

Untersuchungen zur Synthese und biochemischen Charakterisierung
von subtypselektiven Inhibitoren der humanen Histondeacetylasen
HDAC8 und 10

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I

(Biowissenschaften)

Institut für Pharmazie

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Herrn M. Sc. Patrik René Zeyen

geb. am 17.10.1992 in Wilhelmshaven

Gutachterin bzw. Gutachter:

1. Prof. Dr. Wolfgang Sippl
2. Prof. Dr. Mike Schutkowski
3. Prof. Dr. Oliver Krämer

Halle (Saale), 2021

Verteidigungsdatum: 14.09.2021

Zusammenfassung

Krebs ist eine Erkrankung, die immer mehr Menschen betrifft und deren Behandlung mit vielen Nebenwirkungen und teilweise schlechten Prognosen verbunden ist. Deswegen ist es wichtig, dass neue Therapien erforscht und entwickelt werden. Die vorliegende Arbeit leistet ihren Beitrag auf diesem Gebiet, durch die Entwicklung potenter Inhibitoren einzelner Vertreter der Familie der Histondeacetylasen (HDAC).

HDACs spielen bei der Entstehung und dem Lebenszyklus verschiedenartiger Krebszellen eine signifikante Rolle. Frühere Studien haben gezeigt, dass eine Inhibition verschiedener HDACs ein vielversprechender Ansatz zur Chemotherapie diverser Tumorerkrankungen ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden potente und selektive Inhibitoren für die beiden in Vorarbeiten näher untersuchten Isoformen HDAC8 und HDAC10 synthetisiert, analytisch untersucht und biochemisch charakterisiert. Es wurde eine Substanzbibliothek diverser HDAC8-Inhibitoren, abgeleitet von einer gemeinsamen Leitstruktur, hergestellt und hinsichtlich ihrer Struktur-Wirkungs-Beziehungen untersucht. Die aktivsten und selektivsten Derivate wurden an Neuroblastomzellen getestet und stellten sich hier als potente und vielversprechende Kandidaten heraus. Darüber hinaus wurden die dargestellten Inhibitoren in Zytotoxizitätsassays an humanen HEK293 Zellen als nicht-toxisch klassifiziert, was weniger Nebenwirkungspotential vermuten lässt.

Ebenso wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Substanzbibliothek diverser sehr potenter und selektiver HDAC10-Inhibitoren dargestellt. Diese leiten sich von Ergebnissen durchgeführter Dockingstudien an einem Homologiemodell der hHDAC10 und an der kürzlich aufgelösten Kristallstruktur von Zebrafisch HDAC10 (zHDAC10) ab. Die dargestellten Verbindungen wurden hinsichtlich ihrer Struktur-Wirkungs-Beziehungen untersucht. Die aktivsten und selektivsten Derivate wurden an ausgewählten Leukämiezellen getestet und stellten sich hier als potente und vielversprechende Kandidaten heraus. Zudem wurden erste Untersuchungen durchgeführt, die den Mechanismus aufklären sollen, wie HDAC10-Inhibition die Apoptose in Leukämiezellen einleitet. Darüber hinaus wurden die dargestellten Inhibitoren in Zytotoxizitätsassays an HEK293 Zellen als nicht-toxisch klassifiziert. Damit können diese Verbindungen weiter auch in Tierversuchen auf ihr Potenzial für eine Tumorthherapie hin untersucht werden.

Insgesamt liefert die vorliegende Arbeit einen wichtigen Beitrag zum Thema neuer HDACs und ihren selektiven Inhibitoren als potenzielle Targets der Krebstherapie. Basierend auf den vorliegenden Daten kann diese neue Substanzklasse für einen Einsatz in der Tumorthherapie in zukünftigen Arbeiten biologisch charakterisiert und optimiert werden.

Abstract

Cancer is a disease that affects more and more people, and the treatment is associated with many side effects and partially poor prognoses. Therefore, it is important that new therapies are researched and developed. This work contributes to this field by developing potent isoform selective inhibitors for the histone deacetylases HDAC8 and 10.

HDACs play a significant role in the development and life cycle of several cancer cells. Previous studies have shown that the inhibition of distinct HDACs is a promising approach for chemotherapy of various types of tumor diseases.

In this work potent and selective HDAC8 and HDAC10 inhibitors were synthesized and biochemically characterized. A substance library of diverse HDAC8 inhibitors, derived from a previously developed lead structure, was produced and examined concerning to their structure-activity relationships. The most active and selective derivatives were tested on neuroblastoma cells and turned out to be potent and promising candidates. In addition, the synthesized inhibitors were classified as nontoxic in cytotoxicity assays using human HEK293 cells, which suggests less potential for side effects.

A compound library of diverse potent and selective HDAC10 inhibitors was also synthesized within the scope of this work. These are derived from results based on docking studies on the homology model of human HDAC10 and on the crystal structure of zHDAC10. The synthesized compounds were examined concerning to their structure-activity relationships. The most active and selective derivatives were tested on several leukemia cells and turned out to be potent and promising candidates. In addition, initial investigations were carried out to clarify the mechanism by which HDAC10 inhibition initiates apoptosis in leukemia cells. Furthermore, the synthesized inhibitors were classified as nontoxic in cytotoxicity assays. This means that these compounds can also be further investigated in animal experiments for their potential in the tumor therapy.

Overall, the present work provides an important contribution to the topic of novel HDACs and their selective inhibitors as potential targets of cancer therapy. Based on the present data, this new class of compounds can be biologically characterized and optimized for use in tumor therapy in future work.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Abstract.....	II
Inhaltsverzeichnis.....	III
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
Abbildungsverzeichnis.....	XI
Tabellenverzeichnis.....	XIII
1. Einleitung	1
1.1 Epigenetik.....	1
1.2 Histone und Histonmodifikationen.....	2
1.3 Histondeacetylasen.....	4
1.3.1 Katalytischer Mechanismus der Zn ²⁺ -abhängigen HDACs.....	6
1.3.2 Bedeutung von HDACs für onkologische Erkrankungen.....	8
1.3.3 Die Rolle von HDACs in Nicht-Krebserkrankungen.....	10
1.4 HDAC8	11
1.4.1 HDAC8 Substrate.....	13
1.5 HDAC10.....	14
1.5.1 HDAC10 Substrate.....	15
1.6 Bekannte HDAC Inhibitoren	17
1.6.1 HDAC8 Inhibitoren.....	19
1.6.2 HDAC10 Inhibitoren.....	21
1.6.3 Computermethoden.....	22
1.7 <i>In-vitro</i> Testsysteme.....	22
1.7.1 HDAC8: Fluor-de-Lys-Assay	23
1.7.2 HDAC1 & HDAC6: ZMAL-Trypsin-Assay.....	24
1.7.3 HDAC10: NDA-Assay.....	24
1.8 Zielstellung der Arbeit	26

2. Synthetische Arbeiten.....	27
2.1 HDAC8-Inhibitoren.....	27
2.1.1 Darstellung der derivatisierten <i>Cap</i> -Gruppe.....	28
2.1.2 Darstellung der 4-Chlorbenzhydroxamsäure-Derivate	31
2.1.3 Darstellung der Thioether-Derivate	32
2.2 HDAC10-Inhibitoren.....	34
2.2.1 Darstellung der Benzhydroxamsäure-Derivate	35
2.2.2 Darstellung der Piperidin-4-acrylhydroxamsäure-Derivate	37
2.3 Substratsynthese	41
2.3.1 Synthese von H_2N -Lys _{Ac} -AMC.....	41
2.3.2 Synthese von Boc- N -Arg _{Pbf} -His _{Tft} -Lys _{Ac} -OH	42
2.3.3 Synthese von H_2N -Arg-His-Lys _{Ac} -Lys _{Ac} -AMC.....	44
3. Ergebnisse und Diskussion	45
3.1 Inhibitorische Aktivität der dargestellten hHDAC8-Inhibitoren.....	45
3.1.1 Inhibitoren der Klasse der Isovanillinsäurederivate	46
3.1.2 Inhibitoren der Klasse der 4-Chlorbenzhydroxamsäurederivate	47
3.1.3 Inhibitoren der Klasse der Thioetherderivate	48
3.2 Selektivität der dargestellten hHDAC8-Inhibitoren.....	50
3.3 Untersuchungen der Zytotoxizität der dargestellten hHDAC8 Inhibitoren	51
3.4 Testung von 6d und 19a an Neuroblastomzellen	52
3.5 Inhibitorische Aktivität der dargestellten HDAC10-Inhibitoren.....	54
3.5.1 Inhibitoren der Klasse der Benzhydroxamsäuren	54
3.5.2 Inhibitoren der Klasse der Piperidin-4-acrylhydroxamsäuren	56
3.6 Selektivität der dargestellten HDAC10-Inhibitoren.....	59
3.7 Untersuchungen der Zytotoxizität der dargestellten HDAC10 Inhibitoren	62
3.8 Testung von 31b und 31e an Leukämiezellen	63
4. Fazit und Ausblick	68
5. Experimentelle Daten	70
5.1 Material und Methoden	70

5.1.1 Chromatographische Methoden.....	70
5.1.2 Massenspektrometrie	74
5.1.3 NMR-Spektroskopie	75
5.1.4 Nummerierung der Substanzen.....	76
5.1.5 Lyophilisation.....	76
5.1.6 Mikrowellensynthese	76
5.1.7 hHDAC8-FDL-Assay	76
5.1.8 Dockingstudien.....	78
5.1.9 Verwendete Chemikalien.....	79
5.1.10 Verwendete Programme.....	79
5.2 Synthesevorschriften.....	80
5.2.1 hHDAC8-Inhibitoren	80
5.2.2 HDAC10-Inhibitoren	104
5.2.3 HDAC10-Negativkontrolle.....	126
5.2.4 hHDAC8-Substrat.....	128
Quellen.....	131
Anhang.....	144
Publikationen.....	145
Danksagung	146
Erklärung.....	148
Angaben zur Person.....	149
Lebenslauf.....	149

Abkürzungsverzeichnis

AAH	7-[(3-aminopropyl)amino]-hexan Hydroxamsäure (C ₉ H ₂₁ N ₃ O ₂)
AAT	7-[(3-aminopropyl)amino]-1,1,1-trifluorheptan-2-one (C ₁₀ H ₁₉ F ₃ N ₂ O)
Ac	Acetylgruppe (C ₂ H ₃ O)
Acetyl-CoA	Acetyl-CoenzymA (C ₂₃ H ₃₈ N ₇ O ₁₇ P ₃ S)
ADP	Adenosindiphosphat (C ₁₀ H ₁₅ N ₅ O ₁₀ P ₂)
ALL	akute lymphatische Leukämie
AMC	7-Amino-4-methylcumarin (C ₁₀ H ₉ NO ₂)
AML	akute myeloische Leukämie
APCI-MS	Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck-Massenspektrometrie (von engl.: <i>Atmospheric-pressure chemical ionization</i>)
aq	wässrige Lösung (von lat.: aqua)
Äq	Äquivalent
Ar, Ar'	Aromat oder Aromat' (NMR-Auswertung)
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl, Schutzgruppe (C ₅ H ₉ O ₂)
BRET	Biolumineszenz-Resonanzenergietransfer
BSA	Bovines Serumalbumin
CHK1	Checkpoint-Kinase-1
CMA	Chaperon vermittelte Autophagie (von engl.: <i>chaperone-mediated autophagy</i>)
d	Duplett (NMR)
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan (CH ₂ Cl ₂)
dd	Duplett vom Duplett (NMR)
δ	Delta (chemische Verschiebung: NMR)
DIPEA	Diisopropylethylamin (C ₈ H ₁₉ N)
DMF	Dimethylformamid (C ₃ H ₇ NO)
DMSO	Dimethylsulfoxid (C ₂ H ₆ OS)
DMTCCL	Dimethylthiocarbamoylchlorid (C ₃ H ₆ CINS)

DNA	Desoxyribonukleinsäure (von engl.: <i>Desoxyribonucleic acid</i>)
DTT	Dithiotreitol ($C_4H_{10}O_2S_2$)
EDCI*HCl	1-Ethyl-3(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide-hydrochlorid ($C_8H_{17}N_3^*HCl$)
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur (von engl.: <i>European Medicines Agency</i>)
ERR α	Östrogenbezogener Rezeptor α , (von engl.: <i>Estrogen-related receptor α</i>)
ESI-MS	Elektronenspray-Ionisation-Massenspektrometrie
EtOAc	Ethylacetat ($C_4H_8O_2$)
EtOH	Ethanol (C_2H_5OH)
FDA	US-Behörde für Lebens- und Arzneimittel (von engl.: <i>U. S. Food and Drug Administration</i>)
FDL	Fluor-de-Lys
FI	Fluoreszenzintensität
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl, Schutzgruppe ($C_{15}H_{11}O_2$)
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
FUS	Im Sarkom fusioniertes Protein (von engl.: <i>Fused in sarcoma</i>)
GADPH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GATA-1	GATA-Bindungsfaktor-1, bindet an GATA-Motiv der DNA
GSK-3 β	Glykogensynthase-Kinase 3 β
HAT	Histonacetyltransferase
HBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat ($C_{11}H_{16}F_6N_5OP$)
HDAC	Histondeacetylase
HDLP	Histondeacetylase ähnliches Protein (von engl.: <i>histone deacetylase-like protein</i>)
HDM	Histondemethylase
hHDAC	humane Histondeacetylase
HIF-1 α	Hypoxie-induzierender Faktor-1 α
HMEs	Histon modifizierende Enzyme
HMT	Histonmethyltransferase

HOBt	1-Hydroxybenzotriazol Monohydrat ($C_6H_5N_3O \cdot H_2O$)
HOObt	Hydroxy-3,4-dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin ($C_7H_5N_3O_2$)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (von engl.: <i>High performance liquid chromatography</i>)
HR-MS	Hochauflösende Massenspektrometrie (von engl.: <i>High resolution mass spectrometry</i>)
HSP70	Hitzeschockprotein 70
HTS	Hochdurchsatz-Screening (von engl.: <i>high-throughput-screening</i>)
INSS	internationale Neuroblastom Stadieneinteilung (von engl.: <i>international Neuroblastoma staging system</i>)
IUPAC	internationale Union für reine und angewandte Chemie (von engl.: <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
J	Kopplungskonstante (NMR)
K	Kontrolle
KDAC	Lysinacetylase
LC-MS	(Flüssigchromatographie mit MS-Kopplung, von engl.: <i>Liquid chromatography–mass spectrometry</i>)
LM	Lösungsmittel/ Lösungsmittelgemisch
m	Multipllett (NMR)
MARB-1	Marbostat 100 ($C_{22}H_{20}N_4O_4$)
MeCN	Acetonitril (C_2H_3N)
MeOH	Methanol (CH_3OH)
MLH	MutatorL-Homologe
MMR	DNA-Fehlfaltungsreparatur Proteine (von engl.: DNA-mismatch repair proteine)
MPLC	Mitteldruckflüssigkeitschromatographie (von engl.: <i>Medium pressure liquid chromatography</i>)
MS	Massenspektrometrie
MSH	MutatorS-Homologe
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid

NaOMe	Natriummethanolat (CH ₃ ONa)
NDA	2,3-Naphthalendicarbaldehyd (C ₁₉ H ₂₅ N ₃ O ₄)
NMR	Kernspinresonanz (von engl.: <i>Nuclear magnetic resonance</i>)
OBt	Hydroxybenzotriazol (C ₆ H ₅ N ₃ O)
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl, Schutzgruppe (C ₁₃ H ₁₇ O ₃ S)
PDB	Proteindatenbank
PEG	Polyethylenglycol [(C ₂ H ₄ O) _n]
PHDs	Aminosäuremotiv C ₃ -H ₁ -C ₄ (von engl.: <i>plant Homeodomains</i>), auch PHD-Finger genannt
PI	Propidiumiodid (C ₂₇ H ₃₄ I ₂ N ₄)
Piper	Piperidin oder Piperazin (NMR-Auswertung)
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat (C ₁₈ H ₂₈ F ₆ N ₆ OP ₂)
RNA	Ribonukleiosäure (von engl.: <i>Ribonucleic acid</i>)
rt	Retentionszeit (von engl.: <i>retention time</i>)
s	Singulett (NMR)
SAHA	Suberolanilin Hydroxamsäure, Vorinostat (C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O ₃)
SI	Selektivitätsindex
siRNA	kleine interferierende RNA (von engl.: <i>small interfering RNA</i>)
SIRT	Sirtuin
SMC3	Strukturelle Aufrechterhaltung des Chromosomenproteins 3 (von engl.: <i>Structural maintenance of chromosomes protein 3</i>)
SNAI1	Snail Familie Transkriptionsrepressor 1
STAT3	Signalwandler und Aktivator der Transkription 3, (von engl.: <i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>)
SUMO	kleine Ubiquitin-verwandte Proteine (von engl.: <i>small Ubiquitin-related modifier</i>)
t	Triplett (NMR)
TEA	Triethylamin (C ₆ H ₁₅ N)

TFA	Trifluoressigsäure (C ₂ HF ₃ O ₂)
THF	Tetrahydrofuran (C ₄ H ₈ O)
THP	Tetrahydropyran, Schutzgruppe (C ₅ H ₁₀ O)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan (C ₄ H ₁₁ NO ₃)
Trt	Triphenylmethyl, Schutzgruppe (C ₁₉ H ₁₅)
TSA	Trichostatin A (C ₁₇ H ₂₂ N ₂ O ₃)
UV-Vis	ultraviolett-visuell
V	Volumen
V/V	Volumenverhältnis
ZBG	Zink-bindende Gruppe
zHDAC	Zebrafisch HDAC
ZMAL	Z-Lysin(acetyl)-7-amino-4-methylcumarin (C ₂₆ H ₂₉ N ₃ O ₅)

Proteinogene Aminosäuren:

Aminosäure	Dreibuch- stabencode	Einbuch- stabencode	Aminosäure	Dreibuch- stabencode	Einbuch- stabencode
Alanin	Ala	A	Leucin	Leu	L
Arginin	Arg	R	Lysin	Lys	K
Asparagin	Asn	N	Methionin	Met	M
Asparaginsäure	Asp	D	Phenylalanin	Phe	F
Cystein	Cys	C	Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q	Serin	Ser	S
Glutaminsäure	Glu	E	Threonin	Thr	T
Glycin	Gly	G	Tryptophan	Trp	W
Histidin	His	H	Tyrosin	Tyr	Y
Isoleucin	Ile	I	Valin	Val	V

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Epigenetische Regulationsmechanismen, modifiziert nach Yan et al. ¹⁰1	1
Abbildung 2: Chromatinstruktur, modifiziert nach Figueiredo et al. ²⁶2	2
Abbildung 3: Histon-DNA-Komplex und HMEs, modifiziert nach Filippakopoulos & Knapp ³⁵3	3
Abbildung 4: Lysin Deacetylierung und Acetylierung durch HDAC und HAT.....4	4
Abbildung 5: Klassen der HDACs und deren strukturelle Betrachtung, modifiziert nach Bradley et al. ⁴⁸5	5
Abbildung 6: Mechanismus der Lysin Deacetylierung am Beispiel von hHDAC8, modifiziert nach Porter und Christianson ⁷³7	7
Abbildung 7: Katalytisches Zentrum der hHDAC8 mit TH612	12
Abbildung 8: Proteinstruktur zHDAC1016	16
Abbildung 9: Strukturen bekannter HDAC-Inhibitoren17	17
Abbildung 10: ZBG, Linker und Cap-Gruppe am Beispiel von TSA.....18	18
Abbildung 11: Zweizählige Koordination des Zn ²⁺ durch Hydroxamsäuren am Beispiel der hHDAC8 ⁴⁹18	18
Abbildung 12: PCI-34051 und die von Dr. T. Heimburg synthetisierten HDAC8 Inhibitoren ¹⁸⁴20	20
Abbildung 13: Bekannte HDAC10-Inhibitoren21	21
Abbildung 14: Schema des FDL-Assays23	23
Abbildung 15: Substratstruktur des ZMAL-Trypsin-Assays.....24	24
Abbildung 16: Schema des NDA-HDAC10-Assays ¹⁹⁶25	25
Abbildung 17: Grundgerüste der drei hHDAC8 Inhibitor-Klassen27	27
Abbildung 18: Syntheschema der Isovanillinsäurederivate28	28
Abbildung 19: Mechanismus der Reaktion von Thionylchlorid ¹⁹⁸29	29
Abbildung 20: Mechanismus der Reaktionen von PyBOP ²⁰⁰30	30
Abbildung 21: fünf synthetisierte Isovanillinsäurederivate als hHDAC8-Inhibitoren30	30
Abbildung 22: Syntheschema der 4-Chlorbenzhydroxamsäurederivate31	31
Abbildung 23: vier synthetisierte 4-Chlorbenzhydroxamsäurederivate als hHDAC8 Inhibitoren.....32	32

Abbildung 24: Syntheschema der Thioetherderivate.....	33
Abbildung 25: vier synthetisierte Thioetherderivate als hHDAC8 Inhibitoren	34
Abbildung 26: Grundgerüste der zwei HDAC10 Inhibitor-Klassen	35
Abbildung 27: Syntheschema der Benzhydroxamsäurederivate	35
Abbildung 28: fünf synthetisierte Benzhydroxamsäuren als HDAC10 Inhibitoren	36
Abbildung 29: Syntheschema der Piperidin-4-acrylhydroxamsäure-Derivate	38
Abbildung 30: Mechanismus der Aktivierung mittels HOBt und EDCI ¹⁹⁸	39
Abbildung 31: zehn synthetisierte Piperidin-4-acrylhydroxamsäure-Derivate.....	40
Abbildung 32: Syntheschema der Synthese von H ₂ N-Lys _{Ac} -AMC.....	41
Abbildung 33: Syntheschema zur Synthese von Boc-N-Arg _{Pbf} -His _{Trt} -Lys _{Ac} -OH.....	42
Abbildung 34: Syntheschema zur Synthese von H ₂ N-Arg-His-Lys _{Ac} -Lys _{Ac} -AMC.....	44
Abbildung 35: hHDAC8-Inhibitor TH6	45
Abbildung 36: Dockinglösungen der hHDAC8-Inhibitoren in der katalytischen Tasche von hHDAC8	49
Abbildung 37: Dosis-Wirkungs-Kurve von 6d und 19a gegen BE(2)-C-Zellen	53
Abbildung 38: Verbindung 32; Methylester ohne zHDAC10-Aktivität.....	58
Abbildung 39: Position der HDAC10-Inhibitoren in der katalytischen Tasche von zHDAC10.....	58
Abbildung 40: Inhibition von 31b und 31e in MV4-11-Zellen	64
Abbildung 41: 31e-Aktivität gegen Leukämiezellen	66
Abbildung 42: potente hHDAC8-Inhibitoren 6d und 19a.....	68
Abbildung 43: potente HDAC10-Inhibitoren 31b und 31e.....	69
Abbildung 44: Nummerierung von A) 6a, B) 31a und C) 31j.....	76

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bezeichnungen, Namen nach IUPAC, Molmassen und Ausbeuten der dargestellten Benzhydroxamsäuren mit derivatisierter Cap-Gruppe	31
Tabelle 2: Bezeichnungen, Namen nach IUPAC, Molmassen und Ausbeuten der dargestellten 4-Chlor-benzhydroxamsäure-Derivate	32
Tabelle 3: Bezeichnung, Name nach IUPAC, Molmassen und Ausbeuten der dargestellten Thioether-Derivate.....	34
Tabelle 4: Bezeichnung, Name nach IUPAC, Molmassen und Ausbeuten der dargestellten Benzhydroxam-säure-Derivate	37
Tabelle 5: Bezeichnung, Name nach IUPAC, Molmassen und Ausbeuten der dargestellten Piperidin-4-acrylhydroxamsäure-Derivate	40
Tabelle 6: Struktur und inhibitorische Aktivität gegen hHDAC8 der Isovanillinsäurederivate.....	46
Tabelle 7: Struktur und inhibitorische Aktivität gegen hHDAC8 der 4-Chlorbenzhydroxamsäurederivate.....	47
Tabelle 8: Struktur und inhibitorische Aktivität gegen hHDAC8 der Thioetherderivate	48
Tabelle 9: Selektivität der inhibitorischen Aktivität der dargestellten hHDAC8-Inhibitoren.....	51
Tabelle 10: Zytotoxizität gegen HEK293-Zellen der dargestellten hHDAC8-Inhibitoren	52
Tabelle 11: Struktur und inhibitorische Aktivität gegen zHDAC10 der Benzhydroxamsäurederivate.....	54
Tabelle 12: Struktur und inhibitorische Aktivität gegen zHDAC10 der Piperidin-4-acrylhydroxamsäuren	56
Tabelle 13: Selektivität der inhibitorischen Aktivität der dargestellten HDAC10-Inhibitoren.....	60
Tabelle 14: Zytotoxizität gegen HEK293-Zellen der dargestellten HDAC10-Inhibitoren	62
Tabelle 15: Methode der analytischen HPLC.....	72
Tabelle 16: Methode P1 der präparativen HPLC.....	73
Tabelle 17: Methode P2 der präparativen HPLC.....	73
Tabelle 18: Methode P3 der präparativen HPLC.....	74
Tabelle 19: Methode P4 der präparativen HPLC.....	74

Tabelle 20: Pipettierschema des hHDAC8-FDL-Assays	78
--	-----------

1. Einleitung

1.1 Epigenetik

In der Epigenetik (von altgr. *epi* „dazu“ und *geneá* „Abstammung“ bzw. *génésis* „Ursprung“) ist eine Kernfrage, durch welche Einflüsse die Aktivität verschiedener Gene und somit die Entwicklung einer Zelle gesteuert wird.¹ Epigenetik beschreibt vererbare Veränderungen der Genexpression, welche eine Änderung des Phänotyps, ohne gleichzeitige Änderung des Genotyps (DNA Sequenz), hervorrufen.^{2,3} Dieses Verhalten erlaubt es einer Zelle, durch die Kontrolle der Transkription auf äußere Einflüsse und Pathogene zu reagieren^{4,5} sowie die Differenzierung von Zellen einzuleiten. Ein bekanntes Beispiel ist hier die Differenzierung von Tochterzellen einer befruchteten Eizelle, welche sich trotz gleichem genetischen Code zu vielen verschiedenen Zelltypen des gesamten Organismus spezialisieren können.⁶ Diese Änderungen des Phänotyps werden durch die zeitliche Abfolge der Desoxyribonukleinsäure- (DNA; von engl.: *Desoxyribonucleic acid*) Transkription, -Rekombination, -Replikation und -Reparatur gesteuert.⁷ Die Gesamtheit dieser epigenetischen Zustände wird auch Epigenom genannt.⁸ Dies geschieht auf molekularer Ebene durch ein Gleichgewicht verschiedener kovalenter Modifikationen der DNA, der Histon-Proteine und nicht Histon-Proteine und durch Ribonukleinsäure- (RNA; von engl.: *Ribonucleic acid*) Interferenz (s. Abbildung 1).^{9,10}

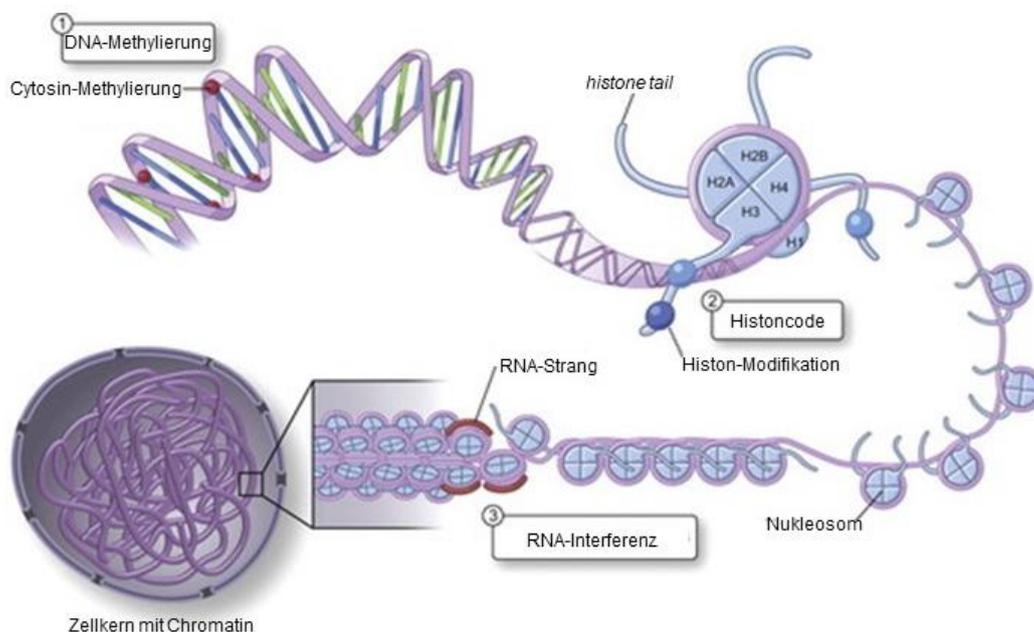


Abbildung 1: Epigenetische Regulationsmechanismen, modifiziert nach Yan *et al.*¹⁰

Diese DNA Modifikationen können eine Methylierung oder Hydroxymethylierung des C₅ der DNA-Base Cytosin sein, welche die Ablesbarkeit des betroffenen Genabschnittes herabsetzen.¹¹ Die Modifikationen der Histon-Proteine können den betreffenden Genabschnitt aktivieren oder unterdrücken.^{12,13,14} Dies geschieht *via* Acetylierung,

Methylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinierung, Adenosindiphosphat- (ADP) Ribosylierung oder SUMOylierung (kleine Ubiquitin-verwandte Proteine; von engl.: *small Ubiquitin-related modifier*).^{5,15,16} Kovalente Modifikationen dieser Art in Kombination mit regulierenden Enzymen und den Genen der DNA können die diversen Phänotypen aus einem Genotyp hervorbringen. Die Gesamtheit an posttranslationalen Modifikationen der Histone nennt sich Histoncode.^{9,17,18} Dieser kann den Zellzyklus und die Zelldifferenzierung regulieren sowie die Apoptose einleiten.^{15,19,20}

1.2 Histone und Histonmodifikationen

Als Nukleosom bezeichnet man die kleinste Packeinheit des Genoms im Zellkern eukaryotischer Zellen.²¹ Es besteht aus etwa 147 DNA-Basenpaarungen, die sich um ein Histonoktamer mit einer 1,65-fachen Wicklung winden.²² Dieses setzt sich aus vier Untereinheiten zusammen (H2A, H2B, H3 und H4), welche Untereinander Dimere ausbilden, die das Histonoktamer der Zusammensetzung (H2A/H2B)-(H3/H4)₂-(H2A/H2B) bilden.^{23,24} In Kombination mit der Linker-DNA und dem Histonprotein H1, welches als Gerüstprotein dient, ergibt sich in elektronenmikroskopischen Aufnahmen die bekannte Perlenschnur-ähnliche Struktur, das Chromatin (s. Abbildung 2).^{22,25}

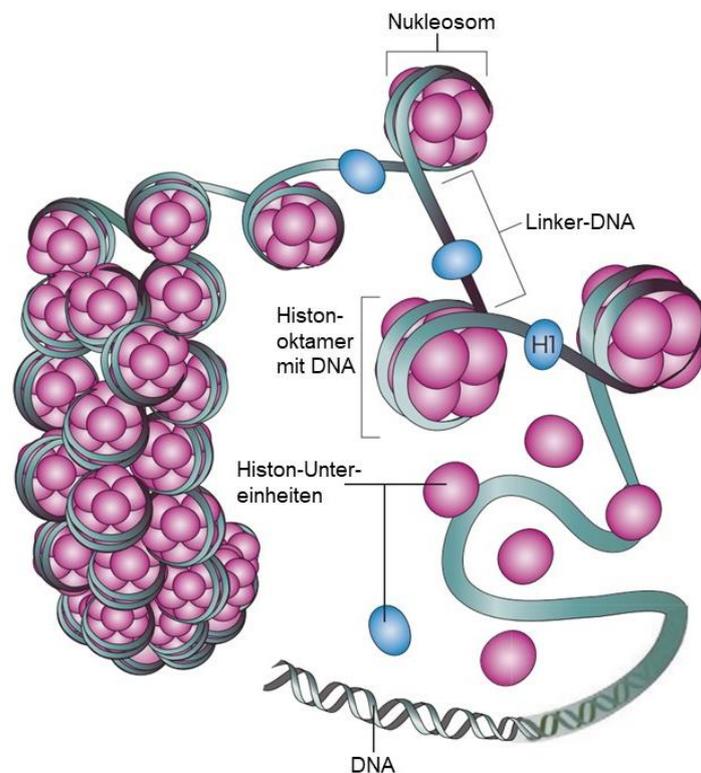


Abbildung 2: Chromatinstruktur, modifiziert nach Figueiredo *et al.*²⁶

Die Histone haben ein globuläres Zentrum und *N*-terminal einen sogenannten *histone tail* mit vielen basischen Aminosäuren (Lysin & Arginin).²⁷ Diese liegen unter physiologischen Bedingungen protoniert, also positiv geladen vor. Mit Hilfe dieser positiven Ladung kann das Histon mit dem negativ geladenen Rückgrat der DNA unter anderem elektrostatisch wechselwirken.^{28,29,30} Diese dicht gepackte Struktur nennt sich Heterochromatin. Sie verhindert das Ablesen der betreffenden Genabschnitte.^{31,32} Durch Modifikationen an diesen basischen Aminosäuren lässt sich die Bindungsstärke der DNA zum Histonprotein beeinflussen. Ladungsänderungen oder sterische Beeinflussung der Nukleosomen können auf molekularer Ebene hierfür verantwortlich gemacht werden.³³ Modifikationen wie Acetylierungen oder Methylierungen schwächen die Interaktion zwischen DNA und Histon, so wird der entsprechende Genabschnitt aktiviert, also für das Ablesen zugelassen.³⁴ Diese locker gepackte Struktur nennt sich Euchromatin.^{31,32}

Für das fließende Gleichgewicht zwischen Heterochromatin und Euchromatin sind Histon modifizierende Enzyme (HMEs) von entscheidender Rolle. Die HMEs lassen sich in drei Klassen einordnen: *Writer*, *Reader* und *Eraser*. *Writer* sind für das Hinzufügen von Modifikationen am *histone tail* zuständig, zu ihnen gehören Histonacetyltransferasen (HAT) und Histonmethyltransferasen (HMT).^{35,36} *Reader* sind Erkennungsdomänen, die den Status der Modifikation mithilfe von Bromodomänen oder *plant homeodomains* (PHDs) ablesen können. Die genannten Transferasen weisen eine solche Domäne auf.^{35,36} *Eraser* sind für das Entfernen von Modifikationen zuständig, zu ihnen gehören Histondeacetylasen (HDAC) und Histondemethylasen (HDM).^{35,37,38}

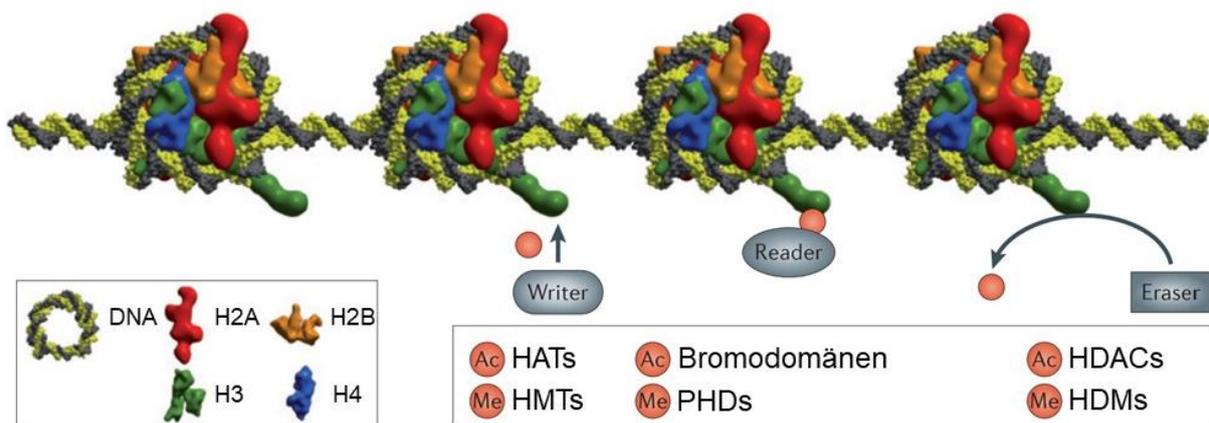


Abbildung 3: Histon-DNA-Komplex und HMEs, modifiziert nach Filippakopoulos & Knapp³⁵

1.3 Histondeacetylasen

Histondeacetylasen (HDAC) spalten die Acetylgruppe der ϵ -Aminofunktion von Lysinresten im *histone tail*, welche zuvor durch HATs mithilfe von Acetyl-CoenzymA (Acetyl-CoA) als Histonmodifikation eingeführt wurde. HDACs sind also die Gegenspieler der HATs. Durch Acetylierung der ϵ -Aminofunktion wird die positive Ladung des Lysins neutralisiert, dies führt zu einer abgeschwächten Histon-DNA Interaktion, also zu einem Aktivieren des Genabschnittes.³⁹ Durch Deacetylierung erhält man das primäre Amin in ϵ -Position des Lysins, welches unter physiologischen Bedingungen protoniert, also positiv geladen, vorliegt (s. Abbildung 4). Die Interaktion des negativ geladenen DNA-Rückgrats mit der positiven Ladung des Histon-Lysins ist stärker, dies führt zu einer Suppression des Genabschnittes. Dieser Wechsel beschreibt das Gleichgewicht zwischen Euchromatin und Heterochromatin. Die HDAC-Aktivität bedingt also Gensuppression und die Bildung von Heterochromatin. Auf diesem Wege spielen die Enzyme der HDAC-Familie eine Schlüsselrolle in der Genregulation.^{40,41,42}

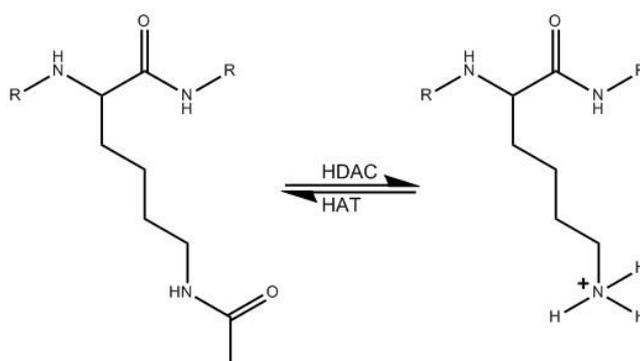


Abbildung 4: Lysin Deacetylierung und Acetylierung durch HDAC und HAT; R = Peptidreste

Neben dem Entfernen von Acetylresten der Histone können HDACs ebenso Acetylgruppen von Lysinresten in nicht Histon-Proteinen spalten, man findet deshalb häufiger die Bezeichnung Lysindeacetylasen (KDAC). Zu den Substraten der KDACs zählen hauptsächlich Transkriptionsfaktoren wie p53, Zytoskelettproteine, wie α -Tubulin, Transportproteine im Zellkern und Chaperone, deren Stabilität und Aktivität vom Acetylierungsmuster abhängt.^{43,44,45}

Der Mensch besitzt 18 verschiedene HDACs, die mittels ihrer Sequenzhomologie zu den HDACs der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) in vier verschiedene Klassen eingeordnet werden können. Zu Klasse III zählen die Sirtuine, die Nicotinamidadenindinukleotid (NAD^+) als Kofaktor benötigen. Es gibt sieben verschiedene Sirtuine (SIRT1-SIRT7), welche keine Sequenzhomologie zu den Klassen I, II und IV aufweisen. Neben der Deacetylaseaktivität konnte für die Sirtuine auch eine ADP-Ribosyltransferaseaktivität nachgewiesen werden.⁴⁶

Klasse I beinhaltet HDAC1, HDAC2, HDAC3 und HDAC8. Klasse II wird nochmals in Klasse IIa und Klasse IIb unterteilt. Zu Klasse IIa gehören HDAC4, HDAC5, HDAC7 und HDAC9. In der Klasse IIb befinden sich HDAC6 und HDAC10, welche zwei katalytischen Domänen besitzen. Klasse IV beinhaltet nur einen Vertreter, namentlich HDAC11 (s. Abbildung 5).^{47,48} Die Klassen I, II und IV sind Zn^{2+} abhängig.³⁹

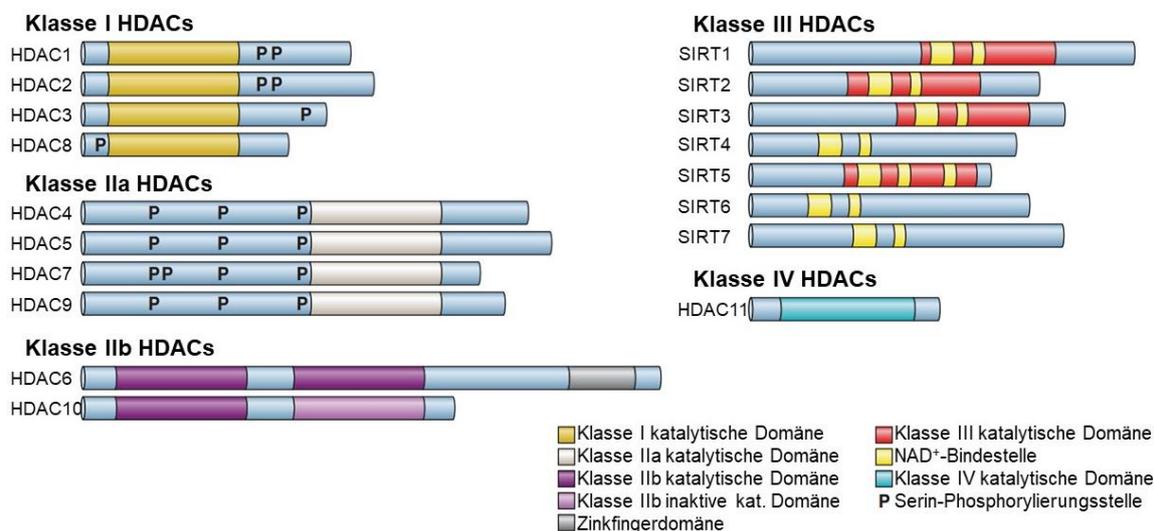


Abbildung 5: Klassen der HDACs und deren strukturelle Betrachtung, modifiziert nach Bradley et al.⁴⁸

Es konnte gezeigt werden, dass klassische HDACs verwandte Enzyme in Arche- und Eubakterien haben. Dies zeigt die Möglichkeit eines gemeinsamen Vorgängerenzyms auf, welches keine Histondeacetylaseaktivität aufweist.^{47,49} So kann auch erklärt werden, wieso nicht alle gezeigten HDACs Histone zum Substrat haben. Hauptsächlich HDACs der Klasse I weisen Histondeacetylaseaktivität auf, sie kommen ubiquitär, bevorzugt im Zellkern lokalisiert, vor. Eine gewebespezifische, zytoplasmatische Aktivität konnte für HDAC1, HDAC3 und HDAC8 gezeigt werden.^{50,51,52} Sie kommen hauptsächlich als Multiproteinkomplex vor, wobei dessen Zusammensetzung über Aktivität und Substratspezifität entscheidet.⁵³ Neben der Lysin-deacetylaseaktivität konnte für HDAC8 auch eine Aktivität gegenüber länger-kettigen Acyllysinen gezeigt werden.⁵⁴ Die HDACs der Klasse I haben Einfluss auf die Transkription, die DNA-Reparatur, das Spleißen von Proteinen und die Zellproliferation.⁵⁵ In *knock-out* Studien an Mäusen konnte gezeigt werden, dass Klasse I HDACs für die Zellproliferation und das Überleben der Zellen mitverantwortlich sind.^{56,57} Da die humane HDAC8 eines der zentralen Themen dieser Arbeit ist wird sie in Kapitel 1.4 genauer betrachtet.

Die HDACs der Klasse IIa werden gewebespezifisch exprimiert, sie kommen im Gehirn, dem Herzen und in Muskelzellen vor. Eine erhöhte Konzentration an HDAC7 wurde außerdem im Lungengewebe nachgewiesen.⁵⁸ Die Deacetylaseaktivität der HDACs der Klasse IIa ist alleinstehend verhältnismäßig gering, erst in Multiproteinkomplexen erreichen sie das

physiologisch relevante Level. Im Multiproteinkomplex fungieren sie als Transkriptionsregulatoren.⁵⁸ Der konservierte N-Terminus der Klasse IIa Enzyme umfasst mehrere Serin-Seitenketten, deren Phosphorylierung als Bindungssignal für 14-3-3-Proteine dient, was zu einem Ausschleusen der Enzyme aus dem Nukleus in das Zytosol führt. Dies hat zur Folge, dass eine Interaktion mit den Transkriptionsregulatoren des Zellkerns ausbleibt, was charakteristisch für die Enzyme der Klasse IIa ist und mitunter der Aktivitätsregulierung dient.⁵⁹

Das besondere bei den HDACs der Klasse IIb ist, dass sie zwei katalytische Domänen besitzen. Bei HDAC6 zeigen beide Domänen eine Aktivität, während HDAC10 eine aktive und eine inaktive katalytische Domäne besitzt.⁵⁸ Die beiden katalytischen Domänen der HDAC6 zeigen unterschiedliche Aktivität und Substratspezifität.⁶⁰ HDAC6 und HDAC10 sind primär im Zytoplasma lokalisiert, können aber durch zelluläre Signale in den Zellkern dirigiert werden.^{61,62,63} Im Zytosol ist die Deacetylaseaktivität der HDAC6 primär für die Organisation des Zytoskeletts verantwortlich. Für eine der katalytischen Domänen wurde zusätzlich Ubiquitinligaseaktivität nachgewiesen.⁶⁴ Über dies hinaus besitzt die HDAC6 eine Ubiquitinbindestelle zum Erkennen fehlgefalteter Proteine und anschließendem Ausbilden von Aggresomen.^{56,65} Neue Untersuchungen haben für HDAC10 eine Polyamindeacetylaseaktivität aufgezeigt.⁶⁶ Da HDAC10 in Leber, Milz und Niere besonders hohe Konzentrationen aufweist wird vermutet, dass das Enzym hier für die Deacetylierung von Polyaminbausteinen verantwortlich ist.^{62,66,67} Da die humane HDAC10 eines der zentralen Themen dieser Arbeit ist wird sie in Kapitel 1.5 genauer betrachtet.

HDAC11, das einzige Enzym der Klasse IV, wurde 2002 erstmals beschrieben.⁶⁸ Da es zu den anderen Klassen nur geringe Sequenzhomologie aufweist wurde die Klasse IV erschaffen. Es wird vermutet, dass HDAC11 bei der Modulation des Immunsystems eine Rolle spielt.⁶⁹ Aktuelle Studien zeigen, dass HDAC11 eine Lysin-Fettsäureamidhydrolaseaktivität zeigt und vor allem Myristoylreste von acylierten Lysin-Seitenketten abspaltet.^{70,71}

1.3.1 Katalytischer Mechanismus der Zn²⁺-abhängigen HDACs

Der katalytische Mechanismus, der für die Hydrolyse des Acetyllysins durch Zn²⁺-abhängige HDACs verantwortlich ist, wurde anfangs durch Kristallstrukturen des *histone deacetylase-like protein* (HDLP) aus *Aquifex aeolicus* aufgeklärt. Die Sequenzhomologie zwischen HDLP und der humanen HDAC1 beträgt 35 %.⁷²

Anschließende Studien haben diesen Mechanismus anhand von Kristallstrukturen und enzymatischen Untersuchungen der humanen HDAC8 (hHDAC8) verfeinert

(s. Abbildung 6).⁷³ Im präkatalytischen Michaelis-Komplex koordiniert die zu spaltende Carbonylfunktion des Acetyllysins das Zn^{2+} -Ion und akzeptiert eine Wasserstoffbrücke zu dem Tyrosinrest 306. Tyrosin 306 zeigt eine Konformationsänderung zwischen einer *in* und einer *out* Orientierung, um die Substratbindung zu gewährleisten. Dies zeigen Computer-gestützte und experimentelle Studien von hHDAC8 und anderen HDACs.^{74,75,76,77,78}

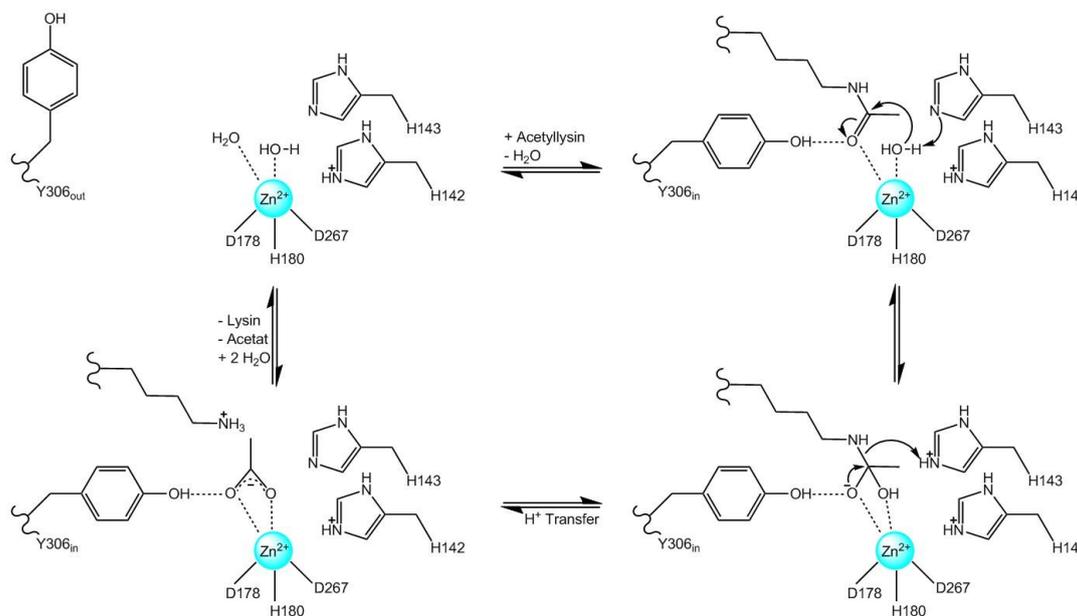


Abbildung 6: Mechanismus der Lysin Deacetylierung am Beispiel von hHDAC8, modifiziert nach Porter und Christianson⁷³

Die Deacetylierung beginnt mit einem nukleophilen Angriff eines Wassermoleküls am partial positiv geladenen Kohlenstoff der Carbonylfunktion. Hierbei wird die Polarität der Carbonylfunktion zusätzlich durch eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Hydroxylgruppe des Tyrosin 306 verstärkt. Auch die Koordination der Carbonylgruppe am Zn^{2+} erhöht die Aktivität und schafft zeitgleich eine räumliche Nähe zum Nukleophil, einem aktivierten Wassermolekül. Das Wassermolekül, welches koordiniert durch die Histidine 142 und 143 vorliegt, zeigt ebenfalls eine Koordination zum Zn^{2+} . Mit diesen Interaktionen geht ein Absenken des pK_S -Werts einher, was den nukleophilen Angriff des Wassers zusätzlich begünstigt. Das gebildete tetraedrische Intermediat wird durch Koordination mit dem Tyrosin 306 und dem Zn^{2+} stabilisiert. Das freiwerdende Proton wird vom Histidin 143 abgefangen. Die entstandene negative Ladung am Carbonylsauerstoff kann über die neu entstandene O-C-O Bindung stabilisiert werden, dies führt zum Spalten der Bindung zwischen dem Stickstoff des Lysins und dem Kohlenstoff der Carbonylverbindung. Die freien Bindungselektronen am Stickstoff können, zu dem am Histidin 143 befindlichen Proton, eine neue Bindung ausbilden. Es entsteht ein primäres Amin und ein Molekül Essigsäure. Durch Protonentransfer wird das primäre Amin protoniert und die Essigsäure deprotoniert. Die Freisetzung des entstandenen Acetats erfolgt über den *Acetate-Release-Channel*. Das protonierte Lysin wird über den Acetyllysin-Kanal freigesetzt.^{73,79}

1.3.2 Bedeutung von HDACs für onkologische Erkrankungen

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass bestimmte HDACs in verschiedenen Krebszellen eine vom physiologisch normalen Niveau abweichende Expression aufweisen. Ebenso konnte gezeigt werden, dass HDACs eine wichtige Rolle beim Ausbilden von Krebszell-typischen Merkmalen spielen.^{80,81,82,83} Im Folgenden werden für alle HDACs Verbindungen zu Krebserkrankungen gezeigt. Diese Vielzahl an HDAC-Beteiligungen in Krebserkrankungen zeigt, dass HDACs sehr attraktive Ziele zur Erforschung neuer Tumorthapeutika sind.

