lee, *Nature* **2017**, *550*, 411–414.
- [110] Q. Chen, J. She, W. Zeng, J. Guo, H. Xu, X.-c. Bai, Y. Jiang, *Nature* **2017**, *550*, 415–418.
- [111] P. Schmiede, M. Fine, G. Blobel, X. Li, *Nature* **2017**, *550*, 366–370.
- [112] X. Zhou, M. Li, D. Su, Q. Jia, H. Li, X. Li, J. Yang, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2017**, *24*, 1146–1154.
- [113] M. Fine, X. Li, S. Dang, *Cell Calcium* **2020**, *86*, 102107.
- [114] P. Schmiede, M. Fine, X. Li, *The FEBS Journal* **2018**, *285*, 2579–2585.
- [115] K. K. Viet, A. Wagner, K. Schwickert, N. Hellwig, M. Brennich, N. Bader, T. Schirmeister, N. Morgner, H. Schindelin, U. A. Hellmich, *Structure* **2019**, *27*, 1246–1257.e1245.
- [116] H. J. Kim, Q. Li, S. Tjon-Kon-Sang, I. So, K. Kiselyov, A. A. Soyombo, S. Muallem, *The EMBO Journal* **2008**, *27*, 1197–1205.
- [117] M. C. Taylor, A. P. McLatchie, J. M. Kelly, *Mol. Microbiol.* **2013**, *89*, 420–432.
- [118] M. C. Taylor, J. M. Kelly, *Parasitology* **2010**, *137*, 899–917.
- [119] C. Grimm, K. Bartel, A. Vollmar, M. Biel, *Pharmaceuticals* **2018**, *11*, 4.
- [120] C. Grimm, M. P. Cuajungco, in *Pathologies of Calcium Channels* (Eds.: N. Weiss, A. Koschak), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2014**, pp. 365–379.
- [121] A. Riccio, A. D. Medhurst, C. Mattei, R. E. Kessel, A. R. Calver, A. D. Randall, C. D. Benham, M. N. Pangalos, *Mol. Brain Res.* **2002**, *109*, 95–104.
- [122] J. Abramowitz, L. Birnbaumer, *The FASEB Journal* **2009**, *23*, 297–328.
- [123] V. D. D'Agati, F. J. Kaskel, R. J. Falk, *N. Engl. J. Med.* **2011**, *365*, 2398–2411.
- [124] A. Dietrich, V. Chubanov, T. Gudermann, *J. Am. Soc. Nephrol.* **2010**, *21*, 736–744.
- [125] A. Dietrich, T. Gudermann, in *Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels: Volume I* (Eds.: B. Nilius, V. Flockerzi), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2014**, pp. 157–188.
- [126] N. Weissmann, A. Dietrich, B. Fuchs, H. Kalwa, M. Ay, R. Dumitrascu, A. Olschewski, U. Storch, M. Mederos y Schnitzler, H. A. Ghofrani, R. T. Schermuly, O. Pinkenburg, W. Seeger, F. Grimminger, T. Gudermann, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103*, 19093–19098.
- [127] N. Weissmann, A. Sydykov, H. Kalwa, U. Storch, B. Fuchs, M. Mederos y Schnitzler, R. P. Brandes, F. Grimminger, M. Meissner, M. Freichel, S. Offermanns, F. Veit, O. Pak, K.-H. Krause, R. T. Schermuly, A. C. Brewer, H. H. H. W. Schmidt, W. Seeger, A. M. Shah, T. Gudermann, H. A. Ghofrani, A. Dietrich, *Nature Commun.* **2012**, *3*, 649.
- [128] J. Song, Y. Wang, X. Li, Y. Shen, M. Yin, Y. Guo, L. Diao, Y. Liu, D. Yue, *Mol. Biol. Rep.* **2013**, *40*, 5115–5122.

- [129] I. Jardin, R. Diez-Bello, J. Lopez, P. Redondo, G. Salido, T. Smani, J. Rosado, *Cancers* **2018**, *10*, 331.
- [130] I. Jardin, G. M. Salido, J. A. Rosado, *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res.* **2020**, 118828.
- [131] A. Bouron, S. Chauvet, S. Dryer, J. A. Rosado, in *Calcium Entry Pathways in Non-excitable Cells* (Ed.: J. A. Rosado), Springer International Publishing, Cham, **2016**, pp. 201–249.
- [132] Q. Tang, W. Guo, L. Zheng, J.-X. Wu, M. Liu, X. Zhou, X. Zhang, L. Chen, *Cell Research* **2018**, *28*, 746–755.
- [133] R. Gaudet, *Mol. Biosyst.* **2008**, *4*, 372–379.
- [134] T. Hofmann, A. G. Obukhov, M. Schaefer, C. Harteneck, T. Gudermann, G. Schultz, *Nature* **1999**, *397*, 259–263.
- [135] M. Estacion, W. G. Sinkins, S. W. Jones, M. A. B. Applegate, W. P. Schilling, *J. Physiol.* **2006**, *572*, 359–377.
- [136] G. Owsianik, K. Talavera, T. Voets, B. Nilius, *Annu. Rev. Physiol.* **2006**, *68*, 685–717.
- [137] S. G. Rhee, *Annu. Rev. Biochem.* **2001**, *70*, 281–312.
- [138] Y. Kwon, T. Hofmann, C. Montell, *Mol. Cell* **2007**, *25*, 491–503.
- [139] P.-H. Tseng, H.-P. Lin, H. Hu, C. Wang, M. X. Zhu, C.-S. Chen, *Biochemistry* **2004**, *43*, 11701–11708.
- [140] Y. Ding, A. Winters, M. Ding, S. Graham, I. Akopova, S. Muallem, Y. Wang, J. H. Hong, Z. Gryczynski, S.-H. Yang, L. Birnbaumer, R. Ma, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 31799–31809.
- [141] S. Graham, M. Ding, Y. Ding, S. Sours-Brothers, R. Luchowski, Z. Gryczynski, T. Yorio, H. Ma, R. Ma, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 23466–23476.
- [142] R. Inoue, T. Okada, H. Onoue, Y. Hara, S. Shimizu, S. Naitoh, Y. Ito, Y. Mori, *Circ. Res.* **2001**, *88*, 325–332.
- [143] S. Jung, R. Strotmann, G. Schultz, T. D. Plant, *Am. J. Physiol.* **2002**, *282*, C347–C359.
- [144] S. Mieke, P. Crause, T. Schmidt, M. Löhn, H.-W. Kleemann, T. Licher, W. Dittrich, H. Rütten, C. Strübing, *PLOS ONE* **2012**, *7*, e35393.
- [145] N. Urban, K. Hill, L. Wang, W. M. Kuebler, M. Schaefer, *Cell Calcium* **2012**, *51*, 194–206.
- [146] S. Häfner, F. Burg, M. Kannler, N. Urban, P. Mayer, A. Dietrich, D. Trauner, J. Broichhagen, M. Schaefer, *ChemMedChem* **2018**, *13*, 1028–1035.
- [147] Y. Bai, X. Yu, H. Chen, D. Horne, R. White, X. Wu, P. Lee, Y. Gu, S. Ghimire-Rijal, D. C. H. Lin, X. Huang, *eLife* **2020**, *9*, e53311.
- [148] B. L. Lin, D. Matera, J. F. Doerner, N. Zheng, D. del Camino, S. Mishra, H. Bian, S. Zeveleva, X. Zhen, N. T. Blair, J. A. Chong, D. P. Hessler, D. Bedja, G. Zhu, G. K. Muller, M. J. Ranek, L. Pantages, M. McFarland, M. R. Netherton, A. Berry, D. Wong, G. Rast, H. S. Qian, S. M. Weldon, J. J. Kuo, A. Sauer, C. Sarko, M. M. Moran, D. A. Kass, S. S. Pullen, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2019**, *116*, 10156–10161.
- [149] T. Halgren, *Chem. Biol. Drug Des.* **2007**, *69*, 146–148.

- [150] Y. Yaxia, P. Jianfeng, L. Luhua, *Curr. Pharm. Des.* **2013**, *19*, 2326–2333.
- [151] S. B. Shuker, P. J. Hajduk, R. P. Meadows, S. W. Fesik, *Science* **1996**, *274*, 1531–1534.
- [152] V. L. Nienaber, P. L. Richardson, V. Klighofer, J. J. Bouska, V. L. Giranda, J. Greer, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 1105–1108.
- [153] X.-c. Bai, G. McMullan, S. H. W. Scheres, *Trends Biochem. Sci.* **2015**, *40*, 49–57.
- [154] D. Robinette, N. Neamati, K. B. Tomer, C. H. Borchers, *Expert Review of Proteomics* **2006**, *3*, 399–408.
- [155] E. Smith, I. Collins, *Future Medicinal Chemistry* **2015**, *7*, 159–183.
- [156] Y. Sadakane, Y. Hatanaka, *Anal. Sci.* **2006**, *22*, 209–218.
- [157] V. Chuang, M. Otagiri, *Molecules* **2013**, *18*, 13831.
- [158] Y. Hatanaka, *Chem. Pharm. Bull.* **2015**, *63*, 1–12.
- [159] J. Sumranjit, S. Chung, *Molecules* **2013**, *18*, 10425.
- [160] G. Dormán, G. D. Prestwich, *Trends Biotechnol.* **2000**, *18*, 64–77.
- [161] D. J. Lapinsky, *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 6237–6247.
- [162] A. Singh, E. R. Thornton, F. H. Westheimer, *J. Biol. Chem.* **1962**, *237*, PC3006–PC3008.
- [163] J. Das, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4405–4417.
- [164] O. Jahn, K. Eckart, H. Tezval, J. Spiess, *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *378*, 1031–1036.
- [165] J. Brunner, *Annu. Rev. Biochem.* **1993**, *62*, 483–514.
- [166] S. A. Fleming, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 12479–12520.
- [167] G. B. Schuster, M. S. Platz, in *Adv. Photochem.*, **1992**, pp. 69–143.
- [168] M. S. Rizk, X. Shi, M. S. Platz, *Biochemistry* **2006**, *45*, 543–551.
- [169] F. Kotzyba-Hibert, I. Kapfer, M. Goeldner, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1296–1312.
- [170] G. Dorman, G. D. Prestwich, *Biochemistry* **1994**, *33*, 5661–5673.
- [171] A. Blencowe, W. Hayes, *Soft Matter* **2005**, *1*, 178–205.
- [172] L. Dubinsky, B. P. Krom, M. M. Meijler, *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 554–570.
- [173] J. R. Hill, A. A. B. Robertson, *J. Med. Chem.* **2018**.
- [174] J. Brunner, H. Senn, F. M. Richards, *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 3313–3318.
- [175] J. P. Toscano, M. S. Platz, V. Nikolaev, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 4712–4713.
- [176] S.-S. Ge, B. Chen, Y.-Y. Wu, Q.-S. Long, Y.-L. Zhao, P.-Y. Wang, S. Yang, *RSC Advances* **2018**, *8*, 29428–29454.
- [177] C. A. Richards, S.-J. Kim, Y. Yamaguchi, H. F. Schaefer, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10104–10107.
- [178] R. R. Lucchese, H. F. Schaefer, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 6765–6766.
- [179] W. T. Borden, N. P. Gritsan, C. M. Hadad, W. L. Karney, C. R. Kemnitz, M. S. Platz, *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 765–771.

- [180] L. Wang, Y. Murai, T. Yoshida, A. Ishida, K. Masuda, Y. Sakihama, Y. Hashidoko, Y. Hatanaka, M. Hashimoto, *Org. Lett.* **2015**, *17*, 616–619.
- [181] A. B. Kumar, R. Manetsch, *Synth. Commun.* **2018**, *48*, 626–631.
- [182] K. A. Woll, K. A. Skinner, E. Gianti, N. V. Bhanu, B. A. Garcia, V. Carnevale, R. G. Eckenhoff, R. Gaudet, *Biophys. J.* **2017**, *113*, 2168–2172.
- [183] H. T. Ton, T. X. Phan, A. M. Abramyan, L. Shi, G. P. Ahern, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2017**, *114*, 3762–3767.
- [184] S. Leis, S. Schneider, M. Zacharias, *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 1550–1562.
- [185] J. L. Ludington, in *Fragment-Based Methods in Drug Discovery* (Ed.: A. E. Klon), Springer New York, New York, NY, **2015**, pp. 145–154.
- [186] A. K. Hamouda, D. C. Chiara, D. Sauls, J. B. Cohen, M. P. Blanton, *Biochemistry* **2006**, *45*, 976–986.
- [187] J. Brunner, F. M. Richards, *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 3319–3329.
- [188] R. Darbandi-Tonkabon, W. R. Hastings, C.-M. Zeng, G. Akk, B. D. Manion, J. R. Bracamontes, J. H. Steinbach, S. J. Mennerick, D. F. Covey, A. S. Evers, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 13196–13206.
- [189] K.-i. Fujita, Y. Takahashi, M. Owaki, K. Yamamoto, R. Yamaguchi, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2785–2788.
- [190] S. Kotha, V. R. Shah, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, *2008*, 1054–1064.
- [191] F. Y. Kwong, A. Klapars, S. L. Buchwald, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 581–584.
- [192] D. W. Old, J. P. Wolfe, S. L. Buchwald, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9722–9723.
- [193] M. S. Driver, J. F. Hartwig, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7217–7218.
- [194] Y. Yin, M. D. Cameron, L. Lin, S. Khan, T. Schröter, W. Grant, J. Pocas, Y. T. Chen, S. Schürer, A. Pachori, P. LoGrasso, Y. Feng, *ACS Med. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 175–179.
- [195] R. Meldola, F. W. Streatfeild, *J. Chem. Soc., Trans.*, **1895**, *67*, 907–913.
- [196] T. Wartmann, T. Lindel, *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, *2013*, 1649–1652.
- [197] S. Ueda, H. Nagasawa, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6411–6413.
- [198] M. J. Eichberg, R. L. Dorta, K. Lamottke, K. P. C. Vollhardt, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2479–2481.
- [199] E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 4504–4523.
- [200] P. G. M. Wuts, T. W. Greene, in *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, **2006**, pp. 696–926.
- [201] H. Edelsbrunner, M. Facello, F. Ping, L. Jie, in *Proceedings of the Twenty-Eighth Annual Hawaii International Conference on System Sciences, Vol. 5*, **1995**, pp. 256–264 vol.255.
- [202] S. Soga, H. Shirai, M. Kobori, N. Hirayama, *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, *47*, 400–406.
- [203] A. R. Ranade, L. Higgins, T. W. Markowski, N. Glaser, D. Kashin, R. Bai, K. H. Hong, E. Hamel, G. Höfle, G. I. Georg, *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 3499–3514.

- [204] M. Platz, A. S. Admasu, S. Kwiatkowski, P. J. Crocker, N. Imai, D. S. Watt, *Bioconjugate Chem.* **1991**, *2*, 337–341.
- [205] T. Seifert, M. Malo, J. Lengqvist, C. Sihlbom, E. M. Jarho, K. Luthman, *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 10794–10799.
- [206] J. García-Añoveros, T. Wiwatpanit, in *Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels: Volume I* (Eds.: B. Nilius, V. Flockerzi), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2014**, pp. 647–658.
- [207] O. S. Smart, J. G. Neduvilil, X. Wang, B. A. Wallace, M. S. P. Sansom, *J. Mol. Graph.* **1996**, *14*, 354–360.
- [208] C. Grimm, *Messenger* **2016**, *5*, 30–36.
- [209] J. A. Schreiber, S. L. Müller, S. E. Westphälinger, D. Schepmann, N. Strutz-Seebohm, G. Seebohm, B. Wünsch, *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *158*, 259–269.
- [210] G. Santoni, M. Santoni, F. Maggi, O. Marinelli, M. B. Morelli, *Frontiers in Oncology* **2020**, *10*.
- [211] D. A. Margarida, *Curr. Drug Targets* **2011**, *12*, 683–693.
- [212] M. A. Ashlock, E. R. Olson, *Annu. Rev. Med.* **2011**, *62*, 107–125.
- [213] D. Shen, X. Wang, X. Li, X. Zhang, Z. Yao, S. Dibble, X.-p. Dong, T. Yu, A. P. Lieberman, H. D. Showalter, H. Xu, *Nature Commun.* **2012**, *3*, 731.
- [214] J. Fotie, S. K. Ayer, B. S. Poudel, C. S. Reid, *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 7069–7073.
- [215] C. L. Forryan, O. V. Klymenko, C. M. Brennan, R. G. Compton, *J. Phys. Chem., B* **2005**, *109*, 8263–8269.
- [216] J. R. Dunetz, Y. Xiang, A. Baldwin, J. Ringling, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 5048–5051.
- [217] M. L. McIntosh, M. R. Naffziger, B. O. Ashburn, L. N. Zakharov, R. G. Carter, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 9204–9213.
- [218] J. Á. Rodríguez-Corrales, J. S. Josan, in *Proteomics for Drug Discovery: Methods and Protocols* (Eds.: I. M. Lazar, M. Kontoyianni, A. C. Lazar), Springer New York, New York, NY, **2017**, pp. 207–219.
- [219] K. Leuner, J. H. Heiser, S. Derksen, M. I. Mladenov, C. J. Fehske, R. Schubert, M. Gollasch, G. Schneider, C. Harteneck, S. S. Chatterjee, W. E. Müller, *Mol. Pharmacol.* **2010**, *77*, 368–377.
- [220] K. Leuner, V. Kazanski, M. Müller, K. Essin, B. Henke, M. Gollasch, C. Harteneck, W. E. Müller, *The FASEB Journal* **2007**, *21*, 4101–4111.
- [221] K. Leuner, W. Li, M. D. Amaral, S. Rudolph, G. Calfa, A. M. Schuwald, C. Harteneck, T. Inoue, L. Pozzo-Miller, *Hippocampus* **2013**, *23*, 40–52.
- [222] Y. Tai, S. Feng, R. Ge, W. Du, X. Zhang, Z. He, Y. Wang, *J. Cell Sci.* **2008**, *121*, 2301–2307.

- [223] J. Zhou, W. Du, K. Zhou, Y. Tai, H. Yao, Y. Jia, Y. Ding, Y. Wang, *Nat. Neurosci.* **2008**, *11*, 741.
- [224] K. Linde, M. M. Berner, L. Kriston, *Cochrane Database of Systematic Reviews* **2008**.
- [225] L. Beerhues, *Phytochemistry* **2006**, *67*, 2201–2207.
- [226] S. Sawamura, M. Hatano, Y. Takada, K. Hino, T. Kawamura, J. Tanikawa, H. Nakagawa, H. Hase, A. Nakao, M. Hirano, R. Rotrattanadumrong, S. Kiyonaka, M. X. Mori, M. Nishida, Y. Hu, R. Inoue, R. Nagata, Y. Mori, *Mol. Pharmacol.* **2016**.
- [227] S. Häfner, N. Urban, M. Schaefer, *Cell Calcium* **2019**, *78*, 26–34.
- [228] W. J. G. Donnelly, P. V. R. Shannon, *J. Chem. Soc. C* **1970**, 524–530.
- [229] T. Meikle, R. Stevens, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1978**, 1303–1312.
- [230] A. Gissot, A. Wagner, C. Mioskowski, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 6807–6812.
- [231] I. C. Nogueira, J. R. Pliego, *Comput. Theor. Chem.* **2018**, *1138*, 117–122.
- [232] W. D. Curtis, J. F. Stoddart, G. H. Jones, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1977**, 785–788.
- [233] N. Kornblum, P. J. Berrigan, W. J. le Noble, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 1257–1258.
- [234] N. Kornblum, R. Seltzer, P. Haberfield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 1148–1154.
- [235] N. Kornblum, P. J. Berrigan, W. J. Le Noble, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 1141–1147.
- [236] I. C. Nogueira, J. R. Pliego Jr, *J. Phys. Org. Chem.* **2019**, *32*, e3947.
- [237] J. G. Topliss, *J. Med. Chem.* **1972**, *15*, 1006–1011.
- [238] J. G. Topliss, *J. Med. Chem.* **1977**, *20*, 463–469.
- [239] D. Thon, Bachelor Thesis, Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg
- [240] B. Zhou, K. H. Hong, M. Ji, J. Cai, *Chem. Biol. Drug Des.* **2018**, *92*, 1597–1609.
- [241] A. Leonardi, D. Barlocco, G. Motta, R. Testa, Patent *WO 2001/005765*, **2004**.
- [242] C. Mamat, M. Pretze, M. Gott, M. Köckerling, *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, *12*, 2478–2489.
- [243] R. Wodtke, J. Steinberg, M. Köckerling, R. Löser, C. Mamat, *RSC Advances* **2018**, *8*, 40921–40933.
- [244] R. H. S. Westerink, A. G. Ewing, *Acta Physiol.* **2008**, *192*, 273–285.
- [245] E. Sullivan, E. M. Tucker, I. L. Dale, in *Calcium Signaling Protocols* (Ed.: D. G. Lambert), Humana Press, Totowa, NJ, **1999**, pp. 125–133.
- [246] I. Vetter, in *Calcium Signaling* (Ed.: M. S. Islam), Springer Netherlands, Dordrecht, **2012**, pp. 45–82.
- [247] A. Ciechanover, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5944–5967.
- [248] J. Myung, K. B. Kim, C. M. Crews, *Med. Res. Rev.* **2001**, *21*, 245–273.
- [249] I. Amm, T. Sommer, D. H. Wolf, *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res.* **2014**, *1843*, 182–196.
- [250] J. Tyedmers, A. Mogk, B. Bukau, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 777–788.
- [251] D. Finley, *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, *78*, 477–513.
- [252] P. M. Cromm, C. M. Crews, *ACS Central Science* **2017**, *3*, 830–838.

- [253] M. H. Glickman, A. Ciechanover, *Physiol. Rev.* **2002**, *82*, 373–428.
- [254] E. K. Fredrickson, R. G. Gardner, *Seminars in Cell & Developmental Biology* **2012**, *23*, 530–537.
- [255] D. Komander, M. Rape, *Annu. Rev. Biochem.* **2012**, *81*, 203–229.
- [256] A. L. Goldberg, *Nature* **2003**, *426*, 895–899.
- [257] Y. Yang, Y. Xiaodan, *The FASEB Journal* **2003**, *17*, 790–799.
- [258] R. Yau, M. Rape, *Nat. Cell Biol.* **2016**, *18*, 579–586.
- [259] J. Adams, *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 349–360.
- [260] S. Bhattacharyya, H. Yu, C. Mim, A. Matouschek, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15*, 122–133.
- [261] D. Voges, a. P. Zwickl, W. Baumeister, *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, *68*, 1015–1068.
- [262] P. Brooks, G. Fuertes, R. Z. Murray, S. Bose, E. Knecht, M. C. Rechsteiner, K. B. Hendil, K. Tanaka, J. Dyson, J. Rivett, *Biochem. J.* **2000**, *346 Pt 1*, 155–161.
- [263] W. Baumeister, J. Walz, F. Zühl, E. Seemüller, *Cell* **1998**, *92*, 367–380.
- [264] J.-M. Peters, Z. Cejka, J. R. Harris, J. A. Kleinschmidt, W. Baumeister, *J. Mol. Biol.* **1993**, *234*, 932–937.
- [265] M. Groll, M. Bochtler, H. Brandstetter, T. Clausen, R. Huber, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 222–256.
- [266] M. Groll, L. Ditzel, J. Löwe, D. Stock, M. Bochtler, H. D. Bartunik, R. Huber, *Nature* **1997**, *386*, 463–471.
- [267] X. Huang, B. Luan, J. Wu, Y. Shi, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2016**, *23*, 778–785.
- [268] S. Murata, H. Yashiroda, K. Tanaka, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, *10*, 104–115.
- [269] Matthias Bochtler, Lars Ditzel, Michael Groll, a. Claudia Hartmann, R. Huber, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1999**, *28*, 295–317.
- [270] M. Groll, M. Bajorek, A. Köhler, L. Moroder, D. M. Rubin, R. Huber, M. H. Glickman, D. Finley, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 1062–1067.
- [271] C. S. Arendt, M. Hochstrasser, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1997**, *94*, 7156–7161.
- [272] A. F. Kisselev, T. N. Akopian, V. Castillo, A. L. Goldberg, *Mol. Cell* **1999**, *4*, 395–402.
- [273] E. M. Huber, G. de Bruin, W. Heinemeyer, G. Paniagua Soriano, H. S. Overkleeft, M. Groll, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 7835–7842.
- [274] A. F. Kisselev, T. N. Akopian, K. M. Woo, A. L. Goldberg, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 3363–3371.
- [275] A. K. Nussbaum, T. P. Dick, W. Keilholz, M. Schirle, S. Stevanović, K. Dietz, W. Heinemeyer, M. Groll, D. H. Wolf, R. Huber, H.-G. Rammensee, H. Schild, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, *95*, 12504–12509.
- [276] B. M. Stadtmueller, C. P. Hill, *Mol. Cell* **2011**, *41*, 8–19.

- [277] K. Sadre-Bazzaz, F. G. Whitby, H. Robinson, T. Formosa, C. P. Hill, *Mol. Cell* **2010**, *37*, 728–735.
- [278] A. Förster, E. I. Masters, F. G. Whitby, H. Robinson, C. P. Hill, *Mol. Cell* **2005**, *18*, 589–599.
- [279] M. H. Glickman, D. M. Rubin, O. Coux, I. Wefes, G. Pfeifer, Z. Cjeka, W. Baumeister, V. A. Fried, D. Finley, *Cell* **1998**, *94*, 615–623.
- [280] R. Verma, L. Aravind, R. Oania, W. H. McDonald, J. R. Yates, E. V. Koonin, R. J. Deshaies, *Science* **2002**, *298*, 611–615.
- [281] E. M. Huber, W. Heinemeyer, X. Li, C. S. Arendt, M. Hochstrasser, M. Groll, *Nature Commun.* **2016**, *7*, 10900.
- [282] K. Tanoka, M. Kasahara, *Immunological Reviews* **1998**, *163*, 161–176.
- [283] M. Groettrup, C. J. Kirk, M. Basler, *Nat. Rev. Immunol.* **2010**, *10*, 73–78.
- [284] B. L. Zerfas, M. E. Maresh, D. J. Trader, *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 1841–1858.
- [285] H. Kimura, P. Caturegli, M. Takahashi, K. Suzuki, *J. Immunol. Res.* **2015**, *2015*, 541984.
- [286] K. L. Rock, I. A. York, A. L. Goldberg, *Nat. Immunol.* **2004**, *5*, 670–677.
- [287] P. M. Kloetzel, *Nat. Immunol.* **2004**, *5*, 661–669.
- [288] M. Basler, C. J. Kirk, M. Groettrup, *Curr. Opin. Immunol.* **2013**, *25*, 74–80.
- [289] S. Heink, D. Ludwig, P.-M. Kloetzel, E. Krüger, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 9241–9246.
- [290] S. Murata, Y. Takahama, M. Kasahara, K. Tanaka, *Nat. Immunol.* **2018**, *19*, 923–931.
- [291] S. Murata, K. Sasaki, T. Kishimoto, S.-i. Niwa, H. Hayashi, Y. Takahama, K. Tanaka, *Science* **2007**, *316*, 1349–1353.
- [292] K. Sasaki, K. Takada, Y. Ohte, H. Kondo, H. Sorimachi, K. Tanaka, Y. Takahama, S. Murata, *Nature Commun.* **2015**, *6*, 7484.
- [293] E. M. Huber, M. Groll, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 8708–8720.
- [294] E. E. Manasanch, R. Z. Orlowski, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2017**, *14*, 417.
- [295] L. J. Crawford, B. Walker, A. E. Irvine, *Journal of Cell Communication and Signaling* **2011**, *5*, 101–110.
- [296] S. Luqman, J. M. Pezzuto, *Phytother. Res.* **2010**, *24*, 949–963.
- [297] Z. Lu, T. Hunter, *Cell Cycle* **2010**, *9*, 2342–2352.
- [298] M. Bazzaro, M. K. Lee, A. Zoso, W. L. H. Stirling, A. Santillan, I.-M. Shih, R. B. S. Roden, *Cancer Res.* **2006**, *66*, 3754–3763.
- [299] P. Beck, C. Dubiella, M. Groll, *Vol. 393*, **2012**, p. 1101.
- [300] D. J. Sherman, J. Li, *Molecules* **2020**, *25*, 671.
- [301] T. Jung, B. Catalgol, T. Grune, *Molecular Aspects of Medicine* **2009**, *30*, 191–296.

- [302] S. D. Demo, C. J. Kirk, M. A. Aujay, T. J. Buchholz, M. Dajee, M. N. Ho, J. Jiang, G. J. Laidig, E. R. Lewis, F. Parlati, K. D. Shenk, M. S. Smyth, C. M. Sun, M. K. Vallone, T. M. Woo, C. J. Molineaux, M. K. Bennett, *Cancer Res.* **2007**, *67*, 6383–6391.
- [303] E. Kupperman, E. C. Lee, Y. Cao, B. Bannerman, M. Fitzgerald, A. Berger, J. Yu, Y. Yang, P. Hales, F. Bruzzese, J. Liu, J. Blank, K. Garcia, C. Tsu, L. Dick, P. Fleming, L. Yu, M. Manfredi, M. Rolfe, J. Bolen, *Cancer Res.* **2010**, *70*, 1970–1980.
- [304] B. D. Dorsey, M. Iqbal, S. Chatterjee, E. Menta, R. Bernardini, A. Bernareggi, P. G. Cassarà, G. D’Arasmo, E. Ferretti, S. De Munari, A. Oliva, G. Pezzoni, C. Allievi, I. Streponi, B. Ruggeri, M. A. Ator, M. Williams, J. P. Mallamo, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 1068–1072.
- [305] H.-J. Zhou, M. A. Aujay, M. K. Bennett, M. Dajee, S. D. Demo, Y. Fang, M. N. Ho, J. Jiang, C. J. Kirk, G. J. Laidig, E. R. Lewis, Y. Lu, T. Muchamuel, F. Parlati, E. Ring, K. D. Shenk, J. Shields, P. J. Shwonek, T. Stanton, C. M. Sun, C. Sylvain, T. M. Woo, J. Yang, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 3028–3038.
- [306] R. H. Feling, G. O. Buchanan, T. J. Mincer, C. A. Kauffman, P. R. Jensen, W. Fenical, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 355–357.
- [307] D. Chauhan, L. Catley, G. Li, K. Podar, T. Hideshima, M. Velankar, C. Mitsiades, N. Mitsiades, H. Yasui, A. Letai, H. Ovaa, C. Berkers, B. Nicholson, T.-H. Chao, S. T. C. Neuteboom, P. Richardson, M. A. Palladino, K. C. Anderson, *Cancer Cell* **2005**, *8*, 407–419.
- [308] N. Basse, S. Piguél, D. Papapostolou, A. Ferrier-Berthelot, N. Richy, M. Pagano, P. Sarthou, J. Sobczak-Thépot, M. Reboud-Ravaux, J. Vidal, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 2842–2850.
- [309] J. F. Lynas, P. Harriott, A. Healy, M. A. McKerverey, B. Walker, *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *8*, 373–378.
- [310] J. Clerc, M. Groll, D. J. Illich, A. S. Bachmann, R. Huber, B. Schellenberg, R. Dudler, M. Kaiser, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 6507–6512.
- [311] M. Bogyo, J. S. McMaster, M. Gaczynska, D. Tortorella, A. L. Goldberg, H. Ploegh, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1997**, *94*, 6629–6634.
- [312] R. C. Kane, A. T. Farrell, R. Sridhara, R. Pazdur, *Clin. Canc. Res.* **2006**, *12*, 2955–2960.
- [313] R. C. Kane, R. Dagher, A. Farrell, C.-W. Ko, R. Sridhara, R. Justice, R. Pazdur, *Clin. Canc. Res.* **2007**, *13*, 5291–5294.
- [314] J. Adams, M. Behnke, S. Chen, A. A. Cruickshank, L. R. Dick, L. Grenier, J. M. Klunder, Y.-T. Ma, L. Plamondon, R. L. Stein, *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *8*, 333–338.
- [315] M. Groll, C. R. Berkers, H. L. Ploegh, H. Ovaa, *Structure* **2006**, *14*, 451–456.
- [316] W. Harshbarger, C. Miller, C. Diedrich, J. Sacchettini, *Structure* **2015**, *23*, 418–424.
- [317] M. Groll, K. B. Kim, N. Kairies, R. Huber, C. M. Crews, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1237–1238.

- [318] J. Schrader, F. Henneberg, R. A. Mata, K. Tittmann, T. R. Schneider, H. Stark, G. Bourenkov, A. Chari, *Science* **2016**, *353*, 594–598.
- [319] P. Moreau, *Expert Review of Hematology* **2014**, *7*, 265–290.
- [320] D. J. Kuhn, Q. Chen, P. M. Voorhees, J. S. Strader, K. D. Shenk, C. M. Sun, S. D. Demo, M. K. Bennett, F. W. B. van Leeuwen, A. A. Chanan-Khan, R. Z. Orlowski, *Blood* **2007**, *110*, 3281–3290.
- [321] D. Chauhan, Z. Tian, B. Zhou, D. Kuhn, R. Orlowski, N. Raje, P. Richardson, K. C. Anderson, *Clin. Canc. Res.* **2011**, *17*, 5311–5321.
- [322] V. R. Macherla, S. S. Mitchell, R. R. Manam, K. A. Reed, T.-H. Chao, B. Nicholson, G. Deyanat-Yazdi, B. Mai, P. R. Jensen, W. F. Fenical, S. T. C. Neuteboom, K. S. Lam, M. A. Palladino, B. C. M. Potts, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 3684–3687.
- [323] B. C. Potts, M. X. Albitar, K. C. Anderson, S. Baritaki, C. Berkers, B. Bonavida, J. Chandra, D. Chauhan, J. C. Cusack, W. Fenical, I. M. Ghobrial, M. Groll, P. R. Jensen, K. S. Lam, G. K. Lloyd, W. McBride, D. J. McConkey, C. P. Miller, S. T. C. Neuteboom, Y. Oki, H. Ovaa, F. Pajonk, P. G. Richardson, A. M. Roccaro, C. M. Sloss, M. A. Spear, E. Valashi, A. Younes, M. A. Palladino, *Curr. Cancer Drug Targets* **2011**, *11*, 254–284.
- [324] M. J. Williamson, J. L. Blank, F. J. Bruzzese, Y. Cao, J. S. Daniels, L. R. Dick, J. Labutti, A. M. Mazzola, A. D. Patil, C. L. Reimer, M. S. Solomon, M. Stirling, Y. Tian, C. A. Tsu, G. S. Weatherhead, J. X. Zhang, M. Rolfe, *Mol. Cancer Ther.* **2006**, *5*, 3052–3061.
- [325] M. Groll, R. Huber, B. C. M. Potts, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5136–5141.
- [326] R. R. Manam, K. A. McArthur, T.-H. Chao, J. Weiss, J. A. Ali, V. J. Palombella, M. Groll, G. K. Lloyd, M. A. Palladino, S. T. C. Neuteboom, V. R. Macherla, B. C. M. Potts, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 6711–6724.
- [327] J. Lowe, D. Stock, B. Jap, P. Zwickl, W. Baumeister, R. Huber, *Science* **1995**, *268*, 533–539.
- [328] A. F. Kisselev, A. L. Goldberg, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 739–758.
- [329] L. J. A. Crawford, B. Walker, H. Ovaa, D. Chauhan, K. C. Anderson, T. C. M. Morris, A. E. Irvine, *Cancer Res.* **2006**, *66*, 6379–6386.
- [330] M. A. Gräwert, N. Gallastegui, M. Stein, B. Schmidt, P.-M. Kloetzel, R. Huber, M. Groll, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 542–544.
- [331] L. Borissenko, M. Groll, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 687–717.
- [332] G. Kaur, S. Batra, *Immunology & Cell Biology* **2016**, *94*, 812–820.
- [333] T. Muchamuel, M. Basler, M. A. Aujay, E. Suzuki, K. W. Kalim, C. Lauer, C. Sylvain, E. R. Ring, J. Shields, J. Jiang, P. Shwonek, F. Parlati, S. D. Demo, M. K. Bennett, C. J. Kirk, M. Groettrup, *Nat. Med. (N. Y., NY, U. S.)* **2009**, *15*, 781–787.
- [334] J. Koerner, T. Brunner, M. Groettrup, *Oncotarget* **2017**, *8*.

- [335] Eva M. Huber, M. Basler, R. Schwab, W. Heinemeyer, Christopher J. Kirk, M. Groettrup, M. Groll, *Cell* **2012**, *148*, 727–738.
- [336] C. Dubiella, R. Baur, H. Cui, E. M. Huber, M. Groll, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 15888–15891.
- [337] H. W. B. Johnson, E. Lowe, J. L. Anderl, A. Fan, T. Muchamuel, S. Bowers, D. C. Moebius, C. Kirk, D. L. McMinn, *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 11127–11143.
- [338] J. Li, T. Yakushi, F. Parlati, A. L. Mackinnon, C. Perez, Y. Ma, K. P. Carter, S. Colayco, G. Magnuson, B. Brown, K. Nguyen, S. Vasile, E. Suyama, L. H. Smith, E. Sergienko, A. B. Pinkerton, T. D. Y. Chung, A. E. Palmer, I. Pass, S. Hess, S. M. Cohen, R. J. Deshaies, *Nat. Chem. Biol.* **2017**, *13*, 486–493.
- [339] L. R. Dick, P. E. Fleming, *Drug Discovery Today* **2010**, *15*, 243–249.
- [340] N. Yin, J. Pei, L. Lai, *Mol. BioSyst.* **2013**, *9*, 1381–1389.
- [341] G. Vauquelin, *Br. J. Pharmacol.* **2016**, *173*, 2319–2334.
- [342] J. Singh, R. C. Petter, T. A. Baillie, A. Whitty, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2011**, *10*, 307–317.
- [343] J. S. Martin, C. J. MacKenzie, D. Fletcher, I. H. Gilbert, *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, *27*, 2066–2074.
- [344] S. Royo, S. Rodríguez, T. Schirmeister, J. Kesselring, M. Kaiser, F. V. González, *ChemMedChem* **2015**, *10*, 1484–1487.
- [345] J. T. Palmer, D. Rasnick, J. L. Klaus, D. Bromme, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 3193–3196.
- [346] S. Jung, Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz (Mainz), **2018**.
- [347] A. Latorre, T. Schirmeister, J. Kesselring, S. Jung, P. Johé, U. A. Hellmich, A. Heilos, B. Engels, R. L. Krauth-Siegel, N. Dirdjaja, L. Bou-Iserte, S. Rodríguez, F. V. González, *ACS Med. Chem. Lett.* **2016**, *7*, 1073–1076.
- [348] Y. Ma, L. Li, S. He, C. Shang, Y. Sun, N. Liu, T. D. Meek, Y. Wang, L. Shang, *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 6146–6162.
- [349] T. Fischer, Masterarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz (Mainz), **2017**.
- [350] T. Schirmeister, J. Kesselring, S. Jung, T. H. Schneider, A. Weickert, J. Becker, W. Lee, D. Bamberger, P. R. Wich, U. Distler, S. Tenzer, P. Johé, U. A. Hellmich, B. Engels, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 8332–8335.
- [351] P. A. Jackson, J. C. Widen, D. A. Harki, K. M. Brummond, *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 839–885.
- [352] J. M. Strelow, *SLAS DISCOVERY: Advancing the Science of Drug Discovery* **2017**, *22*, 3–20.
- [353] S. Ludewig, M. Kossner, M. Schiller, K. Baumann, T. Schirmeister, *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, *10*, 368–382.
- [354] T. Schirmeister, J. Schmitz, S. Jung, T. Schmenger, R. L. Krauth-Siegel, M. Gütschow, *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *27*, 45–50.

- [355] Y. D. Ward, D. S. Thomson, L. L. Frye, C. L. Cywin, T. Morwick, M. J. Emmanuel, R. Zindell, D. McNeil, Y. Bekkali, M. Hrapchak, M. DeTuri, K. Crane, D. White, S. Pav, Y. Wang, M.-H. Hao, C. A. Grygon, M. E. Labadia, D. M. Freeman, W. Davidson, J. L. Hopkins, M. L. Brown, D. M. Spero, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 5471–5482.
- [356] B. GmbH, FlexX/LeadIT BioSolveIT GmbH, Version 2.3.2, Sankt Augustin, Germany, **2017**.
- [357] C. C. Group, Molecular Operating Environment (MOE), Chemical Computing Group, 2019.01, 1010 Sherbrooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, **2019**.
- [358] M. Meta, Masterarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz (Mainz), **2019**.
- [359] L. J. Milo, J. H. Lai, W. Wu, Y. Liu, H. Maw, Y. Li, Z. Jin, Y. Shu, S. E. Poplawski, Y. Wu, D. G. Sanford, J. L. Sudmeier, W. W. Bachovchin, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 4365–4377.
- [360] R. Spina, E. Colacino, J. Martinez, F. Lamaty, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 3817–3821.
- [361] A. Ho, K. Cyrus, K.-B. Kim, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, *2005*, 4829–4834.
- [362] M. Goodman, W. J. McGahren, *Tetrahedron* **1967**, *23*, 2031–2050.
- [363] Y. Yang, in *Side Reactions in Peptide Synthesis* (Ed.: Y. Yang), Academic Press, Oxford, **2016**, pp. 257–292.
- [364] N. L. Benoiton, F. M. F. Chen, *Can. J. Chem.* **1981**, *59*, 384–389.
- [365] J. H. Jones, M. J. Witty, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1979**, 3203–3206.
- [366] L. A. Carpino, A. El-Faham, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 695–698.
- [367] J. Kaeobamrung, M. C. Kozlowski, J. W. Bode, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107*, 20661–20665.
- [368] K. Kobayashi, T. Narumi, S. Oishi, H. Ohno, N. Fujii, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 4626–4629.
- [369] M. A. Blanchette, W. Choy, J. T. Davis, A. P. Essensfeld, S. Masamune, W. R. Roush, T. Sakai, *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 2183–2186.
- [370] O. Kühl, in *Phosphorus-31 NMR Spectroscopy: A Concise Introduction for the Synthetic Organic and Organometallic Chemist* (Ed.: O. Kühl), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2008**, pp. 7–23.
- [371] A. V. Chemagin, N. V. Yashin, Y. K. Grishin, T. S. Kuznetsova, N. S. Zefirov, *Synthesis* **2010**, *2010*, 259–266.
- [372] S. Opekar, R. Pohl, P. Beran, L. Rulišek, P. Beier, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 1453–1458.
- [373] B.-T. Xin, G. de Bruin, M. Verdoes, D. V. Filippov, G. A. van der Marel, H. S. Overkleeft, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 5710–5718.
- [374] J.-A. Fehrentz, B. Castro, *Synthesis* **1983**, *1983*, 676–678.
- [375] R. M. Miller, J. Taunton, in *Methods Enzymol., Vol. 548* (Ed.: K. M. Shokat), Academic Press, **2014**, pp. 93–116.
- [376] F. Benedetti, F. Berti, P. Campaner, L. Fanfoni, N. Demitri, F. M. Olajuyigbe, M. De March, S. Geremia, *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, *5*, 968–972.

- [377] T. Yamaguchi-Sasaki, Y. Tamura, Y. Ogata, T. Kawaguchi, J. Kurosaka, Y. Sugaya, K. Iwakiri, T. Busujima, R. Takahashi, N. Ueda-Yonemoto, E. Tanigawa, T. Abe-Kumasaka, H. Sugiyama, K. Kanuma, *Chem. Pharm. Bull.* **2020**, *68*, 345–362.
- [378] X. Zeng, S. Liu, G. B. Hammond, B. Xu, *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 11977–11981.
- [379] E. Ko, J. Liu, L. M. Perez, G. Lu, A. Schaefer, K. Burgess, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 462–477.
- [380] S. Ohira, *Synth. Commun.* **1989**, *19*, 561–564.
- [381] G. J. Roth, B. Liepold, S. G. Müller, H. J. Bestmann, *Synthesis* **2004**, *2004*, 59–62.
- [382] J. E. Baldwin, R. C. Thomas, L. I. Kruse, L. Silberman, *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 3846–3852.
- [383] P. Bunse, E.-U. Würthwein, B. Wünsch, *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, *2018*, 1806–1812.
- [384] R. Kazem Shiroodi, V. Gevorgyan, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4991–5001.
- [385] J. Jiang, Y. Liu, C. Hou, Y. Li, Z. Luan, C. Zhao, Z. Ke, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 3558–3563.
- [386] S. Hase, Y. Kayaki, T. Ikariya, *Organometallics* **2013**, *32*, 5285–5288.
- [387] G. Haufe, *J. Prakt. Chem.* **1996**, *338*, 99–113.
- [388] O. E. Okoromoba, J. Han, G. B. Hammond, B. Xu, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 14381–14384.
- [389] M.-H. Yang, S. S. Matikonda, R. A. Altman, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 3894–3897.
- [390] R. Ettari, C. Bonaccorso, N. Micale, C. Heindl, T. Schirmeister, M. L. Calabrò, S. Grasso, M. Zappalà, *ChemMedChem* **2011**, *6*, 1228–1237.
- [391] C. Yung-Chi, W. H. Prusoff, *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22*, 3099–3108.
- [392] L. G. Ferreira, R. N. Dos Santos, G. Oliva, A. D. Andricopulo, *Molecules* **2015**, *20*, 13384–13421.
- [393] X.-Y. Meng, H. Zhang, M. Mezei, M. Cui, *Curr. Comput.-Aided Drug Des.* **2011**, *7* 2, 146–157.
- [394] C. Sottriffer, *Molecular Informatics* **2018**, *37*, 1800062.
- [395] G. Klebe, H.-J. Böhm, *J. Recept. Signal Transduction* **1997**, *17*, 459–473.
- [396] R. G. Pearson, *Coord. Chem. Rev.* **1990**, *100*, 403–425.
- [397] R. M. LoPachin, T. Gavin, A. DeCaprio, D. S. Barber, *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25*, 239–251.
- [398] N. Fuchs, M. Meta, D. Schuppan, L. Nuhn, T. Schirmeister, *Cells* **2020**, *9*, 2021.
- [399] W. Rut, K. Groborz, L. Zhang, X. Sun, M. Zmudzinski, B. Pawlik, X. Wang, D. Jochmans, J. Neyts, W. Młynarski, R. Hilgenfeld, M. Drag, *Nat. Chem. Biol.* **2020**.
- [400] M. E. Flanagan, J. A. Abramite, D. P. Anderson, A. Aulabaugh, U. P. Dahal, A. M. Gilbert, C. Li, J. Montgomery, S. R. Oppenheimer, T. Ryder, B. P. Schuff, D. P. Uccello, G. S. Walker, Y. Wu, M. F. Brown, J. M. Chen, M. M. Hayward, M. C. Noe, R. S. Obach, L.

- Philippe, V. Shanmugasundaram, M. J. Shapiro, J. Starr, J. Stroh, Y. Che, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 10072–10079.
- [401] M. W. Walter, A. Felici, M. Galleni, R. P. Soto, R. M. Adlington, J. E. Baldwin, J.-M. Frère, M. Gololobov, C. J. Schofield, *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *6*, 2455–2458.
- [402] I. Ruppert, K. Schlich, W. Volbach, *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 2195–2198.
- [403] G. K. S. Prakash, A. K. Yudin, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 757–786.
- [404] L. Newman, J. Rowley, S. Vander Hoorn, N. S. Wijesooriya, M. Unemo, N. Low, G. Stevens, S. Gottlieb, J. Kiarie, M. Temmerman, *PLOS ONE* **2015**, *10*, e0143304.
- [405] J. F. Peipert, *N. Engl. J. Med.* **2003**, *349*, 2424–2430.
- [406] W. W. Andrews, R. L. Goldenberg, B. Mercer, J. Iams, P. Meis, A. Moawad, A. Das, J. P. VanDorsten, S. N. Caritis, G. Thurnau, M. Miodovnik, J. Roberts, D. McNellis, *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2000**, *183*, 662–668.
- [407] M. J. Burton, D. C. W. Mabey, *PLOS Neglected Tropical Diseases* **2009**, *3*, e460.
- [408] F. A. Plummer, J. N. Simonsen, D. W. Cameron, J. O. Ndinya-Achola, J. K. Kreiss, M. N. Gakinya, P. Waiyaki, M. Cheang, P. Piot, A. R. Ronald, E. N. Ngugi, *J. Infect. Dis.* **1991**, *163*, 233–239.
- [409] WHO, *WHO guidelines for the treatment of Chlamydia trachomatis*, WHO Document Production Services, Genf, **2016**.
- [410] K. M. Sandoz, D. D. Rockey, *Future Microbiology* **2010**, *5*, 1427–1442.
- [411] D. Vucic, V. M. Dixit, I. E. Wertz, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2011**, *12*, 439–452.
- [412] J. E. Corn, D. Vucic, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2014**, *21*, 297–300.
- [413] S. Misaghi, Z. R. Balsara, A. Catic, E. Spooner, H. L. Ploegh, M. N. Starnbach, *Mol. Microbiol.* **2006**, *61*, 142–150.
- [414] Jonathan N. Pruneda, Charlotte H. Durkin, Paul P. Geurink, H. Ovaa, B. Santhanam, David W. Holden, D. Komander, *Mol. Cell* **2016**, *63*, 261–276.
- [415] Y. A. Ramirez, T. B. Adler, E. Altmann, T. Klemm, C. Tiesmeyer, F. Sauer, S. G. Kathman, A. V. Statsyuk, C. Sotriffer, C. Kisker, *ChemMedChem* **2018**, *13*, 2014–2023.
- [416] G. Le Negrate, A. Krieg, B. Faustin, M. Loeffler, A. Godzik, S. Krajewski, J. C. Reed, *Cell. Microbiol.* **2008**, *10*, 1879–1892.
- [417] A. Fischer, K. S. Harrison, Y. Ramirez, D. Auer, S. R. Chowdhury, B. K. Prusty, F. Sauer, Z. Dimond, C. Kisker, P. S. Hefty, T. Rudel, *eLife* **2017**, *6*, e21465.
- [418] Y. A. Ramirez, Dissertation, Julius-Maximilians-Universität Würzburg (Würzburg), **2019**.
- [419] N. D. Rawlings, M. Waller, A. J. Barrett, A. Bateman, *Nucleic Acids Res.* **2013**, *42*, D503–D509.
- [420] J. B. Alan, D. R. Neil, *Biol. Chem.* **2001**, *382*, 727–734.

- [421] P. Grosche, F. Sirockin, A. Mac Sweeney, P. Ramage, P. Erbel, S. Melkko, A. Bernardi, N. Hughes, D. Ellis, K. D. Combrink, N. Jarousse, E. Altmann, *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *25*, 438–443.
- [422] A. Mac Sweeney, P. Grosche, D. Ellis, K. Combrink, P. Erbel, N. Hughes, F. Sirockin, S. Melkko, A. Bernardi, P. Ramage, N. Jarousse, E. Altmann, *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, *5*, 937–941.
- [423] H. Gilman, P. R. v. Ess, *J. Am. Chem. Soc.* **1933**, *55*, 1258–1261.
- [424] S. Nahm, S. M. Weinreb, *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 3815–3818.
- [425] J. E. Campbell, K. W. Duncan, M. A. Foley, D. M. Harvey, K. W. Kuntz, J. E. J. Mills, M. J. Munchhof, Patent *WO 2017/181177*, **2017**.
- [426] D. L. Buckley, I. Van Molle, P. C. Gareiss, H. S. Tae, J. Michel, D. J. Noblin, W. L. Jorgensen, A. Ciulli, C. M. Crews, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 4465–4468.
- [427] Z. Zhang, S. Sun, V. Kodumuru, D. Hou, S. Liu, N. Chakka, S. Sviridov, S. Chowdhury, D. G. McLaren, L. G. Ratkay, K. Khakh, X. Cheng, H. W. Gschwend, R. Kamboj, J. Fu, M. D. Winther, *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 568–583.
- [428] B. Askari, H. Amiri Rudbari, N. Micale, T. Schirmeister, T. Efferth, E.-J. Seo, G. Bruno, K. Schwickert, *Dalton Trans.* **2019**, *48*, 15869–15887.
- [429] L. Kelland, *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 573–584.
- [430] B. A. Chabner, T. G. Roberts, *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 65–72.
- [431] K. R. Harrap, *Cancer Treatment Reviews* **1985**, *12*, 21–33.
- [432] R. J. Knox, F. Friedlos, D. A. Lydall, J. J. Roberts, *Cancer Res.* **1986**, *46*, 1972–1979.
- [433] Y. Kidani, K. Inagaki, M. Iigo, A. Hoshi, K. Kuretani, *J. Med. Chem.* **1978**, *21*, 1315–1318.
- [434] E. Raymond, S. Faivre, S. Chaney, J. Woynarowski, E. Cvitkovic, *Mol. Cancer Ther.* **2002**, *1*, 227–235.
- [435] L. R. Kelland, G. Abel, M. J. McKeage, M. Jones, P. M. Goddard, M. Valenti, B. A. Murrer, K. R. Harrap, *Cancer Res.* **1993**, *53*, 2581–2586.
- [436] H. Choy, *Expert Review of Anticancer Therapy* **2006**, *6*, 973–982.
- [437] Z. H. Siddik, *Oncogene* **2003**, *22*, 7265–7279.
- [438] A. Eastman, *Cancer Cells* **1990**, *2*, 275–280.
- [439] P. J. Loehrer, L. H. Einhorn, *Ann. Intern. Med.* **1984**, *100*, 704–713.
- [440] J. M. Rademaker-Lakhai, D. van den Bongard, D. Pluim, J. H. Beijnen, J. H. M. Schellens, *Clin. Canc. Res.* **2004**, *10*, 3717–3727.
- [441] C. G. Hartinger, S. Zorbas-Seifried, M. A. Jakupec, B. Kynast, H. Zorbas, B. K. Keppler, *J. Inorg. Biochem.* **2006**, *100*, 891–904.
- [442] L. Ma, R. Ma, Z. Wang, S.-M. Yiu, G. Zhu, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 10735–10738.
- [443] C. M. Anderson, I. R. Taylor, M. F. Tibbetts, J. Philpott, Y. Hu, J. M. Tanski, *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 12917–12924.

- [444] M. S. Davies, D. S. Thomas, A. Hegmans, S. J. Berners-Price, N. Farrell, *Inorg. Chem.* **2002**, *41*, 1101–1109.
- [445] F. Pelletier, V. Comte, A. Massard, M. Wenzel, S. Toulot, P. Richard, M. Picquet, P. Le Gendre, O. Zava, F. Edafe, A. Casini, P. J. Dyson, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 6923–6933.
- [446] N. K. Sharma, R. K. Ameta, M. Singh, *Biochemistry Research International* **2016**, *2016*, 4359375.
- [447] G. Enjun, L. Cong, Z. Mingchang, L. Huakuan, W. Qiong, L. Lei, *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2009**, *9*, 356–368.
- [448] L. R. Kelland, *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **1993**, *15*, 191–219.
- [449] S. Parveen, F. Arjmand, S. Tabassum, *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *175*, 269–286.
- [450] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512–7515.
- [451] G. R. Fulmer, A. J. M. Miller, N. H. Sherden, H. E. Gottlieb, A. Nudelman, B. M. Stoltz, J. E. Bercaw, K. I. Goldberg, *Organometallics* **2010**, *29*, 2176–2179.
- [452] M. J. O'Neil, P. E. Heckelman, C. B. Koch, K. J. Roman, *The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*, 14. ed., Whitehouse Station, NJ, **2006**.
- [453] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, *J. Mol. Graph.* **1996**, *14*, 33–38.
- [454] M. G. Lerner, H. A. Carlson, APBS Plugin for PyMOL, University of Michigan, **2006**.
- [455] T. J. Dolinsky, J. E. Nielsen, J. A. McCammon, N. A. Baker, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, W665–W667.
- [456] A. Waterhouse, M. Bertoni, S. Bienert, G. Studer, G. Tauriello, R. Gumienny, F. T. Heer, T. A P. de Beer, C. Rempfer, L. Bordoli, R. Lepore, T. Schwede, *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, W296–W303.
- [457] C. J. Trabbic, J. H. Overmeyer, E. M. Alexander, E. J. Crissman, H. M. Kvale, M. A. Smith, P. W. Erhardt, W. A. Maltese, *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 2489–2512.
- [458] G. Bartoli, M. Bosco, M. Locatelli, E. Marcantoni, M. Massaccesi, P. Melchiorre, L. Sambri, *Synlett* **2004**, *2004*, 1794–1798.
- [459] T. A. Kelly, D. W. McNeil, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 9003–9006.
- [460] N. R. Paz, D. Rodríguez-Sosa, H. Valdés, R. Marticorena, D. Melián, M. B. Copano, C. C. González, A. J. Herrera, *Org. Lett.* **2015**, *17*, 2370–2373.
- [461] M.-N. Dufour, P. Jouin, J. Poncet, A. Pantaloni, B. Castro, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1986**, 1895–1899.
- [462] M. Peters, M. Trobe, R. Breinbauer, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 2450–2456.
- [463] E. J. Yoo, S. H. Park, S. H. Lee, S. Chang, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 1155–1158.
- [464] R. Barroso, M. Escribano, M.-P. Cabal, C. Valdés, *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, *2014*, 1672–1683.
- [465] M. Vivier, M. Rapp, M.-J. Galmier, A.-S. Jarrousse, E. Miot-Noirault, F. Leal, V. Weber, J. Métin, J. Sauzière, J.-M. Chezal, J.-C. Madelmont, *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 5705–5710.

- [466] G. Biagiotti, S. Cicchi, F. De Sarlo, F. Machetti, *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 2014, 7906–7915.
- [467] S. P. A. Hinkes, C. D. P. Klein, *Org. Lett.* **2019**, 21, 3048–3052.
- [468] Y. Zhu, X. Zhao, X. Zhu, G. Wu, Y. Li, Y. Ma, Y. Yuan, J. Yang, Y. Hu, L. Ai, Q. Gao, *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 4192–4199.
- [469] A. S. Ivanov, A. A. Zhalnina, S. V. Shishkov, *Tetrahedron* **2009**, 65, 7105–7108.
- [470] X. Feng, J. Xiong, Y. Lu, X. Xia, M. X. Zhu, *Cell Calcium* **2014**, 56, 446–456.
- [471] D. F. C. Moffat, F. A. Day, S. R. Patel, A. J. Belfield, A. D. G. Donald, A. H. Davidson, A. H. Drummond, Patent *WO 2008/053131 A1*, **2004**.

12 Anhang

12.1 NMR-Spektren

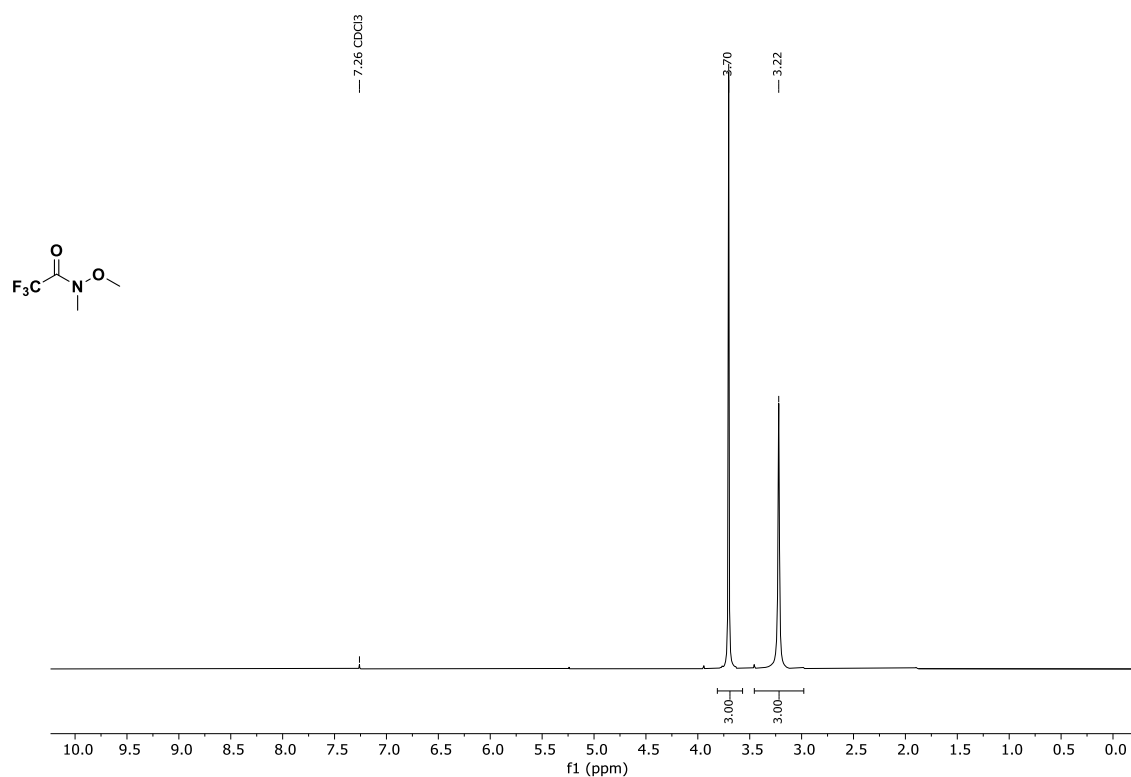


Abb. 12.1: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (300 MHz, CDCl_3) von 2,2,2-Trifluor-*N*-methoxy-*N*-methylacetamid (**M-5**).

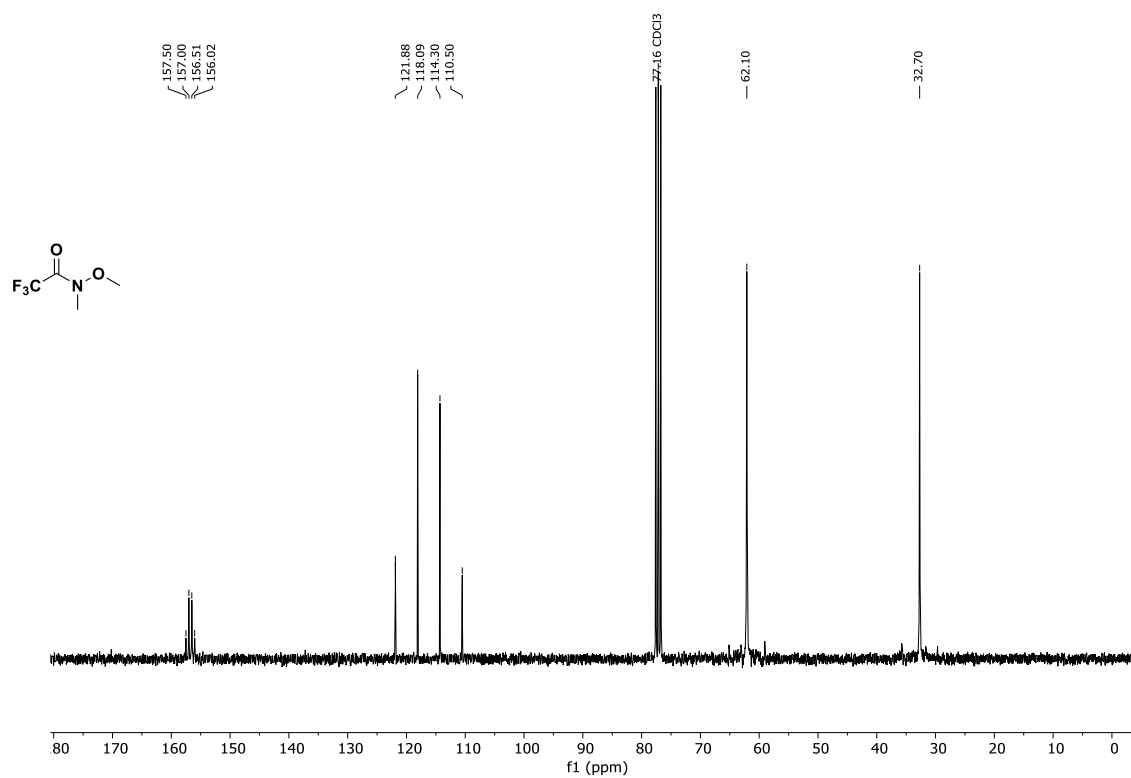


Abb. 12.2: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (75.5 MHz, CDCl_3) von 2,2,2-Trifluor-*N*-methoxy-*N*-methylacetamid (**M-5**).

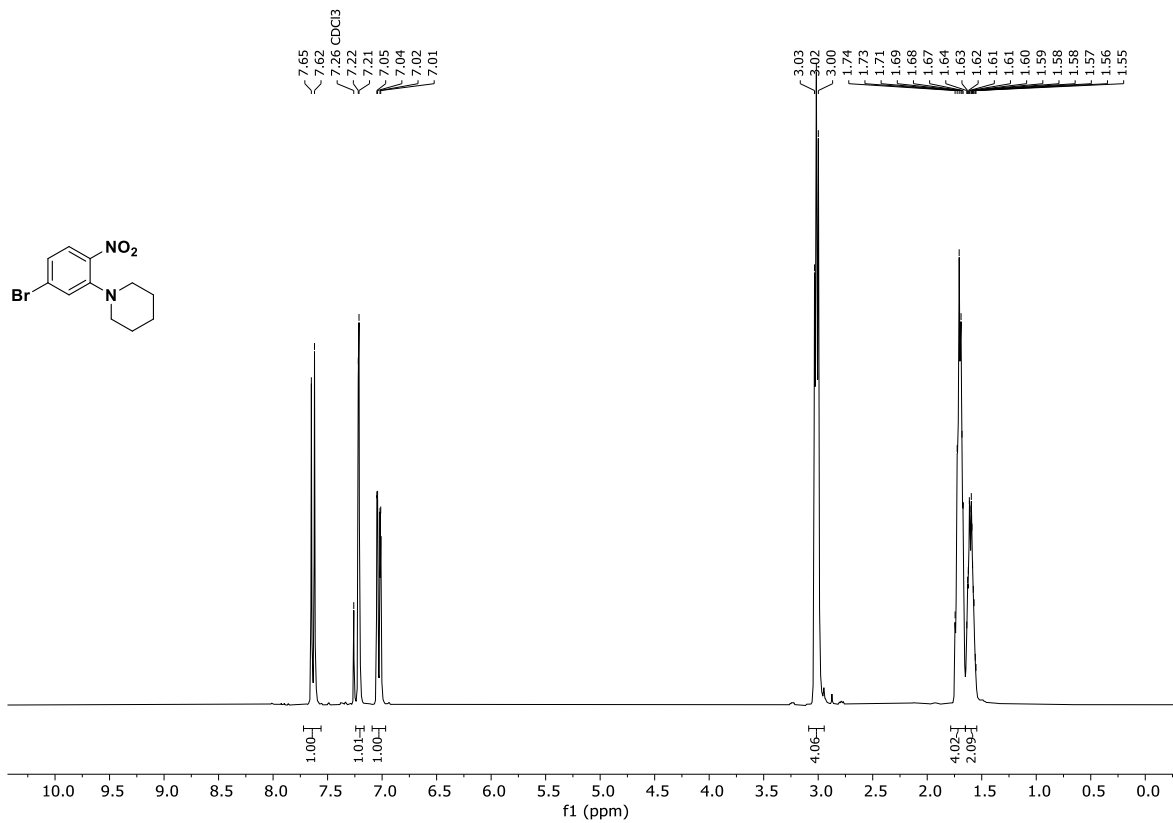


Abb. 12.3: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl₃) von 1-(5-Brom-2-nitrophenyl)piperidin (**M-7a**).

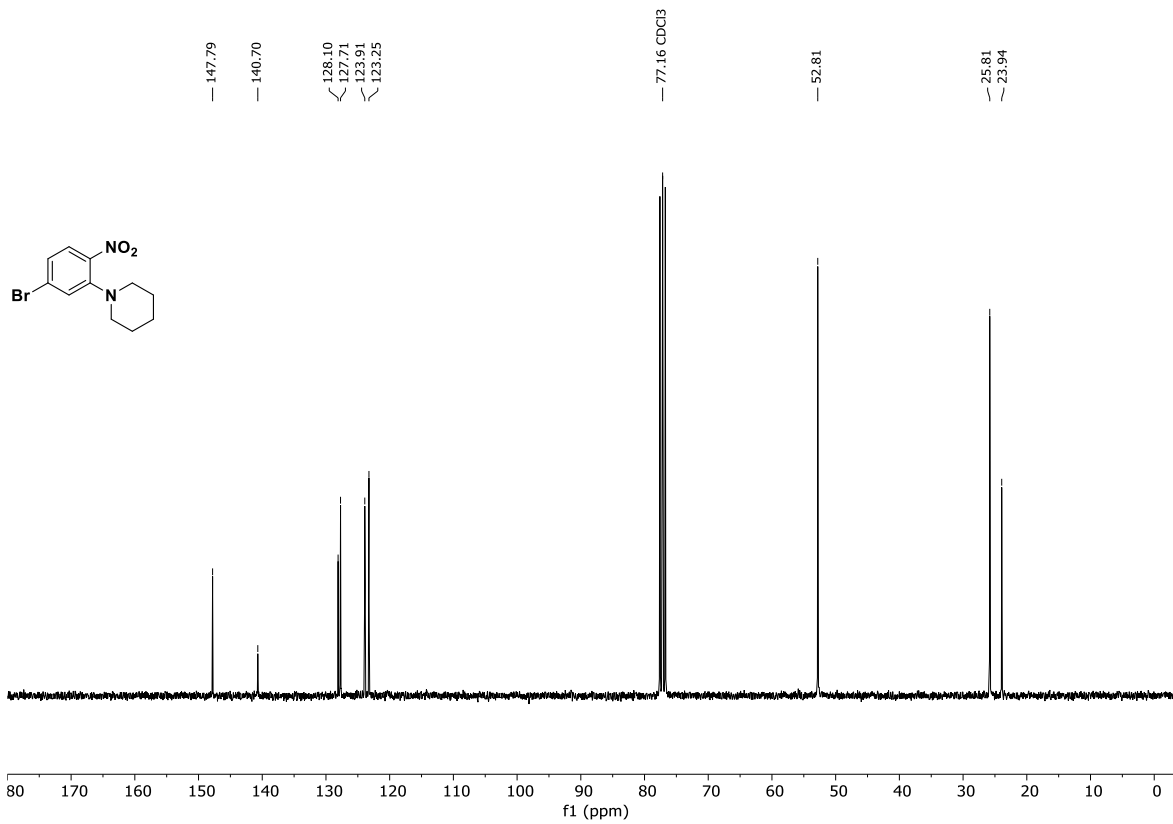


Abb. 12.4: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, CDCl₃) von 1-(5-Brom-2-nitrophenyl)piperidin (**M-7a**).

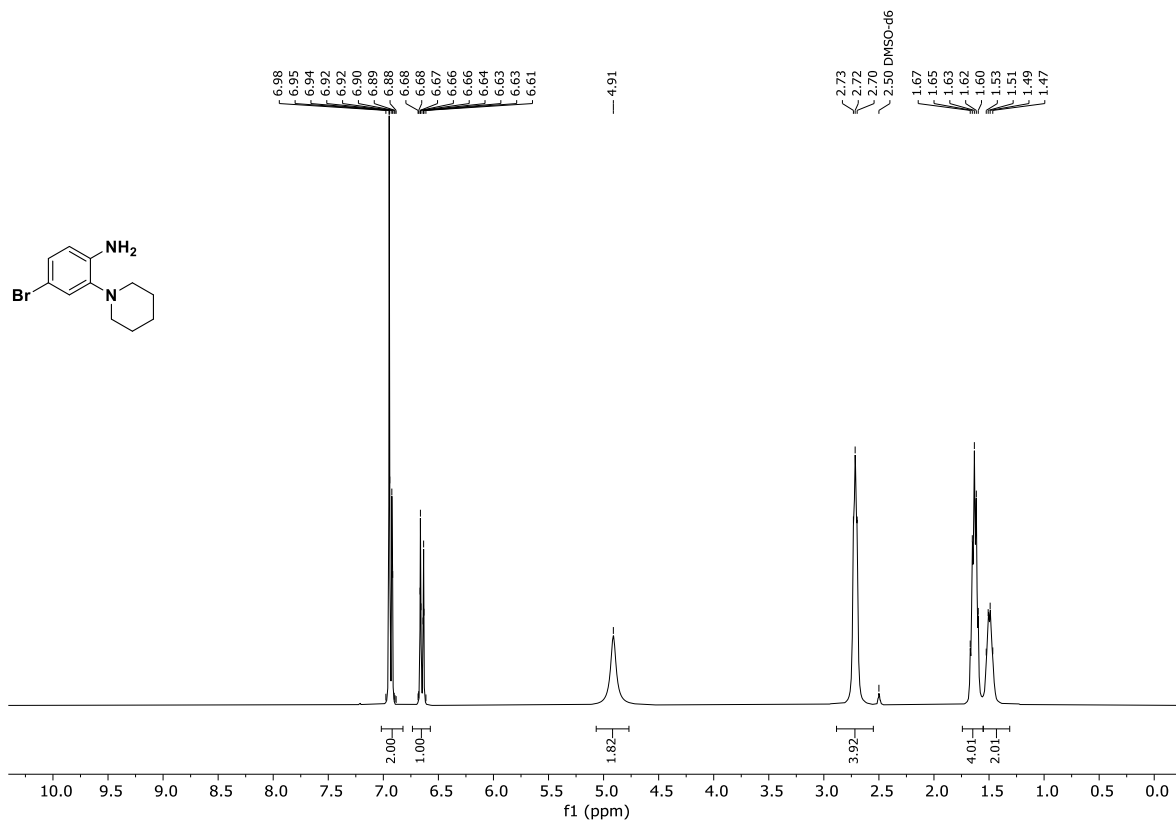


Abb. 12.5: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, DMSO-*d*₆) von 4-Brom-2-(piperidin-1-yl)anilin (**M-8a**).

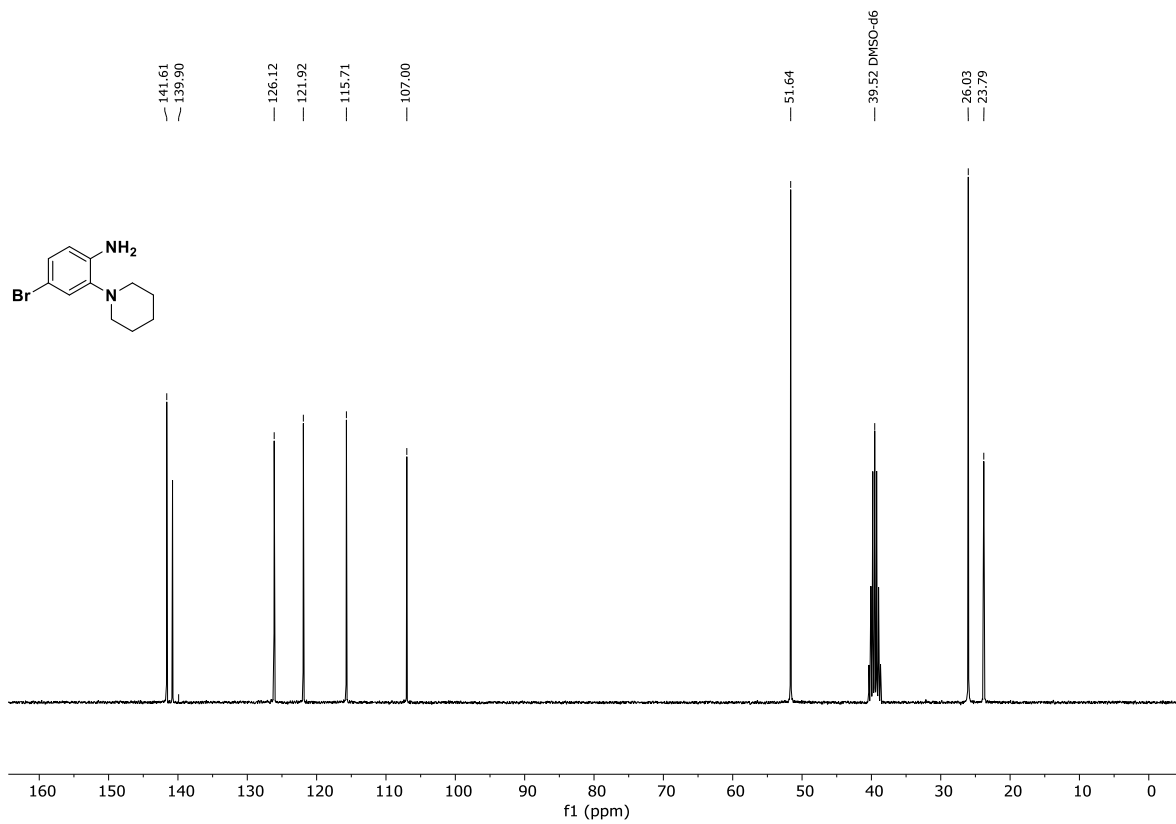


Abb. 12.6: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) von 4-Brom-2-(piperidin-1-yl)anilin (**M-8a**).

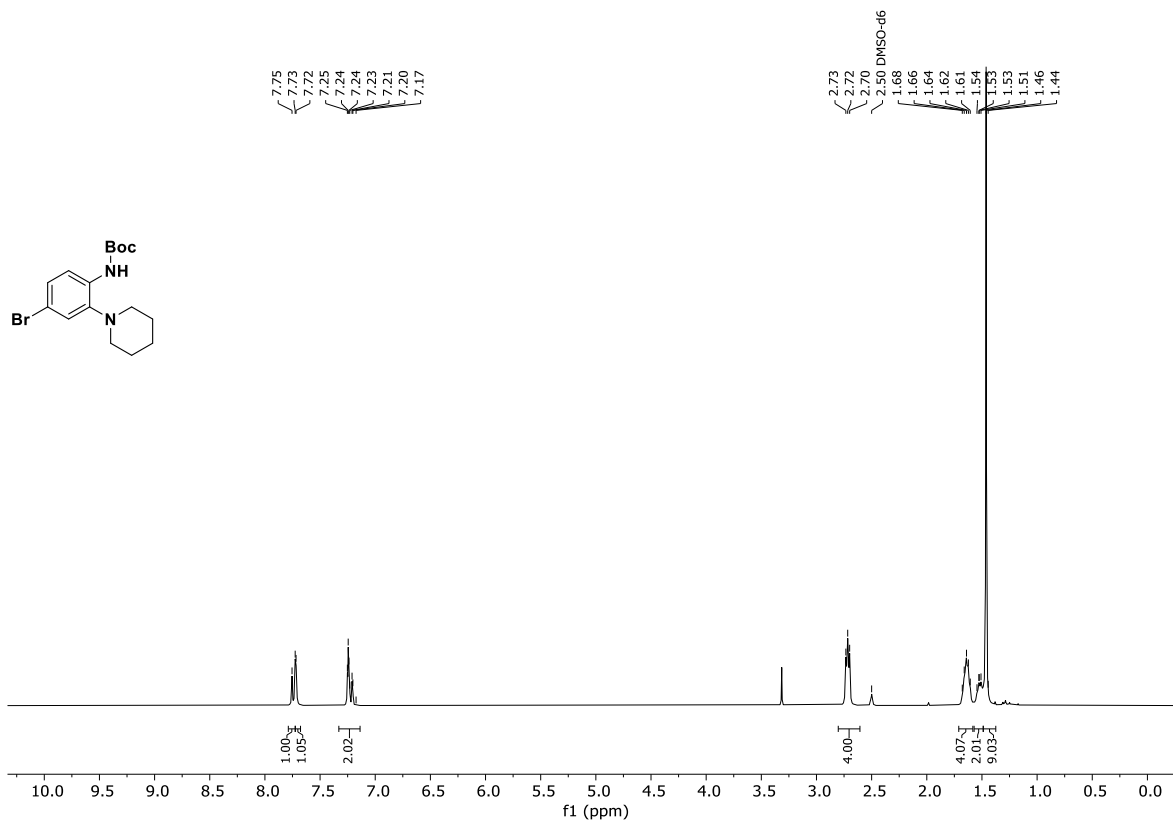


Abb. 12.7: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, DMSO-*d*₆) von *tert*-Butyl-(4-brom-2-(piperidin-1-yl)phenyl)carbamate (**M-9a**).

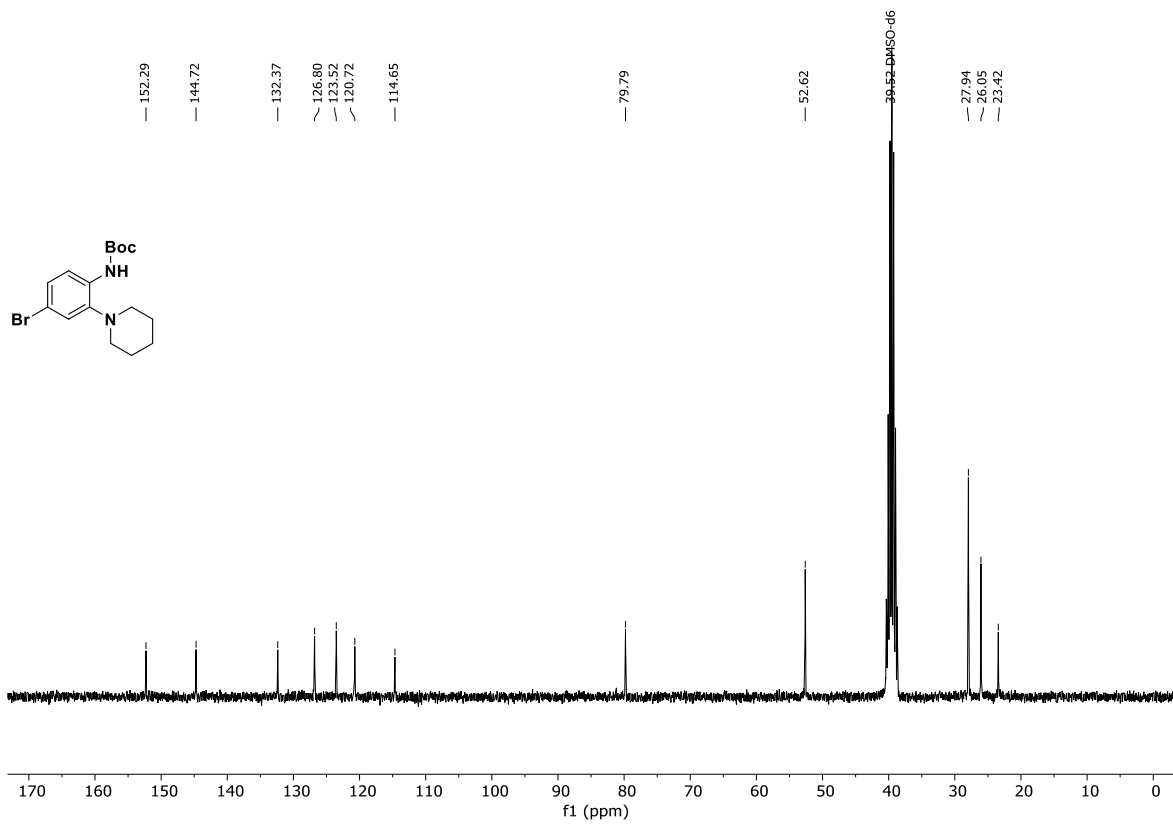


Abb. 12.8: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) von *tert*-Butyl-(4-brom-2-(piperidin-1-yl)phenyl)carbamate (**M-9a**).

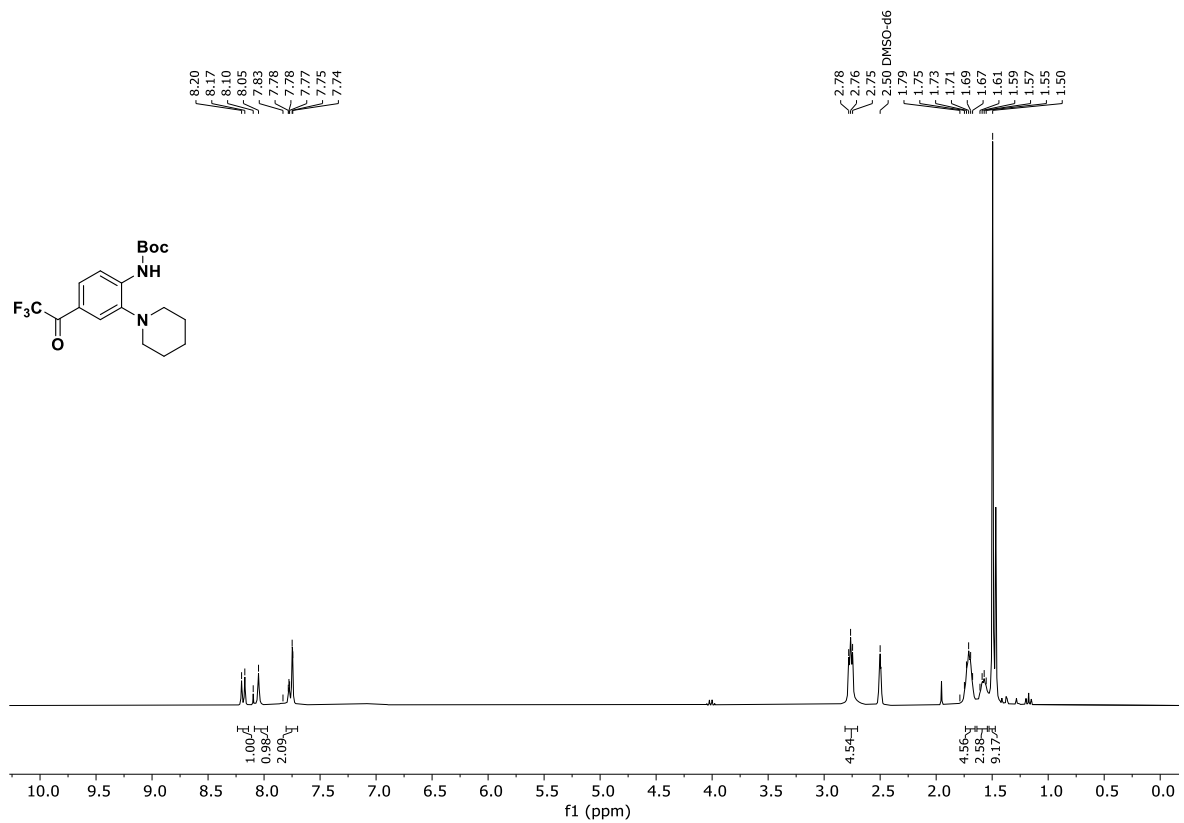


Abb. 12.9: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, DMSO-*d*₆) von *tert*-Butyl-(2-(piperidin-1-yl)-4-(2,2,2-trifluoroacetyl)phenyl)-carbamat (**M-10a**).

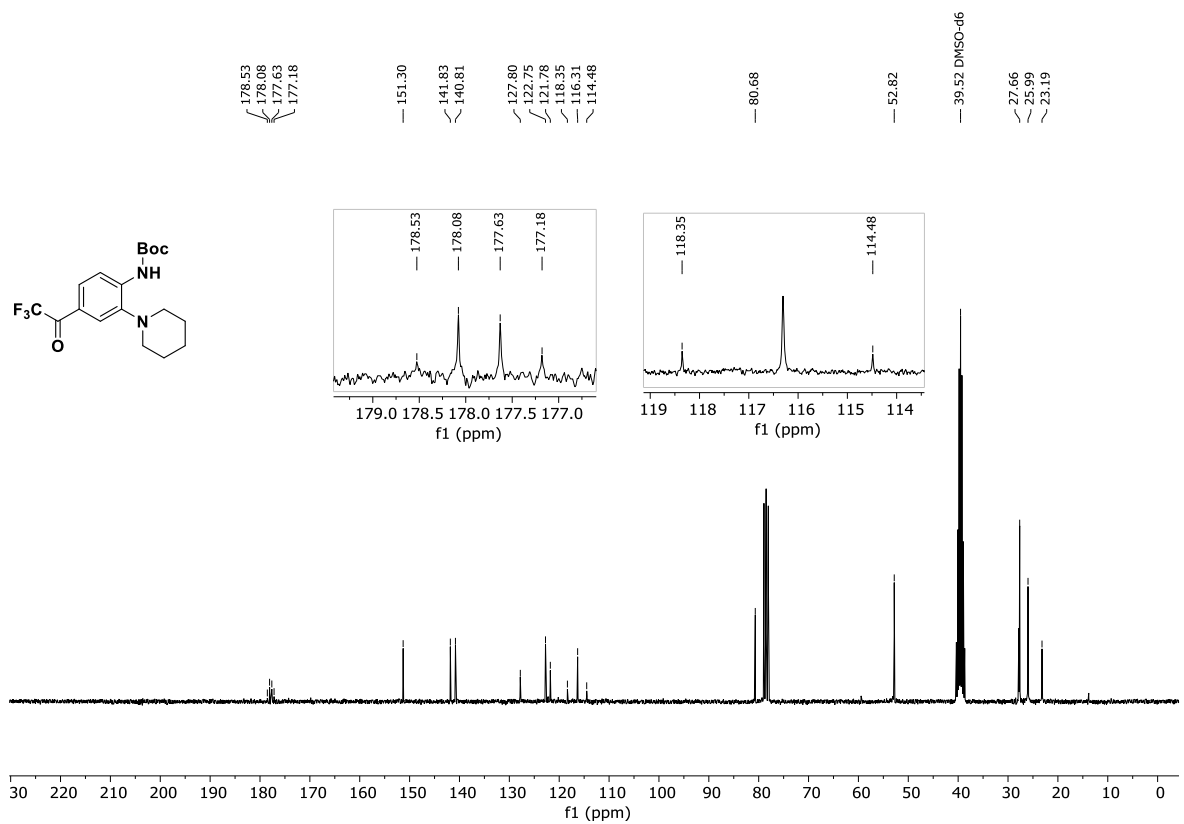


Abb. 12.10: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) von *tert*-Butyl-(2-(piperidin-1-yl)-4-(2,2,2-trifluoroacetyl)phenyl)carbamate (**M-10a**).

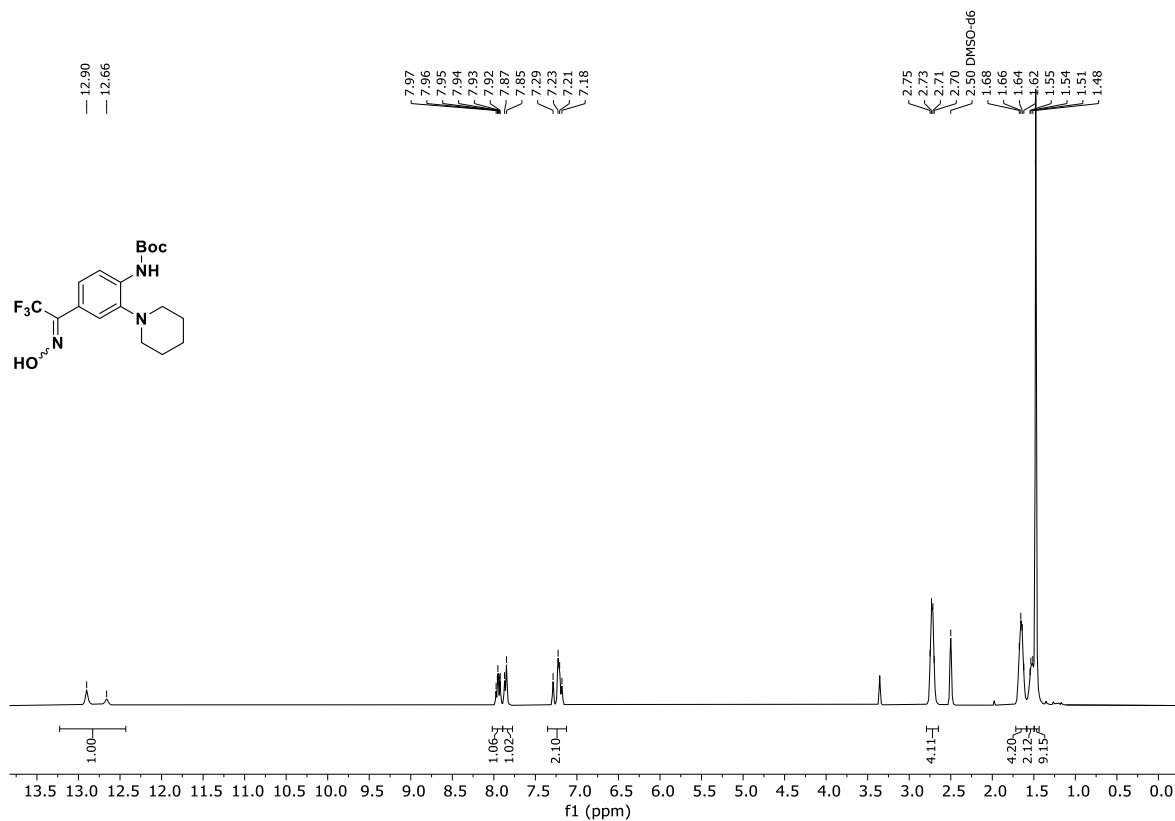


Abb. 12.11: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, DMSO-*d*₆) von *tert*-Butyl-(*E/Z*)-(2-(piperidin-1-yl)-4-(2,2,2-trifluor-1-(hydroxyimino)ethyl)phenyl)carbamat (**M-11a**).

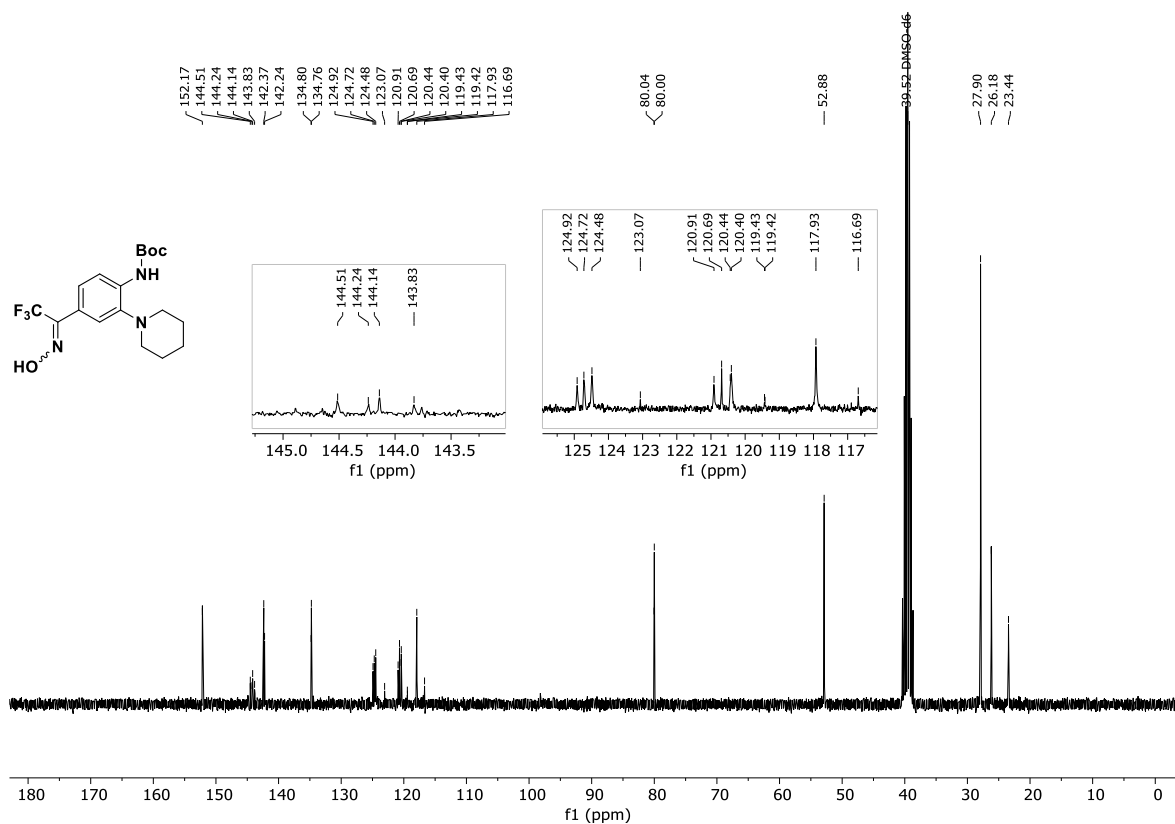


Abb. 12.12: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) von *tert*-Butyl-(*E/Z*)-(2-(piperidin-1-yl)-4-(2,2,2-trifluor-1-(hydroxyimino)ethyl)phenyl)carbamat (**M-11a**).

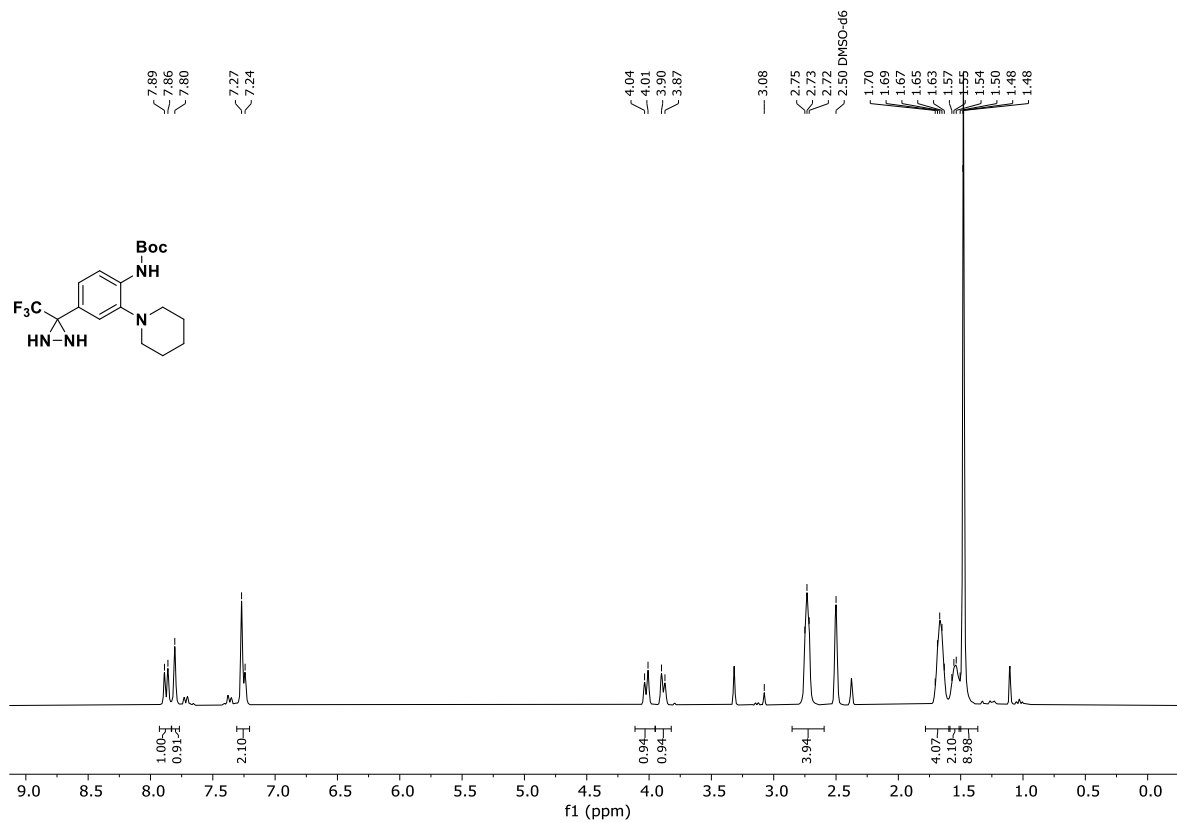


Abb. 12.13: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, DMSO-*d*₆) von *tert*-Butyl-(2-(piperidin-1-yl)-4-(3-(trifluormethyl)diaziridin-3-yl)phenyl)carbamat (**M-12a**).

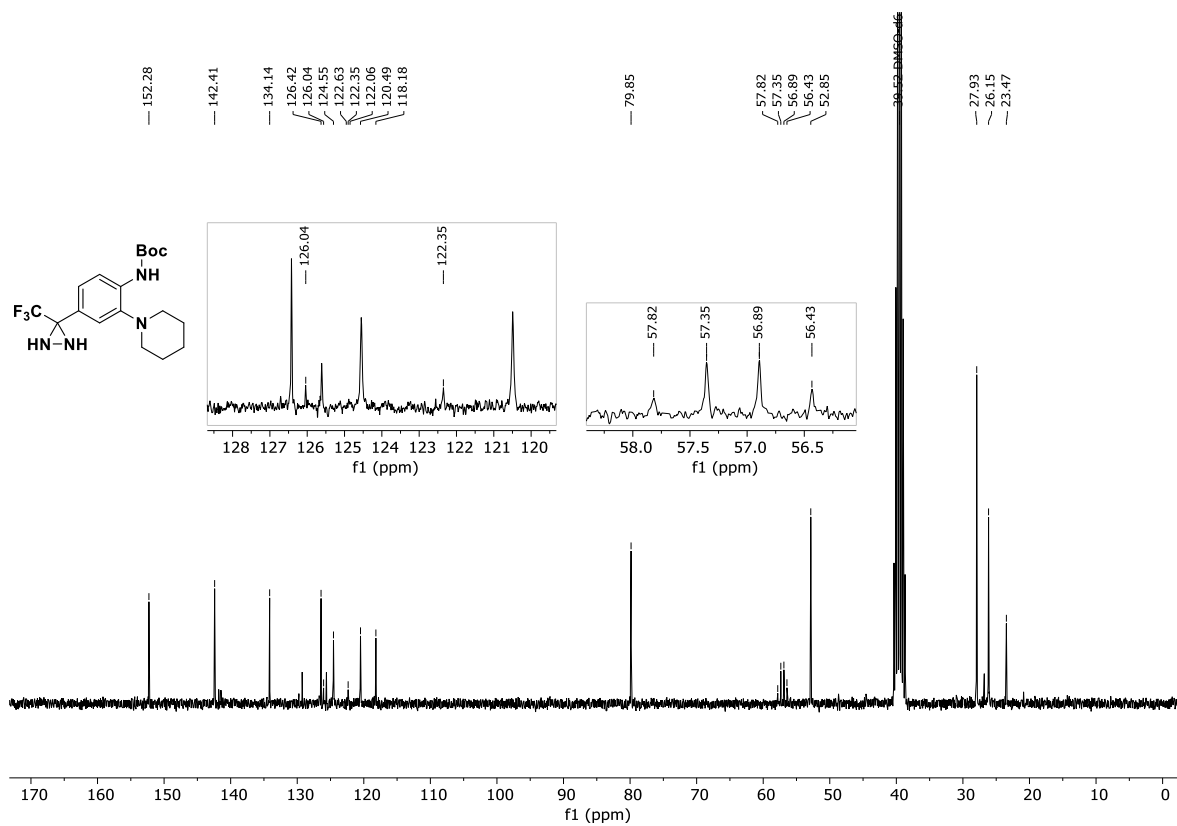


Abb. 12.14: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) von *tert*-Butyl-(2-(piperidin-1-yl)-4-(3-(trifluormethyl)diaziridin-3-yl)phenyl)carbamat (**M-12a**).

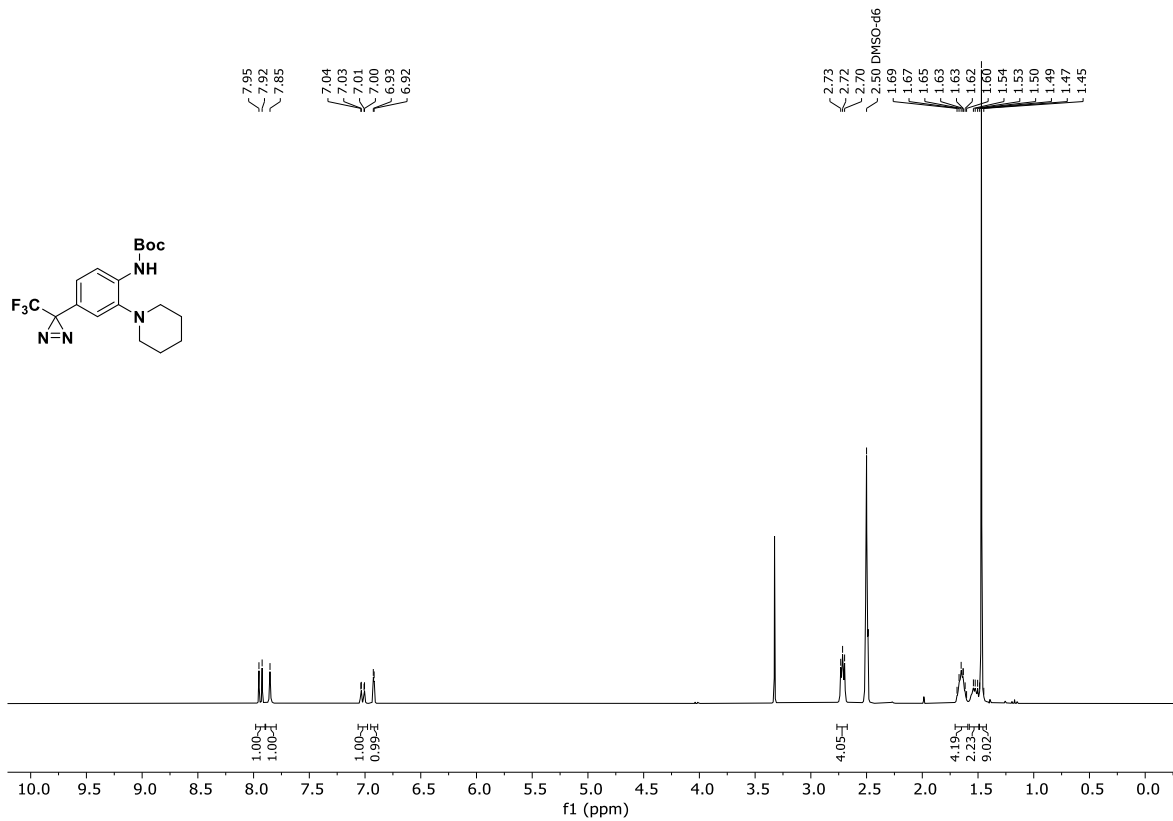


Abb. 12.15: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, DMSO-*d*₆) von *tert*-Butyl-(2-(piperidin-1-yl)-4-(3-(trifluoromethyl)-3*H*-diazirin-3-yl)phenyl)carbamate (**M-13a**).

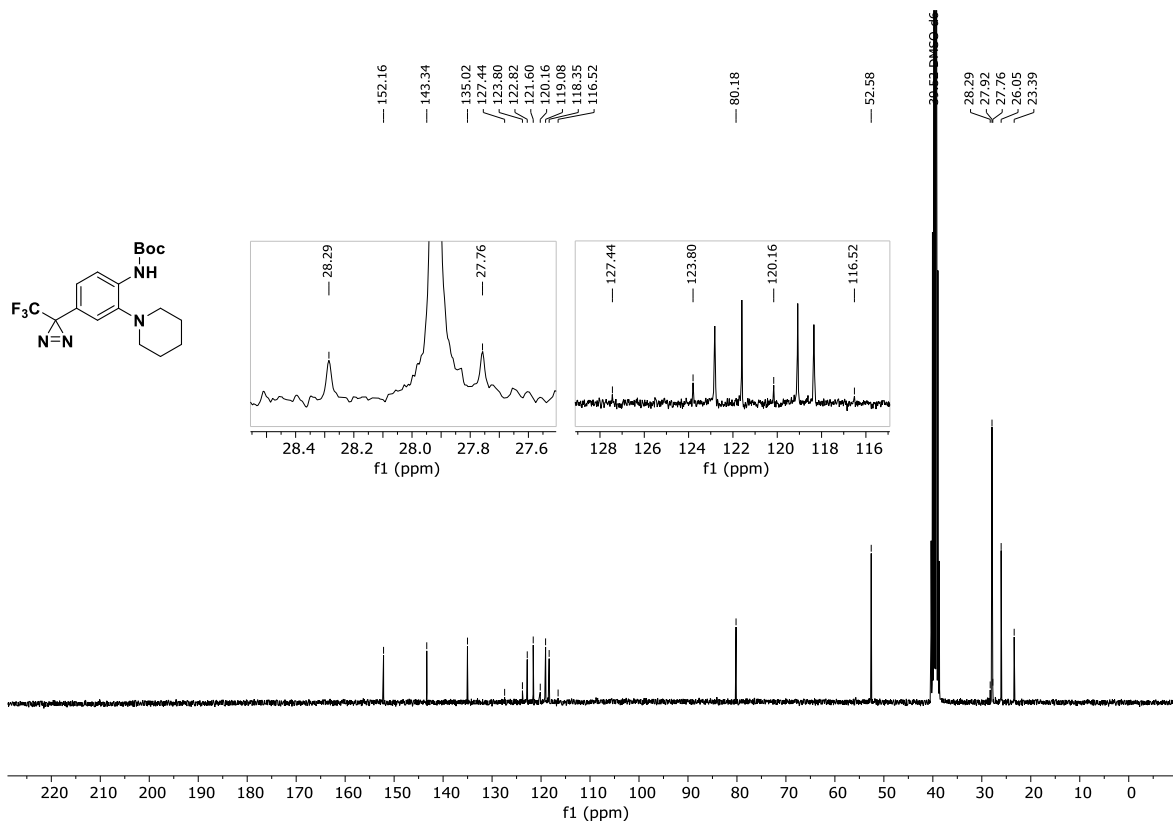


Abb. 12.16: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) von *tert*-Butyl-(2-(piperidin-1-yl)-4-(3-(trifluoromethyl)-3*H*-diazirin-3-yl)phenyl)carbamate (**M-13a**).

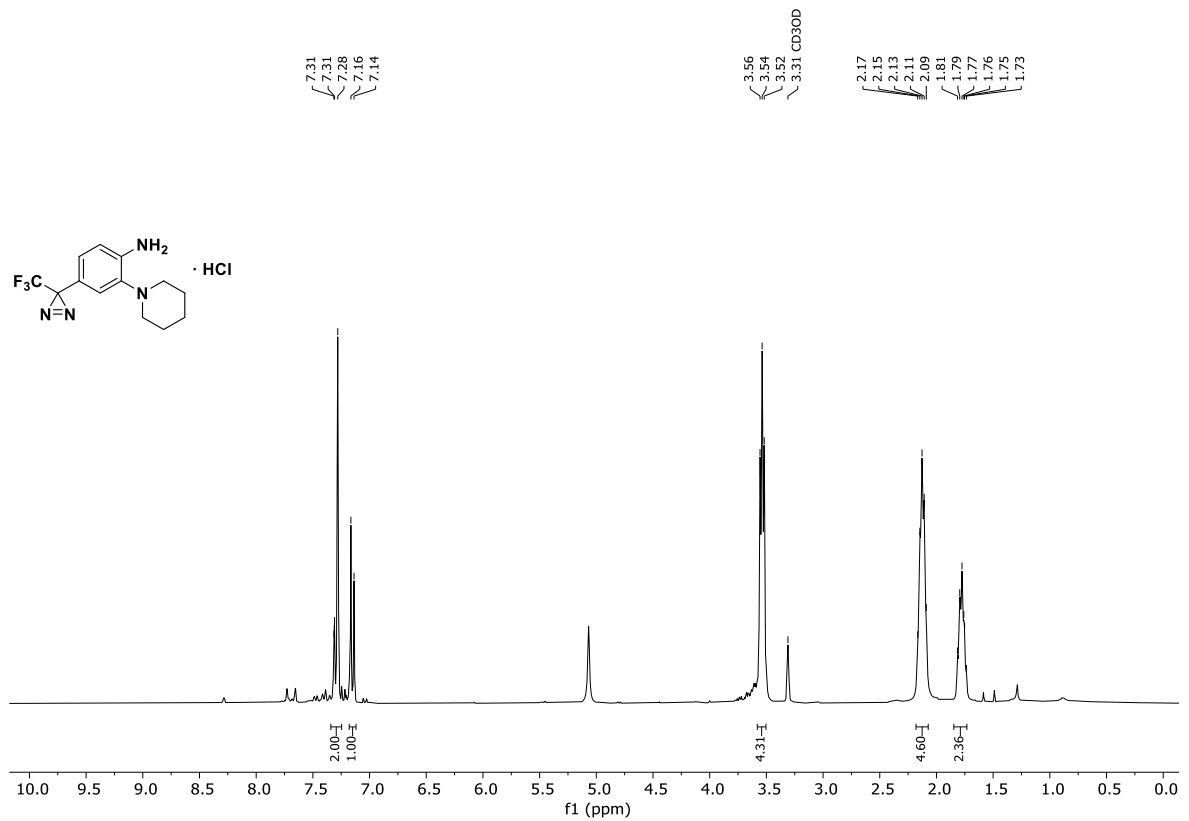


Abb. 12.17: ^1H -NMR-Spektrum (300 MHz, Methanol- d_4) von 2-(Piperidin-1-yl)-4-(3-(trifluormethyl)-3H-diazirin-3-yl)-anilin-Hydrochlorid (**M-14a**).

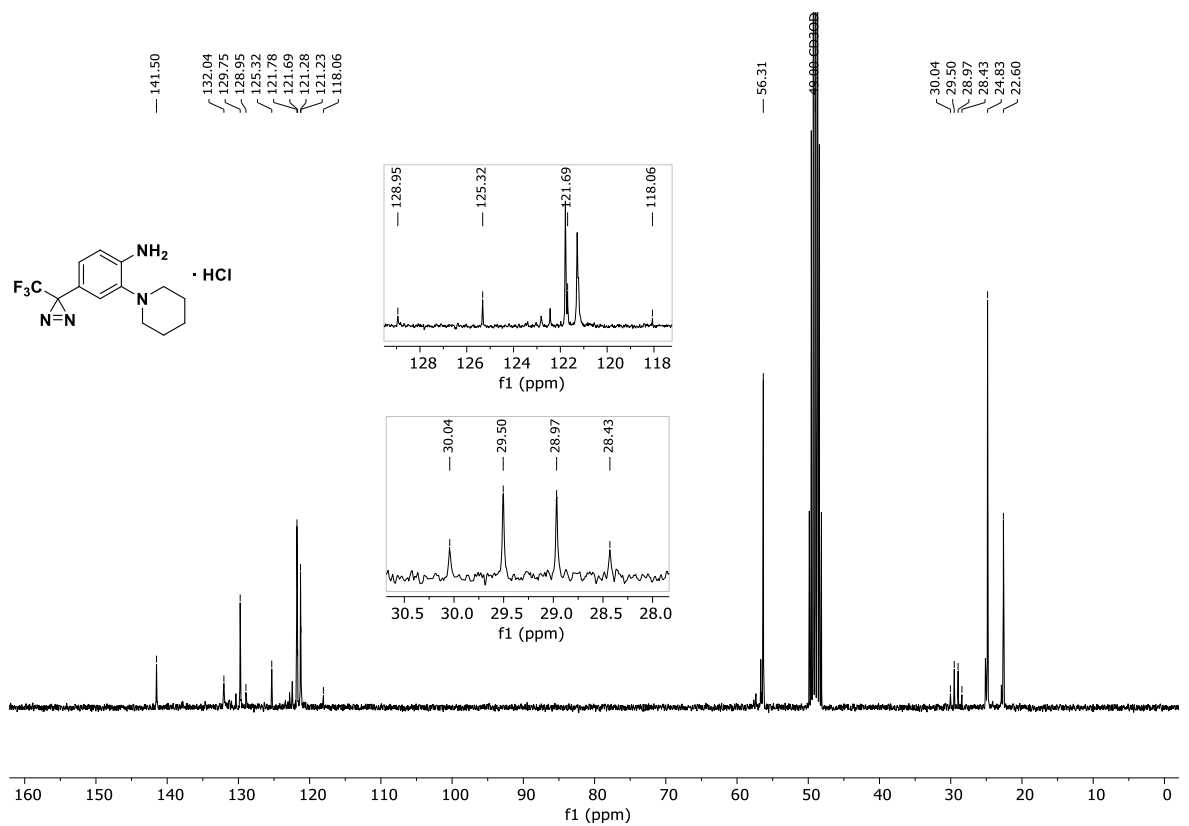


Abb. 12.18: ^{13}C -NMR-Spektrum (75.5 MHz, Methanol- d_4) von 2-(Piperidin-1-yl)-4-(3-(trifluormethyl)-3H-diazirin-3-yl)-anilin-Hydrochlorid (**M-14a**).

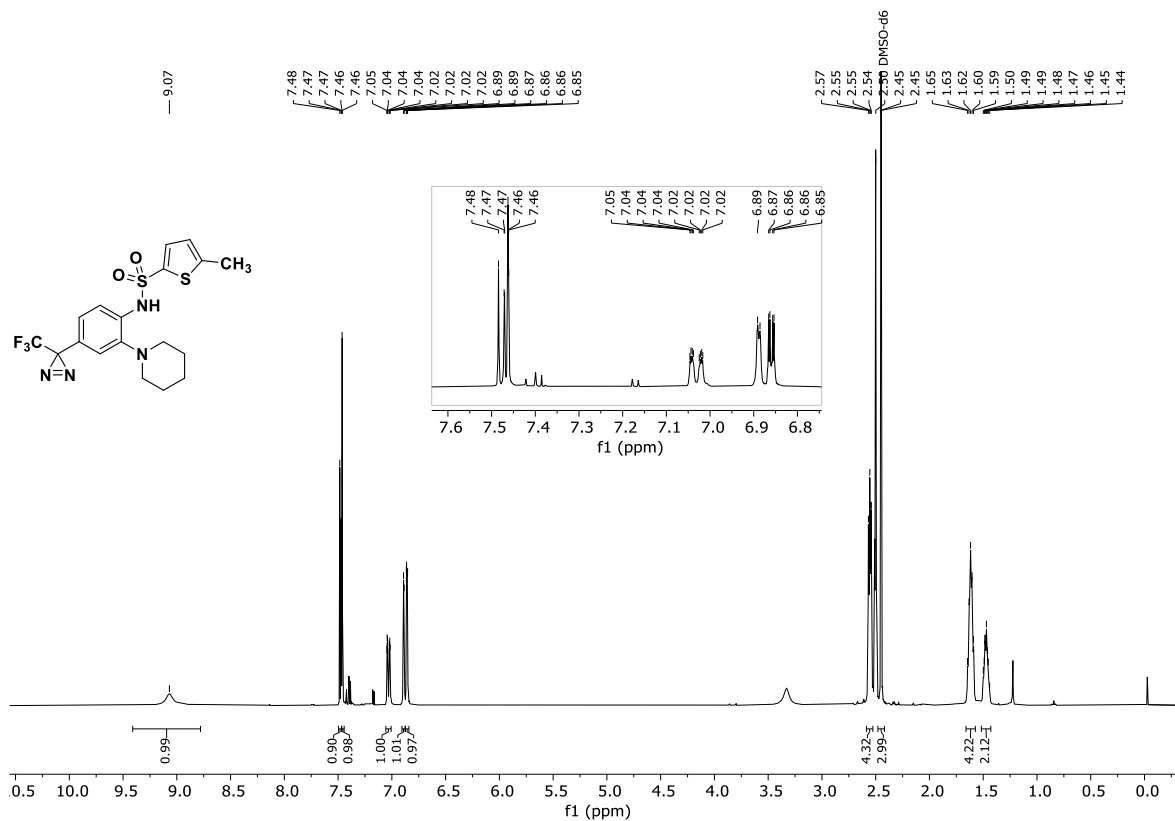


Abb. 12.19: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz, DMSO-*d*₆) von 5-Methyl-*N*-(2'-(piperidin-1-yl)-4'-(3-(trifluormethyl)-3*H*-diazirin-3-yl)phenyl)thiophen-2-sulfonamid (MK6-83^{PG1}, M-3a, KS239).

