

# **Synthese, Konformationsanalyse und biologische Evaluierung von neuartigen antitumoraktiven Peptoid-Derivaten**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Viktoria Krieger**  
aus Pawlodar

Düsseldorf, März 2017

aus dem Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. Thomas Kurz
2. JProf. Dr. Finn K. Hansen

Tag der mündlichen Prüfung: 15.05.2017

## **Eidesstaatliche Erklärung**

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Die Dissertation ist von mir in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Fakultät eingereicht worden. Bisher wurden von mir keine Promotionsversuche (weder erfolglos noch erfolgreich) unternommen.

Düsseldorf, März 2017

(Viktoria Krieger)

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Oktober 2012 bis September 2016 am Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Arbeitskreis von Prof. Dr. Thomas Kurz. Ich danke ihm vielmals für die stets offene Arbeitsatmosphäre und die Möglichkeit, die er mir gegeben hat, in seinem Arbeitskreis zu promovieren. Zusätzlich wurde diese Arbeit durch JProf. Dr. Finn K. Hansen betreut. Ihm danke ich herzlich für die Überlassung des Themas, die engagierte Betreuung und für die Übernahme des Korreferats.

Für die bioinformatischen Untersuchungen möchte ich Dr. Emanuele Ciglia, Dr. Christoph Gertzen und Benedikt Frieg aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Holger Gohlke danken. Für die Durchführung der biologischen Untersuchungen danke ich Dr. Alexandra Hamacher aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Matthias U. Kassack, Dr. Johanna Senger aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Manfred Jung und Katharina Stenzel aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Thomas Kurz. Für die Aufnahme der Röntgenstruktur möchte ich Dr. Vera Vasylyeva und für die Durchführung tiefergehender NMR-Experimente möchte ich Roland Thoma und Dr. Nader de Sousa Amadeu aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Christoph Janiak vom Institut für Anorganische Chemie und Strukturchemie danken. Bei Dr. Peter Tommes und Peter Behm vom Institut für Anorganische Chemie und Strukturchemie sowie bei Maria Beuer vom Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie bedanke ich mich für die Aufnahme der NMR- und Massenspektren. Gabriele Zerta vom Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie danke ich für die Anfertigung der Elementaranalysen.

Zusätzlich möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die tolle Arbeitsatmosphäre, die Freundschaft und die konstruktiven Diskussionen bedanken. Herrn JProf. Dr. Finn K. Hansen danke ich vielmals für seine Hilfe während der Promotion sowie bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit und die erfolgreiche Zusammenarbeit in den letzten Jahren. Ein großer Dank für die tollen Unterhaltungen geht ebenfalls an Daniela Diedrich, meiner langjährigen Laborkollegin, Katharina Stenzel, Leandro Avelar, Tanja Knaab und Marcel Mackwitz.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und meinem Ehemann Waldemar für ihre Unterstützung, ihr Verständnis und die stets hilfreich geführten Diskussionen.

## Publikationen

### Originalarbeiten

**Krieger, V.;** Ciglia, E.; Thoma, R.; Vasylyeva, V.; Frieg, B.; de Sousa Amadeu, N.; Kurz, T.; Janiak, C.; Gohlke, H.; Hansen, F. K.,  $\alpha$ -Aminoxy peptoids: A unique peptoid backbone with a preference for *cis*-amide bonds, *Chem. Eur. J.* **2017**, *23* (15), 3699–3707.

**Krieger, V.;** Hamacher, A.; Gertzen, C. G. W.; Senger, J.; Marek, M.; Romier, C.; Kurz, T.; Jung, M.; Gohlke, H.; Kassack, M. U.; Hansen, F. K., Design, multicomponent synthesis and anticancer activity of a focused library of HDAC inhibitors with peptoid-based cap groups, *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (13), 5493–5506.

Eine weitere Originalarbeit befindet sich in Vorbereitung.

### Sonstige Originalarbeit

Neukirchen, S.; **Krieger, V.;** Roschger, C.; Schubert, M.; Elsässer, B.; Cabrele, C., Impact of the amino-acid sequence on the conformation of side-chain lactam-bridged octapeptides, *J. Pept. Sci.* **2017**, DOI: 10.1002/psc.2997.

### Posterpräsentationen

Einige Teile dieser Arbeit wurden bereits auf wissenschaftlichen Tagungen als Poster präsentiert:

$\alpha$ -Aminoxy Peptoids: A Unique Peptoid Backbone with a Preference for *Cis*-Amide Bonds.

**Syntschewsk V.;** Ciglia E; de Sousa Amadeu N; Vasylyeva V; Janiak C; Kurz T; Gohlke H; Hansen F K, Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, 24.09 – 26.09.2014, Frankfurt a. M.

Synthesis and systematic conformational investigation of  $\alpha$ -aminoxy peptoids. **Syntschewsk V.;** Ciglia E; de Sousa Amadeu N; Vasylyeva V; Janiak C; Kurz T; Gohlke H; Hansen F K, 4<sup>th</sup> Austrian Peptide Symposium, 04.12.2014, Salzburg.

Multicomponent synthesis and anticancer activity of a novel class of peptoid-based HDAC inhibitors. **Syntschewsk V**; Hamacher A; Kurz T; Kassack M U; Hansen F K, Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, 23.09 – 25.09.2015, Düsseldorf.

Efficient synthesis and anticancer activity of a focused library of novel peptoid-based HDAC inhibitors. **V. Syntschewsk**, A. Hamacher, J. Senger, M. Marek, C. Romier, T. Kurz, M. Jung, M. U. Kassack, F. K. Hansen, Frontiers in Medicinal Chemistry, 13.03 – 16.03.2016, Bonn.

*- A person who never made a mistake never tried anything new -*

*Albert Einstein*

***Für meine Familie***

# Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	I
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1    Histonacetyltransferasen und Histondeacetylasen.....	2
1.1.1    Klassen und Isoformen der Histondeacetylasen.....	3
1.1.2    Histondeacetylasen und ihre Rolle bei der Tumorentstehung.....	6
1.1.3    Klassen der HDAC-Inhibitoren .....	8
1.1.4    HDAC-Inhibitoren in der klinischen Entwicklung zur Therapie von..... Tumorerkrankungen .....	15
1.1.5    Klassen- und Isoformselektive HDAC-Inhibitoren.....	16
1.2    Peptidomimetika .....	17
1.2.1    Peptoide im Vergleich zu Peptiden.....	20
1.2.2    Peptoid-Klassen.....	20
1.2.3 <i>Cis-/trans</i> -induzierende Seitenketten.....	22
1.2.4    Ausgewählte Applikationen von Peptoiden.....	24
<b>2. Leitgedanke</b> .....	<b>27</b>
<b>3. Peptoid-basierte HDAC-Inhibitoren</b> .....	<b>28</b>
3.1    Zielsetzung .....	28
3.2    Zusammenfassung der Publikation .....	29
3.3    Publikation .....	31
<b>4. Peptoid-basierte 2-Aminoanilide als selektive HDAC-Inhibitoren</b> .....	<b>64</b>
4.1    2-Aminoanilide.....	64
4.1.1    Foot pocket der HDAC-Klasse I .....	66
4.1.2    Bindungsmechanismus der 2-Aminoanilide .....	67
4.1.3    2-Aminoanilide in der Therapie von Tumorerkrankungen .....	70
4.2    Zielsetzung .....	71
4.3    Retrosynthetische Analyse .....	72
4.4    Literaturübersicht .....	74
4.4.1    Submonomermethode – Festphase und Flüssigphase.....	75
4.4.2    Synthese von Isocyaniden.....	76
4.4.3    Synthese von Biphenylen.....	77

4.5	Synthese der peptoid-basierten 2-Aminoanilide .....	78
4.5.1	Darstellung der Boc-geschützten 1,2-Phenylendiaminderivate <b>XX</b> , <b>XXII</b> und <b>XXVI</b> .....	79
4.5.2	Darstellung der 2-Aminoanilide <b>9a-h</b> und <b>10a-f</b> anhand der Ugi-4-Komponenten Reaktion <b>I</b> .....	81
4.5.3	Darstellung des 2-Aminoanilids <b>9i</b> anhand der Submonomermethode <b>II</b> .....	84
4.5.4	Darstellung der 2-Aminoanilide <b>9j,k</b> anhand der Submonomermethode <b>III</b> .....	87
4.6	NMR-Untersuchungen .....	90
4.7	Biologische Evaluation .....	93
4.7.1	MTT Zellviabilitäts-Assay.....	94
4.7.2	HDAC-Inhibition im Ganzzell-Assay.....	96
4.7.3	Inhibition ausgewählter HDAC-Isoformen .....	98
4.8	Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse .....	100
<b>5.</b>	<b>Synthese und Konformationsanalyse von <math>\alpha</math>-Aminoxy Peptoiden</b> .....	<b>103</b>
5.1	Zielsetzung .....	103
5.2	Zusammenfassung der Publikation .....	104
5.3	Publikation .....	106
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>166</b>
<b>7.</b>	<b>Summary</b> .....	<b>177</b>
<b>8.</b>	<b>Experimenteller Teil</b> .....	<b>188</b>
8.1	Geräteverzeichnis und Analysemethoden .....	188
8.2	Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV) und analytische Daten.....	190
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	241
	VERZEICHNIS DER SCHEMATA.....	245
	TABELLENVERZEICHNIS .....	246
	LITERATURVERZEICHNIS.....	247

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

### Å

Å                      Ångström (0,1 nm)

### A

A2780                      humane Ovarialkarzinom-Zelllinie  
abs.                      absolut  
AcCl                      Acetylchlorid  
ACN                      Acetonitril  
ACE                      Angiotensin-Konversionsenzym  
ADMET                      Adsorption, Distribution, Metabolismus, Exkretion, Toxizität  
AMC                      7-Amino-4-methylcoumarin  
AML                      akute myeloische Leukämie  
AMP                      antimikrobielle Peptide  
Äquiv.                      Äquivalente  
AS                      Aminosäure  
AAV                      Allgemeine Arbeitsvorschrift

### B

BA                      butyric acid (Buttersäure)  
Boc                      *tert*-Butyloxycarbonyl  
Boc<sub>2</sub>O                      Di-*tert*-butyldicarbonat

### C

Cal27                      humane Zungenkarzinom-Zelllinie  
<sup>13</sup>C NMR                      carbon nuclear magnetic resonance  
CD                      Circular dichroismus  
CDCl<sub>3</sub>                      deuteriertes Chloroform  
CFDA                      Chinese Food and Drug Administration  
CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>                      Dichlormethan  
CHN                      Elementaranalyse  
CisR                      cisplatin-resistente Zelllinie  
CMT                      Morbus Charcot–Marie–Tooth  
CTCL                      kutanes T-Zell Lymphom

## D

$\delta$	chemische Verschiebung in ppm
d	Dublett (dd = Dublett vom Dublett; dt = Dublett vom Triplet)
DC	Dünnschichtchromatographie
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	<i>N,N</i> -Dimethylpyridin-4-amin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> = deuteriertes Dimethylsulfoxid)
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )

## E

EDC·HCl	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid
EMA	European Medicines Agency (Europäische Arzneimittel-Agentur)
ER <sup>+</sup>	östrogenrezeptor-positiv
EtOAc	Ethylacetat
Et <sub>3</sub> N	Triethylamin
EtOH	Ethanol

## F

FDA	Food and Drug Administration (Lebens- und Arzneimittelbehörde)
FP	foot pocket

## H

<sup>1</sup> H NMR	proton nuclear magnetic resonance
H <sub>2</sub>	Wasserstoff
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
HAT/HATs	Histonacetyltransferase/Histonacetyltransferasen
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorphosphat
HBR	Bromwasserstoff
HCl	Salzsäure
HDAC/HDACs	Histondeacetylase/Histondeacetylasen

HDACi/HDACi	Histondeacetylase-Inhibitoren
HDAH	histone-deacetylase-like amidohydrolase
HDLP	histone-deacetylase-like protein
<b>I</b>	
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
<b>J</b>	
<i>J</i>	Kopplungskonstante
<b>K</b>	
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Kaliumcarbonat
<b>L</b>	
LiOH·H <sub>2</sub> O	Lithiumhydroxid Monohydrat
LM	Lösungsmittel
LP	lower pocket
<b>M</b>	
m	Multiplett
MD	Molekulardynamik
MDS	myelodysplastisches Syndrom
MeOH	Methanol
MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub>	deuteriertes Methanol
MHz	Megahertz
M	mol pro Liter
MM	multiples Myelom
mmol	Millimol
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
<b>N</b>	
Na	Natrium
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Natriumcarbonat
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NaH	Natriumhydrid
NaOH	Natriumhydroxid
NBO	Natural bond orbital

n.e.	Kein Effekt ( <i>no effect</i> )
NH <sub>2</sub> OH·HCl	Hydroxylamin-hydrochlorid
nm	Nanometer
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie ( <i>nuclear magnetic resonance</i> )
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

#### P

PDB	protein data bank
Pd(C)	Palladium-Kohle-Katalysator
Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub>	Triphenylphosphin
PhB(OH) <sub>2</sub>	Phenylboronsäure
PLI	Protein-Ligand-Interaktion
PPI	Protein-Protein-Interaktion
ppm	parts per million
PTCL	peripheres T-Zell Lymphom
PTM	posttranslationale Histonmodifikation

#### Q

q	Quartett
---	----------

#### R

RMSD	Root-mean-square deviation
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
ROESY	Rotational Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
RP	reverse Phase
RT	Raumtemperatur

#### S

s	Singulett
SAR	structure-activity relationship
SG	Schutzgruppe
SI	Selektivitätsindex
SP	side pocket

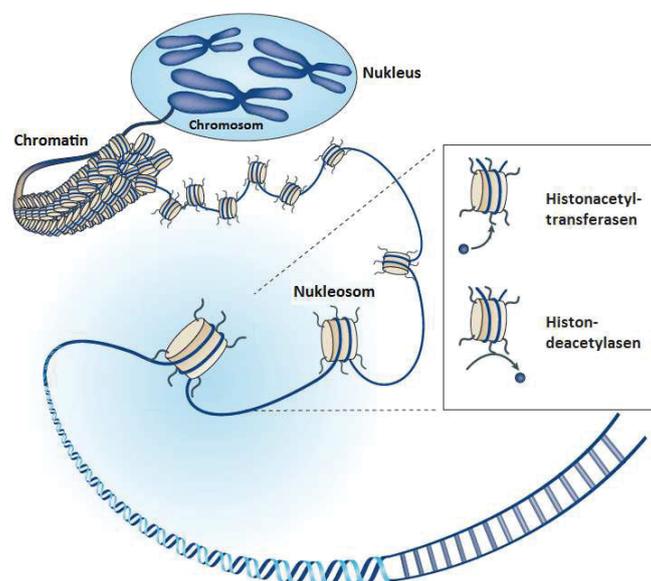
#### T

TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran

$t_R$	Retentionszeit
TSA	Trichostatin A
<b>U</b>	
U-4CR	Ugi-4-Komponenten Reaktion
<b>V</b>	
VT-NMR	NMR-Spektren bei variabler Temperatur
<b>Z</b>	
ZBG	zinkbindende Gruppe ( <i>zinc-binding group</i> )
ZMAL	Z-( $\epsilon$ -Acetyl)lysin-7-amino-4-methylcumarin

# 1. Einleitung

Viele Krankheiten beeinflussen heutzutage unser Leben. Während einige vererbbar sind, werden andere Krankheiten durch diverse Umwelteinflüsse ausgelöst. Conrad Waddington bezeichnete 1942 den Prozess, der sich mit Veränderungen in der Genexpression und nicht mit Veränderungen in der DNA-Sequenz beschäftigt, als Epigenetik.[1] Veränderungen in der Genexpression basieren auf dem An- und Ausschalten von Genen. Drei Prozesse sind in die Modifikation der Genexpression involviert: DNA-Methylierung, RNA-Interferenz und posttranslationale Histon-modifikationen (PTM).[2] Aufgrund ihrer Verwicklung in eine Vielzahl biologischer Prozesse, wie DNA-Replikation, -Reparatur, -Transkriptionsregulation sowie Chromosomenkondensations- und -trennung, handelt es sich bei den posttranslationalen Modifikationen von Histonen (PTM) um ein stark untersuchtes Forschungsgebiet.[3] Histone sind basische Proteine, die als Histon-Oktamer vorliegen.[4] Um diese Histon-Oktamere ist die DNA zweifach gewunden und bildet ein Nukleosom (Abbildung 1). Bei der Spiralisierung mehrerer Nukleosome kommt es zur Verdichtung des Chromatins<sup>1</sup> und damit zur Ausbildung der Chromosomen. Posttranslationale Modifikationen an Histonen (PTMs) wie z. B. die Phosphorylierung, Methylierung, Ubiquitinylierung und Ac-/Deacetylierung führen zu einer Änderung der Chromatinstruktur und damit zu einer veränderten Genexpression.[5]



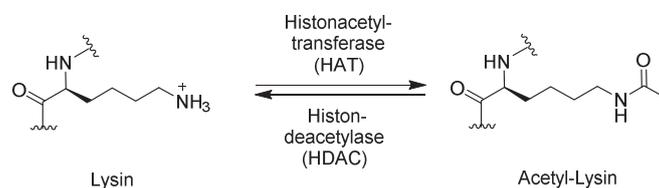
**Abbildung 1.** Von den Histonen zu den Chromosomen. (Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Drug Discovery, 11 (5), 384 – 400, copyright 2012).[6]

<sup>1</sup> **Chromatin** wird durch die Anlagerung mehrerer Nukleosomen ausgebildet. Es handelt sich dabei um eine organisierte und verpackte Form der DNA.

Die Acetylierung und Deacetylierung stellen zwei Mechanismen dar, bei denen ein Acetylrest auf die  $\epsilon$ -Aminogruppe der *N*-terminalen Lysinreste übertragen oder abgespalten wird.[6] Die beiden Enzymklassen, die die Verantwortung für diese Prozesse tragen, heißen Histonacetyltransferasen (HATs) und Histondeacetylasen (HDACs). Die Aufrechterhaltung des Acetylierungsgleichgewichts ist von großer Bedeutung. So liegt in diversen Tumorerkrankungen ein gestörtes Gleichgewicht der De-/Acetylierung von Histonen vor, welches zu einer veränderten Expression von Proteinen, unter anderem von Histondeacetylasen, führt.[6] Durch die Entwicklung von Hemmstoffen, den sogenannten Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACI), kann das gestörte Gleichgewicht wieder in Balance gebracht werden. Dies soll als therapeutischer Ansatz für die Behandlung unterschiedlicher Erkrankungen dienen. Im Folgenden ist wichtiges Hintergrundwissen zu dieser Thematik zusammengefasst.

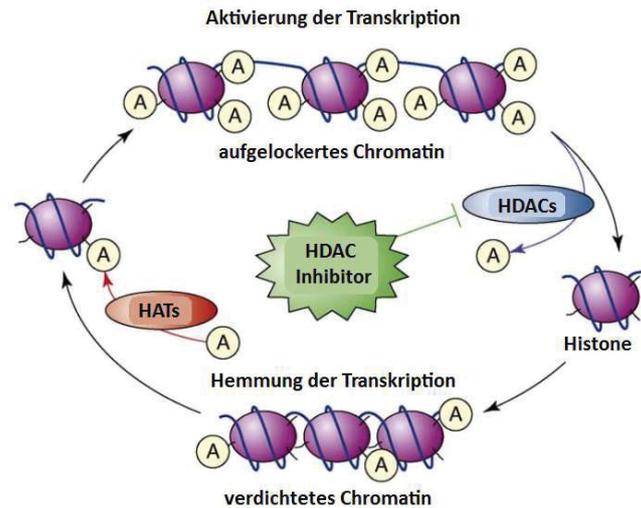
## 1.1 Histonacetyltransferasen und Histondeacetylasen

Histonacetyltransferasen (HATs) und Histondeacetylasen (HDACs) sind zwei Enzyme, die das Acetylierungsgleichgewicht der Lysinreste steuern (Abbildung 2).



**Abbildung 2.** Das Gleichgewicht zwischen HAT und HDAC.

Dabei übertragen die Histonacetyltransferasen mithilfe des acetylierten Coenzym A einen Acetylrest auf die  $\epsilon$ -Aminogruppe von Lysinresten, die sich auf den Histonproteinen und Nicht-Histonproteinen befinden.[7] Es resultiert eine neutral vorliegende Verbindung (Acetamid). Die fehlenden ionischen Wechselwirkungen führen zu einer Auflockerung der Chromatinstruktur. Die Histondeacetylasen hingegen sind für die Deacetylierung verantwortlich (Abbildung 2).



**Abbildung 3.** Einfluss der HATs, HDACs und HDAC-Inhibitoren (HDACI) auf die Transkription (modifiziert nach [8]).

Die Deacetylierung der Lysinreste führt zu einer Interaktion der positiv geladenen  $\epsilon$ -Aminogruppe mit dem negativ geladenen Phosphatrückgrat der DNA und damit zu einer Verdichtung der Chromatinstruktur (Abbildung 3). Die dichte Chromatinstruktur verhindert den Zugang der Transkriptionsfaktoren zur DNA, mit der Folge einer Stummschaltung von Genen. Hieraus resultiert eine veränderte Genexpression, die bereits mit der Entwicklung einer Vielzahl an Krankheiten in Verbindung gesetzt wurde.

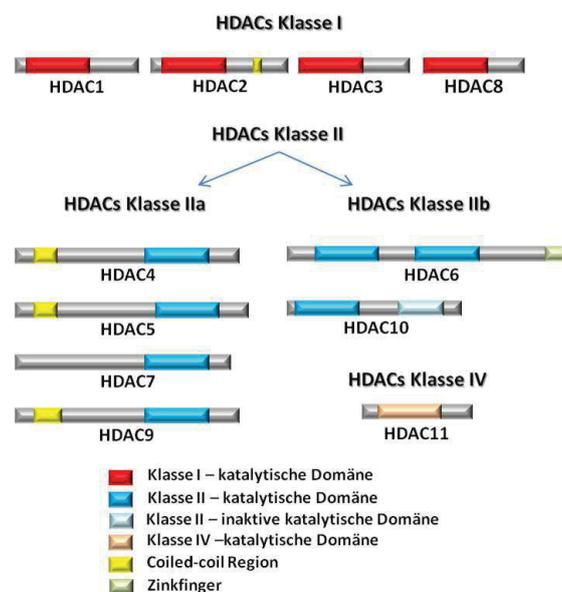
### 1.1.1 Klassen und Isoformen der Histondeacetylasen

Die HDACs bestehen aus 18 Isoformen und gliedern sich in die  $Zn^{2+}$ -abhängigen Klassen I, II und IV und die  $NAD^+$ -abhängige Klasse III (Tabelle 1). Diese Unterteilung erfolgte gemäß ihrer Homologie zu den in Hefen vorkommenden Histondeacetylasen.[7]

**Tabelle 1.** HDACs.[9]

Klasse	Enzyme	Zn <sup>2+</sup> -Abhängigkeit	Lokalisation in der Zelle
I	HDAC1,2,3,8	Ja	Nukleus
IIa	HDAC4,5,7,9	Ja	Nukleus und Zytoplasma
IIb	HDAC6,10	Ja	Zytoplasma
III	Sirtuine 1-7	Nein	Variabel <sup>2</sup>
IV	HDAC11	Ja	Nukleus und Zytoplasma

Unter den klassischen Histondeacetylasen werden Mitglieder der Klassen I, II und IV zusammengefasst (Abbildung 4).[7, 9] Diese Zn<sup>2+</sup>-abhängigen Enzyme, die ein Zn<sup>2+</sup>-Ion in ihrer Substratbindungstasche enthalten, können durch Zn<sup>2+</sup>-chelatisierende Verbindungen gehemmt werden. Aufgrund des fehlenden Zn<sup>2+</sup>-Ions, sind diese bei den Sirtuinen der HDAC-Klasse III, inaktiv.[10]

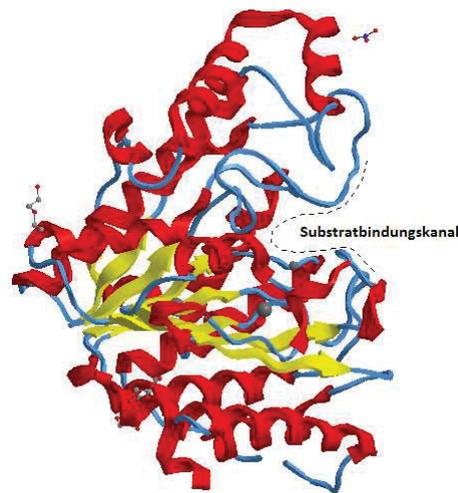


**Abbildung 4.** Gliederung der HDACs.[11]

Die Aufklärung diverser Kristallstrukturen brachte Einsicht in die dreidimensionale Struktur und den Aufbau der Histondeacetylasen. Die ersten beiden Kristallstrukturen waren bakteriellen Ursprungs. Die erste wurde 1999 von *Finnin* und Mitarbeitern aufgeklärt.[12] Hierbei handelte es sich um das Enzym HDLP (histone-deacetylase-like protein), welches aus dem Bakterium *Aquifex aeolicus* isoliert wurde. HDLP zeigt eine höhere Homologie zur

<sup>2</sup> Die Lokalisation der **Sirtuine** ist variabel, da die insgesamt sieben Histondeacetylasen verschiedene Lokalisationen innerhalb der Zelle haben.[19]

HDAC-Klasse I auf. Als weitere Kristallstruktur bakteriellen Ursprungs ist HDAH (histone-deacetylase-like amidohydrolase, 2005) zu nennen.[13] Diese weist eine hohe sequenzielle und funktionale Homologie zur humanen HDAC-Klasse II auf.[13] Anschließend folgten Strukturaufklärungen der humanen HDACs 1, 2, 4, 6, 7 und 8.[14-18] Anhand der Kristallstrukturen konnte das allgemeine Faltungsmuster der Histondeacetylasen aufgeklärt werden (Abbildung 5).

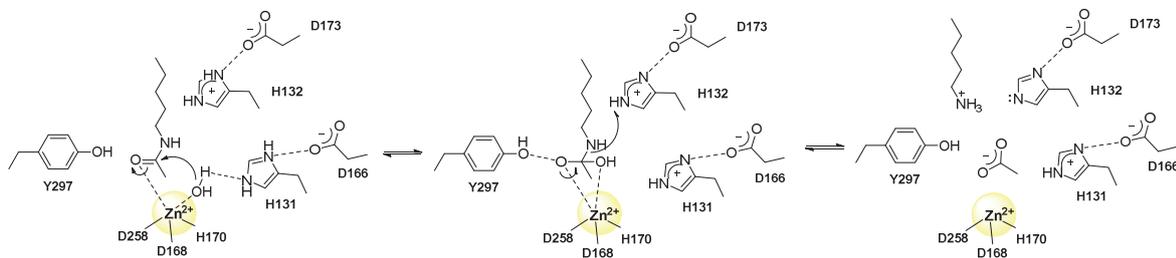


**Abbildung 5.** Die dreidimensionale Struktur der HDACs am Beispiel von HDAC6 (*Danio rerio*, PDB: 5EFK).

Die Faltungsstruktur der Histondeacetylasen ist durch eine charakteristische Arginasetopologie geprägt.[20] Das aktive Zentrum der Histondeacetylasen besteht aus 8 parallel angeordneten  $\beta$ -Faltblattsträngen, die jeweils ober- und unterhalb von  $\alpha$ -Helices umgeben sind.[20] Bei den blau unterlegten Bereichen handelt es sich um sogenannte Loop-Regionen (Abbildung 5). Diese weisen im Eingangsbereich der Substratbindungstasche die größten Unterschiede zwischen den verschiedenen Vertretern auf. Die Bindungstasche besteht aus einem  $\sim 11$  Å langen Substratbindungskanal, an dessen Ende sich ein  $\text{Zn}^{2+}$ -Ion befindet. Dieses ist durch zwei Aspartat- und einen Histidinrest im aktiven Zentrum koordiniert und spielt eine essenzielle Rolle im katalytischen Mechanismus.[12]

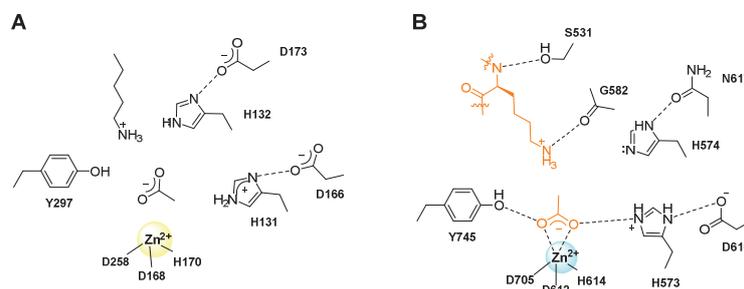
*Finnin* und Mitarbeiter haben 1999 einen Mechanismus vorgeschlagen, der die Deacetylierung des Lysinrestes im katalytischen Zentrum der HDACs beschreibt.[12] Dieser Mechanismus zeigt sowohl Eigenschaften der Metallo-, als auch der Serinproteasen auf. So wird durch die Koordination des Carbonylsauerstoffs des Acetyl-Lysins an das  $\text{Zn}^{2+}$ -Ion, die

Carbonylaktivität erhöht, welches einen nukleophilen Angriff des Wassermoleküls, erleichtert durch das Charge-Relay System D166-H131, ermöglicht. So bildet sich ein tetraedrischer Übergangszustand, der nach der Protonierung am Stickstoff durch H132 und der Abspaltung der Acetylgruppe zerfällt.



**Abbildung 6.** Vorgeschlagener katalytischer Mechanismus der Deacetylierung von Acetyl-Lysin im katalytischen Zentrum der HDLP (histone-deacetylase-like protein).[12]

Dieser vorgeschlagene katalytische Mechanismus konnte im Jahre 2016 von *Hai* und *Christianson* bestätigt werden.[16] Anhand der Kristallstrukturen eines Substrats im Komplex mit HDAC6 zCD<sup>3</sup> (*Danio rerio* (Zebrafisch)) konnten Momentaufnahmen wichtiger Katalyseschritte festgehalten werden.



**Abbildung 7.** Deacetylierungsschritt im vorgeschlagenen katalytischen Mechanismus bei HDLP (histone-deacetylase-like protein) (A) und bei HDAC6 zCD2 (B).[12, 16]

Im letzten Schritt des Katalysemechanismus konnte von *Hai* und *Christianson* gezeigt werden, dass nach der Abspaltung des Lysins das Acetat zweifach und nahezu symmetrisch von Zink koordiniert wird (Abbildung 7).[16]

### 1.1.2 Histondeacetylasen und ihre Rolle bei der Tumorentstehung

Die gestörte Balance zwischen Histonacetyltransferasen und Histondeacetylasen resultiert in der Beeinträchtigung diverser zellulärer Prozesse. Daher stellen HDAC-Inhibitoren einen

<sup>3</sup> **HDAC6 zCD2:** HDAC6 besitzt zwei katalytische Domänen (catalytic domain=CD). Die zweite katalytische Domäne des Zebrafisches (*D. rerio*, zCD2) weist eine hohe Homologie zu HDAC6 hCD2 auf.

wichtigen therapeutischen Ansatz in der Therapie von zahlreichen Tumorerkrankungen dar. Dieser Ansatz liegt in der Überexpression der HDACs in verschiedenartigen Tumoren begründet. Dabei ist vor allem der Einfluss von HDACs auf die Zelldifferenzierung, Zellwanderung- und Beweglichkeit sowie auf den Proteinabbau und die Angiogenese von Bedeutung. Die wichtigsten tumorrelevanten HDAC-Vertreter stellen momentan dabei die Isoenzyme der Klasse I sowie HDAC6 dar. Alle Mitglieder sind in unterschiedlichen Tumorarten überexprimiert, angefangen von HDAC1, 2, und 3 im Ovarialkarzinom,[21] HDAC1 im Prostatakarzinom,[22, 23] HDAC2 bei Magen- und Darmkarzinomen [23] und HDAC3 im Lungenkarzinom.[23] Ferner führt die Inhibition von HDAC8 zu einem gestörten Zellwachstum in mehreren Tumorzellen.[23, 24] Eine weitere Überexpression liegt bei HDAC6 (Klasse IIb) im Brustkarzinom vor (Tabelle 2).[23] Obwohl die Überexpression einiger HDAC-Isoformen bestimmten Tumorarten zugeordnet wurde, ist noch nicht bekannt, welche Rolle diese bei der Entwicklung von Tumorgewebe spielen. Demzufolge ist die Entwicklung klassen- und isoformselektiver HDAC-Inhibitoren von großer Relevanz, um den molekularen Mechanismus aufzuklären, der zwischen der HDAC-Aktivität und der Bildung unterschiedlicher Tumorarten einhergeht.

**Tabelle 2.** Überexpression der HDACs in Tumorgeweben.[25]

<b>Malignität</b>	<b>HDAC-Isoform</b>
Kutanes T-Zell Lymphom	1,2,6
Magenkarzinom	1,2,3
Darmkarzinom	1,2,3
Hepatozellkarzinom (Leberzellkarzinom)	1
Prostatakarzinom	1,2,3
Ovarialkarzinom	1,2,3
Brustkarzinom	1,3,6

HDAC-Inhibitoren werden weiterhin in der Therapie von unterschiedlichen neurodegenerativen Erkrankungen untersucht, hierbei sind Chorea Huntington, Friedreichs Ataxie, Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer und Morbus Charcot–Marie–Tooth (CMT) zu nennen.[26] Außerdem werden auch neuropsychiatrische Erkrankungen mit einer Störung der Histonacetylierung/-deacetylierung in Verbindung gesetzt. So konnten durch den Einsatz

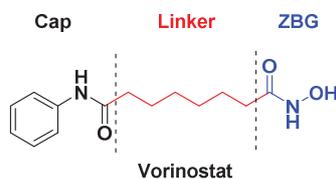
von HDAC-Inhibitoren bei Schizophrenie, Angststörungen oder bei Depressionen Verbesserungen in dem Krankheitsbild erzielt werden.[26] Ebenso wird die Wirkung von HDACI bei viralen und parasitären Infektionskrankheiten wie HIV, Malaria, Leishmaniose und Schistosomiasis untersucht.[27]

### 1.1.3 Klassen der HDAC-Inhibitoren

Das aktive Zentrum der Histondeacetylasen ist stark konserviert und weist strukturelle Merkmale auf, die bei dem Design von HDAC-Inhibitoren wichtig sind. Das  $Zn^{2+}$ -Ion kann durch verschiedene zinkbindende Gruppen (ZBG) chelatisiert werden. Die wichtigsten HDAC-Inhibitoren werden üblicherweise in folgende Klassen eingeteilt.[7]

- Hydroxamsäuren
- Carbonsäuren
- Elektrophile Ketone
- Thiole und Thiolderivate
- 2-Aminoanilide
- Cyclopeptide

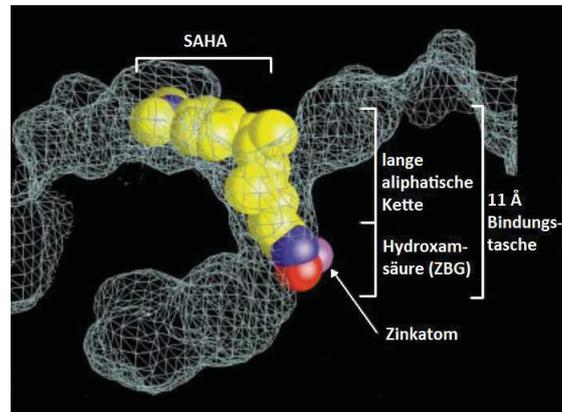
Die Einteilung erfolgt in der Regel anhand der ZBG, wobei die Cyclopeptide eine Ausnahme darstellen. Die Vertreter der genannten Klassen weisen gemeinsame Strukturmerkmale auf. Diese sind am Beispiel von Vorinostat, dem ersten von der Food and Drug Administration (FDA) zugelassenen HDACI, dargestellt (Abbildung 8). Zum einen bestehen sie aus einer hydrophoben Cap-Gruppe.



**Abbildung 8.** Allgemeines Pharmakophormodell der HDACI am Beispiel von Vorinostat.[7, 28]

Diese ist dem Lösungsmittel ausgesetzt und kann mit den Aminosäuren im Eingangsbereich des Substratbindungskanal interagieren. An die Cap-Gruppe grenzt eine hydrophobe Linkerregion, die die zinkbindende Gruppe (ZBG) und die Cap-Gruppe verbindet und mit dem lipophilen Tunnel der Bindungstasche wechselwirkt. Das letzte Strukturmerkmal stellt die

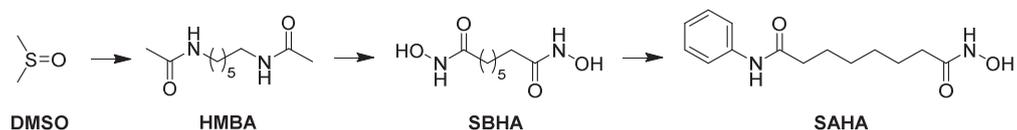
ZBG dar. Diese Gruppe dient zum chelatisieren des  $Zn^{2+}$ -Ions und ist somit sehr wichtig zur Inhibition von HDACs (Abbildung 8 und 9).



**Abbildung 9.** Bindungsmodus von Vorinostat (SAHA) im katalytischen Zentrum des histone-deacetylase-like proteins. (Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature 401 (6749), 188 – 193, copyright 1999).[12]

### Hydroxamsäuren

Die Hydroxamsäuren stellen die wichtigsten und am besten untersuchten Vertreter der HDAC-Inhibitoren dar. In den 1970er Jahren wurde festgestellt, dass sowohl Dimethylsulfoxid (DMSO), als auch Buttersäure Zelldifferenzierung induzieren.[29, 30] An Trichostatin A (TSA), gewonnen aus dem Bakterium *Streptomyces*, konnte 1990 erstmals die Inhibition von Histone-deacetylasen nachgewiesen werden, wobei die metabolische Instabilität und genotoxische Eigenschaften die Entwicklung als Wirkstoff verhinderten.[7, 31] TSA wurde ursprünglich 1976 als ein gegen Pilze wirksames Antibiotikum identifiziert.[31] Etwa zeitgleich wurde ausgehend aus DMSO eine Verbindung entwickelt, die nicht nur das Wachstum von Tumorzellen hemmt, sondern auch zur Apoptose führt.[32] Bei dieser Verbindung handelte es sich um Vorinostat (SAHA) (Abbildung 10).

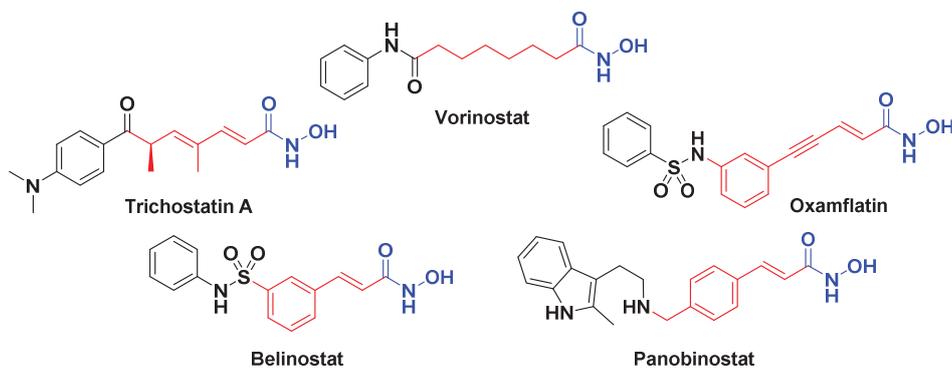


**Abbildung 10.** Die Entwicklung von Vorinostat (SAHA).[32]

Aufgrund der vorliegenden Strukturähnlichkeit zu Trichostatin A und dessen inhibitorischer Aktivität der HDACs, konnte Vorinostat 1998 als HDAC-Inhibitor identifiziert werden.[32] Im

Jahre 2006 folgte die Zulassung von Vorinostat (SAHA) von der Food and Drug Administration (FDA) für die Therapie des kutanen T-Zell Lymphoms (CTCL)<sup>4</sup>.

Weitere Studien beschäftigten sich mit der Variation der Linkerregion und der Cap-Gruppe von Trichostatin A (TSA). Der Austausch der Doppelbindung in Position 4 bei TSA bzw. der Dreifachbindung bei Oxamflatin durch einen Phenylring führte zur Entwicklung weiterer Vertreter (Abbildung 11). So entstanden diverse Zimtsäurederivate, aus denen die beiden Vertreter Belinostat und Panobinostat resultierten. Belinostat wurde 2014 zur Behandlung des peripheren T-Zell Lymphoms (PTCL) und Panobinostat im Jahre 2015 zur Behandlung des multiplen Myeloms (MM) von der FDA zugelassen. Ebenfalls erteilte anschließend die European Medicines Agency (Europäische Arzneimittel-Agentur, EMA) ihre Zulassung für Panobinostat.

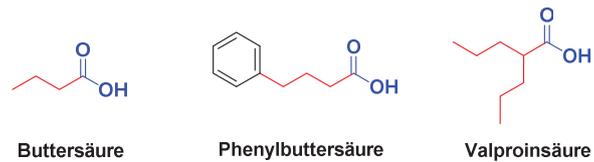


**Abbildung 11.** Ausgewählte Vertreter der Hydroxamsäuren.[7]

## Carbonsäuren

Carbonsäuren inhibieren Histondeacetylasen im millimolaren Bereich. Damit gehören sie zu den schwächeren HDAC-Inhibitoren.[33] 1933 wurde die zelldifferenzierende Wirkung von Buttersäure (BA) bei diversen Tumorzellen beobachtet.[7] Kurze Zeit später wurde BA als HDAC-Inhibitor identifiziert. Jedoch ließ sich bei BA nur *in vitro* ein inhibitorischer Effekt der HDACs zeigen. Die weiteren Vertreter der Carbonsäuren stellen Phenylbutter- und Valproinsäure dar (Abbildung 12). Valproinsäure, eine als Antiepileptikum eingesetzte Carbonsäure, konnte als HDAC-Inhibitor mit schwacher Wirkpotenz identifiziert werden.[7]

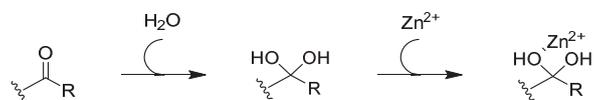
<sup>4</sup> Bei dem **kutanen T-Zell Lymphom (CTCL)** handelt es sich um bösartige Neubildungen des Immunsystems, welche sich durch eine ungeordnete Ausbreitung der T-Lymphozyten auszeichnet. Die T-Lymphozyten stellen eine Gruppe der weißen Blutkörperchen dar und sind neben den B-Lymphozyten für die gewonnene Immunabwehr des Körpers zuständig.



**Abbildung 12.** Carbonsäuren mit HDAC-inhibitorischer Aktivität.[7]

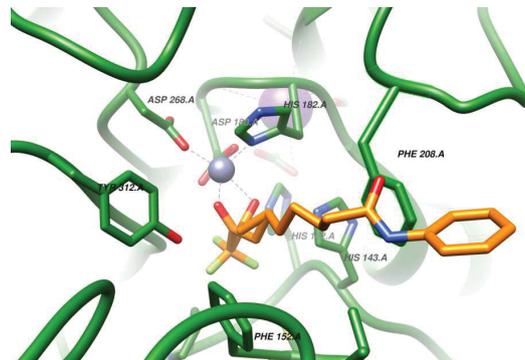
### Elektrophile Ketone

Elektrophile Ketone sind besser bekannt als Proteaseinhibitoren. Zu den Proteasen gehört beispielsweise die metallhaltige Carboxypeptidase A. Hierbei ist bekannt, dass das  $Zn^{2+}$ -Ion von der hydratisierten Form des Ketons chelatisiert wird (Abbildung 13).



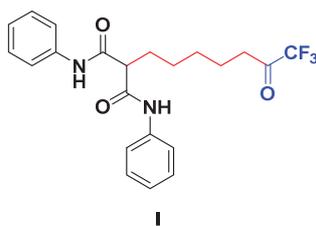
**Abbildung 13.** Zinkbindung durch elektrophile Ketone.[34]

2007 konnte bei der Bindung eines Trifluormethylketons mit FB188 HDAH die gleiche Zinkchelatisierung festgestellt werden (Abbildung 14).[35]



**Abbildung 14.** Kristallstruktur eines Trifluormethylketons im Komplex mit FB188 HDAH (PDB: 2GH6).

Als erster Vertreter dieser Substanzklasse wurde das Trifluormethylketon I identifiziert (Abbildung 15).[34] Der Nachteil dieser Klasse liegt in der kurzen Halbwertszeit der Trifluormethylketone sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, welches durch eine rasche Reduktion zum entsprechenden inaktiven Alkohol erklärt werden kann.[34] Neben den Trifluormethyl-, Methyl- und Ethylketonen zählen ebenfalls  $\alpha$ -Ketoamide,  $\alpha$ -Ketoester und  $\alpha$ -Ketoverbindungen heterozyklischer Natur zu der Substanzklasse der elektrophilen Ketone.



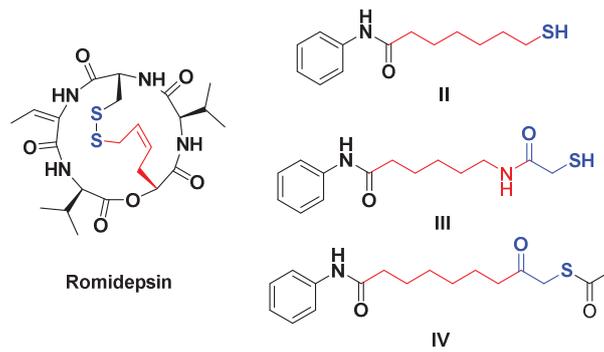
**Abbildung 15.** Erster Vertreter (I) der elektrophilen Ketone.[34]

### Thiole und Thiolelderivate

Romidepsin liegt als Prodrug<sup>5</sup> vor und stellt den vierten Vertreter der FDA zugelassenen HDACI dar, welches im Jahre 2009 zur Therapie des CTCL und PTCL zugelassen wurde (Abbildung 16).[36] Dabei handelt es sich um ein zyklisches Tetrapeptid, das aus dem Bakterium *Chromobacterium violaceum* isoliert wurde. Es enthält eine Disulfidbrücke, die in der Zelle in seine aktive Form, das Dithiol, reduziert wird.[36] Das resultierende freie Thiol chelatisiert dabei das  $Zn^{2+}$ -Ion einzähnig.

Weiterhin ist bekannt, dass Thiole zinkabhängige Enzyme, wie beispielsweise das Angiotensin-Konversionsenzym (ACE), inhibieren.[37] Basierend auf diesen Erkenntnissen, wurden weitere Thiole und Thiolelderivate auf ihre HDAC-Inhibition hin untersucht.[38] *Suzuki* und Mitarbeiter konnten 2004 zeigen, dass durch den Austausch der Hydroxamsäurefunktion durch ein Thiol in Vorinostat kein Einbruch in der HDAC-Inhibition zu verzeichnen ist.[37] Um die Oxidationsempfindlichkeit der Thiole zu umgehen, wurden substituierte Thiolelderivate synthetisiert (Abbildung 16). Dies führte zu einer reduzierten HDAC-Hemmung.[39] Im Jahre 2005 stellten *Suzuki* und Mitarbeiter die Synthese von Thioester-Prodrugs, den Vorstufen der aktiven zinkbindenden Thiole, vor. Weiterhin gelang die Einführung einer Keto- bzw. Amidfunktion (Mercaptoketone bzw. Mercaptoacetamide) in unmittelbarer Umgebung zum Thiol. In beiden Fällen wurden aktive HDAC-Inhibitoren erhalten.[39] Hierdurch wurde eine zweizählige Chelatisierung des  $Zn^{2+}$ -Ions ermöglicht.

<sup>5</sup> **Prodrugs** sind pharmakologisch inaktive Wirkstoffe, die im Organismus in ihre aktive Form überführt werden.