So konnte für HDAC1 eine Beteiligung unter anderem an Magenkrebs,⁸⁴ Lungenkrebs,⁸⁵ Darmkrebs,⁸⁶ Prostatakrebs⁸⁷ und Leberzellkarzinomen⁸⁸ gezeigt werden. Durch HDAC1 *Knockdown* in Gebärmutterhalskrebszellen wurde eine Inhibition der Proliferation und ein Einleiten der Autophagozytose beobachtet.⁸⁰ Bei Brustkrebszelllinien wurde bei HDAC1 *Knockdown* ein Wachstumsstopp, Zellzyklusarrest und Apoptose beobachtet.⁸⁹ In Darmkrebszellen wurde ein durch HDAC1 *Knockdown* bedingtes Unterdrücken des Zellwachstums festgestellt.^{80,86}

Für HDAC2 wurde eine Beteiligung unter anderem an Darmkrebs,⁹⁰ Gebärmutterhalskrebs,⁹¹ Magenkrebs⁹² und Prostatakrebs⁹³ gezeigt. In Gebärmutterhalskrebszellen führte ein HDAC2 *Knockdown* zur Apoptose. Durch HDAC2 *Knockdown* wurde in Brustkrebszellen eine Inhibierung der Proliferation, ein Einleiten der Apoptose und Zellseneszenz ausgelöst.⁹⁴ Der HDAC2 *Knockdown* in Darmkrebszellen führt zu einem Erliegen des Zellwachstums.^{80,95}

Für HDAC3 wurde eine Beteiligung unter anderem an Magenkrebs,⁹⁶ Prostatakrebs⁹⁷ und Darmkrebs⁹⁸ nachgewiesen. Hierbei wurde eine Kombination aus überexprimierten HDAC1, HDAC2 und HDAC3 gezeigt. Bei Zellen der Promyelozytenleukämie führte ein *Knockdown* von HDAC3 zu einer Aktivierung von Differenzierungsgenen. Bei Zellen der akuten myeloischen Leukämie (AML) führte ein HDAC3 *Knockdown* zu einer Unterbrechung des Zellzyklus.⁸⁰

HDAC8 spielt eine wichtige Rolle bei Neuroblastomen im Kindesalter.⁹⁹ Hier wurde eine erhöhte HDAC8 Expression mit einer schlechteren Überlebensrate, klinischen und genetischen Risikofaktoren und einem vorangeschrittenen Status der Erkrankung in Verbindung gebracht. Ein HDAC8 *Knockdown* in Neuroblastomzellen führte zum Zellzyklusarrest und unterbindet die Zellteilung. Ebenso konnte gezeigt werden, dass ein HDAC8 *Knockdown* in Lungen-, Gebärmutterhals- und Darmkrebszellen die Proliferation reduziert.⁸⁰ In T-Zell Lymphomzellen wurde durch HDAC8 Inhibition die Apoptose eingeleitet.¹⁰⁰ HDAC8 *Knockdown* in Plattenepithelkarzinom- und Brustkrebszellen führt zur Apoptose.^{101,102} HDAC8 liegt in Leberzellkarzinomen ebenfalls überexprimiert vor.¹⁰³

Für HDAC4 wurde eine Beteiligung unter anderem an Brustkrebs,¹⁰⁴ Eierstockkrebs¹⁰⁵ und der Promyelozytenleukämie¹⁰⁶ gezeigt. Bei Zellen der Promyelozytenleukämie unterdrückt HDAC4 Differenzierungsgene.¹⁰⁶ Bei Eierstockkrebs führt ein HDAC4 *Knockdown* zu einer verminderten Expression und Funktionalität von HIF-1 α (Hypoxie-induzierender Faktor-1 α), einem Transkriptionsfaktor, welcher unter anderem für Cisplatinresistenzen verantwortlich gemacht wird.¹⁰⁵

Für HDAC5 wurde eine Beteiligung unter anderem an Darmkrebs,¹⁰⁷ Lungenkrebs,¹⁰⁸ Brustkrebs¹⁰⁹ und akuter Erythroleukämie festgestellt. Bei der akuten Erythroleukämie interagiert HDAC5 mit GATA-1 (GATA-Bindungsfaktor-1, bindet an GATA-Motiv der DNA), einem Transkriptionsfaktor der Erythrozyten.⁸⁰ Bei Darm- und Lungenkrebszellen ist HDAC5 mitverantwortlich für die Proliferation.^{107,108}

Für HDAC7 wurde eine Beteiligung unter anderem an Darmkrebs,¹¹⁰ Lungenkrebs,¹¹¹ Magenkrebs¹¹² und Brustkrebs¹¹³ festgestellt. Bei Magenkrebs wird HDAC7 mitverantwortlich für die Bildung von Metastasen gemacht.¹¹² Bei der Karzinogenese von Lungenkrebs spielt HDAC7 durch die Inhibierung des Transkriptionsfaktors STAT3 (Signalwandler und Aktivator der Transkription 3, von engl.: *Signal transducer and activator of transcription 3*) eine wichtige Rolle.¹¹¹

Für HDAC9 wurde eine Beteiligung unter anderem an Brustkrebs,¹¹⁴ Leberzellkarzinomen,¹¹⁵ Magenkrebs¹¹⁶ und Lungenkrebs¹¹⁷ festgestellt. Bei Brustkrebs spielt HDAC9 eine Rolle bei der Resistenz des Tumors gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika.¹¹⁴ HDAC9 *Knockdown* steht im Zusammenhang mit verringertem Tumorwachstum und Einleiten der Apoptose in Lungenkrebszellen.¹¹⁷

Für HDAC6 wurde eine Beteiligung unter anderem an Mundhöhlenkarzinomen,⁸⁰ Brustkrebs,¹¹⁸ Darmkrebs¹¹⁹ und Lungenkrebs¹²⁰ beobachtet. Ein HDAC6 *Knockdown* in Dickdarmkrebszellen führte zu einer Herabregulierung von HIF-1 α , einem Transkriptionsfaktor, welcher unter anderem für Cisplatinresistenzen verantwortlich gemacht wird.⁸⁰ Die Inhibition von HDAC6 schwächt das Wachstum von Lungenkrebszellen ab.¹¹² HDAC6 trägt zur Metastasierung von Brustkrebszellen bei.¹¹⁸ Allerdings zeigen selektive HDAC6 Inhibitoren keine bis sehr schwache klinische Aktivität in verschiedenen Krebserkrankungen was die Rolle von HDAC6 kontrovers erscheinen lässt.¹²¹

Für HDAC10 wurde eine Beteiligung unter anderem an Lungenkrebs,^{63,122} Eierstockkrebs¹²³ und Neuroblastomen festgestellt.^{124,125,126} Eine HDAC10 Inhibition führte zum Zellzyklusarrest und zur Apoptose in Lungenkrebszellen.^{63,122} Cisplatin resistente Eierstockkrebszellen konnten durch einen HDAC10 *Knockdown* wieder für die Cisplatintherapie zugänglich gemacht werden.¹²³ Bei Doxorubicin-resistenten Neuroblastomzellen führte eine HDAC10 Inhibition zu einer Sensibilisierung gegenüber der Chemotherapie.^{124,125,126}

Für HDAC11 wurde eine Beteiligung unter anderem an Prostatakrebs,¹²⁷ Brustkrebs,¹²⁸ Leberzellkarzinomen¹²⁹ und Urothelkarzinomen des Nierenbeckens¹²⁹ festgestellt. In Leberzelllinien wurde beobachtet, dass eine HDAC11 Inhibition zur Apoptose führt.¹³⁰ Es wurde gezeigt, dass eine HDAC11 Inhibition die Metastasenbildung bei Brustkrebs fördert.¹²⁸

1.3.3 Die Rolle von HDACs in Nicht-Krebserkrankungen

Es wurden ebenfalls viele HDAC-Beteiligungen an Nicht-Krebserkrankungen gezeigt. So zeigt HDAC1 unter physiologischen Bedingungen eine Interaktion mit FUS (Im Sarkom fusioniert, von engl.: *Fused in sarcoma*), einem DNA/RNA bindendem Protein, welches auf DNA-Schäden reagiert und diese über homologe Rekombination repariert. Liegt eine Mutation der Gene für FUS vor, so kann die HDAC-FUS Interaktion geschwächt werden, was zu amyotropher Lateralsklerose, einer nicht heilbaren degenerativen Erkrankung des motorischen Nervensystems, führen kann.¹³¹

HDAC8 konnte als ein verantwortliches Enzym für das Cornelia-de-Lange-Syndrom, einem seltenen Dysmorphiesyndrom mit kognitiven Beeinträchtigungen, identifiziert werden. Es wurde eine SMC3 (Strukturelle Aufrechterhaltung des Chromosomenproteins 3, von engl.: *Structural maintenance of chromosomes protein 3*) Deacetylaseaktivität für HDAC8 gezeigt, welche durch Mutationen verloren gehen kann. Ein SMC3 Deacetylaseaktivitätsverlust der HDAC8 steht in direktem Zusammenhang mit einem Ausbilden der Erkrankung.^{132,133,134}

Es konnte gezeigt werden, dass erhöhte HDAC10 Level in Leberzellen von Ratten unter Nahrungsmangel einen signifikanten Einfluss auf ein eingeschränktes Wachstum und Autophagozytose in den Leberzellen haben.¹³⁵

Ebenfalls konnte ein Einfluss von HDAC2, HDAC3, HDAC6, HDAC9 und HDAC10 auf chronisch entzündliche Darmerkrankungen belegt werden. So wurde bei einer Inhibition der HDACs durch Butyrate eine entzündungshemmende Wirkung festgestellt.¹³⁶

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine HDAC2- und HDAC8-Inhibition durch Butyrate zu einer Dämpfung der Entzündung bei rheumatoider Arthritis führt.¹³⁷

Auch nicht humane HDACs sind Ziel von diversen Therapien. So werden zum Beispiel bei Bilharziose (Schistosomiasis), einer parasitären Erkrankung, die weltweit mehr als 290,8 Millionen Menschen betrifft (WHO, Stand: 2018),¹³⁸ diverse Therapieansätze erforscht, die durch eine Inhibition der schistosomalen HDAC8 ein Absterben der Parasitenlarven erreichen.¹³⁹

1.4 HDAC8

Die humane HDAC8 wurde 2000 erstmals beschrieben.^{140,141,142} Aufgrund der 54%igen Sequenzhomologie zu HDAC1 und HDAC2 und der 39%igen Sequenzhomologie zu HDAC3 wurde HDAC8 als Klasse I HDAC eingestuft.¹⁴¹ HDAC8 ist ein ubiquitär exprimiertes 42 kDa Enzym, welches aus 377 Aminosäuren aufgebaut ist. Es befindet sich gleichermaßen im Nukleus wie auch im Cytoplasma, dies unterscheidet die HDAC8 von den anderen Klasse I HDACs.¹⁴³ Ebenso ein Unterschied zu den anderen Klasse I HDACs ist, dass HDAC8 keine C-terminale Protein-bindende Domäne besitzt.¹⁴⁴ Die HDAC8 Aktivität und Spezialisierung kann durch Serin 39 Phosphorylierung, ein konserviertes Aspartat 101 und einen sehr flexiblen Loop erklärt werden.^{144,145}

HDAC8 ist mitverantwortlich für die Differenzierung von Zellen der glatten Muskulatur und für deren Kontraktion durch Interaktionen mit α -Aktin sowie für die Dynamik im Cytoskelett.^{52,146} Eine weitere Rolle, die HDAC8 einnimmt, ist die Kontrolle der Morphogenese des Schädelknochens, so führt ein HDAC8 *Knockdown* bei perinatalen Mäusen zu Instabilitäten im Schädel, welche zum Tode führen.¹⁴⁷

HDAC8 konnte als ein verantwortliches Enzym für das Cornelia-de-Lange-Syndrom, einem seltenen Dismorphiesyndrom mit kognitiven Beeinträchtigungen, identifiziert werden. Es wurde eine SMC3 Deacetylaseaktivität für HDAC8 gezeigt, welche durch Mutationen verloren gehen kann. Ein SMC3 Deacetylaseaktivitätsverlust der HDAC8 steht in direktem Zusammenhang mit dem Ausbilden der Erkrankung.^{132,133,134} Es wurde gezeigt, dass HDAC8 in Brustkrebszellen überexprimiert vorliegt und hier die Verbreitung der Krebszellen fördert. Hierbei erhöht HDAC8 die Stabilität von SNAI1 (Snail Familie Transkriptionsrepressor 1, Snail ist eine Transkriptionsfaktorenfamilie), einem wichtigen Regulator der Epithelial-mesenchymalen Transition. Dies funktioniert über die von HDAC8 eingeleitete Verringerung der Expression der GSK-3 β (Glykogensynthase-Kinase 3 β), einer Kinase.¹⁴⁸ Es konnte gezeigt werden, dass HDAC8 eine signifikante Rolle bei der Pathogenese von Neuroblastomen im Kindesalter spielt und dass die HDAC8 Expression direkt mit einem vorangeschrittenem Krankheitsstatus und Markern für schlechtere Prognosen korreliert. So konnte bei Patienten, die nach INSS-Klassifikation (internationale Neuroblastom Stadieneinteilung, von engl.: *international Neuroblastoma staging system*) Stufe vier erreichen, festgestellt werden, dass HDAC8 die einzige HDAC ist, die signifikant überexprimiert vorliegt. Es wurde gezeigt, dass ein HDAC8 *Knockdown* in Neuroblastomzellen zum Zellzyklusarrest führt und die Zellteilung unterbindet, ohne die H4 Acetylierung im Organismus zu stören.⁹⁹

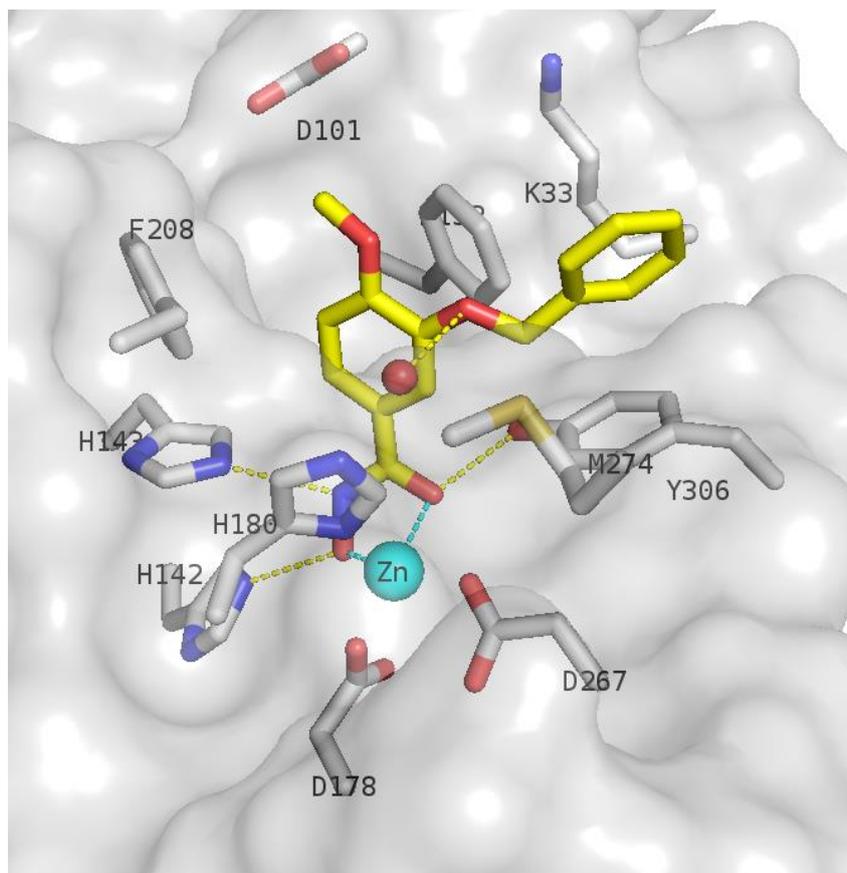


Abbildung 7: Katalytisches Zentrum der hHDAC8 mit TH6, PDB ID: 2V5X; Gelb: Inhibitor-Kohlenstoff; Grau: Enzym-Kohlenstoff; Rot: Sauerstoff; Blau: Stickstoff; Gelb: Schwefel; Cyanfarbene Sphäre: Zinkion; rote Sphäre: Wassermolekül; gestrichelte Linie: Wasserstoffbrückenbindung. Erstellt von Dr. Dina Robaa

In Abbildung 7 erkennt man das katalytische Zentrum der hHDAC8 und wie TH6 (vergleiche Kapitel 1.6.1) bindet. Man erkennt gut, dass die Hydroxamsäurefunktion das Zn^{2+} zweizähning koordiniert und dass durch Wasserstoffbrücken zu den Histidinen 142 und 143 diese Bindung weiter stabilisiert wird. Weitere Wasserstoffbrückenbindungen finden sich zwischen Hydroxamsäurefunktion und dem für die Katalyse wichtigen Tyrosin 306 und zwischen Etherfunktion und einem in der katalytischen Tasche befindlichen Wassermolekül. Ebenfalls gut zu erkennen sind die *Gatekeeper*-Aminosäure Methionin 274 und das konservierte Aspartat 101. Ebenfalls zu erkennen ist die Koordination des Zn^{2+} durch Aspartat 178, Histidin 180 und Aspartat 267, welche das Zinkion an der für die Katalyse relevanten Stelle fixieren, wie in Kapitel 1.3.1 beschrieben.

1.4.1 HDAC8 Substrate

Die humane HDAC8 zeigt *in vitro* eine Aktivität gegen eine Vielzahl von acetylierten Histonlysinen. Hierzu gehören unspezifische, acetylierte Lysine von H2A, H2B, H3 und H4. Studien stellten fest, dass Peptidsequenzen des *histone tail* von H4 mit einem acetylierten Lysin an Position 16 ein sehr gutes *in vitro* Substrat sind.^{140,141,142,149} Ebenfalls zeigte HDAC8 eine Deacetylaseaktivität gegenüber einem acetylierten Lysin an Position 20 des *histone tail* von H4, diese Deacetylierung verläuft jedoch bedeutend langsamer.^{149,150}

Die Tatsache, dass HDAC8 ebenfalls im Cytoplasma von Zellen der glatten Muskulatur vorliegt, zeigt, dass auch nicht-Histon Substrate von HDAC8 erkannt werden. So wurde festgestellt, dass HDAC8 Peptidsequenzen umsetzt, die dem C-Terminus des Transkriptionsfaktors p53 nachempfunden sind. Der Umsatz der p53-Peptidsequenz erfolgte signifikant schneller als der des acetylierten Lysins an Position 16 des H4.^{52,146,149,151} Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass 7-Amino-4-methylcumarin-Derivate (AMC-Derivate) von Peptidsequenzen, die p53 und H4 nachempfunden sind, als Substrat erkannt und umgesetzt werden, auch hier wurde eine Präferenz zum p53 Substrat nachgewiesen.¹⁴⁹ Neben p53 hat HDAC8 viele weitere nicht-Histon Substrate. Hierzu zählen unter anderem SMC3,¹³² ERR α (Östrogenbezogener Rezeptor α , von engl.: *Estrogen-related receptor α*),¹⁵² Peroxidedoxin 6 und Parkinson Protein 7.^{153,154}

Studien zeigen, dass die Substratspezifität der HDAC8 durch Interaktionen gesteuert wird, welche in unmittelbarer Nähe zum Substratbindetunnel stattfinden, aber auch durch Interaktionen, die eine größere Distanz zur Substratbindestelle aufweisen. So wurde gezeigt, dass HDAC8 die drei an Position 9, 14 und 56 monoacetylierten H3/H4 Tetramere effizienter umsetzt als die korrespondierenden acetylierten Peptide, welche aus 7, 13 oder 17 Aminosäuren aufgebaut waren.¹⁵⁵

Es ist umstritten, ob Histone *in vivo* echte Substrate der HDAC8 sind.¹⁴⁹ Daten zeigen, dass HDAC8 Inhibition zu Hyperacetylierung¹⁵⁶ und dass HDAC8 Überexprimierung zu geringer Acetylierung führt,¹⁵⁷ aber genaue Massenspektrometrie (MS) Analysen konnten Histone nicht als HDAC8 Substrat nachweisen.¹⁵³ Es ist möglich, dass HDAC8 nur wenige bestimmte Histonabschnitte als Substrat erkennt, welche bei MS Analysen durch globale Acetylierungsmuster überdeckt werden¹⁵⁸ oder dass die HDAC8 Aktivität vom Zelltyp abhängt.¹⁵⁹

Längerkettige Acyllysine gehören ebenfalls zu den Substraten, die HDAC8 umsetzt. Acylgruppen mit einer Länge von zwei bis 16 Kohlenstoffatomen, welche am Stickstoff von Lysin 9 eines H3 Peptids hängen, werden durch HDAC8 gespalten. Die Katalyse der Spaltung von Octanoyl-, Dodecanoyl- und Myristoyllysin ist hierbei um ein Vielfaches besser als für Acetyllysin. So wurde in Jurkatzellen bei HDAC8 Inhibition ein global höheres Level

an Fettsäureacylierung nachgewiesen.⁵⁴ Das Anhängen von Fettsäuren an Enzyme ist eine posttranslationale Modifikation, die unter anderem für die Interaktion von Enzymen mit der Zellmembran eine Rolle spielt.¹⁶⁰

1.5 HDAC10

Die humane HDAC10 wurde 2002 erstmals beschrieben.^{62,67,161,162} Aufgrund der 55 %igen Sequenzhomologie zu HDAC6 wurde sie in Klasse IIb eingeteilt. Die Tatsache, dass beide Enzyme zwei katalytische Domänen besitzen, hebt sie besonders von den Enzymen der anderen Klassen ab. Bei der HDAC10 ist allerdings nur eine der beiden aktiv, da die inaktive Domäne keine Substratbindestelle besitzt. Eine Vermutung ist, dass die inaktive katalytische Domäne mit der aktiven interagiert und so deren Sensitivität beeinflusst.^{62,67,161,162} Die humane HDAC10 ist ein 64 kDa Enzym bestehend aus 669 Aminosäuren.⁶⁷ Für HDAC10 konnte eine Polyamindiacetylaseaktivität nachgewiesen werden.⁶⁶

Jüngere Studien stellten einen Zusammenhang zwischen HDAC10 und mehreren physiologischen wie auch pathologischen Prozessen her. Bei HDAC10 *Knockout* wurde eine Aktivitätssteigerung regulatorischer T-Zellen beobachtet, was die immunsuppressiven Effekte der T-Zellen steigert.^{163,164} Auch ein Effekt auf DNA-Reparaturmechanismen konnte gezeigt werden.¹⁶⁵ Ebenso wurde festgestellt, dass HDAC10 einen Einfluss auf die Metastasierung, die Proliferation und die Resistenzentwicklung von verschiedenen Krebszellen hat.^{63,122,123,166} So hat die HDAC10 induzierte Hemmung der Metalloproteasen 2 und 9 einen hemmenden Einfluss auf die Metastasierung von Gebärmutterhalskrebs.¹⁶⁶ Verschiedene Zelllinien von Lungenkrebszellen zeigten eine erhöhte Konzentration an HDAC10. Es wurde festgestellt, dass HDAC10 essenziell für die Proliferation der Lungenkrebszellen ist und dass eine Hemmung oder ein *Knockout* zum Zellzyklusarrest und schließlich zur Apoptose führte.^{63,122} Bei der Cisplatintherapie von Eierstockkrebs können die Krebszellen Resistenzen entwickeln. Es konnte gezeigt werden, dass HDAC10 hier eine Rolle spielt und dass ein Hemmen der HDAC10 der Krebszellen durch siRNA (kleine interferierende RNA, von engl.: *small interfering RNA*) zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Cisplatin führte.¹²³

Neuroblastomzellen können eine Resistenz gegenüber Doxorubicin entwickeln. Dies funktioniert über ein Ausschleusen des Chemotherapeutikums aus der Zelle *via* lysosomaler Exozytose. Studien zeigten, dass HDAC10 eine wichtige Rolle in der Homöostase der Lysosomen spielt, das heißt, dass es in der Autophagozytose saure Vesikel, die zum Abbau diverser Biomoleküle dienen, beeinflusst. Es wurde festgestellt, dass eine HDAC10 Hemmung zur Akkumulation von Lysosomen in resistenten Neuroblastomzellen führt. Doxorubicin, welches innerhalb der Lysosomen vorliegt, wird dann nicht mehr *via* Exozytose

aus der Zelle geschleust. Das Chemotherapeutikum verbleibt nicht im Lysosom, sondern kann sich im Zellkern sammeln und zum Zelltod der Neuroblastomen beitragen. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass eine HDAC10 Inhibition in Neuroblastomzellen zu Doppelstrangbrüchen der DNA führt, was zusätzliche Mechanismen für die Sensibilisierung gegenüber Doxorubicin nahelegt. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass die Kombinationsbehandlung mit Doxorubicin und HDAC10-Inhibitoren Neuroblastomzellen tötet, gesunde Zellen hingegen nicht.^{124,125,126}

1.5.1 HDAC10 Substrate

Für HDAC10 wurde eine Polyamindiacetylaseaktivität nachgewiesen, um spezifische Substrate zu identifizieren wurde eine Vielzahl an acetylierten Substraten getestet. Die Ergebnisse wurden herangezogen, um die HDAC10 mit der verwandten HDAC6 zu vergleichen. Es wurden zunächst acetylierte Lysinpeptide wie Gly-Ala-Lys_{Ac}-AMC und Arg-Gly-Lys_{Ac}-AMC getestet, da sie gute HDAC6-Substrate sind. Hierbei wurde kaum Deacetylaseaktivität der HDAC10 nachgewiesen.⁶⁶ Um eine negative Interaktion mit dem AMC in der katalytischen Tasche auszuschließen wurde ein auf LC-MS (Flüssigchromatographie mit MS-Kopplung, von engl.: *Liquid chromatography–mass spectrometry*) basierender Test durchgeführt, der auf fluoreszierende Peptidmodifikationen verzichtet. Hierbei wurde die geringe Deacetylaseaktivität der HDAC10 an den Peptid-Substraten bestätigt.^{66,167} Als nächstes wurden diverse acetylierte Polyamine als Substrat verwendet. Hierbei stellte sich heraus, dass Polyaminsubstrate mit einer Länge zwischen acht und zwölf Atomen gut als Substrat erkannt wurden. Als essenziell stellte sich hierbei ein sekundäres Amin an Position 4 oder 5 heraus, so wurde *N*⁶-Acetylspermidin gut als Substrat erkannt, *N*¹-Acetylspermidin hingegen nicht. Es konnte gezeigt werden, dass HDAC6 keine bis sehr geringe Aktivität gegen alle Polyaminsubstrate zeigt.⁶⁶

Betrachtet man den strukturellen Aufbau von HDAC10, so erkennt man den Glutamatrest 272 [E274 in zHDAC10 (Zebrafisch HDAC10)], der die Funktion des *Gatekeepers* übernimmt (s. Abbildung 8 A). Die negative Ladung dieses *Gatekeepers* bedingt durch elektrostatische Wechselwirkungen, dass die positiv geladenen Polyaminsubstrate gut in den Substratbindetunnel eindringen können.⁶⁶ In der katalytischen Domäne 1 der HDAC6 bildet ein Lysinrest den *Gatekeeper*, dieser interagiert mit α -Carbonylstrukturen acetylierter Lysinproteine.⁶⁰ Bei HDAC8 ist die *Gatekeeper*-Aminosäure ein Methionin, bei allen übrigen humanen HDACs ist Leucin die *Gatekeeper*-Aminosäure. Neben dem Glutamatrest 272 finden sich weitere Glutamat- und Aspartatreste in direkter Umgebung des Substratbindetunnels, sodass sich für diese Region im Protein ein negatives Oberflächenpotential ergibt, welches die Substratbindung weiter begünstigt

(s. Abbildung 8 B). Betrachtet man den inneren Bereich des Enzyms, so erkennt man, dass dieser rund um das Zn^{2+} ein positives Oberflächenpotential zeigt (s. Abbildung 8 B). Die Präferenz der HDAC10 für Polyaminsubstrate mit einem sekundären Amin an Position 4 oder 5 ergibt sich aus dieser Tatsache, da zum Beispiel das sekundäre Amin an Position 3, wie bei *N*¹-Acetylspermidin, zu einer elektrostatischen Abstoßung mit dem positiven Oberflächenpotential führt.⁶⁶ Ebenfalls charakteristisch für HDAC10 ist der lange Zugangstunnel zum katalytischen Zentrum, der durch eine 3_{10} -Helix mit einem P(E,A)CE-Motiv gebildet wird (s. Abbildung 8 A). Durch diesen verengten Zugangstunnel wird die Bindung sterisch anspruchsvollerer acetylierter Lysinpeptide behindert und die Bindung sterisch einfacherer Polyamine begünstigt.^{73,168} Einzelne Mutationen der genannten Eigenschaften führen unabhängig voneinander zu einer besseren Bindung acetylierter Lysinpeptide und einer schlechteren Bindung acetylierter, linearer Polyamine.⁶⁶

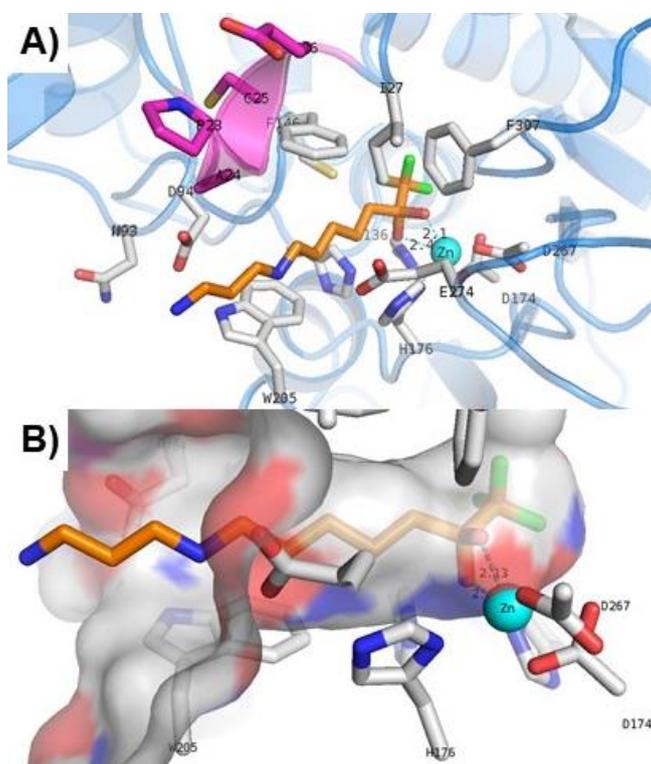


Abbildung 8: Proteinstruktur zHDAC10 (Struktur des Komplexes von zHDAC10 Y307F mit 7-[(3-aminopropyl)amino]-1,1,1-trifluorheptan-2-one (AAT); PDB ID: 5TD7): A) Struktur des Zugangstunnels, man erkennt die Bindung der Trifluormethylketonstruktur in der hydratisierten Form als geminales Diol und die *Gatekeeper*-Aminosäure E 274: Orange: AAT-Kohlenstoff; Weiß: Aminosäurekohlenstoff; Blau: Stickstoff; Grün: Fluor; Rot: Sauerstoff; Lila: P(E,A)CE-Motiv; Hellblau: Enzymstrukturen; Cyanfarbene Sphäre: Zn^{2+} . B) Oberflächenpotential im Bereich des Substratbindetunnels: Rot: negatives Potential; Blau: positives Potential; Orange: AAT-Kohlenstoff; Weiß: Aminosäurekohlenstoff; Blau: Stickstoff; Grün: Fluor; Rot: Sauerstoff; Cyanfarbene Sphäre: Zn^{2+} . Erstellt von Talha Yesiloglu

Die Katalyse der Deacetylierung in HDAC10 verläuft wie für die hHDAC8 in Kapitel 1.3.1 bereits beschrieben. Der einzige Unterschied ist, dass die HDAC10 Histidin 136 und 137 als Säure-Base Funktionalität für die Katalyse benötigt, wo bei hHDAC8 Histidin 143 ausreicht. Histidin 142 in hHDAC8 ist lediglich an der Koordination des Zn^{2+} , jedoch nicht unmittelbar an der Katalyse beteiligt.¹⁶⁹

1.6 Bekannte HDAC Inhibitoren

Es gibt viele verschiedene Klassen, die potenzielle HDAC-Inhibitoren hervorbringen. Hierzu gehören Hydroxamsäuren, wie Suberolanilin Hydroxamsäure (SAHA, Vorinostat) oder Trichostatin A (TSA). Ebenfalls können kurzkettige Carbonsäuren wie Valproinsäure, Aminoaniline wie Entinostat, natürliche zyklische Peptide wie Apicidin, aber auch Substanzen mit Thiofunktionen wie Largazol, welches geschützt als hydrolytisch labiler Thioester eingesetzt wird, oder elektrophile Ketone wie 7-[(3-Aminopropyl)amino]-1,1,1-trifluorheptan-2-one (AAT), welches im Enzymkomplex ein geminales Diol ausbildet (s. Abbildung 9), eine inhibitorische Aktivität gegen HDACs zeigen. Bis auf wenige Ausnahmen fungieren die HDAC-Inhibitoren als Chelatoren des Zink-Ions im katalytischen Zentrum.⁴⁹

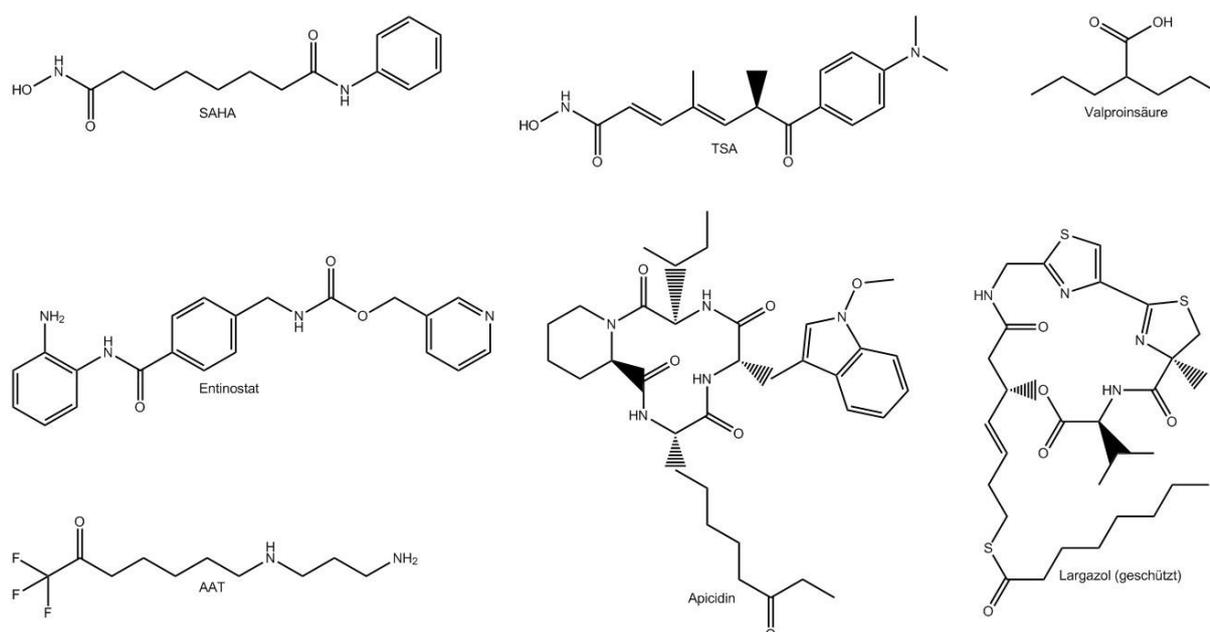


Abbildung 9: Strukturen bekannter HDAC-Inhibitoren

Abgesehen von Valproinsäure können alle gezeigten HDAC-Inhibitoren strukturell vereinfacht dargestellt werden. Hierbei unterteilt man die Inhibitoren in drei Untereinheiten. Die erste ist die Zink-bindende Gruppe (ZBG), die für eine Koordination des Zn^{2+} in der Bindetasche der HDACs verantwortlich ist. Das zweite Merkmal ist die endständige Gruppe, die am äußeren Teil des Substratbindetunnels mit Aminosäuren interagiert, diese Gruppe wird auch *Cap*-Gruppe genannt, sie ist hauptsächlich für die Isoformselektivität verantwortlich. Als drittes ist eine verbindende Gruppe relevant, die die ZBG mit der *Cap*-Gruppe verbindet. Diese Verbindungsdomäne wird auch Linker genannt. Der Linker bestimmt einerseits die Ausrichtung der ZBG, zum anderen interagiert der Linker mit Aminosäuren im unteren Teil der Substratbindetasche.^{49,170}

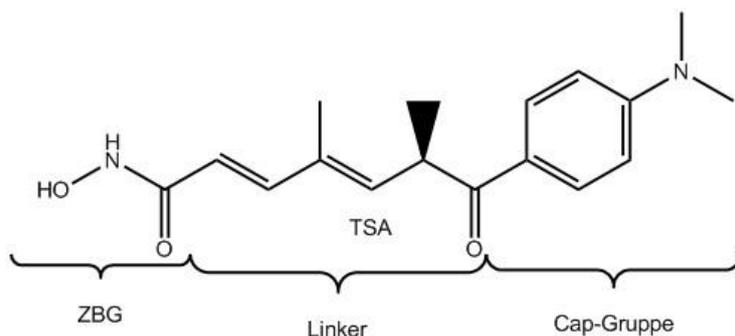


Abbildung 10: ZBG, Linker und Cap-Gruppe am Beispiel von TSA

Die häufigste ZBG ist die Hydroxamsäurefunktion. Sie zeigt in den meisten Fällen eine zweizählige Koordination des Zink-Ions über die Carbonyl- und die Hydroxylgruppe. Es wurden aber auch einzeln einzählige Komplexe beobachtet.¹⁷¹ Die Hydroxamsäure als ZBG zeigt jedoch auch einige Nachteile. So hat sie aufgrund ihrer starken Polarität eine schlechte orale Bioverfügbarkeit und sie zeigt allgemein eine schlechte metabolische Stabilität.¹⁷²

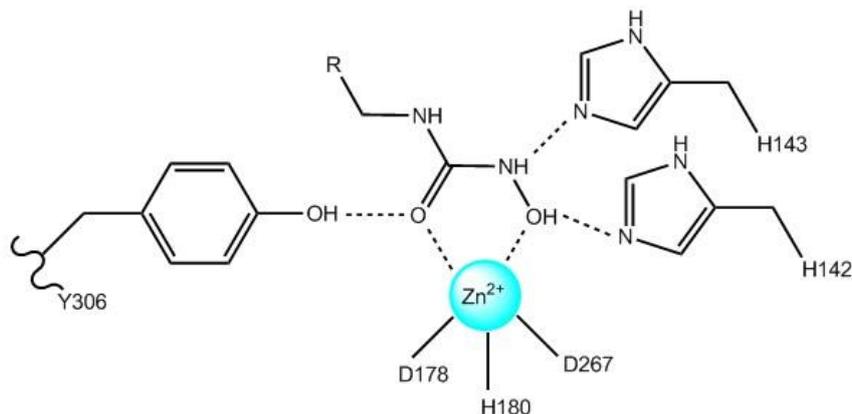


Abbildung 11: Zweizählige Koordination des Zn²⁺ durch Hydroxamsäuren am Beispiel der hHDAC8⁴⁹

Neben der gewünschten Subtypselektivität müssen die Verbindungen noch eine Reihe weiterer Bedingungen erfüllen, um als potenzielle Wirkstoffe eingesetzt werden zu können. So dürfen sie keine anderen Zink-abhängigen Enzyme beeinflussen. Enzyme deren Aktivität ebenfalls von Zink abhängt sind Alkoholdehydrogenasen, Carboanhydrasen und alkalische Phosphatasen. Als Strukturbildner kommt Zink ebenfalls in Zinkfingerdomänen vor. Diese Vielfalt an Enzymen darf durch HDAC-Inhibitoren also nicht beeinflusst werden. Ebenso darf keine Beeinflussung von Enzymen und Proteinen stattfinden, die andere mehrwertige Kationen nutzen, wie Hämoglobin. Durch solche Aktivitätsverluste in anderen Enzymen können unerwünschte Arzneimittelwirkungen hervorgerufen werden. Untersuchungen verglichen verschiedene Metallenzym-inhibitoren auf ihre Selektivität. Die Ergebnisse konnten eine hohe Selektivität der einzelnen Inhibitoren gegen ihre jeweilige Zielstruktur bestätigen. Getestet wurden Carboanhydrasen, Matrixmetalloproteasen, Histondeacetylasen und Tyrosinkinase und die jeweiligen Inhibitoren.¹⁷³ Dies sind vielversprechende Grundlagen für die Entwicklung neuer HDAC-Inhibitoren mit einer Hydroxamsäurefunktion als ZBG.

2006 wurde der erste HDAC-Inhibitor Varinostat zur Therapie von refraktären kutanen T-Zell-Lymphomen zugelassen.¹⁷⁴ Romidepsin, Belinostat und ausschließlich in China Tucidinostat sind zugelassene HDAC-Inhibitoren für die gleiche Indikation.^{175,176,177} Panobinostat wurde von der US-Behörde für Lebens- und Arzneimittel (FDA, von engl.: *U. S. Food and Drug Administration*) und der europäischen Arzneimittel-Agentur (EMA, von engl.: *European Medicines Agency*) gegen multiple Myelome zugelassen.¹⁷⁸ Viele weitere Substanzen wie beispielsweise Quisinostat und Abexinostat befinden sich derzeit in klinischen Studien.^{179,180} Bei den Zugelassenen Inhibitoren handelt es sich um so genannte *pan*-Inhibitoren, sie besitzen kaum bis keine Selektivität gegen einzelne HDACs und können so zu einer Reihe an Nebenwirkungen führen. Diese können von Diarrhöe und Übelkeit, über Herzrhythmusstörungen bis hin zu Anämie und Knochenmarksdepression führen.¹⁸¹ Diese Nebenwirkungen schränken den Einsatz der zugelassenen Inhibitoren stark ein. Deswegen ist die Entwicklung subtypeselektiver HDAC-Inhibitoren eine gute Möglichkeit Krankheiten zu therapieren, ohne eine Vielzahl an teils drastischen Nebenwirkungen in Kauf nehmen zu müssen.

1.6.1 HDAC8 Inhibitoren

Die ersten selektiven hHDAC8 Inhibitoren wurden einerseits durch Struktur-basiertes Design und andererseits durch Hochdurchsatz Screenings identifiziert.^{182,183} PCI-34051 ist eine der ersten vielversprechenden Substanzen, mit einer guten Selektivität gegenüber hHDAC8 (IC₅₀: hHDAC8: 92 nM; hHDAC1: 28 µM; hHDAC6: 48 µM) und zellulären Aktivität. Dieser Inhibitor basiert auf einer Hydroxamsäure als ZBG, einem Indol als Linker und einer 4-Methoxybenzyl *Cap*-Gruppe (s. Abbildung 12).¹⁰⁰ Dr. Tino Heimburg (Arbeitsgruppe Prof. Dr. W. Sippl; Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) hat im Laufe seiner Arbeit viele weitere Substanzen synthetisiert (s. Abbildung 12) mit dem Ziel, eine bessere Inhibition der hHDAC8 mit gleichzeitiger verbesserter Selektivität gegenüber hHDAC1 und hHDAC6 zu erreichen. Bei allen hergestellten Verbindungen handelt es sich um Benzhydroxamsäuren, da dieses Strukturelement als sehr vielversprechend identifiziert wurde.¹³⁹ Bei dem ersten von Dr. Heimburg synthetisierten Inhibitor, TH1, handelt es sich um eine Benzhydroxamsäure, welche an Position 3 einen über eine Amidbindung gekoppelten Phenylring aufweist. TH1 zeigt eine gute hHDAC8 Inhibition und Selektivität gegenüber hHDAC1. Die Selektivität gegenüber hHDAC6 ist mit Faktor fünf eher moderat. Bei allen drei Werten konnte keine Verbesserung zu PCI-34051 erzielt werden.¹³⁹ Bei TH2 wurde als *Cap*-Gruppe ein über eine Amidbindung gekoppeltes Chinolin gewählt, zudem wurde die Benzhydroxamsäure in *para*-Position methyliert. Im Vergleich zu TH1 zeigte sich hier eine signifikante Steigerung der inhibitorischen Aktivität gegenüber hHDAC8 und der Selektivität gegen hHDAC1, allerdings

war kaum Selektivität gegen hHDAC6 beobachtbar.¹³⁹ Die Verbindung TH3 zeigt als *Cap*-Gruppe einen Benzylrest, der über ein Amin an Position 3 der Benzhydroxamsäure verknüpft ist. Bei TH3 bewegt sich die Inhibition gegen hHDAC8 in einem moderaten Rahmen, jedoch war ein signifikanter Verlust der hHDAC1 Selektivität gemessen worden. Die Selektivität gegen hHDAC6 ist im Vergleich zu TH1 und TH2 signifikant gestiegen.¹³⁹ Die Verbindung TH4 unterscheidet sich zu TH1 lediglich durch die Invertierung des Amidlinkers. Dieser Unterschied führte zu einer signifikanten Verbesserung der hHDAC8 Inhibition und der Selektivität gegen hHDAC1 und hHDAC6.^{184,185} TH5 zeigt ebenfalls ein invertiertes Amid als Linker. Wie bei TH2 wurde bei TH5 die *para*-Position der Benzhydroxamsäure modifiziert, in diesem Fall jedoch mittels einer Methoxyfunktion. Ein weiterer Unterschied zu den vorhergegangenen TH-Verbindungen ist, dass die Phenyl-*Cap*-Gruppe an Position 4 eine Chlormodifikation trägt. Diese Änderungen führten zu einer signifikanten Verbesserung der hHDAC8 Inhibition, allerdings gekoppelt mit einer ebenfalls signifikant gestiegenen Inhibition der hHDAC1 und hHDAC6.¹⁸⁴ Die Verbindung TH6 verzichtet auf eine Modifikation der Phenyl-*Cap*-Gruppe. Als Linker wurde in Anlehnung an TH3 auf ein Amid verzichtet und ein Ether gewählt. Wie bei TH5 trägt TH6 eine Methoxymodifikation in *para*-Position der Benzhydroxamsäure. TH6 zeigt eine sehr gute hHDAC8 Inhibition, in Kombination mit einem signifikanten Anstieg der Selektivität gegenüber hHDAC1 und hHDAC6. Im Vergleich mit PCI-34051 zeigt TH6 eine signifikant verbesserte hHDAC8 Inhibition und hHDAC1 Selektivität, jedoch einen Verlust der Selektivität gegenüber hHDAC6 (IC_{50} : hHDAC8: 27 nM; hHDAC1: 12 μ M; hHDAC6: 3 μ M). Mit einer Selektivität um Faktor 107 gegen hHDAC6 ist zwar der Wert von PCI-34051 nicht erreicht, dennoch ist dies ein sehr gutes Ergebnis.¹⁸⁵ Deswegen wurde TH6 als Leitstruktur der hHDAC8 Inhibitoren dieser Arbeit ausgewählt.

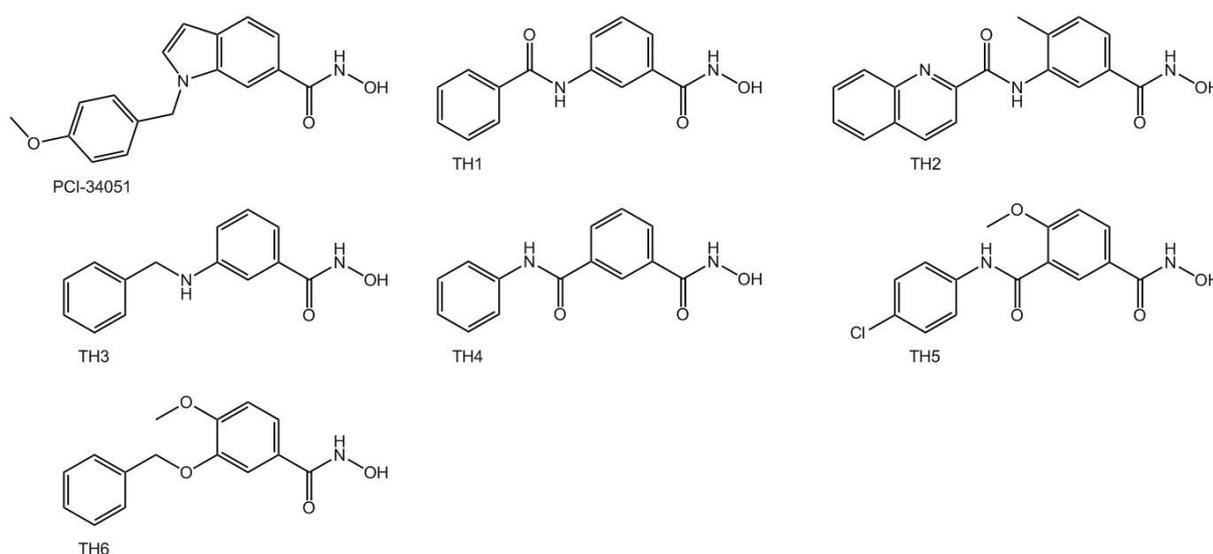


Abbildung 12: PCI-34051 und die von Dr. T. Heimbürg synthetisierten HDAC8 Inhibitoren¹⁸⁴

1.6.2 HDAC10 Inhibitoren

Da die meisten verfügbaren Daten zur Hemmung von HDAC10 mit Lysin_{AC} basierten Testsystemen ermittelt wurden, bei denen die HDAC10 Aktivität nur sehr gering ist, ist nur wenig über potente HDAC10 Inhibitoren bekannt. Einzelne Untersuchungen mit geeigneten Testsystemen ergaben Bindungsaffinitäten für bekannte HDAC Inhibitoren.¹⁸⁶ So wurde für einige selektive hHDAC6 Inhibitoren eine starke Bindung an HDAC10 gezeigt. Hierzu zählen Tubastatin A (s. Abbildung 13)¹⁸⁷ und Nexturastat.¹⁸⁸ Ebenfalls starke Bindungen wurden bei den *pan*-HDAC Inhibitoren Quisinostat und Abexiostat nachgewiesen. Untersuchungen mit Tubastatin A, einem Benzhydroxamsäureinhibitor, zeigten, dass das basische, tertiäre Amin unerlässlich für die HDAC10 Bindung ist. Dies liegt an der Interaktion der *Gatekeeper*-Aminosäure Glutamat mit dem Amin.^{186,189}

Andere Untersuchungen zeigten für *N*^β-Acetylspermidin-Derivate eine inhibitorische Aktivität gegen HDAC10.¹⁹⁰ Hierzu zählte AAT (s. Abbildung 13), welches ein aktiviertes Keton besitzt, das als geminales Diol das Zn²⁺ komplexiert (s. Abbildung 8, Seite 16). AAT zeigte einen IC₅₀-Wert von 80 nM. Für andere Derivate, die eine andere ZBG besitzen, konnte ebenfalls inhibitorische Aktivität gegen HDAC10 nachgewiesen werden. Hierzu zählen die Hydroxamsäure 7-[(3-Aminopropyl)amino]-hexan Hydroxamsäure (AAH) (IC₅₀: 120 nM), das Thiol (IC₅₀: 370 nM; Acetylgeschütztes Thiol: 30 nM) und das nicht aktivierte Keton (IC₅₀: 2,3 μM).¹⁹⁰ Für all diese Inhibitoren wurde die Interaktion zur *Gatekeeper*-Aminosäure nachgewiesen, welche je nach Orientierung im katalytischen Zentrum leichte Variationen zeigte.¹⁹⁰ Für die in dieser Arbeit synthetisierten HDAC10 Inhibitoren wurde die Hydroxamsäure als ZBG gewählt. Das basische Amin für die *Gatekeeper*-Interaktion wurde ebenfalls berücksichtigt.

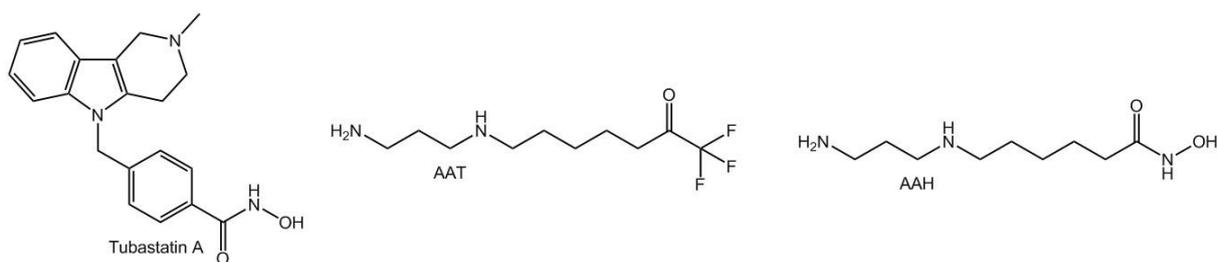


Abbildung 13: Bekannte HDAC10-Inhibitoren

1.6.3 Computermethoden

Anhand der bekannten Interaktionen von Inhibitoren und Substraten mit den Enzymen wurden Strukturen abgeleitet, die in die Substratbindetasche eindringen und das zentrale Zink-Ion koordinieren können. Diese designten Substanzen zeigten verschiedene Grundgerüste und Derivatisierungen. Sie wurden durch *Docking* am jeweiligen Enzym auf die theoretische Bindungsstärke hin untersucht. Die durch die erhaltenen *Docking-scores* vielversprechendsten Strukturen wurden visualisiert, das heißt, man zeigt die vorhergesagte Bindung des designten Inhibitors im katalytischen Zentrum des Zielenzyms. Die vielversprechenden Substanzen, welche die gewünschten Interaktionen zeigen, wurden für die Synthese in Betracht gezogen. Das *Docking* für HDAC8 wurde an der bekannten Struktur der hHDAC8 durchgeführt. Das *Docking* für HDAC10 wurde zunächst an einem Homologiemodell, basierend auf der zweiten katalytischen Domäne von HDAC6, und später anhand der Kristallstruktur von zHDAC10 durchgeführt. Aufgrund der hoch konservierten katalytischen Tasche wird für gute zHDAC10-Inhibitoren vorhergesagt, dass diese ebenfalls in der hHDAC10 potent sind.

Das Docking wurde wie ausführlich in [154], [185] und [191], Publikationen der AG Sippl, beschrieben durchgeführt.

1.7 *In-vitro* Testsysteme

Für die biochemische Charakterisierung von neuen potenziellen Inhibitoren sind biochemische Testsysteme unentbehrlich, denn sie lassen auf das inhibitorische Potential neuer Substanzen schließen. Es gibt *in vitro* Testsysteme, diese zeigen die Interaktion eines potenziellen Inhibitors mit einem isolierten Enzym unter optimierten Bedingungen. Ebenso gibt es Testsysteme, die zellbasiert funktionieren, also eine Interaktion des potenziellen Inhibitors mit dem Enzym unter physiologischen Bedingungen zeigen. Dies kann Aufschluss über Interaktionen mit Proteinkomplexen oder über die Zellgängigkeit der Substanzen geben. Ebenso können mitunter auch Interaktionen mit Proteinen stattfinden, die nicht dem Zielenzym entsprechen. In beiden Systemen kann die enzymatische Aktivität sowie eine Inhibitor-Protein-Bindung bestimmt werden. Für die Detektion können verschiedene Verfahren genutzt werden, hierzu zählen UV-Vis-Spektroskopie (ultraviolett-visuell), NMR-Spektroskopie (Kernspinresonanz, von engl.: *Nuclear magnetic resonance*), MS, direkte Fluoreszenzspektroskopie, Fluoreszenzpolarisation, Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET), Biolumineszenz-Resonanzenergietransfer (BRET) und Szintillationszählung. Für Hochdurchsatzscreening (HTS, von engl.: *high-throughput-screening*) werden Systeme angewandt, die eine kurze Messzeit pro Messpunkt, eine gute Reproduzierbarkeit und eine ausreichende Robustheit aufweisen.¹⁹²

1.7.1 HDAC8: Fluor-de-Lys-Assay

Die inhibitorische Aktivität gegen HDAC8 kann mittels Fluor-de-Lys-Assay (FDL) ermittelt werden. Dieser ist kommerziell erhältlich (Enzo Life Sciences, BLM-KI178; Farmingdale, NY, USA). Verwendet wird ein Tetrapeptid der Zusammensetzung H_2N -Arg-His-Lys_{Ac}-Lys_{Ac}-AMC, welches C-terminal mit AMC markiert ist. Diese Sequenz ist den Aminosäuren 379-382 des p53 nachempfunden.¹⁹³

Durch die Deacetylierung des Substrates durch HDAC8 entsteht eine freie, primäre Aminofunktion. Wird diese protoniert kann Trypsin dies erkennen und spaltet selektiv das AMC vom deacetylierten Substratmolekül (s. Abbildung 14). Diese Spaltung bedingt eine Änderung der Elektronendichte im aromatischen System des AMC-Fluorophors, was eine bathochrome Verschiebung der Emissionswellenlänge hervorruft. Diese Verschiebung kann durch fluorometrische Detektion erkannt werden, hierbei steht die Intensität der Fluoreszenz in direktem Zusammenhang mit der Menge an durch HDAC8 gespaltenem Substrat.¹⁹⁴

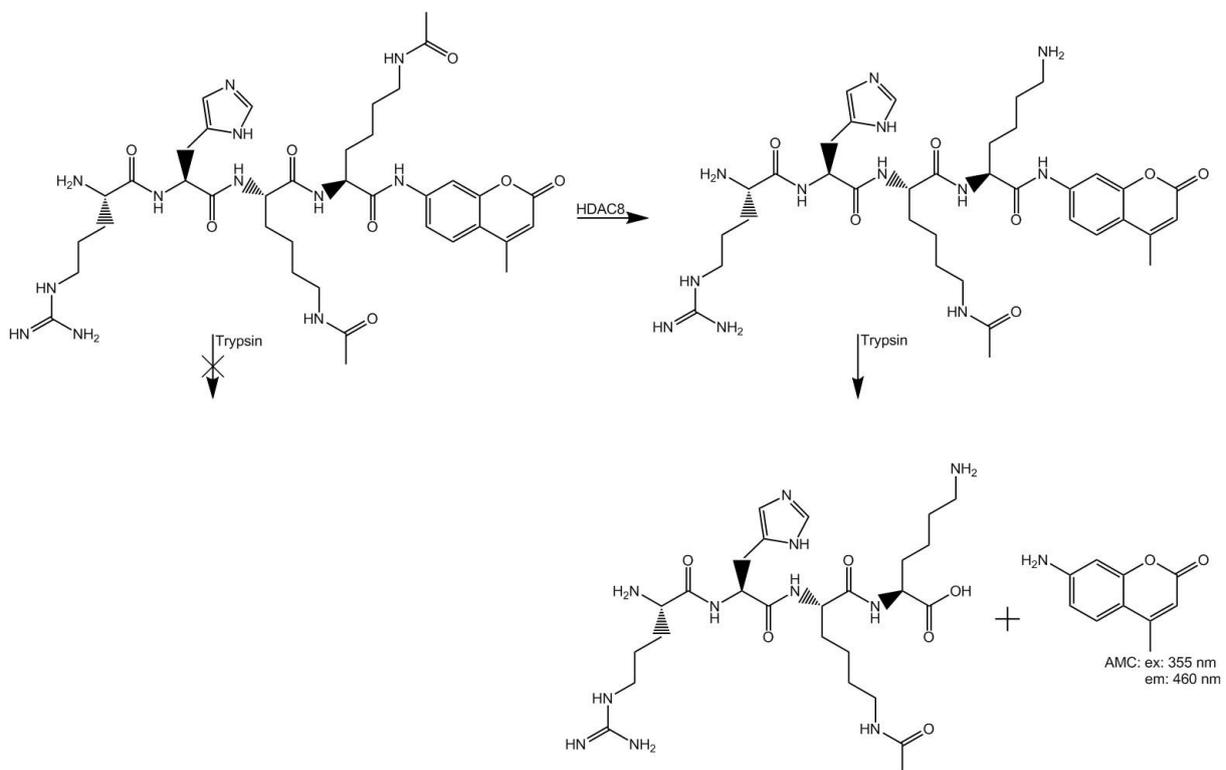


Abbildung 14: Schema des FDL-Assays

1.7.2 HDAC1 & HDAC6: ZMAL-Trypsin-Assay

Die inhibitorische Aktivität gegen HDAC1 und HDAC6 kann mittels ZMAL-Trypsin-Assay ermittelt werden. In diesem Testsystem wird Z-Lysin(acetyl)-7-amino-4-methylcumarin (ZMAL) als Substrat verwendet (s. Abbildung 15). Die Detektion erfolgt analog zum FDL-Assay über Fluoreszenzmessung des freien AMC.¹⁹⁵

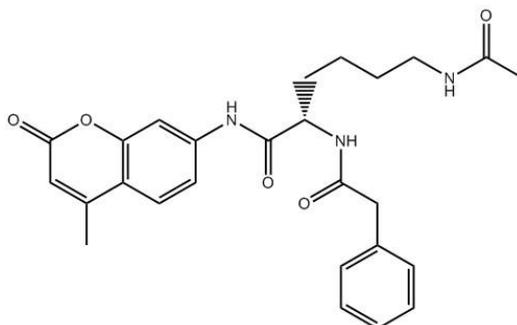


Abbildung 15: Substratstruktur des ZMAL-Trypsin-Assays

Der FDL- wie auch der ZMAL-Trypsin-Assay kommen bevorzugt beim HTS zum Einsatz. Sie ermöglichen das Testen einer großen Zahl an Verbindungen in kurzer Zeit an verschiedenen isolierten HDAC-Subtypen. Die direkte Fluoreszenzmessung ist mitunter anfällig gegenüber fluoreszenzlöschenden Eigenschaften oder Eigenfluoreszenz der Testsubstanzen. Diese können zu Fehlinterpretationen führen. So werden für Substanzen, die solche Effekte aufweisen, gesonderte Nullwerte aufgenommen oder die Screeningergebnisse durch einen unabhängigen Test bestätigt, um Assayartefakte zu vermeiden.¹⁹⁶

1.7.3 HDAC10: NDA-Assay

Im Laufe seiner Promotionsarbeit hat Daniel Herp (Arbeitsgruppe Prof. Dr. M. Jung; Albert-Ludwigs-Universität Freiburg) einen Assay für Hochdurchsatzscreenings der HDAC10 etabliert. Da die humane HDAC10 (hHDAC10) verhältnismäßig instabil ist und kommerziell nur mit unzureichender Reinheit erworben werden kann, wurde bei diesem Assay die HDAC10 aus Zebrafischen (*Danio rerio*) verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass zHDAC10 mit 63 % Sequenzidentität und 79 % Sequenzanalogie der hHDAC10 sehr ähnlich ist.⁶⁶ Zudem ist zHDAC10 leichter aufzureinigen und stabiler als hHDAC10. Der Assay beruht auf der Fluoreszenzlöschung durch 2,3-Naphthalendicarbaldehyd (NDA). Als Substrat diente ein *N*⁶-Acetylspermidin-AMC-Derivat (s. Abbildung 16). Das Substrat wird durch die HDAC10 deacetyliert. Das entstehende primäre Amin reagiert anschließend mit NDA. NDA reagiert in Anwesenheit von 2-Mercaptoethansulfonat-Natrium selektiv mit primären Aminen zu einer Benzisindolstruktur. Diese führt zu einer intramolekularen Fluoreszenzlöschung (s. Abbildung 16). Die Fluoreszenzlöschung wird detektiert und gibt direkten Aufschluss über die Menge an deacetyliertem Substrat.¹⁹⁷

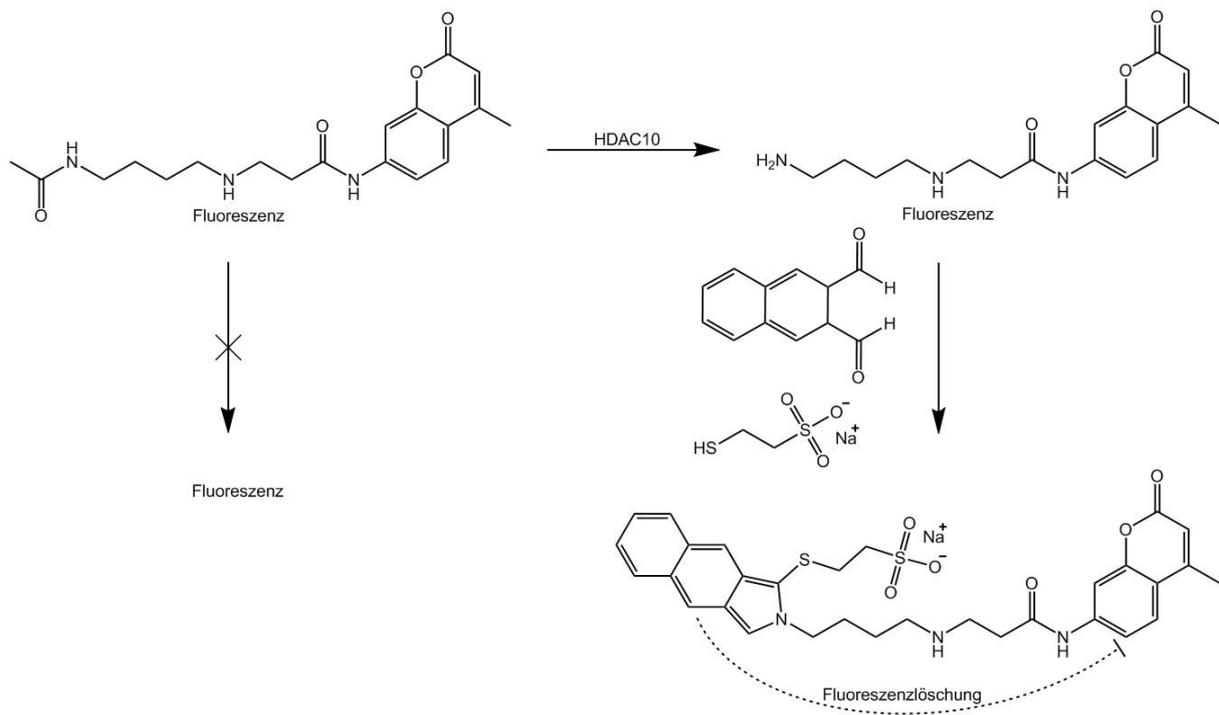


Abbildung 16: Schema des NDA-HDAC10-Assays¹⁹⁶

1.8 Zielstellung der Arbeit

Basierend auf Forschungsergebnissen vorangegangener Arbeiten sollten neuartige, potente und selektive Inhibitoren der hHDAC8 synthetisiert und biochemisch charakterisiert werden. Aufgrund der Aktivität der hHDAC8 in diversen Krebserkrankungen, aber vor allem in Neuroblastomen, sind hHDAC8-Inhibitoren vielversprechende Substanzen für zukünftige Therapieansätze. Als Leitstruktur wurde hierfür die Benzhydroxamsäure TH6 (s. Abbildung 12, Seite 20) ausgewählt.¹⁸⁵

Über die HDAC10 ist im Vergleich zu anderen HDACs nicht viel bekannt. Allerdings konnte eine Beteiligung der HDAC10 an Resistenzmechanismen gegen Chemotherapeutika in der Neuroblastomtherapie identifiziert werden. Es wurde gezeigt, dass verwendete unspezifische HDAC10-Inhibitoren diesen Resistenzmechanismen entgegenwirken können.¹²⁶ Somit stellen HDAC10-Inhibitoren eventuell ebenfalls vielversprechende Substanzen für zukünftige Therapieansätze dar, vor allem für Kombinationstherapien mit Chemotherapeutika, gegen die diverse Krebszellen zuvor Resistenzen entwickeln konnten. Allerdings gibt es bis dato keine potenten und selektiven HDAC10 Inhibitoren welche eine endgültige Beurteilung dieser Substanzklasse zulassen würden.

Ausgangspunkt der Synthesen dieser Arbeit waren virtuelle *Screening*-Daten, die mit Hilfe eines Homologiemodells der humanen HDAC10 und der Kristallstruktur der zHDAC10 gewonnen wurden.