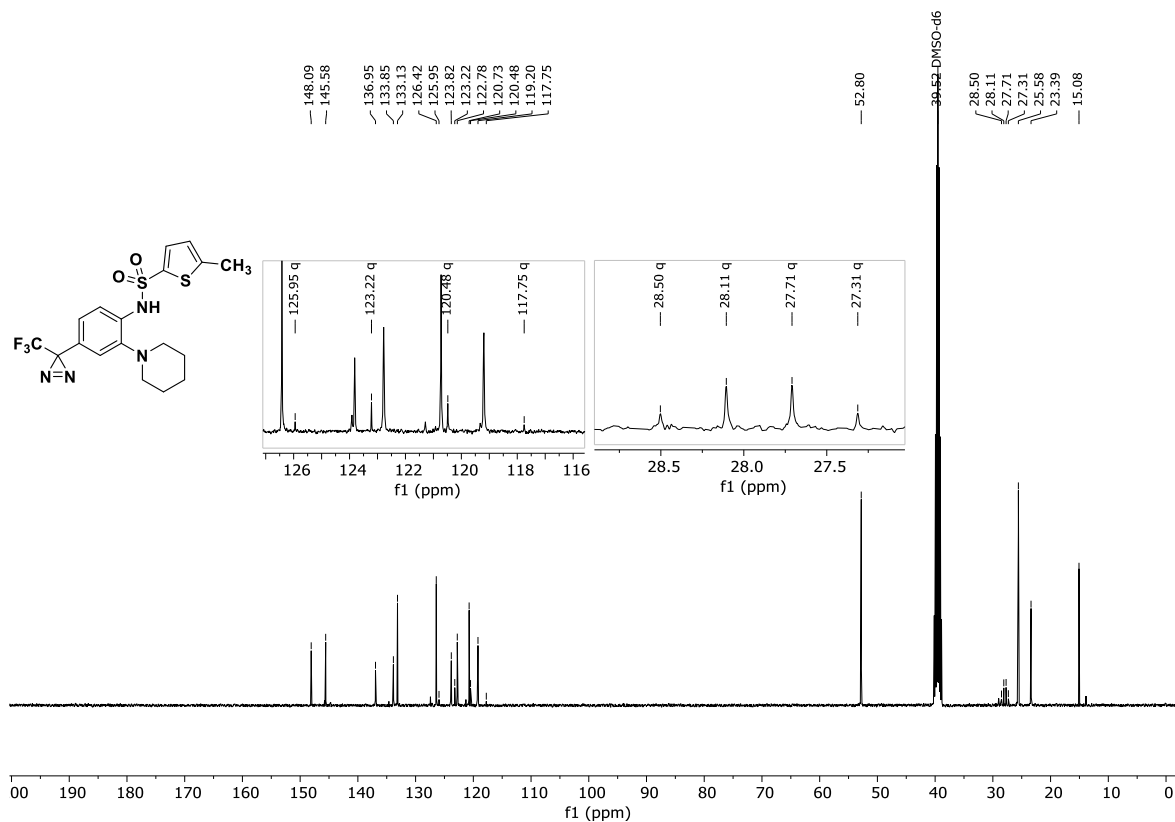


Abb. 12.20: ¹³C-NMR-Spektrum (100.6 MHz, DMSO-*d*₆) von 5-Methyl-*N*-(2'-(piperidin-1-yl)-4'-(3-(trifluormethyl)-3*H*-diazirin-3-yl)phenyl)thiophen-2-sulfonamid (MK6-83^{PG1}, M-3a, KS239).

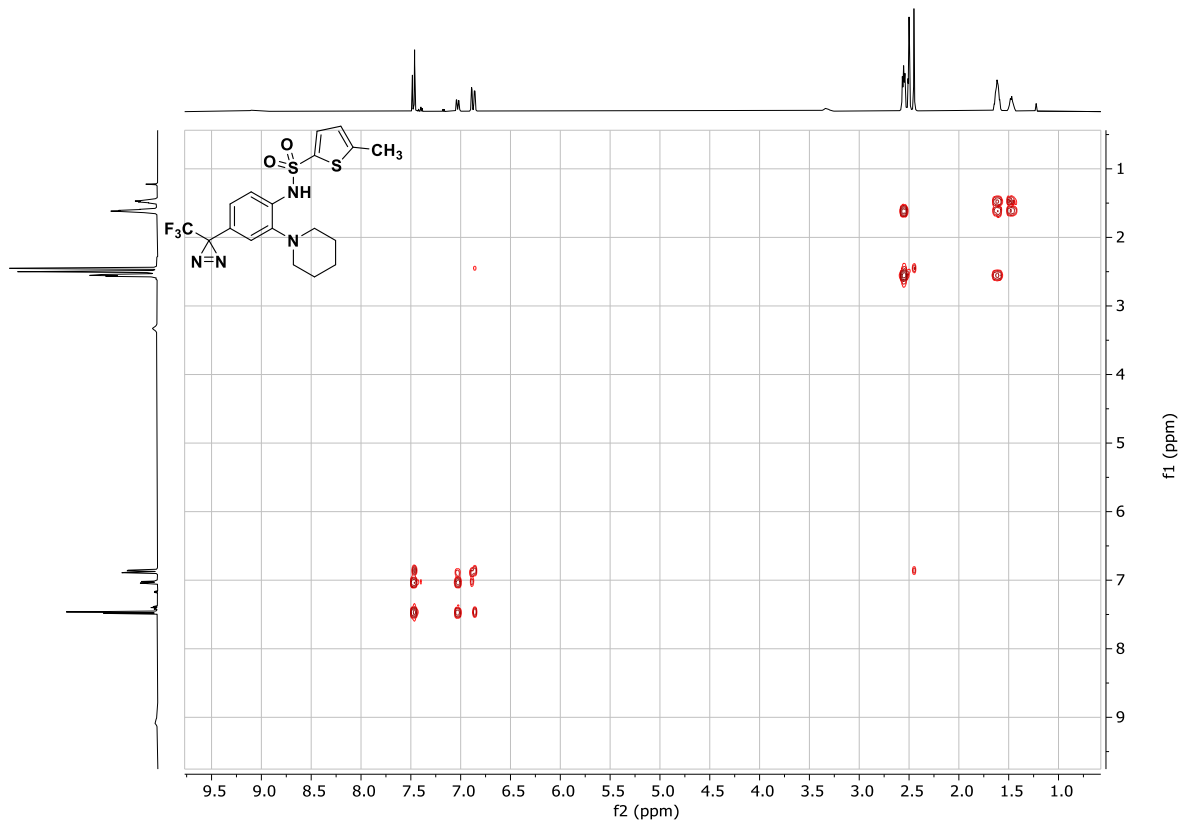


Abb. 12.21: ^1H - ^1H -COSY-Spektrum (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) von 5-Methyl-*N*-(2'-(piperidin-1-yl)-4'-(3-(trifluormethyl)-3*H*-diazirin-3-yl)phenyl)thiophen-2-sulfonamid (MK6-83^{PG1}, M-3a, KS239).

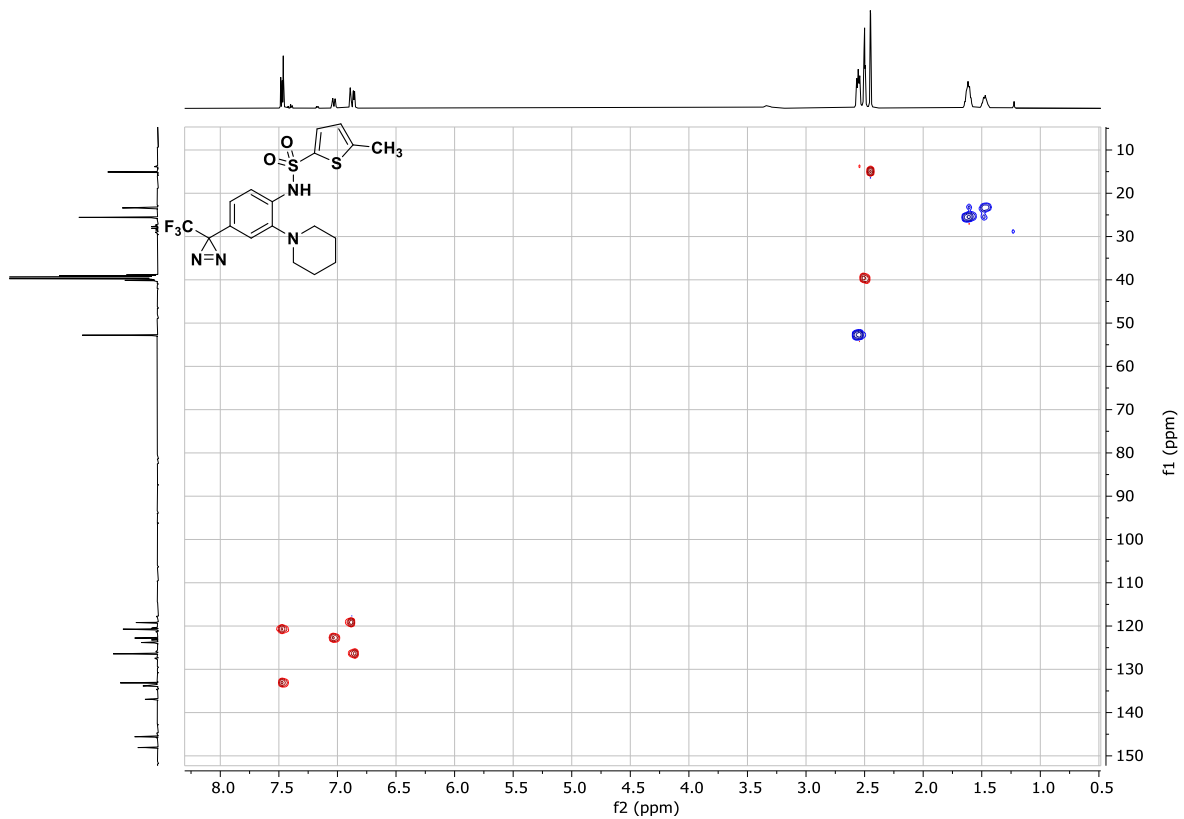


Abb. 12.22: ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) von 5-Methyl-*N*-(2'-(piperidin-1-yl)-4'-(3-(trifluormethyl)-3*H*-diazirin-3-yl)phenyl)thiophen-2-sulfonamid (MK6-83^{PG1}, M-3a, KS239).

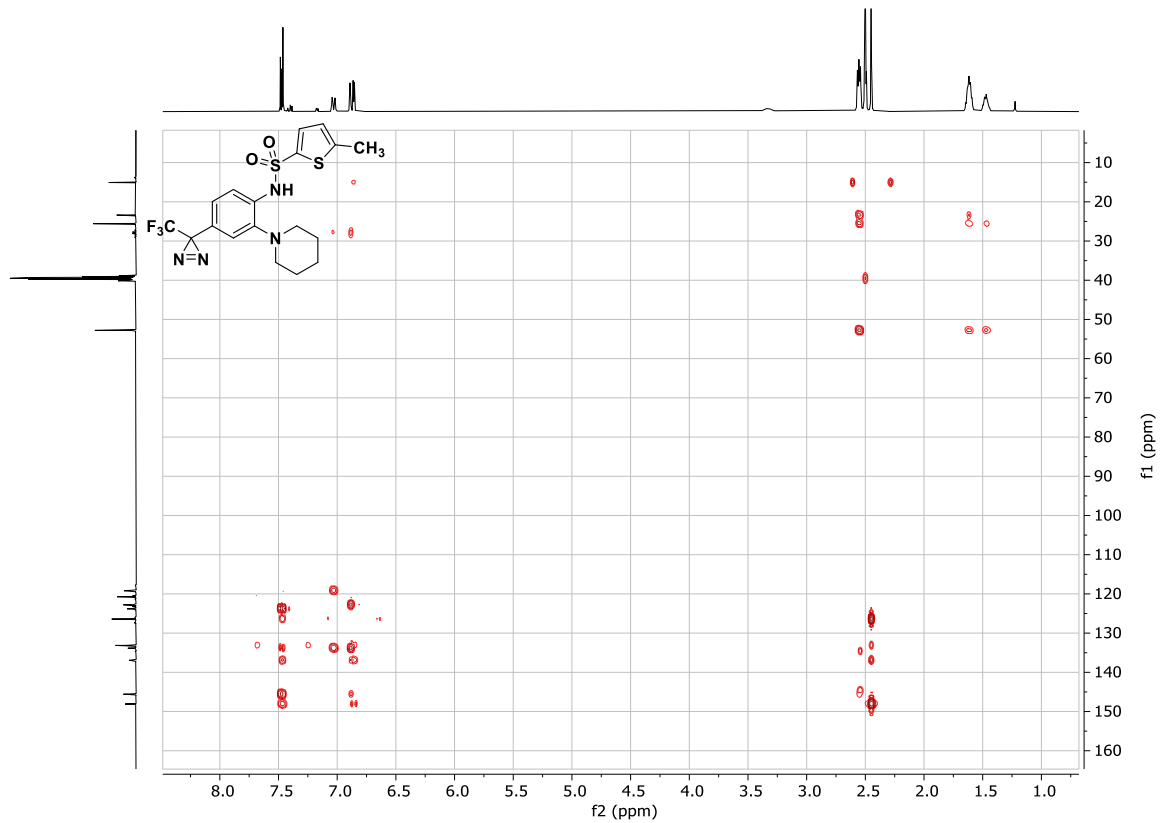


Abb. 12.23: ^1H - ^{13}C -HMBC-Spektrum (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) von 5-Methyl-*N*-(2'-(piperidin-1-yl)-4'-(3-(trifluormethyl)-3*H*-diazirin-3-yl)phenyl)thiophen-2-sulfonamid (MK6-83^{PG1}, M-3a, KS239).

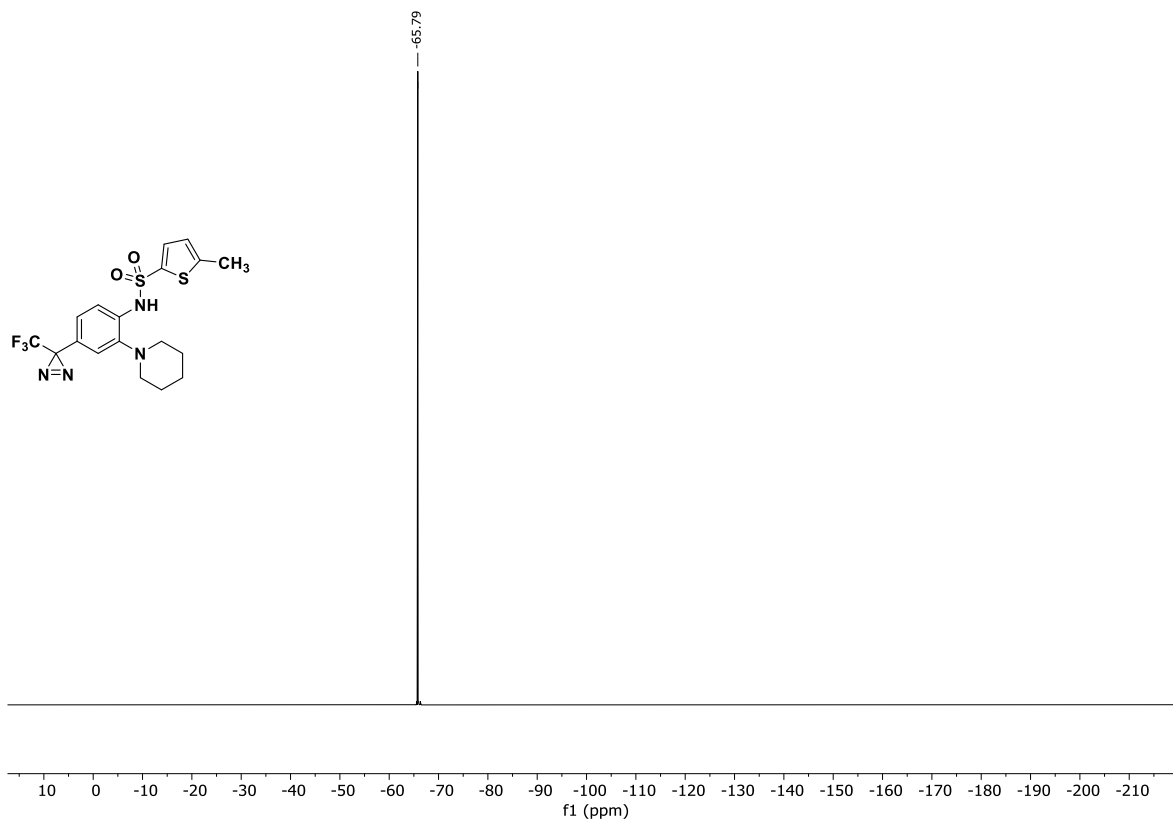
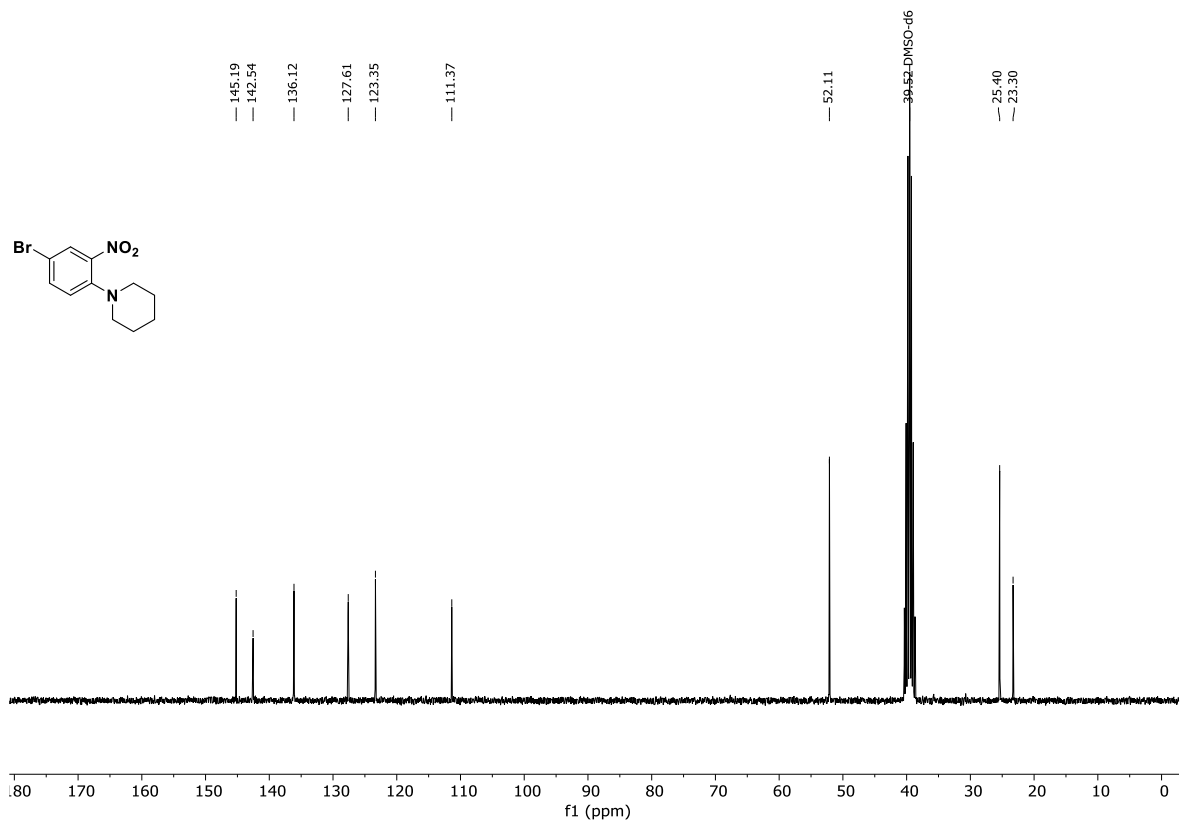
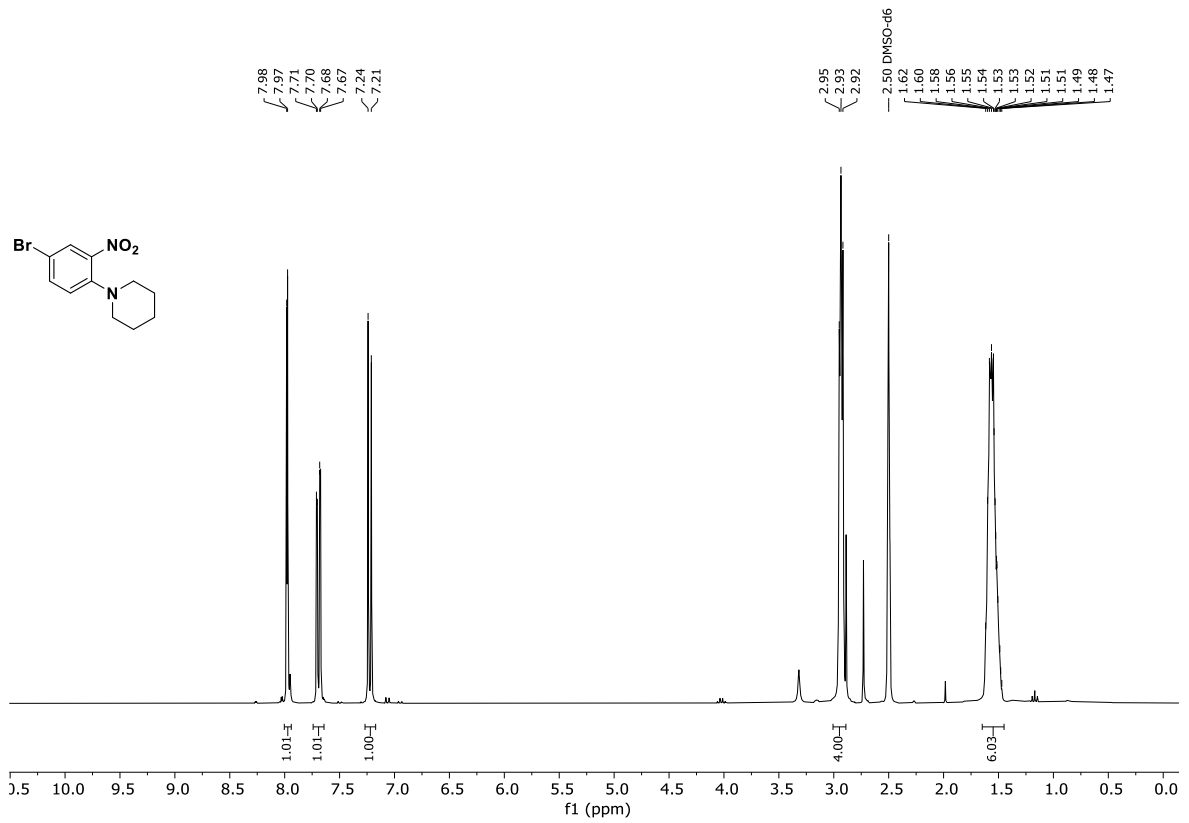


Abb. 12.24: ^{19}F -NMR-Spektrum (376 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) von 5-Methyl-*N*-(2'-(piperidin-1-yl)-4'-(3-(trifluormethyl)-3*H*-diazirin-3-yl)phenyl)thiophen-2-sulfonamid (MK6-83^{PG1}, M-3a, KS239).



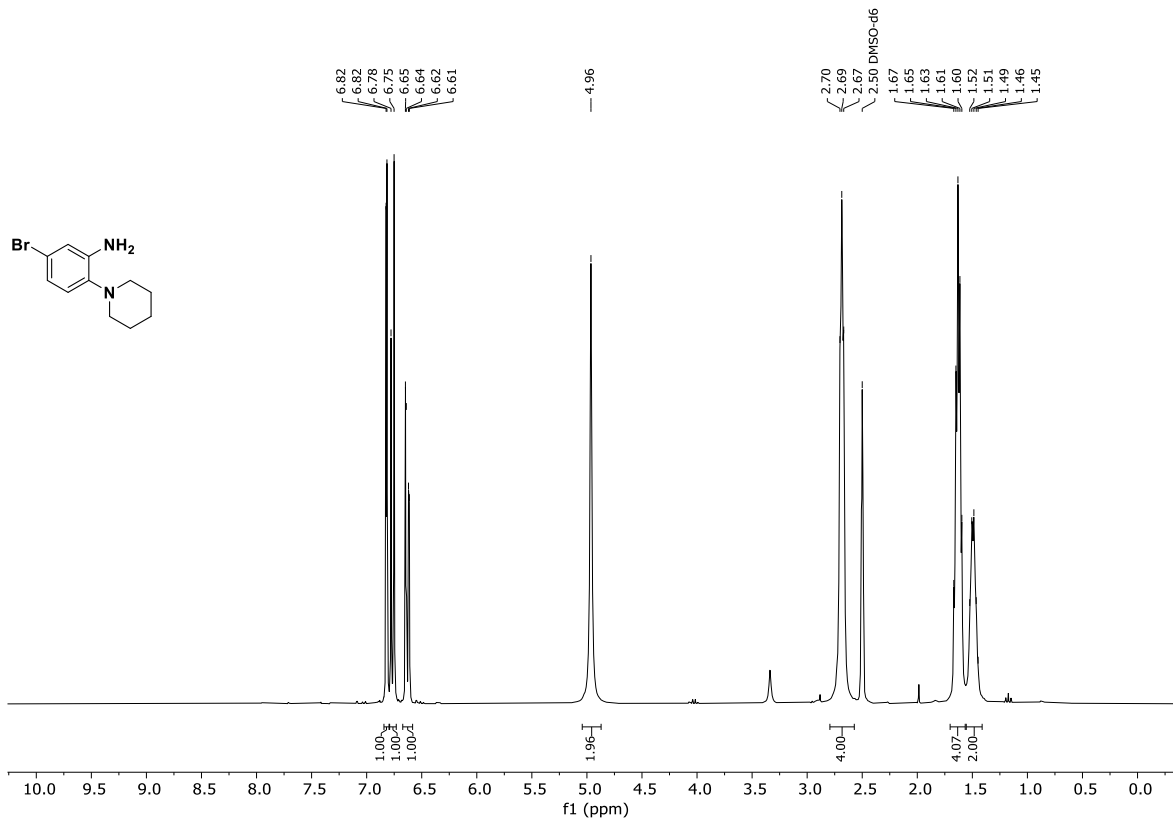


Abb. 12.27: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) von 5-Brom-2-(piperidin-1-yl)anilin (M-8b).

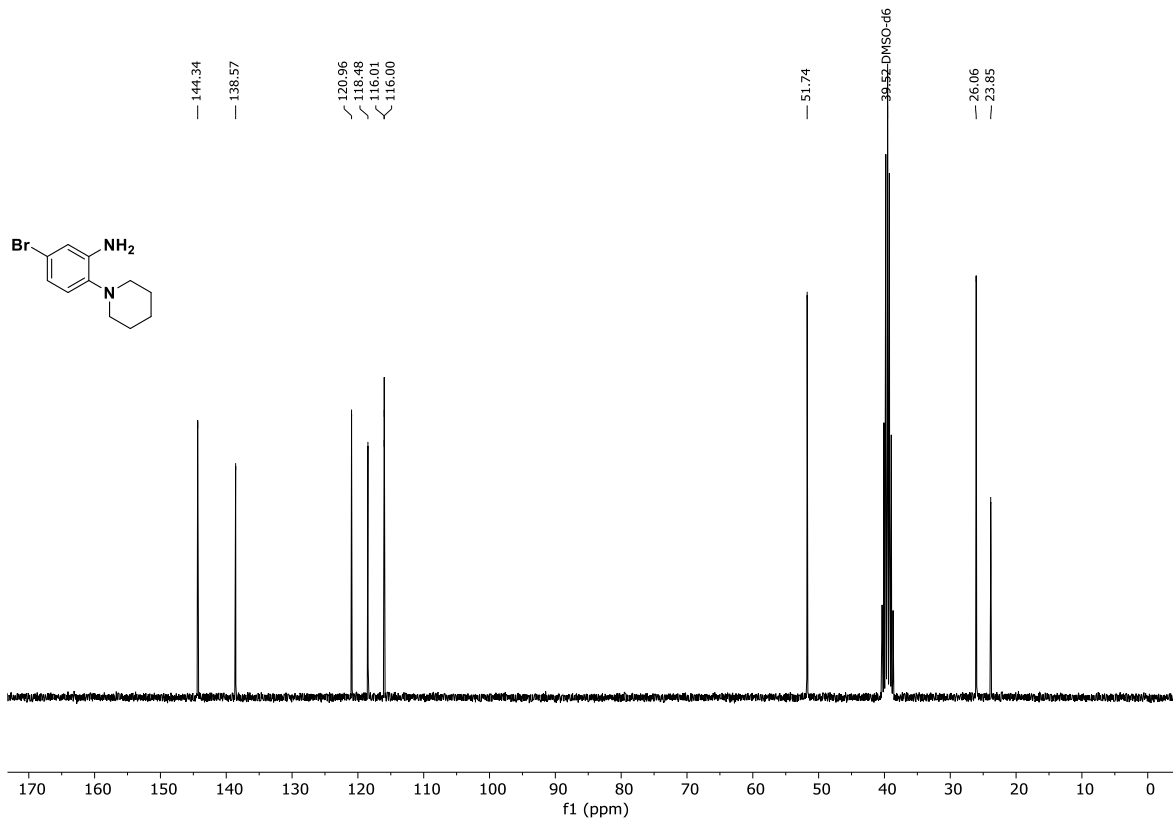


Abb. 12.28: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (75.5 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) von 5-Brom-2-(piperidin-1-yl)anilin (M-8b).

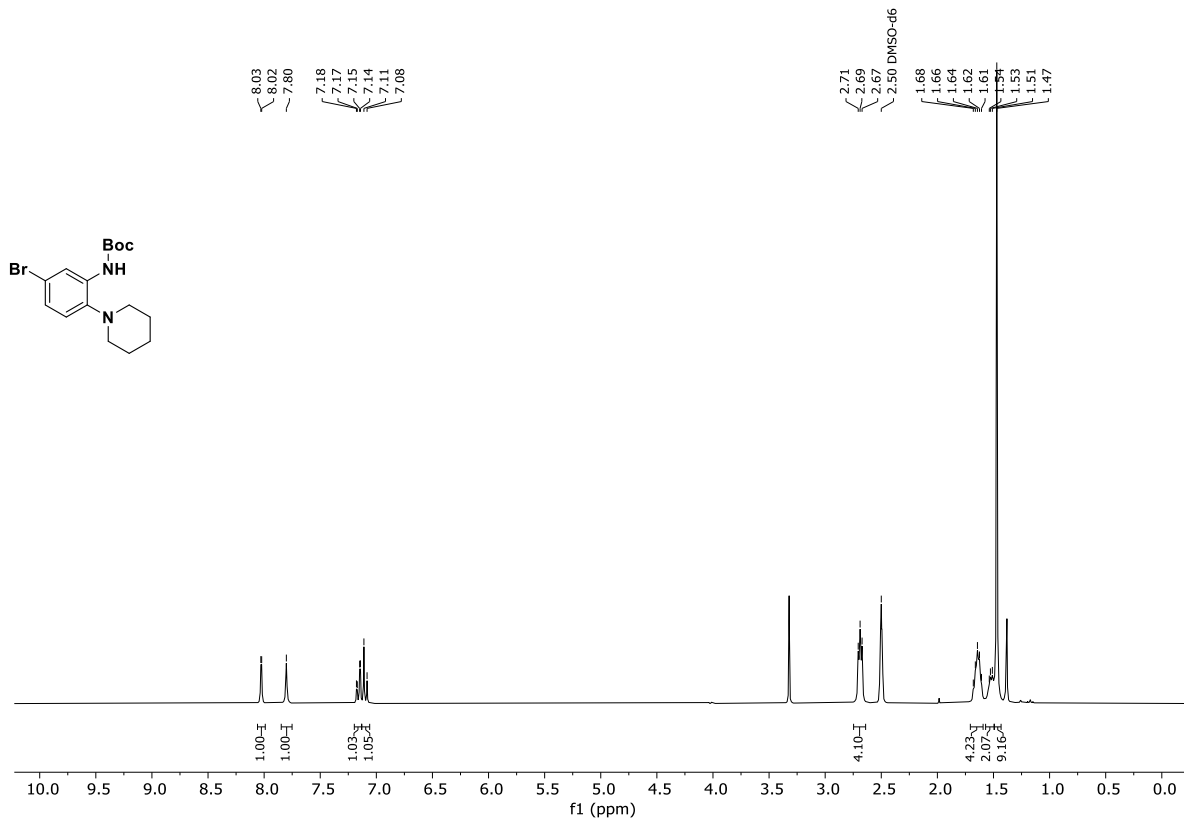


Abb. 12.29: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, DMSO-*d*₆) von *tert*-Butyl-(5-brom-2-(piperidin-1-yl)phenyl)carbamate (M-9b).

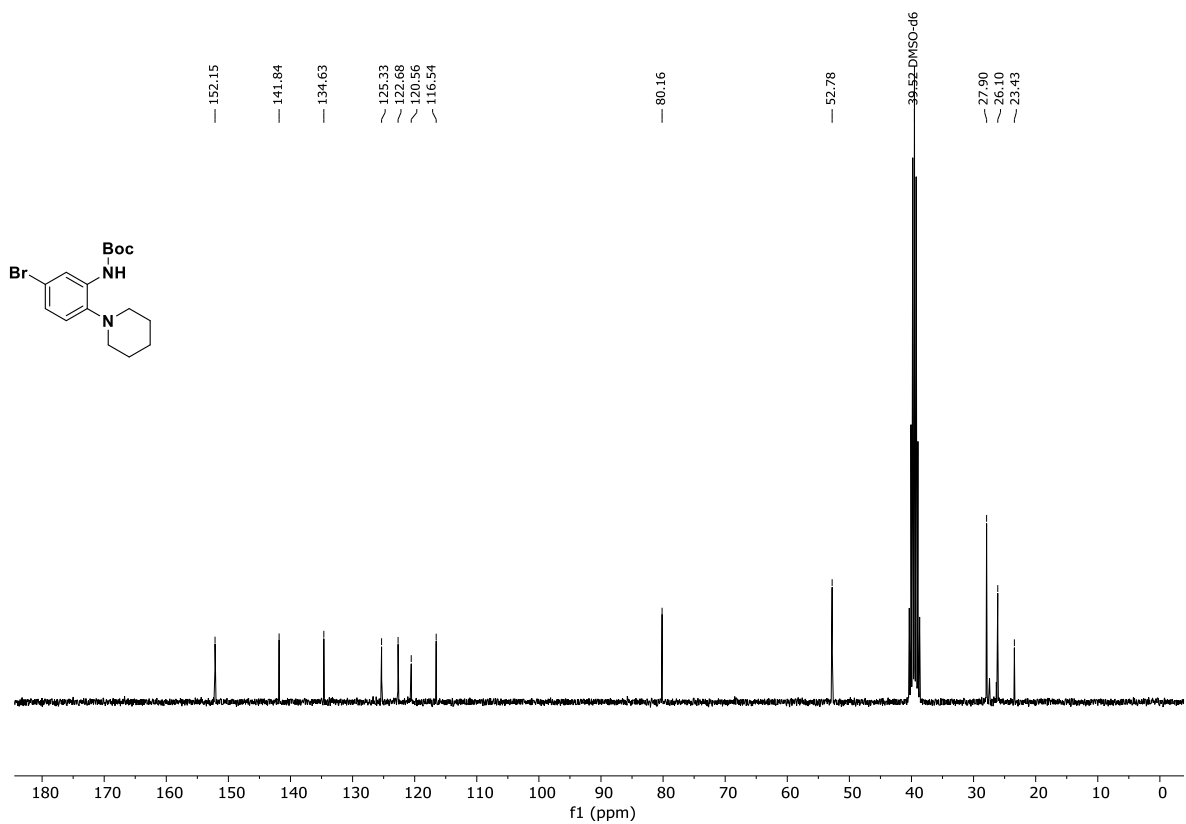


Abb. 12.30: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) von *tert*-Butyl-(5-brom-2-(piperidin-1-yl)phenyl)carbamate (M-9b).

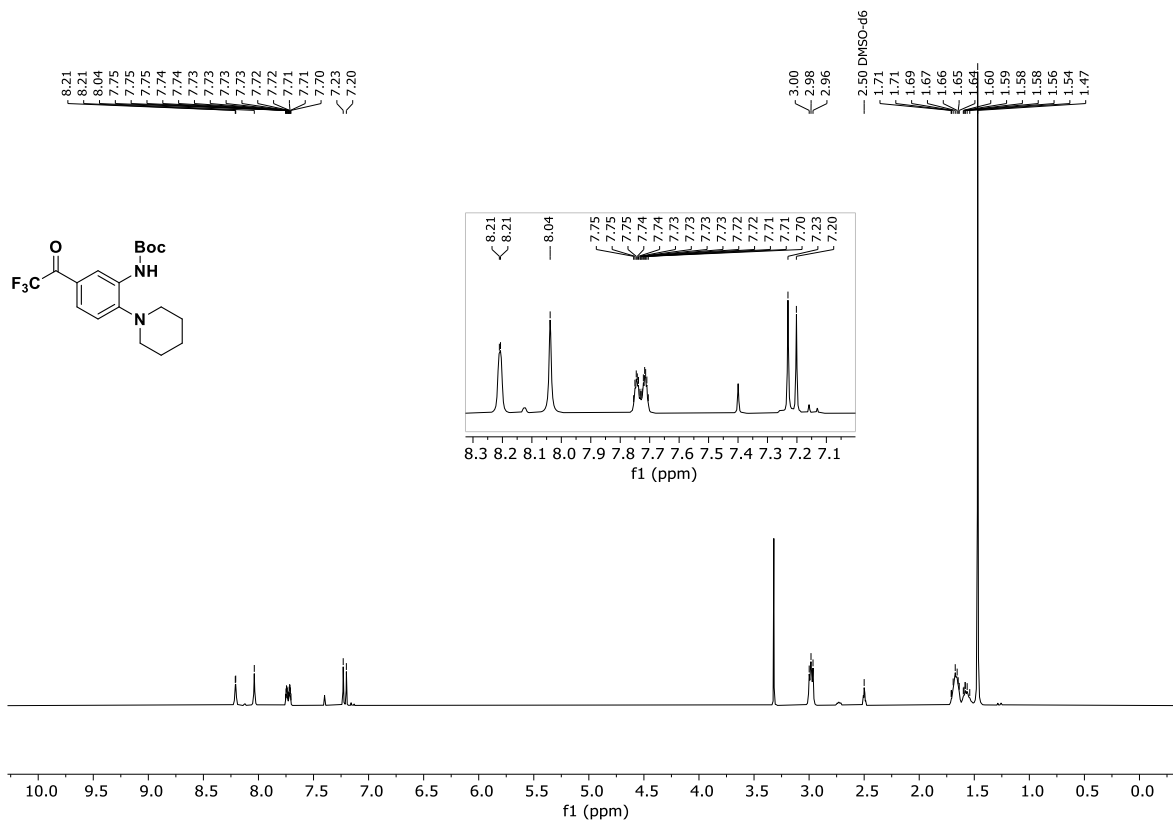


Abb. 12.31: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, DMSO-*d*₆) von *tert*-Butyl-(2-(piperidin-1-yl)-5-(2,2,2-trifluoroacetyl)-phenyl)-carbamate (**M-10b**).

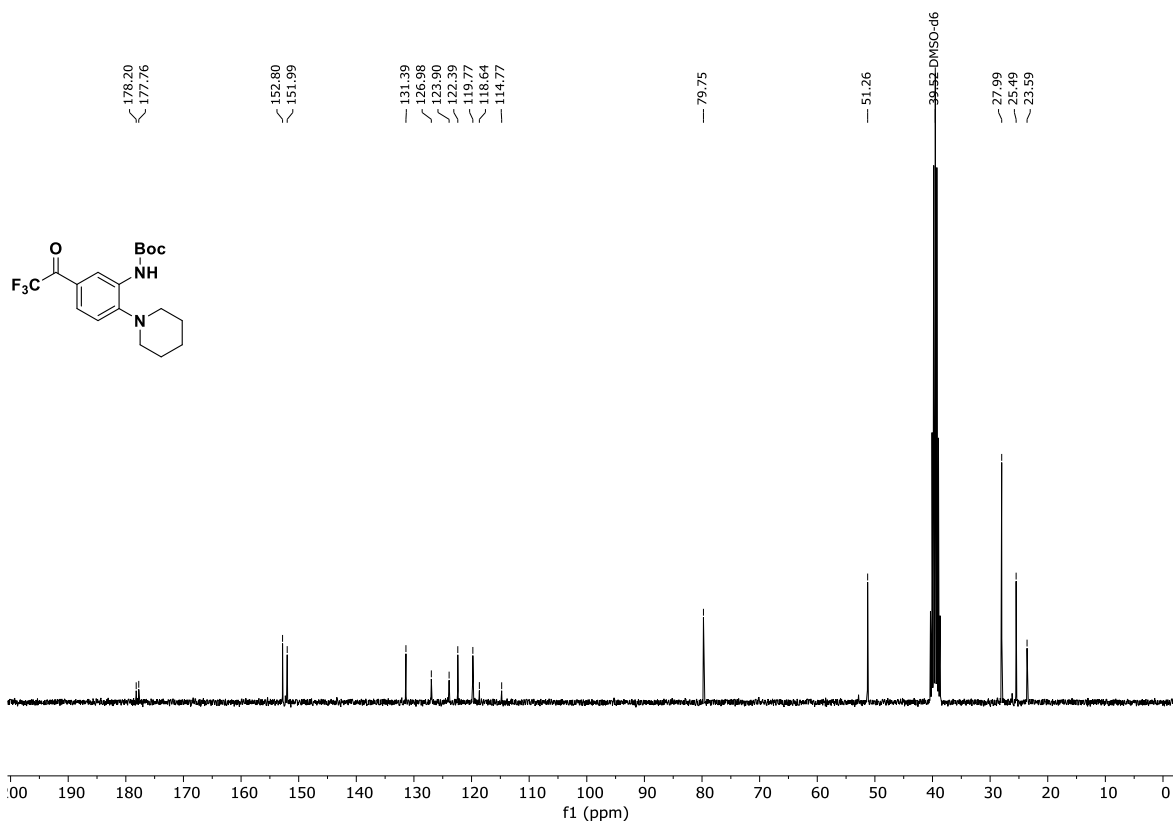


Abb. 12.32: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) von *tert*-Butyl-(2-(piperidin-1-yl)-5-(2,2,2-trifluoroacetyl)-phenyl)carbamate (**M-10b**).

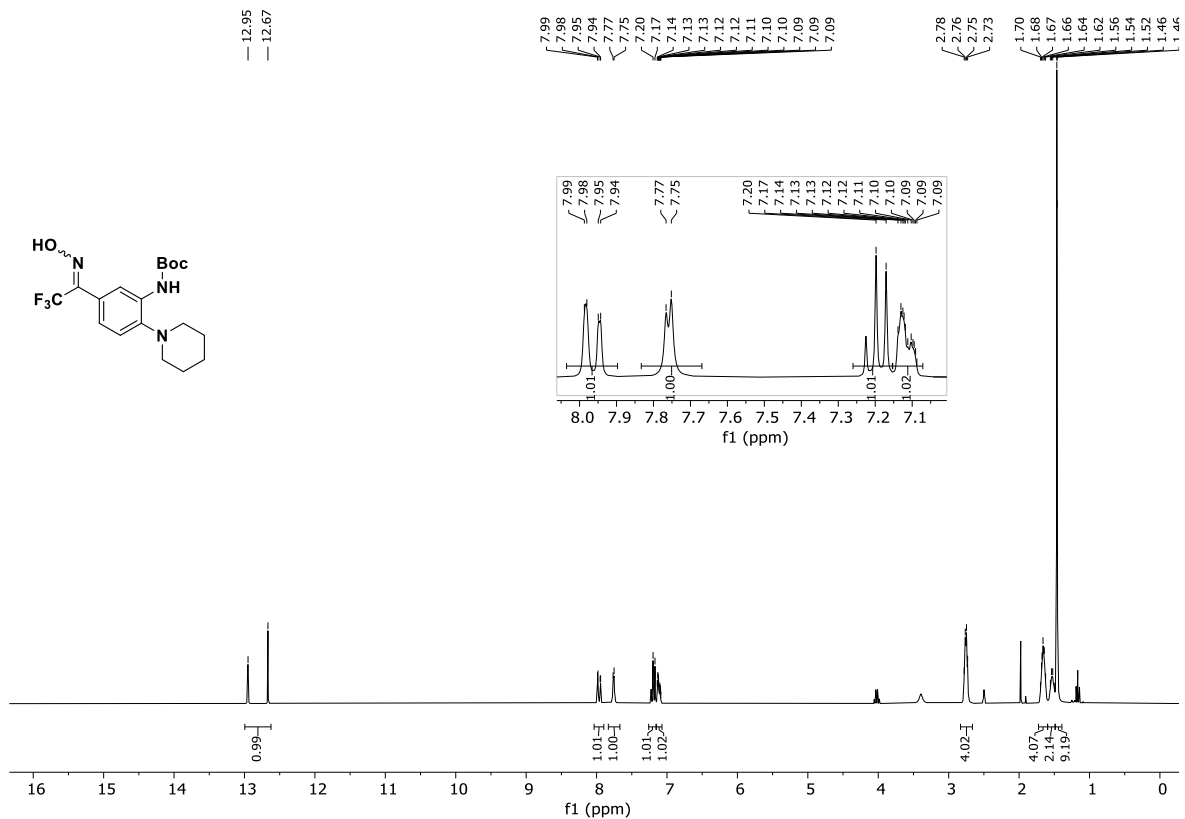


Abb. 12.33: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, DMSO-*d*₆) von *tert*-Butyl-(*E/Z*)-(2-(piperidin-1-yl)-5-(2,2,2-trifluor-1-(hydroxyimino)ethyl)phenyl)carbamate (**M-11b**).

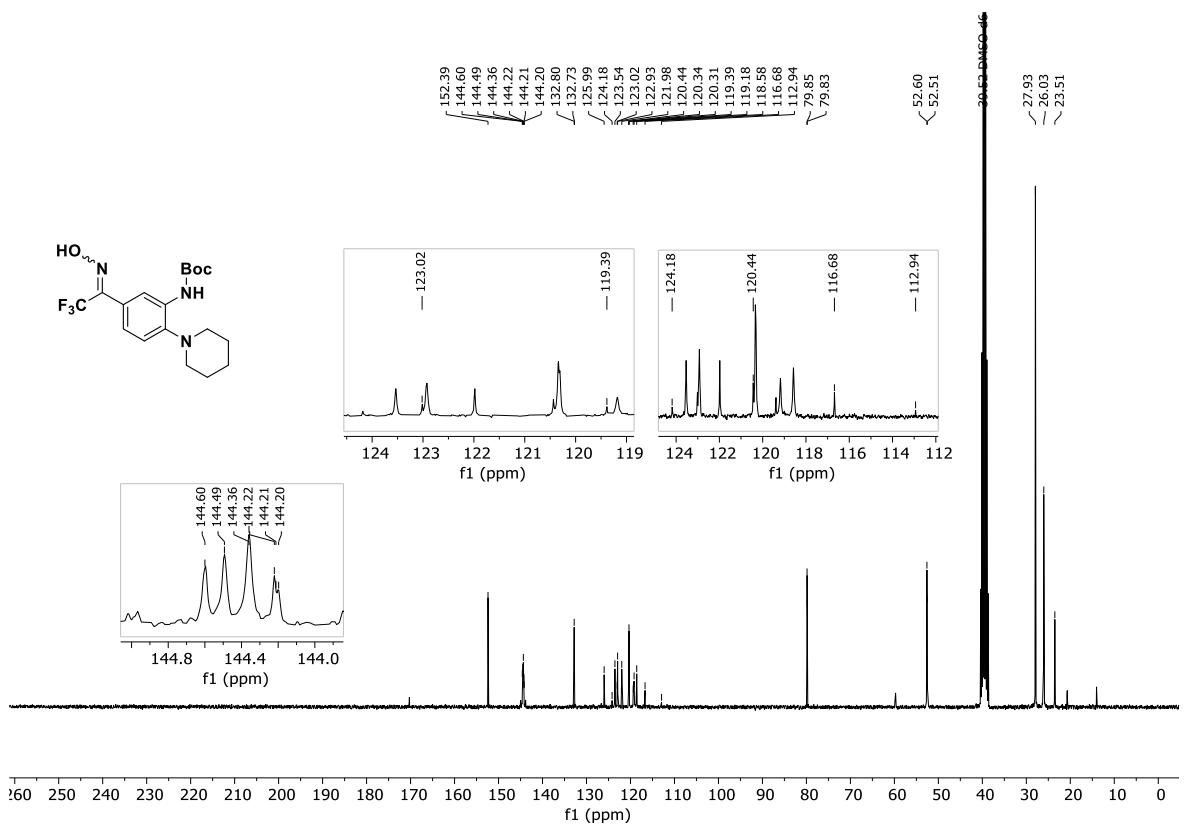


Abb. 12.34: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) von *tert*-Butyl-(*E/Z*)-(2-(piperidin-1-yl)-5-(2,2,2-trifluor-1-(hydroxyimino)ethyl)phenyl)carbamate (**M-11b**).

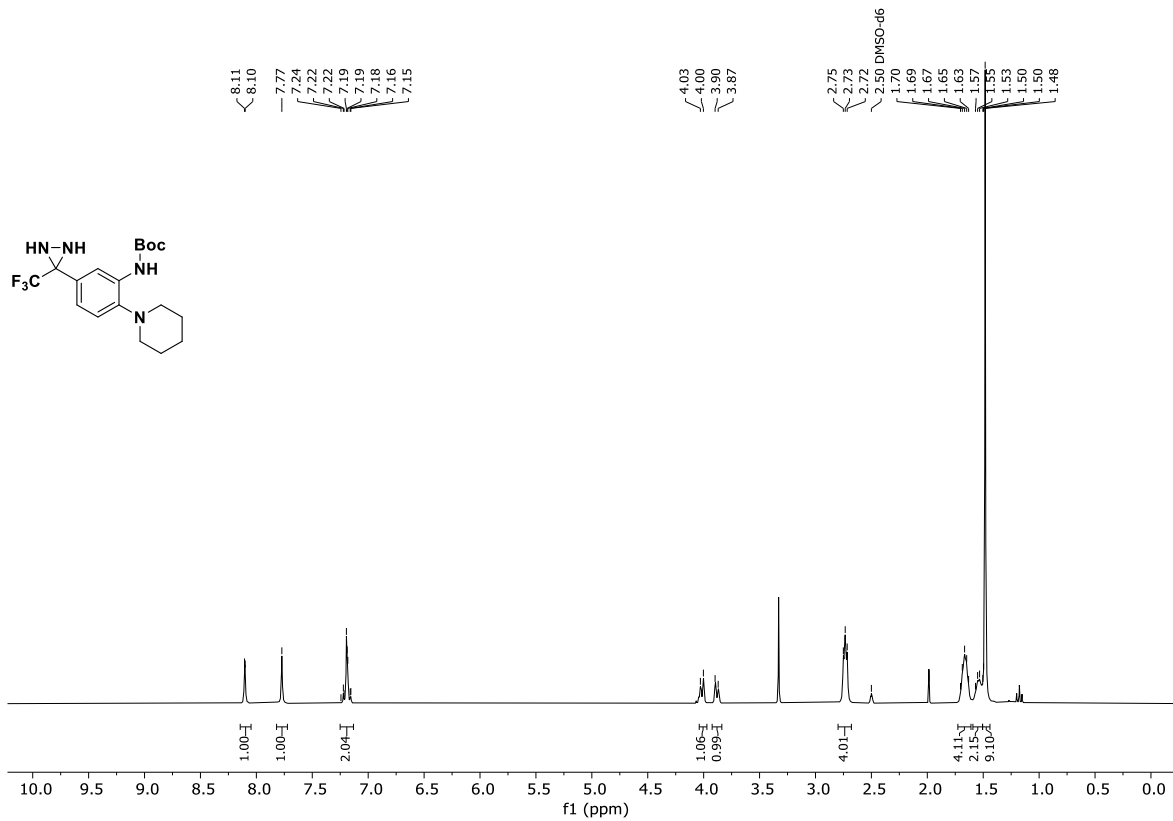


Abb. 12.35: ^1H -NMR-Spektrum (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) von *tert*-Butyl-(2-(piperidin-1-yl)-5-(3-(trifluormethyl)diaziridin-3-yl)phenyl)carbamate (**M-12b**).

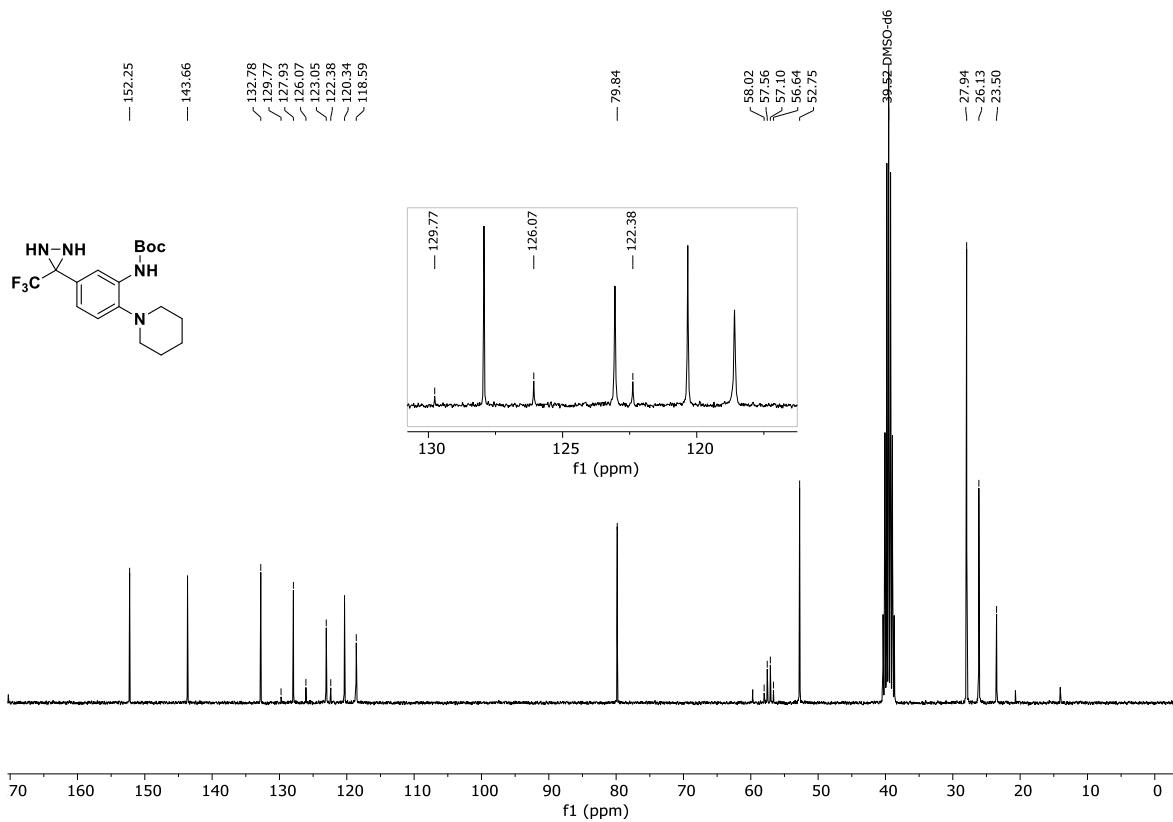


Abb. 12.36: ^{13}C -NMR-Spektrum (75.5 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) von *tert*-Butyl-(2-(piperidin-1-yl)-5-(3-(trifluormethyl)diaziridin-3-yl)phenyl)carbamate (**M-12b**).

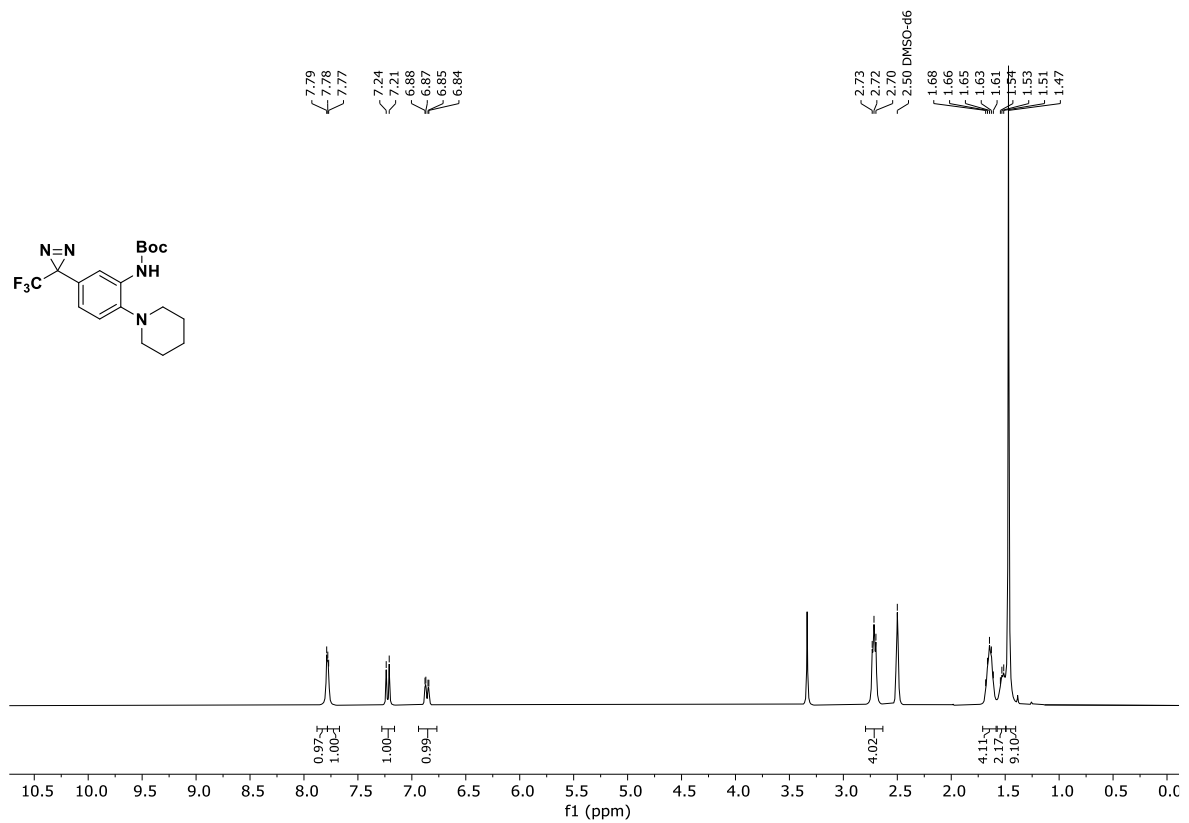


Abb. 12.37: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, DMSO-*d*₆) von *tert*-Butyl-(2-(piperidin-1-yl)-5-(3-(trifluormethyl)-3*H*-diazirin-3-yl)phenyl)carbamate (**M-13b**).

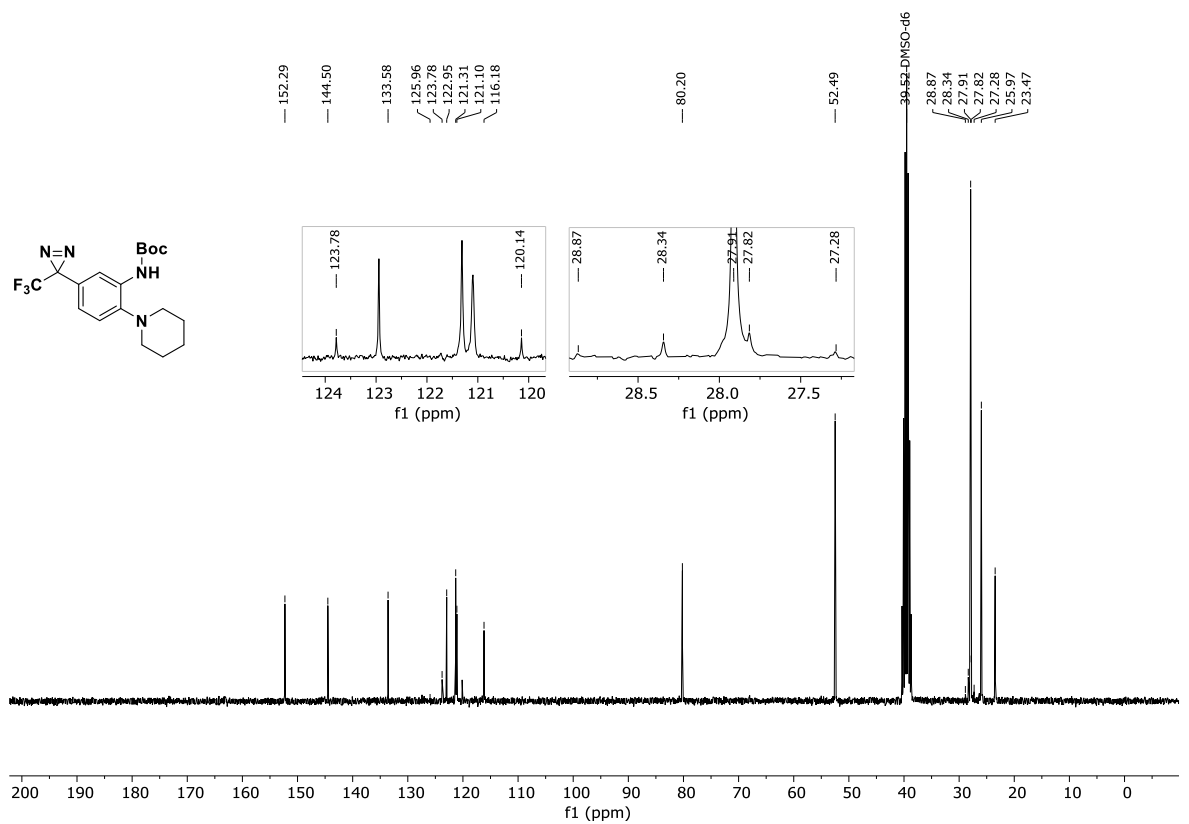


Abb. 12.38: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) von *tert*-Butyl-(2-(piperidin-1-yl)-5-(3-(trifluormethyl)-3*H*-diazirin-3-yl)phenyl)carbamate (**M-13b**).

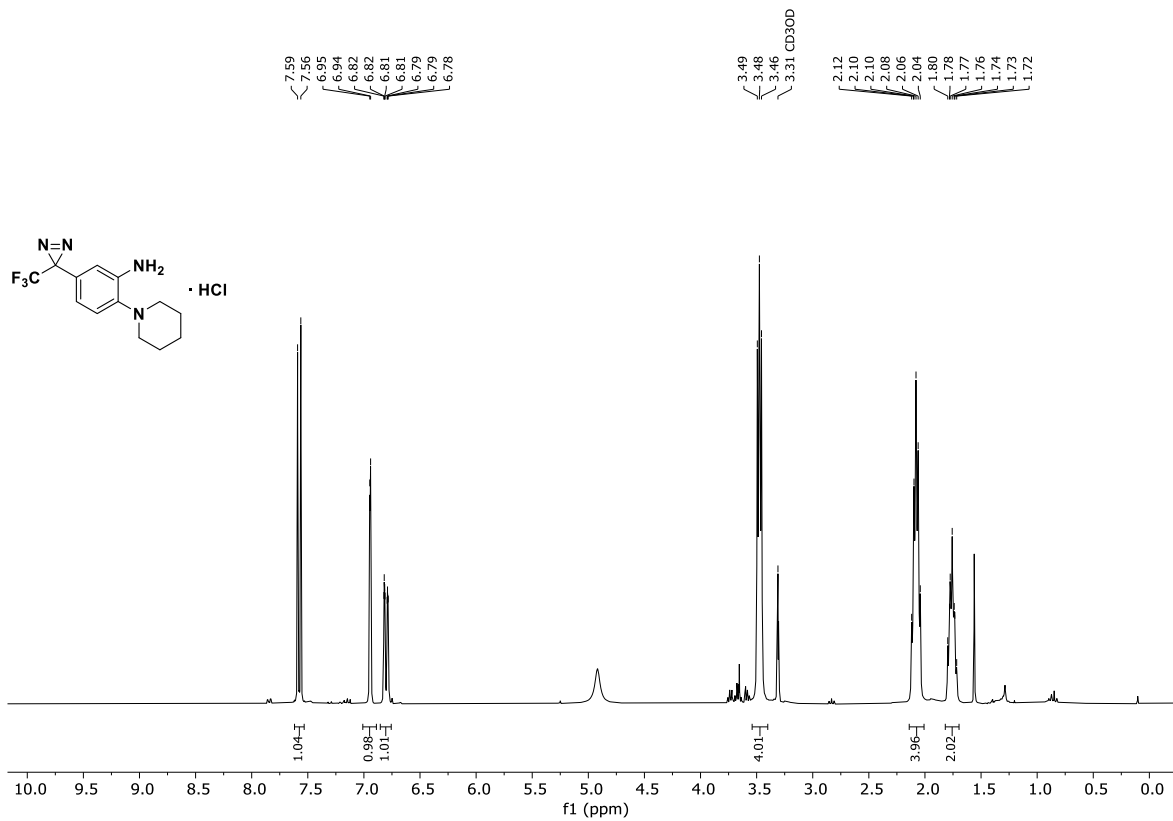


Abb. 12.39: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (300 MHz, Methanol- d_4) von 2-(Piperidin-1-yl)-5-(3-(trifluormethyl)-3H-diazirin-3-yl)anilin-Hydrochlorid (**M-14b**).

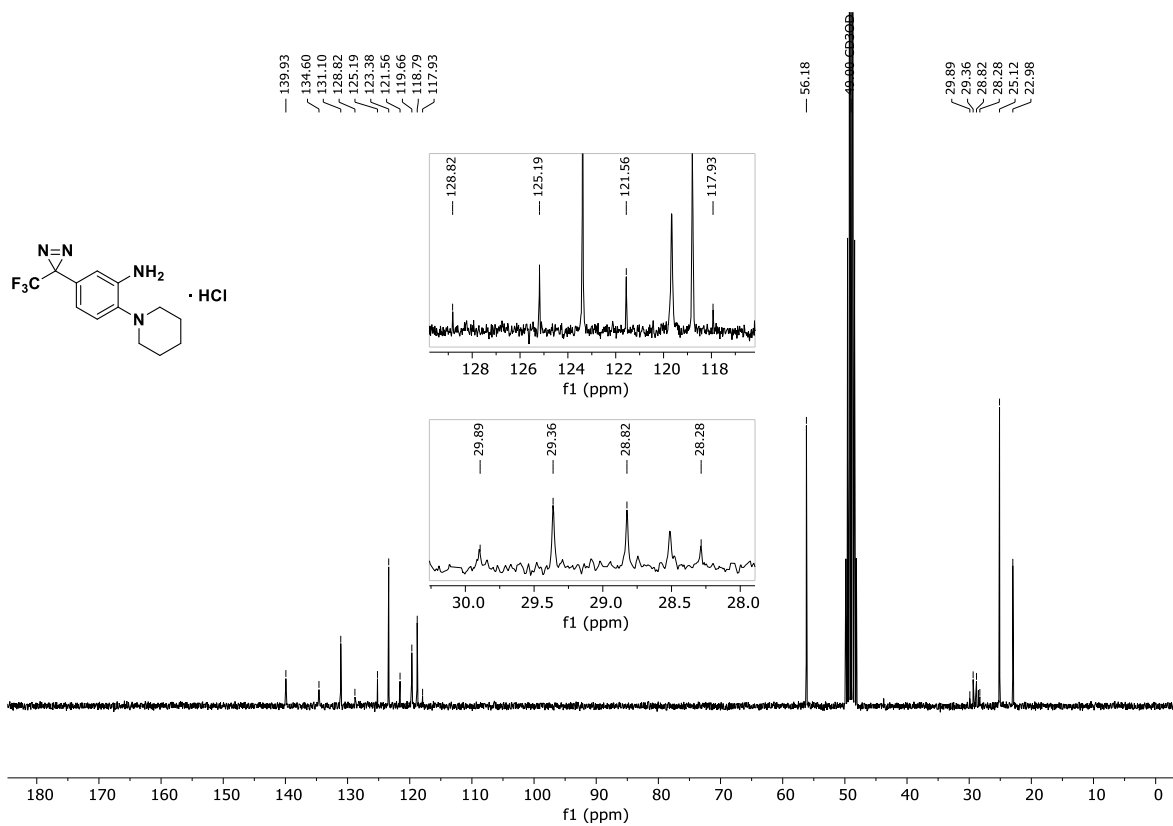


Abb. 12.40: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (75.5 MHz, Methanol- d_4) von 2-(Piperidin-1-yl)-5-(3-(trifluormethyl)-3H-diazirin-3-yl)anilin-Hydrochlorid (**M-14b**).

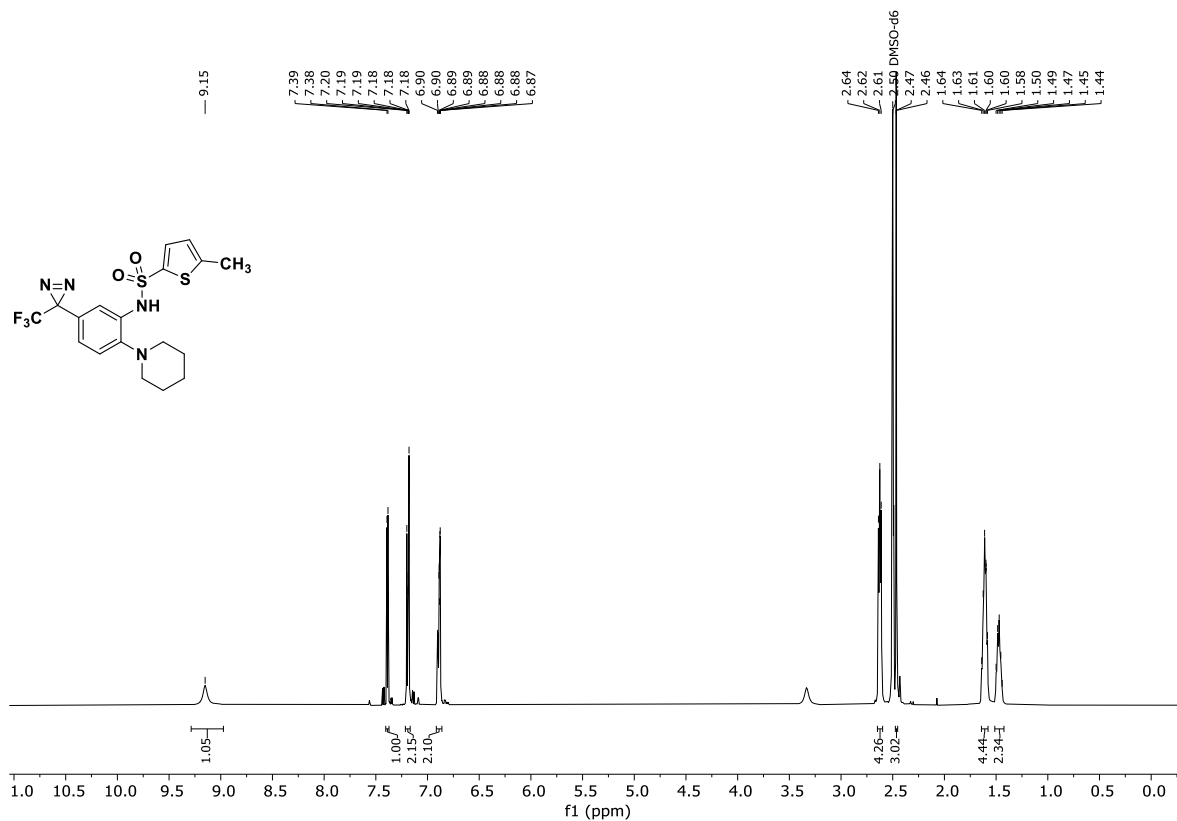


Abb. 12.41: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz, DMSO-*d*₆) von 5-Methyl-*N*-(2'-(piperidin-1-yl)-5'-(3-(trifluormethyl)-3*H*-diazirin-3-yl)phenyl)thiophen-2-sulfonamid (MK6-83^{PG2}, M-3b, KS249).

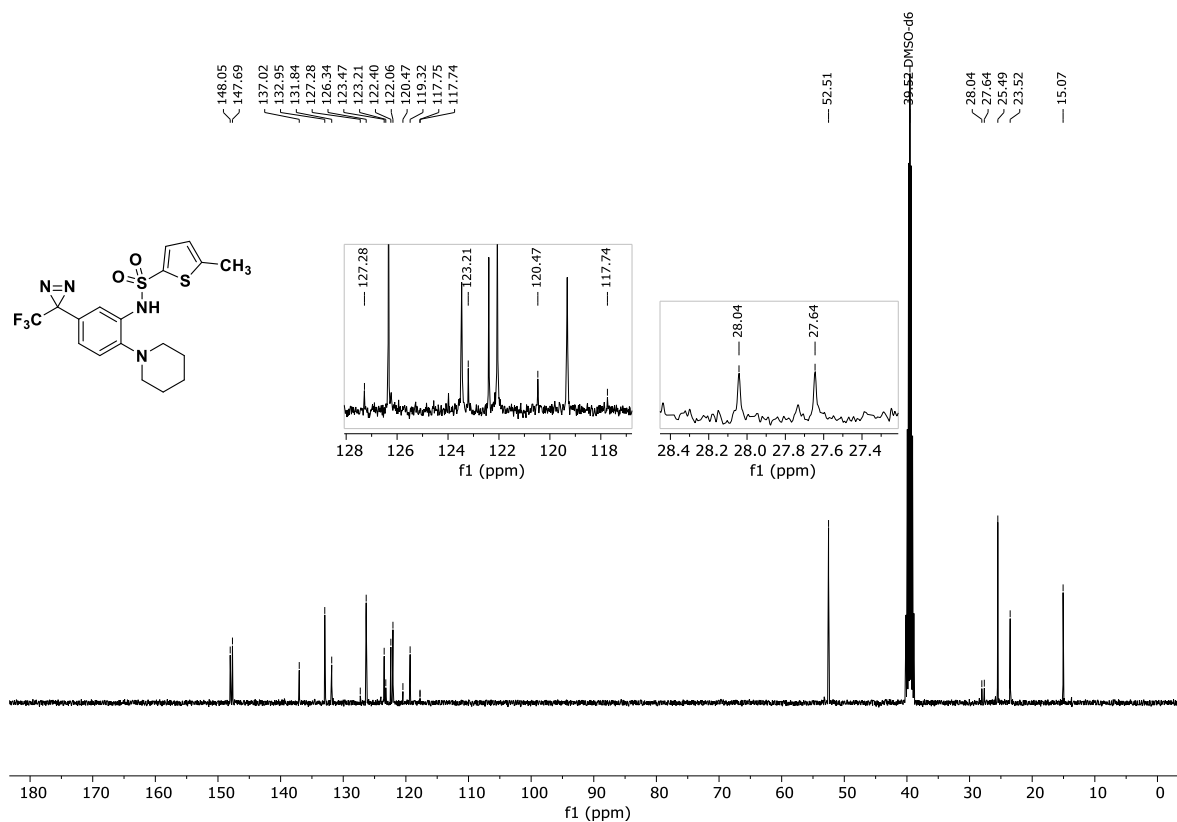


Abb. 12.42: ¹³C-NMR-Spektrum (100.6 MHz, DMSO-*d*₆) von 5-Methyl-*N*-(2'-(piperidin-1-yl)-5'-(3-(trifluormethyl)-3*H*-diazirin-3-yl)phenyl)thiophen-2-sulfonamid (MK6-83^{PG2}, M-3b, KS249).

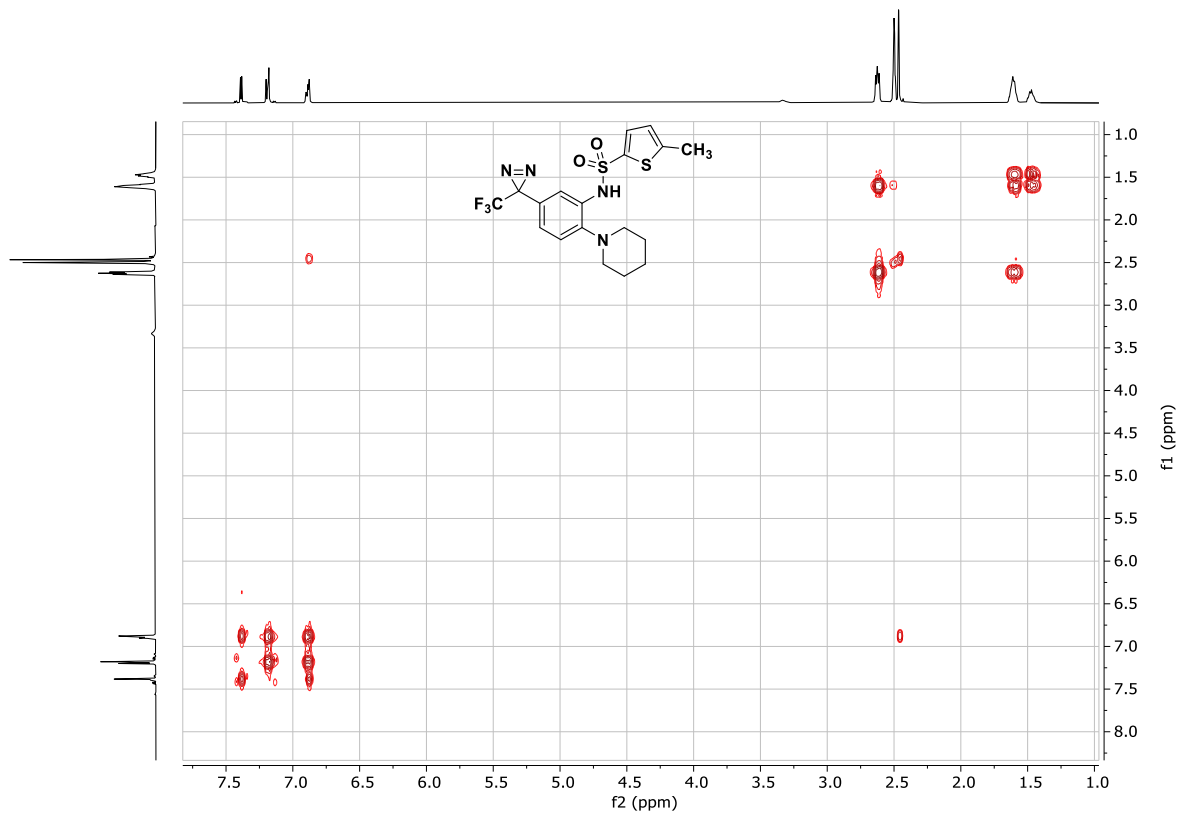


Abb. 12.43: ^1H - ^1H -COSY-Spektrum (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) von 5-Methyl-*N*-(2'-(piperidin-1-yl)-5'-(3-(trifluormethyl)-3*H*-diazirin-3-yl)phenyl)thiophen-2-sulfonamid (MK6-83^{PG2}, M-3b, KS249).

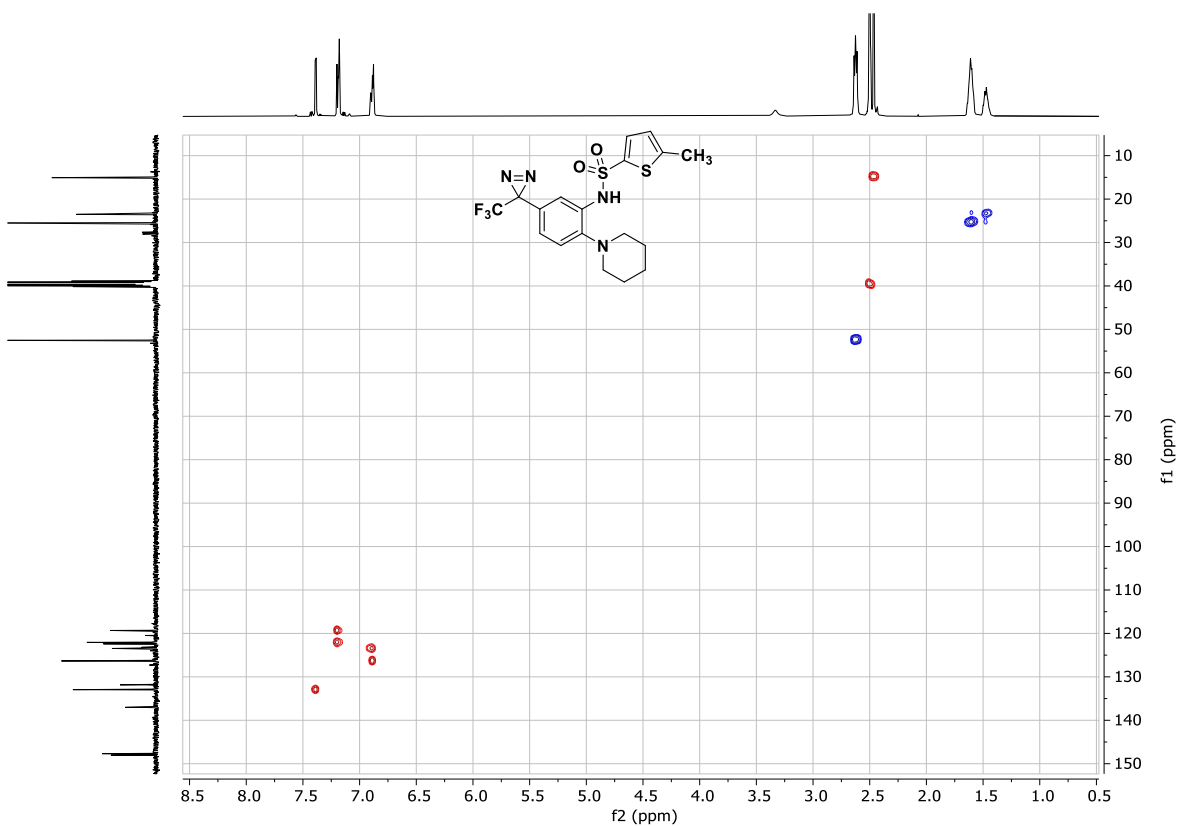


Abb. 12.44: ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) von 5-Methyl-*N*-(2'-(piperidin-1-yl)-5'-(3-(trifluormethyl)-3*H*-diazirin-3-yl)phenyl)thiophen-2-sulfonamid (MK6-83^{PG2}, M-3b, KS249).

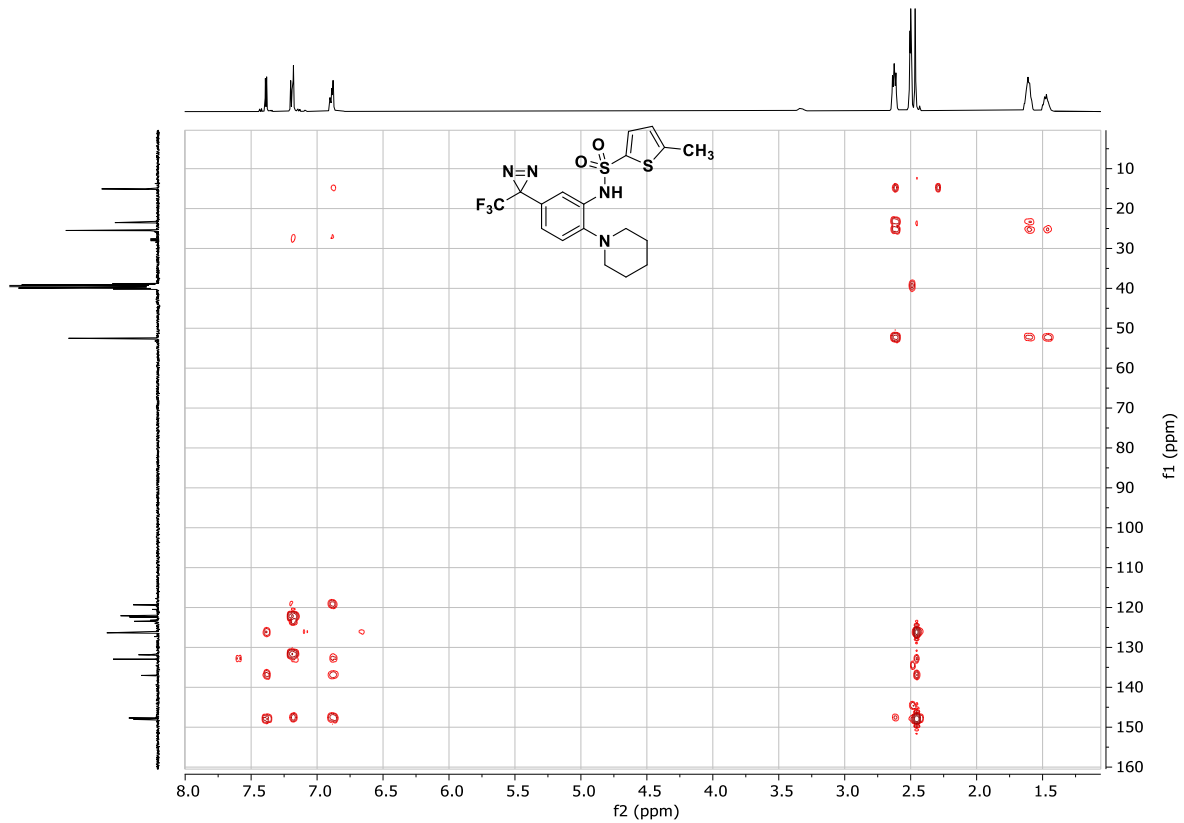


Abb. 12.45: ^1H - ^{13}C -HMBC-Spektrum (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) von 5-Methyl-*N*-(2'-(piperidin-1-yl)-5'-(3-(trifluormethyl)-3*H*-diazirin-3-yl)phenyl)thiophen-2-sulfonamid (**MK6-83^{PG2}**, **M-3b**, **KS249**).

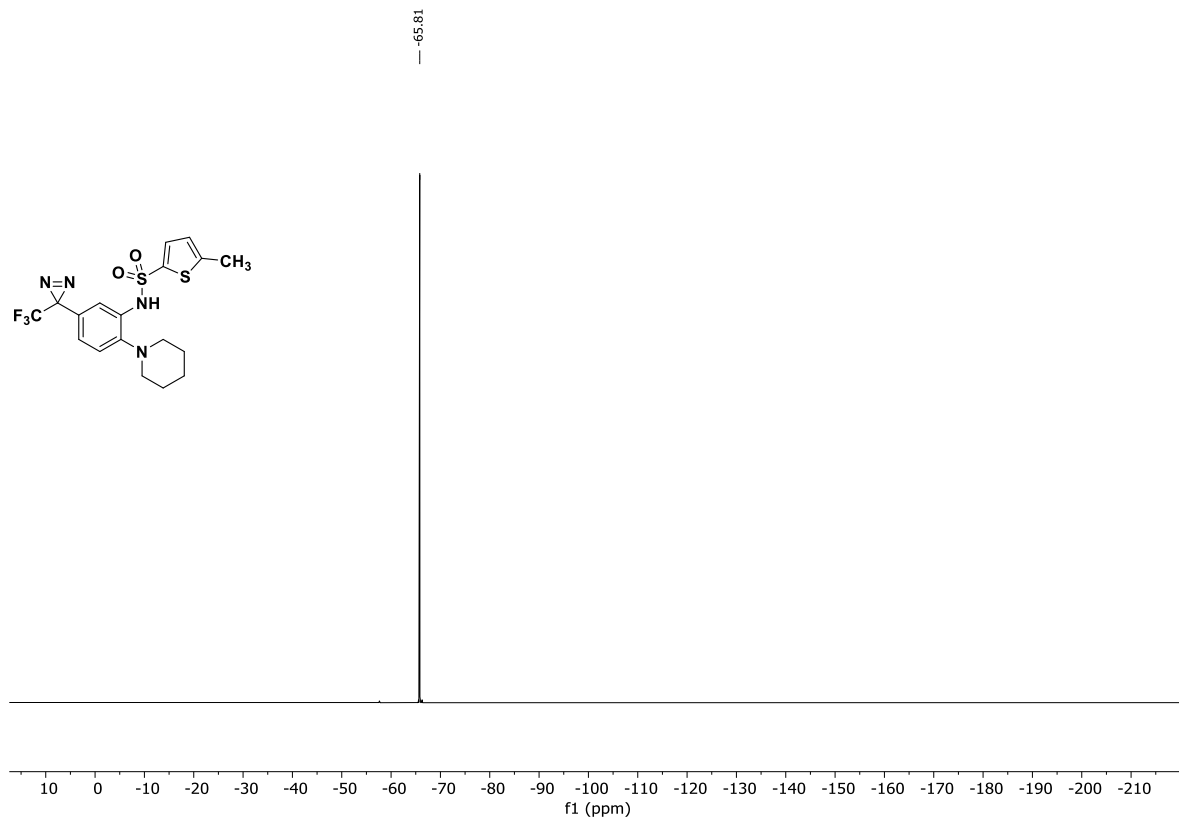


Abb. 12.46: ^{19}F -NMR-Spektrum (376 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) von 5-Methyl-*N*-(2'-(piperidin-1-yl)-5'-(3-(trifluormethyl)-3*H*-diazirin-3-yl)phenyl)thiophen-2-sulfonamid (**MK6-83^{PG2}**, **M-3b**, **KS249**).

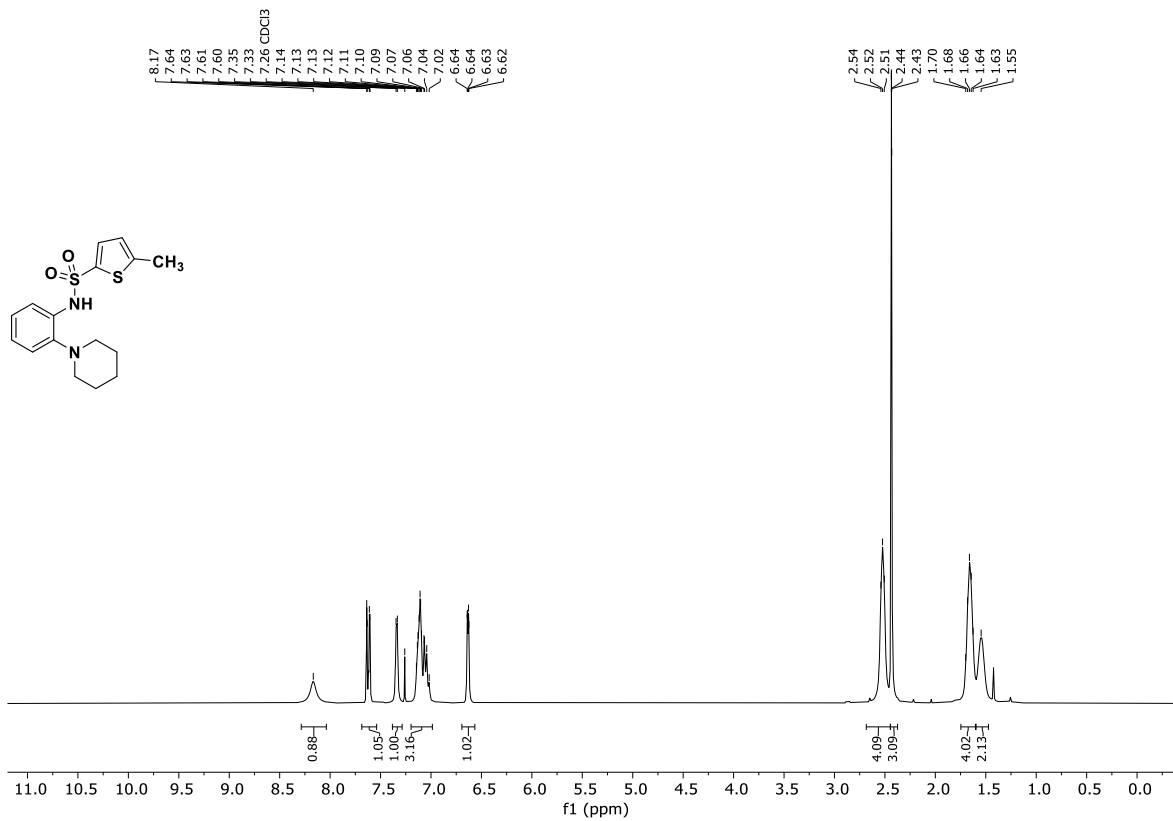


Abb. 12.47: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl₃) von 5-Methyl-N-(2-(piperidin-1-yl)phenyl)thiophen-2-sulfonamid (MK6-83, 41a).

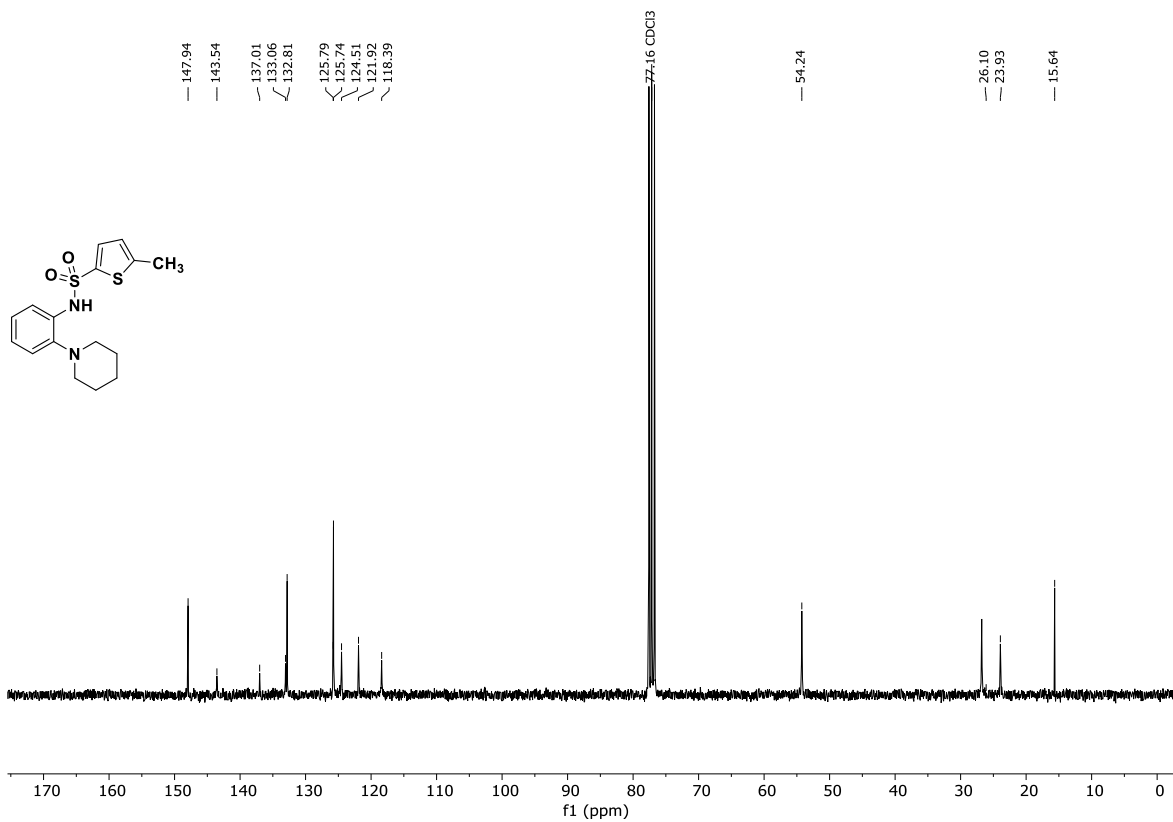


Abb. 12.48: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, CDCl₃) von 5-Methyl-N-(2-(piperidin-1-yl)phenyl)thiophen-2-sulfonamid (MK6-83, 41a).

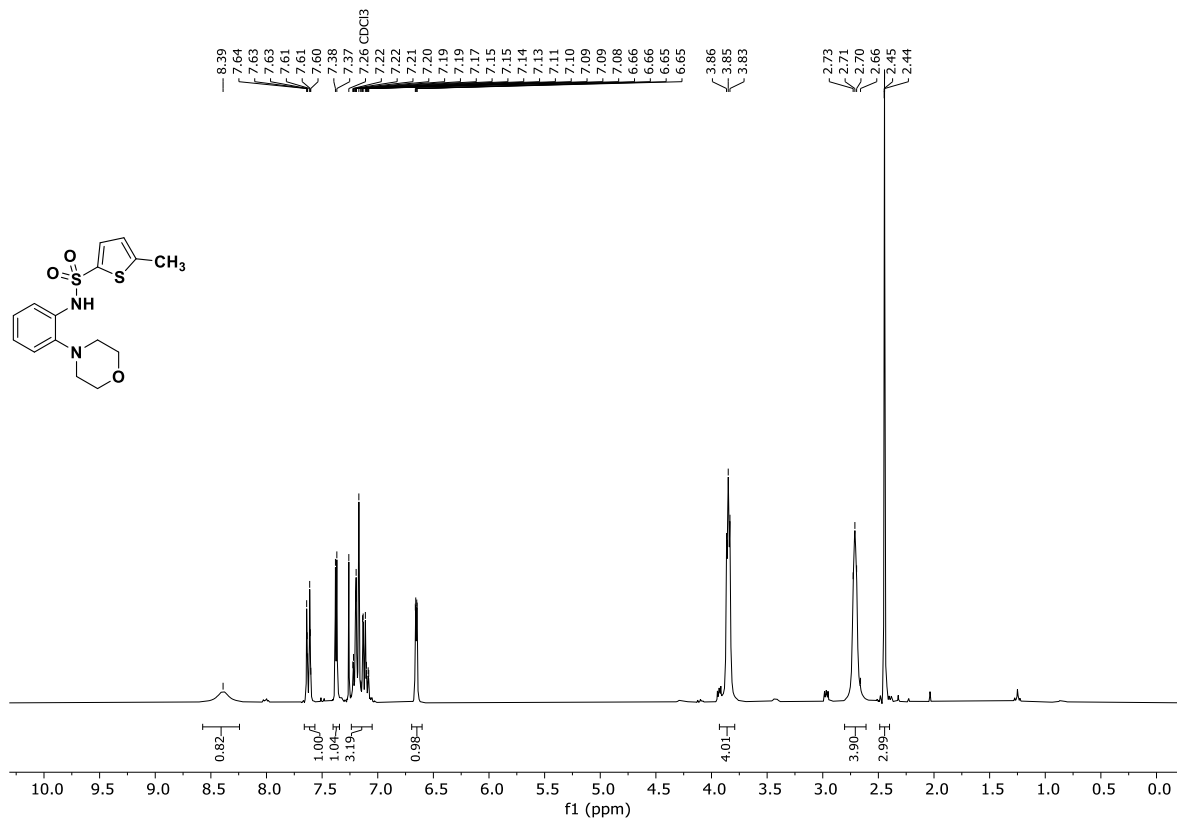


Abb. 12.49: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl₃) von 5-Methyl-N-(2-morpholinophenyl)thiophen-2-sulfonamid (41b).

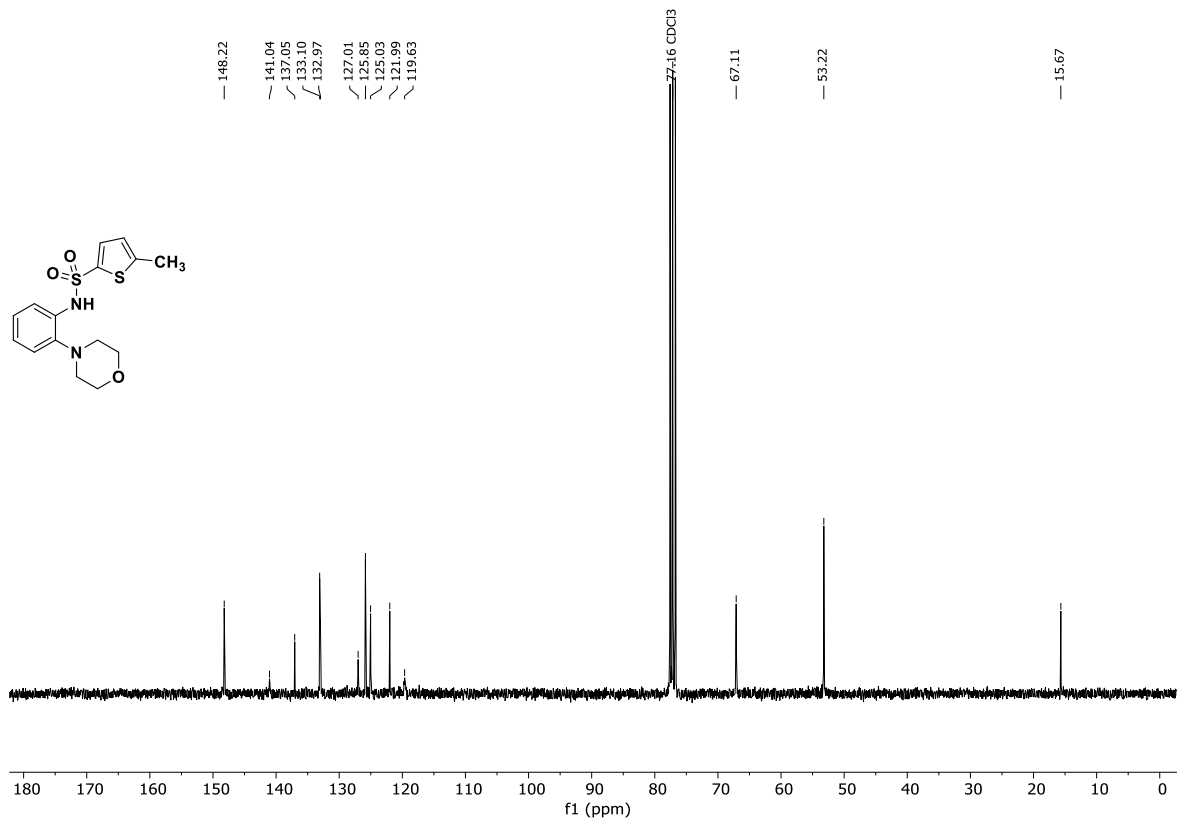


Abb. 12.50: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, CDCl₃) von 5-Methyl-N-(2-morpholinophenyl)thiophen-2-sulfonamid (41b).

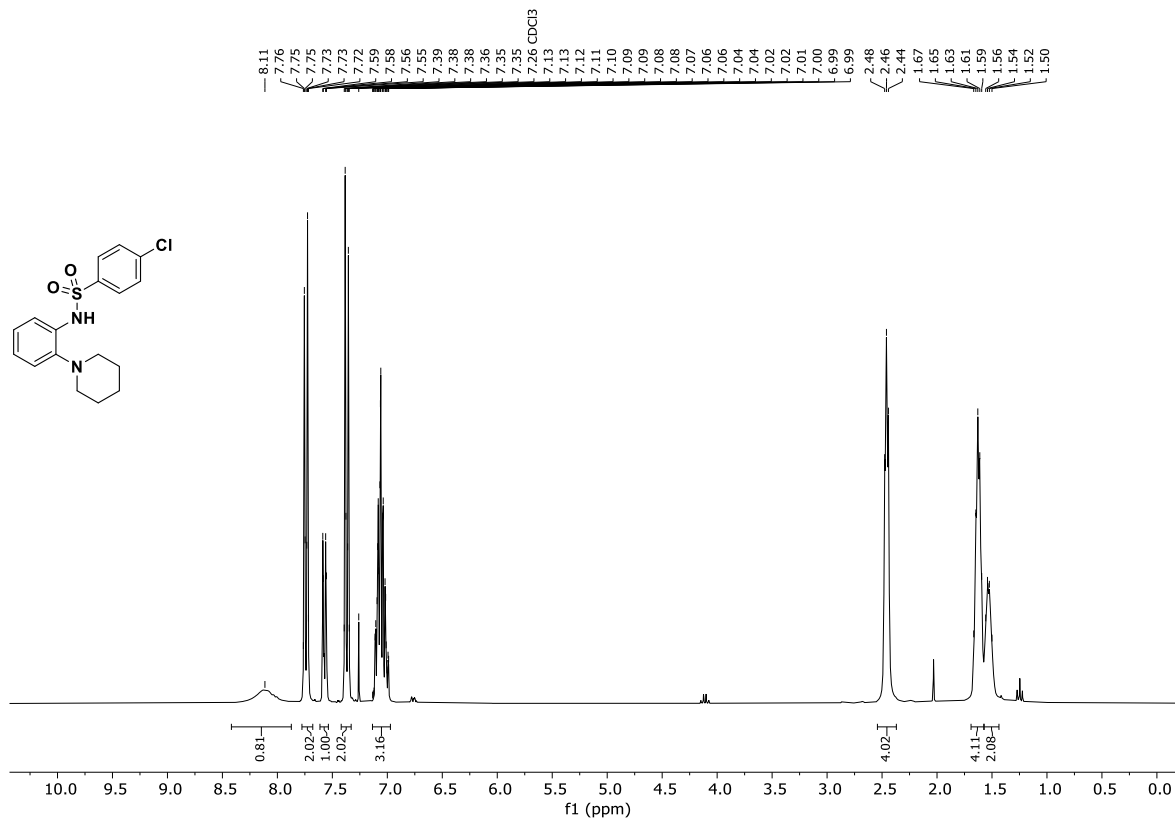


Abb. 12.51: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl₃) von 4'-Chlor-N-(2-(piperidin-1-yl)phenyl)benzenesulfonamid (41c).

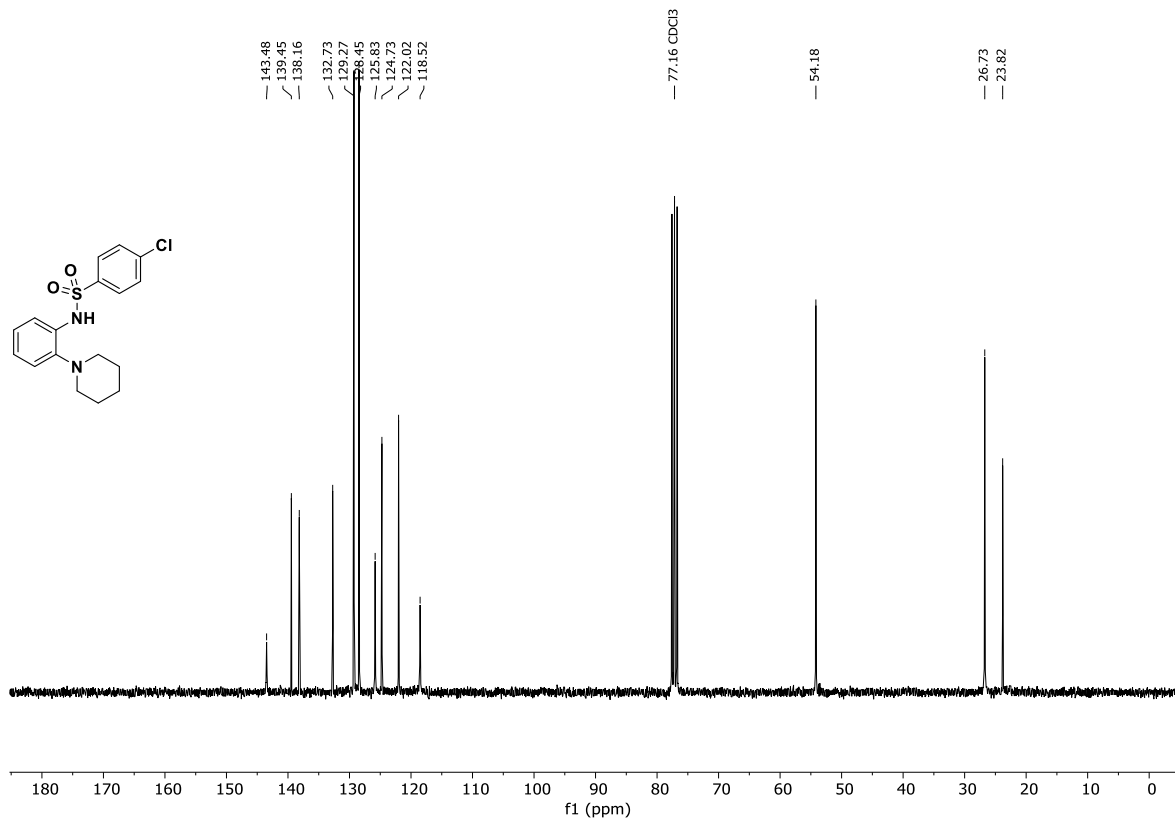
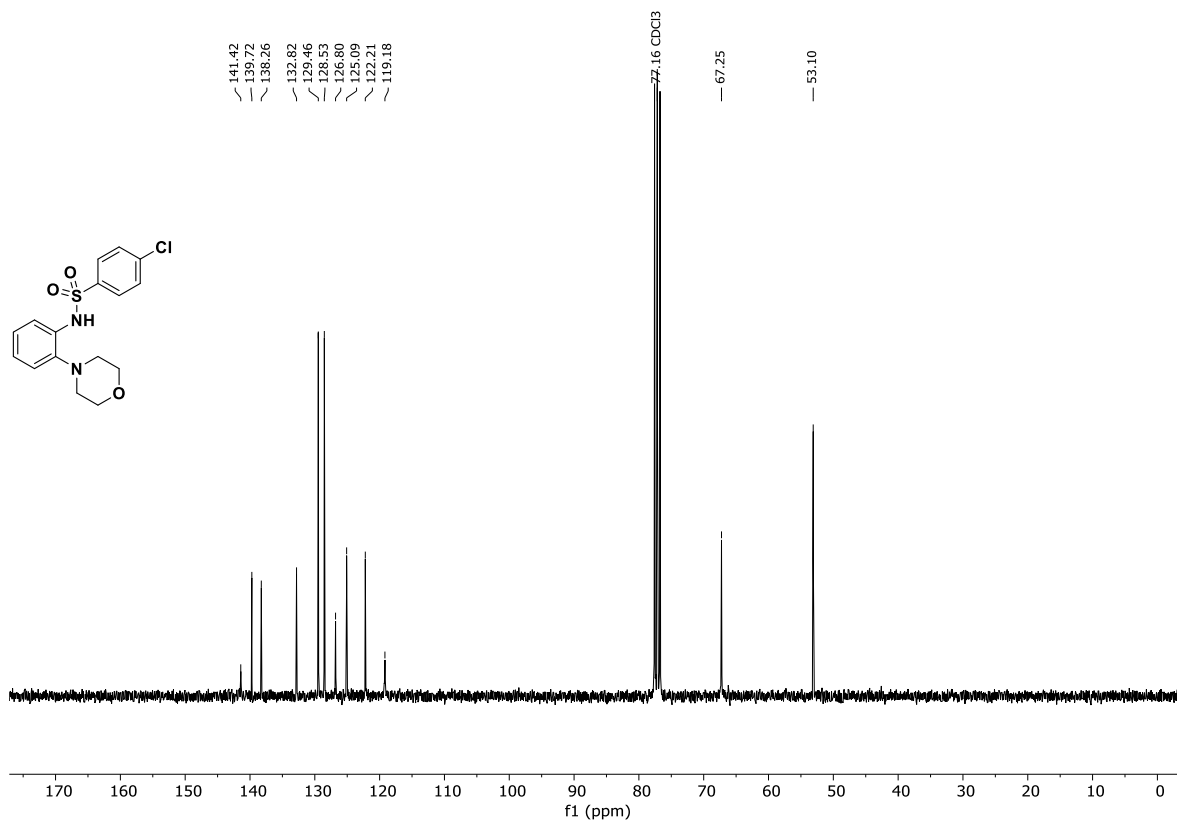
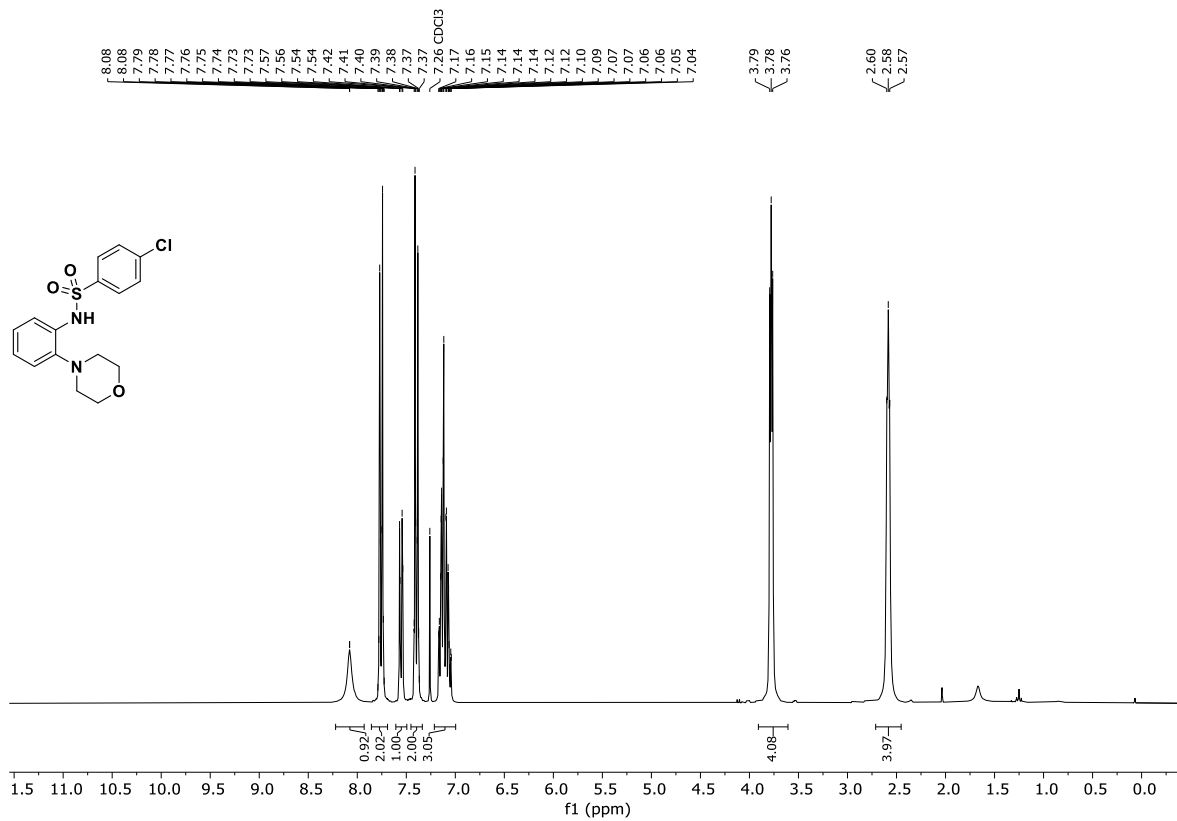


Abb. 12.52: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, CDCl₃) von 4'-Chlor-N-(2-(piperidin-1-yl)phenyl)benzenesulfonamid (41c).



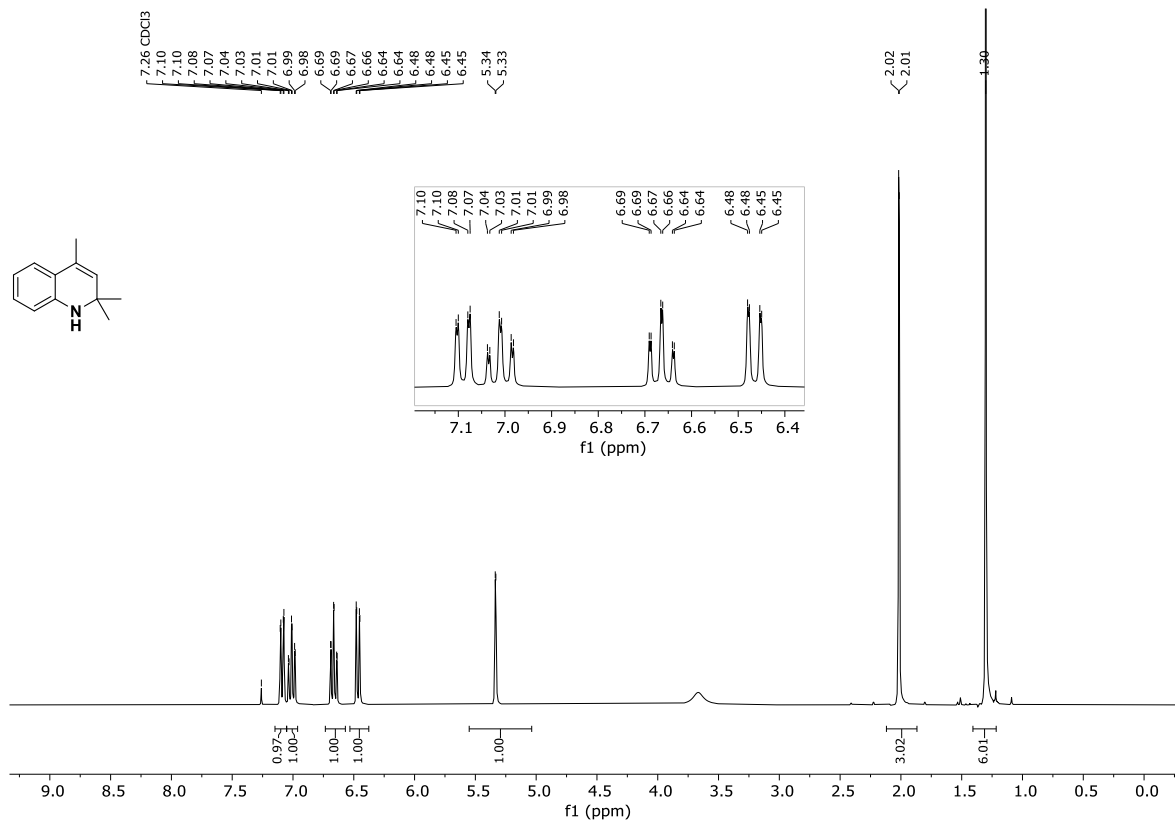


Abb. 12.55: ^1H -NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl_3) von 2,2,4-Trimethyl-1,2-dihydrochinolin (TMQ, 70).