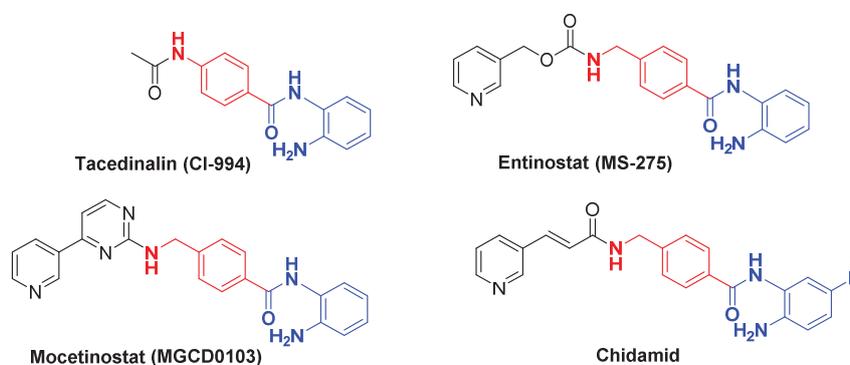


**Abbildung 16.** Zinkchelatisierende Thiole und Thiolelderivate.

## 2-Aminoanilide

Die Substanzklasse der 2-Aminoanilide als potentielle HDAC-Inhibitoren resultierte aus der Antitumoraktivität von Dinalin, einem Wirkstoff mit antikonvulsiven Eigenschaften und dessen acetylierten Derivat *N*-Acetyldinalin (Tacedinalin, CI-994). Hieraus folgte die Annahme, dass die Tumoraktivität in Zusammenhang mit der HDAC-Inhibition stehen könnte.[7, 40] Der zuvor umstrittene Bindungsmodus der 2-Aminoanilide konnte anhand der ersten Kristallstruktur eines 2-Aminoanilids im Komplex mit HDAC2 belegt werden.[41] Diese zeigt, dass sowohl die Carbonylfunktion, als auch das freie Amin in *ortho*-Position zum Amid für die Chelatisierung wichtig sind.

Weitere Analoga des Tacedinalin, wie z. B. Entinostat (MS-275) und Mocetinostat (MGCD0103) folgten.[42, 43] Beide Vertreter weisen antiproliferative Eigenschaften auf und inhibieren selektiv die Histondeacetylasen der Klasse I (Abbildung 17).[42, 43] Eine aromatische Substitution in *para*-Position zur freien Aminogruppe führte zur Entwicklung selektiver HDAC1 und 2 Hemmstoffe.

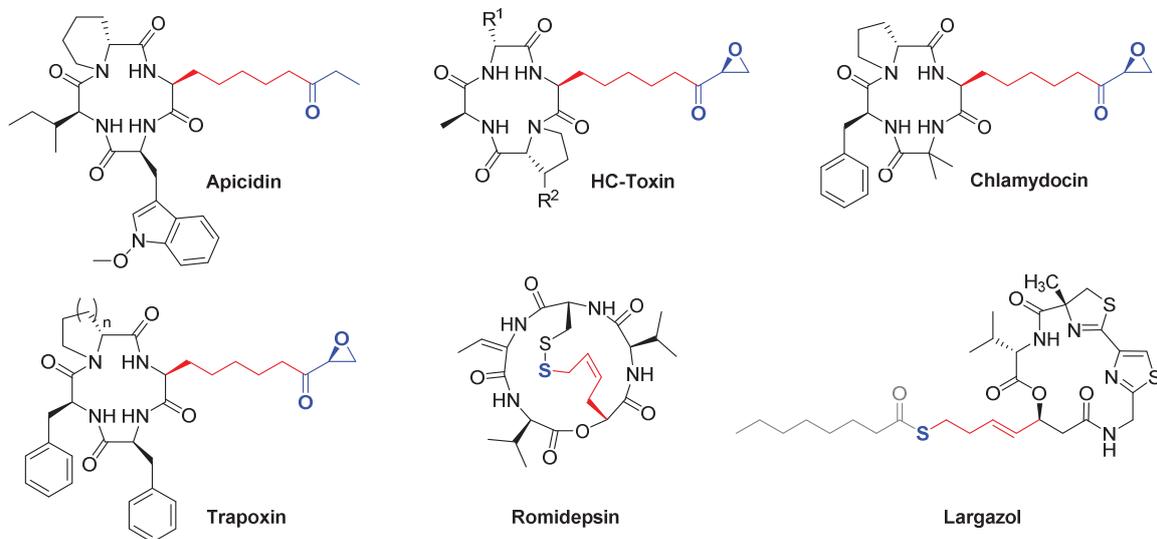


**Abbildung 17.** Erste Vertreter der 2-Aminoanilide.

Das Chidamid repräsentiert einen weiteren Vertreter der 2-Aminoanilide. Dieser wurde 2015 in China von der Chinese Food and Drug Administration (CFDA) zur PTCL-Therapie zugelassen.[44]

### Cyclopeptide

Die zyklischen Peptide stellen eine weitere Klasse der HDACI dar. Im Gegensatz zu den bisher genannten HDACI hat die hydrophobe Cap-Gruppe der Cyclopeptide einen stärkeren Einfluss auf die HDAC-Inhibition.[7] Die Cap-Gruppe interagiert dabei mit dem Eingangsbereich des Substratbindungskanal. Bekannte Vertreter stellen Apicidin, HC-Toxin, Chlamydocin, Trapoxin A/B, Largazol und Romidepsin dar (Abbildung 18). HC-Toxin, Chlamydocin und Trapoxin A/B weisen eine Epoxidgruppe auf und gehören zu den irreversiblen Hemmstoffen. Im Gegensatz zu Apicidin kann bei diesen Vertretern über die Epoxidgruppe eine kovalente Bindung zum Enzym ausgebildet werden.[7] Apicidin verfügt nicht über diese Epoxidgruppe und gehört deshalb zu den reversiblen HDACI. Hieraus resultiert, dass die lipophile Gruppe eine essenzielle Rolle bei der HDAC-Hemmung spielt.[7]

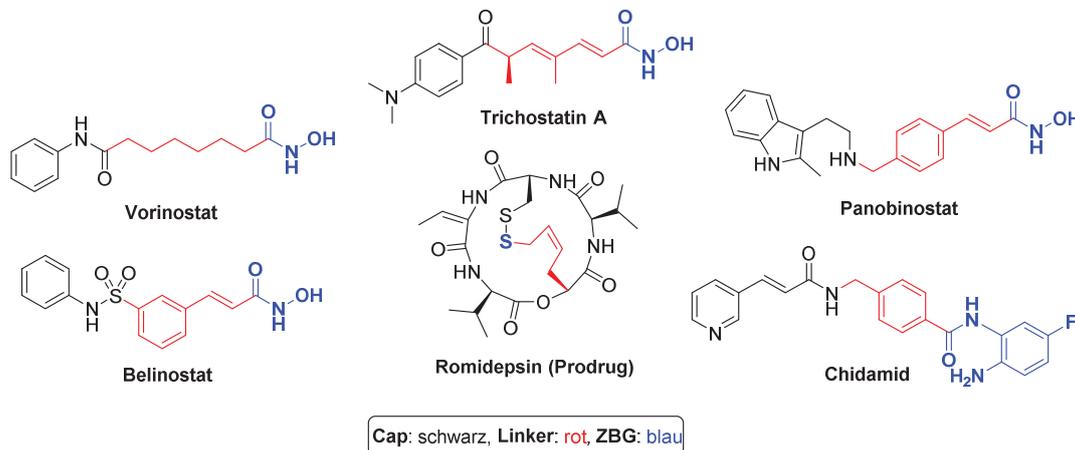


**Abbildung 18.** Bekannte zyklische Peptide als HDAC-Inhibitoren.

Die HDAC-Inhibition der Prodrugs Largazol und Romidepsin liegt sowohl in der sperrigen hydrophoben Cap-Gruppe, als auch in der zinkbindenden Gruppe (Thiol) zugrunde.

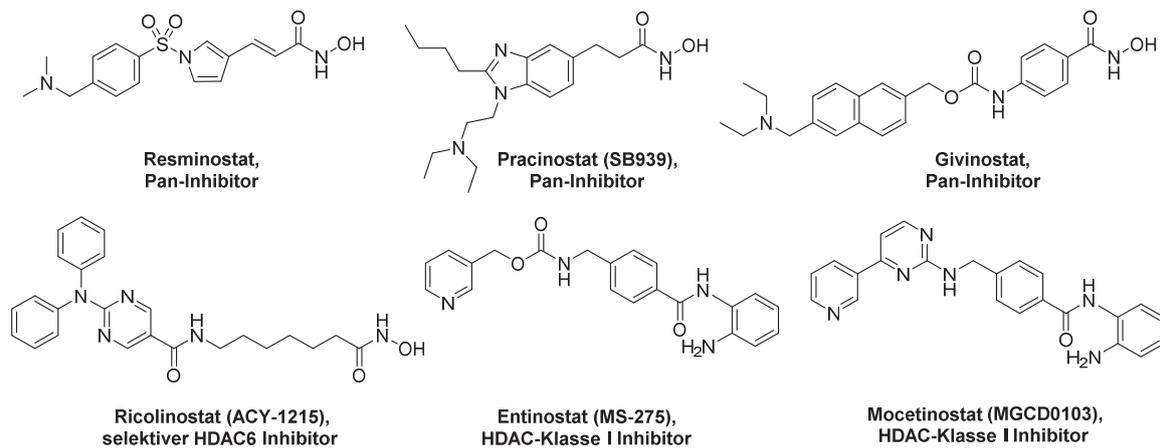
### 1.1.4 HDAC-Inhibitoren in der klinischen Entwicklung zur Therapie von Tumorerkrankungen

Basierend auf den bisherigen Erkenntnissen der Überexpression von HDACs in bestimmten Tumorarten, stieg das Interesse an der Entwicklung von HDAC-Inhibitoren zur Therapie von Tumorerkrankungen.



**Abbildung 19.** Ausgewählte HDAC-Inhibitoren dargestellt anhand des Pharmakophormodells.[28]

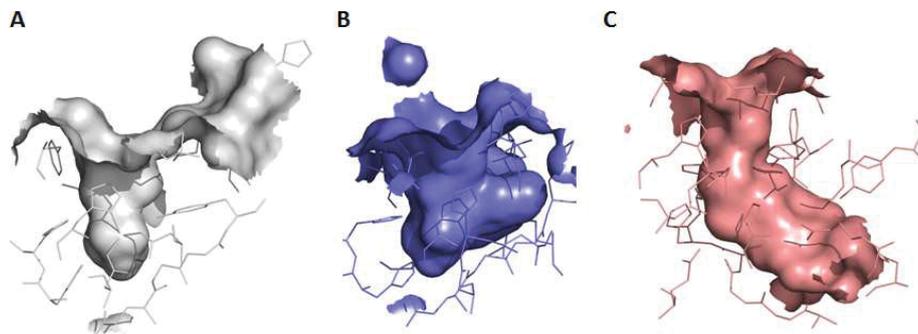
Zusätzlich zu den bisher von der FDA (Food and Drug Administration), EMA (European Medicines Agency) bzw. CFDA (Chinese Food and Drug Administration) zugelassenen Wirkstoffen (Abbildung 19), befinden sich derzeit eine Vielzahl an Verbindungen in klinischen Studien. Resminostat, ein Vertreter der Hydroxamsäuren, befindet sich in Phase 2 zur Behandlung von Leberzellkarzinomen und dem Hodgkin Lymphom.[45] Weiterhin wird Pracinostat zur Behandlung des myelodysplastischen Syndroms und der akuten myeloischen Leukämie (AML) verwendet und befindet sich ebenfalls in Phase 2 der klinischen Studien. Givinostat wird bei chronischer lymphatischer Leukämie, dem multiplem Myelom (MM) und dem Hodgkins Lymphom (Phase 1/2) untersucht.[45] Ein weiterer interessanter Vertreter der Hydroxamsäuren ist Ricolinostat. Dieser befindet sich in Phase 1/2 zur Behandlung des multiplen Myeloms. Ebenfalls befinden sich zwei weitere Wirkstoffe der 2-Aminoanilide in fortgeschrittenen klinischen Studien. Hierbei handelt es sich um Mocetinostat, in Phase 2 zur Therapie des myelodysplastischen Syndroms (MDS), des Hodgkin Lymphoms und der akuten myeloischen Leukämie (AML) [43] und Entinostat, in Phase 3 beim Brustkarzinom und Phase 2 bei AML.[46]



**Abbildung 20.** Einige Wirkstoffe in klinischen Studien.

### 1.1.5 Klassen- und Isoformselektive HDAC-Inhibitoren

Bei den bisher von der FDA, EMA oder CFDA zugelassenen HDAC-Inhibitoren handelt es sich hauptsächlich um Pan-Inhibitoren.[47] Diese bilden eine Klasse von Inhibitoren, die HDACs unspezifisch hemmen. Hieraus folgt, dass die Inhibition mehrerer Histondeacetylasen Nebenwirkungen zur Folge haben kann.<sup>6</sup> Dementsprechend stellt die unselektive Inhibition von HDACs einen wichtigen Nachteil dar. So liegt die Vermutung nahe, dass der Einsatz selektiver Hemmstoffe zur Reduktion einiger Nebenwirkungen, wie z. B. Müdigkeit, Anorexie oder Herzrhythmusstörungen, führen kann.[48] Das Design selektiver Inhibitoren wird jedoch dadurch erschwert, dass das aktive Zentrum der HDACs stark konserviert ist.[12] Dennoch lassen sich einige Unterschiede in Form von sogenannten sub-pockets in der Substratbindungstasche feststellen (Abbildung 21).



**Abbildung 21.** Darstellung der sub-pockets in der Bindungstasche (A = side pocket (HDAC6, PDB: 5EDU), B = lower pocket (HDAC4, PDB: 4CBT), C = foot pocket (HDAC2, PDB: 3MAX)).

<sup>6</sup> Andererseits wurde die klinische Wirksamkeit selektiver HDACI noch nicht nachgewiesen.

Hierbei werden die sub-pockets in die side pocket (SP), lower pocket (LP) und foot pocket (FP) eingeteilt. Die Bindungstasche bei HDAC6 und 8 weist eine side pocket (SP) auf (Abbildung 21A). Diese zeichnet sich durch einen abgesenkten Eingangsbereich der Substratbindungstasche und einem verkürzten hydrophoben Tunnel aus. Somit können Inhibitoren mit einem kürzeren Linker und einer sperrigen bzw. verzweigten hydrophoben Cap-Gruppe die HDAC-Isoformen 6 und 8 selektiv inhibieren.[49, 50] HDACs der Klasse IIa besitzen eine lower pocket (LP) (Abbildung 21B). Die LP kommt durch einen Austausch der Aminosäure Tyrosin durch Histidin (z. B. His976 bei HDAC4) im aktiven Zentrum zustande und ist charakteristisch für die HDAC-Klasse IIa. Weiterhin folgt aus dem Aminosäureaustausch eine reduzierte Deacetylierungsaktivität der Isoenzyme der HDAC-Klasse IIa.[50, 51] Die Isoformen der HDAC-Klasse I (insbesondere bei HDAC1, 2) weisen die sogenannte foot pocket (FP) auf (Abbildung 21C). Diese befindet sich am Ende des hydrophoben Tunnels. Sie bietet räumlich anspruchsvolleren zinkbindenden Gruppen, z.B. den 2-Aminoaniliden, die Möglichkeit zur Interaktion mit dem  $Zn^{2+}$ -Ion.[52]

Zusätzlich zu ihrer unspezifischen HDAC-Inhibition weisen die FDA zugelassenen Hydroxamsäuren<sup>7</sup> auch mutagene Eigenschaften auf, die im Ames Test<sup>8</sup> anhand eindeutiger Mutationen im Bakterium *Salmonella typhimurium* festgestellt wurden.[53, 54] Mechanistisch kann die Mutagenität von Hydroxamsäuren durch die Lossen-Umlagerung<sup>9</sup> erklärt werden.[55] Dennoch handelt es sich bei Hydroxamsäuren um potente HDAC-Inhibitoren, an denen die Pharmaindustrie intensiv forscht. Dies lässt sich anhand einer Vielzahl diverser Hydroxamsäuren und ihrem Vorliegen in unterschiedlichen fortgeschrittenen klinischen Studien zeigen. Zusätzlich wird parallel an alternativen zinkbindenden Gruppen geforscht.

## 1.2 Peptidomimetika

Natürliche vorkommende Peptide bieten vielerlei Funktionen und finden Anwendung in verschiedenen Forschungsbereichen. Dabei werden die Eigenschaften eines Peptids durch

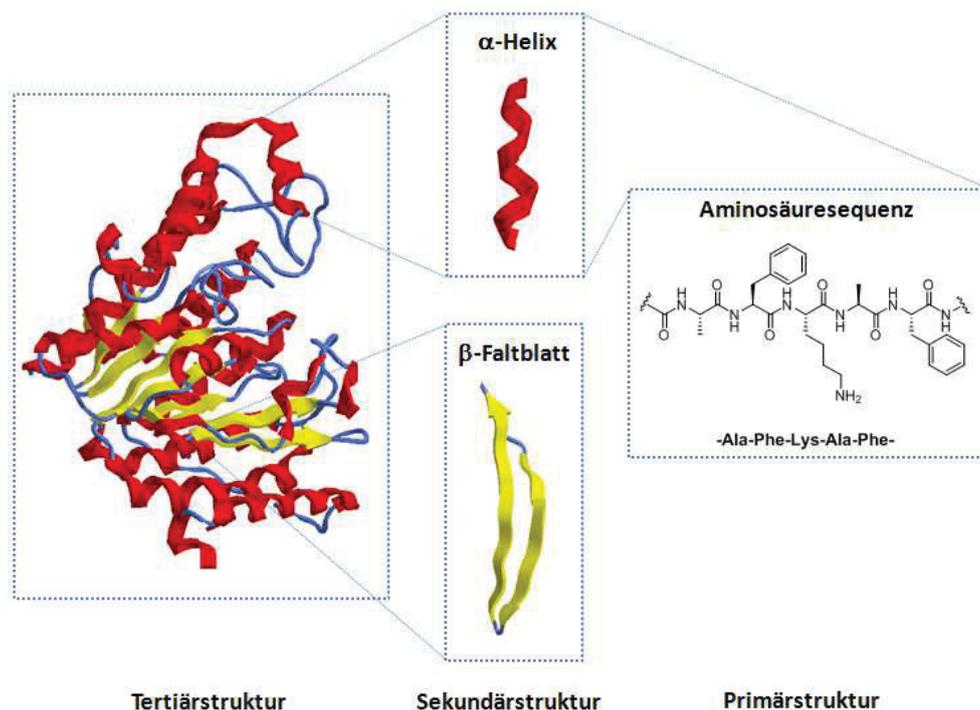
---

<sup>7</sup> Drei der bisher vier von der FDA zugelassenen HDAC-Inhibitoren stellen Hydroxamsäuren dar.

<sup>8</sup> Der **Ames Test** ist ein Testverfahren, um chemische Mutagene zu identifizieren.

<sup>9</sup> Bei der **Lossen-Umlagerung** handelt es sich um den Abbau von Hydroxamsäuren zum primären Amin. Dabei lagert sich die Hydroxamsäure unter basischen Bedingungen zu einem Isocyanat um, einem reaktiven Produkt, dass schnell hydrolysiert oder mit Nukleophilen (z.B. Nukleinbasen der DNA) weiterreagieren kann.[55]

seine Struktur bestimmt. Die räumliche Struktur eines Peptids ist in verschiedene Ebenen gegliedert. Hierbei wird hauptsächlich von der Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur gesprochen. Bei der Primärstruktur handelt es sich um die Anordnung der Aminosäuren in einer bestimmten Reihenfolge innerhalb einer Peptidsequenz (Abbildung 22). Liegt die Aminosäurekette in einer definierten lokalen räumlichen Anordnung vor, wie z. B. in einer  $\alpha$ -Helix oder als  $\beta$ -Faltblatt, wird von der Sekundärstruktur gesprochen. Die Faltung kann z. B. durch Wasserstoffbrückenbindungen hervorgerufen werden.[56] Bei der Tertiärstruktur handelt es sich um die gesamte räumliche Struktur einer Proteinkette (Abbildung 22).<sup>10</sup>



**Abbildung 22.** Drei verschiedene Ebenen der räumlichen Struktur eines Proteins. (Tertiärstruktur: HDAC6 des Zebrafisches (PDB: 5EFK), Sekundärstruktur:  $\alpha$ -Helix (PDB: 1BXL) und  $\beta$ -Faltblatt (PDB: 4R80)).

Der Aspekt, dass Proteine eine bestimmte räumliche Anordnung einnehmen, spielt heutzutage in der Untersuchung von Protein-Ligand-Interaktionen (PLI) und Protein-Protein-Interaktionen (PPI) eine wichtige Rolle.[57] Bei PPIs handelt es sich um Wechselwirkungen zwischen zwei oder mehreren Proteinen. Diese Interaktionen sind meist nicht-kovalenter Natur. Dabei handelt es sich entweder um Van-der-Waals-Kräfte, elektrostatische Wechselwirkungen oder Wasserstoffbrückenbindungen. Da es sich bei Proteinen um

<sup>10</sup> Die räumliche Anordnung mehrerer Proteinketten innerhalb eines Proteins wird als **Quartärstruktur** bezeichnet.

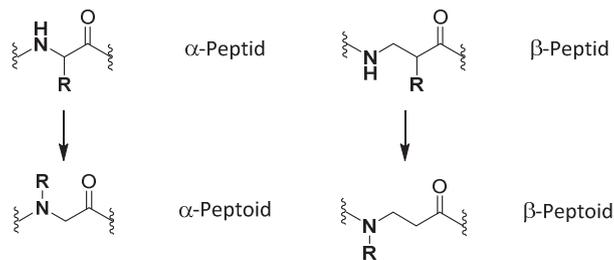
Makromoleküle handelt, wird der Fokus der Wirkstoffentwicklung auf den Abschnitt innerhalb des Proteins gelegt, der für die Interaktionen mit anderen Proteinen essenziell ist. Diese Bereiche werden als sogenannte "hot spots" bezeichnet.[58] Peptide weisen jedoch einige grundlegende Nachteile auf. Hier seien unter anderem die Proteolyseinstabilität, schlechte Membranpermeabilität, eingeschränkte chemische Vielfalt und die Konformationsflexibilität (Flexibilität des Peptidrückgrats), besonders bei linearen Peptiden, zu nennen. Aufgrund der oben genannten Nachteile von Peptiden wurde in den vergangenen Jahren intensiv an der Entwicklung von neuen Peptidomimetika geforscht. Bei Peptidomimetika handelt es sich um niedermolekulare nichtpeptidische Substanzen. Sie ahmen die essenziellen Elemente eines natürlich vorkommenden Peptids in seiner Sekundärstruktur und der Fähigkeit zur Interaktion mit dem natürlichen Interaktionspartner, nach.[59] Im Jahre 2015 stellte *Grossmann* und Mitarbeiter eine neue Einteilung der Peptidomimetika zusammen (Tabelle 3).[60] Dabei besitzt Klasse A die größte und Klasse D die geringste Ähnlichkeit zum Ausgangspeptid. Bei Klasse A und B handelt es sich um peptidartige Strukturen, wohingegen Vertreter der Klasse C und D aus niedermolekularen Strukturgerüsten aufgebaut sind.

**Tabelle 3.** Einteilung der Peptidomimetika.[60]

<b>Peptidomimetika</b>	
<b>Peptide</b> Natürliche Peptidsequenzen, die von Proteinen und (nicht)ribosomalen Peptiden abgeleitet werden	
<b>Klasse A – modifizierte Peptide</b> Peptide - hauptsächlich bestehend aus $\alpha$ -Aminosäuren mit geringen Seitenketten- oder Peptidrückgratmodifikationen	<b>peptidartig</b>
<b>Klasse B – modifizierte Peptide/Foldamere</b> Peptide mit diversen Rückgrat- und Seitenkettenmodifikationen, einschließlich Foldamere	
<b>Klasse C – Strukturmimetika</b> Niedermolekulare Verbindungen, deren Substituenten analog zur peptidischen Seitenkette ausgerichtet sind	<b>niedermolekular</b>
<b>Klasse D – mechanistische Mimetika</b> Niedermolekulare Verbindungen, die die Wirkungsweise eines biologisch aktiven Peptids nachahmen	

## 1.2.1 Peptoide im Vergleich zu Peptiden

Bei Peptiden handelt es sich um chemische Verbindungen, die aus der Verknüpfung mehrerer Aminosäuren einer bestimmten Reihenfolge hervorgehen. Sie unterscheiden sich von Proteinen in ihrer Größe. So werden Aminosäureketten bis maximal 100 Aminosäuren als Peptide bezeichnet, bei längererkettigen Ketten handelt es sich um Proteine. Die einzelnen Aminosäuren sind dabei durch Amidbindungen, die sogenannte Peptidbindung, verknüpft.



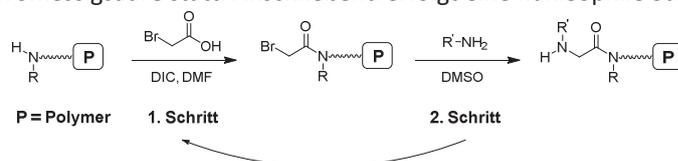
**Abbildung 23.**  $\alpha$ - und  $\beta$ -Peptoide abgeleitet von den entsprechenden Peptidstrukturen.

Peptoide leiten sich von den natürlich vorkommenden Peptiden ab und gehören somit gemäß *Grossmann* zur Klasse B der Peptidomimetika. In diesem Fall ist die Seitenkette auf den Stickstoff verschoben (Abbildung 23). Dies hat zur Folge, dass der  $\alpha$ -Kohlenstoff achiral wird und keine internen Wasserstoffbrücken ausgebildet werden können.[61] Aufgrund dieser Einschränkung kann es zu einer reduzierten Proteinaffinität kommen. Im Gegensatz zu Peptiden weisen Peptoide Vorteile im Bereich der einfacheren Synthese,<sup>11</sup> der chemischen Diversität,<sup>12</sup> proteolytischen Stabilität und einer erhöhten Zellpermeabilität auf.[62]

## 1.2.2 Peptoid-Klassen

Peptoide lassen sich in unterschiedliche Klassen einteilen. Hierbei sind einerseits die strukturell ähnlichen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Peptoide sowie die  $\alpha$ -Aminoxy-Peptoide zu nennen. Im

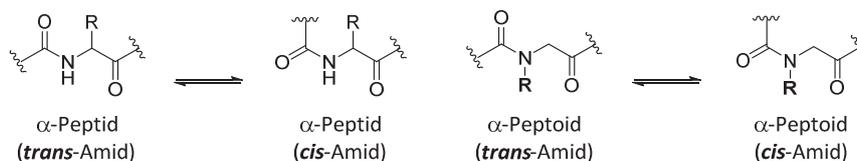
<sup>11</sup> In der **Submonomermethode** wird in zwei aufeinanderfolgenden Schritten auf fester Phase (Rink-Amid-Harz=Polymer) ein Peptoidrückgrat aufgebaut. Hierbei findet zuerst eine Acylierung einesamins mit Bromessigsäure statt. Anschließend erfolgt eine nukleophile Substitution (Schema unten).



**Schema.** Submonomermethode.

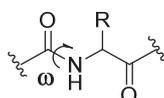
<sup>12</sup> In der Submonomermethode kann prinzipiell der Einsatz von jedem primären Amin erfolgen.

Gegensatz zu Peptiden, die zu 99.95 – 99.97% aus *trans*-konfigurierten Amidene bestehen,<sup>13</sup> weisen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Peptide, ein hohes Maß an *cis*-konfigurierten Amidene auf.[63]



**Abbildung 24.** Darstellung der *cis*- und *trans*-konfigurierten Amide in  $\alpha$ -Peptiden/Peptoiden.

Die Begriffe *cis* und *trans* werden im Zusammenhang mit dem Amidwinkel  $\omega$  verwendet und leiten sich von der Peptidnomenklatur ab (Abbildung 24). Hierbei wird auf die Atome im Rückgrat Bezug genommen (Abbildung 25).



**Abbildung 25.**  $\omega$ -Amidwinkel in einem  $\alpha$ -Peptid.

Der Nachteil ist, dass die bevorzugte Amidkonfiguration stark von der Art der Seitenkette abhängt, da sowohl das *cis*-, als auch das *trans*-Konformer bei *N*-alkylsubstituierten Peptoiden nahezu isoenergetisch vorliegt.[64] Es ist jedoch zu bemerken, dass trotz fehlender Protonen am Stickstoff und damit fehlender intramolekularer Wasserstoffbrücken in oligomeren Strukturen von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Peptoiden helikale Strukturen beobachtet wurden.[62] Beispielsweise veröffentlichten *Olsen* und Mitarbeiter im Jahre 2015 eine Kristallstruktur eines  $\beta$ -Peptoidhexamers mit sechs *cis*-induzierenden *N*-(*S*)-1-(1-naphthyl)-ethyl-Seitenketten.[65] Anhand der Kristallstruktur konnten im  $\beta$ -Peptoidhexamer sowohl *cis*-konfigurierte Amide, als auch eine helikale Konformation identifiziert werden.

Interessanterweise wird die Sekundärstruktur von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Peptoiden nicht nur von dem Peptoidrückgrat, sondern auch sehr stark von der Art der Seitenkette gesteuert. Die Einschränkung auf eine geringe Anzahl an *cis*-/*trans*-induzierenden Seitenketten limitiert somit signifikant die Anwendung von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Peptoiden in der medizinischen Chemie.  $\alpha$ -Aminoxy Peptide stellen Analoga von  $\beta$ -Peptiden dar, in denen die  $\beta$ -Methyleneinheit durch einen Sauerstoff substituiert wurde. Bei dieser Klasse handelt es sich ebenfalls um

<sup>13</sup> Eine Ausnahme stellt **Prolin** dar. Peptidbindungen, die Prolin enthalten, weisen zu 6.5% *cis*-konfigurierte Amidbindungen auf (alle anderen natürlichen Aminosäuren: 0.05% *cis*).[63]

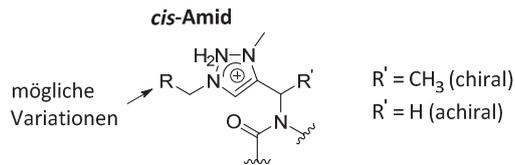
Peptidomimetika der Klasse B, welche sich durch ihr rigides Peptidrückgrat auszeichnen.[65] Unabhängig von der jeweiligen Art der Seitenkette kommt es bei homochiralen Oligomeren der  $\alpha$ -Aminoxy Peptide zur Ausbildung einer definierten helikalen Sekundärstruktur.[66] 2016 konnten *Hansen* und Mitarbeiter erstmals die Kristallstruktur eines  $\alpha$ -Aminoxy Peptidhexamers vorstellen. Anhand dessen konnten sie das Vorliegen einer rechtshändigen  $2_8$ -Helix bestätigen.[67] Diese Sekundärstruktur wird dabei durch eine 8-gliedrige Wasserstoffbrücke induziert. Im Jahre 2002 veröffentlichte *Shin* und *Park* die Synthese von  $\alpha$ -Aminoxy Peptoiden, welche sich wiederum direkt von den  $\alpha$ -Aminoxy Peptiden ableiten (Abbildung 26). Die Aufklärung der Sekundärstruktur des neuartigen Rückgrats war jedoch nicht Bestandteil der Studie.[68]



**Abbildung 26.**  $\alpha$ -Aminoxy Peptide und Peptoide.

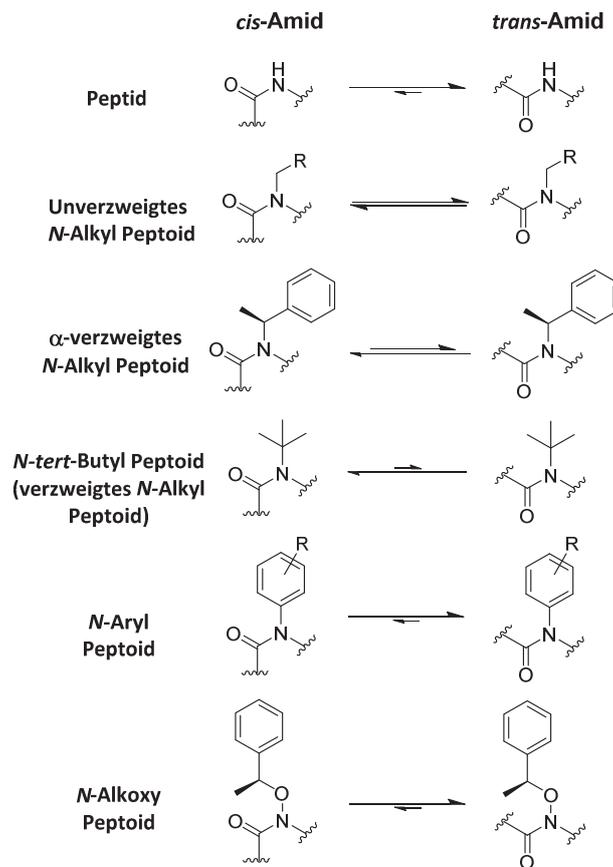
### 1.2.3 *Cis-/trans*-induzierende Seitenketten

Aufgrund der fehlenden Rigidität des Peptidrückgrates der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Peptoide werden *cis*- und *trans*-induzierende Seitenketten eingesetzt. Diese ermöglichen eine Einflussnahme auf die Konformation und die daraus resultierende helikale Sekundärstruktur. Hierbei existieren unterschiedliche Vertreter sowohl *cis*-, als auch *trans*-induzierender Seitenketten. Oligomere aus sperrigen,  $\alpha$ -verzweigten *N*-Alkyl Substituenten zeigen eine sich wiederholende Geometrie von *cis*-Amidbindungen auf. Die Ursache liegt in der Einschränkung der möglichen Konformationen des Peptidrückgrates.[69] Jedoch zeigen Peptoide mit diesen Seitenketten nur eine geringe Präferenz für die Ausbildung von *cis*-Amiden, da der Unterschied in der Freien Enthalpie der *cis*- und *trans*-Konformere sehr gering ist ( $< 1$  kcal/mol). Das Einführen einer sperrigen *N*-Alkyl Seitenkette wie *tert*-Butyl führt ausschließlich zur Induktion von *cis*-Amidbindungen (Abbildung 27).[70] Mit einer triazolium-artigen Seitenkette stellten *Taillefumier* und Mitarbeiter 2012 einen weiteren effizienten *cis*-induzierenden Vertreter vor.[71] Die *cis*-Geometrie wird weniger von der Sterik verursacht, sondern basiert auf einer Interaktion zwischen dem Peptidrückgrat und der Seitenkette, die durch eine elektronische Delokalisierung der  $n \rightarrow \pi^*_{Ar}$  (ausgehend vom Carbonyl ( $O_{i-1}$ ) zum antibindenden Orbital ( $\pi^*$ ) des triazolium-artigen Motivs des Restes *i*) hervorgerufen wird. Darüber hinaus bietet das triazoliumartige Motiv eine Möglichkeit der Seitenkettenvariation (Abbildung 27).



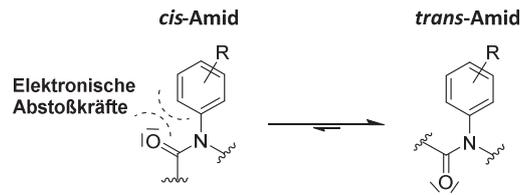
**Abbildung 27.** Mögliche Variationen der triazoliumartigen Seitenkette.[71]

Eine starke Präferenz für *trans*-Amidbindungen über hingegen *N*-Aryl Seitenketten aus (Abbildung 28).[72] Die bevorzugte Amidgeometrie wird dabei durch elektronische Abstoßkräfte induziert.



**Abbildung 28.** Geometrie der Amidbindungen in Peptiden und Peptoiden.[72]

Der Phenylring und der Carbonylsauerstoff versuchen, aufgrund ihrer Elektronendichte, den größtmöglichen Abstand zueinander anzunehmen. Dabei stellt die *trans*-Konformation im Vergleich zur *cis*-Konformation die energetisch günstigere Möglichkeit dar (Abbildung 29).[72]



**Abbildung 29.** Elektronische Abstoßkräfte im *N*-Aryl Peptoid.[72]

*N*-Alkoxyamide bieten eine weitere Alternative zur Induktion von *trans*-Amidbindungen. Hierbei übt der elektronenziehende Sauerstoff am Amidstickstoff einen starken strukturellen Einfluss aus. Die resultierende Präferenz der *trans*-Geometrie kann durch zwei Faktoren, ausgelöst durch den Sauerstoff, erklärt werden. Einerseits handelt es sich bei Sauerstoff im Vergleich zu Alkylgruppen um einen sterisch weniger anspruchsvollen Substituenten. Andererseits können ebenso die vorliegenden stereoelektronischen Effekte zwischen dem Sauerstoff und dem Carbonylsauerstoff, die Ursache der präferierten *trans*-Amidbindung sein.[73] Oligomere, die aus *trans*-Amidbindungen aufgebaut sind, weisen eine Polyprolin-Typ-II ähnliche Helix<sup>14</sup> auf, wohingegen Vertreter mit ausschließlich *cis*-Amidbindungen sich in eine Polyprolin-Typ-I ähnliche Helix<sup>15</sup> falten.[70]

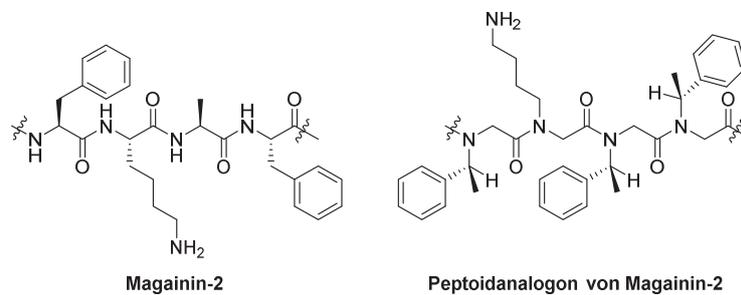
#### 1.2.4 Ausgewählte Applikationen von Peptoiden

Die Anwendung von Peptoiden wird heutzutage in diversen Bereichen untersucht. Beispielsweise dienen sie zur Oberflächenapplikation zur Verhütung von Biofouling auf diversen Materialien in medizinischen oder industriellen Bereichen oder als Peptidomimetikum, z. B. als Mimetika von antimikrobiellen Peptiden (AMPs).[74] Antimikrobielle Peptide bestehen aus etwa 10 - 50 Aminosäuren und sind häufig amphiphiler Natur.[75] Die hydrophobe Region ist für die Einflechtung in die Zellmembran verantwortlich, wohingegen die kationische Region eine Selektivität der bakteriellen Zellmembran gegenüber der Säugetiermembran gewährleistet. Diese Selektivität wird durch negativ geladene Lipidkopfgruppen in der bakteriellen Zellmembran hervorgerufen.[75] Trotz ihrer bemerkenswerten antimikrobiellen Eigenschaften scheiterten sie bisher in der Entwicklung als Arzneistoffe aufgrund ihrer Proteolyseinstabilität, den hohen

<sup>14</sup> Bei der **Polyprolin-Typ-II Helix (PPII)** handelt es sich um eine Sekundärstruktur, die als linkshändige Helix vorliegt. Sie ist durch *trans*-Amidbindungen geprägt.

<sup>15</sup> Bei der **Polyprolin-Typ-I Helix (PPI)** handelt es sich um eine Sekundärstruktur, die als rechtshändige und kompaktere Helix, im Vergleich zur PPII, vorliegt. Sie ist durch *cis*-Amidbindungen geprägt.

Produktionskosten und der meist unzureichenden Pharmakokinetik.[75] Dies führte zur Synthese von peptidomimetischen Analoga der entsprechenden AMPs. Peptidomimetika wie z. B. Peptoide stellen im Gegensatz zu Peptiden proteolysestabile Verbindungen dar,[76] die ebenfalls antibakterielle Eigenschaften sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien zeigten.[77] Im Jahre 2003 folgte der Bericht von *Barron* und Mitarbeiter über die Synthese von Peptoiden basierend auf der Struktur des antimikrobiellen Peptids Magainin-2 (Abbildung 30).[78] Diese Peptoide wiesen eine inhibitorische Aktivität sowohl bei *Escherichia coli*, als auch bei *Bacillus subtilis* im niedrig mikromolaren Bereich auf.[78] Zusätzlich stellten *Barron* und Mitarbeiter im Jahre 2011 fest, dass AMPs ebenfalls eine antimikrobielle Wirkung gegenüber *Mycobacterium tuberculosis*<sup>16</sup> aufweisen.[79]



**Abbildung 30.** Magainin-2 und antimikrobielles Peptoidanalogon von Magainin-2 (Ausschnitt).

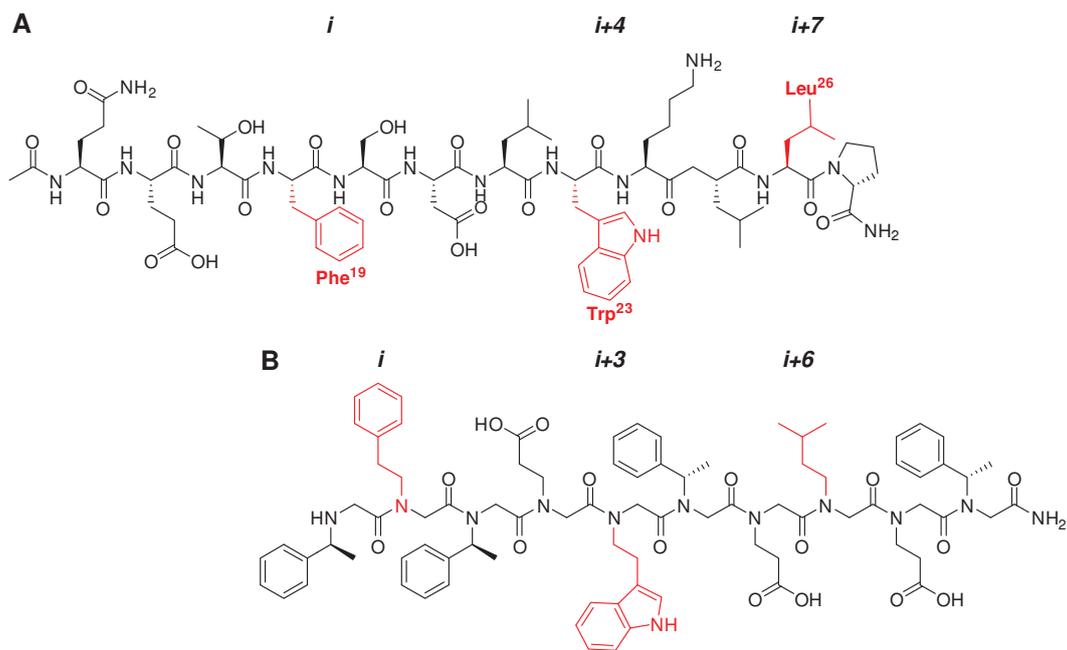
Untersuchungen an peptidomimetischen Analoga des Peptids Amylin<sup>17</sup> konnten belegen, dass diese nicht nur die Bildung von  $\beta$ -Faltblättern, sondern auch die Aggregation der Amyloid-Fibrillen unterbinden.[80] Das Peptid Amylin ist ein Hauptbestandteil der Amyloidablagerungen, welche im Typ II der Diabetes eine wichtige Rolle spielen.[80] Weiterhin finden Peptoide als Inhibitoren von Protein-Protein-Interaktionen Anwendung, wie z. B. bei der Interaktion von p53 und HDM2.<sup>18</sup>[81] Im Jahre 2006 konnten *Appella* und Mitarbeiter erfolgreich peptoid-basierte Inhibitoren der p53-HDM2 Interaktion herstellen.[81] Die Transformation der Peptid- in die Peptoidsequenz wurde in Anbetracht der jeweilig vorliegenden Sekundärstrukturen durchgeführt. Da die Peptoid-Helix im

<sup>16</sup> ***Mycobacterium tuberculosis*** ist ein Gram-positives Bakterium, das Tuberkulose verursacht.[79]

<sup>17</sup> **Amylin** ist ein Peptidhormon, welches zusammen mit Insulin von den  $\beta$ -Zellen der Bauchspeicheldrüse gebildet wird. Amylin weist, wie das  $\beta$ -Amyloid, eine von  $\beta$ -Faltblättern geprägte Sekundärstruktur auf und bindet an denselben Amylinrezeptor. Bei  $\beta$ -Amyloid handelt es sich um ein Peptid, das den Hauptbestandteil der Amyloid Plaques repräsentiert. Diese gelten als die Ursache von Alzheimer.[80]

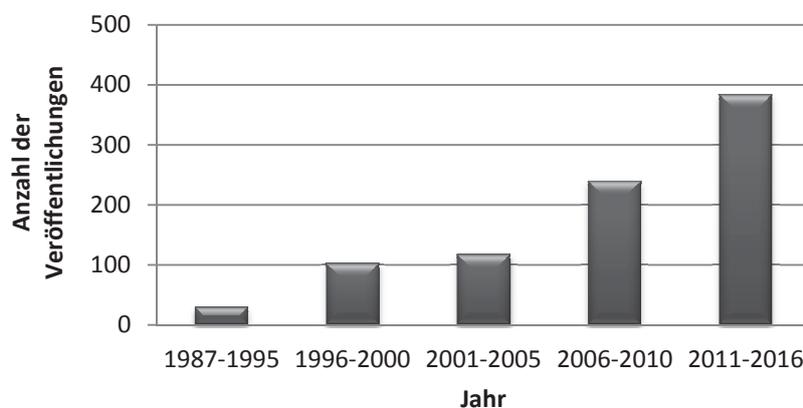
<sup>18</sup> Die Protein-Protein-Interaktion von **p53** (Tumorsuppressorgen) und **HDM2** (natürlicher Antagonist von p53) stellt einen wichtigen Ansatzpunkt in der Therapie von Tumorerkrankungen dar.

Vergleich zur Peptid-Helix dichter gepackt ist (3 anstatt 3.6 Aminosäurereste pro Wendung), musste die Sequenz um eine Aminosäure gekürzt werden, um die Interaktionspartner des p53 adressieren zu können. Daraus resultierten die neuen Interaktionspositionen  $i$ ,  $i+3$  und  $i+6$  statt  $i$ ,  $i+4$  und  $i+7$  (Abbildung 31).



**Abbildung 31.** Wildtyp p53 (16-26) (A) und ein peptoid-basiertes Analogon von p53 (B).

Die aufgeführten Beispiele spiegeln die diversen Anwendungsmöglichkeiten von Peptoiden wieder. So kam es in den letzten Jahren zu einer steten Zunahme an Veröffentlichungen auf dem Gebiet der Peptoide (Abbildung 32), welche das gestiegene Interesse an dieser Substanzklasse widerspiegelt.



**Abbildung 32.** Anzahl der Veröffentlichungen zu Peptoiden in den vergangenen Jahren.[82]

## 2. Leitgedanke

In der vorliegenden Arbeit wird die Synthese, Konformationsanalyse und biologische Untersuchung unterschiedlicher Peptidomimetika zur Therapie von Tumorerkrankungen behandelt. Die Rationale zur Entwicklung von Peptidomimetika basiert auf dem Vorliegen einiger wichtiger Nachteile von Peptiden. Hierzu zählen die Proteolyseinstabilität, die schlechte Membranpermeabilität, die eingeschränkte chemische Vielfalt und die Konformationsflexibilität, insbesondere bei linearen Peptiden. Dementsprechend war es das Ziel dieser Arbeit, aufbauend auf peptidischen Leitstrukturen, unterschiedliche Peptoid-Analoga zu entwickeln und diese auf ihre biologische Aktivität zu untersuchen.