Hauptaufgabe dieser Arbeit war das Erstellen und biochemische Charakterisieren einer Substanzbibliothek verschiedener Hydroxamsäurederivate und das Analysieren ihrer Struktur-Wirkungs-Beziehungen. Für Untersuchungen hinsichtlich der Selektivität sollten etablierte *in-vitro*-Assays gegen HDAC1, HDAC6, HDAC8 und HDAC10 genutzt werden, welche im Rahmen dieser Arbeit und durch die Arbeitsgruppe um Prof. M. Jung (Albert-Ludwigs-Universität Freiburg) durchgeführt werden sollten. Darüber hinaus sollten die Inhibitoren in Zytotoxizitätsassays hinsichtlich ihres Nebenwirkungspotentials untersucht werden. Ebenso sollten die aktivsten Derivate für weitere Tests an ausgewählten Krebszelllinien, wie der akuten myeloischen Leukämie, herangezogen werden. Dies erfolgte im Rahmen nationaler und internationaler Kooperationen, um ergebnisorientiert Wirkstoffoptimierungen vornehmen zu können.

2. Synthetische Arbeiten

2.1 HDAC8-Inhibitoren

Als Ausgangspunkt der Entwicklung neuer hHDAC8-Inhibitoren diente die von Dr. Heimburg (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Sippl; Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) synthetisierte Verbindung TH6 (s. Abbildung 12, Seite 20). Bei TH6 handelt es sich um 3-Benzoxymethoxy-4-methoxy-benzhydroxamsäure. TH6 zeigt eine hHDAC8 Inhibition im nanomolaren Bereich mit einem Selektivitätsindex (SI) von 448 gegenüber hHDAC1 und 107 gegenüber hHDAC6.¹⁸⁵

Es wurden drei Klassen an Verbindungen hergestellt (s. Abbildung 17), die hinsichtlich ihrer Struktur-Wirkungs-Beziehungen untersucht werden sollten. In der ersten Klasse sollte die terminale *Cap*-Gruppe von TH6 derivatisiert werden. Hierfür wurden einerseits Chlorderivatisierungen und andererseits eine veränderte Linkerlänge zwischen Ether und Phenylring eingeführt. Bei der zweiten Klasse wurde die 4-Methoxygruppe durch eine Chlorfunktion ausgetauscht. Die dritte Klasse an HDAC8 Inhibitoren stellten die Thioether dar. Es gab diverse Substitutionsmuster, die klassenübergreifend verwendet wurden, um eine genaue Aussage über Struktur-Wirkungs-Beziehungen treffen zu können.

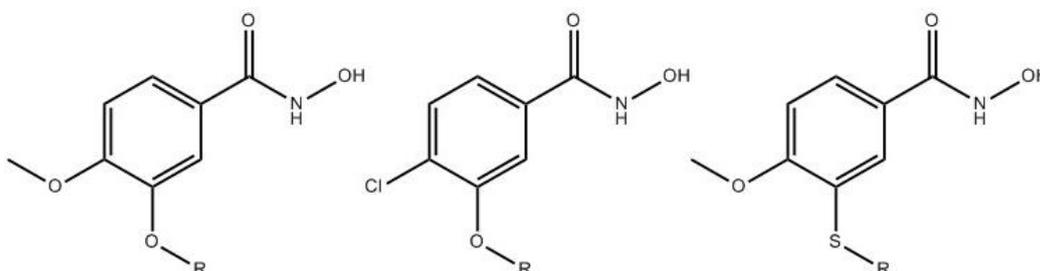


Abbildung 17: Grundgerüste der drei hHDAC8 Inhibitor-Klassen

Der Synthese aller drei Klassen war gemein, dass zunächst die entsprechenden Carbonsäuren dargestellt wurden, welche abschließend in die Hydroxamsäure überführt wurden. Alle Reaktionen wurden mittels Dünnschichtchromatographie (DC) verfolgt. Zwischen einzelnen Reaktionsschritten erfolgte in der Regel eine chromatographische Reinigung der dargestellten Zwischenprodukte. Endprodukte wurden mit Hilfe der präparativen Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC, von engl.: *High performance liquid chromatography*) gereinigt und mittels analytischer HPLC die Reinheit in % bestimmt.

2.1.1 Darstellung der derivatisierten Cap-Gruppe

Die Synthese dieser Verbindungen startete mit Isovanillinsäure, die, um Nebenreaktionen zu vermeiden, in den Methyl ester überführt wurde. Anschließend wurde die freie Hydroxylfunktion mit Hilfe der Williamson-Ethersynthese zu den entsprechenden Ethern umgesetzt. Daraufhin wurde *via* basischer Esterhydrolyse die Methyl Schutzgruppe der Carbonsäure entfernt, um diese für die Reaktion zur Hydroxamsäure zugänglich zu machen. Unter Zuhilfenahme geeigneter Aktivierungsreagenzien wurde die Carbonsäure aktiviert und in die Tetrahydropyran- (THP) geschützte Hydroxamsäure überführt. Der letzte Schritt ist die Spaltung der THP-Schutzgruppe. Bei dieser Reaktion wurde zunächst die THP-geschützte Hydroxamsäure dargestellt, da diese durch chromatographische Trennvorgänge bedeutend besser von der freien Carbonsäure getrennt werden konnte als die freie Hydroxamsäure.

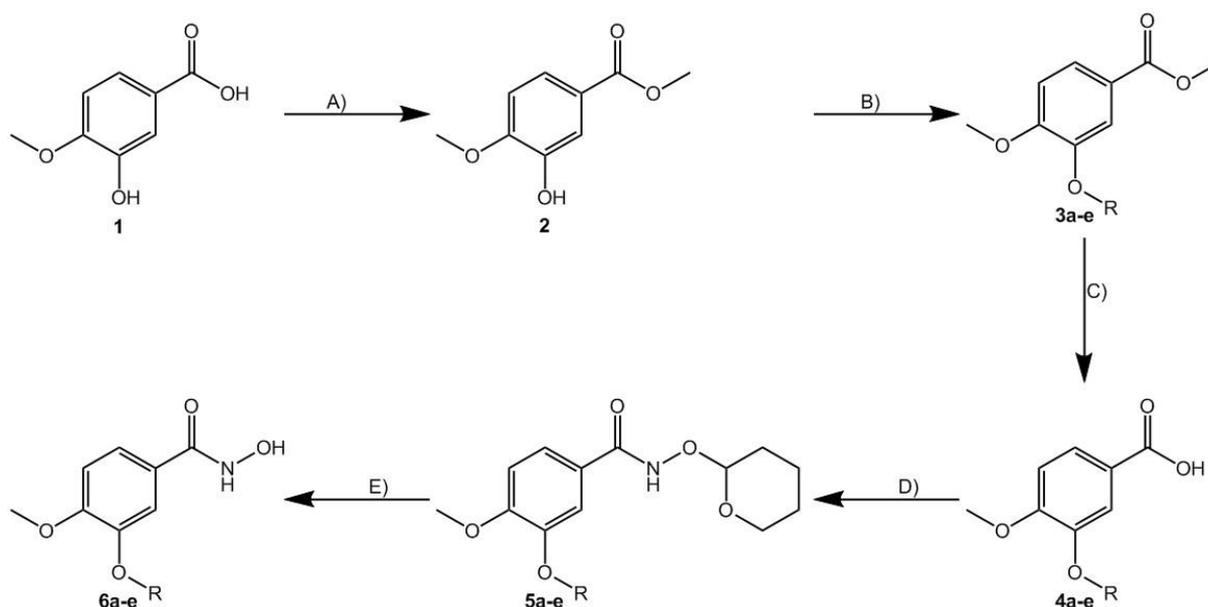


Abbildung 18: Syntheschema der Isovanillinsäurederivate. A) Methanol (MeOH), SOCl₂, Reflux, 5 h; B) Dimethylformamid (DMF), K₂CO₃, Alkylbromid, 80 °C, 6 h; C) MeOH, 1 M NaOH_{aq}, Reflux, 3 h; D) Tetrahydrofuran (THF), THP-Hydroxylamin, Diisopropylethylamin (DIPEA), Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat (PyBOP), Raumtemperatur, über Nacht; E) THF, katalyt. HCl, Raumtemperatur, über Nacht

Im ersten Schritt wird die Carbonsäure mit Thionylchlorid aktiviert. Hierbei greift ein Elektronenpaar der Carbonsäure-Doppelbindung den Schwefel des Thionylchlorids nukleophil an. Das andere Sauerstoffatom der Carboxylfunktion kann mithilfe des +M-Effekts die Reaktion weiter begünstigen und selbst eine Doppelbindung zum Carbonsäure-Kohlenstoffatom ausbilden. Das in diesem Schritt freiwerdende Chloridion kann im nächsten Schritt den Carbonylkohlenstoff erneut nukleophil angreifen. Es entsteht eine tertiäre Übergangsverbindung. Das Sauerstoffatom kann jetzt erneut eine Doppelbindung zum Carbonylkohlenstoff ausbilden, sodass die Bindung zum anderen Sauerstoffatom gespalten wird. Es entstehen das Säurechlorid, Schwefeldioxid und Salzsäure (s. Abbildung 19).

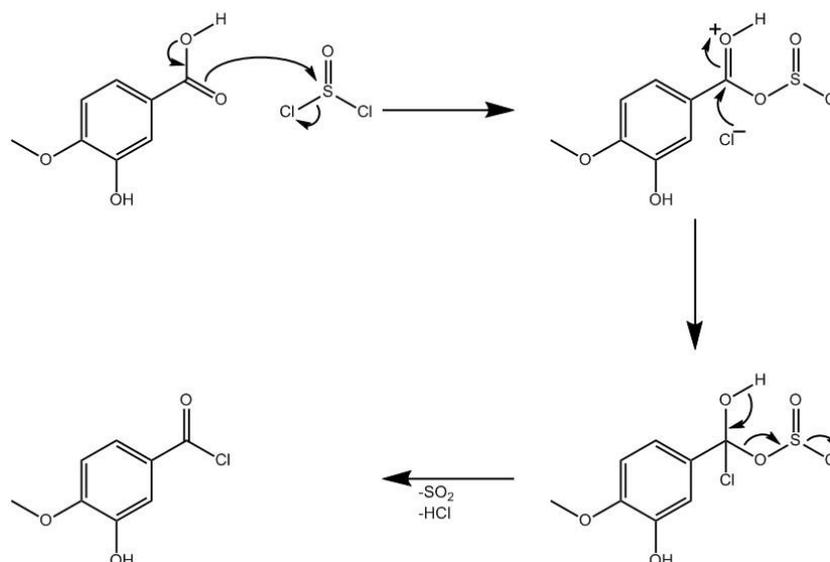


Abbildung 19: Mechanismus der Reaktion von Thionylchlorid¹⁹⁸

Anschließend kann MeOH, das gleichzeitig als Lösungsmittel dient, das Kohlenstoffatom des Säurechlorids nukleophil angreifen. Die Veresterung verläuft quantitativ. Der nächste Schritt ist eine Williamson-Ethersynthese, bei der unter leicht basischen Bedingungen das Alkoholat das Alkylbromid nukleophil angreifen kann. Als Base dient Kaliumcarbonat, als Lösungsmittel wird DMF verwendet, die Reaktion findet bei 80 °C statt. Es kommt zu einer nukleophilen Substitution, bei der der Ether entsteht. Im dritten Schritt wird der Methylester gespalten. Hierfür wird wässrige Natriumhydroxidlösung und MeOH als Lösungsmittel verwendet. Bei dieser basischen Esterhydrolyse kommt es zu einem nukleophilen Angriff des Hydroxidions an das Carbonylkohlenstoff, es bildet sich ein Orthocarbonsäuremonoester-Anion. Anschließend kommt es zu einer Abspaltung des Methanolats, welches unverzüglich eine Säure-Base-Reaktion mit der gebildeten Carbonsäure eingeht. Durch Ansäuern wird aus dem Carboxylat die Carbonsäure gewonnen. Der nächste Schritt, die Darstellung der THP-geschützten Hydroxamsäure, beginnt mit einer Aktivierung der Carbonsäure. Dies geschieht in basischem (DIPEA) THF mit Hilfe von PyBOP. Zunächst wird die Carbonsäure durch DIPEA deprotoniert, bevor das freie Elektronenpaar des Carboxylats den positiv geladenen Phosphor des PyBOP nukleophil angreift. Es entsteht das Phosphoniumsalz, welches auf zwei mögliche Arten weiter reagieren kann (s. Abbildung 20). Einerseits kann das freie Elektronenpaar des Stickstoffatoms des THP-Hydroxylamins direkt den positivierten Kohlenstoff des Phosphoniumsalzes nukleophil angreifen und die geschützte Hydroxamsäure bilden, andererseits kann das Phosphoniumsalz mit dem entstandenen deprotonierten Hydroxybenzotriazol (OBt) einen aktivierten Ester ausbilden, der wiederum durch das freie Elektronenpaar des Stickstoffatoms des THP-Hydroxylamins nukleophil angegriffen werden kann. Beide Reaktionen führen zum gleichen Produkt, jedoch läuft die zweite signifikant langsamer ab, dafür werden bei dieser Variante Racemisierungen verhindert.¹⁹⁹ Da die erste Variante bedeutend schneller abläuft und die dargestellten

Verbindungen keine chiralen Zentren aufweisen wird diese wahrscheinlich bevorzugt ablaufen.

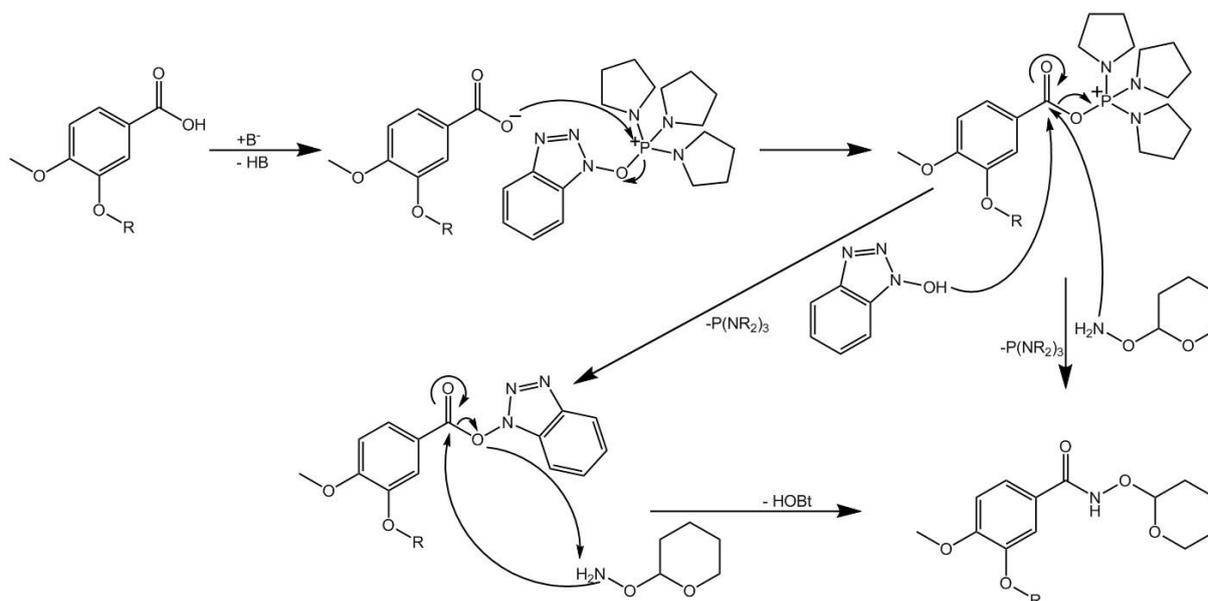


Abbildung 20: Mechanismus der Reaktionen von PyBOP²⁰⁰

Der letzte Schritt ist die Spaltung der THP-Schutzgruppe, um die freie Hydroxamsäure zu erhalten. Hierfür wird eine katalytische Menge wässriger Salzsäurelösung verwendet. Das terminale Sauerstoffatom der Hydroxamsäurefunktion wird hierbei protoniert. Anschließend kann ein Wassermolekül am C₁ der Schutzgruppe angreifen, was ein Spalten der Bindung zwischen Hydroxamsäure und Schutzgruppe zur Folge hat. Es entstehen die freie Hydroxamsäure und Oxanol.

Auf diesem Wege wurden fünf hHDAC8 Inhibitoren dargestellt (s. Abbildung 21).

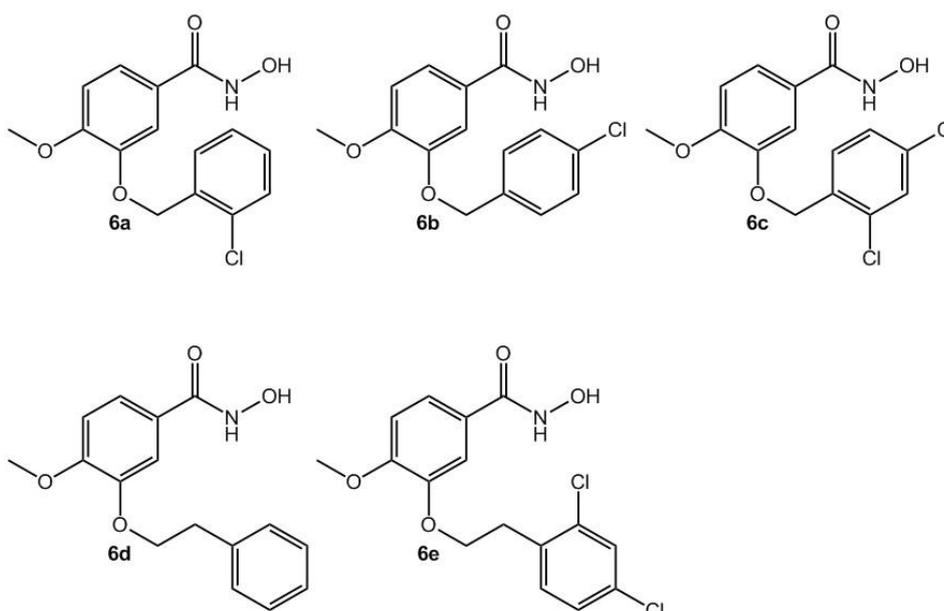


Abbildung 21: fünf synthetisierte Iovanillinsäurederivate als hHDAC8-Inhibitoren

Tabelle 1: Bezeichnungen, Namen nach internationaler Union für reine und angewandte Chemie (IUPAC, von engl.: *International Union of Pure and Applied Chemistry*), Molmassen und Ausbeuten der dargestellten Benzhydroxamsäuren mit derivatisierter Cap-Gruppe

Verbindung	IUPAC-Name	Molekulargewicht [g/mol]	Ausbeute [%]
6a	3-[(2-Chlorbenzyl)oxy]-4-methoxybenzhydroxamsäure	308,1	91,0
6b	3-[(4-Chlorbenzyl)oxy]-4-methoxybenzhydroxamsäure	308,1	62,0
6c	3-[(2,4-Dichlorbenzyl)oxy]-4-methoxybenzhydroxamsäure	342,0	68,0
6d	3-[(Ethylbenzol)oxy]-4-methoxybenzhydroxamsäure	288,1	18,5
6e	3-[(2,4-Dichlorethylbenzol)oxy]-4-methoxybenzhydroxamsäure	356,0	9,1

2.1.2 Darstellung der 4-Chlorbenzhydroxamsäure-Derivate

Die Synthese dieser Verbindungen begann mit 4-Chlor-3-hydroxy-benzoesäure, die, um Nebenreaktionen zu vermeiden, in den Methylester überführt wurde. Anschließend wurde die freie Hydroxylfunktion mit Hilfe der Williamson-Ethersynthese zum entsprechenden Ether umgesetzt. Daraufhin wurde mithilfe basischer Esterhydrolyse die Methyl-Schutzgruppe der Carbonsäure entfernt, um diese für die Reaktion zur Hydroxamsäure zugänglich zu machen. Unter Zuhilfenahme von PyBOP wurde die Carbonsäure aktiviert und in die THP-geschützte Hydroxamsäure überführt. Der letzte Schritt ist die Spaltung der THP-Schutzgruppe. Bei dieser Reaktion wird zunächst die THP-geschützte Hydroxamsäure dargestellt, da diese durch chromatographische Trennvorgänge bedeutend besser von der freien Carbonsäure getrennt werden konnte als die freie Hydroxamsäure.

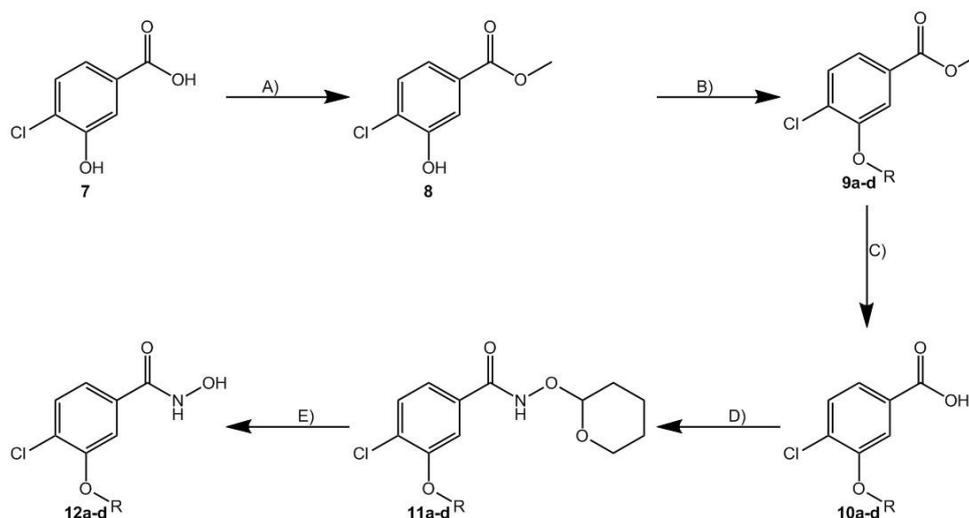


Abbildung 22: Syntheschema der 4-Chlorbenzhydroxamsäurederivate; A) MeOH, SOCl₂, Reflux, 5 h; B) DMF, K₂CO₃, Alkylbromid, 80 °C, 6 h; C) MeOH, 1 M NaOH_{aq}, Reflux, 3 h; D) THF, THP-Hydroxylamin, DIPEA, PyBOP, Raumtemperatur, über Nacht; E) THF, katalyt. HCl, Raumtemperatur, über Nacht

Die Synthesemechanismen verliefen analog zu den in Kapitel 2.1.1 beschriebenen Synthesen. Es wurden vier Substanzen dieser Klasse hergestellt.

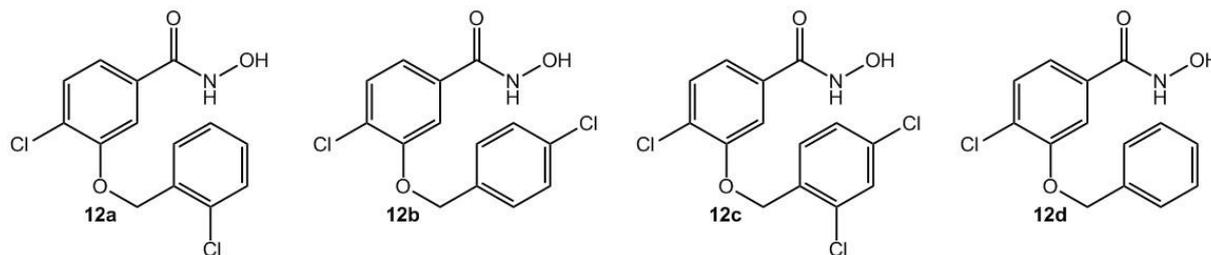


Abbildung 23: vier synthetisierte 4-Chlorbenzhydroxamsäurederivate als hHDAC8 Inhibitoren

Tabelle 2: Bezeichnungen, Namen nach IUPAC, Molmassen und Ausbeuten der dargestellten 4-Chlorbenzhydroxamsäure-Derivate

Verbindung	IUPAC-Name	Molekulargewicht [g/mol]	Ausbeute [%]
12a	4-Chlor-3-[(2-chlorbenzyl)oxy]-benzhydroxamsäure	312,0	42,2
12b	4-Chlor-3-[(4-Chlorbenzyl)oxy]-benzhydroxamsäure	312,0	47,0
12c	4-Chlor-3-[(2,4-Dichlorbenzyl)oxy]-benzhydroxamsäure	346,0	36,5
12d	3-Benzyloxy-4-chlorbenzhydroxamsäure	278,1	11,5

2.1.3 Darstellung der Thioether-Derivate

Die Synthese dieser Verbindungen startete mit Isovanillinsäure, die, um Nebenreaktionen zu vermeiden, in den Methylester überführt wurde. Anschließend wurde die freie Hydroxylgruppe zum O-Dimethylthiocarbamat umgesetzt, welches daraufhin mithilfe einer internen Umlagerung in das S-Dimethylthiocarbamat umgesetzt wurde.²⁰¹ Das S-Dimethylthiocarbamat wurde gespalten, um das freie aromatische Thiol zu erhalten, welches im Sinne einer Williamson-Ethersynthese zu den entsprechenden Thioethern umgesetzt wurde. Daraufhin wurde mithilfe der basischen Esterhydrolyse die Methyl Schutzgruppe der Carbonsäure entfernt, um diese für die Reaktion zur Hydroxamsäure zugänglich zu machen. Die Carbonsäure wurde aktiviert und zur THP-geschützten Hydroxamsäure umgesetzt. Der letzte Schritt ist die Spaltung der THP-Schutzgruppe, um die freie Hydroxamsäure zu erhalten. Bei dieser Reaktion wurde zunächst die THP-geschützte Hydroxamsäure dargestellt, da diese durch chromatographische Trennvorgänge bedeutend besser von der freien Carbonsäure getrennt werden konnte als die freie Hydroxamsäure.

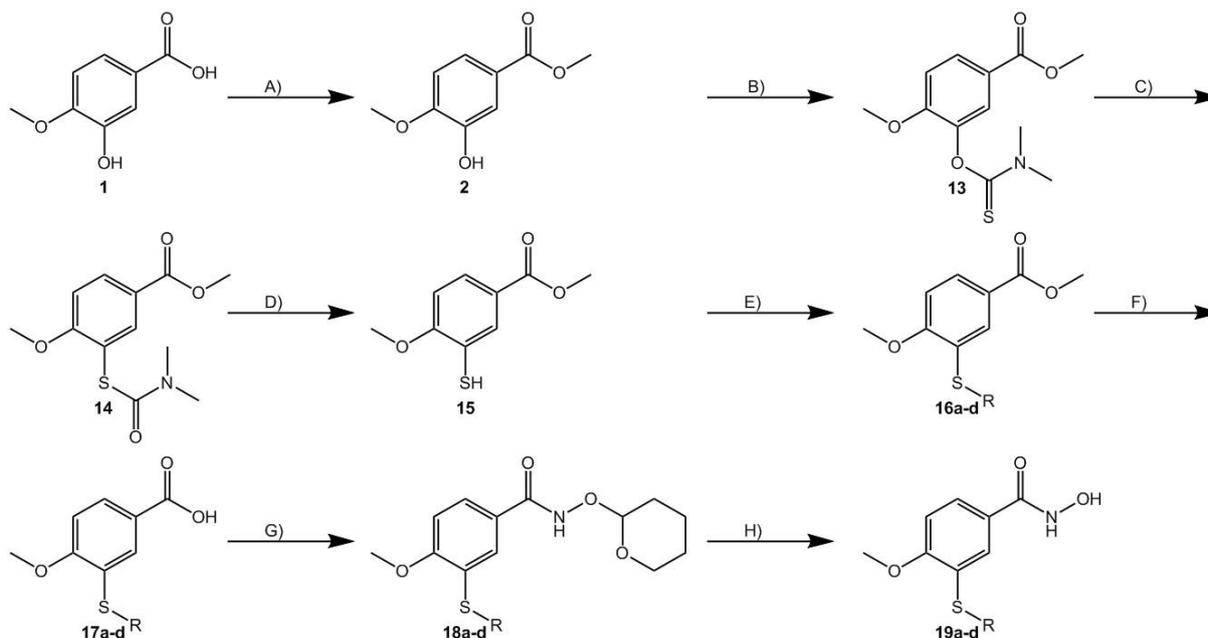


Abbildung 24: Syntheschema der Thioetherderivate; A) MeOH, SOCl_2 , Reflux, 5 h; B) DMF, NaH, Dimethylthiocarbonylchlorid (DMTCCI), Raumtemperatur, Schutzgas, drei Tage; C) Diphenylether, $280\text{ }^\circ\text{C}$, 2 h; D) MeOH, Natriummethanolat (NaOMe), Reflux, 12 h; E) DMF, Dithiothreitol (DTT), K_2CO_3 , Alkylbromid, Reflux, 6 h; F) MeOH, 1 M NaOH_{aq} , Reflux, 6 h; G) THF, THP-Hydroxylamin, DIPEA, PyBOP, Raumtemperatur, über Nacht; H) THF, katalyt. HCl, Reflux, 2,5 h

Im ersten Schritt wird die Carbonsäure mit Thionylchlorid aktiviert. Anschließend kann Methanol, das gleichzeitig als Lösungsmittel dient, das Kohlenstoffatom des Säurechlorids nukleophil angreifen. Die Veresterung verläuft quantitativ. Anschließend wird Natriumhydrid und DMTCCI in DMF hinzugegeben. Das Alkoholat kann jetzt das Kohlenstoffatom des DMTCCI nukleophil angreifen, es entsteht das O-Dimethylthiocarbamat. Dieses bildet durch interne Umlagerung bei sehr hohen Temperaturen das S-Dimethylthiocarbamat. Anschließend wird mithilfe von NaOMe in MeOH das freie Thiol hergestellt, hierbei greift das Methanolat das Carbonylkohlenstoff nukleophil an und bewirkt so eine Spaltung der Schwefel-Kohlenstoff-Bindung. NaOMe wird verwendet, damit die Schutzgruppe der Carbonsäurefunktion nicht verändert wird. Der nächste Schritt ist die Synthese des Thioethers. Dies geschieht mithilfe von Kaliumcarbonat in DMF unter leicht basischen Bedingungen. Das Thiolat greift das Alkylbromid nukleophil an, sodass nach der nukleophilen Substitution der Thioether entsteht. Bei der Thioethersynthese wird DTT zugesetzt, um eine mögliche Disulfidbildung zu unterbinden. Der folgende Schritt ist die Spaltung des Methylesters. Hierfür wird wässrige Natriumhydroxidlösung und MeOH als Lösungsmittel verwendet. Bei dieser basischen Esterhydrolyse kommt es zu einem nukleophilen Angriff des Hydroxidions an den Carbonylkohlenstoff, es bildet sich ein Orthocarbonsäuremonoester-Anion. Anschließend kommt es zu einer Abspaltung des Methanolats, welches unverzüglich eine Säure-Base-Reaktion mit der gebildeten Carbonsäure eingeht. Durch Ansäuern wird aus dem Carboxylat die Carbonsäure gewonnen. Im nächsten Schritt erfolgt die Synthese der THP-geschützten Hydroxamsäure

und deren Entschützung. Diese Reaktionen erfolgen analog zur in Kapitel 2.1.1 beschriebenen Synthese. Es wurden vier Inhibitoren dieser Klasse synthetisiert.

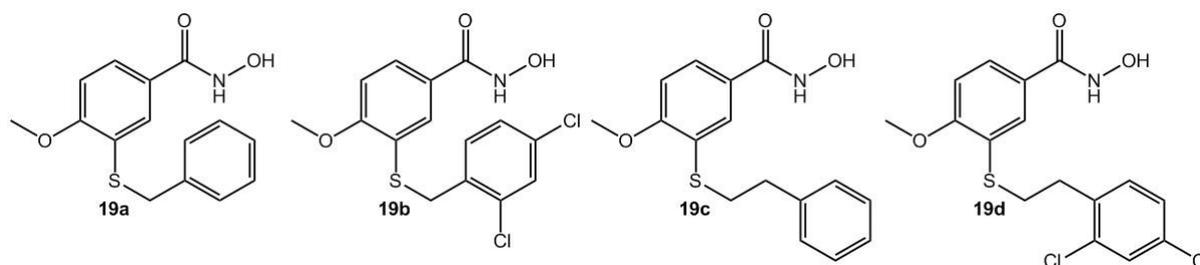


Abbildung 25: vier synthetisierte Thioetherderivate als hHDAC8 Inhibitoren

Tabelle 3: Bezeichnung, Name nach IUPAC, Molmassen und Ausbeuten der dargestellten Thioether-Derivate

Verbindung	IUPAC-Name	Molekulargewicht [g/mol]	Ausbeute [%]
19a	3-Benzylthio-4-methoxybenzhydroxamsäure	290,1	10,3
19b	3-[(2,4-Dichlorbenzyl)thio]-4-methoxybenzhydroxamsäure	358,0	13,3
19c	4-methoxy-3-(phenethylthio)benzhydroxamsäure	304,1	17,4
19d	3-[(2,4-Dichlorphenethyl)thio]-4-methoxybenzhydroxamsäure	372,0	14,1

2.2 HDAC10-Inhibitoren

Für die Entwicklung neuartiger HDAC10 Inhibitoren war bereits bekannt, dass ein basisches Amin, das mit einem nur in HDAC10 vorkommendem Glutamat interagiert, und eine ZBG unerlässlich sind (s. Kapitel 1.6.2). Es sollten möglichst potente Inhibitoren synthetisiert werden, die eine gute Selektivität gegenüber anderen HDACs, besonders gegenüber HDAC6 aufweisen, da bisher beschriebene HDAC10 Inhibitoren wie Tubastatin A auch sehr potent HDAC6 hemmen.

Es wurden zwei Klassen an Verbindungen hergestellt (s. Abbildung 26), die hinsichtlich ihrer Struktur-Wirkungs-Beziehungen untersucht werden sollten. In der ersten Klasse wurden Benzhydroxamsäuren dargestellt, die in *para*-Position eine Aminomethylfunktion tragen, welche die *Cap*-Gruppe bindet. Bei der zweiten Klasse handelt es sich um Verbindungen, deren Grundgerüst eine Piperidin-4-acrylhydroxamsäure ist. Der Piperidin-Stickstoff bindet als tertiäres Amin die *Cap*-Gruppe.

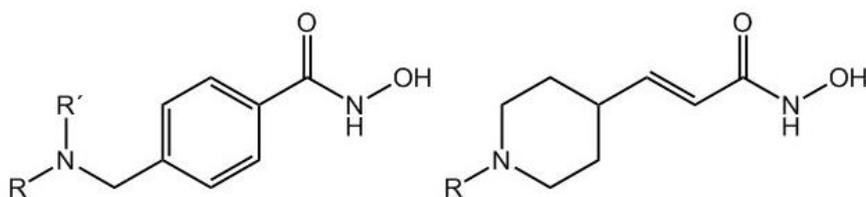


Abbildung 26: Grundgerüste der zwei HDAC10 Inhibitor-Klassen

Der Synthese beider Klassen war gemein, dass zunächst die entsprechenden Carbonsäuren dargestellt wurden, welche abschließend in die Hydroxamsäure überführt wurden. Alle Reaktionen wurden mittels DC verfolgt. Zwischen einzelnen Reaktionsschritten erfolgte in der Regel eine chromatographische Reinigung der dargestellten Zwischenprodukte. Endprodukte wurden mit Hilfe der präparativen HPLC gereinigt.

2.2.1 Darstellung der Benzhydroxamsäure-Derivate

Die Synthese dieser Verbindungen startete mit 4-Aminomethylbenzoesäure, die, um Nebenreaktionen zu vermeiden, in den Methyl ester überführt wurde. Anschließend wurde das primäre Amin mittels reduktiver Aminierung zu den entsprechenden sekundären Aminen umgesetzt. Daraufhin wurde durch basische Esterhydrolyse die Methyl-Schutzgruppe der Carbonsäure entfernt, um diese für die Reaktion zur Hydroxamsäure zugänglich zu machen. Die Carbonsäure wurde aktiviert und zur THP-geschützten Hydroxamsäure umgesetzt. Der letzte Schritt ist die Spaltung der THP-Schutzgruppe, um die freie Hydroxamsäure zu erhalten. Die dargestellten tertiären Amine wurden als fertige Carbonsäure erstanden, somit wurde lediglich die Synthese zur Hydroxamsäure durchgeführt. Bei der Hydroxamsäure-Reaktion wurde zunächst die THP-geschützte Hydroxamsäure dargestellt, da diese durch chromatographische Trennvorgänge bedeutend besser von der freien Carbonsäure getrennt werden konnte als die freie Hydroxamsäure.

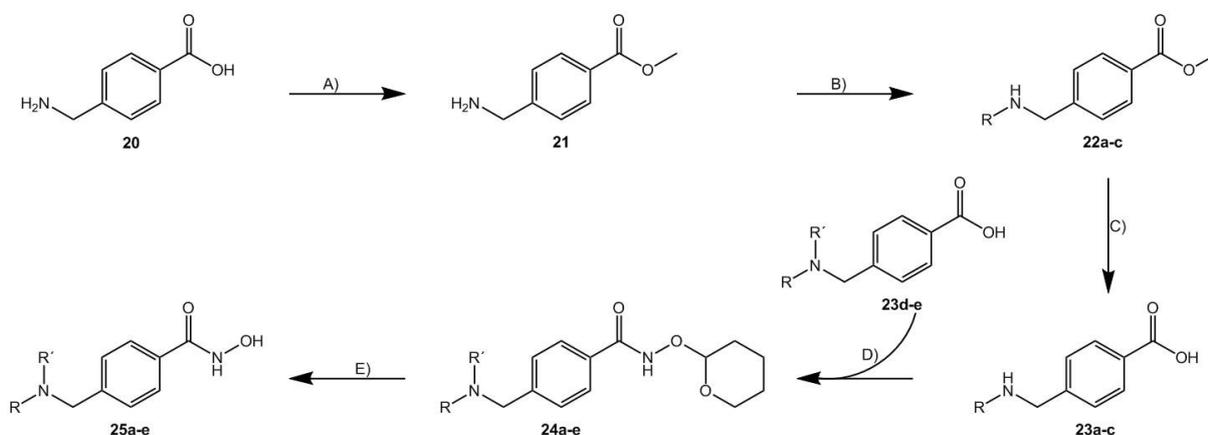


Abbildung 27: Syntheschema der Benzhydroxamsäurederivate: A) MeOH, SOCl₂, Raumtemperatur, 12 h; B) Dichlormethan (DCM), MeOH, Carboxaldehyd, Natriumtriacetoxyborhydrid, Raumtemperatur, über Nacht; C) MeOH, 1 M NaOH_{aq}, Raumtemperatur, 48 h; D) THF, THP-Hydroxylamin, DIPEA, PyBOP, Raumtemperatur, über Nacht; E) THF, katalyt. HCl, Raumtemperatur, über Nacht

Im ersten Schritt wird die Carbonsäure mit Thionylchlorid aktiviert. Anschließend kann MeOH, das gleichzeitig als Lösungsmittel dient, das Kohlenstoffatom des Säurechlorids nukleophil angreifen. Der nächste Schritt ist die reduktive Aminierung in einer Mischung aus DCM und MeOH. Hier greift das freie Elektronenpaar des primärenamins das Carbonylkohlenstoff des eingesetzten Aldehyds nukleophil an. Es bildet sich ein tertiärer Übergangszustand mit einem sekundären Amin und einem Alkohol am benachbarten Kohlenstoff, einem Halbaminal. Dieses reagiert, der Erlenmeyer-Regel folgend, unter Wasserabspaltung zum Imin. Es folgt die Reduktion des Imins zum sekundären Amin, mit Natriumtriacetoxyborhydrid als Reduktionsmittel. Natriumtriacetoxyborhydrid ist, im Gegensatz zu vielen anderen Hydrierungsreagenzien, eine milde und selektive Chemikalie. Dies ist nötig, um eine Reduktion der Esterfunktion zu verhindern, da mit einem Überschuss Hydrierungsreagenz gearbeitet wird. Es folgt die Spaltung des Methylesters mithilfe wässriger Natriumhydroxydlösung und Methanol. Es kommt zu einem nukleophilen Angriff des Hydroxydions an den Carbonylkohlenstoff, was zu einem Orthocarbonsäuremonoester-Anion als Übergangszustand führt. Anschließend spaltet sich das Methanolat vom Kohlenstoffatom und geht eine Säure-Base-Reaktion mit der entstandenen Carbonsäure ein. Durch Ansäuern protoniert man das Carboxylat zur Carbonsäure. Im nächsten Schritt erfolgt die Synthese der THP-geschützten Hydroxamsäure und deren Entschützung. Diese Reaktionen erfolgen analog zur in Kapitel 2.1.1 beschriebenen Synthese. Auf diesem Wege wurden fünf Inhibitoren synthetisiert.

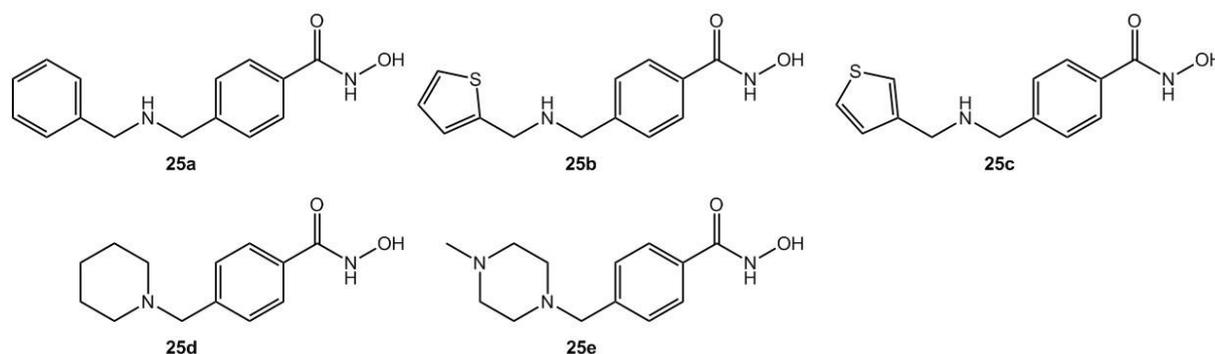


Abbildung 28: fünf synthetisierte Benzhydroxamsäuren als HDAC10 Inhibitoren

Tabelle 4: Bezeichnung, Name nach IUPAC, Molmassen und Ausbeuten der dargestellten Benzhydroxamsäure-Derivate

Verbindung	IUPAC-Name	Molekulargewicht [g/mol]	Ausbeute [%]
25a	4-[(Benzylamino)methyl]-benzhydroxamsäure	257,1	5,1
25b	4-[(Thiophen-2-ylmethyl)amino]methyl)-benzhydroxamsäure	263,1	1,1
25c	4-[(Thiophen-3-ylmethyl)amino]methyl)-benzhydroxamsäure	263,1	4,1
25d	4-(Piperidin-1-ylmethyl)benzhydroxamsäure	235,1	4,7
25e	4-[(<i>N</i> -Methylpiperazinyl)methyl]benzhydroxamsäure	250,2	18,8

Die verhältnismäßig geringen Ausbeuten einiger der dargestellten Verbindungen lassen sich durch verschiedene Gründe erklären. Einerseits ist es bei der Aufarbeitung, durch den polaren Charakter der Verbindungen und der teilweise sehr kleinen Reaktionsansätze, zu Verlusten gekommen, andererseits hat die reduktive Aminierung bei einigen der dargestellten Verbindungen nicht den gewünschten Umsatz erzielt. Dies kann unter anderem an der Benutzung von älterem Natriumtriacetoxyborhydrid oder nicht komplett getrocknetem Lösungsmittel liegen. Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass das sekundäre oder tertiäre Amin unter sauren und wässrigen Bedingungen nur eingeschränkt stabil ist. Dies führte zu weiteren Verlusten während der Entschützung der Hydroxamsäure.

2.2.2 Darstellung der Piperidin-4-acrylhydroxamsäure-Derivate

Die Synthese der Verbindungen startete mit der *tert*-Butylcarbonyl (Boc)-Entschützung des Amins von *N*-Boc-(2-Ethoxycarbonylvinyl)piperidin. Das sekundäre Amin wurde anschließend entweder durch reduktive Aminierung oder Alkylierung zum tertiären Amin derivatisiert. Es folgte die basische Esterhydrolyse zur Entschützung der Carbonsäurefunktion um diese für Folgereaktionen zugänglich zu machen. Die Carbonsäure wurde aktiviert und zur THP-geschützten Hydroxamsäure umgesetzt. Der letzte Schritt ist die Spaltung der THP-Schutzgruppe, um die freie Hydroxamsäure zu erhalten. Bei dieser Reaktion wurde zunächst die THP-geschützte Hydroxamsäure dargestellt, da diese durch chromatographische Trennvorgänge bedeutend besser von der freien Carbonsäure getrennt werden konnte als die freie Hydroxamsäure.

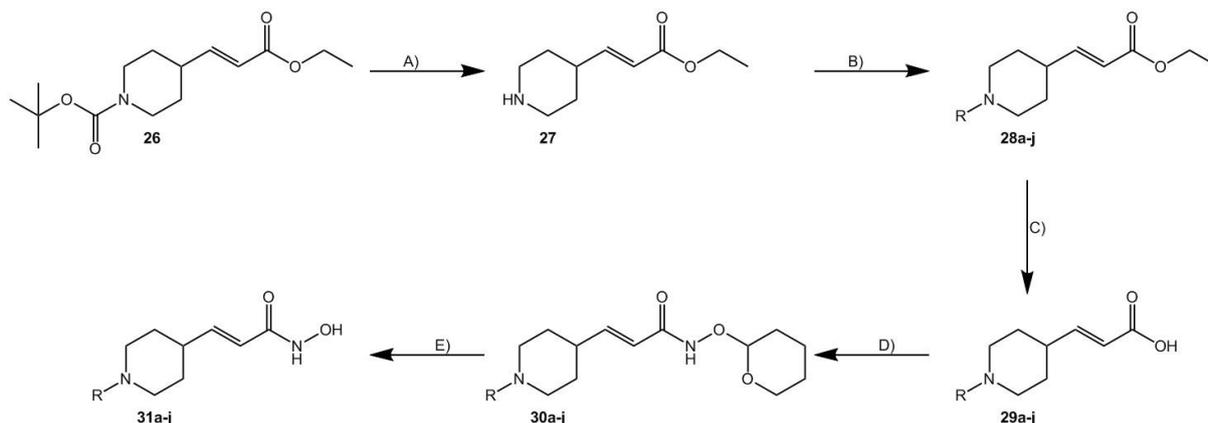


Abbildung 29: Syntheschema der Piperidin-4-acrylhydroxamsäure-Derivate: A) DCM, Trifluoressigsäure (TFA), 60 °C, 5 h; B) Alkylierung: DMF, K₂CO₃, Alkylbromid, Kaliumiodid, lichtgeschützt, Schutzgas, Raumtemperatur, 72 h; reduktive Aminierung: Ethanol (EtOH), Carboxaldehyd, Natriumtriacetoxyborhydrid, Raumtemperatur, lichtgeschützt, Schutzgas, 48 h; C) THF, H₂O, Lithiumhydroxid, Raumtemperatur, lichtgeschützt, Schutzgas, 12 h; D₁) PyBOP, THF, THP-Hydroxylamin, DIPEA, Raumtemperatur, lichtgeschützt, Schutzgas, 48 h; D₂) 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt), THF, DMF, 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid (EDCI*HCl), DIPEA, THP-Hydroxylamin, Raumtemperatur, lichtgeschützt, Schutzgas, 12 h; E) THF, katalyt. HCl, Raumtemperatur, lichtgeschützt, Schutzgas, über Nacht

Der erste Schritt ist die Entschützung des Amins von *N*-Boc-(2-Ethoxycarbonylvinyl)piperidin. Hierfür wurde eine 1:1 Mischung aus DCM und TFA verwendet. Hierbei wird das *tert*-Butylcarbamat protoniert, was zu einer Spaltung in *tert*-Butylkation und Carbamidsäure führt. Zweitere kann zum freien sekundären Amin decarboxylieren. Im nächsten Schritt wird das Amin derivatisiert, dies kann *via* Alkylierung (S_N2) oder reduktiver Aminierung geschehen. Bei der Alkylierung wird Kaliumcarbonat in DMF verwendet. Das freie Elektronenpaar des Amins kann den α-Kohlenstoff des Alkylbromids nukleophil angreifen. In basischer Lösung wird das Produkt deprotoniert, es entsteht das freie tertiäre Amin. Bei der reduktiven Aminierung in EtOH greift das freie Elektronenpaar des sekundären Amins das Kohlenstoffatom der Aldehydfunktion nukleophil an. Es bildet sich ein tertiärer Übergangszustand mit einem tertiären Amin und einem Alkohol am benachbarten Kohlenstoff, einem Halbaminal. Dieses reagiert, der Erlenmeyer-Regel folgend, unter Wasserabspaltung zum quartären Amin. Es folgt die Reduktion des quartären zum tertiären Amin, mit Natriumtriacetoxyborhydrid als Reduktionsmittel. Natriumtriacetoxyborhydrid ist, im Gegensatz zu vielen anderen Hydrierungsreagenzien, eine milde und selektive Chemikalie. Dies ist nötig, um eine Reduktion der Esterfunktion und der Doppelbindung zu verhindern, da mit einem Überschuss Hydrierungsreagenz gearbeitet wird. Es folgt die Spaltung des Ethylesters mithilfe wässriger Lithiumhydroxidlösung und THF. Es kommt zu einem nukleophilen Angriff des Hydroxidions an den Carbonylkohlenstoff, was zu einem Orthocarbonsäuremonoester-Anion als Übergangszustand führt. Anschließend spaltet sich das Ethanolat vom Kohlenstoffatom und geht eine Säure-Base-Reaktion mit der entstandenen Carbonsäure ein. Durch leichtes Ansäuern protoniert man das Carboxylat zur Carbonsäure. Im nächsten Schritt erfolgt die Synthese der THP-geschützten

Hydroxamsäure. Diese Reaktionen erfolgen entweder analog zur in Kapitel 2.1.1 beschriebenen Synthese mit PyBOP als Aktivierungsreagenz, oder über eine Aktivierung mittels EDCI und HOBt. Durch DIPEA wird in einem 1:1 Gemisch aus THF und DMF ein basisches Milieu geschaffen, welches zur Deprotonierung der Carbonsäure führt. Das Carboxylat kann nun den Kohlenstoff der protonierten Carbodiimidfunktion nukleophil angreifen, es entsteht ein O-Acylisoharnstoffderivat. Anschließend kann ein freies Elektronenpaar der Hydroxyfunktion des HOBt das Carbonylkohlenstoff nukleophil angreifen. Es entstehen ein Harnstoffderivat und die durch HOBt-Bindung aktivierte Carbonsäure. Diese kann durch das freie Elektronenpaar des Stickstoffatoms des THP-Hydroxylamins wiederum nukleophil angegriffen werden, sodass die Bindung zwischen HOBt und Carbonsäure wieder gespalten wird. Es entstehen die geschützte Hydroxamsäure und HOBt (s. Abbildung 30). Der letzte Schritt ist die Entschützung der Hydroxamsäure durch katalytische Mengen HCl in THF, wie in Kapitel 2.1.1 beschrieben.

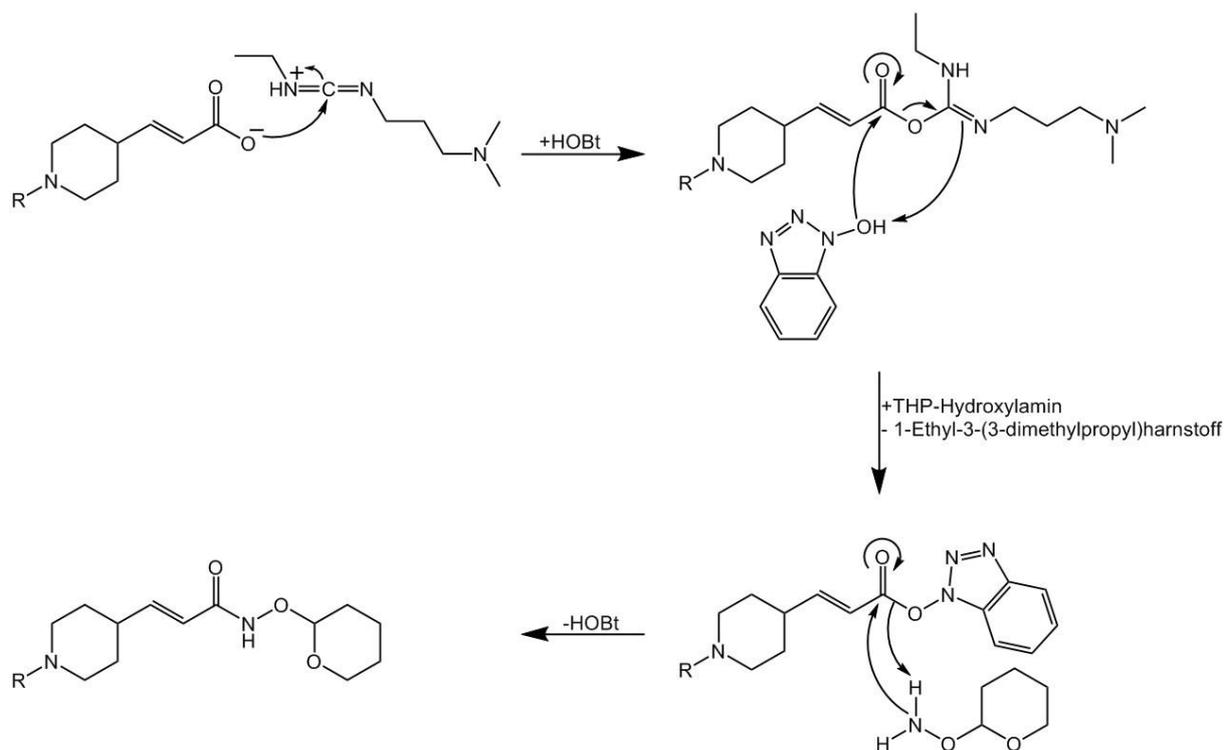


Abbildung 30: Mechanismus der Aktivierung mittels HOBt und EDCI¹⁹⁸

Auf diesem Wege wurden zehn Inhibitoren dieser Klasse hergestellt.

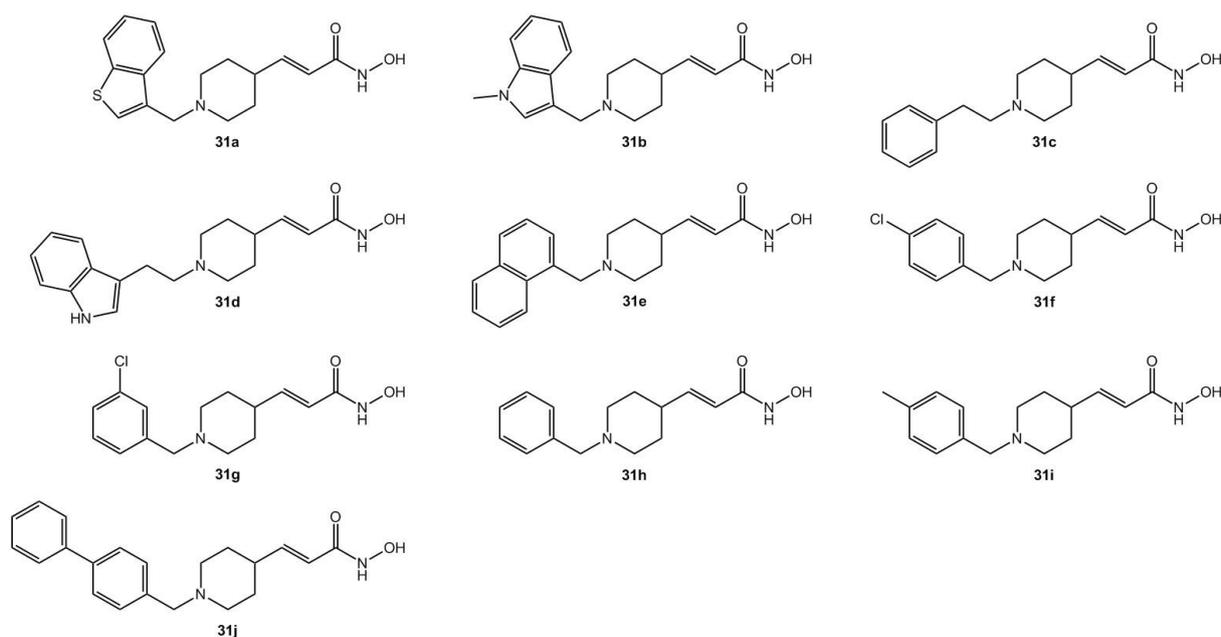


Abbildung 31: zehn synthetisierte Piperidin-4-acrylhydroxamsäure-Derivate

Tabelle 5: Bezeichnung, Name nach IUPAC, Molmassen und Ausbeuten der dargestellten Piperidin-4-acrylhydroxamsäure-Derivate

Verbindung	IUPAC-Name	Molekulargewicht [g/mol]	Ausbeute [%]
31a	(E)-3-{1-[benzo(b)thiophen-3-ylmethyl]piperidin-4-yl}acrylhydroxamsäure	317,1	10,8
31b	(E)-3-{1-[(1-Methylindol-3-yl)methyl]piperidin-4-yl}acrylhydroxamsäure	314,2	21,5
31c	(E)-3-(1-Phenethylpiperidin-4-yl)acrylhydroxamsäure	275,2	30,3
31d	(E)-3-{1-[2-(1H-Indol-3-yl)ethyl]piperidin-4-yl}acrylhydroxamsäure	314,2	22,3
31e	(E)-3-[1-(Naphthalen-1-ylmethyl)piperidin-4-yl]acrylhydroxamsäure	311,2	30,0
31f	(E)-3-[1-(4-Chlorbenzyl)piperidin-4-yl]acrylhydroxamsäure	295,1	5,1
31g	(E)-3-[1-(3-Chlorbenzyl)piperidin-4-yl]acrylhydroxamsäure	295,1	2,8
31h	(E)-3-(1-Benzylpiperidin-4-yl)acrylhydroxamsäure	261,2	2,7
31i	(E)-3-[1-(4-Methylbenzyl)piperidin-4-yl]acrylhydroxamsäure	275,2	0,4
31j	(E)-3-{1-[(1,1'-Biphenyl)-4-ylmethyl]piperidin-4-yl}acrylhydroxamsäure	337,2	1,6

Die verhältnismäßig geringen Ausbeuten einiger der dargestellten Verbindungen lassen sich durch verschiedene Gründe erklären. Einerseits ist es bei der Aufarbeitung, durch den polaren Charakter der Verbindungen und der teilweise sehr kleinen Reaktionsansätze, zu Verlusten gekommen, andererseits hat die reduktive Aminierung bei einigen der

dargestellten Verbindungen nicht den gewünschten Umsatz erzielt. Dies kann unter anderem an der Benutzung von älterem Natriumtriacetoxyborhydrid oder nicht komplett getrocknetem Lösungsmittel liegen. Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass das tertiäre Amin unter sauren und wässrigen Bedingungen nur eingeschränkt stabil ist. Dies führte zu weiteren Verlusten während der Entschützung der Hydroxamsäure.

2.3 Substratsynthese

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der FDL-Trypsin-hHDAC8-Assay durchgeführt. Für diesen wurde das Substrat synthetisch hergestellt. Strukturell wurde sich hierbei am hHDAC8-Substrat BLM-KI178 der Firma Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY, USA) orientiert.¹⁹³ Die Synthese gliederte sich hierbei in drei Schritte. Der erste Schritt war die Synthese eines acetylierten mit AMC markierten Lysins. Der zweite Schritt war die Festphasensynthese des geschützten Tripeptids Arg-His-Lys_{Ac}. Der letzte Schritt war die Kopplung beider Teile und die Entschützung des hergestellten, markierten Tetrapeptids.

2.3.1 Synthese von H₂N-Lys_{Ac}-AMC

Diese Synthese startete mit der Aktivierung der Carbonsäurefunktion von Boc-Lys_{Ac} mithilfe von Isobutylchlorformiat als gemischtes Anhydrid. Dieses reagierte anschließend mit AMC. Es folgt die Entschützung der Boc-geschützten Aminofunktion mittels Salzsäure.