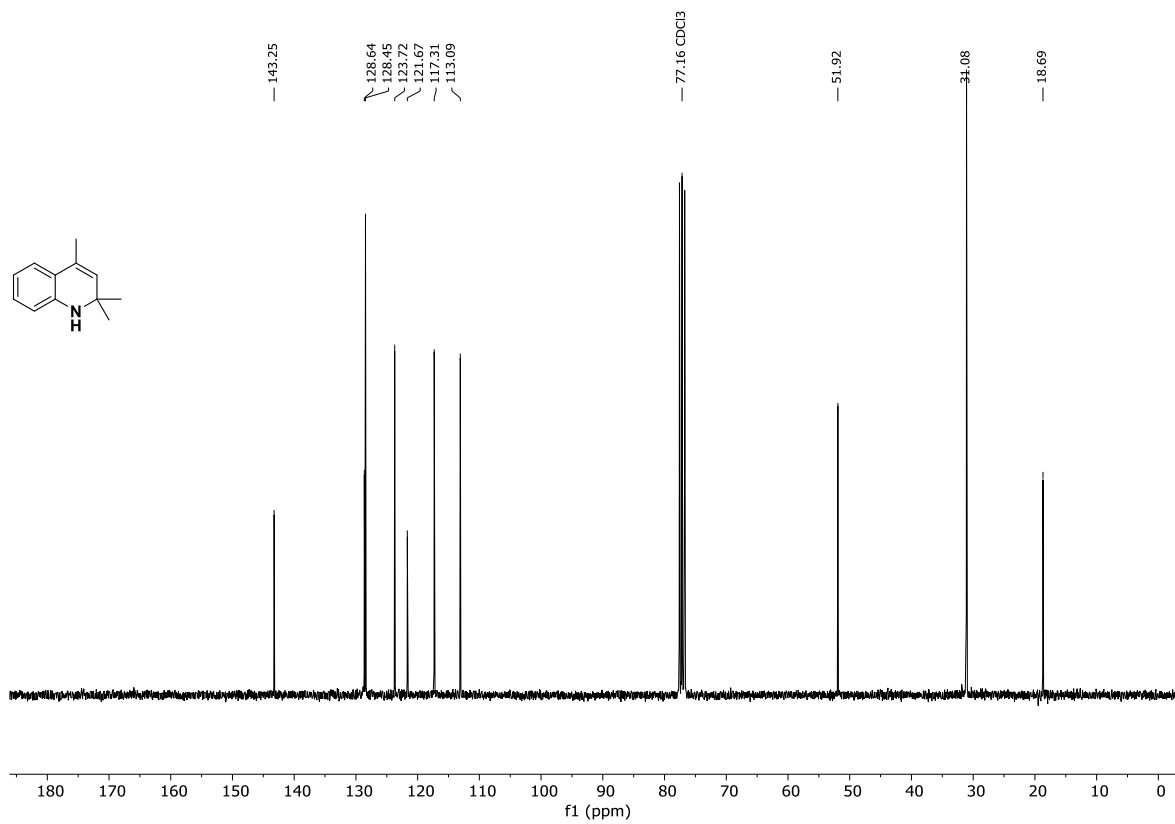


Abb. 12.56: ^{13}C -NMR-Spektrum (75.5 MHz, CDCl_3) von 2,2,4-Trimethyl-1,2-dihydrochinolin (TMQ, 70).

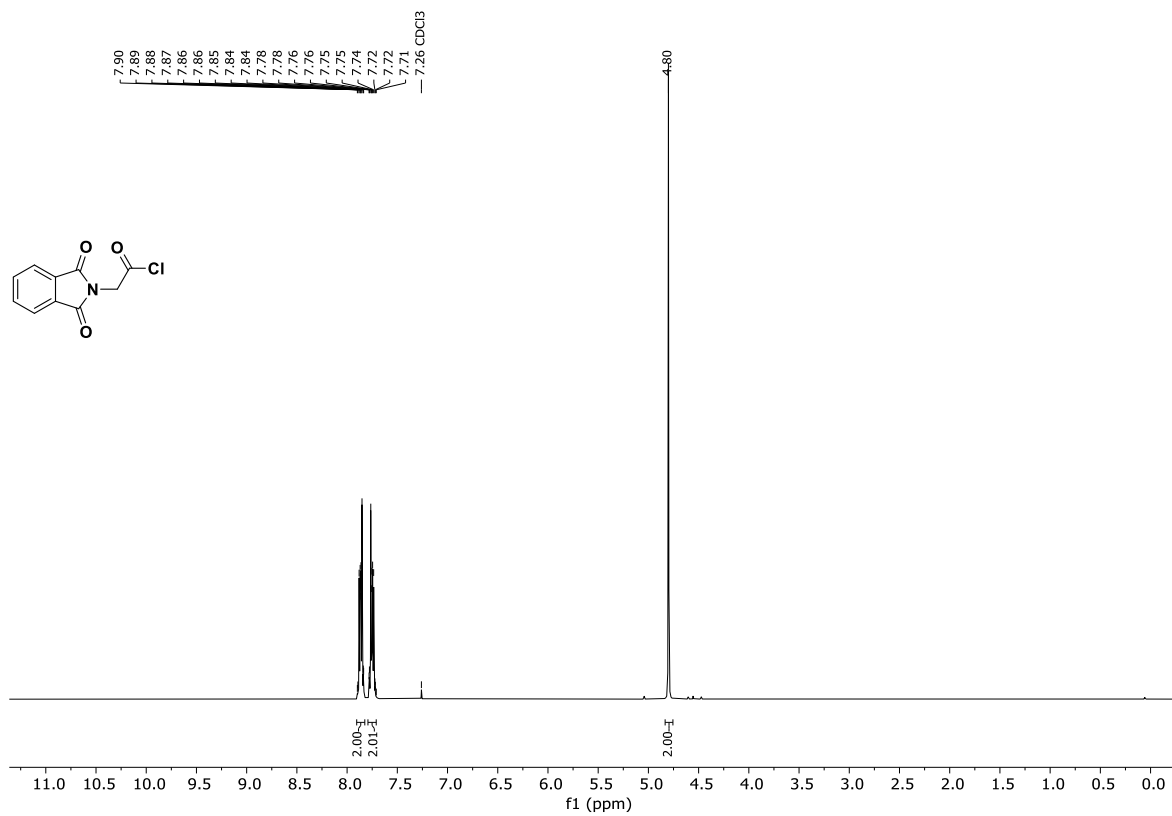


Abb. 12.57: ^1H -NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl_3) von 2-(1,3-Dioxisoindolin-2-yl)acetylchlorid (72).

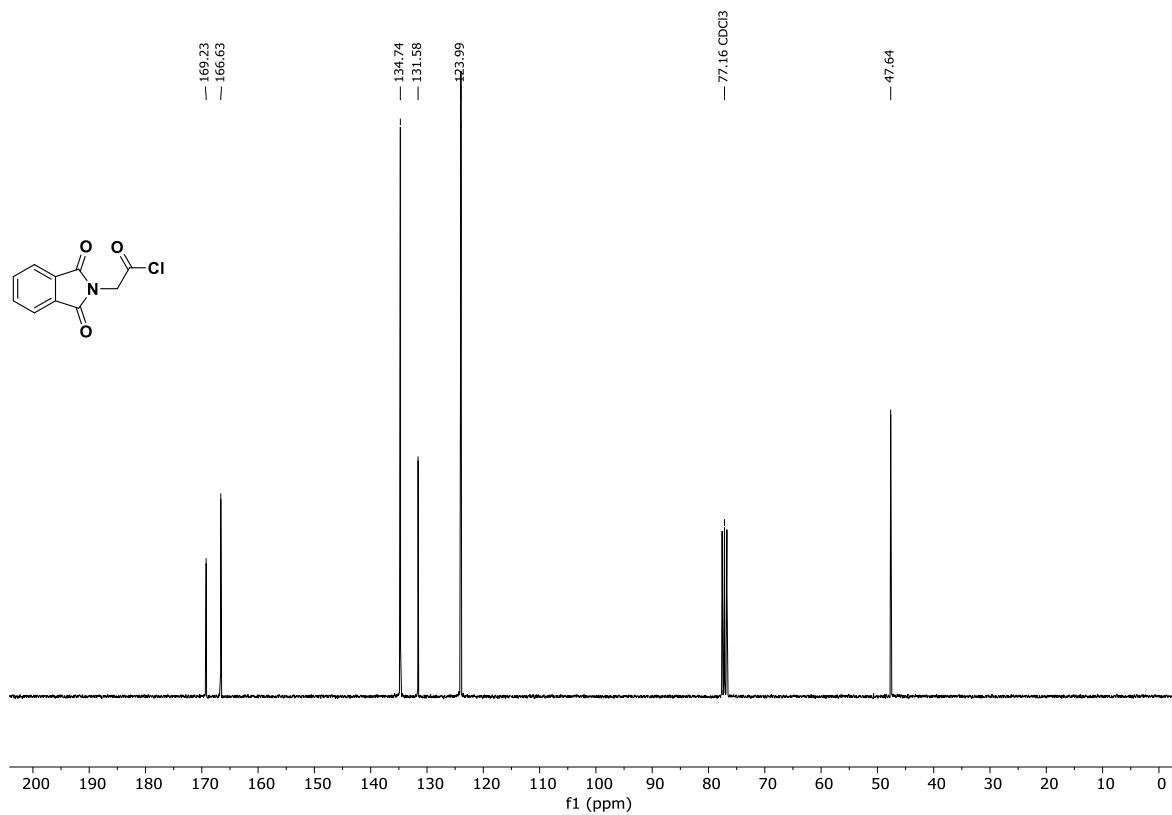


Abb. 12.58: ^{13}C -NMR-Spektrum (75.5 MHz, CDCl_3) von 2-(1,3-Dioxisoindolin-2-yl)acetylchlorid (72).

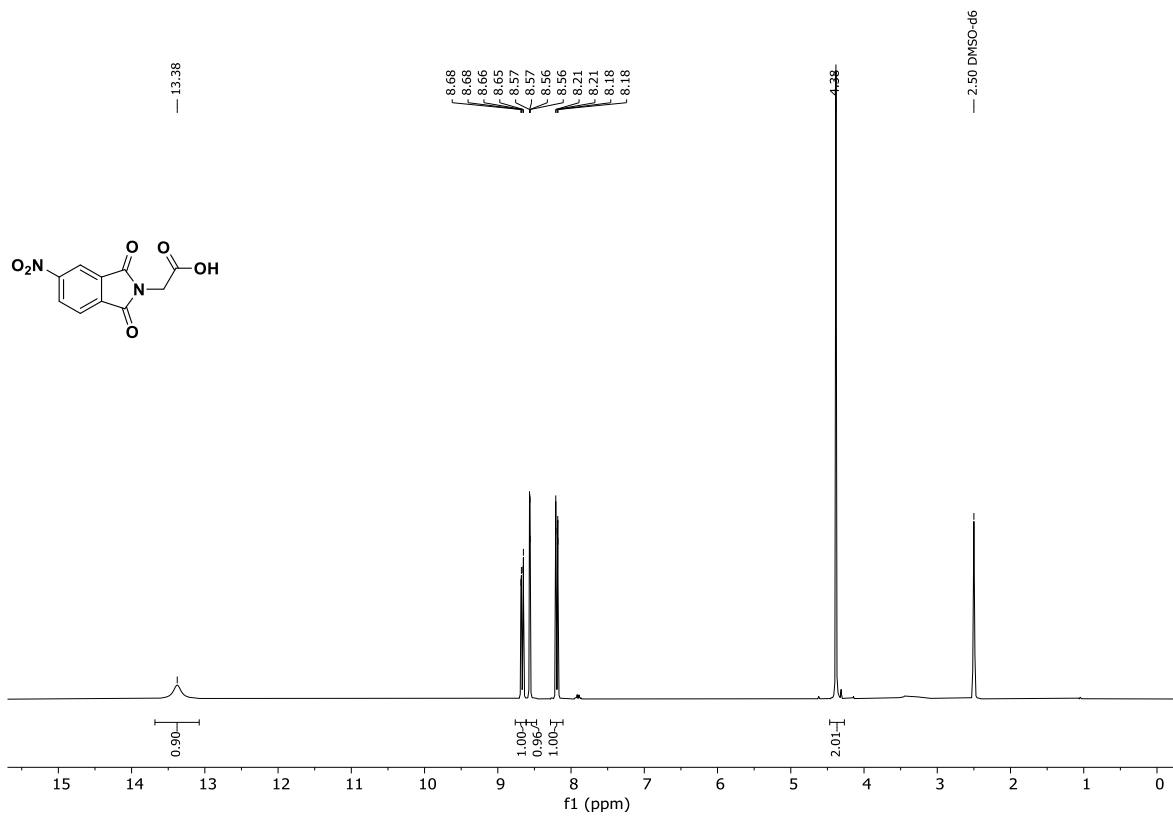


Abb. 12.59: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, DMSO-*d*₆) von 2-(5-Nitro-1,3-dioxisoindolin-2-yl)essigsäure (73).

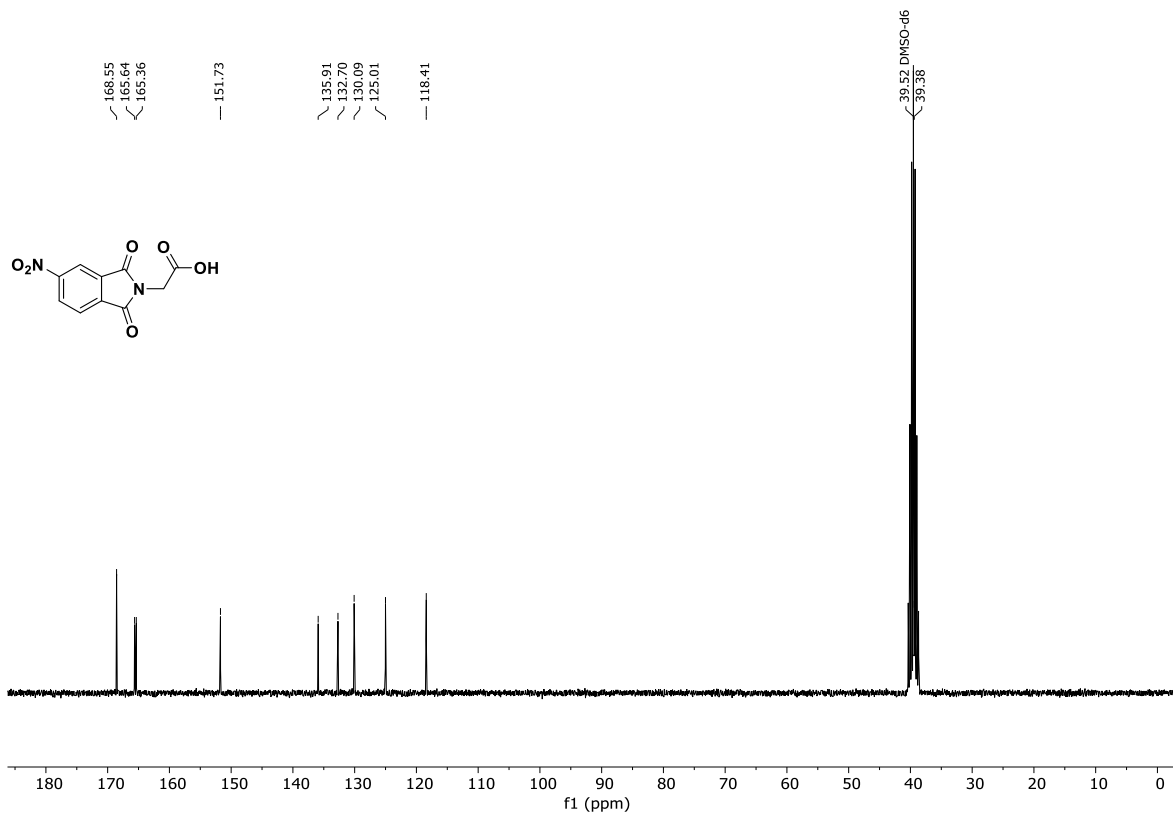


Abb. 12.60: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) von 2-(5-Nitro-1,3-dioxisoindolin-2-yl)essigsäure (73).

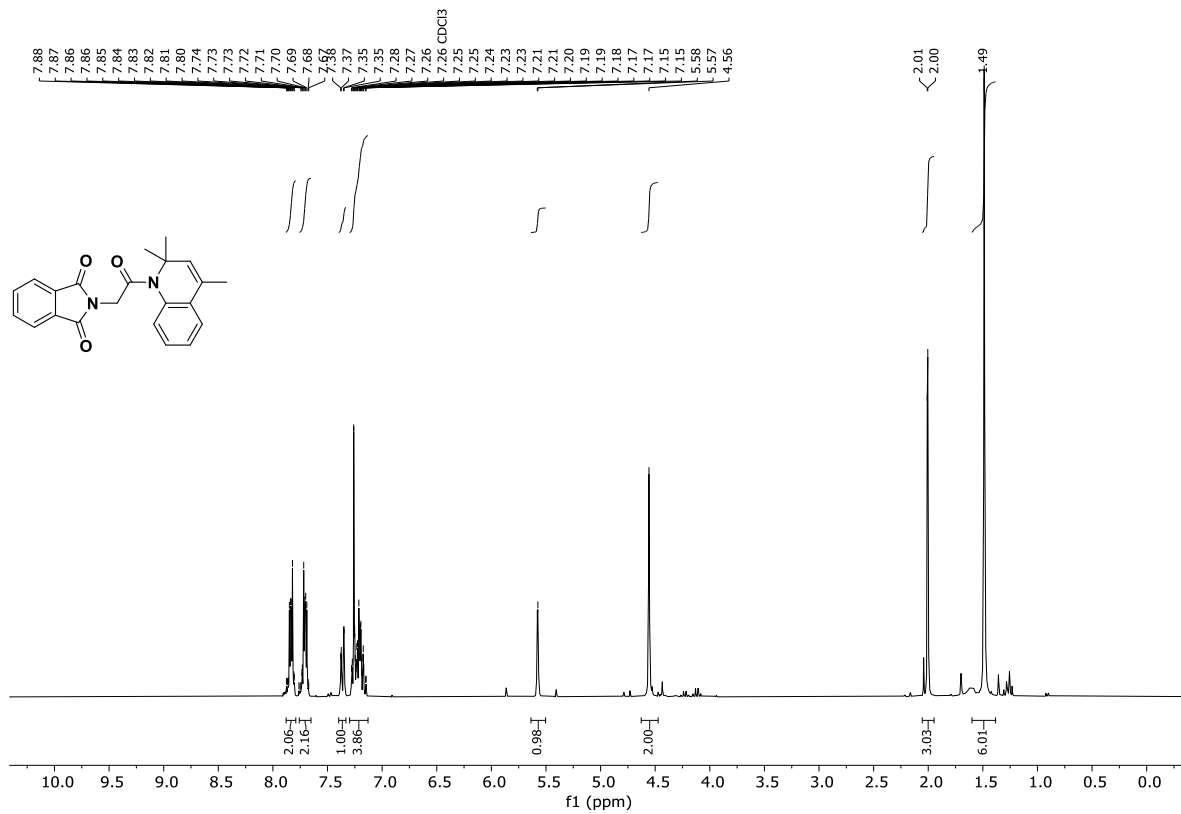


Abb. 12.61: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl₃) von 2-[2-Oxo-2-(2,2,4-trimethylchinolin-1-yl)ethyl]isoindolin-1,3-dion (SF-51, 61).

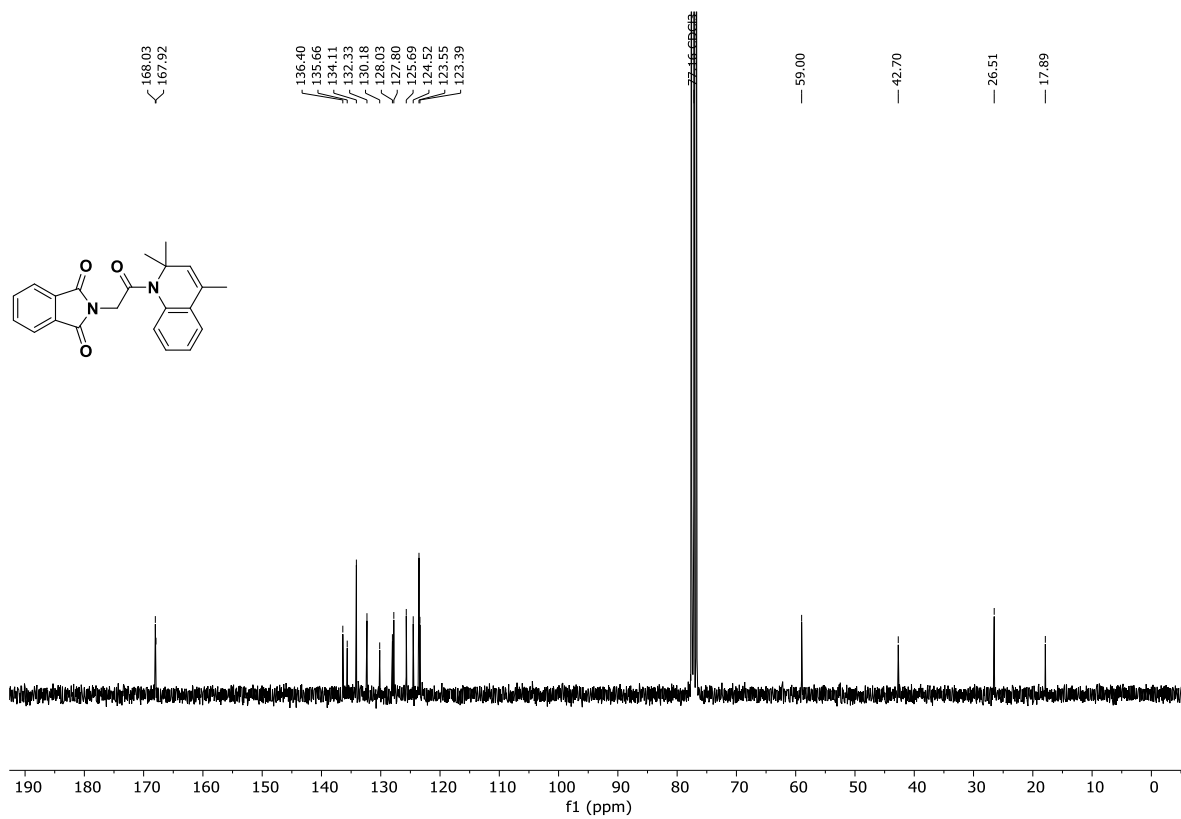


Abb. 12.62: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, CDCl₃) von 2-[2-Oxo-2-(2,2,4-trimethylchinolin-1-yl)ethyl]isoindolin-1,3-dion (SF-51, 61).

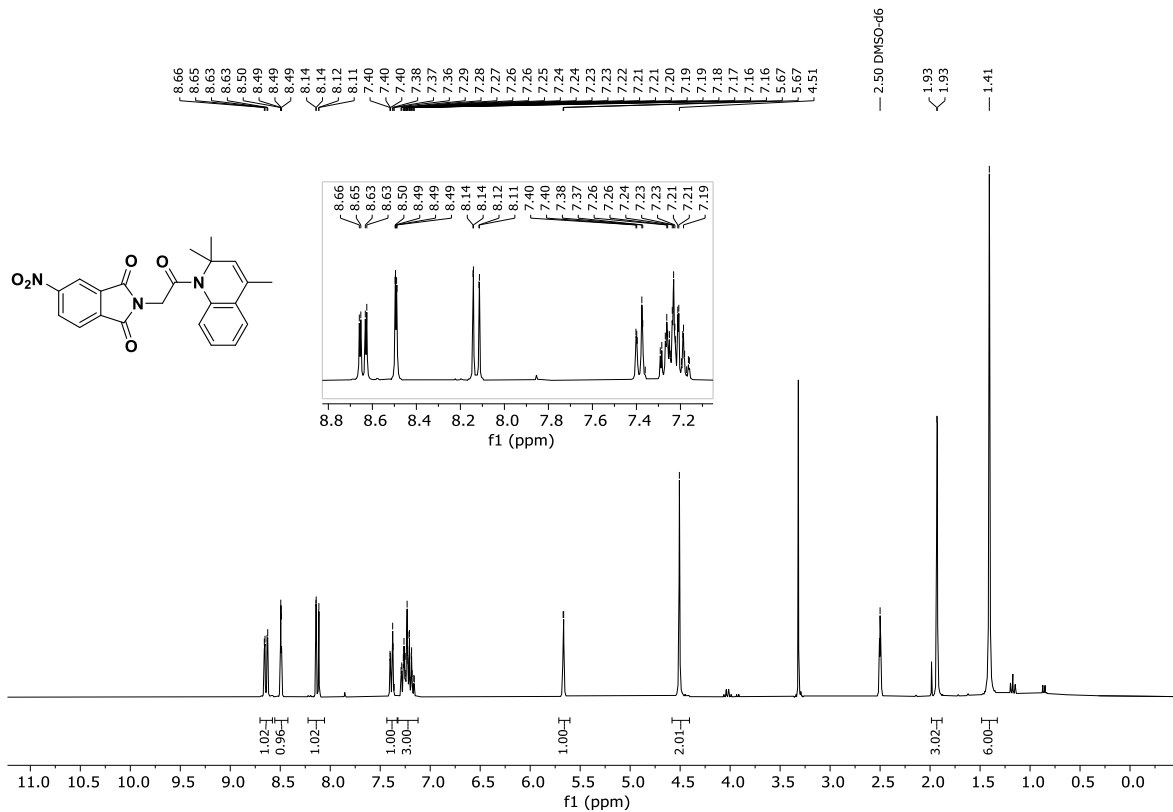


Abb. 12.63: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, DMSO-*d*₆) von 5-Nitro-2-[2-oxo-2-(2,2,4-trimethylchinolin-1-yl)ethyl]-isoindolin-1,3-dion (**74**).

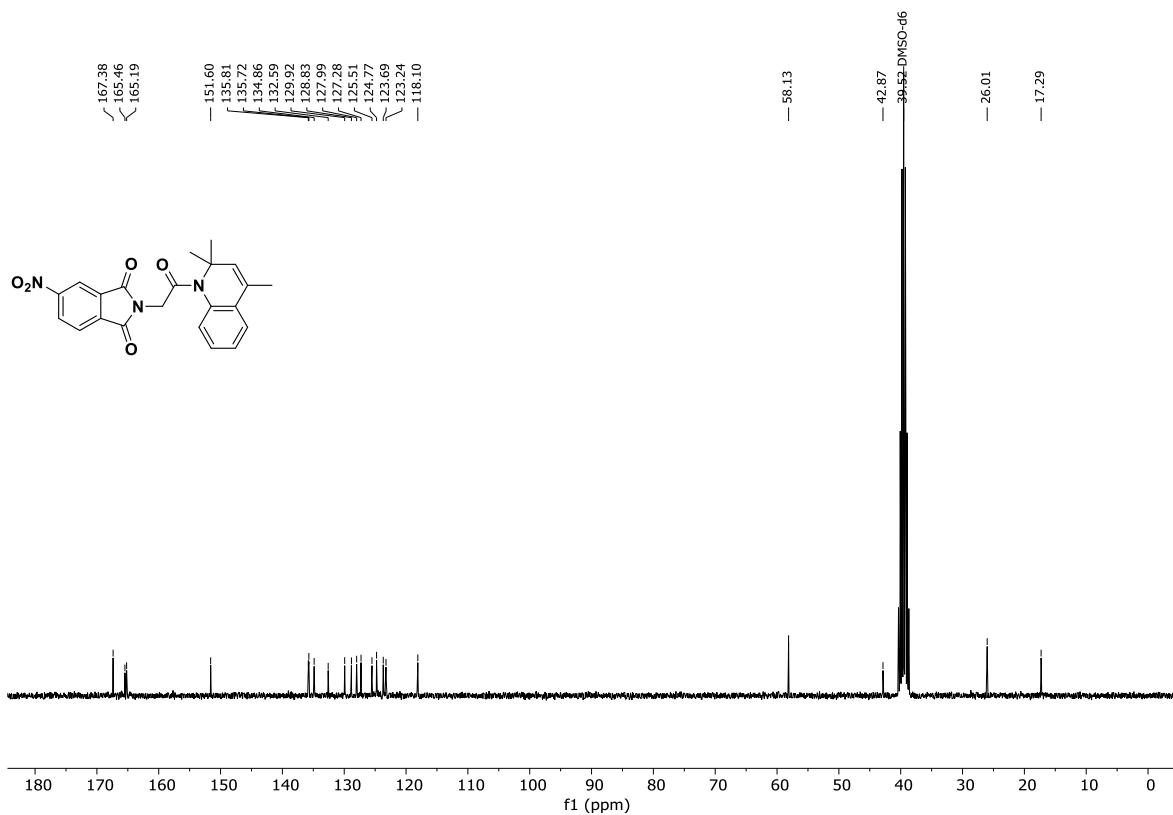


Abb. 12.64: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) von 5-Nitro-2-[2-oxo-2-(2,2,4-trimethylchinolin-1-yl)ethyl]-isoindolin-1,3-dion (**74**).

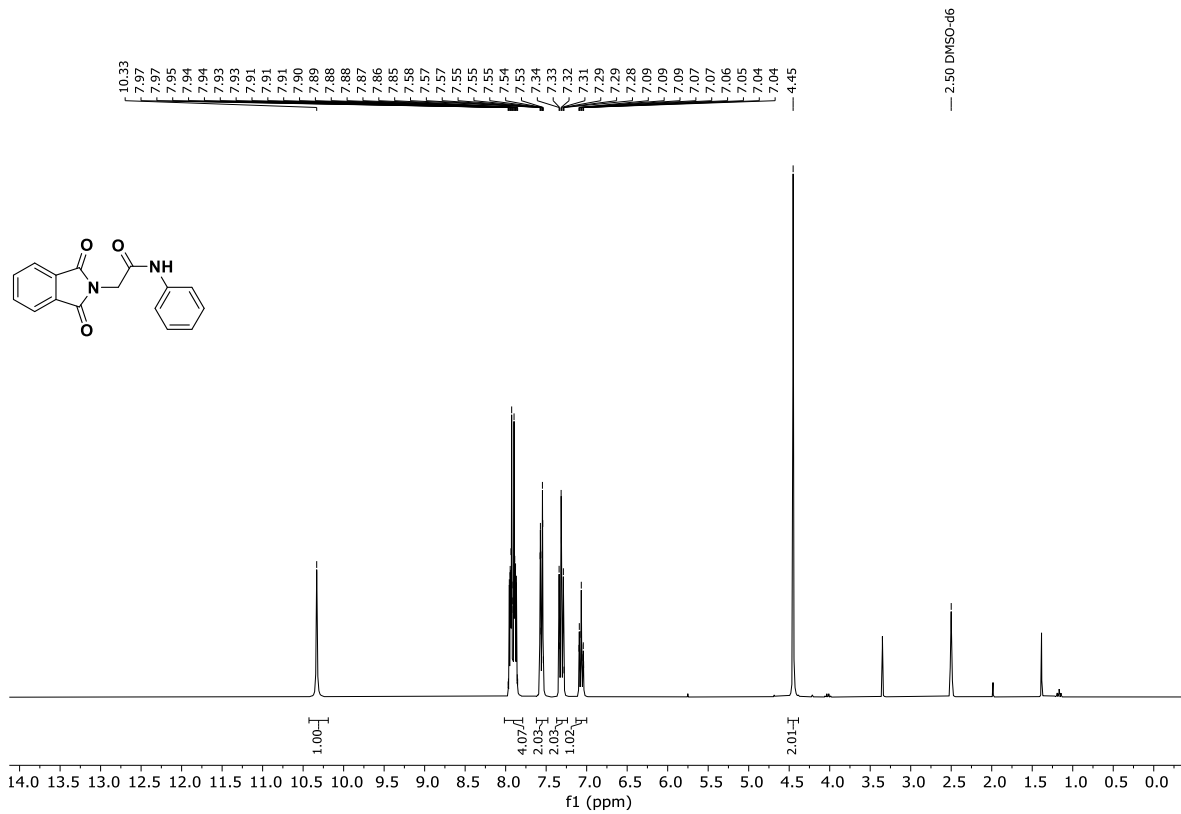


Abb. 12.65: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, DMSO-*d*₆) von *N*-(Phenyl)-2-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)acetamid (75a).

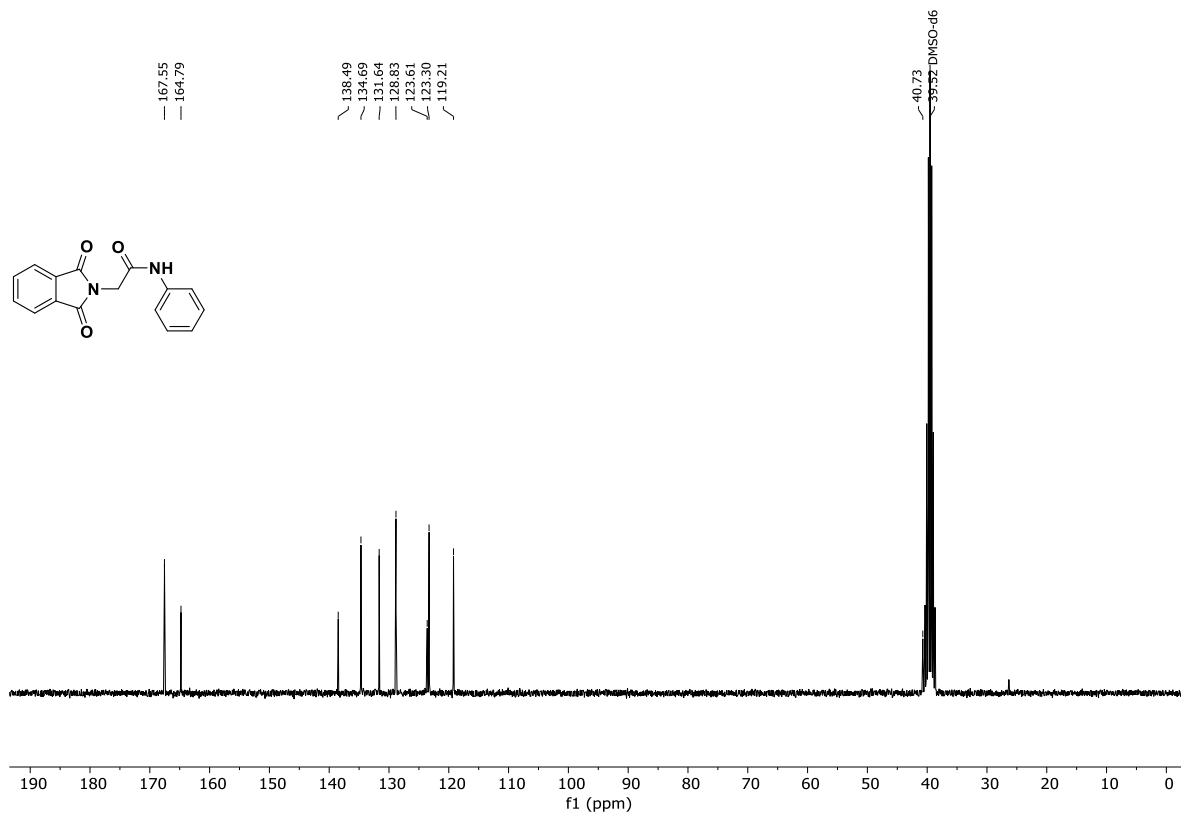


Abb. 12.66: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) von *N*-(Phenyl)-2-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)acetamid (75a).

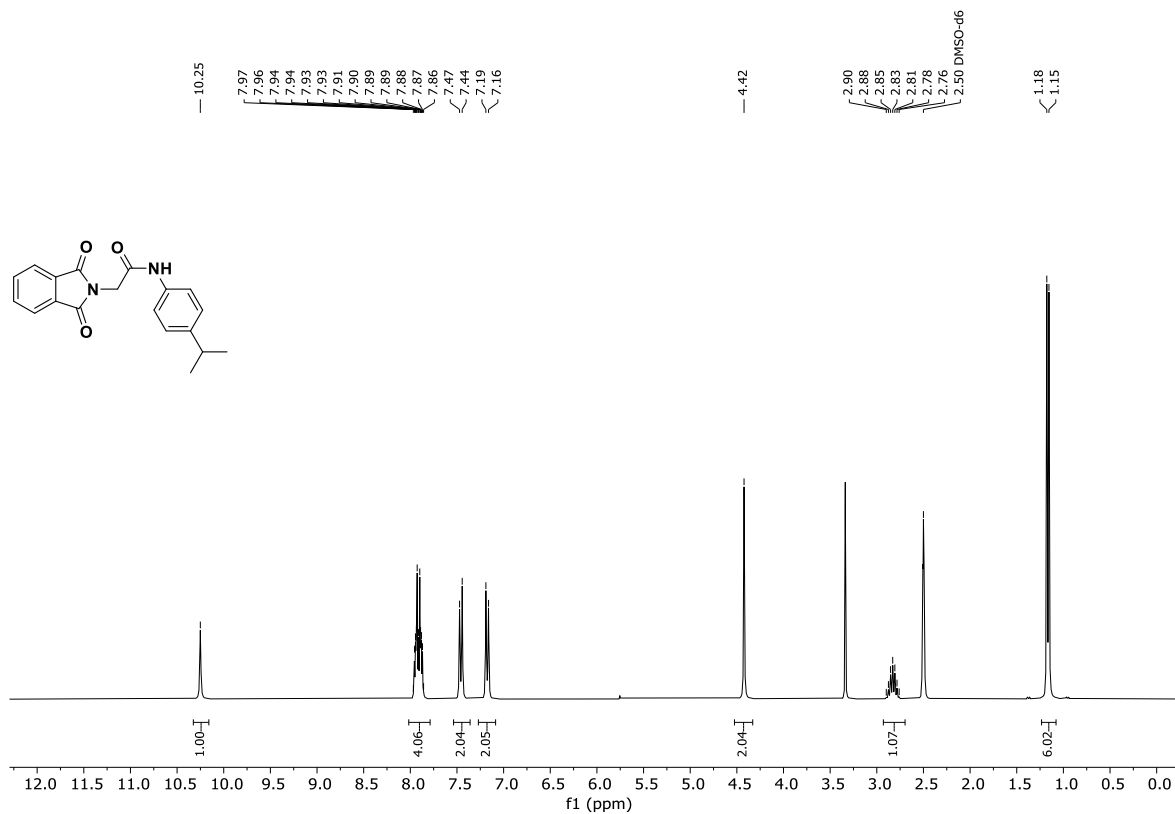


Abb. 12.67: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, DMSO-*d*₆) von *N*-(4-Isopropylphenyl)-2-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)-acetamid (75b).

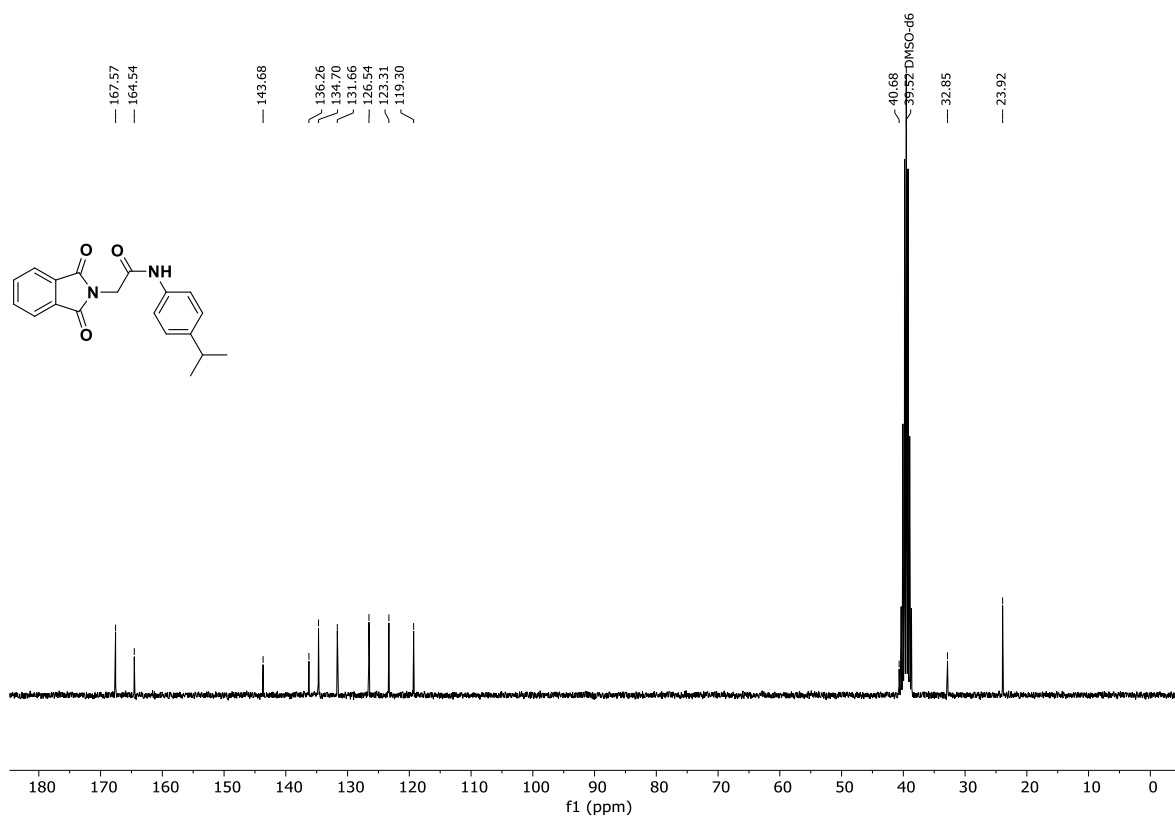


Abb. 12.68: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) von *N*-(4-Isopropylphenyl)-2-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)-acetamid (75b).

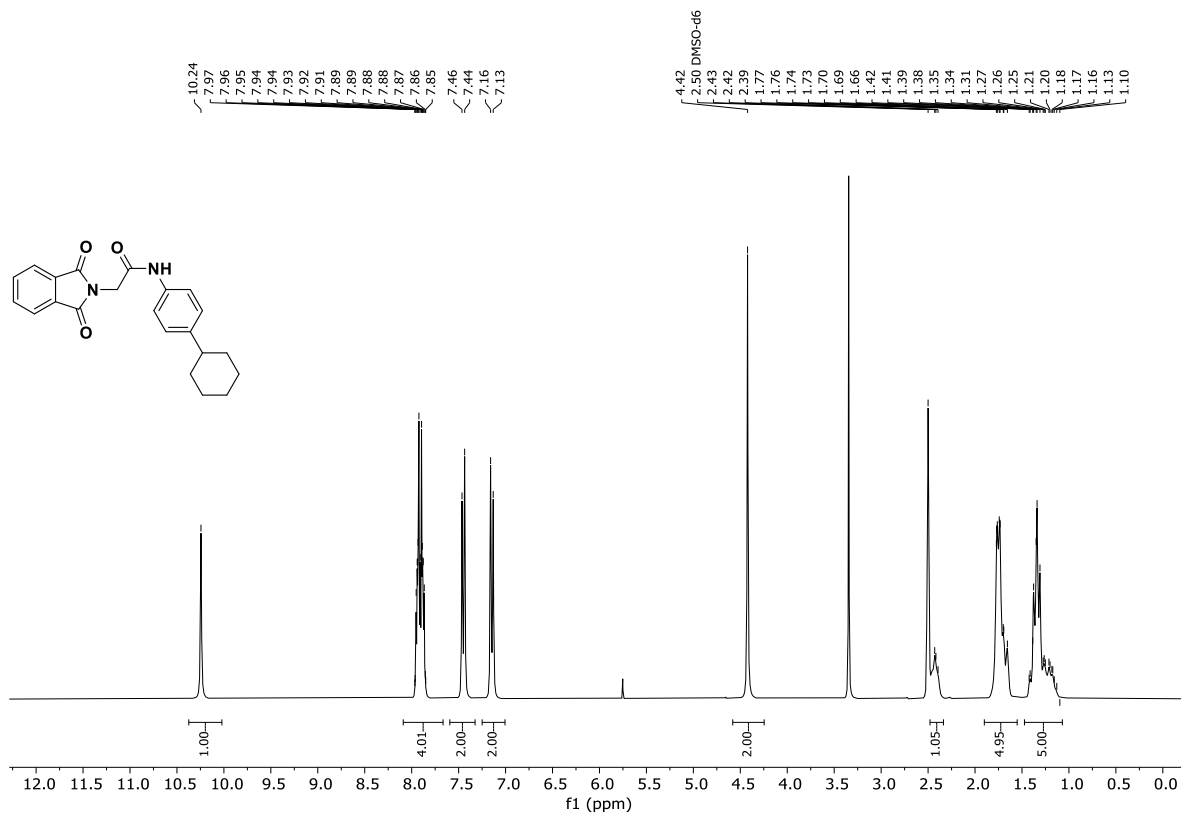


Abb. 12.69: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, DMSO-*d*₆) von *N*-(4-Cyclohexylphenyl)-2-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)-acetamid (**75c**).

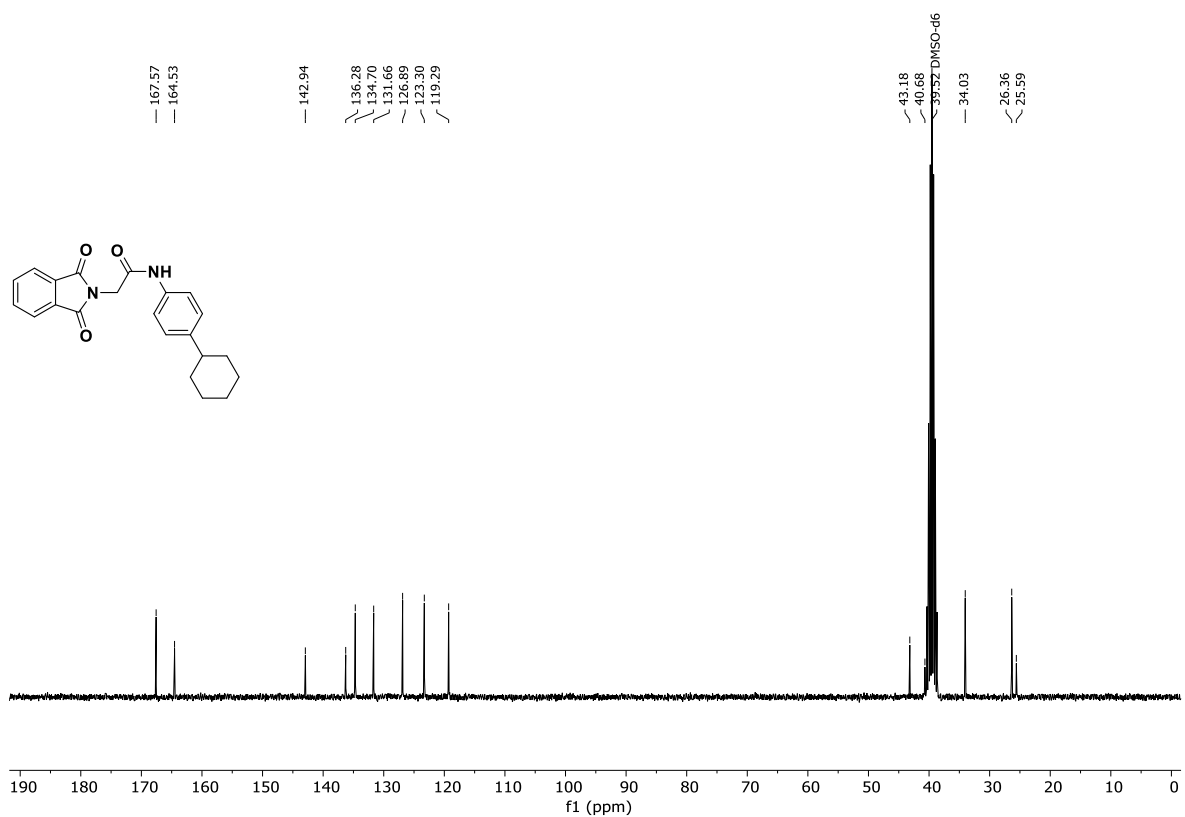


Abb. 12.70: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) von *N*-(4-Cyclohexylphenyl)-2-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)-acetamid (**75c**).

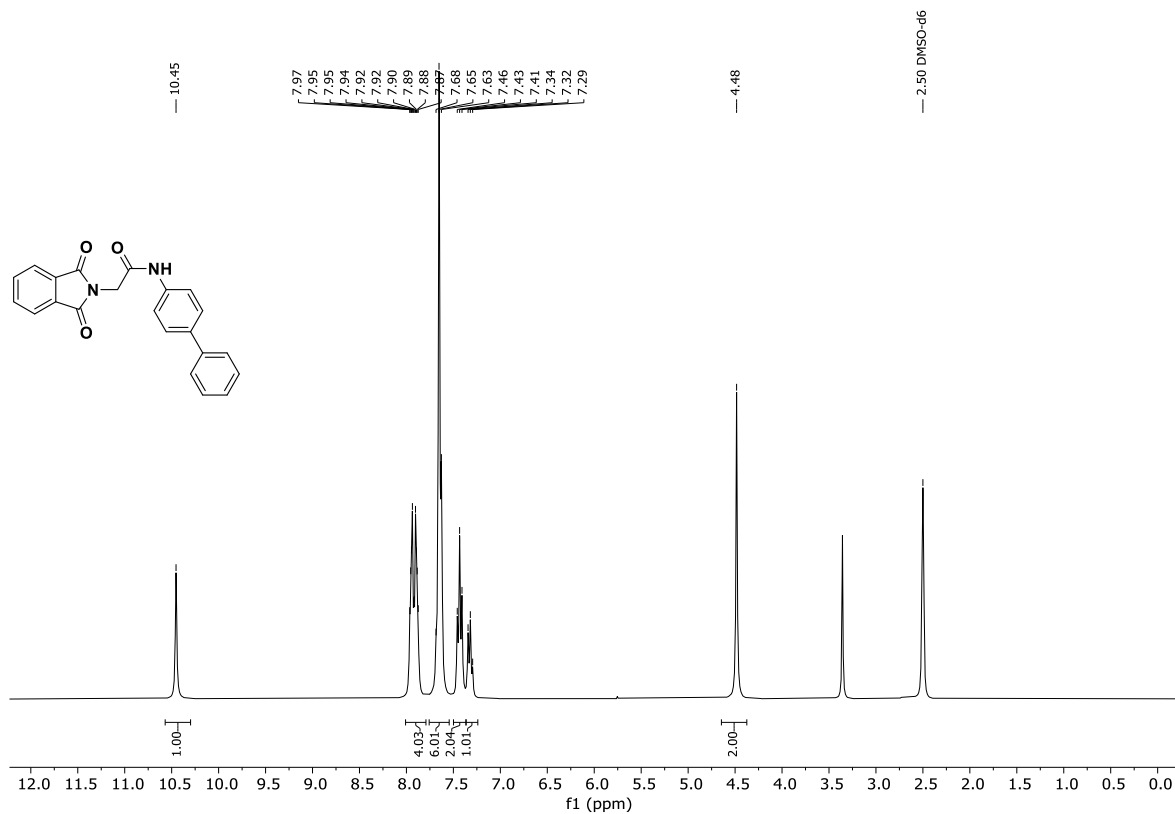


Abb. 12.71: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) von *N*-([1,1'-Biphenyl]-4-yl)-2-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)-acetamid (**75d**).

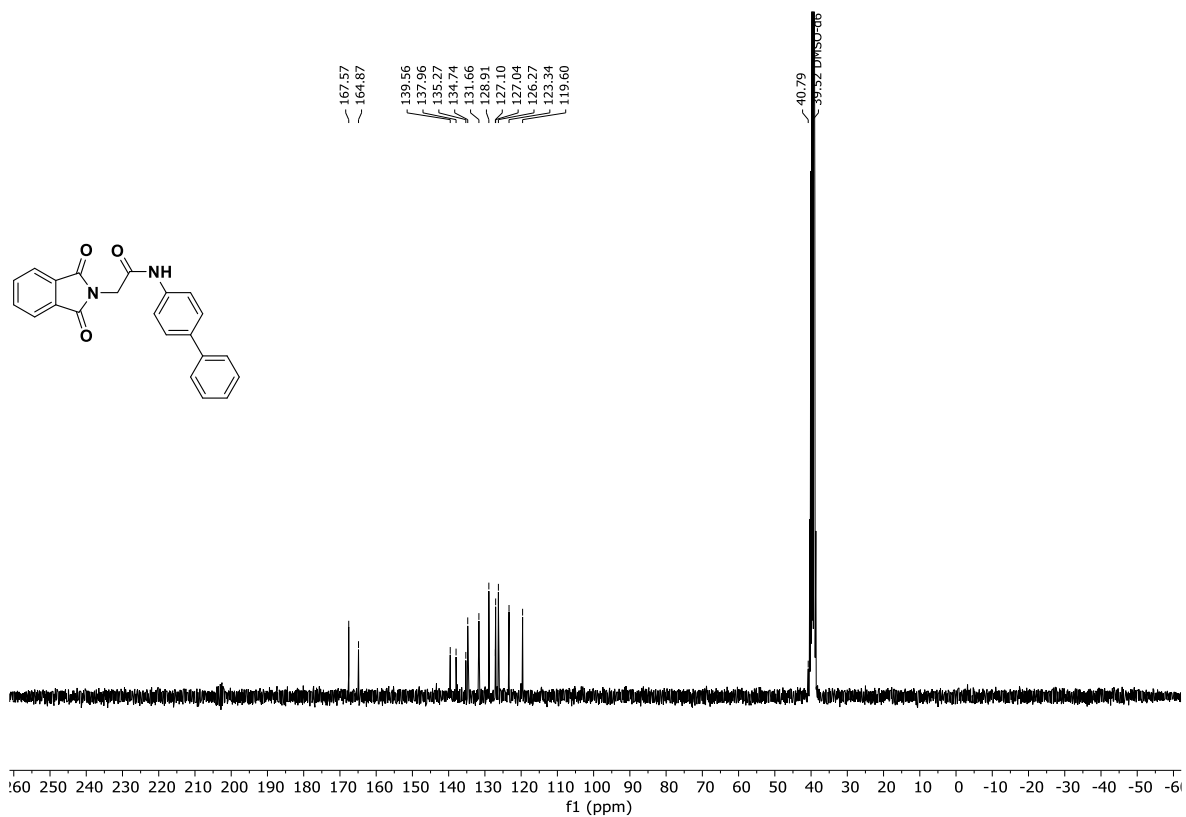


Abb. 12.72: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (75.5 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) von *N*-([1,1'-Biphenyl]-4-yl)-2-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)-acetamid (**75d**).

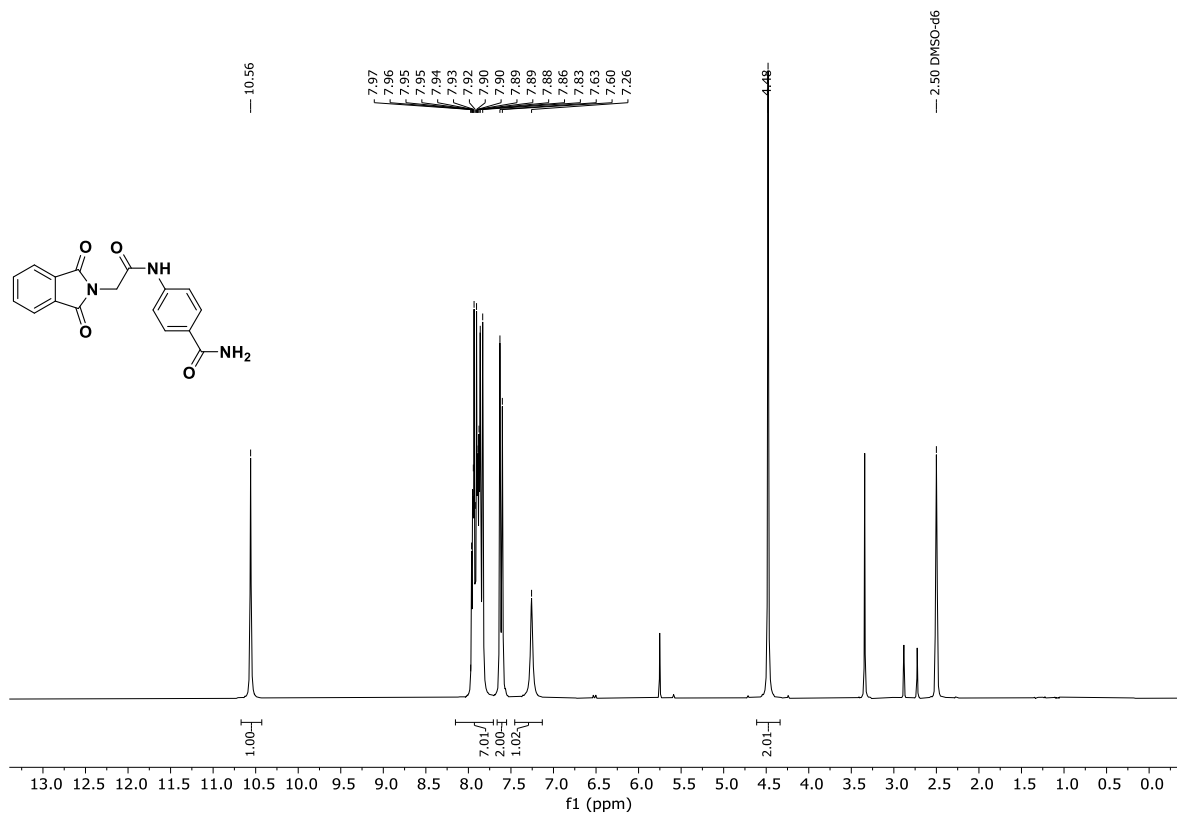


Abb. 12.73: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, DMSO-*d*₆) von *N*-(4-(Aminocarbonyl)phenyl)-2-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)acetamid (75e).

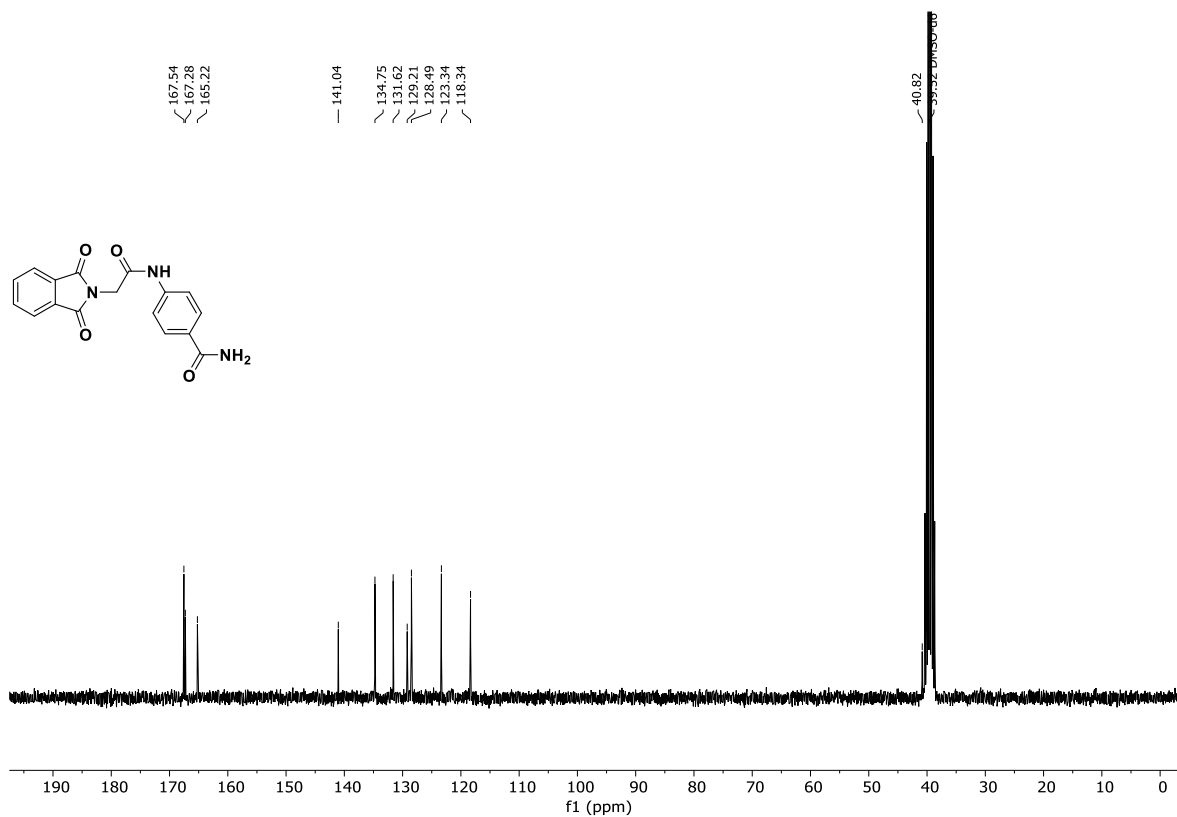


Abb. 12.74: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) von *N*-(4-(Aminocarbonyl)phenyl)-2-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)acetamid (75e).

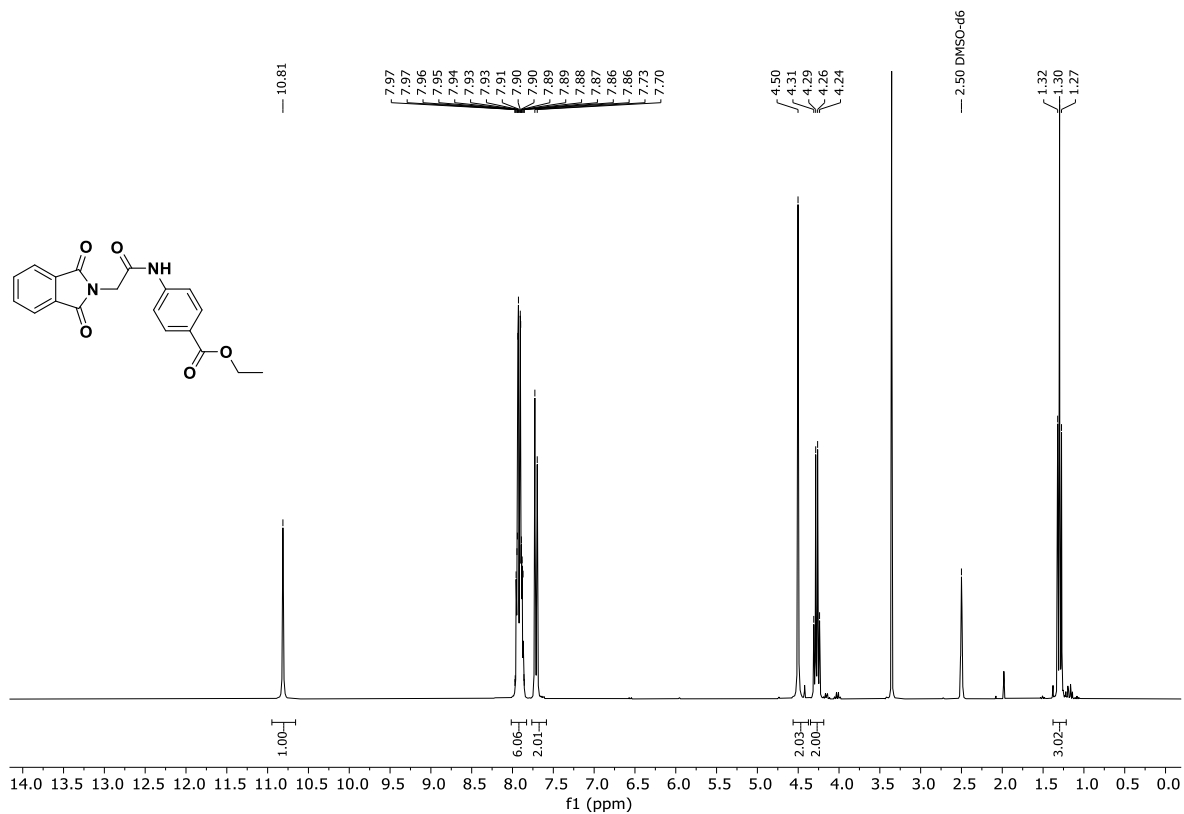


Abb. 12.75: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, DMSO-*d*₆) von *N*-(4-(Ethylcarboxy)phenyl)-2-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)acetamid (75f).

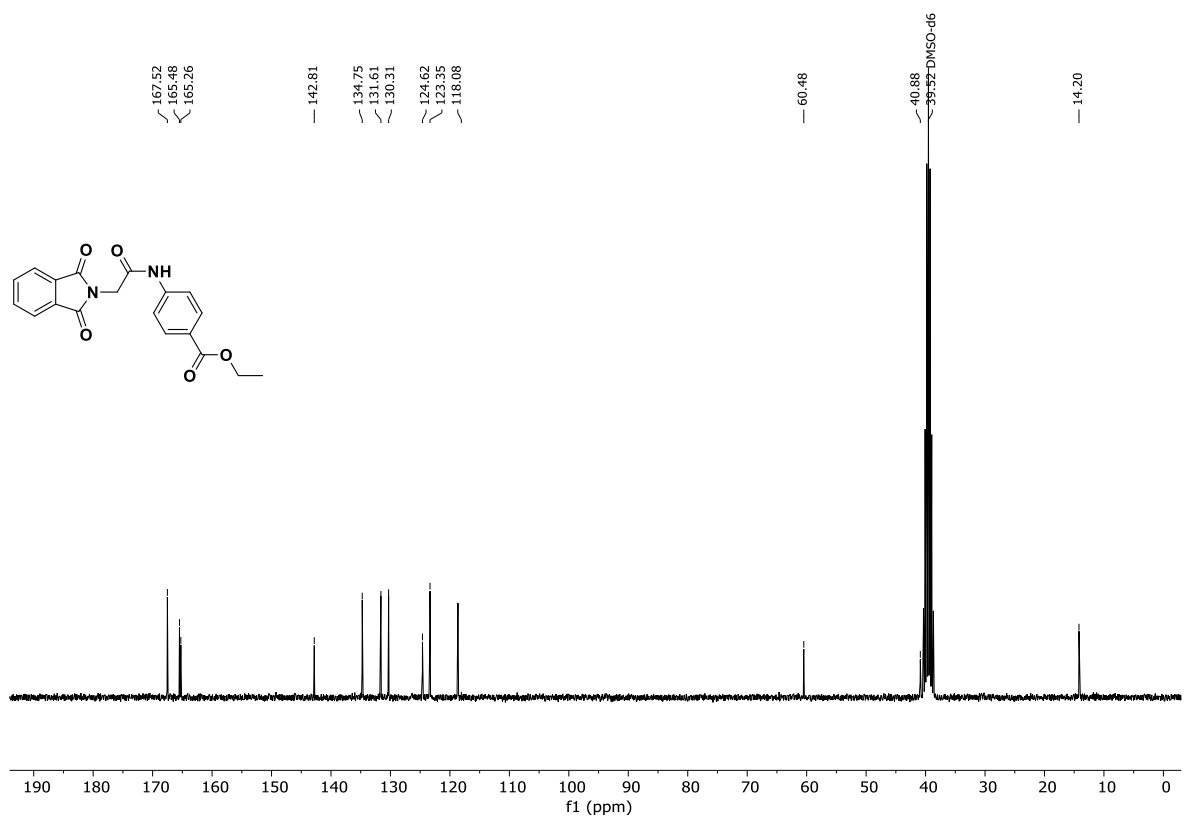


Abb. 12.76: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) von *N*-(4-(Ethylcarboxy)phenyl)-2-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)acetamid (75f).

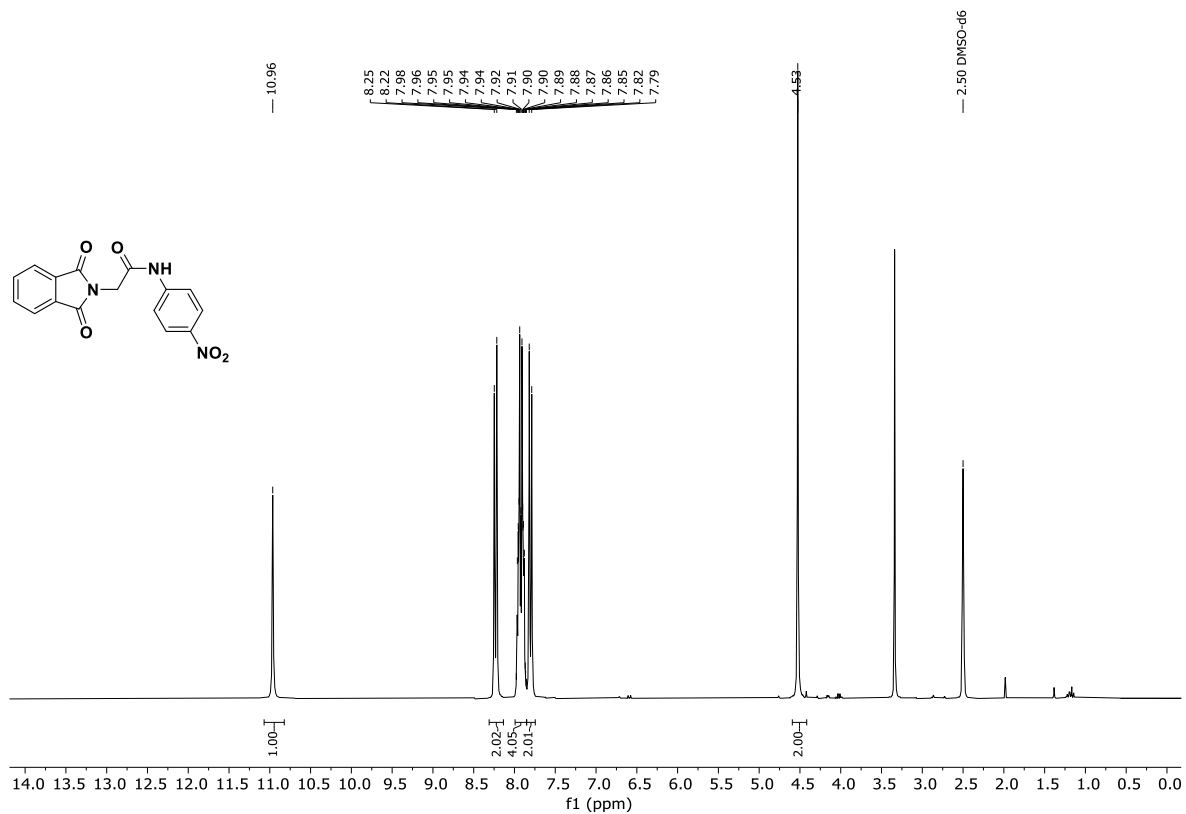


Abb. 12.79: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, DMSO-*d*₆) von *N*-(4-Nitrophenyl)-2-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)acetamid (75h).

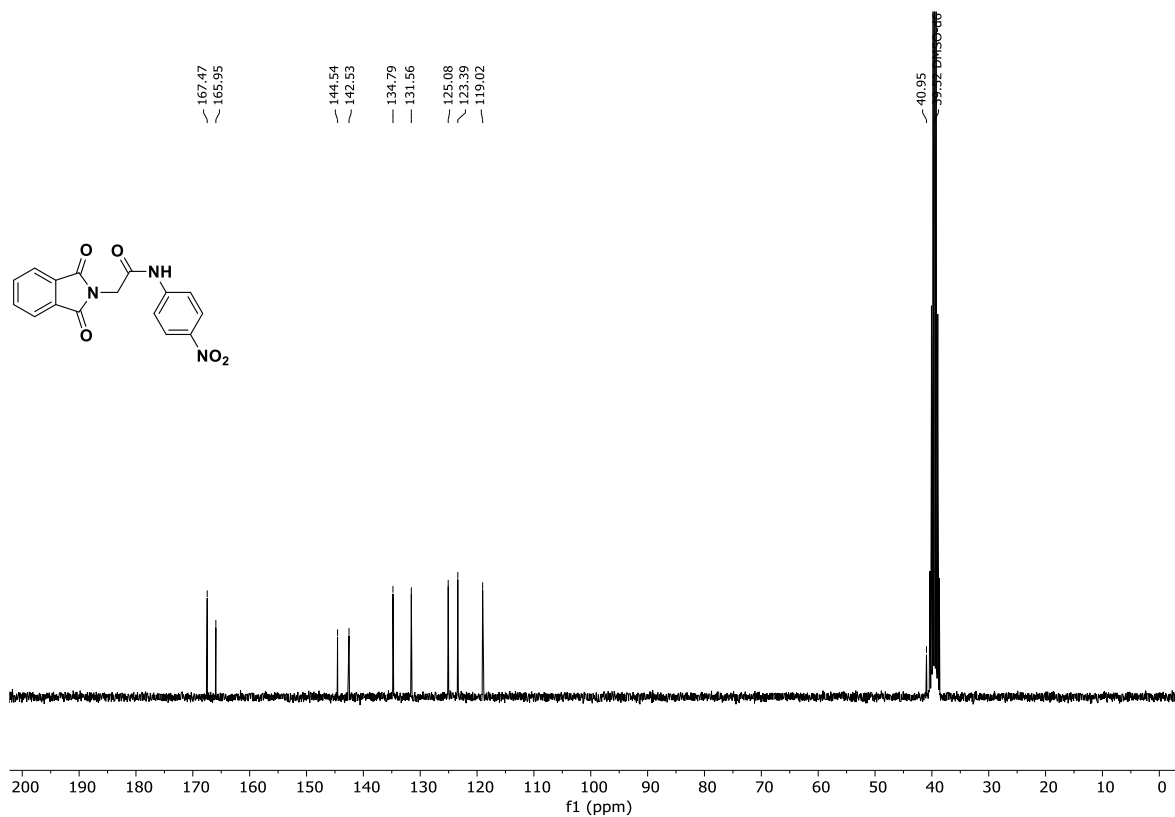


Abb. 12.80: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) von *N*-(4-Nitrophenyl)-2-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)acetamid (75h).

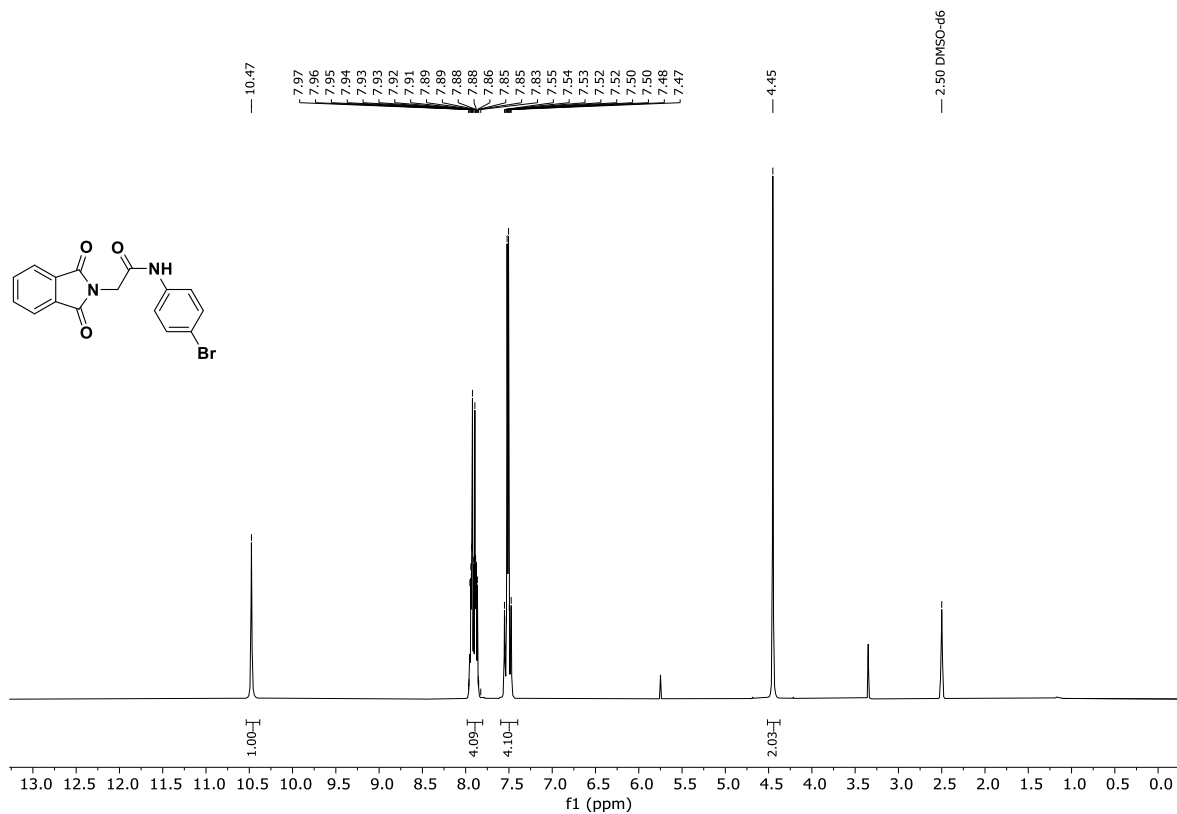


Abb. 12.81: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, DMSO-*d*₆) von *N*-(4-Bromphenyl)-2-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)acetamid (75i).

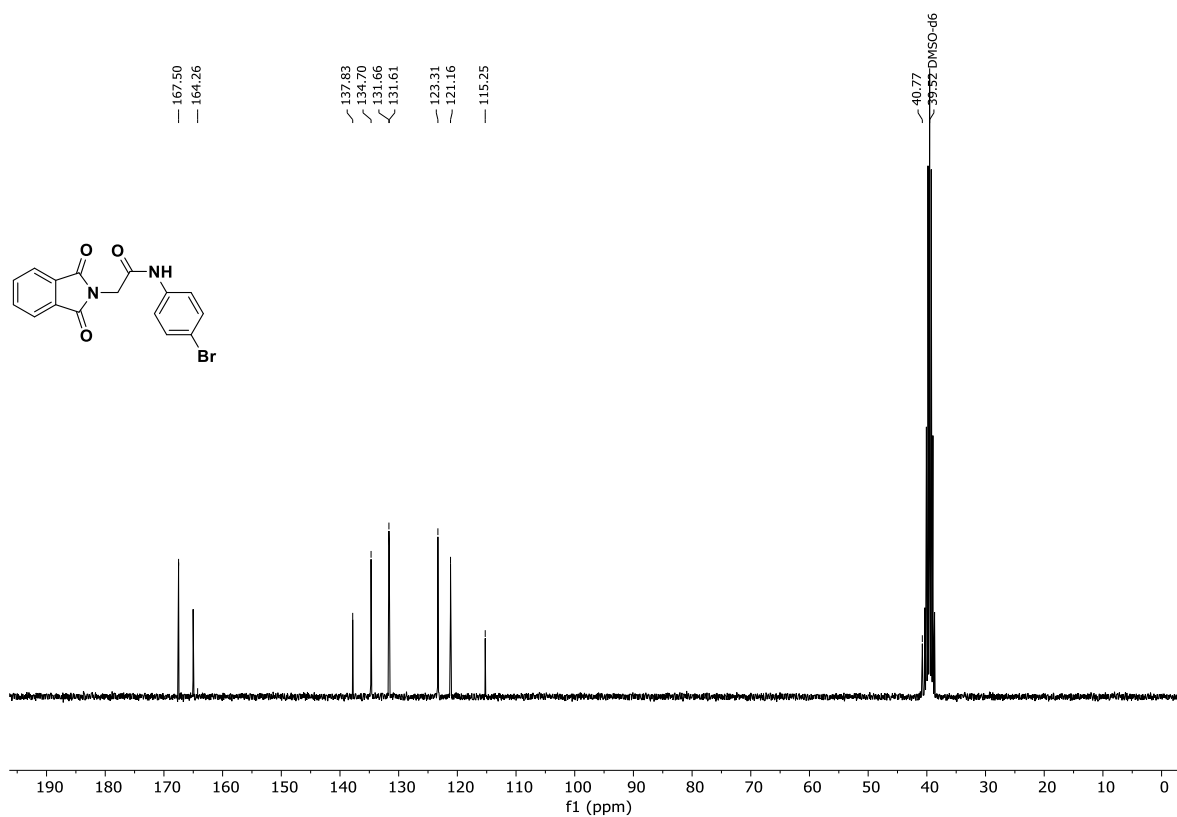


Abb. 12.82: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) von *N*-(4-Bromphenyl)-2-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)acetamid (75i).

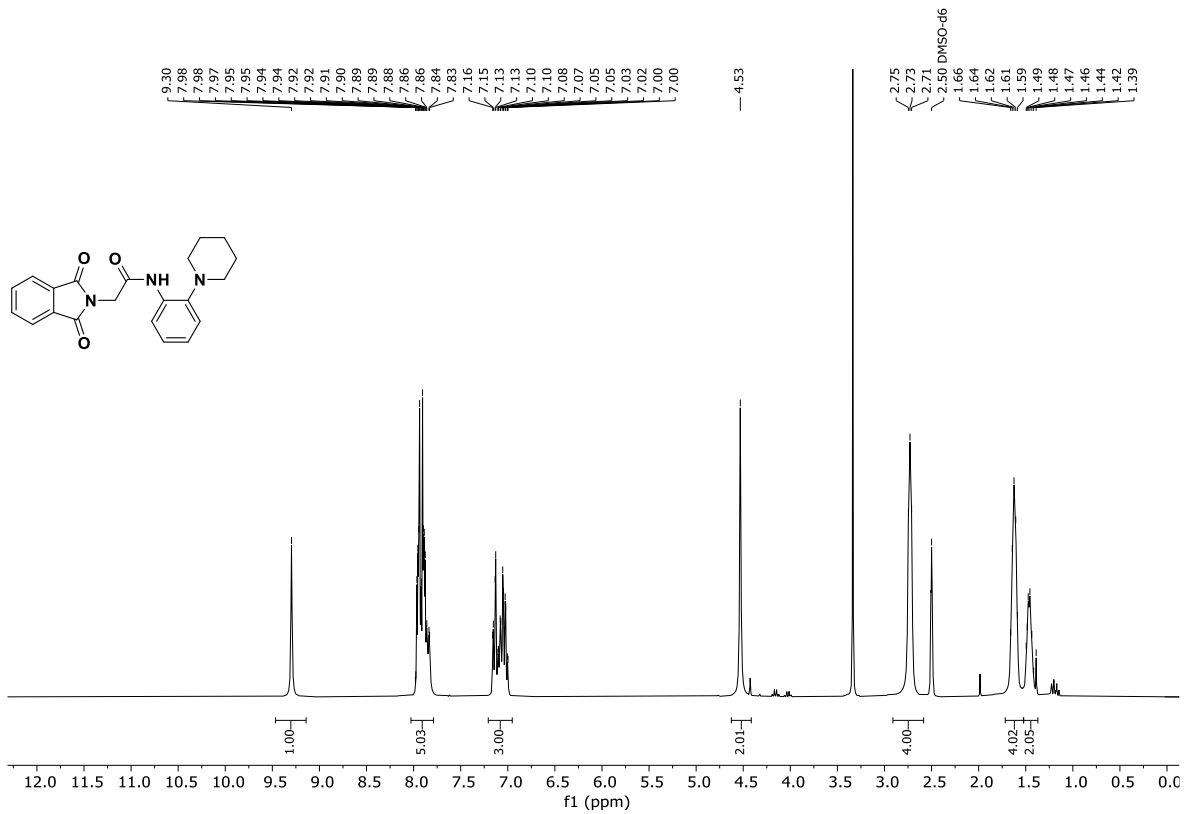


Abb. 12.83: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, DMSO-*d*₆) von *N*-(2-Piperidin-1-yl)phenyl-2-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)acetamid (75j).

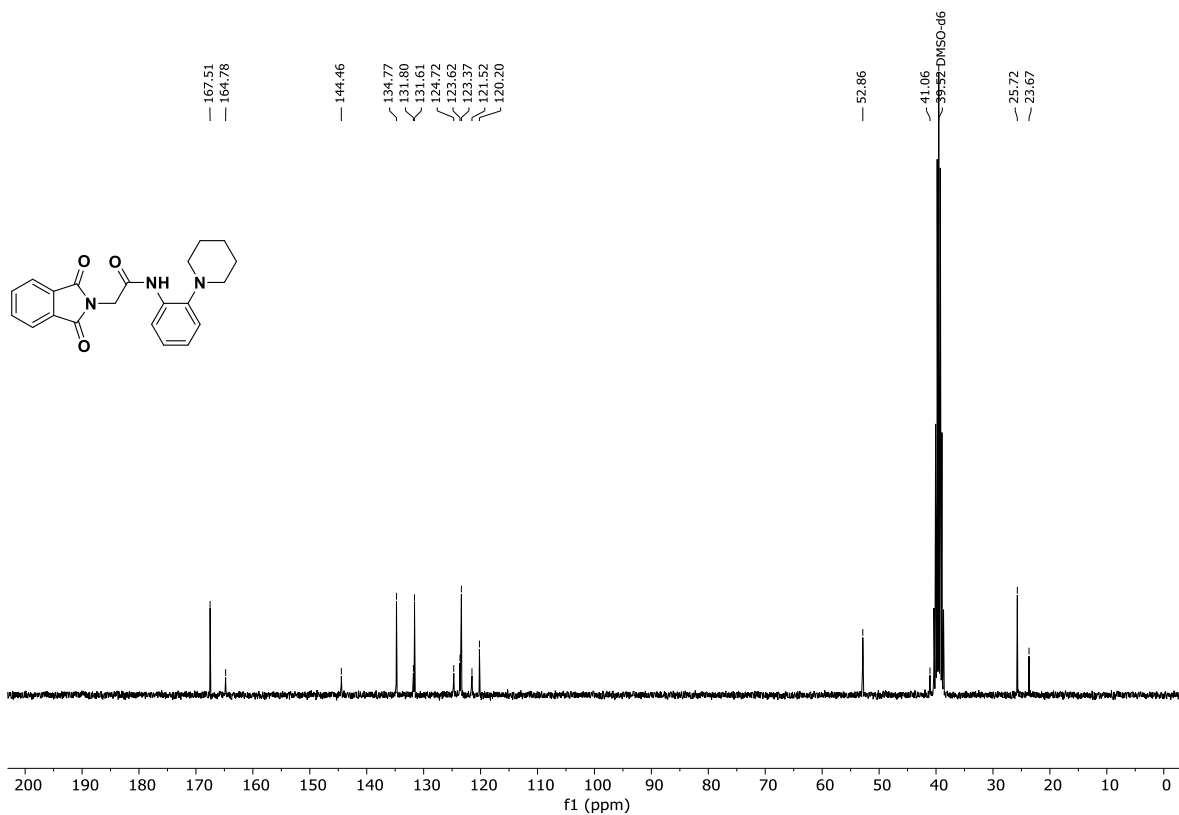


Abb. 12.84: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) von *N*-(2-Piperidin-1-yl)phenyl-2-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)acetamid (75j).

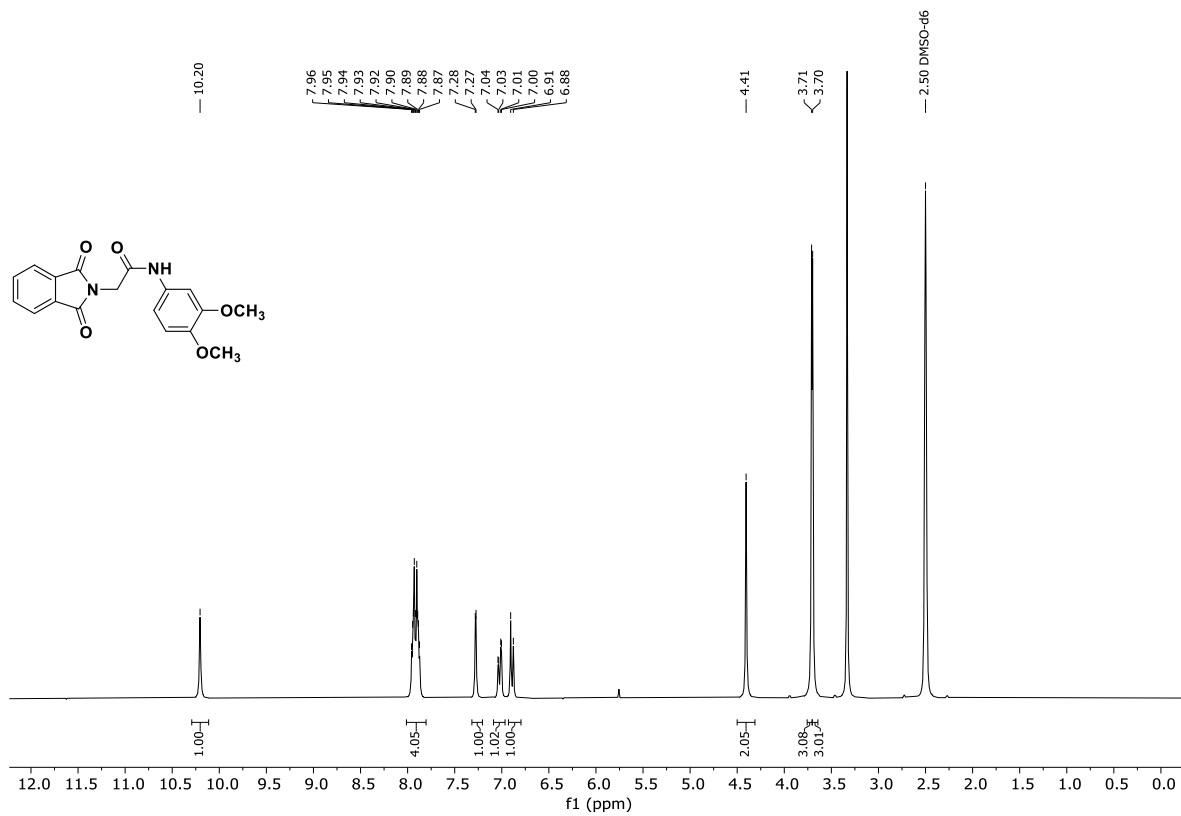


Abb. 12.85: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, DMSO-*d*₆) von *N*-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)-acetamid (**75k**).

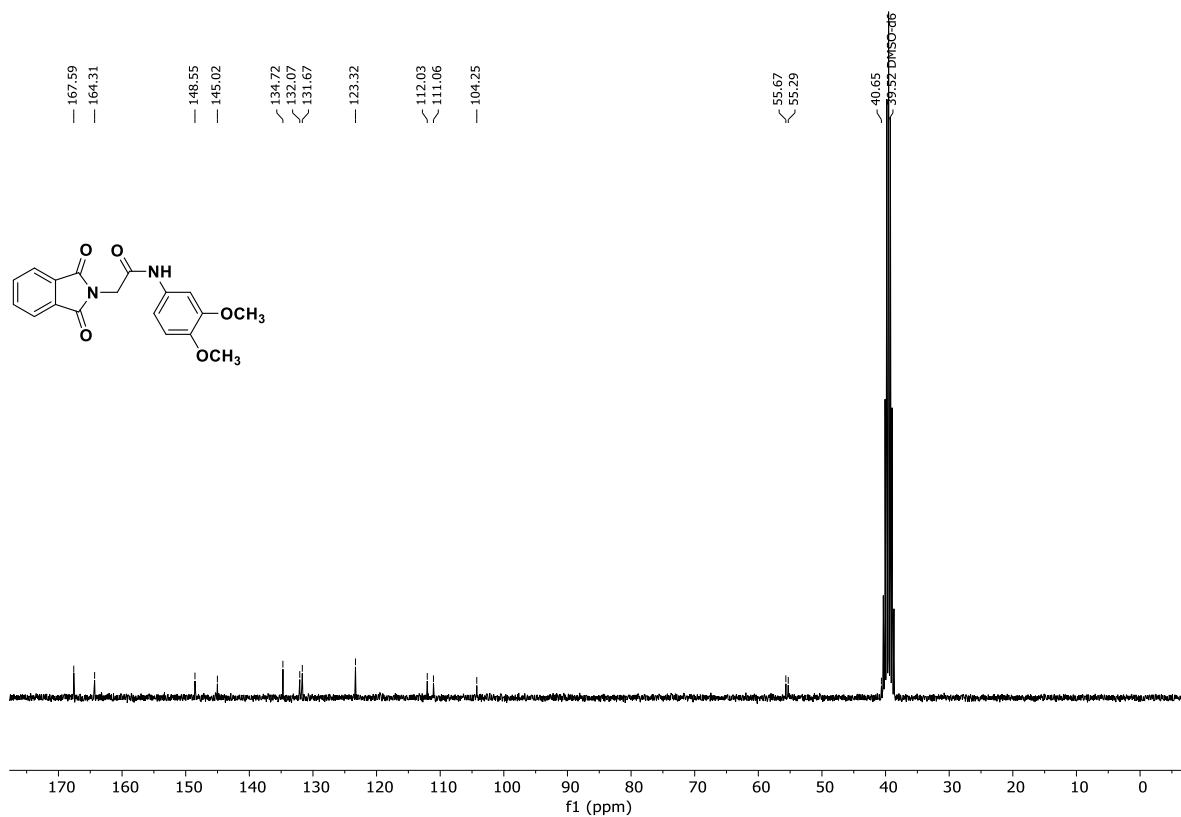


Abb. 12.86: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) von *N*-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)-acetamid (**75k**).

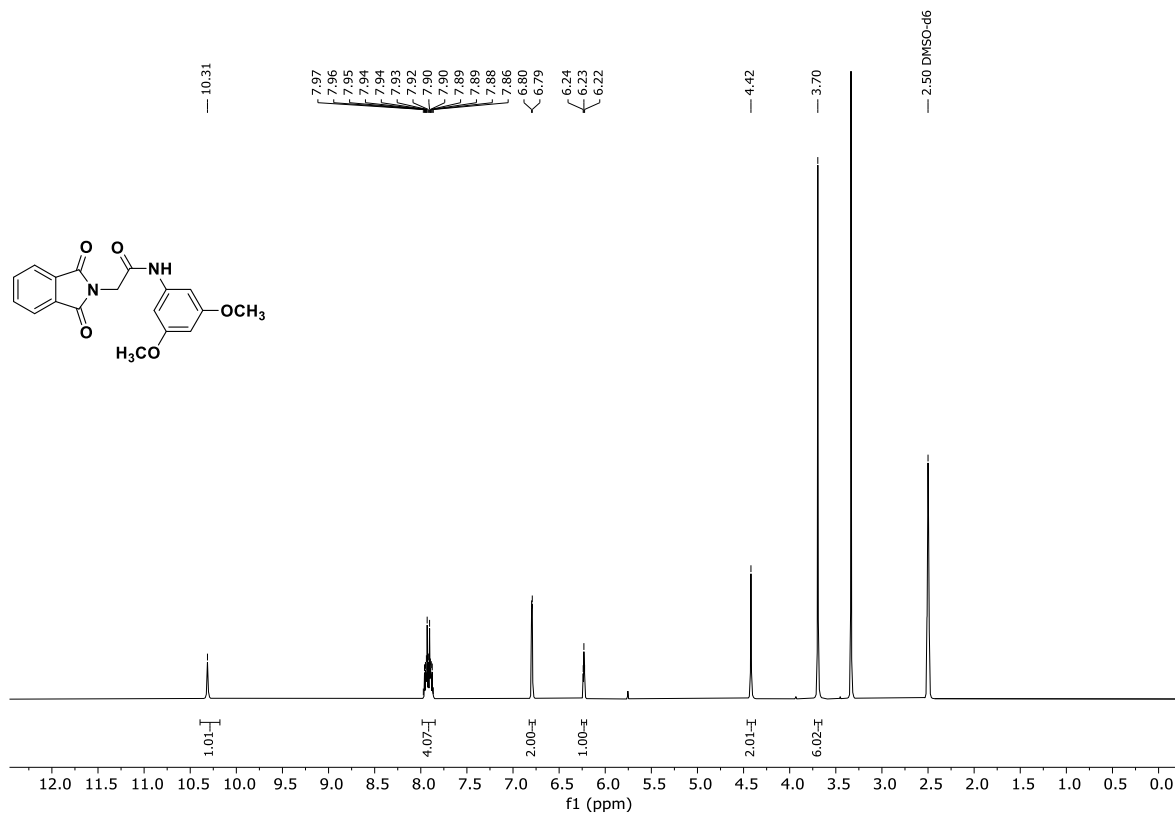


Abb. 12.87: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, DMSO-*d*₆) von *N*-(3,5-Dimethoxyphenyl)-2-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)acetamid (751).

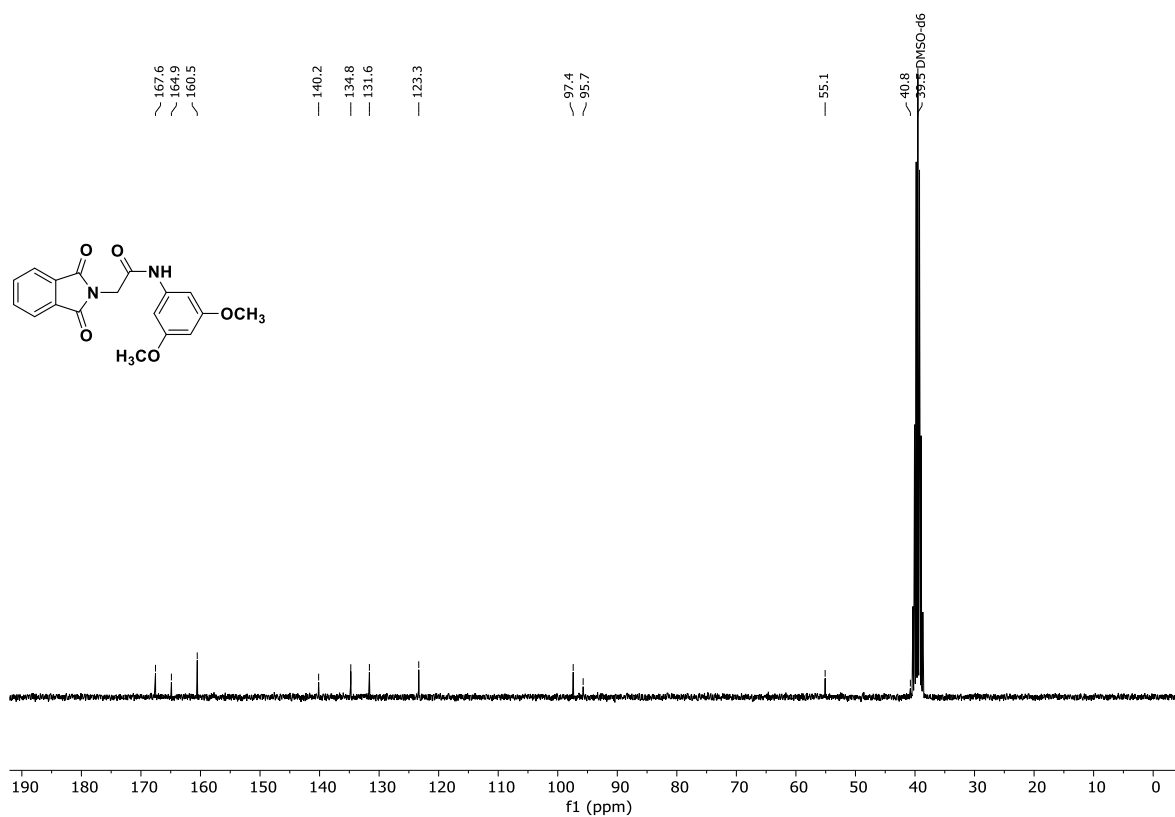


Abb. 12.88: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) von *N*-(3,5-Dimethoxyphenyl)-2-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)acetamid (751).

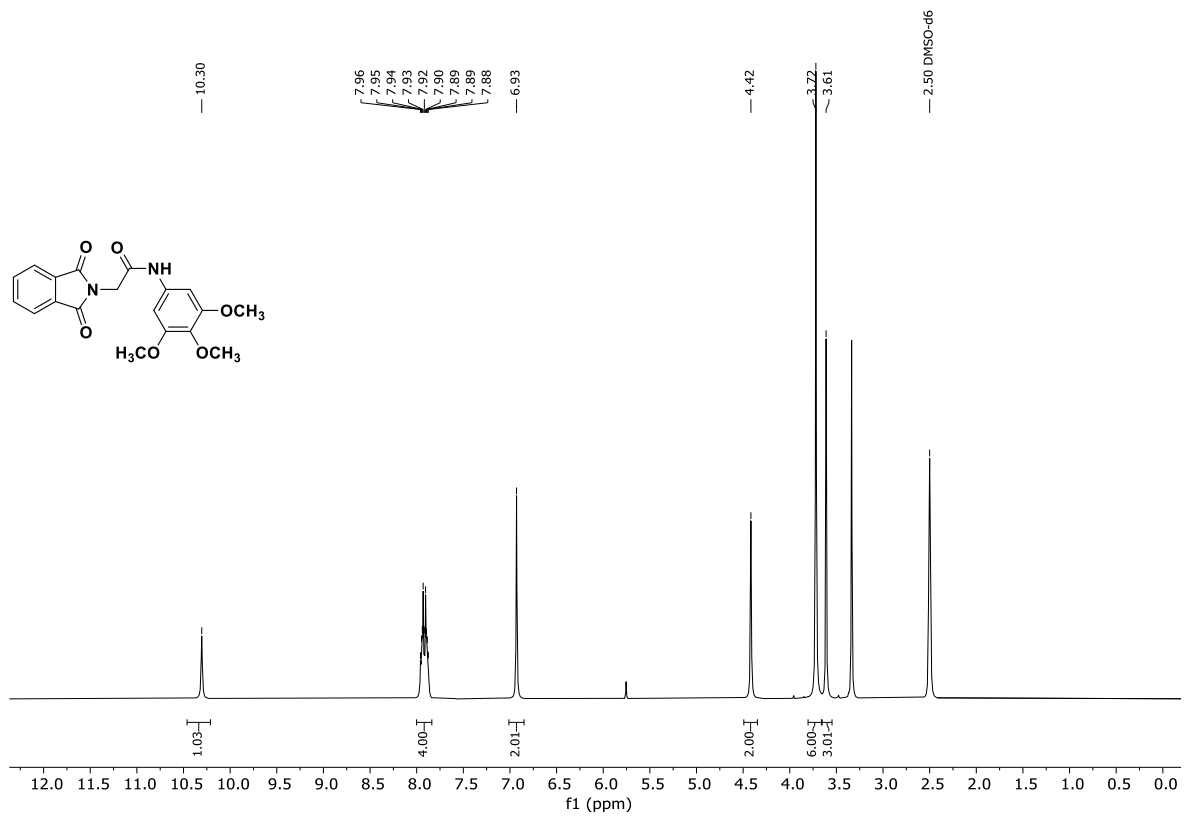


Abb. 12.89: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, DMSO-*d*₆) von *N*-(3,4,5-Trimethoxyphenyl)-2-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)-acetamid (**75m**).

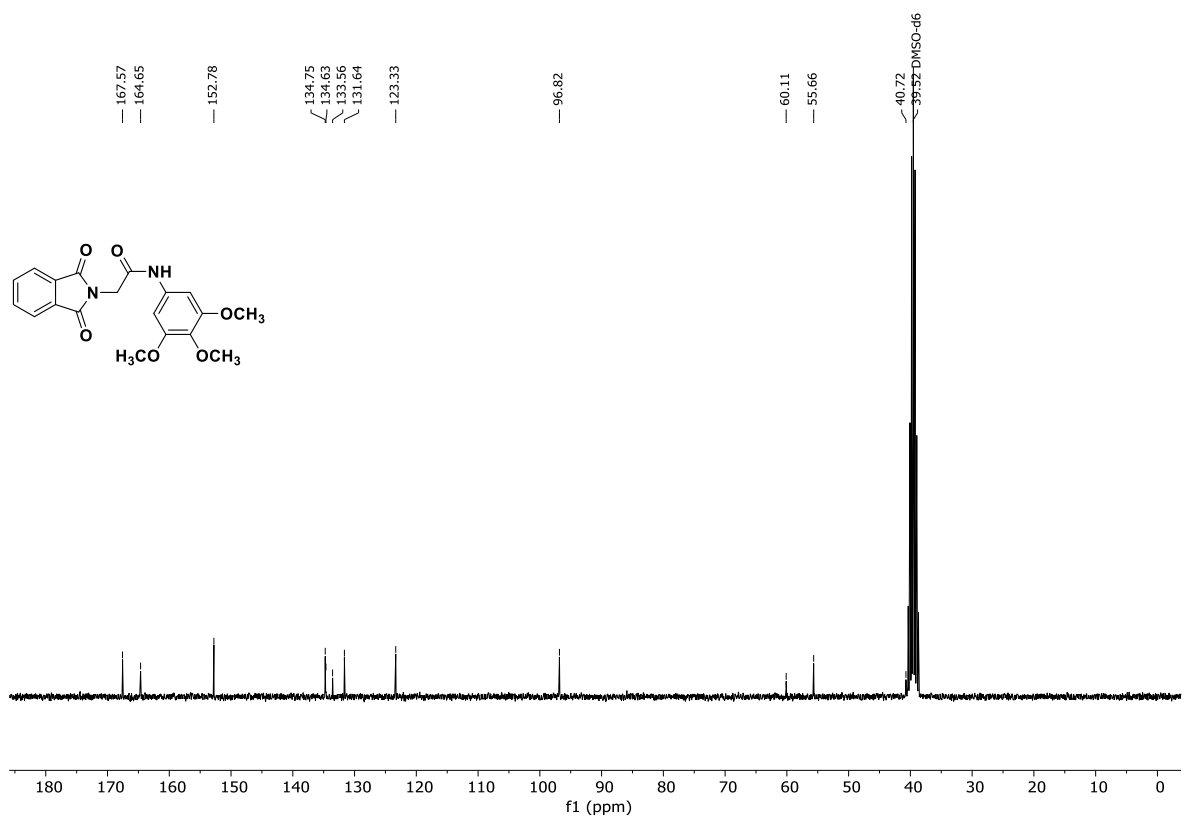


Abb. 12.90: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) von *N*-(3,4,5-Trimethoxyphenyl)-2-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)-acetamid (**75m**).

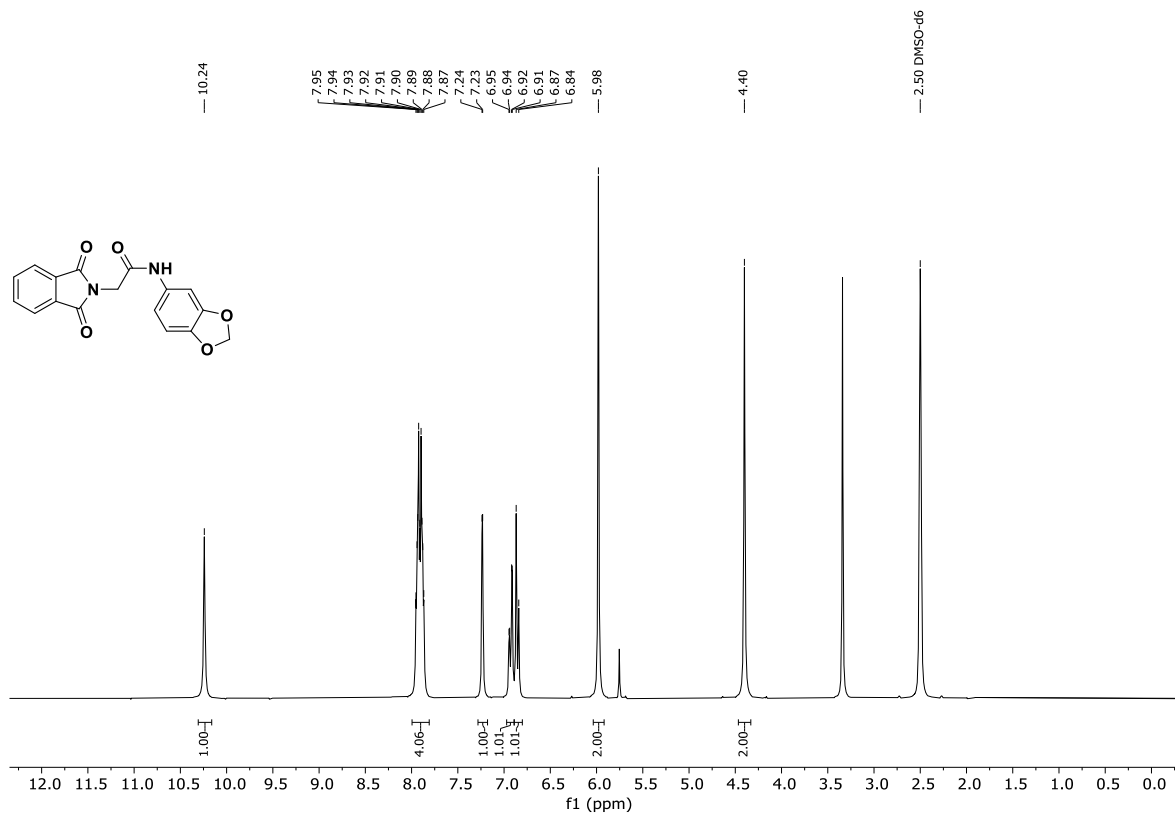


Abb. 12.91: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, DMSO-*d*₆) von *N*-(Benzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)-2-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)acetamid (**75n**).

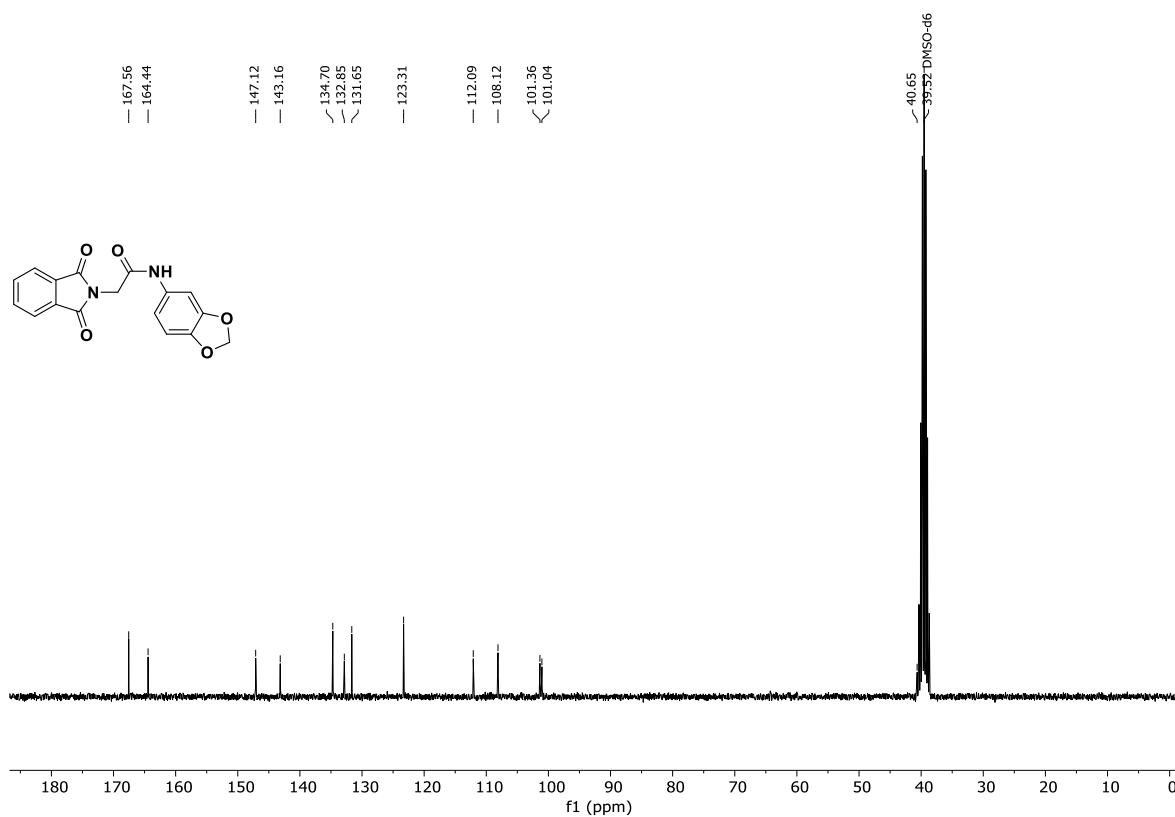


Abb. 12.92: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) von *N*-(Benzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)-2-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)acetamid (**75n**).

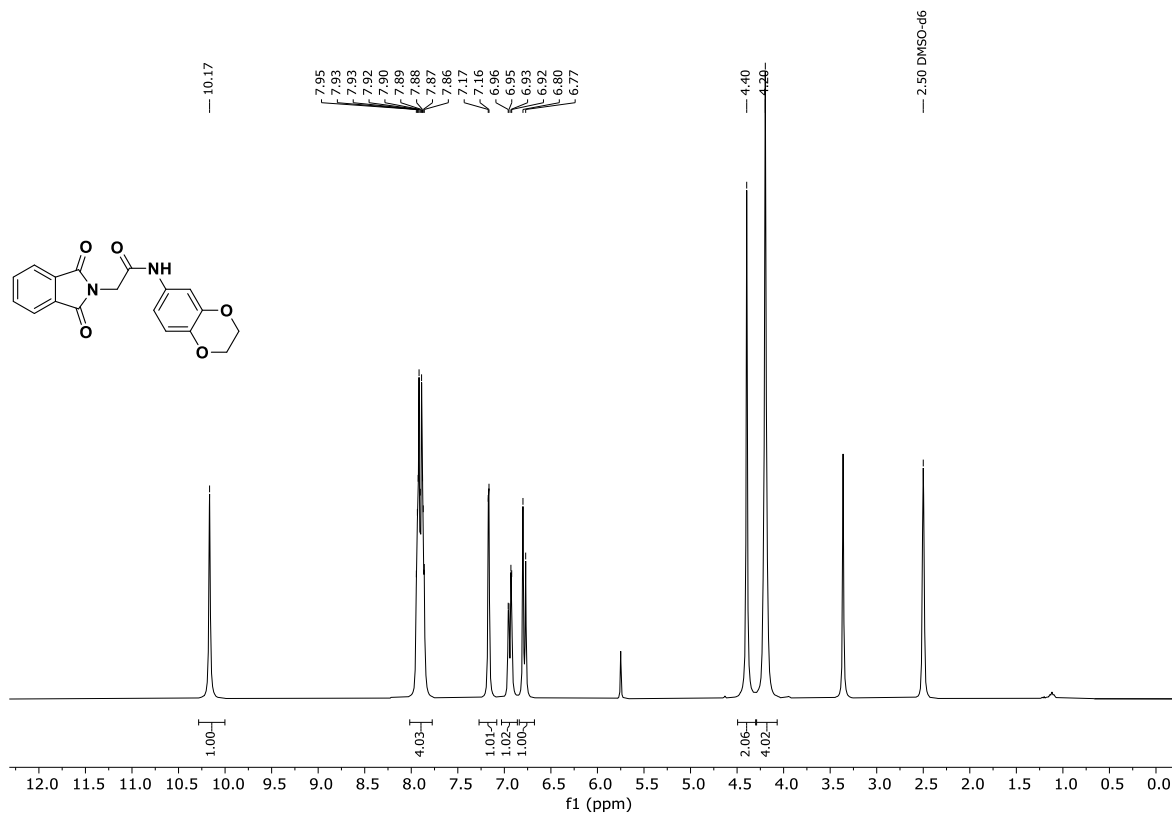


Abb. 12.93: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, DMSO-*d*₆) von *N*-(Benzo[*d*][1,4]dioxan-6-yl)-2-(1,3-dioxoisindolin-2-yl)-acetamid (**75o**).

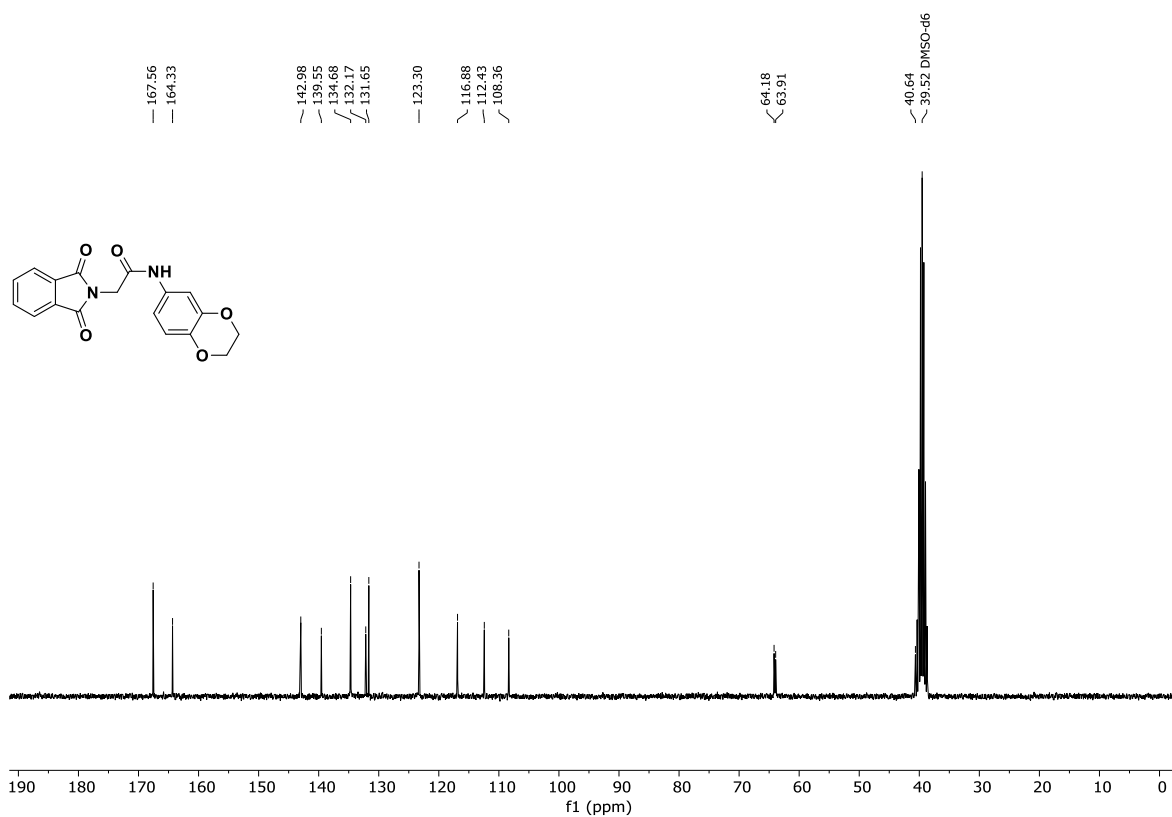


Abb. 12.94: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) von *N*-(Benzo[*d*][1,4]dioxan-6-yl)-2-(1,3-dioxoisindolin-2-yl)-acetamid (**75o**).