In der Entwicklung von neuen Wirkstoffen zur Behandlung von Tumorerkrankungen erwiesen sich Inhibitoren der Histondeacetylasen als vielversprechend. So sollten aufgrund der genannten Nachteile von Peptiden in den ersten beiden Projekten dieser Arbeit in Anlehnung an peptid-basierte HDACI verschiedene peptoid-basierte HDACI synthetisiert und auf ihre Zytotoxizität und HDAC-Inhibition *in vitro* untersucht werden. Neben vielen Vorteilen sind die  $\alpha$ -Peptoide ebenso durch das Phänomen einer flexiblen Amidgeometrie geprägt. Daher sollte im dritten Projekt dieser Arbeit das Rückgrat der  $\alpha$ -Aminoxy Peptoide analysiert werden. Hierzu sollten einige Modellsubstanzen synthetisiert und diese hinsichtlich der Amidgeometrie und Sekundärstruktur mithilfe verschiedener Analysemethoden untersucht werden.

### 3. Peptoid-basierte HDAC-Inhibitoren

Alle Verbindungen, die aus der folgenden Publikation stammen und in den folgenden Kapiteln diskutiert werden, sind analog zur Publikation nummeriert und mit einem \* versehen.

#### 3.1 Zielsetzung

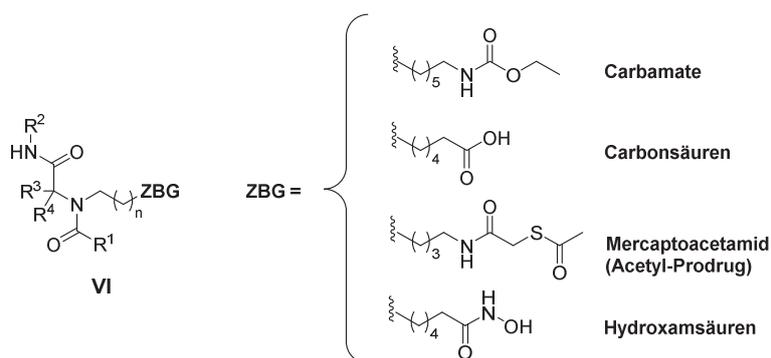
Die Idee zur Synthese peptoid-basierter HDAC-Inhibitoren entstand in Anlehnung an eine Arbeit von Fairlie und Mitarbeitern aus dem Jahre 2006.[83] Diese entwickelten basierend auf dem natürlich vorkommenden zyklischen Tetrapeptid Trapoxin B lineare Tripeptid-Mimetika (Abbildung 33). Bei dem linearen System handelt es sich somit um peptid-basierte HDAC-Inhibitoren (**V**). Die peptid-basierten HDACI **V** sind durch eine umständliche stereoselektive Synthese zu erhalten. Ferner weisen Peptide im Vergleich zu Peptoiden eine reduzierte Stabilität gegenüber Proteolyse auf.



**Abbildung 33.** Modifikation der peptid-basierten HDACI (**V**) zu peptoid-basierten HDACI (**VI**) aus dem Naturstoff Trapoxin B.

Aufgrund der genannten Nachteile der HDACI vom Typ **V** war es das Ziel in diesem Projekt neue peptidomimetische Analoga zu entwickeln und zu untersuchen. Hierzu sollte der Linker vom  $\alpha$ -Kohlenstoff auf den Amidstickstoff verschoben werden. Die geplanten Analoga **VI** können somit als peptoid-basierte HDACI angesehen werden. Die potentiellen Vorteile der peptoid-basierten HDACI **VI** liegen unter anderem im Einsatz günstiger Ausgangssubstanzen und einer chemisch weniger aufwendigen Synthese. Weiterhin weist diese Art von Rückgrat eine potentiell höhere Proteolysestabilität auf.[57] Demnach sollten ausgehend von den peptid-basierten HDACI **V** peptoid-basierte HDACI vom Typ **VI** mit verschiedenen zinkbindenden Gruppen (ZBG) synthetisiert werden (Abbildung 34). Anschließend sollten diese im Arbeitskreis von Prof. Dr. Kassack (Heinrich-Heine-Universität, Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie) auf ihre HDAC-Inhibition und Zytotoxizität *in*

*in vitro* untersucht werden. Verbindungen, die als potente HDAC-Inhibitoren identifiziert werden, sollten weiterführenden biologischen Untersuchungen im Arbeitskreis *Kassack* sowie im Arbeitskreis von *Prof. Dr. Jung* (Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Institut für Pharmazeutische Wissenschaften) und im Arbeitskreis von *Prof. Dr. Dekker* (Reichsuniversität Groningen, Institut für Chemische und Pharmazeutische Biologie) unterzogen werden. Ferner sollten die Bindungsmodi der vielversprechendsten Verbindungen in Dockingstudien im Arbeitskreis von *Prof. Dr. Gohlke* (Heinrich-Heine-Universität, Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie) analysiert werden.

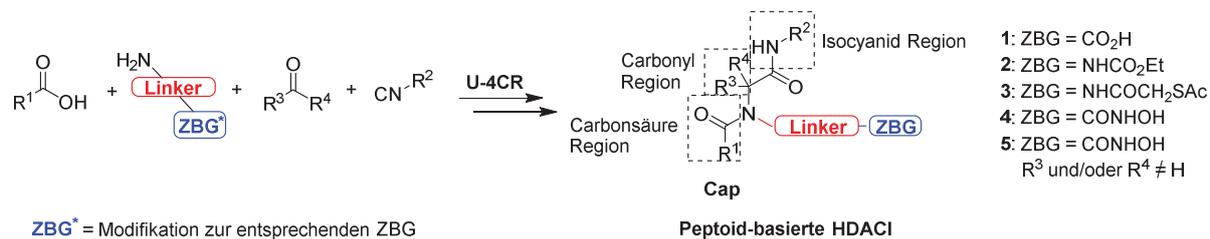


**Abbildung 34.** Auflistung der zu synthetisierenden zinkbindenden Gruppen.

### 3.2 Zusammenfassung der Publikation

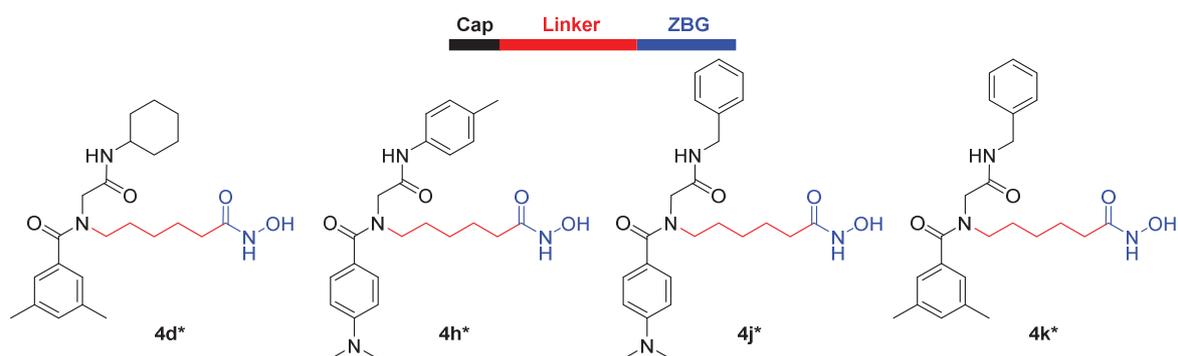
In der folgenden Arbeit ‚Design, multicomponent synthesis and anticancer activity of a focused library of HDAC inhibitors with peptoid-based cap groups‘ wird eine neuartige Klasse von HDAC-Inhibitoren vorgestellt. Hierbei handelt es sich um die Klasse der peptoid-basierten HDACI. Peptide unterscheiden sich im Vergleich zu Peptiden durch einen Seitenkettenttransfer vom  $\alpha$ -Kohlenstoff auf den Amidstickstoff. In Anlehnung an die peptidischen Strukturen von *Fairlie* und Mitarbeitern aus dem Jahre 2006 (Abbildung 33) wurden peptoid-basierte HDACI mit unterschiedlichen zinkbindenden Gruppen (ZBG) synthetisiert und auf ihre biologische Aktivität hin untersucht. Zu den untersuchten ZBG zählen die Gruppen der Carbonsäuren und Hydroxamsäuren sowie die Thiole in einer acetylierten Prodrug-Form. Die Carbamate repräsentieren einen weniger bekannten Vertreter der zinkbindenden Gruppen und stellen die vierte untersuchte ZBG in der Publikation dar. Diese wurden in Anlehnung an eine Arbeit von *Balunas* und Mitarbeiter aus

dem Jahre 2013 synthetisiert, welche den Naturstoff Santacruzamat A<sup>19</sup> als einen pikomolaren HDAC2 Inhibitor beschrieben (Abbildung 35).[33] Im Jahre 2016 mussten *Balunas* und Mitarbeiter die Ergebnisse ihrer Arbeit jedoch revidieren.[84]



**Abbildung 35.** Peptoid-basierte HDAC-Inhibitoren.

Basierend auf der Ugi-4-Komponenten Reaktion (U-4CR), einer Mehrkomponentenreaktion, und anschließenden Modifikationen zur entsprechenden zinkbindenden Gruppe, wurden verschiedene peptoid-basierte HDACI erhalten (Abbildung 35). Durch diese effiziente Synthesestrategie wurde sowohl die ZBG, als auch die Carbonsäure, Carbonyl und Isocyanid Region (Cap) umfangreich variiert. Somit konnte durch die diversitätsorientierte Synthese eine fokussierte Substanzbibliothek hergestellt werden. Alle Verbindungen wurden anschließend hinsichtlich ihrer Zytotoxizität im MTT-Assay und HDAC-Inhibition in einem zellulären HDAC-Assay untersucht. Hierbei erwiesen sich die peptoid-basierten Hydroxamsäure-Derivate, insbesondere die Verbindungen **4d\***, **4h\***, **4j\*** und **4k\*** als die potentesten Vertreter der hergestellten Substanzbibliothek (Abbildung 36). Tiefergehende biologische Untersuchungen ergaben im HDAC Enzym-Assay eine moderate Präferenz für die Inhibition von HDAC1 gegenüber HDAC6.



**Abbildung 36.** Peptoid-basierte Hydroxamsäure-Derivate **4d\***, **4h\***, **4j\*** und **4k\***.

<sup>19</sup> **Santacruzamat A** ist ein Naturstoff mit einer Carbamatstruktur, isoliert aus einem marinen Cyanobakterium, vgl. *Symploca* sp.

Ebenfalls konnte eine erhöhte Acetylierung der natürlichen HDAC-Substrate  $\alpha$ -Tubulin<sup>20</sup> und Histon H3<sup>21</sup> verzeichnet werden. In Kombinationsstudien der peptoid-basierten Hydroxamsäure **4j\*** mit Cisplatin wurde zudem eine Zunahme der Cisplatin-Sensitivität in der Cisplatin-resistenten Zelllinie Cal27CisR nachgewiesen. NMR-spektroskopische Untersuchungen ergaben weiterhin, dass die peptoid-basierten Hydroxamsäuren als *cis*- und *trans*-Rotamere vorliegen. Hierauf aufbauend wurden die Bindungsmodi beider Rotamere separat, sowohl in HDAC1, als auch in HDAC6 im Rahmen von Dockingstudien untersucht. Im Falle der Hydroxamsäure **4j\*** konnte eine präferierte Bindung des *cis*-Rotamers für HDAC1 sowie des *trans*-Rotamers für HDAC6 festgestellt werden.

Zusammengefasst werden in der Publikation die Struktur-Aktivitäts-Beziehungen und Struktureigenschaften peptoid-basierter HDACI beschrieben. Hierbei wurden die peptoid-basierten Hydroxamsäuren vom Typ **VI** als vielversprechende neuartige HDACI identifiziert. Die Ugi-4-Komponenten Reaktion ermöglicht eine unkomplizierte, effiziente und leichte Synthese einer Vielzahl peptoid-basierter HDACI. Deshalb stellt diese Substanzklasse einen wichtigen Ausgangspunkt zur Entwicklung weiterer HDAC-Inhibitoren mit verbesserter Antitumoraktivität dar.

### 3.3 Publikation

Die vorliegende Arbeit wurde veröffentlicht in: „Journal of Medicinal Chemistry“

(Viktoria Krieger, Alexandra Hamacher, Christoph G. W. Gertzen, Johanna Senger, Martin Marek, Christophe Romier, Thomas Kurz, Manfred Jung, Holger Gohlke, Matthias U. Kassack, and Finn K. Hansen, Design, multicomponent synthesis, and anticancer activity of a focused histone deacetylase (HDAC) inhibitor library with peptoid-based cap groups. *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (13), 5493 – 5506)<sup>22</sup>

**Impact factor:** 6.259

---

<sup>20</sup>  **$\alpha$ -Tubulin** ist ein Protein, dass von HDAC6 deacetyliert wird.

<sup>21</sup> **Histon H3** repräsentiert eines der fünf Histon-Proteine des Chromatins. Das *N*-terminale Ende des Histons H3 ragt aus dem Nukleosom heraus und kann durch diverse Prozesse modifiziert werden, wie z. B. durch die Acetylierung und Deacetylierung.

<sup>22</sup> Die folglich aufgeführte Supporting Info stellt eine gekürzte Version dar. Die zur Publikation gehörende vollständige Supporting Info ist online zu finden unter: DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00197.

**Eigener Anteil an der Arbeit:** 70%, Erstautorin, Durchführung aller organischen Synthesen, analytische Charakterisierung aller Verbindungen, Planung und Interpretation der VT-NMR-Experimente, Mitarbeit an der Erstellung des Manuskriptes.

"Reprinted (adapted) with permission from Journal of Medicinal Chemistry, *60* (13), 5493–5506, 'Design, multicomponent synthesis, and anticancer activity of a focused histone deacetylase (HDAC) inhibitor library with peptoid-based cap groups' Copyright 2017 American Chemical Society. "

## Design, Multicomponent Synthesis, and Anticancer Activity of a Focused Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitor Library with Peptoid-Based Cap Groups

Viktoria Krieger,<sup>†</sup> Alexandra Hamacher,<sup>†</sup> Christoph G. W. Gertzen,<sup>†</sup> Johanna Senger,<sup>‡</sup> Martijn R. H. Zwinderman,<sup>§</sup> Martin Marek,<sup>||</sup> Christophe Romier,<sup>||</sup> Frank J. Dekker,<sup>§</sup> Thomas Kurz,<sup>†</sup> Manfred Jung,<sup>‡</sup> Holger Gohlke,<sup>†</sup> Matthias U. Kassack,<sup>†</sup> and Finn K. Hansen<sup>\*,†,⊥</sup>

<sup>†</sup>Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Universitätsstraße 1, 40225 Düsseldorf, Germany

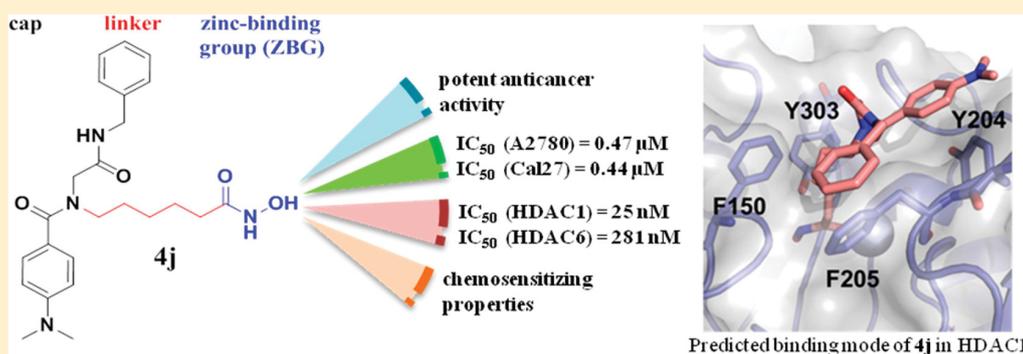
<sup>‡</sup>Institut für Pharmazeutische Wissenschaften, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Albertstraße 25, 79104 Freiburg im Breisgau, Germany

<sup>§</sup>Department of Chemical and Pharmaceutical Biology, Groningen Research Institute of Pharmacy, University of Groningen, 9712 Groningen, The Netherlands

<sup>||</sup>Département de Biologie Structurale Intégrative, Institut de Génétique et Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Université de Strasbourg (UDS), CNRS, INSERM, 1 Rue Laurent Fries, 67404 Illkirch Cedex, France

<sup>⊥</sup>Pharmaceutical/Medicinal Chemistry, Institute of Pharmacy, Leipzig University, Brüderstraße 34, 04103 Leipzig, Germany

### Supporting Information



**ABSTRACT:** In this work, we report the multicomponent synthesis of a focused histone deacetylase (HDAC) inhibitor library with peptoid-based cap groups and different zinc-binding groups. All synthesized compounds were tested in a cellular HDAC inhibition assay and an MTT assay for cytotoxicity. On the basis of their noteworthy activity in the cellular HDAC assays, four compounds were further screened for their inhibitory activity against recombinant HDAC1–3, HDAC6, and HDAC8. All four compounds showed potent inhibition of HDAC1–3 as well as significant inhibition of HDAC6 with IC<sub>50</sub> values in the submicromolar concentration range. Compound **4j**, the most potent HDAC inhibitor in the cellular HDAC assay, revealed remarkable chemosensitizing properties and enhanced the cisplatin sensitivity of the cisplatin-resistant head–neck cancer cell line Cal27CisR by almost 7-fold. Furthermore, **4j** almost completely reversed the cisplatin resistance in Cal27CisR. This effect is related to a synergistic induction of apoptosis as seen in the combination of **4j** with cisplatin.

## INTRODUCTION

The interest in epigenetic drug targets has significantly increased in recent years.<sup>1</sup> Histone acetylation and deacetylation by histone acetyltransferases (HATs) and histone deacetylases (HDACs) represent key epigenetic modifications that modulate chromatin structures and the transcription of genes.<sup>1</sup> HDACs are overexpressed in several cancer types, and inhibition of HDACs can result in anticancer effects through various mechanisms involving reduced cell motility/migration, invasion, angiogenesis, proliferation, induction of apoptosis,

and inhibition of DNA repair.<sup>2</sup> As a consequence, HDACs have emerged as valuable targets for the development of novel anticancer drugs.<sup>3</sup> Four HDAC inhibitors (HDACi) have been FDA-approved to treat cancer. The first three approvals for HDACi (vorinostat, romidepsin, belinostat; Figure 1) have been granted for relatively rare types of lymphoma (cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) and/or peripheral T-cell lymphoma

Received: February 5, 2017

Published: June 2, 2017

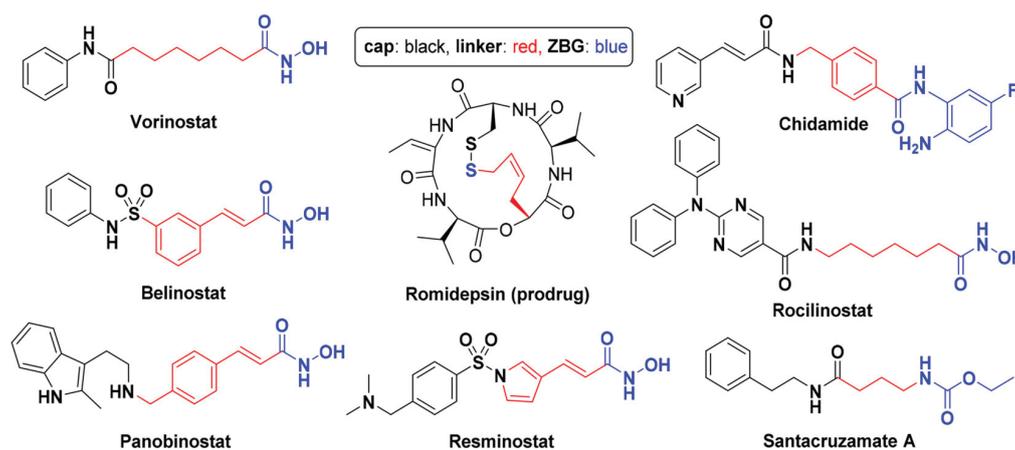


Figure 1. Selected histone deacetylase inhibitors.

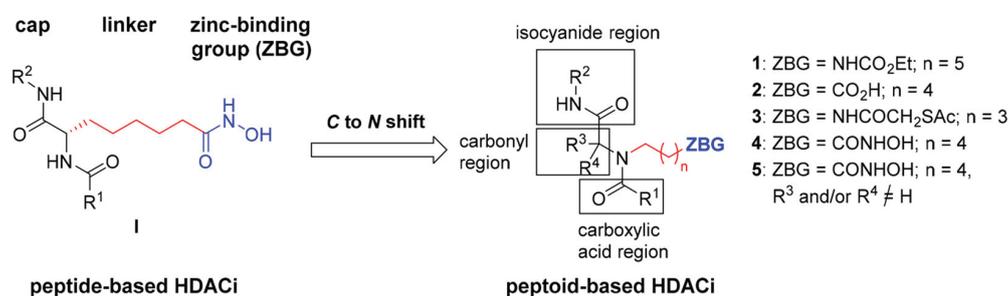


Figure 2. Design of the target compounds 1–5.

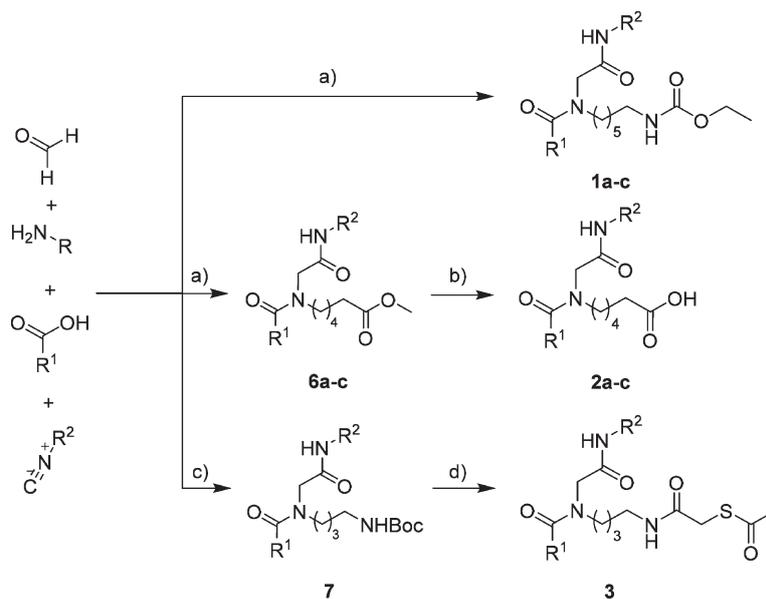
(PTCL)). Furthermore, chidamide (Figure 1), the first benzamide-based HDACi, has recently received approval in China for relapsed or refractory PTCL.<sup>4</sup> However, the recent FDA-approval of panobinostat (Figure 1) to treat multiple myeloma proves that HDACi can show efficacy in more common cancer types. Consequently, there are currently many clinical trials underway to study HDACi as single agents and in combination with other drugs to treat both solid and hematological tumors.<sup>3</sup> Moreover, there is growing evidence that HDACi might be suitable to treat several noncancer diseases such as inflammation, neurodegenerative diseases, immune disorders, parasitic diseases, and HIV.<sup>2,5</sup>

On the basis of their homology to yeast proteins and cofactor dependence, HDACs have been divided into different classes. HDAC classes I, II (subdivided into classes IIa and IIb), and IV are zinc-dependent enzymes, whereas class III HDACs (sirtuins) are NAD<sup>+</sup>-dependent.<sup>2</sup> Class I isozymes (HDAC1, -2, -3, -8) are mainly located in the nucleus, while class IIa (HDAC4, -5, -7, -9) and IV (HDAC11) HDACs shuttle between nucleus and cytoplasm. In contrast, class IIb isoforms (HDAC6, -10) are primarily found in the cytoplasm.<sup>2</sup> Unselective HDACi possess a range of unwanted side effects including bone marrow depression, diarrhea, weight loss, fatigue, and cardiac arrhythmias.<sup>2</sup> Thus, to discover efficacious HDACi with a better safety profile, it has been proposed to develop isoform-selective HDACi.<sup>6</sup> Starting from the well-established cap–linker–zinc-binding group (ZBG) pharmacophore model (Figure 1) and available X-ray crystal structures or homology models, several isoform-selective HDACi have been discovered in recent years.<sup>6</sup> It is evident that the use of unselective HDACi outside of oncology is limited because of their side effects.<sup>2</sup> However, in the case of cancer therapy the

benefit of isoform- or class-selective HDACi is still under debate. At least so far, there is no clear clinical evidence that isoform-selective HDACi reveal sufficient efficacy in combination with fewer adverse effects.<sup>2</sup>

Class I HDACs, especially HDAC1–3, and HDAC6 (class IIb), are considered key targets for cancer treatment.<sup>2,7</sup> Recently, rocilinostat (ACY-1215),<sup>8</sup> a preferential HDAC6 inhibitor with mediocre selectivity and low nanomolar activity against class I HDACs, has reached phase II clinical trials for multiple myeloma. Furthermore, resminostat, an HDACi that primarily targets HDAC1–3 and HDAC6, received “orphan drug” status by the FDA for Hodgkin lymphoma and hepatocellular carcinoma.<sup>9</sup> Thus, when developing HDAC inhibitors for the treatment of cancer, it may be desirable to inhibit both class I isoforms and HDAC6 to exploit the cytotoxicity associated with inhibiting the class I isoforms while simultaneously enhancing the anticancer activity by also targeting HDAC6.<sup>4</sup>

In a previous communication, we have reported a series of peptoid-based HDACi as preferential HDAC6 inhibitors.<sup>10</sup> In this project, we aimed at the development of highly potent anticancer HDACi that simultaneously inhibit class I HDACs and HDAC6. Using the HDAC pharmacophore model as a starting point, we designed a novel series of HDACi bearing peptoid-based cap groups in combination with an alkyl linker. The synthesis of a focused HDACi library was achieved using a straightforward and efficient multicomponent approach based on the Ugi four-component reaction (U-4CR) as the key step. Different ZBGs were introduced by a series of post-Ugi transformations. Herein, we report the rational design, multicomponent synthesis, biological evaluation, and modeling

Scheme 1. Synthesis of Non-Hydroxamates 1a–c, 2a–c, and 3 Intended To Target HDACs<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Reagents and conditions: (a) (i) amine component (1.2 equiv), paraformaldehyde (1.2 equiv), Et<sub>3</sub>N (1.2 equiv), MeOH, 4 Å MS, rt, 30 min; (ii) R<sup>1</sup>COOH (1 equiv), rt, 10 min; (iii) R<sup>2</sup>NC (1 equiv), rt, 16 h; (b) LiOH·H<sub>2</sub>O (2 equiv), MeOH, rt, 16 h; (c) (i) amine component (1.2 equiv), paraformaldehyde (1.2 equiv), MeOH, 4 Å MS, rt, 30 min; (ii) R<sup>1</sup>COOH (1 equiv), rt, 10 min; (iii) R<sup>2</sup>NC (1 equiv), rt, 16 h; (d) (i) TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:5, v/v), rt, 30 min; (ii) 2-(acetylthio)acetic acid (1.2 equiv), pyridine (2 equiv), DIC (1.2 equiv), HOAt (1.2 equiv), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/DMF (1:1, v/v), rt, 16 h.

studies of this new class of HDACi with potent anticancer activity and remarkable chemosensitizing properties.

## RESULTS AND DISCUSSION

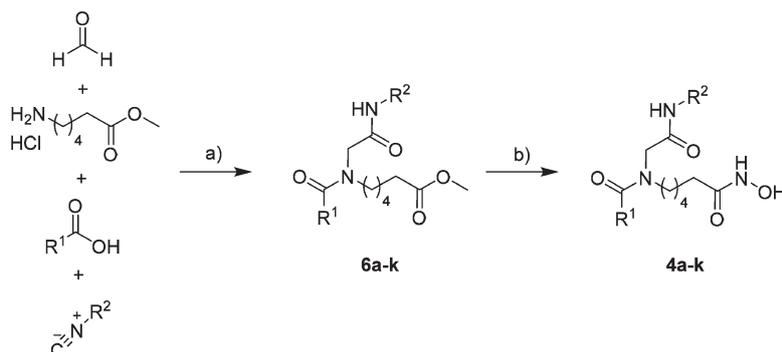
**Design and Synthesis of Peptoid-Based HDACi.** In 2006, Fairlie and co-workers described analogues of the cyclic tetrapeptide HDACi trapoxin B containing a hydroxamic acid as ZBG in place of the epoxy ketone found in the natural product.<sup>11</sup> To simplify the chemical structure, they designed ring-opened tripeptide analogues utilizing 2-aminosuberic acid as a key building block resulting in the peptide-based HDACi of type I (Figure 2).<sup>11</sup> Several compounds from this series revealed potent anticancer activity and remarkable activity against HDAC1 and HDAC6.<sup>11,12</sup> To expand the chemical space, to avoid the cumbersome synthesis of enantiomerically pure unnatural amino acids, and to enable a straightforward multicomponent synthesis, we decided to attach the linker to the nitrogen rather than to the  $\alpha$ -carbon providing HDACi with peptoid-based cap groups (1–5, Figure 2). Peptoids, or *N*-alkylglycine derivatives, feature several notable differences over peptides, including (1) proteolytic stability, (2) increased cell permeability, (3) an achiral backbone, (4) ease of synthesis, and (5) increased conformational space due to *cis/trans*-amide bond rotamerism.<sup>13–16</sup>

From a synthetic point of view, a wide range of peptoids can be efficiently prepared (among others) via the Ugi four-component reaction (U-4CR), allowing the rapid generation of focused compound libraries. On the basis of the U-4CR, we aimed at the synthesis of a series of non-hydroxamate HDACi (1–3), peptoid-based HDACi with a hydroxamic acid ZBG (4), and HDACi with peptoid–peptide hybrid cap groups (5, R<sup>3</sup> and/or R<sup>4</sup> ≠ H) (Figure 2). The structures of the designed peptoid-based HDACi 1–5 can be described by a peptoid-based cap (black), linker (red), and ZBG (blue) pharmaco-

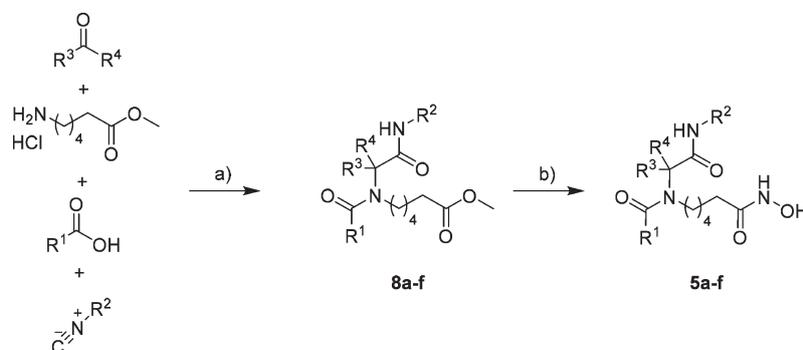
phore model. We retained the alkyl linker realized in the HDACi of type I because this type of linker is known to provide HDACi with activity against class I HDACs and HDAC6. To identify compounds with optimized anticancer properties, we intended to perform a systematic variation of the cap group. On the basis of the U-4CR synthetic protocol, the cap group can be further divided into an isocyanide, carbonyl, and carboxylic acid region (Figure 2). The systematic variation of the peptoid-based cap can therefore be achieved by simple variation of respective components in the U-4CR. To study whether the hydroxamate can be replaced by other established zinc-binding groups, the introduction of different ZBGs such as carboxylic acids,<sup>17</sup> ethyl carbamates,<sup>18</sup> and mercaptoacetamides (as acetyl prodrugs)<sup>19</sup> was planned by performing suitable post-Ugi transformations or by utilizing appropriately modified amine components.

The synthesis of our HDACi library is summarized in Schemes 1–3. The first series of compounds contained non-hydroxamate ZBGs. In detail, the synthesis of the compounds 1a–c, 2a–c, and 3 was achieved through straightforward U-4CR reactions differing in the use of the amine component (Scheme 1). In all cases, the respective amine component and paraformaldehyde were stirred in dry methanol in the presence of 4 Å molecular sieves (4 Å MS) to provide the imine intermediates. The subsequent addition of the carboxylic acid and isocyanide component provided the desired Ugi products.

The ethyl carbamates 1a–c were directly obtained after the U-4CR using ethyl (6-aminoethyl)carbamate trifluoroacetate as amine component. Compounds 2a–c and 3 were synthesized by performing suitable post-Ugi transformations. The peptoid-based HDACi 2a–c with a carboxylic acid as ZBG were prepared in a two-step protocol. The U-4CR using the amine methyl 6-aminohexanoate hydrochloride in the presence of triethylamine as base afforded the intermediates 6a–c. The

Scheme 2. Synthesis of Hydroxamate HDACi 4a–k<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Reagents and conditions: (a) (i) methyl 6-aminohexanoate hydrochloride (1.2 equiv), paraformaldehyde (1.2 equiv), Et<sub>3</sub>N (1.2 equiv), MeOH, 4 Å MS, rt, 30 min; (ii) R<sup>1</sup>COOH (1 equiv), rt, 10 min; (iii) R<sup>2</sup>NC (1 equiv), rt, 16 h; (b) (i) LiOH·H<sub>2</sub>O (2 equiv), MeOH, rt, 16 h; (ii) *N*-methylmorpholine (1.3 equiv), isobutyl chloroformate (1.3 equiv), MeOH, 0 °C, 15 min; (iii) NH<sub>2</sub>OH·HCl (4 equiv), KOH (4 equiv), MeOH, rt, 16 h.

Scheme 3. Synthesis of Hydroxamate HDACi 5a–f<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Reagents and conditions: (a) (i) methyl 6-aminohexanoate hydrochloride (1.2 equiv), aldehyde or ketone (1.2 equiv), Et<sub>3</sub>N (1.2 equiv), MeOH, 4 Å MS, rt, 30 min; (ii) R<sup>1</sup>COOH (1 equiv), rt, 10 min; (iii) R<sup>2</sup>NC (1 equiv), rt, 16 h; (b) (i) LiOH·H<sub>2</sub>O (2 equiv), MeOH, rt, 16 h; (ii) *N*-methylmorpholine (1.3 equiv), isobutyl chloroformate (1.3 equiv), MeOH, 0 °C, 15 min; (iii) NH<sub>2</sub>OH·HCl (4 equiv), KOH (4 equiv), MeOH, rt, 16 h.

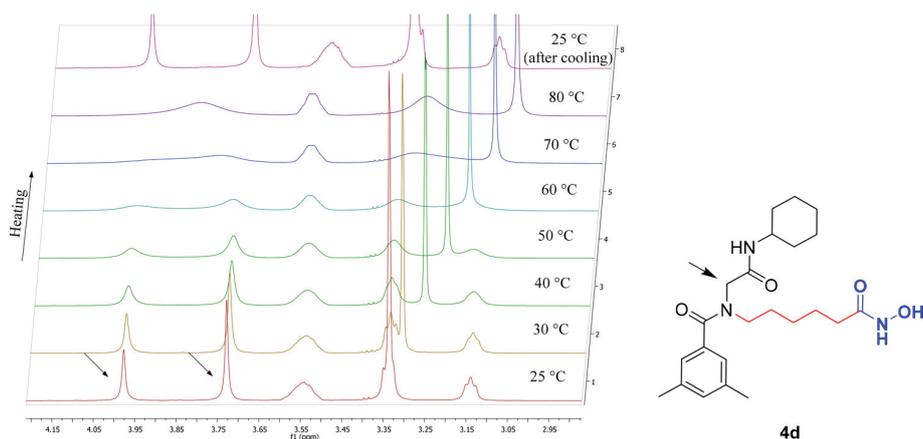
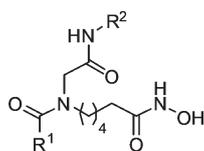


Figure 3. Variable temperature NMR experiment of compound 4d in DMSO-*d*<sub>6</sub> from 25 to 80 °C and cooling back to 25 °C.

target compounds 2a–c were subsequently prepared via the hydrolysis of the corresponding methyl ester intermediates 6a–c. For the synthesis of mercaptoacetamide derivative 3, *N*-Boc-1,4-butanediamine was used as amine component to provide the Boc-protected Ugi product 7. The acidic deprotection of 7 followed by the amide coupling reaction with 2-(acetylthio)-

acetic acid yielded the mercaptoacetamide compound 3 as acetyl prodrug.

The synthesis of the hydroxamates 4a–k was accomplished in three steps as outlined in Scheme 2. First, the Ugi reaction furnished the methyl ester derivatives 6a–k. Conversion of the intermediates into the corresponding carboxylic acid followed

Table 1. HDAC Inhibition and Cytotoxicity of the Compounds 4a–k<sup>a</sup>

4a-k

compd	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	HDACi IC <sub>50</sub> [μM]		MTT IC <sub>50</sub> [μM]		HDACi IC <sub>50</sub> [μM]		MTT IC <sub>50</sub> [μM]	
			A2780	A2780CisR	A2780	A2780CisR	Cal27	Cal27CisR	Cal27	Cal27CisR
4a	Ph	c-Hex	1.66	1.13	3.46	8.21	1.34	1.08	3.80	10.3
4b	1-naphthyl	c-Hex	0.96	1.29	0.26	4.12	0.75	0.60	2.40	5.60
4c	4-Me <sub>2</sub> N-Ph	c-Hex	1.42	1.90	1.54	3.31	1.40	1.52	2.97	35.5
4d	3,5-Me <sub>2</sub> -Ph	c-Hex	0.88	0.93	0.16	3.81	0.71	0.64	1.13	1.14
4e	Ph	<i>t</i> -Bu	8.98	9.51	20.7	42.4	6.85	4.59	16.7	19.5
4f	4-Me <sub>2</sub> N-Ph	<i>t</i> -Bu	2.06	2.49	1.03	5.18	1.78	1.97	4.04	2.18
4g	4-Me <sub>2</sub> N-Ph	<i>i</i> -Bu	1.09	0.82	1.90	3.19	0.87	0.80	1.87	2.11
4h	4-Me <sub>2</sub> N-Ph	4-tolyl	0.66	0.68	0.40	1.61	0.37	0.49	0.53	0.60
4i	3,5-Me-Ph	4-tolyl	1.30	0.81	1.27	2.18	0.95	0.80	1.67	2.11
4j	4-Me <sub>2</sub> N-Ph	Bn	0.48	0.32	0.47	1.62	0.27	0.35	0.44	1.13
4k	3,5-Me-Ph	Bn	0.63	0.35	0.33	1.85	0.37	0.41	0.70	1.41
vorinostat			0.96	0.97	2.42 <sup>b</sup>	3.12 <sup>b</sup>	0.86	0.73	2.64 <sup>b</sup>	2.08 <sup>b</sup>
cisplatin					2.25	17.2			3.01	50.4

<sup>a</sup>Values are the mean of three experiments. The standard deviations are <10% of the mean. <sup>b</sup>Data from ref 26.

by mixed anhydride coupling with a freshly prepared solution of hydroxylamine provided the desired peptoid-based HDACi 4a–k.

The target compounds 5a–f were prepared using essentially the same synthetic protocol. However, paraformaldehyde was replaced by suitable aldehydes or ketones to enable the incorporation of additional substituents at the glycine motif (Scheme 3).

**NMR Spectroscopy.** Interestingly, the <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra of most of the synthesized compounds of types 1–4 showed the presence of two distinct sets of NMR signals. The occurrence of *cis/trans*-amide bond rotamers in peptoids is a well-known phenomenon, and the effect of various *N*-alkyl side chain functionalities on this *cis-trans* equilibrium has been studied extensively.<sup>20–22</sup> Accordingly, we assumed that the two sets of NMR signals in our compounds are caused by the presence of rotamers. Variable temperature proton spectra (VT NMR, Figure 3) for 4d in DMSO-*d*<sub>6</sub> over the range of 25–80 °C supported our assumption that the complex peaks obtained at room temperature were due to restricted rotation at the tertiary amide bond. The two rotameric forms underwent coalescence at 70–80 °C, and these changes in the NMR spectra were reversible upon cooling.

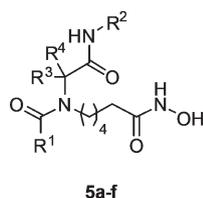
Surprisingly, all peptoid-based compounds with a 4-dimethylaminophenyl-based cap group (1c, 4c, 4f, 4g, 4h, and 4j) showed only one set of NMR signals at room temperature. However, we noticed that some signals appeared relatively broad at room temperature. Therefore, we performed VT NMR on compound 4c in MeOH-*d*<sub>4</sub> at reduced temperatures over the range of 25 to –20 °C. At low temperatures (e.g., –20 °C) we observed again two sets of NMR signals (Figure S1, Supporting Information) confirming the presence of rotamers. Furthermore, the VT NMR experiment on compound 4c disclosed a coalescence temperature between 10 and 25 °C (Figure S1, Supporting Information). The presence of rotamers suggests that it is

important to investigate both rotameric forms when predicting the binding mode of this novel HDACi type.

**Inhibition of Cellular HDAC Activity and Anticancer Activity.** All compounds were first tested in a whole cell HDAC inhibition assay and an MTT assay for cytotoxicity. The compounds with non-hydroxamate ZBGs (1a–c, 2a–c, and 3) were screened for HDAC inhibition and cytotoxicity using the human ovarian cancer cell lines A2780 and its cisplatin resistant subclone A2780CisR. All non-hydroxamates were inactive or revealed only very low activity (Table S1, Supporting Information).

The ethyl carbamates 1a–c were designed based on a report from Balunas and co-workers in which they identified the natural product santacruzamate A (see Figure 1) as a picomolar HDAC2 and nanomolar HDAC6 inhibitor with cytotoxic properties.<sup>18</sup> Compounds 1a–c were therefore designed as santacruzamate A analogues. In order to exclude that the inactivity of the santacruzamate A analogues 1a–c arises from the modified cap group, we synthesized an authentic sample of santacruzamate A according to the published protocol.<sup>18</sup> However, also santacruzamate A was inactive in our cellular assays. It is worth noting that our results are in good agreement with a recent report of Liu et al. who studied santacruzamate A and a series of analogues as potential anticancer agents.<sup>23</sup> In their hands, santacruzamate A showed no cytotoxicity and was inactive against HDACs from cell lysates and HDAC2 in enzymatic assays.<sup>23</sup> Furthermore, Balunas and co-workers recently reported in a follow-up study that they were unable to repeat the results from their original report.<sup>24</sup> Accordingly, on the basis of our and literature data, santacruzamate A is not acting as an HDACi.

Due to the low activity of the non-hydroxamates 1a–c, 2a–c, and 3, we decided to focus our study on peptoid-based HDACi with a hydroxamic acid as ZBG. All hydroxamate-based HDACi 4a–k and 5a–f were assessed for HDAC inhibitory activity and cytotoxicity in the human ovarian cancer cell lines A2780 and A2780CisR and the human tongue squamous cell carcinoma

Table 2. HDAC Inhibition and Cytotoxicity of the Compounds 5a–f<sup>a</sup>

5a-c: R<sup>3</sup>+R<sup>4</sup> = CH<sub>3</sub>  
 5d: R<sup>3</sup>+R<sup>4</sup> = -(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-  
 5e: R<sup>3</sup> = Ph, R<sup>4</sup> = H  
 5f: R<sup>3</sup> = 4-Tolyl, R<sup>4</sup> = H

compd	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	HDAC IC <sub>50</sub> [μM]		MTT IC <sub>50</sub> [μM]		HDACi IC <sub>50</sub> [μM]		MTT IC <sub>50</sub> [μM]	
			A2780	A2780CisR	A2780	A2780CisR	Cal27	Cal27CisR	Cal27	Cal27CisR
5a	Ph	c-Hex	37.9	44.9	295	281	26.2	43.0	66.9	4.07
5b	4-Me <sub>2</sub> N-Ph	c-Hex	24.5	30.8	68.5	107	18.2	28.8	47.7	46.1
5c	Ph	<i>t</i> -Bu	127	102	207	579	92.5	132	75.8	13.8
5d	Ph	c-Hex	13.4	10.1	42.6	50.5	14.3	10.2	44.1	77.5
5e	Ph	c-Hex	3.14	2.92	3.87	5.18	2.06	2.65	6.36	5.28
5f	Ph	c-Hex	2.81	3.63	2.09	4.29	2.94	3.22	4.52	19.0
vorinostat			0.96	0.97	2.42 <sup>b</sup>	3.12 <sup>b</sup>	0.86	0.73	2.64 <sup>b</sup>	2.08 <sup>b</sup>
cisplatin					2.25	17.2			2.50	16.1

<sup>a</sup>Values are the mean of three experiments. The standard deviations are <10% of the mean. <sup>b</sup>Data from ref 26.

Table 3. Inhibition Activities (IC<sub>50</sub> [nM]) of Compounds 4d, 4h, 4j, and 4k against HDAC Isoforms 1, 2, 3, 6, and 8

compd	IC <sub>50</sub> [nM]				
	HDAC1	HDAC2	HDAC3	HDAC6	HDAC8
4d	27.4 ± 4.6	84 ± 3.5	60 ± 3.0	214 ± 23.4	7400 ± 2970
4h	96.4 ± 19.7	146 ± 6.2	16 ± 0.8	106 ± 14.2	6760 ± 1050
4j	25.0 ± 9.2	66 ± 2.4	6.5 ± 0.6	281 ± 36.8	2750 ± 220
4k	24.7 ± 7.1	61 ± 3.1	26 ± 1.9	135 ± 12.7	7330 ± 770
vorinostat	45 ± 8	200 ± 5	13 ± 1	108 ± 11	1260 ± 210

cell lines Cal27 and Cal27CisR. The results are summarized in Tables 1 and 2.

Convincingly, all peptoid-based HDACi 4a–k revealed single-digit micromolar or submicromolar HDAC inhibition in our whole cell HDAC assays (Table 1). The screening provided useful structure–activity relationships. In particular, compounds derived from 3,5-dimethylbenzoic acid and 4-(dimethylamino)benzoic acid as carboxylic acid component in the U-4CR showed remarkable activity in the cellular HDAC assay. The strongest HDAC inhibitory activity was observed in the cases of compounds 4d, 4h, 4j, and 4k with submicromolar IC<sub>50</sub> values against all four cell lines. In regard to the isocyanide component, a noteworthy gain of activity was observed when benzyl isocyanide was employed in the U-4CR. As a consequence, compounds 4j and 4k (R<sup>2</sup> = Bn) were the most potent HDACi from this series, showing IC<sub>50</sub> values from 0.27 to 0.63 μM. Interestingly, both compounds revealed almost equipotent cellular HDAC inhibition in the respective cancer cell pairs. In good agreement with the results from the cellular HDAC assay, compounds 4d, 4h, 4j, and 4k showed strong activity in the MTT assay against the two cancer cell pairs with IC<sub>50</sub> values in the range of 0.16–3.81 μM. Cytotoxic activity was reduced in cisplatin-resistant cell lines A2780CisR (e.g., 4k, 5.6-fold) and to a lesser extent in Cal27CisR (e.g., 4k, 2-fold). These differences somewhat resemble effects seen for cisplatin and may be attributed to transporter-mediated differences between A2780 and A2780CisR.<sup>25</sup> Most notably, compounds 4h, 4j, and 4k clearly exceeded the anticancer activities of the reference compounds vorinostat and cisplatin.

Compounds 5a–f were synthesized to study whether the incorporation of additional hydrophobic groups at the α-position of the glycine motif results in an increased activity.

However, as summarized in Table 2, all α-substituted compounds revealed reduced activity in the whole cell HDAC assay and decreased cytotoxicity compared with their unsubstituted counterparts of type 4. These results suggest that it is detrimental to modify the glycine motif, and future efforts to optimize the anticancer activity of this type of peptoid-based HDACi via Ugi four-component reactions should focus on the systematic variation of the carboxylic acid, isocyanide, and amine components.