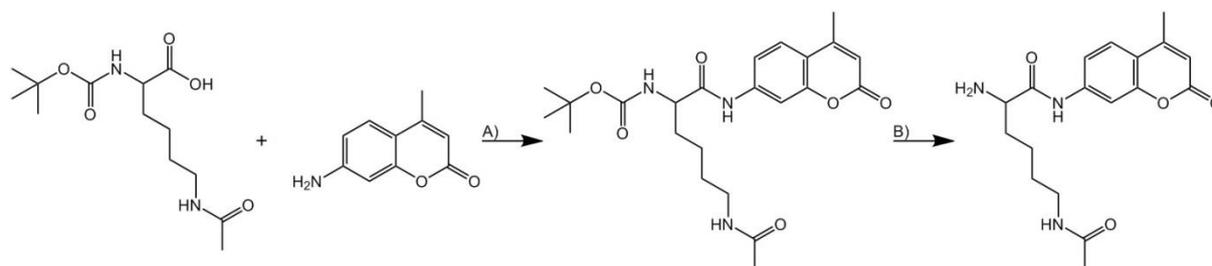


Abbildung 32: Syntheschema der Synthese von H₂N-Lys_{Ac}-AMC: A) THF, Isobutylchlorformiat, N-Methylmorpholin, -20 °C, über Nacht; B) Cyclopentylmethylether, HCl, 20 Minuten, Raumtemperatur

Der erste Schritt ist die Aktivierung der Carbonsäure mittels Isobutylchlorformiat in THF und N-Methylmorpholin. Das freie Elektronenpaar des Carboxylats greift den Carbonylkohlenstoff von Isobutylchlorformiat nukleophil an, es entstehen ein Chloridion und das gemischte Säureanhydrid. Anschließend kann das primäre Amin des AMC den Carbonylkohlenstoff des Lysins nukleophil angreifen, sodass das AMC über einen Amidlinker an das Lysin gekoppelt wird. Nach Beenden dieser Reaktion mit Wasser folgt die Entschützung des Amins. Durch 3 M Salzsäure in Cyclopentylmethylether wird das *tert*-Butylcarbamat protoniert, was zu einer Spaltung in *tert*-Butylkation und Carbamidsäure führt. Zweitere kann zum freien primären Amin decarboxylieren.

2.3.2 Synthese von Boc-N-Arg_{Pbf}-His_{Trt}-Lys_{Ac}-OH

Bei dieser Synthese handelt es sich um eine Festphasensynthese, das heißt, der erste Schritt ist die Immobilisierung von, mit Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) und Acetyl (Ac) geschütztem, Fmoc-Lys_{Ac}-OH an 2-Chlortritylchlorid-Harz. Es folgt die Entschützung der Aminofunktion des immobilisierten Lysins und die Kopplung von, mit Triphenylmethyl (Trt) geschütztem, Fmoc-His_{Trt}-OH an diese. Anschließend wird die Aminofunktion entschützt, damit diese mit, mit 2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl (Pbf) geschütztem, Fmoc-Arg_{Pbf}-OH reagieren kann. Nach Spaltung der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe und der Schützung der Aminofunktion mit einer Boc-Schutzgruppe erfolgt die Spaltung des Tripeptids vom Harz.

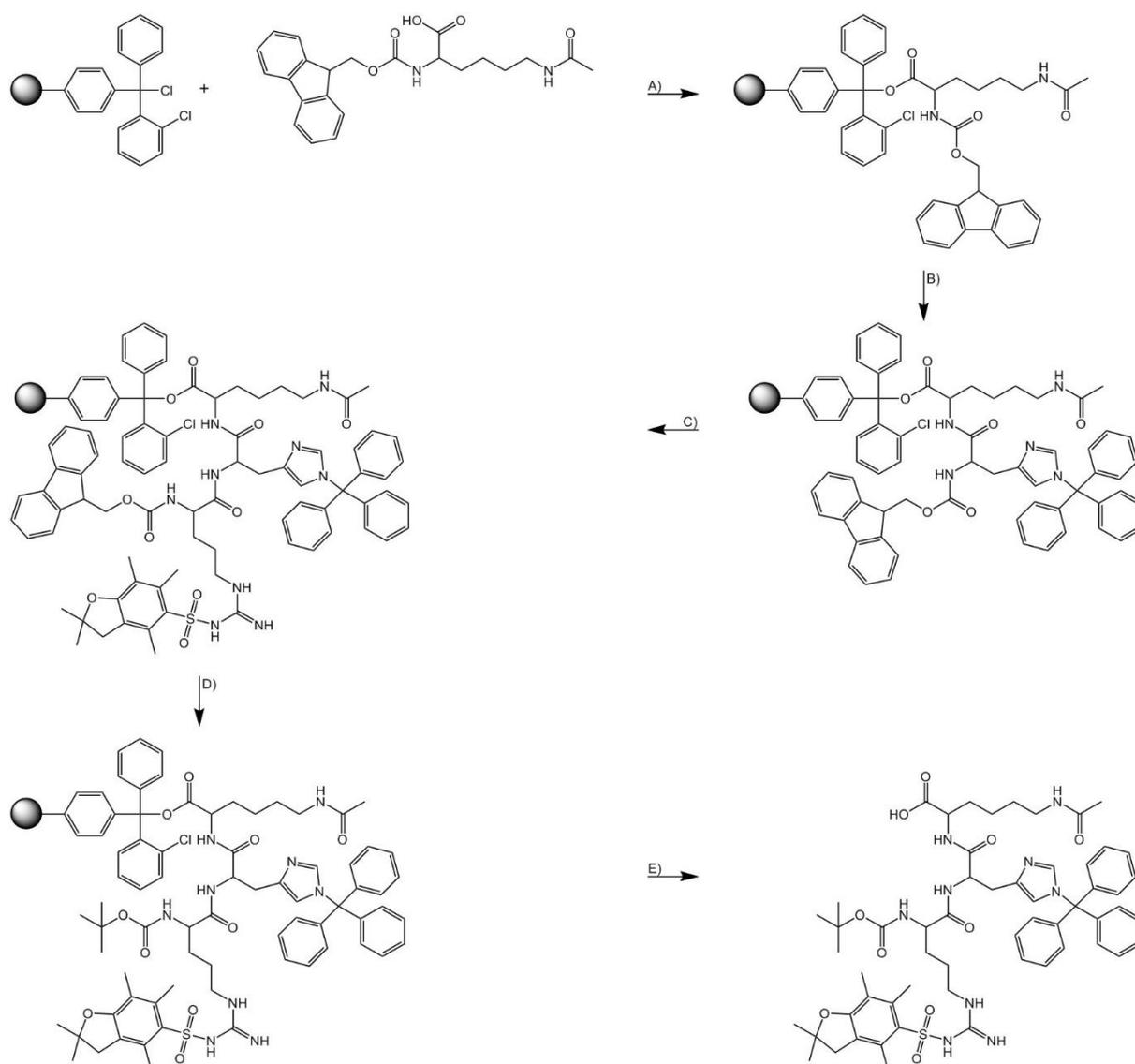


Abbildung 33: Syntheschema zur Synthese von Boc-N-Arg_{Pbf}-His_{Trt}-Lys_{Ac}-OH: A.I) DCM, DIPEA, 2 h, Raumtemperatur; A.II) DMF, Piperidin, 20 Minuten, Raumtemperatur; B.I) DMF, Fmoc-His_{Trt}-OH, DIPEA, 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HBTU), 30 Minuten, Raumtemperatur; B.II) DMF, Piperidin, 20 Minuten, Raumtemperatur; C.I) DMF, Fmoc-Arg_{Pbf}-OH, DIPEA, HBTU, 2 h, Raumtemperatur; C.II) DMF, Piperidin, 20 Minuten, Raumtemperatur; D) DMF, DIPEA, Ditertbutyldicarbonat, 1 h, Raumtemperatur; E) DCM, Hexafluorisopropanol, 20 Minuten, Raumtemperatur

Der erste Schritt dieser Reaktion ist das Immobilisieren von Fmoc-Lys_{Ac}-OH. Hierfür wird das 2-Chlortritylchlorid Harz (100-200 mesh; 1 % Divinylbenzen) mit DIPEA und Fmoc-Lys_{Ac}-OH in DCM versetzt. Es kommt zu einem nukleophilen Angriff der deprotonierten Säurefunktion auf das tertiäre Kohlenstoffatom der 2-Chlortritylchlorid-Funktion, was zu der Ausbildung eines Esters führt. Nach dieser Reaktion werden überschüssige 2-Chlortritylchlorid-Bindestellen blockiert, indem sie mit MeOH zum Ether reagieren. Anschließend wird die Fmoc-Schutzgruppe mithilfe von Piperidin in DMF vom Amin gespalten. Hierbei wird das tertiäre Kohlenstoffatom der Schutzgruppe durch das Piperidin deprotoniert. Dies führt zur Bildung von Dibenzofulven und der Carbamidsäure, welche zum primären Amin und CO₂ decarboxyliert. Das Dibenzofulven kann mit dem Piperidin zum tertiären Amin weiterreagieren. Der nächste Schritt ist die Reaktion des primären Amins mit Fmoc-His_{Tf}-OH. Zunächst wird die Carbonsäure mit Hilfe von HBTU und DIPEA aktiviert. Die Aktivierung mittels HBTU verläuft analog zu der Aktivierung mithilfe von EDCI und HOBt, wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben. An die aktivierte Carbonsäure kann die Aminofunktion des immobilisierten Lysins nukleophil angreifen und eine Peptidbindung ausbilden. Es folgt erneut die Entschützung des primären Amins mittels Piperidin. Anschließend wird die Reaktion des primären Amins mit Fmoc-Arg_{Pbf}-OH, welches ebenfalls durch HBTU aktiviert wird, zum Amid durchgeführt. Es folgt erneut ein Spalten der Fmoc-Schutzgruppe mithilfe von Piperidin. Anschließend wird das primäre Amin mit einer Boc-Schutzgruppe versehen. Hierfür wird das immobilisierte Tripeptid mit DIPEA und Ditertbutyldicarbonat in DMF versetzt. Hierbei greift ein freies Elektronenpaar des Amins eines der Carbonylkohlenstoffe des Säureanhydrids nukleophil an. Es entstehen das geschützte Amin und *tert*-Butylcarbonat, welches zu *tert*-Butanol decarboxyliert. Bei der Reaktion freiwerdende Protonen werden von DIPEA abgefangen. Als letzter Schritt folgt die Spaltung des geschützten Tripeptids vom Harz mithilfe von Hexafluoroisopropanol in DCM. Durch Hexafluoroisopropanol wird der Ester protoniert, dies führt zu einer Bildung der freien Säure und des 2-Chlortrityl-Kations, welches durch Mesomerieeffekte eine verhältnismäßig gute Abgangsgruppe darstellt.

2.3.3 Synthese von H_2N -Arg-His-Lys_{Ac}-Lys_{Ac}-AMC

Bei der Kopplung der beiden zuvor synthetisierten Bausteine erfolgt zunächst die Kopplung des geschützten Tripeptids an das Lys_{Ac}-AMC. Es folgt die Entschützung zum H_2N -Arg-His-Lys_{Ac}-Lys_{Ac}-AMC.

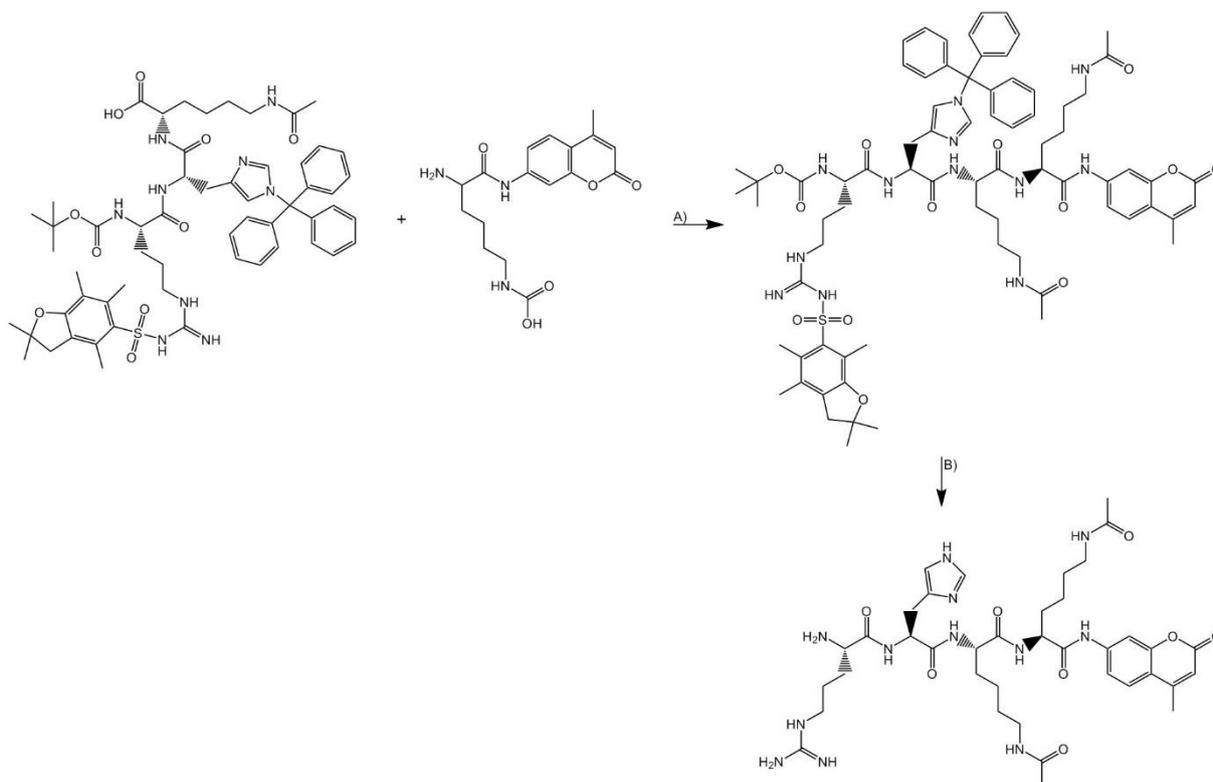


Abbildung 34: Syntheschema zur Synthese von H_2N -Arg-His-Lys_{Ac}-Lys_{Ac}-AMC: A) DMF, DCM, Hydroxy-3,4-dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin (HOObt), EDCI, 1,5 h, 0 °C; B) TFA, Wasser, 2 h, Raumtemperatur

Zu Anfang der Kopplung wird die freie Säurefunktion des Tripeptids mittels HOObt und EDCI in DMF aktiviert. Die Reaktion mittels HOObt und EDCI verläuft analog zur Aktivierung mithilfe von HOBt und EDCI, wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben. Nachdem die Peptidbindung geknüpft wurde, werden die Boc-, Pbf- und Trt-Schutzgruppen abgespalten. Dies erfolgt mittels TFA in Wasser. Die Boc-Entschützung verläuft, wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben. Bei der Pbf-Entschützung wird das doppelt gebundene Stickstoffatom des Arginins protoniert. Hierdurch kann die Stickstoff-Schwefel Bindung des Sulfonamids umgeklappt werden, sodass das Stickstoffatom des Sulfonamids nun am Kohlenstoff doppelt gebunden vorliegt. Das zuvor doppelt gebundene Stickstoffatom ist nun einfach gebunden. Das entstandene, abgespaltene Sulfonyl-Kation kann durch das Trifluoracetat stabilisiert werden. Bei der Trt-Entschützung wird das Stickstoffatom des His protoniert, sodass das mesomeriestabilisierte Tritylkation abgespalten wird.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Inhibitorische Aktivität der dargestellten hHDAC8-Inhibitoren

Die angegebenen Hemmwerte der Inhibitoren gegen hHDAC8 wurden im Verlauf dieser Arbeit unter Zuhilfenahme des unter Kapitel 1.7.1 beschriebenen enzymatischen Assays ermittelt. Zum Erstellen der Struktur-Wirkungs-Beziehungen wurden die IC_{50} -Werte der in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen herangezogen. Ausgehend vom IC_{50} -Wert von TH6, der in dieser Arbeit neu bestimmt wurde, wird die *in-vitro* Aktivität der Substanzen bewertet und verglichen. Im Vergleich zum publizierten IC_{50} -Wert von TH6 von 27 ± 3 nM ist der in dieser Arbeit gemessene Wert von 76 ± 15 nM etwas schlechter.¹⁸⁵ Gründe hierfür könnten in der unterschiedlichen Proteinpräparation und der Verwendung des selbst synthetisierten Substrates liegen. Es wurde entschieden, den neuen Wert zum Vergleich heranzuziehen, da dieser unter identischen Assaybedingungen gemessen wurde wie die IC_{50} -Werte der dargestellten Verbindungen.

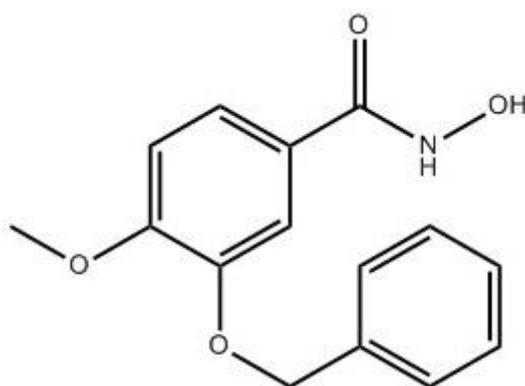
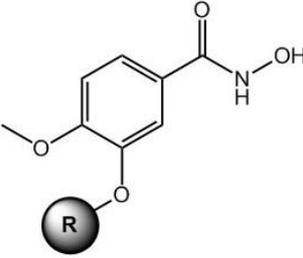


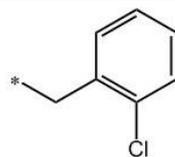
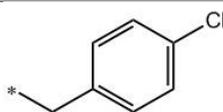
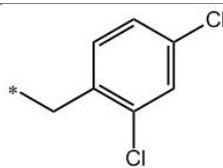
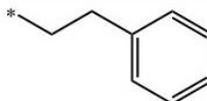
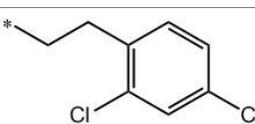
Abbildung 35: hHDAC8-Inhibitor TH6

3.1.1 Inhibitoren der Klasse der Iovanillinsäurederivate

Als erste Substanzklasse wurden die Iovanillinsäurederivate mit derivatisierter *Cap*-Gruppe hinsichtlich ihrer Struktur-Wirkungsbeziehungen untersucht.

Tabelle 6: Struktur und inhibitorische Aktivität gegen hHDAC8 der Iovanillinsäurederivate



Verbindung	R	IC ₅₀ -Wert hHDAC8 [nM]
6a (PZ005)		119,6 ± 20,2
6b (PZ011)		142,9 ± 35,0
6c (PZ009)		841,5 ± 116,5
6d (PZ028)		44,9 ± 2,5
6e (PZ029)		671,5 ± 55,7

Alle fünf Inhibitoren dieser Klasse zeigen *in-vitro* einen submikromolaren IC₅₀-Wert gegen hHDAC8. Eine einfache Chlorderivatisierung der *Cap*-Gruppe stellte sich hierbei als nachteilig im Vergleich mit TH6 heraus, so zeigen **6a** und **6b** eine leicht verminderte Inhibition gegen hHDAC8. Das an Position 2 und 4 dichlorierte Derivat **6c** hingegen zeigte eine stark verminderte inhibitorische Aktivität. Diese Ergebnisse legen einen schlechten Einfluss der Chlorderivatisierungen der Benzyl-*Cap*-Gruppe auf die hHDAC8-Inhibition nahe. Eine Phenethyl *Cap*-Gruppe (**6d**) zeigte mit 44,9 ± 2,5 nM eine verbesserte inhibitorische Aktivität gegen hHDAC8. Bei der in Position 2 und 4 dichlorierten Phenethyl-*Cap*-Gruppe in

6e setzt sich der vorige Trend fort, dass Chlorderivatisierungen einen negativen Einfluss auf die inhibitorische Aktivität gegen hHDAC8 zeigen. Im Vergleich von **6e** und **6c** zeigt sich, dass hier der Ethyllinker zwischen Etherfunktion und Phenylring ebenfalls einen positiven Einfluss auf die inhibitorische Aktivität hat. Aus diesen Ergebnissen lässt sich für die Struktur-Wirkungs-Beziehungen ableiten, dass Chlorderivatisierungen der *Cap*-Gruppe einen negativen und dass der Ethyllinker einen positiven Einfluss auf die Inhibition der hHDAC8 haben.

3.1.2 Inhibitoren der Klasse der 4-Chlorbenzhydroxamsäurederivate

Als zweite Substanzklasse wurden die 4-Chlorbenzhydroxamsäurederivate mit derivatisierter *Cap*-Gruppe und einer Chlorfunktion an Position 4 der Benzhydroxamsäure hinsichtlich ihrer Struktur-Wirkungsbeziehungen untersucht.

Tabelle 7: Struktur und inhibitorische Aktivität gegen hHDAC8 der 4-Chlorbenzhydroxamsäurederivate

Verbindung		IC ₅₀ -Wert hHDAC8 [nM]
12a (PZ013)		2097 ± 445
12b (PZ015)		1016 ± 102
12c (PZ017)		4151 ± 704
12d (PZ027)		149,3 ± 18,1

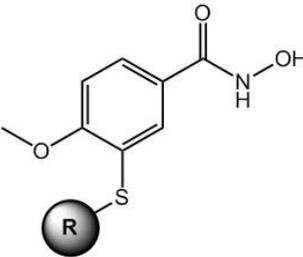
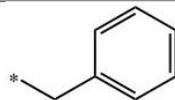
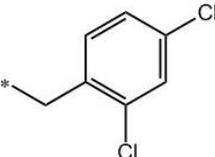
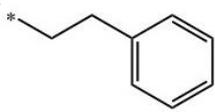
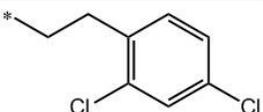
Bei den Verbindungen dieser Klasse setzt sich der Trend aus Kapitel 3.1.1 fort, dass Chlorderivatisierungen der *Cap*-Gruppe einen negativen Einfluss auf die Inhibition der hHDAC8 haben. Alle vier dargestellten Substanzen zeigen eine verminderte Aktivität im

Vergleich zu den 4-Methoxyderivaten. Dies zeigt einen negativen Einfluss der 4-Chlorfunktion auf die inhibitorische Aktivität dieser Verbindungen. So zeigt **12a** eine um Faktor 17 verringerte Aktivität im Vergleich zu **6a**. **12b** zeigt im Vergleich zu **6b** eine um Faktor 7 und **12c** im Vergleich zu **6c** eine um Faktor 5 verringerte inhibitorische Aktivität gegen hHDAC8. Die 4-Chlorbenzhydroxamsäure ohne Chlordersivierungen der *Cap*-Gruppe **12d** zeigt eine um Faktor 2 verschlechterte inhibitorische Aktivität gegen hHDAC8 im Vergleich zu TH6. Aus diesen Ergebnissen lässt sich für die Struktur-Wirkungs-Beziehungen der negative Einfluss von Chlordersivierungen der *Cap*-Gruppe bestätigen. Ebenso zeigen diese Ergebnisse einen negativen Einfluss einer Chlorfunktion an Position 4 der Benzhydroxamsäure.

3.1.3 Inhibitoren der Klasse der Thioetherderivate

Als dritte Substanzklasse wurden die Thioetherderivate mit derivatisierter *Cap*-Gruppe hinsichtlich ihrer Struktur-Wirkungsbeziehungen untersucht.

Tabelle 8: Struktur und inhibitorische Aktivität gegen hHDAC8 der Thioetherderivate

Verbindung		IC ₅₀ -Wert hHDAC8 [nM]
19a (PZ031)		50,3 ± 10,5
19b (PZ022)		460,2 ± 97,6
19c (PZ036)		168,4 ± 25,8
19d (PZ037)		838,2 ± 144,3

Alle vier Inhibitoren dieser Klasse zeigen *in-vitro* einen submikromolaren IC_{50} -Wert gegen hHDAC8. Im Vergleich zu TH6 zeigt Verbindung **19a** mit $50,3 \pm 10,5$ nM eine verbesserte inhibitorische Aktivität gegen hHDAC8. Ebenso zeigt **19b** eine erhöhte Inhibition im Vergleich zu **6c**, jedoch ist im Vergleich zu **19a** der negative Effekt der Chlorderivatisierungen der *Cap*-Gruppe erkennbar. Diese Ergebnisse zeigen einen positiven Einfluss der Thioetherfunktion und bestätigen den negativen Einfluss der chlorderivatisierten *Cap*-Gruppe. Eine Kombination aus beiden Derivatisierungen, die einen positiven Einfluss zeigen, also Ethyllinker und Thioether in Verbindung **19c**, zeigen einen negativen Einfluss auf die inhibitorische Aktivität. Dies kann durch eine bessere Interaktion der Verbindungen **19a** und **6d**, mit der katalytischen Tasche der hHDAC8, durch die Verlängerung des Linkers zwischen den beiden aromatischen Funktionen erklärt werden. Bei Verbindung **19c** wird dieser Linker weiter verlängert, was diese positive Interaktion wieder abschwächt. Beim Vergleich von **19d** mit **19c** bestätigt sich der negative Einfluss von Chlorderivatisierungen der *Cap*-Gruppe. Vergleicht man **19d** mit **6e**, so bestätigt sich der negative Effekt aus einer Kombination von Thioether und Ethyllinker.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Chlorderivatisierungen der *Cap*-Gruppe und an Position 4 der Benzhydroxamsäurefunktion einen negativen Effekt auf die inhibitorische Aktivität gegen hHDAC8 haben. Einen positiven Effekt auf die inhibitorische Aktivität zeigen ein Ethylether- und ein Methylthioetherlinker. Für Ethylthioetherlinker konnte ein negativer Einfluss auf die inhibitorische Aktivität gezeigt werden.

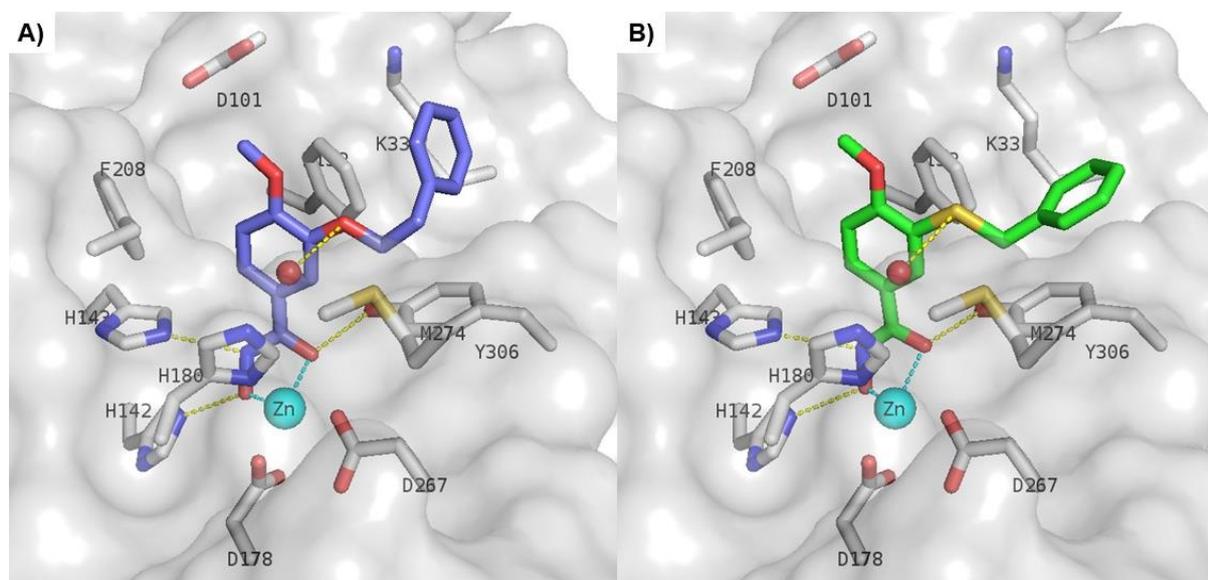


Abbildung 36: Dockinglösungen der hHDAC8-Inhibitoren in der katalytischen Tasche von hHDAC8 (PDB-ID: 2V5X): A) Bindung von **6d**: Lila: Inhibitor Kohlenstoff; Grau: Enzym Kohlenstoff; Rot: Sauerstoff; Blau: Stickstoff; Gelb: Schwefel; Cyanfarbene Sphäre: Zn^{2+} ; Rote Sphäre: Wasser; gestrichelte Linien: Wasserstoffbrückenbindungen. B) Bindung von **19a**: Grün: Inhibitor Kohlenstoff; Grau: Enzym Kohlenstoff; Rot: Sauerstoff; Blau: Stickstoff; Gelb: Schwefel; Cyanfarbene Sphäre: Zn^{2+} ; Rote Sphäre: Wasser; gestrichelte Linien: Wasserstoffbrückenbindungen. Erstellt von Dr. Dina Robaa

Betrachtet man die vorhergesagte Bindung von **6d** und **19a** (s. Abbildung 36), so erkennt man, dass die Bindung der ZBG am Zn^{2+} wie gewünscht stattfindet. Verglichen mit der Bindung der Hydroxamsäurefunktion von TH6 (s. Abbildung 7, Seite 12) mit denen der beiden gezeigten Inhibitoren, so ist neben einer kleinen Variation der Orientierung kein Unterschied der Zn^{2+} -Koordination feststellbar. Die Orientierungen der Methoxyfunktion und des aromatischen Rings der Isovanillinsäure sind ebenfalls nahezu identisch. Auch die Wasserstoffbrückenbindung zwischen Ether/Thioether und dem Wassermolekül im Substratbindetunnel ist in allen drei Verbindungen gut zu erkennen. Betrachtet man die Orientierung der *Cap*-Gruppen, so erkennt man signifikante Unterschiede. Bei **6d** zeigt der Phenylring, bedingt durch den Ethyllinker, in eine andere Richtung und geht somit andere Interaktionen ein als die *Cap*-Gruppe von TH6. Dieser Unterschied ist beim Vergleich zwischen **19a** und TH6 in geringerem Ausmaß ebenfalls zu erkennen. Die größere Ähnlichkeit zwischen der Orientierung von **19a** und TH6 im Vergleich mit der Ähnlichkeit zwischen **6d** und TH6 und der besseren hHDAC8-Aktivität von **6d** zeigen, dass die Änderung der Orientierung der *Cap*-Gruppe einen signifikanten Einfluss auf die Inhibition der hHDAC8 haben.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das Isovanillinhydroxamsäuregrundgerüst aller drei Verbindungen auf ähnliche Weise das Zinkion koordiniert und eine ähnliche Orientierung mit vergleichbaren Koordinationen aufweist. Die jeweiligen *Cap*-Gruppen weisen unterschiedliche Orientierungen auf, sodass die Derivatisierungen der *Cap*-Gruppen für die unterschiedlichen inhibitorischen Aktivitäten verantwortlich gemacht werden können.

3.2 Selektivität der dargestellten hHDAC8-Inhibitoren

Die angegebenen Werte gegen hHDAC1 und hHDAC6 wurden in der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. M. Jung (Albert-Ludwigs-Universität Freiburg) mithilfe der unter Kapitel 1.7.2 beschriebenen Assays ermittelt. Ziel war es, Substanzen darzustellen, die eine bessere Aktivität gegen hHDAC8 und eine bessere Selektivität gegen hHDAC1 und hHDAC6 als TH6 zeigen. Da viele der synthetisierten Inhibitoren keine Verbesserung der hHDAC8-Inhibition im Vergleich mit TH6 erzielten, wurde bei zahlreichen Verbindungen auf eine weitere Untersuchung verzichtet. Für TH6 ergibt sich mit dem neu Ermittelten IC_{50} -Wert gegen hHDAC8 von $76,1 \pm 14,9$ nM ein SI von 159 gegen hHDAC1 (IC_{50} : $12,1 \pm 5,7$ μ M) und von 38 gegen hHDAC6 (IC_{50} : $2,9 \pm 0,3$ μ M).¹⁸⁵

Drei der dargestellten hHDAC8-Inhibitoren wurden hinsichtlich ihrer Selektivität untersucht.

Tabelle 9: Selektivität der inhibitorischen Aktivität der dargestellten hHDAC8-Inhibitoren

Verbindung	hHDAC8 IC ₅₀ [nM]	hHDAC1 Inhibition [%]	hHDAC1 IC ₅₀ [µM]	hHDAC6 Inhibition [%]	hHDAC6 IC ₅₀ [µM]
6b (PZ011)	142,9 ± 35,0	45 % @ 10 µM 9 % @ 1 µM	14,5 ± 3,5	78 % @ 10 µM 32 % @ 1 µM	4,6 ± 0,4
6d (PZ028)	44,9 ± 2,5	40 % @ 10 µM 2 % @ 1 µM	nd	74 % @ 10 µM 37 % @ 1 µM	nd
19a (PZ031)	50,3 ± 10,5	42 % @ 10 µM 13 % @ 1 µM	nd	79 % @ 10 µM 13 % @ 1 µM	nd

Für **6b** ergibt sich ein SI von 101 gegen hHDAC1 und 32 gegen hHDAC6. Im Vergleich zur Leitstruktur sind dies kleine Verschlechterungen der Selektivität. Es wird vermutet, dass andere Derivate mit einer chlorderivatisierten *Cap*-Gruppe zusätzlich zur verminderten Aktivität gegen hHDAC8 ebenfalls verschlechterte Selektivitäten zeigen. Für **6d** und **19a** liegen keine IC₅₀-Werte gegen hHDAC1 und hHDAC6 vor, jedoch weisen die prozentualen Inhibitionen beider Verbindungen auf eine ähnliche inhibitorische Aktivität gegen beide Enzyme wie **6b** hin. Daraus ergibt sich ein SI von etwa 320 gegen hHDAC1 und von circa 100 gegen hHDAC6 für **6d**. Für **19a** ergibt sich so ein SI von ungefähr 290 gegen hHDAC1 und etwa 90 gegen hHDAC6. Für **6d** und **19a** ergeben sich neben den Verbesserungen der hHDAC8-Inhibition somit auch Verbesserungen der Selektivität gegen hHDAC1 und hHDAC6 im Vergleich mit TH6.

3.3 Untersuchungen der Zytotoxizität der dargestellten hHDAC8 Inhibitoren

Die Untersuchungen zur Zytotoxizität der synthetisierten Verbindungen wurden von PD Dr. F. Erdmann (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) durchgeführt. Verwendet wurden hierbei immortalisierte menschliche embryonale Nierenzellen (HEK293). Als Testsystem wurde der Viabilitätstest *Alamar Blue* der Firma ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA) verwendet, welcher die metabolische Aktivität und das Redoxpotential der Zellen misst.²⁰² Die Zellen wurden bei einer Inhibitorkonzentration von 50 µM für 45 h inkubiert und anschließend mittels Fluoreszenzmessung gegen einen Standard ausgewertet. Hierbei wird Resazurin, ein wasserlöslicher, ungiftiger, blauer Redox-Farbstoff, verwendet. Dieser reagiert durch Reduktion zum fluoreszierenden, rosafarbenen Resorufin.²⁰³

Tabelle 10: Zytotoxizität gegen HEK293-Zellen der dargestellten hHDAC8-Inhibitoren

Verbindung	Überlebensrate [%]
6a (PZ005)	77,6 ± 14,4
6b (PZ011)	62,8 ± 8,4
6c (PZ009)	70,1 ± 6,7
6d (PZ028)	96,0 ± 10,6
6e (PZ029)	74,3 ± 9,9
12a (PZ013)	74,7 ± 1,4
12b (PZ015)	63,6 ± 14,9
12c (PZ017)	65,4 ± 2,9
12d (PZ027)	76,1 ± 12,5
19a (PZ031)	72,9 ± 2,7
19b (PZ022)	73,8 ± 6,5
19c (PZ036)	79,1 ± 9,0
19d (PZ037)	87,2 ± 9,5

Alle dargestellten hHDAC8-Inhibitoren zeigen eine schwache bis keine zytotoxische Wirkung bei 50 μ M.

3.4 Testung von 6d und 19a an Neuroblastomzellen

Aufgrund der guten Ergebnisse der Verbindungen **6d (PZ028)** und **19a (PZ031)** wurde entschieden, diese an den menschlichen Neuroblastomzellen BE(2)-C zu Testen. Diese Zellen sind Klone von Neuroblastomzellen, aus dem Gehirn eines zweijährigen Jungen, welche durch Metastasen aus dem Knochenmark abgeleitet sind.²⁰⁴ Die Zellen wurden 96 h mit Verschiedenen Konzentrationen der Inhibitoren inkubiert und anschließend die Zellkolonien ausgezählt. Aus den erhaltenen Daten wurden Dosis-Wirkungs-Kurven (s. Abbildung 37) erstellt, aus denen anschließend die IC₅₀-Werte gegen Neuroblastomzellen bestimmt werden konnten. Diese Experimente wurden von der Arbeitsgruppe um Dr. I. Oehme (Universität Heidelberg) durchgeführt.

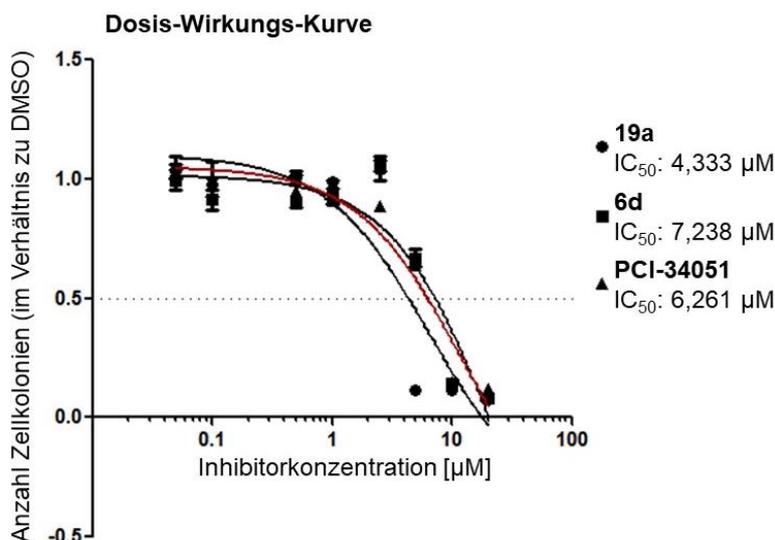


Abbildung 37: Dosis-Wirkungs-Kurve von 6d (PZ028) und 19a (PZ031) gegen BE(2)-C-Zellen. Diese Daten wurden von Frau Dr. Ina Oehme, Hopp Kintertumorzentrum Heidelberg, gewonnen.

In Abbildung 37 erkennt man, dass sowohl **6d (PZ028)** als auch **19a (PZ031)** eine gute Wirkung gegen Neuroblastomzellen aufweisen. Als positiv Kontrolle ist der Inhibitor PCI-34051 (IC₅₀: 6,3 µM) (s. Kapitel 1.6.1) vermessen worden. Mit einem IC₅₀-Wert von 4,3 µM ist **19a (PZ031)** die aktivere Verbindung, auch wenn der *in-vitro* IC₅₀-Wert gegen hHDAC8 etwas schlechter war. Dies kann an einer etwas besseren Bioverfügbarkeit der Verbindung **19a (PZ031)** liegen. Inhibitor **6d (PZ028)** zeigt mit einem IC₅₀-Wert von 7,2 µM gegen Neuroblastomzellen eine Wirkung, die etwas schlechter ist als die der Positivkontrolle.

Um zu zeigen, dass die gute Wirksamkeit der Verbindungen **6d (PZ028)** und **19a (PZ031)** auf die Inhibition der hHDAC8 zurückzuführen ist wurden, ebenfalls durch die Arbeitsgruppe um Dr. I. Oehme (Universität Heidelberg), Western-Blot Experimente durchgeführt, die die Konzentrationen verschiedener hHDAC-Substrate aus behandelten und unbehandelten BE(2)-C-Zellen verglichen. Hierfür wurden die Neuroblastomzellen 6 h mit 4 µM **19a (PZ031)** beziehungsweise mit 7 µM **6d (PZ028)** inkubiert. Untersucht wurden unter anderem die Konzentrationen von SMC3_{Ac} (hHDAC8-Substrat), H4_{Ac} (hHDAC1-Substrat) und Tubulin_{Ac} (hHDAC6-Substrat). Hierbei stellte sich heraus, dass, bei Inkubation der Zellen mit **6d (PZ028)** und **19a (PZ031)**, die SMC3_{Ac} Konzentration, im Vergleich mit unbehandelten Zellen (inkubiert mit DMSO), signifikant anstieg. Diese Hyperacetylierung von SMC3 beweist, dass die gewünschte hHDAC8-inhibition stattfindet. Für die hHDAC1 und hHDAC6 zeigte sich keine bis eine geringe Erhöhung der Konzentration der acetylierten Substrate. Dies zusammen mit den Ergebnissen gegen die HEK293-Zellen deutet darauf hin, dass die gute Wirkung gegen die Neuroblastomzellen auf die Inhibition der hHDAC8 und nicht auf *off-target*-Effekte zurückzuführen ist.

Die Daten der Western-Blot-Experimente befinden sich im Anhang (Anhang.pdf ab Seite A52)

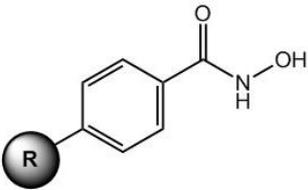
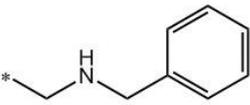
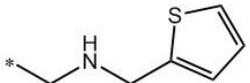
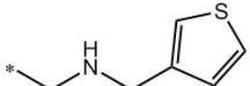
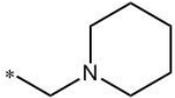
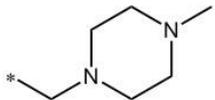
3.5 Inhibitorische Aktivität der dargestellten HDAC10-Inhibitoren

Die angegebenen Werte gegen zHDAC10 wurden in der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. M. Jung (Albert-Ludwigs-Universität Freiburg) mithilfe des unter Kapitel 1.7.3 beschriebenen Assays ermittelt. Zum Erstellen der Struktur-Wirkungs-Beziehungen wurden die IC₅₀-Werte der in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen herangezogen und untereinander verglichen, da die dargestellten Strukturen nicht von einer gemeinsamen Leitstruktur abgeleitet wurden. Es erfolgte in diesem Kapitel keine Bewertung hinsichtlich der Stabilität oder der Eignung als Arzneistoff der dargestellten Verbindungen.

3.5.1 Inhibitoren der Klasse der Benzhydroxamsäuren

Als erste Substanzklasse wurden die Benzhydroxamsäuren mit derivatisierter *Cap*-Gruppe hinsichtlich ihrer Struktur-Wirkungsbeziehungen untersucht. Diese Verbindungen leiten sich von Dockingergebnissen am hHDAC10-Homologiemodell ab.

Tabelle 11: Struktur und inhibitorische Aktivität gegen zHDAC10 der Benzhydroxamsäurederivate; nd = nicht detektiert

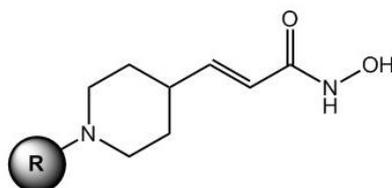
Verbindung		IC ₅₀ -Wert zHDAC10 [nM]
		
25a (PZ033)		37 ± 10
25b (PZ039)		106 ± 28
25c (PZ040)		24 ± 5
25d (PZ034)		nd
25e (PZ035)		43 ± 7

Für **25d** wurde aufgrund neuer Dockingergebnisse an der Kristallstruktur von zHDAC10, der schlechten Ausbeute und Reinheit und der niedrigen Aktivität gegen andere HDACs entschieden, keine weiteren Tests an ihr durchzuführen. **25c** zeigt mit 24 ± 5 nM die stärkste zHDAC10-Inhibition dieser Klasse. Dies zeigt, dass die ZBG und das basische Amin die gewünschten Interaktionen in der katalytischen Tasche der zHDAC10 eingehen. Die im Vergleich um Faktor vier schlechtere Inhibition von **25b** zeigt, dass die Orientierung des Thiophen-Schwefelatoms eine Rolle spielt. Hier kann eine Interaktion, wahrscheinlich eine Wasserstoffbrückenbindung zu Asparagin 93 oder Aspartat 94, Aminosäuren des Substratbindetunnels, ausgebildet werden, die die Bindung und somit die Inhibition zusätzlich verstärkt. Die gute inhibitorische Aktivität von **25e** zeigt, dass es bei der Interaktion mit der *Gatekeeper*-Aminosäure keinen signifikanten Unterschied macht, ob das basische Amin sekundärer oder tertiärer Natur ist. **25a** zeigt ebenfalls eine gute inhibitorische Aktivität gegen zHDAC10, dies kann ebenfalls durch die Interaktion der ZBG mit dem Zn^{2+} und des sekundären, basischen Amins mit der *Gatekeeper*-Aminosäure Glutamat 274 erklärt werden. Zusätzlich kann eine potenzielle π - π -Wechselwirkung zwischen der *Cap*-Gruppe und Tryptophan 205 die Bindung weiter begünstigen.

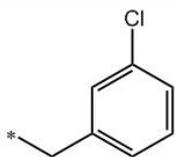
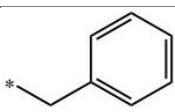
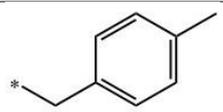
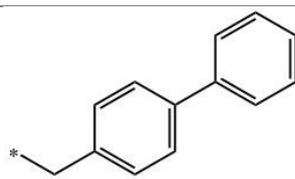
3.5.2 Inhibitoren der Klasse der Piperidin-4-acrylhydroxamsäuren

Als zweite Substanzklasse der HDAC10-Inhibitoren wurden die Piperidin-4-acrylhydroxamsäuren mit derivatisierter *Cap*-Gruppe hinsichtlich ihrer Struktur-Wirkungsbeziehungen untersucht. Diese Verbindungen leiten sich von Dockingergebnissen an der Kristallstruktur von zHDAC10 ab.

Tabelle 12: Struktur und inhibitorische Aktivität gegen zHDAC10 der Piperidin-4-acrylhydroxamsäuren; nd = nicht detektiert



Verbindung	R	IC ₅₀ -Wert zHDAC10 [nM]
31a (PZ044)		62 ± 18
31b (PZ045)		58 ± 10
31c (PZ046)		11 ± 1
31d (PZ047)		29 ± 6
31e (PZ048)		20 ± 2
31f (PZ049)		33 ± 3

31g (PZ050)		60 ± 5
31h (PZ051)		534 ± 104
31i (PZ053)		23 % @ 10 μM
31j (PZ054)		nd

Der beste HDAC10-Inhibitor der dargestellten Verbindungen ist **31c** mit einem IC_{50} -Wert von 11 ± 1 nM. Vergleicht man **31c** mit **31h**, welche sich lediglich durch ein Kohlenstoffatom im Linker unterscheiden, fällt auf, dass bei kürzerem Linker zwischen *Cap*-Gruppe und Piperidinfunktion die inhibitorische Aktivität um Faktor 50 nachgelassen hat. Dies kann daran liegen, dass bei **31h** der Phenylring nicht weit genug von der Interaktionsstelle zwischen tertiärem Amin des Piperidins und Glutamat 274 entfernt ist, sodass eine π - π -Wechselwirkung zu Tryptophan 205 ausbleibt. Gleiches gilt für **31i**, jedoch scheint die Methylderivatisierung einen zusätzlichen Nachteil zu haben, der die inhibitorische Aktivität herabsetzt. Die Verbindungen **31f** und **31g**, die, im Vergleich mit **31h**, eine Chlorderivatisierung der *Cap*-Gruppe tragen, zeigen wieder eine deutlich gesteigerte Aktivität. Hierbei stellte sich heraus, dass die Chlorfunktion an Position 4 (**31f**) etwa doppelt so potent ist wie die Chlorderivatisierung an Position 3 (**31g**). Bei den Verbindungen **31d** und **31e** wurde ebenfalls eine potente zHDAC10-Inhibition festgestellt. **31e** verfügen zwar, wie **31h**, über einen Methyllinker zwischen tertiärem Amin und *Cap*-Gruppe, jedoch ist das aromatische System (Naphthyl) signifikant größer, sodass die π - π -Wechselwirkung stattfinden kann. **31d** besitzt einen Ethyllinker und eine Indol-*Cap*-Gruppe. Dies zeigt, dass eine Kombination aus Ethyllinker und größerer *Cap*-Gruppe ebenfalls potente Inhibitoren hervorbringt. **31b** und **31a** zeigen im Vergleich zu **31d** eine leicht verschlechterte inhibitorische Aktivität gegen zHDAC10. Dies zeigt, dass der Ethyllinker in Kombination mit einer Indol-*Cap*-Gruppe bessere Interaktionen im katalytischen Zentrum zeigt als ein Methyllinker in Kombination mit einer *N*-Methylandol- (**31b**) oder Benzothiophen-*Cap*-Gruppe (**31a**).

Bei Versuchen mit Verbindung **32** (s. Abbildung 38) stellte sich heraus, dass ein Verlust der ZBG mit einem Verlust der inhibitorischen Aktivität gegen zHDAC10 einher geht. So konnte bei Inkubation mit **32** keinerlei Inhibition der zHDAC10 nachgewiesen werden. Ebenso war keine inhibitorische Aktivität gegen andere HDACs nachweisbar. Dies zeigt, dass das tertiäre, basische Amin wichtig für die Aktivität und Selektivität der Verbindungen ist, jedoch ohne geeignete ZBG keine potenten Inhibitoren hervorbringt.

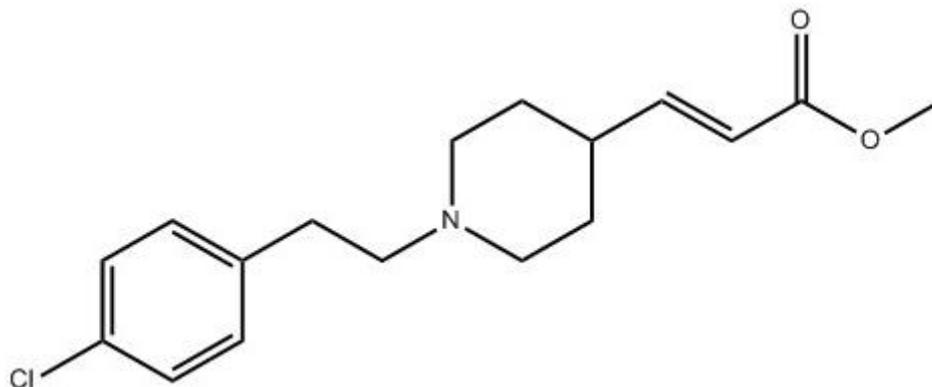


Abbildung 38: Verbindung 32; Methylester ohne zHDAC10-Aktivität

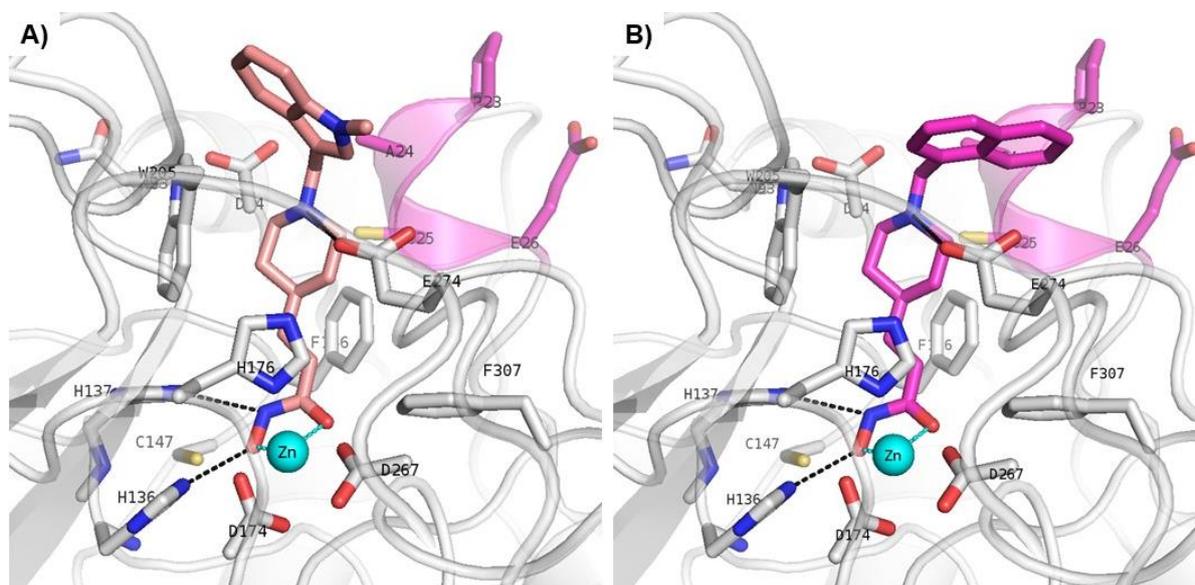


Abbildung 39: Position der HDAC10-Inhibitoren in der katalytischen Tasche von zHDAC10 (PDB-ID: 5TD7): A) Bindung von **31b**: Rosa: Inhibitor Kohlenstoff; Grau: Enzymkohlenstoff; Rot: Sauerstoff; Blau: Stickstoff; Gelb: Schwefel; Cyanfarbene Sphäre: Zn^{2+} ; gestrichelte Linien: Wasserstoffbrückenbindungen; Pink: P(E,A) CE-Motiv. B) Bindung von **31e**: Pink: Inhibitor Kohlenstoff; Grau: Enzymkohlenstoff; Rot: Sauerstoff; Blau: Stickstoff; Gelb: Schwefel; Cyanfarbene Sphäre: Zn^{2+} ; gestrichelte Linien: Wasserstoffbrückenbindungen; Pink: P(E,A) CE-Motiv. Erstellt von Talha Yesiloglu

In Abbildung 39 kann man gut erkennen, dass die Zn^{2+} -Koordination des Piperidin-4-acrylhydroxamsäuregrundgerüsts bei **31b** wie auch **31e** auf gleiche Weise stattfindet. Die Orientierung des Grundgerüsts beider Inhibitoren ist nahezu identisch. Die Wasserstoffbrückenbindungen des Hydroxamsäure-*warheads* zu Histidin 136 & 137 sowie zum Zinkion

sind gut zu erkennen. Ebenso kann man gut erkennen, dass die *Gatekeeper*-Aminosäure Glutamat 274 eine Wasserstoffbrückenbindung zum basischen, tertiären Amin der Piperidinfunktion ausbildet. Somit können aus den abgebildeten Dockinglösungen (s. Abbildung 39) für **31b** und **31e** die gewünschten Koordinationen der ZBG und des tertiärenamins bestätigt werden. Bei **31b** erkennt man zudem, dass sich die *Cap*-Gruppe in räumlicher Nähe zum Tryptophan 205 befindet und diesem zugewandt ist. Dies lässt eine π - π -Wechselwirkung der *Cap*-Gruppe mit der aromatischen Aminosäure vermuten. Bei **31e** ist diese Orientierung der *Cap*-Gruppe nicht zu erkennen. Hier ist die Naphthylfunktion vom Tryptophan 205 abgewandt. Da beide Verbindungen potente zHDAC10-Inhibitoren sind, kann vermutet werden, dass bei **31e** eine andere bindungsfördernde Interaktion der *Cap*-Gruppe stattfindet.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das Piperidin-4-acrylhydroxamsäuregrundgerüst wie gewünscht mit dem Zn^{2+} und der *Gatekeeper*-Aminosäure interagiert. Die unterschiedlichen Orientierungen der *Cap*-Gruppen zeigen, dass verschiedene Interaktionen im äußeren Teil des Substratbindetunnels stattfinden können, welche die inhibitorische Aktivität gegenüber zHDAC10 beeinflussen.

3.6 Selektivität der dargestellten HDAC10-Inhibitoren

Die angegebenen Werte gegen hHDAC1 und hHDAC6 wurden in der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. M. Jung (Albert-Ludwigs-Universität Freiburg) mithilfe der unter Kapitel 1.7.2 beschriebenen Assays ermittelt. Die angegebenen Werte gegen hHDAC8 wurden im Rahmen dieser Arbeit unter Zuhilfenahme des unter Kapitel 1.7.1 beschriebenen Assays ermittelt. Ziel war es Substanzen darzustellen, mit einer potenten HDAC10-Inhibition und einer guten Selektivität gegenüber hHDAC1, hHDAC6 und hHDAC8.

Tabelle 13: Selektivität der inhibitorischen Aktivität der dargestellten HDAC10-Inhibitoren; nd = nicht detektiert; nl = keine Inhibition; * Daten gemessen von Matthes Zessin (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)

Verbindung	zHDAC10 IC ₅₀ [nM]	hHDAC1 IC ₅₀ [µM]	hHDAC6 IC ₅₀ [nM]	hHDAC8 IC ₅₀ [nM]
25a (PZ033)	37 ± 10	49 % @ 10 µM 19 % @ 1 µM	210 ± 26	3476 ± 521
25b (PZ039)	106 ± 28	68 % @ 10 µM 15 % @ 1 µM	158 ± 21	3244 ± 406
25c (PZ040)	24 ± 5	50 % @ 10 µM 16 % @ 1 µM	177 ± 28	1901 ± 342
25d (PZ034)	nd	nd	nd	nl
25e (PZ035)	43 ± 7	54 % @ 10 µM 6 % @ 1 µM	280 ± 25	2412 ± 208
31a (PZ044)	62 ± 18	66 % @ 10 µM 29 % @ 1 µM	1417 ± 138	1266 ± 167
31b (PZ045)	58 ± 10	67 % @ 10 µM 12 % @ 1 µM	2428 ± 528	917 ± 172
31c (PZ046)	11 ± 1	16 ± 9	4350 ± 400	452 ± 50
31d (PZ047)	29 ± 6	54 % @ 10 µM 7 % @ 1 µM	4794 ± 1081	420 ± 55
31e (PZ048)	20 ± 2	3 ± 0,2	3690 ± 450	465 ± 73
31f (PZ049)	33 ± 3	9 ± 1	430 ± 50	947 ± 256
31g (PZ050)	60 ± 5	67 % @ 10 µM 24 % @ 1 µM	83 % @ 10 µM 40 % @ 1 µM	2497 ± 258
31h (PZ051)	534 ± 104	62 % @ 10 µM 12 % @ 1 µM	89 % @ 10 µM 34 % @ 1 µM	nl
31i (PZ053)	23 % @ 10 µM 2 % @ 1 µM	nl	nl	nl
31j (PZ054)	nd	56 % @ 10 µM* 22 % @ 1 µM*	72 % @ 10 µM* 29 % @ 1 µM*	91 % @ 10 µM* 54 % @ 1 µM*

Die Benzhydroxamsäuren zeigen eine gute hHDAC1- und moderate hHDAC8-Selektivität. Die beste hHDAC1-Selektivität dieser Klasse zeigte **25c** mit einem SI von 417, die schlechteste **25b** mit einem SI von 85. Für die hHDAC8 liegen die SI zwischen 30 für **25b** und 94 für **25a**. Die Benzhydroxamsäurederivate zeigen kaum Selektivität gegen hHDAC6, hier schwanken die Werte zwischen einem SI von 1,5 für **25b** und 7 für **25a**, **25c** und **25e**. Da von den genannten HDACs die HDAC6 die ähnlichste zur HDAC10 ist, ist das Erreichen einer guten Selektivität gegen hHDAC6 eine der Hauptaufgaben für die Synthese potenzieller Arzneistoffe. Dies ist mit Vertretern der Piperidin-4-acrylhydroxamsäurederivate gelungen. Beispielsweise zeigt **31c** mit einem SI von 395 gegen hHDAC6 und von 1454 gegen hHDAC1 eine starke Selektivität. **31c** zeigt neben der besten zHDAC10-Inhibition also auch die stärkste Selektivität gegen hHDAC1 und hHDAC6. Ebenfalls ist die hHDAC8-Selektivität mit einem SI von 41 für **31c** eine der besten dieser Substanzklasse. Die moderaten Selektivitäten der meisten Vertreter dieser Substanzklasse gegen hHDAC8, mit SI von 14 für **31d** bis 42 für **31g**, stellen aber mitunter kein Problem dar. Sollten die Inhibitoren als Therapeutika gegen Neuroblastome in Betracht gezogen werden, so kann eine hHDAC8-Inhibition zusätzlich zur HDAC10-Inhibition einen positiven Effekt zeigen, da, wie in Kapitel 1.3.2 beschrieben, die hHDAC8 ebenfalls eine Schlüsselrolle in Neuroblastomzellen spielt. Die Selektivität der anderen Verbindungen der Piperidin-4-acrylhydroxamsäuren gegen hHDAC1 schwankt zwischen etwa 145 für **31a** und etwa 344 für **31d**. Der einzige Ausreißer ist hier **31h** mit einem SI von etwa 17 gegen hHDAC1. Dies kann durch die signifikante Abnahme der zHDAC10-Inhibition von **31h** erklärt werden. Alle Substanzen zeigen eine hHDAC1-Inhibition im unteren mikromolaren Bereich, so auch **31h**, so kommt durch die signifikant schlechtere zHDAC10-Inhibition der schlechtere SI gegenüber hHDAC1 zustande. Für die SI der Verbindungen neben **31c** gegen hHDAC6 ergeben sich Werte zwischen etwa 7 für **31h** und 184 für **31e**. Diese Werte können wie für die SI gegen hHDAC1 erklärt werden, da die hHDAC1-Inhibition für alle Piperidin-4-acrylhydroxamsäuren im unteren mikromolaren Bereich liegen und die zHDAC10-Inhibitionen schwanken. Eine Ausnahme hierbei ist **31f**, die, mit einem IC₅₀-Wert von 430 ± 50 nM gegen hHDAC6, die hHDAC6 signifikant stärker inhibiert als die anderen Verbindungen, dieser Klasse.