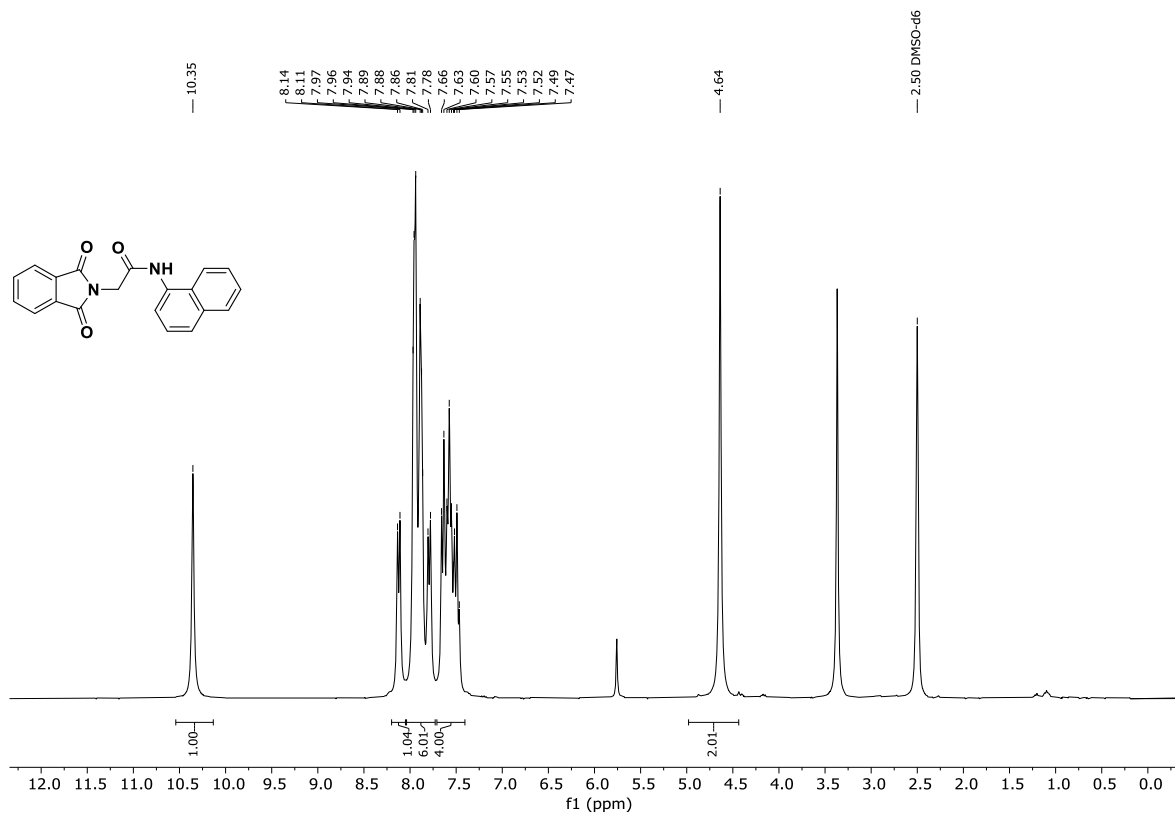


Abb. 12.95: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, DMSO-*d*₆) von *N*-(Naphthalen-1-yl)-2-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)acetamid (75p).

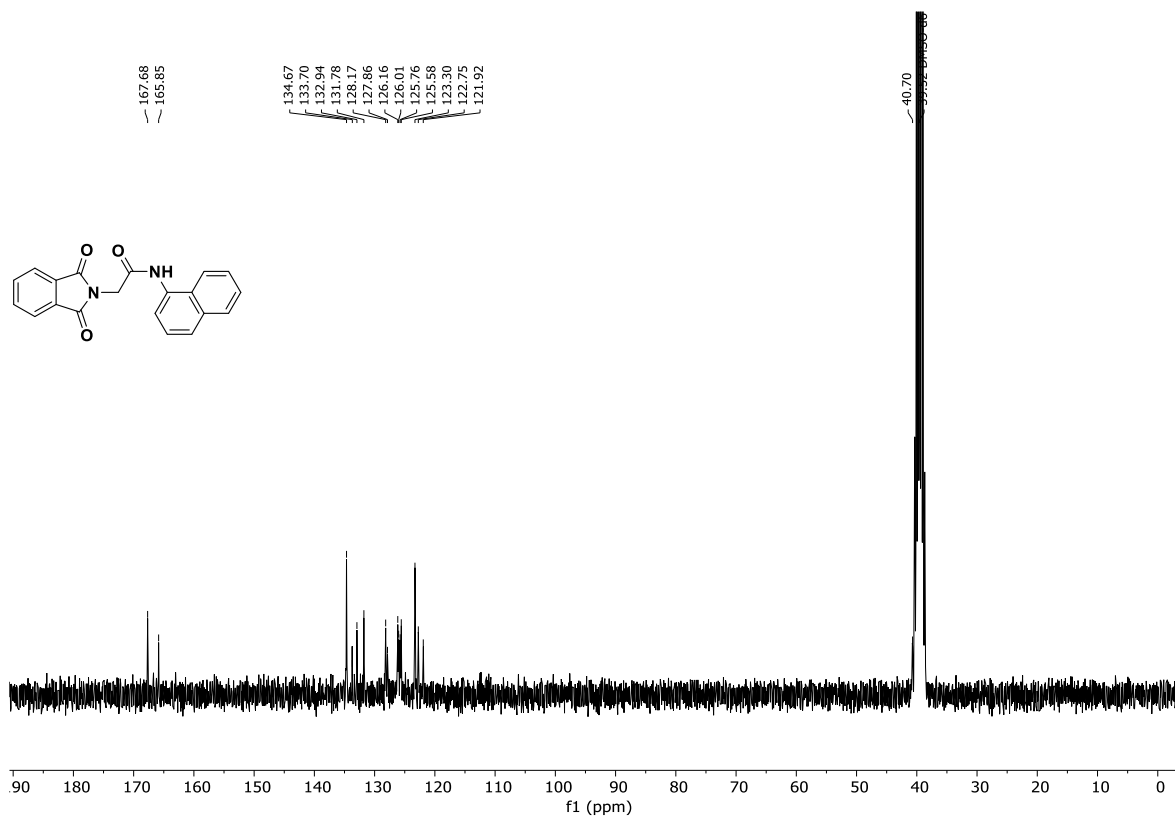


Abb. 12.96: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) von *N*-(Naphthalen-1-yl)-2-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)acetamid (75p).

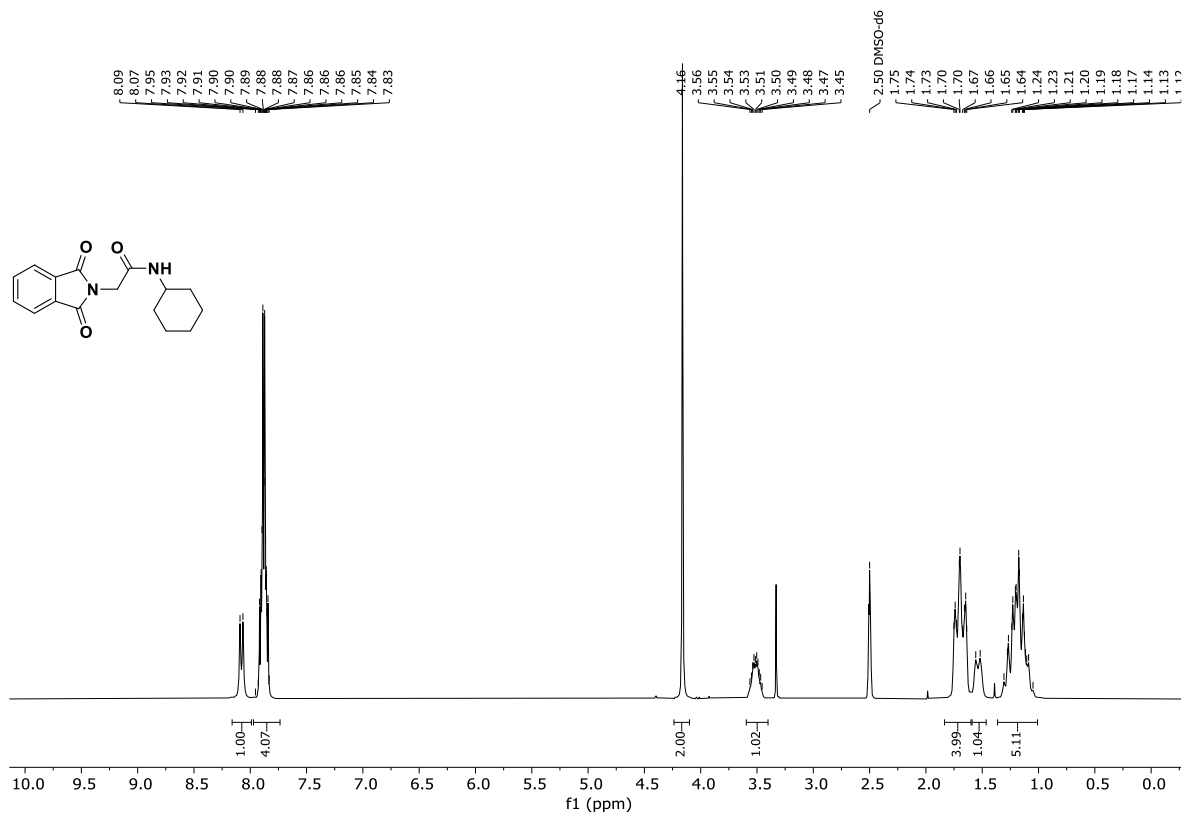


Abb. 12.97: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, DMSO-*d*₆) von *N*-Cyclohexyl-2-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)acetamid (75q).

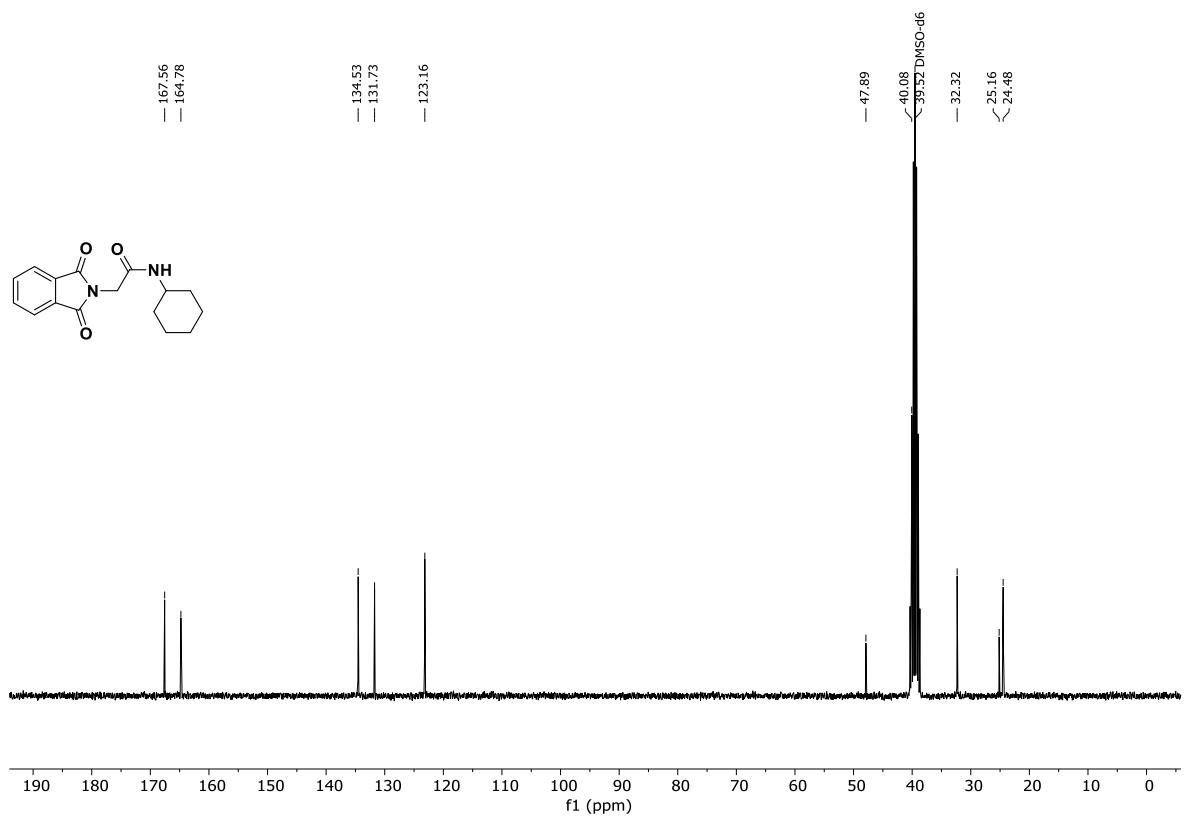


Abb. 12.98: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) von *N*-Cyclohexyl-2-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)acetamid (75q).

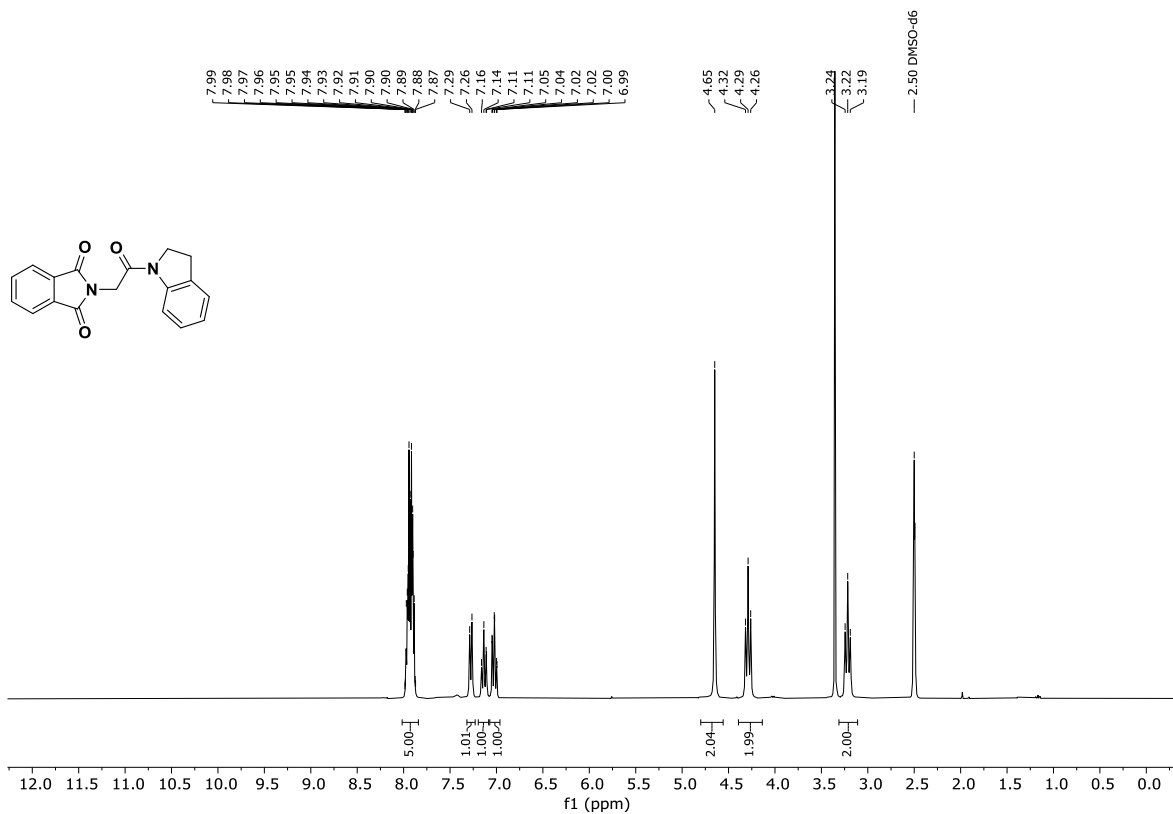


Abb. 12.99: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, DMSO-*d*₆) von 2-(2-(Indolin-1-yl)-2-oxoethyl)-1,3-dioxoisindolin (**75r**).

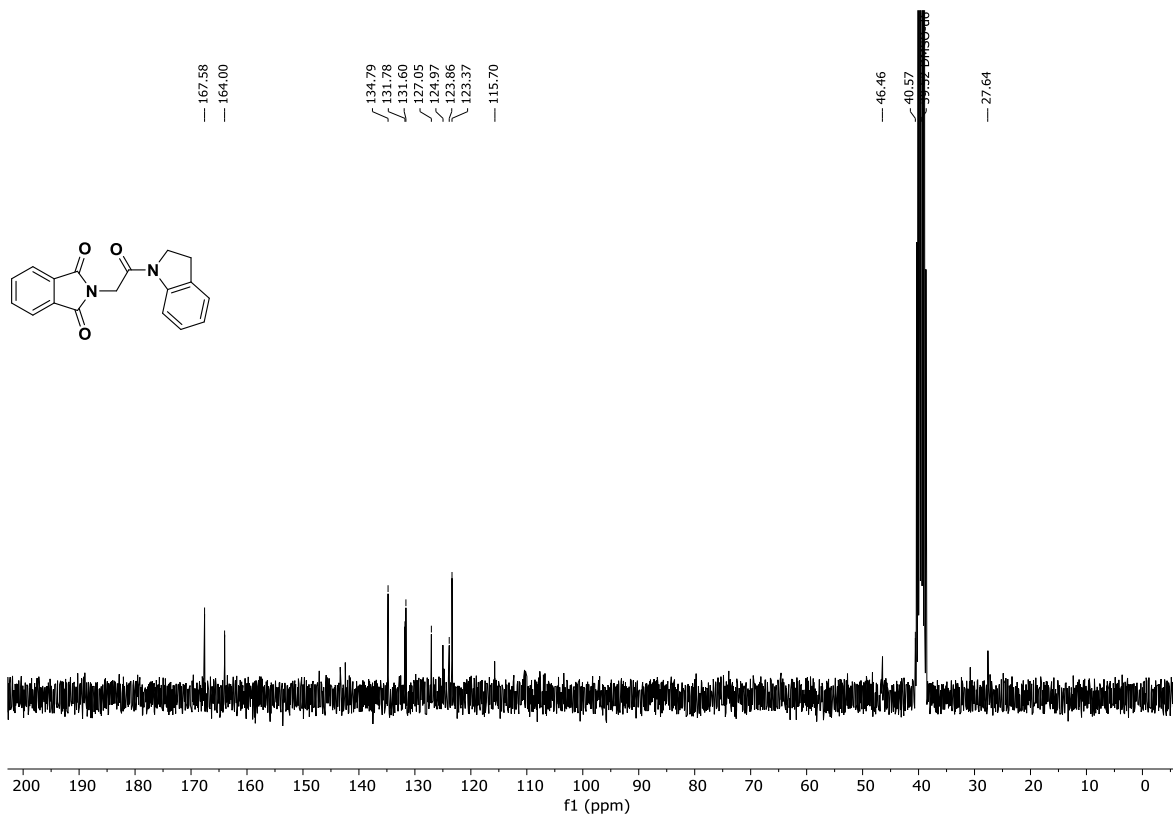


Abb. 12.100: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) von 2-(2-(Indolin-1-yl)-2-oxoethyl)-1,3-dioxoisindolin (**75r**).

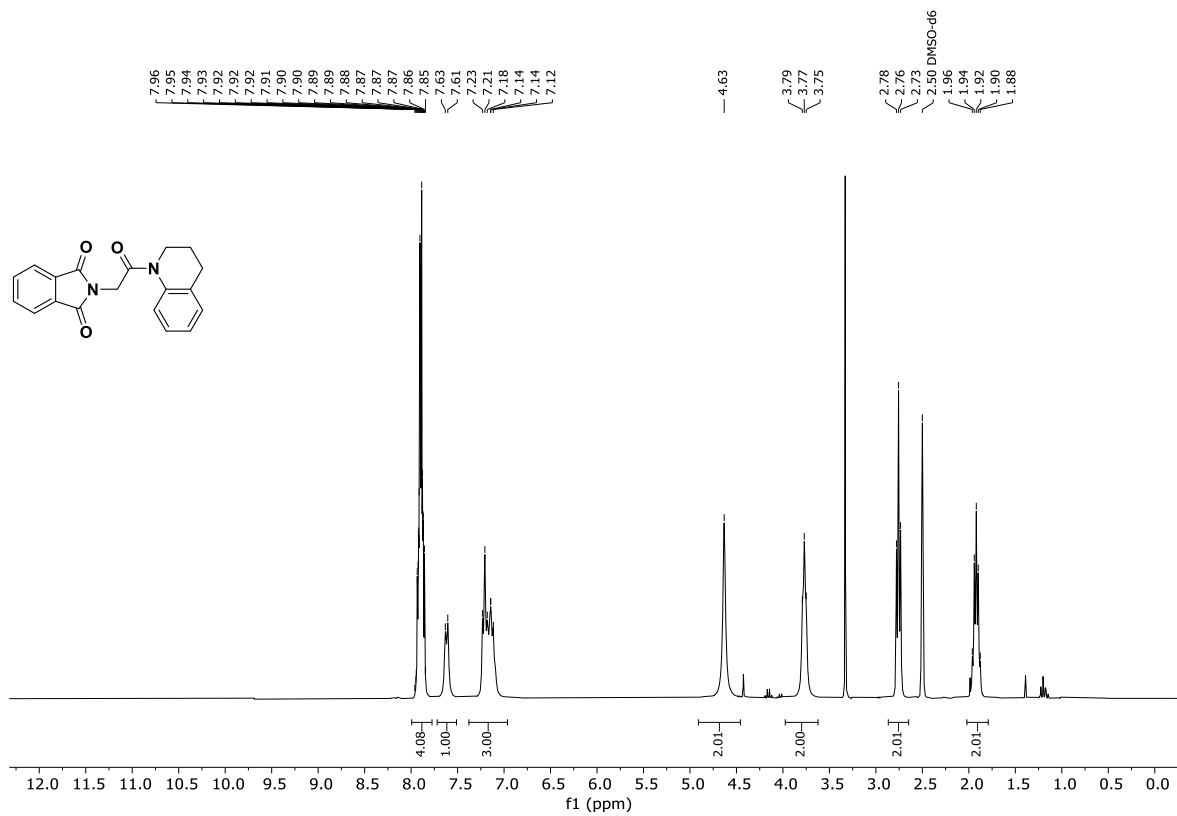


Abb. 12.101: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, DMSO-*d*₆) von 2-(2-(3,4-Dihydrochinolin-1(2H)-yl)-2-oxoethyl)-1,3-dioxisoindolin (**75s**).

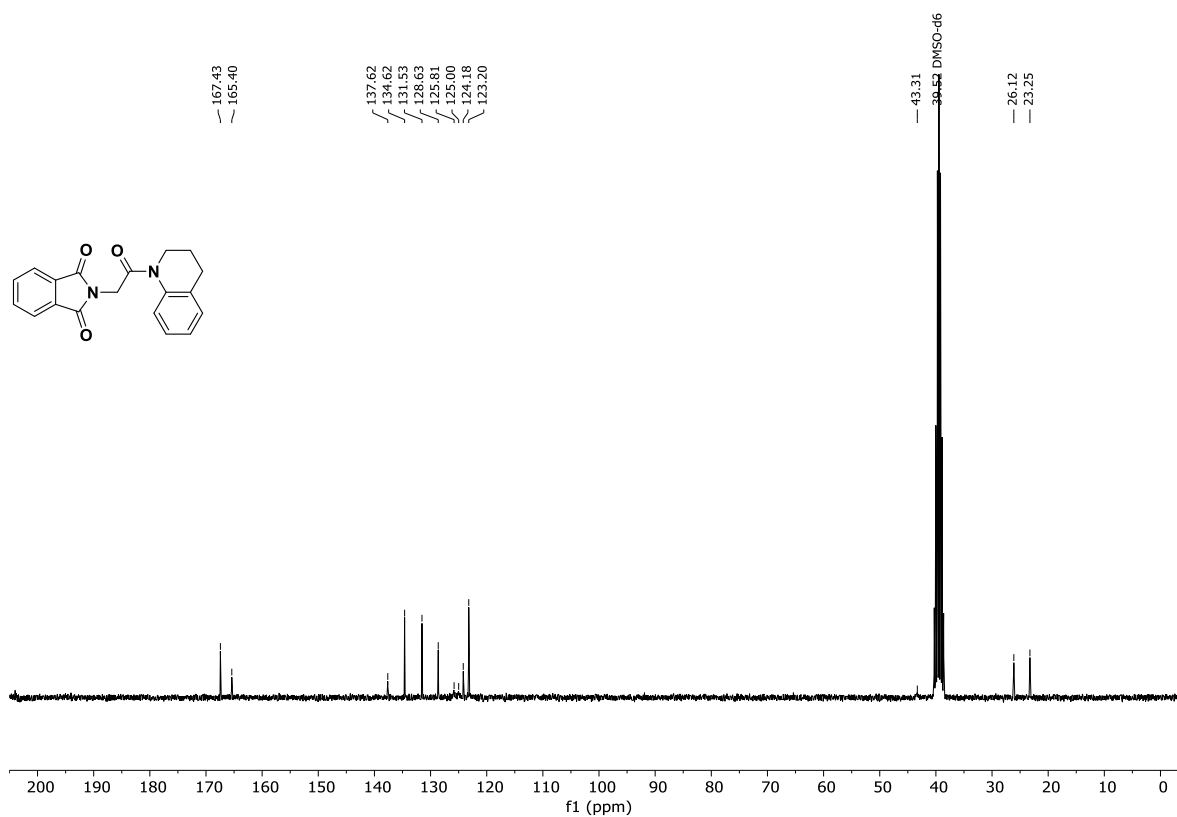


Abb. 12.102: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) von 2-(2-(3,4-Dihydrochinolin-1(2H)-yl)-2-oxoethyl)-1,3-dioxisoindolin (**75s**).

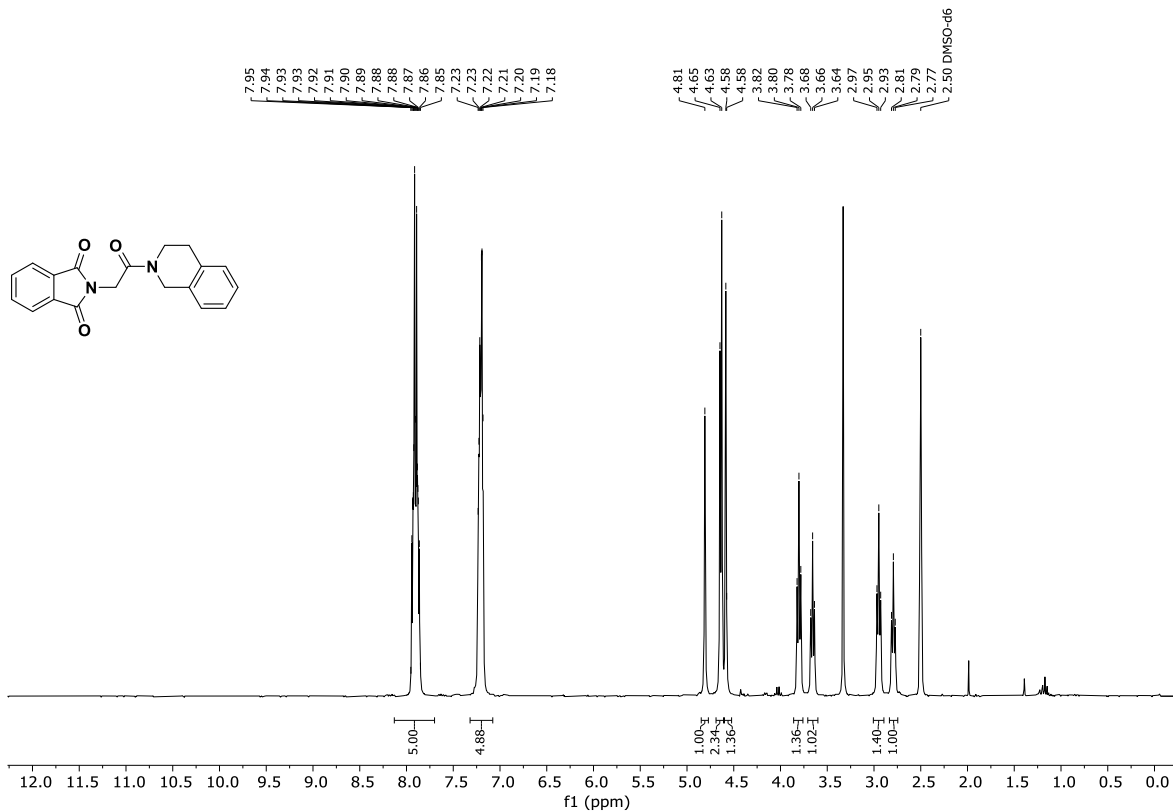


Abb. 12.103: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, DMSO-*d*₆) von 2-(2-(3,4-Dihydroisochinolin-2(1H)-yl)-2-oxoethyl)-1,3-dioxoisindolin (75t).

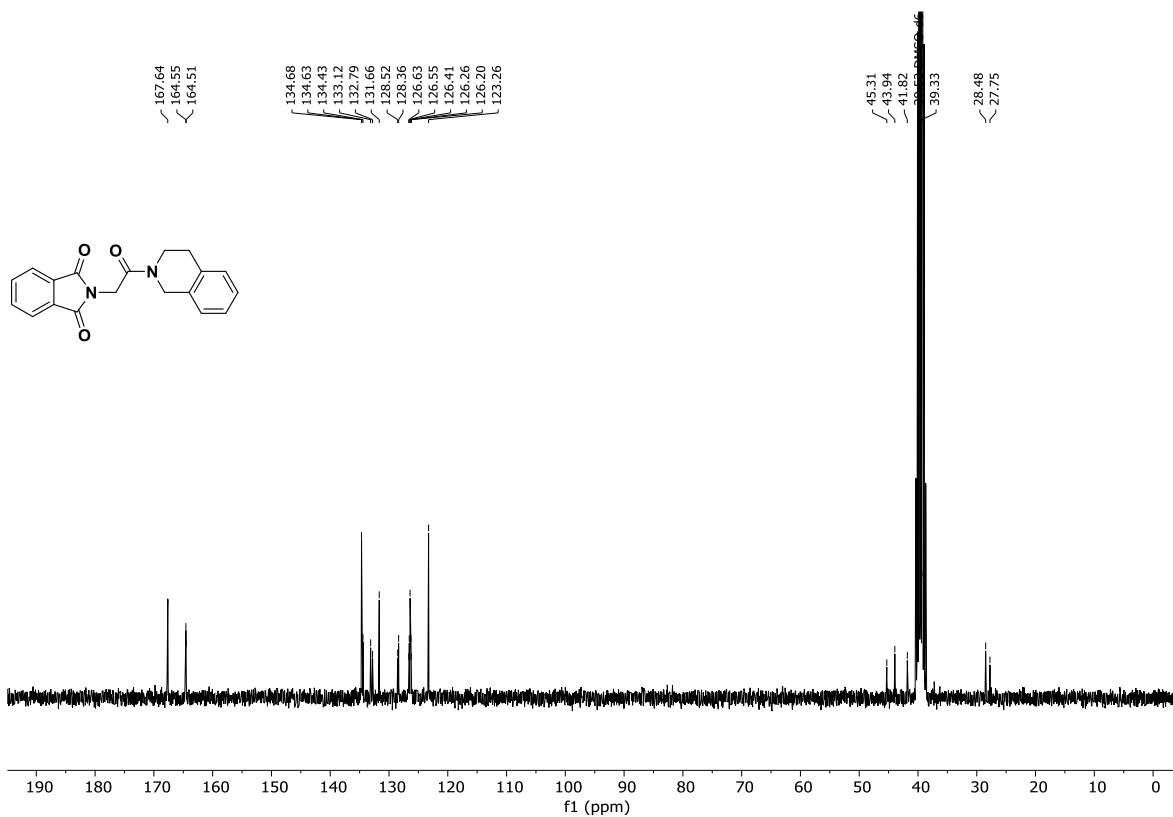


Abb. 12.104: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) von 2-(2-(3,4-Dihydroisochinolin-2(1H)-yl)-2-oxoethyl)-1,3-dioxoisindolin (75t).

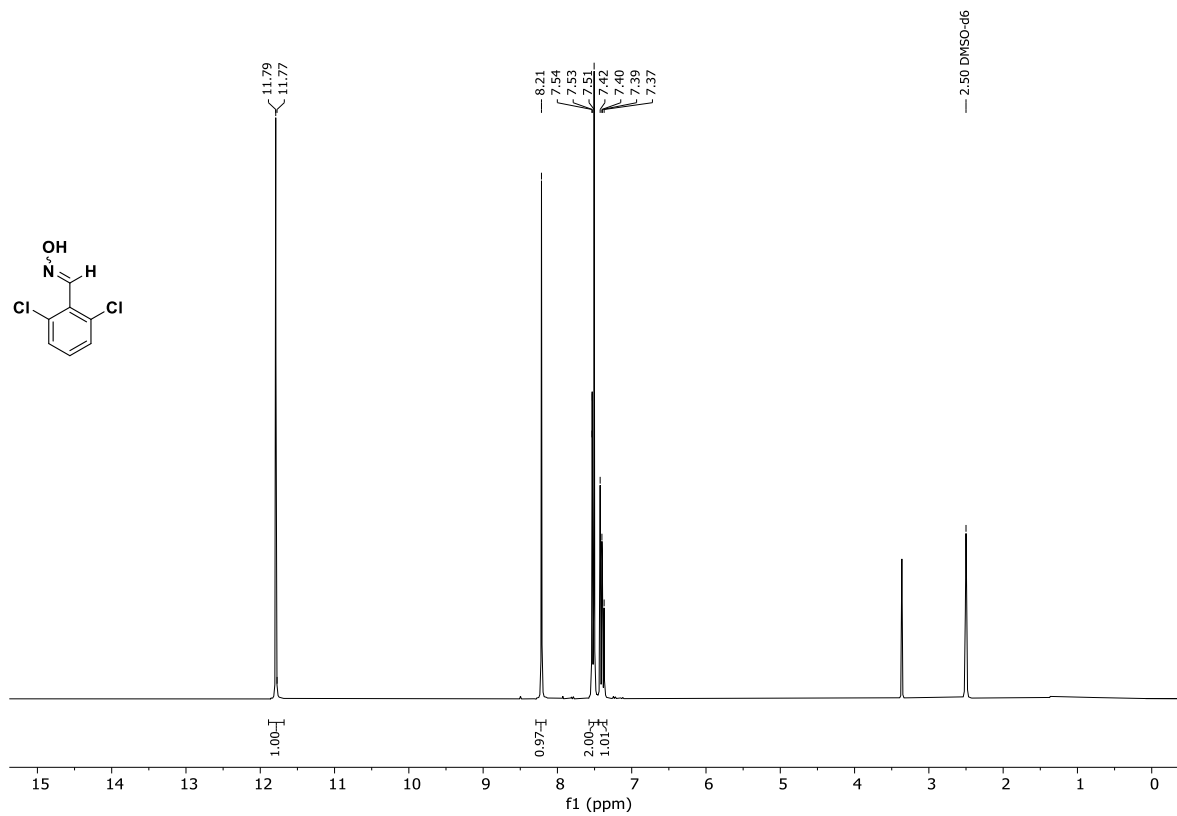


Abb. 12.105: ^1H -NMR-Spektrum (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) von 2,6-Dichlorbenzaloxim (77).

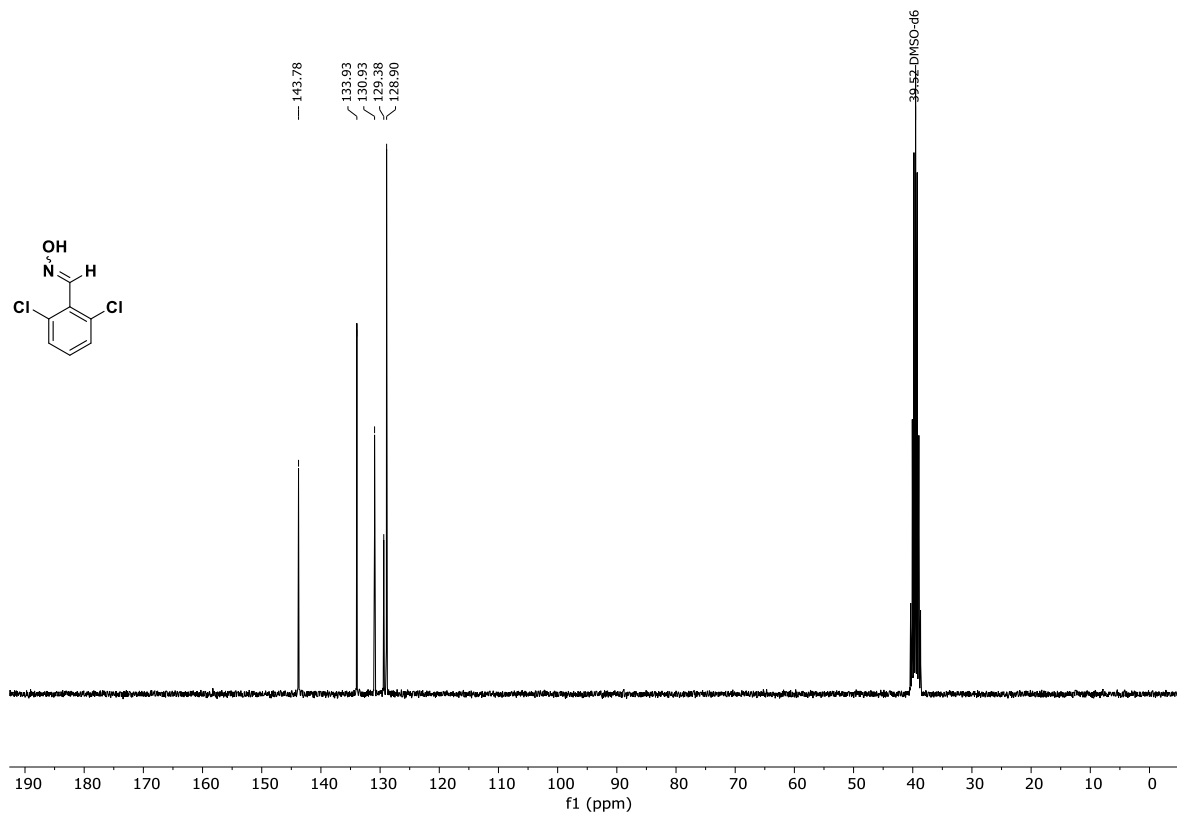


Abb. 12.106: ^{13}C -NMR-Spektrum (75.5 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) von 2,6-Dichlorbenzaloxim (77).

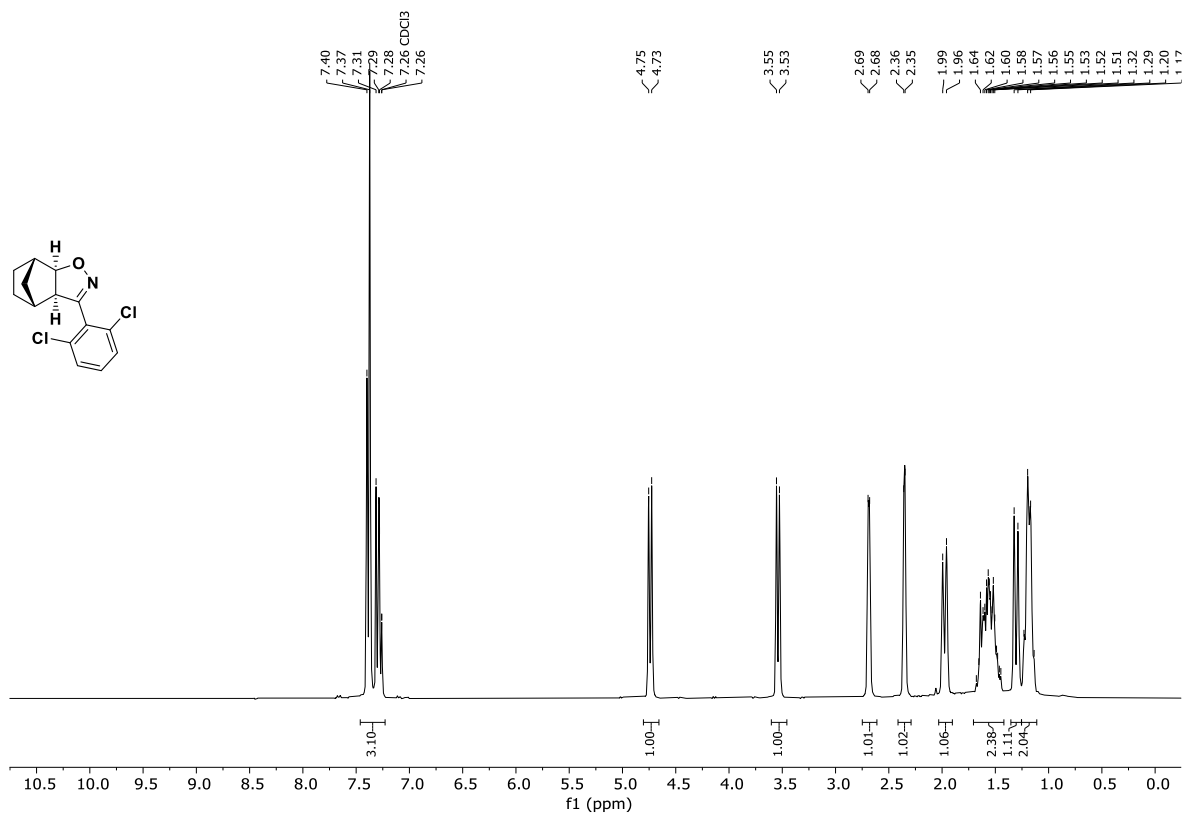


Abb. 12.107: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl₃) von (3aRS,4RS,7SR,7aRS)-3-(2,6-Dichlorophenyl)-3a,4,5,6,7,7a-hexahydro-4,7-methano-benzo[d]isoxazol (**ML2-SA1**, (±)-**64**).

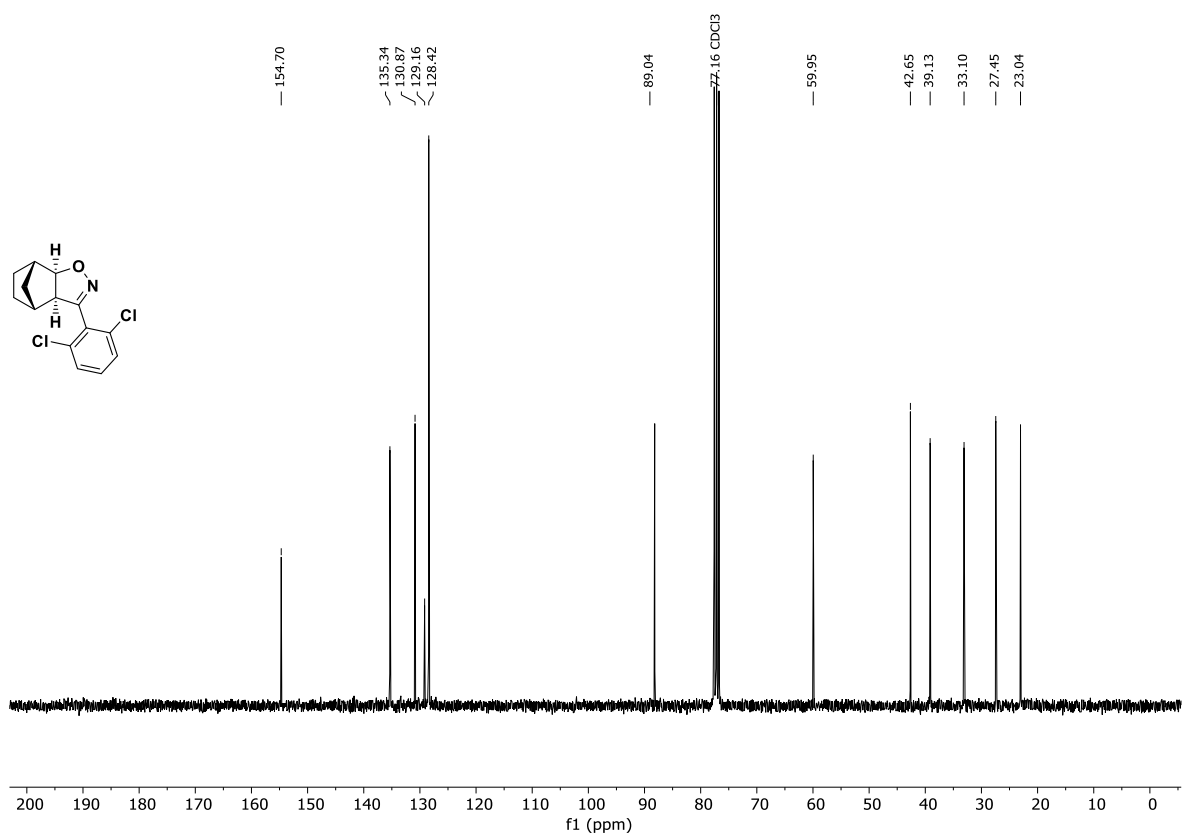


Abb. 12.108: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, CDCl₃) von (3aRS,4RS,7SR,7aRS)-3-(2,6-Dichlorophenyl)-3a,4,5,6,7,7a-hexahydro-4,7-methano-benzo[d]isoxazol (**ML2-SA1**, (±)-**64**).

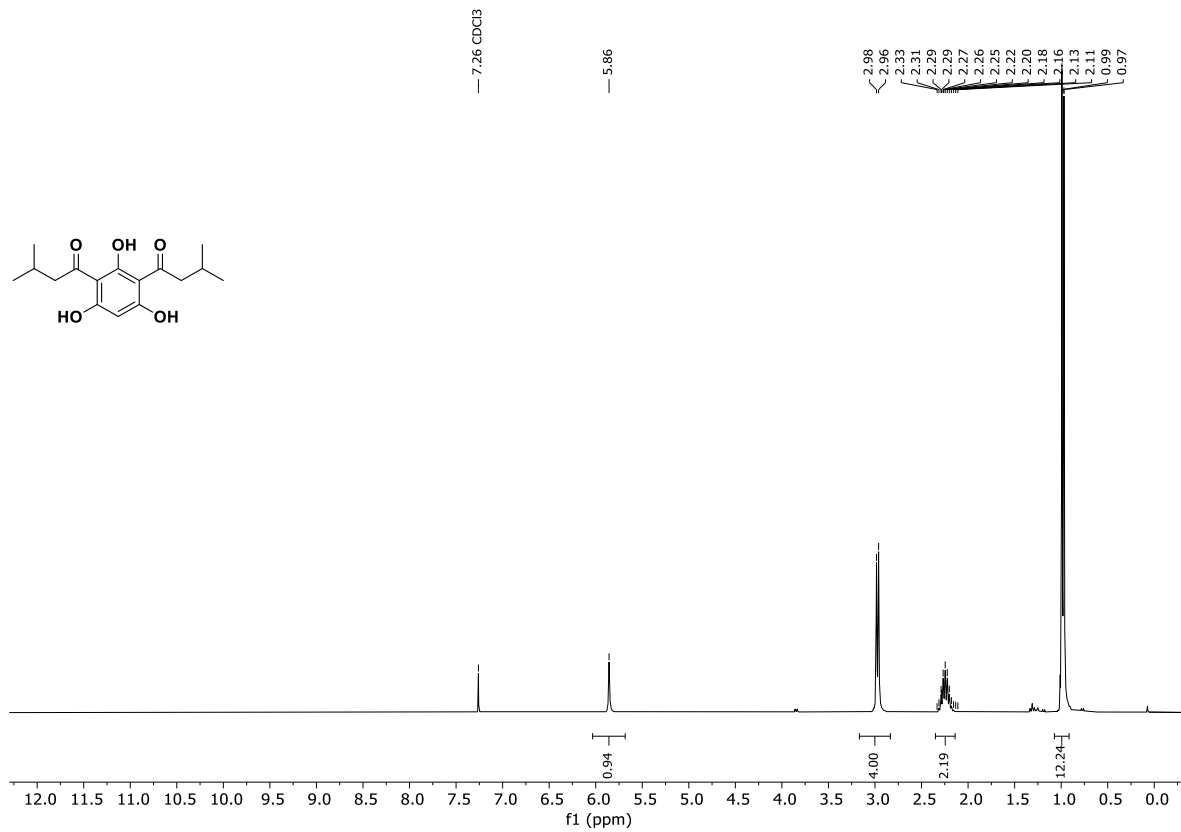


Abb. 12.109: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl₃) 2,6-Bis(isovaleryl)phloroglucin (Hyp1, 80).

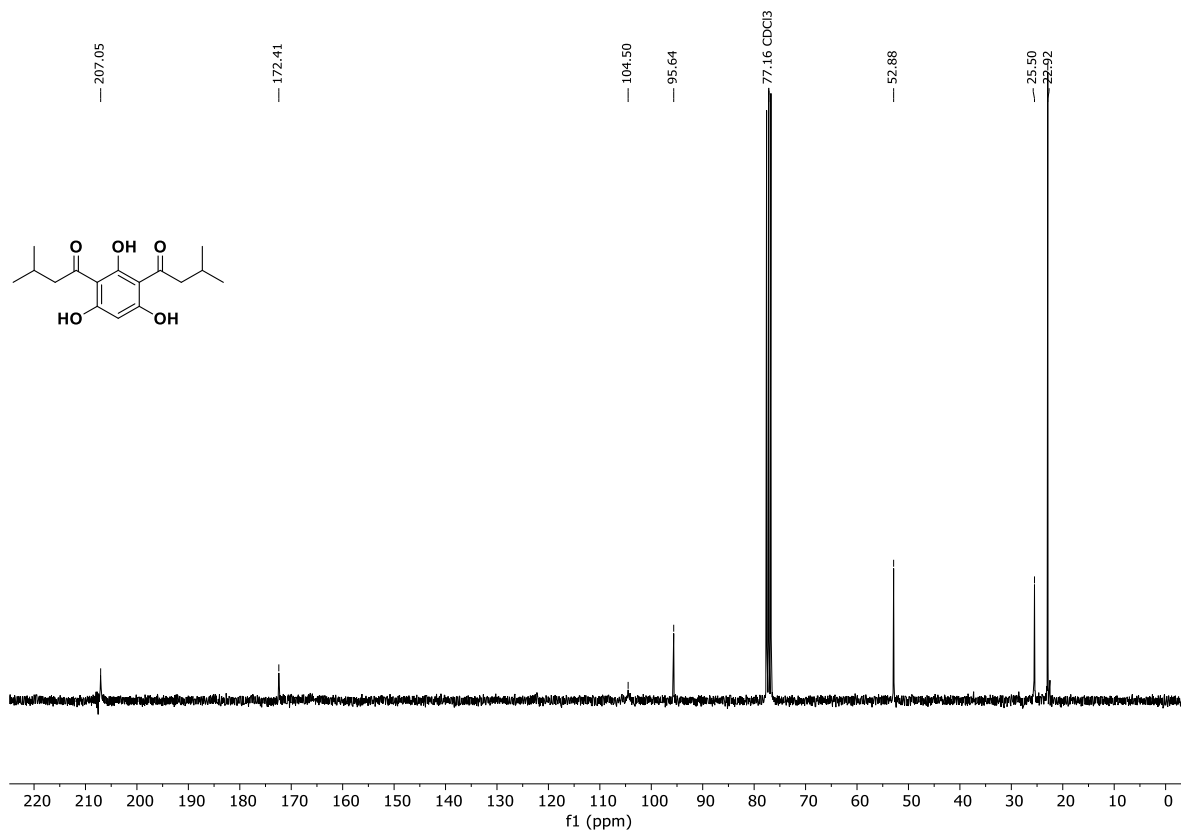


Abb. 12.110: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, CDCl₃) von 2,6-Bis(isovaleryl)phloroglucin (Hyp1, 80).

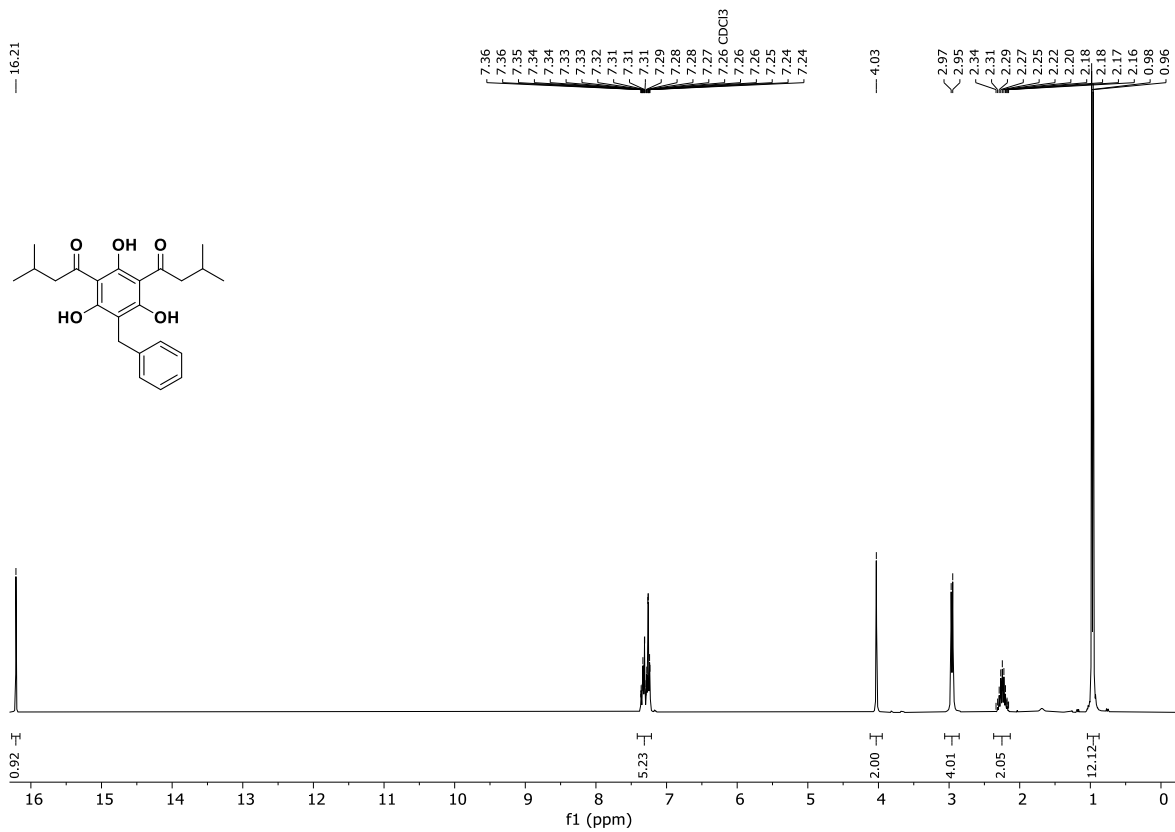


Abb. 12.111: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl₃) von 4-Benzyl-2,6-bis(isovaleryl)phloroglucin (88a).

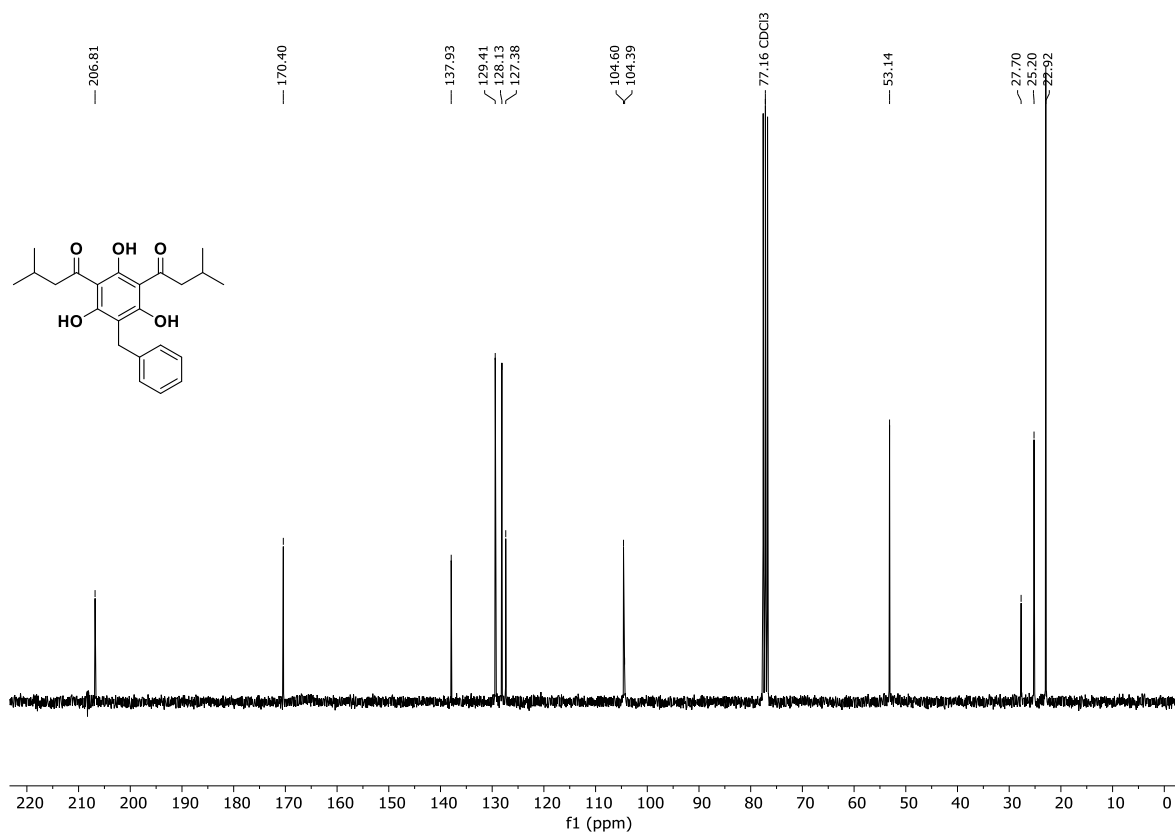


Abb. 12.112: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, CDCl₃) von 4-Benzyl-2,6-bis(isovaleryl)phloroglucin (88a).

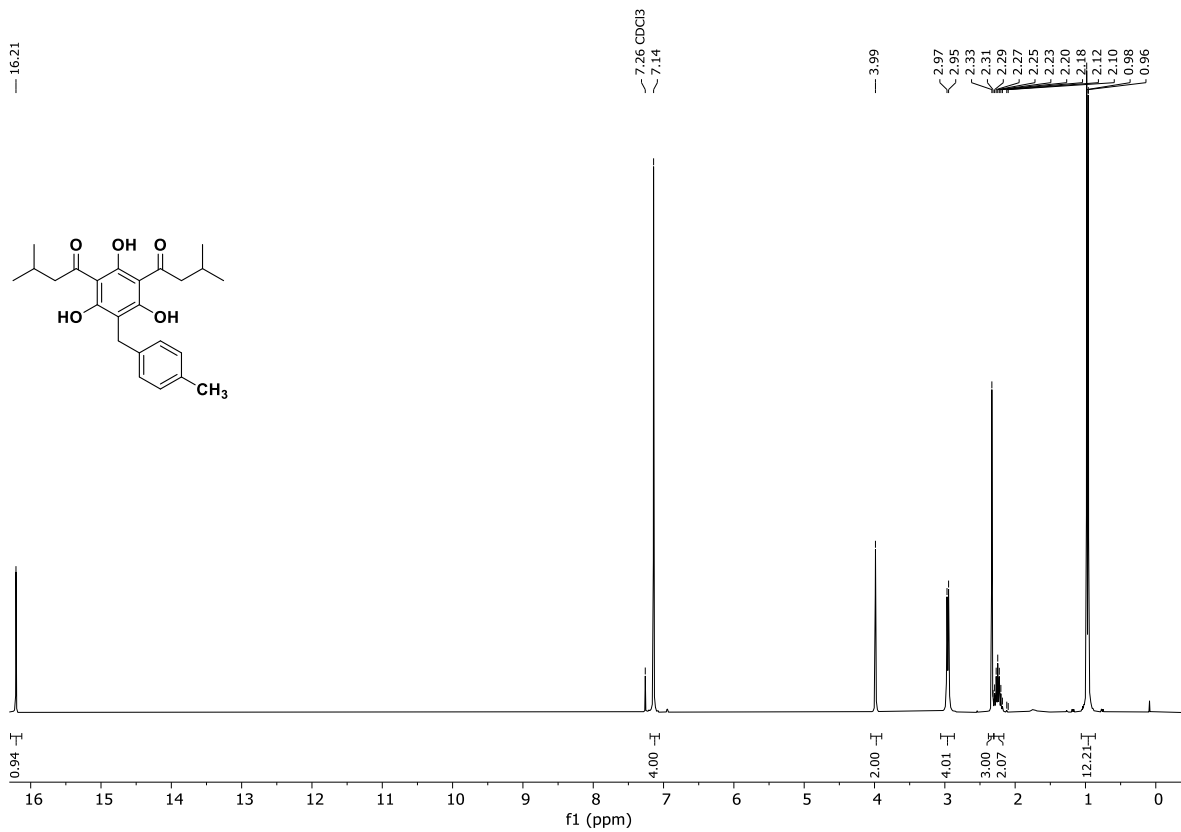


Abb. 12.113: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl₃) von 4-(4'-Methylbenzyl)-2,6-bis(isovaleryl)phloroglucin (88b).

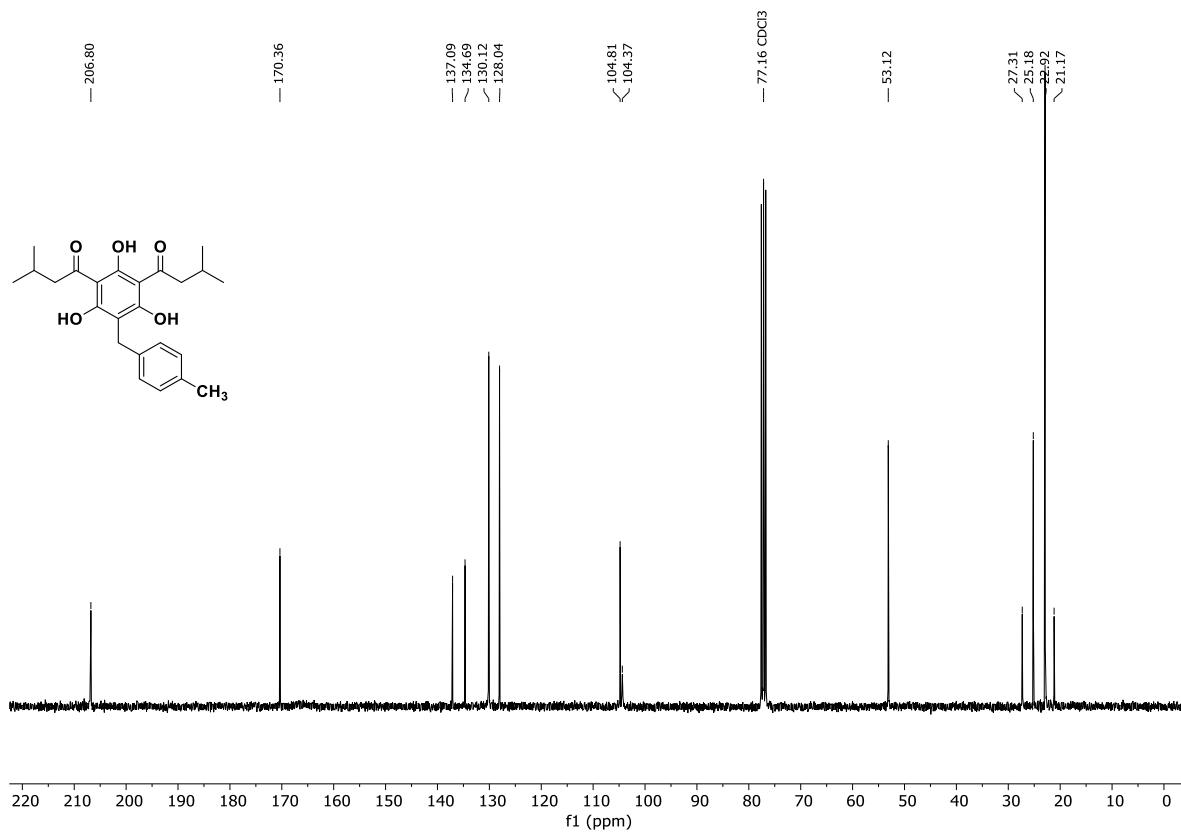


Abb. 12.114: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, CDCl₃) von 4-(4'-Methylbenzyl)-2,6-bis(isovaleryl)phloroglucin (88b).

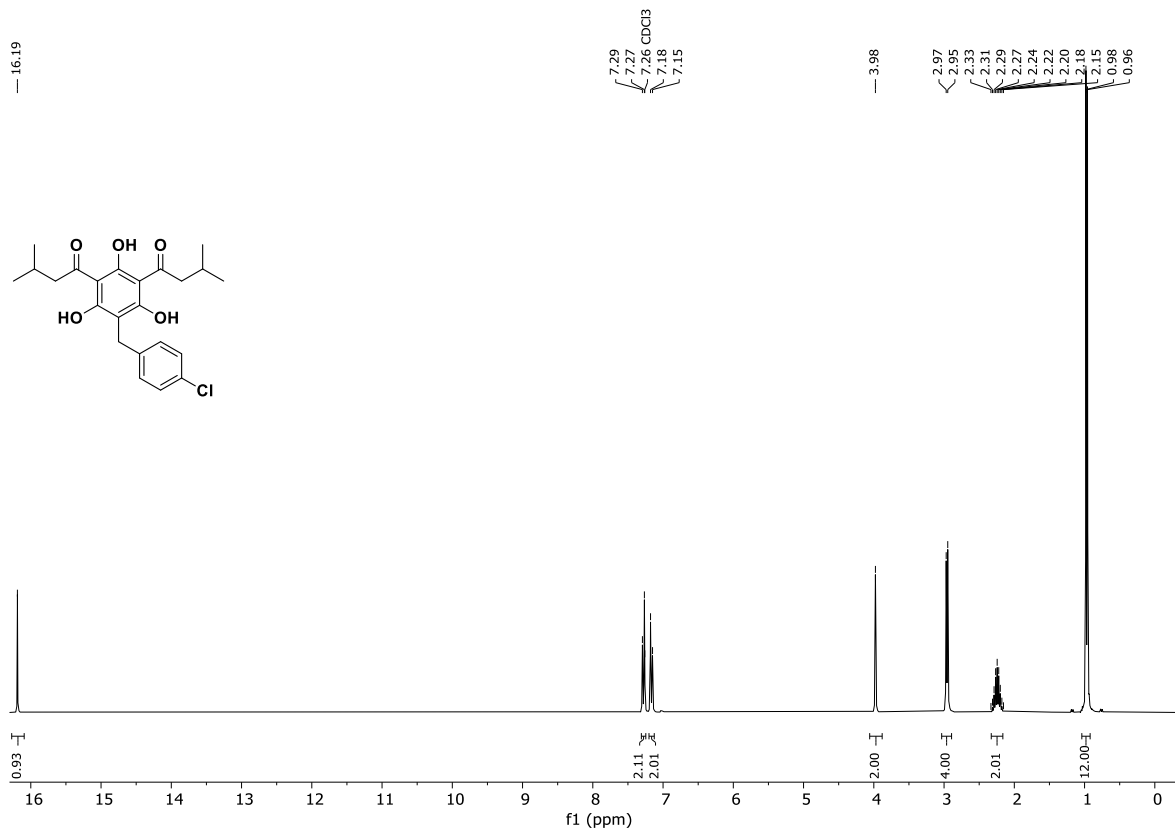


Abb. 12.115: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl₃) von 4-(4'-Chlorbenzyl)-2,6-bis(isovaleryl)phloroglucin (88c).

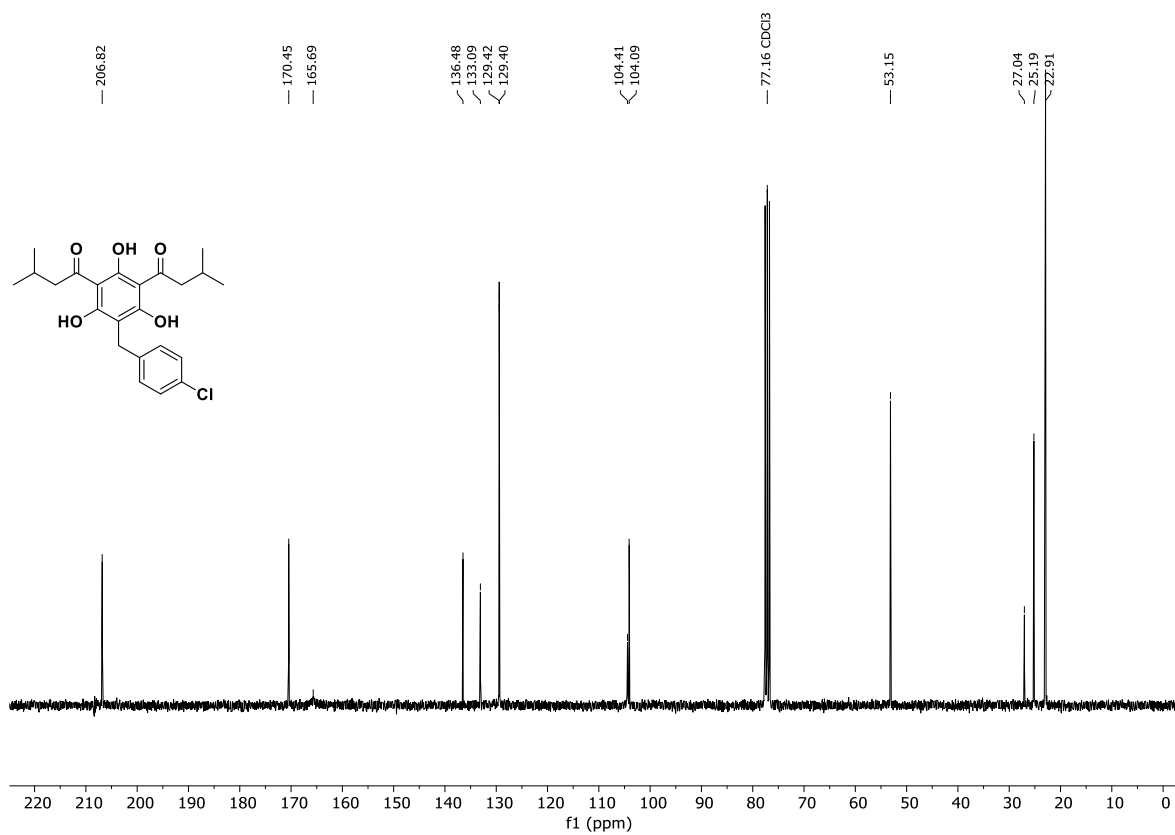


Abb. 12.116: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, CDCl₃) von 4-(4'-Chlorbenzyl)-2,6-bis(isovaleryl)phloroglucin (88c).

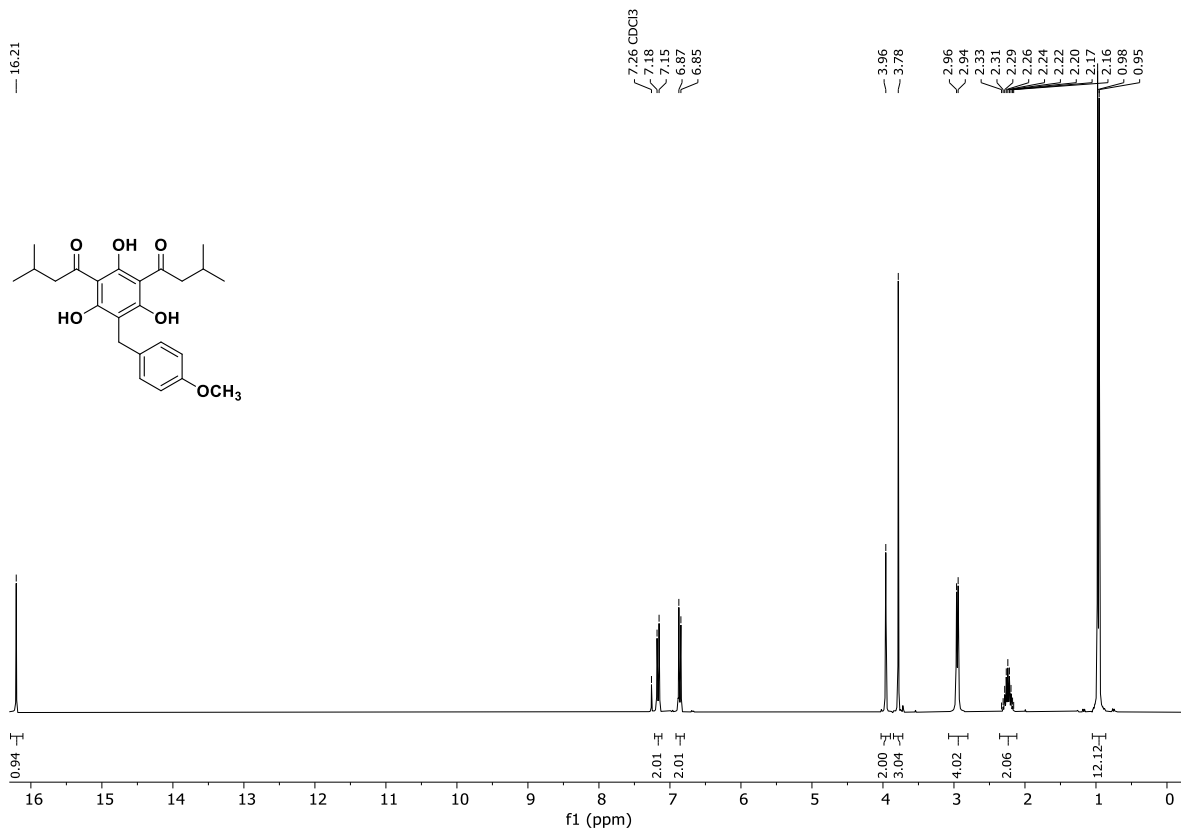


Abb. 12.117: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl₃) von 4-(4'-Methoxybenzyl)-2,6-bis(isovaleryl)phloroglucin (**88d**).

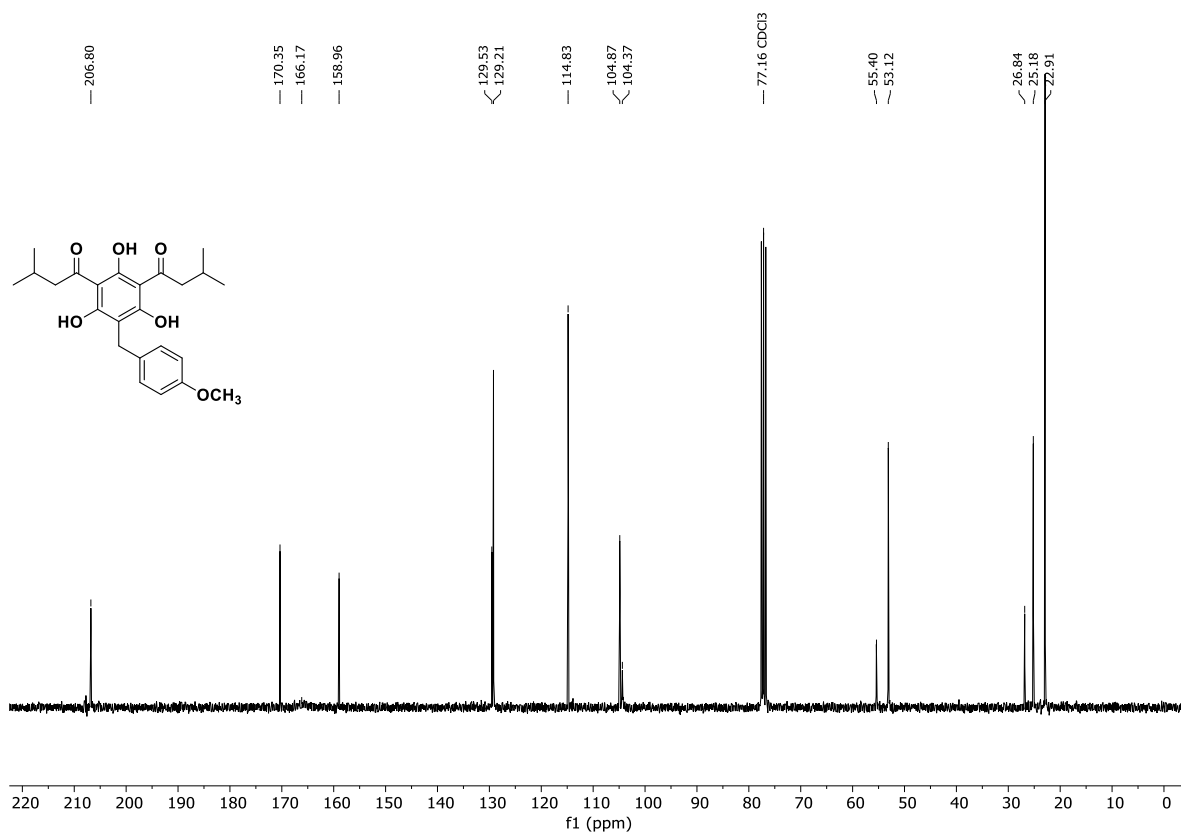


Abb. 12.118: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, CDCl₃) von 4-(4'-Methoxybenzyl)-2,6-bis(isovaleryl)phloroglucin (**88d**).

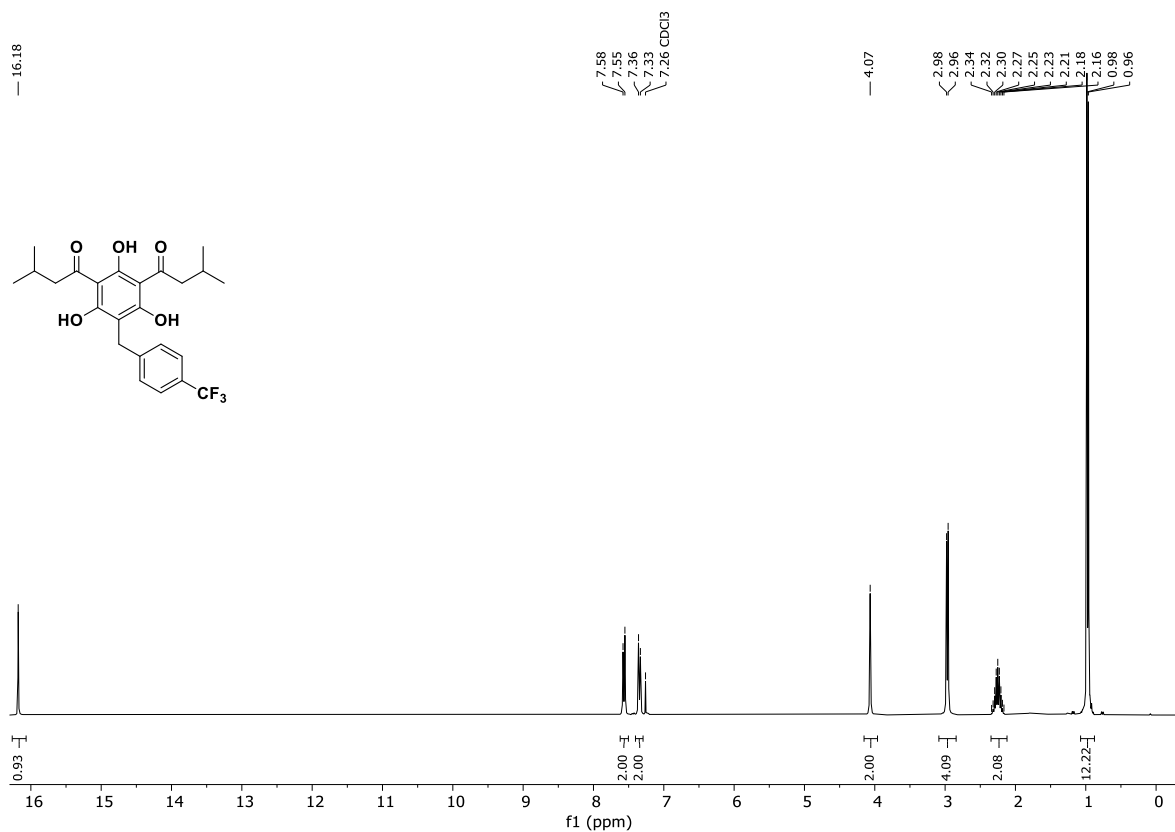


Abb. 12.119: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl₃) von 4-(4'-(Trifluormethyl)benzyl)-2,6-bis(isovaleryl)phloroglucin (88e).

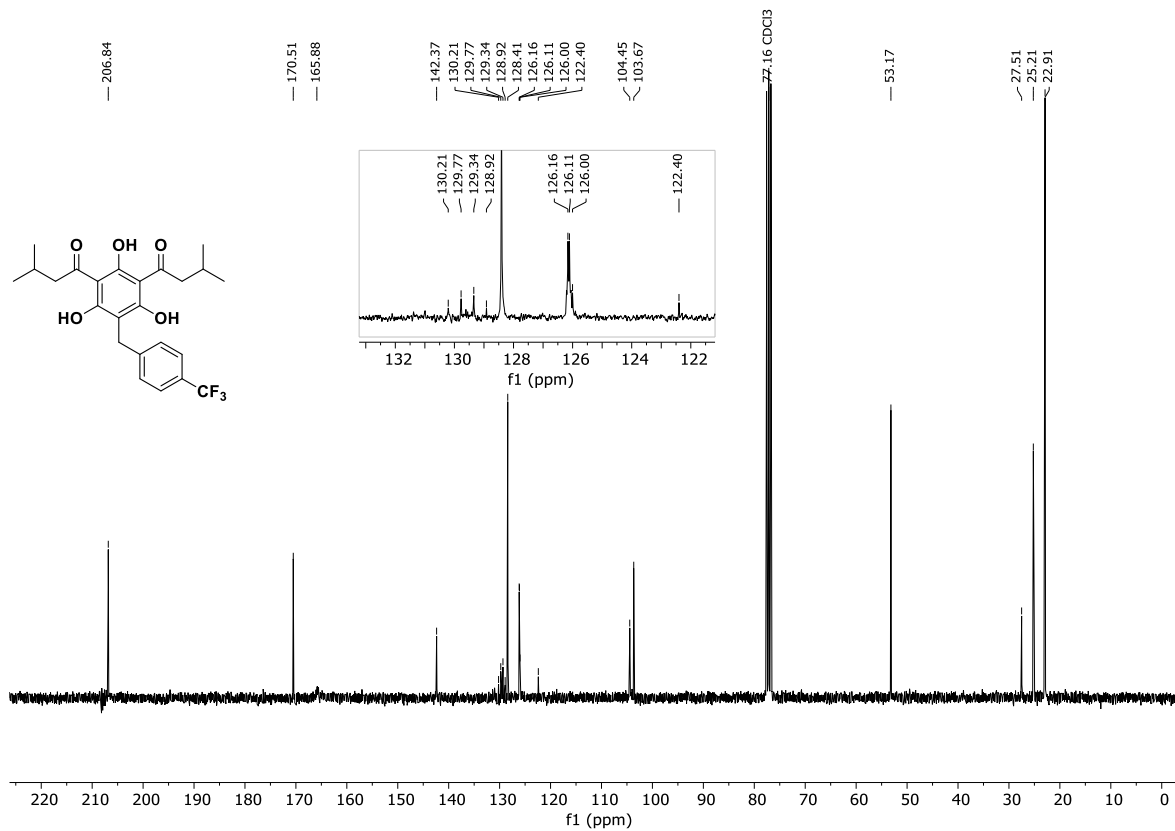


Abb. 12.120: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, CDCl₃) von 4-(4'-(Trifluormethyl)benzyl)-2,6-bis(isovaleryl)phloroglucin (88e).

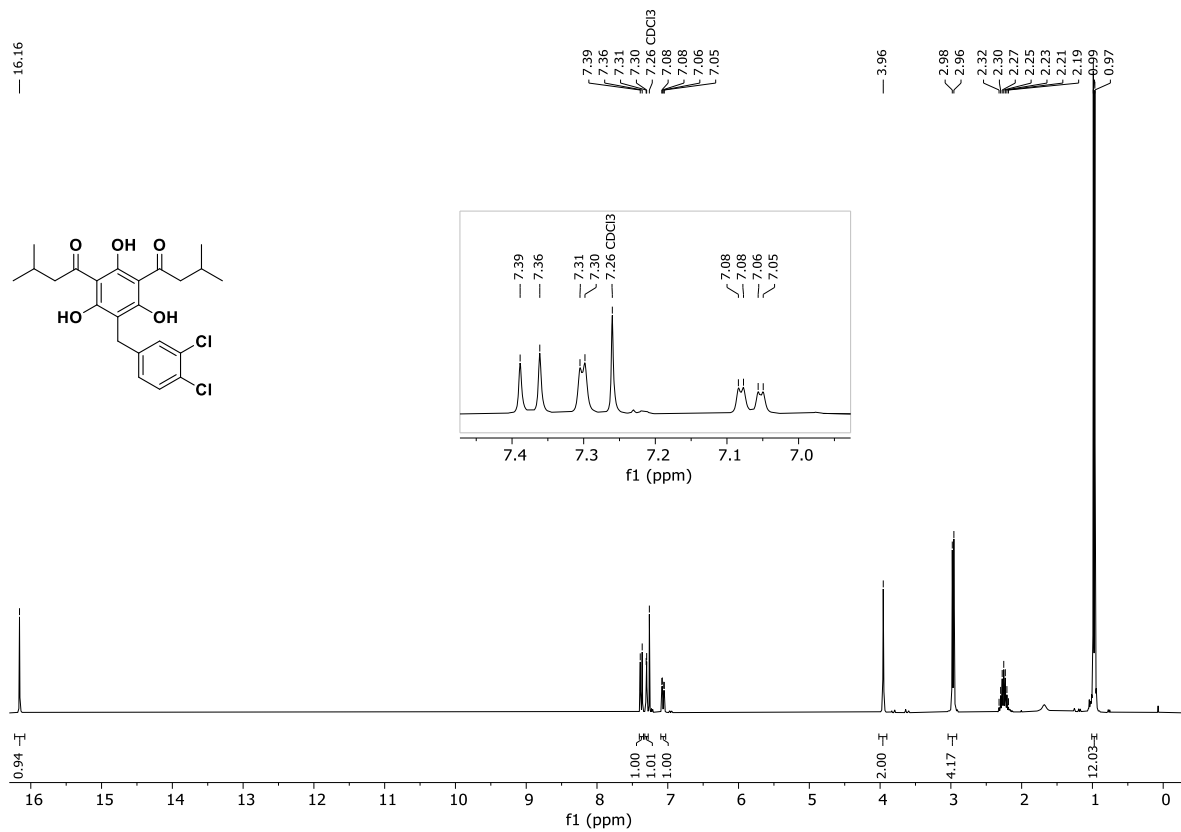


Abb. 12.121: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl₃) von 4-(3',4'-Dichlorbenzyl)-2,6-bis(isovaleryl)phloroglucin (88f).

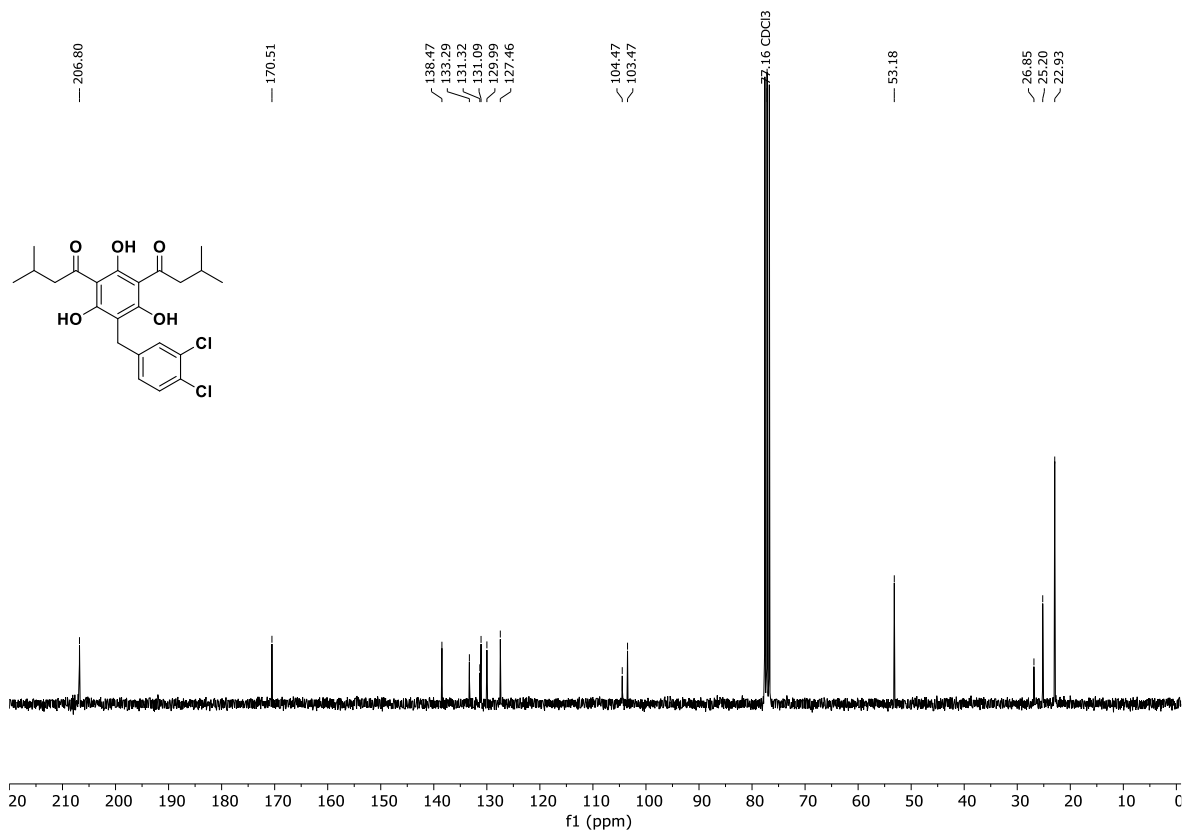


Abb. 12.122: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, CDCl₃) von 4-(3',4'-Dichlorbenzyl)-2,6-bis(isovaleryl)phloroglucin (88f).

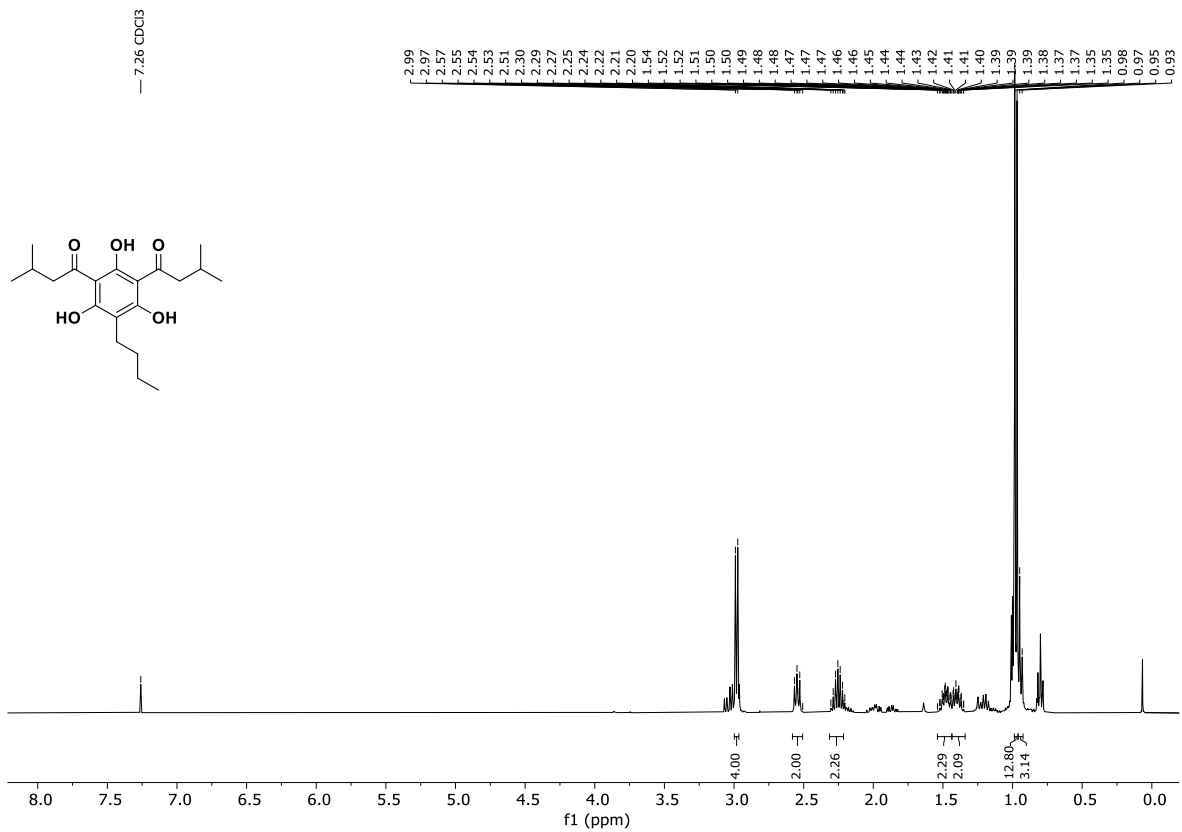


Abb. 12.123: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl₃) von 4-(*n*-Butyl)-2,6-bis(isovaleryl)phloroglucin (DT10, 90).

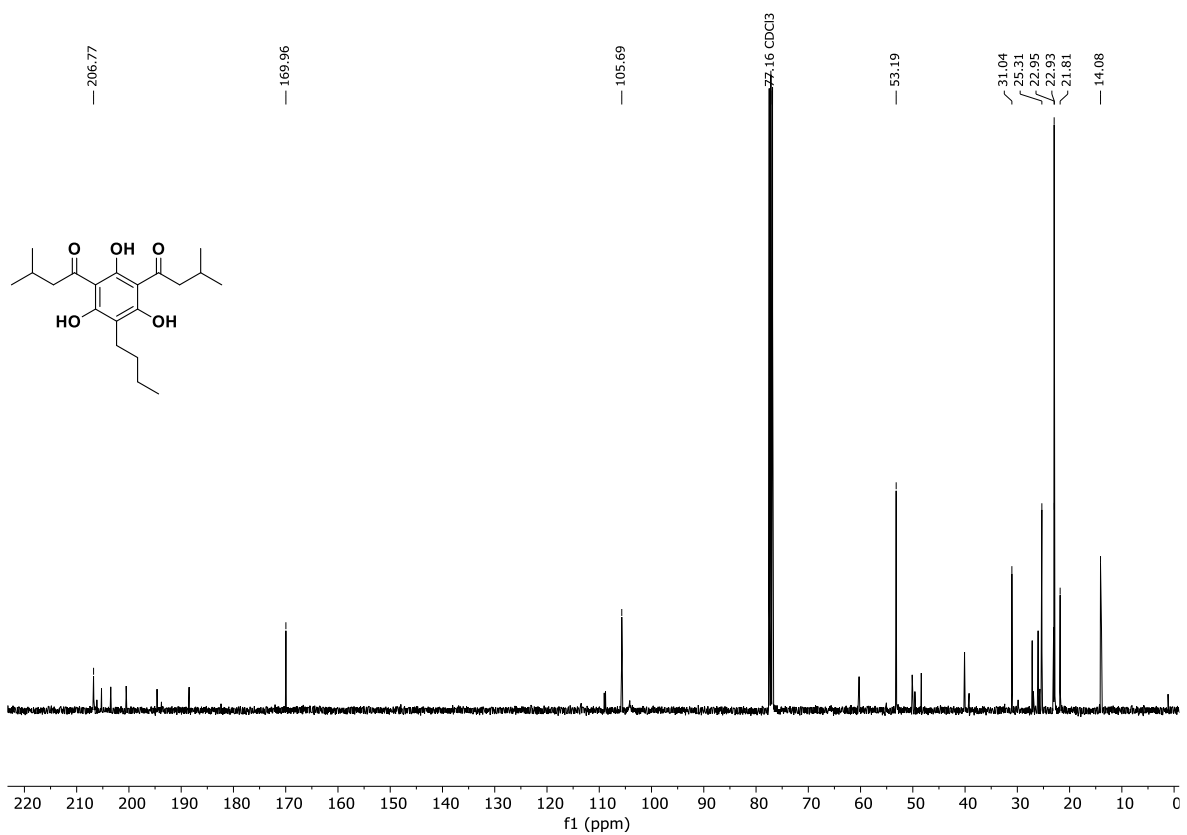


Abb. 12.124: ¹³C-NMR-Spektrum (100.6 MHz, CDCl₃) von 4-(*n*-Butyl)-2,6-bis(isovaleryl)phloroglucin (DT10, 90).

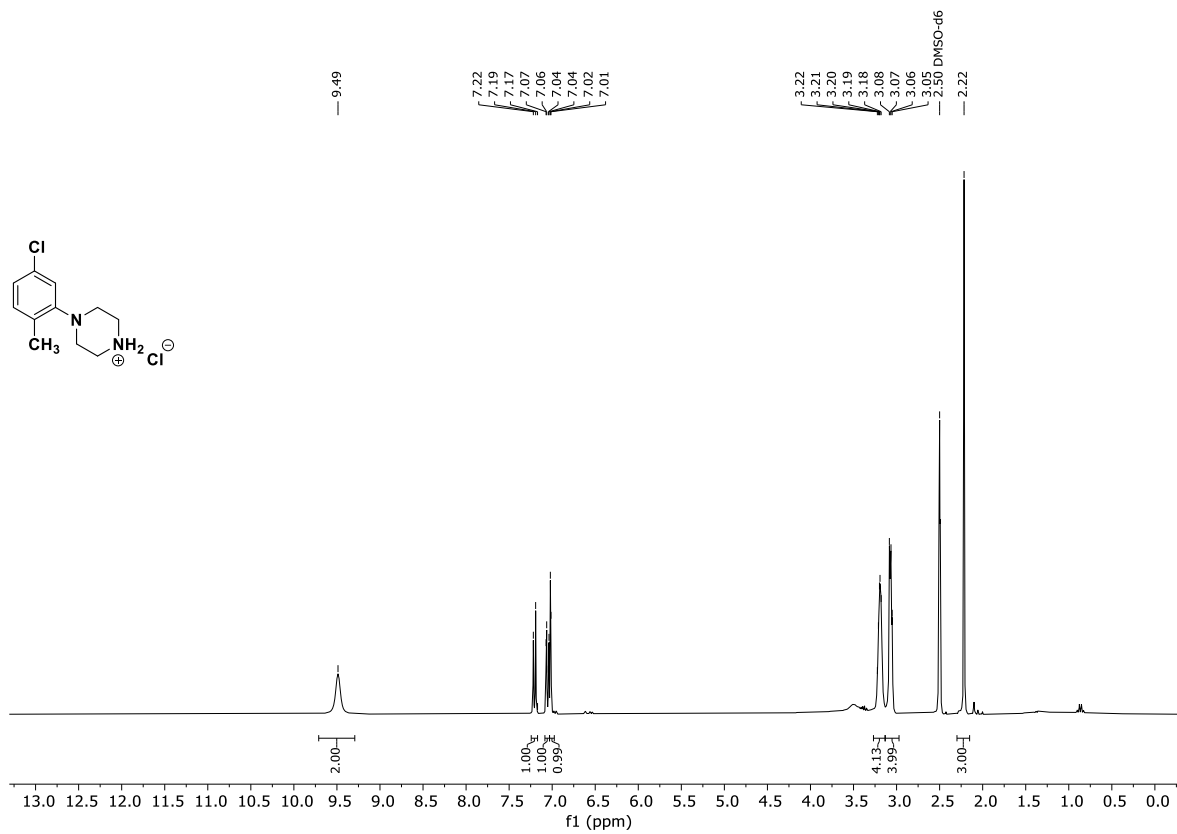


Abb. 12.125: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) von 1-(5-Chlor-2-methylphenyl)piperazin-Hydrochlorid (**93**).

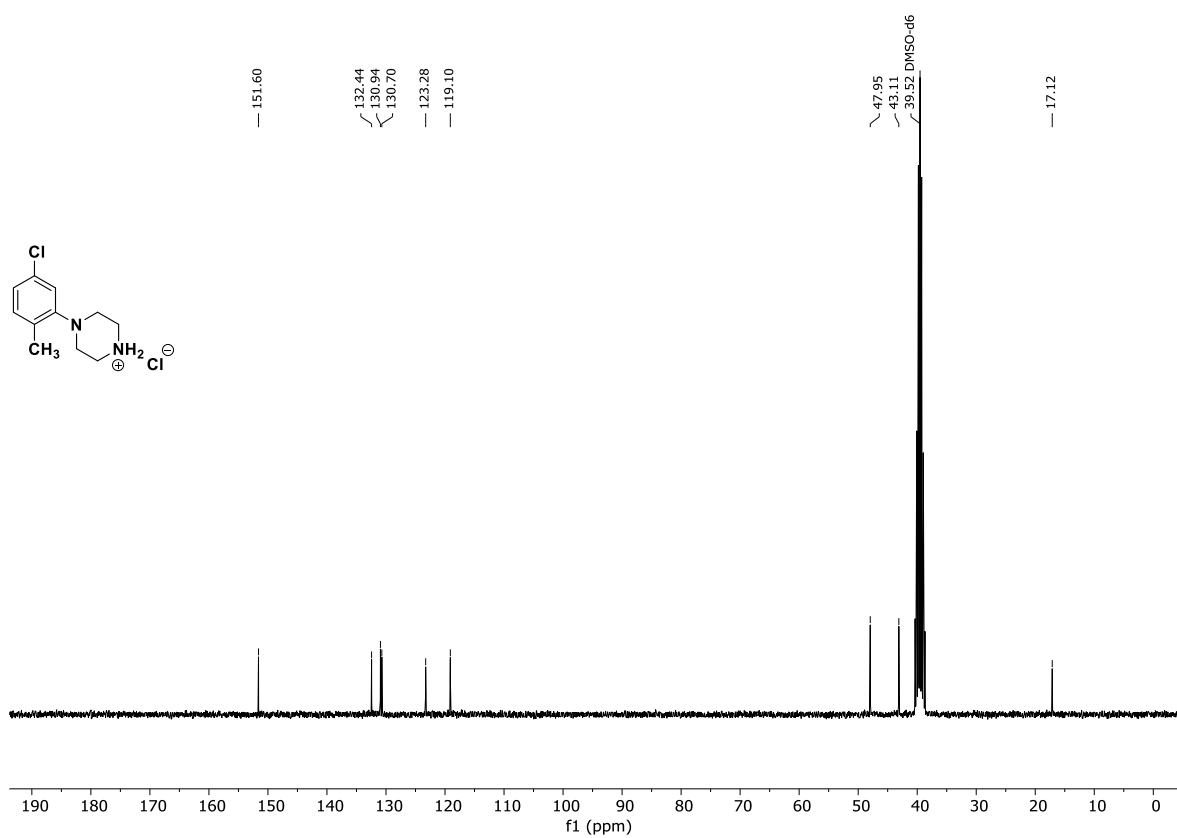


Abb. 12.126: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (75.5 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) von 1-(5-Chlor-2-methylphenyl)piperazin-Hydrochlorid (**93**).

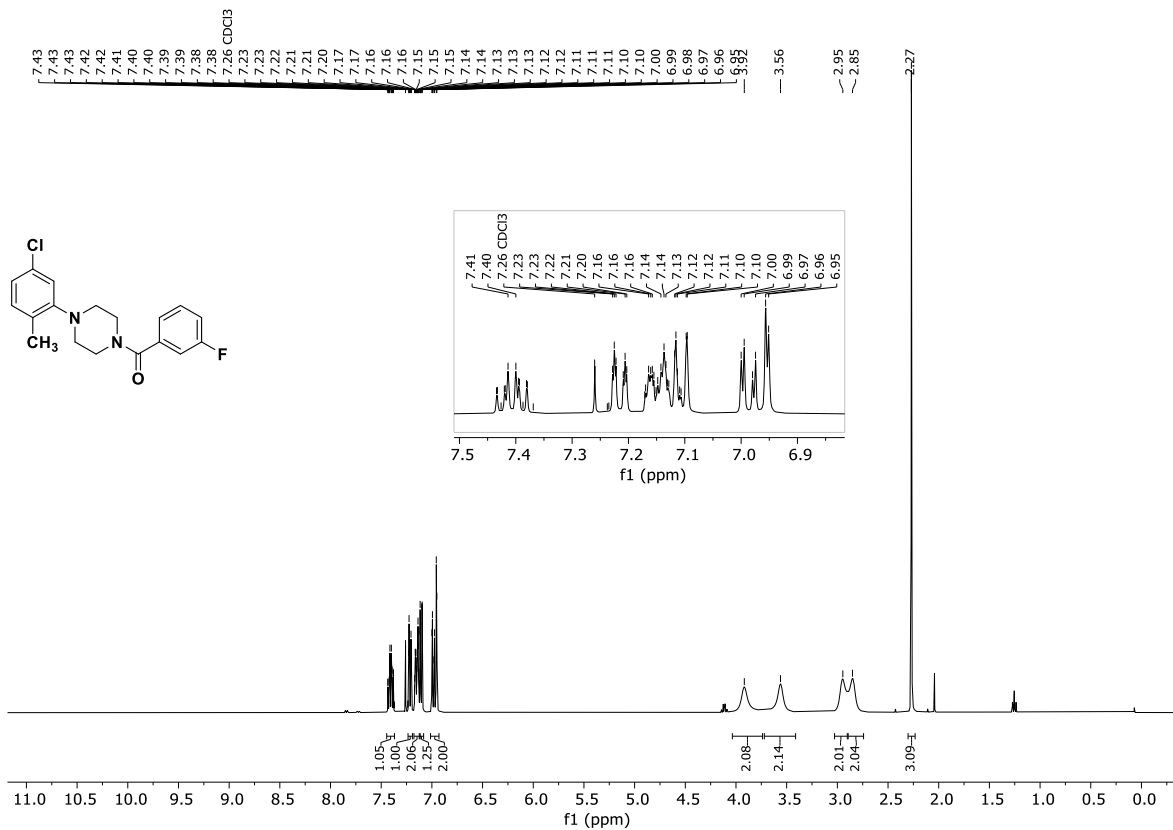


Abb. 12.127: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl₃) von 1-(3'-Fluorbenzoyl)-4-(5''-chlor-2''-methylphenyl)piperazin (82a).

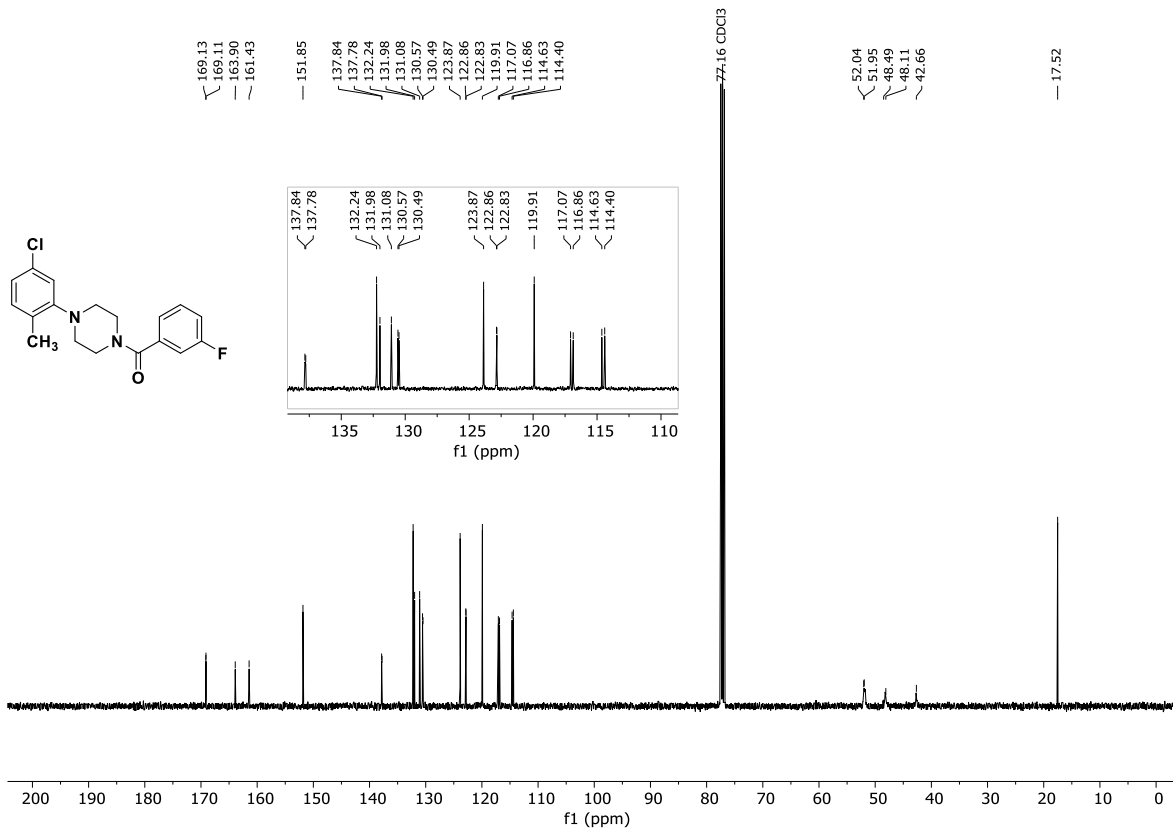


Abb. 12.128: ¹³C-NMR-Spektrum (100.6 MHz, CDCl₃) von 1-(3'-Fluorbenzoyl)-4-(5''-chlor-2''-methylphenyl)piperazin (82a).

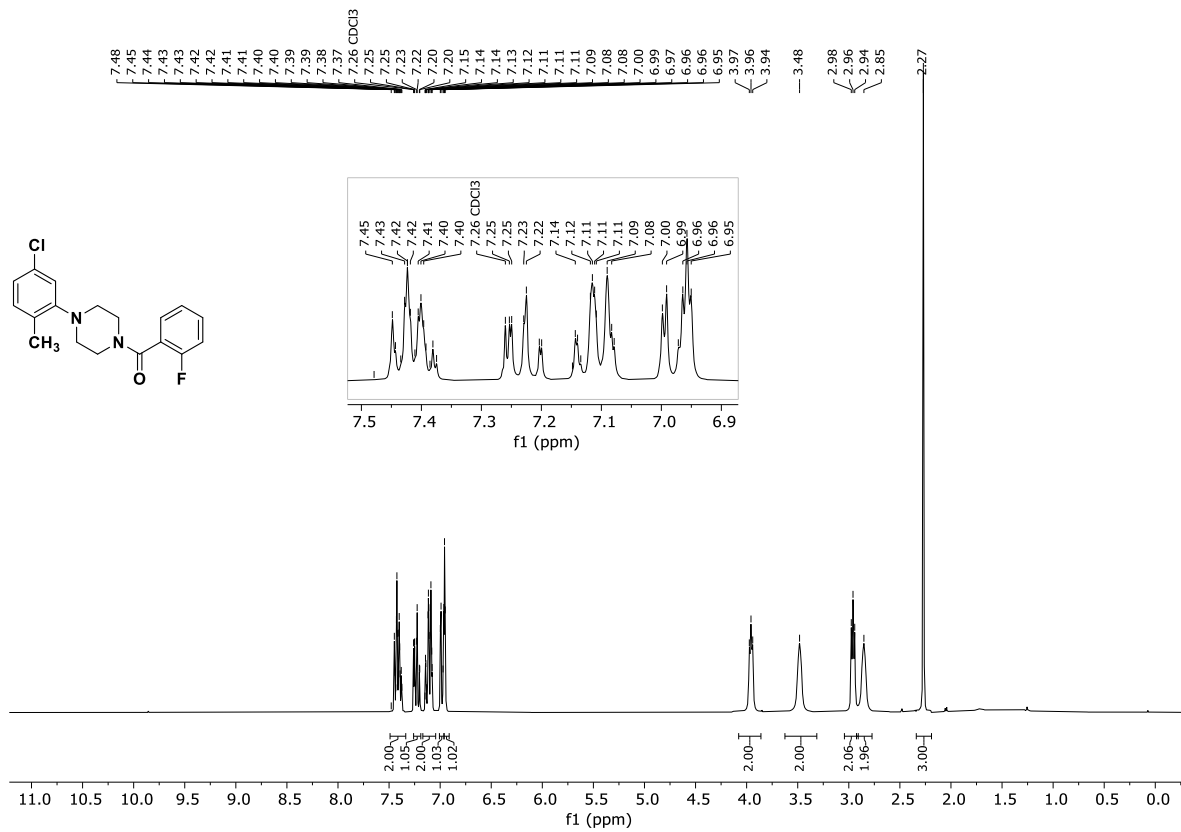


Abb. 12.129: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl₃) von 1-(2'-Fluorbenzoyl)-4-(5''-chlor-2''-methylphenyl)piperazin (82b).

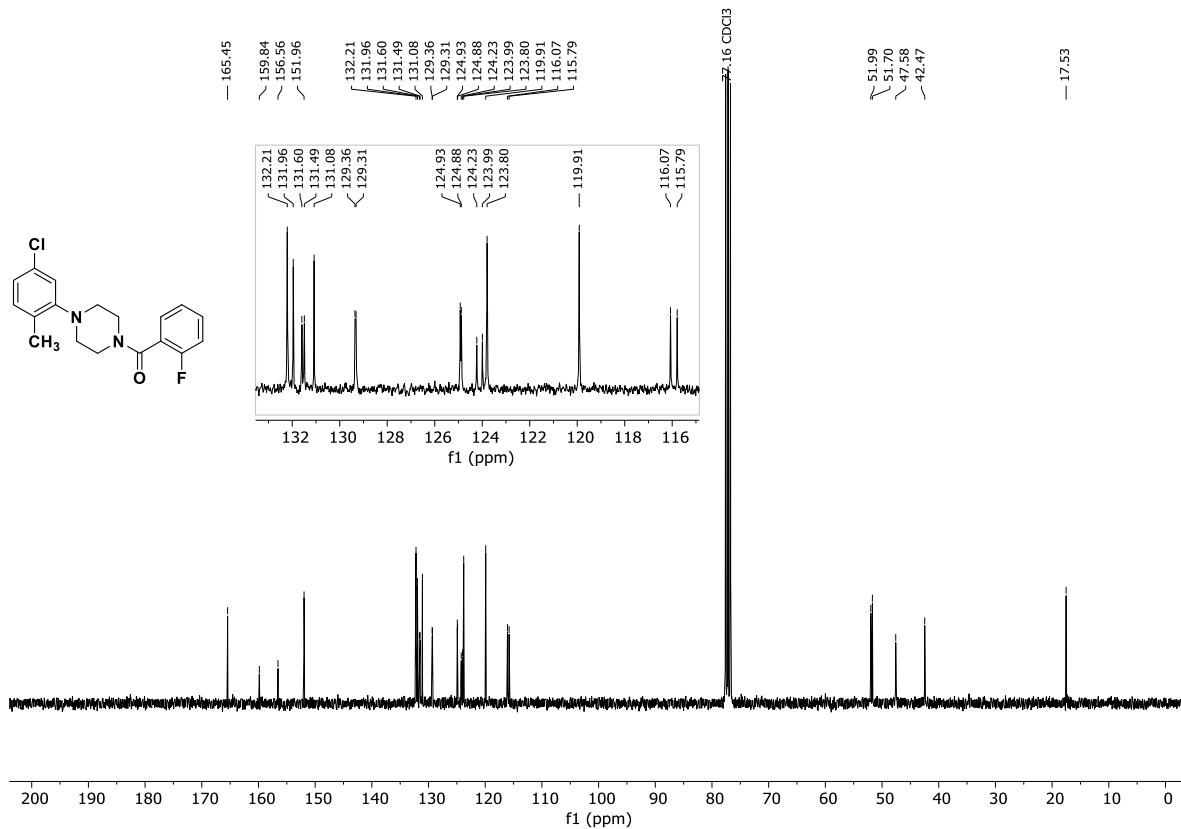


Abb. 12.130: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, CDCl₃) von 1-(2'-Fluorbenzoyl)-4-(5''-chlor-2''-methylphenyl)piperazin (82b).