**Inhibition of HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC6, and HDAC8.** Due to their remarkable cytotoxicity and activity in the cellular HDAC assays, compounds 4d, 4h, 4j, and 4k were screened for their inhibitory activity against recombinant HDAC1, HDAC6, and HDAC8 using ZMAL (Z-Lys(ε-Ac)-AMC) as substrate (Table 3). All four compounds showed strong inhibition of HDAC1 with IC<sub>50</sub> values in the range of 24.7–96.4 nM. The HDACi 4d, 4h, 4j, and 4k also showed significant inhibition of HDAC6 with IC<sub>50</sub> values in the range of 106–281 nM. Compared to the potency on HDAC1, the compounds were significantly less active against HDAC8 (Table 3). In order to investigate their activity against the other class I isoforms, 4d, 4h, 4j, and 4k were screened for their inhibition of HDAC2 and HDAC3 using MAL (Boc-Lys(ε-Ac)-AMC)<sup>27</sup> as substrate. As illustrated in Table 3, all four compounds showed potent inhibition of HDAC2 and HDAC3 with IC<sub>50</sub> values of 61–146 nM (HDAC2) and 6.5–60 nM (HDAC3). Notably, 4j showed remarkable activity against HDAC3 (IC<sub>50</sub> = 6.5 nM). Taken together, compounds 4d, 4h,

4j, and 4k revealed potent activity against recombinant HDAC1–3 (class I) and HDAC6 (class IIb).

**Docking Studies.** Compounds 4j and 4k were docked using AutoDock/DrugScore<sup>28</sup> as docking engine/scoring function into a crystal structure of HDAC1 and a homology model of HDAC6, which had been refined by means of molecular dynamics simulations, to understand their selectivity profile.<sup>10</sup> A crystal structure of HDAC6<sup>29</sup> only became available by the end of this study. The HDAC6 homology model used here and the crystal structure are very similar to an overall rmsd of 2.93 Å and a binding pocket rmsd of 1.63 Å (residues within 8 Å of the zinc atom). It has been shown that despite backbone movements of up to 2 Å within the binding pocket, a correct binding pose can be identified by docking.<sup>30</sup> Finally, the orientation of the residues within the binding pocket of the crystal structure and our homology model are very similar (Figure S2, Supporting Information). Hence, we expect that both HDAC6 structures are similarly suitable for elucidating the binding modes of 4j and 4k. As NMR data show the presence of both *cis*- and *trans*-rotamers of the compounds, both rotamers of 4j and 4k were docked. The results of the docking show a remarkable isoform selectivity of the rotamers: While no valid docking pose can be identified for the *trans*-rotamer of 4j in HDAC1 (i.e., the largest cluster contained <20% of the docking poses), the largest cluster found for this rotamer docked to HDAC6 contains 43% of all docking poses (Table 4). In turn, the opposite was found for the *cis*-rotamer of

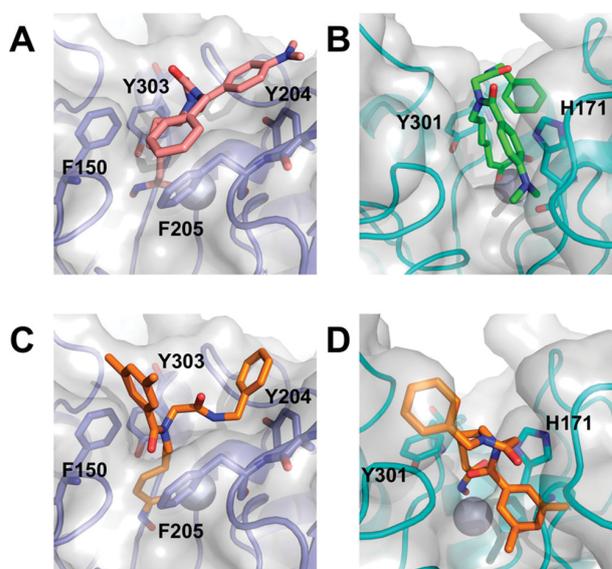
**Table 4. Docking Results of HDACi 4j and 4k into HDAC Isoforms 1 and 6**

compd	HDAC1 <sup>a</sup>	HDAC6 <sup>a</sup>
4j <i>cis</i>	69	n/a <sup>b</sup>
4j <i>trans</i>	n/a <sup>b</sup>	43
4k <i>cis</i>	88	25
4k <i>trans</i>	n/a <sup>b</sup>	22

<sup>a</sup>Percent of all configurations in the largest cluster. <sup>b</sup>No docking configuration fulfilling the criteria given in the section above could be identified.

4j: Here, no valid docking pose can be identified in HDAC6, while 69% of all poses are found in the largest cluster when docked to HDAC1 (Table 4). This suggests that the *cis*-rotamer of 4j binds to HDAC1 while the *trans*-rotamer binds to HDAC6. In the predicted docking pose, the *cis*-rotamer of 4j complexes the zinc ion in the binding pocket of HDAC1 with its hydroxamic acid moiety, which also forms a hydrogen bond to Y303. The *cis*-rotamer of 4j also forms  $\pi$ -stacking interactions with Y204 and F205 of HDAC1 (Figure 4A). The *trans*-rotamer of 4j also complexes the zinc ion and binds with the aniline moiety into a hydrophobic pocket of an incision in the rim of HDAC6, while forming  $\pi$ -stacking interactions only with H171 (Figure 4B). In addition, in contrast to the *cis*-rotamer binding to HDAC1, its hydroxamic acid moiety cannot form a hydrogen bond to Y301. Together, these findings could explain the 11-fold decreased inhibitory activity toward HDAC6 (Table 3).

When docking the rotamers of 4k into HDAC6, no such selectivity can be observed: For the *cis*- and *trans*-rotamer of 4k, 25% and 22% of all docked poses are found in the largest cluster, respectively (Table 4). However, similar to 4j, only the *cis*-rotamer of 4k binds to HDAC1 with 88% of all poses found in the largest cluster (Table 4). Here, the *cis*-rotamer of 4k

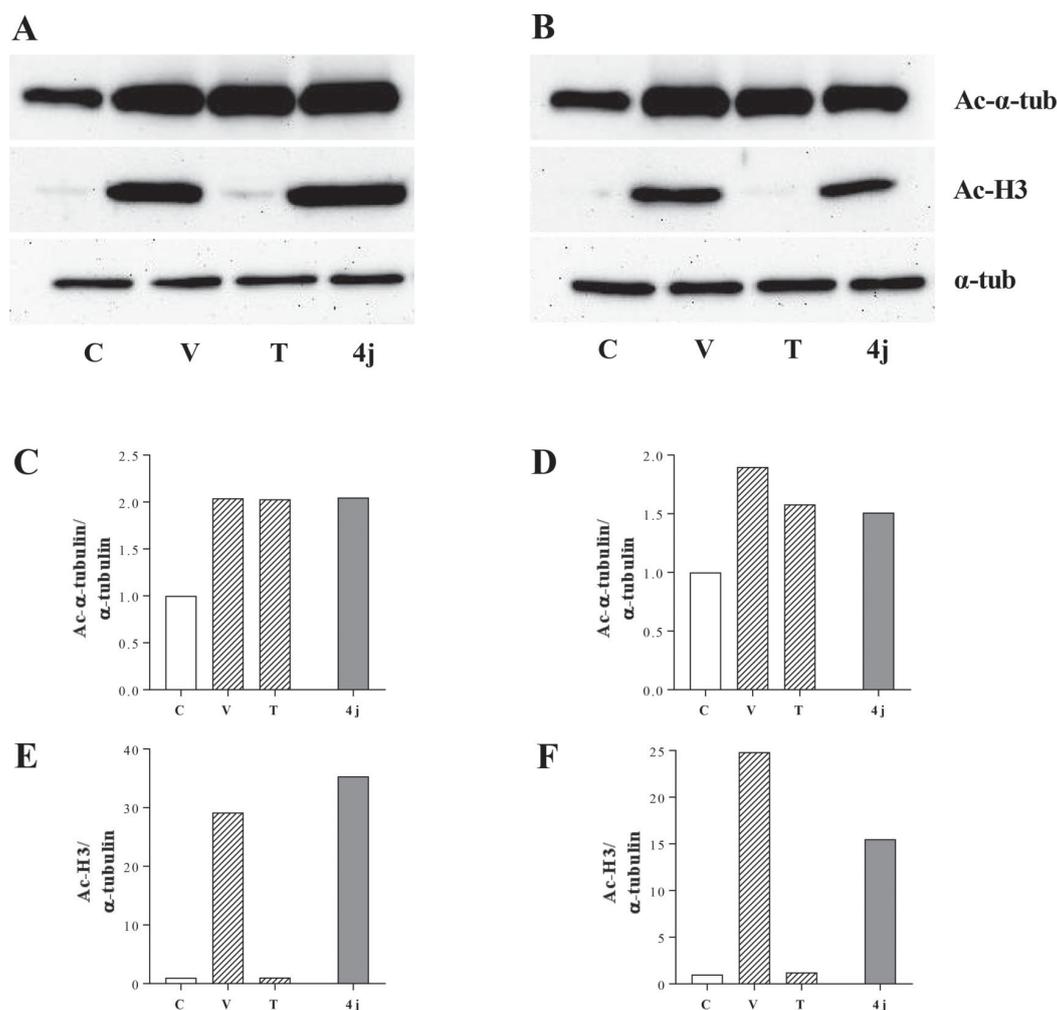


**Figure 4.** Binding mode models of the *cis*-rotamer of 4j (salmon; A), *trans*-rotamer of 4j (green; B), *cis*-rotamer of 4k (orange; C, D) in a crystal structure of HDAC1 (PDB code 4BKX, purple; A, C) and a homology model of HDAC6 (cyan; B, D). Zinc is shown as a sphere; the surface is shown in gray.

complexes the zinc ion in the catalytic center while forming  $\pi$ -stacking interactions with F150 and Y204 (Figure 4C). Again, the hydrogen bond to Y303 is present, stabilizing the hydroxamic acid moiety of the *cis*-rotamer of 4k inside the catalytic center of HDAC1 (Figure 4C). Both rotamers of 4k fill the hydrophobic pockets of the incision in the rim of HDAC6 with their aromatic rings while complexing the zinc ion in the catalytic center of HDAC6 (Figure 4D). However, unlike in HDAC1 and similar to findings for 4j, the hydrogen bond to Y301 is not present, which could explain the 6-fold lower affinity of 4k toward HDAC6 compared to HDAC1 (Table 3).

**Acetylation of  $\alpha$ -Tubulin and Histone H3.** Compound-4j-induced acetylation of  $\alpha$ -tubulin and histone H3 was analyzed in Cal27 and Cal27CisR after incubation with 10  $\mu$ M 4j for 24 h. Results of a representative Western blot are shown in Figure 5. Vorinostat (pan-inhibitor) and tubastatin A (HDAC6 selective HDACi) were used as controls. In both cell lines, 4j induced an increase in acetylation of  $\alpha$ -tubulin and histone H3, indicating the inhibition of HDAC6 and class I HDACs. Both effects were more pronounced in Cal27 than in Cal27CisR and were similar to the pan-HDACi vorinostat. Tubastatin A increased only the acetylation of  $\alpha$ -tubulin without affecting histone H3, thus serving as control for an HDAC6 selective effect in the cellular environment.

**Computed Pharmacokinetic Properties and hERG K<sup>+</sup> Channel Inhibition.** To further characterize compound 4j, pharmacokinetic properties and hERG K<sup>+</sup> channel inhibition of 4j (both rotamers), and for comparison, our previously published HDAC6 preferential HDACi 2i (both rotamers),<sup>10</sup> and the structurally related HDACi BZDSa<sup>31</sup> were computed with QikProp (QP).<sup>32</sup> All compounds show a favorable computed QP log *P* < 3.2 and a moderate computed aqueous solubility (QP log *S*) (Table 5). Furthermore, all compounds show a moderate computed apparent Caco-2 and MDCK permeability (Table 5). Interestingly, the *trans*-rotamer of 4j



**Figure 5.**  $\alpha$ -Tubulin and histone H3 acetylation in Cal27 and Cal27CisR. (A, B) Representative immunoblot of acetylated  $\alpha$ -tubulin (Ac- $\alpha$ -tub), acetylated histone H3 (Ac-H3), and  $\alpha$ -tubulin ( $\alpha$ -tub) in Cal27 and Cal27CisR. Cal27 (A) and Cal27CisR (B) cells were incubated for 24 h with vehicle (DMSO 0.1%, C), vorinostat 10  $\mu$ M (V), tubastatin A 10  $\mu$ M (T), or 4j 10  $\mu$ M, respectively. (C–F) Densitometric analysis of tubulin acetylation in Cal27 (C) and Cal27CisR (D) and histone H3 acetylation in Cal27 (E) and Cal27CisR (F) was performed by ImageJ software (NIH). All values have been normalized to  $\alpha$ -tubulin.

shows a Caco-2 permeability that is larger by  $\sim 2.4$ -fold than that of the *cis*-rotamer. While all rotamers of compounds **2i** and **4j** showed a moderate computed inhibition of hERG  $K^+$  channels, **BZDSa** is predicted to inhibit hERG  $K^+$  channels with an affinity ( $\log IC_{50} < -5$ ) that is concerning (Table 5).

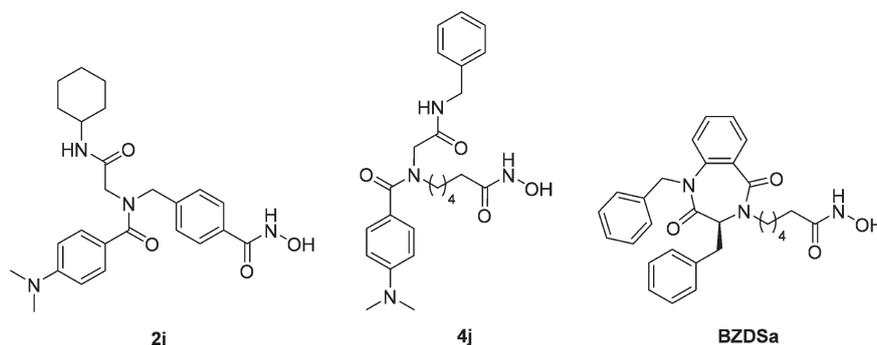
**Enhancement of Cisplatin-Induced Cytotoxicity.** The most potent (cellular HDAC assay) compound **4j** was selected for its ability to enhance the cytotoxicity of cisplatin in the human head and neck squamous cancer cell line Cal27 and its cisplatin-resistant subline Cal27CisR. **4j** was preincubated at 250 and 500 nM, respectively, 48 h prior to determining the  $IC_{50}$  of cisplatin. The HDAC6 selective inhibitor tubastatin A (10  $\mu$ M) and the pan-inhibitor vorinostat (1  $\mu$ M) were included as controls. Resulting  $IC_{50}$  values and shift factors of these combination experiments are shown in Table 6.

**4j** enhanced cisplatin-induced cytotoxicity concentration-dependent in both cell lines. Notably, 500 nM **4j** induced a significant hypersensitization (shift factor 3.9,  $p < 0.05$ ) against cisplatin in the sensitive cell line Cal27. In the cisplatin-resistant cell line Cal27CisR, **4j** induced a significant shift up to 6.8 at both concentrations (Table 6), almost completely reversing

cisplatin resistance. The effect of **4j** was thus similar to the effect of the pan-inhibitor vorinostat (Table 6). In contrast, tubastatin A induced no (Cal27) or only moderate, not significant (Cal27CisR) enhancement of cisplatin sensitivity.

To analyze if the observed effects were mediated by an enhancement of the cisplatin-induced apoptosis, Cal27 and Cal27CisR were preincubated for 48 h with 250 nM or 500 nM of **4j**, respectively. Then, cisplatin was added in a concentration corresponding to the approximate  $IC_{50}$  for each cell line and apoptotic nuclei were counted by flow cytometry. Results are shown in Figure 6.

**4j** in neither concentration induced a significant change in the amount of apoptotic nuclei compared to untreated control in both cell lines. This indicates that the concentrations of **4j** used in the apoptosis assay as well as for the combination experiments had no cytotoxic effects by themselves. However, in combination with cisplatin, **4j** induced an increase in apoptosis in comparison to cisplatin alone. The combined treatment in Cal27 showed a significant increase in the amount of apoptotic nuclei for 250 nM and 500 nM **4j**, whereas in the

Table 5. Computed Pharmacokinetic Data and hERG K<sup>+</sup> Inhibition of Compounds 2i,<sup>10</sup> 4j, and BZDSa<sup>31</sup>

	compd				
	2i <i>cis</i> <sup>a</sup>	2i <i>trans</i> <sup>a</sup>	4j <i>cis</i>	4j <i>trans</i>	BZDSa <sup>b</sup>
QP log <i>P</i> o/w	1.969	1.816	1.537	1.129	3.198
QP log <i>S</i> aqueous solubility	-4.502	-4.283	-3.914	-3.659	-4.278
apparent Caco-2 permeability <sup>c</sup>	98	101	82	200	144
apparent MDCK permeability <sup>c</sup>	66	58	73	106	109
hERG K <sup>+</sup> channel inhibition log IC <sub>50</sub> <sup>d</sup>	-4.667	-4.283	-4.294	-3.553	-5.652

<sup>a</sup>HDAC6 selective compound from ref 10. <sup>b</sup>Compound from ref 31. <sup>c</sup>In nm/s. <sup>d</sup>Of concern if <-5.<sup>32</sup>

Table 6. IC<sub>50</sub> (μM) of Cisplatin in Cal27 and Cal27CisR after Treatment with Cisplatin or in Combination with 250 nM 4j, 500 nM 4j, 10 μM Tubastatin A, or 1 μM Vorinostat, Respectively<sup>a</sup>

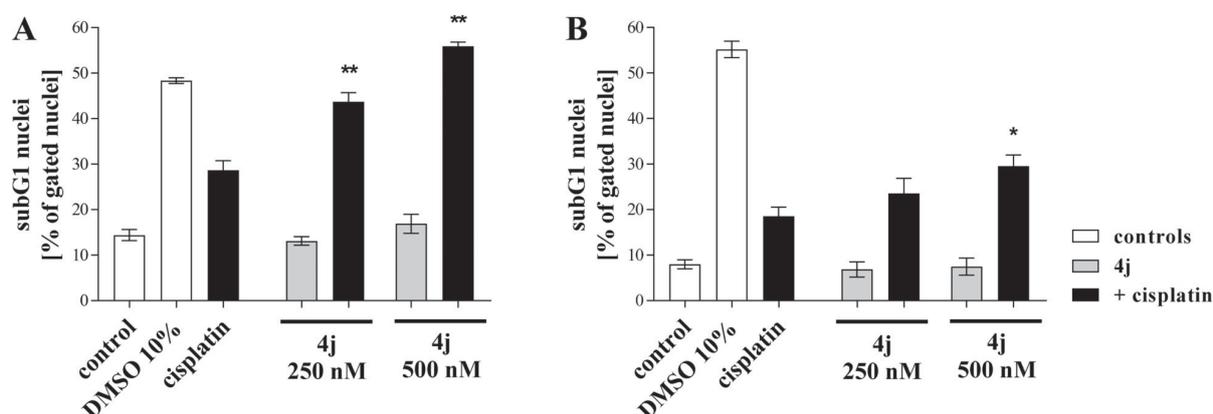
compd	cell line			
	Cal27		Cal27CisR	
	IC <sub>50</sub>	SF	IC <sub>50</sub>	SF
cisplatin	3.01		50.4	
cisplatin + 4j 250 nM	1.95	1.5	16.1	3.1
cisplatin + 4j 500 nM	0.78	3.9	7.37	6.8
cisplatin + tubastatin A 10 μM	2.74	1.1	33.6	1.5
cisplatin + vorinostat 1 μM			7.41	6.8

<sup>a</sup>Shift factors (SF) were calculated by dividing the IC<sub>50</sub> of cisplatin alone by the IC<sub>50</sub> of the corresponding drug combination.

cisplatin resistant cell line Cal27CisR 500 nM 4j induced a significant increase in apoptosis induction.

## CONCLUSIONS

This paper describes a fast and straightforward multicomponent synthesis of novel peptoid-based HDACi with different ZBGs. Compounds 4d, 4h, 4j, and 4k containing a peptoid-based cap group and a hydroxamic acid as ZBG turned out to be the most potent inhibitors in a cellular HDAC and MTT assay. When screened for their inhibitory activity against selected recombinant HDAC isoforms, all four compounds showed strong inhibition of HDAC1–3 and also a significant inhibition of HDAC6 with IC<sub>50</sub> values in the submicromolar concentration range. Experimental NMR data of the synthesized peptoid-based HDACi revealed the presence of *cis*- and *trans*-rotamers. Docking studies with 4j and 4k in HDAC1 and HDAC6



**Figure 6.** 4j enhances cisplatin-induced apoptosis in Cal27 and Cal27CisR. Cal27 (A) and Cal27CisR (B) cells were preincubated with 250 nM or 500 nM 4j for 48 h. Cisplatin was added at concentrations of 3 μM (Cal27, A) or 25 μM (Cal27CisR, B). DMSO 10% was added for 24 h to serve as a positive control for apoptosis induction. Cells cultured with DMSO 0.005% corresponding to the DMSO concentration of 500 nM 4j were used as vehicle control. All experimental conditions were incubated for same periods of time. Data are the mean ± SD, *n* = 3. Statistical analysis to compare the apoptosis induction by cisplatin alone and the combination of cisplatin with 4j was performed using one-way ANOVA test ((\*) *p* < 0.05 and (\*\*\*) *p* < 0.01).

exposed a preferential binding of the *cis*-rotamers of **4k** and **4j** for HDAC1 over HDAC6 while showing a higher preference of the *trans*-rotamer of **4j** for HDAC6. Furthermore, the hit compound **4j** increased acetylation of  $\alpha$ -tubulin and histone H3. Notably, **4j** enhanced the cisplatin sensitivity of the cisplatin-resistant head–neck cancer cell line Cal27CisR by a factor of 6.8. This effect is due to a synergistic induction of apoptosis as seen in the combination of **4j** with cisplatin. In conclusion, the structure–activity relationships of the peptoid-based HDACi revealed in this paper will guide further development toward HDACi with improved anticancer and chemosensitizing properties.

## EXPERIMENTAL SECTION

**Chemistry. General.** Ethyl (6-aminoethyl)carbamate trifluoroacetate,<sup>18,33</sup> methyl 6-aminohexanoate hydrochloride,<sup>34</sup> and *tert*-butyl (4-aminobutyl)carbamate<sup>35</sup> were prepared according to published procedures. All other chemicals and solvents were obtained from commercial suppliers (Sigma-Aldrich, Acros Organics, Carbolution Chemicals) and used as purchased without further purification. The progress of all reactions was monitored by thin layer chromatography (TLC) using Merck precoated silica gel plates (with fluorescence indicator UV<sub>254</sub>). Components were visualized by irradiation with ultraviolet light (254 nm) or staining in potassium permanganate solution. Flash column chromatography was performed using prepacked silica cartridge with the solvent mixtures specified in the corresponding experiment. Melting points (mp) were taken in open capillaries on a Mettler FP 5 melting-point apparatus and are uncorrected. Proton (<sup>1</sup>H) and carbon (<sup>13</sup>C) NMR spectra were recorded on a Bruker Avance 300, 500, or 600 using DMSO-*d*<sub>6</sub>, MeOH-*d*<sub>4</sub>, or CDCl<sub>3</sub> as solvent. Chemical shifts are given in parts per million (ppm), relative to residual solvent peak for <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C. <sup>1</sup>H NMR signals marked with an asterisk (\*) correspond to peaks assigned to the minor rotamer conformation. Elemental analysis was performed on a PerkinElmer PE 2400 CHN elemental analyzer. High resolution mass spectra (HRMS) analysis was performed on a UHR-TOF maXis 4G, Bruker Daltonics, Bremen, by electrospray ionization (ESI). Analytical HPLC analyses were carried out on a Varian Prostar system equipped with a Prostar 410 (autosampler), 210 (pumps), and 330 (UV detector) using a Phenomenex Luna Su C18(2) 1.8  $\mu$ m particle (250 mm  $\times$  4.6 mm) column, supported by Phenomenex Security Guard cartridge kit C18 (4.0 mm  $\times$  3.0 mm). UV absorption was detected at 254 nm with a linear gradient of 10% A to 100% A in 20 min using HPLC-grade water + 0.1% TFA (solvent B) and HPLC-grade acetonitrile + 0.1% TFA (solvent A) for elution at a flow rate of 1 mL/min. The purity of all final compounds was 95% or higher.

**Experimental Data.** General procedures for the synthesis of target compounds **1a–c**, **2a–c**, **3**, **4a–k**, and **5a–f** as well as compound characterization data for compounds **1a**, **2a**, **3**, **4a**, and **5a** are given below. The synthesis of all other compounds is reported in the Supporting Information.

**General Procedure for the Synthesis of 1a–c.** A mixture of ethyl (6-aminoethyl)carbamate trifluoroacetate (226 mg, 1.2 mmol, 1.2 equiv), paraformaldehyde (36 mg, 1.2 mmol, 1.2 equiv), triethylamine (166  $\mu$ L, 1.2 mmol, 1.2 equiv), and 200 mg of crushed molecular sieves (MS) 4 Å was stirred in dry methanol (2 mL, 0.5 M) at room temperature for 30 min. Subsequently, the appropriate carboxylic acid (1.0 mmol, 1.0 equiv) and, after further 10 min, the isocyanide (1.0 mmol, 1.0 equiv) were added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 16 h. After completion of the reaction, the reaction mixture was filtered and the solvent was removed under reduced pressure. The crude products were purified by flash column chromatography (prepacked silica cartridge, hexane–ethyl acetate, gradient 100:00  $\rightarrow$  50:50 in 30 min) and crystallized from ethyl acetate/hexane to yield the desired carbamates **1a–c**.

**Ethyl (6-(N-(2-(Cyclohexylamino)-2-oxoethyl)benzamido)-hexyl)carbamate (1a).** White solid; 56% yield; mp 70 °C; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  = 7.79–7.76 (m, 1H), 7.44–7.34 (m,

5H), 7.04–6.98 (m, 1H), 3.99\*/3.73 (s, 2H), 3.98–3.94 (m, 2H), 3.57–3.51 (m, 1H), 3.35–3.13 (m, 2H), 2.97–2.85 (m, 2H), 1.75–1.04 (m, 21H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  = 171.38, 171.31, 167.50, 167.33, 156.71, 156.69, 137.32, 137.12, 129.63, 129.60, 128.80, 128.67, 126.95, 126.84, 59.83, 51.90, 50.05, 48.06, 47.76, 46.37, 32.92, 32.71, 29.87, 29.70, 28.08, 26.98, 26.62, 26.55, 26.13, 26.07, 25.68, 25.62, 25.00, 24.92, 15.17. Anal. Calcd for C<sub>24</sub>H<sub>38</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: C 67.79; H 8.64; N 9.74. Found: C 67.07; H 8.66; N 9.61.

**General Procedure for the Synthesis of 2a–c.** Lithium hydroxide monohydrate (126 mg, 2.98 mmol, 2 equiv) was added to the respective methyl ester **6a–c** (577 mg, 1.49 mmol, 1 equiv) dissolved in methanol (2 mL) and stirred at room temperature for 16 h. After completion of the reaction, the reaction mixture was acidified with 1 M HCl to pH  $\approx$  1 and extracted with ethyl acetate (3  $\times$  20 mL). The combined organic extracts were dried over sodium sulfate, and the solvent was removed under reduced pressure. The products were crystallized from ethyl acetate/hexane to yield the desired carboxylic acids **2a–c**.

**N-(2-(Cyclohexylamino)-2-oxoethyl)-N-(6-(hydroxyamino)-6-oxohexyl)benzamide (2a).** White solid; quantitative yield; mp 93 °C; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  = 11.99 (bs, 1H), 7.80–7.77 (m, 1H), 7.44–7.34 (m, 5H), 4.00\*/3.74 (s, 2H), 3.57–3.51 (m, 1H), 3.34–3.13 (m, 2H), 2.22/2.10\* (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.76–1.04 (m, 16H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  = 174.32, 174.18, 170.85, 166.94, 166.79, 136.79, 136.61, 129.04, 128.23, 128.12, 126.40, 126.31, 51.36, 49.44, 47.54, 47.24, 45.66, 33.52, 33.37, 32.35, 32.16, 27.39, 27.32, 26.18, 25.89, 25.41, 25.10, 24.38, 24.24, 23.87. Anal. Calcd for C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: C 67.35; H 8.08; N 7.48. Found: C 67.08; H 7.93; N 7.35.

**Synthetic Procedure for the Preparation of 3.** Compound **7** (181 mg, 0.42 mmol, 1 equiv) was dissolved in a mixture of trifluoroacetic acid/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15:85, 3 mL) and stirred for 2 h at room temperature. After completion of the reaction, the mixture was treated with saturated aqueous Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution, extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3  $\times$  10 mL), and washed with brine (3  $\times$  10 mL). The resulting oil was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/DMF (1:1, 10 mL). Pyridine (37  $\mu$ L, 0.46 mmol, 2 equiv), 2-(acetylthio)acetic acid (29  $\mu$ L, 0.276 mmol, 1.2 equiv), DIC (48  $\mu$ L, 0.276 mmol, 1.2 equiv), and HOAt (38 mg, 0.276 mmol, 1.2 equiv) were added, and the reaction mixture was stirred at room temperature for 16 h. The reaction mixture was diluted with ethyl acetate (10 mL) and washed with brine (3  $\times$  20 mL). The solvent was removed under reduced pressure and the crude product was purified by flash column chromatography (prepacked silica cartridge, hexane–ethyl acetate, gradient 100:00  $\rightarrow$  50:50 in 30 min). The product was crystallized from ethyl acetate–hexane to yield the desired product **3**.

**S-(2-((4-(N-(2-(Cyclohexylamino)-2-oxoethyl)benzamido)-butyl)amino)-2-oxoethyl)ethane-thioate (3).** White solid; 57% yield; mp 128 °C; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 7.37–7.31 (m, 5H), 6.97/6.50\* (bs, 1H), 6.40/5.88\* (bs, 1H), 4.06/3.78\* (bs, 2H), 3.74–3.69 (m, 1H), 3.46 (s, 2H), 3.28–3.24 (m, 2H), 3.17–3.05 (m, 2H), 2.33 (s, 3H), 1.83–1.16 (m, 14H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 195.91, 173.21, 168.77, 168.30, 135.43, 130.20, 128.82, 126.73, 51.03, 50.95, 48.39, 46.09, 39.16, 33.21, 32.90, 30.43, 26.09, 25.68, 25.58, 24.70. Anal. Calcd for C<sub>23</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S: C 61.72; H 7.43; N 9.39. Found: C 61.45; H 7.34; N 9.52.

**General Procedure for the Synthesis of 4a–k.** *N*-Methylmorpholine (218  $\mu$ L, 1.98 mmol, 2 equiv) and isobutyl chloroformate (257  $\mu$ L, 1.98 mmol, 2 equiv) were added to a solution of the respective carboxylic acid **6a–k** (388 mg, 0.99 mmol, 1 equiv) in methanol (5 mL) and stirred for 15 min at 0 °C. Separately a fresh solution of NH<sub>2</sub>OH was prepared. This was done by adding NH<sub>2</sub>OH-HCl (310 mg, 4.46 mmol, 4.5 equiv) to a solution of KOH (250 mg, 4.46 mmol, 4.5 equiv) in MeOH (5 mL) at 0 °C. The NH<sub>2</sub>OH solution was stirred for 15 min and filtered to the mixed anhydride of **6a–k** and stirred for 16 h. The solvent was removed under reduced pressure. The crude products were purified by flash column chromatography (prepacked silica cartridge, dichloromethane–dichloromethane/methanol (70:30), gradient 100:00  $\rightarrow$  70:30 in 25 min) and crystallized from dichloromethane–diethyl ether to yield the desired hydroxamic acids **4a–k**.

**N-(2-(Cyclohexylamino)-2-oxoethyl)-N-(6-(hydroxyamino)-6-oxohexyl)benzamide (4a).** White solid; 52% yield; mp 104 °C;  $t_R$  = 11.03 min, purity = 96.1%;  $^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  = 10.34/10.29\* (s, 1H), 8.68–8.61 (m, 1H), 7.79–7.77 (m, 1H), 7.44–7.34 (m, 5H), 3.99\*/3.73 (s, 2H), 3.56–3.51 (m, 1H), 3.32–3.13 (m, 2H), 1.96/1.85\* (t,  $J$  = 7.1 Hz, 2H), 1.76–1.00 (m, 16H).  $^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  170.84, 168.99, 168.81, 166.95, 166.79, 136.78, 136.59, 129.04, 128.24, 128.11, 126.40, 126.31, 64.81, 51.37, 49.50, 47.54, 47.21, 45.74, 32.35, 32.16, 27.36, 26.25, 26.00, 25.51, 25.10, 24.90, 24.39, 15.08. HRMS (ESI) [ $M + H$ ] $^+$ : 390.2384. Calcd for  $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{O}_4$ : 390.2387.

**General Procedure for the Synthesis of 5a–f.** Lithium hydroxide monohydrate (82 mg, 1.96 mmol, 2 equiv) was added to the respective methyl ester 8a–f (451 mg, 0.98 mmol, 1 equiv) dissolved in methanol (2 mL) and stirred at room temperature for 16 h. After completion of the reaction, the reaction mixture was acidified with 1 M HCl to pH  $\approx$  1 and extracted with ethyl acetate. The solvent was removed under reduced pressure to provide the corresponding carboxylic acid. *N*-Methylmorpholine (218  $\mu\text{L}$ , 1.98 mmol, 2 equiv) and isobutyl chloroformate (257  $\mu\text{L}$ , 1.98 mmol, 2 equiv) were added to a solution of the carboxylic acid dissolved in methanol (5 mL) and stirred for 15 min at 0 °C. Separately a fresh solution of  $\text{NH}_2\text{OH}$  was prepared. This was done by adding  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$  (310 mg, 4.46 mmol, 4.5 equiv) to a solution of KOH (250 mg, 4.46 mmol, 4.5 equiv) in methanol (5 mL) at 0 °C. The  $\text{NH}_2\text{OH}$  solution was stirred for 15 min and filtered to the mixed anhydride of 8a–f and stirred for 16 h. The solvent was removed under reduced pressure. The crude products were purified by flash column chromatography (prepacked silica cartridge, dichloromethane–dichloromethane/methanol (70:30), gradient 100:00  $\rightarrow$  70:30 in 25 min) and crystallized from dichloromethane–diethyl ether to yield the desired hydroxamic acids 5a–f.

**N-(2-(tert-Butylamino)-2-oxoethyl)-N-(6-(hydroxyamino)-6-oxohexyl)benzamide (5a).** White solid; 50% yield; mp 84 °C;  $t_R$  = 11.62 min, purity = 99.0%;  $^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  = 10.27 (s, 1H), 8.62 (s, 1H), 7.44–7.37 (m, 5H), 7.13 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H), 3.48–3.44 (m, 1H), 3.25–3.22 (m, 2H), 1.80 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 2H), 1.67–0.89 (m, 22H).  $^{13}\text{C NMR}$  (151 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  = 172.75, 170.79, 168.77, 138.34, 128.66, 128.19, 125.89, 60.96, 47.67, 46.12, 32.48, 31.97, 30.49, 25.75, 25.34, 24.91, 24.35, 24.15. HRMS (ESI) [ $M + H$ ] $^+$ : 546.1901. Calcd for  $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{O}_8$ : 546.1905.

**Biological Evaluation. Reagents.** Cisplatin was purchased from Sigma (Germany), propidium iodide (PI) was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Germany), and tubastatin A was purchased from Selleckchem (Germany). Vorinostat was synthesized according to known procedures.<sup>36</sup> Subsequent compound dilutions were prepared from stock solutions in DMSO (10 mM) by using the appropriate medium. All other reagents were supplied by PAN Biotech (Germany) unless otherwise stated.

**Cell Lines and Cell Culture.** The human ovarian carcinoma cell line A2780 was obtained from European Collection of Cell Cultures (ECACC, Salisbury, U.K.). The human tongue cell line Cal27 was obtained from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Germany). The corresponding cisplatin resistant CisR cell lines were generated by exposing the parental cell lines to weekly cycles of cisplatin in an  $\text{IC}_{50}$  concentration over a period of 24–30 weeks as described in Gosepath et al.<sup>37</sup> and Eckstein et al.<sup>38</sup> All cell lines were grown at 37 °C under humidified air supplemented with 5%  $\text{CO}_2$  in RPMI 1640 (A2780) or DMEM (Cal27) containing 10% fetal calf serum, 120 IU/mL penicillin, and 120  $\mu\text{g}/\text{mL}$  streptomycin. The cells were grown to 80% confluency before using them for the appropriate assays.

**MTT Cell Viability Assay.** The rate of cell survival under the action of test substances was evaluated by an improved MTT assay as previously described.<sup>26,39</sup> In brief, A2780 or Cal27 cell lines were seeded at a density of 5000 or 2500 cells/well in 96-well plates (Corning, Germany). After 24 h, cells were exposed to increasing concentrations of the test compounds. Combination experiments were performed as previously described,<sup>40</sup> 4j was incubated 48 h prior to cisplatin. Incubation was ended after 72 h, and cell survival was determined by addition of MTT solution (5 mg/mL in phosphate

buffered saline). The formazan precipitate was dissolved in DMSO (VWR, Germany). Absorbance was measured at 544 and 690 nm in a FLUOstar microplate reader (BMG LabTech, Offenburg, Germany).

**Whole Cell HDAC Inhibition Assay.** The cellular HDAC assay was based on an assay published by Ciossek et al.<sup>39</sup> and Bonfils et al.<sup>41</sup> with minor modifications as described in ref 26. Briefly, human cancer cell lines Cal27/Cal27CisR and A2780/A2780CisR were seeded in 96-well tissue culture plates (Corning, Germany) at a density of  $1.5 \times 10^4$  cells/well in a total volume of 90  $\mu\text{L}$  culture medium. After 24 h, cells were incubated for 18 h with increasing concentrations of test compounds. The reaction was started by adding 10  $\mu\text{L}$  of 3 mM Boc-Lys( $\epsilon$ -Ac)-AMC (Bachem, Germany) to reach a final concentration of 0.3 mM. The cells were incubated with the Boc-Lys( $\epsilon$ -Ac)-AMC for 3 h under cell culture conditions. After this incubation, 100  $\mu\text{L}/\text{well}$  stop solution (25 mM Tris-HCl (pH 8), 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1% NP40, 2.0 mg/mL trypsin, 10  $\mu\text{M}$  vorinostat) was added and the reaction was developed for 3 h under cell culture conditions. Fluorescence intensity was measured at excitation of 320 nm and emission of 520 nm in a NOVOstar microplate reader (BMG LabTech, Offenburg, Germany).

**In Vitro Testing on HDAC1, -6, and -8.**<sup>42,43</sup> OptiPlate-96 black microplates (PerkinElmer) were used with an assay volume of 60  $\mu\text{L}$ . Human recombinant HDAC1 (BPS Bioscience, catalog no. 50051) or human recombinant HDAC6 (BPS Bioscience, catalog no. 50006) were diluted in incubation buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$  and 1 mg/mL BSA). An amount of 52  $\mu\text{L}$  of this dilution was incubated with 3  $\mu\text{L}$  of different concentrations of inhibitors in DMSO and 5  $\mu\text{L}$  of the fluorogenic substrate ZMAL (Z-(Ac)Lys-AMC)<sup>44</sup> (126  $\mu\text{M}$ ) at 37 °C. After 90 min of incubation time 60  $\mu\text{L}$  of the stop solution (33  $\mu\text{M}$  trichostatin A (TSA) and 6 mg/mL trypsin in trypsin buffer (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, NaCl 100 mM) were added. After a following incubation at 37 °C for 30 min, the fluorescence was measured on a BMG LABTECH POLARstar OPTIMA plate reader (BMG LABTECH, Germany) with an excitation wavelength of 390 nm and an emission wavelength of 460 nm. For the inhibition of human HDAC8 1/2-AREAPLATE-96 F microplates (PerkinElmer) with an assay volume of 30  $\mu\text{L}$  were used. Human HDAC8 enzyme was obtained as described before.<sup>45</sup> An amount of 22.5  $\mu\text{L}$  of enzyme diluted in incubation buffer (50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 15 mM Tris, pH 7.5, 3 mM  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 10 mM KCl) was mixed with 2.5  $\mu\text{L}$  of inhibitor in DMSO and 5  $\mu\text{L}$  of Z-Lys( $\epsilon$ -trifluoroacetyl)-AMC (150  $\mu\text{M}$ ). The plate was incubated at 37 °C for 90 min. An amount of 30  $\mu\text{L}$  of the stop solution (see HDAC1 and HDAC6) was added, and the plate was incubated again at 37 °C for 30 min. Measurement was performed as described for HDAC1 and HDAC6.

**In Vitro Testing on HDAC2 and -3.**<sup>46</sup> Black 96-well flat bottom microplates (Corning Costar, Corning Incorporated, NY) were used. Human recombinant C-terminal FLAG-tag HDAC2 (BPS Bioscience, catalog no. 50052) or human recombinant C-terminal His-tag HDAC3/NcoR2 (BPS Bioscience, catalog no. 50003) was diluted in incubation buffer (25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.01% Triton-X, and 1 mg/mL BSA). 40  $\mu\text{L}$  of this dilution was incubated with 10  $\mu\text{L}$  of different concentrations of inhibitors in 10% DMSO/incubation buffer and 50  $\mu\text{L}$  of the fluorogenic Boc-Lys( $\epsilon$ -Ac)-AMC (20  $\mu\text{M}$ , Bachem, Germany) at 37 °C. After a 90 min incubation time 50  $\mu\text{L}$  of the stop solution (25 mM Tris-HCl (pH 8), 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.01% Triton-X, 6.0 mg/mL trypsin from porcine pancreas type IX-S, lyophilized powder, 13 000–20 000 BAEE units/mg protein (Sigma-Aldrich), and 200  $\mu\text{M}$  vorinostat) was added. After a following incubation at 37 °C for 30 min, the fluorescence was measured on a Synergy H1 hybrid multimode microplate reader (BioTek, USA) with a gain of 70 and an excitation wavelength of 390 nm and an emission wavelength of 460 nm. GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc.) was used for the determination of the  $\text{IC}_{50}$  of each inhibitor. Nonlinear regression was used for data fitting.

**Measurement of Apoptotic Cells.** Cal27 and Cal27CisR cells were seeded at a density of  $3 \times 10^4$  cells/well in 24-well plates (Sarstedt, Germany). Cells were treated with 4j and cDDP alone or in

combination for the indicated time points. Supernatant was removed after a centrifugation step, and the cells were lysed in 500  $\mu$ L of hypotonic lysis buffer (0.1% sodium citrate, 0.1% Triton X-100, 100  $\mu$ g/mL PI) at 4 °C in the dark overnight. The percentage of apoptotic nuclei with DNA content in sub-G1 was analyzed by flow cytometry using the CyFlow instrument (Partec, Germany).

**Immunoblotting.** Cells were treated with 1  $\mu$ M 4j or vehicle for 24 h. The pan-HDACi vorinostat and the HDAC6 selective inhibitor tubastatin A were used as controls. Cell pellets were dissolved with lysis buffer 6 (Bio-Techne, Germany) and clarified by centrifugation. Equal amounts of total protein (20  $\mu$ g) were resolved by SDS-PAGE and transferred to polyvinylidene fluoride membranes. Blots were incubated with primary antibodies against acetylated  $\alpha$ -tubulin,  $\alpha$ -tubulin, and acetyl histone H3 (Lys24) (Santa Cruz Biotechnology, Germany). Immunoreactive proteins were visualized using luminol reagent (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) with an Intas Imager (Intas, Germany). Densitometric analysis was performed on scanned images using the ImageJ software (National Institutes of Health).<sup>47</sup>

**Data Analysis.** Concentration–effect curves were constructed with Prism 4.0 (GraphPad, San Diego, CA) by fitting the pooled data of at least three experiments performed in triplicates to the four-parameter logistic equation. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA test.

**Docking Studies.** For the molecular docking, the *cis*- and *trans*-rotamers of 4j and 4k were drawn with ChemDraw Ultra,<sup>48</sup> converted into a 3D structure, and energy minimized with Moloc using the MAB force field.<sup>49</sup> The HDACi were then docked into HDAC1 (PDB code 4BKX)<sup>50</sup> and into a homology model of HDAC6, which was already successfully used to predict HDACi binding mode models,<sup>10</sup> utilizing AutoDock3<sup>51,52</sup> as a docking engine and the DrugScore<sup>53,54</sup> distance-dependent pair-potentials as an objective function as described in ref 55. Because of the flexibly connected saturated and unsaturated carbon cycles, a clustering rmsd cutoff of 2.0 Å was chosen; for all other docking parameters default values were used. Docking solutions with more than 20% of all configurations in the largest cluster were considered sufficiently converged, and the configuration with the lowest docking energy of that cluster, binding to the zinc ion in the binding pocket with a distance of <3 Å to the hydroxamic acid oxygen, was used for further evaluation.

**Computation of Pharmacokinetic Properties and hERG K<sup>+</sup> Channel Inhibition.** To compute the pharmacokinetic properties and the hERG K<sup>+</sup> channel inhibition of compounds 2i,<sup>10</sup> 4j, and BZDSa,<sup>31</sup> the compounds were drawn in Maestro and, in the cases of 2i<sup>10</sup> and 4j, both *cis*- and *trans*-rotamers were evaluated. Subsequently, their protonation states were assigned with LigPrep at a pH of 7.4, and their pharmacokinetic properties and hERG K<sup>+</sup> channel inhibition were computed with the program QikProp from the Maestro suite of programs.<sup>32</sup>

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### 📄 Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00197.

Supplementary figures, additional synthetic protocols and compound characterization data, and <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra (PDF)

Coordinates information for structure representation (PDB)

Molecular formula strings and some data (CSV)

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*Phone: (+49) 341 97 36801. Fax: (+49) 341 97 36889. E-mail: [finn.hansen@uni-leipzig.de](mailto:finn.hansen@uni-leipzig.de).

### ORCID

Frank J. Dekker: 0000-0001-7217-9300

Thomas Kurz: 0000-0002-9474-4224

Manfred Jung: 0000-0002-6361-7716

Holger Gohlke: 0000-0001-8613-1447

Finn K. Hansen: 0000-0001-9765-5975

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

The Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) is acknowledged for funds used to purchase the UHR-TOF maXis 4G, Bruker Daltonics, Bremen HRMS instrument used in this research. The authors thank the COST action CM1406 (Epigenetic Chemical Biology EPICHEMBO) for support. We acknowledge the European Research Council for providing ERC Starting Grant 309782 and the NWO for providing VIDI Grant 723.012.005 to F.J.D. This work was supported by the Fonds der Chemischen Industrie (to F.K.H.). J. S. and M.J. thank the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) for funding (Grant Ju 295/13-1).