Insgesamt ist **31c** mit einer potenten zHDAC10-Inhibition und guten Selektivitäten gegen hHDAC1, hHDAC6 und hHDAC8 der vielversprechendste Kandidat. Ebenfalls sehr vielversprechende Verbindungen sind **31b**, **31d** und **31e**.

3.7 Untersuchungen der Zytotoxizität der dargestellten HDAC10 Inhibitoren

Die Untersuchungen zur Zytotoxizität der synthetisierten Verbindungen wurden von PD Dr. F. Erdmann (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) so, wie in Kapitel 3.3 dargestellt, durchgeführt.

Tabelle 14: Zytotoxizität gegen HEK293-Zellen der dargestellten HDAC10-Inhibitoren

Verbindung	Überlebensrate [%]
25a (PZ033)	77,1 ± 5,0
25b (PZ039)	71,6 ± 6,1
25c (PZ040)	81,5 ± 2,8
25d (PZ034)	92,6 ± 13,4
25e (PZ035)	86,4 ± 2,3
31a (PZ044)	88,2 ± 1,0
31b (PZ045)	68,2 ± 4,8
31c (PZ046)	54,4 ± 1,4
31d (PZ047)	77,3 ± 4,4
31e (PZ048)	51,6 ± 3,9
31f (PZ049)	84,6 ± 1,5
31g (PZ050)	88,6 ± 2,2
31h (PZ051)	100,9 ± 6,9
31i (PZ053)	104,9 ± 0,8
31j (PZ054)	55,0 ± 4,4

Alle dargestellten HDAC10-Inhibitoren zeigen eine schwache bis keine zytotoxische Wirkung bei 50 µM.

3.8 Testung von 31b und 31e an Leukämiezellen

Aufgrund der guten Ergebnisse bezüglich der zHDAC10-Aktivität, der Selektivität und der Verfügbarkeit der dargestellten Verbindungen wurden **31b (PZ045)** und **31e (PZ048)** für weitere Tests an akute myeloische Leukämie (AML)-Zelllinien herangezogen. AML ist eine maligne Erkrankung des blutbildenden Systems, und zwar der Myelopoese. Diese stellen den Teils des blutbildenden Systems dar, der für die Bildung von Granulozyten, Monozyten, Erythrozyten und Megakaryozyten verantwortlich ist.²⁰⁵ Die Testung an Leukämiezellen wurden von der Arbeitsgruppe um Prof. O. Krämer (Johannes Gutenberg-Universität Mainz) durchgeführt. Ein Test an MV4-11-Zellen (Zellen der AML) zeigte eine Akkumulation cyto-ID positiver Autophagosomen, was die gewünschte HDAC10-Inhibition belegt (s. Abbildung 40 A).¹²⁶ Ebenso konnte gezeigt werden, dass in MV4-11-Zellen, bei 2 bis 15 μM **31b (PZ045)** und **31e (PZ048)**, kein signifikanter Anstieg der Konzentration acetylierter Histone stattfindet. Damit wird gezeigt dass keine Inhibition der Klasse 1 HDACs zellulär stattfindet (s. Abbildung 40 B).²⁰⁶ Ein leichter Anstieg der Tubulin_{AC}-Konzentration zeigt, dass eine schwache HDAC6-Inhibition stattfindet.^{206,207,208} Diese bewegt sich jedoch in einem stark verminderten Umfang im Vergleich zu Marbostat-100 (MARB-1), einem HDAC6-Inhibitor (s. Abbildung 40 B).^{207,208} MARB-1 und Entinostat (MS-275), ein Klasse 1 HDAC-Inhibitor, zeigten keinerlei Akkumulation cyto-ID positiver Autophagosomen, dies belegt, dass die HDAC10-Inhibition die Autophagosom-Biogenese beeinflusst.¹²⁶ Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von MV4-11-Zellen mit **31b (PZ045)** und **31e (PZ048)** einen Konzentrationsanstieg der HSP-70 (Hitzeschockprotein 70) und dem Autophagieregulator p62 zur Folge hat. Beides sind wichtige Regulatoren der Proteinhomöostase und der Makroautophagie (s. Abbildung 40 B).^{205,209} Die Akkumulation von HSP-70 und p62 zeigt eine durch HDAC10-Inhibition induzierte Änderung der Makroautophagie an, was ebenfalls ein Merkmal der HDAC10-Inhibition in Neuroblastomzellen ist.^{125,210} HDAC10 selbst akkumulierte ebenfalls dosisabhängig bei Behandlung der MV4-11-Zellen mit **31b (PZ045)** und **31e (PZ048)** (s. Abbildung 40 B).

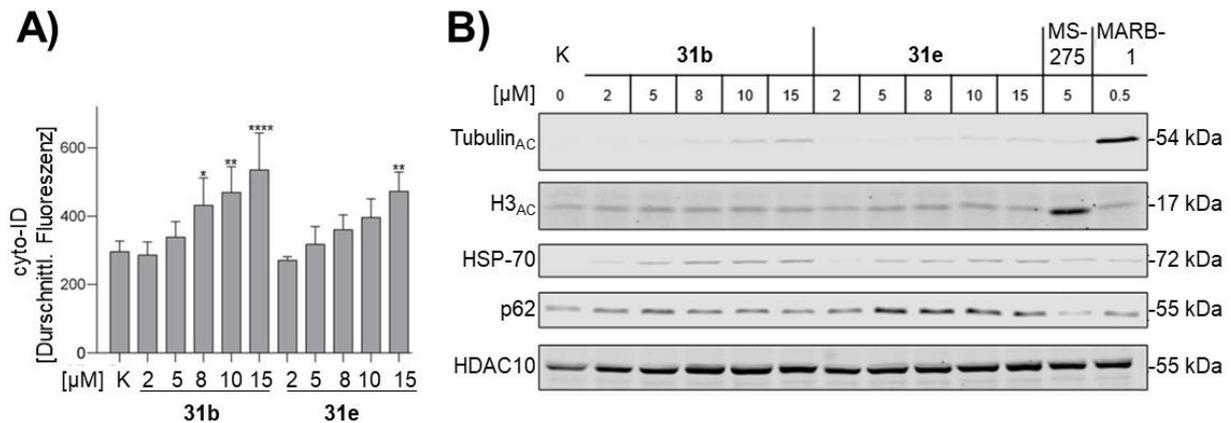


Abbildung 40: Inhibition von 31b (PZ045) und 31e (PZ048) in MV4-11-Zellen: A) Steigende Konzentration (2-15 μM) von 31b und 31e, 24 h, K wurde mit Lösungsmittel inkubiert, 10 μM Chloroquinzusatz zum Vermeiden lysosomaler Ansäuerung, n = 3, K = Kontrolle; B) Steigende Konzentration (2-15 μM) von 31b und 31e, MS-275 und MARB-1 als Positivkontrolle anderer HDACs, 24 h, K wurde mit Lösungsmittel inkubiert, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und β -Aktin als Beladungskontrolle; n = 2, K = Kontrolle. Statistische Signifikanz (ermittelt mit ANOVA) wird durch * angegeben. Diese Daten wurden von Frau Yanira Zeyn, AG Krämer, Universitätsmedizin Mainz, gewonnen.

Da **31e (PZ048)** eine höhere Selektivität für HDAC10 gegenüber HDAC6 (s. Abbildung 40 B; Tubulin-Acetylierung) und einen stärkeren Effekt auf die Autophagozytose (s. Abbildung 40 B; Akkumulation von p62) als **31b (PZ045)** zeigte, wurden mit **31e (PZ048)** weiterführende Experimente durchgeführt. Diese wurden ebenfalls durch die Arbeitsgruppe um Prof. O. Krämer (Johannes Gutenberg-Universität Mainz) ausgeführt. So wurden verschiedene Leukämiezelllinien mit **31e (PZ048)** behandelt und die Apoptose als Phosphatidylserin-Präsentation an der Zelloberfläche und durch das Verlieren der Fähigkeit, Propidiumiodid (PI), einem farbigen DNA-Interkalator, zu exportieren, gemessen. Dies wurde mittels Durchflusszytometrie, der PI-Fluoreszenz und Annexin-V-Färbung, welche Zellen in der frühen Phase der Apoptose färbt, ermöglicht. Zellen, die sich in der frühen Phase der Apoptose befinden, sind Annexin-V positiv und Zellen in der späten Phase der Apoptose sind Annexin-V positiv und enthalten zudem größere Mengen PI.²¹¹ Es wurde festgestellt, dass **31e (PZ048)** in RS4-11-Zellen [Zellen der ALL (akuten lymphatischen Leukämie)] frühe und späte Apoptose auslöst. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass in Ramoszellen (Zellen des Burkitt-Lymphoms) späte Apoptose und in SU-DHL-6 B-Zellen (Zellen des folliculären B-Zell Lymphoms) frühe Apoptose durch die Behandlung mit **31e (PZ048)** ausgelöst wird (s. Abbildung 41 A). Im Gegensatz dazu wurde in MV4-11-, THP-1- (Zellen der AML), K562- (Zellen der chronischen myeloischen Leukämie) und HEL-Zellen (Zellen der Polycythaemia vera) durch **31e (PZ048)** keine Apoptose ausgelöst. Dies zeigt, dass die pro-apoptischen Effekte von **31e (PZ048)** nicht unselektiv sind und nur in einigen Leukämiezellen auftreten. Es wurde durch eine Positivkontrolle mit MS-275 gezeigt, dass der Unterschied zwischen RS4-11- und MV4-11-Zellen nicht durch eine generell höhere Sensitivität der RS4-11-Zellen gegenüber der HDAC-Inhibition erklärt werden kann.

40,1 % der RS4-11-Zellkulturen zeigten Apoptose, wenn diese mit **31e (PZ048)** inkubiert werden. Bei weiteren Untersuchungen stellte sich heraus, dass in mit **31e (PZ048)** behandelten RS4-11-Zellen die Konzentration aktiver Caspase 3 (Protease, die essenziell für die Apoptose ist) und dem Marker für Apoptose, replikativem Stress und DNA-Schäden γ H2AX signifikant ansteigt.^{212,213} Ebenso wurden sowohl für behandelte als auch unbehandelte Zellen eine vergleichbare HDAC10-Expression und globale Histon-Acetylierung gezeigt (s. Abbildung 41 B). Die Analyse der Tubulin-Acetylierung in mit **31e (PZ048)** behandelten RS4-11 Zellen bestätigt, dass **31e (PZ048)** ein sehr schlechter HDAC6-Inhibitor, im Vergleich mit MARB-1, ist. Zudem konnte bei einer starken HDAC6-Inhibition mit MARB-1 keine Apoptose in RS4-11-Zellen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die pro-apoptotischen Effekte von **31e (PZ048)** nicht durch eine Inhibition der Klasse 1 HDACs oder der HDAC6 zu erklären sind. Dies legt den Schluss nahe, dass die gewünschte HDAC10-Inhibition zu genannten Effekten führt.

Die Resistenz der MV4-11-Zellen gegen zytotoxische Effekte durch **31e (PZ048)** steht nicht in Zusammenhang mit einer nicht stattfindenden HDAC10-Inhibition, was durch die nachgewiesenen cyto-ID positiven Vesikel gezeigt wird (s. Abbildung 40 A). Bei der Analyse von mit **31e (PZ048)** behandelten RS4-11-Zellen wurden diese subzellulären Strukturen ebenfalls nachgewiesen (s. Abbildung 41 C). Somit findet sich eine Akkumulation an cyto-ID positiven Vesikeln, sowohl in den für **31e (PZ048)** sensitiven RS4-11-Zellen als auch in den **31e (PZ048)** resistenten MV4-11 Zellen. Bei einer Inhibition der autophagischen Aktivität mit Chloroquin wurden keine zytotoxischen Effekte an MV4-11- und RS4-11-Zellen beobachtet. Diese Daten zeigen, dass allein die **31e (PZ048)** induzierte Änderung der Autophagie nicht der Grund für die verschiedenen Sensitivitäten der verschiedenen Leukämiezelllinien gegenüber **31e (PZ048)** ist.

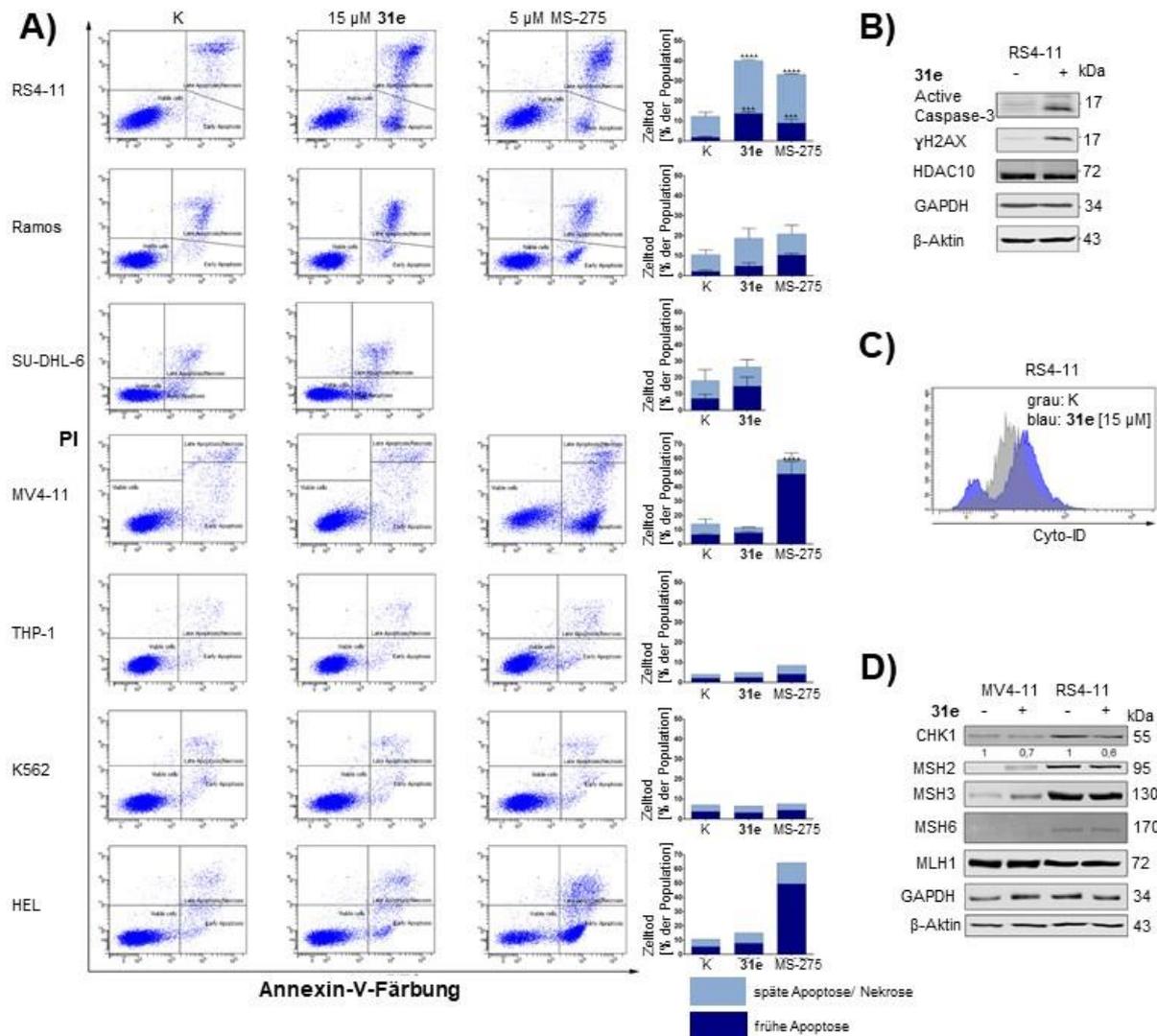


Abbildung 41: 31e-Aktivität gegen Leukämiezellen: A) Eine Reihe Leukämiezellen wurden für 24 h mit 15 µM 31e (PZ048) oder 5 µM MS-275 inkubiert und auf Annexin-V und PI untersucht; K = Kontrolle, inkubiert mit Puffer; n = 2-3; ***p ≤ 0,001, ****p ≤ 0,0001. B) RS4-11-Zellen wurden für 24 h mit 31e inkubiert und wie angegeben einer Immunoblot-Analyse unterzogen; GAPDH und β-Aktin als Ladungskontrolle; n = 2. C) Overlay von cyto-ID positiven Vesikeln in mit 31e und in mit Puffer behandelten RS4-11-Zellen D) Immunoblot-Analyse für Checkpoint-Kinase-1 (CHK1), DNA-mismatch repair Proteine (MMR): MutatorS-Homologe 2, 3 und 6 (MSH) und MutatorL-Homologe 1 (MLH); GAPDH und β-Aktin als Ladungskontrolle, + 15 µM 31e, - Puffer, 24 h, n=2. Diese Daten wurden von Frau Yanira Zeyn, AG Krämer, Universitätsmedizin Mainz, gewonnen.

Es konnte ein Zusammenhang zwischen HDAC10-*Knockout* in Gebärmutterhalskrebszellen und Chaperon vermittelter Autophagie (CMA, von engl.: chaperone-mediated autophagy) hergestellt werden,²¹⁴ wobei GAPDH und CHK1 angegriffen werden.²¹⁵ Immunoblot-Analysen für CHK1 zeigten eine leichte Verringerung in MV4-11- und RS4-11-Zellen, wenn diese mit **31e (PZ048)** behandelt werden. GAPDH zeigte bei Inkubation mit **31e (PZ048)** keine signifikante Änderung in Leukämiezellen (s. Abbildung 41 D), was eine zelltypspezifische Regulierung der CMA-Ziele nahelegt. Unabhängig hiervon kann man von den Daten ableiten, dass eine einzelne Veränderung des CMA nicht erklären kann, warum B-ALL-Zellen anfälliger für **31e (PZ048)** sind als AML-Zellen.

Die Akkumulation von γ H2AX ist ein Zeichen für DNA-Schäden²¹³ und das MMR-Protein MSH2 ist durch HDAC10 Elimination inaktiviert.²¹⁶ Deswegen wurde ebenfalls auf die Regulation der MMR Proteine in MV4-11 und RS4-11-Zellen, die mit 15 μ M **31e (PZ048)** behandelt wurden, getestet. Es wurde eine starke Expression von MSH2, MSH3, MSH6 und MLH1 in RS4-11-Zellen beobachtet. Mit Ausnahme von MLH1 waren die genannten MMR Proteine in RS4-11-Zellen signifikant höher exprimiert als in MV4-11-Zellen. Ebenso konnte beobachtet werden, dass MSH2 durch **31e (PZ048)** Behandlung in MV4-11-Zellen stärker exprimiert wurde, wobei diese Level nicht das der RS4-11-Zellen erreichte (s. Abbildung 41 D). Folglich kann ein Mangel an MMR Proteinen nicht als einfache Erklärung für die Sensitivität der RS4-11-Zellen gegenüber **31e (PZ048)** herangezogen werden.

Die gezeigten Daten zeigen, dass weitere Experimente durchgeführt werden müssen, um zu klären, wie HDAC10 verschiedene Krebszellen vor der Apoptose bewahrt und wie es zur Einleitung der Apoptose durch **31e (PZ048)** kommt.

4. Fazit und Ausblick

Die Behandlung von Krebserkrankungen im Menschen ist zum aktuellen Zeitpunkt schwierig und mit einer großen Zahl potenzieller Nebenwirkungen verbunden. Aktuelle Studien zeigen, dass einige hHDACs ein attraktives Ziel für die Tumorthherapie darstellen, da deren Inhibierung im besten Fall nebenwirkungsfrei abläuft, aber Krebszellen schädigt.

In dieser Arbeit wurden, ausgehend von vorangegangenen Arbeiten, potente hHDAC8 Inhibitoren entwickelt, synthetisiert und charakterisiert, die eine gute Selektivität gegenüber anderen hHDACs aufweisen. Aus den gewonnenen Daten wurden anschließend Struktur-Wirkungs-Beziehungen für hHDAC8-Inhibitoren abgeleitet. Darüber hinaus zeigten die dargestellten hHDAC8-Inhibitoren in Zytotoxizitätsassays keine zytotoxischen Eigenschaften bei Konzentrationen, die im therapeutischen Bereich liegen, sodass *off-target*-Effekte und Nebenwirkungen unwahrscheinlich sind. Die aktivsten und selektivsten Verbindungen, mit einem IC₅₀-Wert im unteren nanomolaren Bereich gegen hHDAC8, wurden für weitere Tests an Neuroblastomzellen herangezogen. Bei den Neuroblastomzellen BE(2)-C stellten sich die Verbindungen **6d (PZ028)** und **19a (PZ031)** als sehr potent heraus (s. Abbildung 42). Weiterführende Experimente bestätigten, dass die gute Wirkung gegen die Tumorzellen auf die Inhibition der hHDAC8 und wahrscheinlich nicht auf *off-target*-Effekte zurückzuführen ist.

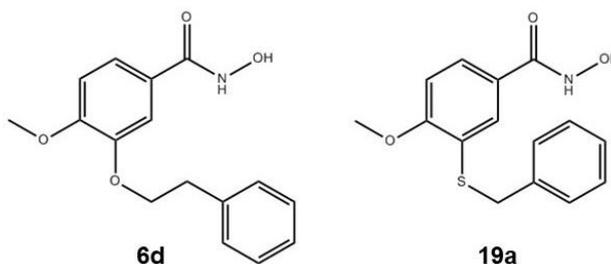


Abbildung 42: potente hHDAC8-Inhibitoren **6d (PZ028)** und **19a (PZ031)**

Die dargestellten hHDAC8-Inhibitoren sollten in Zukunft noch weiteren ergänzenden und abschließenden Tests unterzogen werden, um ihre Eignung als potenzielles Chemotherapeutikum zur Tumorbekämpfung zu prüfen. Ebenso bietet es sich an, aus den gewonnenen Daten weitere Strukturoptimierungen abzuleiten und weitere potente und selektive hHDAC8-Inhibitoren herzustellen, um ein breites Spektrum an potenziellen Tumorthapeutika zu gewinnen.

Neben der Entwicklung potenter hHDAC8-Inhibitoren konzentriert sich diese Arbeit ebenso auf die Entwicklung, Synthese und Charakterisierung potenter HDAC10-Inhibitoren, die eine gute Selektivität gegenüber anderen HDACs aufweisen. Ausgehend von *in silico* Experimenten mit dem Homologiemodell der hHDAC10 und der Kristallstruktur der zHDAC10 wurde eine Reihe potenzieller Verbindungen hergestellt und *in vitro* gegen diverse HDACs getestet. Aus den gewonnenen Daten wurden anschließend Struktur-Wirkungs-

Beziehungen für HDAC10-Inhibitoren abgeleitet. Darüber hinaus zeigten die dargestellten HDAC10-Inhibitoren in Zytotoxizitätsassays keine akuten zytotoxischen Eigenschaften bei Konzentrationen, die im therapeutischen Bereich liegen. Von den aktivsten und selektivsten Verbindungen wurden **31b (PZ045)** und **31e (PZ048)** für weiterführende Experimente an Leukämiezellen ausgewählt. Hierbei stellten sich beide Verbindungen als vielversprechend heraus. Es konnte gezeigt werden, dass in diversen Leukämiezelllinien eine Behandlung mit HDAC10-Inhibitoren zur Apoptose führt. Weiterführende Experimente konnten zeigen, dass diese zytotoxischen Effekte gegen Krebszellen durch die HDAC10-Inhibition hervorgerufen werden.

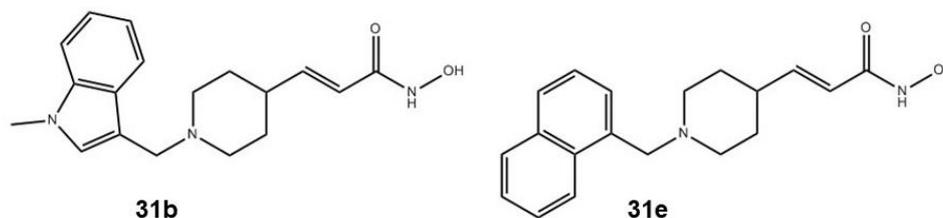


Abbildung 43: potente HDAC10-Inhibitoren 31b (PZ045) und 31e (PZ048)

In Zukunft sollten weiterführende Experimente den genauen Mechanismus klären, der hinter dem HDAC10 induzierten Schutz der Krebszellen gegen Apoptose steckt, beziehungsweise wie die Inhibition der HDAC10 zur Apoptose führt. Ebenso sollten die dargestellten Inhibitoren weiteren ergänzenden und abschließenden Tests unterzogen werden, um ihre Eignung als potenzielles Chemotherapeutikum zur Tumorbekämpfung zu prüfen. Darüber hinaus bietet es sich an, aus den gewonnenen Daten Strukturoptimierungen der HDAC10-Inhibitoren durchzuführen, um weitere potenzielle Tumorthapeutika zu erhalten.

Ein ebenfalls vielversprechender Ansatz zur Bekämpfung von Krebserkrankungen durch das Inhibieren von HDACs ist das Erforschen von PROTACs (Proteolyse durch Chimäre, von engl.: Proteolysis targeting chimeras), bei denen bifunktionelle Moleküle eingesetzt werden. Diese bestehen aus einem Liganden, der die HDAC bindet, in der Regel von einem potenten Inhibitor abgeleitet, einem Liganden, der die Ubiquitin Ligase E3 bindet und einem Linker, der beide Teile verbindet. Durch Binden der Entsprechenden Enzyme an den Liganden wird eine räumliche Nähe zwischen Zielenzym und Ligase geschaffen, welches die Biodegeneration des Zielenzym vorantreibt.²¹⁷ Die in dieser Arbeit dargestellten Inhibitoren können als entsprechende HDAC-Liganden von potenziellen PROTACs herangezogen werden.

Am Ende der Arbeit kann ein positives Resümee gezogen werden. Das Ziel, potente und selektive Inhibitoren darzustellen, konnte erfüllt werden. Es konnte eine Reihe an Daten gewonnen werden, die den Grundstein für vielversprechende neue Ansätze in der Tumorthherapie bilden können.

5. Experimentelle Daten

5.1 Material und Methoden

5.1.1 Chromatographische Methoden

Dünnschichtchromatographie

Bei allen Reaktionen wurde eine Verlaufskontrolle mittels DC durchgeführt. Ebenso diente die DC zur Einschätzung der Reinheit von Zwischen- und Endprodukten, sowie durch das Ermitteln der R_f -Werte zur Charakterisierung einzelner Verbindungen. Es wurde mit Kieselgel 60 F₂₅₄-beschichteten Aluminiumplatten der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) und der Firma VWR (Radnor, PA, USA) gearbeitet. Die Substanzen wurden entweder gelöst in einem geeigneten Lösungsmittel oder direkt aus den Reaktionsgemisch, mithilfe einer Kapillare auf die Fertigplatte aufgetragen. Die Entwicklung der DC-Platten erfolgte in Chromatographiekammern unter Kammersättigung. Standardlaufmittel folgender Zusammensetzung (V/V) dienten als mobile Phase (V = Volumen; V/V = Volumenverhältnis; LM = Lösungsmittelgemisch):

LM1: Chloroform

LM2: Chloroform/MeOH (8/2)

LM3: Chloroform/MeOH (8/2 + 0,5% Triethylamin)

LM4: Chloroform/MeOH (8/2 + 0,5% Ameisensäure)

LM5: EtOAc

LM6: EtOAc/*n*-Hexan (1/1)

Die Detektion aller Verbindungen mit aromatischen Systemen erfolgte in der Regel mithilfe der Fluoreszenzlöschung bei 254 nm (kurzwellig) und 366 nm (langwellig). Alle Verbindungen, die eine Hydroxamsäurefunktion tragen, wurden zusätzlich mit einer wässrigen Eisen-(III)-chloridlösung detektiert. Der Komplex weist eine tiefrote bis braune Färbung auf. Alle Verbindungen mit primären oder sekundären Aminfunktionen wurden zusätzlich mit einer Ninhydrinlösung (1,5 g Ninhydrin in 100 ml *n*-Butanol und 3 ml Eisessig) und Erwärmen nachgewiesen. Das entstehende Ruhemanns Purpur weist eine charakteristische intensive violette Färbung auf.

Säulenchromatographie

Die Säulenchromatographie wurde zur Aufarbeitung von Zwischen- und Endprodukten verwendet. Als stationäre Phase wurde Kieselgel 60 (0,063-0,200 mm) der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) verwendet. Als mobile Phase dienten Gemische aus Chloroform und MeOH sowie aus EtOAc und *n*-Hexan. In der Regel wurde die Polarität der Laufmittel kontinuierlich erhöht. In einigen Fällen wurde diesen Gemischen geringe Mengen Triethylamin (TEA) oder Ameisensäure zugesetzt. Die Detektion erfolgte mittels DC. Es wurden zwei verschiedene Methoden verwendet:

Methode 1:

Die Menge an Kieselgel wurde für ein Verhältnis 20/1 ($m_{\text{Kieselgel}}/m_{\text{Substanzgemisch}}$) abgewogen und trocken mithilfe von Unterdruck in die Säule eingefüllt. Das Auftragen des Substanzgemisches erfolgte mittels Adsorption an Kieselgel. Hierfür wurde das Substanzgemisch, gelöst in einem geeigneten Lösungsmittel, mit Kieselgel im Verhältnis 1/1 ($m_{\text{Kieselgel}}/m_{\text{Substanzgemisch}}$) versetzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer unter Vakuum entfernt. Das getrocknete Kieselgel mit dem adsorbierten Substanzgemisch wurde anschließend auf das Säulenmaterial aufgetragen, bevor das Säulenmaterial mit etwas Seesand reinst der Firma Grüssing (Filsum, Deutschland) vorgeglüht und säurebehandelt bedeckt wurde. Dies verhindert ein Aufwirbeln des Säulenmaterials beim Zugeben des Laufmittels.

Methode 2:

Die Menge an Kieselgel wurde für ein Verhältnis 20/1 ($m_{\text{Kieselgel}}/m_{\text{Substanzgemisch}}$) abgewogen und trocken mithilfe von Unterdruck in die Säule eingefüllt. Anschließend wurde das Säulenmaterial mit dem unpolarsten Laufmittelverhältnis konditioniert. Anschließend wurde das Substanzgemisch direkt, gelöst im unpolaren Bestandteil des Laufmittels, aufgetragen. Das Volumen zum Lösen des Substanzgemisches muss dabei so gering wie möglich gewählt sein. Anschließend wird das Säulenmaterial mit etwas Seesand reinst der Firma Grüssing (Filsum, Deutschland) vorgeglüht und säurebehandelt bedeckt. Dies verhindert ein Aufwirbeln des Säulenmaterials beim Zugeben des Laufmittels.

Mitteldruckflüssigkeitschromatographie

Die Mitteldruckflüssigkeitschromatographie (MPLC, von engl.: *Medium pressure liquid chromatography*) wurde auf einem Isolera One der Firma Biotage (Uppsala, Schweden) mit UV-Vis Detektor durchgeführt. Verwendet wurden SNAP Ultra Säulen mit einer Partikelgröße von 25 µm verschiedener Größen (5, 10 und 25 g), Sfär Silica HC Säulen mit einer Partikelgröße von 20 µm verschiedener Größen (10 und 25 g) beide hergestellt durch die Firma Biotage (Uppsala, Schweden) und CHROMABOND Flash BT15 SiOH Säulen der Firma Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) mit einer Partikelgröße von 40 – 63 µm mit einer Füllmenge von 15 g.

Als mobile Phase wurde ein Gradient aus Chloroform und Methanol verwendet. Das Substanzgemisch wurde entweder als Lösung direkt auf die Säule gegeben oder adsorbiert an Kieselgel mithilfe einer leeren Kartusche vor die Säule geschaltet. Flussrate, Säulengröße und Gradient wurden dem Trennproblem angepasst. Die Substanzen der einzelnen Fraktionen wurden über den integrierten UV-Vis Detektor und DC charakterisiert.

Analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die Reinheit der Endprodukte wurde mittels analytischer HPLC überprüft. Es wurden eine LiChrospher 100 RP-18 Säule 3 x 250 mm der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) mit einer Partikelgröße von 5 µm oder eine XTerra RP-18 Säule 3,9 x 100 mm der Firma Waters (Milford, MA, USA) mit einer Partikelgröße von 5 µm und ein SPD-M10A VP PDA Detektor, zwei LC-20AD Pumpen und ein SIL-HT *autosampler* alle der Firma Shimadzu (Tokyo, Japan) verwendet. Die Reinheit wurde bei einer Absorption von 254 nm und einer Flussrate von 1 ml/min gemessen. Angegeben werden die prozentuale Reinheit und die Retentionszeit (rt, von engl.: *retention time*)

Der gewählte Gradient bestand aus MeOH + 0,05% TFA und Wasser + 0,05% TFA:

Tabelle 15: Methode der analytischen HPLC.

Zeit [min]	H₂O + 0,05% TFA [%]	MeOH + 0,05% TFA [%]
0	95	5
15	5	95
20	5	95
25	95	5
30	95	5

Präparative Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Jedes Endprodukt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurden eine XTerra RP18 Säule mit einer Partikelgröße von 7 µm der Firma Waters (Milford, MA, USA) für die Methoden P1 und P2 und eine LiChrosorb RP-18 Säule mit einer Partikelgröße von 7 µm der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) für die Methoden P3 und P4 verwendet. Zudem kamen ein SPD-M10A VP PDA Detektor, zwei LC-10AD Pumpen und ein SIL-HT *autosampler* alle der Firma Shimadzu (Tokyo, Japan) zum Einsatz. Die Reinheit wurde bei einer Absorption von 254 nm gemessen.

Es wurden vier verschiedene Methoden verwendet:

Methode P1:

Der gewählte Gradient bestand aus MeOH + 0,1% TFA und Wasser + 0,1% TFA und hatte eine Flussrate von 10 ml/min:

Tabelle 16: Methode P1 der präparativen HPLC.

Zeit [min]	H₂O + 0,1% TFA [%]	MeOH + 0,1% TFA [%]
0	95	5
30	5	95
40	5	95
45	95	5

Methode P2:

Der gewählte Gradient bestand aus Acetonitril (MeCN) + 0,1% TFA und Wasser + 0,1% TFA und hatte eine Flussrate von 10 ml/min:

Tabelle 17: Methode P2 der präparativen HPLC.

Zeit [min]	H₂O + 0,1% TFA [%]	MeCN + 0,1% TFA [%]
0	99	1
10	99	1
40	5	95
45	95	5

Methode P3:

Der gewählte Gradient bestand aus MeCN + 0,1% TFA und Wasser + 0,1% TFA und hatte eine Flussrate von 15 ml/min:

Tabelle 18: Methode P3 der präparativen HPLC.

Zeit [min]	H ₂ O + 0,1% TFA [%]	MeCN + 0,1% TFA [%]
0	97	3
10	97	3
30	70	30
40	5	95
45	97	3

Methode P4:

Der gewählte Gradient bestand aus MeCN + 0,1% TFA und Wasser + 0,1% TFA und hatte eine Flussrate von 20 ml/min:

Tabelle 19: Methode P4 der präparativen HPLC.

Zeit [min]	H ₂ O + 0,1% TFA [%]	MeCN + 0,1% TFA [%]
0	90	10
10	5	95
40	5	95
45	90	10

5.1.2 Massenspektrometrie

Elektronenspray-Ionisation-Massenspektrometrie

Bei einigen Reaktionen wurde eine Elektronenspray-Ionisation-MS (ESI-MS) als Verlaufskontrolle und als Identitätsprüfung eingesetzt. Verwendet wurde ein Ionenfallen-Massenspektrometer Finnigan LCQ-Classical mit beheizbarer Kapillare (220°C) der Firma Thermo Electron (Waltham, MA, USA) mit einer Spritzenpumpe Modell 22 (20 µl/min) der Firma Harvard Apparatus (Holliston, MA, USA). Die Ionisation erfolgte sowohl positiv als auch negativ im Elektronenspray bei 5,0 kV.

Die zu untersuchenden Substanzen waren in einer Mischung aus Chloroform und Methanol verschiedener Zusammensetzung gelöst.

Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck-Massenspektrometrie

Bei einigen Reaktionen wurde eine Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck-MS (APCI-MS, von engl.: *atmospheric pressure chemical ionization*) als Verlaufskontrolle und als Identitätsprüfung eingesetzt. Verwendet wurde ein Expression^s CMS der Firma Advion (Ithaca, NY, USA).

Die zu untersuchenden Substanzen waren in einer Mischung aus Chloroform und Methanol verschiedener Zusammensetzung gelöst.

Hochauflösende Massenspektrometrie

Jedes synthetisierte Endprodukt wurde mittels hochauflösender MS (HR-MS, von engl.: *high resolution mass spectrometry*) charakterisiert. Verwendet wurde eine Proxeon-Nano-ESI-Quelle (1,3 kV) und ein LTQ-Orbitrap-XL-Massenspektrometer beides der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA).

Die zu untersuchenden Substanzen waren in Methanol gelöst.

5.1.3 NMR-Spektroskopie

¹H-Kernspinresonanz-Spektroskopie

Jedes synthetisierte Endprodukt wurde mittels ¹H-Kernspinresonanz-Spektroskopie (¹H-NMR) charakterisiert. Hierfür wurde ein Gemini 2000 (400 MHz) der Firma Varian (Palo Alto, CA, USA) verwendet. Die zu messenden Substanzen waren in (CD₃)₂SO oder CD₃OD gelöst. Das Lösungsmittelsignal bildete hierbei den internen Standard.

Die chemische Verschiebung (δ) ist in ppm angegeben. Die Signale im ¹H-NMR-Spektrum werden wie folgt angegeben: chemische Verschiebung (Multiplizität, Protonenzahl, zugeordnetes ***Proton*** (fett und kursiv), Kopplungskonstante J in Hz). Für die Multiplizitäten gelten folgende Abkürzungen: s (Singulett), d (Duplett), dd (Duplett vom Duplett), t (Triplet), m (Multipllett).

5.1.4 Nummerierung der Substanzen

Für eine eindeutige Zuordnung bei der Auswertung der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren wurde folgende Nummerierung der Substanzen vorgenommen:

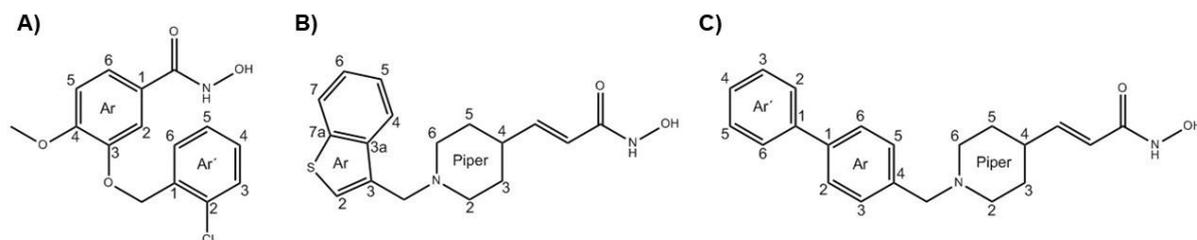


Abbildung 44: Nummerierung von **A) 6a**, **B) 31a** und **C) 31j** (Ar & Ar' = Aromat; Piper = Piperidin/ Piperazin)

5.1.5 Lyophilisation

Alle synthetisierten Endprodukte wurden per Lyophilisation getrocknet. Dies erfolgte mithilfe der Kühlfalle CT 60 der Firma Heto Lab Equipment (Allerød, Dänemark) und einer Drehschieber-Vakuumpumpe RZ 2 der Firma vacubrand (Wertheim, Deutschland).

Die zu trocknenden Substanzen, meist in einem Gemisch aus MeOH/ Wasser oder ACN/ Wasser gelöst, wurden über Trockeneis eingefroren und bis zur Trockene lyophilisiert.

5.1.6 Mikrowellensynthese

Alle Reaktanden und das Lösungsmittel für die entsprechende Reaktion wurden direkt in einem 20 ml Reaktionsgefäß eingewogen und mit einem Septum verschlossen. Reaktionsdauer, Temperatur und Leistung wurden je nach Reaktion ausgewählt. Verwendet wurde eine Monowave 450 mit MAS 24 autosampler der Firma Anton Paar (Graz, Österreich).

5.1.7 hHDAC8-FDL-Assay

Der Aktivitätsassay gegen hHDAC8 wurde wie der kommerziell erhältliche FDL-Assay der Firma Enzo Life Sciences (BML-KI178; Farmingdale, NY, USA) durchgeführt.¹⁹³ Das Enzym wurde durch die Arbeitsgruppe um Prof. C. Romier (Universität de Strasbourg) hergestellt und für den Assay zur Verfügung gestellt.¹⁹⁴ Das Substrat wurde, wie in Kapitel 5.2 beschrieben, synthetisiert und nach Anweisungen des Herstellers verwendet.¹⁹³ Enzymlösung (15 μl ; Puffer 1), Inhibitorlösung, hergestellt als Verdünnungsreihe ausgehend von einer 10 mM Lösung in Dimethylsulfoxid (DMSO), (10 μl ; Puffer 1), und FDL-

Substratlösung (25 µl; Puffer 1) werden 90 Minuten bei 37 °C in *HalfArea-96-Well-Med.binding-Microplates* in schwarz (greiner BIO-ONE, Frickenhausen, Deutschland) inkubiert. Stopplösung (50 µl; Puffer 2) wird hinzugegeben und 45 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Fluoreszenz wird an einem POLARstar Omega Plattenreader (BMG Labtech GmbH, Ortenberg, Deutschland), bei einer Anregungswellenlänge von 390 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm, gemessen.¹⁹⁵ Ein Blankwert (25 µl Puffer 1 und 25 µl FDL-Substratlösung), ein Kontrollwert (10 µl Puffer 1, 15 µl Enzymlösung und 25 µl FDL-Substratlösung) und eine 100 %-Umsatzkontrolle (AMC gelöst in Puffer 2 entsprechend der Konzentration des FDL-Substrates, 50 µl) werden ebenso gemessen. Die prozentuale Inhibition wird wie folgt bestimmt (FI = Fluoreszenzintensität):

$$\text{Inhibition [\%]} = 100 \% - (FI_{\text{Inhibitor}} - FI_{\text{Blank}}) / (FI_{\text{Kontrolle}} - FI_{\text{Blank}}) * 100 \%$$

IC₅₀-Werte werden mittels nichtlinearer Regression mit Origin 2019 (OriginLab) berechnet.

Die verwendeten Puffer haben folgende Zusammensetzung (Tris = Tris(hydroxymethyl)-aminomethan; BSA = Bovines Serumalbumin; PEG = Polyethylenglycol):

Puffer 1 (HDAC8-Puffer, pH = 8,0): 50 mM Tris/Cl, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mg/ml BSA, 10 % PEG 8000.

Puffer 2 (Trypsin-Puffer, pH = 8,0): 50 mM Tris, 100 mM NaCl.

Die verwendeten Lösungen haben folgende Zusammensetzung:

Enzymlösung: Enzymstammlösung (~ 3 mg/ ml) wird mit Puffer 1 verdünnt (Konzentration variiert je nach Aktivität des Enzyms).

FDL-Substratlösung: FDL-Substratstammlösung (5 mM in DMSO) wird mit Puffer 1 zu einer 100 µM Lösung verdünnt.

Inhibitorlösung: Inhibitorstammlösung (10 mM in DMSO) wird mit Puffer 1 in einer Verdünnungsreihe verdünnt.

TSA-Lösung: TSA-Stammlösung (3,3 mM in DMSO) wird mit Puffer 2 1: 100 verdünnt.

Stopplösung: 8,3 µl Trypsinstammlösung (6 mg/ ml in DMSO) und 4,2 µl TSA-Lösung werden mit 37,5 µl Puffer 2 verdünnt.

AMC-Lösung: AMC-Stammlösung (12,6 mM in DMSO) wird mit Puffer 2 im Verhältnis 1: 251 zu einer 50 µM Lösung verdünnt.

Tabelle 20: Pipettierschema des hHDAC8-FDL-Assays

Pipettierschema	Verdünnungen mit Puffer 1				Puffer 2	
	37 °C, 90 min				37 °C, 45 min	
	Puffer 1	Enzym	Inhibitor	Substrat	AMC	Stopp
Blank	25 µl	0 µl	0 µl	25 µl	0 µl	50 µl
Kontrolle	10 µl	15 µl	0 µl	25 µl	0 µl	50 µl
Probe	0 µl	15 µl	10 µl	25 µl	0 µl	50 µl
100 %-Kontrolle	0 µl	0 µl	0 µl	0 µl	50 µl	50 µl

5.1.8 Dockingstudien

Das Docking an hHDAC8 wurde von Dr. Dina Robaa und an HDAC10 von Talha Zahid Yesiloglu (beide Arbeitsgruppe Prof. Dr. W. Sippl; Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) durchgeführt. Die verwendeten Liganden und Ligand-Proteinkomplexe wurden wie bereits veröffentlicht ausgearbeitet.¹³⁹

Für die Ligandenvorbereitung, also zum Erstellen der Strukturen aller Verbindungen, wurde MOE (Version 2014.09, Chemical Computing Group, Montreal, Kanada) verwendet.

Für die Vorbereitung der Liganden zum Docking wurde *LigPrep tool* verwendet, welches in der Schrödinger Software (Version 2018-1) implementiert ist.⁶⁰ Es wurden alle möglichen Tautomere und Stereoisomere generiert. Diese wurden anschließend einer Energieminimierung unterzogen, hierfür wurde das integrierte *Optimized Potentials for Liquid Simulations* (OPLS_2005) Kraftfeld verwendet.²¹⁸ Daraufhin wurden für jeden Liganden maximal 64 Konformationen mit ConfGen unter Standardeinstellungen berechnet.^{219,220}

Für die Präparation der Proteine wurden Kristallstrukturen der HDACs (zHDAC10, PDB ID: 6UHU & 5TD7; hHDAC8, PDB ID 2V5X) aus der Proteindatenbank (PDB; www.rcsb.org) geladen.²²¹ Alle Wassermoleküle, mit Ausnahme derer, die in der katalytischen Tasche sitzen, wurden entfernt. Weitere Vorbereitungen der Proteinstruktur wurden mithilfe des *Protein Preparation Wizard* aus der Schrödinger Software (Version 2017-2) erstellt. Die Bindungsordnung wurde zugewiesen, Wasserstoffatome wurden hinzugefügt und das Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen wurde optimiert. Das Protonierungsmuster bei pH=7 wurde mithilfe des Epik-tool aus der Schrödinger Software vorhergesagt. Die Struktur wurde einer Energieminimierung (RMSD der Atomverschiebung zum Beenden der Minimierung waren 0,3 Å) unterworfen, hierfür wurde das OPLS_2005 Kraftfeld verwendet.²¹⁸

Dockingstudien wurden mithilfe von *Glide* (Schrödinger Software 2017-2) durchgeführt. Das Rezeptorgitter wurde, durch zuweisen der co-kristallisierten Liganden als Zentroid der Gitterbox, erstellt. Die erstellten 3D-Konformationen der Liganden wurden, mithilfe von *Glide*

und *Standard Precision* (SP) als *Scoring*-Funktion, in das Rezeptorgitter gedockt. Insgesamt wurden 20 Positionen der Ligandenkonformationen in die Minimalisierung nach dem Docking einbezogen. Es wurden maximal zwei Dockinglösungen für jede Ligandenkonformation generiert.

Homologiemodell:

Da am Anfang dieser Arbeit keine 3D-Struktur von HDAC10 verfügbar war, wurde zuerst in einem erstellten Homologiemodell von HDAC10 gedockt. Die HDAC10-Aminosäuresequenz wurde von UniProt (The UniProt Consortium, 2017; Zugangsnummer: Q969S8) bezogen. Eine BLAST-Suche der Aminosäuresequenz wurde für die HDAC10 katalytische Domäne (Aminosäuren 1-323) durchgeführt, um die nächsten Verwandten zu identifizieren. Hierfür wurde die BLOSUM62 Matrix verwendet. Anschließend wurde ein Sequenzalignment der HDAC10 katalytischen Domäne am nächsten Verwandten, der hHDAC6 (Sequenzidentität: 55,6 %), in MOE (Version 2016.08, Chemical Computing Group, Montreal, Kanada) durchgeführt. Das Homologiemodell wurde anschließend mithilfe der Kristallstruktur der hHDAC6 (PDB ID: 5EDU) in MODELLER 9.11 generiert.²²²

5.1.9 Verwendete Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich Co. Ltd. (St. Louis, MO, USA), abcr GmbH (Karlsruhe, Deutschland) oder der Chemikalienausgabe des Instituts für Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg bezogen. Alle gekauften Chemikalien wurden wie bezogen verwendet. Alle verwendeten Lösungsmittel waren analytisch rein und wurden vor der Verwendung nach allgemeiner Vorschrift getrocknet.²²³

Die Laufmittel für die HPLC wurden in ausreichender Reinheit bestellt. Bei Wasser (H₂O) handelt es sich um destilliertes Wasser. Wässrige Lösungen werden mit aq (von lat.: aqua) gekennzeichnet. Demineralisiertes Wasser, für die Puffer des hHDAC8-Assays, wurde mittels Ionenaustausch gewonnen.

5.1.10 Verwendete Programme

Alle Abbildungen, die Reaktionen oder Strukturformeln zeigen wurden mit ChemBioDraw Ultra Version 13.0.0.3015 (2012) erstellt. Für die Auswertung von NMR-Spektren wurde MestReNova Version 6.0.2-5475 (2009) eingesetzt. Für die Auswertung des hHDAC8-Assays wurde Origin 2019 (OriginLab) verwendet.

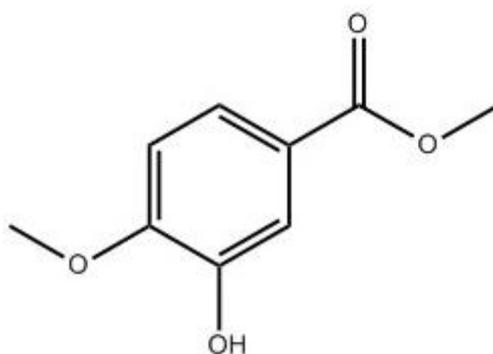
5.2 Synthesevorschriften

Alle synthetisierten Verbindungen werden als ungeladene, freie Substanzen dargestellt und benannt. Substanzen, die unter physiologischen Bedingungen ionisch vorliegen, oder als Salz aufgereinigt wurden, werden in diesem Kapitel ungeladen gezeigt. Vier Verbindungen (6e, 25d, 31i, 32) haben, aufgrund von Verlusten während der Aufarbeitung und Problemen bei der präparativen Aufreinigung, nicht die geforderte Reinheit von > 95 % erreicht. Die Struktur-Wirkungs-Beziehungen wurden unter Verwendung auch der Verbindungen mit leicht verringerter Reinheit erstellt. Für diverse Zwischenprodukte wurde, aufgrund der etablierten Synthesewege, auf eine genauere Beschreibung der Analytik verzichtet. Verschiedene eingesetzte Äquivalente werden als X Äq angegeben.

5.2.1 hHDAC8-Inhibitoren

2 (PZ001)

Methyl-3-hydroxy-4-methoxybenzoat



500 mg Isovanillinsäure (1 Äq, 3,0 mmol) werden in 100 ml MeOH gelöst und im Eisbad auf 0°C gekühlt. Anschließend werden 650 µl Thionylchlorid (3 Äq, 8,9 mmol) tröpfchenweise unter Rühren hinzugegeben und das Reaktionsgemisch langsam auf Raumtemperatur aufgewärmt. Im Anschluss wird die Reaktion für 30 min unter Reflux erhitzt und am Rotationsverdampfer das Lösungsmittel und überschüssiges Thionylchlorid unter Vakuum entfernt. Der zurückbleibende Feststoff wird in 30 ml EtOAc aufgenommen und drei Mal mit 1 M NaCl_{aq} gewaschen und anschließend über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet. Danach wird das Produkt aus Chloroform auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform: MeOH; 100 %: 0 % bis 80 %: 20 %, V/V). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet. Das Produkt wird bei -20°C lichtgeschützt gelagert.

Beschaffenheit: Farbloser amorpher Feststoff.

Ausbeute: 91,0 %

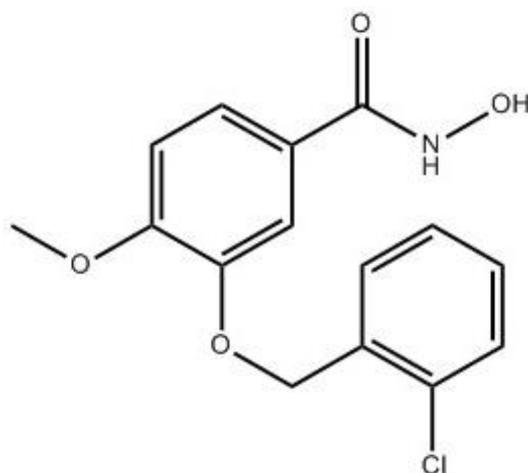
HPLC: rt 7,67 min (99,63 %)

$^1\text{H-NMR}$ [$(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, ppm]: δ = 3,77 (s, 3H, Ar-O-**CH**₃), 3,81 (s, 3H, CO₂**CH**₃), 7,00 (d, 1H, Ar_{C5}-**H**, J = 8,8 Hz), 7,34 (d, 1H, Ar_{C2}-**H**, J = 2,0 Hz), 7,42 (dd, 1H, Ar_{C6}-**H**, J₁ = 2,0 Hz, J₂ = 8,8 Hz), 9,38 (s, 1H, Ar-**OH**).

MS m/z: 183,47 [M-H]⁺

6a (PZ005)

3-[(2-Chlorbenzyl)oxy]-4-methoxybenzhydroxamsäure



200 mg **2** (1 Äq, 1,1 mmol) werden in 25 ml DMF gelöst und im Eisbad auf 0°C gekühlt, bevor 493 mg Kaliumcarbonat (3 Äq, 3,3 mmol) und 232 μl 2-Chlorbenzylbromid (1,5 Äq, 1,7 mmol) langsam unter Rühren hinzugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt werden. Anschließend wird das Reaktionsgemisch mit 300 ml gesättigter NaCl_{aq} versetzt und drei Mal mit 100 ml EtOAc ausgeschüttelt. Das Produkt, gelöst in der EtOAc-Phase, wird am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, aus Chloroform auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform; 100 %). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

Das Produkt wird in 20 ml MeOH und 5 ml 1 M NaOH_{aq} aufgenommen und 3 h unter Reflux gerührt. Im Anschluss wird das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, in 50 ml Wasser aufgenommen, mit etwas 1 M HCl_{aq} neutralisiert und drei Mal mit 50 ml EtOAc ausgeschüttelt. Die organische Phase wird mit 25 ml 4 M NaCl_{aq} gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird aus Chloroform auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform: MeOH; 100 %: 0 % bis

90 %: 10 %, V/V). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

160 mg des Produktes (1 Äq, 0,56 mmol) werden in 15 ml THF gelöst. Anschließend werden 143 µl DIPEA (1,5 Äq, 0,82 mmol), 330 mg PyBOP (1,2 Äq, 0,66 mmol) und 96 mg THP-Hydroxylamin (1,5 Äq, 0,82 mmol) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, in 25 ml EtOAc aufgenommen, mit 25 ml 1 M wässriger Natriumcarbonatlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und erneut am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet. Das Produkt wird in möglichst wenig Chloroform mit 0,5 % TEA gelöst und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform: MeOH: TEA; 99,5 %: 0 %: 0,5 % bis 99 %: 0,5 %: 0,5 %, V/V/V). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und in 10 ml THF aufgenommen. Es werden drei Tropfen konzentrierte HCl_{aq} zugetropft und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird das Produkt am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, aus Chloroform auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform: MeOH: HCOOH; 99,8 %: 0 %: 0,2 % bis 89,8 %: 10 %: 0,2 %, V/V/V). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und mittels HPLC (Methode P1) gereinigt. Das Produkt wird bei -20°C lichtgeschützt gelagert.

Beschaffenheit: Farbloser amorpher Feststoff.

Ausbeute: 91,0 %

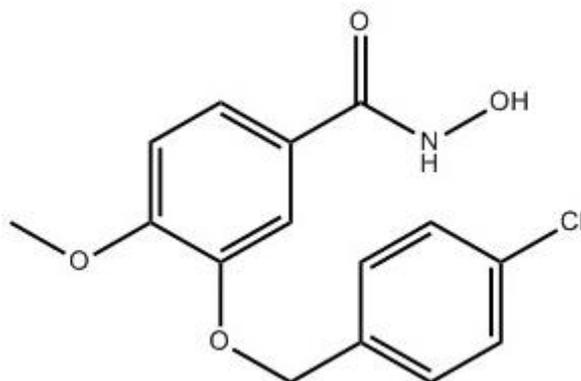
HPLC: rt 9,30 min (99,97 %)

¹H-NMR [(CD₃)₂SO, ppm]: δ = 3,80 (s, 3H, Ar-O-CH₃), 5,15 (s, 2H, Ar-O-CH₂-Ar'), 7,04 (d, 1H, Ar_{C5}-H, J = 8,4 Hz), 7,40 (m, 3H, Ar'_{C4}-H & Ar'_{C5}-H & Ar'_{C6}-H), 7,44 (d, 1H, Ar_{C2}-H, J = 2 Hz), 7,50 (m, 1H, Ar_{C6}-H), 7,58 (m, 1H, Ar'_{C3}-H), 11,08 (s, 1H, NH-OH).

HR-MS m/z: 308,0674 [M+H]⁺; berechnet für C₁₅H₁₅ClNO₄⁺: 308,0690

6b (PZ011)

3-[(4-Chlorbenzyl)oxy]-4-methoxybenzhydroxamsäure



190 mg **2** (1 Äq, 1,0 mmol) werden in 20 ml DMF gelöst und im Eisbad auf 0°C gekühlt, bevor 431 mg Kaliumcarbonat (3 Äq, 3,1 mmol) und 321 mg 4-Chlorbenzylbromid (1,5 Äq, 1,6 mmol) langsam unter Rühren hinzugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt werden. Anschließend wird das Reaktionsgemisch 3 h bei 80°C gerührt, nach abkühlen mit 300 ml gesättigter NaCl_{aq} versetzt und drei Mal mit 100 ml EtOAc ausgeschüttelt. Das Produkt, gelöst in der EtOAc-Phase, wird am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, aus Chloroform auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform; 100 %). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

Das Produkt wird in 20 ml MeOH und 5 ml 1 M NaOH_{aq} aufgenommen, für drei Tage bei Raumtemperatur und 3 h unter Reflux gerührt. Im Anschluss wird das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, in 50 ml Wasser aufgenommen, mit etwas 1 M HCl_{aq} neutralisiert und drei Mal mit 50 ml EtOAc ausgeschüttelt. Die organische Phase wird mit 25 ml 4 M NaCl_{aq} gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird aus Chloroform auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform: MeOH; 100 %: 0 % bis 97 %: 3 %, V/V). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

222 mg des Produktes (1 Äq, 0,76 mmol) werden in 20 ml THF gelöst. Anschließend werden 200 µl DIPEA (1,5 Äq, 1,1 mmol), 458 mg PyBOP (1,2 Äq, 0,91 mmol) und 133 mg THP-Hydroxylamin (1,5 Äq, 1,1 mmol) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, in 25 ml EtOAc aufgenommen, mit 25 ml 1 M wässriger Natriumcarbonatlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und erneut am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet. Das Produkt wird in möglichst wenig Chloroform mit 0,5 % TEA gelöst und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient:

Chloroform: MeOH: TEA; 99,5 %: 0 %: 0,5 % bis 99 %: 0,5 %: 0,5 %, V/V/V). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und in 10 ml THF aufgenommen. Es werden fünf Tropfen konzentrierte HCl_{aq} zugetropft und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird das Produkt am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, aus Chloroform auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform: HCOOH ; 99,8 %: 0,2 %; V/V). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und mittels HPLC (Methode P1) gereinigt. Das Produkt wird bei -20°C lichtgeschützt gelagert.