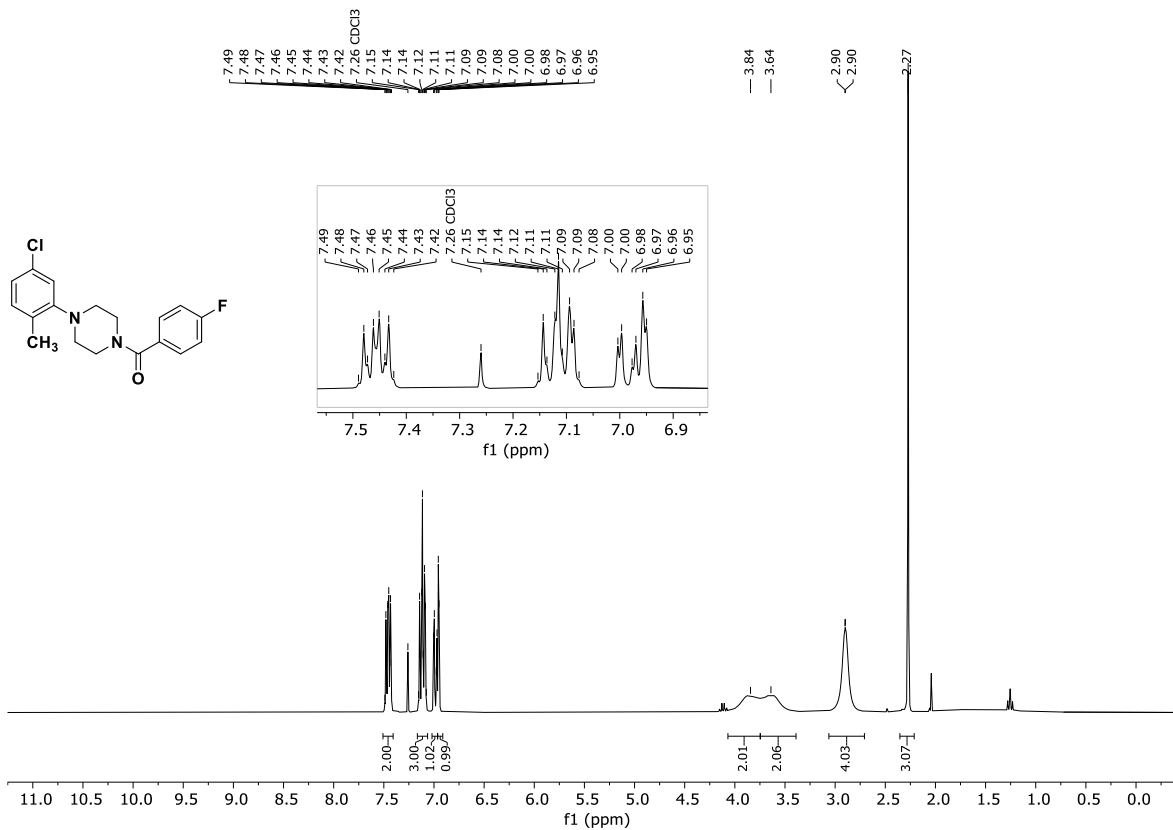


Abb. 12.131: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl₃) von 1-(4'-Fluorbenzoyl)-4-(5''-chlor-2''-methylphenyl)piperazin (82c).

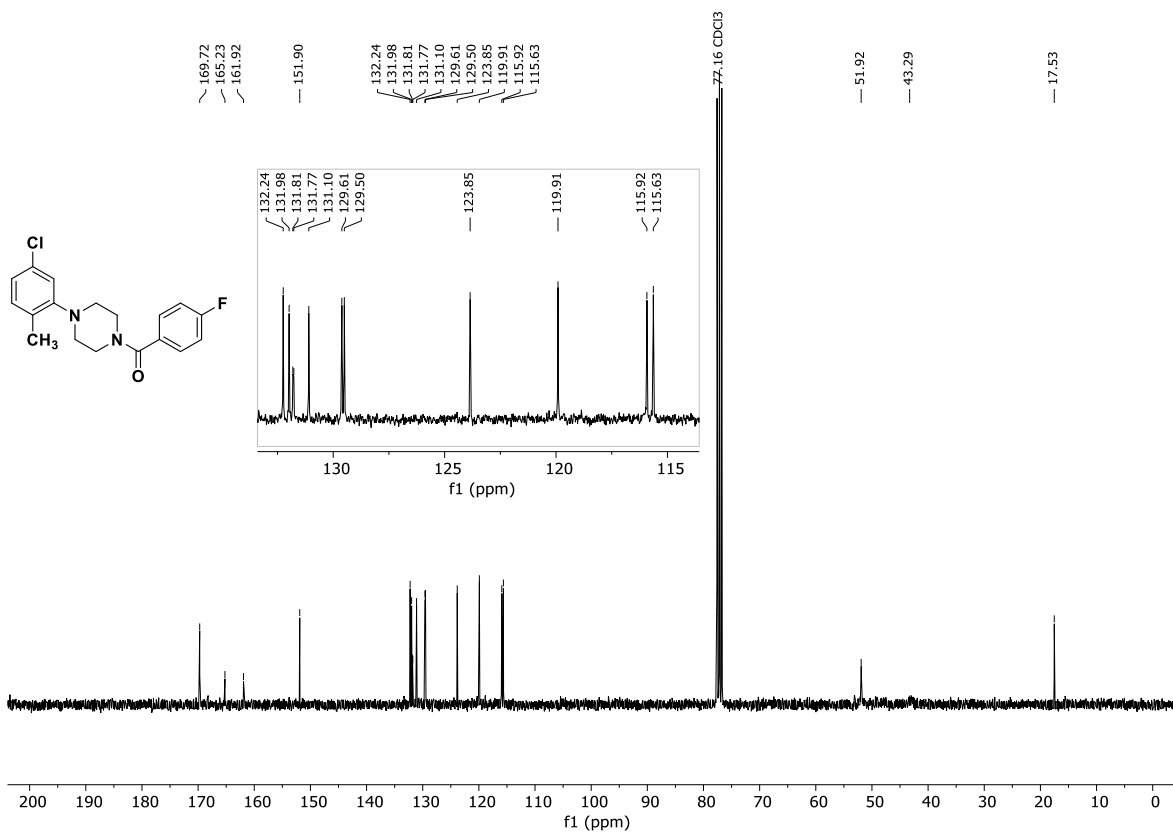


Abb. 12.132: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, CDCl₃) von 1-(4'-Fluorbenzoyl)-4-(5''-chlor-2''-methylphenyl)piperazin (82c).

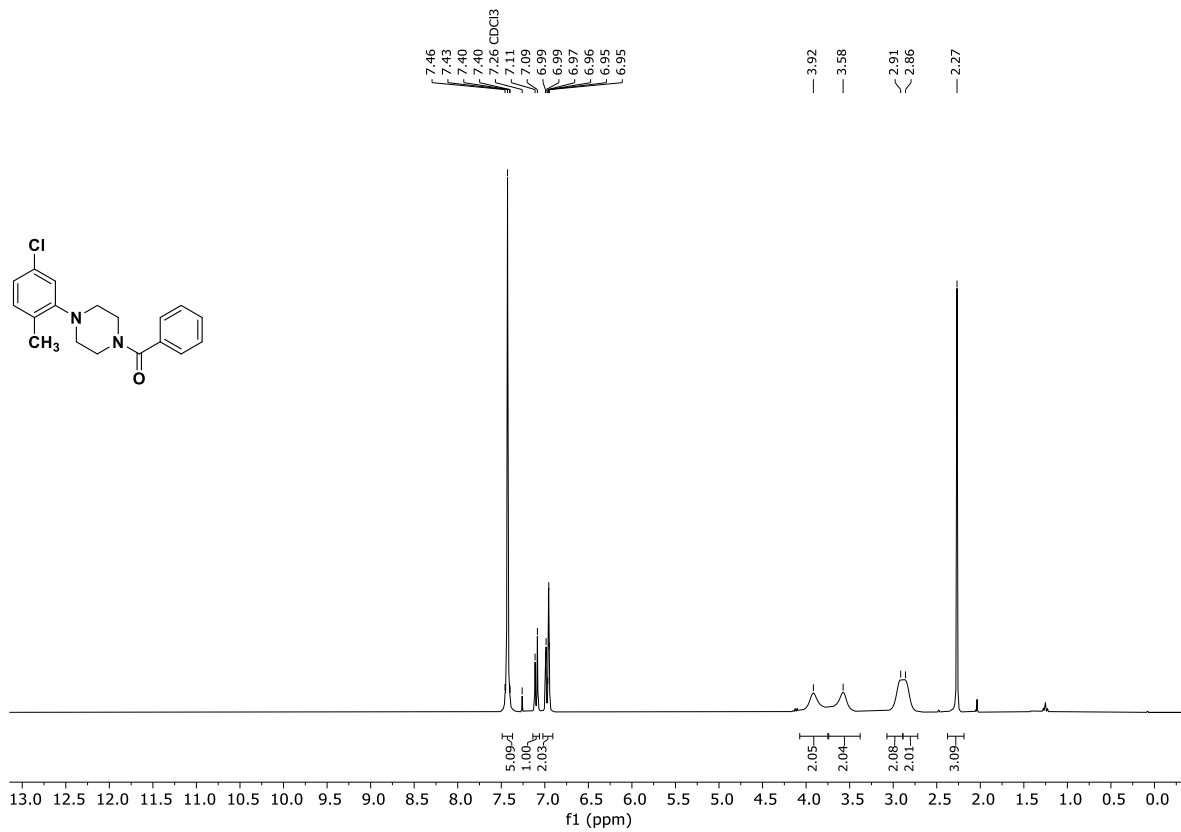


Abb. 12.133: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (300 MHz, CDCl_3) von 1-Benzoyl-4-(5''-chlor-2''-methylphenyl)piperazin (82d).

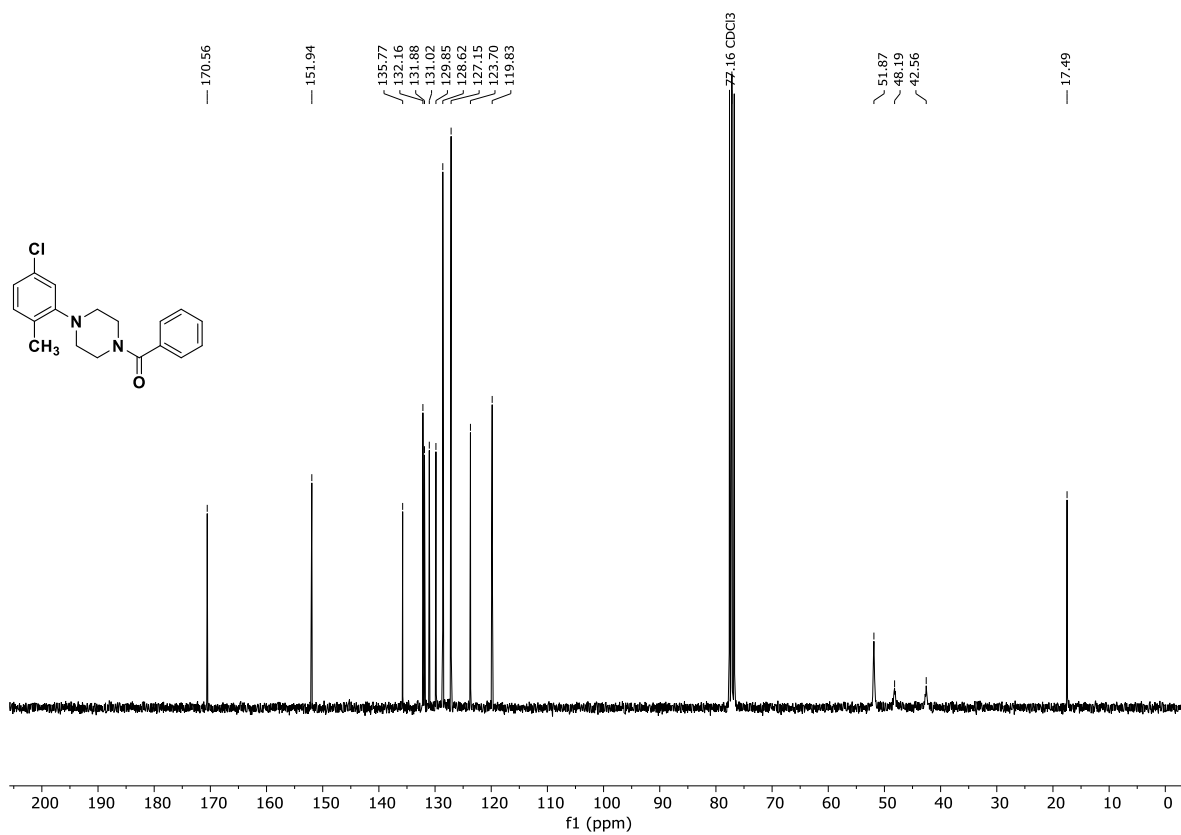


Abb. 12.134: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (75.5 MHz, CDCl_3) von 1-Benzoyl-4-(5''-chlor-2''-methylphenyl)piperazin (82d).

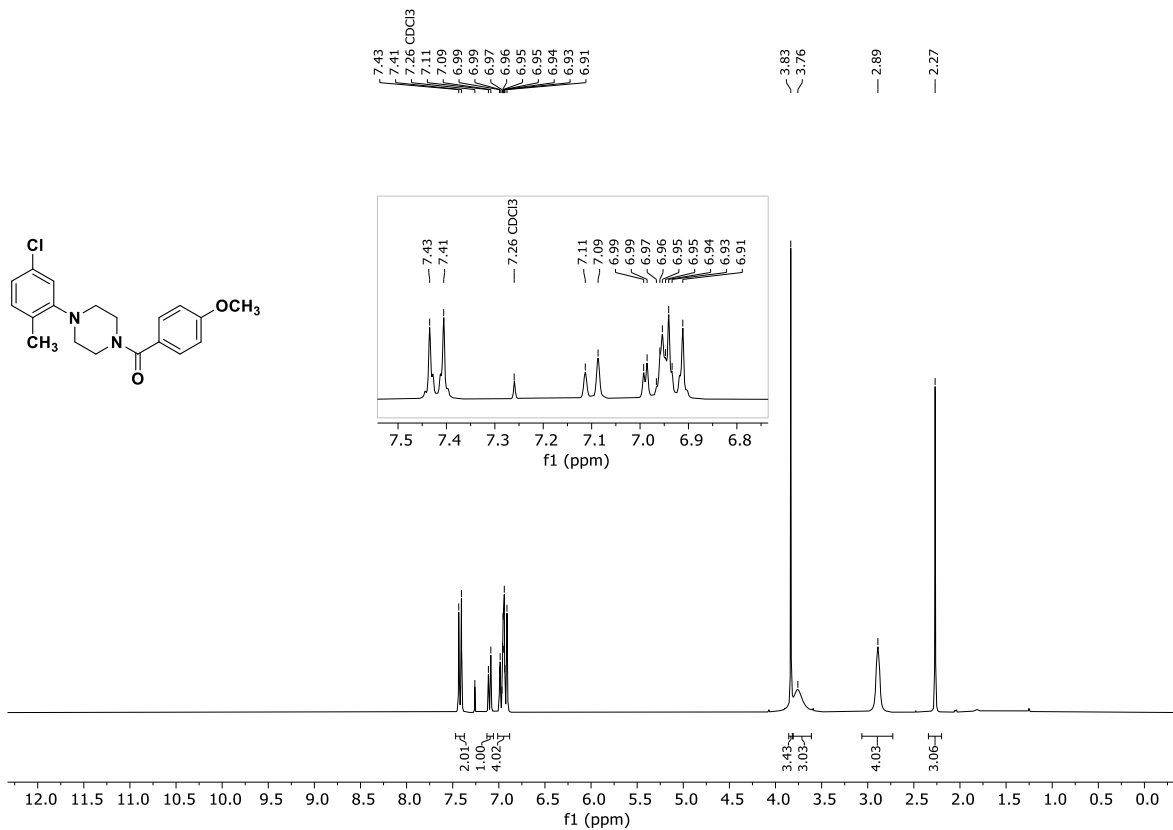


Abb. 12.135: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl₃) von 1-(4'-Methoxybenzoyl)-4-(5''-chloro-2''-methylphenyl)-piperazin (82e).

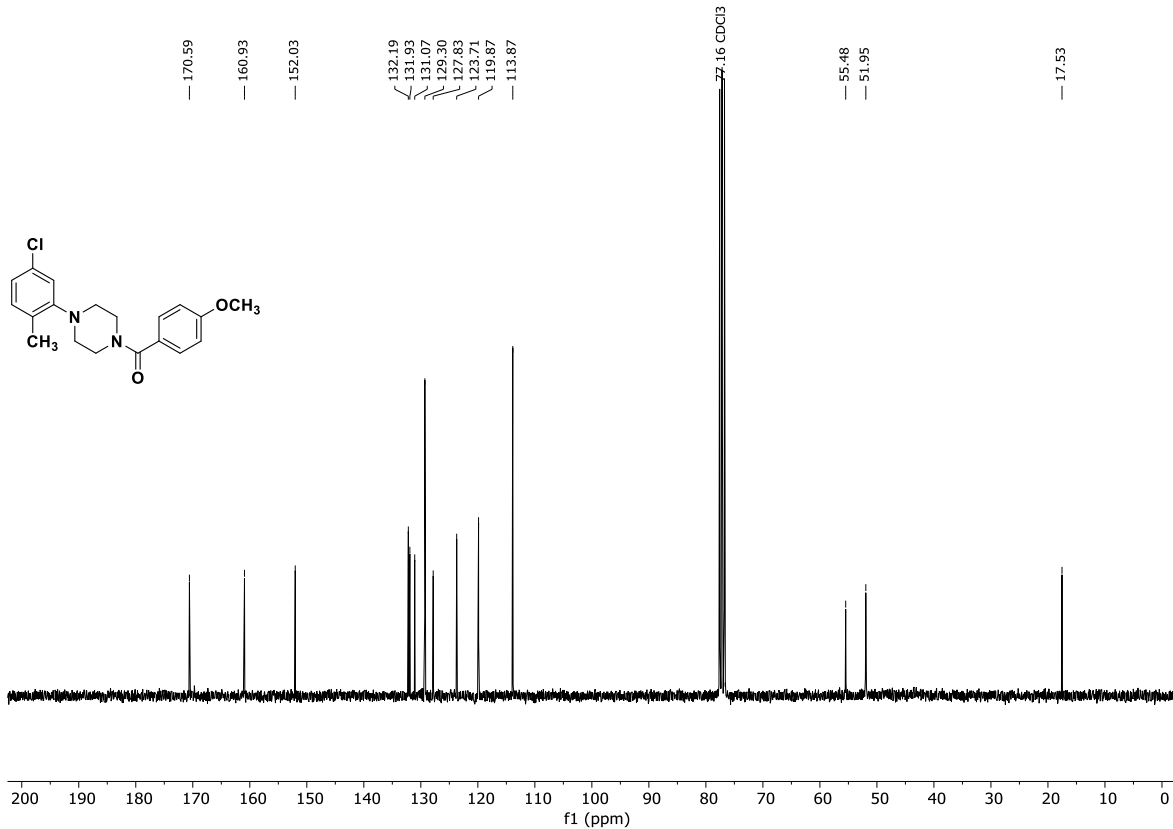


Abb. 12.136: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, CDCl₃) von 1-(4'-Methoxybenzoyl)-4-(5''-chloro-2''-methylphenyl)-piperazin (82e).

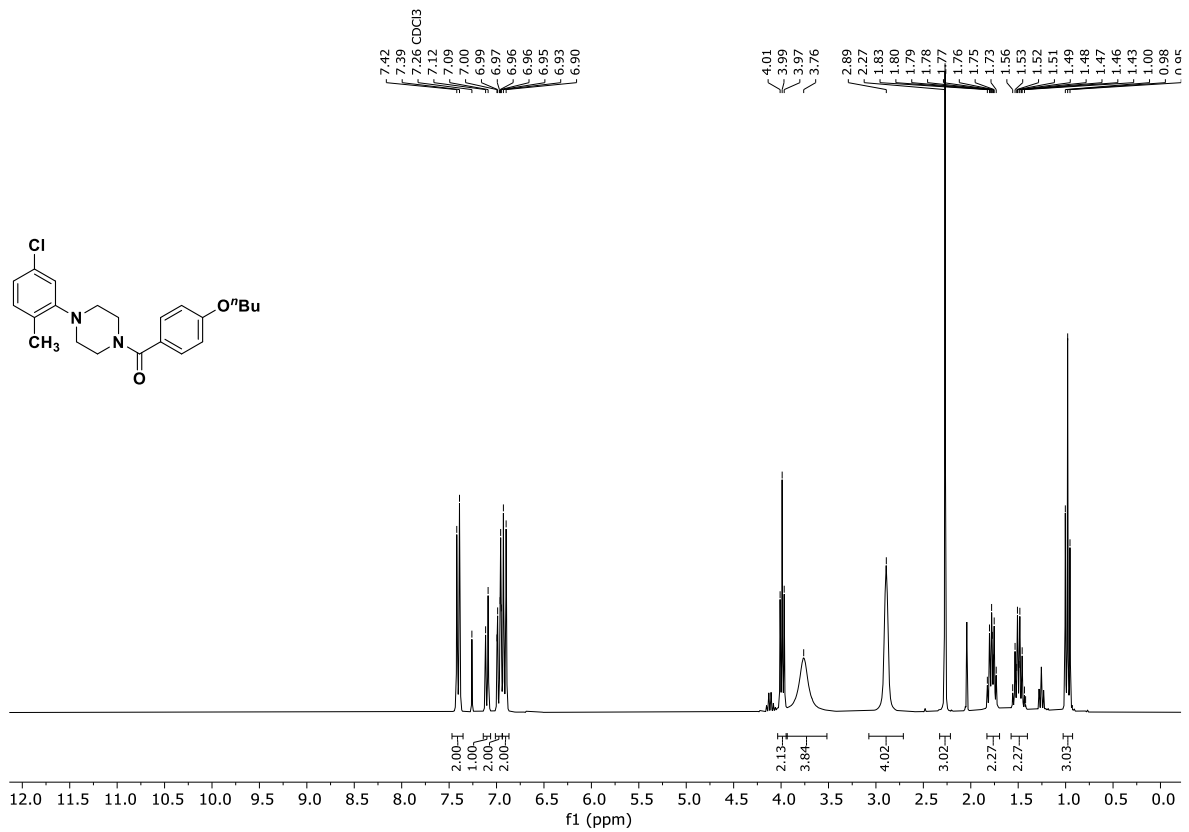


Abb. 12.137: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl₃) von 1-(4'-Butoxybenzoyl)-4-(5''-chlor-2''-methylphenyl)piperazin (82f).

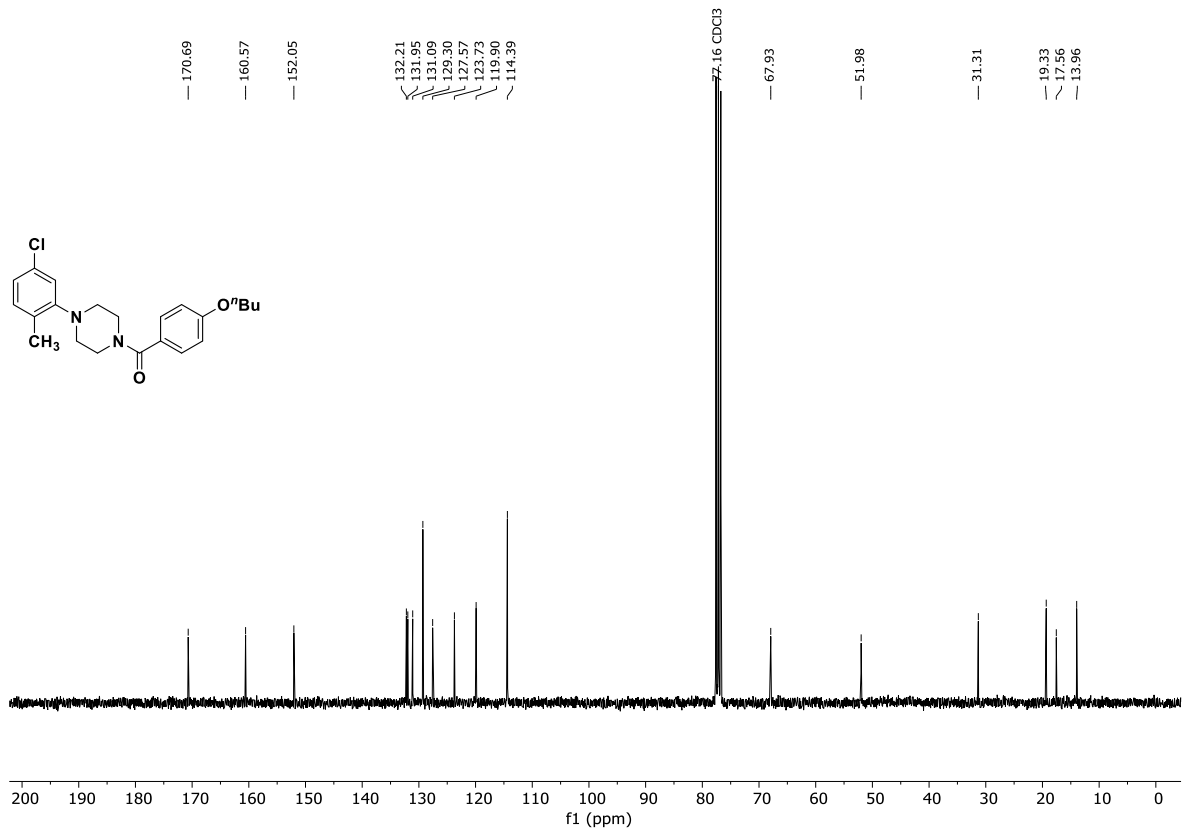


Abb. 12.138: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, CDCl₃) von 1-(4'-Butoxybenzoyl)-4-(5''-chlor-2''-methylphenyl)piperazin (82f).

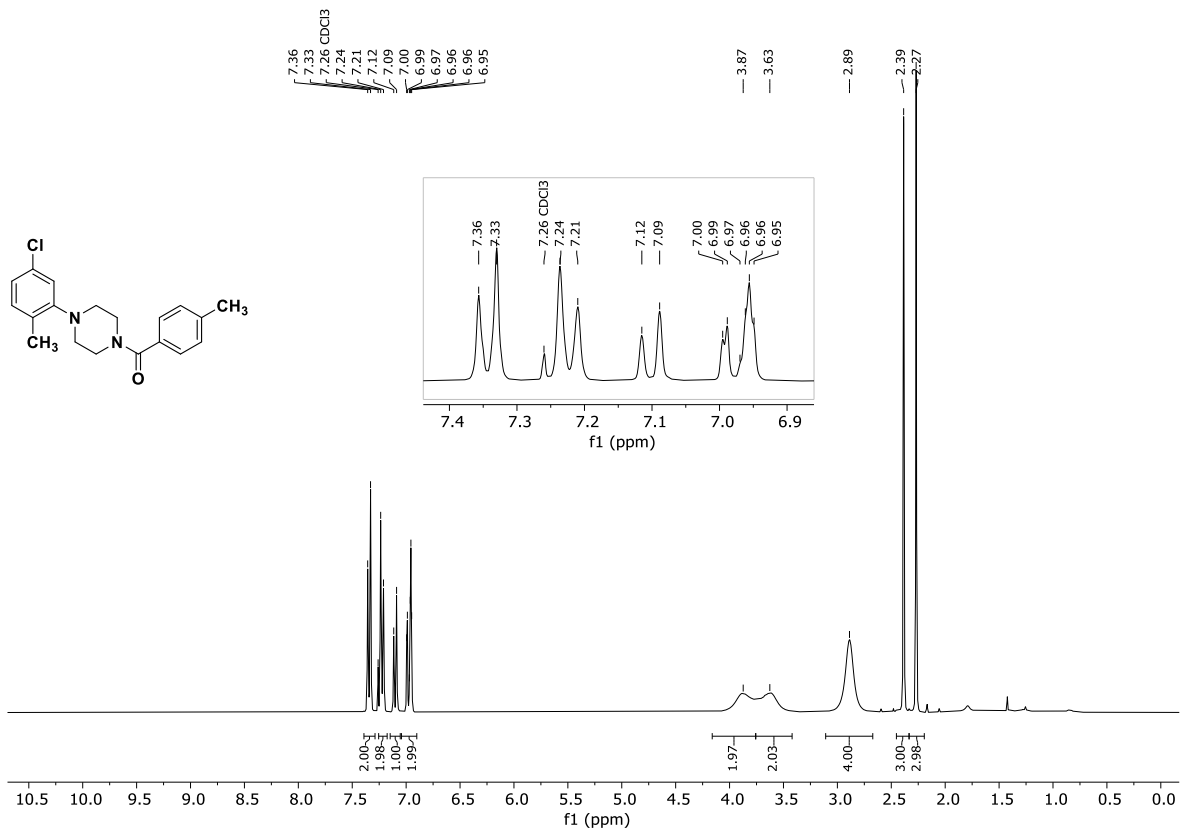


Abb. 12.139: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl₃) von 1-(4'-Methylbenzoyl)-4-(5''-chlor-2''-methylphenyl)piperazin (82g).

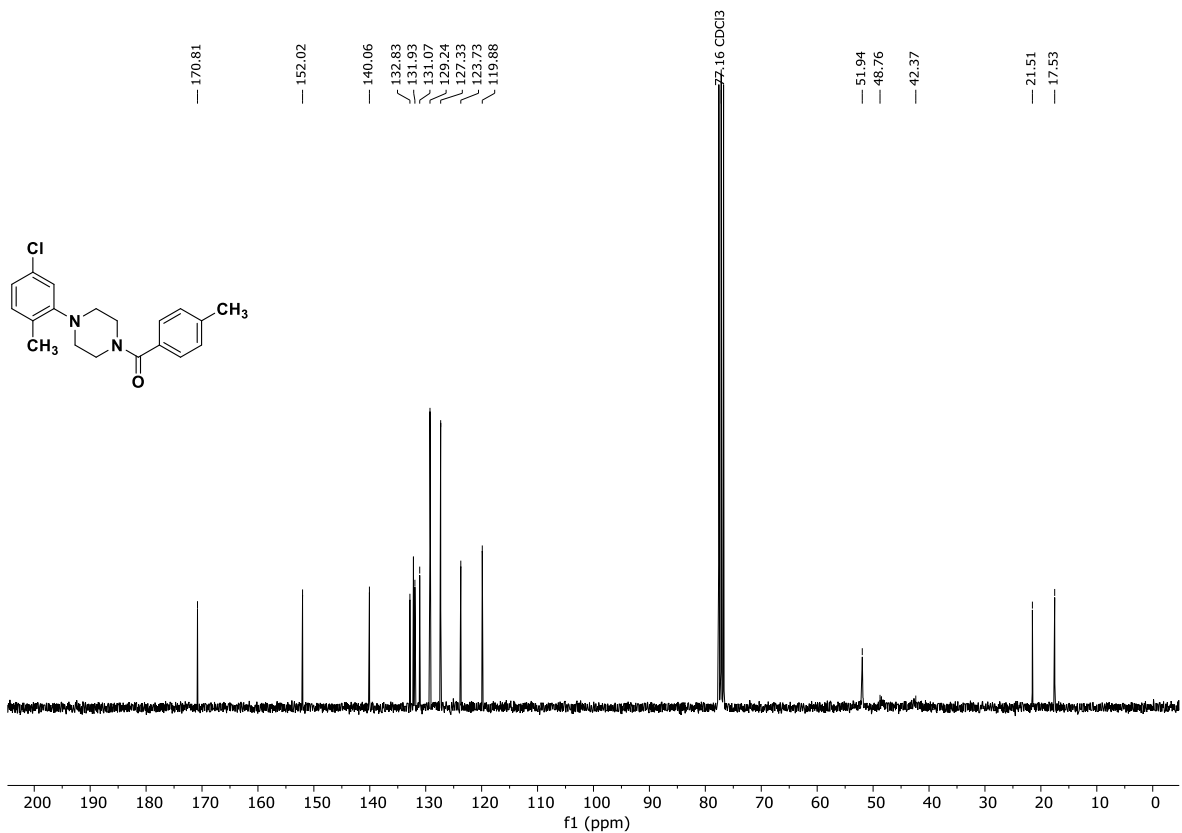


Abb. 12.140: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, CDCl₃) von 1-(4'-Methylbenzoyl)-4-(5''-chlor-2''-methylphenyl)piperazin (82g).

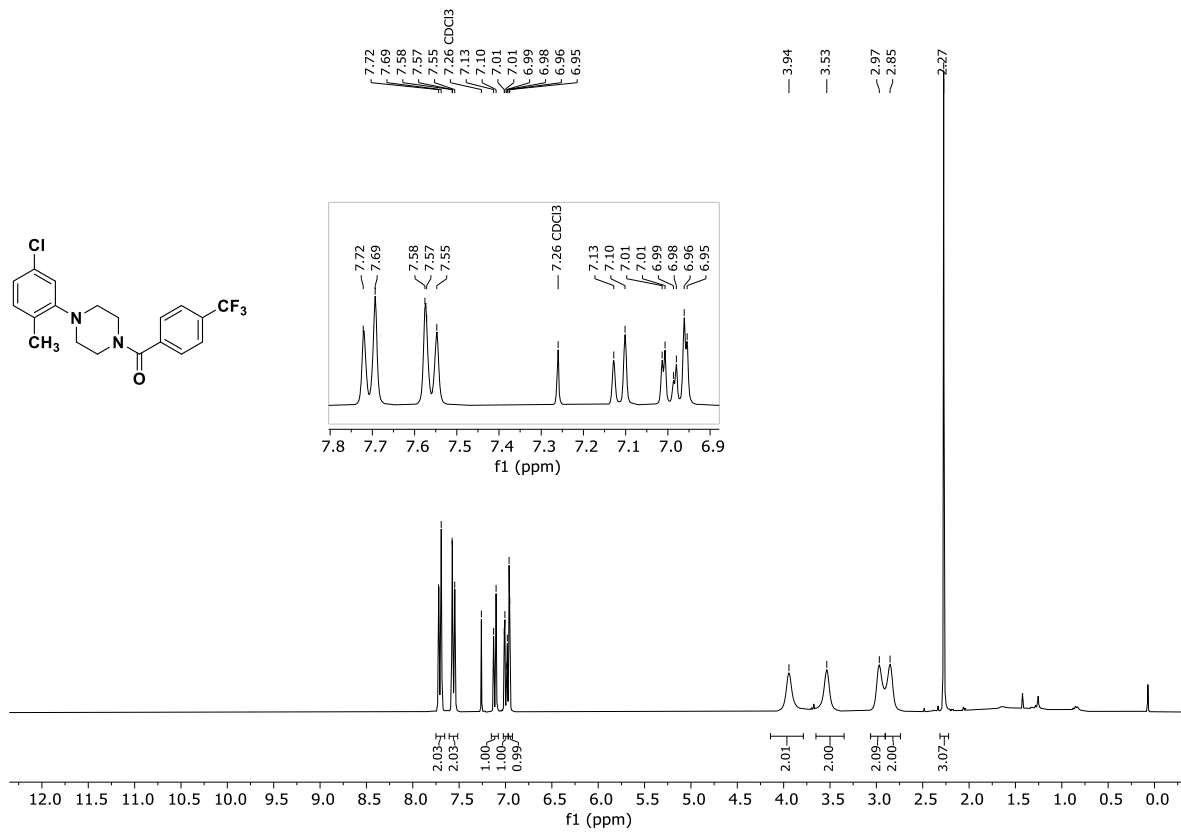


Abb. 12.141: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl₃) von 1-(4'-(Trifluormethyl)benzoyl)-4-(5''-chlor-2''-methylphenyl)-piperazin (**82h**).

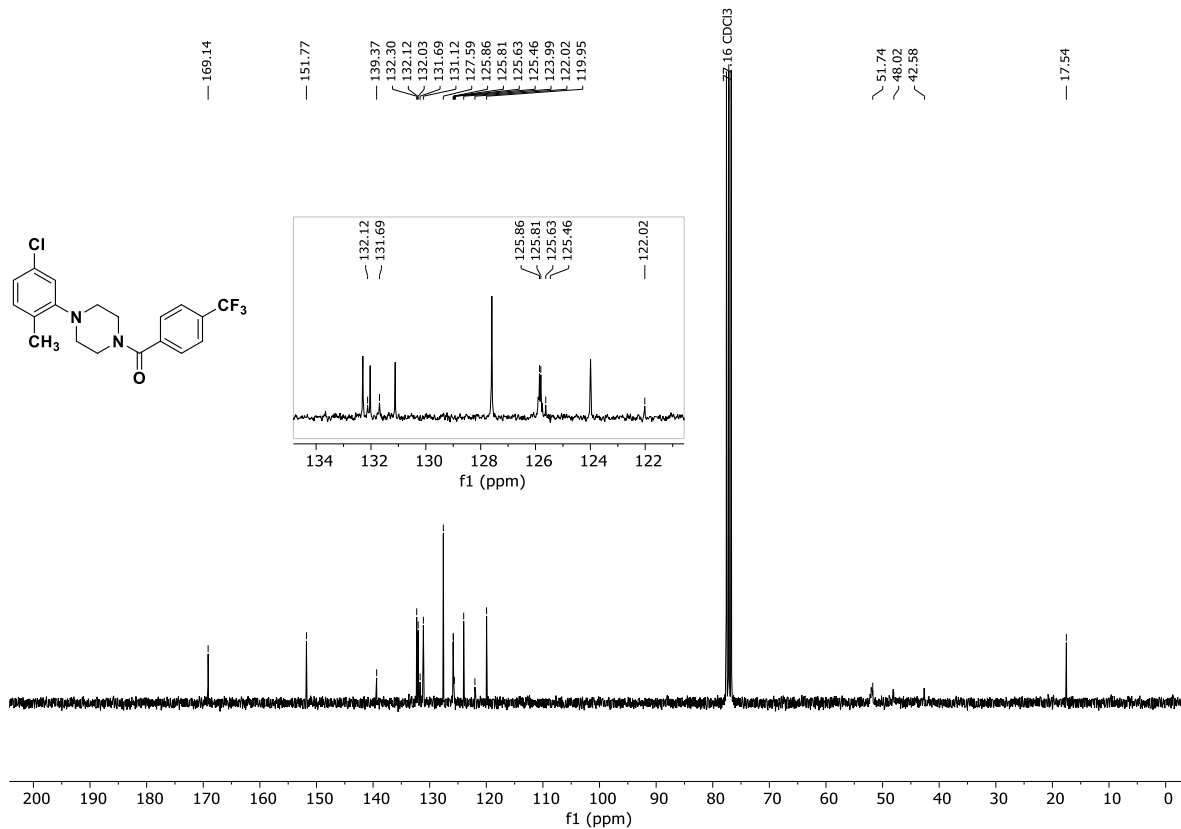


Abb. 12.142: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, CDCl₃) von 1-(4'-(Trifluormethyl)benzoyl)-4-(5''-chlor-2''-methylphenyl)-piperazin (**82h**).

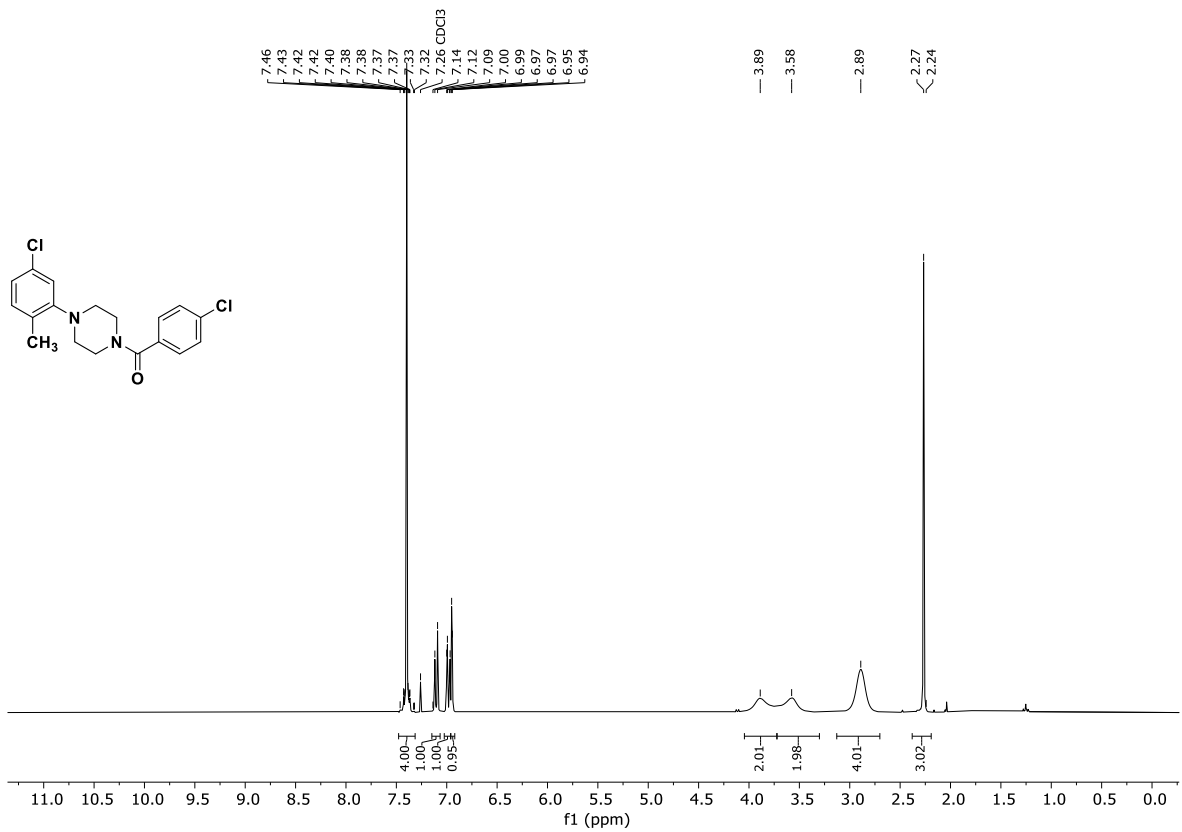


Abb. 12.143: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl₃) von 1-(4'-Chlorbenzoyl)-4-(5''-chlor-2''-methylphenyl)piperazin (82i).

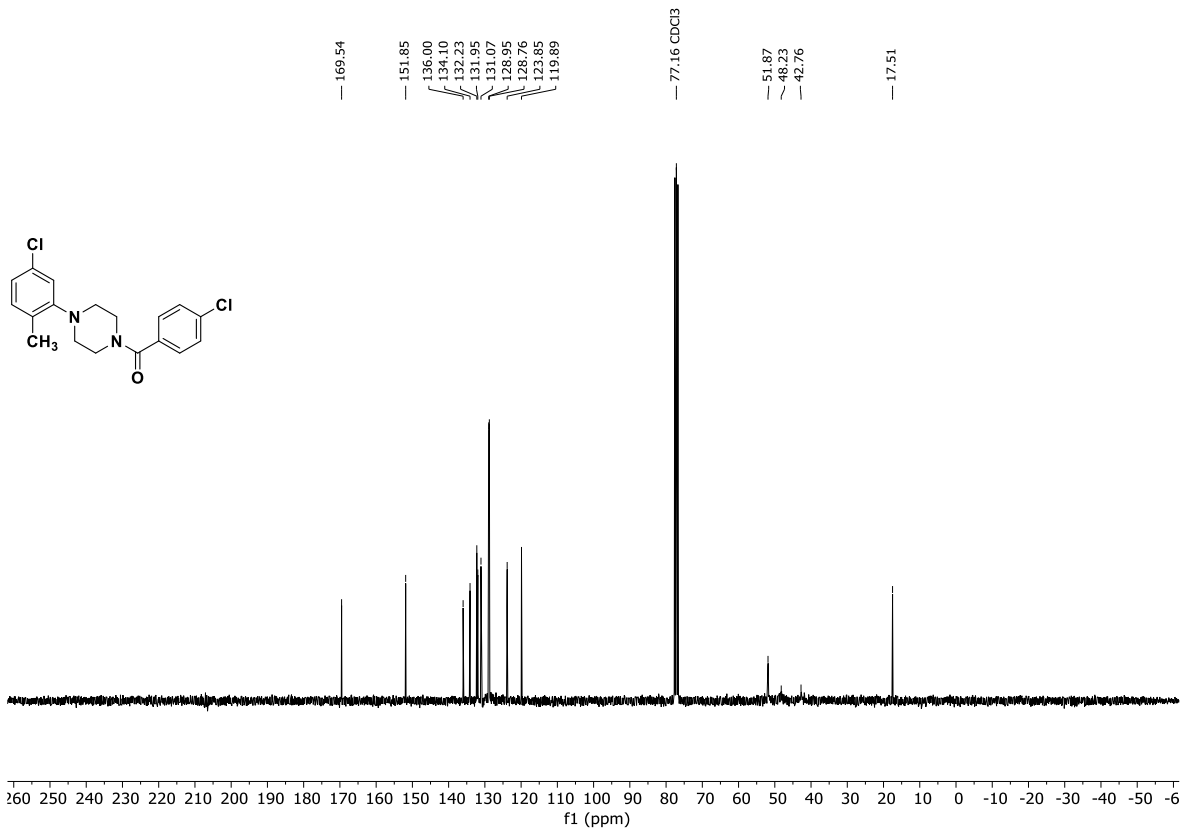


Abb. 12.144: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, CDCl₃) von 1-(4'-Chlorbenzoyl)-4-(5''-chlor-2''-methylphenyl)piperazin (82i).

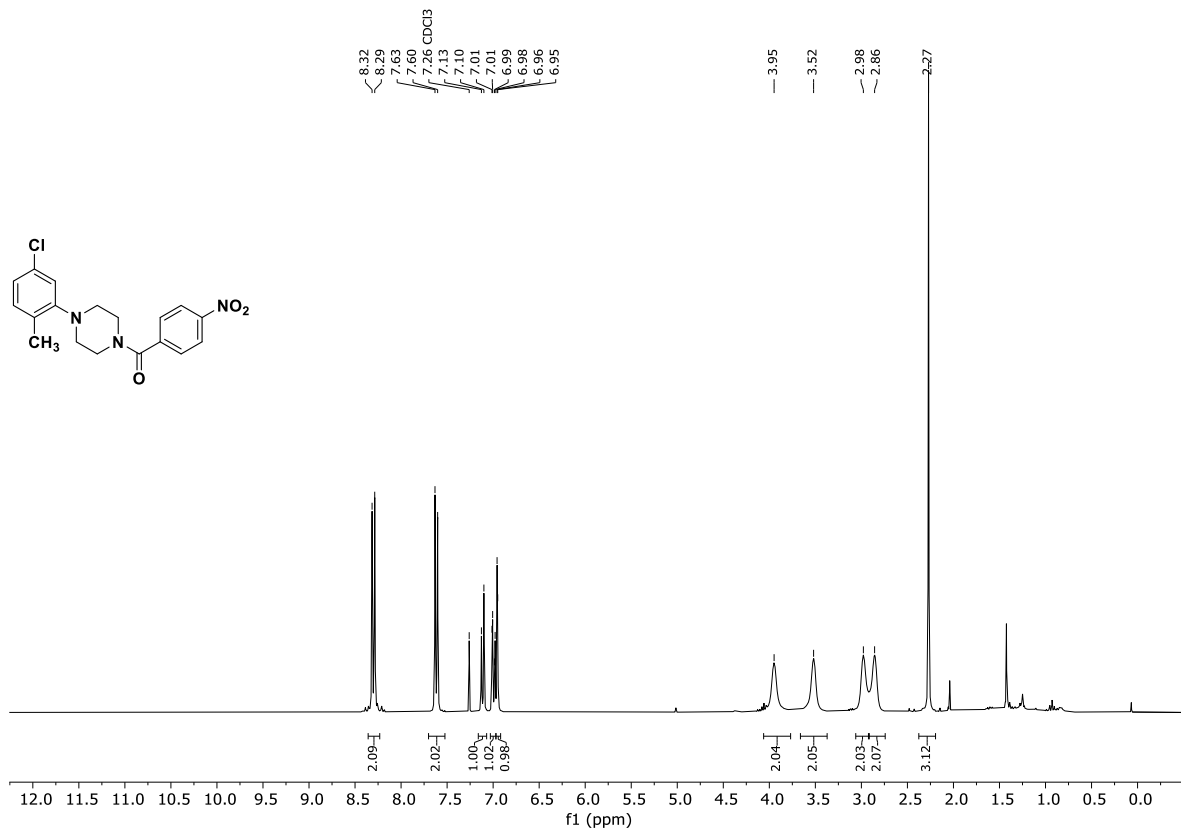


Abb. 12.145: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl₃) von 1-(4'-Nitrobenzoyl)-4-(5''-chlor-2''-methylphenyl)piperazin (82j).

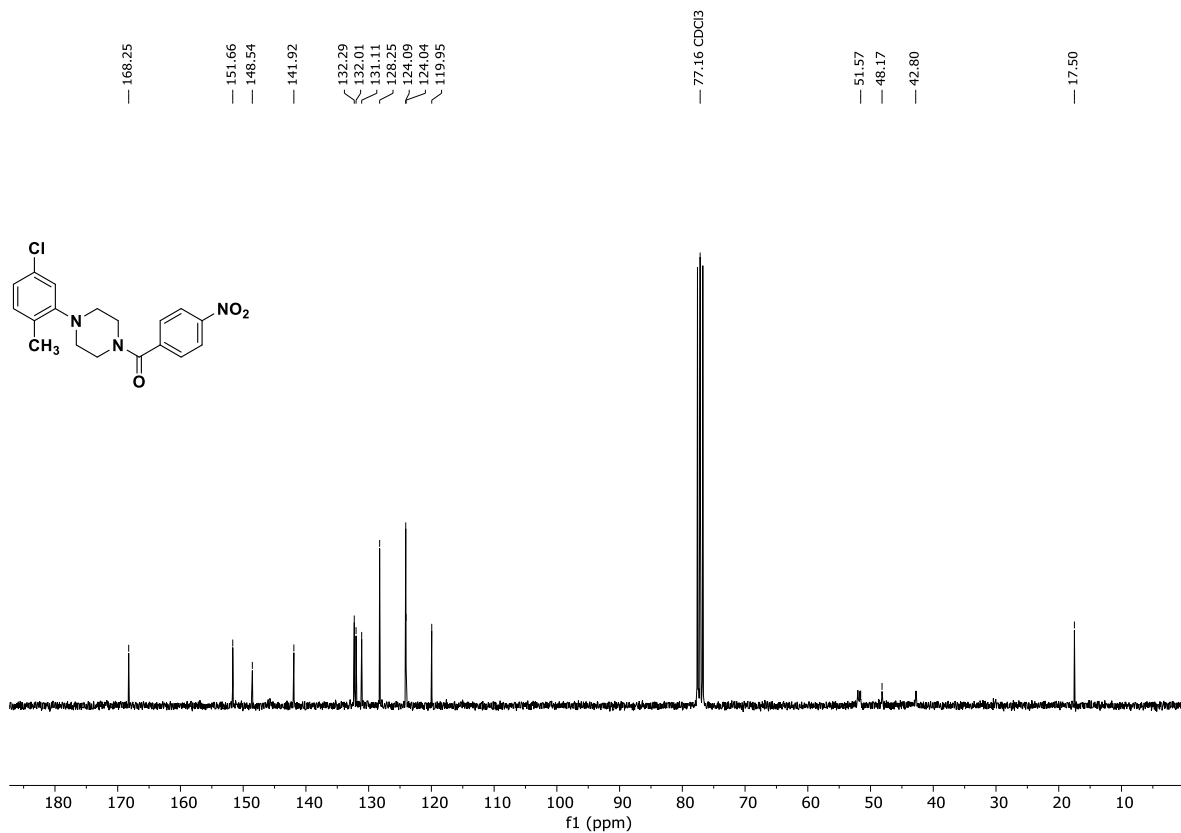


Abb. 12.146: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, CDCl₃) von 1-(4'-Nitrobenzoyl)-4-(5''-chlor-2''-methylphenyl)piperazin (82j).

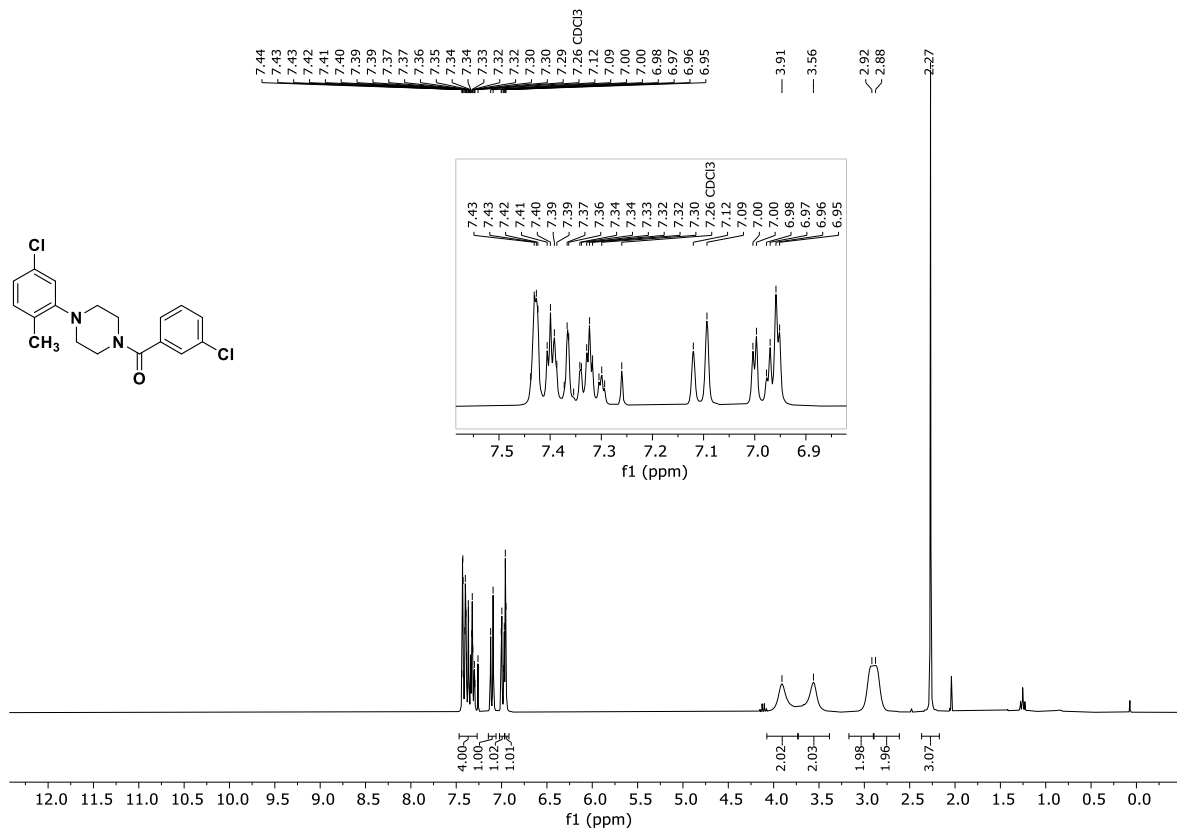


Abb. 12.149: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl₃) von 1-(3'-Chlorbenzoyl)-4-(5''-chlor-2''-methylphenyl)piperazin (821).

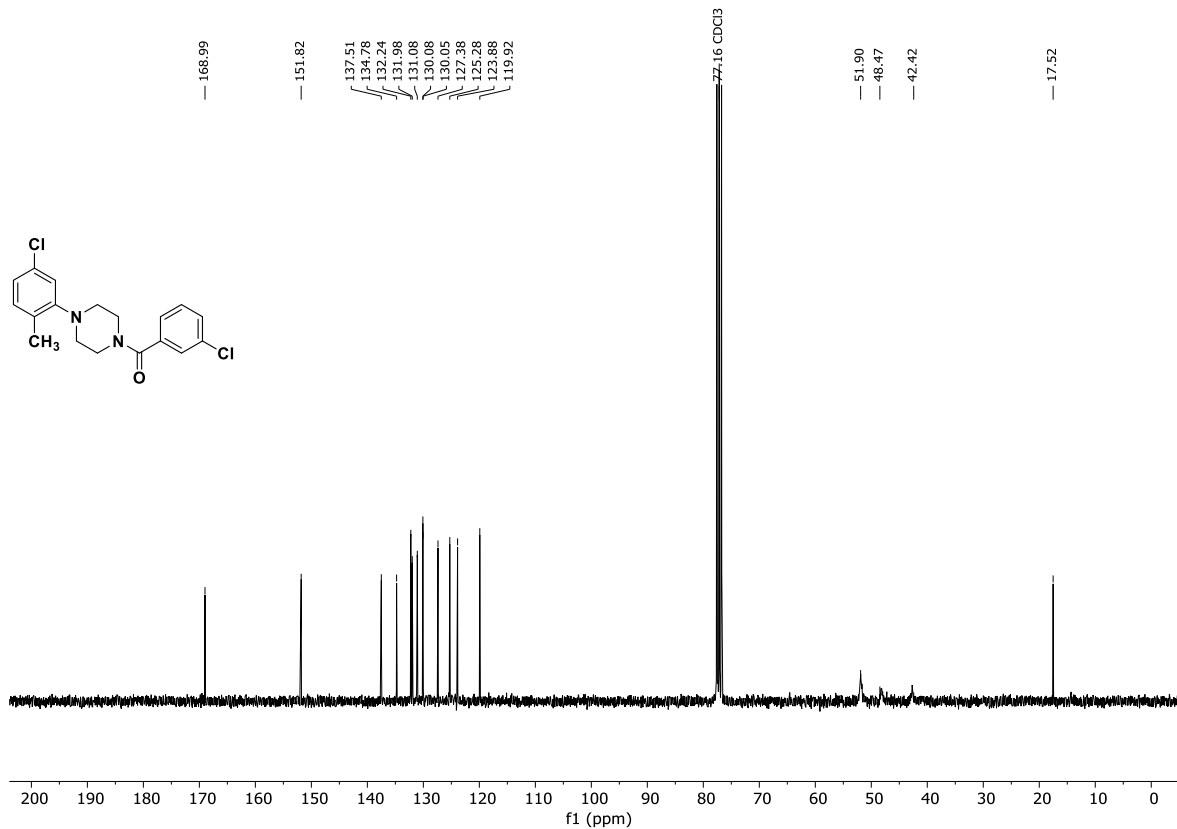


Abb. 12.150: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, CDCl₃) von 1-(3'-Chlorbenzoyl)-4-(5''-chlor-2''-methylphenyl)piperazin (821).

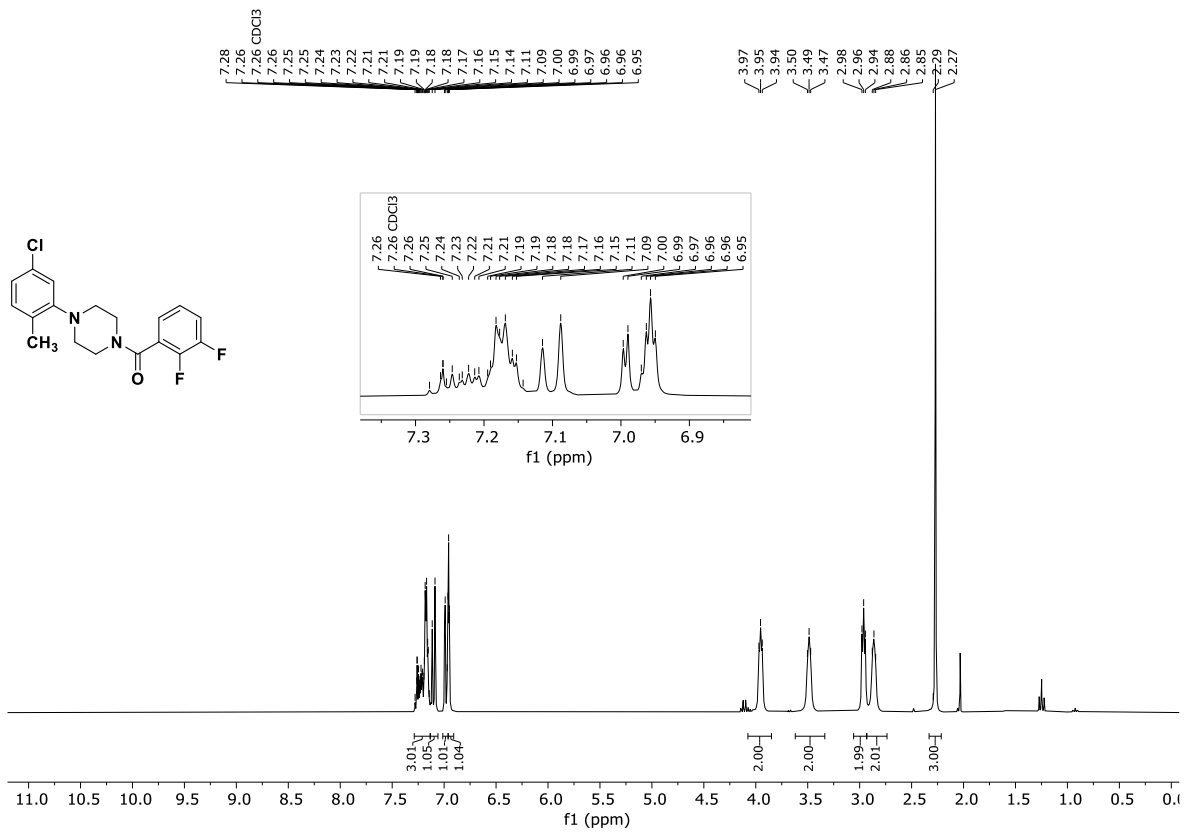


Abb. 12.151: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl₃) von 1-(2',3'-Difluorbenzoyl)-4-(5''-chlor-2''-methylphenyl)-piperazin (**82m**).

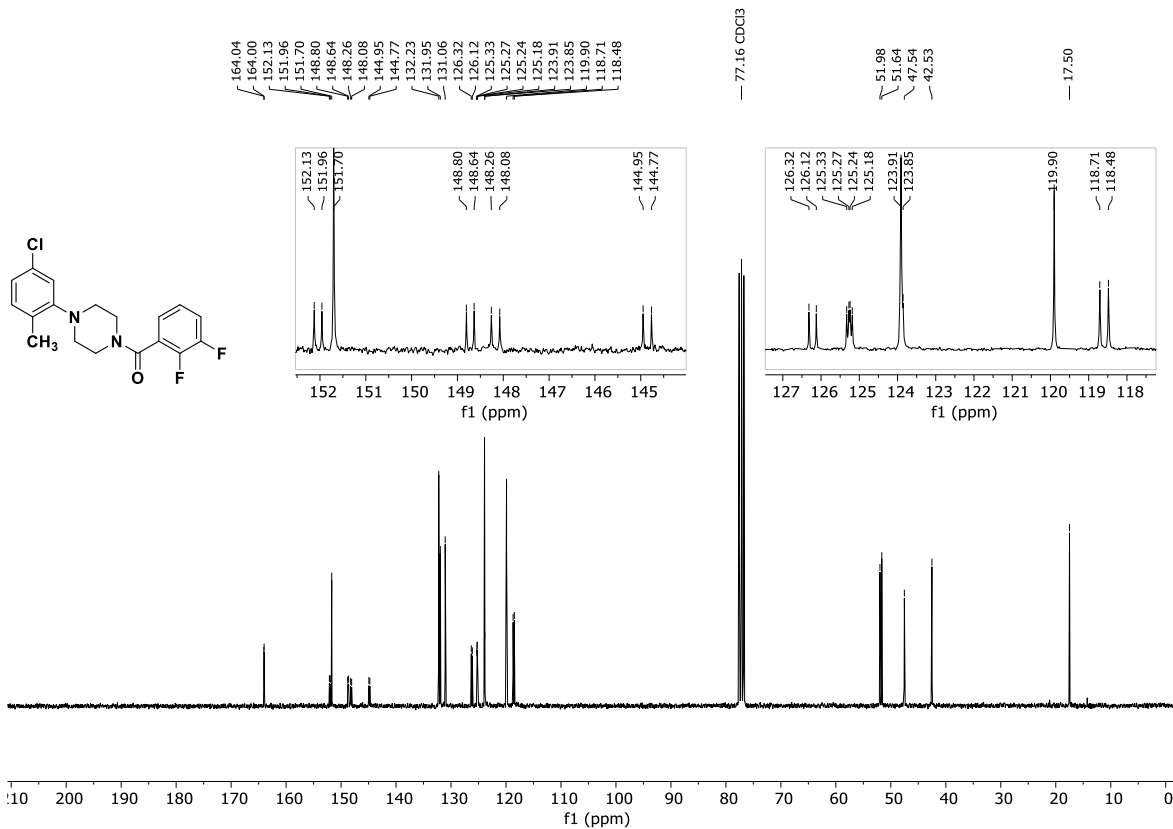


Abb. 12.152: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, CDCl₃) von 1-(2',3'-Difluorbenzoyl)-4-(5''-chlor-2''-methylphenyl)-piperazin (**82m**).

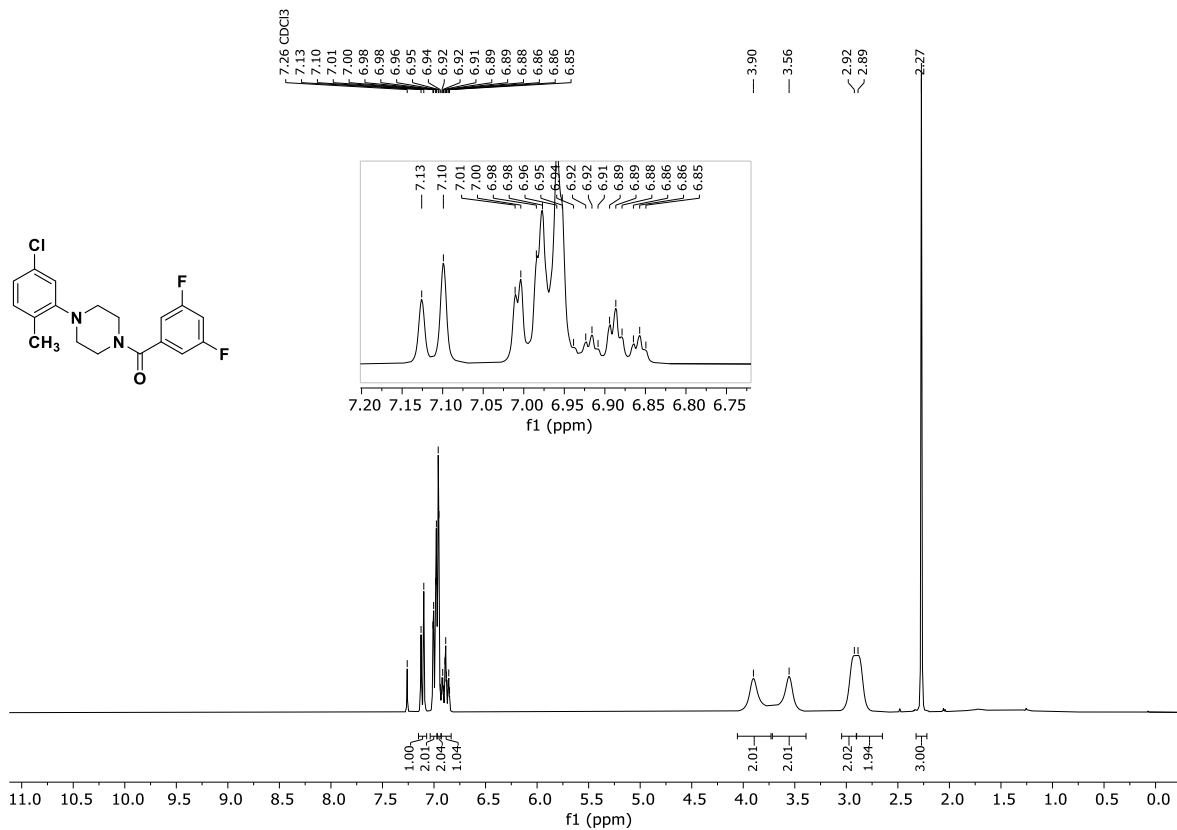


Abb. 12.153: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl₃) von 1-(3',5'-Difluorbenzoyl)-4-(5''-chlor-2''-methylphenyl)-piperazin (**82n**).

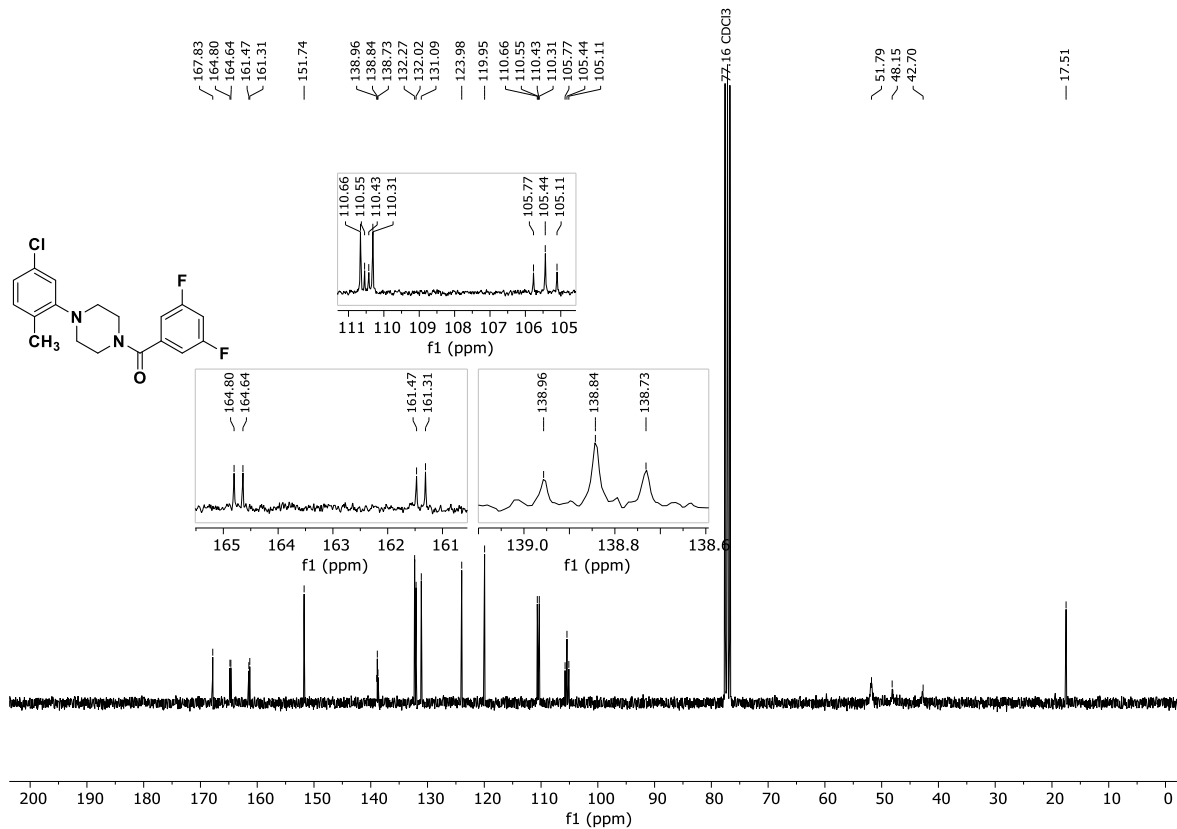


Abb. 12.154: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, CDCl₃) von 1-(3',5'-Difluorbenzoyl)-4-(5''-chlor-2''-methylphenyl)-piperazin (**82n**).

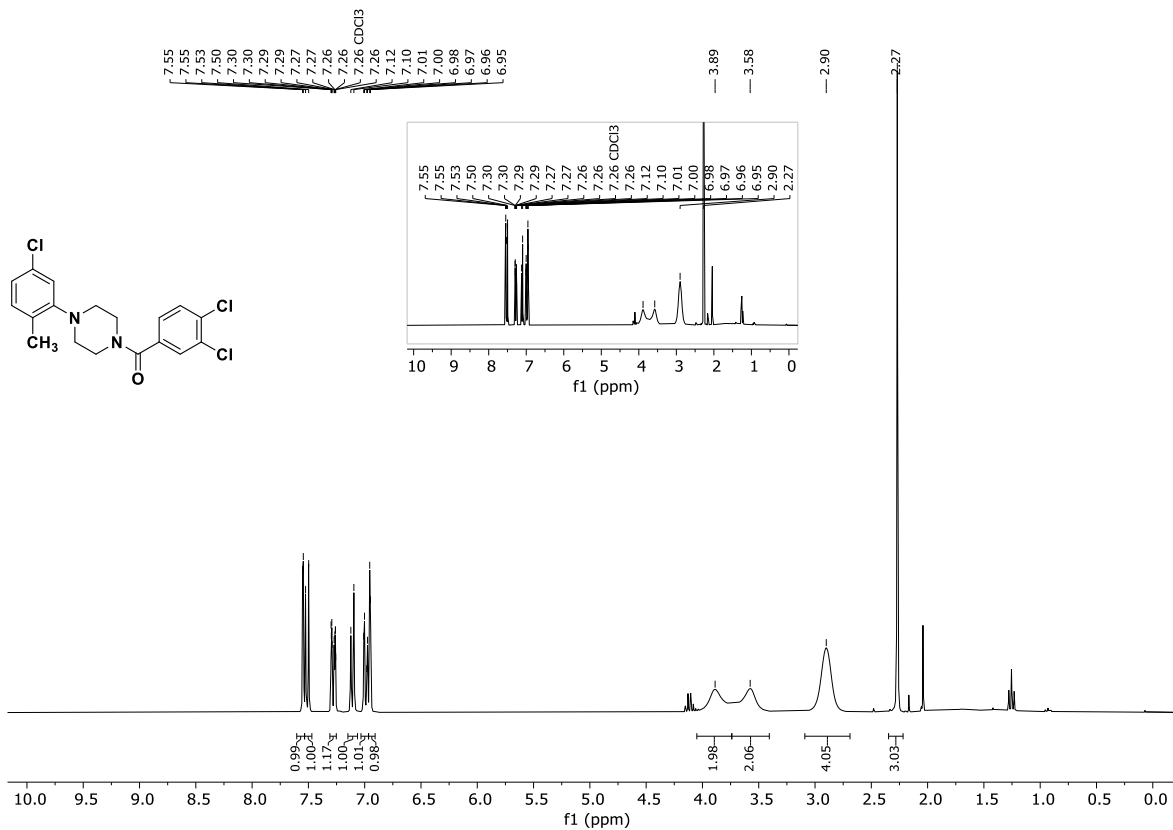


Abb. 12.155: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl₃) von 1-(3',4'-Dichlorbenzoyl)-4-(5''-chlor-2''-methylphenyl)-piperazin (82o).

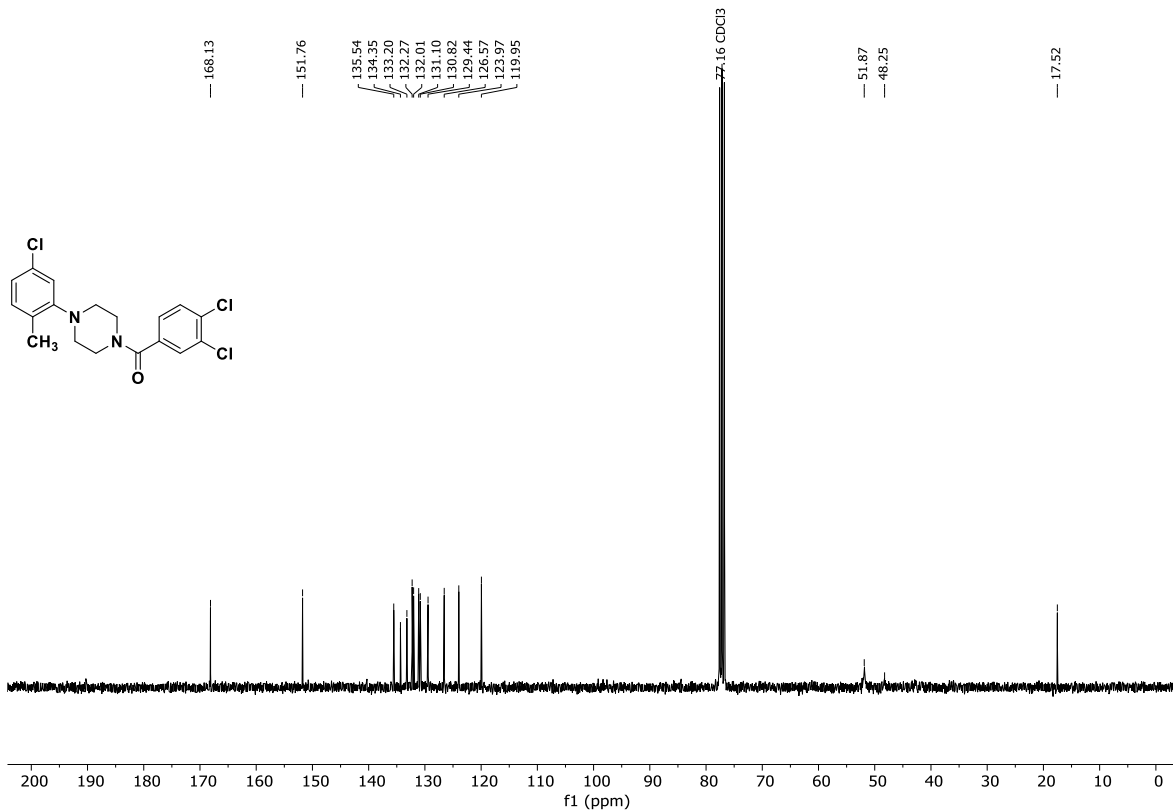


Abb. 12.156: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, CDCl₃) von 1-(3',4'-Dichlorbenzoyl)-4-(5''-chlor-2''-methylphenyl)-piperazin (82o).

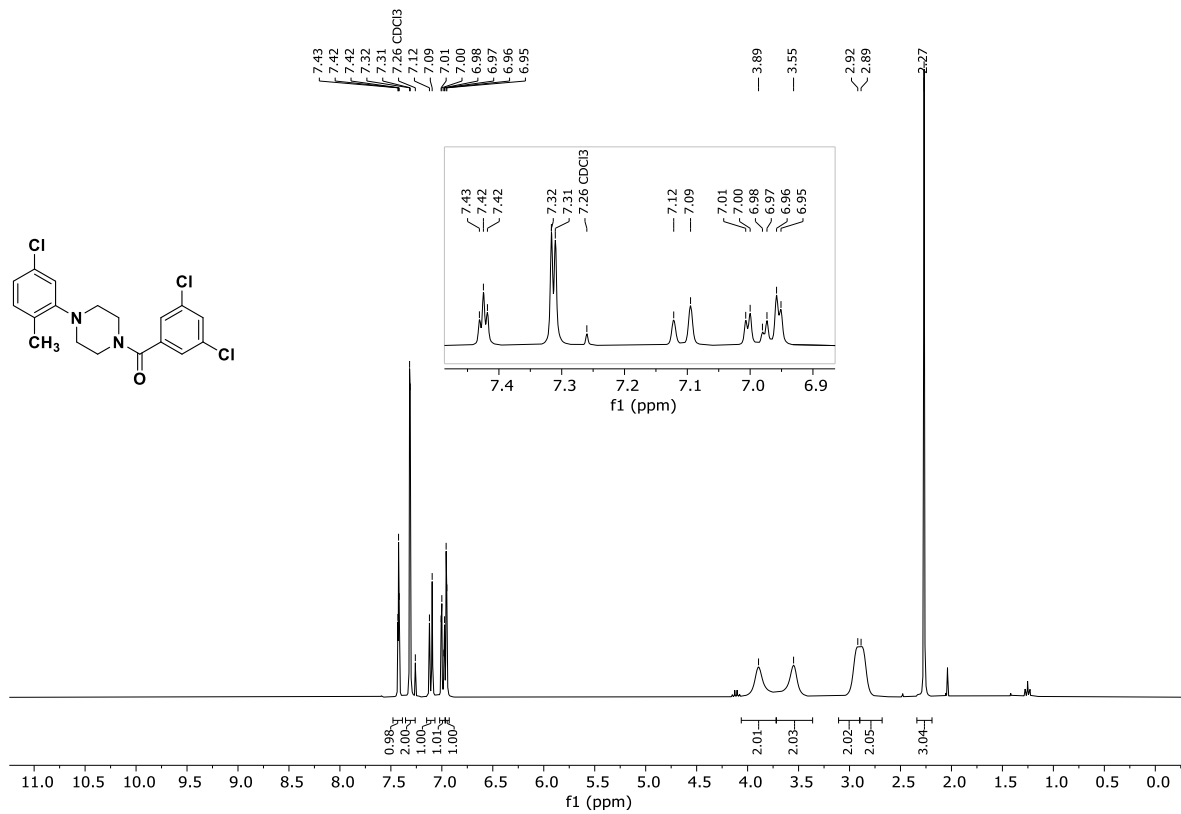


Abb. 12.157: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl₃) von 1-(3',5'-Dichlorobenzoyl)-4-(5''-chlor-2''-methylphenyl)-piperazin (82p).

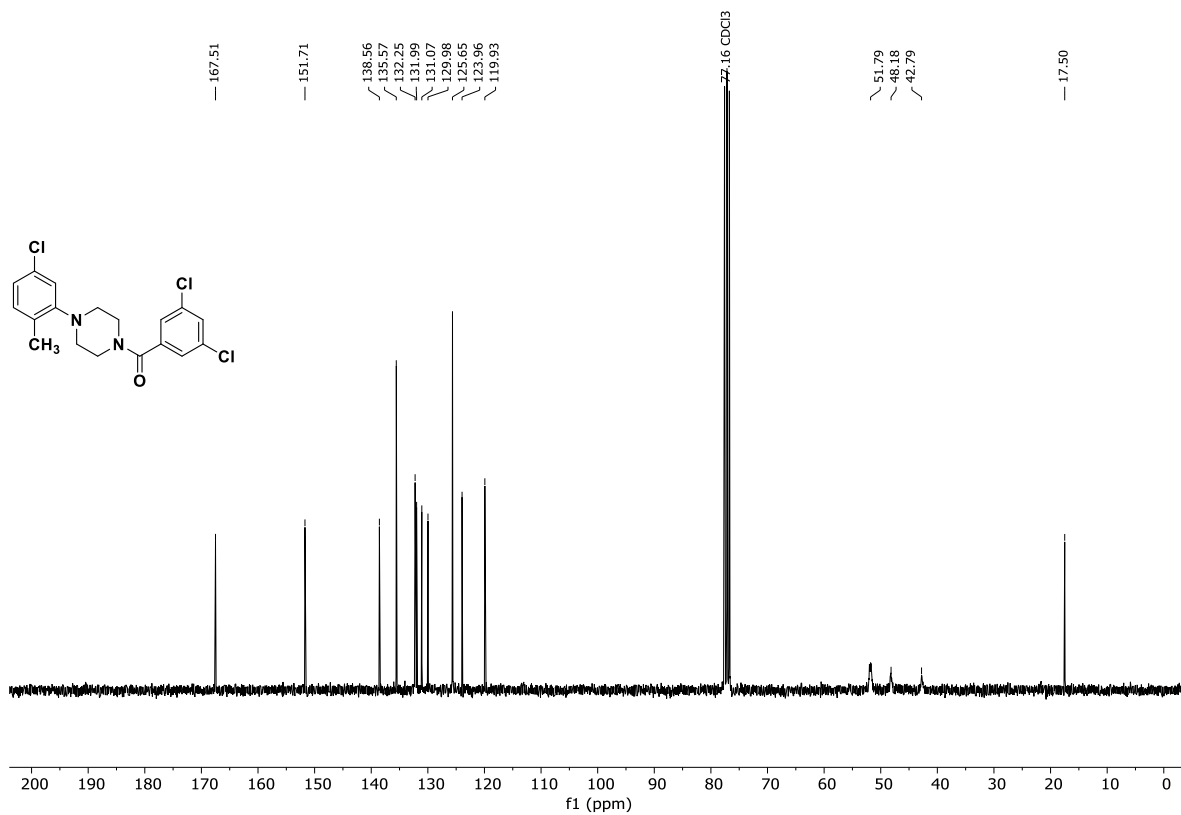


Abb. 12.158: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, CDCl₃) von 1-(3',5'-Dichlorobenzoyl)-4-(5''-chlor-2''-methylphenyl)-piperazin (82p).

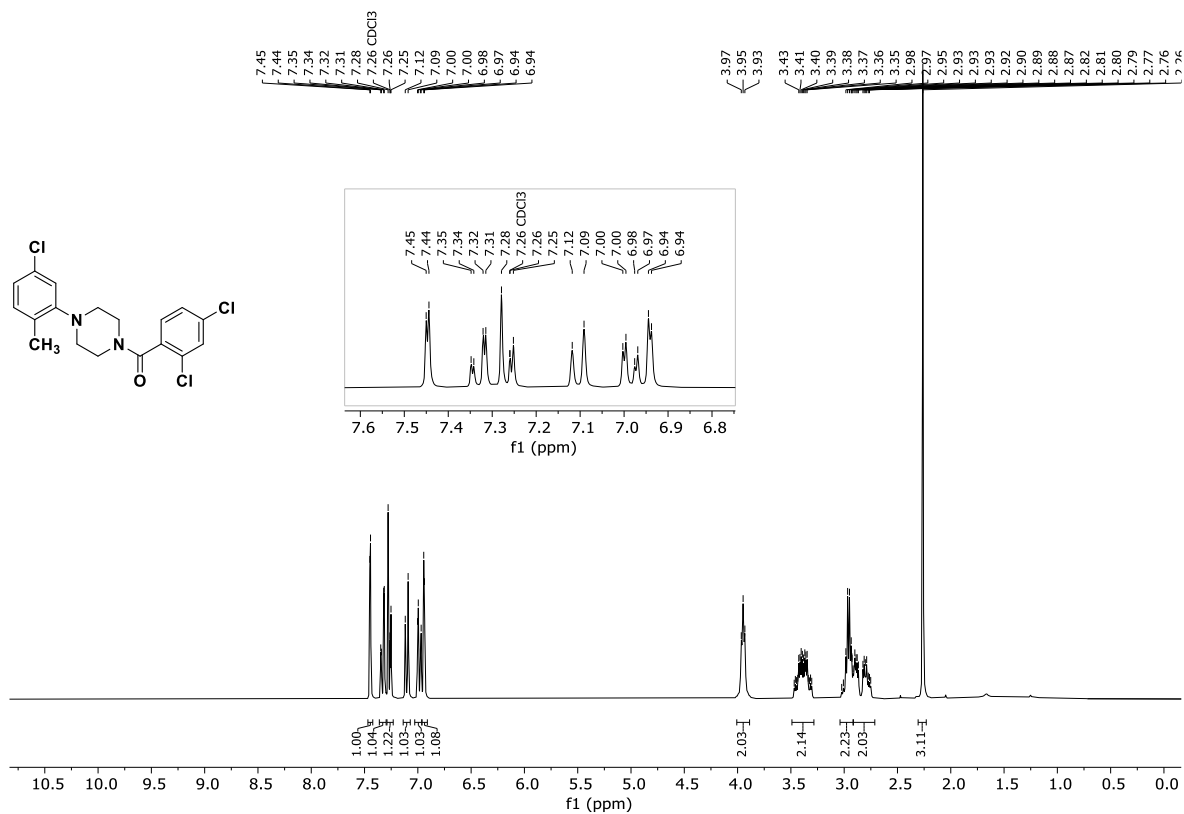


Abb. 12.159: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl₃) von 1-(2',4'-Dichlorbenzoyl)-4-(5''-chlor-2''-methylphenyl)piperazin (**82q**).

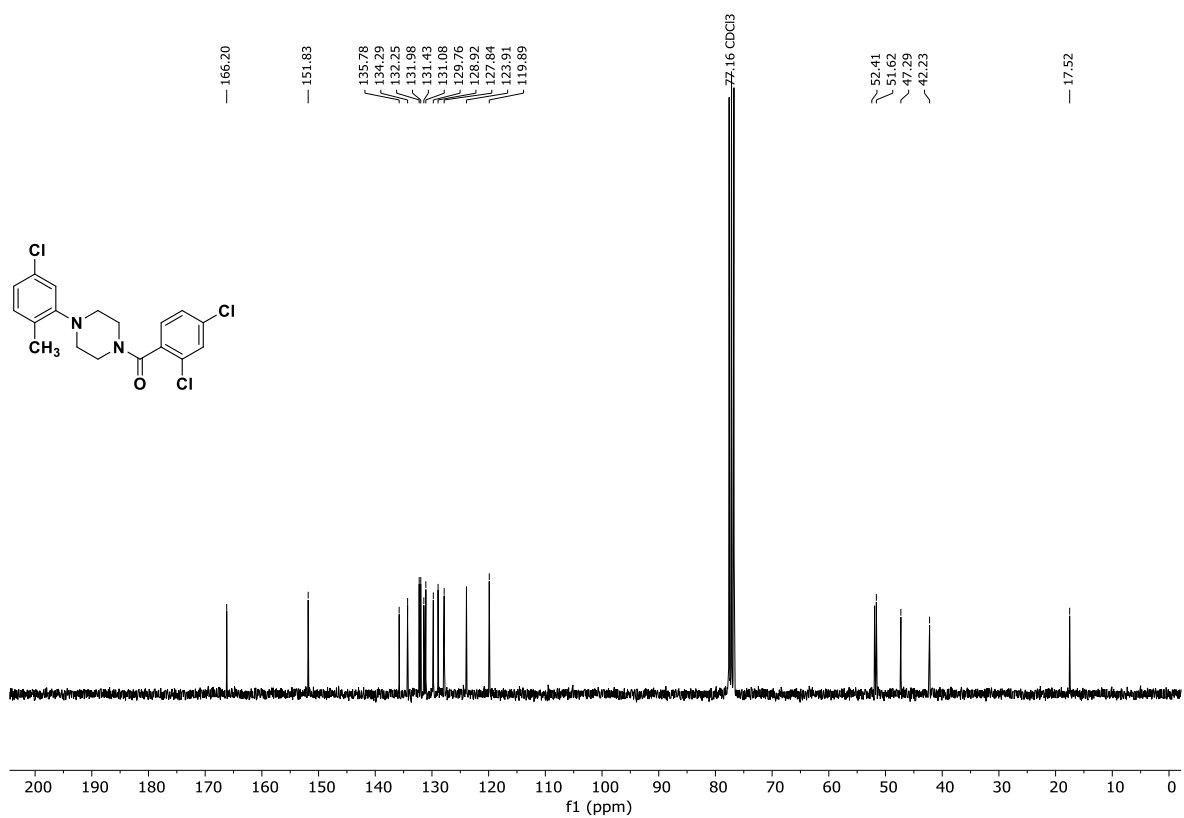


Abb. 12.160: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, CDCl₃) von 1-(2',4'-Dichlorbenzoyl)-4-(5''-chlor-2''-methylphenyl)piperazin (**82q**).

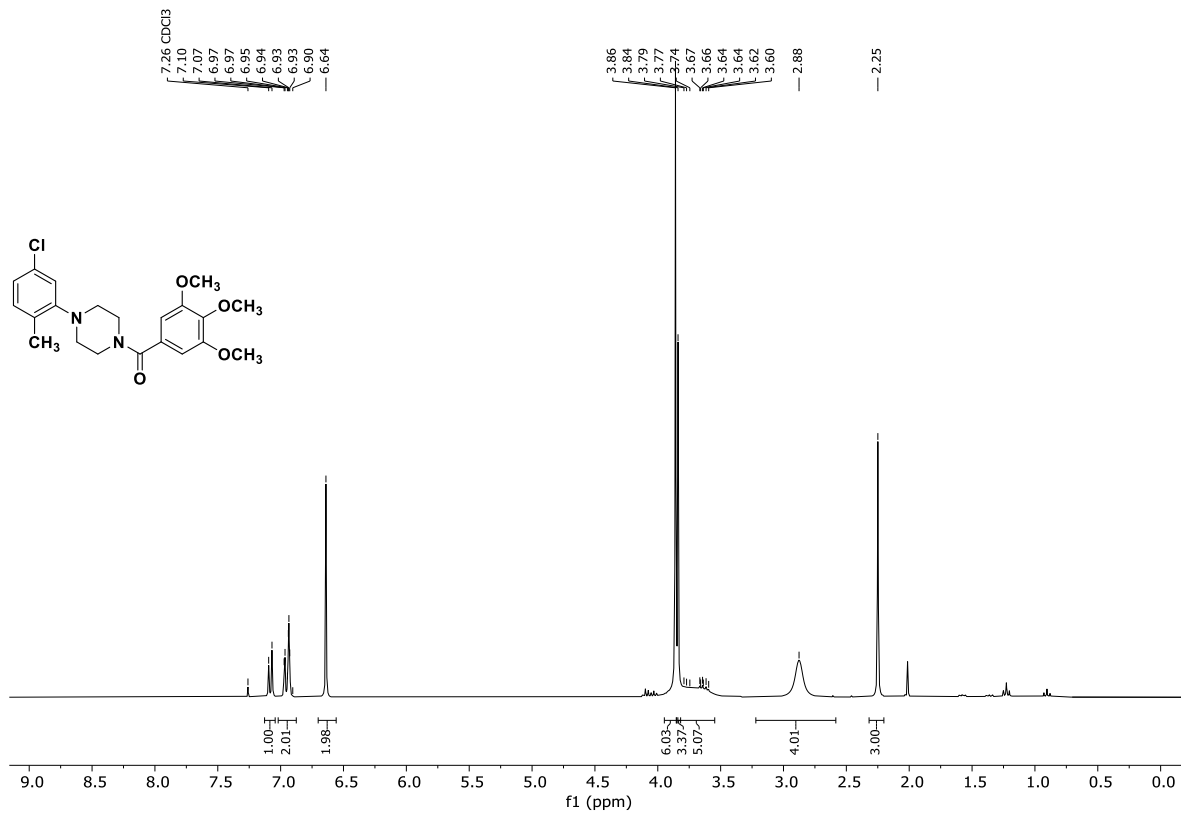


Abb. 12.161: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl₃) von 1-(3',4',5'-Trimethoxybenzoyl)-4-(5''-chlor-2''-methylphenyl)piperazin (**82r**).

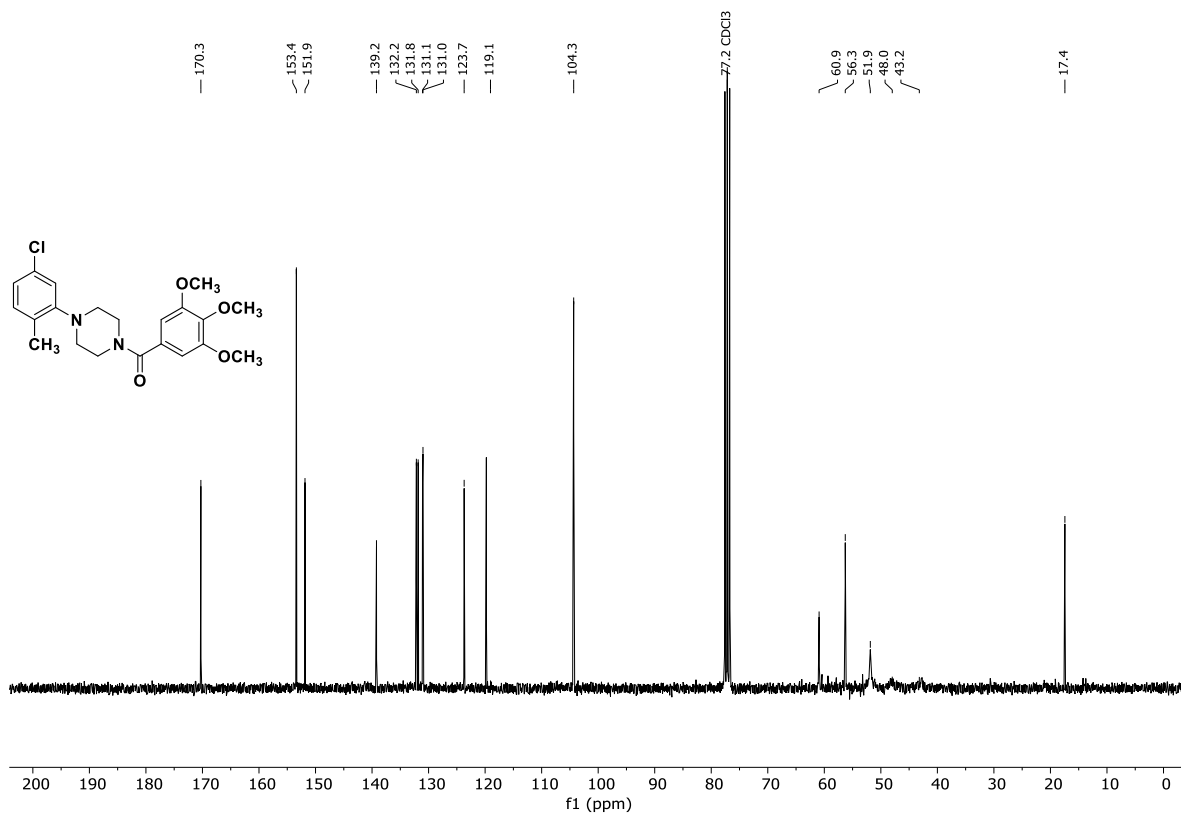


Abb. 12.162: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, CDCl₃) von 1-(3',4',5'-Trimethoxybenzoyl)-4-(5''-chlor-2''-methylphenyl)piperazin (**82r**).

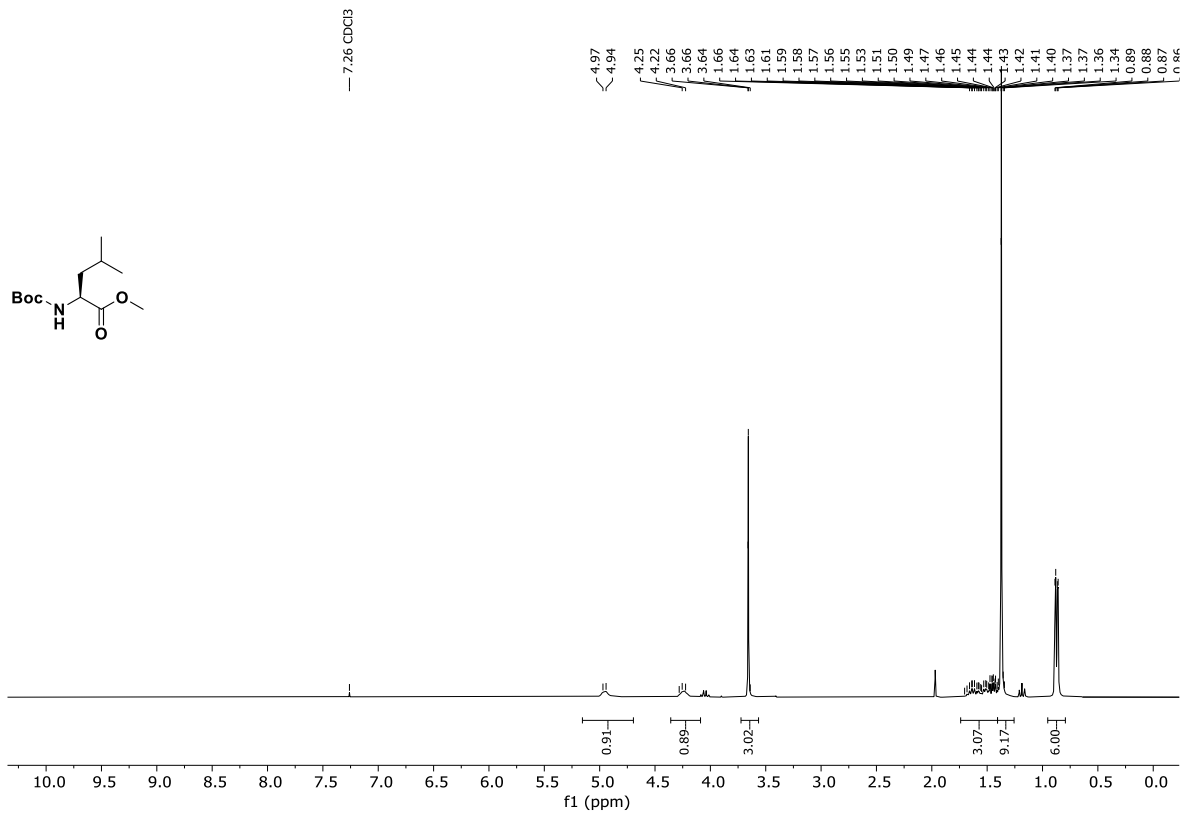


Abb. 12.163: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl₃) von *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-L-leucin-methylester (130).

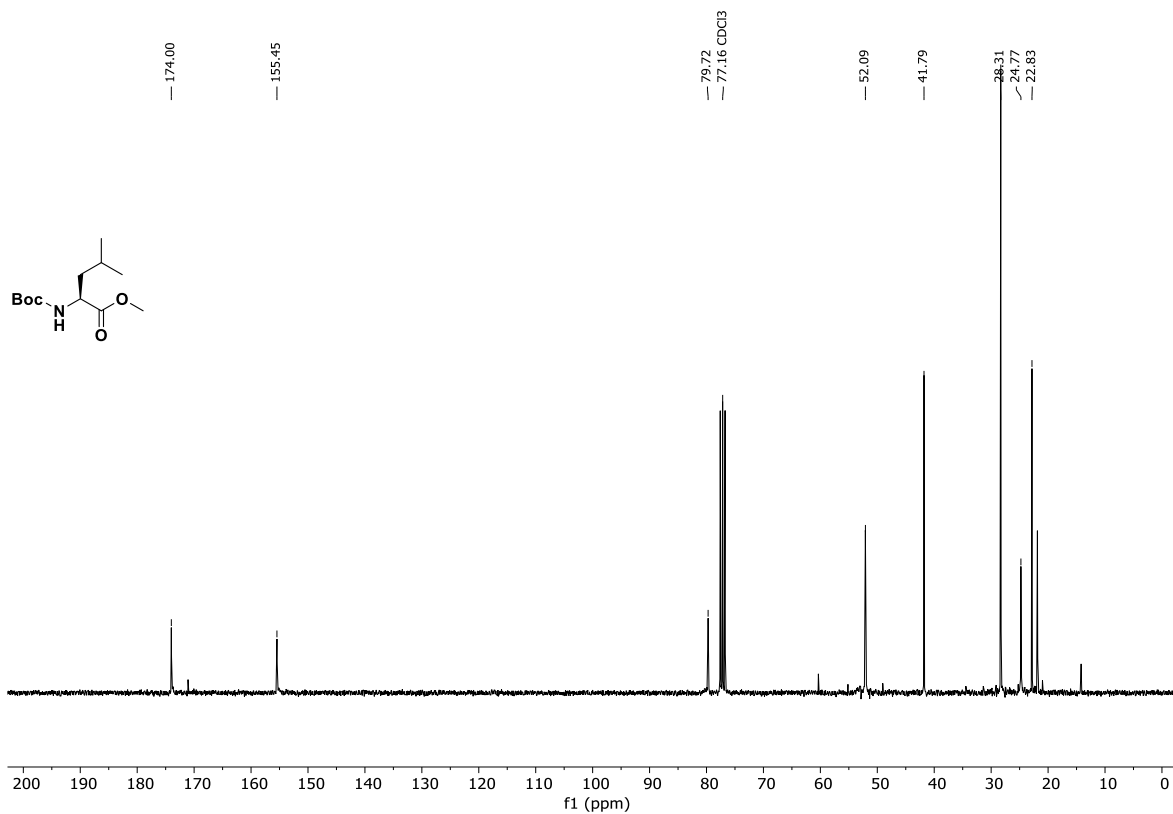


Abb. 12.164: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, CDCl₃) von *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-L-leucin-methylester (130).

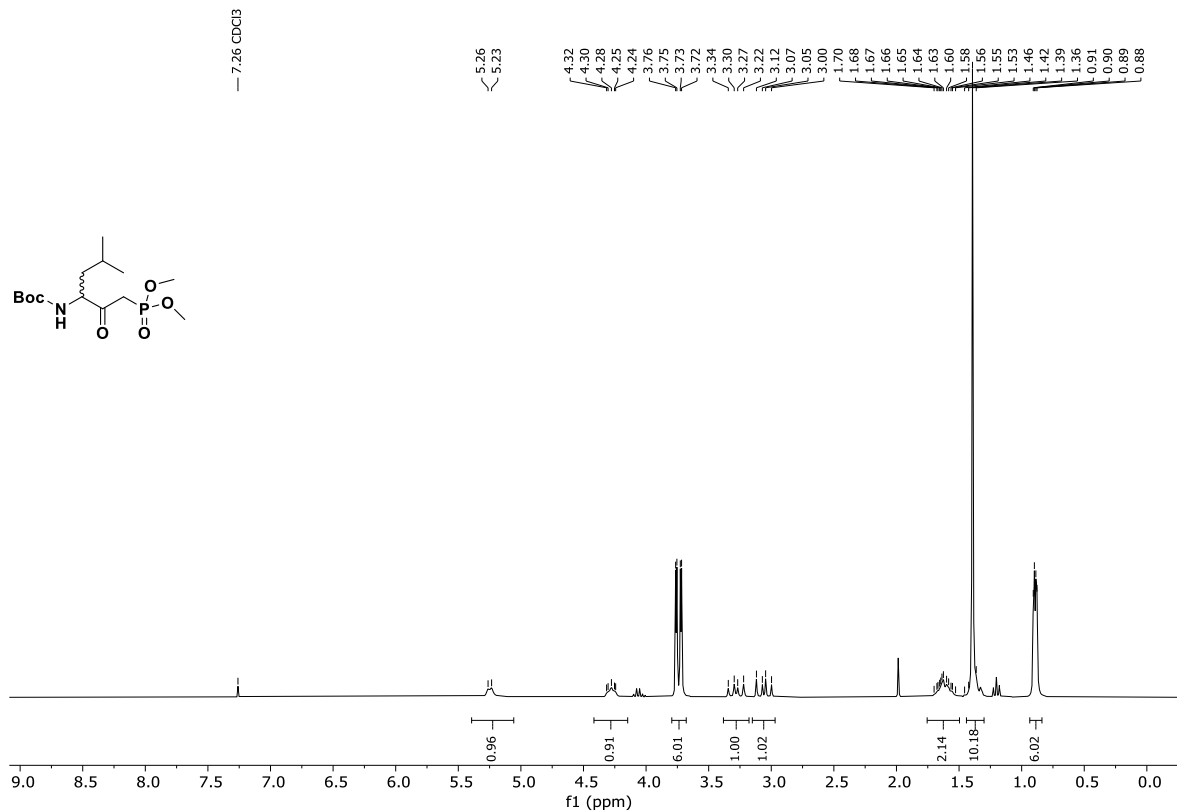


Abb. 12.165: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl₃) von *N*-Boc-dimethyl-(*RS*)-(3-amino-5-methyl-2-oxohexyl)-phosphonat (**132**).

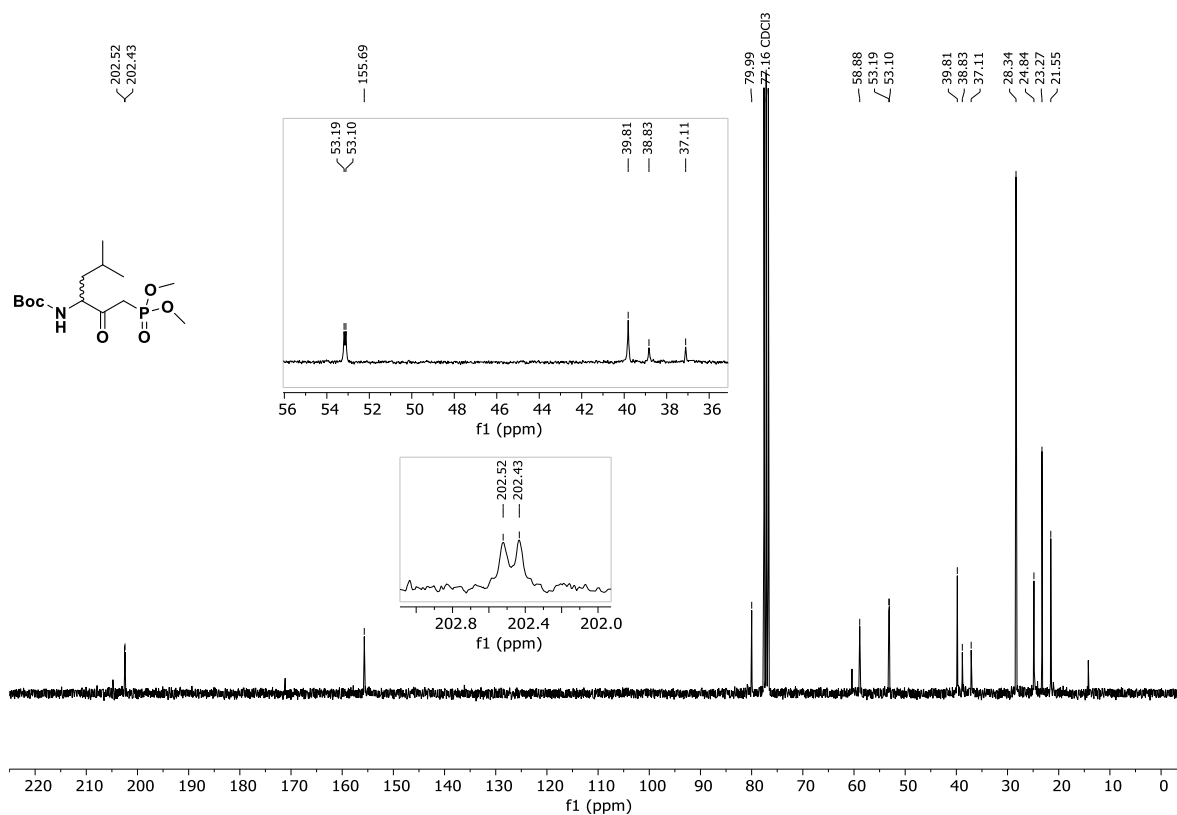


Abb. 12.166: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, CDCl₃) von *N*-Boc-dimethyl-(*RS*)-(3-amino-5-methyl-2-oxohexyl)-phosphonat (**132**).

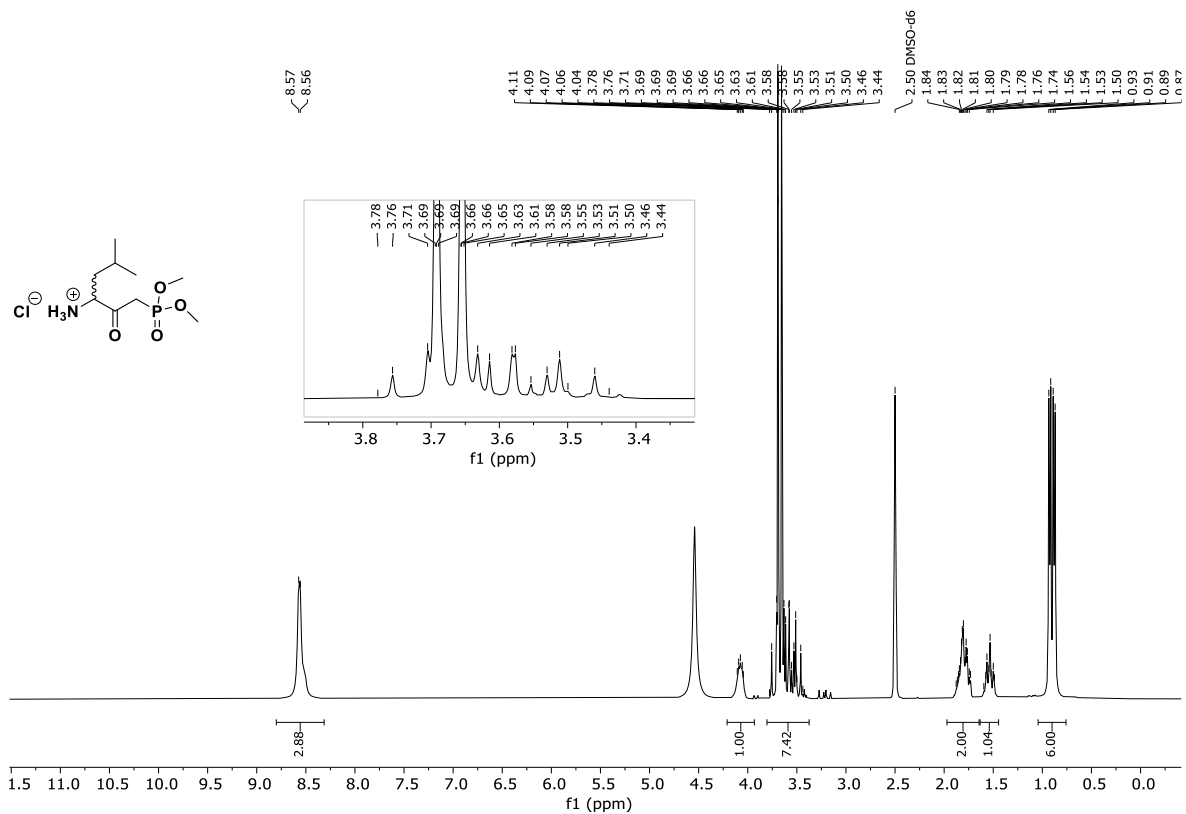


Abb. 12.167: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) von Dimethyl-(*RS*)-(3-amino-5-methyl-2-oxohexyl)phosphonat-Hydrochlorid ($125 \cdot \text{HCl}$).

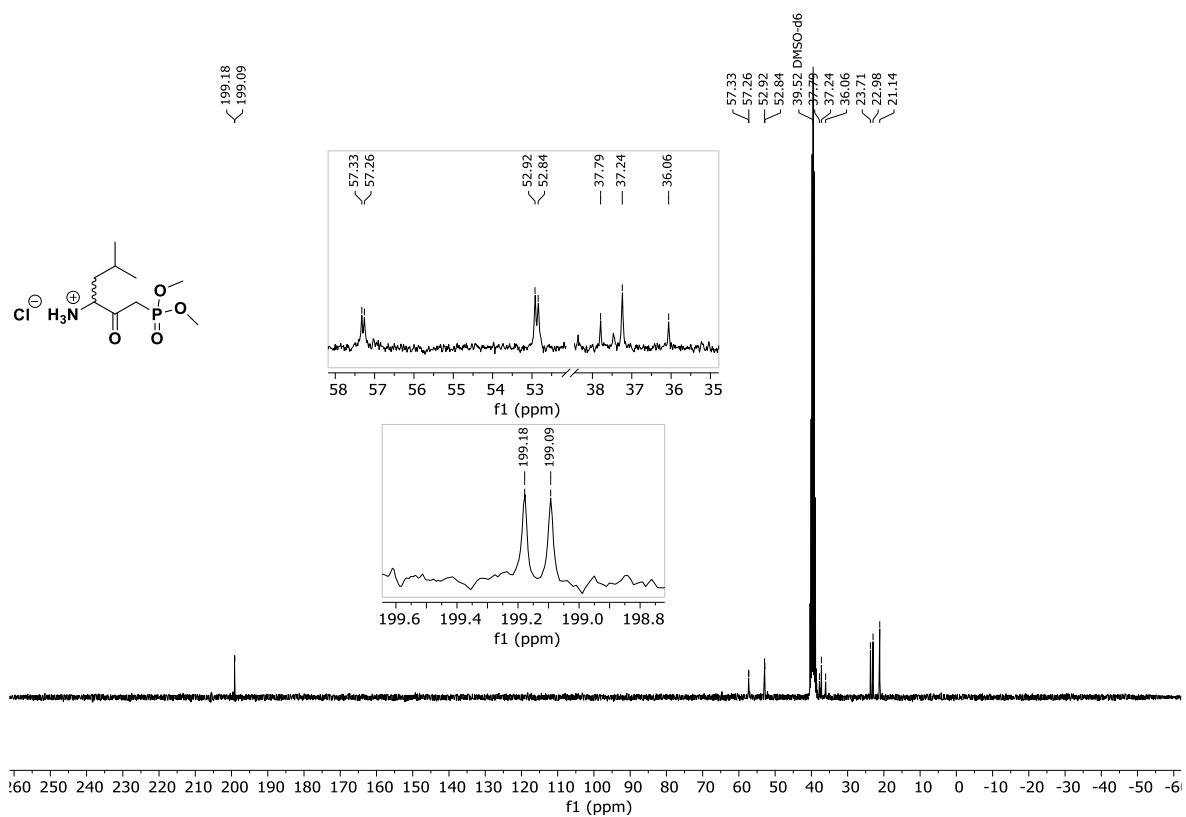


Abb. 12.168: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (75.5 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) von Dimethyl-(*RS*)-(3-amino-5-methyl-2-oxohexyl)phosphonat-Hydrochlorid ($125 \cdot \text{HCl}$).

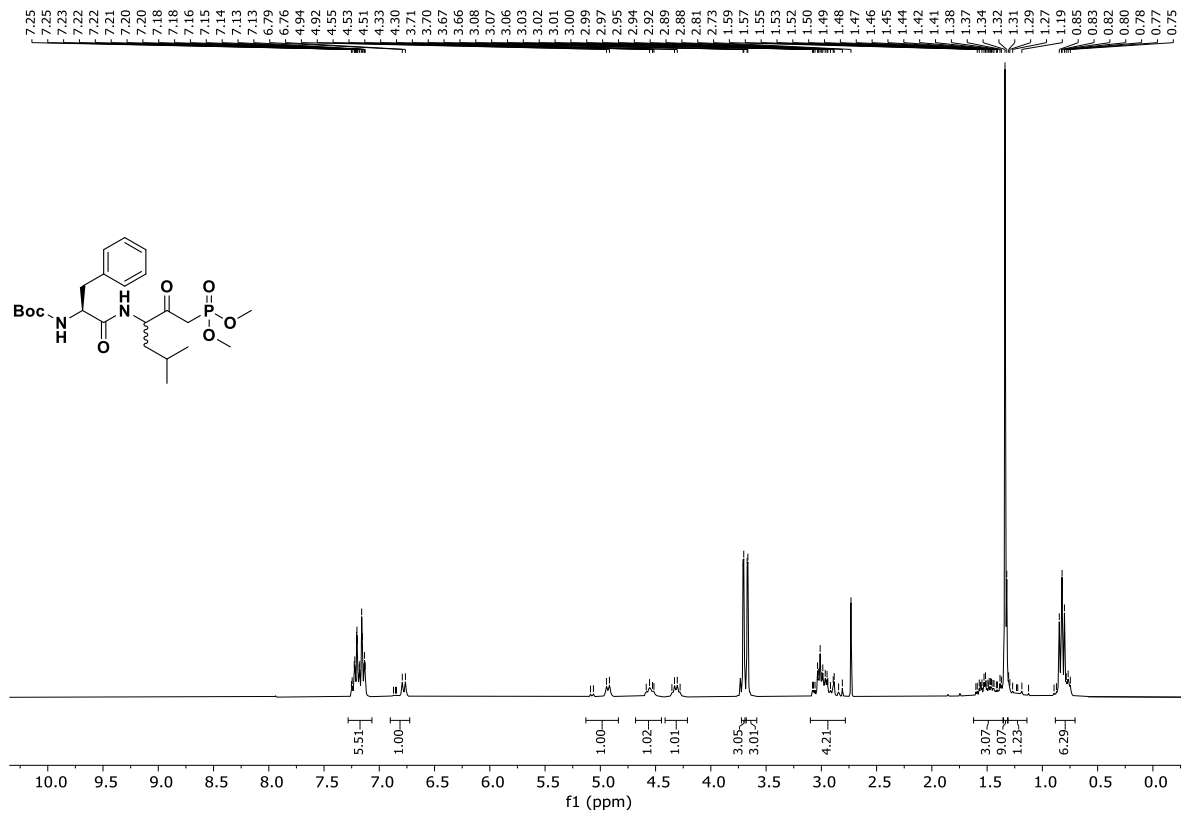


Abb. 12.169: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl₃) von *N*-(Boc-L-phenylalanyl)-dimethyl-(*RS*)-(3-amino-5-methyl-2-oxohexyl)phosphonat (**138**).