## ■ ABBREVIATIONS USED

CisR, cisplatin resistant subclone; DIC, diisopropylcarbodiimide; Et<sub>3</sub>N, triethylamine; HAT, histone acetyltransferase; HDAC, histone deacetylase; HDACi, histone deacetylase inhibitors; HOAt, 1-hydroxy-7-azabenzotriazol; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; MS, molecular sieves; rt, room temperature; TSA, trichostatin A; U-4CR, Ugi four-component reaction; VT NMR, variable temperature nuclear magnetic resonance; ZBG, zinc-binding group

## ■ REFERENCES

- (1) Biel, M.; Wascholowski, V.; Giannis, A. Epigenetics - an epicenter of gene regulation: histones and histone-modifying enzymes. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 3186–3216.
- (2) (a) New, M.; Olzscha, H.; La Thangue, N. B. HDAC inhibitor-based therapies: can we interpret the code? *Mol. Oncol.* **2012**, *6*, 637–656. (b) Witt, O.; Deubzer, H. E.; Milde, T.; Oehme, I. HDAC family: what are the cancer relevant targets? *Cancer Lett.* **2009**, *277*, 8–21. (c) Kalin, J. H.; Bergman, J. A. Development and therapeutic implications of selective histone deacetylase 6 inhibitors. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 6297–6313.
- (3) Mottamal, M.; Zheng, S.; Huang, T. L.; Wang, G. Histone deacetylase inhibitors in clinical studies as templates for new anticancer agents. *Molecules* **2015**, *20*, 3898–3941.
- (4) (a) Shi, Y.; Dong, M.; Hong, X.; Zhang, W.; Feng, J.; Zhu, J.; Yu, L.; Ke, X.; Huang, H.; Shen, Z.; Fan, Y.; Li, W.; Zhao, X.; Qi, J.; Huang, H.; Zhou, D.; Ning, Z.; Lu, X. Results from a multicenter, open-label, pivotal phase II study of chidamide in relapsed or refractory peripheral T-cell lymphoma. *Ann. Oncol.* **2015**, *26*, 1766–1771. (b) Pan, D.-S.; Yang, Q.-J.; Fu, X.; Shan, S.; Zhu, J.-Z.; Zhang, K.; Li, Z.-B.; Ning, Z.-Q.; Lu, X.-P. Discovery of an orally active subtype-selective HDAC inhibitor, chidamide, as an epigenetic modulator for cancer treatment. *MedChemComm* **2014**, *5*, 1789–1796.
- (5) (a) Hansen, F. K.; Skinner-Adams, T. S.; Duffy, S.; Marek, L.; Sumanadasa, S. D. M.; Kuna, K.; Held, J.; Avery, V. M.; Andrews, K. T.; Kurz, T. Synthesis, antimalarial properties, and SAR studies of alkoxyurea-based HDAC inhibitors. *ChemMedChem* **2014**, *9*, 665–670. (b) Trenholme, K.; Marek, L.; Duffy, S.; Pradel, G.; Fisher, G.; Hansen, F. K.; Skinner-Adams, T. S.; Butterworth, A.; Ngwa, C. J.; Moecking, J.; Goodman, C. D.; McFadden, G. I.; Sumanadasa, S. D. M.; Fairlie, D. P.; Avery, V. M.; Kurz, T.; Andrews, K. T. Lysine acetylation in sexual stage malaria parasites is a target for antimalarial

- small molecules. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 3666–3678.
- (c) Hansen, F. K.; Sumanadasa, S. D. M.; Stenzel, K.; Duffy, S.; Meister, S.; Marek, L.; Schmetter, R.; Kuna, K.; Hamacher, A.; Mordmüller, B.; Kassack, M. U.; Winzeler, E. A.; Avery, V. M.; Andrews, K. T.; Kurz, T. Discovery of HDAC inhibitors with potent activity against multiple malaria parasite life cycle stages. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *82*, 204–213.
- (d) Butler, K. V.; Kalin, J.; Brochier, C.; Vistoli, G.; Langley, B.; Kozikowski, A. P. Rational design and simple chemistry yield a superior, neuroprotective HDAC6 inhibitor, tubastatin A. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 10842–10846.
- (e) Archin, N. M.; Liberty, A. L.; Kashuba, A. D.; Choudhary, S. K.; Kuruc, J. D.; Crooks, A. M.; Parker, D. C.; Anderson, E. M.; Kearney, M. F.; Strain, M. C.; Richman, D. D.; Hudgens, M. G.; Bosch, R. J.; Coffin, J. M.; Eron, J. J.; Hazuda, D. J.; Margolis, D. M. Administration of vorinostat disrupts HIV-1 latency in patients on antiretroviral therapy. *Nature* **2012**, *487*, 482–485.
- (6) Balasubramanian, S.; Verner, E.; Buggy, J. J. Isoform-specific histone deacetylase inhibitors: The next step? *Cancer Lett.* **2009**, *280*, 211–221.
- (7) Marson, C. M.; Matthews, C. J.; Atkinson, S. J.; Lamadema, N.; Thomas, N. S. B. Potent and selective inhibitors of histone deacetylase-3 containing chiral oxazoline capping groups and a *N*-(2-Aminophenyl)-benzamide binding unit. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 6803–6818.
- (8) Santo, L.; Hideshima, T.; Kung, A. L.; Tseng, J. C.; Tamang, D.; Yang, M.; Jarpe, M.; van Duzer, J. H.; Mazitschek, R.; Ogier, W. C.; Cirstea, D.; Rodig, S.; Eda, H.; Scullen, T.; Canavese, M.; Bradner, J.; Anderson, K. C.; Jones, S. S.; Rajee, N. Preclinical activity, pharmacodynamic, and pharmacokinetic properties of a selective HDAC6 inhibitor, ACY-1215, in combination with bortezomib in multiple myeloma. *Blood* **2012**, *119*, 2579–2589.
- (9) Whittle, J. R.; Desai, J. R. Histone deacetylase inhibitors in cancer: What have we learned? *Cancer* **2015**, *121*, 1164–1167.
- (10) Diedrich, D.; Hamacher, A.; Gertzen, C. G. W.; Alves Avelar, L. A.; Reiss, G. J.; Kurz, T.; Gohlke, H.; Kassack, M. K.; Hansen, F. K. Rational design and diversity-oriented synthesis of peptoid-based selective HDAC6 inhibitors. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 3219–3222.
- (11) Kahnberg, P.; Lucke, A. J.; Glenn, M. P.; Boyle, G. M.; Tyndall, J. D.; Parsons, P. G.; Fairlie, D. P. Design, synthesis, potency, and cytoselectivity of anticancer agents derived by parallel synthesis from alpha-aminosuberic acid. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 7611–7622.
- (12) Gupta, P. K.; Reid, R. C.; Liu, L.; Lucke, A. J.; Broomfield, S. A.; Andrews, M. R.; Sweet, M. J.; Fairlie, D. P. Inhibitors selective for HDAC6 in enzymes and cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 7067–7070.
- (13) Yoo, B.; Kirshenbaum, K. Peptoid architectures: elaboration, actuation, and application. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 714–721.
- (14) Culf, A. S.; Ouellette, R. J. Solid-phase synthesis of *N*-substituted glycine oligomers (alpha-peptoids) and derivatives. *Molecules* **2010**, *15*, 5282–5335.
- (15) Barreto, A. de F. S.; Vercillo, O. E.; Birkett, M. A.; Caulfield, J. C.; Wessjohann, L. A.; Andrade, C. K. Z. Fast and efficient microwave-assisted synthesis of functionalized peptoids via ugi reactions. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 5024–5027.
- (16) Krieger, V.; Ciglia, E.; Thoma, R.; Vasylyeva, V.; Frieg, B.; de Sousa Amadeu, N.; Kurz, T.; Janiak, C.; Gohlke, H.; Hansen, F. K.  $\alpha$ -Aminoxy peptoids: a unique peptoid backbone with a preference for *cis*-amide bonds. *Chem. - Eur. J.* **2017**, *23*, 3699–3707.
- (17) Maolanon, A. R.; Villadsen, J. S.; Christensen, N. J.; Hoeck, C.; Friis, T.; Harris, P.; Gottfredsen, C. H.; Fristrup, P.; Olsen, C. A. Methyl effect in azumamides provides insight into histone deacetylase inhibition by macrocycles. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 9644–9657.
- (18) Pavlik, C. M.; Wong, C. Y. B.; Ononye, S.; Lopez, D. D.; Engene, N.; McPhail, K. L.; Gerwick, W. H.; Balunas, M. J. Santacruzamate A, a potent and selective histone deacetylase inhibitor from the panamanian marine cyanobacterium *Cf. Symploca* Sp. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 2026–2033.
- (19) Suzuki, T.; Nagano, Y.; Kouketsu, A.; Matsuura, A.; Maruyama, S.; Kurotaki, M.; Nakagawa, H.; Miyata, N. Novel inhibitors of human histone deacetylases: design, synthesis, enzyme inhibition, and cancer cell growth inhibition of SAHA-based non-hydroxamates. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1019–1032.
- (20) Gorske, B. C.; Stringer, J. R.; Bastian, B. L.; Fowler, S. A.; Blackwell, H. E. New strategies for the design of folded peptoids revealed by a survey of noncovalent interactions in model systems. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16555–16567.
- (21) Laursen, J. S.; Engel-Andreasen, J.; Olsen, C. A.  $\beta$ -Peptoid foldamers at last. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 2696–2704.
- (22) Laursen, J. S.; Engel-Andreasen, J.; Fristrup, P.; Harris, P.; Olsen, C. A. *Cis-trans* amide bond rotamers in  $\beta$ -peptoids and peptoids: Evaluation of stereoelectronic effects in backbone and side chains. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 2835–2844.
- (23) Liu, Q.; Lu, W.; Ma, M.; Liao, J.; Ganesan, A.; Hu, Y.; Wen, S.; Huang, P. Synthesis and biological evaluation of santacruzamate A and analogs as potential anticancer agents. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 1109–1112.
- (24) Gromek, S. M.; deMayo, J. A.; Maxwell, A. T.; West, A. M.; Pavlik, C. M.; Zhao, Z.; Li, J.; Wiemer, A. J.; Zweifach, A.; Balunas, M. J. Synthesis and biological evaluation of santacruzamate A analogues for anti-proliferative and immunomodulatory activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24*, 5183–5196.
- (25) Galluzzi, L.; Senovilla, L.; Vitale, I.; Michels, J.; Martins, I.; Kepp, O.; Castedo, M.; Kroemer, G. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* **2012**, *31*, 1869–1883.
- (26) Marek, L.; Hamacher, A.; Hansen, F. K.; Kuna, K.; Gohlke, H.; Kassack, M. U.; Kurz, T. Histone deacetylase (HDAC) inhibitors with a novel connecting unit linker region reveal a selectivity profile for HDAC4 and HDAC5 with improved activity against chemoresistant cancer cells. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 427–436.
- (27) Hoffmann, K.; Brosch, G.; Loidl, P.; Jung, M. A non-isotopic assay for histone deacetylase activity. *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 2057–2058.
- (28) (a) Goodsell, D. S.; Morris, G. M.; Olson, A. J. Automated docking of flexible ligands: applications of Autodock. *J. Mol. Recognit.* **1996**, *9*, 1–5. (b) Gohlke, H.; Hendlich, M.; Klebe, G. Knowledge-based scoring function to predict protein-ligand interactions. *J. Mol. Biol.* **2000**, *295*, 337–356.
- (29) Hai, Y.; Christianson, D. W. Histone deacetylase 6 structure and molecular basis of catalysis and inhibition. *Nat. Chem. Biol.* **2016**, *12*, 741–747.
- (30) (a) Ahmed, A.; Kazemi, S.; Gohlke, H. Protein flexibility and mobility in structure-based drug design. *Front. Drug Des. Discovery* **2007**, *3*, 455–476. (b) Ciglia, E.; Vergin, J.; Reimann, S.; Smits, S. H. J.; Schmitt, L.; Groth, G.; Gohlke, H. Resolving hot spots in the C-terminal dimerization domain that determine the stability of the molecular chaperone Hsp90. *PLoS One* **2014**, *9*, e96031. (c) Kazemi, S.; Krüger, D. M.; Sirockin, F.; Gohlke, H. Elastic potential grids: accurate and efficient representation of intermolecular interactions for fully flexible docking. *ChemMedChem* **2009**, *4*, 1264–1268.
- (31) Loudni, L.; Roche, J.; Potiron, V.; Clarhaut, J.; Bachmann, C.; Gesson, J.-P.; Tranoy-Opalinski, I. Design, synthesis and biological evaluation of 1,4-benzodiazepine-2,5-dione-based HDAC inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 4819–4823.
- (32) *QikProp*, release 2017-1; Schrödinger, LLC: New York, NY, 2017.
- (33) (a) Howell, L. A.; Gulam, R.; Mueller, A.; O'Connell, M. A.; Searcey, M. Design and synthesis of threading intercalators to target DNA. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 6956–6959. (b) Grieco, P. A.; Clark, J. D. Retro aza diels-alder reactions of 2-azanobornenes: improved methods for the unmasking of primary amines. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 2271–2272.
- (34) Jakobsen, C. M.; Denmeade, S. R.; Isaacs, J. T.; Gady, A.; Olsen, C. E.; Christensen, S. B. Design, synthesis, and pharmacological evaluation of thapsigargin analogues for targeting apoptosis to prostatic cancer cells. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 4696–4703.
- (35) West, C. W.; Estiarte, M. A.; Rich, D. H. New methods for side-chain protection of cysteine. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1205–1208.
- (36) Gediya, L. K.; Chopra, P.; Purushottamachar, P.; Maheshwari, N.; Njar, V. C. O. A new simple and high-yield synthesis of

suberoylanilide hydroxamic acid and its inhibitory effect alone or in combination with retinoids on proliferation of human prostate cancer cells. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 5047–5051.

(37) Gosepath, E. M.; Eckstein, N.; Hamacher, A.; Servan, K.; von Jonquieres, G.; Lage, H.; Györffy, B.; Royer, H. D.; Kassack, M. U. Acquired cisplatin resistance in the head-neck cancer cell line Cal27 is associated with decreased DKK1 expression and can partially be reversed by overexpression of DKK1. *Int. J. Cancer* **2008**, *123*, 2013–2019.

(38) Eckstein, N.; Servan, K.; Girard, L.; Cai, D.; von Jonquieres, G.; Jaehde, U.; Kassack, M. U.; Gazdar, A. F.; Minna, J. D.; Royer, H. D. Epidermal growth factor receptor pathway analysis identifies amphiregulin as a key factor for cisplatin resistance of human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 739–750.

(39) Ciossek, T.; Julius, H.; Wieland, H.; Maier, T.; Beckers, T. A homogeneous cellular histone deacetylase assay suitable for compound profiling and robotic screening. *Anal. Biochem.* **2008**, *372*, 72–81.

(40) Engelke, L. H.; Hamacher, A.; Proksch, P.; Kassack, M. U. Ellagic acid and resveratrol prevent the development of cisplatin resistance in the epithelial ovarian cancer cell line A2780. *J. Cancer* **2016**, *7*, 353–363.

(41) Bonfils, C.; Kalita, A.; Dubay, M.; Siu, L. L.; Carducci, M. A.; Reid, G.; Martell, R. E.; Besterman, J. M.; Li, Z. Evaluation of the pharmacodynamic effects of MGCD0103 from preclinical models to human using a novel HDAC enzyme assay. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 3441–3449.

(42) Heltweg, B.; Trapp, J.; Jung, M. In vitro assays for the determination of histone deacetylase activity. *Methods* **2005**, *36*, 332–337.

(43) Wegener, D.; Wirsching, F.; Riester, D.; Schwienhorst, A. A fluorogenic histone deacetylase assay well suited for high-throughput activity screening. *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 61–68.

(44) Heltweg, B.; Dequiedt, F.; Verdin, E.; Jung, M. Nonisotopic substrate for assaying both human zinc and NAD<sup>+</sup>-dependent histone deacetylases. *Anal. Biochem.* **2003**, *319*, 42–48.

(45) Marek, M.; Kannan, S.; Hauser, A. T.; Moraes Mourao, M.; Caby, S.; Cura, V.; Stofa, D. A.; Schmidtkunz, K.; Lancelot, J.; Andrade, L.; Renaud, J. P.; Oliveira, G.; Sippl, W.; Jung, M.; Cavarelli, J.; Pierce, R. J.; Romier, C. Structural basis for the inhibition of histone deacetylase 8 (HDAC8), a key epigenetic player in the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *PLoS Pathog.* **2013**, *9*, e1003645.

(46) Szymanski, W.; Ourailidou, M. E.; Velema, W. A.; Dekker, F. J.; Feringa, B. L. Light-Controlled Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitors: Towards Photopharmacological Chemotherapy. *Chem. - Eur. J.* **2015**, *21*, 16517–16524.

(47) Schneider, C. A.; Rasband, W. S.; Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 671–675.

(48) Mills, N. ChemDraw Ultra 10.0. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13649–13650 (Computer Software Review).

(49) Gerber, P. R.; Müller, K. MAB, a generally applicable molecular force field for structure modelling in medicinal chemistry. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **1995**, *9*, 251–268.

(50) Millard, C. J.; Watson, P. J.; Celardo, I.; Gordiyenko, Y.; Cowley, S. M.; Robinson, C. V.; Fairall, L.; Schwabe, J. W. Class I HDACs share a common mechanism of regulation by inositol phosphates. *Mol. Cell* **2013**, *51*, 57–67.

(51) Osterberg, F.; Morris, G. M.; Sanner, M. F.; Olson, A. J.; Goodsell, D. S. Automated docking to multiple target structures: incorporation of protein mobility and structural water heterogeneity in AutoDock. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **2002**, *46*, 34–40.

(52) Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.* **1998**, *19*, 1639–1662.

(53) Radestock, S.; Bohm, M.; Gohlke, H. Improving binding mode predictions by docking into protein-specifically adapted potential fields. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 5466–5479.

(54) Gohlke, H.; Hendlich, M.; Klebe, G. Knowledge-based scoring function to predict protein-ligand interactions. *J. Mol. Biol.* **2000**, *295*, 337–356.

(55) Sotriffer, C. A.; Gohlke, H.; Klebe, G. Docking into knowledge-based potential fields: a comparative evaluation of DrugScore. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1967–1970.

# Electronic Supplementary Information

## Design, multicomponent synthesis and anticancer activity of a focused histone deacetylase (HDAC) inhibitor library with peptoid-based cap groups

*Viktoria Krieger,<sup>†</sup> Alexandra Hamacher,<sup>†</sup> Christoph G. W. Gertzen,<sup>†</sup> Johanna Senger,<sup>‡</sup> Martijn R. H. Zwinderman,<sup>§</sup> Martin Marek,<sup>#</sup> Christophe Romier,<sup>#</sup> Frank J. Dekker,<sup>§</sup> Thomas Kurz,<sup>†</sup> Manfred Jung,<sup>‡</sup> Holger Gohlke,<sup>†</sup> Matthias U. Kassack,<sup>†</sup> and Finn K. Hansen<sup>\*†,Δ</sup>*

<sup>†</sup>Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Universitätsstr. 1, 40225 Düsseldorf, Germany.

<sup>‡</sup>Institut für Pharmazeutische Wissenschaften, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Albertstraße 25, 79104 Freiburg i.Br., Germany.

<sup>§</sup>Department of Chemical and Pharmaceutical Biology, Groningen Research Institute of Pharmacy, University of Groningen, The Netherlands.

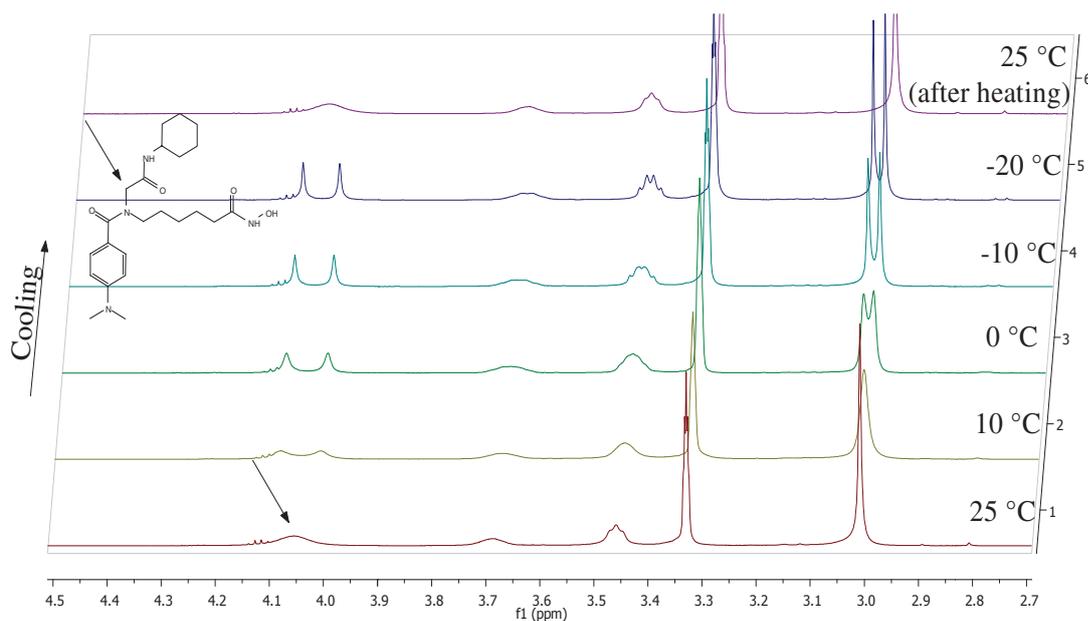
<sup>§</sup>Département de Biologie Structurale Intégrative, Institut de Génétique et Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Université de Strasbourg (UDS), CNRS, INSERM, 1 Rue Laurent Fries, 67404 Illkirch Cedex, France.

<sup>Δ</sup>Pharmaceutical/Medicinal Chemistry, Institute of Pharmacy, Leipzig University, Brüderstraße 34, 04103 Leipzig, Germany.

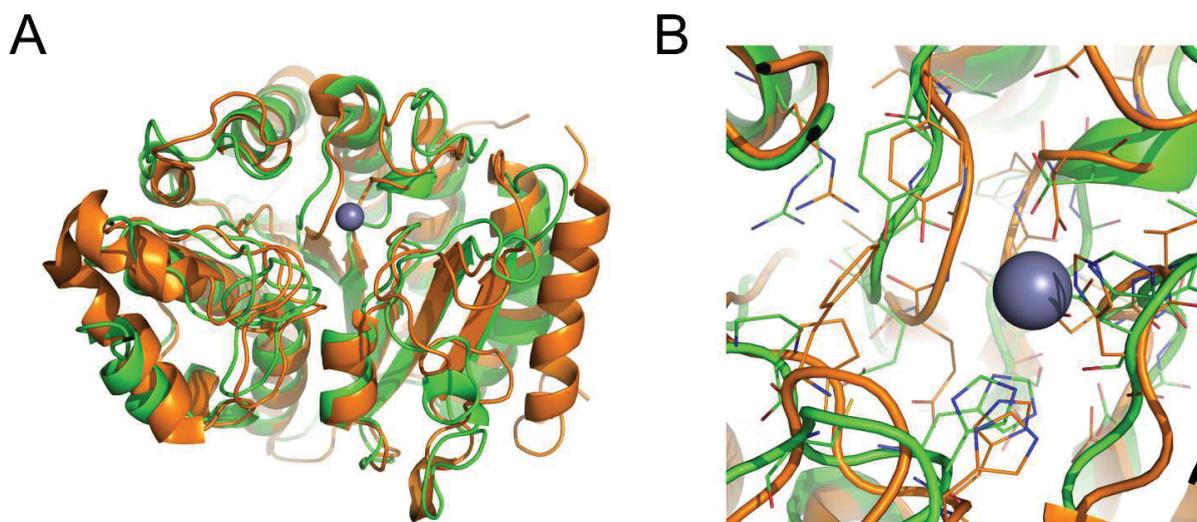
## Table of Contents

1. Supplemental Figures and Tables.....	3
2. Chemistry .....	5
Synthetic procedure for the synthesis of <b>7</b> .....	9
General procedure for the synthesis of <b>8a-f</b> .....	13
3. References .....	17

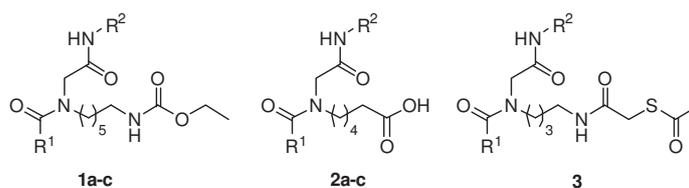
## 1. Supplemental Figures and Tables



**Figure S1.** VT NMR spectra of compound **4c** in  $\text{MeOH-}d_4$ .



**Figure S2.** Comparison of the HDAC6 X-ray crystal structure<sup>1</sup> and the homology model used in this study. **A** Structural alignment of the HDAC6 X-ray crystal structure (orange) and homology model (green) with the zinc atom (sphere) in the binding pocket. **B** Detailed view of the binding pocket with residues within 8 Å of the zinc atom shown in lines representation.

**Table S1.** HDAC inhibition and cytotoxicity of the compounds **1a-c**, **2a-c**, and **3**.<sup>a</sup>

compd	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	HDACi		MTT	
			IC <sub>50</sub> [μM]		IC <sub>50</sub> [μM]	
			A2780	A2780 CisR	A2780	A2780 CisR
<b>1a</b>	Ph	c-Hex	n.e.	n.e.	366	336
<b>1b</b>	1-Naphthyl	c-Hex	n.e.	134	112	105
<b>1c</b>	4-Me <sub>2</sub> N-Ph	<i>t</i> Bu	n.e.	n.e.	149	221
<b>2a</b>	Ph	c-Hex	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
<b>2b</b>	1-Naphthyl	c-Hex	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
<b>2c</b>	Ph	<i>t</i> Bu	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
<b>3</b>	Ph	c-Hex	80.4	100	212	116
<b>vorinostat</b>	---	---	0.96	0.97	2.42 <sup>b</sup>	3.12 <sup>b</sup>
<b>cisplatin</b>	---	---	---	---	2.25	17.2

<sup>a</sup>Values are the mean of three experiments. The standard deviations are < 10% of the mean.

n.e. = no effect up to 100 μM. <sup>b</sup>Data from ref. 2.

## 2. Chemistry

### **Ethyl 6-(*N*-(2-(cyclohexylamino)-2-oxoethyl)-1-naphthamido)hexyl)carbamate (1b).**

White solid; 53% yield; mp. 77 °C; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 8.19 – 7.36 (m, 8H), 7.07<sup>\*</sup>/6.92 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H), 4.45 – 2.76 (m, 9H), 1.81 – 0.90 (m, 21H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 169.98, 169.96, 166.85, 166.74, 156.26, 156.14, 129.21, 128.96, 128.57, 128.54, 128.26, 128.11, 126.79, 126.44, 126.32, 125.40, 125.23, 125.15, 124.67, 123.58, 123.42, 59.37, 59.33, 50.91, 49.11, 47.70, 47.45, 46.77, 45.71, 40.09, 40.06, 32.53, 32.11, 29.45, 29.06, 27.54, 26.69, 26.29, 26.09, 25.55, 25.42, 25.23, 25.10, 24.55, 24.37, 14.70, 14.68. Anal. Calcd. for C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>S: C 59.08; H 5.34; N 5.30. Found: C 58.95; H 5.41; N 5.20.

### **Ethyl 6-(*N*-(2(*tert*-butylamino)-2-oxoethyl)-4-(dimethylamino)benzamido)hexyl)carbamate (1c).**

Colourless oil; 41% yield; *t*<sub>R</sub> = 12.03 min, purity = 97.3%; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 7.31 – 7.30 (m, 2H), 6.64 – 6.63 (m, 2H), 4.86 – 4.74 (m, 1H), 4.07 – 4.04 (m, 2H), 3.94 (s, 2H), 3.40 – 3.38 (m, 2H), 3.08 – 3.06 (m, 2H), 2.97 (s, 6H), 1.61 – 1.56 (m, 2H), 1.40 – 1.38 (m, 2H), 1.32 (s, 9H), 1.20 – 1.18 (m, 5H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 173.34, 169.29, 156.79, 151.72, 129.01, 122.20, 111.35, 60.76, 52.96, 51.23, 40.89, 4.33, 29.91, 28.84, 28.29, 26.36, 26.30, 14.80. HRMS (ESI) [M+H]<sup>+</sup>: 449.3123, Calcd. for C<sub>24</sub>H<sub>41</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>: 449.3122.

### **Methyl 6-(*N*-(2-(cyclohexylamino)-2-oxoethyl)benzamido)hexanoate (6a).**

White solid; 59% yield; mp. 67 °C; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 7.80 – 7.76 (m, 1H), 7.44 – 7.34 (m, 5H), 4.00<sup>\*</sup>/3.73 (s, 2H), 3.59<sup>\*</sup>/3.55 (s, 3H), 3.52 – 3.51 (m, 1H), 3.35 – 3.13 (m, 2H), 2.32/2.19<sup>\*</sup> (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.76 – 1.02 (m, 16H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 173.33, 173.16, 170.93, 170.83, 167.02, 166.85, 136.81, 136.63, 129.13, 128.33, 128.19, 126.47, 126.34, 51.39, 51.17, 49.45, 47.59, 47.24, 45.69, 33.18, 32.98, 32.44, 32.23, 27.27, 26.16, 25.84, 25.32, 25.20, 25.14, 24.54, 24.45, 24.23, 23.83. Anal. Calcd. for C<sub>22</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: C 68.01; H 8.30; N 7.21. Found: C 67.76; H 8.28; N 7.10.

### **Methyl 6-(*N*-(2-(cyclohexylamino)-2-oxoethyl)-1-naphthamido)hexanoate (6b).**

White solid; 71% yield; mp. 105 °C; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 8.19 – 7.36 (m, 8H), 4.45 – 2.95 (m, 8H), 2.37<sup>\*</sup>/2.07 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.81 – 0.91 (m, 16H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 173.35, 173.06, 170.01, 169.96, 166.85, 166.74, 134.79, 134.53, 132.97,

132.79, 129.19, 128.96, 128.58, 128.55, 128.25, 128.11, 126.79, 126.44, 126.33, 125.38, 125.21, 125.14, 124.71, 123.57, 123.42, 51.20, 51.10, 50.87, 48.99, 47.71, 47.45, 46.76, 45.55, 33.23, 32.81, 32.52, 32.14, 27.21, 26.37, 26.00, 25.23, 25.12, 25.10, 24.55, 24.37, 24.25, 23.68. Anal. Calcd. for C<sub>26</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: C 71.21; H 7.81; N 6.39. Found: C 71.50; H 8.05; N 6.34.

**Methyl 6-(N-(2-(*tert*-butylamino)-2-oxoethyl)benzamido)hexanoate (6c).** White solid; 79% yield; mp. 57 °C; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 7.53<sup>\*</sup>/7.48 (s, 1H), 7.44 – 7.33 (m, 5H), 3.97<sup>\*</sup>/3.70 (s, 2H), 3.59/3.55<sup>\*</sup> (s, 3H), 3.35 – 3.11 (m, 2H), 2.32/2.19<sup>\*</sup> (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.56 – 1.03 (m, 15H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 173.32, 173.15, 170.96, 170.80, 167.44, 167.13, 136.90, 136.68, 129.10, 128.34, 128.16, 126.48, 126.33, 51.65, 51.17, 50.22, 50.16, 49.33, 47.40, 45.70, 33.19, 32.97, 28.55, 28.33, 27.26, 26.23, 25.84, 25.33, 24.23, 23.83. Anal. Calcd. for C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: C 66.27; H 8.34; N 7.73. Found: C 66.24; H 8.33; N 7.66.

**Methyl 6-(N-(2-(cyclohexylamino)-2-oxoethyl)-4-(dimethylamino)benzamido)hexanoate (6d).** White solid; 72% yield; mp. 93 °C; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 7.80 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 7.27 – 7.24 (m, 2H), 6.69 – 6.66 (m, 2H), 3.94 – 3.82 (m, 2H), 3.57 – 3.54 (m, 4H), 3.30 – 3.25 (m, 2H), 2.93 (s, 6H), 2.27 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 1.74 – 1.09 (m, 16H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 173.27, 171.23, 167.38, 150.92, 128.39, 123.08, 110.95, 51.16, 47.53, 33.13, 32.33, 25.74, 25.18, 24.50, 24.12. Anal. Calcd. for C<sub>24</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: C 66.79; H 8.64; N 9.74. Found: C 66.57; H 8.75; N 9.60.

**Methyl 6-(N-(2-(cyclohexylamino)-2-oxoethyl)-3,5-dimethylbenzamido)hexanoate (6e).** White solid; 89% yield; mp. 80 °C; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 7.78<sup>\*</sup>/7.74 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.06 – 6.91 (m, 3H), 3.97<sup>\*</sup>/3.72 (s, 2H), 3.59 – 3.52 (m, 4H), 3.35 – 3.12 (m, 2H), 2.32/2.19<sup>\*</sup> (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.29<sup>\*</sup>/2.25 (s, 6H), 1.75 – 1.04 (m, 16H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 173.32, 173.15, 171.01, 167.14, 166.88, 137.46, 137.30, 136.79, 136.61, 130.38, 123.99, 123.91, 51.32, 51.16, 49.30, 47.59, 47.08, 45.69, 33.1732.97, 32.43, 32.29, 27.22, 26.11, 25.83, 25.26, 25.20, 25.15, 24.53, 24.46, 24.24, 23.79, 20.76. Anal. Calcd. for C<sub>24</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: C 69.20; H 8.71; N 6.73. Found: C 69.12; H 8.48; N 6.67.

**Methyl 6-(N-(2-(*tert*-butylamino)-2-oxoethyl)-4-(dimethylamino)benzamido)hexanoate (6f).** White solid; 68% yield; mp. 94 °C; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 7.51 (s, 1H),

7.26 – 7.24 (m, 2H), 6.68 – 6.67 (m, 2H), 3.84 (bs, 2H), 3.58 (s, 3H), 3.28 – 3.25 (m, 2H), 2.93 (s, 6H), 2.35 – 2.21 (m, 2H), 1.52 – 1.26 (m, 15H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 173.27, 171.22, 167.80, 150.91, 128.39, 123.20, 110.94, 51.16, 50.18, 39.78, 33.13, 28.45, 25.73, 24.12. Anal. Calcd. for C<sub>22</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: C 65.16; H 8.70; N 10.36. Found: C 65.04; H 8.41; N 10.35.

**Methyl 6-(*N*-(2-(butylamino)-2-oxoethyl)-4-(dimethylamino)benzamido)hexanoate (6g).**

White solid; 61% yield; mp. 79 °C; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 7.96 – 7.83 (m, 1H), 7.27 – 7.25 (m, 2H), 6.68 – 6.67 (m, 2H), 3.88 (bs, 2H), 3.57 (s, 3H), 3.29 – 3.26 (m, 2H), 3.08 (dd, *J* = 12.7, 6.8 Hz, 2H), 2.93 (s, 6H), 2.35 – 2.21 (m, 2H), 1.54 – 1.20 (m, 10H), 0.87 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 173.26, 171.25, 168.24, 150.93, 128.41, 123.00, 110.91, 51.15, 39.75, 38.16, 33.13, 31.18, 25.70, 24.10, 19.50, 13.64. Anal. Calcd. for C<sub>22</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: C 65.16; H 8.70; N 10.36. Found: C 65.04; H 8.79; N 10.24.

**Methyl 6-(4-(dimethylamino)-*N*-(2-oxo-2-(*p*-tolylamino)ethyl)benzamido)hexanoate (6h).**

Yellow oil; 50% yield; *t*<sub>R</sub> = 13.44 min, purity = 97.5%; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 9.90 (s, 1H), 7.47 – 7.46 (m, 2H), 7.28 – 7.26 (m, 2H), 7.12 – 7.10 (m, 2H), 6.70 – 6.69 (m, 2H), 4.11 (bs, 2H), 3.57 (s, 3H), 3.36 – 3.33 (m, 2H), 2.93 (bs, 6H), 2.28 – 2.25 (m, 5H), 1.59 – 1.08 (m, 6H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 173.26, 171.39, 167.19, 150.98, 129.11, 128.35, 122.90, 119.09, 111.01, 51.16, 33.14, 25.68, 24.08, 20.42. HRMS (ESI) [M+H]<sup>+</sup>: 440.2545, Calcd. for C<sub>25</sub>H<sub>34</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: 440.2544.

**Methyl 6-(3,5-dimethyl-*N*-(2-oxo-2-(*p*-tolylamino)ethyl)benzamido)hexanoate (6i).**

Yellow oil; 56% yield; *t*<sub>R</sub> = 18.45 min, purity = 98.3%; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 9.09 (s, 1H), 7.41 – 7.00 (m, 7H), 4.23 (s, 2H), 3.62 (s, 3H), 3.44 – 3.31 (m, 2H), 2.32 – 2.30 (m, 9H), 2.23 – 2.12 (m, 2H), 1.63 – 1.15 (m, 6H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 173.88, 173.84, 167.67, 138.45, 135.52, 135.15, 133.88, 131.79, 129.53, 124.44, 119.99, 52.21, 51.57, 51.34, 33.78, 28.23, 25.96, 24.35, 21.32, 20.96. HRMS (ESI) [M+H]<sup>+</sup>: 425.2432, Calcd. for C<sub>25</sub>H<sub>33</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 425.2435.

**Methyl 6-(*N*-(2-(benzylamino)-2-oxoethyl)-4-(dimethylamino)benzamido)hexanoate (6j).**

White solid; 73% yield; mp. 82 °C; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 8.51 – 8.31 (m, 1H), 7.34 – 6.65 (m, 9H), 4.31 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.97 (bs, 2H), 3.58 (s, 3H), 3.32 – 3.30 (m, 2H),

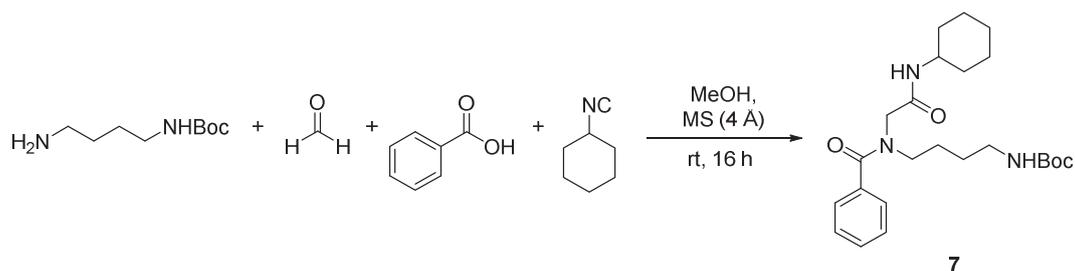
2.93 (s, 6H), 2.36 – 2.21 (m, 2H), 1.56 – 1.17 (m, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 173.32, 171.38, 168.65, 150.96, 139.38, 128.43, 128.28, 127.28, 126.83, 122.95, 110.94, 51.20, 42.14, 33.17, 27.49, 25.75, 24.14. Anal. Calcd. for  $\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_4$ : C 68.31; H 7.57; N 9.56. Found: C 68.06; H 7.28; N 9.58.

**Methyl 6-(*N*-(2-(benzylamino)-2-oxoethyl)-3,5-dimethylbenzamido)hexanoate (6k).** White solid; 89% yield; mp. 86 °C;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 8.45 – 8.39 (m, 1H), 7.33 – 6.92 (m, 8H), 4.33<sup>\*</sup>/4.27 (d,  $J$  = 5.6 Hz, 2H), 4.06<sup>\*</sup>/3.84 (s, 1H), 3.59/3.56<sup>\*</sup> (s, 3H), 3.37 – 3.16 (m, 2H), 2.33 – 2.18 (m, 8H), 1.57 – 1.05 (m, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 173.34, 173.17, 171.11, 171.09, 168.19, 168.17, 139.44, 139.20, 137.44, 137.41, 136.70, 136.47, 130.45, 128.27, 128.24, 127.24, 127.15, 126.86, 126.73, 124.01, 123.98, 51.36, 49.54, 51.17, 51.15, 47.55, 45.64, 42.15, 42.06, 33.19, 32.97, 27.31, 26.09, 25.83, 25.25, 24.24, 23.79, 20.76. Anal. Calcd. for  $\text{C}_{25}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_4$ : C 70.73; H 7.60; N 6.60. Found: C 70.84; H 7.51; N 6.90.

**6-(*N*-(2-(Cyclohexylamino)-2-oxoethyl)-1-naphthamido)hexanoic acid (2b).** White solid; quantitative yield; mp. 101 °C;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 11.95 (s, 1H), 8.19 – 7.36 (m, 8H), 4.46 – 2.94 (m, 5H), 2.27<sup>\*</sup>/1.99 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 2H), 1.81 – 0.82 (m, 16H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 174.34, 174.09, 170.01, 169.96, 166.83, 166.69, 134.75, 134.51, 132.93, 132.76, 129.17, 128.95, 128.51, 128.16, 128.05, 126.72, 126.37, 126.24, 125.30, 125.14, 125.06, 124.67, 123.56, 123.38, 50.90, 49.01, 47.68, 47.44, 46.79, 45.53, 33.59, 33.22, 32.44, 32.04, 27.28, 26.38, 26.07, 25.26, 25.18, 25.05, 24.46, 24.28, 23.77. Anal. Calcd. for  $\text{C}_{25}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_4$ : C 70.73; H 7.60; N 6.60. Found: C 70.50; H 7.80; N 6.59.

**6-(*N*-(2-(*tert*-Butylamino)-2-oxoethyl)benzamido)hexanoic acid (2c).** White solid; quantitative yield; mp. 135 °C;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 11.97 (s, 1H), 7.53 – 7.33 (m, 5H), 3.97<sup>\*</sup>/3.70 (s, 2H), 3.33 – 3.11 (m, 2H), 2.22/2.10<sup>\*</sup> (t,  $J$  = 7.3 Hz, 2H), 1.55 – 1.04 (m, 15H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 174.46, 174.29, 170.96, 170.81, 167.44, 167.14, 136.92, 136.71, 129.13, 129.10, 128.35, 128.17, 126.49, 126.33, 51.65, 50.23, 50.18, 49.39, 47.39, 45.73, 33.57, 33.41, 28.56, 28.34, 27.36, 26.31, 25.95, 25.46, 24.31, 23.93. Anal. Calcd. for  $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_4$ : C 65.49; H 8.10; N 8.04. Found: C 65.27; H 7.84; N 8.02.

## Synthetic procedure for the synthesis of 7



A mixture of *tert*-butyl (4-aminobutyl)carbamate (681 mg, 3.62 mmol, 1.2 equiv), paraformaldehyde (109 mg, 3.62 mmol, 1.2 equiv), and 300 mg of crushed molecular sieves (MS) 4 Å was stirred in dry methanol (3 mL, 0.5 M) at room temperature for 30 min. Subsequently, benzoic acid (369 mg, 3.02 mmol, 1.0 equiv) and after further 10 min cyclohexyl isocyanide (376  $\mu$ L, 3.02 mmol, 1.0 equiv) were added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 16 h. After completion of the reaction, the reaction mixture was filtered and the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by flash column chromatography (prepacked silica cartridge, hexane-ethyl acetate, gradient: 100:00  $\rightarrow$  50:50 in 30 min) to yield the desired product 7.

***tert*-Butyl (4-(*N*-(2-(cyclohexylamino)-2-oxoethyl)benzamido)butyl)carbamate (7).** Colourless oil; 57% yield;  $t_R$  = 16.17 min, 91.0% purity;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  7.74 – 7.73 (m, 1H), 7.44 – 7.36 (m, 5H), 6.76/6.68\* (s, 1H), 4.00\*/3.74 (s, 2H), 3.57 – 3.52 (m, 1H), 3.36 – 3.19 (m, 2H), 2.94 – 2.77 (m, 2H), 1.75 – 1.09 (m, 23H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  170.82, 166.91, 155.52, 129.01, 128.14, 128.08, 126.32, 77.26, 54.70, 51.38, 47.51, 45.60, 32.12, 28.16, 27.83, 25.07, 24.35, 23.94. HRMS (ESI)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 432.2858, Calcd. for  $\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{N}_3\text{O}_4$ : 432.2857.

***N*-(2-(Cyclohexylamino)-2-oxoethyl)-*N*-(6-(hydroxyamino)-6-oxohexyl)-1-naphthamide (4b).** White/yellowish solid; 55% yield; mp. 82  $^\circ\text{C}$ ;  $t_R$  = 13.06 min, purity = 95.3%;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  = 10.39\*/10.24 (s, 1H), 8.69\*/8.61 (s, 1H), 8.20 – 7.36 (m, 8H), 4.47 – 2.94 (m, 5H), 2.02 – 0.88 (m, 18 H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  = 170.00, 169.99, 169.07, 168.82, 166.85, 166.75, 134.82, 134.54, 132.97, 132.77, 129.19, 128.96, 128.59, 128.56, 128.25, 128.12, 126.86, 126.83, 126.47, 126.33, 125.38, 125.29, 125.15, 124.72, 123.57, 123.44, 50.88, 49.07, 47.72, 47.46, 46.68, 45.63, 32.53, 32.26, 32.15, 32.01, 27.41, 26.48, 26.19, 25.43, 25.23, 25.10, 24.98, 24.56, 24.38. HRMS (ESI)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 440.2548, Calcd. for  $\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_4$ : 440.2544.

***N*-(2-(Cyclohexylamino)-2-oxoethyl)-4-(dimethylamino)-*N*-(6-(hydroxyamino)-6-oxoethyl)benzamide (4c).** White solid; 42% yield; mp. 105 °C;  $t_R$  = 9.73 min, purity = 98.4%;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 10.32 (s, 1H), 8.65 (bs, 1H), 7.80 (bs, 1H), 7.26 – 7.24 (m, 2H), 6.68 – 6.67 (m, 2H), 3.86 (bs, 2H), 3.56 – 3.55 (m, 1H), 3.28 – 3.25 (m, 2H), 2.93 (s, 6H), 1.97 – 1.87 (m, 2H), 1.73 – 1.13 (m, 16H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 171.22, 168.99, 167.39, 150.93, 128.40, 123.10, 110.96, 47.54, 32.34, 32.19, 25.99, 25.19, 24.89, 24.51. HRMS (ESI)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 433.2813, Calcd. for  $\text{C}_{23}\text{H}_{37}\text{N}_4\text{O}_4$ : 433.2809.

***N*-(2-(Cyclohexylamino)-2-oxoethyl)-*N*-(6-(hydroxyamino)-6-oxohexyl)-3,5-dimethylbenzamide (4d).** White solid; 33% yield; mp. 140 °C;  $t_R$  = 13.10 min, purity = 100%;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 10.34/10.28\* (s, 1H), 8.66/8.63\* (s, 1H), 7.78\*/7.74 (d,  $J$  = 7.7 Hz, 1H), 7.06 – 6.91 (m, 3H), 3.97\*/3.72 (s, 2H), 3.58 – 3.52 (m, 1H), 3.34 – 3.12 (m, 2H), 2.29\*/2.25 (s, 6H), 1.96/1.85\* (t,  $J$  = 7.2 Hz, 2H), 1.75 – 1.00 (m, 16H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 171.48, 169.53, 169.37, 167.63, 167.37, 137.97, 137.80, 137.27, 137.09, 130.88, 124.47, 124.39, 51.81, 49.91, 48.07, 47.51, 46.31, 32.91, 32.77, 32.71, 32.58, 27.90, 26.73, 26.53, 26.00, 25.68, 25.62, 25.47, 25.11, 25.02, 24.94, 21.26. HRMS (ESI)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 418.2696, Calcd. for  $\text{C}_{23}\text{H}_{36}\text{N}_3\text{O}_4$ : 418.2700.

***N*-(2-(*tert*-Butylamino)-2-oxoethyl)-*N*-(6-(hydroxyamino)-6-oxohexyl)benzamide (4e).** White solid; 45% yield; mp. 80 °C;  $t_R$  = 10.74 min, purity = 95.3%;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 10.34/10.29\* (s, 1H), 8.66 – 8.64 (m, 1H), 7.53\*/7.48 (s, 1H), 7.44 – 7.33 (m, 5H), 3.97\*/3.70 (s, 2H), 3.33 – 3.10 (m, 2H), 1.96/1.85\* (t,  $J$  = 7.3 Hz, 2H), 1.55 – 0.99 (m, 15H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 170.95, 170.81, 169.06, 168.86, 167.45, 167.13, 136.91, 136.68, 129.13, 129.10, 128.37, 128.16, 126.49, 126.33, 51.65, 50.23, 50.17, 49.43, 47.34, 45.80, 32.24, 32.06, 28.56, 28.34, 27.42, 26.38, 26.05, 25.55, 24.99, 24.61. HRMS (ESI)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 364.2230, Calcd. for  $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_4$ : 364.2231.