Beschaffenheit: Farbloser amorpher Feststoff.

Ausbeute: 62,0 %

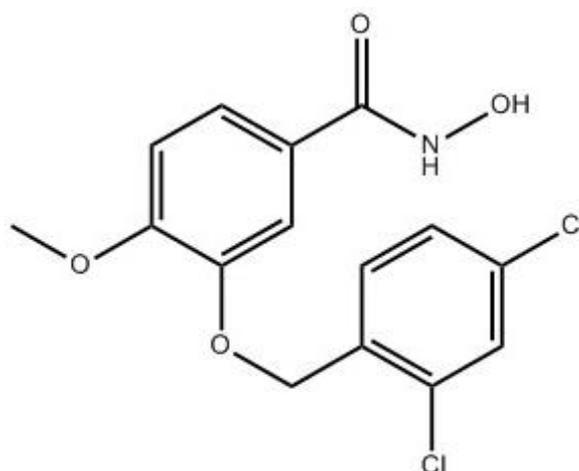
HPLC: rt 10,14 min (99,42 %)

$^1\text{H-NMR}$ [$(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, ppm]: $\delta = 3,79$ (s, 3H, Ar-O-**CH**₃), 5,09 (s, 2H, Ar-O-**CH**₂-Ar'), 7,02 (d, 1H, Ar_{C5}-**H**, $J = 8,4$ Hz), 7,38 (dd, 1H, Ar_{C6}-**H**, $J_1 = 8,4$ Hz, $J_2 = 2,0$ Hz), 7,42 (d, 1H, Ar_{C2}-**H**, $J = 2,0$ Hz), 7,45 (m, 4H, Ar'_{C2}-**H** & Ar'_{C3}-**H**, Ar'_{C5}-**H** & Ar'_{C6}-**H**), 11,04 (s, 1H, NH-**OH**).

HR-MS m/z : 308,0683 $[\text{M}+\text{H}]^+$; berechnet für $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{ClNO}_4^+$: 308,0690

6c (PZ009)

3-[(2,4-Dichlorbenzyl)oxy]-4-methoxybenzhydroxamsäure



400 mg **2** (1 Äq, 2,2 mmol) werden in 50 ml DMF gelöst und im Eisbad auf 0°C gekühlt, bevor 912 mg Kaliumcarbonat (3 Äq, 6,6 mmol) und 792 mg 2,4-Dichlorbenzylbromid (1,5 Äq, 3,3 mmol) langsam unter Rühren hinzugegeben werden. Anschließend wird das Reaktionsgemisch, nach langsamem Erwärmen auf Raumtemperatur, für 6 h bei 80°C gerührt. Das Reaktionsgemisch wird nach Abkühlen auf Raumtemperatur mit 50 ml 1 M NaCl_{aq} versetzt und anschließend das Produkt drei Mal mit 50 ml EtOAc ausgeschüttelt. Das Produkt, gelöst in der EtOAc-Phase, wird am Rotationsverdampfer unter Vakuum

getrocknet, aus Chloroform auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform; 100 %). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

Das Produkt wird in 20 ml MeOH und 5 ml 1 M NaOH_{aq} aufgenommen und 3 h unter Reflux gerührt. Im Anschluss wird das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, in 50 ml Wasser aufgenommen, mit etwas 1 M HCl_{aq} neutralisiert und drei Mal mit 50 ml EtOAc ausgeschüttelt. Die organische Phase wird mit 25 ml 4 M NaCl_{aq} gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird aus Chloroform auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform: MeOH; 100 %: 0 % bis 90 %: 10 %, V/V). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

200 mg des Produktes (1 Äq, 0,61 mmol) werden in 15 ml THF gelöst. Anschließend werden 160 µl DIPEA (1,5 Äq, 0,92 mmol), 369 mg PyBOP (1,2 Äq, 0,73 mmol) und 107 mg THP-Hydroxylamin (1,5 Äq, 0,92 mmol) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, in 25 ml EtOAc aufgenommen, mit 25 ml 1 M wässriger Natriumcarbonatlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und erneut am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet. Das Produkt wird in möglichst wenig Chloroform mit 0,5 % TEA gelöst und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform: MeOH: TEA; 99,5 %: 0 %: 0,5 % bis 99 %: 0,5 %: 0,5 %, V/V/V). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und in 10 ml THF aufgenommen. Es werden drei Tropfen konzentrierte HCl_{aq} zugetropft und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird das Produkt am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, aus Chloroform auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform: MeOH: HCOOH; 99,8 %: 0 %: 0,2 % bis 89,8 %: 10 %: 0,2 %, V/V/V). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und mittels HPLC (Methode P1) gereinigt. Das Produkt wird bei -20°C lichtgeschützt gelagert.

Beschaffenheit: Farbloser amorpher Feststoff.

Ausbeute: 68,0 %

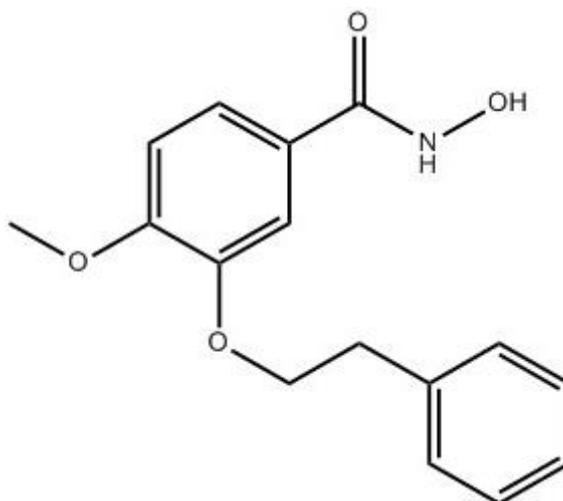
HPLC: rt 10,73 min (99,91 %)

¹H-NMR [(CD₃)₂SO, ppm]: δ = 3,78 (s, 3H, Ar-O-CH₃), 5,12 (s, 2H, Ar-O-CH₂-Ar'), 7,04 (d, 1H, Ar_{C5}-H, J = 8,4 Hz), 7,42 (m, 2H, Ar_{C2}-H & Ar'_{C6}-H), 7,48 (dd, 1H, Ar'_{C5}-H, J₁ = 2 Hz, J₂ = 8,0 Hz), 7,60 (d, 1H, Ar_{C6}-H, J = 8,0 Hz), 7,76 (d, 1H, Ar'_{C3}-H, J = 2,0 Hz), 8,90 (s, 1H, CO-NH-OH), 11,07 (s, 1H, NH-OH).

HR-MS m/z: 342,0289 [M+H]⁺; berechnet für C₁₅H₁₄Cl₂NO₄⁺: 342,0300

6d (PZ028)

3-[(Ethylbenzol)oxy]-4-methoxybenzhydroxamsäure



250 mg **2** (1 Äq, 1,4 mmol) werden in 20 ml DMF gelöst und im Eisbad auf 0°C gekühlt, bevor 568 mg Kaliumcarbonat (3 Äq, 4,1 mmol) und 280 µl 2-Bromethylbenzol (1,5 Äq, 2,1 mmol) langsam unter Rühren hinzugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt werden. Anschließend wird das Reaktionsgemisch 4 h bei 80°C gerührt, nach abkühlen mit 300 ml gesättigter NaCl_{aq} versetzt, drei Mal mit 50 ml EtOAc und drei Mal mit 50 ml Chloroform ausgeschüttelt. Das Produkt, gelöst in den organischen Phasen, wird am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, aus Chloroform auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform; 100 %). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

Das Produkt wird in 20 ml MeOH und 5 ml 1 M NaOH_{aq} aufgenommen, über Nacht bei Raumtemperatur und 3 h unter Reflux gerührt. Im Anschluss wird das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, in 50 ml Wasser aufgenommen, mit etwas 1 M HCl_{aq} angesäuert und drei Mal mit 50 ml EtOAc ausgeschüttelt. Die organische Phase wird mit 25 ml 4 M NaCl_{aq} gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird aus Chloroform auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform: MeOH; 100 %: 0 % bis 97 %: 3 %, V/V). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

103 mg des Produktes (1 Äq, 0,46 mmol) werden in 20 ml THF gelöst. Anschließend werden 120 µl DIPEA (1,5 Äq, 0,69 mmol), 277 mg PyBOP (1,2 Äq, 0,55 mmol) und 133 mg THP-Hydroxylamin (1,5 Äq, 0,69 mmol) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch über Nacht bei

Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, in 25 ml EtOAc aufgenommen, mit 25 ml 1 M wässriger Natriumcarbonatlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und erneut am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet. Das Produkt wird in möglichst wenig Chloroform mit 0,5 % TEA gelöst und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform: MeOH: TEA; 99,5 %: 0 %: 0,5 % bis 99 %: 0,5 %: 0,5 %, V/V/V). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und in 10 ml THF aufgenommen. Es werden fünf Tropfen konzentrierte HCl_{aq} zugetropft und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird das Produkt am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, aus Chloroform auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform: HCOOH ; 99,5 %: 0,5 %; V/V). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und mittels HPLC (Methode P1) gereinigt. Das Produkt wird bei -20°C lichtgeschützt gelagert.

Beschaffenheit: Farbloser amorpher Feststoff.

Ausbeute: 18,5 %

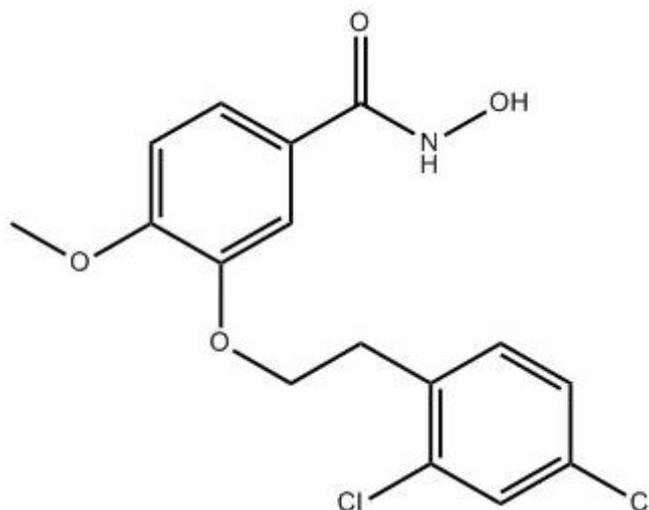
HPLC: rt 12,14 min (96,94 %)

$^1\text{H-NMR}$ [$(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, ppm]: $\delta = 1,71$ (m, 1H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-Ar}'$), 3,77 (s, 3H, Ar-O-CH_3), 4,17 (t, 2H, $\text{Ar-O-CH}_2\text{-CH}_2$, $J = 7,2$ Hz), 6,99 (d, 1H, $\text{Ar}_{\text{C}_5}\text{-H}$, $J = 8,0$ Hz), 7,21 (m, 1H, $\text{Ar}'_{\text{C}_4}\text{-H}$), 7,32 (m, 6H, $\text{Ar}_{\text{C}_2}\text{-H}$, $\text{Ar}_{\text{C}_6}\text{-H}$, $\text{Ar}'_{\text{C}_2}\text{-H}$, $\text{Ar}'_{\text{C}_3}\text{-H}$, $\text{Ar}'_{\text{C}_5}\text{-H}$ & $\text{Ar}'_{\text{C}_6}\text{-H}$), 8,86 (s, 1H, CO-NH-OH), 11,03 (s, 1H, NH-OH).

HR-MS m/z : 288,1232 $[\text{M}+\text{H}]^+$; berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{NO}_4^+$: 288,1236

6e (PZ029)

3-[(2,4-Dichlorethylbenzol)oxy]-4-methoxybenzhydroxamsäure



300 mg **2** (1 Äq, 1,7 mmol) werden in 50 ml Aceton gelöst, 684 mg Kaliumcarbonat (3 Äq, 5,0 mmol), 495 mg Natriumiodid (2 Äq, 3,3 mmol) und 2514 mg 2,4-Dichlorphenethylbromid (6 Äq, 9,9 mmol) hinzugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch 8 h unter Reflux und vier Wochen bei Raumtemperatur gerührt, mit 300 ml gesättigter NaCl_{aq} versetzt und drei Mal mit 50 ml EtOAc ausgeschüttelt. Das Produkt, gelöst in der EtOAc-Phase, wird am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, aus Chloroform auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: n-Hexan: EtOAc; 100 %: 0 % bis 67 %: 33 %). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

Das Produkt wird in 20 ml MeOH und 5 ml 1 M NaOH_{aq} aufgenommen und 3 h unter Reflux gerührt. Im Anschluss wird das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, in 50 ml Wasser aufgenommen, mit etwas 1 M HCl_{aq} neutralisiert und drei Mal mit 50 ml EtOAc ausgeschüttelt. Die organische Phase wird mit 25 ml 4 M NaCl_{aq} gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

50 mg des Produktes (1 Äq, 0,15 mmol) werden in 20 ml THF gelöst. Anschließend werden 40 μl DIPEA (1,5 Äq, 0,23 mmol), 90 mg PyBOP (1,2 Äq, 0,18 mmol) und 27 mg THP-Hydroxylamin (1,5 Äq, 0,23 mmol) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, in 25 ml EtOAc aufgenommen, mit 25 ml 1 M wässriger Natriumcarbonatlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und erneut am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet. Das Produkt wird in möglichst wenig Chloroform mit 0,5 % TEA gelöst und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform: MeOH: TEA; 99,5 %: 0 %: 0,5 % bis 94,5 %: 5 %: 0,5 %, V/V/V). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und in 10 ml THF aufgenommen. Es werden fünf Tropfen konzentrierte HCl_{aq} zugetropft und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird das Produkt am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, aus Chloroform auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform: HCOOH; 99,5 %: 0,5 %; V/V). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und mittels HPLC (Methode P1) gereinigt. Das Produkt wird bei -20°C lichtgeschützt gelagert.

Beschaffenheit: Roter amorpher Feststoff.

Ausbeute: 9,1 %

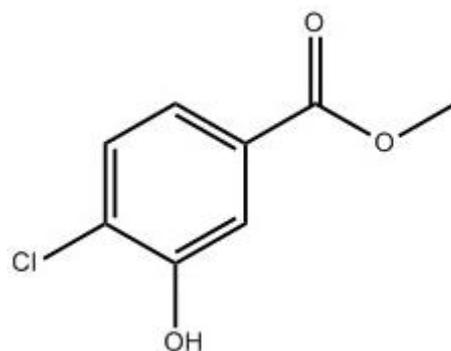
HPLC: rt 15,99 min (ca. 60 %)

$^1\text{H-NMR}$ [$(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, ppm]: $\delta = 3,15$ (s, 1H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-Ar}'$), $3,77$ (s, 3H, Ar-O-CH_3), $4,18$ (s, 2H, $\text{Ar-O-CH}_2\text{-CH}_2$), $7,00$ (s, 1H, $\text{Ar}_{\text{C}5}\text{-H}$), $7,49$ (m, 5H, $\text{Ar}_{\text{C}2}\text{-H}$, $\text{Ar}_{\text{C}6}\text{-H}$, $\text{Ar}'_{\text{C}3}\text{-H}$, $\text{Ar}'_{\text{C}5}\text{-H}$ & $\text{Ar}'_{\text{C}6}\text{-H}$), $8,87$ (s, 1H, CO-NH-OH), $11,02$ (s, 1H, NH-OH).

HR-MS m/z: 356,0454 $[\text{M}+\text{H}]^+$; berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{NO}_4^+$: 356,0456

8 (PZ012)

Methyl-4-chlor-3-hydroxybenzoat



300 mg 4-Chlor-3-hydroxybenzoesäure (1 Äq, 1,7 mmol) werden in 50 ml MeOH gelöst und im Eisbad auf 0°C gekühlt. Anschließend werden 372 μl Thionylchlorid (3 Äq, 5,1 mmol) tröpfchenweise unter Rühren hinzugegeben und das Reaktionsgemisch langsam auf Raumtemperatur aufgewärmt. Im Anschluss wird die Reaktion für 3 h unter Reflux erhitzt, über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und danach am Rotationsverdampfer das Lösungsmittel und überschüssiges Thionylchlorid unter Vakuum entfernt. Der zurückbleibende Feststoff wird aus Chloroform auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform; 100 %). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet. Das Produkt wird bei -20°C lichtgeschützt gelagert.

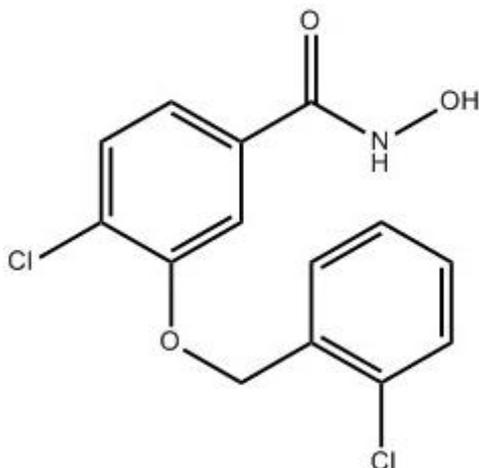
Beschaffenheit: Farbloser amorpher Feststoff.

Ausbeute: 99,3 %

$^1\text{H-NMR}$ [$(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, ppm]: $\delta = 3,81$ (s, 3H, CO_2CH_3), $7,36$ (dd, 1H, $\text{Ar}_{\text{C}6}\text{-H}$, $J_1 = 2,0$ Hz, $J_2 = 8,0$ Hz), $7,46$ (d, 1H, $\text{Ar}_{\text{C}5}\text{-H}$, $J = 8,4$ Hz), $7,54$ (d, 1H, $\text{Ar}_{\text{C}2}\text{-H}$, $J = 2,0$ Hz), $10,63$ (s, 1H, Ar-OH).

12a (PZ013)

4-Chlor-3-[(2-chlorbenzyl)oxy]-benzhydroxamsäure



312 mg **8** (1 Äq, 1,7 mmol) werden in 20 ml DMF gelöst und im Eisbad auf 0°C gekühlt, bevor 703 mg Kaliumcarbonat (3 Äq, 5,1 mmol) und 349 µl 2-Chlorbenzylbromid (1,5 Äq, 2,6 mmol) langsam unter Rühren hinzugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt werden. Anschließend wird das Reaktionsgemisch 3 h unter Reflux erhitzt, mit 300 ml gesättigter NaCl_{aq} versetzt und drei Mal mit 100 ml EtOAc ausgeschüttelt. Das Produkt, gelöst in der EtOAc-Phase, wird am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, aus Chloroform auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform; 100 %). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

Das Produkt wird in 15 ml MeOH und 5 ml 1 M NaOH_{aq} aufgenommen und 3 h unter Reflux gerührt. Im Anschluss wird das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, in 50 ml Wasser aufgenommen, mit etwas 1 M HCl_{aq} neutralisiert und drei Mal mit 50 ml EtOAc ausgeschüttelt. Die organische Phase wird mit 25 ml 4 M NaCl_{aq} gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird aus Chloroform auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform: 100 %). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

411 mg des Produktes (1 Äq, 1,4 mmol) werden in 15 ml THF gelöst. Anschließend werden 360 µl DIPEA (1,5 Äq, 2,1 mmol), 864 mg PyBOP (1,2 Äq, 1,7 mmol) und 243 mg THP-Hydroxylamin (1,5 Äq, 2,1 mmol) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, in 25 ml EtOAc aufgenommen, mit 25 ml 1 M wässriger Natriumcarbonatlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und erneut am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet. Das Produkt wird in möglichst wenig Chloroform mit 0,5 % TEA gelöst und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient:

Chloroform: TEA; 99,5 %: 0,5 % V/V). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und in 10 ml THF aufgenommen. Es werden drei Tropfen konzentrierte HCl_{aq} zugetropft und über drei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird das Produkt am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, aus Chloroform auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform: MeOH: HCOOH; 99,5 %: 0 %: 0,5 % bis 84,5 %: 15 %: 0,5 %, V/V/V). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und mittels HPLC (Methode P1) gereinigt. Das Produkt wird bei -20°C lichtgeschützt gelagert.

Beschaffenheit: Farbloser amorpher Feststoff.

Ausbeute: 42,2 %

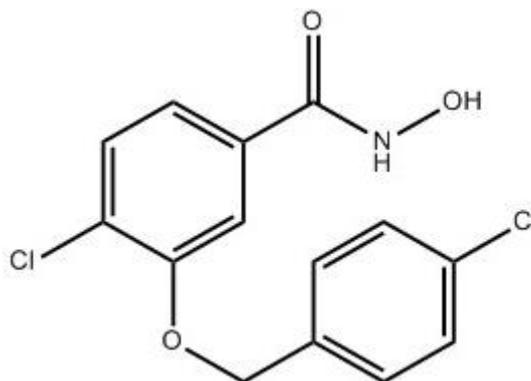
HPLC: rt 10,01 min (99,55 %)

$^1\text{H-NMR}$ [$(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, ppm]: $\delta = 5,29$ (s, 2H, Ar-O-**CH**₂-Ar'), 7,39 (m, 3H, Ar'_{C4}-**H**, Ar'_{C5}-**H** & Ar'_{C6}-**H**), 7,53 (m, 2H, Ar_{C2}-**H** & Ar_{C6}-**H**), 7,60 (d, 1H, Ar'_{C3}-**H**, $J = 1,6$ Hz), 7,64 (m, 1H, Ar_{C5}-**H**), 9,11 (s, 1H, CO-N**H**-OH), 11,31 (s, 1H, NH-O**H**).

HR-MS m/z : 312,0189 $[\text{M}+\text{H}]^+$; berechnet für $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{NO}_3^+$: 312,0194

12b (PZ015)

4-Chlor-3-[(4-Chlorbenzyl)oxy]-benzhydroxamsäure



140 mg **8** (1 Äq, 0,75 mmol) werden in 20 ml DMF gelöst und im Eisbad auf 0°C gekühlt, bevor 311 mg Kaliumcarbonat (3 Äq, 2,3 mmol) und 231 mg 4-Chlorbenzylbromid (1,5 Äq, 1,1 mmol) langsam unter Rühren hinzugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt werden. Anschließend wird das Reaktionsgemisch 90 min unter Reflux gerührt, nach abkühlen mit 300 ml gesättigter NaCl_{aq} versetzt und drei Mal mit 100 ml EtOAc ausgeschüttelt. Das Produkt, gelöst in der EtOAc-Phase, wird am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, aus Chloroform auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform; 100 %). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

Das Produkt wird in 20 ml MeOH und 5 ml 1 M NaOH_{aq} aufgenommen und 3 h unter Reflux gerührt. Im Anschluss wird das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, in 50 ml Wasser aufgenommen, mit etwas 1 M HCl_{aq} neutralisiert und drei Mal mit 50 ml EtOAc ausgeschüttelt. Die organische Phase wird mit 25 ml 4 M NaCl_{aq} gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird aus Chloroform auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform; 100 %). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

170 mg des Produktes (1 Äq, 0,57 mmol) werden in 20 ml THF gelöst. Anschließend werden 156 µl DIPEA (1,5 Äq, 0,9 mmol), 375 mg PyBOP (1,2 Äq, 0,75 mmol) und 105 mg THP-Hydroxylamin (1,5 Äq, 0,9 mmol) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, in 25 ml EtOAc aufgenommen, mit 25 ml 1 M wässriger Natriumcarbonatlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und erneut am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet. Das Produkt wird in möglichst wenig Chloroform mit 0,5 % TEA gelöst und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform: TEA; 99,5 %: 0,5 % V/V). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und in 10 ml THF aufgenommen. Es werden fünf Tropfen konzentrierte HCl_{aq} zugetropft und über drei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird das Produkt am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, aus Chloroform auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform: MeOH: HCOOH; 99,5 %: 0 %: 0,5 % bis 96,5 %: 3 %: 0,5 %, V/V/V). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und mittels HPLC (Methode P1) gereinigt. Das Produkt wird bei -20°C lichtgeschützt gelagert.

Beschaffenheit: Farbloser amorpher Feststoff.

Ausbeute: 47,0 %

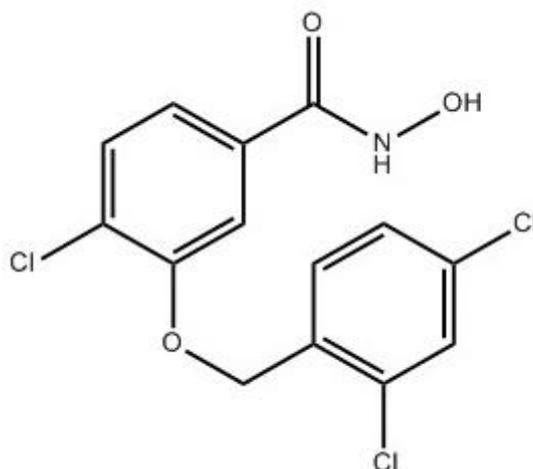
HPLC: rt 10,05 min (99,94 %)

¹H-NMR [(CD₃)₂SO, ppm]: δ = 5,24 (s, 2H, Ar-O-CH₂-Ar'), 7,35 (dd, 1H, Ar_{C6}-H, J₁ = 2,0 Hz, J₂ = 8,4), 7,49 (m, 5H, Ar_{C5}-H, Ar'_{C2}-H, Ar'_{C3}-H, Ar'_{C5}-H & Ar'_{C6}-H) 7,57 (d, 1H, Ar_{C2}-H, J = 2,0 Hz), 9,09 (s, 1H, CO-NH-OH), 11,26 (s, 1H, NH-OH).

HR-MS m/z: 312,0180 [M+H]⁺; berechnet für C₁₄H₁₂Cl₂NO₃⁺: 312,0194

12c (PZ017)

4-Chlor-3-[(2,4-Dichlorbenzyl)oxy]-benzhydroxamsäure



140 mg **8** (1 Äq, 0,75 mmol) werden in 20 ml DMF gelöst und im Eisbad auf 0°C gekühlt, bevor 311 mg Kaliumcarbonat (3 Äq, 2,3 mmol) und 270 mg 2,4-Dichlorbenzylbromid (1,5 Äq, 1,1 mmol) langsam unter Rühren hinzugegeben werden. Anschließend wird das Reaktionsgemisch, nach langsamem Erwärmen, über Nacht bei Raumtemperatur gerührt bevor es für 90 min bei 80°C gerührt wird. Das Reaktionsgemisch wird nach Abkühlen auf Raumtemperatur mit 50 ml 1 M NaCl_{aq} versetzt und anschließend das Produkt drei Mal mit 50 ml EtOAc ausgeschüttelt. Das Produkt, gelöst in der EtOAc-Phase, wird am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, aus Chloroform auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform; 100 %). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

Das Produkt wird in 20 ml MeOH und 5 ml 1 M NaOH_{aq} aufgenommen und 3 h unter Reflux gerührt. Im Anschluss wird das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, in 50 ml Wasser aufgenommen, mit etwas 1 M HCl_{aq} neutralisiert und drei Mal mit 50 ml EtOAc ausgeschüttelt. Die organische Phase wird mit 25 ml 4 M NaCl_{aq} gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird aus Chloroform auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform: MeOH; 100 %: 0 % bis 97 %: 3 %, V/V). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

165 mg des Produktes (1 Äq, 0,5 mmol) werden in 15 ml THF gelöst. Anschließend werden 156 µl DIPEA (1,8 Äq, 0,9 mmol), 375 mg PyBOP (1,5 Äq, 0,75 mmol) und 105 mg THP-Hydroxylamin (1,8 Äq, 0,9 mmol) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, in 25 ml EtOAc aufgenommen, mit 25 ml 1 M wässriger Natriumcarbonatlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und erneut am

Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet. Das Produkt wird in möglichst wenig Chloroform mit 0,2 % TEA gelöst und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform: TEA; 99,8 %: 0,2 % V/V). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und in 10 ml THF aufgenommen. Es werden fünf Tropfen konzentrierte HCl_{aq} zugetropft und über drei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird das Produkt am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, aus Chloroform auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform: MeOH: HCOOH; 99,5 %: 0 %: 0,5 % bis 96,5 %: 3 %: 0,5 %, V/V/V). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und mittels HPLC (Methode P1) gereinigt. Das Produkt wird bei -20°C lichtgeschützt gelagert.

Beschaffenheit: Farbloser amorpher Feststoff.

Ausbeute: 36,5 %

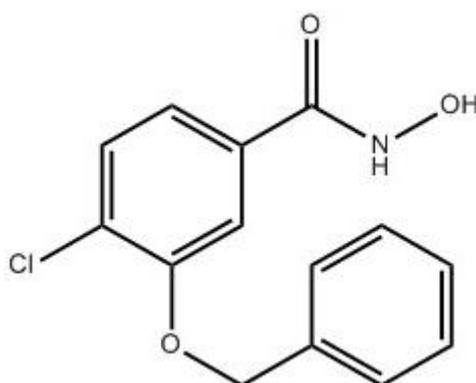
HPLC: rt 11,03 min (97,07 %)

$^1\text{H-NMR}$ [$(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, ppm]: $\delta = 5,27$ (s, 2H, Ar-O-**CH**₂-Ar'), 7,38 (dd, 1H, Ar'_{C5}-**H**, $J_1 = 1,6$ Hz, $J_2 = 12$ Hz), 7,53 (m, 2H, Ar_{C6}-**H** & Ar'_{C6}-**H**), 7,59 (d, 1H, Ar_{C2}-**H**, $J = 1,6$ Hz), 7,65 (d, 1H, Ar_{C5}-**H**, $J = 8,4$ Hz), 7,70 (d, 1H, Ar'_{C3}-**H**, $J = 2,0$ Hz), 9,11 (s, 1H, CO-N**H**-OH), 11,31 (s, 1H, NH-O**H**).

HR-MS m/z: 345,9809 [M-H]⁻; berechnet für $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{Cl}_3\text{NO}_3^+$: 345,9805

12d (PZ027)

3-Benzyloxy-4-chlorbenzhydroxamsäure



320 mg **8** (1 Äq, 1,72 mmol) werden in 25 ml DMF gelöst und im Eisbad auf 0°C gekühlt, bevor 500 mg Kaliumcarbonat (2 Äq, 3,6 mmol) und 310 μl Benzylbromid (1,5 Äq, 2,5 mmol) langsam unter Rühren hinzugegeben werden. Es wird 3 h unter Reflux gerührt, nach abkühlen mit 50 ml gesättigter NaCl_{aq} versetzt und drei Mal mit 80 ml Chloroform ausgeschüttelt. Das Produkt, gelöst in der Chloroform-Phase, wird am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, aus Chloroform auf Kieselgel adsorbiert und

säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform; 100 %). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

Das Produkt wird in 20 ml MeOH und 5 ml 1 M NaOH_{aq} aufgenommen, 3 h unter Reflux und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wird das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, in 50 ml Wasser aufgenommen, mit etwas 1 M HCl_{aq} neutralisiert und drei Mal mit 80 ml EtOAc ausgeschüttelt. Die organische Phase wird mit 25 ml 1 M Natriumcarbonatlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird aus Chloroform auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform: MeOH; 100 %: 0 % bis 97 %: 3 %). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

85 mg des Produktes (1 Äq, 0,31 mmol) werden in 20 ml THF gelöst. Anschließend werden 81 µl DIPEA (1,5 Äq, 0,47 mmol), 194 mg PyBOP (1,2 Äq, 0,37 mmol) und 55 mg THP-Hydroxylamin (1,5 Äq, 0,47 mmol) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, in 25 ml EtOAc aufgenommen, mit 25 ml 1 M wässriger Natriumcarbonatlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und erneut am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet. Das Produkt wird in möglichst wenig Chloroform mit 0,5 % TEA gelöst und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform: TEA; 99,5 %: 0,5 % V/V). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und in 10 ml THF aufgenommen. Es werden fünf Tropfen konzentrierte HCl_{aq} zugetropft und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird das Produkt am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, aus Chloroform auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform: MeOH: HCOOH; 99,5 %: 0 %: 0,5 % bis 96,5 %: 3 %: 0,5 %, V/V/V). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und mittels HPLC (Methode P1) gereinigt. Das Produkt wird bei -20°C lichtgeschützt gelagert.

Beschaffenheit: Farbloser amorpher Feststoff.

Ausbeute: 11,5 %

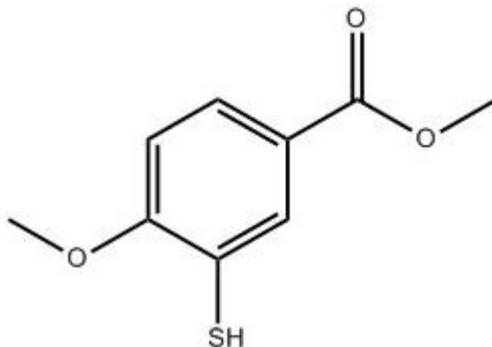
HPLC: rt 13,48 min (99,13 %)

¹H-NMR [(CD₃)₂SO, ppm]: δ = 5,24 (s, 2H, Ar-O-CH₂-Ar'), 7,35 (m, 2H, Ar'_{C3}-H, Ar'_{C5}-H), 7,40 (m, 2H, Ar'_{C2}-H & Ar'_{C6}-H), 7,46 (m, 2H, Ar_{C6}-H & Ar'_{C4}-H), 7,52 (d, 1H, Ar_{C5}-H, J = 8,0 Hz), 7,58 (d, 1H, Ar_{C2}-H, J = 2,0), 9,09 (s, 1H, CO-NH-OH), 11,21 (s, 1H, NH-OH).

HR-MS m/z: 278,0581 [M+H]⁺; berechnet für C₁₄H₁₃ClNO₃⁺: 278,0584

15 (PZ008)

Methyl-3-mercapto-4-methoxybenzoat



1 g **2** (1 Äq, 5,5 mmol) wird in einem getrockneten und ausgeheizten Dreihalskolben in 50 ml DMF gelöst, unter Argonrückstrom mit 800 mg Natriumhydrid (6 Äq, 33,3 mmol) versetzt und 10 min bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre gerührt. Es wird fünf Mal mit Argon sekuriert und unter Argonrückstrom 1 g Dimethylthiocarbamoylchlorid (1,5 Äq, 8,1 mmol) hinzugegeben. Es wird erneut drei Mal mit Argon sekuriert und anschließend der Reaktionsansatz fünf Tage bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wird mit 50 ml Chloroform verdünnt, vorsichtig mit etwas Wasser versetzt und mit 1 M HCl_{aq} neutralisiert. Die beiden Phasen werden getrennt und die wässrige Phase zwei Mal mit 50 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die organischen Phasen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet. Der braune Rückstand wird mit wenig MeOH versetzt, der ungelöste weiße Feststoff abgesaugt und über Nacht im Exsikkator getrocknet.

487 mg des Produktes (1 Äq, 1,9 mmol) werden mit 4 ml aufgewärmtem Diphenylether versetzt und zwei Mal für 50 min bei 280°C im Microwellenreaktor gerührt. Die Reaktionslösung wird direkt säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: *n*-Hexan unter diskontinuierlicher Zugabe von EtOAc 0 % bis 50 %). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

Das Produkt wird in 10 ml MeOH aufgenommen, mit 5 ml 1 M NaOH_{aq} versetzt und drei Tage bei Raumtemperatur gerührt, bevor die Reaktionslösung 3 h unter Reflux erhitzt wird. Anschließend wird die Lösung mit 1 M HCl_{aq} angesäuert (pH = 4), drei Mal mit 25 ml Chloroform ausgeschüttelt und die organische Phase einrotiert. Das Rohprodukt wird aus Chloroform auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform: MeOH; 100 %: 0 % bis 95 %: 5 %, V/V). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet. Das Produkt wird bei -20°C lichtgeschützt gelagert.

100 mg des Produktes (1 Äq, 0,54 mmol) werden in 10 ml MeOH gelöst und im Eisbad auf 0°C gekühlt. Anschließend werden 119 µl Thionylchlorid (3 Äq, 1,63 mmol) tröpfchenweise

unter Rühren hinzugegeben und das Reaktionsgemisch langsam auf Raumtemperatur aufgewärmt. Im Anschluss wird die Reaktion für 3 h unter Reflux erhitzt und danach am Rotationsverdampfer das Lösungsmittel und überschüssiges Thionylchlorid unter Vakuum entfernt. Das Produkt wird bei -20°C lichtgeschützt gelagert.

Beschaffenheit: Farbloser amorpher Feststoff.

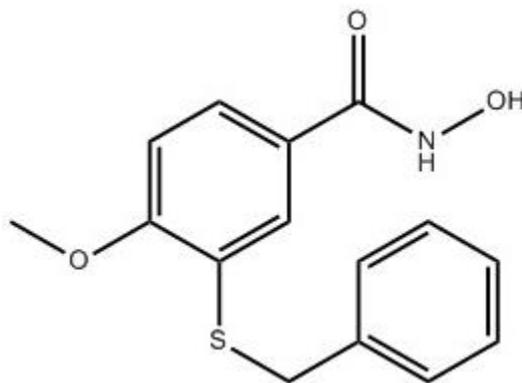
Ausbeute: 25,6 %

$^1\text{H-NMR}$ [$(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, ppm]: δ = 3,79 (s, 3H, Ar-O-**CH**₃), 3,88 (s, 3H, CO₂**CH**₃), 5,25 (s, 1H, Ar-**S****H**), 7,06 (d, 1H, Ar_{C5}-**H**, J = 8,8 Hz), 7,72 (dd, 1H, Ar_{C6}-**H**, J_1 = 8,4 Hz, J_2 = 2,0 Hz), 7,95 (d, 1H, Ar_{C2}-**H**, J = 2,0 Hz).

MS m/z : 197,27 [M-H]⁻

19a (PZ031)

3-Benzylthio-4-methoxybenzhydroxamsäure



107 mg **15** (1 Äq, 0,54 mmol) werden in 20 ml DMF gelöst und mit 250 mg DTT (3 Äq, 1,6 mmol) versetzt. Der Kolben wird fünf Mal mit Argon sekuriert und das Reaktionsgemisch 30 min bei Raumtemperatur gerührt, bevor 224 mg Kaliumcarbonat (3 Äq, 1,6 mmol) und 193 μl Benzylbromid (3 Äq, 1,6 mmol) langsam unter Argon Rückstrom hinzugegeben werden. Es wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, bevor 386 μl Benzylbromid (3 Äq, 3,2 mmol) hinzugegeben werden. Im Anschluss wird das Reaktionsgemisch vier Tage bei Raumtemperatur gerührt, am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, aus Chloroform auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: n-Hexan: EtOAc; 100 %: 0 % bis 90 %: 10 %). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

Das Produkt wird in 20 ml MeOH und 10 ml 1 M NaOH_{aq} aufgenommen, 3 h unter Reflux und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wird das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, in 50 ml Wasser aufgenommen, mit 1 M

HCl_{aq} neutralisiert und zwei Mal mit 80 ml EtOAc ausgeschüttelt. Die organische Phase wird am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

188 mg des Rohproduktes (1 Äq, 0,54 mmol) werden in 20 ml THF gelöst. Anschließend werden 232 µl DIPEA (2,3 Äq, 1,3 mmol), 525 mg PyBOP (2,3 Äq, 1,3 mmol) und 147 mg THP-Hydroxylamin (2,3 Äq, 1,3 mmol) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, in 25 ml EtOAc aufgenommen, mit 25 ml 1 M wässriger Natriumcarbonatlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und erneut am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet. Das Produkt wird in möglichst wenig Chloroform mit 0,2 % TEA gelöst und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform: TEA; 99,8 %: 0,2 % V/V). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und in 10 ml THF aufgenommen. Es werden fünf Tropfen konzentrierte HCl_{aq} zugetropft und über drei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird das Produkt am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, aus Chloroform auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform: MeOH: HCOOH; 99,5 %: 0 %: 0,5 % bis 96,5 %: 3 %: 0,5 %, V/V/V). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und mittels HPLC (Methode P1) gereinigt. Das Produkt wird bei -20°C lichtgeschützt gelagert.

Beschaffenheit: Farbloser amorpher Feststoff.

Ausbeute: 10,3 %

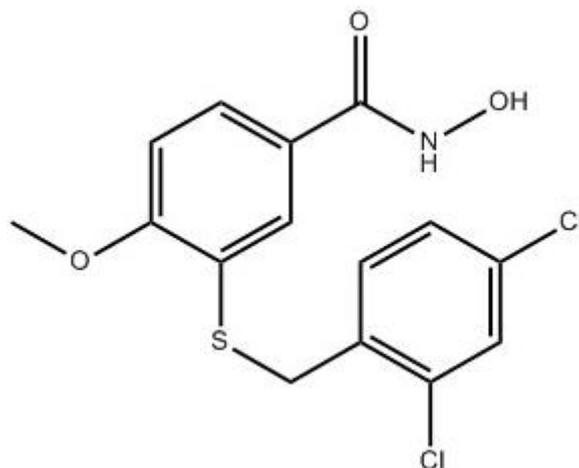
HPLC: rt 12,05 min (98,78 %)

¹H-NMR [(CD₃)₂SO, ppm]: δ = 3,84 (s, 1H, Ar-O-CH₃), 4,18 (s, 2H, Ar-S-CH₂-Ar'), 7,02 (d, 1H, Ar_{C5}-H, J = 8,4 Hz), 7,22 (m, 1H, Ar'_{C4}-H), 7,30 (m, 4H, Ar'_{C2}-H, Ar'_{C3}-H, Ar'_{C5}-H, Ar'_{C6}-H), 7,59 (dd, 1H, Ar_{C6}-H, J₁ = 2,0 Hz, J₂ = 8,4), 7,66 (d, 1H, Ar_{C2}-H, J = 2,0), 8,91 (s, 1H, CO-NH-OH), 11,09 (s, 1H, NH-OH).

HR-MS m/z: 290,0844 [M+H]⁺; berechnet für C₁₅H₁₆NO₃S⁺: 290,0851

19b (PZ022)

3-[(2,4-Dichlorbenzyl)thio]-4-methoxybenzhydroxamsäure



100 mg **15** (1 Äq, 0,54 mmol) werden in 20 ml DMF gelöst und mit 251 mg DTT (3 Äq, 1,6 mmol) versetzt. Der Kolben wird fünf Mal mit Argon sekuriert und das Reaktionsgemisch 30 min bei Raumtemperatur gerührt, bevor 225 mg Kaliumcarbonat (3 Äq, 1,6 mmol) und 196 mg 2,4-Dichlorbenzylbromid (1,5 Äq, 0,82 mmol) langsam unter Argon Rückstrom hinzugegeben werden. Es wird vier Tage bei Raumtemperatur und 5 h unter Reflux gerührt, mit 25 ml 4 M NaCl_{aq} versetzt und drei Mal mit 50 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die organische Phase wird am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, der Rückstand aus Chloroform auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform: MeOH; 100 %: 0 % bis 92 %: 8 %). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

Das Produkt wird in 15 ml MeOH und 5 ml 1 M NaOH_{aq} aufgenommen, 6 h unter Reflux und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Es wird mit 1 M HCl_{aq} neutralisiert und drei Mal mit 30 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die organische Phase wird am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, der Rückstand aus Chloroform auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform: MeOH; 100 %: 0 % bis 92 %: 8 %). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

100 mg des Produktes (1 Äq, 0,31 mmol) werden in 10 ml THF gelöst. Anschließend werden 78 µl DIPEA (1,5 Äq, 0,45 mmol), 181 mg PyBOP (1,2 Äq, 0,35 mmol) und 53 mg THP-Hydroxylamin (1,5 Äq, 0,45 mmol) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, in 25 ml EtOAc aufgenommen, mit 25 ml 1 M wässriger Natriumcarbonatlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und erneut am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet. Das Produkt wird in möglichst wenig Chloroform mit 0,5 % TEA gelöst und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform: TEA; 99,5 %: 0,5 % V/V). Die Produktfraktionen werden am

Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und in 5 ml THF aufgenommen. Es werden fünf Tropfen konzentrierte HCl_{aq} zugetropft und über Nacht bei Raumtemperatur und 2,5 h unter Reflux gerührt. Danach wird das Produkt am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, aus Chloroform auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform: MeOH: HCOOH; 99,5 %: 0 %: 0,5 % bis 99 %: 0,5 %: 0,5 %, V/V/V). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und mittels HPLC (Methode P1) gereinigt. Das Produkt wird bei -20°C lichtgeschützt gelagert.

Beschaffenheit: Farbloser amorpher Feststoff.

Ausbeute: 13,3 %

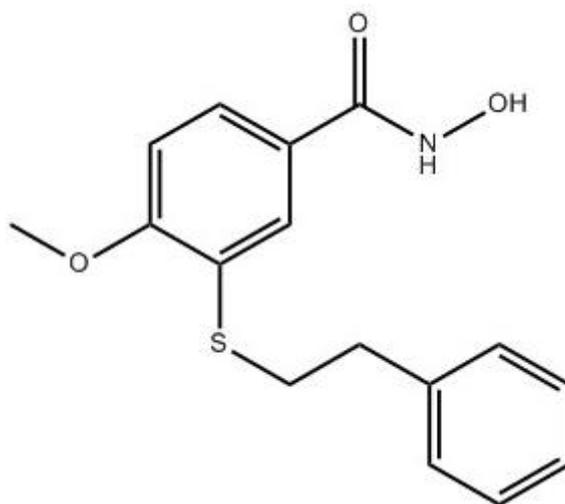
HPLC: rt 12,65 min (98,45 %)

$^1\text{H-NMR}$ [$(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, ppm]: $\delta = 3,83$ (s, 1H, Ar-O-CH₃), 4,23 (s, 2H, Ar-S-CH₂-Ar'), 7,04 (d, 1H, Ar_{C5}-H, J = 8,8 Hz), 7,32 (m, 1H, Ar'_{C6}-H), 7,35 (m, 1H, Ar'_{C5}-H), 7,59 (d, 1H, Ar_{C2}-H, J = 2,0 Hz), 7,66 (m, 2H, Ar_{C6}-H & Ar'_{C3}-H), 8,91 (s, 1H, CO-NH-OH), 11,10 (s, 1H, NH-OH).

HR-MS m/z: 358,0069 [M+H]⁺; berechnet für C₁₅H₁₄Cl₂NO₃S⁺: 358,0071

19c (PZ036)

4-methoxy-3-(phenethylthio)benzhydroxamsäure



100 mg **15** (1 Äq, 0,54 mmol) werden in 10 ml DMF gelöst und mit 270 mg DTT (3,4 Äq, 1,7 mmol), 240 mg Kaliumcarbonat (3,4 Äq, 1,7 mmol) und 1000 μl 2-Bromethylbenzen (14,6 Äq, 7,3 mmol) versetzt. Es wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, mit 15 ml 4 M NaCl_{aq} versetzt und drei Mal mit 15 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die organische Phase wird am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, der Rückstand in Chloroform aufgenommen, über Natriumsulfat getrocknet, aus Chloroform auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch mittels MPLC (Gradient: n-Hexan: EtOAc; 98 %: 2 % bis 50 %:

50 %) gereinigt. Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

Das Produkt wird in 25 ml MeOH und 12 ml 1 M NaOH_{aq} aufgenommen, 3 h unter Reflux und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wird am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und der Rückstand in Wasser aufgenommen. Es wird mit 1 M HCl_{aq} neutralisiert und drei Mal mit 20 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die organische Phase wird am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

92 mg des Produktes (1 Äq, 0,32 mmol) werden in 10 ml THF gelöst. Anschließend werden 81 µl DIPEA (1,5 Äq, 0,48 mmol), 200 mg PyBOP (1,2 Äq, 0,38 mmol) und 55 mg THP-Hydroxylamin (1,5 Äq, 0,48 mmol) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch drei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und in möglichst wenig Chloroform mit 0,5 % TEA gelöst und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform: TEA: MeOH; 99,5 %: 0,5 %: 0 % bis 98,5 %: 0,5 %: 1 % V/V/V). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und in 10 ml THF aufgenommen. Es wird 1 ml 1 M HCl_{aq} zugetropft und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird das Produkt am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, aus Chloroform auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform: HCOOH: MeOH; 99,5 %: 0,5 %: 0 % bis 89,5 %: 0,5 %: 10 %, V/V/V). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und mittels HPLC (Methode P1) gereinigt. Das Produkt wird bei -20°C lichtgeschützt gelagert.

Beschaffenheit: Farbloser amorpher Feststoff.

Ausbeute: 17,4 %

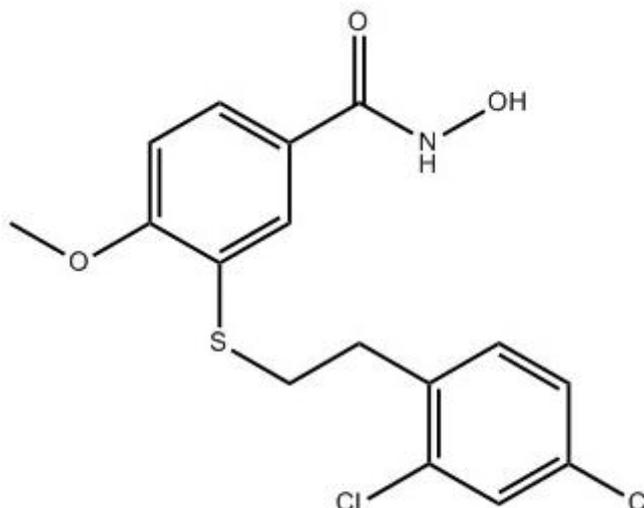
HPLC: rt 11,53 min (97,89 %)

¹H-NMR [(CD₃)₂SO, ppm]: δ = 2,87 (s, 2H, S-CH₂-CH₂-Ar'), 3,17 (m, 2H, S-CH₂-CH₂), 3,84 (s, 1H, Ar-O-CH₃), 7,03 (s, 1H, Ar_{C5}-H), 7,28 (m, 5H, Ar'_{C2}-H, Ar'_{C3}-H, Ar'_{C4}-H, Ar'_{C5}-H & Ar'_{C6}-H), 7,63 (m, 2H, Ar_{C2}-H & Ar_{C6}-H), 8,91 (s, 1H, CO-NH-OH), 11,11 (s, 1H, NH-OH).

HR-MS m/z: 304,1006 [M+H]⁺; berechnet für C₁₆H₁₈NO₃S⁺: 304,1007

19d (PZ037)

3-[(2,4-Dichlorphenethyl)thio]-4-methoxybenzhydroxamsäure



100 mg **15** (1 Äq, 0,54 mmol) werden in 10 ml DMF gelöst und mit 270 mg DTT (3,4 Äq, 1,7 mmol), 240 mg Kaliumcarbonat (3,4 Äq, 1,7 mmol) und 450 µl 1-(2-Bromethyl)-2,4-Dichlorbenzen (5 Äq, 2,8 mmol) versetzt. Es wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, mit 15 ml 4 M NaCl_{aq} versetzt und drei Mal mit 15 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die organische Phase wird am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, der Rückstand in Chloroform aufgenommen, über Natriumsulfat getrocknet, aus Chloroform auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch mittels MPLC (Gradient: n-Hexan: EtOAc; 98 %: 2 % bis 50 %: 50 %) gereinigt. Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

Das Produkt wird in 25 ml MeOH und 12 ml 1 M NaOH_{aq} aufgenommen, 3 h unter Reflux und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wird am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und der Rückstand in Wasser aufgenommen. Es wird mit 1 M HCl_{aq} neutralisiert und drei Mal mit 20 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die organische Phase wird am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

114 mg des Produktes (1 Äq, 0,32 mmol) werden in 10 ml THF gelöst. Anschließend werden 81 µl DIPEA (1,5 Äq, 0,48 mmol), 200 mg PyBOP (1,2 Äq, 0,38 mmol) und 55 mg THP-Hydroxylamin (1,5 Äq, 0,48 mmol) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch drei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und in möglichst wenig Chloroform mit 0,5 % TEA gelöst und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform: TEA: MeOH; 99,5 %: 0,5 %: 0 % bis 98,5 %: 0,5 %: 1 % V/V/V). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und in 10 ml THF aufgenommen. Es wird 1 ml 1 M HCl_{aq} zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird das Produkt am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, aus Chloroform auf Kieselgel

adsorbiert und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform: HCOOH: MeOH; 99,5 %: 0,5 %: 0 % bis 89,5 %: 0,5 %: 10 %, V/V/V). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und mittels HPLC (Methode P1) gereinigt. Das Produkt wird bei -20°C lichtgeschützt gelagert.

Beschaffenheit: Farbloser amorpher Feststoff.

Ausbeute: 14,1 %

HPLC: rt 13,21 min (97,66 %)

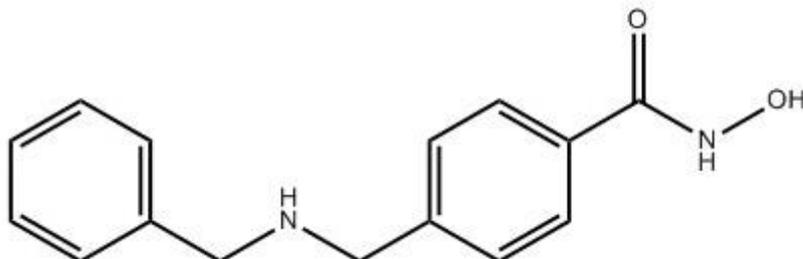
$^1\text{H-NMR}$ [$(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, ppm]: δ = 2,98 (s, 2H, S-CH₂-CH₂-Ar'), 3,15 (s, 2H, S-CH₂-CH₂), 3,84 (s, 1H, Ar-O-CH₃), 7,02 (s, 1H, Ar_{C5}-H), 7,39 (m, 2H, Ar'_{C5}-H & Ar'_{C6}-H), 7,61 (m, 3H, Ar_{C2}-H, Ar_{C6}-H & Ar'_{C3}-H), 8,92 (s, 1H, CO-NH-OH), 11,110 (s, 1H, NH-OH).

HR-MS m/z: 372,0227 [M+H]⁺; berechnet für C₁₆H₁₆Cl₂NO₃S⁺: 372,0228

5.2.2 HDAC10-Inhibitoren

25a (PZ033)

4-[(Benzylamino)methyl]-benzhydroxamsäure



500 mg 4-Aminomethylbenzoesäure (1 Äq, 3,3 mmol) werden in MeOH gelöst und im Eisbad gekühlt, bevor 650 μ l Thionylchlorid (2,7 Äq, 9,0 mmol) langsam hinzugegeben werden. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

200 mg des Produkts (1 Äq, 1,2 mmol) werden in 20 ml DCM gelöst, mit 116 μ l Benzaldehyd (2 Äq, 2,4 mmol) versetzt und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss werden 509 mg Na(Ac)₃BH (2 Äq, 2,4 mmol) langsam zugegeben und die Reaktion über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden 20 ml MeOH zugegeben und das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet. Der Rückstand wird aus Chloroform auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform: MeOH; 100 %: 0 % bis 95 %: 5 % V/V). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

100 mg des Produktes (1 Äq, 0,39 mmol) werden in 15 ml MeOH und 5 ml 1 M NaOH_{aq} gelöst und 4 h unter Reflux gerührt. Es wird mit 1 M HCl_{aq} neutralisiert, das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, aus Chloroform auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform: MeOH; 100 %: 0 % bis 86 %: 14 %, V/V). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

Das Produkt wird in 30 ml THF aufgenommen. Anschließend werden 154 μ l DIPEA (2 Äq, 0,8 mmol), 309 mg PyBOP (1,5 Äq, 0,59 mmol) und 90 mg THP-Hydroxylamin (2 Äq, 0,8 mmol) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und in möglichst wenig Chloroform mit 0,5 % TEA gelöst und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform: TEA; 99,5 %: 0,5 % V/V). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und in 10 ml THF aufgenommen. Es werden 1,5 ml 1 M HCl_{aq} zugetropft und über Nacht bei

Raumtemperatur gerührt. Danach wird das Produkt am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, aus Chloroform auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform: HCOOH: MeOH; 99,75 %: 0,25 %: 0 % bis 84,75 %: 0,25 %: 15 %, V/V/V). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und mittels HPLC (Methode P2) gereinigt. Das Produkt wird bei -20°C lichtgeschützt gelagert.

Beschaffenheit: Farbloser amorpher Feststoff.

Ausbeute: 5,1 %

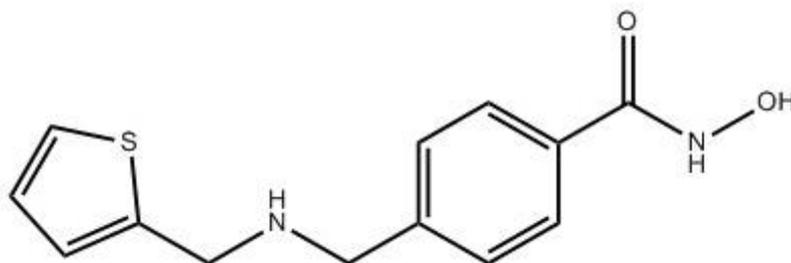
HPLC: rt 7,07 min (95,88 %)

$^1\text{H-NMR}$ [(CD₃)₂SO, ppm]: δ = 4,12 (s, 4H, Ar-CH₂-NH₂⁺-CH₂-Ar'), 7,39 (s, 3H, Ar_{C3}-H, Ar_{C5}-H & Ar'_{C4}-H), 7,58 (m, 4H, Ar'_{C2}-H, Ar'_{C3}-H, Ar'_{C5}-H & Ar'_{C6}-H), 7,77 (s, 2H, Ar_{C2}-H & Ar_{C6}-H), 9,07 (s, 1H, CO-NH-OH), 10,05 (s, 2H, CH₂-NH₂⁺-CH₂), 11,34 (s, 1H, NH-OH).

HR-MS m/z: 257,1287 [M+H]⁺; berechnet für C₁₅H₁₇N₂O₂⁺: 257,1290

25b (PZ039)

4-[[[(Thiophen-2-ylmethyl)amino]methyl]-benzhydroxamsäure



500 mg 4-Aminomethylbenzoesäure (1 Äq, 3,3 mmol) werden in MeOH gelöst und im Eisbad gekühlt, bevor 650 µl Thionylchlorid (2,7 Äq, 9,0 mmol) langsam hinzugegeben werden. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

1486 mg des Produkts (1 Äq, 9,0 mmol) werden in 130 ml DCM: MeOH (5: 8 V/V) gelöst, mit 586 µl Thiophen-2-carboxaldehyd (0,7 Äq, 8,6 mmol) langsam versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss werden 2660 mg Na(Ac)₃BH (1,4 Äq, 12,6 mmol) langsam zugegeben und die Reaktion über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden 20 ml MeOH zugegeben und das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet. Der Rückstand wird aus Chloroform: MeOH (1: 1 V/V) auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient:

Chloroform: TEA; 99,5 %: 0,5 V/V). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

90 mg des Produktes (1 Äq, 0,34 mmol) werden in 10 ml MeOH und 3 ml 1 M NaOH_{aq} gelöst und 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wird mit 1 M HCl_{aq} neutralisiert und das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

Das Produkt wird in 30 ml THF aufgenommen. Anschließend werden 555 µl DIPEA (8,8 Äq, 3,0 mmol), 1249 mg PyBOP (7,1 Äq, 2,4 mmol) und 352 mg THP-Hydroxylamin (8,8 Äq, 3,0 mmol) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und in möglichst wenig Chloroform mit 0,5 % TEA gelöst und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform: TEA: MeOH; 99,5 %: 0,5 %: 0 % bis 94,5 %: 0,5 %: 5 % V/V/V). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und in 10 ml THF aufgenommen. Es wird 1 ml 1 M HCl_{aq} zugetropft und über sechs Tage bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird das Produkt am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und mittels HPLC (Methode P2) gereinigt. Das Produkt wird bei -20°C lichtgeschützt gelagert.

Beschaffenheit: Farbloser amorpher Feststoff.