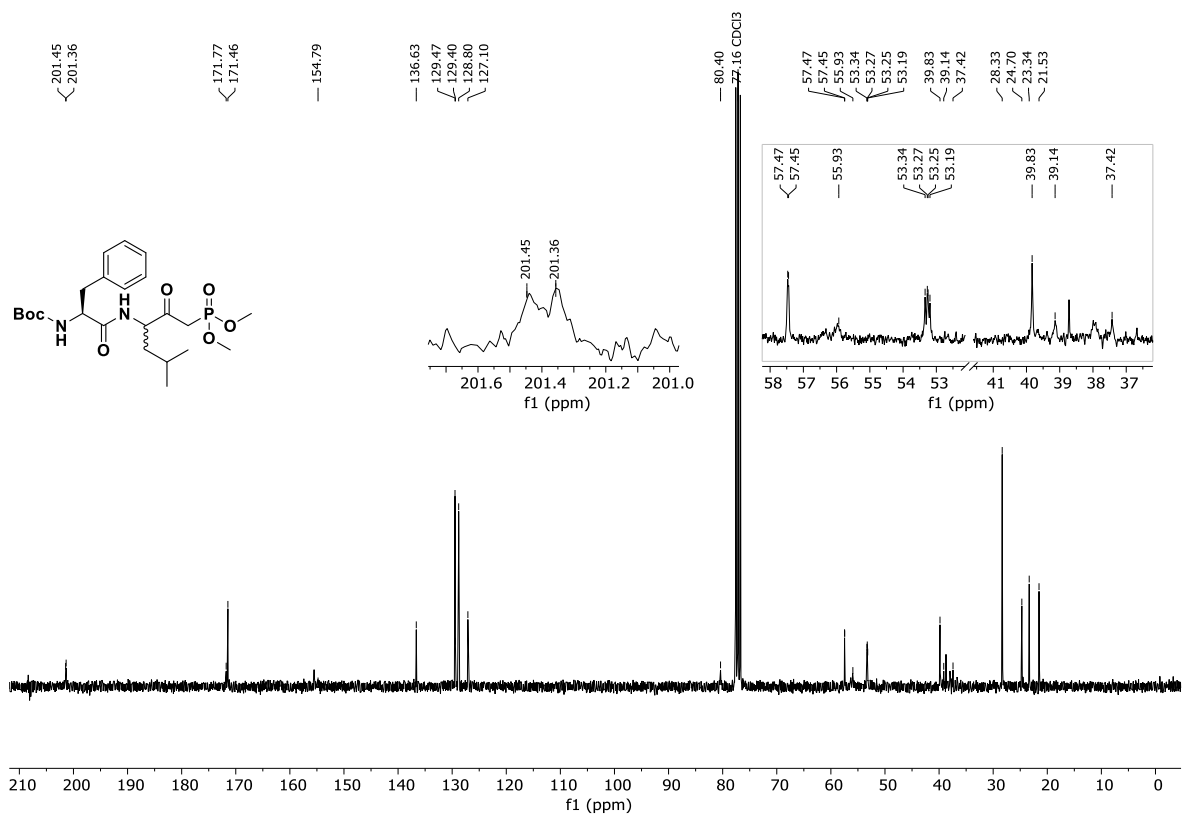


Abb. 12.170: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, CDCl₃) von *N*-(Boc-L-phenylalanyl)-dimethyl-(*RS*)-(3-amino-5-methyl-2-oxohexyl)phosphonat (**138**).

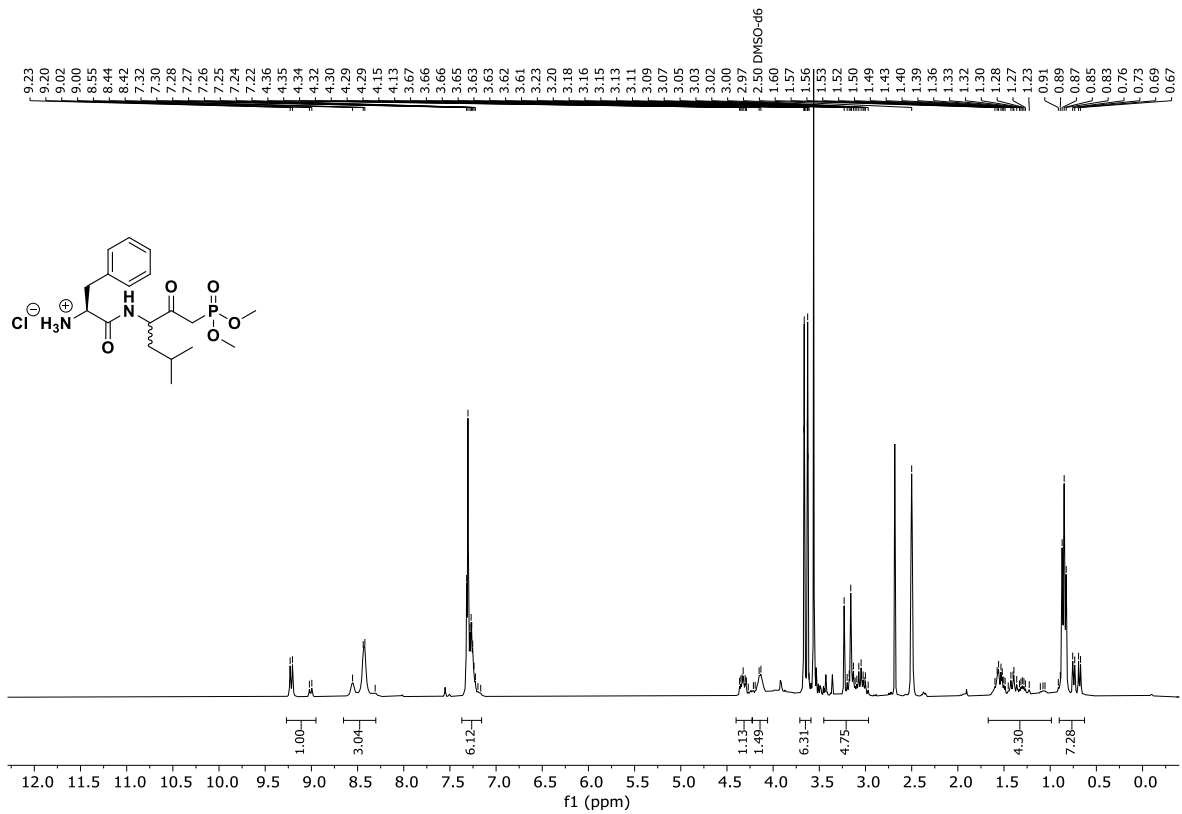


Abb. 12.171: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, DMSO-d₆) von *N*-(*L*-Phenylalanyl)-dimethyl-(*RS*)-(3-amino-5-methyl-2-oxohexyl)phosphonat-Hydrochlorid (**139**).

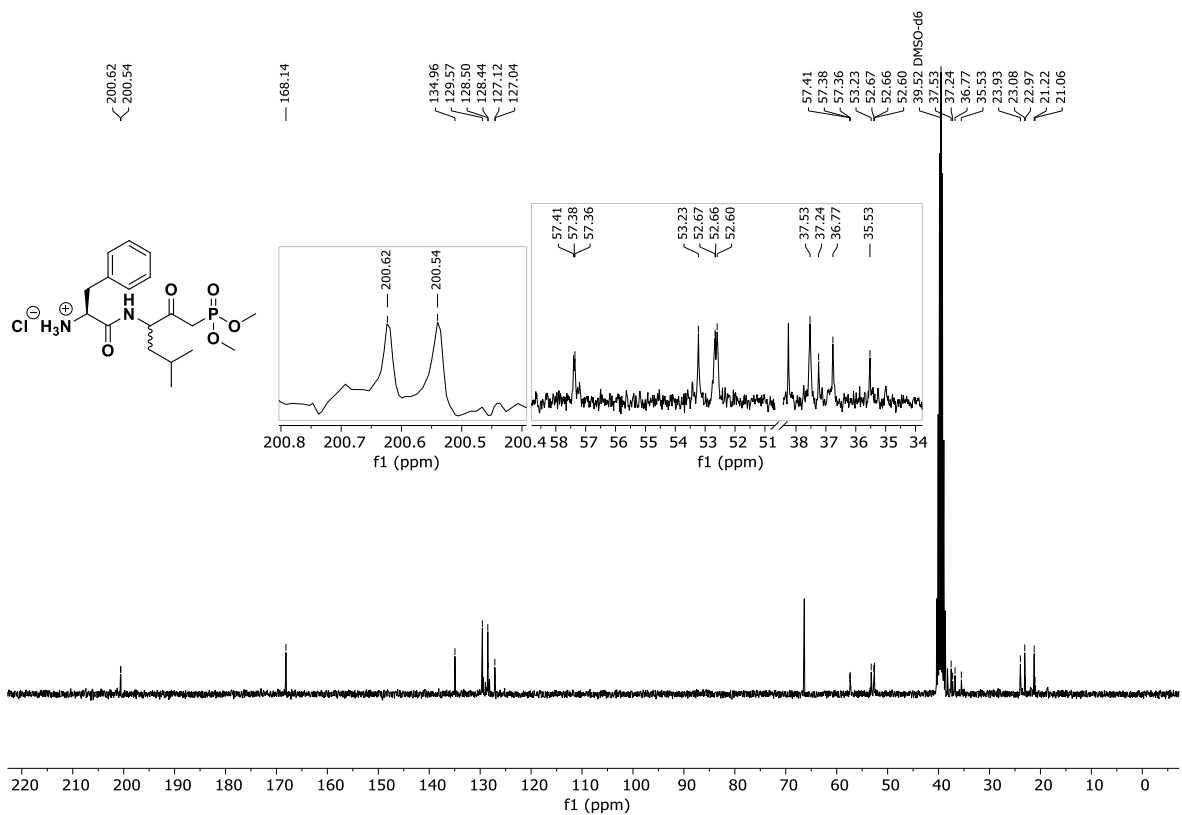


Abb. 12.172: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, DMSO-d₆) von *N*-(*L*-Phenylalanyl)-dimethyl-(*RS*)-(3-amino-5-methyl-2-oxohexyl)phosphonat-Hydrochlorid (**139**).

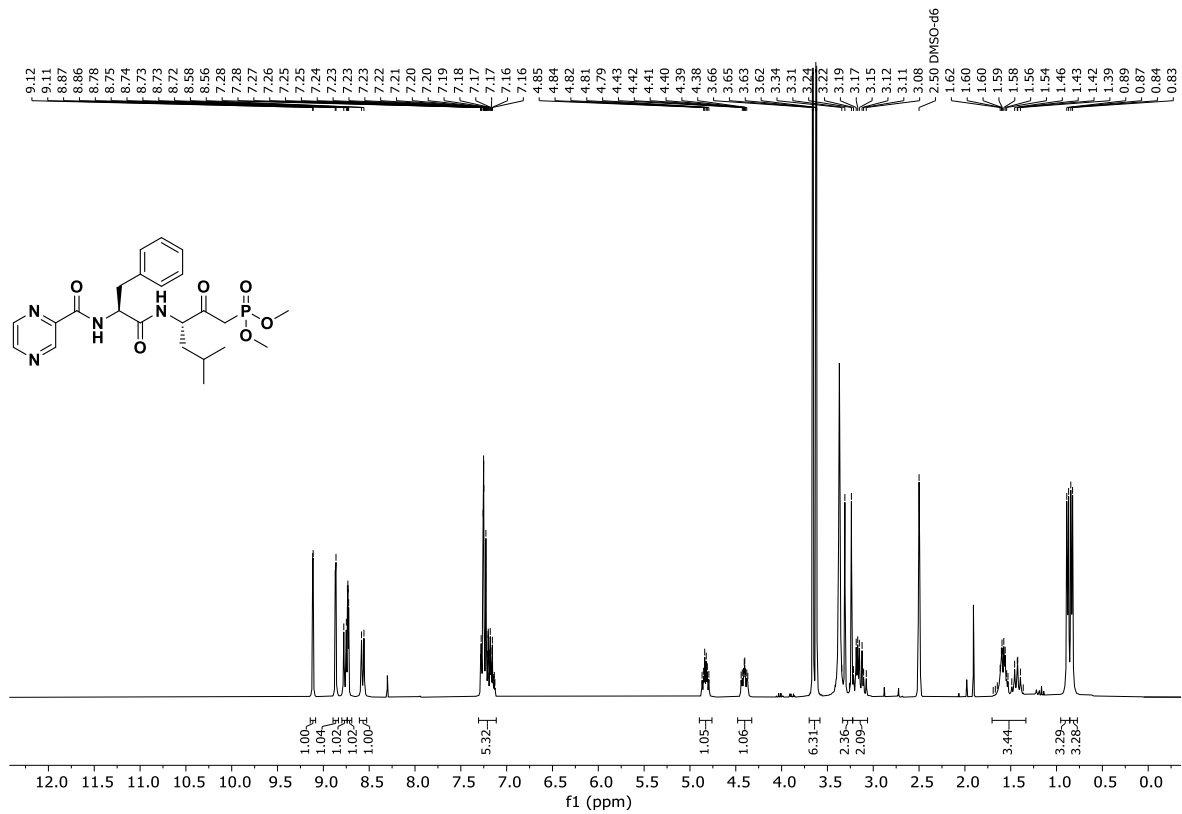


Abb. 12.173: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, DMSO-*d*₆) von *N*-(Pyrazinoyl-L-phenylalanyl)-dimethyl-(*S*)-(3-amino-5-methyl-2-oxohexyl)-phosphonat ((*S,S*)-**121**).

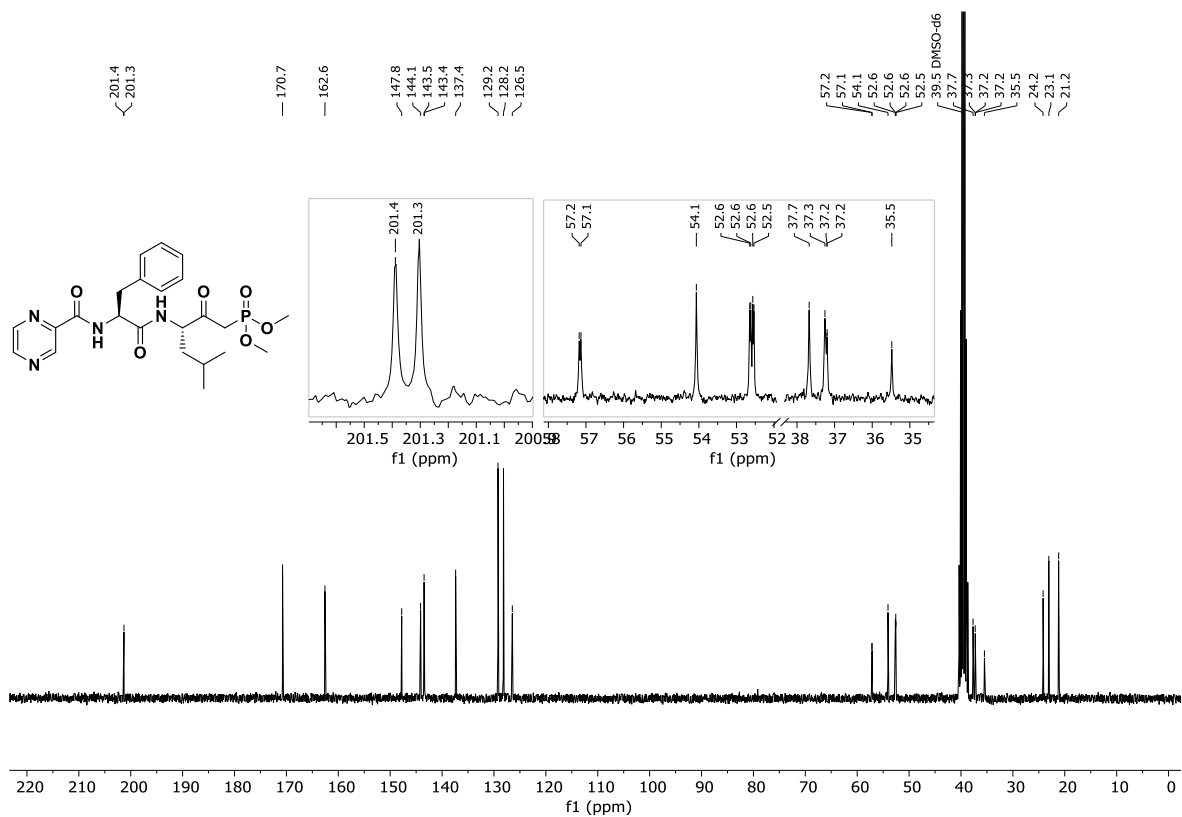


Abb. 12.174: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) von *N*-(Pyrazinoyl-L-phenylalanyl)-dimethyl-(*S*)-(3-amino-5-methyl-2-oxohexyl)-phosphonat ((*S,S*)-**121**).

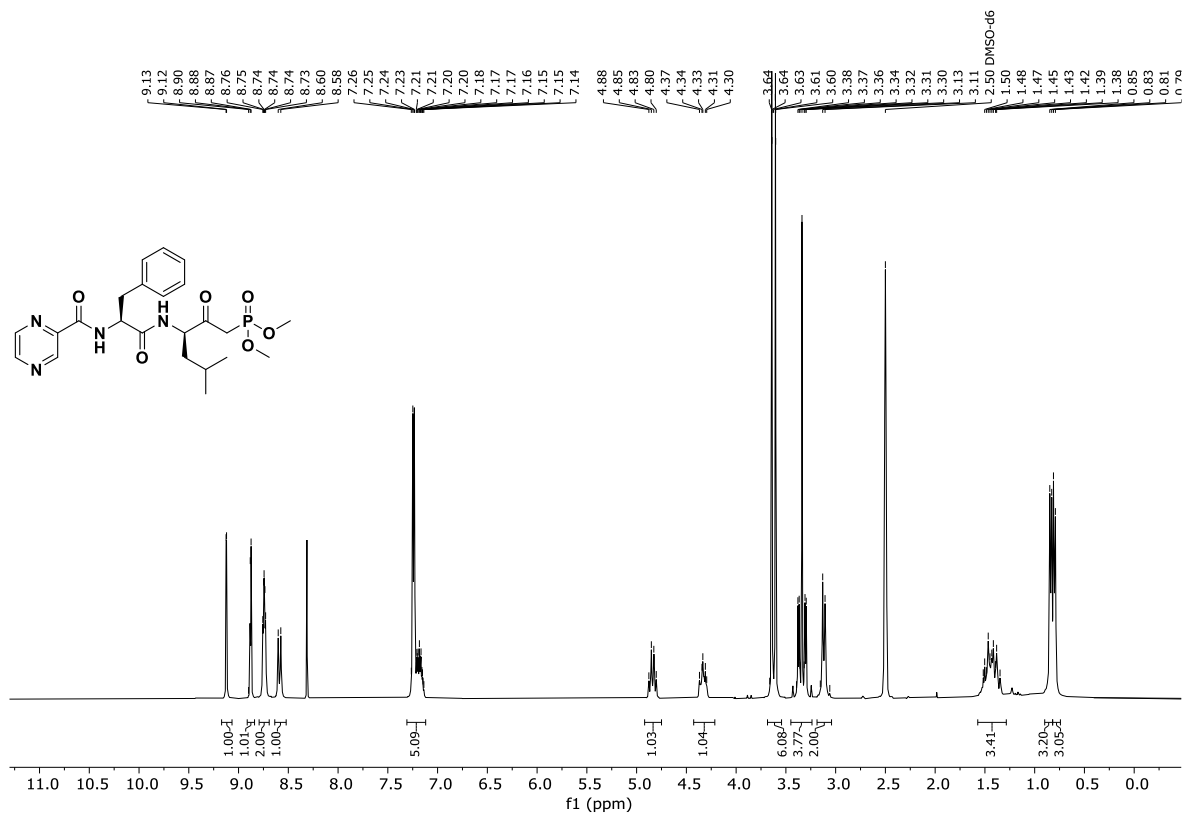


Abb. 12.175: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) von *N*-(Pyrazinoyl-*L*-phenylalanyl)-dimethyl-(*R*)-(3-amino-5-methyl-2-oxohexyl)-phosphonat ((*S,R*)-**121**).

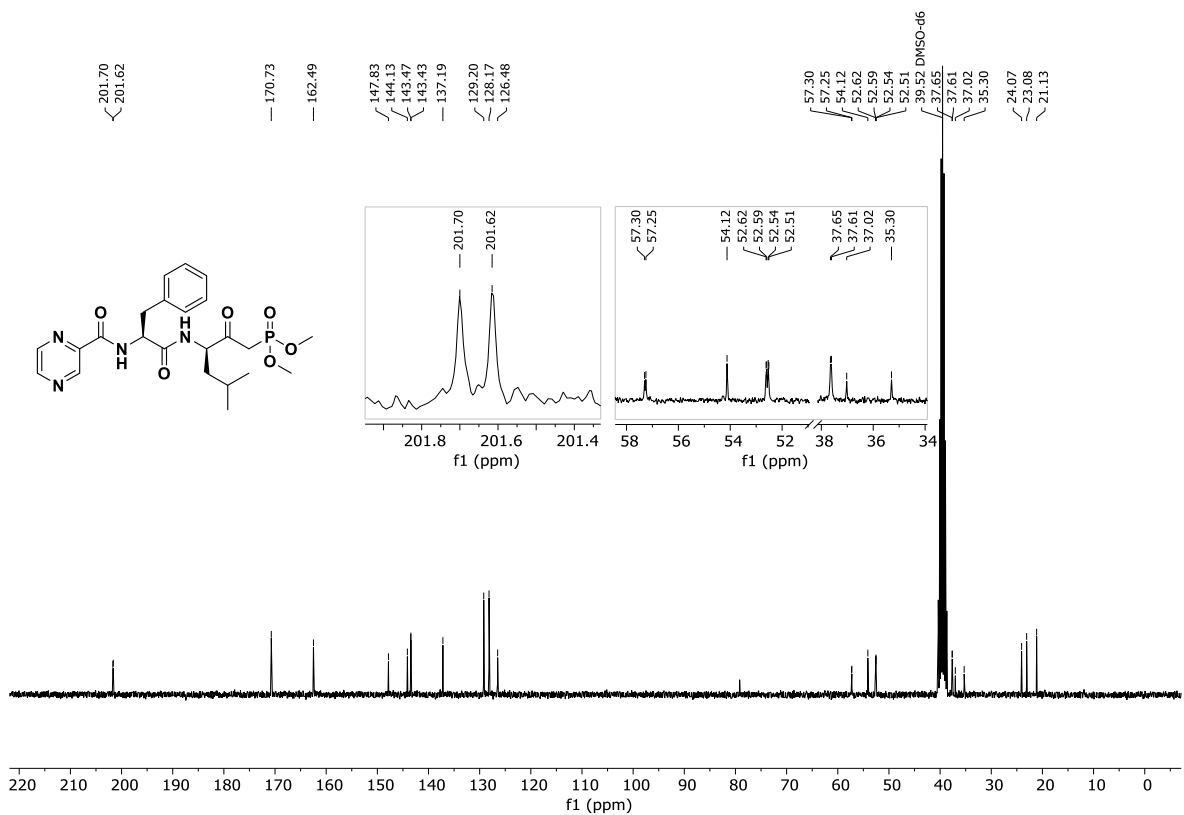


Abb. 12.176: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (75.5 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) von *N*-(Pyrazinoyl-*L*-phenylalanyl)-dimethyl-(*R*)-(3-amino-5-methyl-2-oxohexyl)-phosphonat ((*S,R*)-**121**).

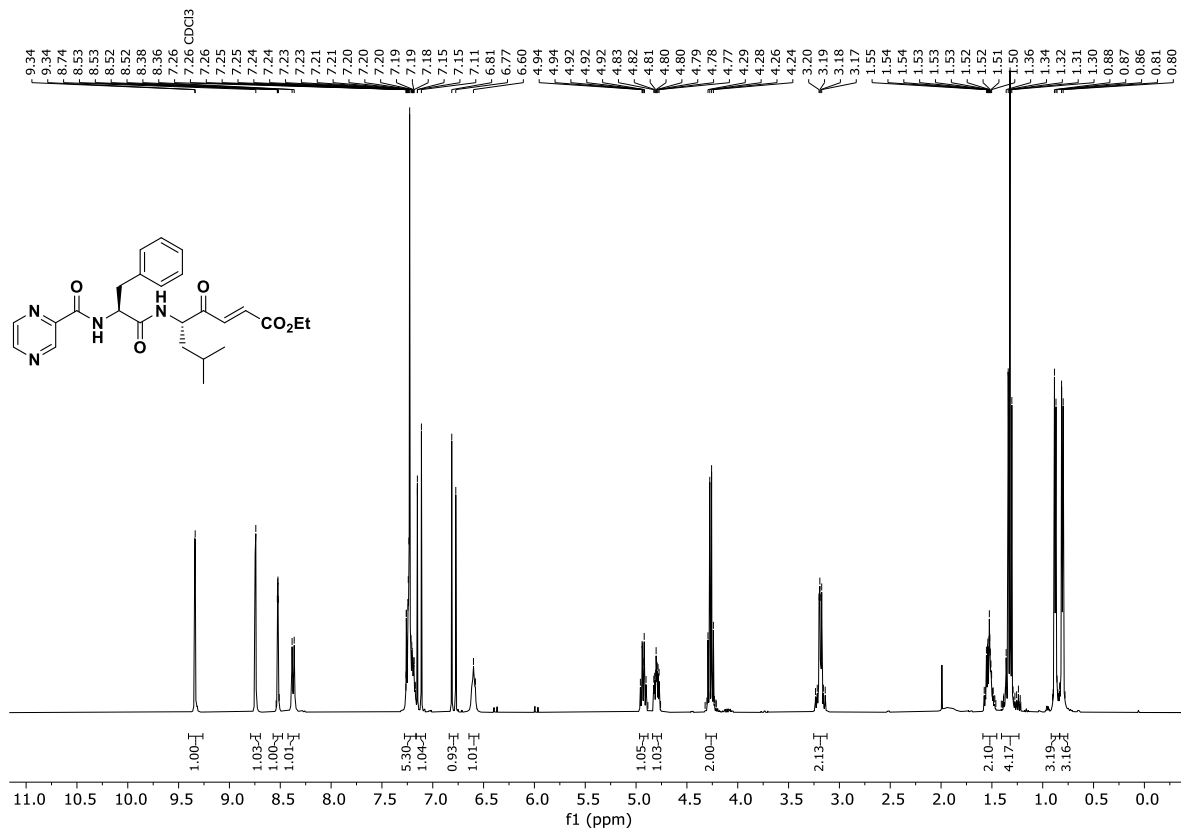


Abb. 12.177: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl₃) von *(E)*-(*S*)-7-Methyl-4-oxo-5-((*N*-pyrazinoyl-*L*-phenylalanyl)amino)oct-2-ensäure-ethylester (*(E)*-(*S,S*)-108).

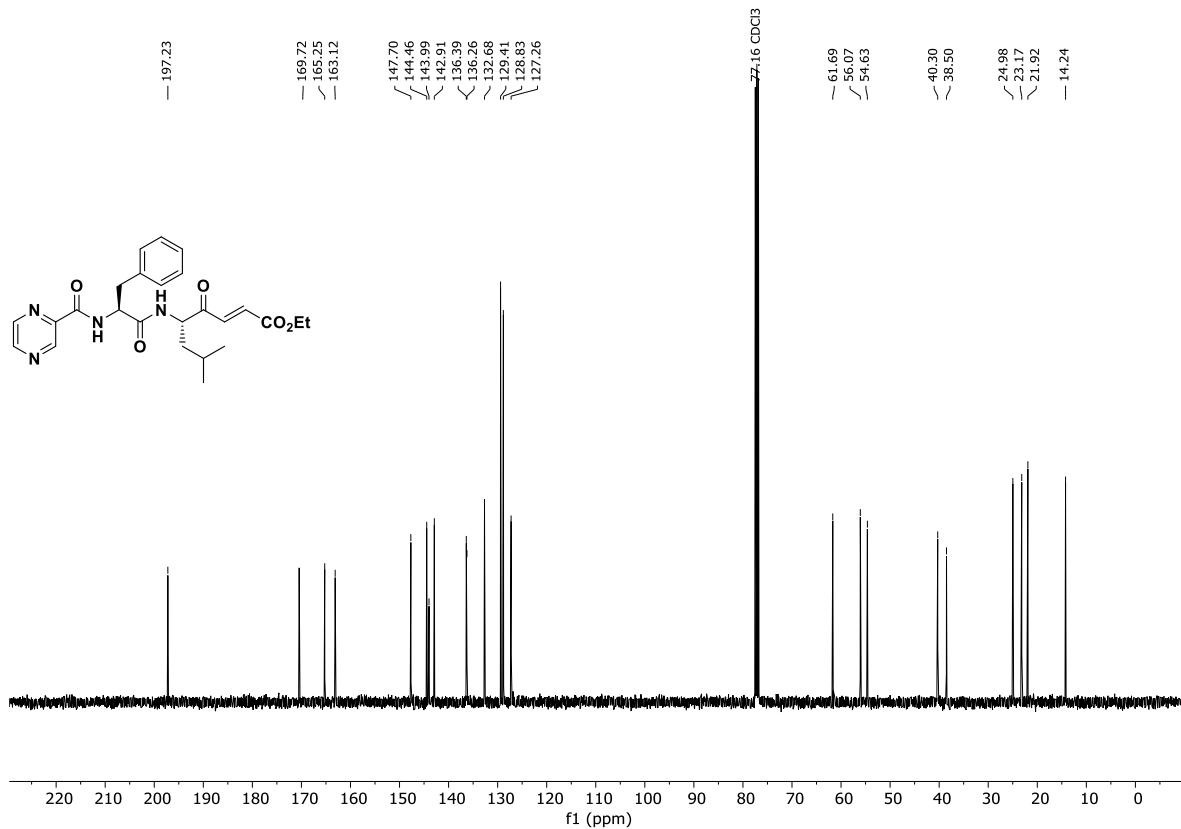


Abb. 12.178: ¹³C-NMR-Spektrum (100.6 MHz, CDCl₃) von *(E)*-(*S*)-7-Methyl-4-oxo-5-((*N*-pyrazinoyl-*L*-phenylalanyl)amino)oct-2-ensäure-ethylester (*(E)*-(*S,S*)-108).

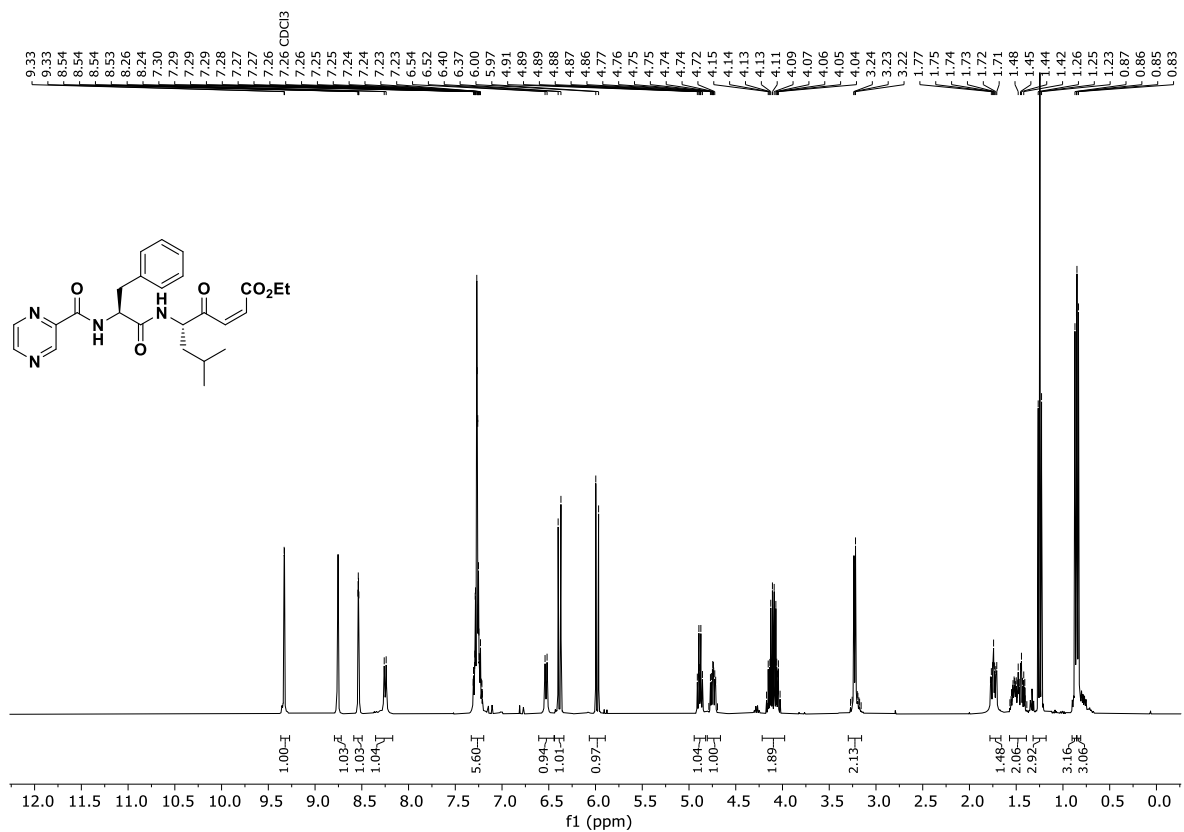


Abb. 12.179: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (400 MHz, CDCl_3) von (Z)-(S)-7-Methyl-4-oxo-5-((N-pyrazinoyl-L-phenylalanyl)amino)oct-2-ensäure-ethylester ((Z)-(S,S)-108).

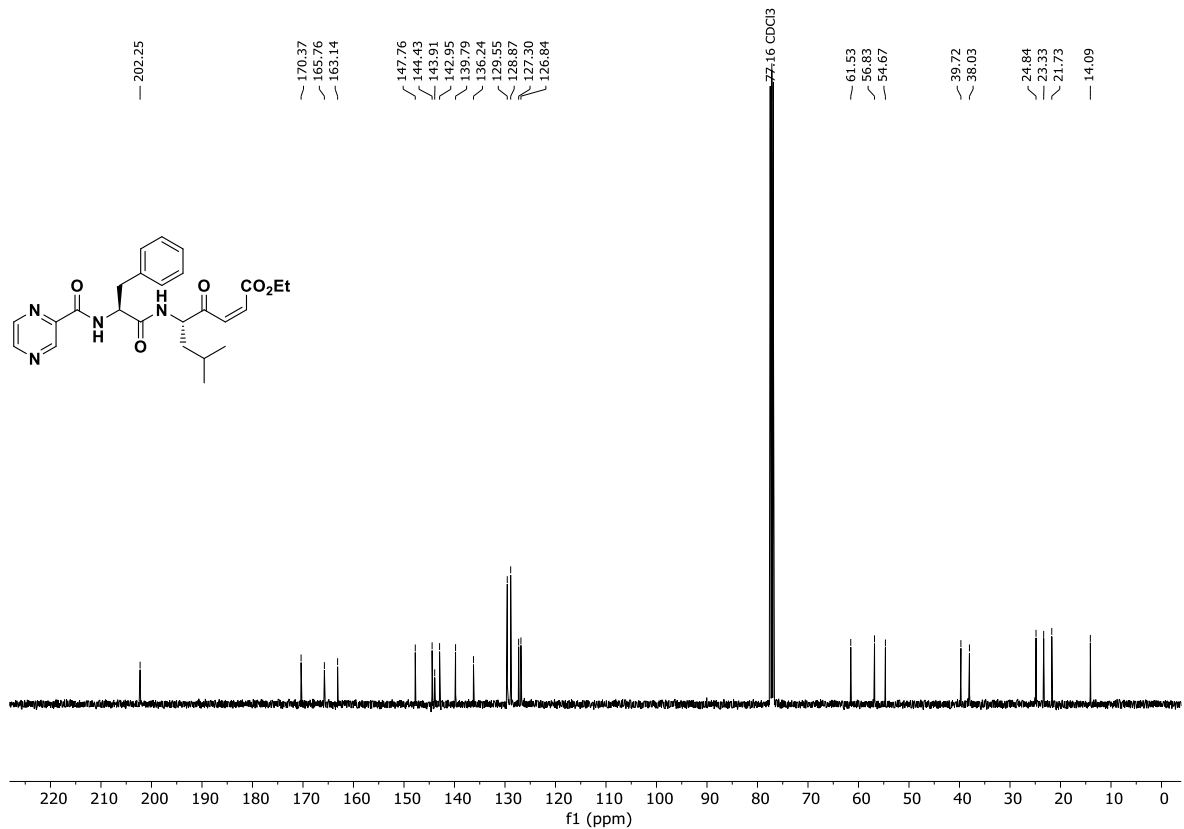


Abb. 12.180: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (100.6 MHz, CDCl_3) von (Z)-(S)-7-Methyl-4-oxo-5-((N-pyrazinoyl-L-phenylalanyl)amino)oct-2-ensäure-ethylester ((Z)-(S,S)-108).

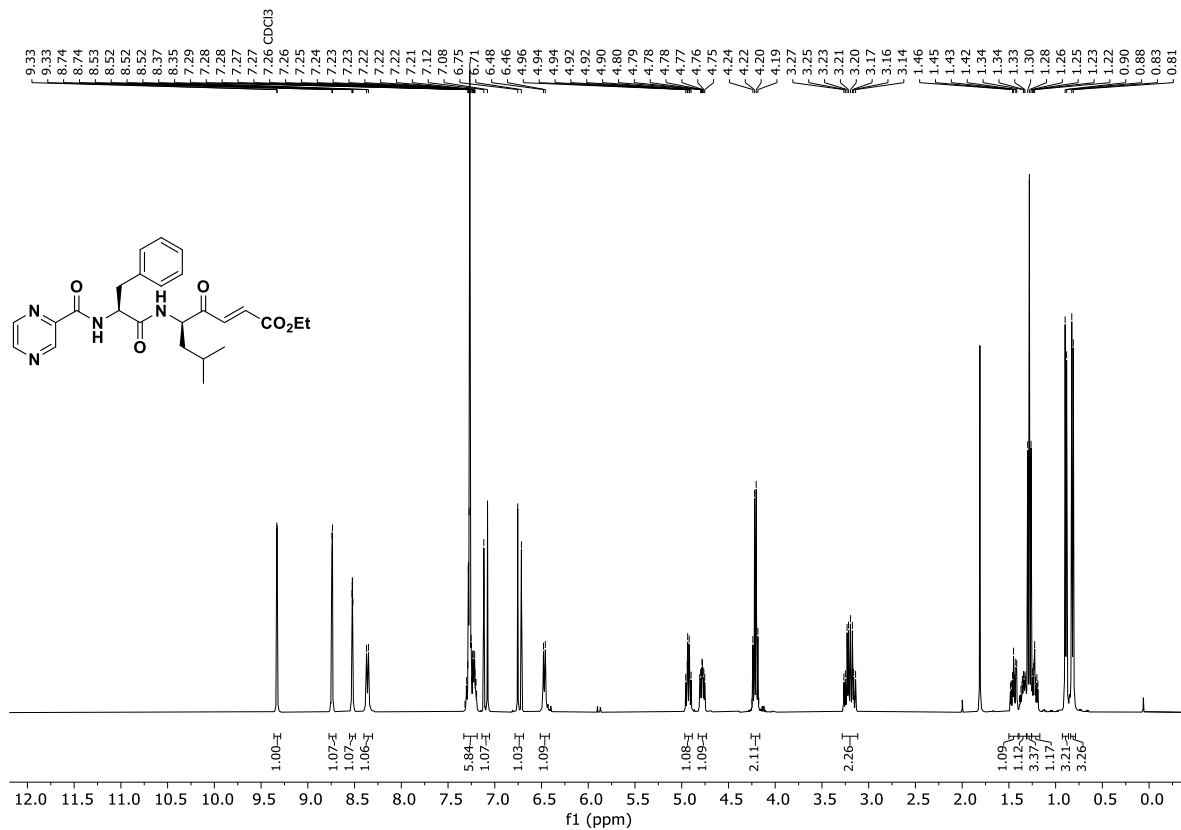


Abb. 12.181: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl₃) von *(E)-(R)*-7-Methyl-4-oxo-5-((*N*-pyrazinoyl-*L*-phenylalanyl)-amino)oct-2-ensäure-ethylester (*(E)-(S,R)*-108).

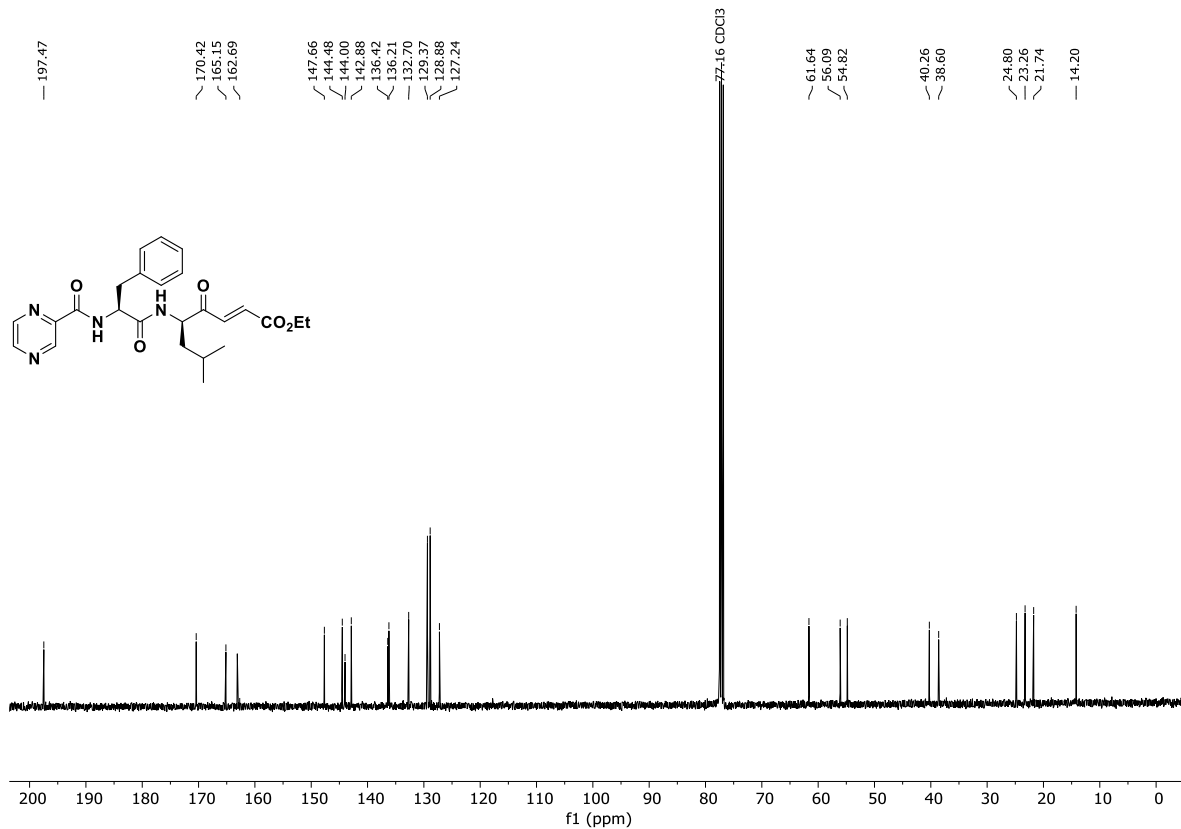


Abb. 12.182: ¹³C-NMR-Spektrum (100.6 MHz, CDCl₃) von *(E)-(R)*-7-Methyl-4-oxo-5-((*N*-pyrazinoyl-*L*-phenylalanyl)-amino)oct-2-ensäure-ethylester (*(Z)-(S,R)*-108).

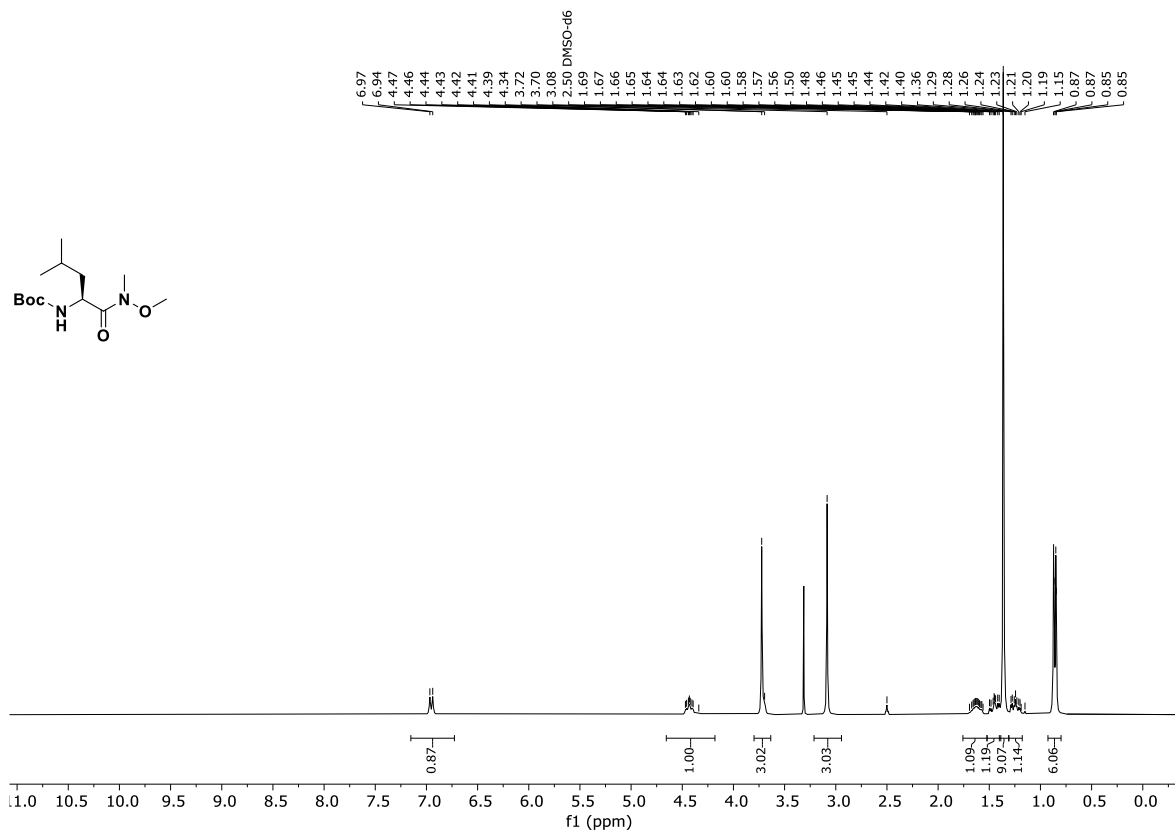


Abb. 12.183: ^1H -NMR-Spektrum (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) von *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-*L*-leucin-*N'*-methoxy-*N'*-methylamid (**150**).

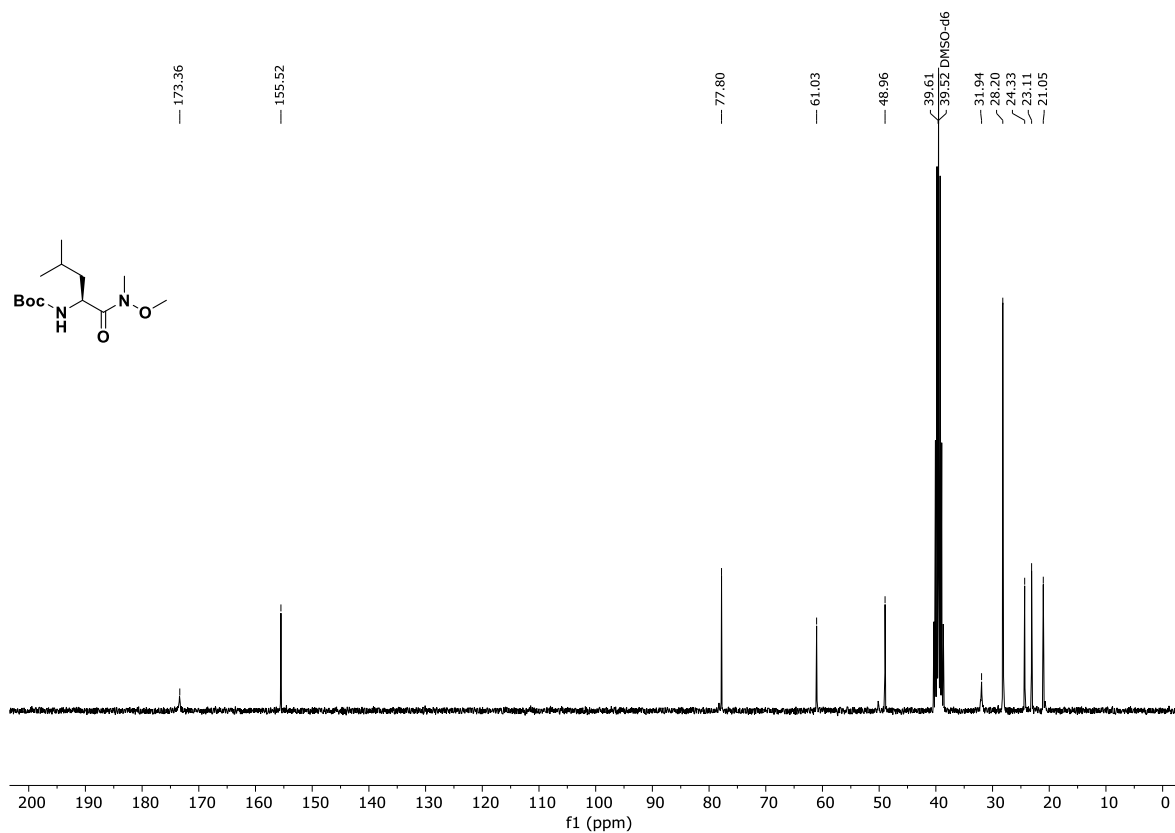


Abb. 12.184: ^{13}C -NMR-Spektrum (75.5 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) von *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-*L*-leucin-*N'*-methoxy-*N'*-methylamid (**150**).

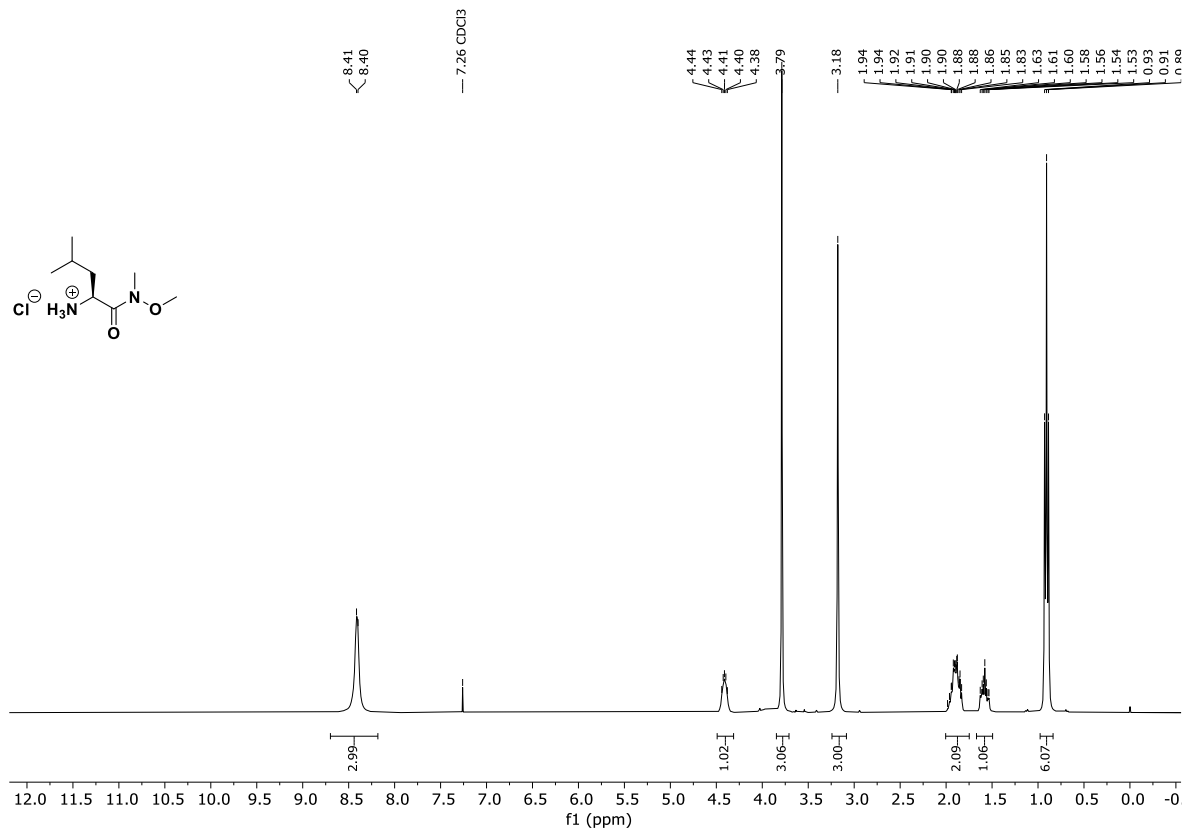


Abb. 12.185: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl₃) von L-Leucin-N'-methoxy-N'-methylamid-Hydrochlorid (147 · HCl).

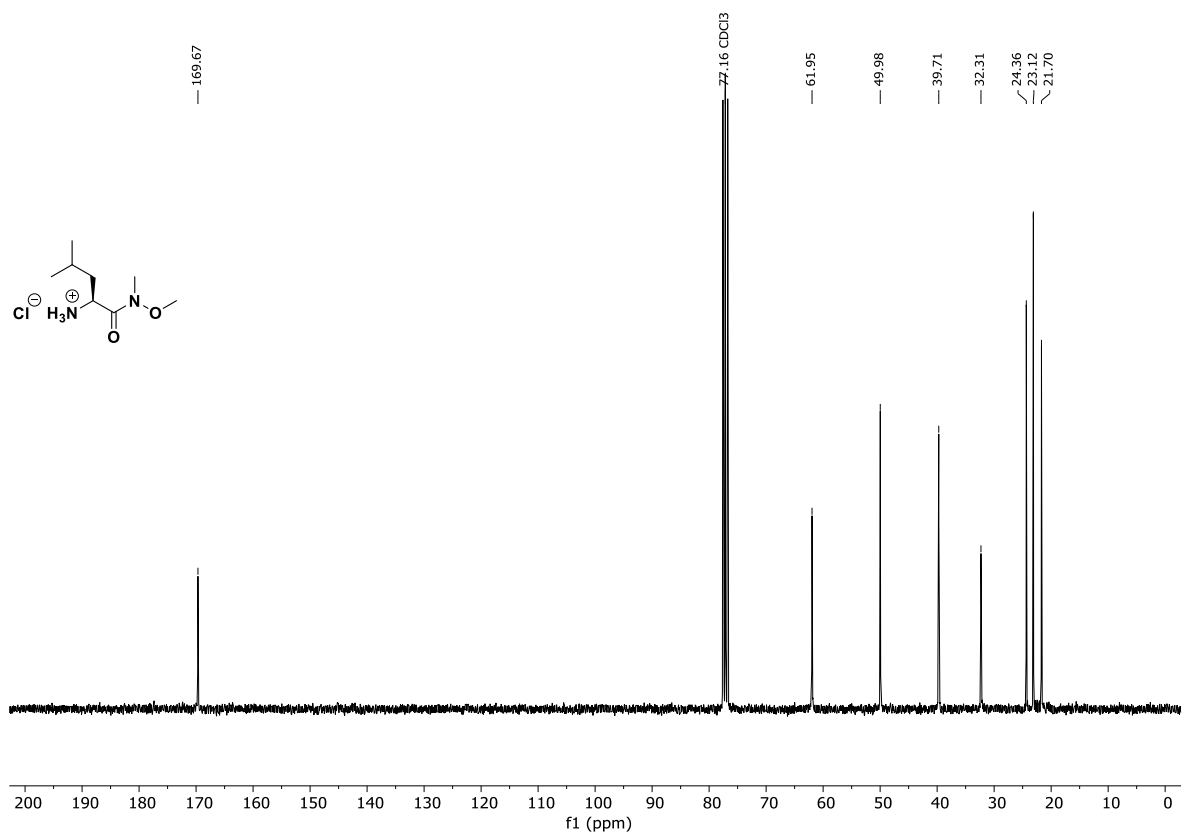


Abb. 12.186: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, CDCl₃) von L-Leucin-N'-methoxy-N'-methylamid-Hydrochlorid (147 · HCl).

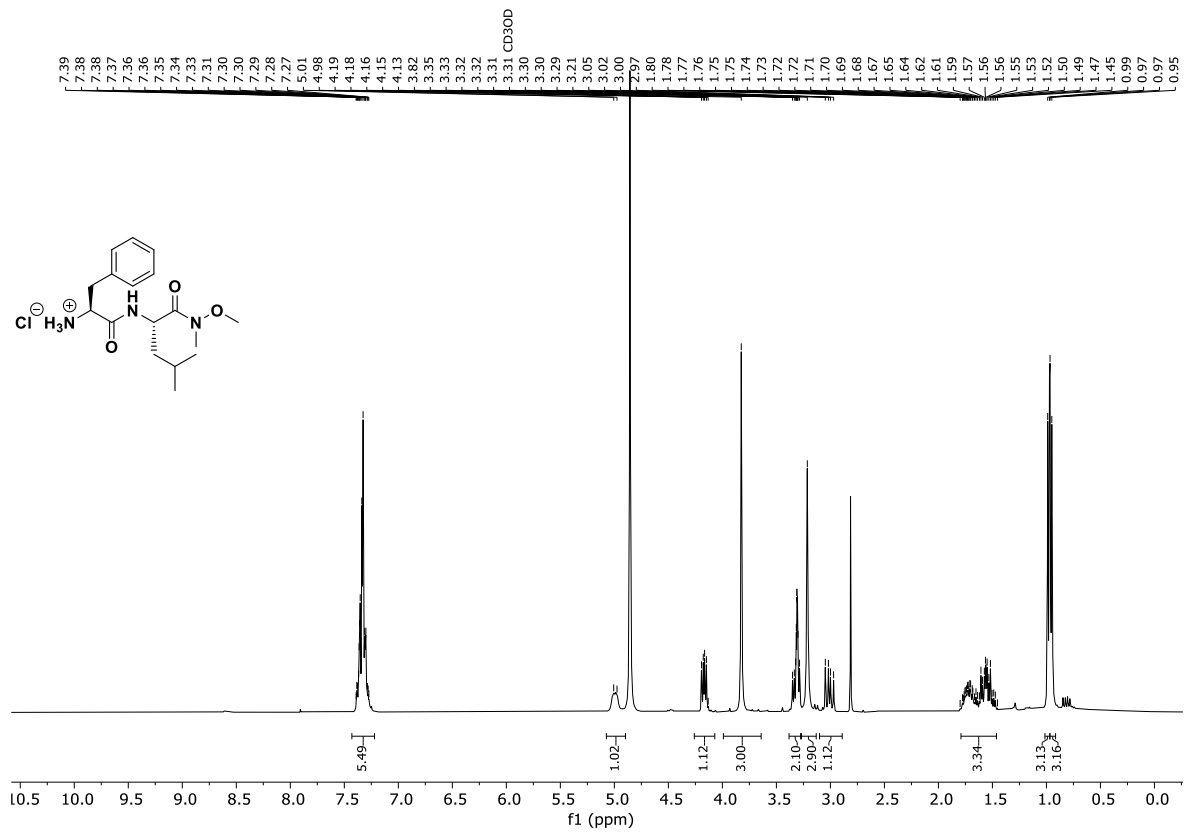


Abb. 12.189: ^1H -NMR-Spektrum (300 MHz, Methanol- d_4) von L-Phenylalanyl-L-leucin- N' -methoxy- N' -methylamid-Hydrochlorid (**153**).

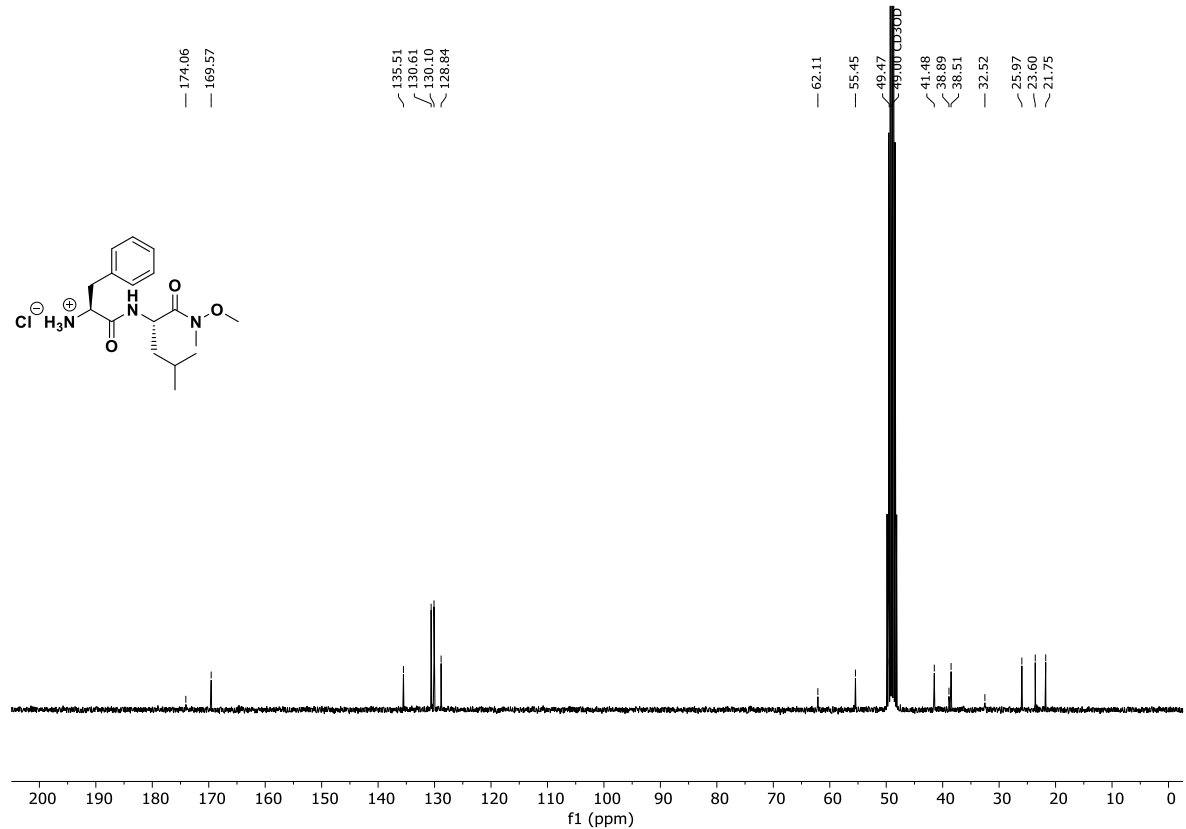


Abb. 12.190: ^{13}C -NMR-Spektrum (75.5 MHz, Methanol- d_4) von L-Phenylalanyl-L-leucin- N' -methoxy- N' -methylamid-Hydrochlorid (**153**).

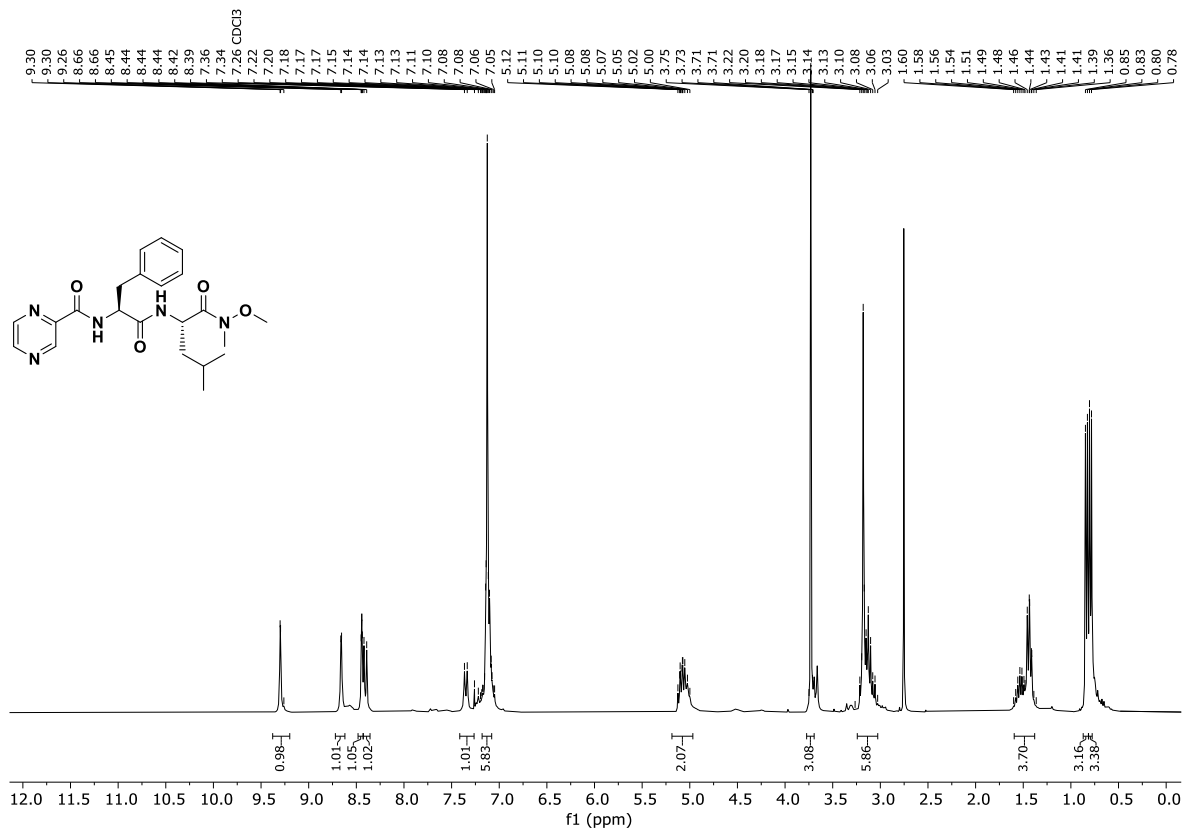


Abb. 12.191: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl₃) von *N*-(Pyrazinoyl-L-phenylalanyl)-L-leucin-*N'*-methoxy-methylamid (**146**).

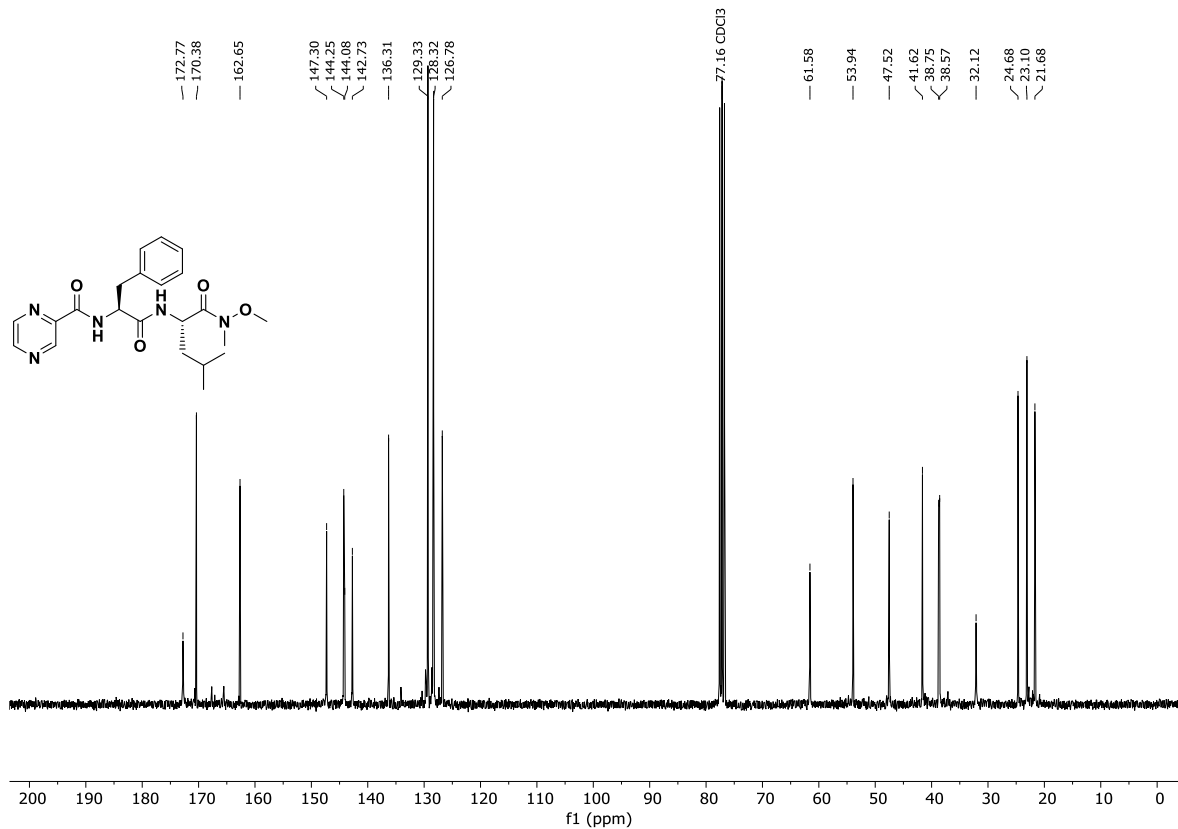


Abb. 12.192: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, CDCl₃) von *N*-(Pyrazinoyl-L-phenylalanyl)-L-leucin-*N'*-methoxy-methylamid (**146**).

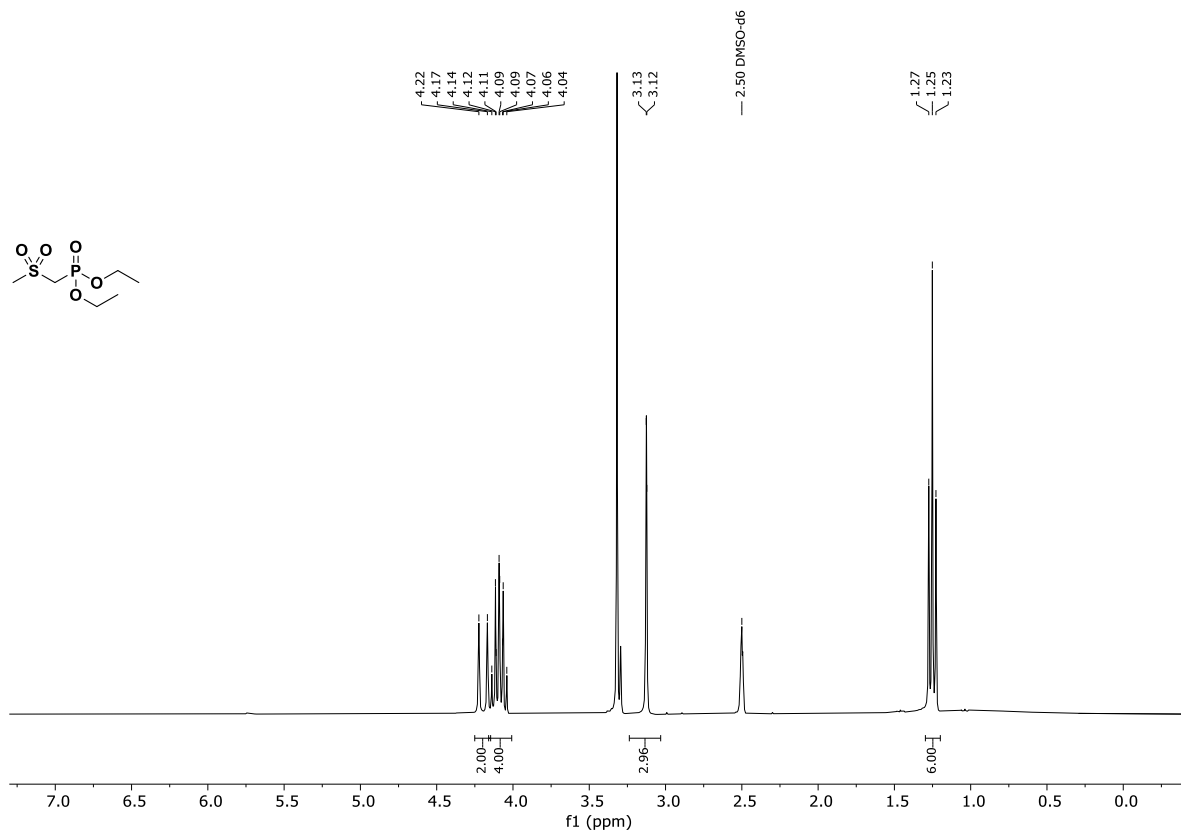


Abb. 12.193: ^1H -NMR-Spektrum (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) von Diethyl((methylsulfonyl)methyl)phosphonat (**156**).

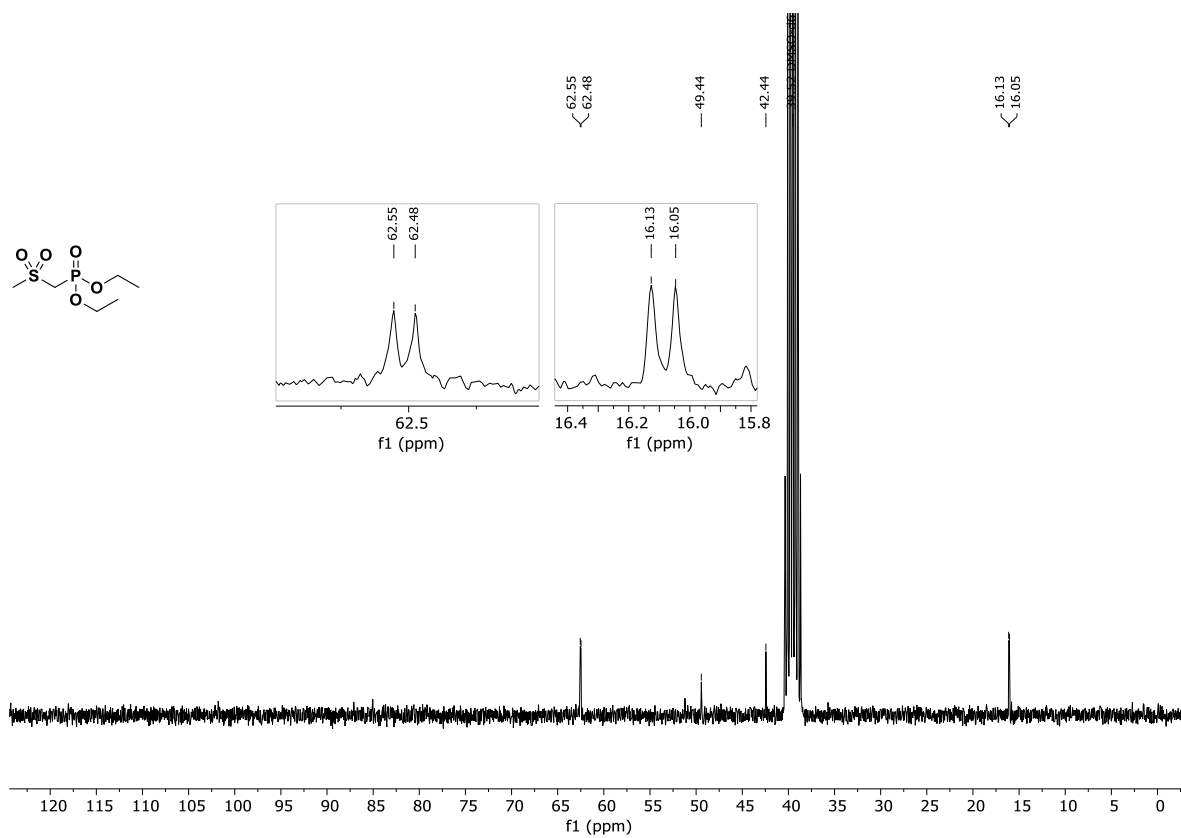
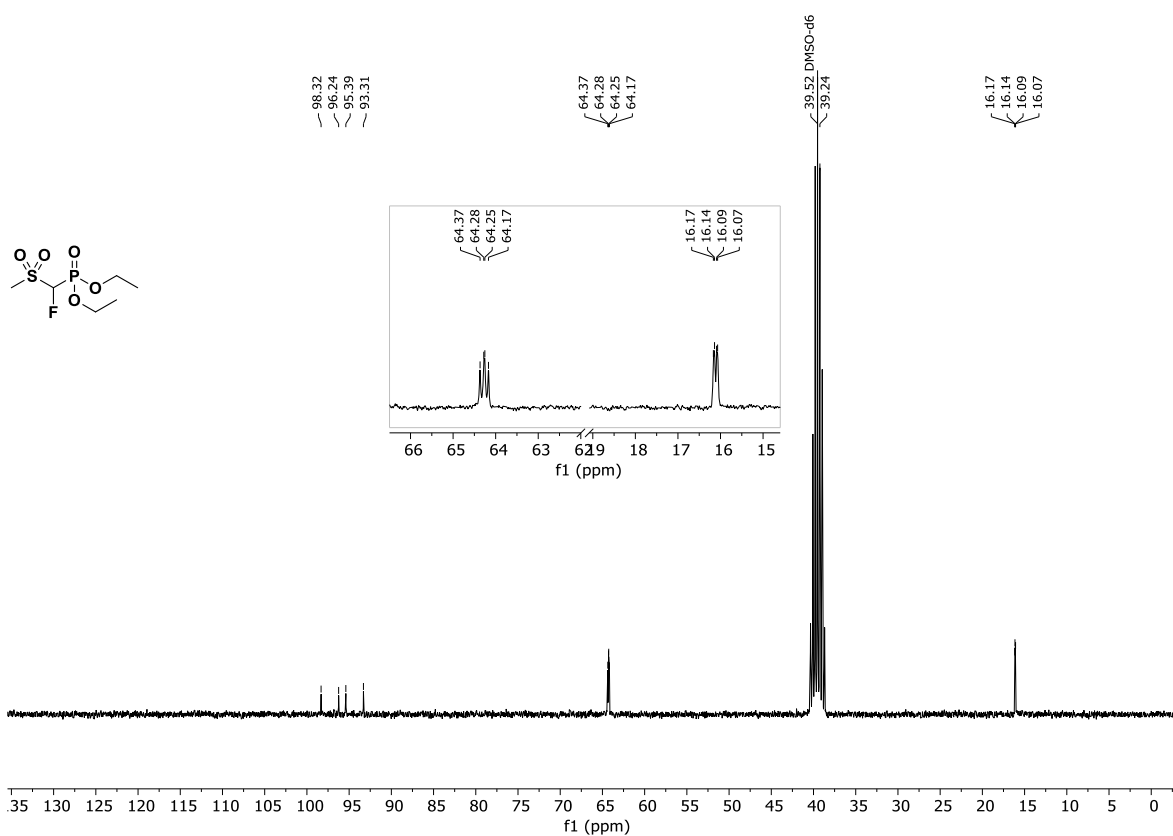
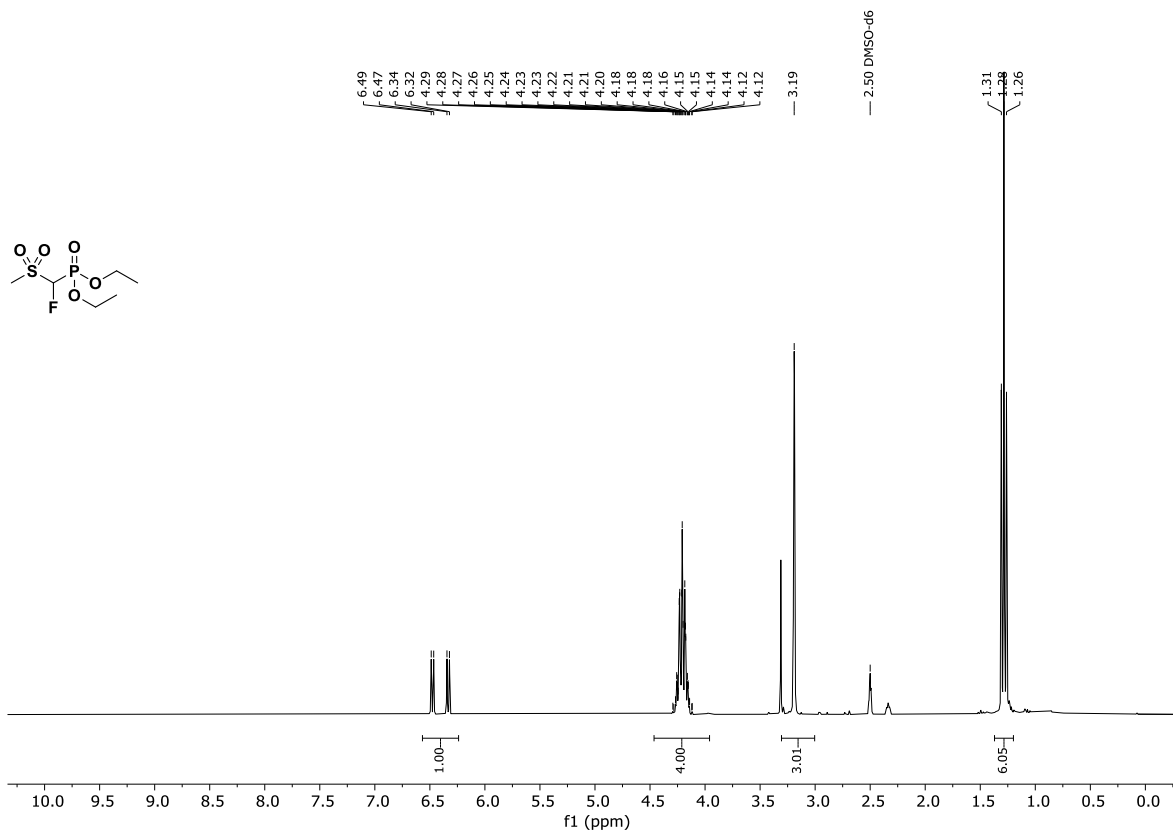


Abb. 12.194: ^{13}C -NMR-Spektrum (75.5 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) von Diethyl((methylsulfonyl)methyl)phosphonat (**156**).



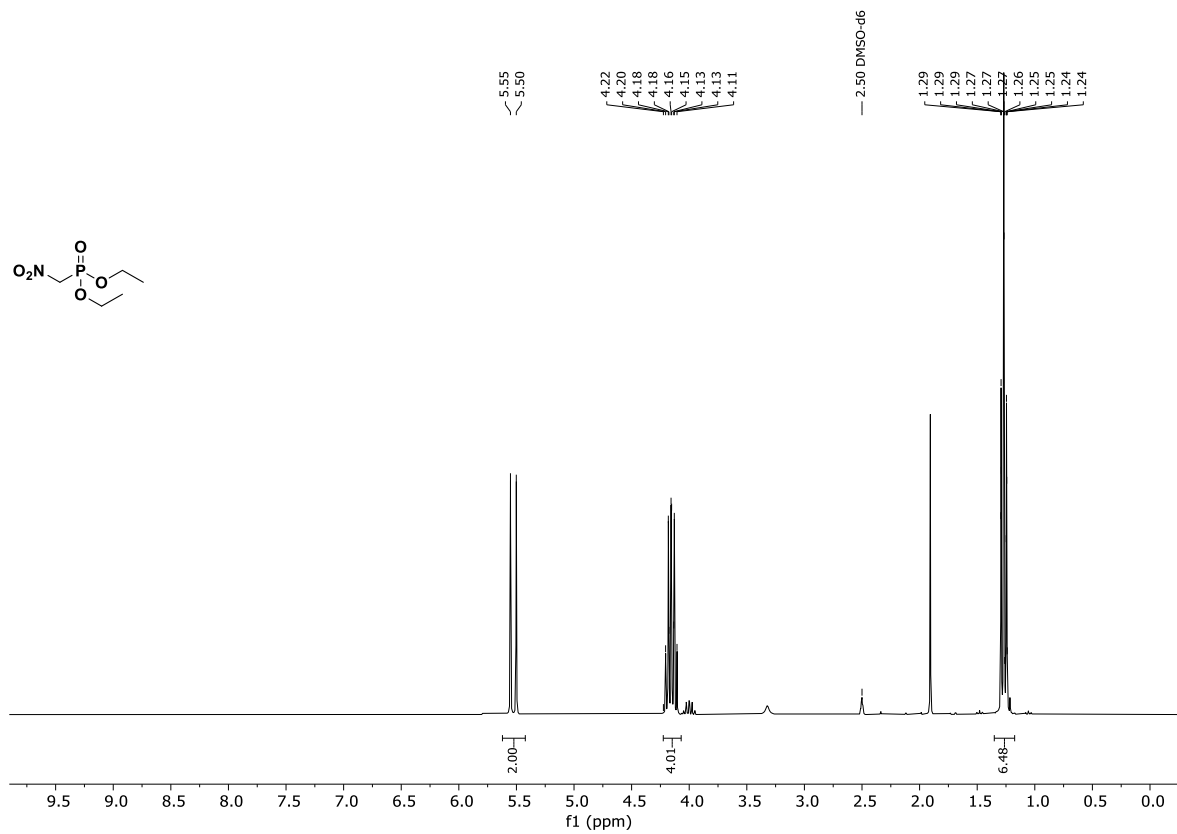


Abb. 12.197: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) von Diethyl(nitromethyl)phosphonat (159).

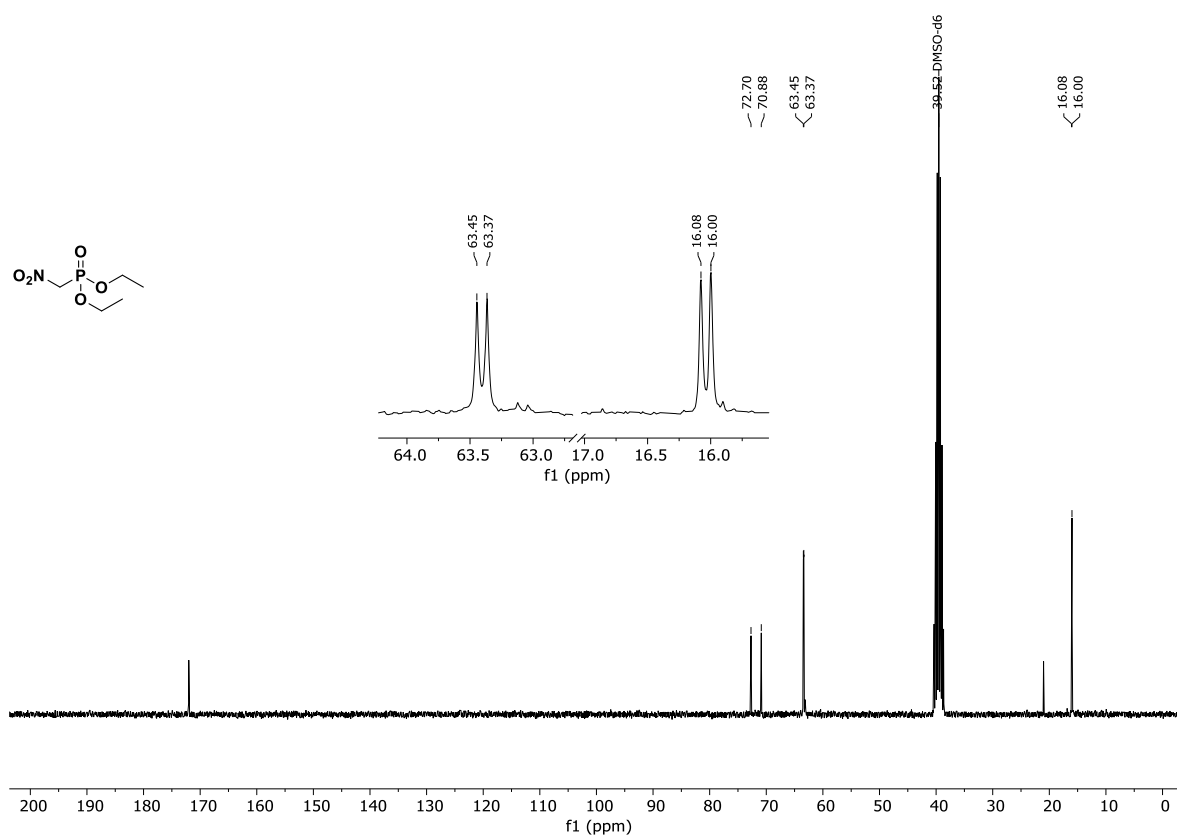


Abb. 12.198: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (75.5 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) von Diethyl(nitromethyl)phosphonat (159).

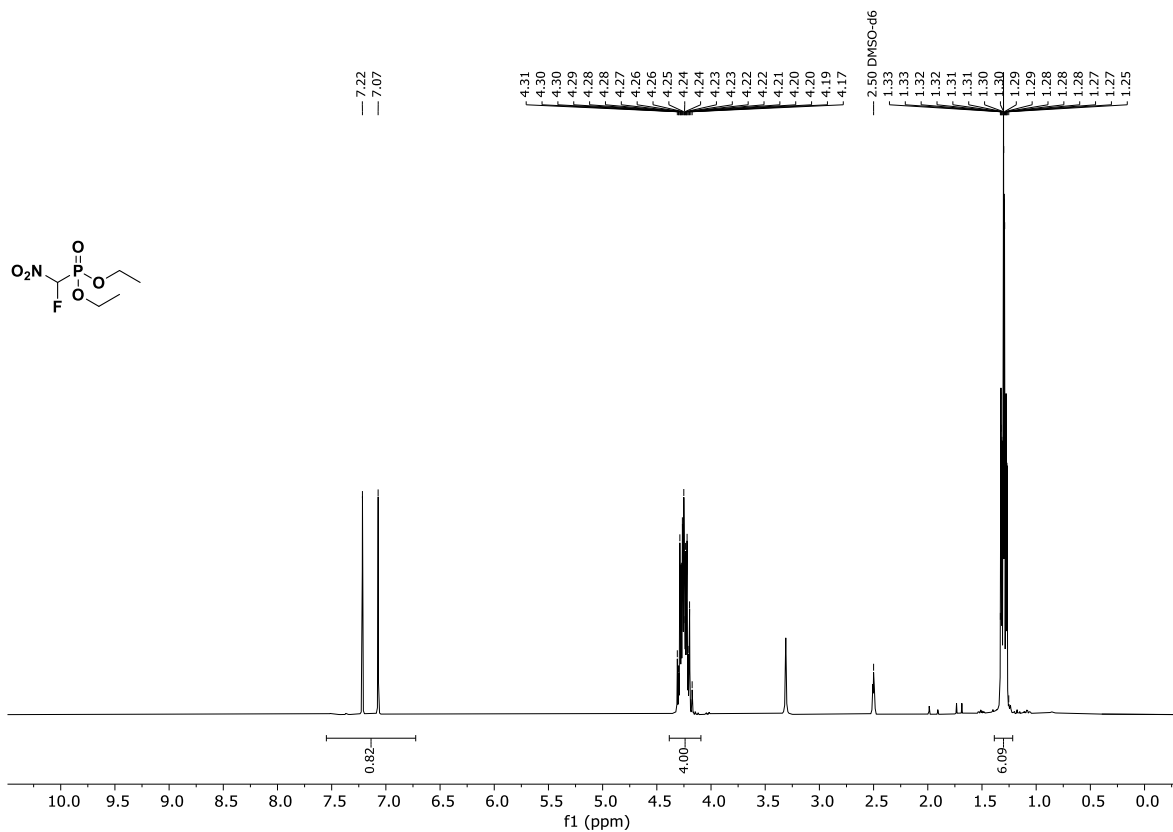


Abb. 12.199: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, DMSO-*d*₆) von Diethyl(fluor(nitro)methyl)phosphonat (**160**).

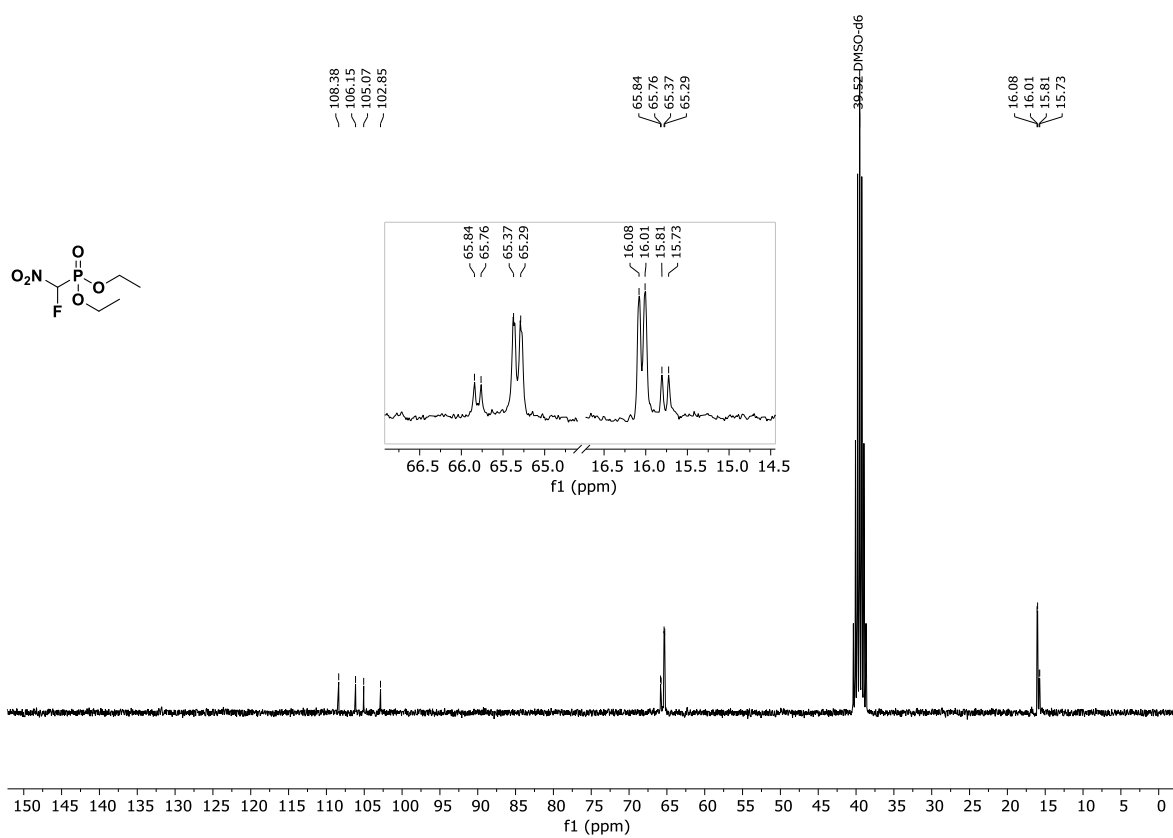


Abb. 12.200: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) von Diethyl(fluor(nitro)methyl)phosphonat (**160**).

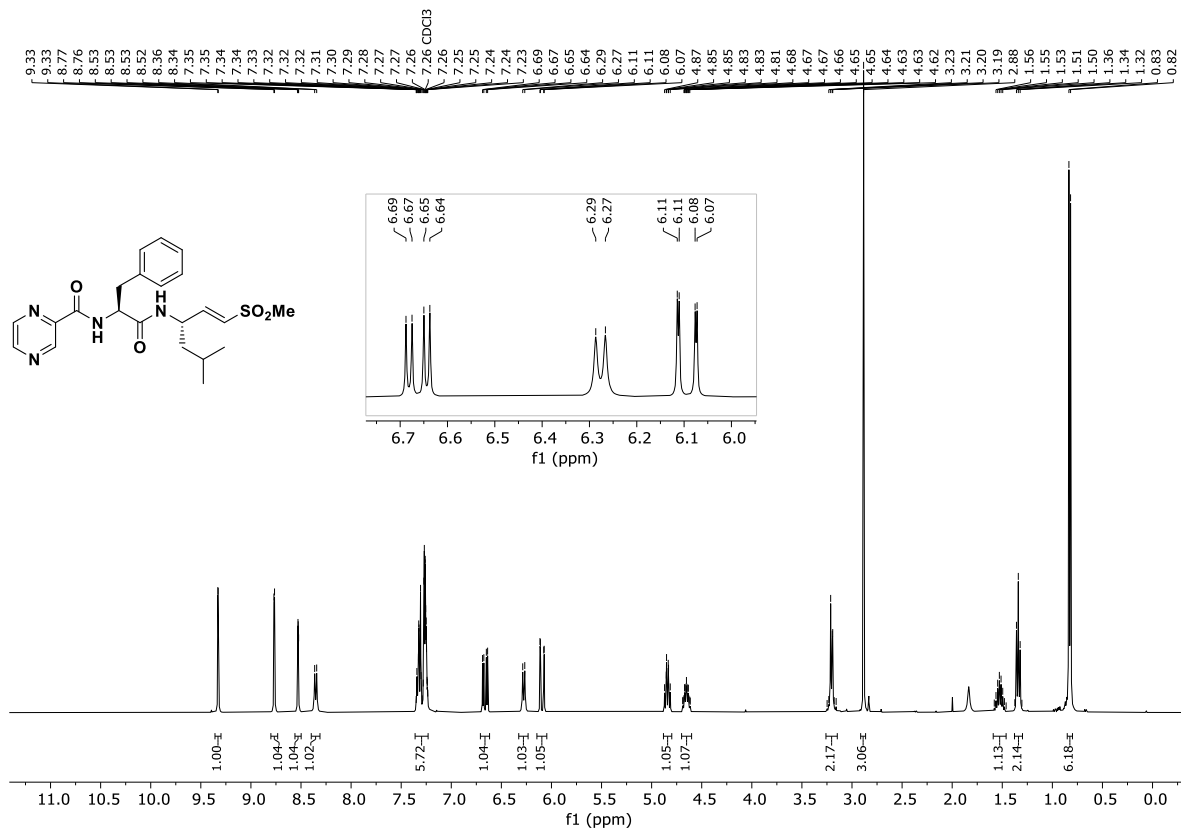


Abb. 12.201: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl₃) von (*S,E*)-5-Methyl-3-((*N*-pyrazinoyl-*L*-phenylalanyl)amino)-1-(methylsulfonyl)hex-1-en (**109**).

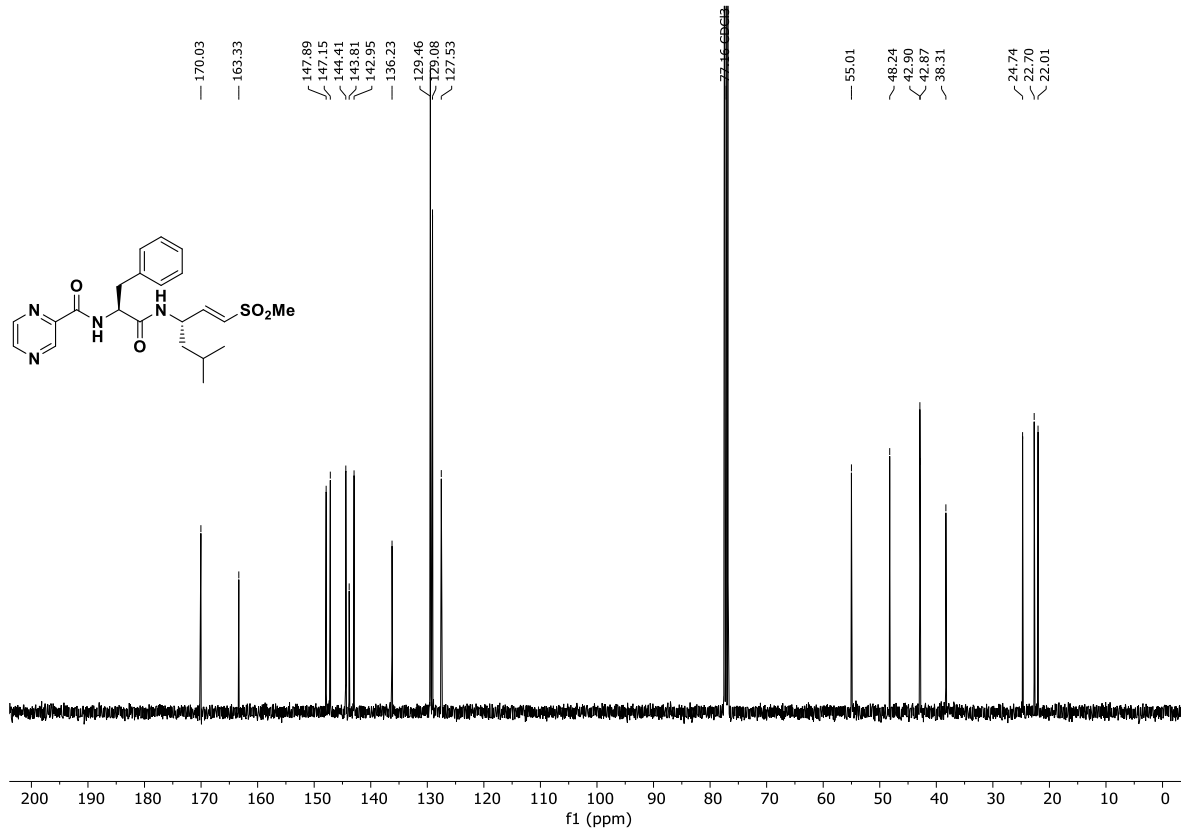


Abb. 12.202: ¹³C-NMR-Spektrum (100.6 MHz, CDCl₃) von (*S,E*)-5-Methyl-3-((*N*-pyrazinoyl-*L*-phenylalanyl)amino)-1-(methylsulfonyl)hex-1-en (**109**).

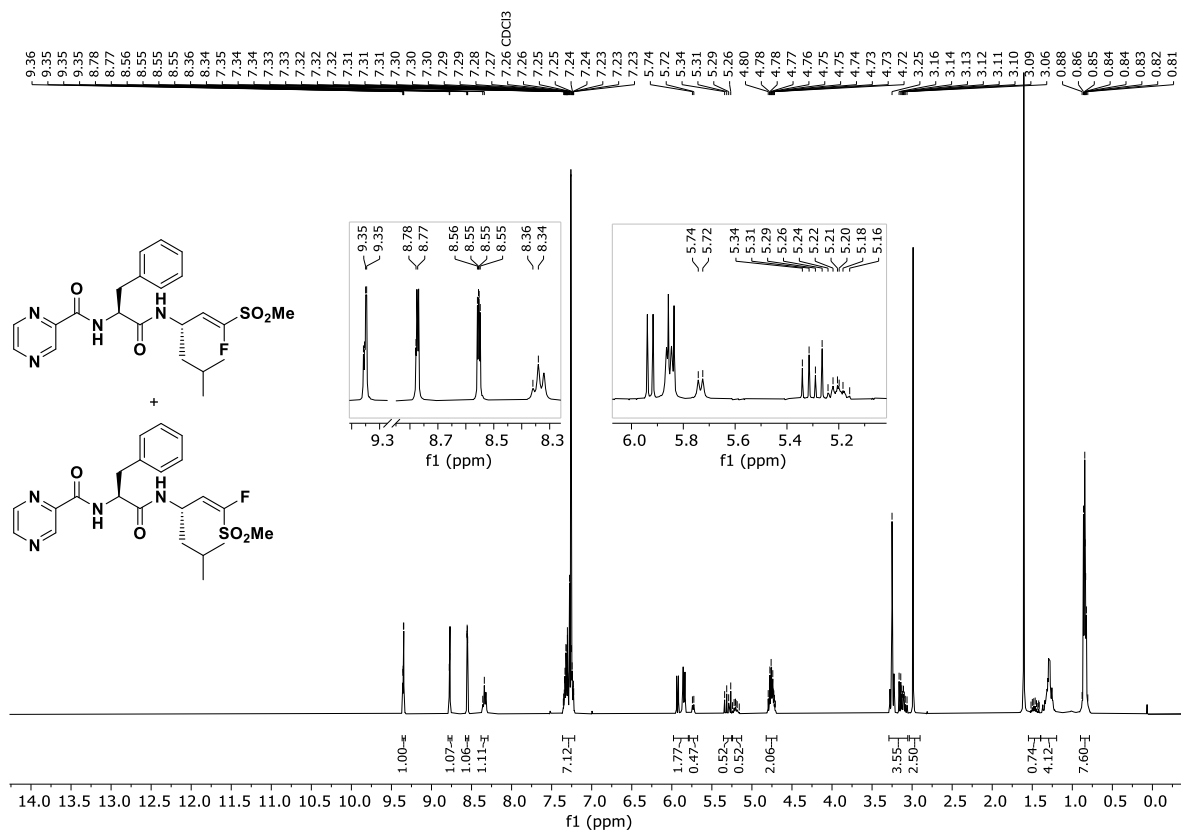


Abb. 12.203: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (400 MHz, CDCl_3) von (*S,E*)-5-Methyl-3-((*N*-pyrazinoyl-*L*-phenylalanyl)amino)-1-(methylsulfonyl)hex-1-en (**112**).

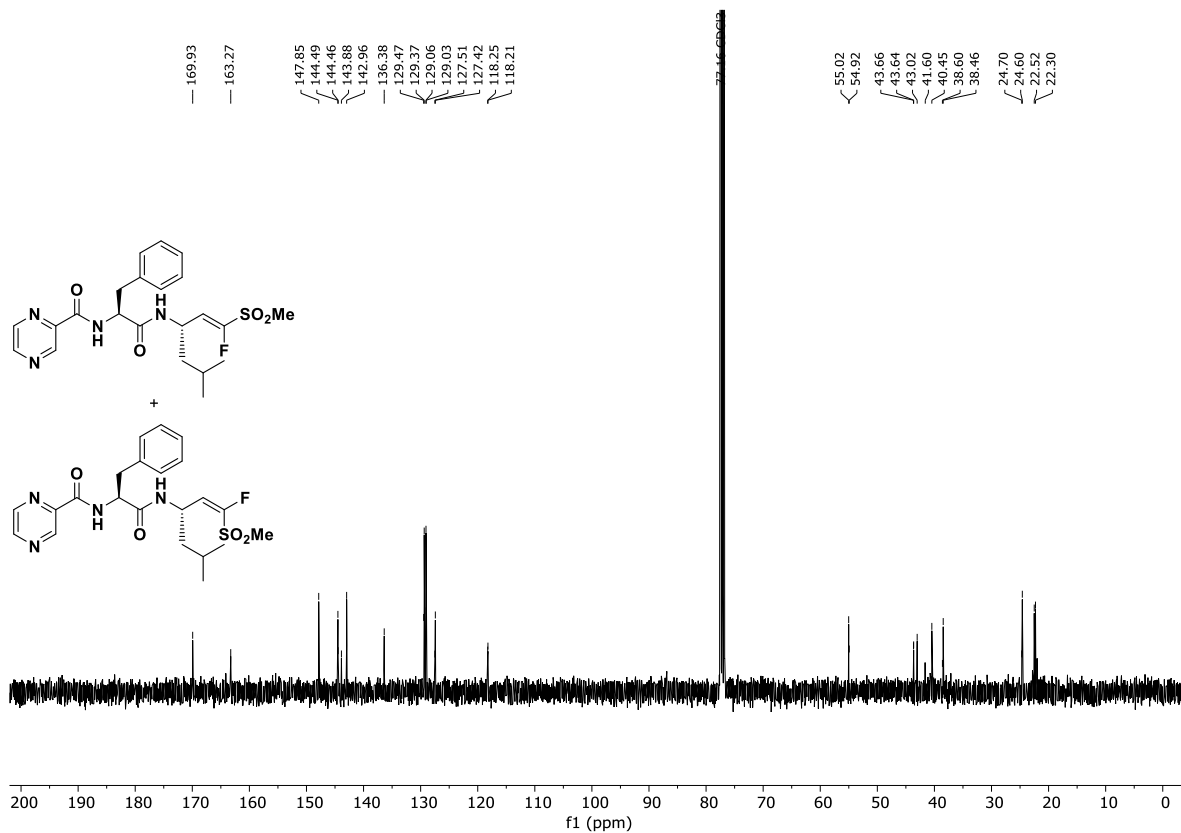


Abb. 12.204: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (100.6 MHz, CDCl_3) von (*S,E*)-5-Methyl-3-((*N*-pyrazinoyl-*L*-phenylalanyl)amino)-1-(methylsulfonyl)hex-1-en (**112**).

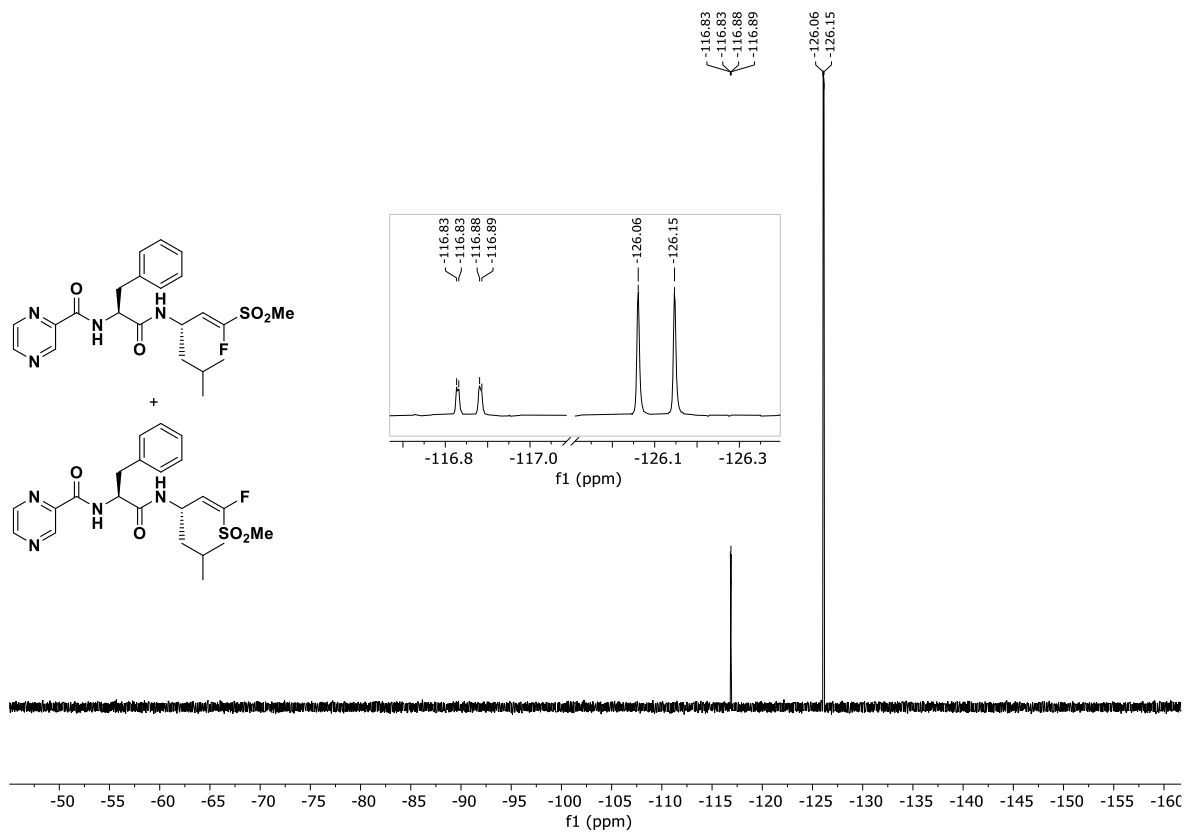


Abb. 12.205: ¹⁹F-NMR-Spektrum (376 MHz, CDCl₃) von (*S,E*)-5-Methyl-3-((*N*-pyrazinoyl-*L*-phenylalanyl)amino)-1-(methylsulfonyl)hex-1-en (**112**).

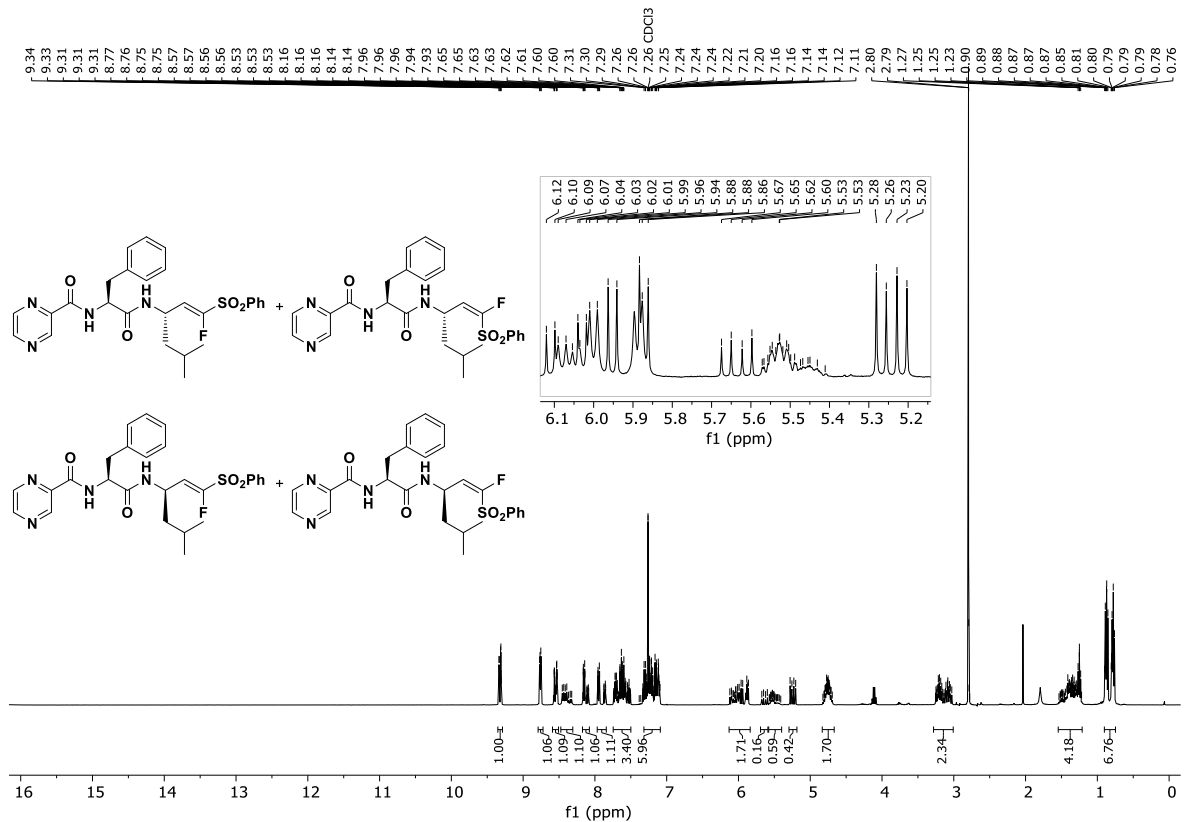


Abb. 12.206: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl₃) von (*RS,E*)-5-Methyl-3-((*N*-pyrazinoyl-*DL*-phenylalanyl)amino)-1-(phenylsulfonyl)hex-1-en (**113**).

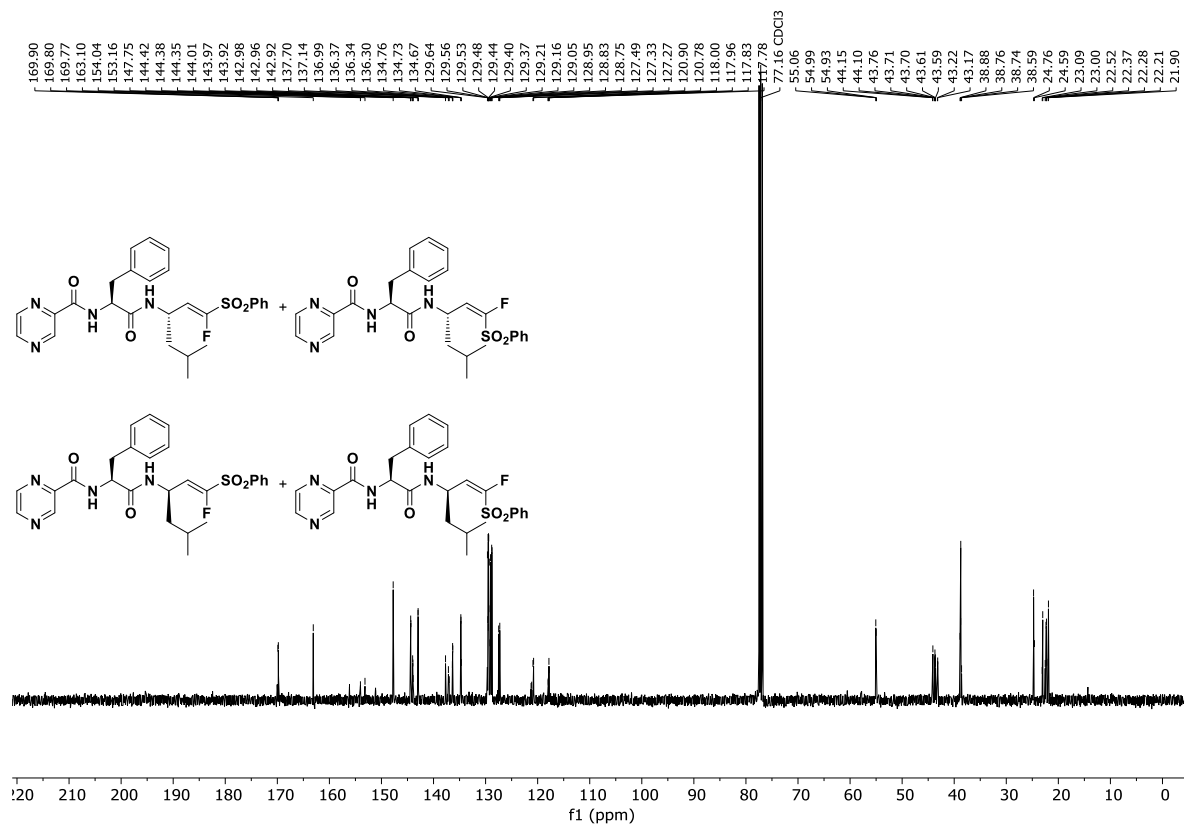


Abb. 12.207: ^{13}C -NMR-Spektrum (100.6 MHz, CDCl_3) von (*RS,E*)-5-Methyl-3-((*N*-pyrazinoyl-DL-phenylalanyl)amino)-1-(phenylsulfonyl)hex-1-en (**113**).