**4-(Dimethylamino)-*N*-(6-(hydroxyamino)-6-oxohexyl)-*N*-(2-oxo-2-(*p*-tolylamino)ethyl)benzamide (4f).** Beige solid; 46% yield; mp. 78 °C;  $t_R$  = 8.33 min, purity = 100%;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 10.32 (s, 1H), 8.65 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.26 – 7.24 (m, 2H), 6.68 – 6.67 (m, 2H), 3.83 (bs, 2H), 3.27 – 3.25 (m, 2H), 2.93 (s, 6H), 1.99 – 1.86 (m, 2H), 1.50 – 1.15 (m, 15H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 171.22, 169.01, 167.81, 150.92, 128.41,

123.18, 110.96, 51.96, 50.19, 45.91, 40.06, 32.20, 28.48, 25.96, 24.91. HRMS (ESI)  $[M+H]^+$ : 407.2651, Calcd. for  $C_{21}H_{35}N_4O_4$ : 407.2653.

***N*-(2-(Butylamino)-2-oxoethyl)-4-(dimethylamino)-*N*-(6-(hydroxyamino)-6-oxohexyl)-benzamide (4g).** White solid; 32% yield; mp. 73 °C;  $t_R$  = 8.48 min, purity = 98.7%;  $^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 10.29 (s, 1H), 8.61 (s, 1H), 7.85 (bs, 1H), 7.27 – 7.25 (m, 2H), 6.68 – 6.67 (m, 2H), 3.88 (bs, 2H), 3.29 – 3.26 (m, 2H), 3.08 (dd,  $J$  = 12.7, 6.6 Hz, 2H), 2.93 (s, 6H), 1.97 – 1.87 (m, 2H), 1.52 – 1.11 (m, 10H), 0.87 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 3H).  $^{13}C$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 171.18, 168.91, 168.15, 150.87, 128.30, 123.01, 110.87, 38.09, 32.10, 31.08, 26.45, 25.84, 24.76, 19.39, 13.51. HRMS (ESI)  $[M+H]^+$ : 407.2652, Calcd. for  $C_{21}H_{34}N_4O_4$ : 407.2653.

**4-(Dimethylamino)-*N*-(6-(hydroxyamino)-6-oxohexyl)-*N*-(2-oxo-2-(*p*-tolylamino)ethyl)-benzamide (4h).** Orange solid; 39% yield; mp. 85 °C;  $t_R$  = 10.02 min, purity = 98.6%;  $^1H$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 10.32 (s, 1H), 9.90 (s, 1H), 8.65 (s, 1H), 7.47 – 6.70 (m, 8H), 4.11 (bs, 2H), 3.35 – 3.32 (m, 2H), 2.93 (s, 6H), 2.25 (s, 3H), 1.97 – 1.89 (m, 2H), 1.59 – 1.16 (m, 6H).  $^{13}C$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 171.41, 169.00, 167.22, 151.00, 129.13, 128.38, 119.11, 111.03, 32.25, 27.49, 26.00, 24.89, 20.44. HRMS (ESI)  $[M+H]^+$ : 441.2502, Calcd. for  $C_{24}H_{33}N_4O_4$ : 441.2496.

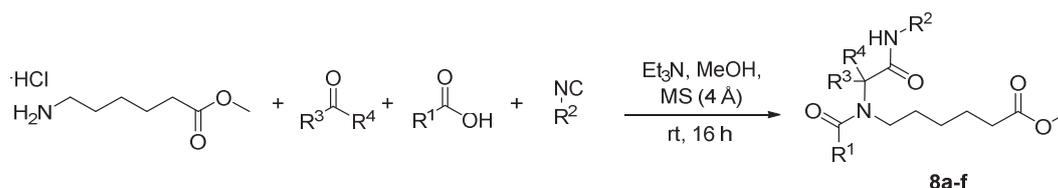
***N*-(1-(Cyclohexylcarbamoyl)cyclohexyl)-*N*-(6-(hydroxyamino)-6-oxohexyl)benzamide (4i).** Orange solid; 28% yield; mp. 86 °C;  $t_R$  = 13.84 min, purity = 100.0%;  $^1H$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 10.34<sup>\*</sup>/10.29 (s, 1H), 9.97/9.78<sup>\*</sup> (s, 1H), 8.66 – 8.63 (m, 1H), 7.50 – 6.94 (m, 7H), 4.18/3.97<sup>\*</sup> (s, 2H), 3.40 – 3.21 (m, 2H), 2.31 – 2.22 (m, 9H), 1.96 – 1.87 (m, 2H), 1.53 – 1.05 (m, 6H).  $^{13}C$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 171.20, 171.16, 169.06, 168.91, 167.04, 166.72, 137.56, 137.46, 136.73, 136.52, 136.45, 136.02, 132.43, 132.00, 130.53, 130.46, 129.14, 123.95, 119.30, 118.98, 51.99, 49.74, 47.94, 45.89, 32.25, 32.12, 27.60, 26.41, 26.03, 25.53, 25.00, 24.63, 20.78, 20.43. HRMS (ESI)  $[M+H]^+$ : 426.2385, Calcd. for  $C_{24}H_{32}N_3O_4$ : 426.2387.

***N*-(1-(Cyclohexylcarbamoyl)cyclohexyl)-*N*-(6-(hydroxyamino)-6-oxohexyl)benzamide (4j).** White solid; 32% yield; mp. 76 °C;  $t_R$  = 9.15 min, purity = 98.9%;  $^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 10.30 (s, 1H), 8.62 (s, 1H), 8.41 (bs, 1H), 7.34 – 6.65 (m, 9H), 4.31 (d,  $J$  = 5.8 Hz, 2H), 3.97 (bs, 2H), 3.32 – 3.29 (m, 2H), 2.93 (s, 6H), 1.93 – 1.91 (m, 2H), 1.56 – 1.15 (m,

6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  = 171.24, 168.92, 168.50, 150.87, 139.27, 128.30, 128.15, 127.16, 126.68, 122.96, 110.87, 42.06, 32.11, 26.72, 25.85, 24.76. HRMS (ESI)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 441.2499, Calcd. for  $\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{O}_4$ : 441.2496.

***N*-(6-(Hydroxyamino)-6-oxohexyl)-3,5-dimethyl-*N*-(2-oxo-2-(*p*-tolylamino)ethyl)benzamide (4k).** White solid; 38% yield; mp. 143 °C;  $t_{\text{R}}$  = 12.78 min, purity = 99.6%;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  = 10.32/10.26\* (s, 1H), 8.63/8.60\* (s, 1H), 8.42 – 8.35 (m, 1H), 7.31 – 6.92 (m, 8H), 4.33\*/4.27 (d,  $J$  = 4.8 Hz, 2H), 4.06\*/3.84 (s, 2H), 3.37 – 3.18 (m, 2H), 2.30\*/2.22 (s, 6H), 2.01 – 1.81 (m, 2H), 1.54 – 1.03 (m, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  = 171.01, 168.94, 168.83, 168.09, 139.33, 139.12, 137.32, 136.66, 136.45, 130.34, 128.15, 127.11, 126.71, 123.91, 51.34, 49.57, 47.45, 45.68, 42.08, 32.14, 32.04, 27.43, 26.16, 25.97, 25.45, 24.87, 24.53, 20.67. HRMS (ESI)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 426.2389, Calcd. for  $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{O}_4$ : 426.2387.

## General procedure for the synthesis of 8a-f



A mixture of methyl 6-aminohexanoate hydrochloride (153 mg, 0.84 mmol, 1.2 equiv), the respective aldehyde or ketone (1.2 equiv), triethylamine (116  $\mu$ L, 0.84 mmol, 1.2 equiv) and 150 mg of crushed molecular sieves (MS) 4 Å was stirred in dry methanol (2 mL, 0.5 M) at room temperature for 30 min. Subsequently, the appropriate carboxylic acid (1.0 mmol, 1.0 equiv) and after further 10 min the isocyanide (1.0 mmol, 1.0 equiv) were added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 16 h. After completion of the reaction, the reaction mixture was filtered and the solvent was removed under reduced pressure. The crude products were purified by flash column chromatography (prepacked silica cartridge, hexane-ethyl acetate, gradient: 100:00  $\rightarrow$  50:50 in 30 min). The products were crystallized from ethyl acetate-hexane to yield the desired products **8a-f**.

**Methyl 6-(N-(1-(cyclohexylamino)-2-methyl-1-oxopropan-2-yl)benzamido)hexanoate (8a).** Yellowish oil; 65% yield;  $t_R$  = 16.32 min, purity = 95.6%;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 7.39 – 7.32 (m, 5H), 6.02 (d,  $J$  = 7.7 Hz, 1H), 3.79 – 3.74 (m, 1H), 3.63 (s, 3H), 3.32 – 3.29 (m, 2H), 2.16 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 2H), 1.93 – 1.01 (m, 22H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 174.03, 173.82, 173.03, 138.04, 129.40, 128.62, 126.41, 62.42, 51.57, 48.39, 46.82, 33.84, 33.20, 31.24, 26.34, 25.87, 25.05, 24.95, 24.29. HRMS (ESI)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 546.1901, Calcd. for  $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{O}_8\text{S}$ : 546.1905.

**Methyl 6-(N-(1-(cyclohexylamino)-2-methyl-1-oxopropan-2-yl)-4-(dimethylamino)benzamido)hexanoate (8b).** Yellow oil; 66% yield;  $t_R$  = 12.25 min, purity = 95.2%;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 7.26 – 7.25 (m, 2H), 6.61 – 6.60 (m, 2H), 3.72 – 3.66 (m, 1H), 3.58 (s, 3H), 3.41 – 3.38 (m, 2H), 2.95 (s, 6H) 2.14 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 2H), 1.87 – 1.02 (m, 22H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 174.57, 174.23, 173.83, 151.40, 128.68, 124.58, 111.28, 62.27, 51.45, 48.02, 47.56, 40.21, 33.77, 32.91, 30.79, 26.27, 25.69, 25.17, 24.74, 24.30. HRMS (ESI)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 460.3169, Calcd. for  $\text{C}_{26}\text{H}_{42}\text{N}_3\text{O}_4$ : 460.3170.

**Methyl 6-(N-(1-(tert-butylamino)-2-methyl-1-oxopropan-2-yl)benzamido)hexanoate (8c).** Yellow oil; 56% yield;  $t_R$  = 15.67 min, purity = 96.1%;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 7.31

– 7.24 (m, 5H), 5.92 (s, 1H), 3.55 (s, 3H), 3.24 – 3.21 (m, 2H), 2.08 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 1.51 – 0.93 (m, 21H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 173.86, 173.61, 172.61, 137.71, 129.20, 128.44, 126.02, 62.54, 51.38, 50.69, 46.45, 33.56, 31.04, 28.54, 26.05, 24.66, 23.98$ . HRMS (ESI)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 359.2595, Calcd. for  $\text{C}_{22}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{O}_4$ : 391.2591.

**Methyl 6-(*N*-(1-(cyclohexylcarbonyl)cyclohexyl)benzamido)hexanoate (8d).** White solid; 75% yield; mp. 89 °C;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta = 7.53$  (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 7.45 – 7.36 (m, 5H), 3.56 – 3.52 (m, 4H), 3.26 – 3.23 (m, 2H), 2.19 – 0.90 (m, 28H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta = 173.06, 172.38, 138.38, 129.08, 128.35, 126.25, 63.88, 51.14, 47.17, 46.47, 32.90, 32.38, 32.34, 29.82, 25.56, 25.30, 25.14, 24.62, 23.60, 22.13$ . Anal. Calcd. for  $\text{C}_{27}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_4$ : C 71.02, H 8.83, N 6.13 Found: C 71.15; H 9.12; N 5.99.

**Methyl 6-(*N*-(2-(cyclohexylamino)-2-oxo-1-phenylethyl)benzamido)hexanoate (8e).** White solid; 57% yield; mp. 84 °C;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta = 8.06^*/7.81$  (bs, 1H), 7.45 – 7.19 (m, 10H), 6.06<sup>\*</sup>/5.27 (bs, 1H), 3.64 – 3.63 (m, 1H), 3.54 (bs, 3H), 3.41 – 3.13 (m, 2H), 2.11 – 1.94 (m, 2H), 1.74 – 0.66 (m, 16H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta = 173.07, 171.43, 171.04, 168.09, 167.95, 137.08, 136.59, 129.16, 128.94, 128.50, 127.98, 126.14, 65.10, 60.79, 51.09, 47.67, 46.58, 44.73, 32.86, 32.10, 28.80, 27.05, 25.90, 25.44, 24.54, 24.46, 23.83, 23.37, 17.42$ . Anal. Calcd. for  $\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_4$ : C 72.39; H 7.81; N 6.03. Found: C 72.39; H 7.79; N 6.08.

**Methyl 6-(*N*-(2-(cyclohexylamino)-2-oxo-1-(*p*-tolyl)ethyl)benzamido)hexanoate (8f).** White solid; 59% yield; mp. 86 °C;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta = 7.98^*/7.75$  (bs, 1H), 7.44 – 7.06 (m, 9H), 5.99<sup>\*</sup>/5.22 (bs, 1H), 3.63 – 3.61 (m, 1H), 3.54 (bs, 3H), 3.41 – 3.11 (m, 2H), 2.30 (bs, 3H), 2.10 – 0.66 (m, 18H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta = 173.12, 171.39, 168.14, 137.34, 137.15, 133.48, 129.15, 129.04, 128.77, 128.49, 126.13, 51.11, 47.63, 32.80, 32.11, 25.15, 24.54, 24.46, 20.65$ . Anal. Calcd. for  $\text{C}_{29}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_4$ : C 72.77; H 8.00; N 5.85. Found: C 72.74; H 8.11; N 5.80.

***N*-(1-(Cyclohexylamino)-2-methyl-1-oxopropan-2-yl)-4-(dimethylamino)-*N*-(6-(hydroxy-amino)-6-oxohexyl)benzamide (5b).** Brownish solid; 66% yield; mp. 87 °C;  $t_{\text{R}} = 9.41$  min, purity = 95.8%;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta = 10.28$  (s, 1H), 8.63 (s, 1H), 7.28 – 7.26 (m, 2H), 7.02 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 6.70 – 6.68 (m, 2H), 3.46 – 3.41 (m, 1H), 3.37 – 3.33 (m,

2H), 2.93 (s, 6H), 1.83 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 1.64 – 0.92 (m, 22H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta = 173.14, 171.87, 168.84, 150.55, 127.85, 125.31, 111.04, 61.00, 47.56, 46.33, 39.85, 32.43, 32.04, 30.63, 25.81, 25.34, 24.81, 24.57, 24.30$ . HRMS (ESI)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 461.3121, Calcd. for  $\text{C}_{25}\text{H}_{41}\text{N}_4\text{O}_4$ : 461.3122.

***N*-(1-(*tert*-Butylamino)-2-methyl-1-oxopropan-2-yl)-*N*-(6-(hydroxyamino)-6-oxohexyl)-benzamide (5c)**. White solid; 48% yield; mp. 107 °C;  $t_{\text{R}} = 10.93$  min, purity = 95.5%;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta = 10.27$  (s, 1H), 8.63 (s, 1H), 7.44 – 7.34 (m, 5H), 6.65 (s, 1H), 3.28 – 3.22 (m, 2H), 1.80 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 1.42 – 0.87 (m, 21H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta = 173.01, 170.86, 168.75, 138.24, 128.70, 128.21, 125.80, 61.55, 49.74, 46.08, 31.92, 30.44, 28.44, 25.71, 24.26, 24.02$ . HRMS (ESI)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 392.2543, Calcd. for  $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_4$ : 392.2544.

***N*-(1-(Cyclohexylcarbamoyl)cyclohexyl)-*N*-(6-(hydroxyamino)-6-oxohexyl)benzamide (5d)**. Slight orange solid; 27% yield; mp. 98 °C;  $t_{\text{R}} = 14.93$  min, purity = 95.7%;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta = 10.23$  (s, 1H), 8.58 (s, 1H), 7.52 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 7.44 – 7.36 (m, 5H), 3.58 – 3.52 (m, 1H), 3.25 – 3.22 (m, 2H), 2.18 – 0.86 (m, 28H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta = 172.50, 172.36, 168.67, 138.30, 129.04, 128.27, 126.21, 63.93, 47.10, 46.60, 32.24, 31.92, 29.89, 25.79, 25.22, 25.04, 24.45, 24.32, 22.03$ . HRMS (ESI)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 458.3013, Calcd. for  $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{N}_3\text{O}_4$ : 458.3013.

***N*-(2-(Cyclohexylamino)-2-oxo-1-phenylethyl)-*N*-(6-(hydroxyamino)-6-oxohexyl)benzamide (5e)**. White solid; 33% yield; mp. 87 °C;  $t_{\text{R}} = 14.06$  min, purity = 99.3%;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta = 10.28 - 10.15$  (m, 1H), 8.61 (s, 1H), 8.05<sup>\*</sup>/7.81 (bs, 1H), 7.45 – 7.19 (m, 9H), 6.04<sup>\*</sup>/5.27 (bs, 1H), 3.64 – 3.63 (m, 1H), 3.23 – 3.02 (m, 2H), 1.75 – 0.56 (m, 18H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta = 171.21, 171.00, 168.93, 168.16, 167.97, 137.10, 136.59, 129.22, 128.88, 128.55, 128.04, 126.16, 65.05, 60.86, 47.70, 46.97, 46.83, 44.89, 32.12, 25.17, 24.55, 24.48$ . HRMS (ESI)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 466.2698, Calcd. for  $\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{N}_3\text{O}_4$ : 466.2700.

***N*-(2-(Cyclohexylamino)-2-oxo-1-(*p*-tolyl)ethyl)-*N*-(6-(hydroxyamino)-6-oxohexyl)benzamide (5f)**. White solid; 47% yield; mp. 80 °C;  $t_{\text{R}} = 14.10$  min, purity = 96.4%;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta = 10.26 - 10.24$  (m, 1H), 8.62 – 8.61 (m, 1H), 7.94/7.75<sup>\*</sup> (s, 1H), 7.44 – 7.06 (m, 9H), 5.99/5.22<sup>\*</sup> (s, 1H), 3.63 – 3.61 (m, 1H), 3.21 – 3.05 (m, 2H), 2.30 (s,

3H), 1.76 – 0.67 (m, 18H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 168.95, 168.87, 168.47, 137.31, 137.14, 133.48, 129.17, 129.07, 128.92, 128.51, 128.36, 126.15, 47.67, 32.20, 32.11, 26.01, 25.15, 24.54, 24.47, 20.68. HRMS (ESI)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 480.2856, Calcd. for  $\text{C}_{28}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_4$ : 480.2857.

### 3. References

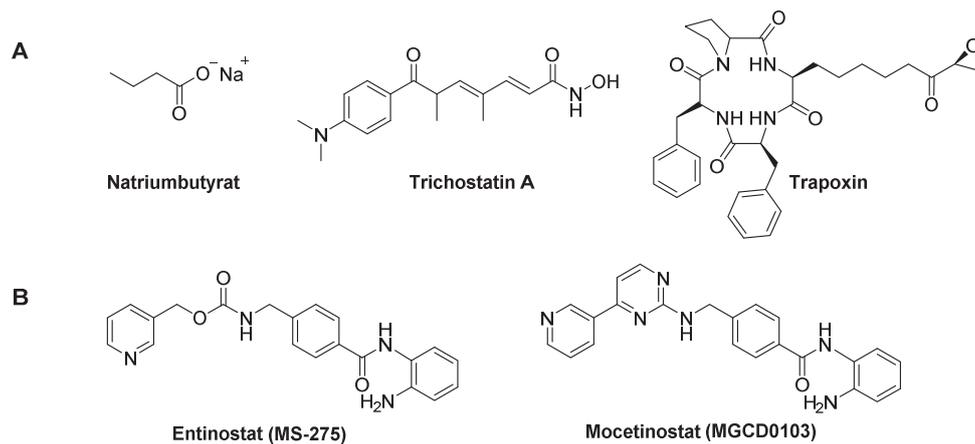
1. Hai, Y.; Christianson, D. W. Histone deacetylase 6 structure and molecular basis of catalysis and inhibition. *Nat. Chem. Biol.* **2016**, *12*, 741–747.
2. Marek, L.; Hamacher, A.; Hansen, F. K.; Kuna, K.; Gohlke, H.; Kassack, M. U.; Kurz, T. Histone deacetylase (HDAC) inhibitors with a novel connecting unit linker region reveal a selectivity profile for HDAC4 and HDAC5 with improved activity against chemoresistant cancer cells. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 427–436.

## 4. Peptoid-basierte 2-Aminoanilide als selektive HDAC-Inhibitoren

Im vorangegangenen Kapitel 3 wurden peptoid-basierte HDACI, mit einer Hydroxamsäure-Funktion als zinkbindende Gruppe, als potente HDAC-Inhibitoren identifiziert. Weiterhin wurde das Isoformprofil der aktivsten Vertreter der peptoid-basierten Hydroxamsäuren (Verbindungen **4d\***, **h\***, **j\*** und **k\***) in HDAC Enzym-Assays untersucht. Hierbei konnte eine leichte Präferenz für HDAC1 gegenüber den HDAC-Isoformen 6 und 8 festgestellt werden. Aufgrund der häufig unspezifischen HDAC-Inhibition und der potentiellen Mutagenität der Hydroxamsäuren wird neben der Arbeit an verbesserten Hydroxamsäuren als HDACI parallel an der Entwicklung von alternativen zinkbindenden Gruppen geforscht. Die 2-Aminoanilide sind als zinkbindende Gruppe für ihre ausgeprägte Selektivität gegenüber der HDAC-Klasse I bekannt. So sollen im folgenden Kapitel peptoid-basierte 2-Aminoanilide als alternative und potente HDACI entwickelt werden.

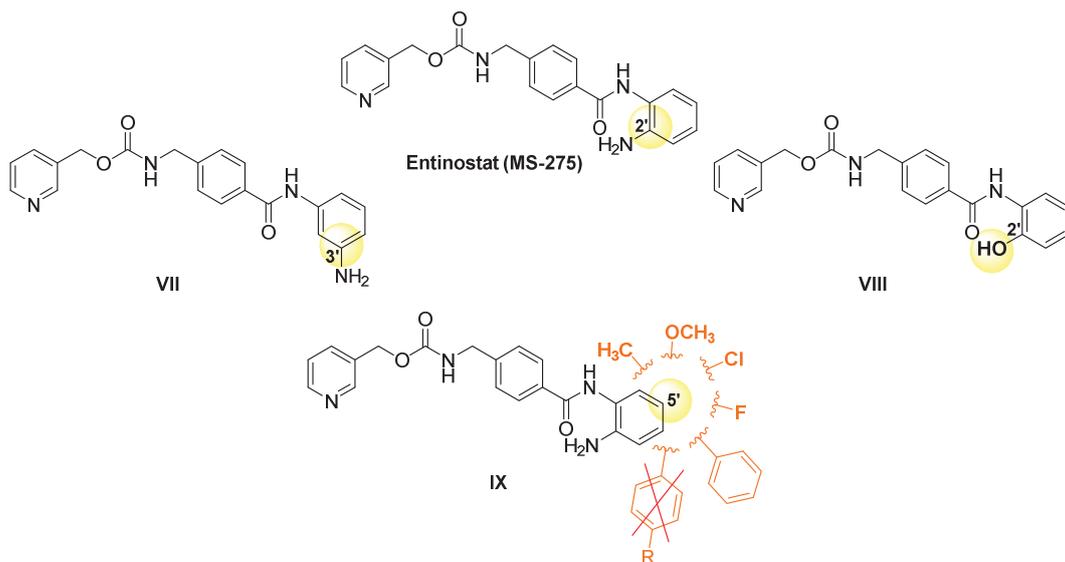
### 4.1 2-Aminoanilide

Neben den Hydroxamsäuren handelt es sich bei den 2-Aminoaniliden um eine weitere wichtige Klasse von HDAC-Inhibitoren. Diese weisen, im Gegensatz zu den meisten Hydroxamsäuren, ein anderes Selektivitätsprofil auf. So inhibieren Entinostat (MS-275) [42] und Mocetinostat (MGCD0103) [43] bevorzugt HDAC1-3 (Klasse I). 1997 wurde von *Suzuki* und Mitarbeitern die HDAC-Hemmung und Antitumoraktivität von diversen 2-Aminoaniliden, wie z. B. von Entinostat, sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* nachgewiesen.[85] Diese 2-Aminoanilide unterschieden sich strukturell von den bekannten HDAC-Inhibitoren wie Natriumbutyrat, Trichostatin A und Trapoxin (Abbildung 37).



**Abbildung 37.** Struktureller Vergleich der HDAC-Inhibitoren.[86]

*Suzuki* und Mitarbeiter zeigten 1999, dass das Entinostat-Derivat **VII**, welches eine 3'-Amino-Gruppe statt einer 2'-Amino-Gruppe (**VIII**) trägt, keine Aktivität im HDAC-Assay aufwies (Abbildung 38).[86]

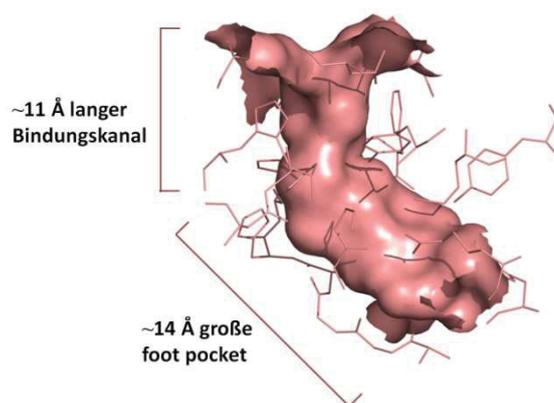


**Abbildung 38.** Entinostat (MS-275) und Entinostat-Analoga **VII**, **VIII** und **IX**. [52, 86]

Weitere Untersuchungen der Strukturaktivitätsbeziehungen der Entinostat-Derivate (MS-275) bestätigten die zuvor von *Suzuki* und Mitarbeitern aufgestellten Erkenntnisse. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Substitution der Amino-Gruppe in Position 2' durch eine Hydroxy-Gruppe in einem vergleichbaren  $IC_{50}$ -Wert resultiert, ebenso wie zusätzliche Substitutionen in Position 5'. Diese sind bis zu einer Größe eines Phenylrestes möglich (Abbildung 38).[86]

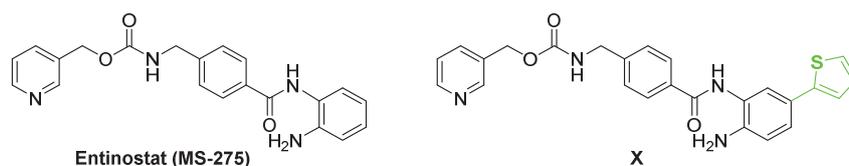
### 4.1.1 Foot pocket der HDAC-Klasse I

Die bisher vorgestellten Derivate des Entinostat (MS-275) stellen einen Ausgangspunkt für die Synthese Klasse I selektiver HDAC-Inhibitoren dar. Ebenfalls wird dies durch die Entdeckung einer etwa 14 Å großen foot pocket (FP), die an das aktive Zentrum grenzt, ermöglicht (Abbildung 39). Die FP konnte zunächst anhand von Kristallstrukturen in HDLP (bakterielles Homolog der HDAC-Klasse I) sowie später in HDAC1, 2, 3 und 8 identifiziert werden.<sup>23</sup>[87]



**Abbildung 39.** Oberflächendarstellung des ~11 Å langen Bindungskanals und der ~14 Å großen foot pocket von HDAC2 (PDB: 3MAX).

Die Sequenzübereinstimmung von HDLP und der humanen HDAC1 beträgt 35.2%. [87] Demzufolge erstellten *Wiech* und Mitarbeiter 2004, basierend auf der Kristallstruktur von HDLP, ein Homologiemodell von HDAC1. [87] Anhand der Dockingstudien konnte gezeigt werden, dass durch eine Substitution in *para*-Position zur freien Aminogruppe die FP adressiert werden kann und somit selektivere Inhibitoren synthetisiert werden können. Dies zeigte sich in dem veränderten Selektivitätsprofil der neu synthetisierten Leitstruktur **X** (Abbildung 40). Im Vergleich zu Entinostat (MS-275) weist die Leitstruktur **X** kaum eine Inhibition von HDAC3 auf. [88]

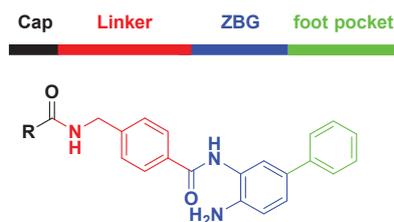


**Abbildung 40.** Entinostat (MS-275) und ein Thienylanalogon (**X**) von Entinostat. [88]

<sup>23</sup> Die FP in den HDACs 1, 2, 3 und 8 ist unterschiedlich groß.

Im Gegensatz zu den unsubstituierten 2-Aminoaniliden, weisen die *para*-arylsubstituierten Derivate eine höhere Selektivität für HDAC1 und 2 gegenüber HDAC3 und 8 auf.[88, 89] Im aktiven Zentrum der HDAC3 liegt am Ende der FP ein Tyrosin vor, wohingegen sich bei HDAC8 ein Tryptophan am Ende des etwa 11 Å langen Tunnels befindet. Diese sperrigen Aminosäuren sind bei HDAC1 und 2 jeweils durch ein Serin und ein Leucin ersetzt und erweitern somit den Eingangsbereich zur FP. Dadurch wird die Inhibition durch *para*-substituierte 2-Aminoanilide ermöglicht. Weitere Substituenten wie Phenyl, 2-Furyl und 2- oder 3-Thienyl sind ebenfalls mit der FP kompatibel, welches vermuten lässt, dass hydrophobe Wechselwirkungen für die höhere HDAC1 und 2 Selektivität verantwortlich sind.[88]

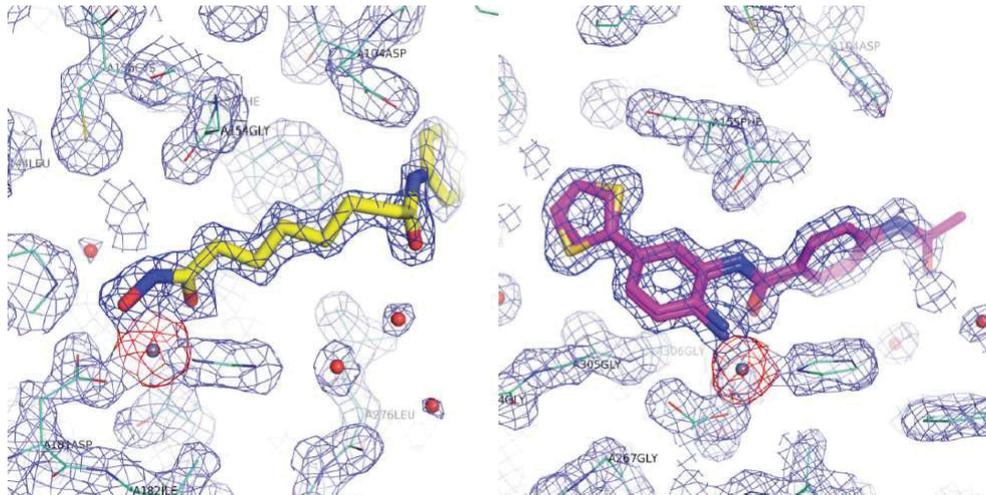
Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wurde ein angepasstes Pharmakophormodell für selektive HDAC1 und 2 Inhibitoren vom 2-Aminoanilidtyp vorgeschlagen (Abbildung 41).[90]



**Abbildung 41.** Pharmakophormodell für selektive HDAC1 und 2 Inhibitoren vom 2-Aminoanilidtyp.[90]

#### 4.1.2 Bindungsmechanismus der 2-Aminoanilide

Die Hemmung der HDACs durch HDAC-Inhibitoren wirkt sich auf wesentliche zelluläre Funktionen aus. Daher ist es umso wichtiger die Bindungskinetik dahinter zu verstehen. Hierbei unterscheiden sich die kinetischen Eigenschaften der Hydroxamsäuren im Vergleich zu den selektiven HDAC-Inhibitoren der HDAC-Klasse I. Eine Betrachtung der Bindungsmechanismen der Hydroxamsäuren und 2-Aminoanilide bzw. 2-Aminophenylanilide zeigt, dass beide Inhibitorklassen das  $Zn^{2+}$ -Ion in einer trigonal bipyramidalen Art und Weise chelatisieren (Abbildung 42).[91]

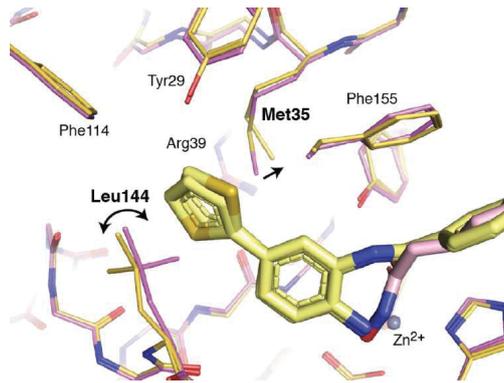


**Abbildung 42.** Stereoansicht der Elektronendichte im aktiven Zentrum von HDAC2 für Vorinostat (links; PDB: 4LXZ) und ein *para*-arylsubstituiertes 2-Aminoanilid (rechts; PDB: 4LY1).[91]

Dennoch weisen 2-Aminoanilide im Vergleich zu den Hydroxamsäuren eine andere Bindungskinetik auf. Diese ist durch längere Verweilzeiten und langsamere kinetische Assoziations- und Dissoziationskonstanten geprägt (slow- and tight-binding). *Para*-substituierte 2-Aminoanilide zeigen zusätzlich eine 3 bis 13-fach längere Verweilzeit als Entinostat (MS-275) auf.[91]

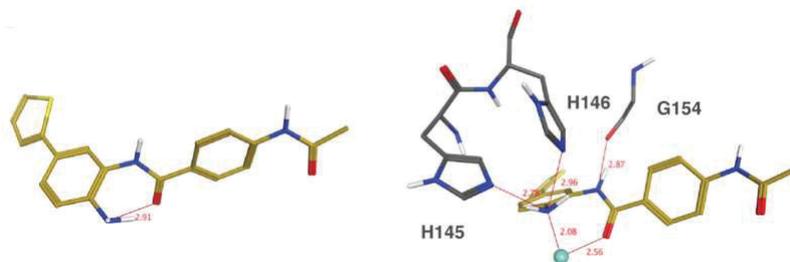
Die Pan-Inhibitoren Vorinostat (SAHA) und Trichostatin A (TSA) (beides Hydroxamsäuren) sind von einer schnellen Bindungskinetik geprägt (fast-on/fast-off).[92] So leitet sich die erste Konsequenz dieser langsamen Kinetik der 2-Aminoanilide auf die IC<sub>50</sub>-Bestimmung ab. Hierbei muss auf die Inkubationszeit geachtet werden, um einen Gleichgewichtszustand der 2-Aminoanilide gewährleisten zu können.[92] Die Ursache der langsamen Bindungskinetik, könnte mit der erforderlichen Umstrukturierung des Enzyms einhergehen. Die Integration der Aryl bzw. Biaryl-Einheit des Inhibitors in die etwa 14 Å große foot pocket (FP) erfordert eine Umorientierung zweier Aminosäureseitenketten. Hierbei handelt es sich einerseits um eine Bewegung des Leu-144 (rotamer flip) und andererseits um eine Verschiebung der Seitenkette von Met-35 um etwa 1 Å (Abbildung 43).<sup>24</sup>[91, 93]

<sup>24</sup> Bei den erwähnten Aminosäuren (AS) handelt es sich um die AS aus HDAC2.



**Abbildung 43.** Umstrukturierung der umliegenden Aminosäuren in der FP bei der Bindung eines 2-Aminophenylanilids (gelb) und Vorinostat (pink) in HDAC2 (PDB: 4LXZ).[91]

Weiterhin trägt der interne Bruch einer Wasserstoffbrücke zwischen dem Amin und dem Carbonyl des Amids zu einer verlangsamten Chelatisierung des  $Zn^{2+}$ -Ions bei (Abbildung 44). Die Stabilisierung erfolgt durch die Knüpfung von zwei neuen Wasserstoffbrücken. Diese werden zwischen dem Amin und zwei Histidinen (His-145 und His-146) ausgebildet. Die Interaktion des Glycins (Gly-154) mit dem Amidstickstoff stellt einen weiteren Stabilisierungspunkt des 2-Aminophenylanilids im aktiven Zentrum von HDAC2 dar.

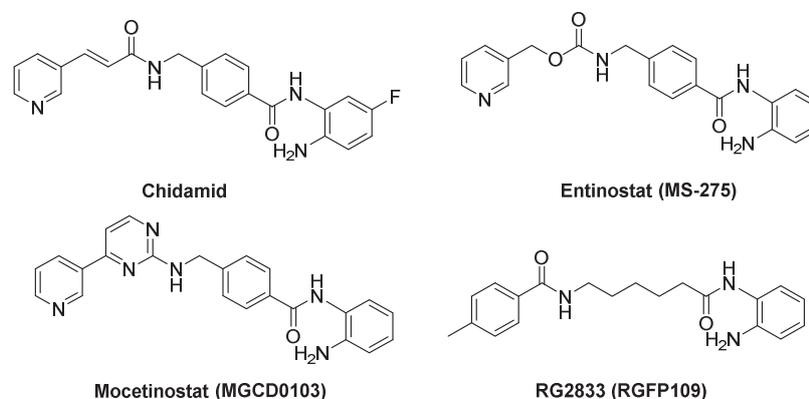


**Abbildung 44.** Intramolekulare Wasserstoffbrücke (links) und neugeknüpfte Wasserstoffbrücken zu den Histidinen His-145 und His-146 im aktiven Zentrum von HDAC2 (rechts; PDB: 4LXZ).[91]

Die Bindung von Hydroxamsäuren wird hingegen durch eine geradlinige Bindungstrajektorie beschrieben. Bei dem Eintritt der Hydroxamsäure in die Bindungstasche und die Chelatisierung des  $Zn^{2+}$ -Ions ist weder eine Umstrukturierung des Enzyms, noch der Bruch einer intramolekularen Wasserstoffbrücke des Liganden erforderlich.[91] Diese Mechanismen erklären die zugrundeliegende unterschiedliche Kinetik der Hydroxamsäuren und der 2-Aminoanilide bzw. 2-Aminophenylanilide.

### 4.1.3 2-Aminoanilide in der Therapie von Tumorerkrankungen

Die 2-Aminoanilide repräsentieren neben den Hydroxamsäuren eine alternative zinkbindende Gruppe. Im Gegensatz zu den Hydroxamsäuren inhibieren diese selektiv die HDACs der Klasse I. Aufgrund dessen befinden sich immer mehr 2-Aminoanilide in fortgeschrittenen klinischen Studien. Neben dem Chidamid, das 2015 in China von der Chinese Food and Drug Administration (CFDA) für das periphere T-Zell Lymphom (PTCL) zugelassen wurde,[44] handelt es sich bei Entinostat (MS-275, Phase 3) um einen weiteren fortgeschrittenen Wirkstoffkandidaten. Dieser wird in der Therapie des Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinoms in der Kombination mit dem Aromatasehemmer Exemestan untersucht (Abbildung 44).[45, 46] Entinostat soll dabei für die Sensitivitätserhöhung der östrogenrezeptor-positiven ( $ER^+$ ) Brustkrebszellen gegenüber der Antiöstrogentherapie verantwortlich sein und stellt damit eine Möglichkeit zur Resistenzüberwindung gegenüber dem östrogenrezeptor-positivem ( $ER^+$ ) Mammakarzinom dar.[46] Mocetinostat, ein weiterer Vertreter der 2-Aminoanilide, befindet sich in Phase 2 zur Therapie des myelodysplastischen Syndroms (MDS), des Hodgkin Lymphoms sowie der akuten myeloischen Leukämie (AML).[45]



**Abbildung 45.** 2-Aminoanilide in fortgeschrittenen klinischen Studien.

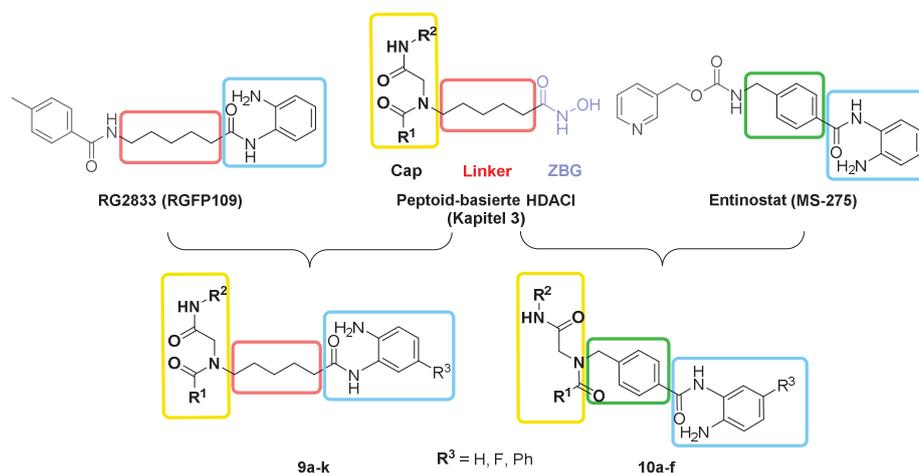
Einen weiteren interessanten Vertreter repräsentiert RG2833 (RGFP109, Abbildung 45). Hierbei konnte festgestellt werden, dass RG2833 in der Lage ist die Chromatinstruktur am *FXN* Gen aufzulockern, welches eine erhöhte Expression des Frataxins<sup>25</sup> zur Folge hat.[94] Weiterhin konnte gezeigt werden, dass insbesondere Pimelinsäure (Heptandisäure)-basierte 2-Aminoanilide, welche HDAC3 am stärksten inhibieren, die *FXN* Genexpression

<sup>25</sup> **Frataxin** ist ein kleines Protein, das in die Bildung eisenhaltiger und schwefelhaltiger Proteine, sowie dem mitochondrialen Eisentransport involviert ist. Ein Frataxinmangel führt zu einem fehlerhaften Energiestoffwechsel in den Mitochondrien.

erhöhen.[92] Deshalb wird RG2833 (RGFP109) derzeit in einer Phase I Studie zur Therapie der Friedreich-Ataxie<sup>26</sup> erprobt.

## 4.2 Zielsetzung

Basierend auf dem Isoformprofil ausgewählter peptoid-basierter Hydroxamsäuren aus Kapitel 3 wurde das Augenmerk auf peptoid-basierte 2-Aminoanilide als selektive HDAC-Inhibitoren der Klasse I gerichtet. Die 2-Aminoanilide repräsentieren neben den Hydroxamsäuren ebenfalls potente HDACI und weisen im Gegensatz zu den Hydroxamsäuren sowohl eine geringere Mutagenität, als auch ein selektiveres Isoformprofil auf. So sollten durch die Hybridisierung der peptoid-basierten Hydroxamsäuren **4a-k**\* mit zwei Vertretern der 2-Aminoanilide, RG2833 (RGFP109) und Entinostat (MS-275), zwei unterschiedliche Klassen an HDAC-Inhibitoren entstehen (Abbildung 46). Beide Klassen weisen Gemeinsamkeiten hinsichtlich ihres Peptoidrückgrats und der zinkbindenden Gruppe auf. Das Peptoidrückgrat entspricht dabei dem der peptoid-basierten Hydroxamsäuren **4a-k**\*, wohingegen die 2-Aminoanilidstruktur die zinkbindende Gruppe widerspiegelt. Die beiden Klassen unterscheiden sich somit hinsichtlich ihrer Linkerregion. Während die Vertreter **9a-k** durch eine aliphatische Linkerregion geprägt sind (siehe RG2833), weisen die Verbindungen **10a-f** eine benzyliche Linkerregion auf (siehe Entinostat, Abbildung 46).



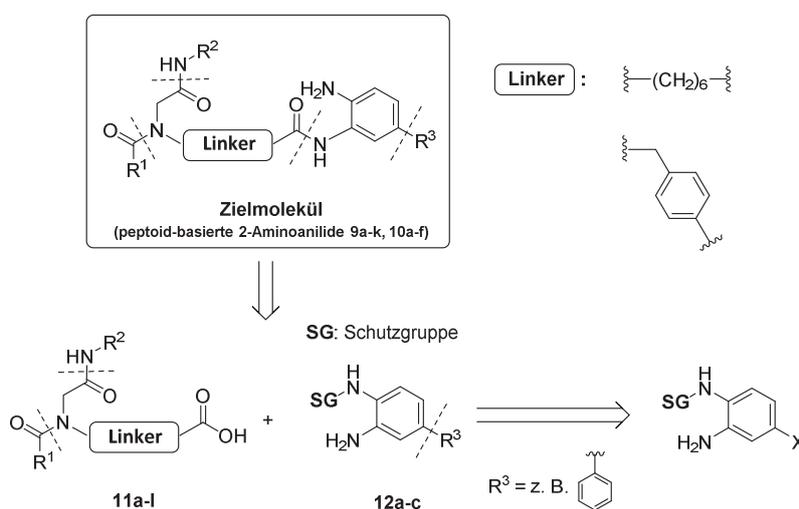
**Abbildung 46.** Hybridisierung der HDACI RG2833 und Entinostat mit den peptoid-basierten HDACI (Kapitel 3).

<sup>26</sup> Die **Friedreich-Ataxie** ist eine neurodegenerative Erkrankung. Diese wird durch eine erhöhte Eisenkonzentration in den Mitochondrien bewirkt. Diese resultiert aus einer fehlerhaften Funktion des Frataxins.

Das Ziel der Substitutionen in Position R<sup>3</sup> war eine Steigerung der Selektivität und Potenz gegenüber den Isoformen HDAC1 und 2. Die synthetisierten Verbindungen sollten ebenfalls auf ihre HDAC-Inhibition und Zytotoxizität *in vitro* untersucht werden.