Ausbeute: 1,1 %

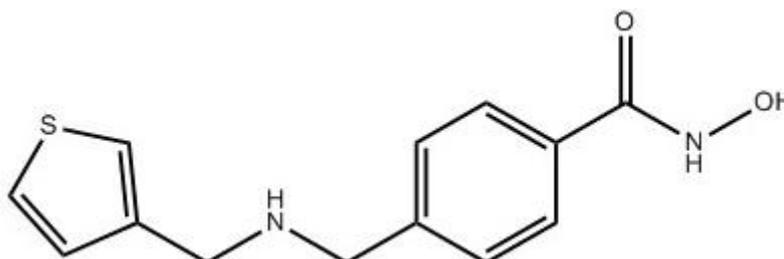
HPLC: rt 5,38 min (96,57 %)

¹H-NMR [(CD₃)₂SO, ppm]: δ = 4,10 (s, 2H, Ar-CH₂-NH₂⁺), 4,30 (s, 2H, NH₂⁺-CH₂-Ar'), 7,08 (dd, 1H, Ar'_{C4}-H, J₁ = 3,6 Hz, J₂ = 5,2 Hz), 7,27 (d, 1H, Ar'_{C3}-H, J = 2,4 Hz), 7,56 (m, 3H, Ar_{C3}-H, Ar_{C5}-H & Ar'_{C5}-H), 7,75 (m, 2H, Ar_{C2}-H & Ar_{C6}-H), 8,98 (m, 3H, CO-NH-OH & CH₂-NH₂⁺-CH₂), 11,26 (s, 1H, NH-OH).

HR-MS m/z: 263,0850 [M+H]⁺; berechnet für C₁₃H₁₅N₂O₂S⁺: 263,0854

25c (PZ040)

4-[[[(Thiophen-3-ylmethyl)amino]methyl]-benzhydroxamsäure



500 mg 4-Aminomethylbenzoesäure (1 Äq, 3,3 mmol) werden in MeOH gelöst und im Eisbad gekühlt, bevor 650 µl Thionylchlorid (2,7 Äq, 9,0 mmol) langsam hinzugegeben werden. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

1486 mg des Produkts (1 Äq, 9,0 mmol) werden in 130 ml DCM: MeOH (5: 8 V/V) gelöst, mit 586 µl Thiophen-3-carboxaldehyd (0,7 Äq, 8,6 mmol) langsam versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss werden 2660 mg Na(Ac)₃BH (1,4 Äq, 12,6 mmol) langsam zugegeben und die Reaktion über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden 20 ml MeOH zugegeben und das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet. Der Rückstand wird aus Chloroform: MeOH (1: 1 V/V) auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform: TEA; 99,5 %: 0,5 V/V). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

270 mg des Produktes (1 Äq, 1,0 mmol) werden in 10 ml MeOH und 3 ml 1 M NaOH_{aq} gelöst und 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wird mit 1 M HCl_{aq} neutralisiert und das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

Das Produkt wird in 30 ml THF aufgenommen. Anschließend werden 555 µl DIPEA (3 Äq, 3,0 mmol), 1249 mg PyBOP (2,4 Äq, 2,4 mmol) und 352 mg THP-Hydroxylamin (3 Äq, 3,0 mmol) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und in möglichst wenig Chloroform mit 0,5 % TEA gelöst und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform: TEA: MeOH; 99,5 %: 0,5 %: 0 % bis 94,5 %: 0,5 %: 5 % V/V/V). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und in 10 ml THF aufgenommen. Es wird 1 ml 1 M HCl_{aq} zugetropft und über sechs Tage bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird das Produkt am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und mittels HPLC (Methode P2) gereinigt. Das Produkt wird bei -20°C lichtgeschützt gelagert.

Beschaffenheit: Farbloser amorpher Feststoff.

Ausbeute: 4,1 %

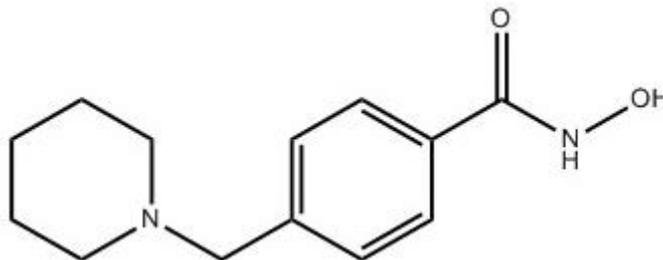
HPLC: rt 5,45 min (98,42 %)

¹H-NMR [(CD₃)₂SO, ppm]: δ = 4,14 (s, 4H, Ar-CH₂-NH₂⁺-CH₂), 7,33 (dd, 1H, Ar'_{C4}-H, J₁ = 1,6 Hz, J₂ = 5,2 Hz), 7,59 (m, 3H, Ar'_{C2}-H, Ar_{C3}-H & Ar_{C5}-H), 7,71 (dd, 1H, Ar'_{C5}-H, J₁ = 1,2 Hz, J₂ = 2,8 Hz), 7,76 (m, 2H, Ar_{C2}-H & Ar_{C6}-H), 9,09 (s, 1H, CO-NH-OH), 9,83 (m, 2H, CH₂-NH₂⁺-CH₂), 11,30 (s, 1H, NH-OH).

HR-MS m/z: 263,0845 [M+H]⁺; berechnet für C₁₃H₁₅N₂O₄S⁺: 263,0854

25d (PZ034)

4-(Piperidin-1-ylmethyl)benzhydroxamsäure



10 mg 4-(Piperidin-1-ylmethyl)benzoesäure (1 Äq, 0,046 mmol) werden in 5 ml THF gelöst und mit 8,1 mg THP-Hydroxylamin (1,5 Äq, 0,068 mmol), 11,6 μ l DIPEA (1,5 Äq, 0,068 mmol) und 7,1 mg PyBOP (1,2 Äq, 0,055 mmol) versetzt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, bevor es am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet wird. Das Rohprodukt wird in möglichst wenig Chloroform mit 0,5 % TEA gelöst und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform: TEA: MeOH; 99,5 %: 0,5 %: 0 % bis 84,5 %: 0,5 %: 15 % V/V/V). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und in 10 ml MeOH: THF 1: 3 aufgenommen. Es werden 5 Tropfen konzentrierte HCl_{aq} zugetropft und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird das Produkt am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, aus Chloroform auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform: HCOOH; 99,5 %: 0,5 % V/V). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und mittels HPLC (Methode P2) gereinigt. Das Produkt wird bei -80°C , lichtgeschützt, in DMSO gelöst (10 mmol/l), gelagert.

Beschaffenheit: Farbloser amorpher Feststoff.

Ausbeute: 4,7 %

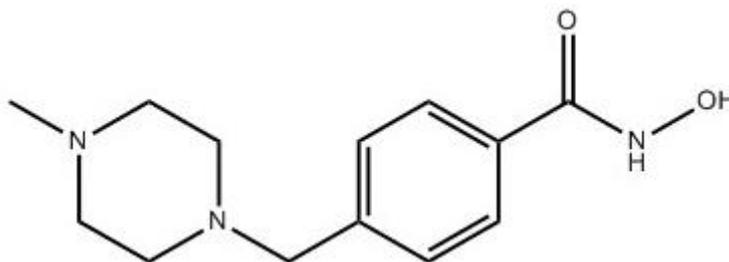
HPLC: rt 1,18 min (81,63 %)

$^1\text{H-NMR}$ [$(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, ppm]: δ = 1,17 (m, 6H, Piper_{C3}-**H**₂, Piper_{C4}-**H**₂, Piper_{C5}-**H**₂), 1,55 (s, 1H, Piper_{C2}-**H**), 1,80 (s, 3H, Piper_{C2}-**H** & Piper_{C6}-**H**₂), 3,00 (m, 2H, N-**CH**₂-Ar), 7,44 (s, 1H, Ar_{C3}-**H**), 7,89 (s, 1H, Ar_{C5}-**H**), 8,21 (s, 2H, Ar_{C2}-**H** & Ar_{C6}-**H**).

HR-MS m/z: 235,1442 [M+H]⁺; berechnet für $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_2^+$: 235,1447

25e (PZ035)

4-[(N-Methylpiperazinyl)methyl]benzhydroxamsäure



100 mg 4-[(N-Methylpiperazinyl)methyl]benzoesäure (1 Äq, 0,43 mmol) werden in 25 ml THF gelöst und mit 78 mg THP-Hydroxylamin (1,5 Äq, 0,64 mmol), 109 µl DIPEA (1,5 Äq, 0,64 mmol) und 66 mg PyBOP (1,2 Äq, 0,51 mmol) versetzt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, bevor es am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet wird. Das Rohprodukt wird in möglichst wenig Chloroform mit 0,5 % TEA gelöst und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform: TEA: MeOH; 99,5 %: 0,5 %: 0 % bis 97,5 %: 0,5 %: 2 % V/V/V). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und in 10 ml MeOH: THF 1: 1 aufgenommen und über Nacht gekühlt. Der ausfallende weiße Feststoff wird mit Hilfe eines Büchnertrichters abgesaugt und im Exsikkator getrocknet.

Der getrocknete Feststoff wird in 10 ml THF aufgenommen, mit 5 Tropfen konzentrierter HCl_{aq} versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird das Produkt am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, aus Chloroform auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform: HCOOH : MeOH; 99,5 %: 0,5 %: 0 % bis 94,5 %: 0,5 %: 5 % V/V/V). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und mittels HPLC (Methode P2) gereinigt. Das Produkt wird bei -20°C , lichtgeschützt gelagert.

Beschaffenheit: Farbloser amorpher Feststoff.

Ausbeute: 18,8 %

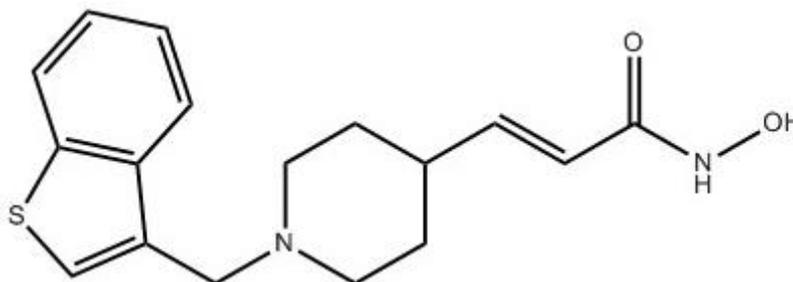
HPLC: rt 3,20 min (100,00 %)

$^1\text{H-NMR}$ [$(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, ppm]: δ = 2,77 (s, 3H, N- CH_3), 3,41 (m, 8H, Piper $_{\text{C}2}$ - H_2 , Piper $_{\text{C}3}$ - H_2 , Piper $_{\text{C}5}$ - H_2 & Piper $_{\text{C}6}$ - H_2), 4,32 (s, 2H, Ar- CH_2 -N), 7,69 (m, 2H, Ar $_{\text{C}3}$ - H & Ar $_{\text{C}5}$ - H), 7,79 (m, 2H, Ar $_{\text{C}2}$ - H & Ar $_{\text{C}6}$ - H), 11,30 (s, 1H, NH- OH).

HR-MS m/z: 250,1551 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$; berechnet für $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_2^+$: 250,1556

31a (PZ044)

(E)-3-{1-[benzo(b)thiophen-3-ylmethyl]piperidin-4-yl}acrylhydroxamsäure



150 mg *N*-Boc-(2-Ethoxycarbonylvinyl)piperidin (1 Äq, 0,53 mmol) werden in 2 ml DCM: TFA 1: 1 gelöst, 5 h auf 65°C erhitzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und in 6 ml EtOH aufgenommen. Es werden 434 mg 1-Benzothiophen-3-carboxaldehyd (5 Äq, 2,7 mmol) zugegeben, 15 min bei Raumtemperatur gerührt, 561 mg Na(Ac)₃BH (5 Äq, 2,7 mmol) zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden 561 mg Na(Ac)₃BH (5 Äq, 2,7 mmol) zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wird am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und aus MeOH auf Kieselgel adsorbiert. Das Produkt wird mittels MPLC (Gradient: Chloroform: MeOH; 100 %: 0 % bis 0 %: 100 % V/V) gereinigt. Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

70 mg des Produktes (1 Äq, 0,21 mmol) werden in 10 ml THF: H₂O 1: 1 aufgenommen, mit 21 mg Lithiumhydroxid·H₂O (2 Äq, 0,43 mmol) versetzt und über drei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Es werden 42 mg Lithiumhydroxid·H₂O (4 Äq, 0,86 mmol) zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wird am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und aus MeOH auf Kieselgel adsorbiert. Das Produkt wird mittels MPLC (Gradient: Chloroform: MeOH; 100 %: 0 % bis 0 %: 100 % V/V) gereinigt. Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

50 mg des Produktes (1 Äq, 0,17 mmol) werden in 4 ml THF: DMF 1: 1 aufgenommen, mit 40 mg EDCI·HCl (1,3 Äq, 0,21 mmol) und 32 mg HOBt (1,3 Äq, 0,21 mmol) versetzt und 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden 84 µl DIPEA (3 Äq, 0,5 mmol) zugegeben, 10 min bei Raumtemperatur gerührt und 24 mg THP-Hydroxylamin (1,3 Äq, 0,21 mmol) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Es werden 40 mg EDCI·HCl (1,3 Äq, 0,21 mmol), 32 mg HOBt (1,3 Äq, 0,21 mmol), 84 µl DIPEA (3 Äq, 0,5 mmol) und 24 mg THP-Hydroxylamin (1,3 Äq, 0,21 mmol) zugegeben und das Reaktionsgemisch über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Reaktion am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und aus MeOH auf Kieselgel adsorbiert. Das Produkt wird mittels MPLC (Gradient: Chloroform: MeOH; 100 %: 0 % bis

0 %: 100 % V/V) gereinigt. Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

Das Produkt wird in 10 ml THF gelöst, mit einem Tropfen konzentrierter HCl_{aq} versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird die Lösung am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, aus MeOH auf Kieselgel adsorbiert und mittels MPLC (Gradient: Chloroform: MeOH; 100 %: 0 % bis 0 %: 100 % V/V) gereinigt. Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und mittels HPLC (Methode P3) gereinigt. Das Produkt wird bei -20°C , lichtgeschützt gelagert.

Beschaffenheit: Farbloser amorpher Feststoff.

Ausbeute: 10,8 %

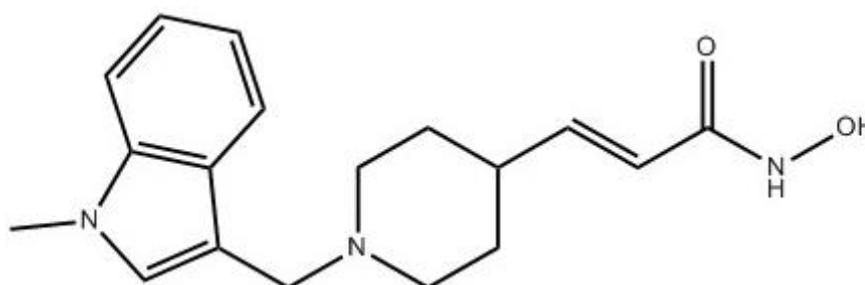
HPLC: rt 4,24 min (95,82 %)

$^1\text{H-NMR}$ [$(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, ppm]: $\delta = 1,82$ (m, 4H, Piper $_{\text{C}3}$ -**H**₂ & Piper $_{\text{C}5}$ -**H**₂), 2,32 (m, 1H, Piper $_{\text{C}4}$ -**H**), 3,08 (m, 4H, Piper $_{\text{C}2}$ -**H** & Piper $_{\text{C}6}$ -**H**), 4,55 (s, 2H, N-**CH**₂-Ar), 5,74 (d, 1H, CH=**CH**-CO, $J_1 = 15,6$ Hz), 6,55 (dd, 1H, **CH**=CH-CO, $J_1 = 6,0$ Hz, $J_2 = 15,6$ Hz), 7,44 (m, 2H, Ar $_{\text{C}5}$ -**H** & Ar $_{\text{C}6}$ -**H**), 8,06 (d, 1H, Ar $_{\text{C}4}$ -**H**, $J_1 = 8,0$ Hz), 8,18 (d, 1H, Ar $_{\text{C}7}$ -**H**, $J_1 = 7,6$ Hz), 8,28 (s, 1H, Ar $_{\text{C}2}$ -**H**), 8,91 (s, 1H, **NH**-OH), 10,74 (s, 1H, **NH**-OH).

HR-MS m/z: 317,1319 $[\text{M}+\text{H}]^+$; berechnet für $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}^+$: 317,1324

31b (PZ045)

(E)-3-{1-[(1-Methylindol-3-yl)methyl]piperidin-4-yl}acrylhydroxamsäure



150 mg *N*-Boc-(2-Ethoxycarbonylvinyl)piperidin (1 Äq, 0,53 mmol) werden in 2 ml DCM: TFA 1: 1 gelöst, 5 h auf 70°C erhitzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und in 5 ml EtOH aufgenommen. Es werden 463 mg 1-Methylindol-3-carboxaldehyd (5,5 Äq, 2,9 mmol) zugegeben, 15 min bei Raumtemperatur gerührt, 561 mg $\text{Na}(\text{Ac})_3\text{BH}$ (5 Äq, 2,7 mmol) zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden 561 mg $\text{Na}(\text{Ac})_3\text{BH}$ (5 Äq, 2,7 mmol) zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wird am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und aus MeOH

auf Kieselgel adsorbiert. Das Produkt wird mittels MPLC (Gradient: Chloroform: MeOH; 100 %: 0 % bis 0 %: 100 % V/V) gereinigt. Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

63 mg des Produktes (1 Äq, 0,19 mmol) werden in 10 ml THF: H₂O 1: 1 aufgenommen, mit 32 mg Lithiumhydroxid*H₂O (4 Äq, 0,76 mmol) versetzt und über drei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Es werden 70 mg Lithiumhydroxid*H₂O (9 Äq, 1,7 mmol) zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wird am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und aus MeOH auf Kieselgel adsorbiert. Das Produkt wird mittels MPLC (Gradient: Chloroform: MeOH; 100 %: 0 % bis 0 %: 100 % V/V) gereinigt. Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

Das Produkt wird in 4 ml THF: DMF 1: 1 aufgenommen, mit 65 mg EDCI*HCl (1,8 Äq, 0,34 mmol) und 51 mg HOBt (1,8 Äq, 0,34 mmol) versetzt und 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden 137 µl DIPEA (4 Äq, 0,8 mmol) zugegeben, 10 min bei Raumtemperatur gerührt und 39 mg THP-Hydroxylamin (1,8 Äq, 0,34 mmol) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Es werden 65 mg EDCI*HCl (1,8 Äq, 0,34 mmol), 51 mg HOBt (1,8 Äq, 0,34 mmol), 137 µl DIPEA (4 Äq, 0,8 mmol) und 39 mg THP-Hydroxylamin (1,8 Äq, 0,34 mmol) zugegeben und das Reaktionsgemisch über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Reaktion am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und aus MeOH auf Kieselgel adsorbiert. Das Produkt wird mittels MPLC (Gradient: Chloroform: MeOH; 100 %: 0 % bis 0 %: 100 % V/V) gereinigt. Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

Das Produkt wird in 10 ml THF gelöst, mit einem Tropfen konzentrierter HCl_{aq} versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird die Lösung am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, aus MeOH auf Kieselgel adsorbiert und mittels MPLC (Gradient: Chloroform: MeOH; 100 %: 0 % bis 0 %: 100 % V/V) gereinigt. Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und mittels HPLC (Methode P3) gereinigt. Das Produkt wird bei -20°C, lichtgeschützt gelagert.

Beschaffenheit: Farbloser amorpher Feststoff.

Ausbeute: 21,5 %

HPLC: rt 3,94 min (97,64 %)

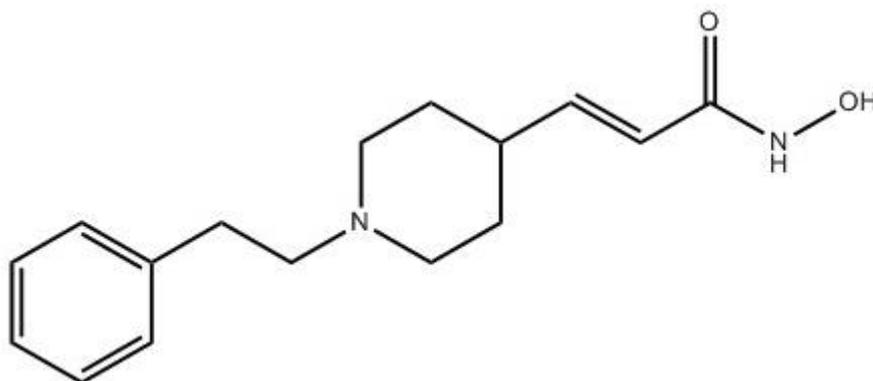
¹H-NMR [(CD₃)₂SO, ppm]: δ = 1,29 (m, 2H, Piper_{C3}-H₂ & Piper_{C5}-H₂), 1,59 (d, 2H, Piper_{C3}-H₂ & Piper_{C5}-H₂, J₁ = 10,8 Hz), 1,95 (m, 2H, Piper_{C2}-H & Piper_{C6}-H), 2,37 (m, 1H, Piper_{C4}-H), 2,85 (d, 2H, Piper_{C2}-H & Piper_{C6}-H, J₁ = 11,2 Hz), 3,59 (s, 2H, N-CH₂-Ar), 3,73 (s, 3H, N-CH₃), 5,73 (d, 1H, CH=CH-CO, J₁ = 15,6 Hz), 6,55 (dd, 1H, CH=CH-CO, J₁ = 6,8 Hz,

$J_2 = 15,6$ Hz), 7,19 (s, 1H, Ar_{C2}-H), 7,34 (d, 1H, Ar_{C5}-H, $J_1 = 8,4$ Hz), 7,43 (m, 1H, Ar_{C7}-H), 7,56 (m, 1H, Ar_{C4}-H), 7,59 (d, 1H, Ar_{C6}-H, $J_1 = 7,6$ Hz), 10,76 (s, 1H, NH-OH).

HR-MS m/z: 314,1865 [M+H]⁺; berechnet für C₁₈H₂₄N₃O₂⁺: 314,1869

31c (PZ046)

(E)-3-(1-Phenethylpiperidin-4-yl)acrylhydroxamsäure



150 mg *N*-Boc-(2-Ethoxycarbonylvinyl)piperidin (1 Äq, 0,53 mmol) werden in 2 ml DCM: TFA 1:1 gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und in 1,5 ml DMF aufgenommen. Es werden 300 mg K₂CO₃ (4 Äq, 2,2 mmol), 187 µl 2-Bromethylbenzol (2,5 Äq, 1,4 mmol) und eine Spatelspitze Kaliumiodid hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht gerührt, es werden 1,5 ml DMF zugegeben und 2 h auf 65°C erhitzt. Im Anschluss wird eine Spatelspitze Kaliumhydroxid zugegeben, über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und aus MeOH auf Kieselgel adsorbiert. Das Produkt wird mittels MPLC (Gradient: Chloroform: MeOH; 100 %: 0 % bis 0 %: 100 % V/V) gereinigt. Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

Das Produkt wird in 10 ml THF: H₂O 1: 1 aufgenommen, mit 138 mg Lithiumhydroxid·H₂O (6 Äq, 3,3 mmol) versetzt und über drei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Lösung am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und aus MeOH auf Kieselgel adsorbiert. Das Produkt wird mittels MPLC (Gradient: Chloroform: MeOH; 100 %: 0 % bis 0 %: 100 % V/V) gereinigt. Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

50 mg des Produktes (1 Äq, 0,17 mmol) werden in 4 ml THF: DMF 1: 1 aufgenommen, mit 92 mg EDCI·HCl (2,5 Äq, 0,48 mmol) und 74 mg HOBt (2,5 Äq, 0,48 mmol) versetzt und 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden 197 µl DIPEA (6 Äq, 1,2 mmol) zugegeben, 10 min bei Raumtemperatur gerührt und 57 mg THP-Hydroxylamin (2,5 Äq,

0,48 mmol) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und aus MeOH auf Kieselgel adsorbiert. Das Produkt wird mittels MPLC (Gradient: Chloroform: MeOH; 100 %: 0 % bis 0 %: 100 % V/V) gereinigt. Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

Das Produkt wird in 10 ml THF gelöst, mit einem Tropfen konzentrierter HCl_{aq} versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird die Lösung am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, aus MeOH auf Kieselgel adsorbiert und mittels MPLC (Gradient: Chloroform: MeOH; 100 %: 0 % bis 0 %: 100 % V/V) gereinigt. Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und mittels HPLC (Methode P3) gereinigt. Das Produkt wird bei -20°C, lichtgeschützt gelagert.

Beschaffenheit: Farbloser amorpher Feststoff.

Ausbeute: 30,3 %

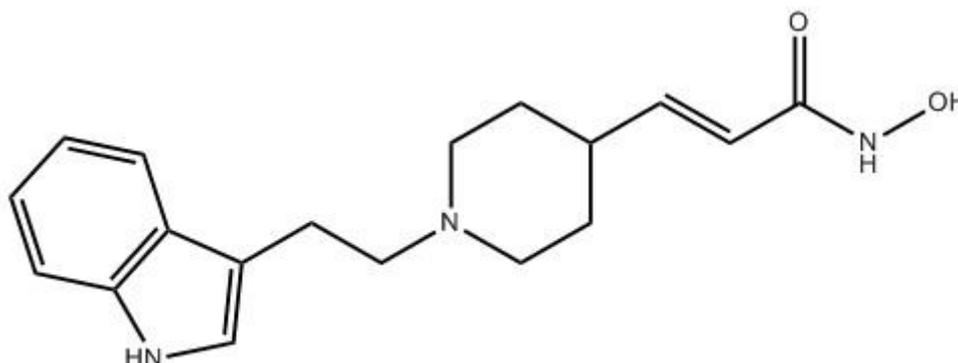
HPLC: rt 2,39 min (95,78 %)

¹H-NMR [(CD₃)₂SO, ppm]: δ = 1,77 (m, 2H, Piper_{C3}-**H**₂ & Piper_{C5}-**H**₂), 1,87 (d, 2H, Piper_{C3}-**H**₂ & Piper_{C5}-**H**₂, J₁ = 13,6 Hz), 2,69 (m, 1H, Piper_{C4}-**H**), 2,97 (m, 2H, Piper_{C2}-**H** & Piper_{C6}-**H**), 3,09 (m, 2H, N-CH₂-CH₂-Ar), 3,20 (m, 2H, N-CH₂-CH₂-Ar), 3,56 (d, 2H, Piper_{C2}-**H** & Piper_{C6}-**H**, J₁ = 11,6 Hz), 5,78 (d, 1H, CH=CH-CO, J₁ = 15,6 Hz), 6,56 (dd, 1H, CH=CH-CO, J₁ = 6,0 Hz, J₂ = 15,6 Hz), 7,25 (m, 3H, Ar_{C3}-**H**, Ar_{C4}-**H** & Ar_{C5}-**H**), 7,32 (m, 2H, Ar_{C2}-**H** & Ar_{C6}-**H**), 8,96 (s, 1H, NH-OH), 10,74 (s, 1H, NH-OH).

HR-MS m/z: 275,1755 [M+H]⁺; berechnet für C₁₆H₂₃N₂O₂⁺: 275,1760

31d (PZ047)

(E)-3-{1-[2-(1*H*-Indol-3-yl)ethyl]piperidin-4-yl}acrylhydroxamsäure



150 mg *N*-Boc-(2-Ethoxycarbonylviny)piperidin (1 Äq, 0,53 mmol) werden in 4 ml DCM: TFA 1:1 gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das

Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und in 1,5 ml DMF aufgenommen. Es werden 300 mg K_2CO_3 (4 Äq, 2,2 mmol), 312 mg 3-(2-Bromethyl)indol (2,5 Äq, 1,4 mmol) und eine Spatelspitze Kaliumiodid hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht gerührt, es werden 1,5 ml DMF zugegeben und 2 h auf 65°C erhitzt. Im Anschluss wird eine Spatelspitze Kaliumhydroxid zugegeben, über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und aus MeOH auf Kieselgel adsorbiert. Das Produkt wird mittels MPLC (Gradient: Chloroform: MeOH; 100 %: 0 % bis 0 %: 100 % V/V) gereinigt. Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

130 mg des Produktes (1 Äq, 0,4 mmol) werden in 10 ml THF: H_2O 1: 1 aufgenommen, mit 100 mg Lithiumhydroxid* H_2O (6 Äq, 2,4 mmol) versetzt und über drei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Lösung am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und aus MeOH auf Kieselgel adsorbiert. Das Produkt wird mittels MPLC (Gradient: Chloroform: MeOH; 100 %: 0 % bis 0 %: 100 % V/V) gereinigt. Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

Das Produkt wird in 4 ml THF: DMF 1: 1 aufgenommen, mit 321 mg EDCI*HCl (4,3 Äq, 1,7 mmol) und 256 mg HOBt (4,3 Äq, 1,7 mmol) versetzt und 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden 684 μ l DIPEA (10 Äq, 4,0 mmol) zugegeben, 10 min bei Raumtemperatur gerührt und 196 mg THP-Hydroxylamin (4,3 Äq, 1,7 mmol) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird über zwei Tage bei Raumtemperatur gerührt, am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und aus MeOH auf Kieselgel adsorbiert. Das Produkt wird mittels MPLC (Gradient: Chloroform: MeOH; 100 %: 0 % bis 0 %: 100 % V/V) gereinigt. Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

Das Produkt wird in 10 ml THF gelöst, mit einem Tropfen konzentrierter HCl_{aq} versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden zwei Tropfen konzentrierte HCl_{aq} hinzugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird die Lösung am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, aus MeOH auf Kieselgel adsorbiert und mittels MPLC (Gradient: Chloroform: MeOH; 100 %: 0 % bis 0 %: 100 % V/V) gereinigt. Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und mittels HPLC (Methode P3) gereinigt. Das Produkt wird bei -20°C, lichtgeschützt gelagert.

Beschaffenheit: Farbloser amorpher Feststoff.

Ausbeute: 22,3 %

HPLC: rt 3,38 min (97,04 %)

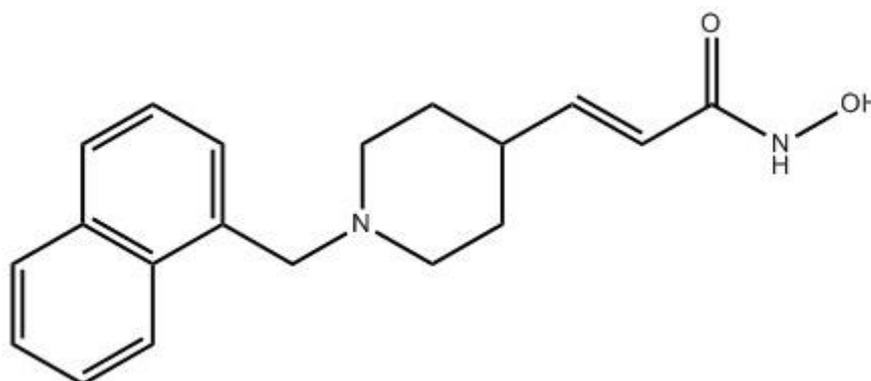
1H -NMR [$(CD_3)_2SO$, ppm]: δ = 1,59 (m, 2H, Piper_{C3}-**H**₂ & Piper_{C5}-**H**₂), 1,92 (d, 2H, Piper_{C3}-**H**₂ & Piper_{C5}-**H**₂, J_1 = 13,2 Hz), 2,40 (m, 1H, Piper_{C4}-**H**), 3,02 (m, 2H, Piper_{C2}-**H** & Piper_{C6}-**H**),

3,11 (m, 2H, N-CH₂-CH₂-Ar), 3,31 (m, 2H, N-CH₂-CH₂-Ar), 3,65 (d, 2H, Piper_{C2}-H & Piper_{C6}-H, J₁ = 11,6 Hz), 5,77 (d, 1H, CH=CH-CO, J₁ = 15,6 Hz), 6,59 (dd, 1H, CH=CH-CO, J₁ = 6,0 Hz, J₂ = 15,6 Hz), 7,00 (t, 1H, Ar_{C5}-H, J₁ = 7,2 Hz), 7,09 (t, 1H, Ar_{C6}-H, J₁ = 6,8 Hz), 7,23 (s, 1H, Ar_{C2}-H), 7,35 (d, 1H, Ar_{C7}-H, J₁ = 8,0 Hz), 7,57 (d, 1H, Ar_{C4}-H, J₁ = 7,6 Hz), 9,67 (s, 1H, ArNH), 10,98 (s, 1H, NH-OH).

HR-MS m/z: 314,1862 [M+H]⁺; berechnet für C₁₈H₂₄N₃O₂⁺: 314,1869

31e (PZ048)

(E)-3-[1-(Naphthalen-1-ylmethyl)piperidin-4-yl]acrylhydroxamsäure



200 mg *N*-Boc-(2-Ethoxycarbonylvinyl)piperidin (1 Äq, 0,71 mmol) werden in 4 ml DCM: TFA 1: 1 gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und in 1,5 ml DMF aufgenommen. Es werden 300 mg K₂CO₃ (3 Äq, 2,2 mmol) zugegeben und das Reaktionsgemisch für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden 390 mg 1-Brommethyl-naphthalen (2,5 Äq, 1,8 mmol) und eine Spatelspitze Kaliumiodid hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht, lichtgeschützt und bei Raumtemperatur gerührt. Es werden 390 mg 1-Brommethyl-naphthalen (2,5 Äq, 1,8 mmol) zugegeben und das Reaktionsgemisch über Nacht, lichtgeschützt und bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsansatz wird am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und aus MeOH auf Kieselgel adsorbiert. Das Produkt wird mittels MPLC (Gradient: Chloroform: MeOH; 100 %: 0 % bis 0 %: 100 % V/V) gereinigt. Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

Das Produkt wird in 10 ml THF: H₂O 1: 1 aufgenommen, mit 150 mg Lithiumhydroxid·H₂O (5 Äq, 3,6 mmol) versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur und lichtgeschützt gerührt. Es werden 10 ml THF: H₂O 1: 1 zugegeben und das Reaktionsgemisch für 5 h unter Reflux erhitzt. Es werden 50 mg Lithiumhydroxid·H₂O (1,7 Äq, 1,2 mmol) zugegeben und das Reaktionsgemisch über drei Tage, lichtgeschützt, bei Raumtemperatur gerührt.

Anschließend wird die Lösung am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und aus MeOH auf Kieselgel adsorbiert. Das Produkt wird mittels MPLC (Gradient: Chloroform: MeOH; 100 %: 0 % bis 0 %: 100 % V/V) gereinigt. Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

Das Produkt wird in 6 ml THF: DMF 1: 1 aufgenommen, mit 80 mg EDCI*HCl (0,6 Äq, 0,42 mmol) und 64 mg HOBt (0,6 Äq, 0,42 mmol) versetzt und 10 min, lichtgeschützt, bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden 168 µl DIPEA (1,3 Äq, 0,9 mmol) zugegeben, 10 min, lichtgeschützt, bei Raumtemperatur gerührt und 50 mg THP-Hydroxylamin (0,6 Äq, 0,42 mmol) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht, lichtgeschützt, bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit 80 mg EDCI*HCl (0,6 Äq, 0,42 mmol), 64 mg HOBt (0,6 Äq, 0,42 mmol), 168 µl DIPEA (1,3 Äq, 0,9 mmol) und 50 mg THP-Hydroxylamin (0,6 Äq, 0,42 mmol) versetzt. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht, lichtgeschützt, bei Raumtemperatur gerührt, am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und aus MeOH auf Kieselgel adsorbiert. Das Produkt wird mittels MPLC (Gradient: Chloroform: MeOH; 100 %: 0 % bis 0 %: 100 % V/V) gereinigt. Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

Das Produkt wird in 10 ml THF gelöst, mit zwei Tropfen konzentrierter HCl_{aq} versetzt und über Nacht, lichtgeschützt, bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Lösung am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, aus MeOH auf Kieselgel adsorbiert und mittels MPLC (Gradient: Chloroform: MeOH; 100 %: 0 % bis 0 %: 100 % V/V) gereinigt. Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und mittels HPLC (Methode P3) gereinigt. Das Produkt wird bei -20°C, lichtgeschützt gelagert.

Beschaffenheit: Farbloser amorpher Feststoff.

Ausbeute: 30,0 %

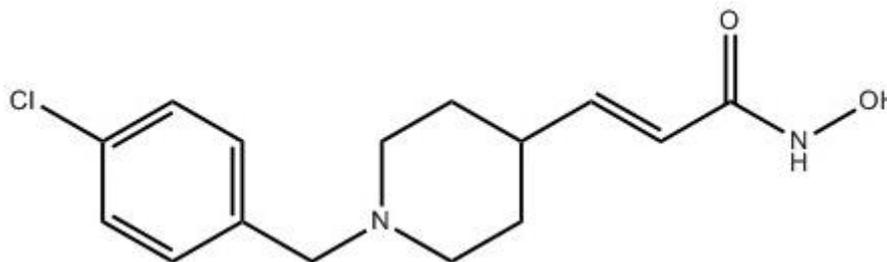
HPLC: rt 4,41 min (95,15 %)

¹H-NMR [(CD₃)₂SO, ppm]: δ = 1,55 (m, 2H, Piper_{C3}-**H₂** & Piper_{C5}-**H₂**), 1,75 (m, 2H, Piper_{C3}-**H₂** & Piper_{C5}-**H₂**), 2,26 (m, 1H, Piper_{C4}-**H**), 3,12 (m, 2H, Piper_{C2}-**H** & Piper_{C6}-**H**), 5,77 (d, 1H, CH=**H**-CO, J₁ = 15,6 Hz), 6,55 (m, 1H, **CH**=CH-CO), 7,56 (m, 4H, Ar_{C2}-**H**, Ar_{C3}-**H**, Ar_{C6}-**H** & Ar_{C7}-**H**), 7,94 (m, 2H, Ar_{C5}-**H** & Ar_{C8}-**H**), 8,34 (s, 1H, Ar_{C4}-**H**), 8,87 (s, 1H, CO-**NH**-OH), 10,69 (s, 1H, **NH**-OH).

HR-MS m/z: 311,1755 [M+H]⁺; berechnet für C₁₉H₂₃N₂O₂⁺: 311,1760

31f (PZ049)

(E)-3-[1-(4-Chlorbenzyl)piperidin-4-yl]acrylhydroxamsäure



200 mg *N*-Boc-(2-Ethoxycarbonylviny)piperidin (1 Äq, 0,71 mmol) werden in 4 ml DCM: TFA 1:1 gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und in 5 ml unvergälltem EtOH aufgenommen. Es werden 521 mg 4-Chlorbenzaldehyd (5 Äq, 3,5 mmol) zugegeben und das Reaktionsgemisch für 15 min bei Raumtemperatur, gerührt. Anschließend werden 748 mg $\text{Na}(\text{Ac})_3\text{BH}$ (5 Äq, 3,5 mmol) zugegeben und das Reaktionsgemisch über Nacht, lichtgeschützt, bei Raumtemperatur gerührt. Es werden erneut 748 mg $\text{Na}(\text{Ac})_3\text{BH}$ (5 Äq, 3,5 mmol) zugegeben und das Reaktionsgemisch über Nacht, lichtgeschützt, bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsansatz wird am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und aus MeOH auf Kieselgel adsorbiert. Das Produkt wird mittels MPLC (Gradient: Chloroform: MeOH; 100 %: 0 % bis 0 %: 100 % V/V) gereinigt. Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

Das Produkt wird in 10 ml THF: H_2O 1: 1 aufgenommen, mit 178 mg Lithiumhydroxid* H_2O (6 Äq, 4,2 mmol) versetzt und über drei Tage bei Raumtemperatur und lichtgeschützt gerührt. Anschließend wird die Lösung am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und aus MeOH auf Kieselgel adsorbiert. Das Produkt wird mittels MPLC (Gradient: Chloroform: MeOH; 100 %: 0 % bis 0 %: 100 % V/V) gereinigt. Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

Das Produkt wird in 6 ml THF: DMF 1: 1 aufgenommen, mit 338 mg $\text{EDCI}\cdot\text{HCl}$ (2,5 Äq, 1,8 mmol) und 270 mg HOBt (2,5 Äq, 1,8 mmol) versetzt und 10 min, lichtgeschützt, bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden 720 μl DIPEA (6 Äq, 4,2 mmol) zugegeben, 10 min, lichtgeschützt, bei Raumtemperatur gerührt und 207 mg THP-Hydroxylamin (2,5 Äq, 1,8 mmol) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht, lichtgeschützt, bei Raumtemperatur gerührt, am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und aus MeOH auf Kieselgel adsorbiert. Das Produkt wird mittels MPLC (Gradient: Chloroform: MeOH; 100 %: 0 % bis 0 %: 100 % V/V) gereinigt. Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

Das Produkt wird in 13 ml THF gelöst, mit zwei Tropfen konzentrierter HCl_{aq} versetzt und über Nacht, lichtgeschützt, bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Lösung am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, aus MeOH auf Kieselgel adsorbiert und mittels MPLC (Gradient: Chloroform: MeOH; 100 %: 0 % bis 0 %: 100 % V/V) gereinigt. Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und mittels HPLC (Methode P3) gereinigt. Das Produkt wird bei -20°C , lichtgeschützt gelagert.

Beschaffenheit: Farbloser amorpher Feststoff.

Ausbeute: 5,1 %

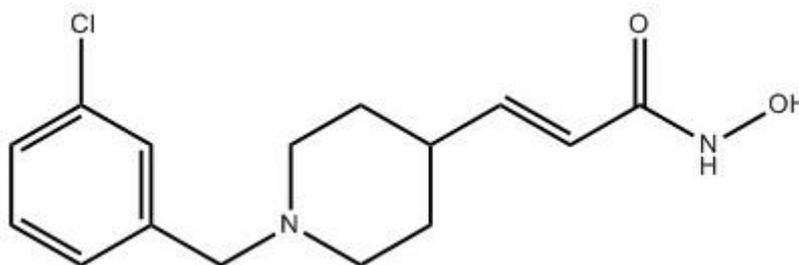
HPLC: rt 2,68 min (98,59 %)

$^1\text{H-NMR}$ [$(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, ppm]: δ = 1,51 (m, 2H, Piper $_{\text{C}3}$ -**H**₂ & Piper $_{\text{C}5}$ -**H**₂), 1,86 (d, 2H, Piper $_{\text{C}3}$ -**H**₂ & Piper $_{\text{C}5}$ -**H**₂, $J_1 = 15,6$ Hz), 2,36 (m, 1H, Piper $_{\text{C}4}$ -**H**), 2,92 (m, 2H, Piper $_{\text{C}2}$ -**H** & Piper $_{\text{C}6}$ -**H**), 3,35 (d, 2H, Piper $_{\text{C}2}$ -**H** & Piper $_{\text{C}6}$ -**H**, $J_1 = 12,4$ Hz), 4,28 (s, 1H, N-**CH**₂-Ar), 5,74 (d, 1H, **CH=CH**-CO, $J_1 = 15,6$ Hz), 6,53 (dd, 1H, **CH=CH**-CO, $J_1 = 6,4$ Hz, $J_2 = 15,6$ Hz), 7,53 (m, 4H, Ar $_{\text{C}2}$ -**H**, Ar $_{\text{C}3}$ -**H**, Ar $_{\text{C}5}$ -**H** & Ar $_{\text{C}6}$ -**H**), 8,59(s, 1H, CO-**NH**-OH), 10,60 (s, 1H, **NH**-OH).

HR-MS m/z: 295,1212 $[\text{M}+\text{H}]^+$; berechnet für $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{ClN}_2\text{O}_2^+$: 295,1213

31g (PZ050)

(E)-3-[1-(3-Chlorbenzyl)piperidin-4-yl]acrylhydroxamsäure



500 mg *N*-Boc-(2-Ethoxycarbonylvinyl)piperidin (1 Äq, 1,8 mmol) werden in 12 ml DCM: TFA 1: 1 gelöst, 5 h bei 60°C und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und in 6 ml DMF aufgenommen. Es werden 975 mg K_2CO_3 (4 Äq, 7,1 mmol) zugegeben und das Reaktionsgemisch für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden 975 mg K_2CO_3 (4 Äq, 7,1 mmol), 692 μl 3-Chlorbenzylbromid (3 Äq, 5,3 mmol) und eine Spatelspitze Kaliumiodid hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wird über zwei Tage, lichtgeschützt, unter Argon und bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsansatz wird am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet. Das Produkt wird mittels MPLC (Gradient: Chloroform: MeOH;

100 %: 0 % bis 0 %: 100 % V/V) gereinigt. Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

Das Produkt wird in 50 ml THF: H₂O 1: 1 aufgenommen, mit 135 mg Lithiumhydroxid*H₂O (1,8 Äq, 3,2 mmol) versetzt und über Nacht, bei Raumtemperatur, lichtgeschützt und unter Argon gerührt. Anschließend wird die Lösung am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet. Das Produkt wird mittels MPLC (Gradient: Chloroform: MeOH; 100 %: 0 % bis 0 %: 100 % V/V) gereinigt. Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer, versetzt mit 500 µl DIPEA, unter Vakuum getrocknet.

Das Produkt wird in 25 ml THF aufgenommen, mit 3,7 ml DIPEA (12 Äq, 21 mmol), 2,7 g PyBOP (3 Äq, 5,3 mmol) und 619 mg THP-Hydroxylamin (3 Äq, 5,3 mmol) versetzt und über zwei Tage, lichtgeschützt, unter Argon und bei Raumtemperatur gerührt. Es werden erneut 3,7 ml DIPEA (12 Äq, 21 mmol), 2,7 g PyBOP (3 Äq, 5,3 mmol) und 617 mg THP-Hydroxylamin (3 Äq, 5,3 mmol) hinzugegeben und über Nacht, lichtgeschützt, unter Argon und bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wird am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und mittels MPLC (Gradient: Chloroform: MeOH; 100 %: 0 % bis 0 %: 100 % V/V) gereinigt. Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

Das Produkt wird in 80 ml THF gelöst, mit zwei Tropfen 1 M HCl_{aq} versetzt und über Nacht, lichtgeschützt, unter Argon, bei Raumtemperatur gerührt. Es werden 26 Tropfen 1 M HCl_{aq} über 4 h verteilt hinzugegeben, während lichtgeschützt, unter Argon und bei Raumtemperatur gerührt wird. Anschließend wird über Nacht, lichtgeschützt, unter Argon, bei Raumtemperatur gerührt. Es werden 10 Tropfen 1 M HCl_{aq} über 3 h verteilt hinzugegeben, während lichtgeschützt, unter Argon und bei Raumtemperatur gerührt wird. Anschließend wird über Nacht, lichtgeschützt, unter Argon, bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wird die Lösung am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und mittels MPLC (Gradient: Chloroform: MeOH; 100 %: 0 % bis 0 %: 100 % V/V) gereinigt. Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und mittels HPLC (Methode P3) gereinigt. Das Produkt wird bei -20°C, lichtgeschützt gelagert.

Beschaffenheit: Farbloser amorpher Feststoff.

Ausbeute: 2,8 %

HPLC: rt 6,38 min (99,39 %)

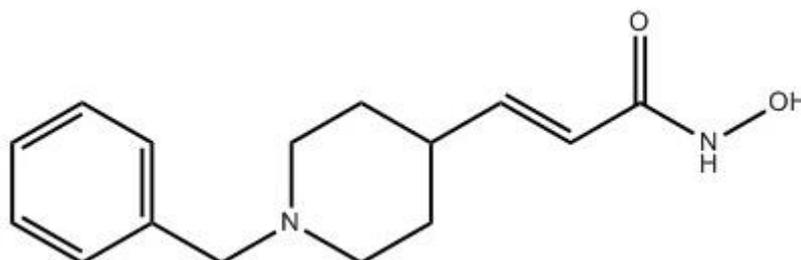
¹H-NMR [CD₃OD, ppm]: δ = 1,67 (m, 2H, Piper_{C3}-H₂ & Piper_{C5}-H₂), 1,94 (d, 2H, Piper_{C3}-H₂ & Piper_{C5}-H₂, J₁ = 10,0 Hz), 2,43 (m, 2H, Piper_{C2}-H & Piper_{C6}-H), 2,84 (m, 2H, Piper_{C2}-H & Piper_{C6}-H), 2,98 (s, 1H, Piper_{C4}-H), 4,12 (s, 2H, N-CH₂-Ar), 5,83 (d, 1H, CH=CH-CO,

$J_1 = 12,4$ Hz), 6,73 (dd, 1H, $\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}$, $J_1 = 4,8$ Hz, $J_2 = 12,0$ Hz), 7,45 (m, 3H, $\text{Ar}_{\text{C}4}-\text{H}$, $\text{Ar}_{\text{C}5}-\text{H}$ & $\text{Ar}_{\text{C}6}-\text{H}$), 7,54 (s, 1H, $\text{Ar}_{\text{C}2}-\text{H}$), 8,41 (s, 1H, $\text{CO}-\text{NH}-\text{OH}$).

HR-MS m/z : 295,1205 $[\text{M}+\text{H}]^+$; berechnet für $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{ClN}_2\text{O}_2^+$: 295,1213

31h (PZ051)

(E)-3-(1-Benzylpiperidin-4-yl)acrylhydroxamsäure



500 mg *N*-Boc-(2-Ethoxycarbonylvinyl)piperidin (1 Äq, 1,8 mmol) werden in 12 ml DCM: TFA 1: 1 gelöst, 5 h bei 60°C und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und in 6 ml DMF aufgenommen. Es werden 975 mg K_2CO_3 (4 Äq, 7,1 mmol) zugegeben und das Reaktionsgemisch für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden 975 mg K_2CO_3 (4 Äq, 7,1 mmol), 628 μl Benzylbromid (3 Äq, 5,3 mmol) und eine Spatelspitze Kaliumiodid hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wird über drei Tage, lichtgeschützt, unter Argon und bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsansatz wird am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

Das Produkt wird in 50 ml THF: H_2O 1: 1 aufgenommen, mit 135 mg Lithiumhydroxid* H_2O (1,8 Äq, 3,2 mmol) versetzt und über Nacht, bei Raumtemperatur, lichtgeschützt und unter Argon gerührt. Anschließend wird die Lösung am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet. Das Produkt wird mittels MPLC (Gradient: Chloroform: MeOH; 100 %: 0 % bis 0 %: 100 % V/V) gereinigt. Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

Das Produkt wird in 25 ml THF aufgenommen, mit 3,7 ml DIPEA (12 Äq, 21 mmol), 2,7 g PyBOP (3 Äq, 5,3 mmol) und 619 mg THP-Hydroxylamin (3 Äq, 5,3 mmol) versetzt und über drei Tage, lichtgeschützt, unter Argon und bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wird am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und mittels MPLC (Gradient: Chloroform: MeOH; 100 %: 0 % bis 0 %: 100 % V/V) gereinigt. Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

Das Produkt wird in 25 ml THF und 12,5 ml H_2O gelöst, mit 20 Tropfen 1 M HCl_{aq} versetzt und über Nacht, lichtgeschützt, unter Argon, bei Raumtemperatur gerührt. Es werden

zehn Tropfen 1 M HCl_{aq} hinzuge tropft, und über Nacht, lichtgeschützt, unter Argon, bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wird die Lösung am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und mittels MPLC (Gradient: Chloroform: MeOH; 100 %: 0 % bis 0 %: 100 % V/V) gereinigt. Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und mittels HPLC (Methode P3) gereinigt. Das Produkt wird bei -20°C, lichtgeschützt gelagert.

Beschaffenheit: Farbloser amorpher Feststoff.

Ausbeute: 2,7 %

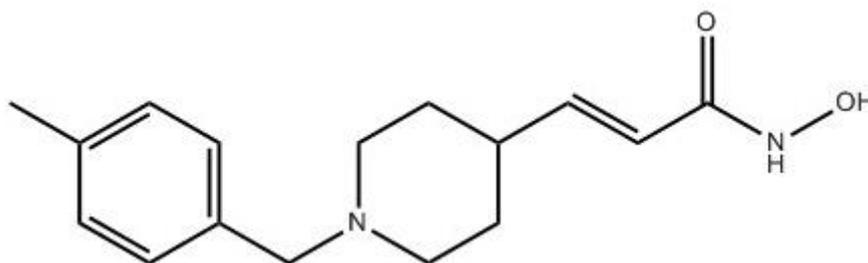
HPLC: rt 7,91 min (96,38 %)

¹H-NMR [CD₃OD, ppm]: δ = 2,02 (m, 2H, Piper_{C3}-H₂ & Piper_{C5}-H₂), 2,29 (m, 2H, Piper_{C3}-H₂ & Piper_{C5}-H₂), 2,86 (m, 2H, Piper_{C2}-H & Piper_{C6}-H), 3,35 (s, 1H, Piper_{C4}-H), 3,51 (d, 2H, Piper_{C2}-H & Piper_{C6}-H, J₁ = 10,4 Hz), 4,42 (s, 2H, N-CH₂-Ar), 5,85 (d, 1H, CH=CH-CO, J₁ = 12,4 Hz), 6,73 (dd, 1H, CH=CH-CO, J₁ = 4,0 Hz, J₂ = 12,4 Hz), 7,47 (s, 1H, Ar_{C2}-H), 7,54 (m, 1H, Ar_{C6}-H), 7,55 (m, 2H, Ar_{C3}-H & Ar_{C5}-H), 7,60 (m, 1H, Ar_{C4}-H).

HR-MS m/z: 261,1595 [M+H]⁺; berechnet für C₁₅H₂₁N₂O₂⁺: 261,1603

31i (PZ053)

(E)-3-[1-(4-Methylbenzyl)piperidin-4-yl]acrylhydroxamsäure



500 mg *N*-Boc-(2-Ethoxycarbonylvinyl)piperidin (1 Äq, 1,8 mmol) werden in 12 ml DCM: TFA 1: 1 gelöst, 5 h bei 60°C und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und in 6 ml DMF aufgenommen. Es werden 975 mg K₂CO₃ (4 Äq, 7,1 mmol) zugegeben und das Reaktionsgemisch für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden 975 mg K₂CO₃ (4 Äq, 7,1 mmol), 977 mg 4-Methylbenzylbromid (3 Äq, 5,3 mmol) und eine Spatelspitze Kaliumiodid hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wird über drei Tage, lichtgeschützt, unter Argon und bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsansatz wird am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet

Das Produkt wird in 50 ml THF: H₂O 1: 1 aufgenommen, mit 135 mg Lithiumhydroxid*H₂O (1,8 Äq, 3,2 mmol) versetzt und über Nacht, bei Raumtemperatur, lichtgeschützt und unter Argon gerührt. Anschließend wird die Lösung am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet. Das Produkt wird mittels MPLC (Gradient: Chloroform: MeOH; 100 %: 0 % bis 0 %: 100 % V/V) gereinigt. Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

Das Produkt wird in 25 ml THF aufgenommen, mit 3,7 ml DIPEA (12 Äq, 21 mmol), 2,7 g PyBOP (3 Äq, 5,3 mmol) und 619 mg THP-Hydroxylamin (3 Äq, 5,3 mmol) versetzt und über drei Tage, lichtgeschützt, unter Argon und bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wird am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und mittels MPLC (Gradient: Chloroform: MeOH; 100 %: 0 % bis 0 %: 100 % V/V) gereinigt. Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

Das Produkt wird in 25 ml THF und 12,5 ml H₂O gelöst, mit 20 Tropfen 1 M HCl_{aq} versetzt und über Nacht, lichtgeschützt, unter Argon, bei Raumtemperatur gerührt. Es werden zehn Tropfen 1 M HCl_{aq} hinzugegeben, und über Nacht, lichtgeschützt, unter Argon, bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wird die Lösung am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und mittels MPLC (Gradient: Chloroform: MeOH; 100 %: 0 % bis 0 %: 100 % V/V) gereinigt. Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und mittels HPLC (Methode P3) gereinigt. Das Produkt wird bei -20°C, lichtgeschützt gelagert.

Beschaffenheit: Farbloser amorpher Feststoff.

Ausbeute: 0,4 %

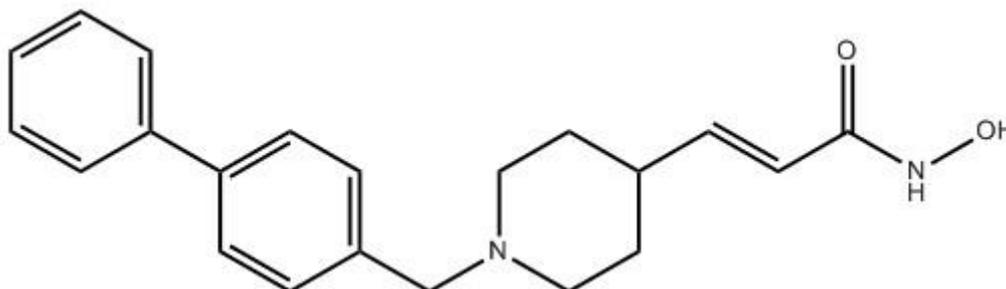
HPLC: rt 7,06 min (91,03 %)

¹H-NMR [CD₃OD, ppm]: δ = 1,65 (m, 2H, Piper_{C3}-**H**₂ & Piper_{C5}-**H**₂), 1,96 (d, 2H, Piper_{C3}-**H**₂ & Piper_{C5}-**H**₂, J₁ = 10,4 Hz), 2,37 (s, 3H, Ar-**CH**₃), 2,44 (s, 1H, Piper_{C4}-**H**), 2,89 (m, 2H, Piper_{C2}-**H** & Piper_{C6}-**H**), 3,37 (d, 2H, Piper_{C2}-**H** & Piper_{C6}-**H**, J₁ = 9,6 Hz), 4,13 (s, 2H, N-**CH**₂-Ar), 5,86 (d, 1H, CH=**CH**-CO, J₁ = 12,4 Hz), 6,71 (dd, 1H, **CH**=CH-CO, J₁ = 5,2 Hz, J₂ = 12,4 Hz), 7,32 (dd, 4H, Ar_{C2}-**H**, Ar_{C3}-**H**, Ar_{C5}-**H** & Ar_{C6}-**H**, J₁ = 6,4 Hz, J₂ = 26,0 Hz), 8,42 (s, 1H, CO-N**H**-OH).

HR-MS m/z: 275,1751 [M+H]⁺; berechnet für C₁₆H₂₃N₂O₂⁺: 275,1760

31j (PZ054)

(E)-3-{1-[(1,1'-Biphenyl)-4-ylmethyl]piperidin-4-yl}acrylhydroxamsäure



500 mg *N*-Boc-(2-Ethoxycarbonylvinyl)piperidin (1 Äq, 1,8 mmol) werden in 12 ml DCM: TFA 1: 1 gelöst, 5 h bei 60°C und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und in 6 ml DMF aufgenommen. Es werden 975 mg K_2CO_3 (4 Äq, 7,1 mmol) zugegeben und das Reaktionsgemisch für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden 975 mg K_2CO_3 (4 Äq, 7,1 mmol), 1305 mg 4-Brommethylbiphenyl (3 Äq, 5,3 mmol) und eine Spatelspitze Kaliumiodid hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wird über drei Tage, lichtgeschützt, unter Argon und bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsansatz wird am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet

Das Produkt wird in 50 ml THF: H_2O 1: 1 aufgenommen, mit 135 mg Lithiumhydroxid* H_2O (1,8 Äq, 3,2 mmol) versetzt und über Nacht, bei Raumtemperatur, lichtgeschützt und unter Argon gerührt. Anschließend wird die Lösung am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet. Das Produkt wird mittels MPLC (Gradient: Chloroform: MeOH; 100 %: 0 % bis 0 %: 100 % V/V) gereinigt. Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

Das Produkt wird in 25 ml THF aufgenommen, mit 3,7 ml DIPEA (12 Äq, 21 mmol), 2,7 g PyBOP (3 Äq, 5,3 mmol) und 619 mg THP-Hydroxylamin (3 Äq, 5,3 mmol) versetzt und über drei Tage, lichtgeschützt, unter Argon und bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wird am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und mittels MPLC (Gradient: Chloroform: MeOH; 100 %: 0 % bis 0 %: 100 % V/V) gereinigt. Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

Das Produkt wird in 25 ml THF und 12,5 ml H_2O gelöst, mit 25 Tropfen 1 M HCl_{aq} versetzt und über Nacht, lichtgeschützt, unter Argon, bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wird die Lösung am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und mittels MPLC (Gradient: Chloroform: MeOH; 100 %: 0 % bis 0 %: 100 % V/V) gereinigt. Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und mittels HPLC (Methode P4) gereinigt. Das Produkt wird bei -20°C, lichtgeschützt gelagert.

Beschaffenheit: Farbloser amorpher Feststoff.