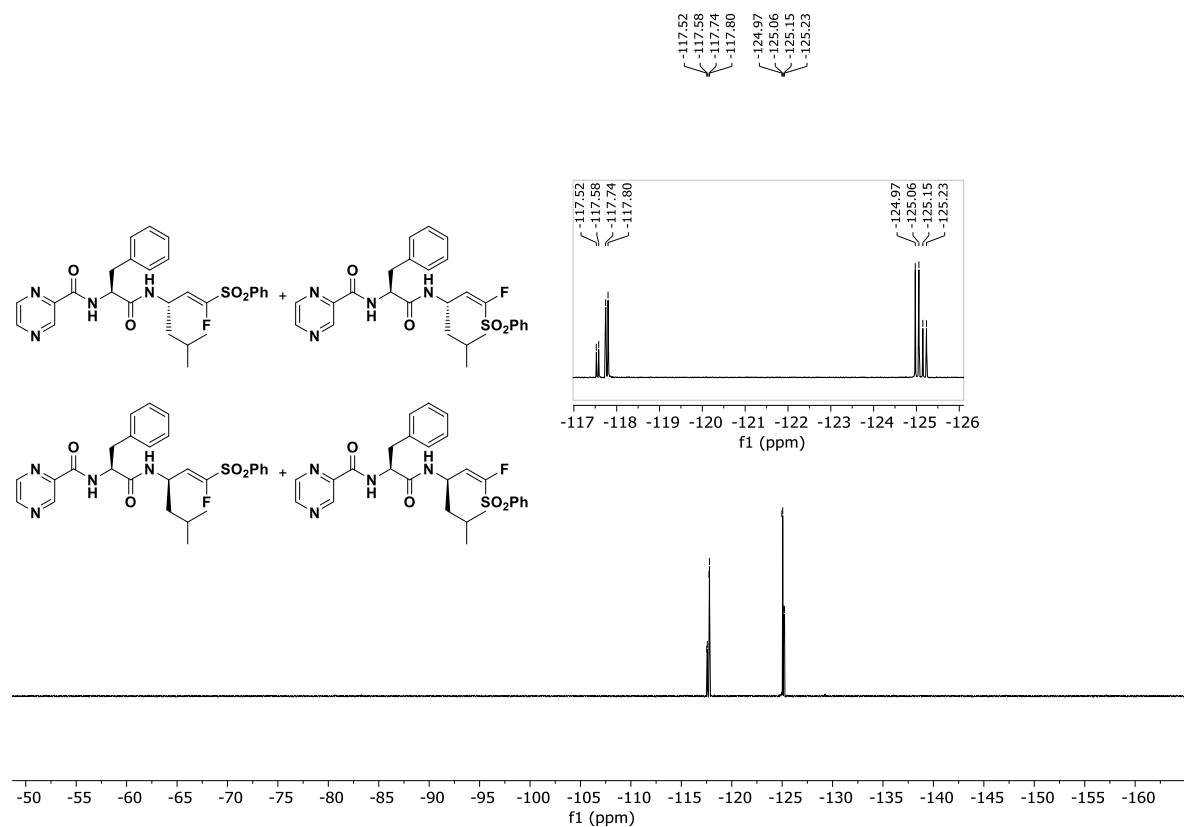


Abb. 12.208: ^{19}F -NMR-Spektrum (376 MHz, CDCl_3) von (*RS,E*)-5-Methyl-3-((*N*-pyrazinoyl-DL-phenylalanyl)amino)-1-(phenylsulfonyl)hex-1-en (**113**).

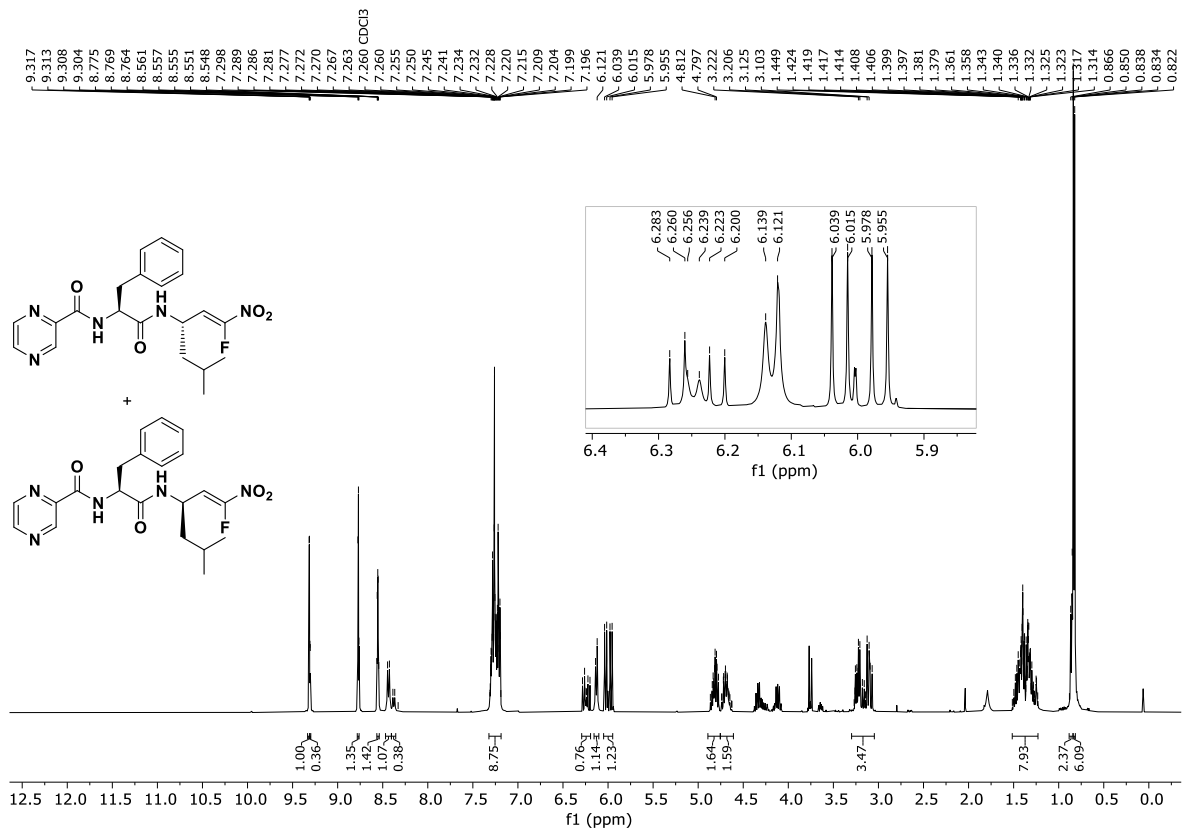


Abb. 12.211: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (400 MHz, CDCl_3) von (S,Z) -1-Fluor-5-methyl-3-((*N*-pyrazinoyl-*L*-phenylalanyl)-amino)-1-nitrohex-1-en (**114**).

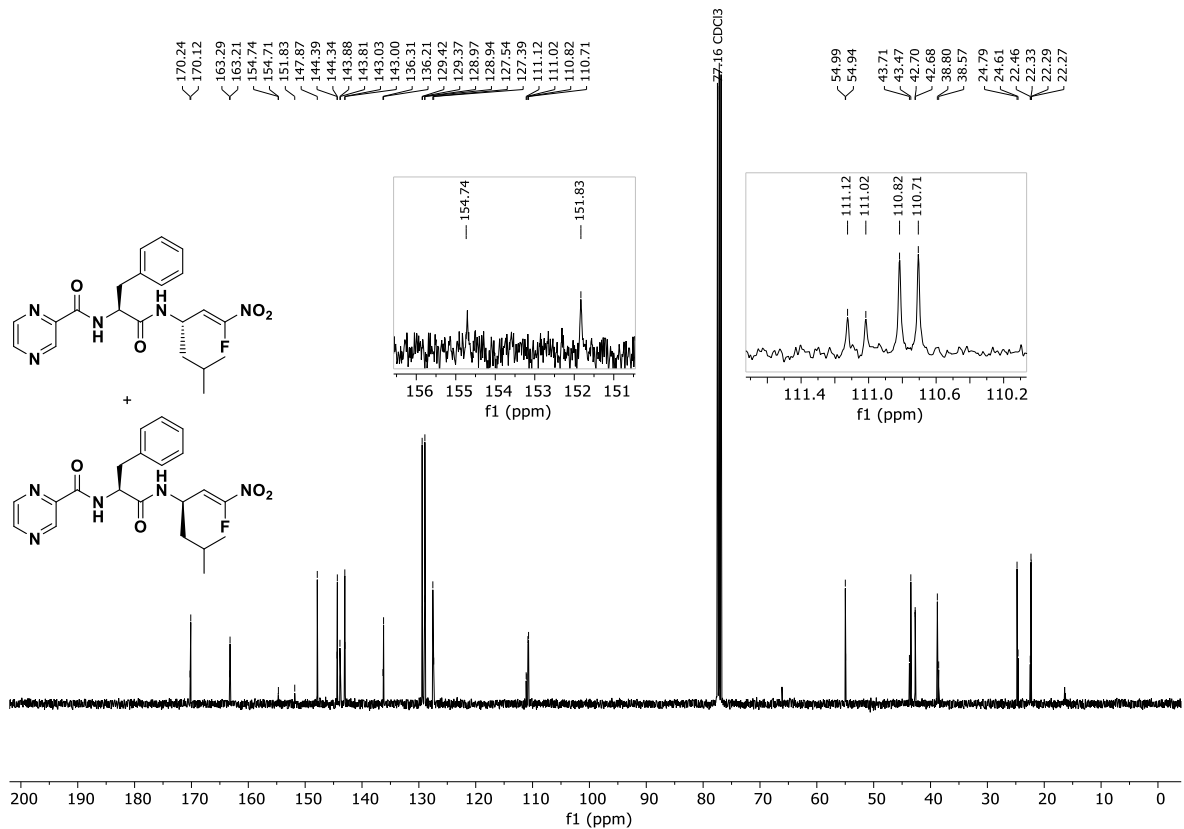


Abb. 12.212: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (100.6 MHz, CDCl_3) von (S,Z) -1-Fluor-5-methyl-3-((*N*-pyrazinoyl-*L*-phenylalanyl)-amino)-1-nitrohex-1-en (**114**).

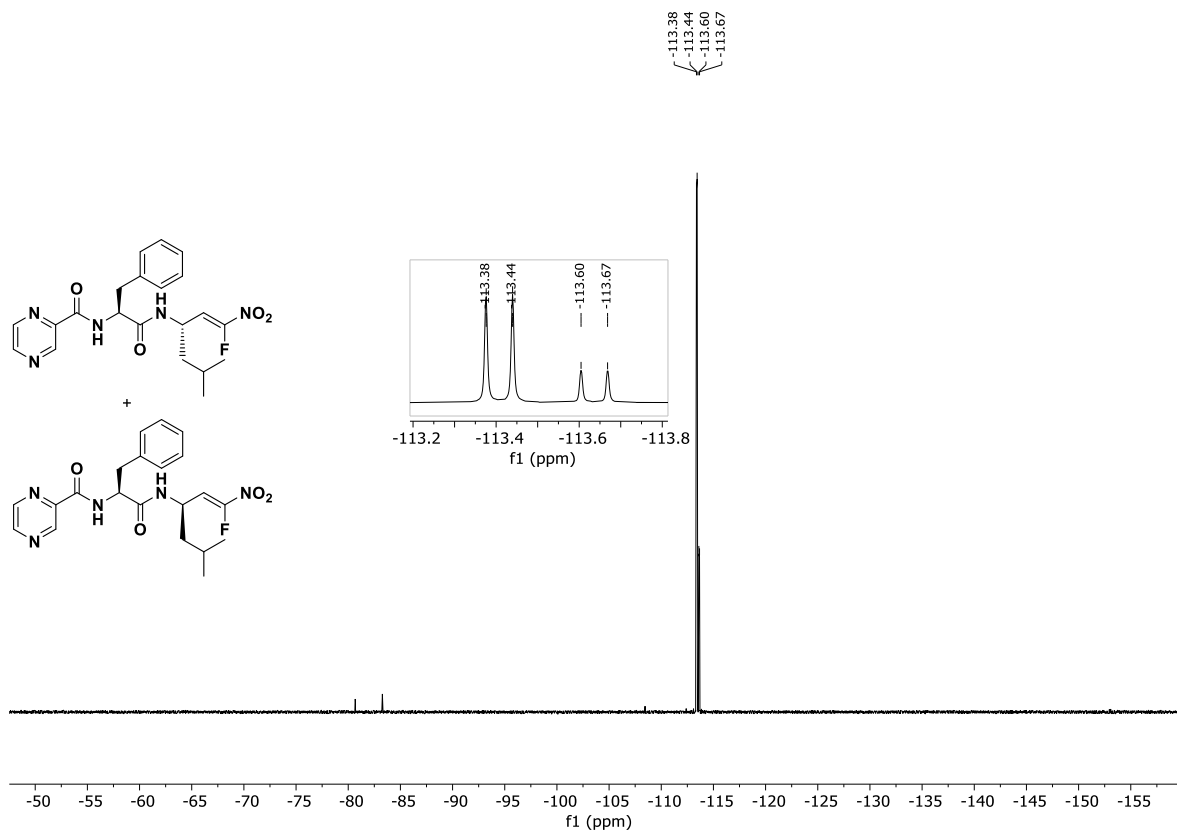


Abb. 12.213: ^{19}F -NMR-Spektrum (376 MHz, CDCl_3) von (*S,Z*)-1-Fluor-5-methyl-3-((*N*-pyrazinoyl-*L*-phenylalanyl)-amino)-1-nitrohex-1-en (**114**).

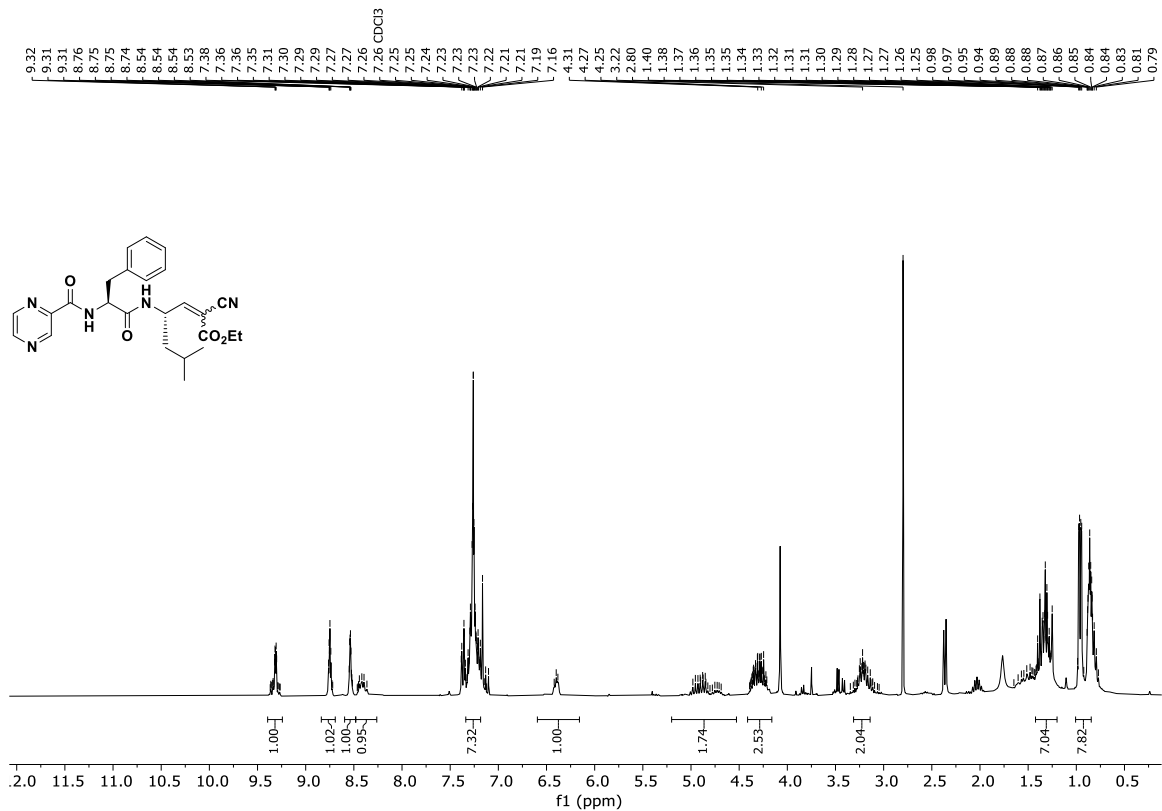


Abb. 12.214: ^1H -NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl_3) von (*S,E/Z*)-2-Cyano-6-methyl-4-((*N*-pyrazinoyl-*L*-phenylalanyl)-amino)hept-2-ensäure-methylester (**118**).

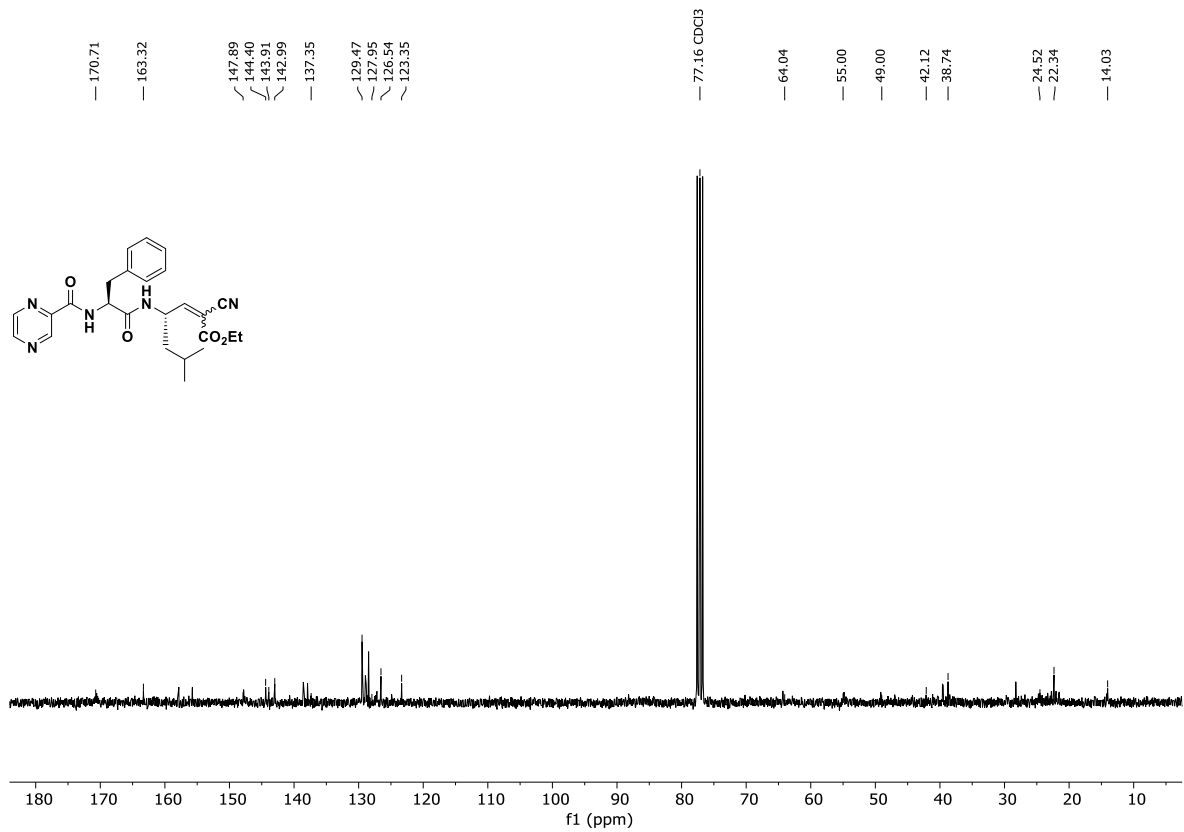


Abb. 12.215: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (75.5 MHz, CDCl_3) von (*S,E/Z*)-2-Cyano-6-methyl-4-((*N*-pyrazinoyl-*L*-phenylalanyl)amino)hept-2-ensäure-methylester (**118**).

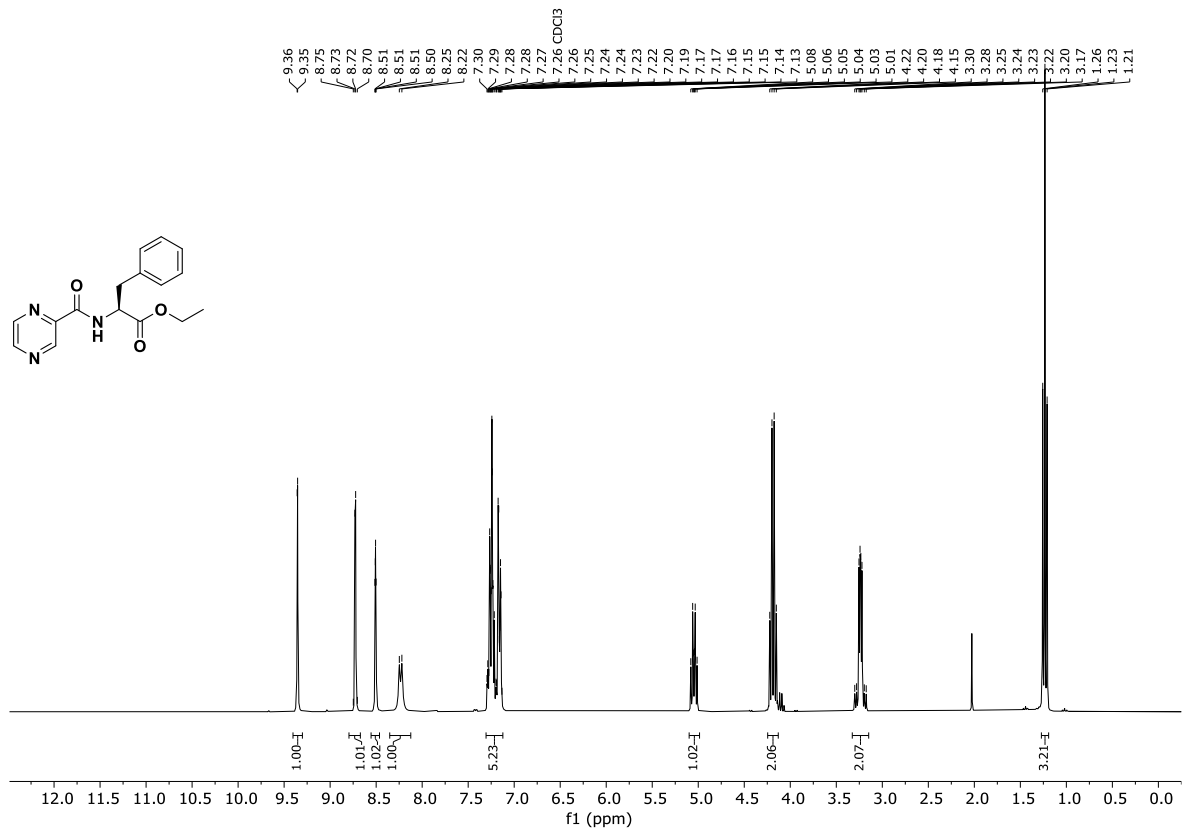


Abb. 12.216: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (300 MHz, CDCl_3) von (Pyrazin-2-carbonyl)-*L*-phenylalaninethylester (**127**).

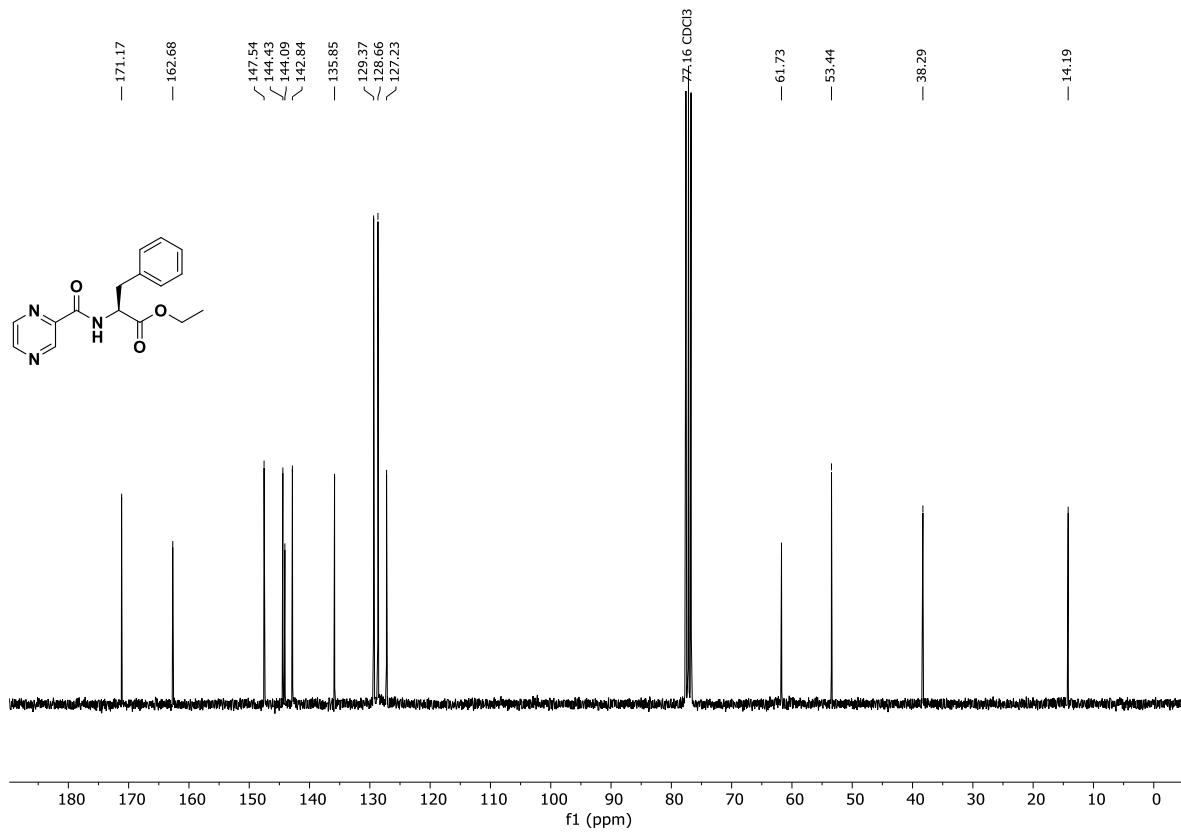


Abb. 12.217: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, CDCl₃) von (Pyrazin-2-carbonyl)-L-phenylalaninethylester (127).

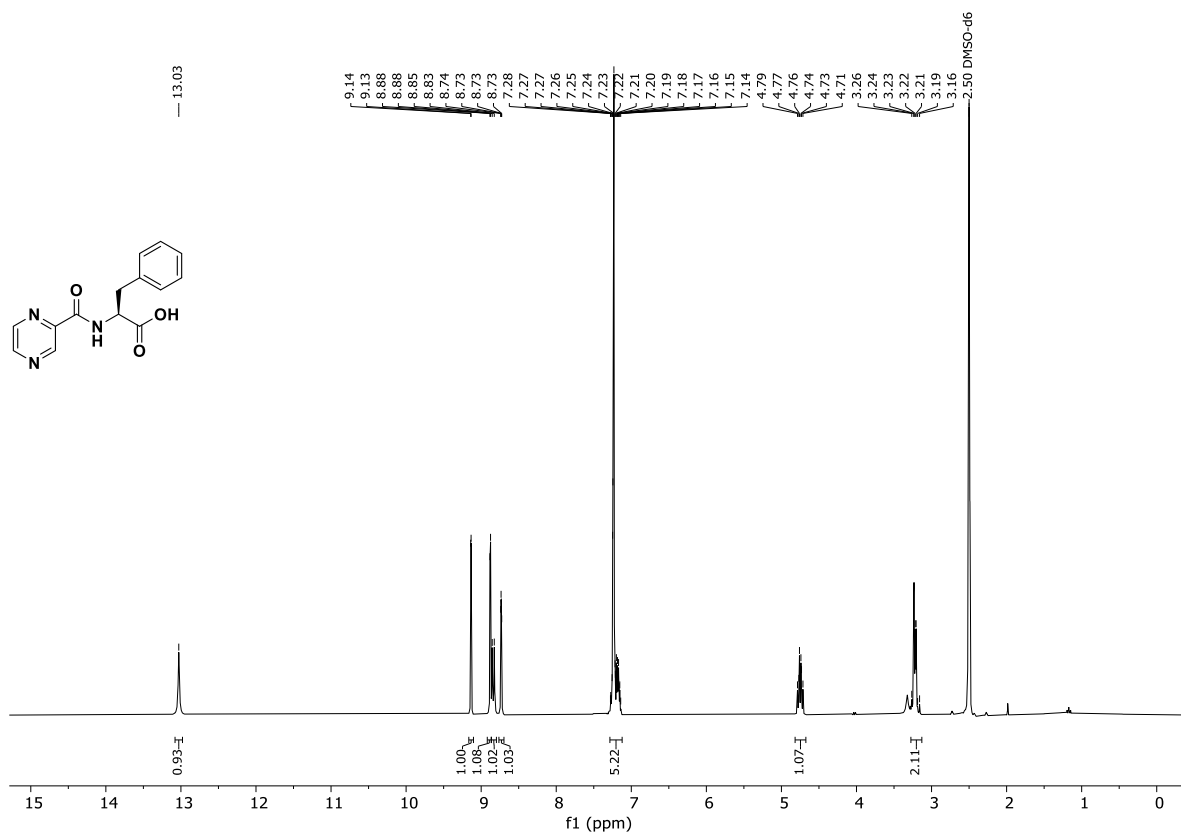


Abb. 12.218: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl₃) von (Pyrazin-2-carbonyl)-L-phenylalanin (128).

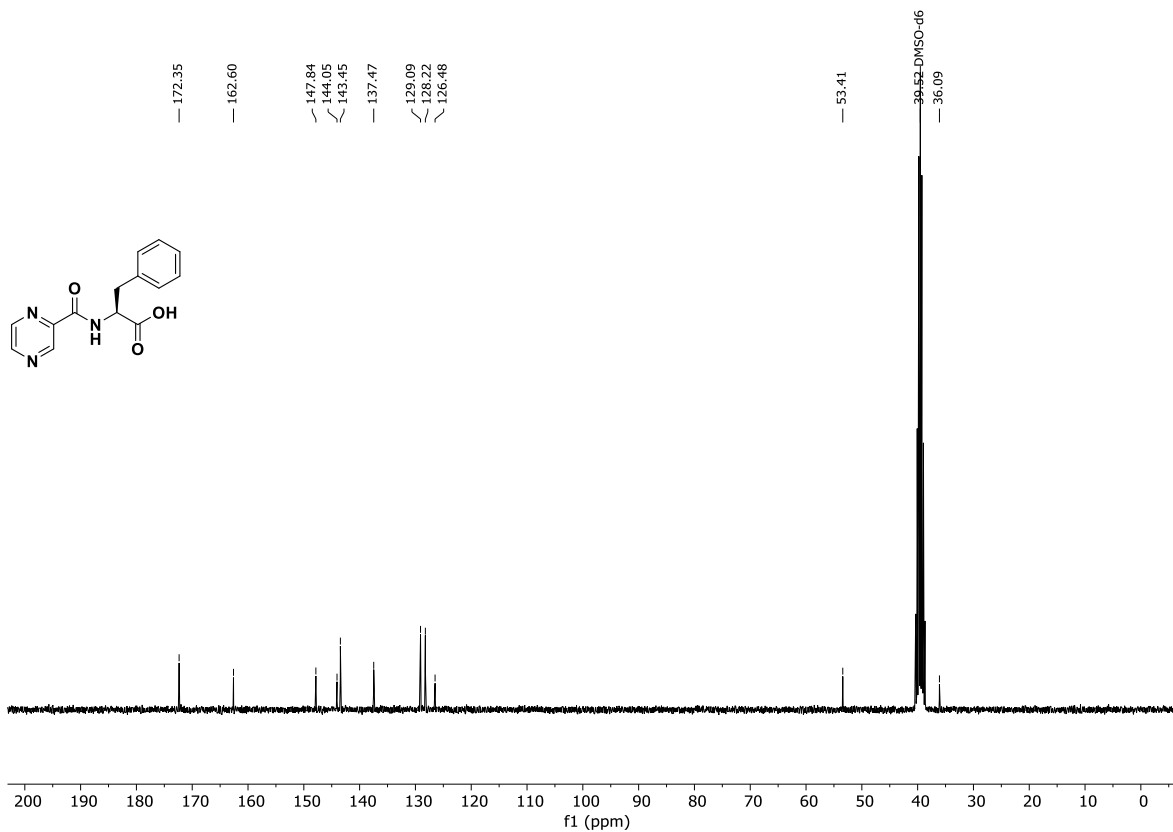


Abb. 12.219: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (75.5 MHz, CDCl_3) von (Pyrazin-2-carbonyl)-L-phenylalanin (128).

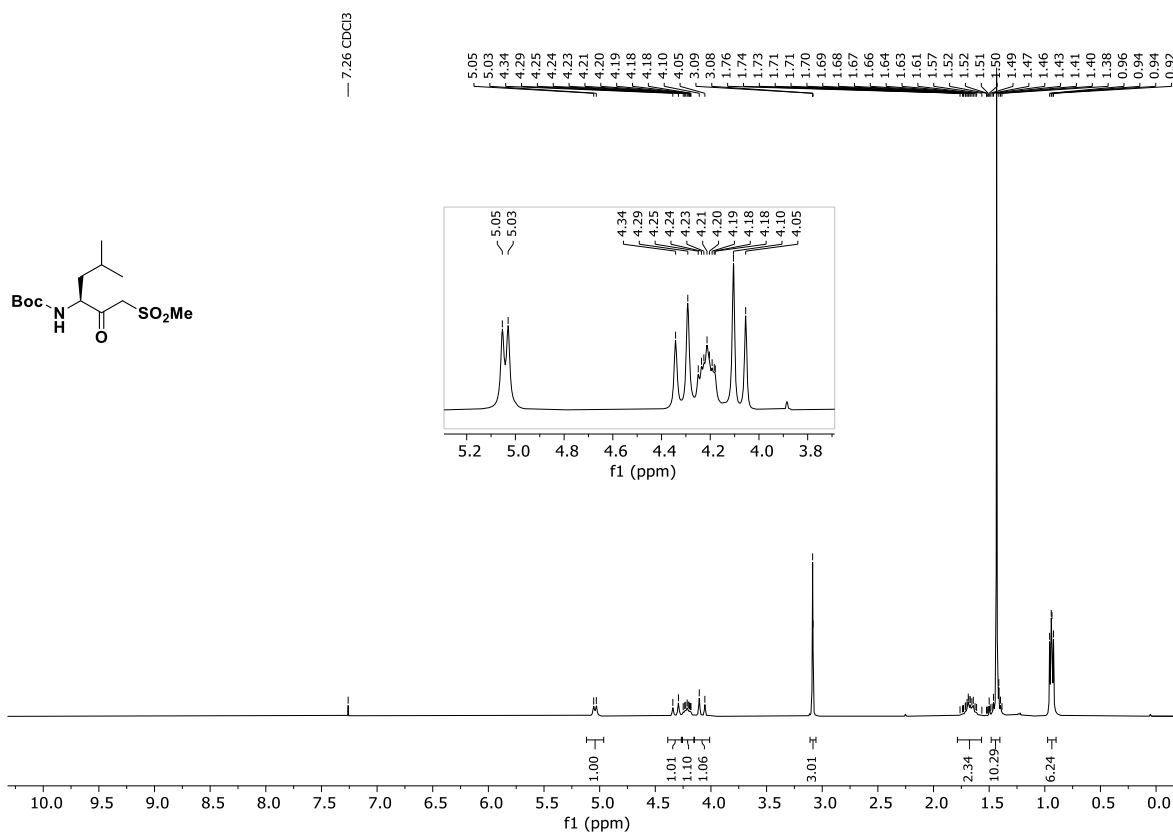


Abb. 12.220: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (300 MHz, CDCl_3) von *N*-Boc-(*S*)-(3-amino-5-methyl-2-oxohexyl)sulfonylmethan (164).

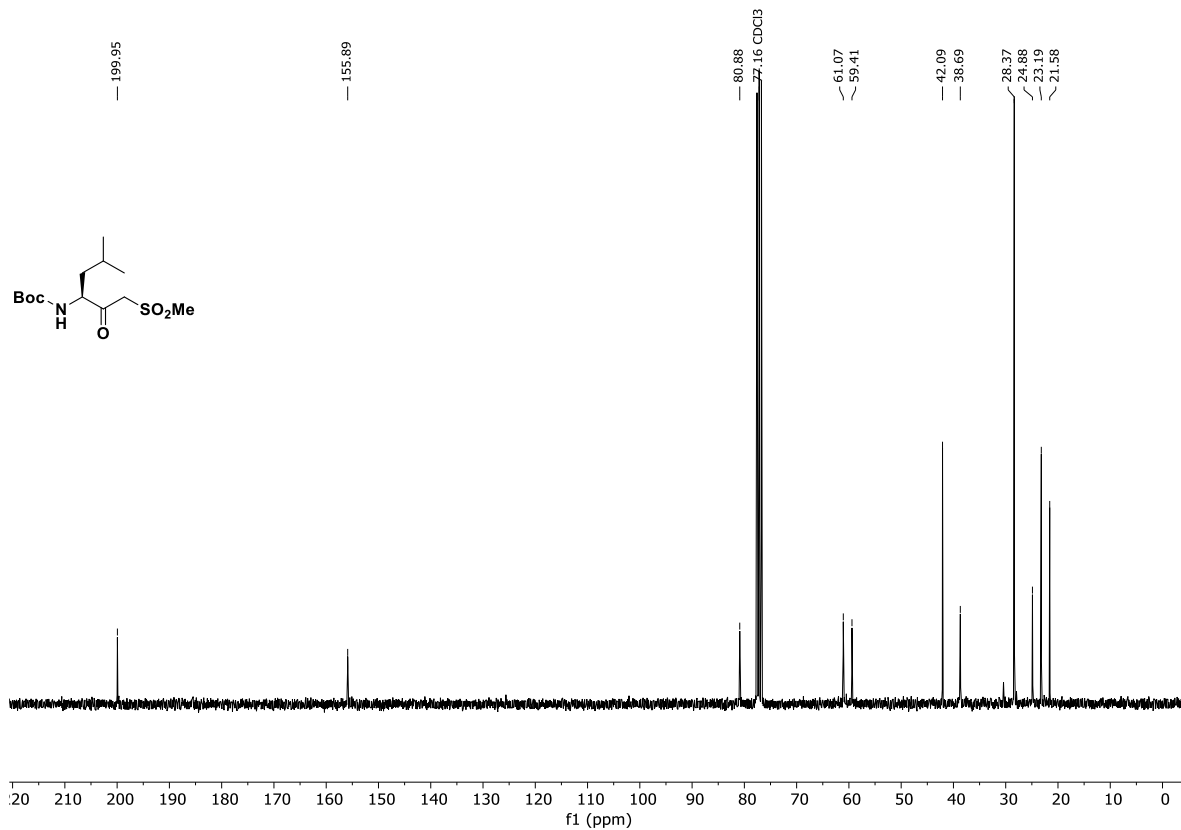


Abb. 12.221: ^{13}C -NMR-Spektrum (75.5 MHz, CDCl₃) von *N*-Boc-(*S*)-(3-amino-5-methyl-2-oxohexyl)sulfonylmethan (**164**).

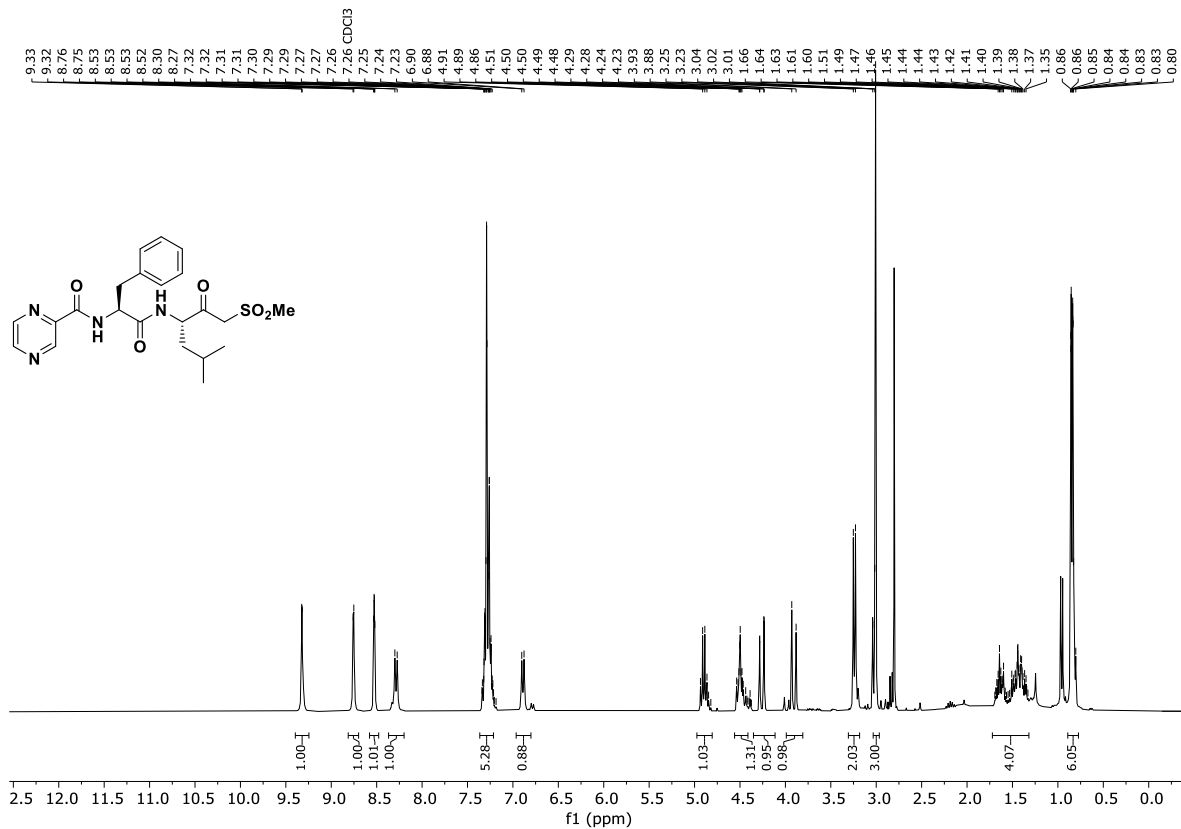


Abb. 12.222: ^1H -NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl₃) von *N*-(Pyrazinoyl-*L*-phenylalanyl)-(*S*)-(3-amino-5-methyl-2-oxohexyl)sulfonylmethan (**119**).

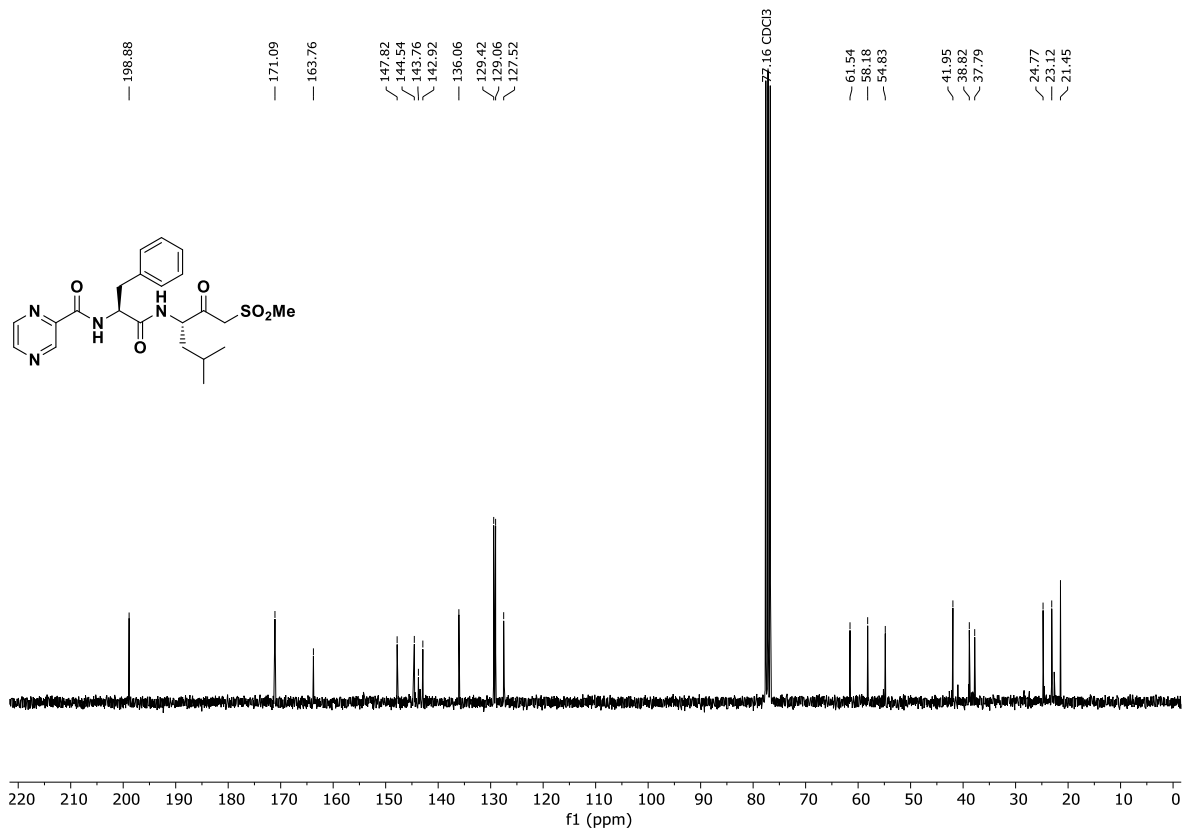


Abb. 12.223: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, CDCl₃) von *N*-(Pyrazinoyl-*L*-phenylalanyl)-(*S*)-(3-amino-5-methyl-2-oxohexyl)sulfonylmethan (**119**).

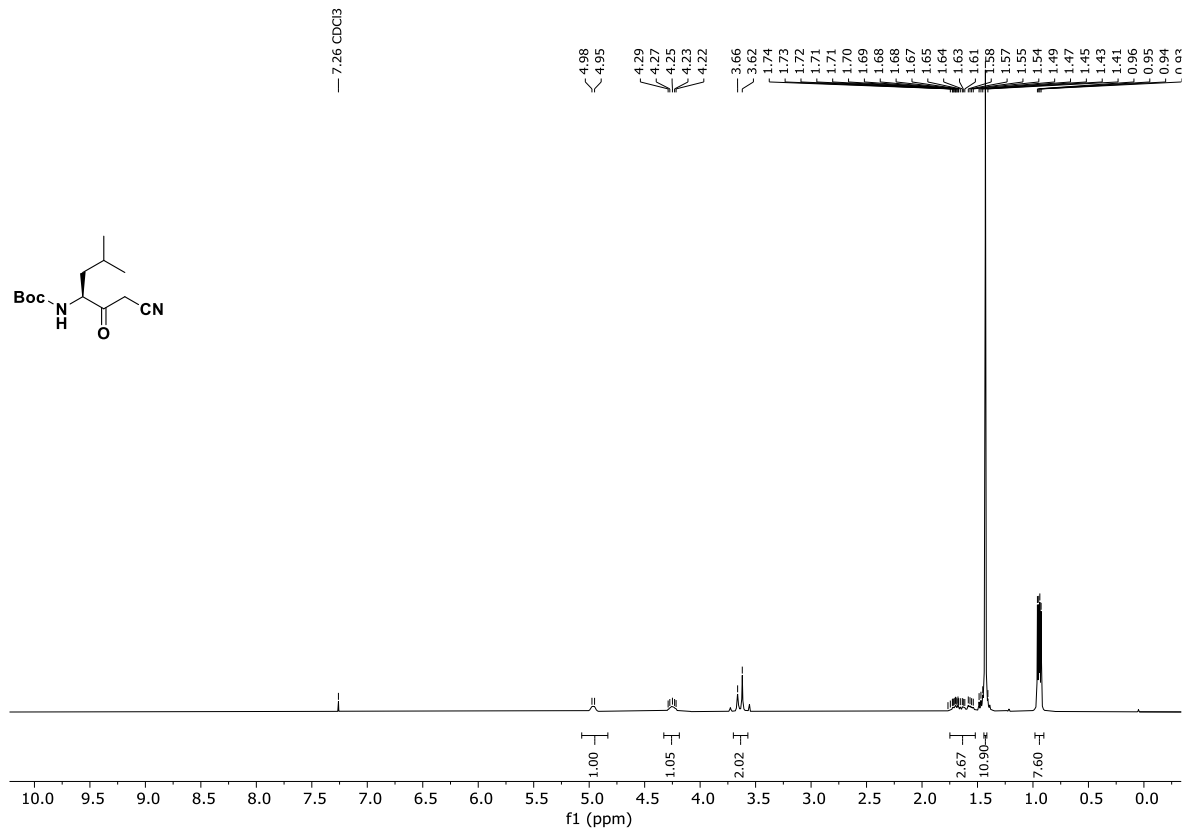


Abb. 12.224: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl₃) von *N*-Boc-(*S*)-(3-amino-5-methyl-2-oxohexyl)methylnitril (**166**).

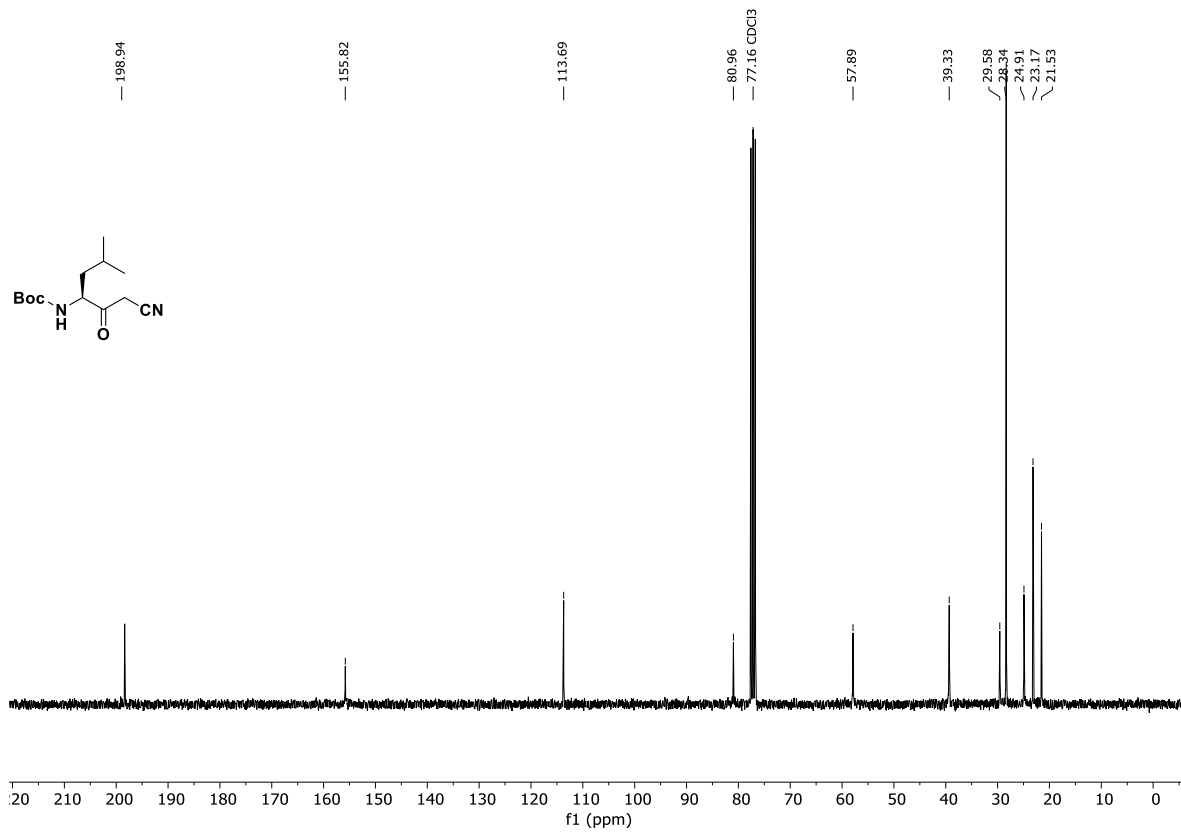


Abb. 12.225: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, CDCl₃) von *N*-Boc-(*S*)-(3-amino-5-methyl-2-oxohexyl)methylnitril (**166**).

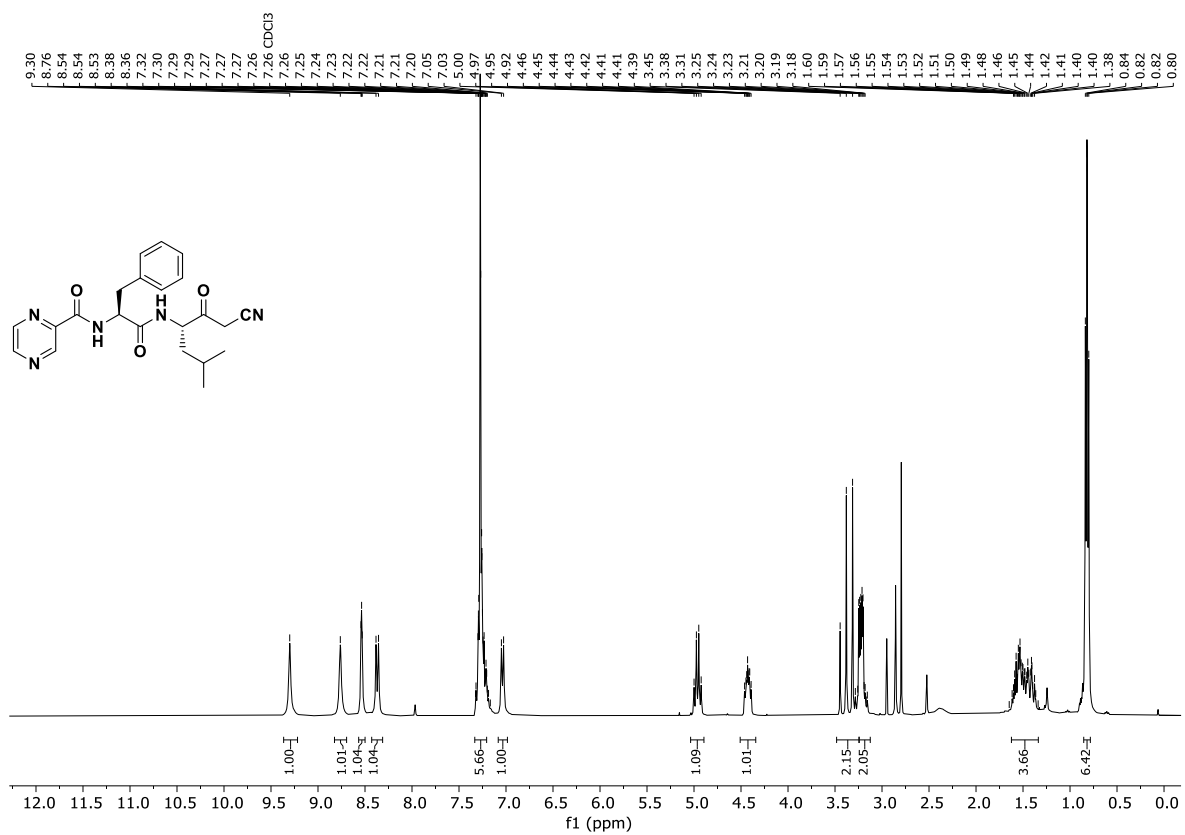


Abb. 12.226: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl₃) von *N*-(Pyrazinoyl-*L*-phenylalanyl)-(*S*)-(3-amino-5-methyl-2-oxohexyl)methylnitril (**120**).

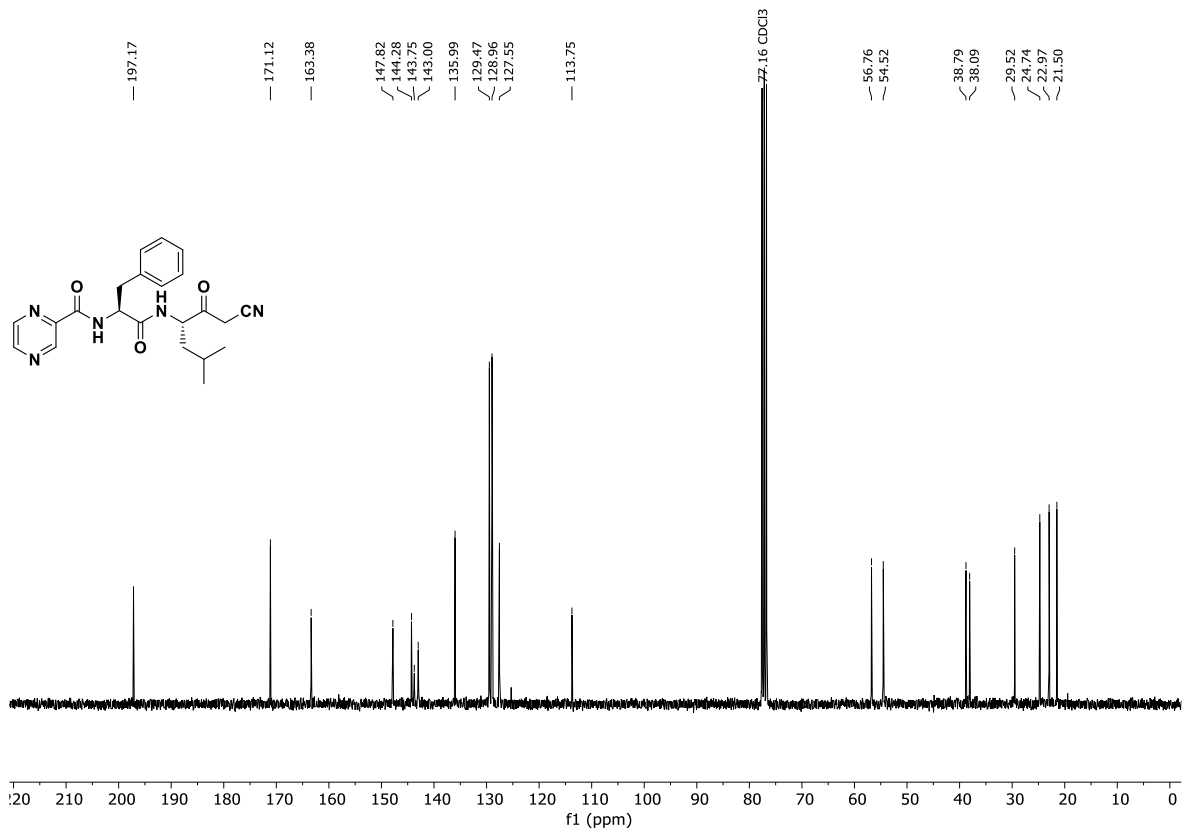


Abb. 12.227: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (75.5 MHz, CDCl₃) von *N*-(Pyrazinoyl-*L*-phenylalanyl)-(*S*)-(3-amino-5-methyl-2-oxohexyl)methynitril (**120**).

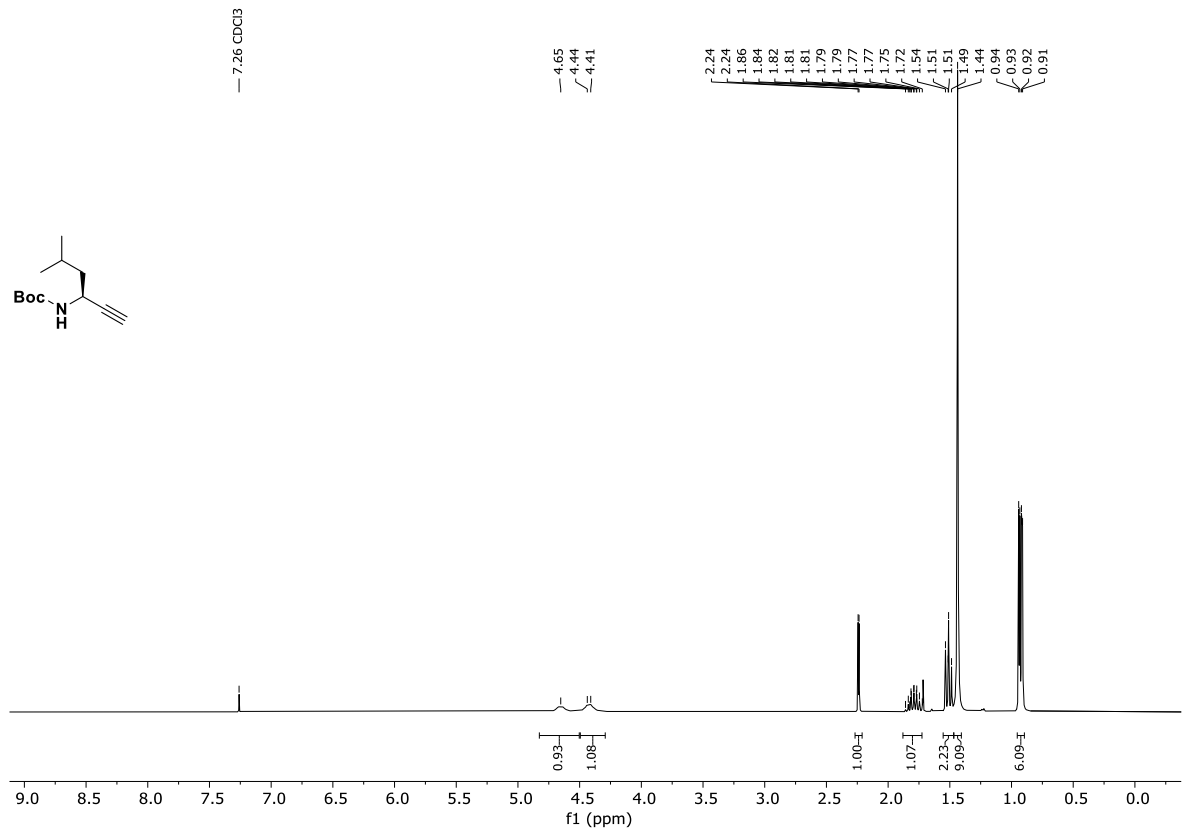


Abb. 12.228: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (300 MHz, CDCl₃) von *N*-Boc-(*S*)-3-amino-5-methyl-hex-1-in (**170**).

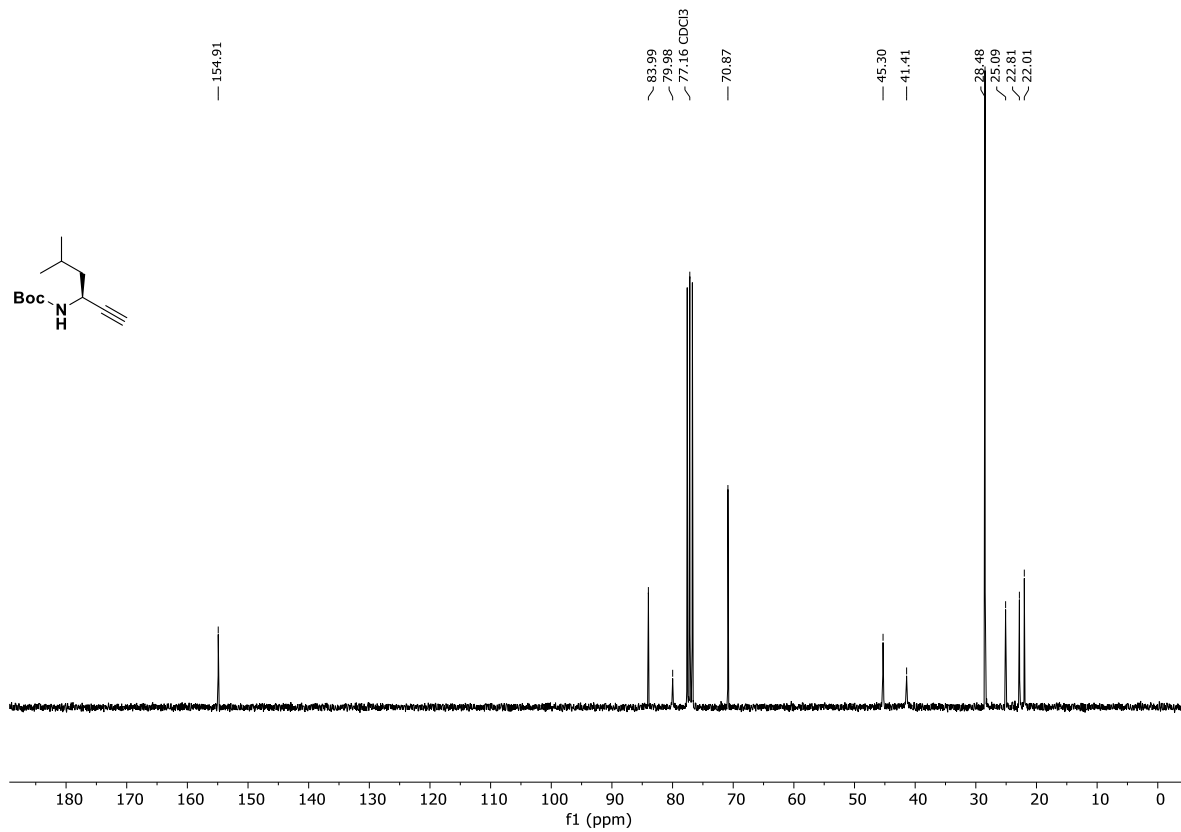


Abb. 12.229: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, CDCl₃) von *N*-Boc-(*S*)-3-amino-5-methyl-hex-1-in (170).

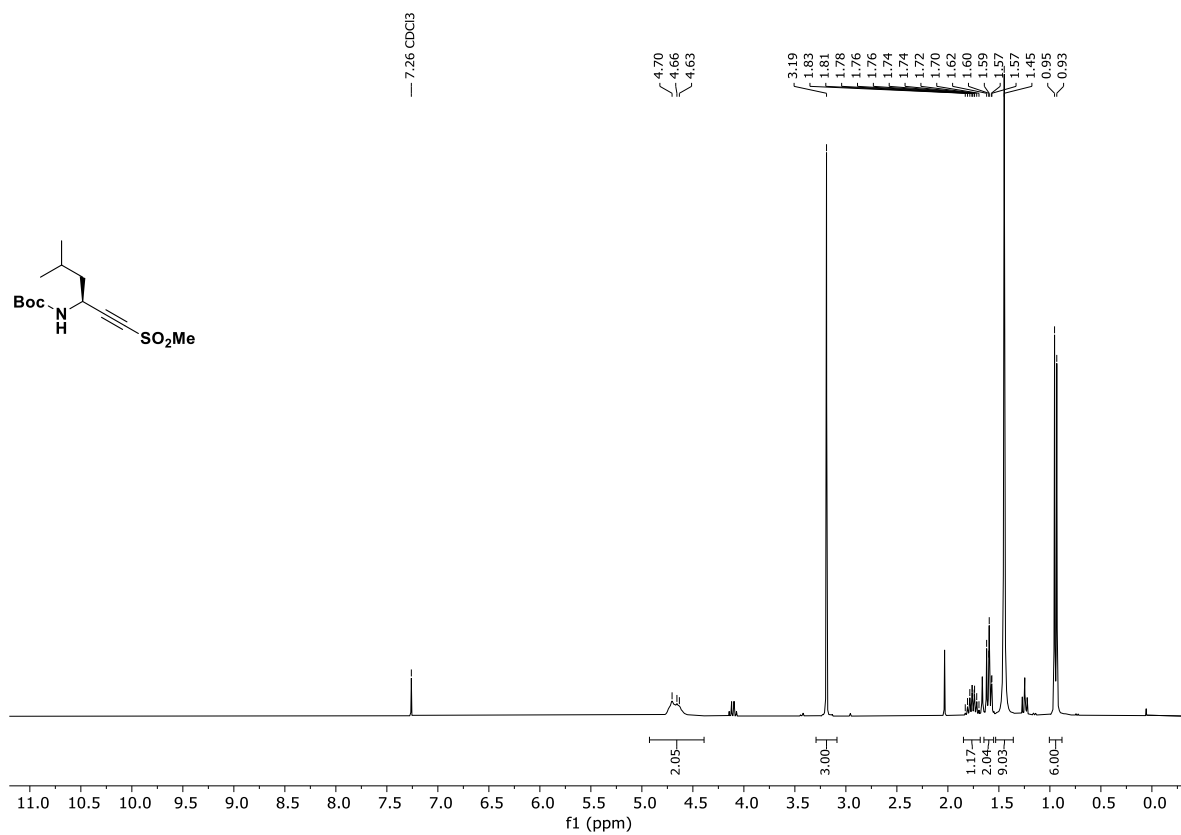


Abb. 12.230: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl₃) von *N*-Boc-(*S*)-3-amino-5-methyl-1-(methylsulfonyl)-hex-1-in (171).

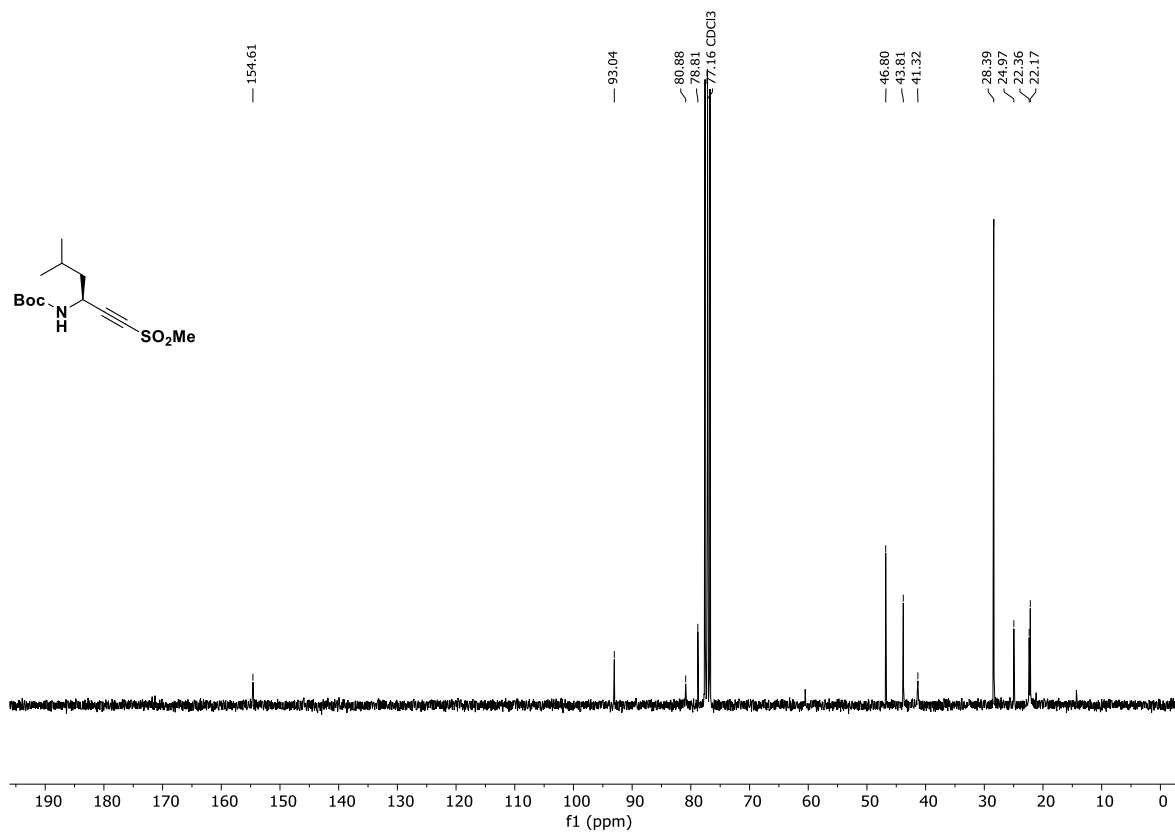


Abb. 12.231: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, CDCl₃) von *N*-Boc-(*S*)-3-amino-5-methyl-1-(methylsulfonyl)-hex-1-*in* (**171**).

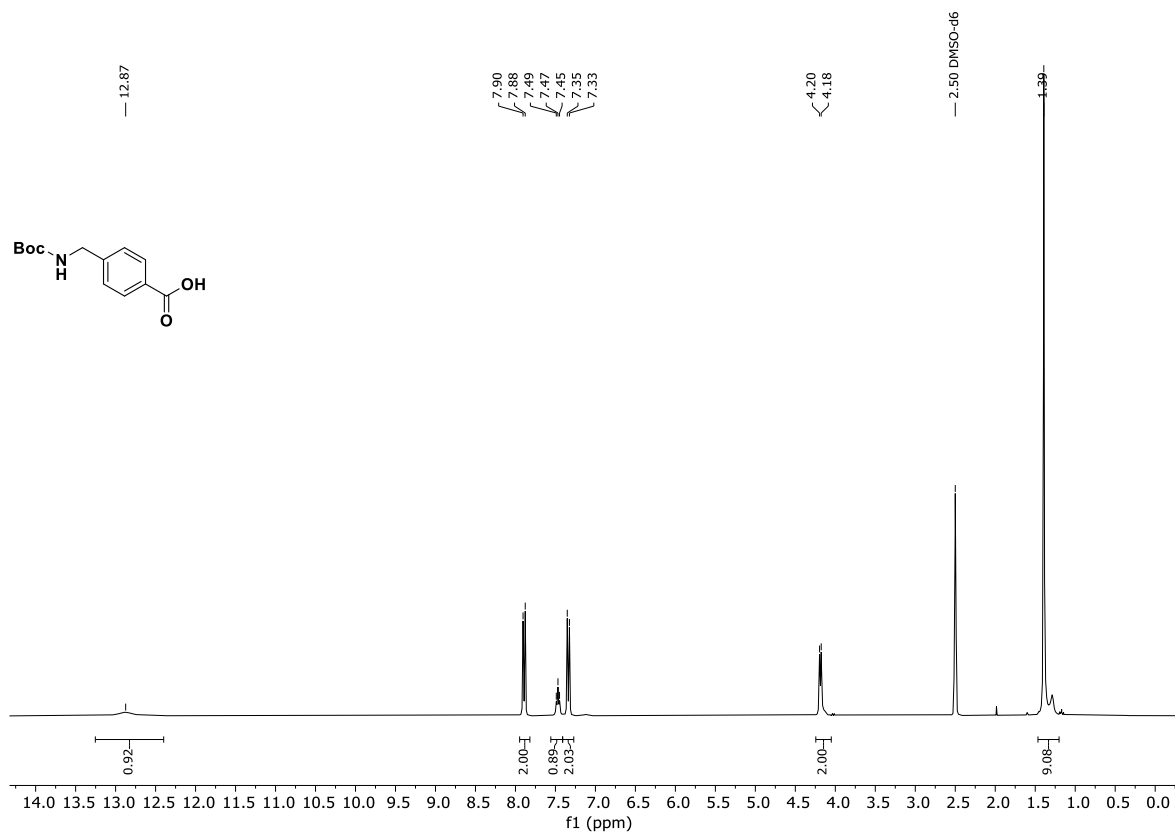


Abb. 12.232: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, DMSO-*d*₆) von 4-((*tert*-Butoxycarbonyl)aminomethyl)benzoesäure (**203**).

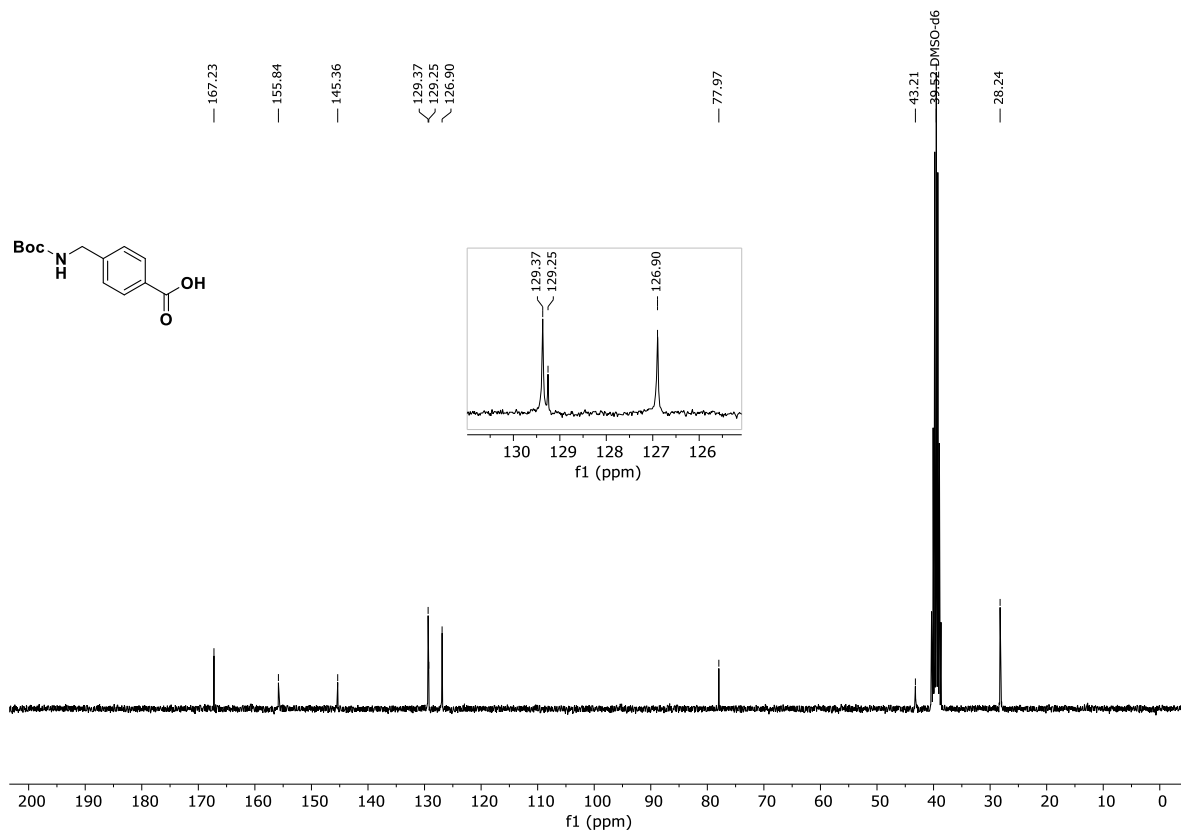


Abb. 12.233: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (75.5 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) von 4-((tert-Butoxycarbonyl)aminomethyl)benzoesäure (203).

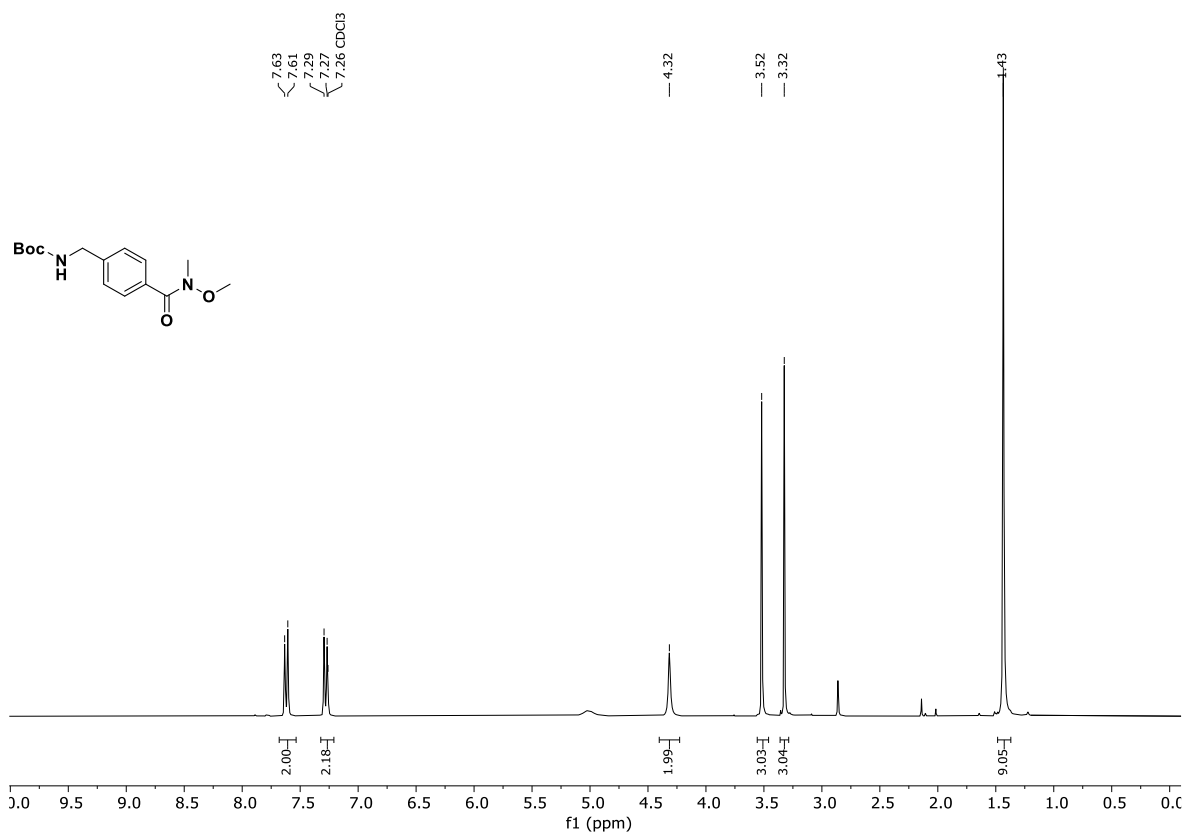


Abb. 12.234: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (300 MHz, CDCl_3) von tert-Butyl-4-(methoxy(methyl)carbamoyl)benzylcarbamate (204).

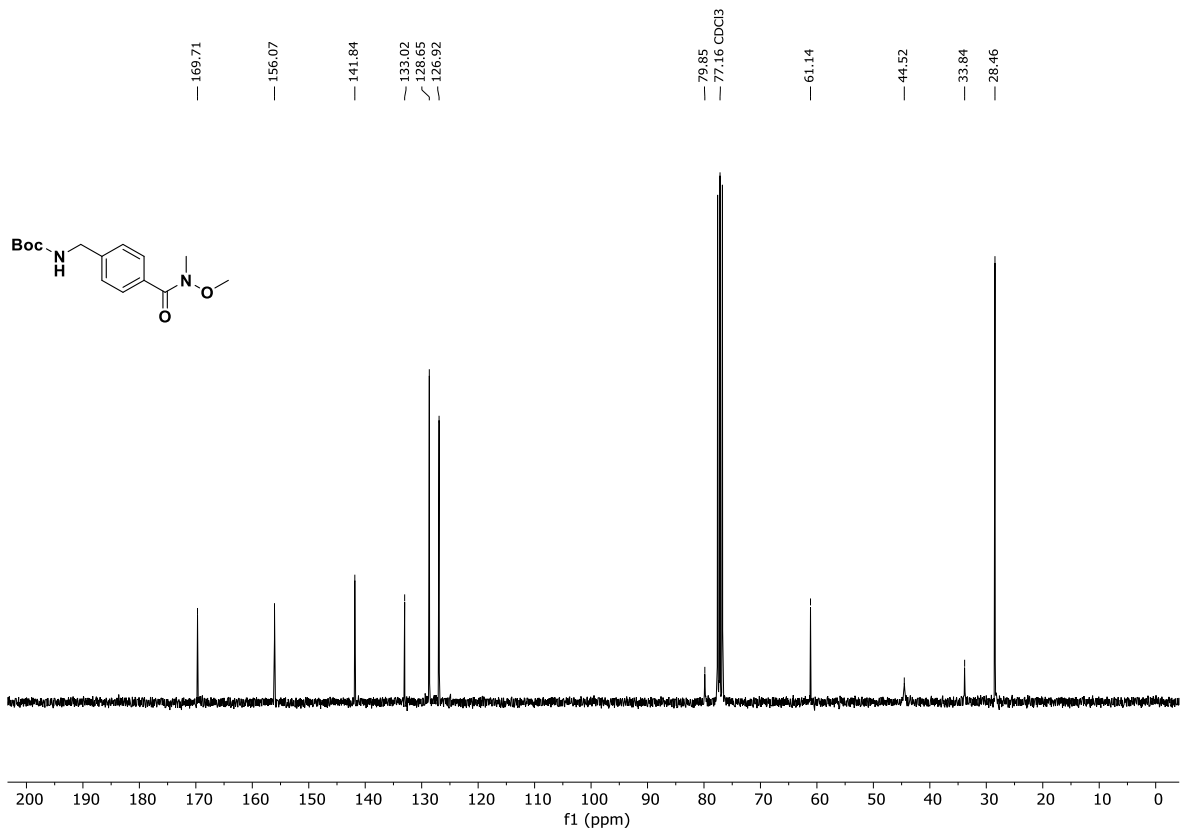


Abb. 12.235: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, CDCl₃) von *tert*-Butyl-(4-(methoxy(methyl)carbamoyl)benzyl)carbamate (**204**).

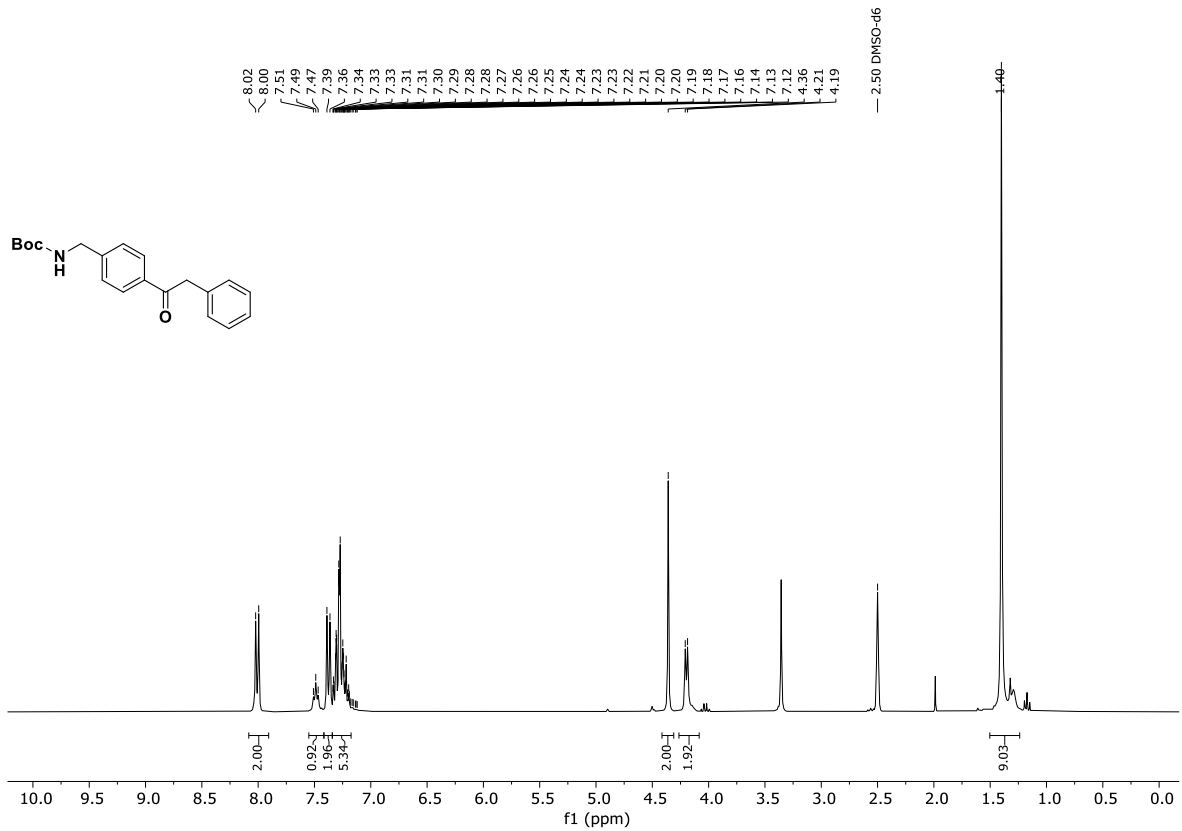


Abb. 12.236: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, DMSO-*d*₆) von *tert*-Butyl-(4-(2-phenylacetyl)benzyl)carbamate (**205**).

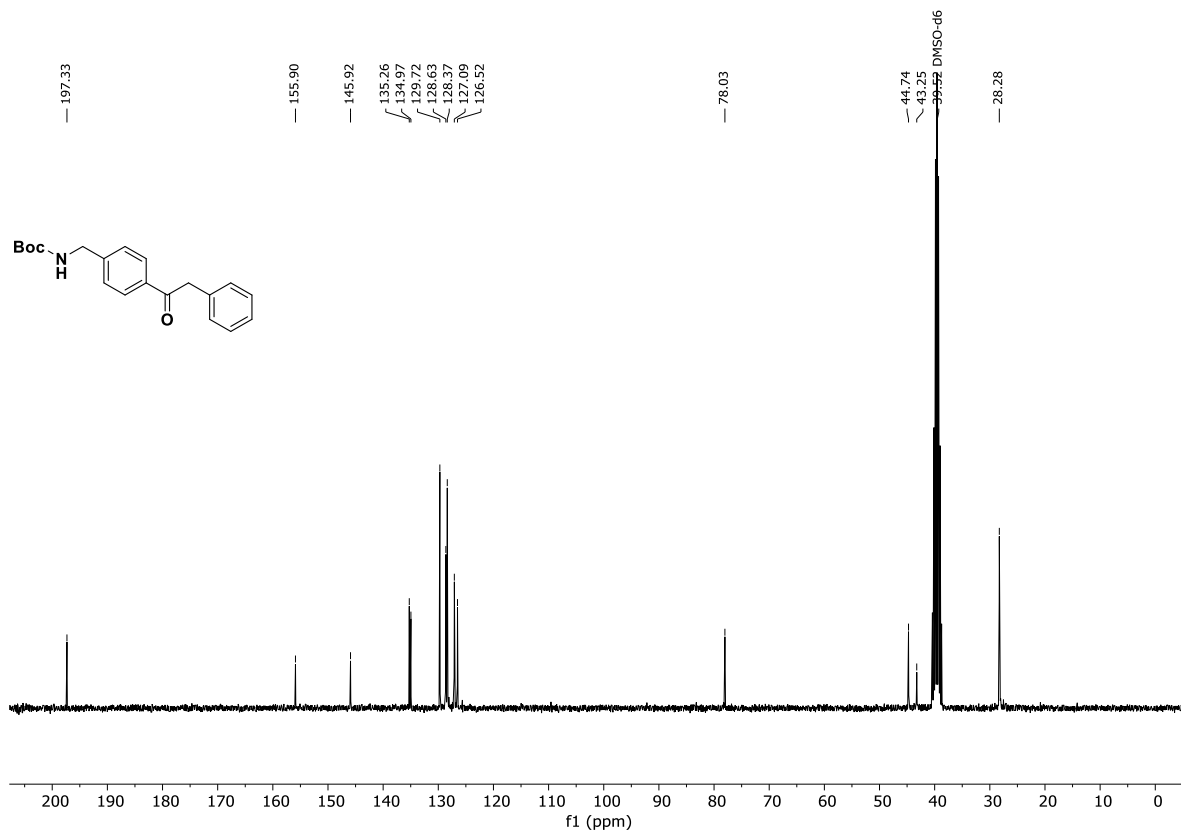


Abb. 12.237: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (75.5 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) von *tert*-Butyl-(4-(2-phenylacetyl)benzyl)carbamate (**205**).

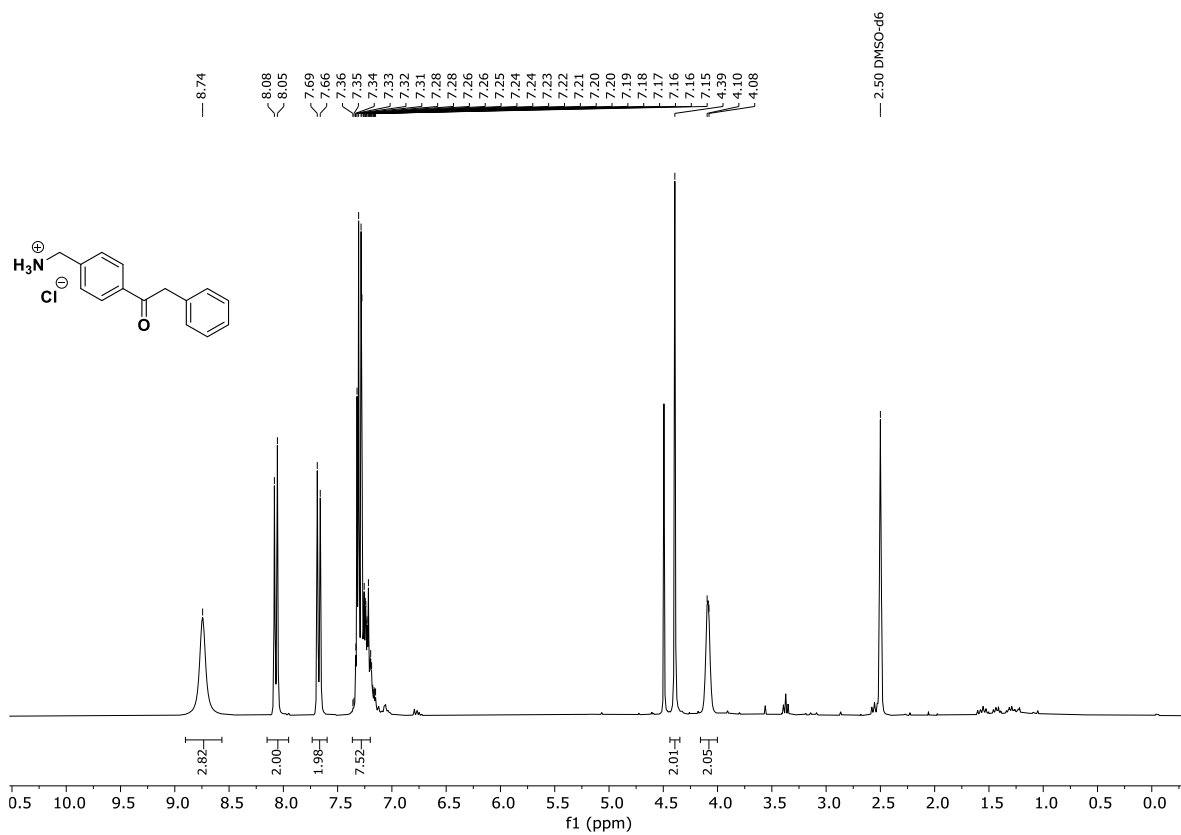


Abb. 12.238: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) von 1-(4-(Aminomethyl)phenyl)-2-phenylethan-1-on-Hydrochlorid (**198 · HCl**).

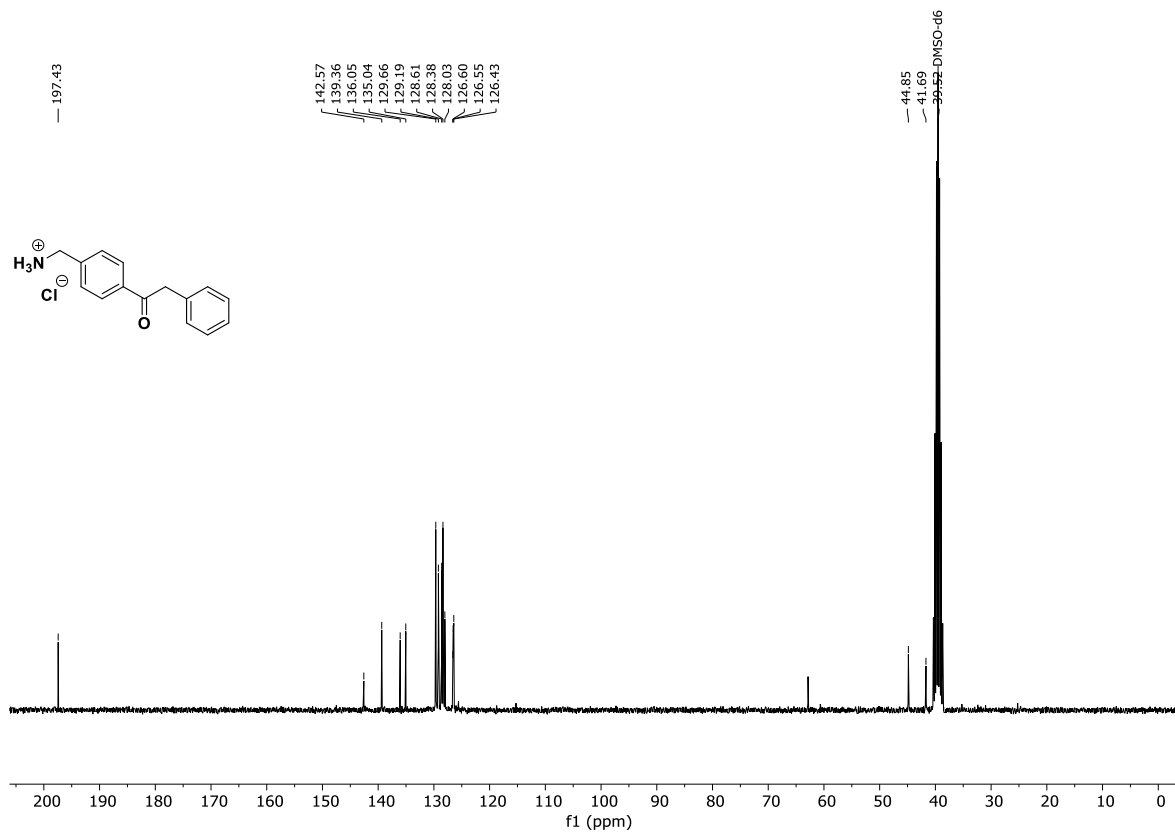


Abb. 12.239: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (75.5 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) von 1-(4-(Aminomethyl)phenyl)-2-phenylethan-1-on-Hydrochlorid (**198** · **HCl**).

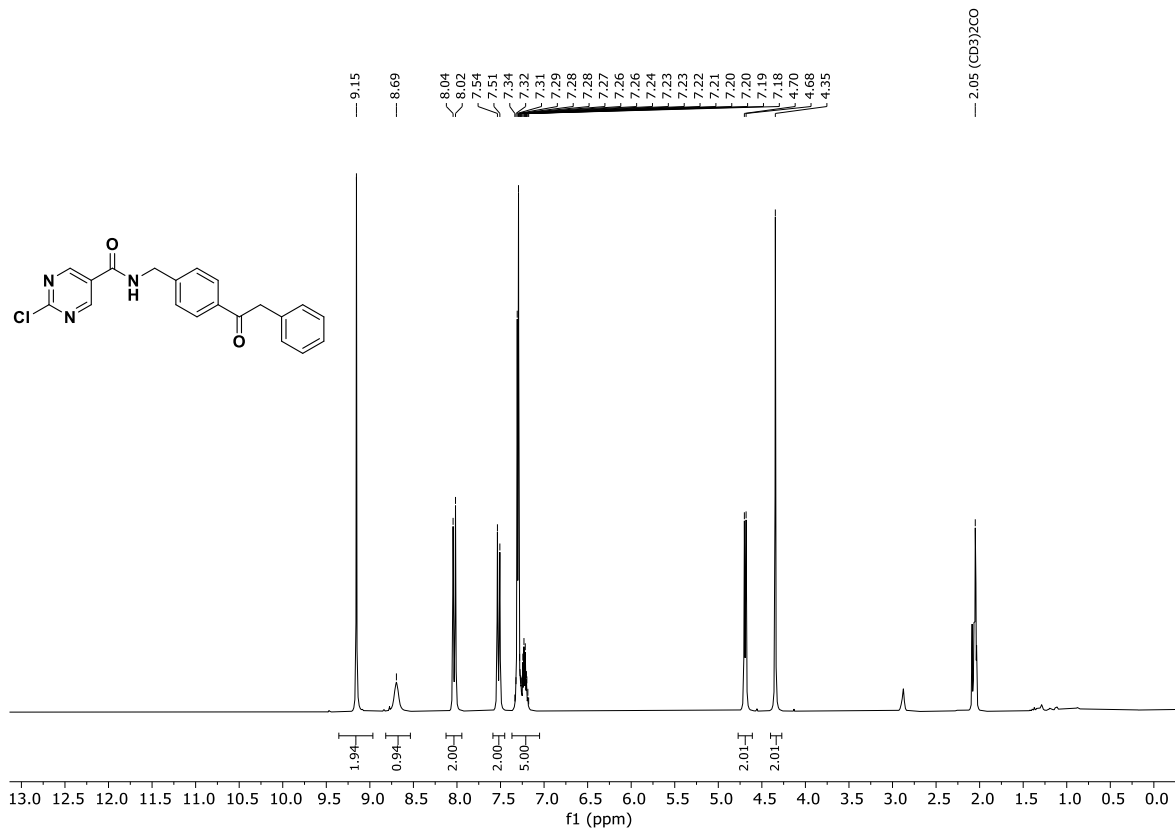


Abb. 12.240: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (300 MHz, $\text{Aceton-}d_6$) von 2-Chlor-*N*-(4-(2-phenylacetyl)benzyl)pyrimidin-5-carbonsäureamid (**206**).

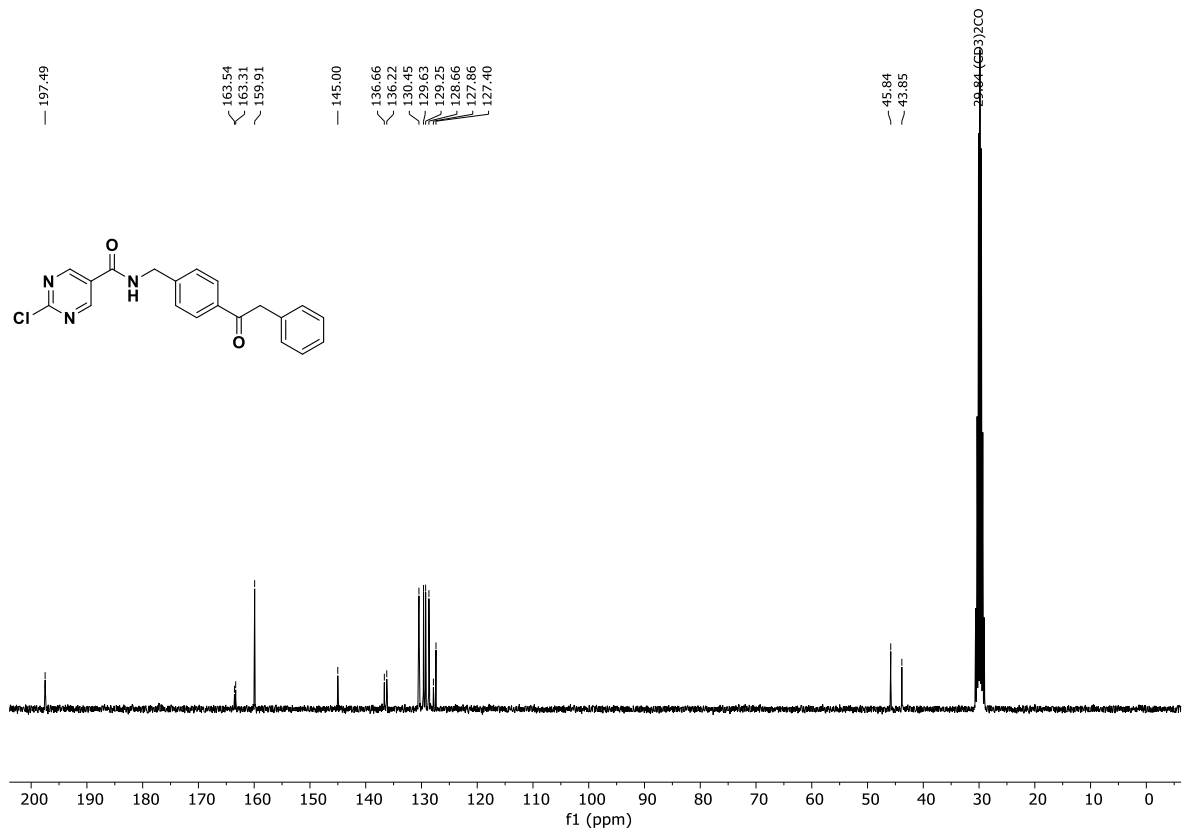


Abb. 12.241: ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, Aceton-d₆) von 2-Chlor-N-(4-(2-phenylacetyl)benzyl)pyrimidin-5-carboxamide (**206**).

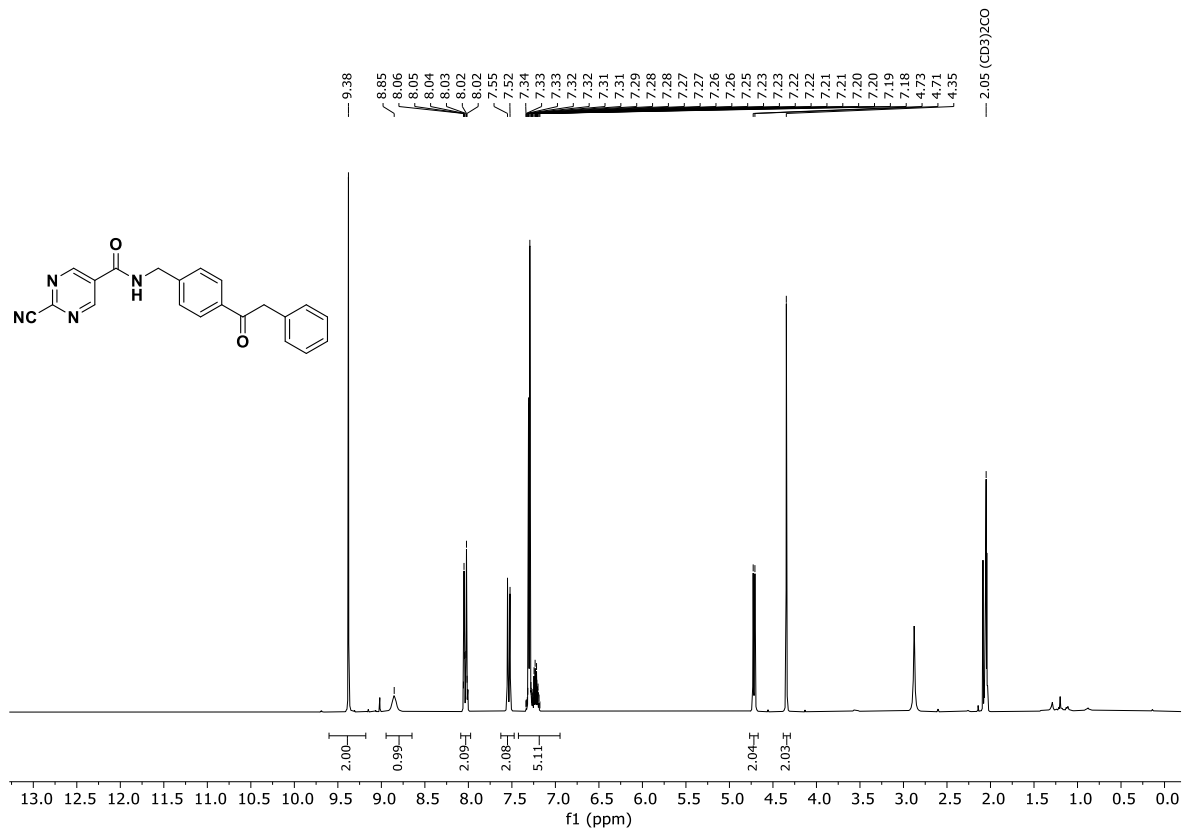


Abb. 12.242: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, Aceton-d₆) von 2-Cyano-N-(4-(2-phenylacetyl)benzyl)pyrimidin-5-carboxamide (**HJR108, 194**).

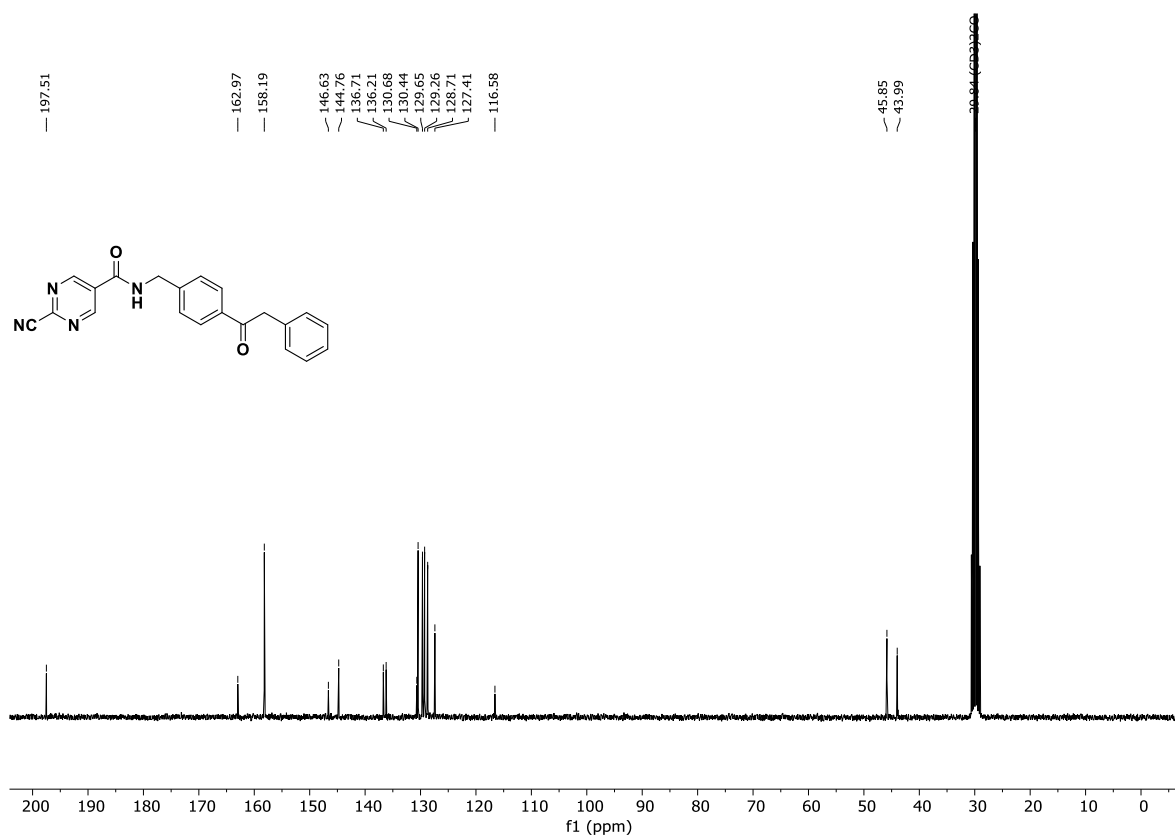


Abb. 12.243: ^{13}C -NMR-Spektrum (75.5 MHz, Aceton- d_6) von 2-Cyano-*N*-(4-(2-phenylacetyl)benzyl)pyrimidin-5-carbonsäureamid (HJR108, 194).

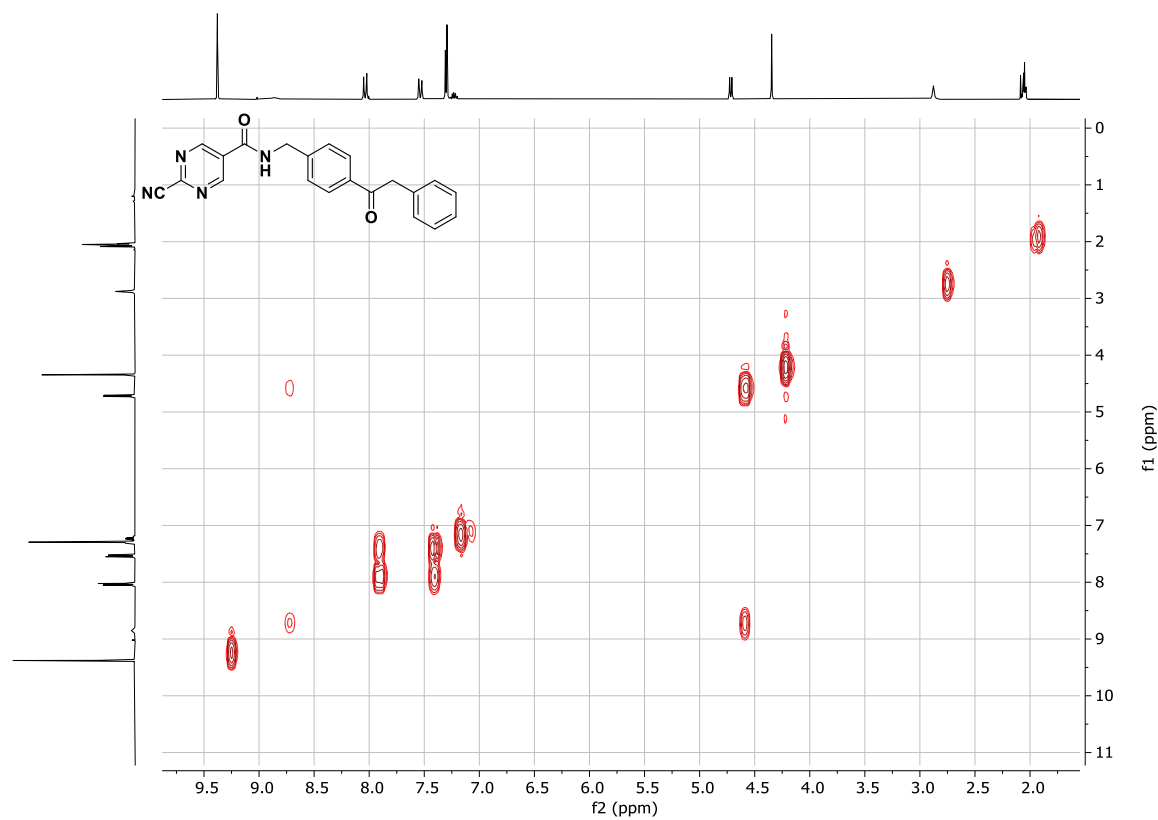


Abb. 12.244: ^1H - ^1H -COSY-Spektrum (300 MHz, Aceton- d_6) von 2-Cyano-*N*-(4-(2-phenylacetyl)benzyl)pyrimidin-5-carbonsäureamid (HJR108, 194).