### 4.3 Retrosynthetische Analyse

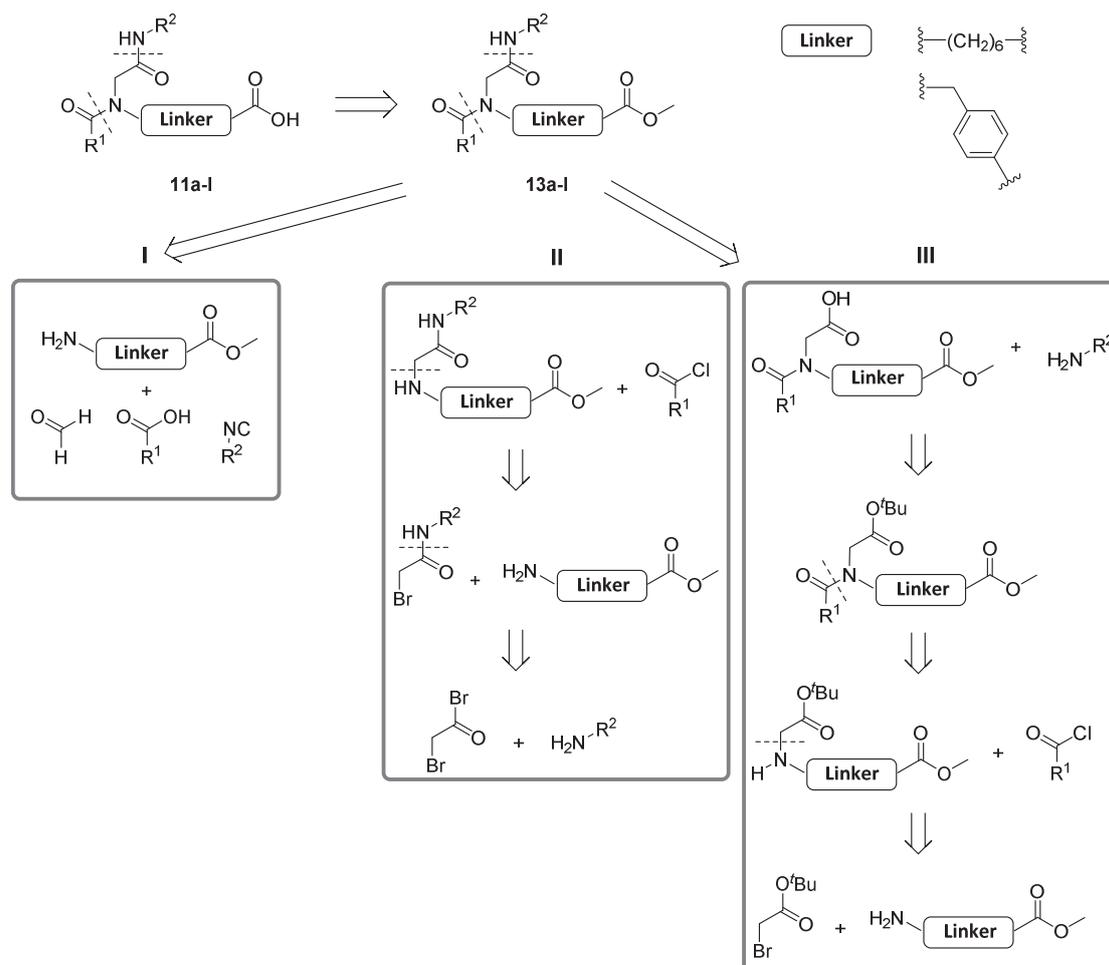
Eine erfolgreiche Synthese eines Zielmoleküls erfordert eine retrosynthetische<sup>27</sup> Analyse. Die Retrosynthese der peptoid-basierten 2-Aminoanilide **9a-k** und **10a-f** wurde in Anlehnung an die Synthese der peptoid-basierten Hydroxamsäuren aus Kapitel 3 durchgeführt. Dabei ergab die retrosynthetische Analyse des Zielmoleküls vier mögliche Schnittstellen (Schema 1). Demnach ist das Zielmolekül durch Acylierung der Carbonsäuren **11a-l** mit den aminogeschützten 1,2-Phenylendiaminderivaten **12a-c** zugänglich. Die Einführung, beispielsweise eines Phenylrestes in Position R<sup>3</sup>, könnte durch eine Kreuzkupplung erfolgen.



**Schema 1.** Erste Schritte der retrosynthetischen Analyse des Zielmoleküls.

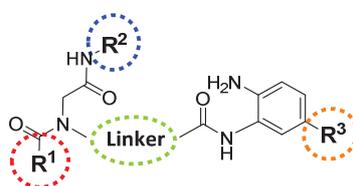
Die Carbonsäuren **11a-l** können aus den entsprechenden Estern **13a-l** durch eine Hydrolyse erhalten werden (Schema 2).

<sup>27</sup> Eine **Retrosynthese** beschäftigt sich mit der Synthesepaltung eines Zielmoleküls. Dabei wird die Zielstruktur in kleinere Bausteine zerlegt, für deren Verknüpfung bereits Synthesebeispiele bekannt sind.



**Schema 2.** Retrosynthetische Analyse der peptoid-basierten 2-Aminoanilide **9a-k** und **10a-f** anhand der Ugi-4-Komponenten Reaktion **I** und der Submonomermethoden **II** und **III**.

Die retrosynthetische Analyse ergab weiterhin, dass das Peptoidrückgrat auf zwei unterschiedlichen Synthesewegen aufgebaut werden kann. Hierbei handelt es sich um die Ugi-4-Komponenten Reaktion<sup>28</sup> I und die Submonomermethode II. Die Submonomermethode II bietet die Möglichkeit zur Variation des Restes R<sup>1</sup>. Aus der Submonomermethode II resultiert durch geringfügige Modifikation der Ausgangssubstanz Bromacetylbromid, ein weiterer möglicher Syntheseweg III (Schema 2). Die modifizierte Submonomermethode III, ausgehend von *tert*-Butylbromacetat und einem Amin, bietet den Vorteil den Rest R<sup>2</sup>, bei gleichbleibendem Rest R<sup>1</sup>, schnell variieren zu können.<sup>29</sup> Diese drei Synthesewege sollten somit einen effizienten Zugriff auf eine Substanzbibliothek mit großer struktureller Diversität ermöglichen (Abbildung 47).

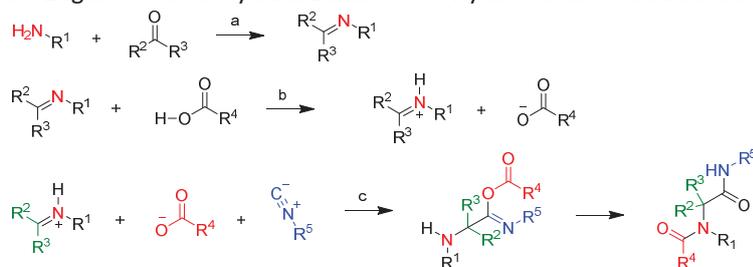


**Abbildung 47.** Variationen der Linkerregion und der Reste R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> und R<sup>3</sup>.

## 4.4 Literaturübersicht

Im folgenden Abschnitt soll eine Literaturübersicht zur Synthese von Peptoid-Derivaten und einiger wichtiger Vorstufen zur Synthese von peptoid-basierten 2-Aminoaniliden vorgestellt werden.

<sup>28</sup> Bei der **Ugi-4-Komponenten Reaktion** handelt es sich um eine Mehrkomponentenreaktion, die erstmals im Jahre 1962 von Ivar Ugi beschrieben wurde.[95] Hierbei wird ein Amin, eine Carbonylkomponente, eine Carbonsäure und ein Isocyanid umgesetzt. Das Amin und die Carbonylkomponente setzen sich zu einem Imin um, welches bei der anschließenden Zugabe einer Carbonsäure protoniert wird und sich schlussendlich nach der Zugabe eines Isocyanids zu einem  $\alpha$ -Acylaminocarbonsäureamid umlagert (Schema unten).



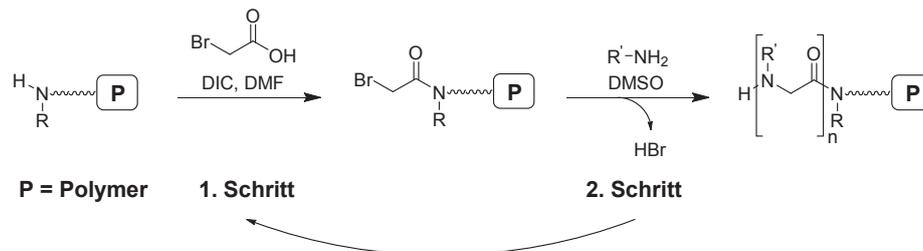
a) Amin (1.2 Äquiv.), Carbonylkomponente (1.2 Äquiv.), Molekularsieb, MeOH (trocken), RT, 30 min.  
b) Carbonsäure (1.0 Äquiv.), RT, 10 min. c) Isocyanid (1.0 Äquiv.), RT, 16 h.

**Schema.** Ugi-4-Komponenten Reaktion.

<sup>29</sup> Die Submonomermethode III ist von Vorteil, wenn die Einführung des Restes R<sup>2</sup> nicht in einer Ugi-Reaktion stattfinden kann, wenn das Isocyanid nicht käuflich erwerbbar, bzw. nicht leicht zugänglich ist.

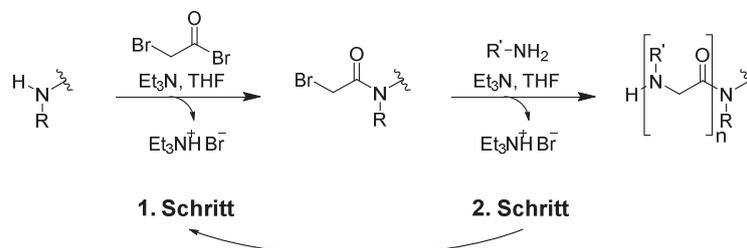
#### 4.4.1 Submonomermethode – Festphase und Flüssigphase

Im Jahre 1992 beschrieben *Zuckermann* und Mitarbeiter erstmals eine effiziente Synthese von Peptiden.[96] Es handelte sich dabei um die Submonomermethode, die sie erfolgreich an der festen Phase<sup>30</sup> etablieren konnten. Hierbei werden in zwei aufeinanderfolgenden Schritten ein Monomer nach dem anderen auf einem Rink-Amid-Harz<sup>31</sup> (P = Polymer) aufgebaut (Schema 3).



**Schema 3.** Schritt 1 und 2 der Submonomermethode an der festen Phase.

Im 1. Schritt der Submonomermethode findet eine Acylierung eines Amins mit Bromessigsäure unter Verwendung von Diisopropylcarbodiimid (DIC) in Dimethylformamid (DMF) statt. Bei der anschließenden Zugabe eines primären Amins resultiert in einer nukleophilen Substitutionsreaktion ( $S_N2$ ) der Austritt von Bromwasserstoff (HBr). Daraufhin folgt die Wiederholung des Zyklus. So können Peptide, bzw. *N*-substituierte Glycin-Oligomere, aus kommerziell leicht zugänglichen Chemikalien mithilfe der Festphasenmethode hergestellt werden. Aufbauend auf der bisher beschriebenen Submonomermethode von *Zuckermann* und Mitarbeitern an der festen Phase, entwickelten *Taillefumier* und Mitarbeiter im Jahre 2009 eine Alternative der Submonomermethode in der flüssigen Phase (Schema 4).[97]



**Schema 4.** Schritt 1 und 2 der Submonomermethode in der flüssigen Phase.

<sup>30</sup> Bei der **Festphasen**-Peptidsynthese handelt es sich um ein Verfahren zur Synthese von Peptiden aus einzelnen Aminosäuren (oder Aminosäuren-Analoga). Die Synthese wird auf der festen Phase, einem Polymer (z. B. Polystyrol) durchgeführt. In mehreren aufeinanderfolgenden und sich wiederholenden Schritten wird eine Aminosäurekette aufgebaut.

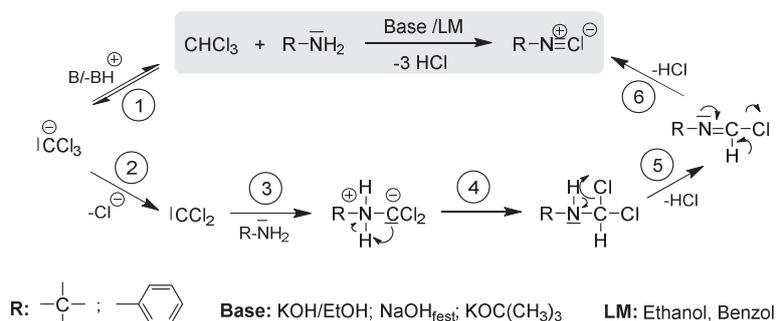
<sup>31</sup> Das **Rink-Amid Harz** ist ein säurelabiler Vertreter der festen Phase. Die Abspaltung mit über 90% Trifluoressigsäure (TFA) in Dichlormethan ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) liefert ein C-terminales Amid.

Im Gegensatz zur Submonomermethode an der festen Phase wird statt Bromessigsäure Bromacetylbromid eingesetzt. In zwei aufeinanderfolgenden Substitutionsreaktionen wird das entsprechende Peptoid erhalten. Der Wechsel des Lösungsmittels (statt Dichlormethan (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) wird Tetrahydrofuran (THF) verwendet) ermöglicht die Filtration des entstandenen Ammoniumsalzes (Et<sub>3</sub>N<sup>+</sup>Br<sup>-</sup>). Das alkylierte Amin wird im 2. Schritt nach der Filtration des Salzes durch Säulenchromatographie gereinigt.

#### 4.4.2 Synthese von Isocyaniden

Bei den Isocyaniden handelt es sich um geruchsintensive und teils giftige Verbindungen. Dementsprechend ist es von großer Wichtigkeit diese auf eine effiziente Art und Weise zu synthetisieren. Das erste Isocyanid wurde 1859 von *Lieke* aus Allyliodid und Silbercyanid hergestellt.[98] Es handelte sich dabei um Allylisocyanid. Weitere gängige Möglichkeiten stellen die Synthesen aus *N*-substituierten Formamiden dar. Hierbei können durch die Dehydratation von Formamiden mit Phosphoroxychlorid, Phosgen oder Diphosgen und dem Einsatz einer Base Isocyanide erhalten werden.[99] Diese Dehydrationsmittel sind jedoch sehr giftige Stoffe. Bei einer weniger toxischen Methode werden Sulfonylchloride als Dehydrationsmittel in Gegenwart einer Base eingesetzt.[100] Diese Reagenzien werden jedoch hauptsächlich bei *N*-Alkyl Formamiden verwendet.

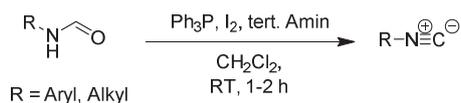
Eine weitere Alternative zu toxischen Reagenzien wird durch die Carbylamin Reaktion<sup>32</sup> beschrieben (Schema 5).



**Schema 5.** Isonitrilsynthese mittels KOH und Chloroform – Carbylamin Reaktion.[101]

<sup>32</sup> Die **Carbylamin Reaktion** ist auch bekannt unter dem Namen Hofmann Isonitril Synthese. Diese Reaktion wird als Nachweisreaktion für primäre Amine verwendet.[101] Liegt ein primäres Amin vor, kommt es zur Bildung eines Isocyanids und damit zur Entwicklung geruchsintensiver Düfte. Sekundäre und tertiäre Amine reagieren nicht zum entsprechenden Isocyanid, da die zugrundeliegenden Substitutionen am Stickstoff die vollständige Abspaltung der Chloride verhindert.

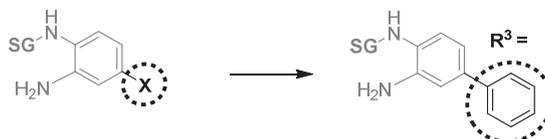
Der Einsatz einer Base wie Kaliumhydroxid führt zur Bildung von Dichlorcarben als Intermediat. Dieses addiert sich an das freie Elektronenpaar eines primären Amins und liefert in zwei aufeinanderfolgenden Eliminierungsreaktionen von Salzsäure (HCl) ein Isocyanid. Außerdem können Isocyanide durch die Reaktion von Triphenylphosphin, Iod und einem tertiären Amin erhalten werden (Schema 6).[102] Diese Methode ermöglicht es aus kostengünstigen, leicht zugänglichen und nicht toxischen Materialien Isocyanide innerhalb kurzer Reaktionszeiten herzustellen.



**Schema 6.** Synthese von Isocyaniden mittels Triphenylphosphin und Iod.[102]

#### 4.4.3 Synthese von Biphenylen

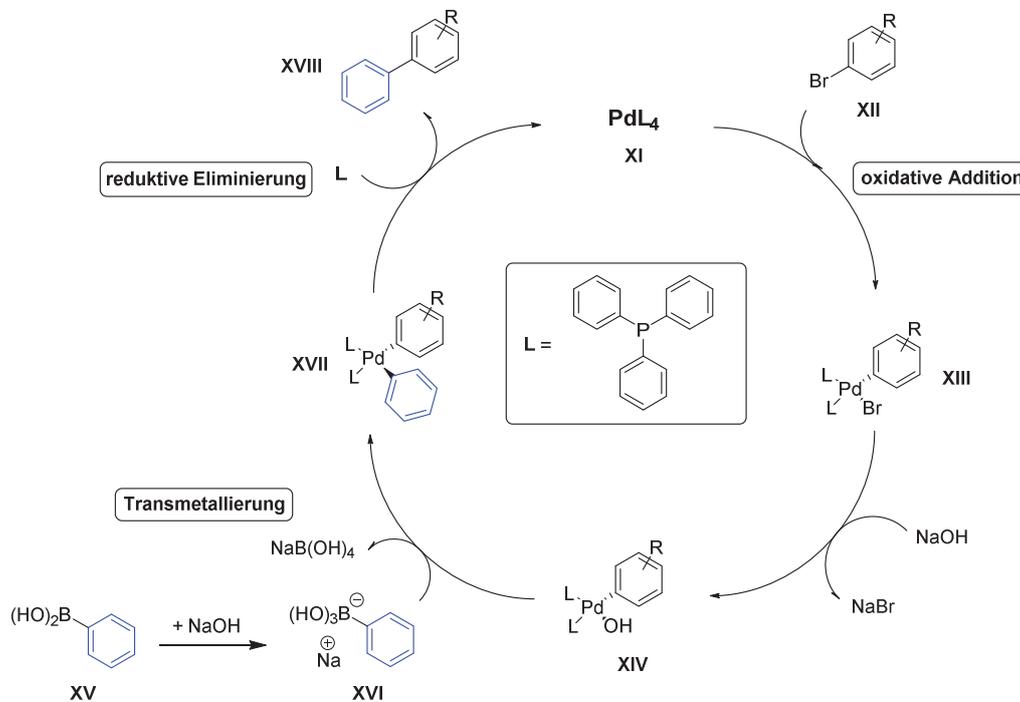
Die Einführung eines Phenylringes (wenn  $\text{R}^3 = \text{Phenyl}$ ) in das System erfordert die Knüpfung einer Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung (Abbildung 48). Dies kann durch eine Kreuzkupplung<sup>33</sup> erfolgen. Die bekannten Vertreter der Kreuzkupplungen stellen die Stille-, Negishi- und Suzuki-Kupplung dar. Die Stille-Kupplung ermöglicht die Knüpfung einer Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung durch den Einsatz von organischen Zinnverbindungen und Halogeniden. Jedoch handelt es sich bei Zinnorganyle um toxische Verbindungen. Die Negishi-Kupplung findet zwischen einem Zinkorganyl und einem Halogenid statt. Das Zinkorganyl ist aus dem Lithiumorganyl unter Einsatz von Zinkchlorid erhältlich. Aufgrund der Kompatibilität mit vielen funktionellen Gruppen, wird die Negishi-Kupplung oft verwendet. Eine weitere Methode der Kreuzkupplung ist die Suzuki-Kupplung. Diese wurde 1979 von *Suzuki* und Mitarbeitern beschrieben.[103] Hierbei reagieren Bororganyle mit Halogenaromaten unter Verwendung eines Palladiumkatalysators.



**Abbildung 48.** Einführung des Restes  $\text{R}^3$ .

<sup>33</sup> Bei einer **Kreuzkupplung** handelt es sich um eine Kupplungsreaktion, bei der die Knüpfung einer Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung durch einen metallischen Katalysator erfolgt.

Nach der oxidativen Addition eines Halogenaromaten **XII** an den Palladiumkomplex **XI**, erfolgt eine Transmetallierung zum Zwischenprodukt **XIV** unter Verwendung einer Base (Schema 7). Der vorliegende Diorganopalladium-Komplex **XVII** zerfällt in einer reduktiven Eliminierung in die organische Verbindung **XVIII** und den Palladiumkomplex **XI**.



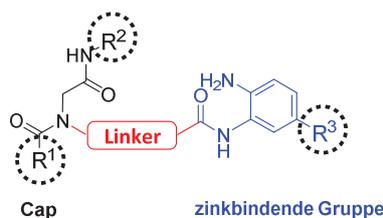
**Schema 7.** Schematische Darstellung des Suzuki-Mechanismus.

Nach *Suzuki* und Mitarbeitern ist die Verwendung einer Base wie NaOH zum einen für die Bildung des Boronates **XVI** und zum anderen für die Bildung des Organopalladium-Hydroxids **XIV** notwendig. Die neu resultierte Pd-O-Bindung ist polarer als die Pd-Br-Bindung und erleichtert aufgrund der höheren Elektrophilie die Transmetallierung.

## 4.5 Synthese der peptoid-basierten 2-Aminoanilide

Basierend auf den Ergebnissen der Literaturrecherche soll im Folgenden die Synthese der peptoid-basierten 2-Aminoanilide **9a-k** und **10a-f** illustriert werden. Zuerst wird die Synthese der Boc-geschützten 1,2-Phenylendiaminderivate **XX**, **XXII** und **XXVI** beschrieben. Anschließend folgt die Schilderung der Synthese des Peptoidrückgrats. Das Peptoidrückgrat kann mittels unterschiedlicher Synthesemethoden aufgebaut werden. Hierbei muss beachtet werden, welche Variation ( $\text{R}^1$  oder  $\text{R}^2$ ) im Vordergrund steht. Demzufolge können die peptoid-basierten 2-Aminoanilide **9a-k** und **10a-f** entweder in einer Reaktion ausgehend von

vier Komponenten (Amin, Carbonylkomponente, Carbonsäure und Isocyanid) in einer vierstufigen (Ugi-4-Komponenten Reaktion I) bzw. ausgehend von Bromacetyl bromid und einem Amin in einer sechsstufigen (Submonomermethode II) oder ausgehend von *tert*-Butylbromacetat und einem Amin in einer siebenstufigen (Submonomermethode III) Synthesesequenz hergestellt werden. Gemeinsam bieten diese drei Varianten einen effizienten Zugang zu peptoid-basierten 2-Aminoaniliden (Abbildung 49).



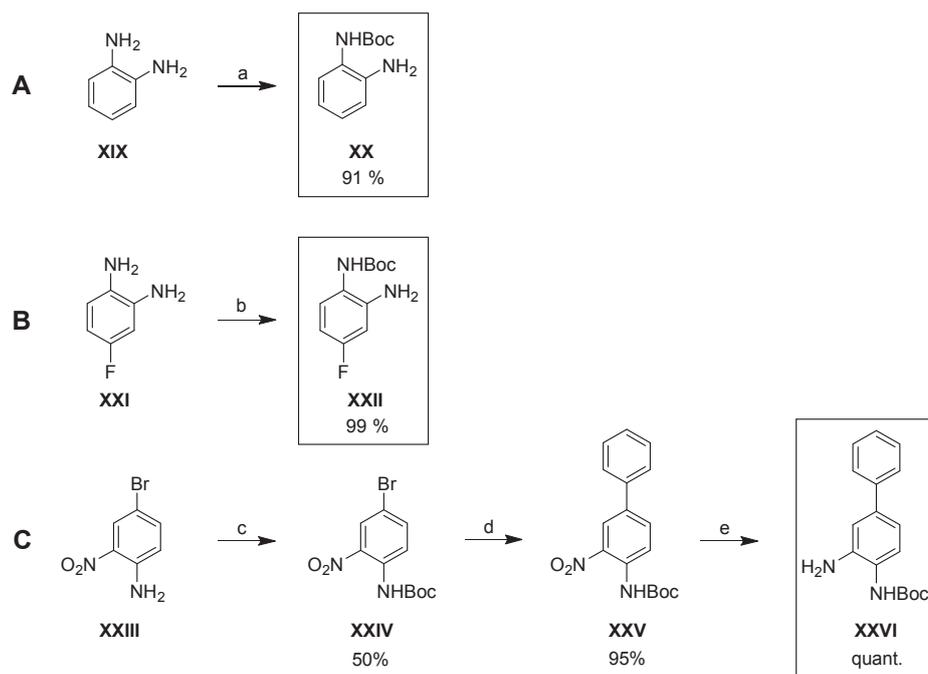
**Abbildung 49.** Mögliche Variationen des Peptoidgerüsts.

In der Ugi-4-Komponenten Reaktion I wird der Rest R<sup>2</sup> in Form eines Isocyanids eingeführt. Viele Isocyanide sind jedoch nicht käuflich erwerbbar oder sehr kostspielig. Um einen vielfältigeren Einsatz der Isocyanide gewährleisten zu können, müssen diese einzeln hergestellt werden. Daher wurde bei nicht kommerziell erhältlichen Isocyaniden der Submonomerweg verwendet.

#### 4.5.1 Darstellung der Boc-geschützten 1,2-Phenylendiaminderivate XX, XXII und XXVI

Die Einführung der zinkbindenden Gruppe sollte anhand einer Amidkupplung zwischen einer Carbonsäure und einem Boc-geschützten 1,2-Phenylendiaminderivat erfolgen (Schema 8). Die Schützung der entsprechenden Aminofunktion mit einer Schutzgruppe ermöglicht einen sauberen und selektiven Reaktionsverlauf der Amidkupplung. Hierbei fiel die Wahl auf die Boc-Schutzgruppe.<sup>34</sup> Bei der Boc-Schutzgruppe handelt es sich um eine säurelabile Gruppe, welche sich nach einer erfolgreichen Amidkupplung effizient und einfach mit einer Säure entfernen lässt. Die Reaktionsbedingungen für die Einführung der Boc-Gruppe sind von der jeweiligen Ausgangssubstanz abhängig (Schema 8).

<sup>34</sup> Die Abkürzung **Boc** steht für *tert*-Butyloxycarbonyl.



**Schema 8.** Synthese der Boc-geschützten 1,2-Phenyldiaminderivate **XX**, **XXII** und **XXVI**. (Reagenzien und Bedingungen: (a) 1,2-Phenyldiamin (10 Äquiv.),  $\text{Boc}_2\text{O}$  (1 Äquiv.),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$ , 16 h; (b) 4-Fluorbenzol-1,2-diamin (5 Äquiv.),  $\text{Boc}_2\text{O}$  (1 Äquiv.), ACN,  $50^\circ\text{C}$ , 16 h; (c) 4-Brom-2-nitroanilin (5 Äquiv.),  $\text{Et}_3\text{N}$  (5 Äquiv.),  $\text{Boc}_2\text{O}$  (1 Äquiv.), THF, Rückfluss, 16 h; (d) *tert*-Butyl (4-Brom-2-nitrophenyl)carbamate (1 Äquiv.), 2M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung,  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (0.06 Äquiv.),  $\text{PhB}(\text{OH})_2$  (1.1 Äquiv.), Toluol/Ethanol, Rückfluss, 3 h; (e) *tert*-Butyl (3-nitro-[1,1'-biphenyl]-4-yl)carbamate,  $\text{Pd}(\text{C})$  10% wt,  $\text{H}_2$ , MeOH, 16 h).

Im Falle des *tert*-Butyl-(2-aminophenyl)carbamats **XX** erfolgte die Synthese in Dichlormethan durch tropfenweise Zugabe von Di-*tert*-butyldicarbonat (Bocanhydrid,  $\text{Boc}_2\text{O}$ ) zu 10 Äquivalenten 1,2-Phenyldiamin **XIX** innerhalb von 2 h bei  $0^\circ\text{C}$  (Schema 8A). Das 1,2-Phenyldiamin **XIX** wird dabei im Überschuss vorgelegt, um eine mehrfache Umsetzung mit Bocanhydrid zu verhindern. In den Fällen von *tert*-Butyl-(2-amino-4-fluorphenyl)carbamate **XXII** und *tert*-Butyl-(4-brom-2-nitrophenyl)carbamate **XXIV** musste die Boc-Schutzung auf anderen Synthesewegen erfolgen (Schema 8B und C). Im Falle von B erfolgte die Einführung der Boc-Schutzgruppe bei  $50^\circ\text{C}$  in Acetonitril. Hierbei wurde das Produkt **XXII** in 99%iger Ausbeute erhalten. Im Falle von C konnte Verbindung **XXIV** erst unter Baseneinsatz (Triethylamin) und Rückfluss in Tetrahydrofuran nach 16 h in 50%iger Ausbeute erhalten werden. Die Durchführung der Synthese bei mildereren Bedingungen hatte hierbei

nicht zur Bildung des gewünschten Produktes **XXIV** geführt. Dies könnte an der deaktivierenden Wirkung der Nitro-Gruppe des Eduktes **XXIII** liegen.

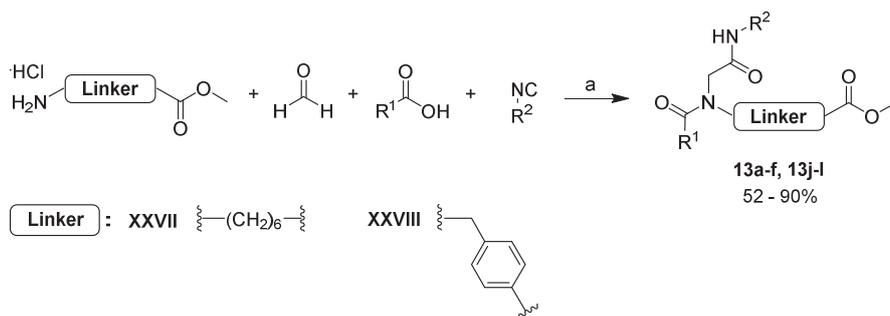
Ausgehend vom Boc-geschützten Produkt **XXIV** erfolgte die Knüpfung einer Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung in einer Suzuki-Kreuzkupplung zum Biphenylderivat **XXV**. Hierzu wurde **XXIV** mit Phenylboronsäure und dem Palladiumkatalysator Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> unter Baseneinsatz (Natriumcarbonat) in 3 h unter Rückfluss zum Produkt **XXV** umgesetzt. Nach Abschluss der Reaktion wurde die Reaktionslösung über Kieselgur filtriert. Anschließend wurde mit Ethylacetat verdünnt und mit Wasser und gesättigter NaCl-Lösung jeweils dreimal gewaschen. Die organische Phase wurde daraufhin über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Biphenylderivat **XXV** wurde als orangener Feststoff aus wenig Methanol in 95%iger Ausbeute ausgefällt. Eine anschließende Reduktion unter Verwendung von Wasserstoff und einem Palladiumkatalysator (Pd/C) in Methanol resultierte im Boc-geschützten Amin **XXVI** in quantitativer Ausbeute.

#### **4.5.2 Darstellung der 2-Aminoanilide 9a-h und 10a-f anhand der Ugi-4-Komponenten Reaktion I**

Die Ugi-4-Komponenten Reaktion ermöglicht eine zeit- und kosteneffiziente Synthese einer großen Vielfalt an Verbindungen. Die Reaktion des Amins **XXVII** bzw. **XXVIII** mit Formaldehyd<sup>35</sup> in trockenem Methanol führt innerhalb von 30 min zur Bildung des entsprechenden Imins. Die anschließende Zugabe einer Carbonsäure und nach weiteren 10 min eines Isocyanids resultierte innerhalb von 24 h in den jeweiligen Produkten **13a-q** (Schema 9). Anschließend wurde das Molekularsieb in den Reaktionslösungen abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach der säulenchromatographischen Reinigung der Rohprodukte mit *n*-Hexan/EtOAc (Gradient) als Eluent, wurden die Produkte **13a-q** in einer 52 – 90%igen Ausbeute, ausgefällt aus Ethylacetat und *n*-Hexan, erhalten (Schema 9).

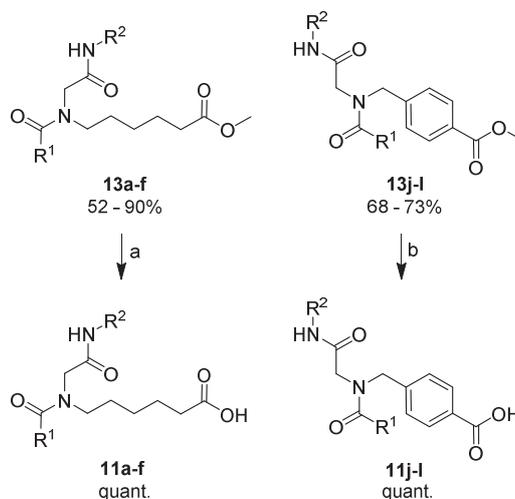
---

<sup>35</sup> Paraformaldehyd diente als **Formaldehyd**-Quelle.



**Schema 9.** Synthese der peptoid-basierten Schlüsselintermediate **13a-f** und **13j-l**. (Reagenzien und Bedingungen: (a) (i) Methyl-6-aminohexanoat-hydrochlorid (1.2 Äquiv.), Paraformaldehyd (1.2 Äquiv.),  $\text{Et}_3\text{N}$  (1.2 Äquiv.), MeOH, 4 Å MS, RT, 30 min; (ii)  $\text{R}^1\text{COOH}$  (1 Äquiv.), RT, 10 min; (iii)  $\text{R}^2\text{NC}$  (1 Äquiv.), RT, 24 h).

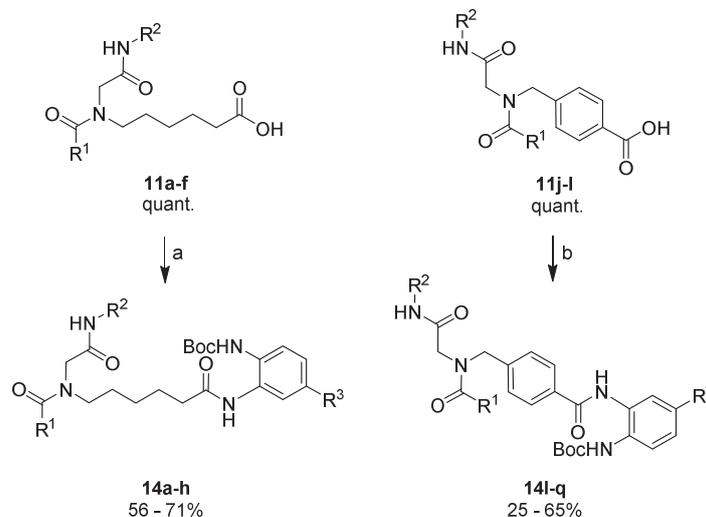
Die Synthese der Schlüsselintermediate **13a-f** und **13j-l** erfolgte unter Modifikation einer literaturbekannten Vorschrift.[104] Bei der Modifikation handelt es sich um die zusätzliche Zugabe von zerstoßenem Molsieb, welches das in der Reaktion entstandene Wasser abfangen sollte.



**Schema 10.** Synthese der peptoid-basierten Carbonsäuren **11a-f** und **11j-l**. (Reagenzien und Bedingungen: (a)  $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$  (2 Äquiv.), MeOH, RT, 16 h; (b)  $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$  (4 Äquiv.), THF, RT, 16 h).

Bei der Hydrolyse der Methylester **13a-f** und **13j-l** konnte festgestellt werden, dass der aromatische Methylester im Vergleich zum aliphatischen Ester erst durch 4 Äquivalente  $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$  statt 2 Äquivalente innerhalb von 16 h hydrolysiert wird (Schema 10). Nach erfolgter Hydrolyse wurde die Reaktionslösung mit 1M Salzsäure bis pH~1 angesäuert und

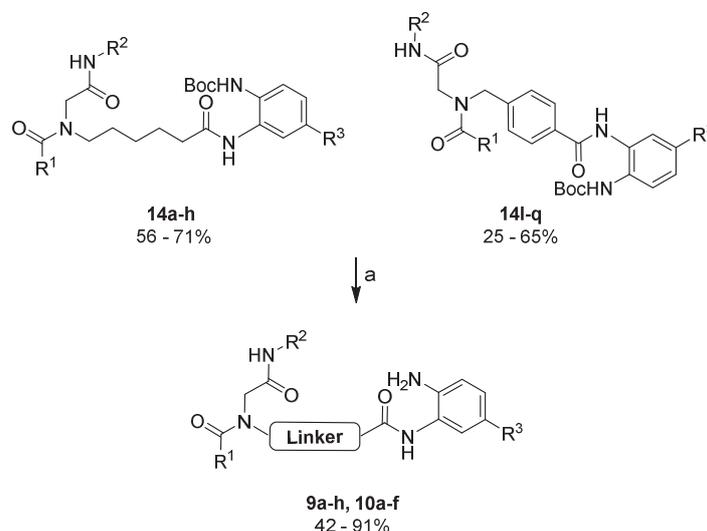
mit Ethylacetat extrahiert. Die resultierten Carbonsäuren **11a-f** und **11j-l** wurden als Rohprodukte direkt weiter umgesetzt.



**Schema 11.** Synthese der Boc-geschützten peptoid-basierten 2-Aminoanilide **14a-h** und **14l-q**. (Reagenzien und Bedingungen: (a)  $R^1\text{COOH}$  (1.2 Äquiv.), Boc-geschütztes 1,2-Phenyldiaminderivat (1 Äquiv.), Pyridin (2 Äquiv.), DIC (1.2 Äquiv.), HOAt (1.2 Äquiv.),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$  (1:1, v/v), RT, 16 h; (b)  $R^1\text{COOH}$  (1.2 Äquiv.), Boc-geschütztes 1,2-Phenyldiaminderivat (1 Äquiv.), EDC·HCl (2 Äquiv.), DMAP (0.4 Äquiv.),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$  (1:1, v/v), RT, 16 h).

Die Amidkupplung der Carbonsäuren **11a-f** mit den Boc-geschützten Aminen **XX**, **XXII** und **XXVI** wurde mit den Kupplungsreagenzien Diisopropylcarbodiimid (DIC) und 1-Hydroxy-7-azabenzotriazol (HOAt) und dem Einsatz von Pyridin in einem Lösungsmittelgemisch bestehend aus  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$  (1:1, v/v) durchgeführt (Schema 11). Die Produkte **14a-h** wurden nach einer Extraktion mit Ethylacetat und dem Waschen mit einer gesättigten NaCl-Lösung sowie einer säulenchromatographischen Reinigung mit *n*-Hexan/EtOAc (Gradient) als Eluent in einer Ausbeute von 56 – 71% erhalten. Bei der Amidkupplung der Carbonsäuren **11j-l** mit den Boc-geschützten Aminen **XX**, **XXII** und **XXVI** hingegen wurde das Kupplungsreagenz 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid (EDC·HCl) statt Diisopropylcarbodiimid (DIC) verwendet. Das Problem während der Amidkupplung der Carbonsäuren **11j-l** mit DIC bestand darin, dass das entstandene 1,3-Diisopropylharnstoff, der als Nebenprodukt in der Kupplung mit DIC anfällt, das gleiche Elutionsverhalten wie die Produkte **14l-q** aufwies. Deshalb wurde bei der Amidkupplung auf das EDC·HCl gewechselt. Das resultierende Harnstoffderivat aus der Kupplung mit EDC·HCl konnte durch eine wässrige Aufarbeitung

entfernt werden. Die Produkte **14l-q** wurden daraufhin mit *n*-Hexan/EtOAc (Gradient) als Eluent säulenchromatographisch gereinigt. Anschließend wurden die Produkte **14l-q**, ausgefällt aus Ethylacetat und *n*-Hexan, in einer Ausbeute von 25 – 65% erhalten.



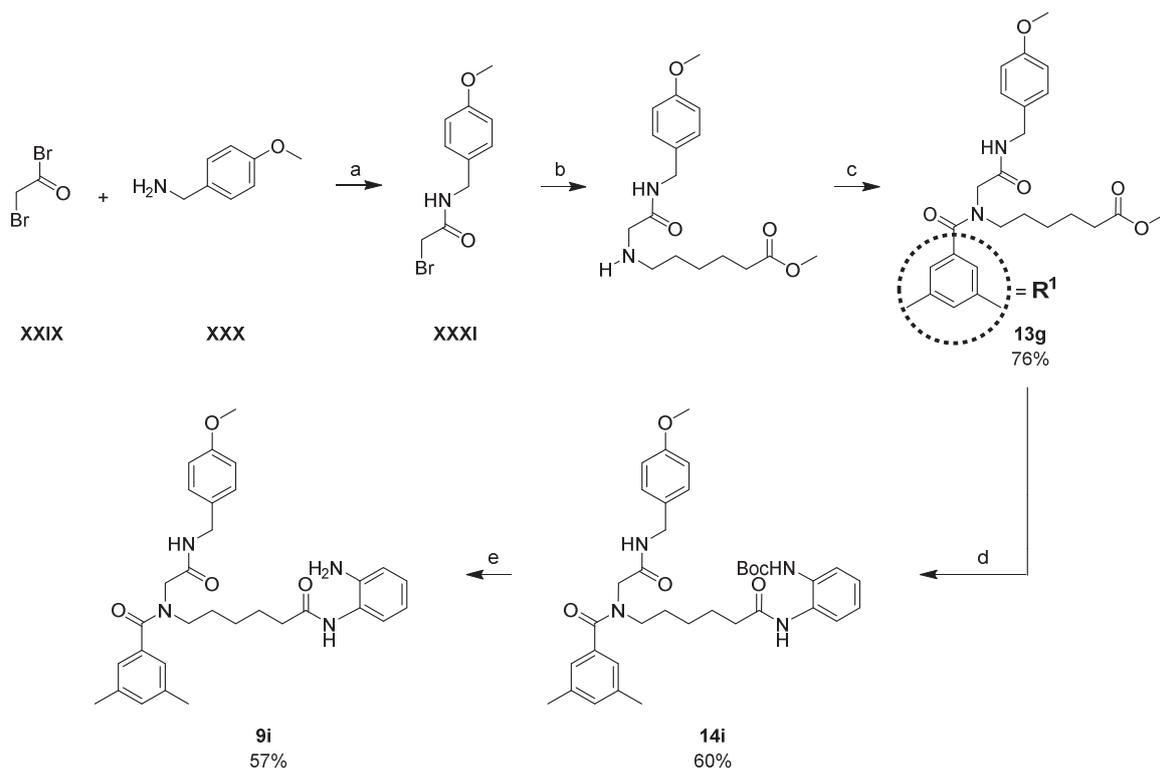
**Schema 12.** Synthese der peptoid-basierten 2-Aminoanilide **9a-h** und **10a-f**. (Reagenzien und Bedingungen: (a) TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:5, v/v), RT, 30 min).

Der letzte Schritt in der Synthese der peptoid-basierten 2-Aminoanilide **9a-h** und **10a-f** erfolgte durch eine acidolytische Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mithilfe von Trifluoressigsäure (TFA) in Dichlormethan (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) (15%, v/v) in 30 min (Schema 12). Die Reaktionslösung wurde mit einer gesättigten Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung neutralisiert und mit Dichlormethan extrahiert.[105] Anschließend wurden die jeweiligen Produkte **9a-h** und **10a-f** aus Ethylacetat und *n*-Hexan ausgefällt und in 25 – 71%iger Ausbeute erhalten.

### 4.5.3 Darstellung des 2-Aminoanilids **9i** anhand der Submonomermethode II

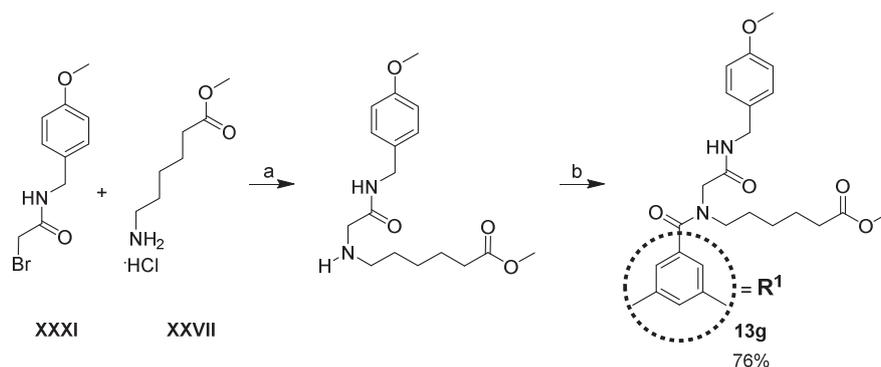
In Anlehnung an die Submonomermethode von *Taillefumier* und Mitarbeitern wurde die im folgenden zusammengefasste Synthese des peptoid-basierten 2-Aminoanilids **9i** entwickelt (Schema 13). Die Synthese stellt neben der Ugi-4-Komponenten Reaktion I eine weitere Möglichkeit zur Variation des Restes R<sup>1</sup> dar und soll hier exemplarisch am peptoid-basierten 2-Aminoanilid **9i** gezeigt werden.<sup>36</sup>

<sup>36</sup> Die meisten Verbindungen aus Kapitel 4 wurden mithilfe der Ugi-4-Komponenten Reaktion I synthetisiert.



**Schema 13.** Synthese des peptoid-basierten 2-Aminoanilids **9i**. (Reagenzien und Bedingungen: (a) 4-Methoxybenzylamin (1 Äquiv.), Bromoacetyl bromid (1 Äquiv.), DIPEA (1 Äquiv.),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$ , 16 h; (b) Methyl-6-aminohexanoat-hydrochlorid (1 Äquiv.),  $\text{Et}_3\text{N}$  (2 Äquiv.),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , RT, 16 h; (c) Amin (1.2 Äquiv.), Pyridin (1.2 Äquiv.), 3,5-Dimethylbenzoylchlorid (1 Äquiv.),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$ , 18 h; (d) (i)  $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$  (2 Äquiv.), MeOH, RT, 16 h; (ii) Carbonsäure (1 Äquiv.), *tert*-Butyl-(2-aminophenyl)carbammat (1 Äquiv.), EDC·HCl (2 Äquiv.), DMAP (0.4 Äquiv.),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$  (1:1, v/v), RT, 16 h; (e) TFA/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1:5, v/v), RT, 30 min).

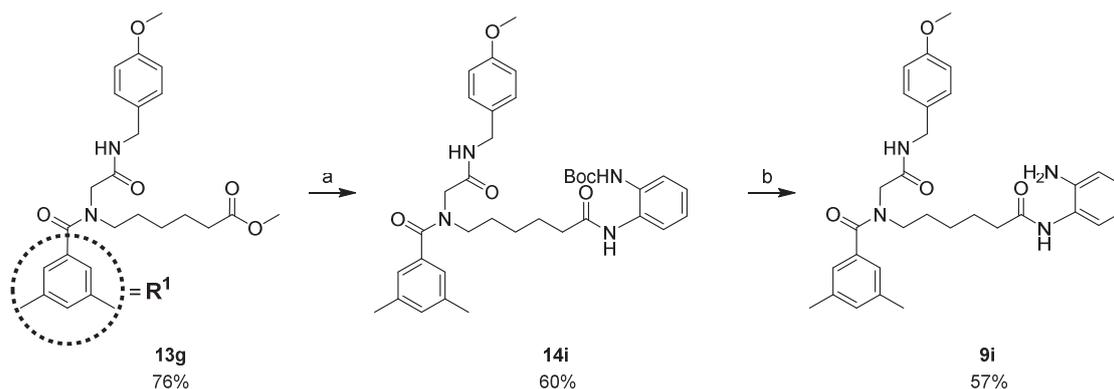
Hierbei wurde Bromoacetyl bromid **XXIX** mit 4-Methoxybenzylamin **XXX** in Gegenwart von Diisopropylethylamin (DIPEA) als Base acyliert (Schema 13). Nach 16 h wurde der Reaktionsansatz mit 1M Salzsäure versetzt und mit Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Die Acylierung zum Produkt **XXXI** verlief in quantitativer Ausbeute.



**Schema 14.** Synthese des Peptoids **13g**. (Reagenzien und Bedingungen: (a) Methyl-6-aminohexanoat-hydrochlorid (1 Äquiv.), Et<sub>3</sub>N (2 Äquiv.), 2-Brom-*N*-(4-methoxybenzyl)-acetamid (1 Äquiv.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, RT, 16 h; (b) Amin (1.2 Äquiv.), Pyridin (1.2 Äquiv.), 3,5-Dimethylbenzoylchlorid (1 Äquiv.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C → RT, 18 h).

Anschließend folgte die Umsetzung zum sekundären Amin. Dabei wurde das Hydrochlorid des 6-Aminohexansäuremethylesters **XXVII** mit 2 Äquivalenten Triethylamin in Dichlormethan vorgelegt und anschließend mit **XXXI** versetzt (Schema 14). Aus dieser Reaktion resultierte das sekundäre Amin, welches als Rohprodukt in einer Acylierungsreaktion mit 3,5-Dimethylbenzoylchlorid und Pyridin zum entsprechenden Peptoid **13g** umgesetzt wurde. Das Peptoid **13g** wurde anschließend mit Dichlormethan extrahiert und die organische Phase mit 1M Salzsäure und Wasser gewaschen. Nach einer säulenchromatographischen Reinigung mit *n*-Hexan/EtOAc (Gradient) als Eluent wurde das Produkt **13i**, ausgefällt aus Ethylacetat und *n*-Hexan, in einer Ausbeute von 76% erhalten.