Ausbeute: 1,6 %

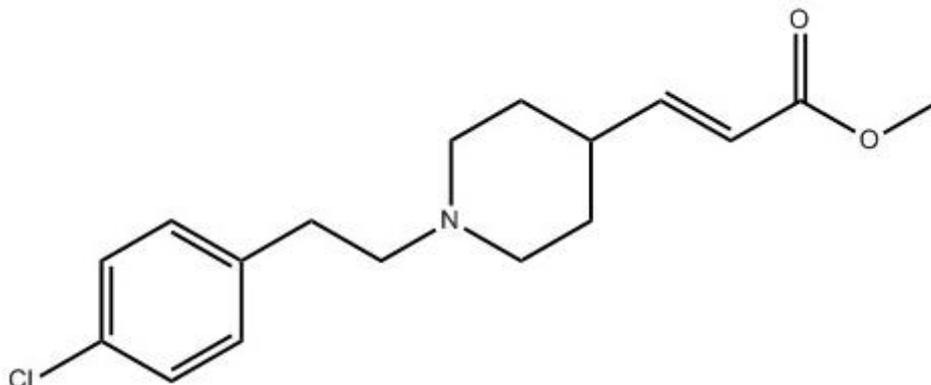
HPLC: rt 10,29 min (97,47 %)

$^1\text{H-NMR}$ [CD_3OD , ppm]: $\delta = 1,72$ (m, 2H, Piper $_{\text{C}3}$ -**H₂** & Piper $_{\text{C}5}$ -**H₂**), 2,01 (m, 2H, Piper $_{\text{C}3}$ -**H₂** & Piper $_{\text{C}5}$ -**H₂**), 2,50 (s, 1H, Piper $_{\text{C}4}$ -**H**), 3,04 (t, 2H, Piper $_{\text{C}2}$ -**H** & Piper $_{\text{C}6}$ -**H**, $J_1 = 9,6$ Hz), 3,48 (d, 2H, Piper $_{\text{C}2}$ -**H** & Piper $_{\text{C}6}$ -**H**, $J_1 = 10,4$ Hz), 4,31 (s, 2H, N-**CH₂**-Ar), 5,86 (d, 1H, CH=**CH**-CO, $J_1 = 12,4$ Hz), 6,74 (dd, 1H, **CH**=CH-CO, $J_1 = 5,2$ Hz, $J_2 = 12,4$ Hz), 7,38 (m, 1H, Ar' $_{\text{C}4}$ -**H**), 7,47 (m, 2H, Ar $_{\text{C}2}$ -**H** & Ar $_{\text{C}6}$ -**H**), 7,59 (m, 2H, Ar $_{\text{C}3}$ -**H** & Ar $_{\text{C}5}$ -**H**), 7,64 (m, 2H, Ar' $_{\text{C}3}$ -**H** & Ar' $_{\text{C}5}$ -**H**), 7,74 (m, 2H, Ar' $_{\text{C}2}$ -**H** & Ar' $_{\text{C}6}$ -**H**), 8,33 (s, 1H, CO-N**H**-OH).

HR-MS m/z: 337,1908 [M+H] $^+$; berechnet für $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_2^+$: 337,1916

5.2.3 HDAC10-Negativkontrolle

32 (PZ043)



150 mg *N*-Boc-(2-Ethoxycarbonylvinyl)piperidin (1 Äq, 0,53 mmol) werden in 2 ml DCM: TFA 1: 1 gelöst, über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und 5 h auf 70°C erhitzt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und in 1,5 ml DMF aufgenommen. Es werden 300 mg K_2CO_3 (4 Äq, 2,2 mmol), 192 μ l 2-(4-Chlorphenyl)ethylbromid (2,5 Äq, 1,3 mmol) und eine Spatelspitze Kaliumiodid hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht gerührt und 3 h auf 65°C erhitzt. Im Anschluss wird eine Spatelspitze Kaliumhydroxid zugegeben, 2 h auf 65°C erhitzt, über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, 3 h auf 65°C erhitzt, am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und aus MeOH auf Kieselgel adsorbiert. Das Produkt wird mittels MPLC (Gradient: Chloroform: MeOH; 100 %: 0 % bis 0 %: 100 % V/V) gereinigt. Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

Das Produkt wird in 10 ml THF: H_2O 1: 1 aufgenommen, mit 55 mg Lithiumhydroxid* H_2O (2 Äq, 1,1 mmol) versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Lösung mit 1 M HCl_{aq} neutralisiert, am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und aus MeOH auf Kieselgel adsorbiert. Das Produkt wird mittels MPLC (Gradient: Chloroform: MeOH; 100 %: 0 % bis 0 %: 100 % V/V) gereinigt. Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

90 mg des Produktes (1 Äq, 0,31 mmol) werden in 4 ml THF: DMF 1: 1 aufgenommen, mit 152 mg $EDCI \cdot HCl$ (2 Äq, 0,66 mmol) und 89 mg HOBt (2 Äq, 0,66 mmol) versetzt und 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden 290 μ l DIPEA (5 Äq, 1,6 mmol) zugegeben, 10 min bei Raumtemperatur gerührt und 77 mg THP-Hydroxylamin (2 Äq, 0,66 mmol) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und aus MeOH auf Kieselgel adsorbiert. Das Produkt wird mittels MPLC (Gradient: Chloroform: MeOH; 100 %: 0 % bis

0 %: 100 % V/V) gereinigt. Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

Das Produkt wird in 4 ml MeOH und 1 ml 1 M HCl_{aq} aufgenommen und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird die Lösung am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, aus MeOH auf Kieselgel adsorbiert und mittels MPLC (Gradient: Chloroform: MeOH; 100 %: 0 % bis 0 %: 100 % V/V) gereinigt. Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, in 25 ml MeOH aufgenommen, 3 h unter Reflux und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wird auf Kieselgel adsorbiert und mittels MPLC (Gradient: Chloroform: MeOH; 100 %: 0 % bis 0 %: 100 % V/V) gereinigt. Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und mittels HPLC (Methode P3) gereinigt. Das Produkt wird bei -20°C, lichtgeschützt gelagert.

Beschaffenheit: Farbloser amorpher Feststoff.

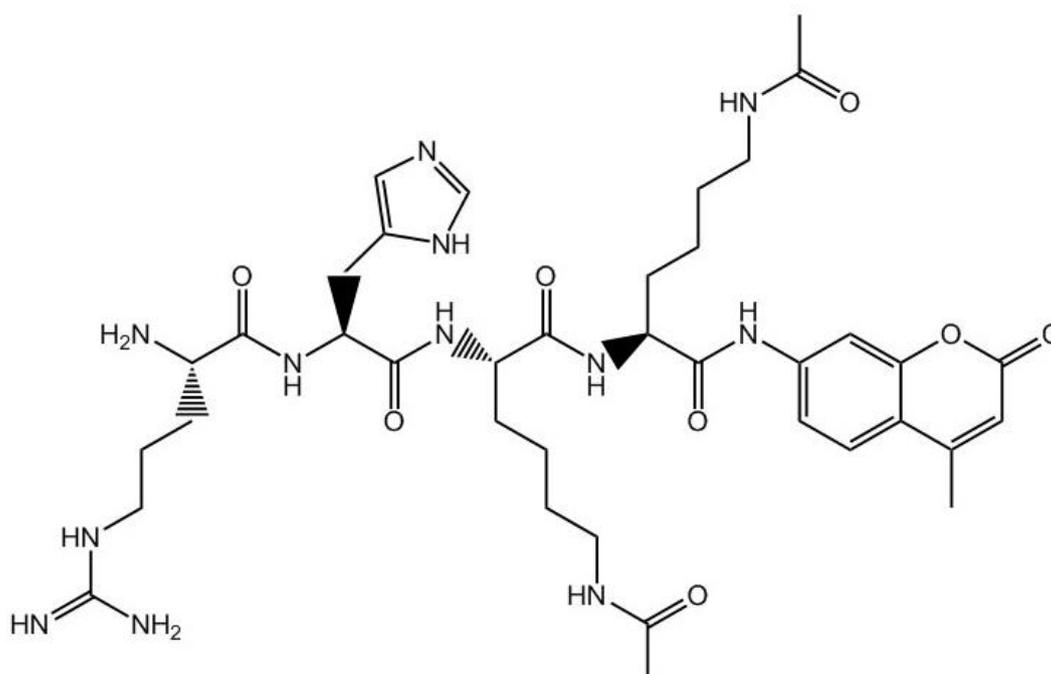
Ausbeute: 5,7 %

HPLC: rt 2,31 min (91,67 %)

¹H-NMR [(CD₃)₂SO, ppm]: δ = 1,46 (m, 2H, Piper_{C3}-**H** & Piper_{C5}-**H**), 1,76 (d, 2H, Piper_{C3}-**H** & Piper_{C5}-**H**, J = 0,8 Hz), 2,24 (m, 2H, Piper_{C2}-**H** & Piper_{C6}-**H**), 2,39 (m, 2H, Piper_{C2}-**H** & Piper_{C6}-**H**), 3,16 (m, 2H, N-CH₂-CH₂-Ar), 2,80 (s, 3H, CO₂CH₃), 3,58 (s, 1H, Piper_{C4}-**H**), 3,64 (s, 2H, N-CH₂-CH₂-Ar), 5,82 (dd, 1H, CH=CH-CO, J₁ = 1,2 Hz, J₂ = 16 Hz), 6,84 (dd, 1H, CH=CH-CO, J₁ = 6,4 Hz, J₂ = 15,6 Hz), 7,56 (m, 2H, Ar_{C2}-**H** & Ar_{C6}-**H**), 7,86 (m, 2H, Ar_{C3}-**H** & Ar_{C5}-**H**).

HR-MS m/z: 308,1410 [M+H]⁺; berechnet für C₁₇H₂₃ClNO₂⁺: 308,1417

5.2.4 hHDAC8-Substrat



Lys_{Ac}-AMC

577 mg Boc-*N*-Lys_{Ac} (1 Äq, 2 mmol) werden in 100 ml THF gelöst, auf -20 °C gekühlt und mit 405 mg *N*-Methylmorpholin (2 Äq, 4 mmol) versetzt. Anschließend werden 273 mg Isobutylchlorformiat (1 Äq, 2 mmol) tropfenweise zugegeben und zehn Minuten gerührt. Darauffolgend werden 526 mg 7-Amino-4-methylcoumarin (AMC) (1,5 Äq, 3 mmol, zugegeben. Der Reaktionsansatz wird 2 h bei -15 °C und anschließend bei Raumtemperatur für 12 h gerührt. Die Reaktion wird durch Wasserzugabe beendet und das Produkt mit EtOAc ausgeschüttelt. Die organische Phase wird mit Zitronensäure und mit Natriumcarbonatlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird aus einer Mischung aus EtOAc und DCM auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Petrolether: EtOAc; 67 %: 33 % bis 0 %: 100 %, V/V). Die Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

100 mg des Produktes werden in 10 ml 16%iger HCl in Cyclopentylmethylether aufgenommen und 20 min bei Raumtemperatur gerührt. Das Produkt wird mit Wasser extrahiert und lyophilisiert.

Boc-N-Arg_{Pbf}-His_{Tft}-Lys_{Ac}-OH

1 g 2-Chlortritylchlor-Harz (100-200 mesh, 1 % DVB) wird mit 8 ml DCM versetzt und quellen gelassen. Nach 5 h wird überschüssigen DCM verworfen und eine Lösung von 411 mg Fmoc-Lys_{Ac}-OH (1 Äq, 1 mmol) und 516 mg DIPEA (4 Äq, 4 mmol) in 3 ml DCM hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wird 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Überschüssige Lösung wird verworfen und das Harz dreimal mit einer Mischung aus DCM:MeOH:DIPEA 17:2:1 gewaschen. Anschließend wird der Kopplungsansatz dreimal mit DCM und fünfmal mit DMF je 8 ml gewaschen.

Das Harz wird zwei Mal mit je 5 ml 20%iger Piperidinlösung in DMF versetzt und zehn Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Der Überstand wird verworfen und das Harz fünf Mal mit je 8 ml DMF gewaschen.

Das Harz wird mit einer Lösung aus 2,5 g Fmoc-His_{Tft}-OH (4 Äq, 4 mmol), 1,5 g HBTU (4 Äq, 4 mmol) und 1,0 g DIPEA (8 Äq, 8 mmol) in 4 ml DMF versetzt und 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wird der Überstand verworfen und diese Reaktion wiederholt durchgeführt. Nach Abschluss der zweiten Reaktion wird der Überstand verworfen und fünfmal mit 8 ml DMF gewaschen.

Das Harz wird zwei Mal mit je 5 ml 20%iger Piperidinlösung in DMF versetzt und zehn Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Der Überstand wird verworfen und das Harz fünf Mal mit je 8 ml DMF gewaschen.

Das Harz wird mit einer Lösung aus 2,6 g Fmoc-Arg_{Pbf}-OH (4 Äq, 4 mmol), 1,5 g HBTU (4 Äq, 4 mmol) und 1,0 g DIPEA (8 Äq, 8 mmol) in 4 ml DMF versetzt und 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wird der Überstand verworfen und diese Reaktion wiederholt durchgeführt. Nach Abschluss der zweiten Reaktion wird der Überstand verworfen und fünfmal mit 8 ml DMF gewaschen.

Das Harz wird zwei Mal mit je 5 ml 20%iger Piperidinlösung in DMF versetzt und zehn Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Der Überstand wird verworfen und das Harz fünf Mal mit je 8 ml DMF gewaschen.

Das Harz wird mit 873 mg Diterbutyldicarbonat (4 Äq, 4 mmol) und 516 mg DIPEA (4 Äq, 4 mmol) in 4 ml DMF versetzt und 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wird der Überstand verworfen und das Harz einmal mit DMF und fünfmal mit DCM gewaschen. Das Harz wird mit 8 ml 25%iger Hexafluorisopropanollösung in DCM versetzt und zehn Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Der Überstand wird gesammelt und die Reaktion wiederholt. Das Harz wird fünfmal mit 8 ml DCM gewaschen und die vereinigten organischen Phasen am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet. Anschließend wird der Rückstand in ACN und Wasser aufgenommen und lyophilisiert.

H₂N-Arg-His-Lys_{Ac}-Lys_{Ac}-AMC

20 mg Lys_{Ac}-AMC (1 Äq, 0,05 mmol) werden in 333 µl DMF gelöst. Es werden 85,1 mg Boc-*N*-Arg_{Pbf}-His_{Trt}-Lys_{Ac}-OH (1,5 Äq, 0,08 mmol) und 666 µl DCM hinzugegeben. Anschließend werden 12,9 mg HOObt (1,5 Äq, 0,08 mmol) hinzugegeben und die Lösung auf 0 °C gekühlt. Es folgt die Zugabe von 12,3 mg EDCI (1,5 Äq, 0,08 mmol). Der Reaktionsansatz wird 90 Minuten gerührt. Anschließend werden 4 ml Wasser: DCM 1:1 zugegeben und die organische Phase gesammelt. Nach Waschen der wässrigen Phase mit 2 ml DCM werden die organischen Phasen vereinigt und am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet. Anschließend wird der Rückstand in ACN und Wasser aufgenommen und lyophilisiert.

Das Produkt wird in 5 ml 95%ige TFA-Lösung aufgenommen und für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Produkt säulenchromatographisch via HPLC gereinigt und die Produktfraktionen gefriergetrocknet.

Beschaffenheit: Weißer amorpher Feststoff.

Ausbeute: 92,0 %

HPLC: rt 2,47 min (96,31 %)

MS m/z: 405,44 [M+2H]²⁺; 809,65 [M+H]⁺

Quellen

1. Griffiths, A. *et al.*; An Introduction to Genetic Analysis. 1. ed. Auflage (2015).
2. Bird, A.; Perceptions of epigenetics. *Nature* 447, 396-398 (2007).
3. Carey, N. The epigenetics revolution: how modern biology is rewriting our understanding of genetics, disease and inheritance. Icon Books Ltd. (2012).
4. Bennett, M. *et al.*; Metabolic gene regulation in a dynamically changing environment. *Nature* 454, 1119-1122 (2008).
5. Turner B.; Environmental sensing by chromatin: an epigenetic contribution to evolutionary change. *FEBS Lett.* 585 (13), 2032-2040 (2011).
6. Reik, W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature.* 447, 425-432 (2007).
7. Yoo, C. & Jones, P. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 37-50 (2006).
8. Bernstein, B. *et al.* The mammalian epigenome. *Cell.* 128, 669-681 (2007).
9. Turner, B. The adjustable nucleosome: an epigenetic signaling module, *Trends Genet.* 28, 436-44 (2012).
10. Yan, M. *et al.* Epigenetics of the vascular endothelium. *J. Appl. Physiol.* 109, 916-926 (2010)
11. Klose, R. & Bird, A. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem. Sci.* 31, 89-97 (2006).
12. Bernstein, B. *et al.* A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell.* 125, 315-326 (2006).
13. Azuara, V. *et al.* Chromatin signatures of pluripotent cell lines. *Nat. Cell Biol.* 8, 532-538 (2006).
14. Jenuwein, T. & Allis, C. Translating the histone code. *Science.* 293, 1074-1080 (2001).
15. Smeenk, G. & Mailand, N. Writers, readers and erasers of histone ubiquitylation in DNA double-strand break repair. *Front. Genet.* 7, 1-14 (2016).
16. Walsh, C. Protein Posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 44, 7342-7372 (2005).
17. Strahl, B. & Allis, C. The language of covalent histone modifications. *Nature.* 403, 41-45 (2000).
18. Turner, B. Histone acetylation and an epigenetic code. *BioEssays.* 22, 836-845 (2000).
19. Cheung, W. *et al.* Acetylation and chromosomal functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 326-333 (2000).
20. Berger, S. *et al.* An operational definition of epigenetics. *Genes Dev.* 23, 781-783 (2009).

21. Luger, K. *et al.* Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*. 389, 251-260 (1997).
22. Ammar, R. *et al.* Chromatin is an ancient innovation conserved between Archaea and Eukarya. *Elife*. 1, 78 (2012).
23. Noll, M. Subunit structure of chromatin. *Nature*. 251, 249-251 (1974).
24. Finch, J. *et al.* Structure of nucleosome core particles of chromatin. *Nature*. 269, 29-36 (1977).
25. Alberts *et al.* *Molecular Biology of the cell*, 6. Auflage (2017).
26. Figueiredo, L. *et al.* Epigenetic regulation in African trypanosomes: a new kid on the block. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 504-513 (2009).
27. Lovrečić, L. *et al.* The Role of Epigenetics in Neurodegenerative Diseases. *Neurodegenerative Diseases*, IntechOpen (2013). [Zugriff 15.01.2021, 13:00 Uhr]
28. Brower-Toland, B. *et al.* Specific contributions of histone tails and their acetylation to the mechanical stability of nucleosomes. *J. Mol. Biol.* 346, 135-146 (2005).
29. Hall, M. *et al.* High-resolution dynamic mapping of histone-DNA interactions in a nucleosome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 124-129 (2009).
30. Jackson, V. In vivo studies on the dynamics of histone-DNA interaction: Evidence for nucleosome dissolution during replication and transcription and a low level of dissolution independent of both. *Biochemistry*. 29, 719-731 (1990).
31. Happel, N. & Doenecke, D. Histone H1 and its isoforms: contribution to chromatin structure and function. *Gene*. 431, 1-12 (2009).
32. Woodcock, C. *et al.* Role of linker histone in chromatin structure and function: H1 stoichiometry and nucleosome repeat length. *Chromosome Res.* 14, 17-25 (2006)
33. Kouzarides, T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 128, 693-705 (2007).
34. Daskalaki, M. *et al.* Histone methylation and acetylation in macrophages as a mechanism for regulation of inflammatory responses. *J. Cell. Physiol.* 233, 6495-6507 (2018)
35. Filippakopoulos, P. & Knapp, S. Targeting bromodomains: epigenetic readers of lysine acetylation. *Nat. Rev. Drug Discov.* 13, 337–56 (2014).
36. Furdas, S. *et al.* Inhibition of bromodomain-mediated protein– protein interactions as a novel therapeutic strategy. *Medchemcomm* 3, 123 (2012).
37. Arrowsmith, C. *et al.* Epigenetic protein families: a new frontier for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 11, 384–400 (2012).

38. Rodd, A. *et al.* Current and Emerging Therapeutics for Cutaneous T-Cell Lymphoma: Histone Deacetylase Inhibitors. *Lymphoma* 2012, 1–10 (2012).
39. Ruijter, A. *et al.* Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem. J.* 370, 737-749 (2003).
40. Grunstein, M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature.* 389, 349-352 (1997).
41. Falkenberg, K. & Johnstone, R. Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders. *Nat. Rev. Drug Discov.* 13, 673-691 (2014).
42. Rodd, A. *et al.* Current and Emerging Therapeutics for Cutaneous T-Cell Lymphoma: Histone Deacetylase Inhibitors. *Lymphoma.* 2012, 1-10 (2012).
43. Olson, D. *et al.* An Unbiased Approach To Identify Endogenous Substrates of “Histone” Deacetylase 8. *ACS Chem. Biol.* 10, 2210-2216 (2014).
44. Spange, S. *et al.* Acetylation of non-histone proteins modulates cellular signalling at multiple levels. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 185-198 (2009).
45. Glozak, M. *et al.* Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene.* 363, 15-23 (2005).
46. Frye, R. Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260, 273-279 (1999).
47. Gregoret, I. *et al.* Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *J. Mol. Biol.* 338, 17-31 (2004).
48. Bradley, E. *et al.* Histone Deacetylases in Bone Development and Skeletal Disorders. *Physiol. Rev.* 95, 1359-1381 (2015).
49. Sippl, W. & Jung, M. *Epigenetic Targets in Drug Discovery.* Wiley-VCH Verlag. 30 (2009).
50. Kim, J. *et al.* HDAC1 nuclear export induced by pathological conditions is essential for the onset of axonal damage. *Nat. Neurosci.* 13, 180-189 (2010).
51. Takami, Y. & Nakayama, T. N-terminal Region, C-terminal Region, Nuclear Export Signal, and Deacetylation Activity of Histone Deacetylase-3 Are Essential for the Viability of the DT40 Chicken B Cell Line. *J. Biol. Chem.* 275, 16191-16201 (2000).
52. Waltregny, D. *et al.* Histone deacetylase HDAC8 associates with smooth muscle alpha-actin and is essential for smooth muscle cell contractility. *FASEB J.* 19, 966-968 (2005).
53. Hayakawa, T. & Nakayama, J. Physiological roles of class I HDAC complex and histone demethylase. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011, 1-10 (2010).
54. Aramsangtienchai, P. *et al.* HDAC8 Catalyzes the Hydrolysis of Long Chain Fatty Acyl Lysine. *ACS Chem. Biol.* 11, 2685-2692 (2016).
55. Moser, M. *et al.* Transcription and beyond: the role of mammalian class I lysine deacetylases. *Chromosoma.* 123, 67-78 (2014).

56. Marks, P. Histone deacetylase inhibitors: a chemical genetics approach to understanding cellular functions. *Biochim. Biophys. Acta.* 1799, 717-725 (2010).
57. Wiech, N. *et al.* Inhibition of histone deacetylases: a pharmacological approach to the treatment of non-cancer disorders. *Curr. Top. Med. Chem.* 9, 257-271 (2009).
58. Verdin, E. *et al.* Class II histone deacetylases: versatile regulators. *Trends Genet.* 19, 286-293 (2003).
59. Nishino, T. *et al.* 14-3-3 regulates the nuclear import of class IIa histone deacetylases. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 377, 852-856 (2008).
60. Hai, Y. & Christianson, D. Histone deacetylase 6 structure and molecular basis of catalysis and inhibition. *Nat. Chem. Biol.* 12, 741-747 (2016).
61. Verdel, A. *et al.* Active maintenance of mHDA2/mHDAC6 histone-deacetylase in the cytoplasm. *Curr. Biol.* 10, 747-749 (2000).
62. Guardiola, A. & Yao, T. Molecular cloning and characterization of a novel histone deacetylase HDAC10. *J. Biol. Chem.* 277, 3350-3356 (2002).
63. Yang, Y. *et al.* HDAC10 promotes lung cancer proliferation via AKT phosphorylation. *Oncotarget.* 7, 59388-59401 (2016).
64. Zhang, M. *et al.* HDAC6 deacetylates and ubiquitinates MSH2 to maintain proper levels of MutS α . *Mol. Cell.* 55, 31-46 (2014).
65. Kawaguchi, Y. *et al.* The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell.* 115, 727-738 (2003).
66. Hai, Y. *et al.* Histone deacetylase 10 structure and molecular function as a polyamine deacetylase. *Nat. Comm.* 8, 15368-15368 (2017).
67. Tong, J. *et al.* Identification of HDAC10, a novel class II human histone deacetylase containing a leucine-rich domain. *Nucleic Acids Res.* 30, 1114-1123 (2002).
68. Gao, L. *et al.* Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the humane histone deacetylase family. *J. Biol. Chem.* 277, 25748-25755 (2002).
69. Yanginlar, C. & Logie, C. HDAC11 is a regulator of diverse immune functions. *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* 1861, 54-59 (2018).
70. Kutil, Z. *et al.* Histone Deacetylase 11 Is a Fatty-Acid Deacylase. *ACS Chem. Biol.* 13, 685-693 (2018).
71. Moreno-Yruela, C. *et al.* Histone Deacetylase 11 Is an ϵ -N-Myristollysine Hydrolase. *Cell Chem. Biol.* 25, 849-856 (2018).
72. Finnin, M. *et al.* Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature.* 401, 188-193 (1999).
73. Porter, N. & Christianson, D. Structure, Mechanism, and Inhibition of the Zinc-Dependent Histone Deacetylases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 59, 9-18 (2019).
74. Bottomley, M. *et al.* Structural and functional analysis of the human HDAC4 catalytic domain reveals a regulatory structural zinc-binding domain. *J. Biol. Chem.* 283, 26694-26704 (2008).

75. Lombardi, P. *et al.* Structure of prokaryotic polyamine deacetylase reveals evolutionary functional relationships with eukaryotic histone deacetylases. *Biochemistry*. 50, 1808-1817 (2011).
76. Arrar, M. *et al.* Structural insight into the separate roles of inositol tetrakisphosphate and deacetylase-activating domain in activation of histone deacetylase 3. *Protein Sci.* 22, 83-92 (2013).
77. Decroos, C. *et al.* Biochemical and structural characterization of HDAC8 mutants associated with Cornelia de Lange syndrome spectrum disorders. *Biochemistry*. 54, 6501-6513 (2015).
78. Porter, N. *et al.* Structural and Functional Influence of the Glycine-Rich Loop G³⁰²GGGY on the Catalytic Tyrosine of Histone Deacetylase 8. *Biochemistry*. 55, 6718-6729 (2016).
79. Gantt, S. *et al.* General Base-General Acid Catalysis in Human Histone Deacetylase 8. *Biochemistry*. 55, 820-832 (2016).
80. Witt, O. *et al.* HDAC family: What are the cancer relevant targets?. *Cancer Lett.* 277, 8-21 (2009).
81. Ozdag, H. *et al.* Differential expression of selected histone modifier genes in human solid cancers. *BMC Genomics*. 7, 90 (2006).
82. Weichert, W. *et al.* Histone deacetylases 1, 2 and 3 are highly expressed in prostate cancer and HDAC2 expression is associated with shorter PSA relapse time after radical prostatectomy. *Br. J. Cancer*. 98, 604-610 (2008).
83. Pulukuri, S. *et al.* Inhibition of histone deacetylase activity promotes invasion of human cancer cells through activation of urokinase plasminogen activator. *J. Biol. Chem.* 282, 35594-35603 (2007).
84. Wu, S. *et al.* LncRNA HRCEG, regulated by HDAC1, inhibits cell proliferation and epithelial-mesenchymal-transition in gastric cancer. *Cancer Genet.* 241, 25-33 (2020).
85. Zhang, L. *et al.* HDAC1 knockdown inhibits invasion and induces apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *Biol. Chem.* 399, 603-610 (2018).
86. Xiong, W. *et al.* MiR-761 inhibits colorectal cancer cell proliferation and invasion through targeting HDAC1. *Pharmazie*. 74, 111-114 (2019).
87. Halkidou, L. *et al.* Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer. *Prostate*. 59, 177-189 (2004).
88. Zhou, H. *et al.* Pharmacological or transcriptional inhibition of both HDAC1 and 2 leads to cell cycle blockage and apoptosis via p21^{Waf1/Cip1} and p19^{INK4d} upregulation in hepatocellular carcinoma. *Cell Prolif.* 51, 12447 (2018).
89. Tang, Z. *et al.* HDAC1 triggers the proliferation and migration of breast cancer cells via upregulation of interleukin-8. *Biol. Chem.* 398, 1347-1356 (2017).
90. Qi, Z. *et al.* HDAC2 promotes the EMT of colorectal cancer cells and via the modular scaffold function of ENSG00000274093.1. *J. Cell. Mol. Med.* 25, 1190-1197 (2020).
91. Hua, F. *et al.* Effect of downregulated histone deacetylase 2 expression on cell proliferation and cell cycle in cervical cancer. *J. Buon.* 19, 497-501 (2014).

92. Zhang, L. *et al.* Weighted gene co-expression network analysis and connectivity map identifies lovastatin as a treatment option of gastric cancer by inhibiting HDAC2. *Gene*. 681, 15-25 (2019).
93. Jang, Y. *et al.* Rosmarinic Acid, a Component of Rosemary Tea, Induced the Cell Cycle Arrest and Apoptosis through Modulation of HDAC2 Expression in Prostate Cancer Cell Lines. *Nutrients*. 10, 1784 (2018).
94. Darvishi, N. *et al.* MiR-646 prevents proliferation and progression of human breast cancer cell lines by suppressing HDAC2 expression. *Mol. Cell. Probes*. 53, 101649 (2020).
95. Ropero, S. *et al.* A truncating mutation of HDAC2 in human cancers confers resistance to histone deacetylase inhibition. *Nat. Genet*. 38, 566-569 (2006).
96. Feng, L. *et al.* Histone deacetylase 3 inhibits expression of PUMA in gastric cancer cells. *J. Mol. Med*. 91, 49-58 (2013).
97. Yan, Y. *et al.* Dual inhibition of AKT-mTOR and AR signaling by targeting HDAC3 in *PTEN*- or *SPOP*-mutated prostate cancer. *EMBO. Mol. Med*. 10, 8478 (2018).
98. Nemati, M. *et al.* Deregulated expression of HDAC3 in colorectal cancer and its clinical significance. *Adv. Clin. Exp. Med*. 27, 305-311 (2018).
99. Oehme, I. *et al.* Histone deacetylase 8 in neuroblastoma tumorigenesis. *Clin. Cancer Res*. 15, 91-99 (2009).
100. Balasubramanian, S. *et al.* A novel histone deacetylase 8 (HDAC8)-specific inhibitor PCI-34051 induces apoptosis in T-cell lymphomas. *Leukemia*. 22, 1026-1034 (2008).
101. Ahn, M. *et al.* histone deacetylase 8 as a novel therapeutic target in oral squamous cell carcinoma. *Oncol. Rep*. 37, 540-546 (2017).
102. Chui, C. *et al.* Induction of Apoptosis and Autophagy in Breast Cancer Cells by a Novel HDAV8 Inhibitor. *Biomolecules*. 9, 824 (2019).
103. Wu, J. *et al.* The up-regulation of histone deacetylase 8 promotes proliferation and inhibits apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Dig. Dis. Sci*. 58, 3545-3553 (2013).
104. Wang, B. *et al.* A dual role of miR-22 modulated by RelA/p65 in resensitizing fulvestrant-resistant breast cancer cells to fulvestrant by targeting FOXP1 and HDAC4 and constitutive acetylation of p53 at Lys283. *Oncogenetics*. 7, 54 (2018).
105. Zhang, X. *et al.* Interaction between p53 and Ras signaling controls cisplatin resistance via HDAC4- and HIF-1 α -mediated regulation of apoptosis and autophagy. *Theranostics*. 9, 1096-1114 (2019).
106. Chauchereau, A. *et al.* HDAC4 mediates transcriptional repression by the acute promyelocytic leukaemia-associated protein PLZF. *Oncogene*. 23, 8777-8784 (2004).
107. He, P. *et al.* HDAC5 promotes colorectal cancer cell proliferation by up-regulating DLL4 expression. *Int. J. Clin. Exp. Med*. 8, 6510-6516 (2015).
108. Zhong, L. *et al.* Histone deacetylase 5 promotes the proliferation and invasion of lung cancer cells. *Oncol. Rep*. 40, 2224-2232 (2018).
109. Oltra, S. *et al.* HDAC5 Inhibitors as a Potential Treatment in Breast Cancer Affecting Very Young Women. *Cancers*. 12, 412 (2020).

110. Gao, S. *et al.* MiR-489 suppresses tumor growth and invasion by targeting HDAC7 in colorectal cancer. *Clin. Transl. Oncol.* 20, 703-712 (2018).
111. Lei, Y. *et al.* Hdac7 promotes lung tumorigenesis by inhibiting Stat3 activation. *Mol. Cancer.* 16, 170 (2017).
112. Yu, Y. *et al.* The expression of HDAC7 in cancerous gastric tissues is positively associated with distant metastasis and poor patient prognosis. *Clin. Transl. Oncol.* 19, 1045-1054 (2017).
113. Caslini, C. *et al.* HDAC7 regulates histone 3 lysine 27 acetylation and transcriptional activity at super-enhancer-associated genes in breast cancer stem cells. *Oncogene.* 38, 6599-6614 (2019).
114. Liang, Z. *et al.* MicroRNA-30c-regulated HDAC9 mediates chemoresistance of breast cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 85, 413-423 (2020).
115. Hu, Y. *et al.* Clinical significance of HDAC9 in hepatocellular carcinoma. *Cell. Mol. Biol.* 65, 23-28 (2019).
116. Xiong, K. *et al.* Identification of HDAC9 as a viable therapeutic target for the treatment of gastric cancer. *Exp. Mol. Med.* 51, 1-15 (2019).
117. Ma, Z. *et al.* Histone deacetylase 9 downregulation decreases tumor growth and promotes apoptosis in non-small cell lung cancer after melatonin treatment. *J. Pineal. Res.* 67, 12587 (2019).
118. Aldana-Masangkay, G. & Sakamoto, K. The role of HDAC6 in cancer. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011, 875824 (2011).
119. Zhang, S. *et al.* SET7 interacts with HDAC6 and suppresses the development of colon cancer through inactivation of HDAC6. *Am. J. Transl. Res.* 12, 602-611 (2020).
120. Deskin, B. *et al.* Inhibition of HDAC6 Attenuates Tumor Growth of Non-Small Cell Lung Cancer. *Transl. Oncol.* 13, 135-145 (2020).
121. Li, t. *et al.* Histone deacetylase 6 in cancer. *J. Hematol. Oncol.* 11, 111 (2018).
122. Shan, C. *et al.* 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase promotes lung cancer growth via pentose phosphate pathway (PPP) flux mediated by LKB1-AMPK/HDAC10/G6PD axis. *Cell Death Diss.* 10, 525 (2019).
123. Islam, M. *et al.* HDAC10 as a potential therapeutic target in ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 144, 613-620 (2017).
124. Oehme, I. *et al.* Histone deacetylase 10-promoted autophagy as a druggable point of interference to improve the treatment response of advanced neuroblastomas. *Autophagy.* 9, 2163-2165 (2013).
125. Oehme, I. *et al.* Histone deacetylase 10 promotes autophagy-mediated cell survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 110, 2529-2601 (2013).
126. Ridinger, J. *et al.* Dual role of HDAC10 in lysosomal exocytosis and DNA repair promotes neuroblastoma chemoresistance. *Sci. Rep.* 8, 10039 (2018).
127. Huo, W. *et al.* Long non-coding RNA BCYRN1 promotes prostate cancer progression via elevation of HDAC11. *Oncol. Rep.* 44, 1233-1245 (2020).

128. Leslie, P. *et al.* Histone deacetylase 11 inhibition promotes breast cancer metastasis from lymph nodes. *Nat. Commun.* 10, 4192 (2019).
129. Liu, S. *et al.* HDAC11: a rising star in epigenetics. *Biomed. Pharmacother.* 131, 110607 (2020).
130. Gong, D. *et al.* Inhibition of histone deacetylase 11 promotes human liver cancer cell apoptosis. *Am. J. Transl. Res.* 11, 983-990 (2019).
131. Wang, W. *et al.* Interaction of FUS and HDAC1 regulates DNA damage response and repair in neurons. *Nat. Neurosci.* 16, 1383-1391 (2013).
132. Deardorff, M. *et al.* HDAC8 mutations in Cornelia de Lange syndrome affect the cohesion acetylation cycle. *Nature.* 489, 313-317 (2012).
133. Decroos, C. *et al.* Compromised structure and function of HDAC8 mutants identified in Cornelia de Lange Syndrome spectrum disorders. *ACS. Chem. Biol.* 9, 2157-2164 (2014).
134. Deardorff, M. *et al.* Structural aspects oh HDAC8 mechanism and dysfunction in Cornelia de Lange syndrome spectrum disorders. *Protein Sci.* 25, 1965-1976 (2016).
135. Pinto, G. *et al.* Growth attenuation is associated with histone deacetylase 10-induced autophagy in the liver. *J. Nutr. Biochem.* 27, 171-180 (2016).
136. Felice, C. *et al.* Review article: selective histone deacetylase isoforms as potential therapeutic targets in inflammatory bowel diseases. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 41, 26-38 (2015).
137. Kim, D. *et al.* Attenuation of Rheumatoid Inflammation by Sodium Butyrate Through Reciprocal Targeting of HDAC2 in Osteoclasts and HDAC8 in T Cells. *Front. Immunol.* 9, 1525 (2018).
138. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>; abgerufen am 26.01.2021 um 11:00 Uhr.
139. Heimburg, T. *et al.* Structure-Based Design and Synthesis of Novel Inhibitors Targeting HDAC8 from *Schistosoma mansoni* for the Treatment of Schistosomiasis. *J. Med. Chem.* 59, 2423-2435 (2016).
140. Hu, E. *et al.* Cloning and characterization of a novel human class 1 histone deacetylase that functions as a transcription repressor. *J. Biol. Chem.* 275, 15254-15264 (2000).
141. Van den Wyngaert, I. *et al.* Cloning and characterization of human histone deacetylase 8. *FEBS Lett.* 478, 77-83 (2000).
142. Buggy, J. *et al.* Cloning and characterization of a novel human histone deacetylase, HDAC8. *Biochem J.* 350, 199-205 (2000).
143. Li, J. *et al.* Histone deacetylase 8 regulates cortactin deacetylation and contraction in smooth muscle tissues. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 307, 288-295 (2014).
144. Samoza, J. *et al.* Structural snapshots of human HDAC8 provide insights into the class 1 histone deacetylase. *Structure.* 12, 1325-1334 (2004).
145. Vannini, A. *et al.* Substrate binding to histone deacetylases as shown by the crystal structure of the HDAC8-substrate complex. *EMBO Rep.* 8, 879-884 (2007).

146. Waltregny, D. *et al.* Expression of histone deacetylase 8, a class I histone deacetylase, is restricted to cells showing smooth muscle differentiation in normal human tissues. *Am. J. Pathol.* 165, 553-564 (2004).
147. Haberland, M. *et al.* Epigenetic control of skull morphogenesis by histone deacetylase 8. *Genes Dev.* 23, 1625-1630 (2009).
148. An, P. *et al.* HDAC8 promotes the dissemination of breast cancer cells via AKT/GSK-3 β /Snail signals. *Oncogene.* 39, 4956-4969 (2020).
149. Wolfson, N. *et al.* HDAC8 Substrates: histones and Beyond. *Biopolymers.* 99, 112-126 (2013).
150. Dose, A. *et al.* NMR profiling of histone deacetylase and acetyl-transferase activities in real time. *ACS. Chem. Biol.* 6, 419-424 (2011).
151. Gantt, S. *et al.* Catalytic activity and inhibition of human histone deacetylase 8 is dependent on the identity of the active site metal ion. *Biochemistry.* 45, 6170-6178 (2006).
152. Wilson, B. *et al.* An acetylation switch modulates the transcriptional activity of estrogen-related receptor alpha. *Mol. Endocrinol* 24, 1349-1358 (2010).
153. Lopez, G. *et al.* HDAC8, a potential therapeutic target for the treatment of malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNST). *PLoS One.* 10, 0133302 (2015).
154. Chakrabarti, A. *et al.* Targeting histone deacetylase 8 as a therapeutic approach to cancer and neurodegenerative diseases. *Future Med. Chem.* 8, 1609-1634 (2016).
155. Castañeda, C. *et al.* HDAC8 substrate selectivity is determined by long- and short-range interactions leading to enhanced reactivity for full-length histone substrates compared with peptides. *J. Biol. Chem.* 292, 21568-21577 (2017).
156. Schölz, C. *et al.* Acetylation site specificities of lysine deacetylase inhibitors in human cells. *Nat. biotechnol.* 33, 415-423 (2015).
157. Lee, H. *et al.* Negative regulation of histone deacetylase 8 activity by cyclic AMP-dependent protein kinase A. *Mol. Cell. Biol.* 24, 765-773 (2004).
158. Saha, A. *et al.* Synthesis and biological evaluation of a targeted DNA-binding transcriptional activator with HDAC8 inhibitory activity. *Bioorg. Med. Chem.* 21, 4201-4209 (2013).
159. Tian, Y. *et al.* Histone Deacetylase HDAC8 Promotes Insulin Resistance and β -Catenin Activation in NAFLD-Associated Hepatocellular Carcinoma. *Cancer. Res.* 75, 4803-4816 (2015).
160. Zha, J. *et al.* Posttranslational N-myristoylation of BID as a molecular switch for targeting mitochondria and apoptosis. *Science.* 290, 1761-1765 (2000).
161. Kao, H. *et al.* Isolation and characterization of mammalian HDAC10, a novel histone deacetylase. *J. Biol. Chem.* 277, 187-193 (2002).
162. Fischer, D. *et al.* Isolation and characterization of a novel class II histone deacetylase, HDAC10. *J. Biol. Chem.* 277, 6656-6666 (2002).
163. Wang, M. *et al.* A Novel Role for Histone Deacetylase 10 (HDAC10) in the Regulation of PD-L1 Expression and Immune Tolerance Mediated By Antigen Presenting Cells (APCs). *Blood.* 130, 3561 (2017).

164. Dahiya, S. *et al.* HDAC10 deletion promotes Foxp3(+) T-regulatory cell function. *Sci. Rep.* 10, 424 (2020).
165. Kotian, S. *et al.* Histone deacetylases 9 and 10 are required for homologous recombination. *J. Biol. Chem.* 286, 7722-7726 (2011).
166. Song, C. *et al.* Histone Deacetylase (HDAC) 10 Suppresses Cervical Cancer Metastasis through Inhibition of Matrix Metalloproteinase (MMP) 2 and 9 Expression. *J. Biol. Chem.* 288, 28021-28033 (2013).
167. Bradner, J. *et al.* Chemical phylogenetics of histone deacetylases. *Nat. Chem. Biol.* 6, 238-243 (2010).
168. Shinsky, S. & Christianson, D. Polyamine Deacetylase Structure and Catalysis: Prokaryotic Acetylpolyamine Amidohydrolase and Eukaryotic HDAC10. *Biochemistry.* 57, 3105-3114 (2018).
169. Herbst-Gervasoni, C. & Christianson, D. X-ray Crystallographic Snapshots of Substrate Binding in the Active Site of Histone Deacetylase 10. *Biochemistry.* 60, 303-313 (2021).
170. Jung, M. *et al.* Analogues of trichostatin a and trapoxin B as histone deacetylase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 7, 1655-1658 (1997).
171. Porter, N. *et al.* Unusual zinc-binding mode of HDAC6-selective hydroxamate inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 114, 13459-13464 (2017).
172. Shen, S. & Kozikowski, A. Why Hydroxamates May Not Be the Best Histone Deacetylase Inhibitors--What Some May Have Forgotten or Would Rather Forget? *ChemMedChem.* 11, 15-21 (2016).
173. Day, J. & Cohen, S. Investigating the selectivity of metalloenzyme inhibitors. *J. Med. Chem.* 56, 7997-8007 (2013).
174. Duvic, M. & Vu, J. Vorinostat: a new oral histone deacetylase inhibitor approved for cutaneous T-cell lymphoma. *Expert. Opin. Investig. Drugs.* 16, 1111-1120 (2007).
175. Furumai, R. *et al.* FK228 (depsipeptide) as a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylases. *Cancer Res.* 62, 4916-4921 (2002).
176. Lee, H. *et al.* FDA Approval: Belinostat for the Treatment of Patients with Relapsed or Refractory Peripheral T-cell Lymphoma. *Clin. Cancer Res.* 21, 2666-2670 (2015).
177. Lu, X. *et al.* Development of chidamide for peripheral T-cell lymphoma, the first orphan drug approved in China. *Intractable Rare Dis. Res.* 5, 185-191 (2016).
178. Raedler, L. Farydak (Panobinostat): First HDAC Inhibitor Approved for Patients with Relapsed Multiple Myeloma. *Am. Health Drug Benefits.* 9, 84-87 (2016).
179. Tjulandin, S. *et al.* A multicenter phase II study of the efficacy and safety of quisinostat (an HDAC inhibitor) in combination with paclitaxel and carboplatin chemotherapy (CT) in patients (pts) with recurrent platinum resistant high grade serous epithelial ovarian, primarily peritoneal or fallopian tube carcinoma cancer (OC). *J. Clin. Oncol.* 35, 5541-5541 (2017).
180. Aggarwal, R. *et al.* RENAIV: A randomized phase III, double-blind, placebo-controlled study of pazopanib with or without abexinostat in patients with locally advanced or metastatic renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 37, 681-681 (2019).

181. Gryder, B. *et al.* Targeted cancer therapy: giving histone deacetylase inhibitors all they need to succeed. *Future Med. Chem.* 4, 505-524 (2012).
182. Krennhrubec, K. *et al.* Design and evaluation of “Linkerless” hydroxamic acids as selective HDAC8 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17, 2874–2878 (2007).
183. Hu, E. *et al.* Identification of novel isoform-selective inhibitors within class I histone deacetylases. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 307, 720–728 (2003).
184. Olson, D. *et al.* Discovery of the first histone deacetylase 6/8 dual inhibitors. *J. Med. Chem.* 56, 4816–4820 (2013).
185. Heimburg, T. *et al.* Structure-Based Design and Biological Characterization of Selective Histone Deacetylase 8 (HDAC8) Inhibitors with Anti-Neuroblastoma Activity. *J. Med. Chem.* 60, 10188-10204 (2017).
186. Gerald, M. *et al.* Selective Inhibition of Histone Deacetylase 10: Hydrogen Bonding to the Gatekeeper Residue is Implicated. *J. Med. Chem.* 62, 4426-4443 (2019).
187. Butler, K. *et al.* Rational design and simple chemistry yield a superior, neuroprotective HDAC6 inhibitor, tubastatin A. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 10842-10846 (2010).
188. De Vreese, R. & D'hooghe, M. Synthesis and applications of benzohydroxamic acid-based histone deacetylase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* 135, 174-195 (2017).
189. Herbst-Gervasoni, C. *et al.* Structural Basis for the Selective Inhibition of HDAC10, the Cytosolic Polyamine Deacetylase. *ACS. Chem. Biol.* 15, 2154-2163 (2020).
190. Herbst-Gervasoni, C. & Christianson, D. Binding of N⁸-Acetylspermidine Analogues to Histone Deacetylase 10 Reveals Molecular Strategies for Blocking Polyamine Deacetylation. *Biochemistry.* 58, 4957-4969 (2019).
191. Melesina, J. *et al.* Strategies To Design Selective Histone Deacetylase Inhibitors. *Chem. Med. Chem. Online* ahead of print (2021).
192. Janzen, W. Screening technologies for small molecule discovery: the state of the art. *Chem. Biol.* 21, 1162-1170 (2014).
193. Enzo Life Sciences. FLUOR DE LYS-HDAC8 deacetylase substrate. PRODUCT DATA SHEET; BML-KI178.
194. Marek, M. *et al.* Structural basis for the inhibition of histone deacetylase 8 (HDAC8), a key epigenetic player in the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *PLoS. Pathog.* 9, 1003645 (2013).
195. Heltweg, B. *et al.* In vitro assays for the determination of histone deacetylase activity. *Methods.* 36, 332-337 (2005).
196. Simeonov, A. *et al.* Fluorescence spectroscopic profiling of compound libraries. *J. Med. Chem.* 51, 2363-2371 (2008).
197. Herp, D. Entwicklung eines In-vitro-Aktivitätstestsystems und selektiver Hemmstoffe für die Histondesacetylase 10. Inauguraldissertation (2020).

198. Brückner, R. *Reaktionsmechanismen*, 3. Auflage (2009).
199. Frérot, E. *et al.* PyBOP[®] and PyBroP: Two reagents for the difficult coupling of the α,α -dialkyl amino acid, *Aib.*. *Tetrahedron*. 47, 259-270 (1991).
200. Kim, M. & Patel, D. 'BOP' as a reagent for mild and efficient preparation of esters. *Tetrahedron Lett.* 35, 5603–5606 (1994).
201. Ablott, T. *et al.* High Temperature Postsynthetic Rearrangement of Dimethylthiocarbamate-Functionalized Metal-Organic Frameworks. *Cryst. Growth Des.* 16, 7067-7073 (2016).
202. Mansour, N. & Bickle, Q. Comparison of microscopy and alamar blue reduction in a larval based assay for schistosome drug screening. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 4, 795 (2010).
203. Twigg, R. Oxidation-Reduction Aspects of Resazurin. *Nature*. 155, 401-402 (1945).
204. https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-2268.aspx?geo_country=de;
abgerufen am 28.02.2021 um 14:00 Uhr.
205. Reikvam, H. *et al.* Heat shock protein 70 - the next chaperone to target in the treatment of human acute myelogenous leukemia? *Expert. Opin. Ther. Targets*. 18, 929-944 (2014).
206. Beyer, M. *et al.* How to Distinguish Between the Activity of HDAC1-3 and HDAC6 with Western Blot. *Methods Mol. Biol.* 1510, 355-364 (2017).
207. Leonhardt, M. *et al.* Design and biological evaluation of tetrahydro-beta-carboline derivatives as highly potent histone deacetylase 6 (HDAC6) inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* 152, 329-357 (2018).
208. Sellmer, A. *et al.* Marbostat-100 Defines a New Class of Potent and Selective Antiinflammatory and Antirheumatic Histone Deacetylase 6 Inhibitors. *J. Med. Chem.* 61, 3454-3477 (2018).
209. Lamark, T. *et al.* Regulation of selective autophagy: the p62/SQSTM1 paradigm. *Essays. Biochem.* 61, 609-624 (2017).
210. Koeneke, E. *et al.* HDAC Family Members Intertwined in the Regulation of Autophagy: A Druggable Vulnerability in Aggressive Tumor Entities. *Cells*. 4, 135-168 (2015).
211. Marx-Blümel, L. *et al.* Assessment of HDACi-Induced Cytotoxicity. *Methods. Mol. Biol.* 1510, 23-45 (2017).

212. Rogakou, E. *et al.* Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *J. Biol. Chem.* 275, 9390-9395 (2000).
213. Kopp, B. *et al.* Validation of the gammaH2AX biomarker for genotoxicity assessment: a review. *Arch. Toxicol.* 93, 2103-2114 (2019).
214. Obayashi, H. *et al.* Histone deacetylase 10 knockout activates chaperone-mediated autophagy and accelerates the decomposition of its substrate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 523, 246-252 (2020).
215. Park, C. *et al.* Regulated degradation of Chk1 by chaperone-mediated autophagy in response to DNA damage. *Nat. Commun.* 6, 6823 (2015).
216. Radhakrishnan, R. *et al.* Histone deacetylase 10 regulates DNA mismatch repair and may involve the deacetylation of MutS homolog 2. *J. Biol. Chem.* 290, 22795-22804 (2015).
217. Pettersson, M. & Crews, C. PROteolysis TARgeting Chimeras (PROTACs) - Past, present and future. *Drug. Discov. Today. Technol.* 31, 15-27 (2019).
218. Banks, J. *et al.* Integrated modeling program, applied chemical theory (IMPACT). *J. Comput. Chem.* 26, 1752-1780 (2005).
219. Miyake, Y. *et al.* Structural insights into HDAC6 tubulin deacetylation and its selective inhibition. *Nat. Chem. Biol.* 12, 748-754 (2016).
220. Watts, K. *et al.* Conformational Search Method for Efficient Generation of Bioactive Conformers. *J. Chem. Inf. Model.* 50, 534-546 (2010).
221. Burley, S. *et al.* RCSB Protein Data Bank: Sustaining a living digital data resource that enables breakthroughs in scientific research and biomedical education. *Protein. Sci.* 27, 316-320 (2018).
222. Webb, B. & Sali, A. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. *Curr. Protoc. Bioinform.* 54, 5.6.1-5.6.37 (2016).
223. Autorenkollektiv. Organikum. WILEY-VCH Verlag GMBH. 24. Auflage, 751ff (2015).

Anhang

Im digitalen Anhang (Anhang.pdf am Ende dieser Arbeit) befinden sich:

- Ab Seite A5 alle NMR-Spektren
- Ab Seite A21 alle HPLC-Spektren
- Ab Seite A37 alle HR-MS-Spektren
- Ab Seite A52 zusätzliche WesternBlot-Experimente mit Neuroblastomzellen

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht.

Originalarbeiten

Heimburg, T.; Kolbinger, F. R.; **Zeyen, P.**; Ghazy, E.; Herp, D.; Schmidtkunz, K.; Melesina, J.; Shaik, T. B.; Erdmann, F.; Schmidt, M.; Romier, C.; Robaa, D.; Witt, O.; Oehme, I.; Jung, M.; Sippl, W., Structure-Based Design and Biological Characterization of Selective Histone Deacetylase 8 (HDAC8) Inhibitors with Anti-Neuroblastoma Activity. *J. Med. Chem.* 60, 10188-10204 (2017).

Ghazy, E.; **Zeyen, P.**; Herp, D.; Hügler, M.; Schmidtkunz, K.; Erdmann, F.; Robaa, D.; Schmidt, M.; Morales, E. R.; Romier, C.; Gunther, S.; Jung, M.; Sippl, W., Design, synthesis, and biological evaluation of dual targeting inhibitors of histone deacetylase 6/8 and bromodomain BRPF1. *Eur. J. Med. Chem.* 200, 112338 (2020).

Vaca, H.R.; Celentano, A.M.; Toscanini, M.A.; Heimburg, T.; Ghazy, E.; **Zeyen, P.**; Hauser, A.T.; Oliveira, G.; Elissondo, M.C.; Jung, M.; Sippl, W.; Camicia, F.; Rosenzvit, M.C. The potential for histone deacetylase (HDAC) inhibitors as cestocidal drugs. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 15, 9226 (2021).

Simoben, C. V.; Ghazy, E.; **Zeyen, P.**; Darwish, S.; Schmidt, M.; Romier, C.; Robaa, D.; Sippl, W., Binding free energy (BFE) calculations and quantitative structure-activity relationship (QSAR) analysis of *Schistosoma mansoni* histone deacetylase 8 (smHDAC8) inhibitors. *Molecules.* 26, 2584 (2021).

Poster

Zeyen, P.; Heimburg, T.; Robaa, D.; Schmidt, M.; Herp, D.; Jung, M.; Sippl, W. Investigations into the synthesis of novel histone deacetylase 8 inhibitors. "CRC/SFB 922 Symposium on Medical Epigenetics" Freiburg (2018).

Danksagung

In erster Linie möchte ich meinen Dank gegenüber Prof. Dr. Wolfgang Sippl ausdrücken, für die Möglichkeit dieses interessante und vielversprechende Thema innerhalb einer außerordentlich netten und hilfsbereiten Arbeitsgruppe bearbeiten zu dürfen. Darüber hinaus möchte ich PD Dr. Matthias Schmidt für die direkte Betreuung meiner Arbeit und das Beantworten meiner zahlreichen Fragen danken. Ebenso möchte ich Dr. Tino Heimbürg und Ehab Ghazy danken, für die Hilfe und die angenehme Zusammenarbeit im Labor. Dr. Dina Robaa und Talha Yesiloglu möchte ich für die Auswertung und Interpretation der Dockinglösungen meiner Substanzen und das Erstellen einiger in dieser Arbeit verwendeten Abbildungen danken. Der gesamten Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Wolfgang Sippl möchte ich für die angenehme Zusammenarbeit, die zahlreichen Diskussionen und die Aktivitäten, die über wissenschaftliches Arbeiten hinausgingen, danken.

Weiterer Dank gilt Prof. Dr. Manfred Jung und seiner Arbeitsgruppe für die angenehme Zusammenarbeit, das Durchführen des zHDAC10- und anderen HDAC-Assays, das Beibringen des hHDAC8-Assays und zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen. Namentlich erwähnen möchte ich hier Dr. Daniel Herp, der den zHDAC10-Assay etabliert und durchgeführt hat und Karin Schmidtkunz, die mich in den hHDAC8-Assay einarbeitete.

PD Dr. Frank Erdmann möchte ich für das Durchführen der Zytotoxizitätsassays und der Bereitstellung des Arbeitsplatzes zum Durchführen der hHDAC8- und smHDAC8-Assays danken.

Prof. Dr. Christophe Romier möchte ich für das Bereitstellen der Enzymlösungen danken, ohne die die von mir durchgeführten Assays nicht funktioniert hätten.

Dr. Christian Ihling danke ich für das Anfertigen der HR-MS-Spektren und Manuela Woigk für das Anfertigen der zahlreichen MS-Spektren, die die Strukturaufklärung meiner Substanzen signifikant erleichtert haben.

PD Dr. Ina Oehme und ihrer Arbeitsgruppe danke ich für das Durchführen der Assays an BE(2)-C-Zellen und weiterführenden Experimenten mit einigen von mir hergestellten hHDAC8-Inhibitoren.

Prof. Dr. Oliver Krämer und seiner Arbeitsgruppe danke ich für die zahlreichen Assays an diversen Leukämie-Zellen und weiterführenden Experimenten, bei denen von mir hergestellte HDAC10-Inhibitoren zum Einsatz kamen.

Dr. Marat Meleshin und der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Mike Schutkowski danke ich für die Möglichkeit der Synthese des hHDAC8-Substrates, wodurch das Durchführen des hHDAC8-Assays einfacher und bedeutend günstiger wurde.

Dr. Dieter Ströhl danke ich für das Anfertigen der vielen ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren, ohne die die Strukturaufklärung meiner Substanzen nicht möglich gewesen wäre.

Ebenso danke ich den technischen Assistenten, die im Institut für Pharmazie hervorragende Arbeit leisten. Zu erwähnen sind hier Simone Kniesa, Martina Mannd und Antje Herbrich-Peters für das akkurate Einwiegen meiner Substanzen und das Durchführen der zahlreichen analytischen wie auch präparativen HPLC-Läufe.

Ebenso danke ich allen, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben und die zum Gelingen meiner Synthesen und Assays beigetragen haben, die hier keine namentliche Erwähnung gefunden haben.

Ebenfalls danke ich meiner Freundin Sophia May für ihre unermüdliche Unterstützung und Geduld im Alltag, aber auch während der Anfertigung dieser Arbeit, sowie für die ein oder andere wissenschaftliche Diskussion.

Darüber hinaus danke ich meinen besten Freunden David Hillmann und Daniel Carstens, die seit unserer gemeinsamen Schulzeit hinter mir stehen und mich in all meinen Vorhaben unterstützen. Sie haben durch diverse Partys, Festivals und Spieleabende die teils stressige Arbeit ausgeglichen und während der Corona-Pandemie durch online Zusammenkünfte diesen Ausgleich aufrechterhalten.

Abschließend möchte ich meiner Familie und vor allem meinen Eltern danken. Sie haben mich durchweg unterstützt, sowohl finanziell als auch emotional. Ohne meine Familie wären mein Studium und meine Arbeit während der Promotion nicht möglich gewesen.

Vielen Dank.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die den Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Ich versichere, dass ich diese Arbeit bisher an keiner anderen Universität oder Hochschule im In- und Ausland vorgelegt habe.

Halle (Saale), 2021

Patrik René Zeyen

Angaben zur Person

Name	Patrik René Zeyen
Geburtsdatum	17.10.1992
Geburtsort	Wilhelmshaven
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Wohnsitz	Kurt-Freund-Straße 23, 06130 Halle (Saale)

Lebenslauf

Schulbildung

1999 – 2003	Grundschule Altengroden, Wilhelmshaven
2003 – 2004	Orientierungsstufe Altengroden, Wilhelmshaven
2004 – 2011	Käthe-Kollwitz-Gymnasium, Wilhelmshaven

Studium

2011 – 2014	Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, Bachelor of Science Biochemie
2014 - 2016	Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, Master of Science Biochemie
2017 – heute	Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Promotion am Institut für Pharmazie

Halle (Saale), 2021

Patrik René Zeyen