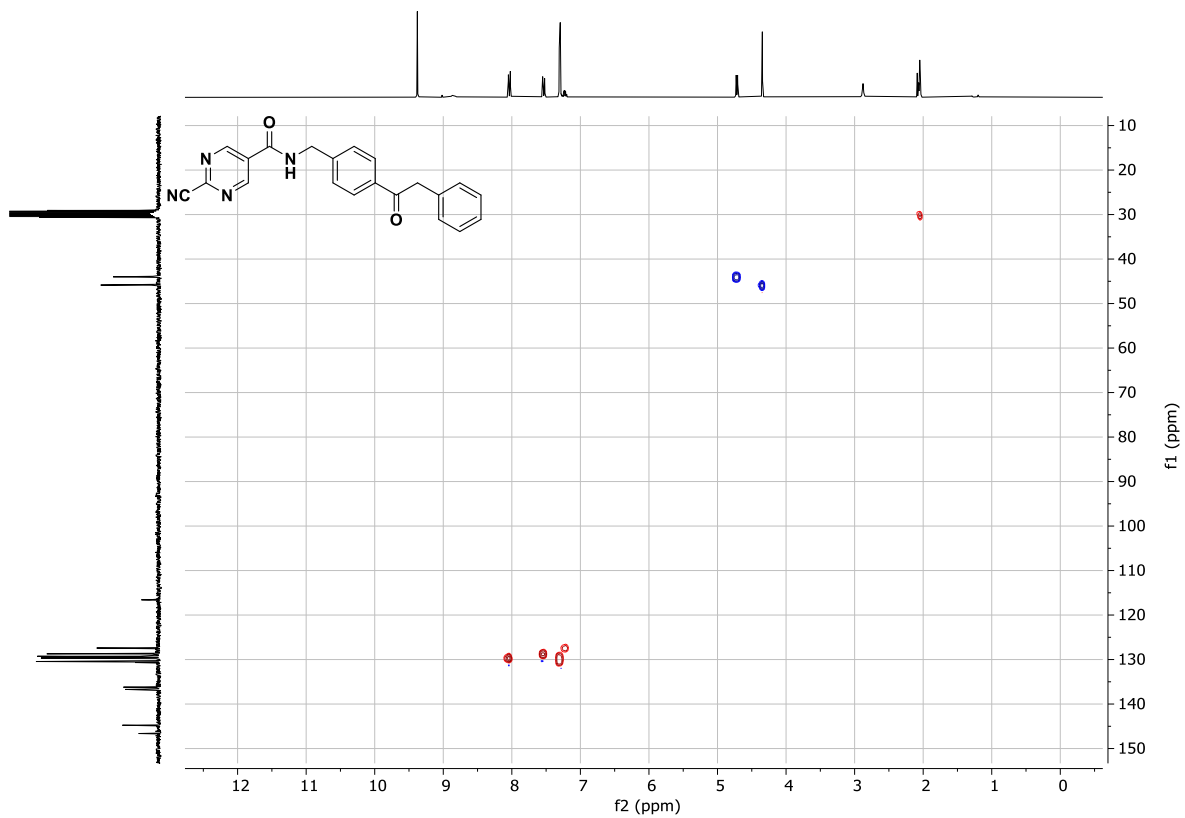


Abb. 12.245: ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum (300 MHz, Aceton- d_6) von 2-Cyano-*N*-(4-(2-phenylacetyl)benzyl)-pyrimidin-5-carbonsäureamid (HJR108, 194)

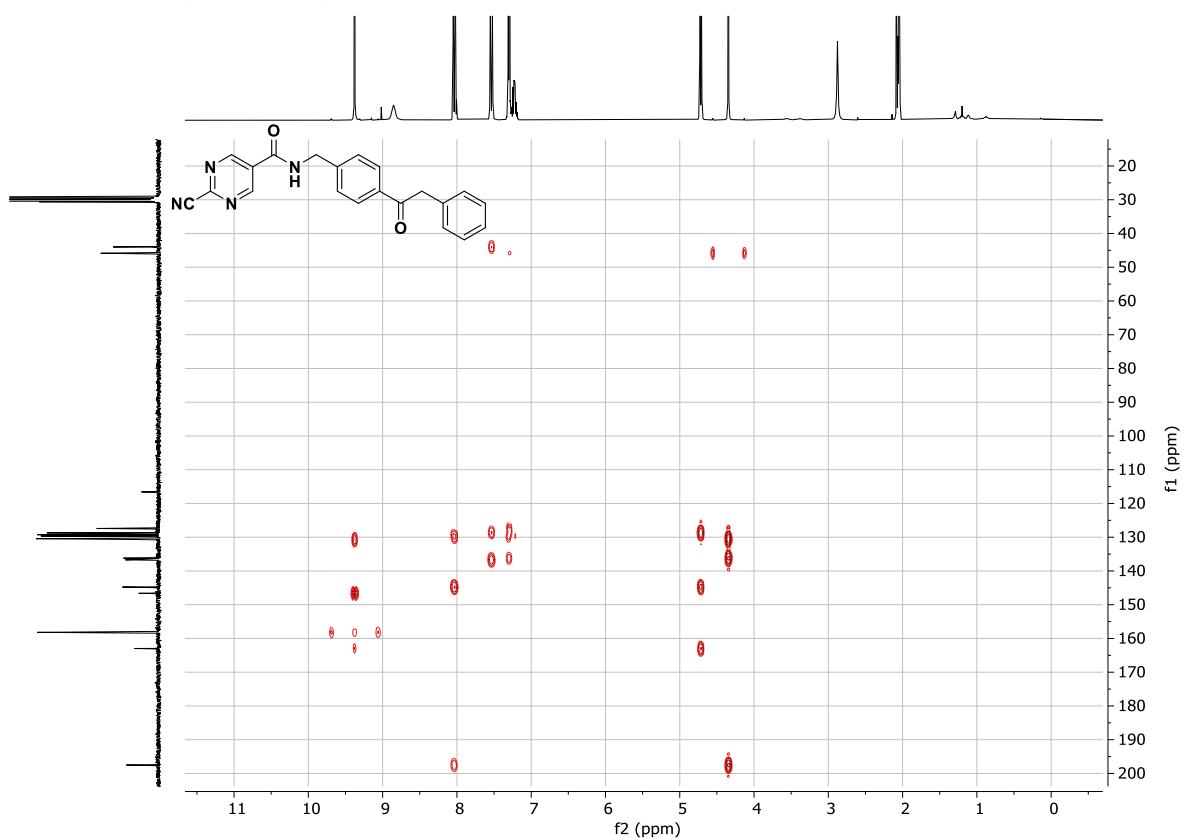


Abb. 12.246: ^1H - ^{13}C -HMBC-Spektrum (300 MHz, Aceton- d_6) von 2-Cyano-*N*-(4-(2-phenylacetyl)benzyl)pyrimidin-5-carbonsäureamid (HJR108, 194).

12.2 Kristallstrukturanalyse

Mithilfe von Kristallstrukturanalysen konnten die Strukturen einiger Verbindungen aus den Kapiteln **3** und **7** bestätigt werden. Die Kristallstrukturanalysen der (Trifluormethyl)diazirine **KS239 (M-3a)** und **KS249 (M-3b)** wurden von [REDACTED] ([REDACTED], Department für Chemie und Biochemie, Universität Bern) durchgeführt, während die Kristallstrukturanalysen von (*S,S*)-**121**/*(R,R)*-**121** sowie (*S,R*)-**121**/*(R,S)*-**121** von [REDACTED] ([REDACTED] (Department Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) realisiert wurden. Ausgewählte und detaillierte kristallographische Informationen sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.

12.2.1 Kristallographische Daten von KS239 (M-3a)

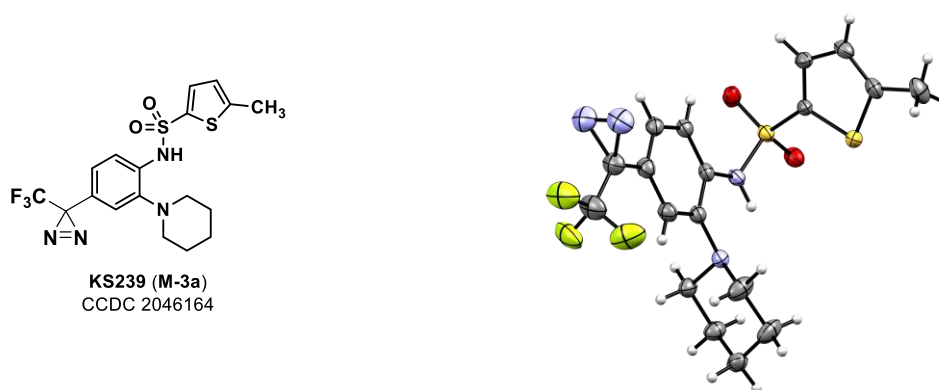


Abb. 12.247: Strukturformel (links) und Molekülstruktur im Festkörper (rechts; ORTEP, Ellipsoide dargestellt mit 50% Wahrscheinlichkeit) von **KS239 (M-3a)**. Rot = Sauerstoff, Blau = Stickstoff, Grau = Kohlenstoff, Grün = Fluor.

Tab. 12.1: Kristalldaten und Strukturverfeinerung von **KS239 (M-3a)**.

Parameter	Wert
Summenformel	C ₁₈ H ₁₉ F ₃ N ₄ O ₂ S ₂
Molekulargewicht/g · mol ⁻¹	444.49
Temperatur/K	100.01(10)
Kristallsystem	monoklin
Raumgruppe	<i>P</i> 2 ₁ / <i>c</i>
<i>a</i> /Å	14.8659(2)
<i>b</i> /Å	7.68040(10)
<i>c</i> /Å	17.72280(10)
<i>α</i> /°	90
<i>β</i> /°	101.6910(10)
<i>γ</i> /°	90
Volumen/Å ³	1981.54(4)

Parameter	Wert
Z	4
Dichte $\rho_{\text{calc}}/\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$	1.490
μ/mm^{-1}	0.319
F(000)	920.0
Kristallgröße/ mm^3	$0.362 \times 0.165 \times 0.08$
Strahlung	Mo K α ($\lambda = 0.71073$)
2 θ Messbereich für Datenerfassung/ $^\circ$	4.694 bis 63.914
Indexbereiche	$-21 \leq h \leq 21, -11 \leq k \leq 11, -26 \leq l \leq 26$
Reflexzahl gemessen	94794
Reflexzahl unabhängig	6617 [$R_{\text{int}} = 0.0362, R_{\text{sigma}} = 0.0151$]
Daten/Beschränkungen/Parameter	6617/0/263
Anpassungsgüte/Fitgüte bzgl. F^2	1.073
Finale R-Indizes [$I \geq 2\sigma(I)$]	$R_1 = 0.0457, wR_2 = 0.1310$
Finale R-Indizes [alle Daten]	$R_1 = 0.0534, wR_2 = 0.1372$
Maximale Peakhöhe in diff. Fouriersynthese/ $e \text{ \AA}^{-3}$	0.57/−0.47

Tab. 12.2: Fraktionelle Atomkoordinaten ($\times 10^4$) und äquivalente isotrope Auslenkungsparameter ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) für **KS239 (M-3a)**. U_{eq} ist als 1/3 der Spur des orthogonalisierten U_{ij} -Tensors definiert.

Atom	x	y	z	U_{eq}
S1	5292.0(2)	6424.2(5)	1532.3(2)	24.78(9)
S2	6404.0(3)	8241.8(5)	525.1(2)	29.96(10)
O2	4647.3(8)	6939.7(17)	1989.1(7)	32.8(2)
O1	5025.6(8)	5192.9(15)	923.8(6)	32.8(2)
N3	6175.2(9)	5528.5(16)	2097.7(7)	26.6(2)
F3	9090.2(13)	5963(2)	5387.2(8)	71.2(5)
F1	9665.6(11)	8461(2)	5811.0(9)	75.0(5)
F2	9911.6(9)	7403(2)	4746.2(9)	69.2(4)
N4	7865.1(9)	4187.1(16)	2580.9(7)	26.4(2)
C4	6711.2(10)	6307.0(18)	2756.4(8)	24.3(2)
C10	5372.6(11)	9959.5(19)	1257.1(8)	28.4(3)
C9	5670.8(10)	8309.0(17)	1160.1(8)	23.3(2)
C5	7596.1(10)	5608.4(19)	3010.0(8)	25.8(3)
C3	6402.9(10)	7668.3(19)	3155.9(8)	26.8(3)
C2	6971.0(11)	8346.5(19)	3806.4(9)	28.7(3)
C11	5744.6(12)	11186(2)	804.1(9)	31.9(3)

Atom	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>	<i>U</i> _{eq}
C6	8156.8(11)	6309(2)	3661.9(9)	31.0(3)
C1	7851.0(11)	7685(2)	4065.5(9)	30.8(3)
C12	6316.4(11)	10454(2)	381.8(9)	30.7(3)
N1	7997.2(13)	9637(2)	5237.1(10)	47.0(4)
N2	8446.2(13)	10395(2)	4826.9(11)	49.8(4)
C18	7696.6(11)	2497(2)	2913.7(9)	31.2(3)
C16	8833.1(11)	1099(2)	2236.8(10)	34.2(3)
C17	7867.7(12)	1013(2)	2391.2(11)	34.7(3)
C13	6831.3(14)	11336(3)	-158.0(12)	44.2(4)
C7	8431.0(13)	8455(2)	4758.5(11)	38.3(4)
C14	8815.3(14)	4303(3)	2464.7(13)	46.6(5)
C8	9270.9(16)	7576(3)	5180.6(12)	51.9(5)
C15	9000.5(16)	2873(3)	1919.0(14)	49.5(5)

Tab. 12.3: Anisotrope Auslenkungsparameter ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) für **KS239 (M-3a)**. Der Exponent des anisotropischen Auslenkungs-faktors hat die Form $-2\pi^2[h^2a^2U_{11}+2hka \cdot b \cdot U_{12}+\dots]$.

Atom	<i>U</i> ₁₁	<i>U</i> ₂₂	<i>U</i> ₃₃	<i>U</i> ₂₃	<i>U</i> ₁₃	<i>U</i> ₁₂
S1	26.68(17)	24.70(16)	21.68(16)	2.25(11)	1.86(12)	1.74(11)
S2	36.9(2)	28.93(18)	26.79(18)	4.78(13)	12.93(14)	8.48(14)
O2	27.5(5)	43.7(6)	28.0(5)	4.6(5)	7.4(4)	1.5(4)
O1	38.0(6)	26.8(5)	29.7(5)	-2.1(4)	-2.4(4)	0.5(4)
N3	30.9(6)	24.0(5)	22.4(5)	1.9(4)	-0.3(4)	4.2(4)
F3	99.7(12)	53.9(8)	45.9(7)	4.8(6)	-18.9(7)	18.6(8)
F1	71.1(9)	79.3(10)	55.2(8)	-27.7(7)	-33.3(7)	19.5(8)
F2	36.9(6)	81.9(11)	80.4(10)	-29.3(9)	-8.4(6)	5.4(6)
N4	29.2(6)	25.8(5)	23.9(5)	2.2(4)	4.9(4)	2.0(4)
C4	28.3(6)	23.4(6)	20.2(5)	4.3(4)	2.7(5)	-1.2(5)
C10	33.3(7)	26.1(6)	24.4(6)	-2.8(5)	3.0(5)	7.9(5)
C9	27.8(6)	23.0(6)	18.7(5)	1.1(4)	3.9(5)	5.5(5)
C5	28.1(6)	26.3(6)	22.1(6)	2.0(5)	3.1(5)	0.8(5)
C3	29.4(6)	25.7(6)	24.8(6)	3.4(5)	4.1(5)	0.7(5)
C2	34.3(7)	26.4(6)	25.2(6)	0.2(5)	5.4(5)	-0.6(5)
C11	39.3(8)	22.0(6)	30.0(7)	0.8(5)	-3.4(6)	3.8(5)
C6	30.2(7)	32.0(7)	27.7(7)	-0.8(5)	-1.3(5)	1.8(6)
C1	34.2(7)	29.6(7)	25.9(6)	-1.5(5)	-0.1(5)	-1.1(6)
C12	34.9(7)	29.5(7)	25.2(6)	7.3(5)	-0.2(5)	-0.6(6)

Atom	U ₁₁	U ₂₂	U ₃₃	U ₂₃	U ₁₃	U ₁₂
N1	48.6(9)	47.3(9)	40.9(8)	-12.7(7)	-1.2(7)	-4.6(7)
N2	51.8(10)	41.7(9)	49.7(9)	-8.4(7)	-4.8(8)	-6.9(7)
C18	34.7(7)	28.0(7)	33.9(7)	3.1(6)	14.2(6)	0.5(6)
C16	29.9(7)	39.2(8)	33.0(7)	-3.6(6)	5.4(6)	6.2(6)
C17	35.5(8)	29.6(7)	41.0(8)	-2.6(6)	12.7(6)	-1.2(6)
C13	44.0(10)	46.8(10)	41.2(9)	17.5(8)	7.0(8)	-5.8(8)
C7	38.7(8)	37.7(8)	34.1(8)	-6.1(6)	-3.2(7)	-0.8(7)
C14	46.4(10)	39.3(9)	62.3(12)	-10.1(9)	30.5(9)	-11.2(8)
C8	51.1(11)	51.4(11)	42.1(10)	-9.1(9)	-16.8(9)	5.9(9)
C15	57.5(12)	43.5(10)	58.7(12)	-8.5(9)	38.6(10)	-6.9(9)

Tab. 12.4: Bindungslängen für **KS239 (M-3a)**.

Atom 1	Atom 2	Länge/Å	Atom 1	Atom 2	Länge/Å
S1	O2	1.4302(12)	C10	C11	1.420(2)
S1	O1	1.4287(12)	C5	C6	1.389(2)
S1	N3	1.6335(12)	C3	C2	1.385(2)
S1	C9	1.7316(14)	C2	C1	1.392(2)
S2	C9	1.7187(14)	C11	C12	1.362(2)
S2	C12	1.7193(16)	C6	C1	1.402(2)
N3	C4	1.4064(18)	C1	C7	1.474(2)
F3	C8	1.334(3)	C12	C13	1.502(2)
F1	C8	1.338(2)	N1	N2	1.228(3)
F2	C8	1.347(3)	N1	C7	1.477(3)
N4	C5	1.4329(19)	N2	C7	1.495(3)
N4	C18	1.4683(19)	C18	C17	1.522(2)
N4	C14	1.471(2)	C16	C17	1.516(2)
C4	C5	1.407(2)	C16	C15	1.514(3)
C4	C3	1.391(2)	C7	C8	1.482(3)
C10	C9	1.3653(19)	C14	C15	1.525(3)

Tab. 12.5: Bindungswinkel für **KS239 (M-3a)**.

Atom 1	Atom 2	Atom 3	Winkel/°	Atom 1	Atom 2	Atom 3	Winkel/°
O2	S1	N3	108.47(7)	C2	C1	C6	119.14(14)
O2	S1	C9	106.93(7)	C2	C1	C7	118.72(15)
O1	S1	O2	119.70(7)	C6	C1	C7	122.13(15)
O1	S1	N3	104.46(7)	C11	C12	S2	111.32(12)

Atom 1	Atom 2	Atom 3	Winkel/°	Atom 1	Atom 2	Atom 3	Winkel/°
O1	S1	C9	109.12(7)	C11	C12	C13	128.27(16)
N3	S1	C9	107.62(7)	C13	C12	S2	120.41(14)
C9	S2	C12	91.60(7)	N2	N1	C7	66.34(14)
C4	N3	S1	125.44(10)	N1	N2	C7	64.84(14)
C5	N4	C18	111.82(11)	N4	C18	C17	110.77(13)
C5	N4	C14	114.05(13)	C15	C16	C17	109.85(15)
C18	N4	C14	110.89(13)	C16	C17	C18	110.98(14)
N3	C4	C5	116.01(13)	C1	C7	N1	118.38(16)
C3	C4	N3	123.52(13)	C1	C7	N2	117.65(16)
C3	C4	C5	120.46(13)	C1	C7	C8	121.92(16)
C9	C10	C11	111.77(13)	N1	C7	N2	48.83(12)
S2	C9	S1	121.51(8)	N1	C7	C8	114.30(16)
C10	C9	S1	126.10(11)	C8	C7	N2	114.58(16)
C10	C9	S2	112.06(11)	N4	C14	C15	110.31(16)
C4	C5	N4	117.67(13)	F3	C8	F1	108.74(19)
C6	C5	N4	123.49(13)	F3	C8	F2	105.68(19)
C6	C5	C4	118.84(14)	F3	C8	C7	111.45(19)
C2	C3	C4	119.86(14)	F1	C8	F2	106.63(19)
C3	C2	C1	120.74(14)	F1	C8	C7	111.84(18)
C12	C11	C10	113.25(13)	F2	C8	C7	112.18(18)
C5	C6	C1	120.96(14)	C16	C15	C14	110.36(16)

Tab. 12.6: Torsionswinkel für KS239 (M-3a).

A	B	C	D	Winkel/°	A	B	C	D	Winkel/°
S1	N3	C4	C5	-159.38(11)	C3	C2	C1	C7	179.74(15)
S1	N3	C4	C3	21.7(2)	C2	C1	C7	N1	12.2(3)
O2	S1	N3	C4	-55.35(14)	C2	C1	C7	N2	-43.6(2)
O2	S1	C9	S2	-175.80(8)	C2	C1	C7	C8	164.81(19)
O2	S1	C9	C10	-2.90(15)	C11	C10	C9	S1	-173.21(11)
O1	S1	N3	C4	175.92(12)	C11	C10	C9	S2	0.27(17)
O1	S1	C9	S2	-44.98(11)	C6	C1	C7	N1	-167.63(17)
O1	S1	C9	C10	127.93(13)	C6	C1	C7	N2	136.54(19)
N3	S1	C9	S2	67.82(10)	C6	C1	C7	C8	-15.1(3)
N3	S1	C9	C10	-119.27(13)	C1	C7	C8	F3	-55.0(3)
N3	C4	C5	N4	-0.10(19)	C1	C7	C8	F1	-176.96(19)
N3	C4	C5	C6	-179.41(13)	C1	C7	C8	F2	63.3(3)

A	B	C	D	Winkel/°	A	B	C	D	Winkel/°
N3	C4	C3	C2	179.12(13)	C12	S2	C9	S1	173.82(10)
N4	C5	C6	C1	-179.04(14)	C12	S2	C9	C10	0.00(12)
N4	C18	C17	C16	56.41(19)	N1	N2	C7	C1	104.8(2)
N4	C14	C15	C16	-58.3(2)	N1	N2	C7	C8	-101.6(2)
C4	C5	C6	C1	0.2(2)	N1	C7	C8	F3	98.6(2)
C4	C3	C2	C1	0.2(2)	N1	C7	C8	F1	-23.3(3)
C10	C11	C12	S2	0.47(18)	N1	C7	C8	F2	-143.11(18)
C10	C11	C12	C13	-179.91(16)	N2	N1	C7	C1	-103.20(19)
C9	S1	N3	C4	60.01(13)	N2	N1	C7	C8	102.2(2)
C9	S2	C12	C11	-0.27(12)	N2	C7	C8	F3	152.61(19)
C9	S2	C12	C13	-179.92(14)	N2	C7	C8	F1	30.7(3)
C9	C10	C11	C12	-0.48(19)	N2	C7	C8	F2	-89.1(2)
C5	N4	C18	C17	172.49(13)	C18	N4	C5	C4	-94.76(15)
C5	N4	C14	C15	-172.73(16)	C18	N4	C5	C6	84.51(18)
C5	C4	C3	C2	0.2(2)	C18	N4	C14	C15	60.0(2)
C5	C6	C1	C2	0.2(2)	C17	C16	C15	C14	55.4(2)
C5	C6	C1	C7	-179.96(16)	C14	N4	C5	C4	138.42(16)
C3	C4	C5	N4	178.88(12)	C14	N4	C5	C6	-42.3(2)
C3	C4	C5	C6	-0.4(2)	C14	N4	C18	C17	-59.00(18)
C3	C2	C1	C6	-0.4(2)	C15	C16	C17	C18	-54.6(2)

Tab. 12.7: Wasserstoffatomkoordinaten ($\times 10^4$) und isotrope Auslenkungsparameter ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) für **KS239 (M-3a)**. U_{eq} ist als 1/3 der Spur des orthogonalisierten U_{ij} -Tensors definiert.

Atom	x	y	z	U_{eq}
H3	6508	4807	1871	32
H10	4974	10246	1581	34
H3A	5817	8122	2987	32
H2	6762	9254	4073	34
H11	5611	12370	796	38
H6	8744	5860	3833	37
H18A	7067	2448	2984	37
H18B	8099	2369	3415	37
H16A	9276	891	2711	41
H16B	8911	204	1869	41
H17A	7781	-91	2633	42
H17B	7427	1079	1907	42

Atom	x	y	z	U _{eq}
H13A	7479	11264	48	66
H13B	6651	12536	-216	66
H13C	6693	10770	-651	66
H14A	9239	4186	2956	56
H14B	8915	5433	2251	56
H15A	8601	3029	1418	59
H15B	9631	2950	1854	59

12.2.2 Kristallographische Daten von KS249 (M-3b)

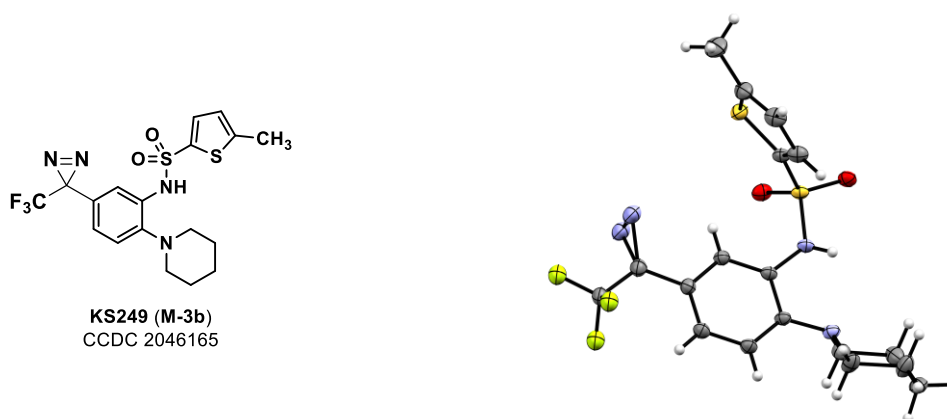


Abb. 12.248: Strukturformel (links) und Molekülstruktur im Festkörper (rechts; ORTEP, Ellipsoide dargestellt mit 50% Wahrscheinlichkeit) von **KS249 (M-3b)**. Rot = Sauerstoff, Blau = Stickstoff, Grau = Kohlenstoff, Grün = Fluor.

Tab. 12.8: Kristalldaten und Strukturverfeinerung von **KS249 (M-3b)**.

Parameter	Wert
Summenformel	C ₁₈ H ₁₉ F ₃ N ₄ O ₂ S ₂
Molekulargewicht/g · mol ⁻¹	444.49
Temperatur/K	100.00(11)
Kristallsystem	monoklin
Raumgruppe	<i>P</i> 2 ₁ / <i>n</i>
a/Å	15.34810(10)
b/Å	8.43370(10)
c/Å	16.1087(2)
α/°	90
β/°	111.7130(10)
γ/°	90
Volumen/Å ³	1937.19(4)
Z	4

Parameter	Wert
Dichte $\rho_{\text{calc}}/\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$	1.524
μ/mm^{-1}	0.326
F(000)	920.0
Kristallgröße/ mm^3	$0.486 \times 0.228 \times 0.055$
Strahlung	Mo K α ($\lambda = 0.71073$)
2 θ Messbereich für Datenerfassung/ $^\circ$	3.132 bis 74.476
Indexbereiche	$-25 \leq h \leq 26, -14 \leq k \leq 14, -27 \leq l \leq 27$
Reflexzahl gemessen	146360
Reflexzahl unabhängig	9856 [$R_{\text{int}} = 0.0543, R_{\text{sigma}} = 0.0190$]
Daten/Beschränkungen/Parameter	9856/0/270
Anpassungsgüte/Fitgüte bzgl. F^2	1.032
Finale R-Indizes [$I \geq 2\sigma(I)$]	$R_1 = 0.0527, wR_2 = 0.1461$
Finale R-Indizes [alle Daten]	$R_1 = 0.0617, wR_2 = 0.1544$
Maximale Peakhöhe in diff. Fouriersynthese/ $e \text{ \AA}^{-3}$	1.12/−1.00

Tab. 12.9: Fraktionelle Atomkoordinaten ($\times 10^4$) und äquivalente isotrope Auslenkungsparameter ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) für **KS249 (M-3b)**. U_{eq} ist als 1/3 der Spur des orthogonalisierten U_{ij} -Tensors definiert.

Atom	x	y	z	U_{eq}
S1	4097.5(2)	4105.3(3)	719.1(2)	19.16(6)
S2	3262.4(2)	6455.7(4)	1594.2(2)	26.37(7)
F2A	6462.7(7)	2924.5(13)	5592.0(7)	31.92(13)
F3A	5946.1(7)	556.0(13)	5248.1(7)	31.92(13)
O2	3981.7(6)	4469.5(12)	-186.3(6)	24.14(16)
O1	3400.5(6)	3168.5(11)	883.2(7)	25.96(17)
F1A	5129.8(7)	2259.4(13)	5647.2(7)	31.92(13)
N4	6778.2(6)	1842.4(12)	1544.4(6)	20.10(15)
N3	5104.8(7)	3217.0(12)	1136.2(7)	21.41(16)
C5	5535.0(7)	2675.1(13)	2025.3(7)	19.00(16)
C1	5634.2(8)	2330.9(14)	3549.0(7)	21.03(17)
C4	6425.2(7)	1972.6(13)	2241.5(7)	18.92(16)
C2	6523.2(8)	1667.4(15)	3771.6(8)	22.76(18)
C6	5138.5(8)	2833.9(14)	2671.1(8)	21.19(18)
C10	4919.0(8)	6899.6(15)	1595.8(8)	25.4(2)
N2A	4160.0(11)	2703(2)	3919.1(10)	34.5(2)
C3	6907.6(8)	1488.6(14)	3118.4(7)	22.05(18)

Atom	x	y	z	U _{eq}
C9	4192.9(8)	5845.5(13)	1323.7(7)	20.85(17)
C7	5205.1(9)	2583.5(15)	4227.4(8)	25.0(2)
C18	6398.2(10)	451.3(15)	967.3(8)	26.8(2)
N1A	4562.7(10)	3972(2)	4110.5(10)	34.5(2)
C14	7802.0(8)	1916(2)	1832.6(9)	30.1(3)
C17	6638.4(12)	569.5(17)	134.6(9)	31.8(3)
C11	4717.9(10)	8226.5(17)	2035.6(9)	30.4(2)
C12	3846.1(11)	8168.9(16)	2075.0(9)	29.9(2)
C8A	5688.7(10)	2083(2)	5183.6(10)	25.4(3)
C16	7693.4(13)	741(2)	375.7(10)	37.0(3)
C15	8075.2(10)	2116(2)	1018.8(10)	36.3(3)
C13	3359.6(15)	9390(2)	2427.7(12)	43.4(4)
F2B	3747(8)	2589(13)	3483(7)	31.92(13)
F3B	4530(7)	4849(14)	3851(7)	31.92(13)
F1B	4338(8)	3301(13)	4913(7)	31.92(13)
C8B	4598(12)	3110(20)	4208(11)	25.4(3)
N2B	5705(15)	1460(30)	5058(15)	34.5(2)
N1B	6064(15)	2640(30)	5146(14)	34.5(2)

Tab. 12.10: Anisotrope Auslenkungsparameter ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) für **KS249 (M-3b)**. Der Exponent des anisotropischen Auslenkungsfaktors hat die Form $-2\pi^2[h^2a^2U_{11}+2hka \cdot b \cdot U_{12}+\dots]$.

Atom	U ₁₁	U ₂₂	U ₃₃	U ₂₃	U ₁₃	U ₁₂
S1	13.74(10)	19.62(11)	20.66(11)	-0.39(8)	2.32(8)	1.97(7)
S2	26.35(14)	25.21(14)	30.12(14)	-0.84(10)	13.45(11)	2.95(10)
F2A	32.8(3)	36.1(3)	30.3(3)	2.7(2)	15.7(2)	1.3(2)
F3A	32.8(3)	36.1(3)	30.3(3)	2.7(2)	15.7(2)	1.3(2)
O2	20.2(3)	28.4(4)	19.1(3)	0.1(3)	1.7(3)	4.2(3)
O1	17.8(3)	25.3(4)	32.6(4)	-2.1(3)	6.7(3)	-2.4(3)
F1A	32.8(3)	36.1(3)	30.3(3)	2.7(2)	15.7(2)	1.3(2)
N4	16.5(3)	22.4(4)	19.1(3)	-1.8(3)	3.8(3)	3.6(3)
N3	16.4(3)	25.1(4)	21.0(4)	4.2(3)	4.9(3)	6.1(3)
C5	16.1(4)	19.2(4)	19.7(4)	1.5(3)	4.2(3)	2.1(3)
C1	20.7(4)	21.0(4)	21.3(4)	0.2(3)	7.7(3)	-0.2(3)
C4	15.9(4)	20.1(4)	18.4(4)	-0.1(3)	3.6(3)	2.6(3)
C2	19.8(4)	26.6(5)	19.6(4)	1.8(4)	4.6(3)	2.4(4)
C6	18.8(4)	21.6(4)	22.8(4)	2.2(3)	7.2(3)	2.7(3)

Atom	U ₁₁	U ₂₂	U ₃₃	U ₂₃	U ₁₃	U ₁₂
C10	19.4(4)	24.6(5)	26.3(5)	-3.2(4)	1.4(4)	-0.8(4)
N2A	32.2(5)	43.9(6)	31.3(4)	2.6(4)	16.2(4)	11.2(4)
C3	17.7(4)	26.0(5)	19.5(4)	1.7(3)	3.6(3)	3.6(3)
C9	17.8(4)	20.2(4)	21.5(4)	-0.1(3)	3.7(3)	2.6(3)
C7	26.7(5)	24.7(5)	25.7(5)	0.0(4)	12.2(4)	-0.5(4)
C18	35.7(6)	20.1(4)	22.9(5)	-2.3(4)	9.1(4)	1.7(4)
N1A	32.2(5)	43.9(6)	31.3(4)	2.6(4)	16.2(4)	11.2(4)
C14	17.3(4)	48.6(8)	22.8(5)	-2.1(5)	5.4(4)	4.6(5)
C17	47.4(8)	24.4(5)	22.6(5)	-2.9(4)	11.8(5)	4.9(5)
C11	31.9(6)	25.9(5)	26.2(5)	-5.8(4)	2.3(4)	-1.4(4)
C12	39.3(7)	25.9(5)	24.0(5)	-3.1(4)	11.1(5)	4.6(5)
C8A	27.1(6)	26.5(6)	26.2(6)	1.0(5)	13.8(5)	-0.1(5)
C16	46.5(8)	39.7(7)	29.1(6)	5.6(5)	19.1(6)	22.4(6)
C15	24.7(5)	57.6(9)	28.8(6)	-2.2(6)	12.3(5)	4.1(6)
C13	59.6(11)	35.7(7)	37.6(7)	-8.3(6)	21.2(7)	10.6(7)
F2B	32.8(3)	36.1(3)	30.3(3)	2.7(2)	15.7(2)	1.3(2)
F3B	32.8(3)	36.1(3)	30.3(3)	2.7(2)	15.7(2)	1.3(2)
F1B	32.8(3)	36.1(3)	30.3(3)	2.7(2)	15.7(2)	1.3(2)
C8B	27.1(6)	26.5(6)	26.2(6)	1.0(5)	13.8(5)	-0.1(5)
N2B	32.2(5)	43.9(6)	31.3(4)	2.6(4)	16.2(4)	11.2(4)
N1B	32.2(5)	43.9(6)	31.3(4)	2.6(4)	16.2(4)	11.2(4)

Tab. 12.11: Bindungslängen für **KS249 (M-3b)**.

Atom 1	Atom 2	Länge/Å	Atom 1	Atom 2	Länge/Å
S2	C9	1.7190(11)	C7	N1A	1.4973(19)
S2	C12	1.7253(15)	C7	C8A	1.5020(19)
F2A	C8A	1.3304(18)	C7	C8B	1.023(16)
F3A	C8A	1.3394(19)	C7	N2B	1.59(2)
F1A	C8A	1.3377(17)	C7	N1B	1.58(2)
N4	C4	1.4201(14)	C18	C17	1.5203(19)
N4	C18	1.4764(16)	C14	C15	1.526(2)
N4	C14	1.4657(15)	C17	C16	1.526(2)
N3	C5	1.4129(14)	C11	C12	1.364(2)
C5	C4	1.4097(14)	C12	C13	1.502(2)
C5	C6	1.3924(15)	C16	C15	1.520(3)
C1	C2	1.3932(16)	F2B	C8B	1.46(2)

Atom 1	Atom 2	Länge/Å	Atom 1	Atom 2	Länge/Å
C1	C6	1.4010(16)	F3B	C8B	1.56(2)
C1	C7	1.4852(16)	F1B	C8B	1.345(18)
C4	C3	1.3915(15)	N2B	N1B	1.12(4)

Tab. 12.12: Bindungswinkel für **KS249 (M-3b)**.

Atom 1	Atom 2	Atom 3	Winkel/°	Atom 1	Atom 2	Atom 3	Winkel/°
O2	S1	N3	105.09(5)	C1	C7	N1B	104.5(7)
O2	S1	C9	109.99(6)	N2A	C7	N1A	47.99(10)
O1	S1	O2	119.06(6)	N2A	C7	C8A	114.93(11)
O1	S1	N3	109.35(6)	N1A	C7	C8A	113.67(11)
O1	S1	C9	106.06(6)	C8B	C7	C1	133.3(9)
N3	S1	C9	106.73(5)	C8B	C7	N2B	115.9(11)
C9	S2	C12	91.28(6)	C8B	C7	N1B	116.9(12)
C4	N4	C18	112.45(10)	N1B	C7	N2B	41.5(13)
C4	N4	C14	115.09(9)	N4	C18	C17	109.58(11)
C14	N4	C18	111.15(10)	N2A	N1A	C7	65.98(11)
C5	N3	S1	125.82(8)	N4	C14	C15	109.61(10)
C4	C5	N3	115.67(9)	C18	C17	C16	111.26(12)
C6	C5	N3	123.83(9)	C12	C11	C10	113.19(12)
C6	C5	C4	120.49(10)	C11	C12	S2	111.37(10)
C2	C1	C6	119.72(10)	C11	C12	C13	128.83(15)
C2	C1	C7	121.79(10)	C13	C12	S2	119.73(13)
C6	C1	C7	118.44(10)	F2A	C8A	F3A	106.91(12)
C5	C4	N4	117.10(9)	F2A	C8A	F1A	107.72(13)
C3	C4	N4	124.38(9)	F2A	C8A	C7	111.65(11)
C3	C4	C5	118.50(10)	F3A	C8A	C7	111.69(13)
C3	C2	C1	119.84(10)	F1A	C8A	F3A	107.19(11)
C5	C6	C1	120.06(10)	F1A	C8A	C7	111.44(12)
C9	C10	C11	111.82(12)	C15	C16	C17	110.55(11)
N1A	N2A	C7	66.03(11)	C16	C15	C14	110.00(14)
C4	C3	C2	121.36(10)	C7	C8B	F2B	115.3(14)
S2	C9	S1	119.30(7)	C7	C8B	F3B	110.9(13)
C10	C9	S1	128.30(9)	C7	C8B	F1B	125.2(16)
C10	C9	S2	112.32(9)	F2B	C8B	F3B	94.1(11)
C1	C7	N2A	118.55(11)	F1B	C8B	F2B	104.7(12)
C1	C7	N1A	118.05(11)	F1B	C8B	F3B	101.5(12)

Atom 1	Atom 2	Atom 3	Winkel/°	Atom 1	Atom 2	Atom 3	Winkel/°
C1	C7	C8A	121.93(11)	N1B	N2B	C7	68.8(17)
C1	C7	N2B	109.1(8)	N2B	N1B	C7	69.7(17)

Tab. 12.13: Torsionswinkel für KS249 (M-3b).

A	B	C	D	Winkel/°	A	B	C	D	Winkel/°
S1	N3	C5	C4	-178.40(9)	C6	C1	C7	C8A	-179.92(12)
S1	N3	C5	C6	0.21(17)	C6	C1	C7	C8B	-2.7(14)
O2	S1	N3	C5	177.96(10)	C6	C1	C7	N2B	161.7(11)
O2	S1	C9	S2	105.86(8)	C6	C1	C7	N1B	-155.1(9)
O2	S1	C9	C10	-70.56(12)	C10	C11	C12	S2	1.41(16)
O1	S1	N3	C5	-53.14(12)	C10	C11	C12	C13	-175.51(15)
O1	S1	C9	S2	-24.12(9)	N2A	C7	C8A	F2A	-137.77(13)
O1	S1	C9	C10	159.46(11)	N2A	C7	C8A	F3A	102.59(14)
N4	C4	C3	C2	179.28(11)	N2A	C7	C8A	F1A	-17.27(18)
N4	C18	C17	C16	55.91(14)	C9	S1	N3	C5	61.18(11)
N4	C14	C15	C16	-58.63(16)	C9	S2	C12	C11	-1.08(11)
N3	S1	C9	S2	-140.65(7)	C9	S2	C12	C13	176.15(13)
N3	S1	C9	C10	42.92(13)	C9	C10	C11	C12	-1.05(17)
N3	C5	C4	N4	-1.83(15)	C7	C1	C2	C3	-178.41(11)
N3	C5	C4	C3	176.72(10)	C7	C1	C6	C5	177.41(11)
N3	C5	C6	C1	-176.91(11)	C18	N4	C4	C5	-81.85(12)
C5	C4	C3	C2	0.85(17)	C18	N4	C4	C3	99.69(13)
C1	C2	C3	C4	0.55(18)	C18	N4	C14	C15	62.62(16)
C1	C7	N1A	N2A	104.41(14)	C18	C17	C16	C15	-53.39(16)
C1	C7	C8A	F2A	66.64(17)	N1A	N2A	C7	C1	-103.33(14)
C1	C7	C8A	F3A	-53.00(16)	N1A	N2A	C7	C8A	100.21(14)
C1	C7	C8A	F1A	-172.85(12)	N1A	C7	C8A	F2A	-84.79(15)
C1	C7	C8B	F2B	50.7(19)	N1A	C7	C8A	F3A	155.57(12)
C1	C7	C8B	F3B	-54.6(19)	N1A	C7	C8A	F1A	35.71(17)
C1	C7	C8B	F1B	-176.7(9)	C14	N4	C4	C5	149.51(11)
C1	C7	N2B	N1B	90.5(14)	C14	N4	C4	C3	-28.95(17)
C1	C7	N1B	N2B	-102.6(14)	C14	N4	C18	C17	-61.02(14)
C4	N4	C18	C17	168.30(10)	C17	C16	C15	C14	54.19(16)
C4	N4	C14	C15	-168.10(12)	C11	C10	C9	S1	176.84(10)
C4	C5	C6	C1	1.63(17)	C11	C10	C9	S2	0.21(14)
C2	C1	C6	C5	-0.20(17)	C12	S2	C9	S1	-176.48(8)

A	B	C	D	Winkel/°	A	B	C	D	Winkel/°
C2	C1	C7	N2A	-157.10(13)	C12	S2	C9	C10	0.48(10)
C2	C1	C7	N1A	147.89(13)	C8A	C7	N1A	N2A	-102.97(13)
C2	C1	C7	C8A	-2.36(19)	C8B	C7	N2B	N1B	-102.1(17)
C2	C1	C7	C8B	174.8(14)	C8B	C7	N1B	N2B	99.6(17)
C2	C1	C7	N2B	-20.8(11)	N2B	C7	C8B	F2B	-112.9(16)
C2	C1	C7	N1B	22.4(9)	N2B	C7	C8B	F3B	141.7(15)
C6	C5	C4	N4	179.52(10)	N2B	C7	C8B	F1B	20(2)
C6	C5	C4	C3	-1.93(16)	N1B	C7	C8B	F2B	-159.5(13)
C6	C1	C2	C3	-0.88(18)	N1B	C7	C8B	F3B	95.2(15)
C6	C1	C7	N2A	25.34(17)	N1B	C7	C8B	F1B	-27(2)
C6	C1	C7	N1A	-29.67(17)					

Tab. 12.14: Wasserstoffatomkoordinaten ($\times 10^4$) und isotrope Auslenkungsparameter ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) für **KS249 (M-3b)**. U_{eq} ist als 1/3 der Spur des orthogonalisierten U_{ij} -Tensors definiert.

Atom	x	y	z	U_{eq}
H2	6859	1345	4355	27
H6	4544	3274	2520	25
H10	5478	6764	1504	31
H3A	7499	1036	3271	26
H18A	5723	409	799	32
H18B	6664	-512	1291	32
H14A	8077	950	2148	36
H14B	8039	2803	2237	36
H17A	6320	1478	-216	38
H17B	6418	-374	-227	38
H11	5138	9052	2273	36
H16A	8005	-232	649	44
H16B	7821	923	-163	44
H15A	7824	3106	720	44
H15B	8753	2152	1208	44
H13A	2997	10078	1950	65
H13B	3818	10002	2885	65
H13C	2953	8871	2673	65
H3	5479(16)	3450(30)	904(15)	35(5)

Tab. 12.15: Atomare Okkupanz (Besetzungsdichte) für KS249 (M-3b).

Atom	Okkupanz	Atom	Okkupanz	Atom	Okkupanz
F2A	0.9126(13)	F3A	0.9126(13)	F1A	0.9126(13)
N2A	0.932(3)	N1A	0.932(3)	C8A	0.918(4)
F2B	0.0874(13)	F3B	0.0874(13)	F1B	0.0874(13)
C8B	0.082(4)	N2B	0.068(3)	N1B	0.068(3)

12.2.3 Kristallographische Daten von (*S,S*)-121/(*R,R*)-121

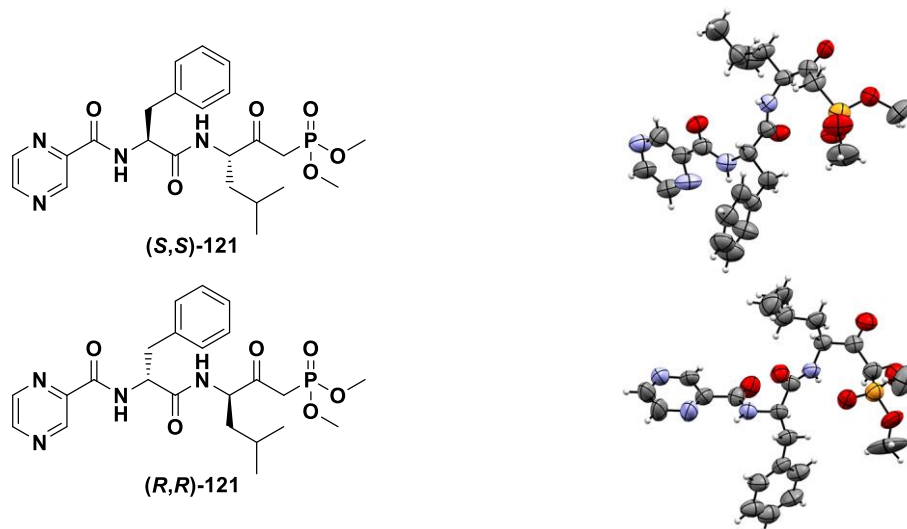


Abb. 12.249: Strukturformeln (links) und Molekülstrukturen im Festkörper (rechts; ORTEP, Ellipsoide dargestellt mit 50% Wahrscheinlichkeit) von (*S,S*)-121/(*R,R*)-121. Rot = Sauerstoff, Blau = Stickstoff, Grau = Kohlenstoff, Orange = Phosphor.

Tab. 12.16: Kristalldaten und Strukturverfeinerung von (*S,S*)-121/(*R,R*)-121.

Parameter	Wert
Summenformel	C ₂₃ H ₃₁ N ₄ O ₆ P
Molekulargewicht/g · mol ⁻¹	490.49
Temperatur/K	153
Kristallsystem	monoklin
Raumgruppe	C c
a/Å	23.493(4)
b/Å	9.3657(8)
c/Å	25.172(4)
α/°	90
β/°	112.366(11)
γ/°	90
Volumen/Å ³	5122.0(13)

Parameter	Wert
Z	8
Dichte $\rho_{\text{calc}}/\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$	1.324
μ/mm^{-1}	1.325
F(000)	2080
Kristallgröße/ mm^3	$0.02 \times 0.06 \times 0.12$
Strahlung	Cu-K α I μ S
2 Θ Messbereich für Datenerfassung/ $^\circ$	4 bis 68
Indexbereiche	$-27 \leq h \leq 27, -14 \leq k \leq 9, -25 \leq l \leq 30$
Reflexzahl gemessen	14967
Reflexzahl unabhängig	7155 [$R_{\text{int}} = 0.1406$]
Anpassungsgüte/Fitgüte bzgl. F^2	1.303
Finale R-Indizes [$I \geq 2\sigma(I)$]	$R_1 = 0.1414, wR_2 = 0.3093$
Finale R-Indizes [alle Daten]	$R_1 = 0.3047, wR_2 = 0.3093$
Maximale Peakhöhe in diff. Fouriersynthese/ $e \text{ \AA}^{-3}$	0.63/−0.45

Tab. 12.17: Endkoordinaten und äquivalente Auslenkungsparameter (\AA^2) für (S,S)-**121**/(R,R)-**121**. U_{eq} ist als 1/3 der Spur des orthogonalisierten U_{ij} -Tensors definiert ($U_{\text{eq}} = (1/3) \cdot \sum_{ij} a_i \cdot a_j \cdot a_{ij}$).

Atom	x	y	z	U_{eq}
C1A	0.637(1)	0.157(3)	0.5857(9)	0.076(8)
C2A	0.666(1)	0.075(3)	0.633(1)	0.11(1)
C3A	0.708(2)	0.117(4)	0.684(1)	0.13(1)
C4A	0.723(1)	0.256(3)	0.685(1)	0.12(1)
C5A	0.698(1)	0.349(3)	0.642(1)	0.11(1)
C6A	0.650(1)	0.298(3)	0.590(1)	0.087(9)
C7A	0.5912(9)	0.103(3)	0.5311(9)	0.080(8)
C8A	0.5257(10)	0.171(3)	0.5172(9)	0.071(8)
N9A	0.5014(8)	0.115(2)	0.5580(7)	0.072(7)
C10A	0.456(1)	0.182(3)	0.566(1)	0.076(9)
O11A	0.4353(7)	0.296(2)	0.5427(7)	0.083(7)
C12A	0.428(1)	0.117(3)	0.6036(10)	0.076(9)
N13A	0.4571(9)	−0.005(2)	0.6314(10)	0.098(10)
C14A	0.428(1)	−0.064(3)	0.665(1)	0.09(1)
C15A	0.374(1)	−0.004(3)	0.668(1)	0.10(1)
N16A	0.3465(9)	0.111(2)	0.6382(9)	0.094(10)
C17A	0.376(1)	0.176(3)	0.606(1)	0.10(1)
C18A	0.482(1)	0.130(3)	0.4574(10)	0.073(7)
O19A	0.4666(7)	0.004(2)	0.4436(7)	0.078(7)
N20A	0.4596(8)	0.236(2)	0.4202(7)	0.071(6)

Atom	x	y	z	U _{eq}
C21A	0.4172(10)	0.221(3)	0.3615(9)	0.073(8)
C22A	0.3576(10)	0.301(3)	0.351(1)	0.082(9)
C23A	0.319(1)	0.260(3)	0.386(1)	0.09(1)
C24A	0.269(1)	0.367(4)	0.378(1)	0.14(2)
C25A	0.292(2)	0.120(3)	0.376(2)	0.16(2)
C26A	0.443(1)	0.267(2)	0.3194(10)	0.070(7)
O27A	0.4124(7)	0.242(2)	0.2673(7)	0.083(7)
C28A	0.503(1)	0.336(2)	0.333(1)	0.080(10)
P29A	0.5650(3)	0.2136(8)	0.3431(3)	0.084(3)
O30A	0.5666(7)	0.092(2)	0.3796(7)	0.091(7)
O31A	0.5550(8)	0.174(2)	0.2798(7)	0.101(8)
C32A	0.593(1)	0.069(3)	0.263(1)	0.12(2)
O33A	0.6211(8)	0.306(2)	0.3662(9)	0.118(9)
C34A	0.680(1)	0.258(3)	0.403(2)	0.15(2)
C1B	0.3636(10)	0.675(3)	0.496(1)	0.073(8)
C2B	0.344(1)	0.595(3)	0.532(1)	0.09(1)
C3B	0.307(1)	0.650(3)	0.558(1)	0.10(1)
C4B	0.296(1)	0.790(3)	0.551(1)	0.10(1)
C5B	0.315(1)	0.877(3)	0.517(1)	0.11(1)
C6B	0.350(1)	0.816(3)	0.488(1)	0.09(1)
C7B	0.4043(10)	0.611(3)	0.4691(10)	0.082(9)
C8B	0.4700(9)	0.665(3)	0.4972(9)	0.071(8)
N9B	0.4966(8)	0.609(2)	0.5546(7)	0.073(7)
C10B	0.546(1)	0.677(3)	0.5947(10)	0.073(8)
O11B	0.5651(8)	0.792(2)	0.5883(7)	0.096(8)
C12B	0.569(1)	0.597(3)	0.650(1)	0.088(9)
N13B	0.5418(10)	0.480(3)	0.6597(9)	0.11(1)
C14B	0.567(1)	0.413(4)	0.713(1)	0.12(1)
C15B	0.621(1)	0.469(4)	0.751(1)	0.11(1)
N16B	0.6520(10)	0.578(3)	0.7438(9)	0.103(10)
C17B	0.627(1)	0.649(3)	0.693(1)	0.10(1)
C18B	0.509(1)	0.630(3)	0.4627(10)	0.071(8)
O19B	0.5230(7)	0.501(2)	0.4593(6)	0.081(7)
N20B	0.5264(8)	0.735(2)	0.4386(7)	0.075(7)
C21B	0.5674(9)	0.722(2)	0.4084(9)	0.067(7)
C22B	0.6274(10)	0.799(3)	0.439(1)	0.083(9)
C23B	0.662(1)	0.755(3)	0.500(1)	0.096(10)
C24B	0.682(1)	0.608(3)	0.500(1)	0.13(2)
C25B	0.717(1)	0.848(3)	0.530(1)	0.13(1)
C26B	0.537(1)	0.765(2)	0.3480(10)	0.070(8)
O27B	0.5668(8)	0.750(2)	0.3163(7)	0.096(8)
C28B	0.474(1)	0.833(3)	0.322(1)	0.084(9)
P29B	0.4161(3)	0.7133(8)	0.2932(3)	0.089(3)

Atom	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>	<i>U</i> _{eq}
O30B	0.4151(7)	0.593(2)	0.3296(7)	0.089(7)
O31B	0.4224(9)	0.670(2)	0.2359(8)	0.111(9)
C32B	0.389(2)	0.558(3)	0.197(1)	0.14(2)
O33B	0.3551(8)	0.805(2)	0.2742(9)	0.122(10)
C34B	0.302(2)	0.750(4)	0.274(2)	0.22(3)

Tab. 12.18: Anisotrope Auslenkungsparameter ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) für (*S,S*)-**121**/*R,R*)-**121**. Der Exponent des anisotropischen Auslenkungsfaktors hat die Form $-2\pi^2[h^2a^2U_{11}+2hka \cdot b \cdot U_{12}+\dots]$.

Atom	<i>U</i> ₁₁	<i>U</i> ₂₂	<i>U</i> ₃₃	<i>U</i> ₁₂	<i>U</i> ₁₃	<i>U</i> ₂₃
C1A	0.06(1)	0.09(1)	0.07(1)	-0.01(1)	0.015(8)	-0.008(9)
C2A	0.11(2)	0.11(2)	0.09(1)	-0.01(2)	0.01(1)	0.02(1)
C3A	0.11(2)	0.14(2)	0.11(2)	-0.01(2)	0.01(1)	0.00(2)
C4A	0.08(2)	0.15(2)	0.10(2)	-0.01(2)	0.00(1)	0.00(2)
C5A	0.10(2)	0.11(2)	0.10(2)	-0.03(1)	0.02(1)	-0.02(1)
C6A	0.07(1)	0.10(1)	0.08(1)	-0.01(1)	0.014(10)	-0.02(1)
C7A	0.050(9)	0.10(2)	0.08(1)	-0.011(10)	0.013(8)	-0.02(1)
C8A	0.061(10)	0.09(2)	0.063(9)	-0.007(10)	0.021(7)	-0.002(9)
N9A	0.06(1)	0.07(1)	0.08(1)	-0.009(8)	0.024(8)	0.006(9)
C10A	0.07(1)	0.08(1)	0.08(1)	0.001(9)	0.026(10)	0.01(1)
O11A	0.062(9)	0.08(1)	0.11(1)	0.002(7)	0.032(8)	0.015(8)
C12A	0.07(1)	0.08(1)	0.07(1)	0.004(10)	0.021(10)	0.006(10)
N13A	0.07(1)	0.09(1)	0.11(2)	0.003(10)	0.01(1)	0.04(1)
C14A	0.08(2)	0.08(2)	0.11(2)	0.01(1)	0.02(1)	0.01(1)
C15A	0.08(2)	0.11(2)	0.10(2)	0.02(1)	0.02(1)	0.01(1)
N16A	0.07(1)	0.11(2)	0.10(2)	0.01(1)	0.022(10)	0.01(1)
C17A	0.09(2)	0.10(2)	0.11(2)	0.01(1)	0.04(1)	0.00(1)
C18A	0.07(1)	0.069(10)	0.069(10)	0.000(9)	0.017(8)	-0.008(8)
O19A	0.070(10)	0.061(8)	0.09(1)	0.003(7)	0.015(8)	0.002(8)
N20A	0.065(10)	0.066(10)	0.078(8)	-0.004(8)	0.024(7)	-0.006(8)
C21A	0.06(1)	0.08(1)	0.076(9)	0.013(10)	0.021(7)	0.02(1)
C22A	0.05(1)	0.09(2)	0.10(2)	0.01(1)	0.024(9)	0.02(1)
C23A	0.07(1)	0.13(2)	0.08(2)	-0.01(1)	0.03(1)	0.00(1)
C24A	0.07(2)	0.21(3)	0.14(2)	0.02(2)	0.04(2)	0.01(2)
C25A	0.11(2)	0.15(2)	0.18(3)	-0.05(2)	0.01(2)	0.05(2)
C26A	0.07(1)	0.06(1)	0.076(9)	-0.010(10)	0.023(8)	0.00(1)
O27A	0.067(10)	0.11(1)	0.078(8)	0.013(9)	0.029(7)	-0.013(9)
C28A	0.08(1)	0.05(1)	0.11(2)	-0.010(9)	0.04(1)	0.01(1)
P29A	0.068(4)	0.090(5)	0.090(5)	-0.016(4)	0.026(3)	0.006(4)
O30A	0.07(1)	0.08(1)	0.12(1)	-0.009(8)	0.032(9)	0.036(9)
O31A	0.10(1)	0.11(1)	0.086(9)	0.03(1)	0.027(9)	-0.008(9)
C32A	0.09(2)	0.08(2)	0.19(3)	0.01(1)	0.06(2)	-0.01(2)
O33A	0.064(9)	0.11(1)	0.16(2)	-0.047(9)	0.015(10)	0.01(1)
C34A	0.07(2)	0.14(3)	0.17(3)	-0.03(2)	-0.01(2)	-0.01(2)

Atom	U ₁₁	U ₂₂	U ₃₃	U ₁₂	U ₁₃	U ₂₃
C1B	0.05(1)	0.07(1)	0.09(1)	0.002(9)	0.016(9)	0.00(1)
C2B	0.08(2)	0.10(2)	0.11(2)	0.01(1)	0.05(1)	0.00(1)
C3B	0.07(2)	0.12(2)	0.10(2)	-0.01(1)	0.03(1)	-0.03(1)
C4B	0.07(2)	0.12(2)	0.09(2)	-0.01(1)	0.02(1)	-0.03(2)
C5B	0.08(2)	0.11(2)	0.13(2)	0.03(2)	0.04(1)	0.00(2)
C6B	0.07(2)	0.07(1)	0.12(2)	0.00(1)	0.03(1)	-0.02(1)
C7B	0.05(1)	0.10(2)	0.09(1)	0.00(1)	0.020(8)	-0.01(1)
C8B	0.055(10)	0.09(1)	0.071(10)	-0.006(9)	0.024(7)	0.004(10)
N9B	0.06(1)	0.08(1)	0.075(9)	-0.011(8)	0.022(7)	0.007(9)
C10B	0.08(1)	0.07(1)	0.067(9)	0.001(9)	0.021(8)	-0.001(9)
O11B	0.09(1)	0.08(1)	0.10(1)	-0.020(9)	0.013(9)	0.000(9)
C12B	0.06(1)	0.12(2)	0.07(1)	0.00(1)	0.017(9)	0.01(1)
N13B	0.08(1)	0.13(2)	0.10(1)	-0.01(1)	0.01(1)	0.04(1)
C14B	0.08(2)	0.19(3)	0.07(1)	-0.03(2)	0.00(1)	0.03(1)
C15B	0.08(2)	0.18(3)	0.07(1)	-0.03(2)	0.02(1)	0.02(2)
N16B	0.07(1)	0.16(2)	0.08(1)	-0.01(1)	0.021(9)	0.02(1)
C17B	0.05(1)	0.15(2)	0.09(1)	-0.01(1)	0.024(9)	0.01(1)
C18B	0.06(1)	0.071(10)	0.08(1)	-0.011(10)	0.031(10)	0.00(1)
O19B	0.08(1)	0.073(8)	0.09(1)	0.003(8)	0.030(8)	0.004(9)
N20B	0.052(9)	0.08(1)	0.09(1)	-0.001(9)	0.027(8)	0.018(9)
C21B	0.06(1)	0.06(1)	0.073(9)	-0.006(9)	0.022(7)	-0.006(10)
C22B	0.05(1)	0.08(1)	0.10(1)	-0.01(1)	0.013(9)	0.00(1)
C23B	0.06(1)	0.11(2)	0.10(1)	0.00(1)	0.01(1)	0.00(1)
C24B	0.11(2)	0.11(2)	0.15(3)	0.01(2)	0.03(2)	0.03(2)
C25B	0.05(1)	0.15(2)	0.16(2)	-0.02(1)	0.01(1)	0.00(2)
C26B	0.07(1)	0.06(1)	0.073(10)	0.00(1)	0.027(7)	-0.01(1)
O27B	0.08(1)	0.12(1)	0.09(1)	0.00(1)	0.042(9)	-0.01(1)
C28B	0.07(1)	0.09(2)	0.09(1)	-0.01(1)	0.023(10)	0.01(1)
P29B	0.071(4)	0.094(5)	0.091(5)	-0.005(4)	0.019(4)	0.012(4)
O30B	0.08(1)	0.08(1)	0.10(1)	-0.023(8)	0.020(9)	0.016(8)
O31B	0.11(1)	0.12(1)	0.09(1)	-0.02(1)	0.026(10)	-0.015(9)
C32B	0.15(3)	0.09(2)	0.12(2)	0.00(2)	-0.01(2)	0.00(1)
O33B	0.054(9)	0.14(2)	0.16(2)	0.016(9)	0.022(10)	0.04(1)
C34B	0.06(2)	0.21(4)	0.39(7)	-0.02(2)	0.09(3)	-0.05(4)

Tab. 12.19: Bindungslängen für (S,S)-121/(R,R)-121.

Atom 1	Atom 2	Länge/Å	Atom 1	Atom 2	Länge/Å
C1A	C6A	1.35(3)	C1A	C2A	1.36(3)
C1A	C7A	1.48(3)	C2A	C3A	1.35(4)
C2A	H2A	0.9500	C3A	C4A	1.34(4)
C3A	H3A	0.9500	C4A	C5A	1.35(4)
C4A	H4A	0.9500	C5A	C6A	1.45(3)
C5A	H5A	0.9500	C6A	H6A	0.9500

Atom 1	Atom 2	Länge/Å	Atom 1	Atom 2	Länge/Å
C7A	C8A	1.58(3)	C7A	H7A	0.9900
C7A	H7B	0.9900	C8A	N9A	1.45(3)
C8A	C18A	1.52(3)	C8A	H8A	10.000
N9A	C10A	1.33(3)	N9A	H9A	0.8800
C10A	O11A	1.22(2)	C10A	C12A	1.46(3)
C12A	N13A	1.37(3)	C12A	C17A	1.38(3)
N13A	C14A	1.37(3)	C14A	C15A	1.43(4)
C14A	H14A	0.9500	C15A	N16A	1.33(3)
C15A	H15A	0.9500	N16A	C17A	1.38(3)
C17A	H17A	0.9500	C18A	O19A	1.24(2)
C18A	N20A	1.33(3)	N20A	C21A	1.44(2)
N20A	H20A	0.8800	C21A	C26A	1.47(3)
C21A	C22A	1.52(3)	C21A	H21A	10.000
C22A	C23A	1.54(3)	C22A	H22A	0.9900
C22A	H22B	0.9900	C23A	C25A	1.44(3)
C23A	C24A	1.50(3)	C23A	H23A	10.000
C24A	H24A	0.9800	C24A	H24B	0.9800
C24A	H24C	0.9800	C25A	H25A	0.9800
C25A	H25B	0.9800	C25A	H25C	0.9800
C26A	O27A	1.25(2)	C26A	C28A	1.47(3)
C28A	P29A	1.79(2)	C28A	H28A	0.9900
C28A	H28B	0.9900	P29A	O30A	1.454(15)
P29A	O33A	1.499(16)	P29A	O31A	1.563(17)
O31A	C32A	1.49(3)	C32A	H32A	0.9800
C32A	H32B	0.9800	C32A	H32C	0.9800
O33A	C34A	1.41(3)	C34A	H34A	0.9800
C34A	H34B	0.9800	C34A	H34C	0.9800
C1B	C6B	1.35(3)	C1B	C2B	1.37(3)
C1B	C7B	1.50(3)	C2B	C3B	1.38(3)
C2B	H2B	0.9500	C3B	C4B	1.33(4)
C3B	H3B	0.9500	C4B	C5B	1.38(4)
C4B	H4B	0.9500	C5B	C6B	1.40(3)
C5B	H5B	0.9500	C6B	H6B	0.9500
C7B	C8B	1.52(3)	C7B	H7C	0.9900
C7B	H7D	0.9900	C8B	N9B	1.44(2)
C8B	C18B	1.52(3)	C8B	H8B	10.000
N9B	C10B	1.36(3)	N9B	H9B	0.8800
C10B	O11B	1.21(3)	C10B	C12B	1.49(3)
C12B	N13B	1.34(3)	C12B	C17B	1.45(3)
N13B	C14B	1.39(3)	C14B	C15B	1.38(3)
C14B	H14B	0.9500	C15B	N16B	1.32(3)

Atom 1	Atom 2	Länge/Å	Atom 1	Atom 2	Länge/Å
C15B	H15B	0.9500	N16B	C17B	1.35(3)
C17B	H17B	0.9500	C18B	O19B	1.26(2)
C18B	N20B	1.30(3)	N20B	C21B	1.44(3)
N20B	H20B	0.8800	C21B	C26B	1.47(3)
C21B	C22B	1.51(3)	C21B	H21B	10.000
C22B	C23B	1.51(3)	C22B	H22C	0.9900
C22B	H22D	0.9900	C23B	C24B	1.45(3)
C23B	C25B	1.51(3)	C23B	H23B	10.000
C24B	H24D	0.9800	C24B	H24E	0.9800
C24B	H24F	0.9800	C25B	H25D	0.9800
C25B	H25E	0.9800	C25B	H25F	0.9800
C26B	O27B	1.24(3)	C26B	C28B	1.52(3)
C28B	P29B	1.70(2)	C28B	H28C	0.9900
C28B	H28D	0.9900	P29B	O30B	1.456(16)
P29B	O31B	1.559(19)	P29B	O33B	1.579(19)
O31B	C32B	1.45(3)	C32B	H32D	0.9800
C32B	H32E	0.9800	C32B	H32F	0.9800
O33B	C34B	1.36(4)	C34B	H34D	0.9800
C34B	H34E	0.9800	C34B	H34F	0.9800

Tab. 12.20: Bindungswinkel für (S,S)-121/(R,R)-121.

Atom 1	Atom 2	Atom 3	Winkel/°	Atom 1	Atom 2	Atom 3	Winkel/°
C6A	C1A	C2A	118(2)	C6A	C1A	C7A	117(2)
C2A	C1A	C7A	125(2)	C3A	C2A	C1A	127(3)
C3A	C2A	H2A	116.3	C1A	C2A	H2A	116.3
C4A	C3A	C2A	113(3)	C4A	C3A	H3A	123.4
C2A	C3A	H3A	123.4	C3A	C4A	C5A	125(3)
C3A	C4A	H4A	117.4	C5A	C4A	H4A	117.4
C4A	C5A	C6A	118(3)	C4A	C5A	H5A	120.8
C6A	C5A	H5A	120.8	C1A	C6A	C5A	117(3)
C1A	C6A	H6A	121.3	C5A	C6A	H6A	121.3
C1A	C7A	C8A	112.3(19)	C1A	C7A	H7A	109.1
C8A	C7A	H7A	109.1	C1A	C7A	H7B	109.1
C8A	C7A	H7B	109.1	H7A	C7A	H7B	107.9
N9A	C8A	C18A	107.9(18)	N9A	C8A	C7A	108.1(18)
C18A	C8A	C7A	110.9(18)	N9A	C8A	H8A	110.0
C18A	C8A	H8A	110.0	C7A	C8A	H8A	110.0
C10A	N9A	C8A	120.0(19)	C10A	N9A	H9A	120.0
C8A	N9A	H9A	120.0	O11A	C10A	N9A	122(2)
O11A	C10A	C12A	119(2)	N9A	C10A	C12A	119(2)

Atom 1	Atom 2	Atom 3	Winkel/°	Atom 1	Atom 2	Atom 3	Winkel/°
N13A	C12A	C17A	126(3)	N13A	C12A	C10A	115(2)
C17A	C12A	C10A	119(2)	C14A	N13A	C12A	112(2)
N13A	C14A	C15A	122(3)	N13A	C14A	H14A	118.8
C15A	C14A	H14A	118.8	N16A	C15A	C14A	122(3)
N16A	C15A	H15A	119.0	C14A	C15A	H15A	119.0
C15A	N16A	C17A	117(3)	C12A	C17A	N16A	120(3)
C12A	C17A	H17A	120.1	N16A	C17A	H17A	120.1
O19A	C18A	N20A	122(2)	O19A	C18A	C8A	122(2)
N20A	C18A	C8A	116(2)	C18A	N20A	C21A	125.1(18)
C18A	N20A	H20A	117.4	C21A	N20A	H20A	117.4
N20A	C21A	C26A	113.3(18)	N20A	C21A	C22A	111.2(19)
C26A	C21A	C22A	109.1(18)	N20A	C21A	H21A	107.7
C26A	C21A	H21A	107.7	C22A	C21A	H21A	107.7
C21A	C22A	C23A	119(2)	C21A	C22A	H22A	107.6
C23A	C22A	H22A	107.6	C21A	C22A	H22B	107.6
C23A	C22A	H22B	107.6	H22A	C22A	H22B	107.1
C25A	C23A	C24A	109(3)	C25A	C23A	C22A	116(3)
C24A	C23A	C22A	111(2)	C25A	C23A	H23A	107.0
C24A	C23A	H23A	107.0	C22A	C23A	H23A	107.0
C23A	C24A	H24A	109.5	C23A	C24A	H24B	109.5
H24A	C24A	H24B	109.5	C23A	C24A	H24C	109.5
H24A	C24A	H24C	109.5	H24B	C24A	H24C	109.5
C23A	C25A	H25A	109.5	C23A	C25A	H25B	109.5
H25A	C25A	H25B	109.5	C23A	C25A	H25C	109.5
H25A	C25A	H25C	109.5	H25B	C25A	H25C	109.5
O27A	C26A	C21A	118(2)	O27A	C26A	C28A	116(2)
C21A	C26A	C28A	126(2)	C26A	C28A	P29A	114.3(16)
C26A	C28A	H28A	108.7	P29A	C28A	H28A	108.7
C26A	C28A	H28B	108.7	P29A	C28A	H28B	108.7
H28A	C28A	H28B	107.6	O30A	P29A	O33A	113.6(11)
O30A	P29A	O31A	114.6(11)	O33A	P29A	O31A	107.6(12)
O30A	P29A	C28A	114.6(11)	O33A	P29A	C28A	103.5(11)
O31A	P29A	C28A	101.7(11)	C32A	O31A	P29A	124.6(17)
O31A	C32A	H32A	109.5	O31A	C32A	H32B	109.5
H32A	C32A	H32B	109.5	O31A	C32A	H32C	109.5
H32A	C32A	H32C	109.5	H32B	C32A	H32C	109.5
C34A	O33A	P29A	124.5(19)	O33A	C34A	H34A	109.5
O33A	C34A	H34B	109.5	H34A	C34A	H34B	109.5
O33A	C34A	H34C	109.5	H34A	C34A	H34C	109.5
H34B	C34A	H34C	109.5	C6B	C1B	C2B	121(3)
C6B	C1B	C7B	118(2)	C2B	C1B	C7B	121(2)

Atom 1	Atom 2	Atom 3	Winkel/°	Atom 1	Atom 2	Atom 3	Winkel/°
C1B	C2B	C3B	123(3)	C1B	C2B	H2B	118.6
C3B	C2B	H2B	118.6	C4B	C3B	C2B	115(3)
C4B	C3B	H3B	122.4	C2B	C3B	H3B	122.4
C3B	C4B	C5B	125(3)	C3B	C4B	H4B	117.6
C5B	C4B	H4B	117.6	C4B	C5B	C6B	118(3)
C4B	C5B	H5B	120.9	C6B	C5B	H5B	120.9
C1B	C6B	C5B	118(3)	C1B	C6B	H6B	121.1
C5B	C6B	H6B	121.1	C1B	C7B	C8B	111.4(18)
C1B	C7B	H7C	109.3	C8B	C7B	H7C	109.3
C1B	C7B	H7D	109.3	C8B	C7B	H7D	109.3
H7C	C7B	H7D	108.0	N9B	C8B	C7B	108.5(18)
N9B	C8B	C18B	111.5(18)	C7B	C8B	C18B	112.9(19)
N9B	C8B	H8B	108.0	C7B	C8B	H8B	108.0
C18B	C8B	H8B	108.0	C10B	N9B	C8B	119.4(19)
C10B	N9B	H9B	120.3	C8B	N9B	H9B	120.3
O11B	C10B	N9B	125(2)	O11B	C10B	C12B	123(2)
N9B	C10B	C12B	112(2)	N13B	C12B	C17B	121(2)
N13B	C12B	C10B	123(2)	C17B	C12B	C10B	116(2)
C12B	N13B	C14B	119(2)	C15B	C14B	N13B	116(3)
C15B	C14B	H14B	121.8	N13B	C14B	H14B	121.8
N16B	C15B	C14B	128(3)	N16B	C15B	H15B	116.2
C14B	C15B	H15B	116.2	C15B	N16B	C17B	117(2)
N16B	C17B	C12B	119(3)	N16B	C17B	H17B	120.4
C12B	C17B	H17B	120.4	O19B	C18B	N20B	124(2)
O19B	C18B	C8B	118(2)	N20B	C18B	C8B	117(2)
C18B	N20B	C21B	125(2)	C18B	N20B	H20B	117.7
C21B	N20B	H20B	117.7	N20B	C21B	C26B	111.7(18)
N20B	C21B	C22B	111.8(18)	C26B	C21B	C22B	112.6(18)
N20B	C21B	H21B	106.8	C26B	C21B	H21B	106.8
C22B	C21B	H21B	106.8	C23B	C22B	C21B	115(2)
C23B	C22B	H22C	108.4	C21B	C22B	H22C	108.4
C23B	C22B	H22D	108.4	C21B	C22B	H22D	108.4
H22C	C22B	H22D	107.5	C24B	C23B	C22B	108(2)
C24B	C23B	C25B	109(2)	C22B	C23B	C25B	112(2)
C24B	C23B	H23B	109.1	C22B	C23B	H23B	109.1
C25B	C23B	H23B	109.1	C23B	C24B	H24D	109.5
C23B	C24B	H24E	109.5	H24D	C24B	H24E	109.5
C23B	C24B	H24F	109.5	H24D	C24B	H24F	109.5
H24E	C24B	H24F	109.5	C23B	C25B	H25D	109.5
C23B	C25B	H25E	109.5	H25D	C25B	H25E	109.5
C23B	C25B	H25F	109.5	H25D	C25B	H25F	109.5

Atom 1	Atom 2	Atom 3	Winkel/°	Atom 1	Atom 2	Atom 3	Winkel/°
H25E	C25B	H25F	109.5	O27B	C26B	C21B	118(2)
O27B	C26B	C28B	118(2)	C21B	C26B	C28B	124(2)
C26B	C28B	P29B	113.7(17)	C26B	C28B	H28C	108.8
P29B	C28B	H28C	108.8	C26B	C28B	H28D	108.8
P29B	C28B	H28D	108.8	H28C	C28B	H28D	107.7
O30B	P29B	O31B	114.4(11)	O30B	P29B	O33B	112.3(11)
O31B	P29B	O33B	104.7(12)	O30B	P29B	C28B	116.2(11)
O31B	P29B	C28B	102.9(12)	O33B	P29B	C28B	105.1(11)
C32B	O31B	P29B	127(2)	O31B	C32B	H32D	109.5
O31B	C32B	H32E	109.5	H32D	C32B	H32E	109.5
O31B	C32B	H32F	109.5	H32D	C32B	H32F	109.5
H32E	C32B	H32F	109.5	C34B	O33B	P29B	122(2)
O33B	C34B	H34D	109.5	O33B	C34B	H34E	109.5
H34D	C34B	H34E	109.5	O33B	C34B	H34F	109.5
H34D	C34B	H34F	109.5	H34E	C34B	H34F	109.5

Tab. 12.21: Torsionswinkel für (S,S)-121/(R,R)-121.

A	B	C	D	Winkel/°	A	B	C	D	Winkel/°
C6A	C1A	C2A	C3A	-3(5)	C7A	C1A	C2A	C3A	-179(3)
C1A	C2A	C3A	C4A	-3(5)	C2A	C3A	C4A	C5A	5(6)
C3A	C4A	C5A	C6A	-1(5)	C2A	C1A	C6A	C5A	7(4)
C7A	C1A	C6A	C5A	-176(2)	C4A	C5A	C6A	C1A	-5(4)
C6A	C1A	C7A	C8A	-62(3)	C2A	C1A	C7A	C8A	115(3)
C1A	C7A	C8A	N9A	-69(2)	C1A	C7A	C8A	C18A	172(2)
C18A	C8A	N9A	C10A	-78(2)	C7A	C8A	N9A	C10A	161(2)
C8A	N9A	C10A	O11A	-4(3)	C8A	N9A	C10A	C12A	174.5(19)
O11A	C10A	C12A	N13A	-175(2)	N9A	C10A	C12A	N13A	6(3)
O11A	C10A	C12A	C17A	7(3)	N9A	C10A	C12A	C17A	-171(2)
C17A	C12A	N13A	C14A	-1(4)	C10A	C12A	N13A	C14A	-178(2)
C12A	N13A	C14A	C15A	1(4)	N13A	C14A	C15A	N16A	2(4)
C14A	C15A	N16A	C17A	-4(4)	N13A	C12A	C17A	N16A	-1(4)
C10A	C12A	C17A	N16A	176(2)	C15A	N16A	C17A	C12A	4(4)
N9A	C8A	C18A	O19A	-55(3)	C7A	C8A	C18A	O19A	63(3)
N9A	C8A	C18A	N20A	124(2)	C7A	C8A	C18A	N20A	-117(2)
O19A	C18A	N20A	C21A	0(4)	C8A	C18A	N20A	C21A	-179.7(19)
C18A	N20A	C21A	C26A	-117(2)	C18A	N20A	C21A	C22A	119(2)
N20A	C21A	C22A	C23A	-60(3)	C26A	C21A	C22A	C23A	174(2)
C21A	C22A	C23A	C25A	-66(3)	C21A	C22A	C23A	C24A	169(2)
N20A	C21A	C26A	O27A	171.8(19)	C22A	C21A	C26A	O27A	64(3)
N20A	C21A	C26A	C28A	-5(3)	C22A	C21A	C26A	C28A	119(2)

A	B	C	D	Winkel/°	A	B	C	D	Winkel/°
O27A	C26A	C28A	P29A	-88(2)	C21A	C26A	C28A	P29A	90(3)
C26A	C28A	P29A	O30A	-46(2)	C26A	C28A	P29A	O33A	-169.8(19)
C26A	C28A	P29A	O31A	78.7(19)	O30A	P29A	O31A	C32A	53(2)
O33A	P29A	O31A	C32A	74(2)	C28A	P29A	O31A	C32A	-177.4(19)
O30A	P29A	O33A	C34A	27(3)	O31A	P29A	O33A	C34A	-101(3)
C28A	P29A	O33A	C34A	152(3)	C6B	C1B	C2B	C3B	4(4)
C7B	C1B	C2B	C3B	180(2)	C1B	C2B	C3B	C4B	-6(4)
C2B	C3B	C4B	C5B	5(4)	C3B	C4B	C5B	C6B	-2(4)
C2B	C1B	C6B	C5B	-1(4)	C7B	C1B	C6B	C5B	-176(2)
C4B	C5B	C6B	C1B	0(4)	C6B	C1B	C7B	C8B	69(3)
C2B	C1B	C7B	C8B	-107(3)	C1B	C7B	C8B	N9B	69(2)
C1B	C7B	C8B	C18B	-167(2)	C7B	C8B	N9B	C10B	-158(2)
C18B	C8B	N9B	C10B	77(3)	C8B	N9B	C10B	O11B	9(4)
C8B	N9B	C10B	C12B	-175.9(19)	O11B	C10B	C12B	N13B	170(3)
N9B	C10B	C12B	N13B	-6(3)	O11B	C10B	C12B	C17B	-13(4)
N9B	C10B	C12B	C17B	-172(2)	C17B	C12B	N13B	C14B	4(4)
C10B	C12B	N13B	C14B	-179(3)	C12B	N13B	C14B	C15B	3(4)
N13B	C14B	C15B	N16B	-1(5)	C14B	C15B	N16B	C17B	3(5)
C15B	N16B	C17B	C12B	-3(4)	N13B	C12B	C17B	N16B	1(4)
C10B	C12B	C17B	N16B	-178(2)	N9B	C8B	C18B	O19B	54(3)
C7B	C8B	C18B	O19B	-68(3)	N9B	C8B	C18B	N20B	-126(2)
C7B	C8B	C18B	N20B	112(2)	O19B	C18B	N20B	C21B	5(4)
C8B	C18B	N20B	C21B	174.9(18)	C18B	N20B	C21B	C26B	119(2)
C18B	N20B	C21B	C22B	-114(2)	N20B	C21B	C22B	C23B	56(3)
C26B	C21B	C22B	C23B	-177(2)	C21B	C22B	C23B	C24B	66(3)
C21B	C22B	C23B	C25B	-173(2)	N20B	C21B	C26B	O27B	-176(2)
C22B	C21B	C26B	O27B	57(3)	N20B	C21B	C26B	C28B	7(3)
C22B	C21B	C26B	C28B	-119(2)	O27B	C26B	C28B	P29B	91(3)
C21B	C26B	C28B	P29B	-92(3)	C26B	C28B	P29B	O30B	50(2)
C26B	C28B	P29B	O31B	-75(2)	C26B	C28B	P29B	O33B	175.3(19)
O30B	P29B	O31B	C32B	45(2)	O33B	P29B	O31B	C32B	-78(2)
C28B	P29B	O31B	C32B	172(2)	O30B	P29B	O33B	C34B	-22(3)
O31B	P29B	O33B	C34B	102(3)	C28B	P29B	O33B	C34B	-149(3)

Tab. 12.22: Wasserstoffatomkoordinaten und isotrope Auslenkungsparameter (\AA^2) für (S,S)-121/(R,R)-121.

Atom	x	y	z	U_{iso}
H2A	0.65473	-0.02343	0.62974	0.13
H3A	0.72413	0.05582	0.71666	0.16
H4A	0.75503	0.29010	0.71913	0.14
H5A	0.71059	0.44597	0.64581	0.13

Atom	x	y	z	U _{iso}
H6A	0.62782	0.36178	0.55938	0.104
H7A	0.58819	-0.00187	0.53326	0.096
H7B	0.60505	0.12561	0.49949	0.096
H8A	0.52908	0.27729	0.52054	0.085
H9A	0.51702	0.03654	0.57728	0.086
H14A	0.44550	-0.14777	0.68596	0.11
H15A	0.35687	-0.04750	0.69294	0.12
H17A	0.35941	0.26221	0.58580	0.12
H20A	0.47199	0.32340	0.43234	0.085
H21A	0.40679	0.11686	0.35472	0.088
H22A	0.33121	0.29045	0.30971	0.098
H22B	0.36795	0.40366	0.35770	0.098
H23A	0.34674	0.26355	0.42749	0.11
H24A	0.28673	0.46345	0.38459	0.21
H24B	0.23840	0.36116	0.33821	0.21
H24C	0.24883	0.34792	0.40466	0.21
H25A	0.32382	0.04846	0.38104	0.24
H25B	0.27156	0.10144	0.40272	0.24
H25C	0.26113	0.11469	0.33627	0.24
H28A	0.51267	0.39415	0.36770	0.096
H28B	0.49974	0.40133	0.30067	0.096
H32A	0.57795	0.06250	0.22121	0.18
H32B	0.63608	0.10048	0.27826	0.18
H32C	0.59015	-0.02483	0.27916	0.18
H34A	0.70875	0.33817	0.41201	0.22
H34B	0.67736	0.22049	0.43816	0.22
H34C	0.69350	0.18301	0.38345	0.22
H2B	0.35645	0.49835	0.53836	0.11
H3B	0.29002	0.59233	0.57911	0.11
H4B	0.27352	0.83288	0.57083	0.12
H5B	0.30488	0.97524	0.51245	0.13
H6B	0.36447	0.87152	0.46416	0.10
H7C	0.38791	0.63451	0.42767	0.098
H7D	0.40409	0.50540	0.47274	0.098
H8B	0.46837	0.77166	0.50006	0.085
H9B	0.48137	0.53082	0.56380	0.087
H14B	0.54748	0.33251	0.72191	0.14
H15B	0.63753	0.42310	0.78773	0.14
H17B	0.64641	0.73094	0.68592	0.12
H20B	0.51190	0.82074	0.44088	0.090
H21B	0.57751	0.61817	0.40857	0.080
H22C	0.65429	0.78335	0.41738	0.099
H22D	0.61887	0.90265	0.43822	0.099

Atom	x	y	z	U _{iso}
H23B	0.63396	0.76067	0.52183	0.115
H24D	0.70469	0.57699	0.54008	0.19
H24E	0.64582	0.54693	0.48263	0.19
H24F	0.70861	0.60163	0.47865	0.19
H25D	0.70405	0.94750	0.52998	0.20
H25E	0.73877	0.81593	0.56965	0.20
H25F	0.74541	0.84245	0.50946	0.20
H28C	0.47363	0.90105	0.29194	0.100
H28D	0.46657	0.88777	0.35246	0.100
H32D	0.40207	0.55450	0.16413	0.21
H32E	0.39775	0.46615	0.21688	0.21
H32F	0.34478	0.57756	0.18280	0.21
H34D	0.26927	0.82279	0.26076	0.33
H34E	0.28942	0.66759	0.24780	0.33
H34F	0.30711	0.71908	0.31275	0.33

12.2.4 Kristallographische Daten von (S,R)-121/(R,S)-121

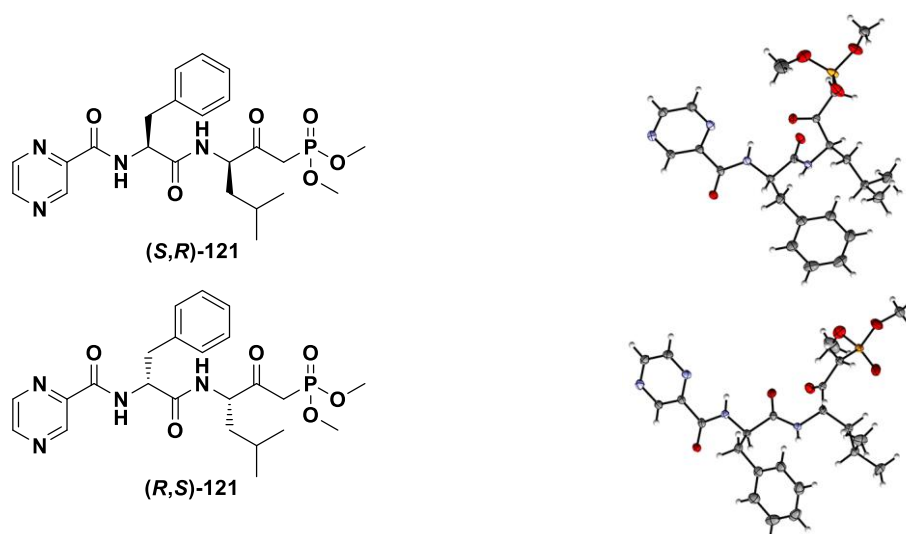


Abb. 12.250: Strukturformeln (links) und Molekülstrukturen im Festkörper (rechts; ORTEP, Ellipsoide dargestellt mit 50% Wahrscheinlichkeit) von (S,R)-121/(R,S)-121. Rot = Sauerstoff, Blau = Stickstoff, Grau = Kohlenstoff, Orange = Phosphor.

Tab. 12.23: Kristalldaten und Strukturverfeinerung von (S,R)-121/(R,S)-121.

Parameter	Wert
Summenformel	C ₂₃ H ₃₁ N ₄ O ₆ P
Molekulargewicht/g · mol ⁻¹	490.49
Temperatur/K	120
Kristallsystem	monoklin
Raumgruppe	P c

Parameter	Wert
$a/\text{\AA}$	11.6418(5)
$b/\text{\AA}$	11.4898(3)
$c/\text{\AA}$	10.1513(4)
$\alpha/^\circ$	90
$\beta/^\circ$	115.039(3)
$\gamma/^\circ$	90
Volumen/ \AA^3	1230.25(8)
Z	2
Dichte $\rho_{\text{calc}}/\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$	1.324
μ/mm^{-1}	0.16
F(000)	520
Kristallgröße/ mm^3	$0.08 \times 0.28 \times 0.38$
Strahlung	Mo-K α
2 Θ Messbereich für Datenerfassung/ $^\circ$	2 bis 28
Indexbereiche	$-15 \leq h \leq 15, -15 \leq k \leq 13, -13 \leq l \leq 13$
Reflexzahl gemessen	18982
Reflexzahl unabhängig	5856 [$R_{\text{int}} = 0.0255$]
Anpassungsgüte/Fitgüte bzgl. F^2	1.046
Finale R-Indizes [$I \geq 2\sigma(I)$]	$R_1 = 0.0395, wR_2 = 0.1028$
Finale R-Indizes [alle Daten]	$R_1 = 0.0466, wR_2 = 0.1028$
Maximale Peakhöhe in diff. Fouriersynthese/ $e \text{\AA}^{-3}$	0.63/−0.45

Tab. 12.24: Endkoordinaten und äquivalente Auslenkungsparameter (\AA^2) für (S,R)-**121**/(R,S)-**121**. U_{eq} ist als 1/3 der Spur des orthogonalisierten U_{ij} -Tensors definiert ($U_{\text{eq}} = (1/3) \cdot \sum_{ij} a_i \cdot a_j \cdot \mathbf{a}_i \cdot \mathbf{a}_j$).

Atom	x	y	z	U_{eq}
C1	0.9383(3)	0.1285(3)	0.6291(3)	0.023(1)
C2	0.9958(3)	0.2223(3)	0.7191(4)	0.028(1)
C3	1.0819(3)	0.2057(3)	0.8626(4)	0.036(1)
C4	1.1106(3)	0.0944(4)	0.9182(4)	0.038(1)
C5	1.0543(4)	−0.0001(4)	0.8300(4)	0.039(1)
C6	0.9693(3)	0.0172(3)	0.6856(4)	0.031(1)
C7	0.8430(3)	0.1466(3)	0.4737(3)	0.0231(10)
C8	0.7054(3)	0.1500(2)	0.4573(3)	0.0174(9)
N9	0.6167(2)	0.1490(2)	0.3051(3)	0.0192(8)
C10	0.5877(3)	0.0522(2)	0.2249(3)	0.0181(9)
O11	0.6319(2)	−0.0444(2)	0.2734(2)	0.0232(7)
C12	0.4965(3)	0.0695(2)	0.0687(3)	0.0177(9)

Atom	x	y	z	U _{eq}
N13	0.4724(2)	0.1798(2)	0.0210(3)	0.0212(9)
C14	0.3943(3)	0.1937(3)	-0.1180(3)	0.024(1)
C15	0.3415(3)	0.0997(3)	-0.2091(3)	0.0243(10)
N16	0.3629(3)	-0.0102(2)	-0.1625(3)	0.0241(9)
C17	0.4404(3)	-0.0244(2)	-0.0219(3)	0.0193(10)
C18	0.6800(3)	0.2629(2)	0.5203(3)	0.0168(9)
O19	0.6657(2)	0.3544(2)	0.4530(2)	0.0252(8)
N20	0.6799(2)	0.2559(2)	0.6519(3)	0.0167(8)
C21	0.6492(3)	0.3582(2)	0.7141(3)	0.0179(9)
C22	0.6786(3)	0.3380(2)	0.8749(3)	0.0192(9)
C23	0.8184(3)	0.3218(3)	0.9759(3)	0.0218(10)
C24	0.8967(3)	0.4284(3)	0.9775(4)	0.035(1)
C25	0.8306(4)	0.2949(3)	1.1291(4)	0.035(1)
C26	0.5080(3)	0.3867(2)	0.6351(3)	0.0195(9)
O27	0.4311(2)	0.3118(2)	0.5792(2)	0.0286(8)
C28	0.4726(3)	0.5130(2)	0.6376(3)	0.0236(10)
P29	0.33734(8)	0.52788(6)	0.67542(8)	0.0257(3)
O30	0.3455(3)	0.4631(2)	0.8038(3)	0.041(1)
O31	0.2151(2)	0.4964(2)	0.5355(3)	0.0385(10)
C32	0.1512(4)	0.3863(4)	0.5314(6)	0.058(2)
O33	0.3312(3)	0.6645(2)	0.6856(3)	0.0377(10)
C34	0.2478(4)	0.7141(3)	0.7424(4)	0.037(1)

Tab. 12.25: Anisotrope Auslenkungsparameter ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) für (S,R)-**121**/(R,S)-**121**. Der Exponent des anisotropischen Auslenkungsfaktors hat die Form $-2\pi^2[h^2a^2U_{11}+2hka \cdot b \cdot U_{12}+\dots]$.

Atom	U ₁₁	U ₂₂	U ₃₃	U ₁₂	U ₁₃	U ₂₃
C1	0.019(1)	0.031(1)	0.023(1)	0.002(1)	0.011(1)	0.001(1)
C2	0.026(2)	0.030(2)	0.029(2)	0.002(1)	0.012(1)	-0.002(1)
C3	0.029(2)	0.045(2)	0.029(2)	-0.001(1)	0.009(1)	-0.010(1)
C4	0.025(2)	0.060(2)	0.025(2)	0.008(2)	0.007(1)	0.004(2)
C5	0.030(2)	0.044(2)	0.041(2)	0.008(1)	0.014(2)	0.016(2)
C6	0.027(2)	0.033(2)	0.034(2)	0.001(1)	0.013(1)	0.000(1)
C7	0.025(1)	0.027(1)	0.019(1)	0.000(1)	0.011(1)	-0.003(1)
C8	0.023(1)	0.014(1)	0.015(1)	0.0006(10)	0.008(1)	-0.0004(9)
N9	0.027(1)	0.015(1)	0.015(1)	0.0010(9)	0.0078(9)	-0.0002(9)
C10	0.021(1)	0.018(1)	0.018(1)	-0.0014(10)	0.010(1)	-0.0034(10)
O11	0.031(1)	0.0166(9)	0.0194(10)	0.0040(8)	0.0085(8)	-0.0010(7)
C12	0.019(1)	0.017(1)	0.019(1)	0.0008(10)	0.010(1)	-0.0015(10)
N13	0.026(1)	0.016(1)	0.023(1)	-0.0010(9)	0.012(1)	0.0005(9)
C14	0.028(2)	0.019(1)	0.024(1)	0.000(1)	0.011(1)	0.003(1)
C15	0.025(1)	0.027(1)	0.017(1)	0.000(1)	0.005(1)	0.001(1)
N16	0.025(1)	0.021(1)	0.023(1)	-0.0003(10)	0.007(1)	-0.0045(10)
C17	0.020(1)	0.017(1)	0.020(1)	0.0011(10)	0.008(1)	-0.0013(10)

Atom	U ₁₁	U ₂₂	U ₃₃	U ₁₂	U ₁₃	U ₂₃
C18	0.018(1)	0.016(1)	0.016(1)	-0.0018(10)	0.007(1)	-0.0025(10)
O19	0.042(1)	0.0154(9)	0.0191(10)	-0.0008(8)	0.0143(9)	0.0019(7)
N20	0.022(1)	0.0124(10)	0.016(1)	0.0006(8)	0.0085(9)	0.0005(8)
C21	0.022(1)	0.014(1)	0.017(1)	-0.0020(10)	0.009(1)	-0.0025(9)
C22	0.021(1)	0.021(1)	0.016(1)	0.000(1)	0.008(1)	-0.001(1)
C23	0.020(1)	0.023(1)	0.018(1)	0.002(1)	0.004(1)	-0.002(1)
C24	0.020(2)	0.033(2)	0.041(2)	-0.005(1)	0.002(1)	0.000(1)
C25	0.038(2)	0.043(2)	0.018(1)	0.007(1)	0.006(1)	0.002(1)
C26	0.023(1)	0.019(1)	0.013(1)	0.004(1)	0.004(1)	-0.0014(10)
O27	0.023(1)	0.025(1)	0.030(1)	-0.0004(8)	0.0032(9)	-0.0095(9)
C28	0.029(2)	0.018(1)	0.019(1)	0.005(1)	0.005(1)	-0.001(1)
P29	0.0427(5)	0.0185(3)	0.0220(4)	0.0098(3)	0.0196(3)	0.0055(3)
O30	0.082(2)	0.023(1)	0.030(1)	0.006(1)	0.035(1)	0.0045(9)
O31	0.029(1)	0.055(2)	0.036(1)	0.003(1)	0.017(1)	0.005(1)
C32	0.035(2)	0.057(3)	0.083(3)	0.000(2)	0.027(2)	-0.015(2)
O33	0.052(1)	0.023(1)	0.048(1)	0.009(1)	0.030(1)	0.006(1)
C34	0.046(2)	0.032(2)	0.027(2)	0.013(1)	0.010(1)	-0.004(1)

Tab. 12.26: Bindungslängen für (S,R)-121/(R,S)-121.

Atom 1	Atom 2	Länge/Å	Atom 1	Atom 2	Länge/Å
C1	C6	1.385(4)	C1	C2	1.388(4)
C1	C7	1.510(4)	C2	C3	1.388(5)
C2	H2	0.9500	C3	C4	1.380(6)
C3	H3	0.9500	C4	C5	1.384(6)
C4	H4	0.9500	C5	C6	1.393(5)
C5	H5	0.9500	C6	H6	0.9500
C7	C8	1.539(4)	C7	H7A	0.9900
C7	H7B	0.9900	C8	N9	1.451(3)
C8	C18	1.529(4)	C8	H8	10.000
N9	C10	1.335(3)	N9	H9	0.85(4)
C10	O11	1.234(3)	C10	C12	1.502(4)
C12	N13	1.343(3)	C12	C17	1.388(4)
N13	C14	1.326(4)	C14	C15	1.385(4)
C14	H14	0.9500	C15	N16	1.334(4)
C15	H15	0.9500	N16	C17	1.337(4)
C17	H17	0.9500	C18	O19	1.226(3)
C18	N20	1.339(3)	N20	C21	1.449(3)
N20	H20	0.86(4)	C21	C26	1.529(4)
C21	C22	1.537(4)	C21	H21	10.000
C22	C23	1.524(4)	C22	H22A	0.9900
C22	H22B	0.9900	C23	C24	1.522(4)

Atom 1	Atom 2	Länge/Å	Atom 1	Atom 2	Länge/Å
C23	C25	1.531(4)	C23	H23	10.000
C24	H24A	0.97(3)	C24	H24B	0.97(3)
C24	H24C	0.97(3)	C25	H25A	0.98(3)
C25	H25B	0.98(3)	C25	H25C	0.98(3)
C26	O27	1.198(4)	C26	C28	1.512(4)
C28	P29	1.779(3)	C28	H28A	0.9900
C28	H28B	0.9900	P29	O30	1.468(2)
P29	O31	1.570(3)	P29	O33	1.577(2)
O31	C32	1.459(5)	C32	H32A	1.01(3)
C32	H32B	1.01(3)	C32	H32C	1.01(3)
O33	C34	1.439(4)	C34	H34A	0.95(3)
C34	H34B	0.95(3)	C34	H34C	0.95(3)

Tab. 12.27: Bindungswinkel für (S,R)-121/(R,S)-121.

Atom 1	Atom 2	Atom 3	Winkel/°	Atom 1	Atom 2	Atom 3	Winkel/°
C6	C1	C2	118.4(3)	C6	C1	C7	120.5(3)
C2	C1	C7	121.2(3)	C3	C2	C1	121.1(3)
C3	C2	H2	119.4	C1	C2	H2	119.4
C4	C3	C2	119.9(3)	C4	C3	H3	120.0
C2	C3	H3	120.0	C3	C4	C5	119.7(3)
C3	C4	H4	120.1	C5	C4	H4	120.1
C4	C5	C6	120.0(3)	C4	C5	H5	120.0
C6	C5	H5	120.0	C1	C6	C5	120.8(3)
C1	C6	H6	119.6	C5	C6	H6	119.6
C1	C7	C8	112.8(2)	C1	C7	H7A	109.0
C8	C7	H7A	109.0	C1	C7	H7B	109.0
C8	C7	H7B	109.0	H7A	C7	H7B	107.8
N9	C8	C18	106.0(2)	N9	C8	C7	110.8(2)
C18	C8	C7	110.7(2)	N9	C8	H8	109.8
C18	C8	H8	109.8	C7	C8	H8	109.8
C10	N9	C8	122.6(2)	C10	N9	H9	118(2)
C8	N9	H9	120(2)	O11	C10	N9	123.4(3)
O11	C10	C12	122.0(2)	N9	C10	C12	114.6(2)
N13	C12	C17	121.8(3)	N13	C12	C10	116.9(2)
C17	C12	C10	121.4(2)	C14	N13	C12	116.2(2)
N13	C14	C15	121.8(3)	N13	C14	H14	119.1
C15	C14	H14	119.1	N16	C15	C14	122.5(3)
N16	C15	H15	118.8	C14	C15	H15	118.8
C15	N16	C17	115.8(2)	N16	C17	C12	121.8(3)
N16	C17	H17	119.1	C12	C17	H17	119.1

Atom 1	Atom 2	Atom 3	Winkel/°	Atom 1	Atom 2	Atom 3	Winkel/°
O19	C18	N20	123.4(2)	O19	C18	C8	119.9(2)
N20	C18	C8	116.6(2)	C18	N20	C21	119.3(2)
C18	N20	H20	123(2)	C21	N20	H20	114(2)
N20	C21	C26	110.8(2)	N20	C21	C22	110.8(2)
C26	C21	C22	107.2(2)	N20	C21	H21	109.4
C26	C21	H21	109.4	C22	C21	H21	109.4
C23	C22	C21	115.3(2)	C23	C22	H22A	108.5
C21	C22	H22A	108.5	C23	C22	H22B	108.5
C21	C22	H22B	108.5	H22A	C22	H22B	107.5
C24	C23	C22	111.9(2)	C24	C23	C25	110.7(3)
C22	C23	C25	108.8(3)	C24	C23	H23	108.5
C22	C23	H23	108.5	C25	C23	H23	108.5
C23	C24	H24A	109.5	C23	C24	H24B	109.5
H24A	C24	H24B	109.5	C23	C24	H24C	109.5
H24A	C24	H24C	109.5	H24B	C24	H24C	109.5
C23	C25	H25A	109.5	C23	C25	H25B	109.5
H25A	C25	H25B	109.5	C23	C25	H25C	109.5
H25A	C25	H25C	109.5	H25B	C25	H25C	109.5
O27	C26	C28	122.9(3)	O27	C26	C21	121.1(2)
C28	C26	C21	115.9(2)	C26	C28	P29	111.6(2)
C26	C28	H28A	109.3	P29	C28	H28A	109.3
C26	C28	H28B	109.3	P29	C28	H28B	109.3
H28A	C28	H28B	108.0	O30	P29	O31	112.32(16)
O30	P29	O33	115.70(14)	O31	P29	O33	103.89(15)
O30	P29	C28	114.32(16)	O31	P29	C28	109.20(13)
O33	P29	C28	100.31(14)	C32	O31	P29	118.8(3)
O31	C32	H32A	109.5	O31	C32	H32B	109.5
H32A	C32	H32B	109.5	O31	C32	H32C	109.5
H32A	C32	H32C	109.5	H32B	C32	H32C	109.5
C34	O33	P29	118.5(2)	O33	C34	H34A	109.5
O33	C34	H34B	109.5	H34A	C34	H34B	109.5
O33	C34	H34C	109.5	H34A	C34	H34C	109.5
H34B	C34	H34C	109.5	–	–	–	–

Tab. 12.28: Torsionswinkel für (S,R)-121/(R,S)-121.

A	B	C	D	Winkel/°	A	B	C	D	Winkel/°
C6	C1	C2	C3	-0.3(5)	C7	C1	C2	C3	178.9(3)
C1	C2	C3	C4	-0.5(5)	C2	C3	C4	C5	0.6(5)
C3	C4	C5	C6	0.2(5)	C2	C1	C6	C5	1.2(5)
C7	C1	C6	C5	-178.1(3)	C4	C5	C6	C1	-1.1(5)

A	B	C	D	Winkel/°	A	B	C	D	Winkel/°
C6	C1	C7	C8	86.3(3)	C2	C1	C7	C8	-92.9(3)
C1	C7	C8	N9	-171.0(2)	C1	C7	C8	C18	71.7(3)
C18	C8	N9	C10	-161.9(2)	C7	C8	N9	C10	78.0(3)
C8	N9	C10	O11	1.3(4)	C8	N9	C10	C12	-178.5(2)
O11	C10	C12	N13	-168.2(3)	N9	C10	C12	N13	11.6(4)
O11	C10	C12	C17	11.5(4)	N9	C10	C12	C17	-168.7(3)
C17	C12	N13	C14	-1.4(4)	C10	C12	N13	C14	178.3(3)
C12	N13	C14	C15	-0.6(4)	N13	C14	C15	N16	1.9(5)
C14	C15	N16	C17	-1.0(4)	C15	N16	C17	C12	-1.1(4)
N13	C12	C17	N16	2.3(4)	C10	C12	C17	N16	-177.3(2)
N9	C8	C18	O19	-44.8(3)	C7	C8	C18	O19	75.4(3)
N9	C8	C18	N20	138.0(2)	C7	C8	C18	N20	-101.9(3)
O19	C18	N20	C21	6.3(4)	C8	C18	N20	C21	-176.5(2)
C18	N20	C21	C26	71.8(3)	C18	N20	C21	C22	-169.4(2)
N20	C21	C22	C23	65.7(3)	C26	C21	C22	C23	-173.3(2)
C21	C22	C23	C24	61.0(3)	C21	C22	C23	C25	-176.3(2)
N20	C21	C26	O27	29.0(4)	C22	C21	C26	O27	-92.0(3)
N20	C21	C26	C28	-153.2(2)	C22	C21	C26	C28	85.8(3)
O27	C26	C28	P29	41.9(4)	C21	C26	C28	P29	-135.8(2)
C26	C28	P29	O30	50.5(2)	C26	C28	P29	O31	-76.3(2)
C26	C28	P29	O33	175.0(2)	O30	P29	O31	C32	-21.1(3)
O33	P29	O31	C32	-146.9(3)	C28	P29	O31	C32	106.8(3)
O30	P29	O33	C34	44.9(3)	O31	P29	O33	C34	78.7(3)
C28	P29	O33	C34	-168.4(3)	-	-	-	-	-

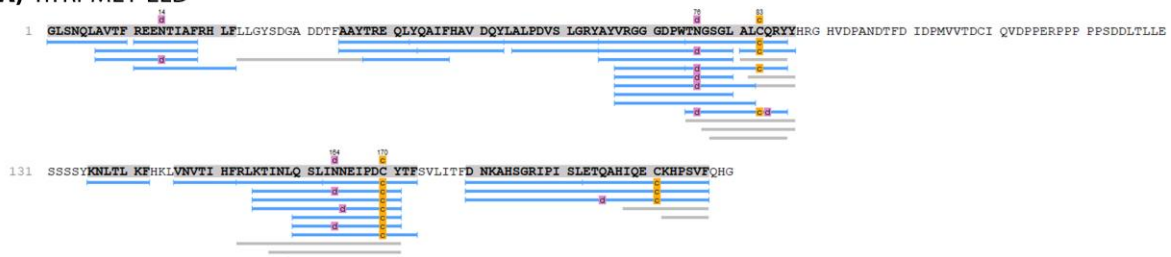
Tab. 12.29: Wasserstoffatomkoordinaten und isotrope Auslenkungsparameter (\AA^2) für (S,R)-121/(R,S)-121.

Atom	x	y	z	U_{iso}
H2	0.97600	0.29916	0.68182	0.033
H3	112.092	0.27085	0.92249	0.043
H4	116.873	0.08280	101.669	0.046
H5	107.361	-0.07681	0.86787	0.046
H6	0.93205	-0.04809	0.62512	0.038
H7A	0.85153	0.08273	0.41293	0.0277
H7B	0.86218	0.22059	0.43729	0.0277
H8	0.68926	0.08169	0.50811	0.0209
H9	0.586(3)	0.213(3)	0.262(4)	0.020(8)
H14	0.37391	0.27025	-0.15611	0.029
H15	0.28809	0.11398	-0.30863	0.0292
H17	0.45759	-0.10091	0.01715	0.0232
H20	0.670(3)	0.192(3)	0.689(4)	0.021(8)
H21	0.69992	0.42580	0.70591	0.0215

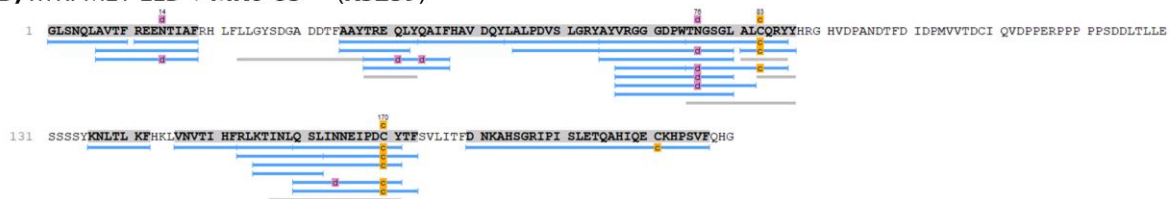
Atom	x	y	z	U _{iso}
H22A	0.64591	0.40515	0.90980	0.0230
H22B	0.63175	0.26807	0.88180	0.0230
H23	0.85124	0.25368	0.94099	0.0262
H24A	0.859(2)	0.497(2)	0.997(3)	0.053
H24B	0.899(2)	0.436(1)	0.884(3)	0.053
H24C	0.982(2)	0.419(1)	1.052(3)	0.053
H25A	0.802(2)	0.363(2)	1.167(2)	0.052
H25B	0.920(2)	0.278(2)	1.193(2)	0.052
H25C	0.778(2)	0.227(2)	1.1254(6)	0.052
H28A	0.45456	0.54899	0.54226	0.0283
H28B	0.54499	0.55496	0.71269	0.0283
H32A	0.202(3)	0.320(2)	0.518(4)	0.086
H32B	0.065(3)	0.387(1)	0.448(4)	0.086
H32C	0.143(3)	0.376(2)	0.625(3)	0.086
H34A	0.162(2)	0.709(2)	0.671(2)	0.055
H34B	0.269(2)	0.794(2)	0.766(3)	0.055
H34C	0.257(2)	0.673(2)	0.828(3)	0.055

12.3 Zusätzliche Daten zum PAL der TRPML1-ELD

A) hTRPML1-ELD



B) hTRPML1-ELD + MK6-83^{PG1} (KS239)



C) hTRPML1-ELD + MK6-83^{PG2} (KS249)

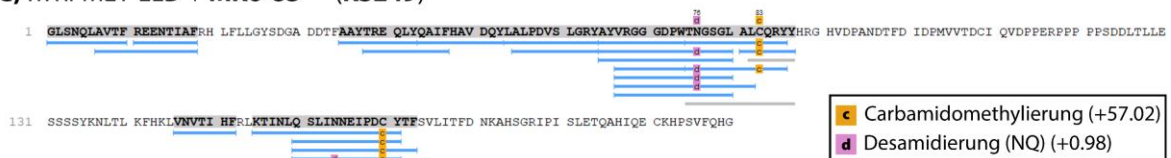


Abb. 12.251: Sequenzabgleich nach proteolytischer Behandlung der Ansätze für die Photoaffinitätsmarkierung durch Chymotrypsin. **A)** Negativkontrolle unter Lichtausschluss in Abwesenheit der photoreaktiven Verbindungen. **B)** und **C)** Belichtete Proben mit hTRPML1-ELD und den entsprechenden (Trifluormethyl)diazirinen. In blau sind die mittels Massenspektrometrie detektierten Peptidfragmente dargestellt.

12.4 Testung an Cysteinproteasen

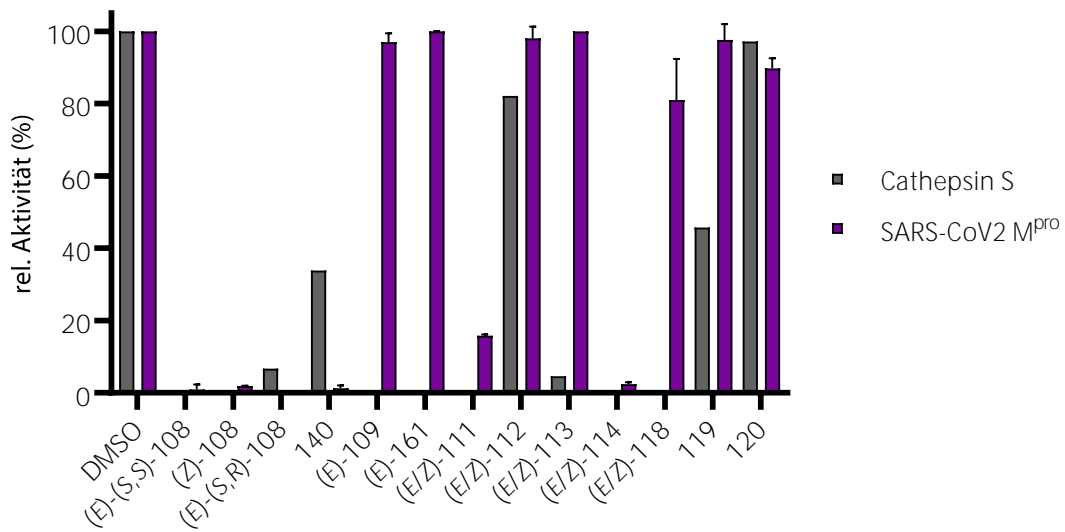
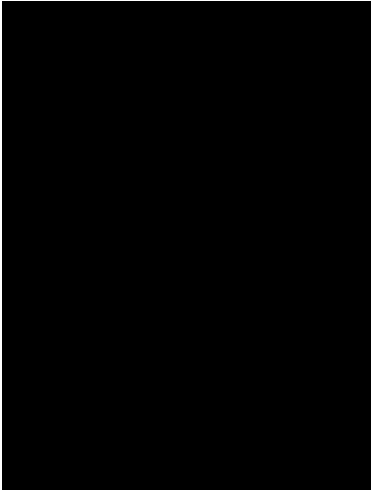


Abb. 12.252: Screening der potenziellen Proteasominhibitoren an den Cysteinproteasen Cathepsin S (n = 1) und SARS-CoV2 M^{pro} (n = 2) (je c = 20 μ M). Dargestellt ist die restliche Enzymaktivität in %.

[REDACTED]
[REDACTED]

Curriculum Vitae

Geburtsdatum: [REDACTED]
Geburtsort: [REDACTED]
Staatsangehörigkeit: [REDACTED]
Familienstand: [REDACTED]



BILDUNG

[REDACTED]	[REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] <ul style="list-style-type: none">[REDACTED][REDACTED][REDACTED][REDACTED] [REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED] [REDACTED] [REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED] [REDACTED] [REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] <ul style="list-style-type: none">[REDACTED][REDACTED][REDACTED][REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED] [REDACTED] <ul style="list-style-type: none">[REDACTED][REDACTED][REDACTED][REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]

[REDACTED]
[REDACTED]

- [REDACTED]
 - [REDACTED]
 - [REDACTED]
- [REDACTED]
 - [REDACTED]
 - [REDACTED]

KENNTNISSE UND INTERESSEN

- [REDACTED]
 - [REDACTED]
 - [REDACTED]
 - [REDACTED]
 - [REDACTED]
- [REDACTED]
 - [REDACTED]
 - [REDACTED]
 - [REDACTED]
 - [REDACTED]
- [REDACTED]
 - [REDACTED]
- [REDACTED]
 - [REDACTED]
 - [REDACTED]

AUSZEICHNUNGEN UND FÖRDERUNGEN

- [REDACTED]
 - [REDACTED]
- [REDACTED]
 - [REDACTED]
- [REDACTED]
 - [REDACTED]
 - [REDACTED]

FORTBILDUNGEN UND KONFERENZTEILNAHMEN

- [REDACTED]
 - [REDACTED]
 - [REDACTED]
 - [REDACTED]
 - [REDACTED]
 - [REDACTED]
- [REDACTED]
 - [REDACTED]
 - [REDACTED]
 - [REDACTED]

PUBLIKATIONEN

K. Schwickert, M. Andrzejewski, S. Grabowsky, T. Schirmeister, *Design, Synthesis and Comprehensive Photochemical Characterization of (Trifluoromethyl)diazirine-containing TRPML1 Ligands*, submitted in *The Journal of Organic Chemistry*.

K. K. Viet, A. Wagner, K. Schwickert, N. Hellwig, M. Brennich, N. Bader, T. Schirmeister, N. Morgner, H. Schindelin, U. A. Hellmich, *Structure of the Human TRPML2 Ion Channel Extracytosolic/Luminal Domain*, *Structure* 2019, 27, 1246–1257.e1245.

B. Askari, H. Amiri Rudbari, N. Micale, T. Schirmeister, T. Efferth, E.-J. Seo, G. Bruno, K. Schwickert, *Ruthenium(ii) and Palladium(ii) Homo- and Heterobimetallic Complexes: Synthesis, Crystal Structures, Theoretical Calculations and Biological Studies*, *Dalton Trans.* 2019, 48, 15869-15887.

M. Konhäuser, E. Steiert, K. Schwickert, T. Schirmeister, P. R. Wich, *Coencapsulation of L-Asparaginase and Etoposide in Acetalated-Dextran Nanoparticles for the Treatment of CML*, in preparation.

LEHRE

seit 10/2017 **Seminar „2D-NMR-Spektroskopie – Einführung in die Strukturaufklärung organischer Moleküle sowie von Arzneistoffen“ (8. Semester im Studiengang Pharmazie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz)**

seit 04/2016 Betreuung des 8. Semesters der Pharmaziestudierenden an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz (**Laborpraktikum „Arzneimittelanalytik – Drug Monitoring, toxikologische und umweltrelevante Untersuchungen“**)

Seminar „Prinzipien und spezielle Aspekte des Wirkstoffdesigns“ (8. Semester im Studiengang Pharmazie sowie Bachelor- und Masterstudierende im Studiengang Biomedizinische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz)

Betreuung von Bachelor- und Masterabschlussarbeiten sowie von Forschungsmodulen (Studiengang Chemie/Biomedizinische Chemie) und Wahlpflichtpraktika (Studiengang Pharmazie)