Im Anschluss erfolgte eine basische Esterhydrolyse mit 2 Äquivalenten Lithiumhydroxid Monohydrat in Methanol. Die isolierte Carbonsäure wurde anschließend als Rohprodukt mit *tert*-Butyl-(2-aminophenyl)carbammat **XX** in einer Amidkupplung für 18 h umgesetzt (Schema 15). Dies geschah unter Verwendung der Kupplungsreagenzien 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid (EDC·HCl) und 4-(Dimethylamino)-pyridin (DMAP) in einem Lösungsmittelgemisch bestehend aus CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/DMF (1:1, v/v).

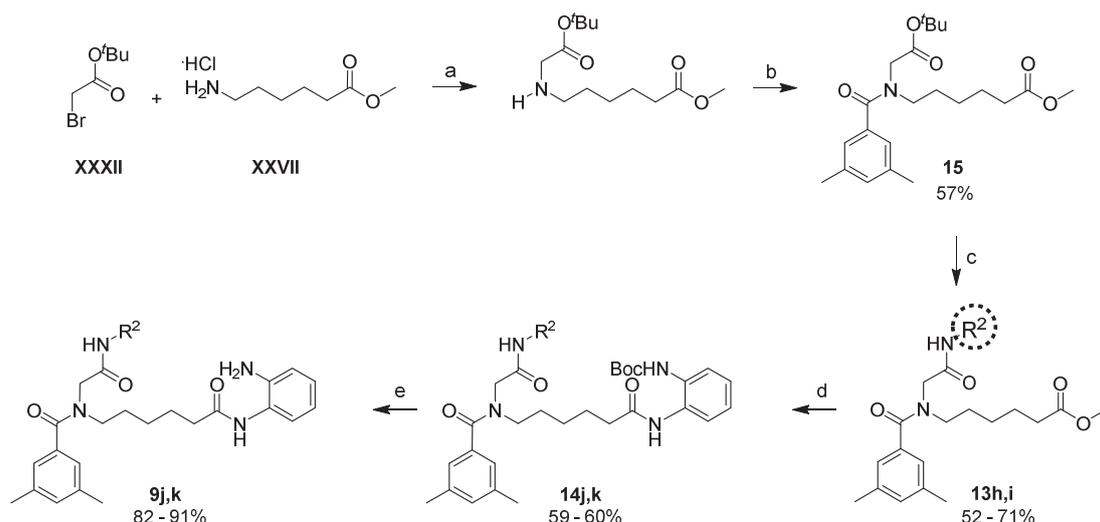


**Schema 15.** Synthese des peptoid-basierten 2-Aminoanilids **9i**. (Reagenzien und Bedingungen: (a) (i) LiOH·H<sub>2</sub>O (2 Äquiv.), MeOH, RT, 16 h; (ii) Carbonsäure (1 Äquiv.), *tert*-Butyl-(2-aminophenyl)carbammat (1 Äquiv.), EDC·HCl (2 Äquiv.), DMAP (0.4 Äquiv.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/DMF (1:1, v/v), RT, 16 h; (b) TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:5, v/v), RT, 30 min).

Die Reaktionslösung wurde anschließend mit Ethylacetat versetzt und mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Im Anschluss an die säulenchromatographische Reinigung mit *n*-Hexan/EtOAc (Gradient) als Eluent, wurde das Produkt **14i** als weißer Feststoff aus Ethylacetat und *n*-Hexan in einer 60%igen Ausbeute ausgefällt. Die Entschützung der säurelabilen Boc-Schutzgruppe zum Produkt **9i** erfolgte mit Trifluoressigsäure in Dichlormethan (1:5, v/v). Aus der anschließenden Neutralisation mit einer gesättigten Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung und Extraktion mit Dichlormethan wurde das Produkt **9i** in einer 57%igen Ausbeute erhalten.[106]

#### 4.5.4 Darstellung der 2-Aminoanilide **9j,k** anhand der Submonomermethode III

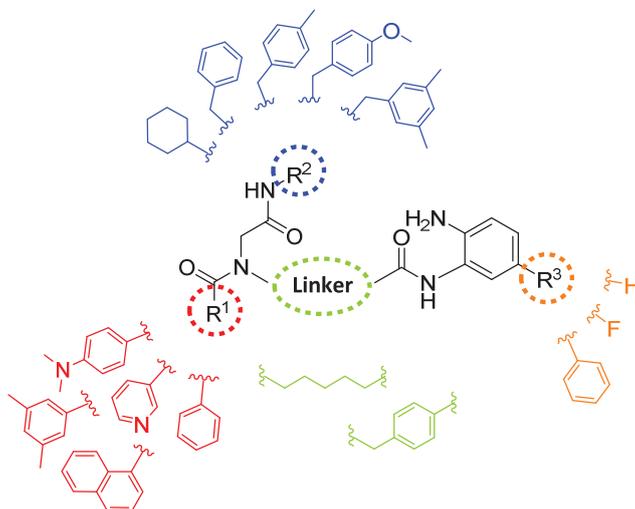
In Anlehnung an die Submonomermethode von *Zuckermann* und Mitarbeitern wurde die im folgenden abgebildete Synthese der peptoid-basierten 2-Aminoanilide **9j,k** zur Variation des Restes R<sup>2</sup> entwickelt (Schema 16).



**Schema 16.** Synthese der peptoid-basierten 2-Aminoanilide **9j,k**. (Reagenzien und Bedingungen: (a) Methyl-6-aminohexanoat-hydrochlorid (1 Äquiv.), *tert*-Butylbromacetat (1 Äquiv.), Et<sub>3</sub>N (2 Äquiv.), THF, RT, 16 h; (b) 6-((2-(*tert*-Butoxy)-2-oxoethyl)amino)hexansäuremethylester (1.2 Äquiv.), Pyridin (1.2 Äquiv.), 3,5-Dimethyl-benzoylchlorid (1 Äquiv.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C → RT, 18 h; (c) (i) TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:5, v/v), RT, 2 h; (ii) R<sup>1</sup>COOH (1 Äquiv.), NH<sub>2</sub>R<sup>2</sup> (1 Äquiv.), EDC·HCl (2 Äquiv.), DMAP (0.4 Äquiv.), DMF/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, RT, 16 h; (d) (i) LiOH·H<sub>2</sub>O (2 Äquiv.), MeOH, RT, 16 h; (ii) R<sup>1</sup>COOH (1 Äquiv.), *tert*-Butyl-(2-aminophenyl)-carbamate (1 Äquiv.), EDC·HCl (2 Äquiv.), DMAP (0.4 Äquiv.), RT, 16 h; (e) TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:5, v/v), RT, 30 min).

Hierbei wurde *tert*-Butylbromacetat **XXXII** mit dem Hydrochloridsalz des Amins **XXVII** in Gegenwart von Triethylamin als Base alkyliert und anschließend als Rohprodukt in einer Acylierungsreaktion mit 3,5-Dimethylbenzoylchlorid zum entsprechenden Peptoid **15** umgesetzt. Nach einer säulenchromatographischen Reinigung mit *n*-Hexan/EtOAc (Gradient) als Elutionsmittel wurde Peptoid **15** als gelbliches Öl in einer 57%igen Ausbeute erhalten. Die Abspaltung der *tert*-Butylgruppe unter sauren Bedingungen lieferte die entsprechende Carbonsäure, welche anschließend als Rohprodukt mit EDC·HCl, DMAP und einem Amin zu den entsprechenden Amiden **13h,i** in Ausbeuten von 71% (**13h**) und 52% (**13i**) reagierte. Nach einer quantitativen Esterhydrolyse mit LiOH·H<sub>2</sub>O, wurden die Boc-geschützten 2-Aminoanilide **14j,k** erhalten. Diese wurden säulenchromatographisch gereinigt (*n*-Hexan/EtOAc (Gradient)) und aus EtOAc/*n*-Hexan ausgefällt (59 – 60% Ausbeute). Die Entschützung der säurelabilen Boc-Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure in Dichlormethan lieferte die Produkte **9j,k** in einer 82 – 91%igen Ausbeute.

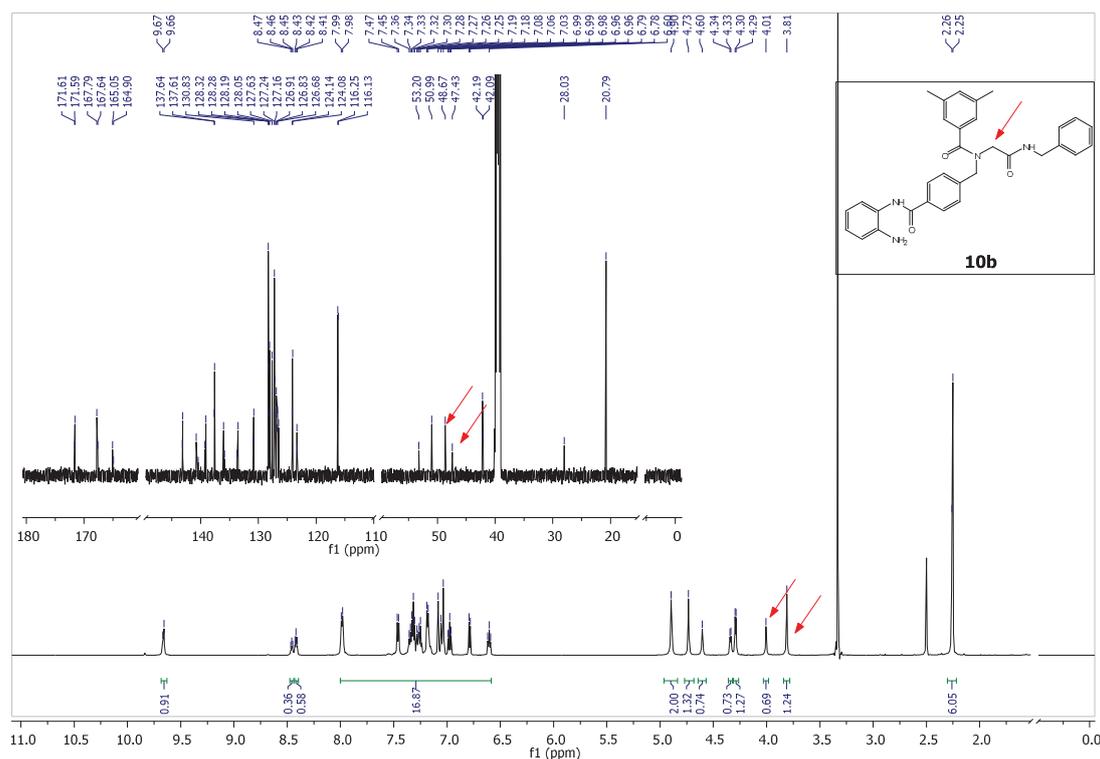
Zusammenfassend konnte anhand der drei vorgestellten Methoden ein vielfältiges Set an peptoid-basierten 2-Aminoaniliden **9a-k** und **10a-f** zeit- und kosteneffizient synthetisiert werden. Eine Übersicht über die durchgeführten Strukturmodifikationen ist in Abbildung 50 zu finden.



**Abbildung 50.** Durchgeführte Variationen der Reste R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> und der Linkerregion.

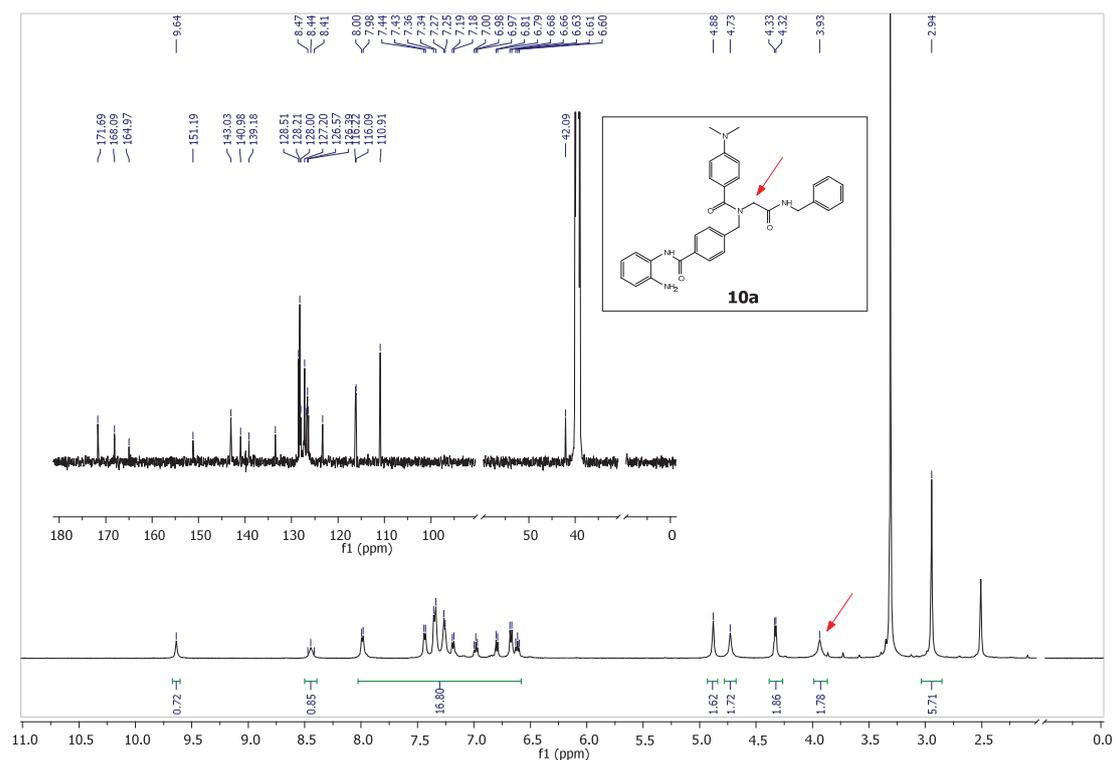
## 4.6 NMR-Untersuchungen

Die Reinheits- und Identitätsprüfung der 2-Aminoanilide **9a-k** und **10a-f** erfolgte anhand von Kernspinresonanzspektroskopie (NMR), Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und Massenspektrometrie (MS). Hierbei konnte bei Raumtemperatur in den NMR-Spektren der meisten Verbindungen ein doppelter Satz an NMR-Signalen festgestellt werden (Abbildung 51 zeigt Verbindung **10b** als einen repräsentativen Vertreter).



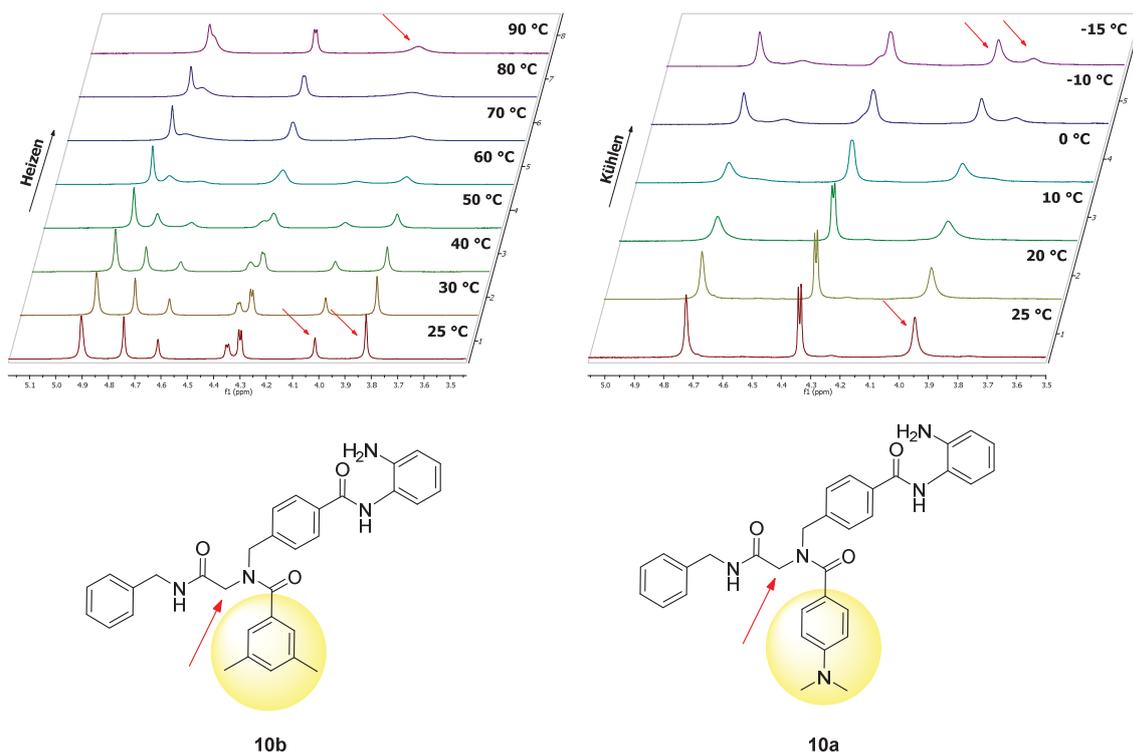
**Abbildung 51.**  $^1\text{H}$  (600 MHz) und  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz) Spektrum der Verbindung **10b** in  $\text{DMSO-}d_6$ . Die Signale der Methylengruppe des Peptoid-Rückgrats sind als repräsentatives Beispiel mit einem roten Pfeil gekennzeichnet.

Eine Ausnahme repräsentieren die 4-Dimethylaminophenyl-substituierten 2-Aminoanilide. Hier war bei Raumtemperatur ausschließlich ein Satz an NMR-Signalen zu erkennen (Abbildung 52).



**Abbildung 52.** <sup>1</sup>H (500 MHz) und <sup>13</sup>C NMR (126 MHz) der Verbindung **10a** in DMSO-*d*<sub>6</sub>. Die Signale der Methylengruppe des Peptoid-Rückgrats sind als repräsentatives Beispiel mit einem roten Pfeil im <sup>1</sup>H NMR gekennzeichnet. Der dazugehörige Kohlenstoff ist im <sup>13</sup>C nicht zu detektieren.

Mit dem Hintergrundwissen, dass die peptoid-basierten HDACI aus Kapitel 3 Rotamere aufweisen, lag es nahe, dass ebenfalls eine eingeschränkte Rotation um die Amidbindung bei den 2-Aminoaniliden vorliegen könnte. Demzufolge wurden zwei repräsentative Verbindungen in einem variablen Temperatur (VT-) NMR Experiment untersucht (Abbildung 53).



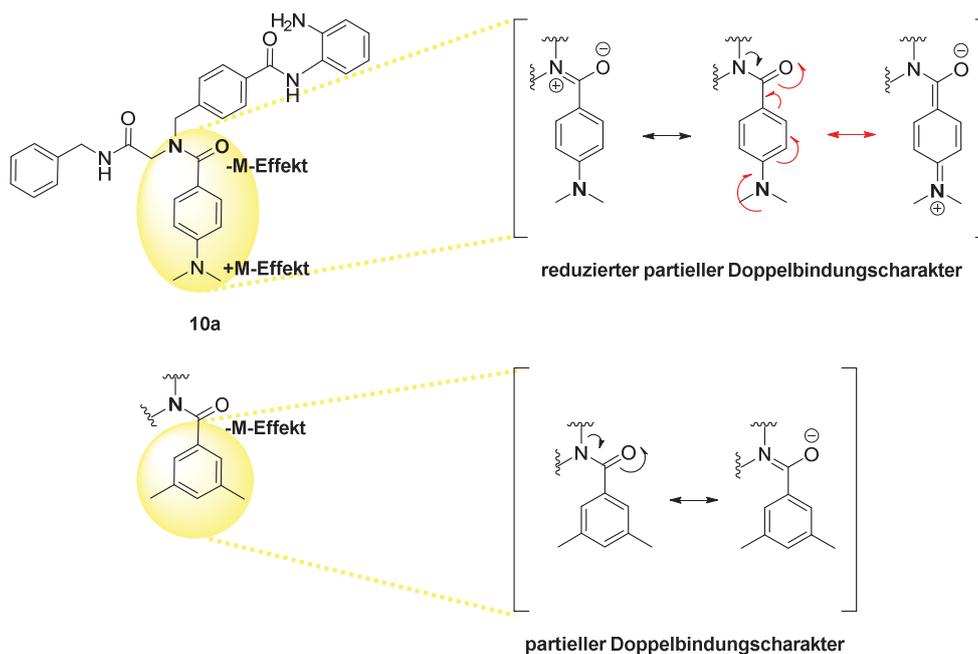
**Abbildung 53.** VT-NMR (25-90 °C, 600 MHz) in DMSO- $d_6$  (links) von **10b** und VT-NMR (25-(-15 °C), 600 MHz) von **10a** in  $CDCl_3$  (rechts).

Die VT-NMRs der 2-Aminoanilide **10a** und **10b** zeigen, dass der doppelte Signalsatz im  $^1H$  NMR von Rotameren herrührt. Dies zeigt sich bei **10b** an der Koaleszenz der beiden NMR-Signale im Hochtemperaturbereich bei etwa 80 °C sowie bei **10a** an der Aufspaltung eines NMR-Signals in zwei unterschiedliche Signale im Tieftemperaturbereich bei etwa -15 °C (Abbildung 53). Beide Verbindungen haben somit deutlich unterschiedliche Koaleszenztemperaturen.<sup>37</sup>

Die Verbindung **10a** weist bei Raumtemperatur nur einen NMR-Signalsatz auf. Dies lässt auf ein flexibleres Peptoidrückgrat schließen, dass durch die Energiezufuhr bei Raumtemperatur in Rotation versetzt wird. Das flexiblere Rückgrat der 4-Dimethylaminophenyl-substituierten 2-Aminoanilide lässt sich anhand des partiellen Doppelbindungscharakters erklären. Der partielle Doppelbindungscharakter kommt durch die mesomeren Effekte der 4-Dimethylamino-Gruppe (+M) und der Carbonylgruppe (-M) zustande.

<sup>37</sup> **Koaleszenztemperatur** gibt die Temperatur wieder, an der die Signale der beiden Rotamere in ein Signal zusammenfallen und ein Durchschnittssignal bilden.

Die 4-Dimethylaminophenyl-substituierten 2-Aminoanilide stellen zu den übrigen hier synthetisierten peptoid-basierten 2-Aminoaniliden eine Ausnahme dar. Im Gegensatz zu den anderen Derivaten, ist durch die *para*-substituierte Dimethylamino-Gruppe eine zusätzliche Mesomeriestruktur möglich (Abbildung 54). Diese führt dazu, dass der partielle Doppelbindungscharakter der 4-Dimethylaminophenyl-substituierten 2-Aminoanilide reduziert wird. Daraus resultiert eine niedrigere Rotationsbarriere, was zum Vorliegen eines flexibleren Peptoidrückgrats führt.



**Abbildung 54.** Reduzierter partieller Doppelbindungscharakter des 4-Dimethylamino-substituierten 2-Aminoanilids **10a**.

Bei den peptoid-basierten 2-Aminoaniliden, die keine 4-Dimethylamino-Gruppe enthalten, ist die zusätzliche Mesomeriestruktur nicht möglich. So weisen diese 2-Aminoanilide aufgrund des partiellen Doppelbindungscharakters keine freie Drehbarkeit um die C-N-Bindung (tertiäre Amidbindung) bei Raumtemperatur auf. Dementsprechend handelt es sich hierbei um rigidere Verbindungen.

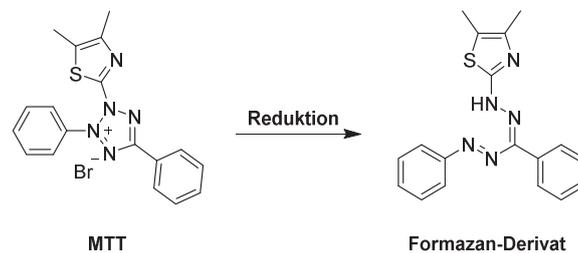
## 4.7 Biologische Evaluation

Die im Rahmen dieses Projektes hergestellten 2-Aminoanilide **9a-k** und **10a-f** wurden anschließend hinsichtlich ihrer biologischen Eigenschaften untersucht. Die Zytotoxizität im MTT Zellviabilitäts-Assay und die HDAC-Inhibition im Ganzzell-Assay wurden im Arbeitskreis

von Prof. Dr. Matthias Kassack (Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Heinrich-Heine Universität (HHU) Düsseldorf) durchgeführt. Die Daten im Enzym-Assay an HDAC1 und HDAC6 wurden von M. Sc. Katharina Stenzel (Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, HHU Düsseldorf) erhoben. Im Folgenden sollen die Ergebnisse aus den jeweiligen biologischen Untersuchungen vorgestellt und anschließend diskutiert werden.

#### 4.7.1 MTT Zellviabilitäts-Assay

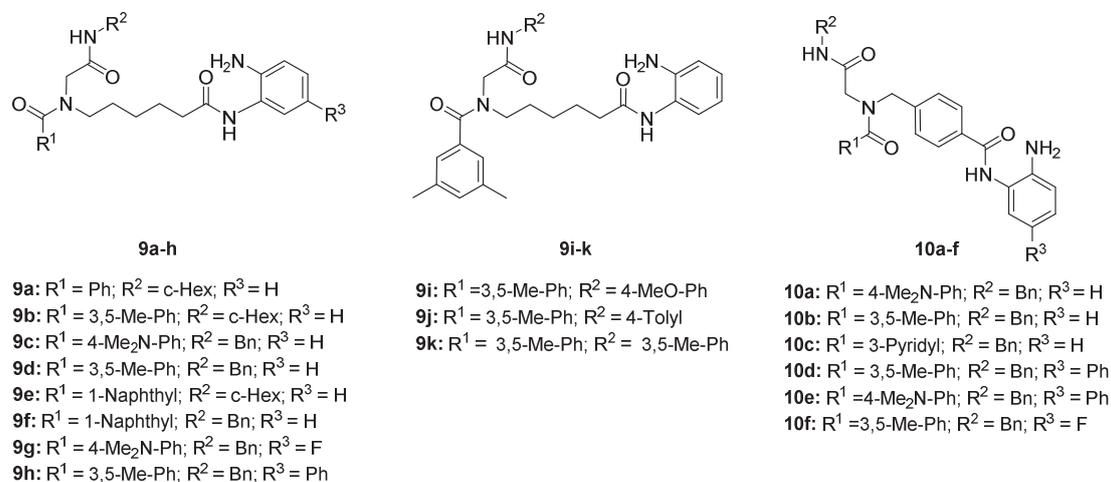
Die Zytotoxizität der 2-Aminoanilide wurde mittels eines MTT-Assays bestimmt. Hierbei werden Zellen *in vitro* mit dem namensgebendem wasserlöslichen Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) behandelt (Abbildung 55). Die Farbreaktion basiert auf der Reduktion des gelben wasserlöslichen Farbstoffs in das wasserunlösliche blauviolette Formazan-Derivat. Dieser Prozess findet vorwiegend in den Mitochondrien lebender und stoffwechselaktiver Zellen statt. In geschädigten Zellen kommt es nicht zur Reduktion des Farbstoffs MTT. In Abhängigkeit von der Intensität des blauvioletten Farbstoffs bei Behandlung der Zellen mit einer potentiellen zytotoxischen Testsubstanz kann die Zellviabilität ermittelt werden.[107]



**Abbildung 55.** Reduktion des wasserlöslichen Farbstoffs MTT.

In dem MTT-Assay wurde die mittlere inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) in zwei unterschiedlichen Zelllinien untersucht. Hierbei wurde die Zellviabilität nach der Inkubation mit den 2-Aminoaniliden in der humanen Ovarialkarzinom-Zelllinie (A2780) sowie in der humanen Zungenkarzinom-Zelllinie (Cal27) untersucht. Dabei dienten Vorinostat und Cisplatin als Referenzsubstanzen. Der  $IC_{50}$ -Wert gibt dabei die Konzentration einer Testsubstanz wieder, bei der die Zellviabilität um das Halbmaximale reduziert wurde.

In der folgenden Abbildung 56 sind die biologisch evaluierten 2-Aminoanilide **9a-h**, **9i-k** und **10a-f** abgebildet. Die Ergebnisse des MTT Zellviabilitäts-Assays sind in Tabelle 4 zusammengefasst.



**Abbildung 56.** Untersuchte 2-Aminoanilide **9a-h**, **9i-k** und **10a-f**.

An den Zelllinien A2780 und Cal27 konnte im MTT Zellviabilitäts-Assay gezeigt werden, dass die 2-Aminoanilide die Zellviabilität beeinflussen (Tabelle 4).

**Tabelle 4.** Ergebnisse des MTT Zellviabilitäts-Assays.<sup>a</sup>

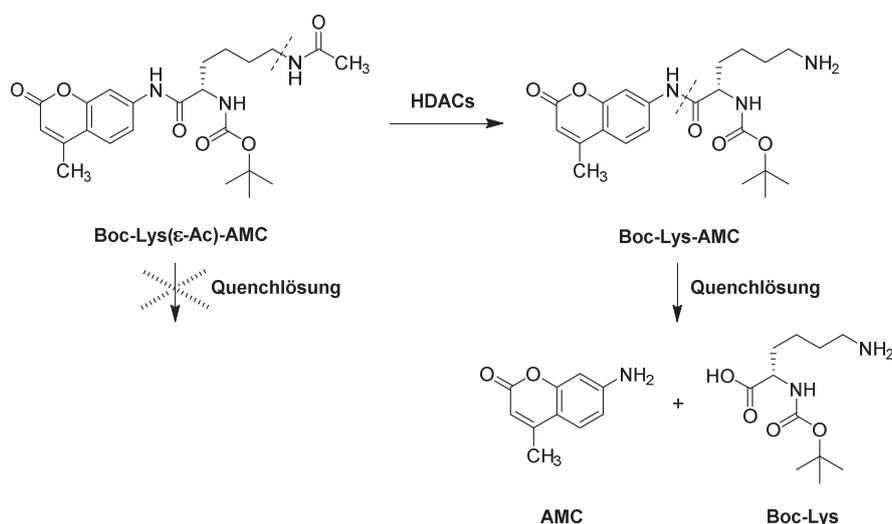
Verbindung	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	MTT IC <sub>50</sub> [μM]	
				A2780	Cal27
<b>9a</b>	Ph	c-Hex	H	181	30.9
<b>9b</b>	3,5-Me-Ph	c-Hex	H	42.0	17.5
<b>9c</b>	4-Me <sub>2</sub> N-Ph	Bn	H	18.5	16.0
<b>9d</b>	3,5-Me-Ph	Bn	H	20.9	13.7
<b>9e</b>	1-Naphthyl	c-Hex	H	18.1	24.9
<b>9f</b>	1-Naphthyl	Bn	H	22.8	11.0
<b>9g</b>	4-Me <sub>2</sub> N-Ph	Bn	F	25.9	20.2
<b>9h</b>	3,5-Me-Ph	Bn	Ph	17.1	18.9
<b>9i</b>	3,5-Me-Ph	4-MeO-Ph	H	24.6	17.4
<b>9j</b>	3,5-Me-Ph	4-Tolyl	H	9.80	18.2
<b>9k</b>	3,5-Me-Ph	3,5-Me-Ph	H	5.10	19.3
<b>10a</b>	4-Me <sub>2</sub> N-Ph	Bn	H	2.40	1.60
<b>10b</b>	3,5-Me-Ph	Bn	H	2.80	1.60
<b>10c</b>	3-Pyridyl	Bn	H	8.90	11.2
<b>10d</b>	3,5-Me-Ph	Bn	Ph	n.e.	8.90
<b>10e</b>	4-Me <sub>2</sub> N-Ph	Bn	Ph	n.e.	11.1
<b>10f</b>	3,5-Me-Ph	Bn	F	5.40	5.72
<b>Vorinostat</b>	---	---	---	2.42	2.64
<b>Cisplatin</b>	---	---	---	3.79	1.32

<sup>a</sup>Die Werte entsprechen dem Durchschnitt aus drei Experimenten. Die Standardabweichung liegt <10% des Durchschnitts. n.e. = Kein Effekt bis zu 100 μM.

Darüber hinaus ließ sich feststellen, dass die alkylsubstituierten 2-Aminoanilide **9a-k** im Vergleich zu Vorinostat und Cisplatin weniger toxische Verbindungen darstellen. Die Verbindungen **10a-f** mit einem benzylicen Linker, besonders **10a** und **10b**, weisen im Vergleich zu den Referenzsubstanzen vergleichbare IC<sub>50</sub>-Werte auf. Weiterhin ist zu beobachten, dass durch eine Substitution in Position R<sup>3</sup> (R<sup>3</sup> = F, Ph) die Zytotoxizität der peptoid-basierten 2-Aminoanilide abnimmt. Insbesondere hat dies einen starken Einfluss auf die Zytotoxizität der benzylsubstituierten 2-Aminoanilide (siehe **10b** vs. **10d** vs. **10f**).

#### 4.7.2 HDAC-Inhibition im Ganzzell-Assay

Zur Bestimmung der *in vitro* Aktivität gegenüber Histondeacetylasen wurde die HDAC-Inhibition in einem Ganzzell-Assay in Anlehnung an die veröffentlichten Arbeiten von Ciossek et al.[108] und Bonfils et al.[109] durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen (A2780 und Cal27) mit steigenden Konzentrationen der 2-Aminoanilide **9a-k** und **10a-f** inkubiert und anschließend mit dem Substrat Boc-Lys(ε-Ac)-AMC (AMC = 7-Amino-4-methylcoumarin) versetzt. Nach der Zugabe einer Quenchlösung<sup>38</sup>, kommt es zur Spaltung des deacetylierten Boc-Lys-AMC durch Trypsin<sup>39</sup>. Anschließend wird die Fluoreszenz des Fluorophors AMC (Abbildung 57) gemessen (Anregungswellenlänge bei λ<sub>ex</sub> = 320 nm, Emissionswellenlänge bei λ<sub>em</sub> = 520 nm).



**Abbildung 57.** Fluoreszenzbasierter HDAC Ganzzell-Assay.

<sup>38</sup> **Quenchlösung** besteht aus (25 mM Tris-HCl (pH 8), 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% NP40, 2.0 mg/mL Trypsin, 10 μM Vorinostat).

<sup>39</sup> **Trypsin** gehört zur Gruppe der Peptidasen und besteht aus einem Gemisch aus drei Verdauungsenzymen (Trypsin 1, 2 und 4). Sie sind verantwortlich für die Spaltung von Peptidbindungen an bestimmten Stellen. Trypsin spaltet Peptide nach basischen Aminosäuren.

In der folgenden Tabelle 5 sind die Ergebnisse des HDAC Ganzzell-Assays der 2-Aminoanilide **9a-k** und **10a-f** an den Zelllinien A2780 und Cal27 zusammengefasst.

**Tabelle 5.** Ergebnisse der HDAC-Inhibition im Ganzzell-Assay.<sup>a</sup>

Verbindung	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	HDACI IC <sub>50</sub> [μM]	
				A2780	Cal27
<b>9a</b>	Ph	c-Hex	H	43.6	21.9
<b>9b</b>	3,5-Me-Ph	c-Hex	H	22.8	12.1
<b>9c</b>	4-Me <sub>2</sub> N-Ph	Bn	H	9.25	4.33
<b>9d</b>	3,5-Me-Ph	Bn	H	8.71	3.93
<b>9e</b>	1-Naphthyl	c-Hex	H	33.1	13.0
<b>9f</b>	1-Naphthyl	Bn	H	10.2	4.13
<b>9g</b>	4-Me <sub>2</sub> N-Ph	Bn	F	13.4	6.82
<b>9h</b>	3,5-Me-Ph	Bn	Ph	1.43	0.47
<b>9i</b>	3,5-Me-Ph	4-MeO-Ph	H	3.53	4.81
<b>9j</b>	3,5-Me-Ph	4-Tolyl	H	4.48	4.57
<b>9k</b>	3,5-Me-Ph	3,5-Me-Ph	H	3.17	3.15
<b>10a</b>	4-Me <sub>2</sub> N-Ph	Bn	H	0.48	0.11
<b>10b</b>	3,5-Me-Ph	Bn	H	0.81	0.18
<b>10c</b>	3-Pyridyl	Bn	H	1.06	1.01
<b>10d</b>	3,5-Me-Ph	Bn	Ph	1.72	0.63
<b>10e</b>	4-Me <sub>2</sub> N-Ph	Bn	Ph	2.62	0.85
<b>10f</b>	3,5-Me-Ph	Bn	F	1.43	0.47
<b>Vorinostat</b>	---	---		0.96	0.86

<sup>a</sup>Die Werte entsprechen dem Durchschnitt aus drei Experimenten. Die Standardabweichung liegt <10% des Durchschnitts. n.e. = Kein Effekt bis zu 100 μM.

Im HDAC Ganzzell-Assay konnte festgestellt werden, dass die 2-Aminoanilide in der Cal27 Zelllinie im Vergleich zur A2780 Zelllinie eine stärkere HDAC-Inhibition aufweisen. Weiterhin können Aussagen zu Struktur-Aktivitäts-Beziehungen getroffen werden. So liegen die IC<sub>50</sub>-Werte der Verbindungen **10a-f** mit einem benzylicischen Linker (insbesondere **10a** und **10b**) im niedrigen mikromolaren bis nanomolaren Bereich und sind damit vergleichbar oder besser als die Werte der Referenzsubstanz Vorinostat. Die 2-Aminoanilide mit einem aliphatischen Linker (**9a-k**) stellen im Vergleich zu Vorinostat schwächere HDAC-Inhibitoren dar. Eine Ausnahme ist die Verbindung **9h**. Während diese in der A2780 Zelllinie schwächer ist als Vorinostat (**9h**: IC<sub>50</sub> = 1.43 μM vs. Vorinostat: IC<sub>50</sub> = 0.96 μM), kommt es in der Cal27 Zelllinie zu einer um den Faktor 2 stärkeren HDAC-Inhibition (**9h**: IC<sub>50</sub> = 0.47 μM vs. Vorinostat: IC<sub>50</sub> = 0.86 μM).

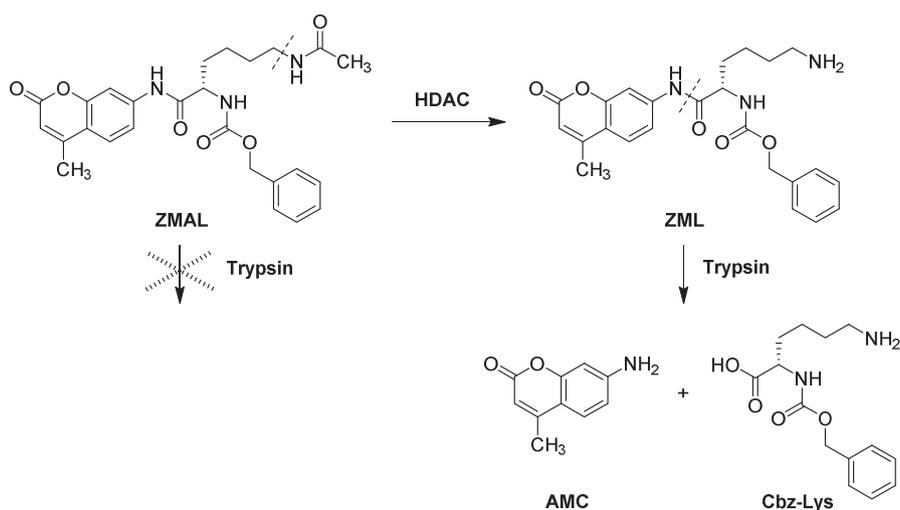
Bei der Analyse der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen der Verbindungen **9a-k** und **10a-f** fällt weiterhin auf, dass alkylsubstituierte 2-Aminoanilide **9a-k** niedrigere IC<sub>50</sub>-Werte aufweisen,

wenn R<sup>1</sup> mit einer 3,5-Dimethylphenylgruppe substituiert ist (Tabelle 5). Bei den benzylsubstituierten 2-Aminoaniliden **10a-f** weisen sowohl die 3,5-Dimethylphenyl- als auch die 4-Dimethylaminophenyl-substituierten 2-Aminoanilide vergleichbare IC<sub>50</sub>-Werte auf (siehe **10a** vs. **10b** und **10e** vs. **10d**).

Ferner ergaben die Substitutionen in Position R<sup>3</sup>, dass das Vorliegen eines Fluoratoms in beiden Zelllinien zu einer Minderung der HDAC-Aktivität führt, sowohl in der Verbindungsklasse **9** als auch in **10** (**9c** (A2780 (Cal27): IC<sub>50</sub> = 9.25 μM (4.33 μM)) vs. **9g** (A2780 (Cal27): IC<sub>50</sub> = 13.4 μM (6.82 μM)) sowie **10b** (A2780 (Cal27): IC<sub>50</sub> = 0.81 μM (0.18 μM)) vs. **10f** (A2780 (Cal27): IC<sub>50</sub> = 1.43 μM (0.47 μM)), siehe Tabelle 5). Die Substitution des Restes R<sup>3</sup> mit einem Phenylring zeigt bei den alkylsubstituierten 2-Aminoaniliden (siehe **9d** vs. **9h**) in beiden Zelllinien eine Steigerung der HDAC-Aktivität um den Faktor 6-8. Im Gegensatz dazu zeigen die benzylsubstituierten 2-Aminoanilide (siehe **10b** vs. **10d** und **1a** vs. **10e**) einen Aktivitätsverlust der HDAC-Inhibition um den Faktor 2-8.

#### 4.7.3 Inhibition ausgewählter HDAC-Isoformen

Zur Bestimmung der *in vitro* Aktivität gegenüber den HDAC-Isoformen 1 und 6 wurde die HDAC-Inhibition in einem Enzym-Assay in Anlehnung an die veröffentlichten Arbeiten von Jung et al.[110] und Olsen et al.[111] untersucht. Als Referenzsubstanz diente Vorinostat. Hierbei wurden rekombinante HDACs mit dem synthetisch hergestellten Substrat Z-(ε-Acetyl)lysin-7-amino-4-methylcumarin (ZMAL) in Gegenwart von steigenden Konzentrationen der 2-Aminoanilide **9a-k** und **10a-f** inkubiert (Abbildung 58). Nach der Deacetylierung des ZMAL zu ZML durch HDACs resultierte in der Zugabe von Trypsin die Freisetzung des Fluorophors 7-Amino-4-methylcumarin (AMC). Anschließend wurde die Fluoreszenz des Fluorophors AMC gemessen (Anregungswellenlänge bei λ<sub>ex</sub> = 390 nm, Emissionswellenlänge bei λ<sub>em</sub> = 460 nm). Aufgrund der vorliegenden Proportionalität der Fluoreszenz und der HDAC-Aktivität des Inhibitors, kann die Fluoreszenzintensität zur IC<sub>50</sub>-Bestimmung herangezogen werden.



**Abbildung 58.** Fluoreszenzbasierter HDAC Enzym-Assay.

Basierend auf den Ergebnissen der HDAC-Inhibition im Ganzzell-Assay wurden die 2-Aminoanilide ebenfalls auf ihre Aktivität im HDAC Enzym-Assay an den ausgewählten Isoformen HDAC1 und 6 und ihre potentielle Isoformselektivität untersucht (Tabelle 6). HDAC1 wurde ausgewählt, da die 2-Aminoanilide bevorzugt die HDACs der Klasse I inhibieren. HDAC6 sollte als Kontrollisofom dienen, um die Selektivität für HDACs der Klasse I zu untersuchen. Wie erwartet zeigten alle 2-Aminoanilide (**9a-k** und **10a-f**) keine Inhibition von HDAC6 ( $IC_{50} > 10000$  nM, siehe Tabelle 6).

**Tabelle 6.** Ergebnisse des HDAC Enzym-Assays.<sup>a</sup>

Verbindung	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	HDACI IC <sub>50</sub> [nM]	
				HDAC1	HDAC6
<b>9a</b>	Ph	c-Hex	H	5455±318	>10000
<b>9b</b>	3,5-Me-Ph	c-Hex	H	5545±297	>10000
<b>9c</b>	4-Me <sub>2</sub> N-Ph	Bn	H	1577±148	>10000
<b>9d</b>	3,5-Me-Ph	Bn	H	1157±206	>10000
<b>9e</b>	1-Naphthyl	c-Hex	H	6555±842	>10000
<b>9f</b>	1-Naphthyl	Bn	H	1670±170	>10000
<b>9g</b>	4-Me <sub>2</sub> N-Ph	Bn	F	1980±28	>10000
<b>9h</b>	3,5-Me-Ph	Bn	Ph	57±5	>10000
<b>9i</b>	3,5-Me-Ph	4-MeO-Ph	H	2075±205	>10000
<b>9j</b>	3,5-Me-Ph	4-Tolyl	H	1098±45	>10000
<b>9k</b>	3,5-Me-Ph	3,5-Me-Ph	H	484±51	>10000
<b>10a</b>	4-Me <sub>2</sub> N-Ph	Bn	H	38±12	>10000
<b>10b</b>	3,5-Me-Ph	Bn	H	62±12	>10000
<b>10c</b>	3-Pyridyl	Bn	H	103±16	>10000
<b>10d</b>	3,5-Me-Ph	Bn	Ph	51±11	>10000
<b>10e</b>	4-Me <sub>2</sub> N-Ph	Bn	Ph	39±11	>10000
<b>10f</b>	3,5-Me-Ph	Bn	F	277±45	>10000
<b>Vorinostat</b>	---	---	---	111±15	102±9

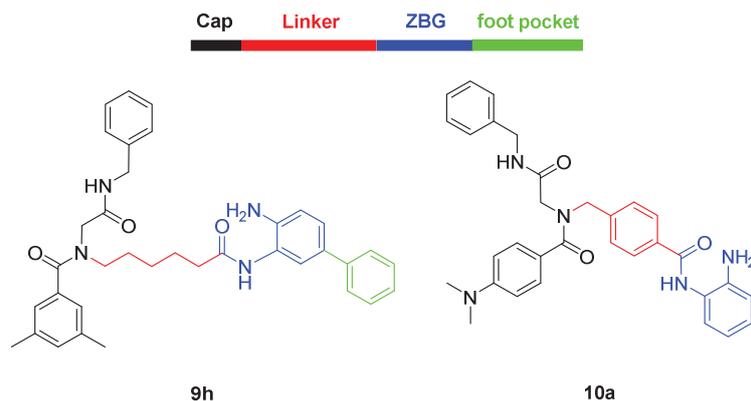
<sup>a</sup>Die Werte entsprechen dem Durchschnitt aus zwei Experimenten.

Hingegen hemmten die peptoid-basierten 2-Aminoanilide **9a-k** und **10a-f** erwartungsgemäß das rekombinante Enzym HDAC1. Hier wurde ebenfalls ein Vergleich zwischen unsubstituierten und fluor- bzw. phenylsubstituierten 2-Aminoaniliden aufgestellt. Dieser Vergleich ergab, dass die Substitution mit Fluor bei den alkylsubstituierten 2-Aminoaniliden einen leichten Aktivitätsverlust (**9c**:  $IC_{50} = 1577 \pm 148$  nM vs. **9g**:  $IC_{50} = 1980 \pm 28$  nM) und bei den benzylsubstituierten 2-Aminoaniliden einen Aktivitätsverlust der HDAC1 Inhibition um den Faktor 5 (**10b**:  $IC_{50} = 62 \pm 12$  nM vs. **10f**:  $IC_{50} = 277 \pm 45$  nM) bewirkte.

Eine weitere Erkenntnis konnte bei der Substitution mit einem Phenylrest in Position R<sup>3</sup> in beiden Verbindungsklassen festgestellt werden. Während bei den benzylsubstituierten 2-Aminoaniliden durch die Substitution mit einem Phenylrest keine Änderung der HDAC1 Inhibition zu verzeichnen war (**10b**:  $IC_{50} = 62 \pm 12$  nM vs. **10d**:  $IC_{50} = 51 \pm 11$  nM bzw. **10a**:  $IC_{50} = 38 \pm 12$  nM vs. **10e**:  $IC_{50} = 39 \pm 11$  nM), führte es bei den alkylsubstituierten 2-Aminoaniliden (siehe **9d**, **9h**) zu einer 20fachen Aktivitätssteigerung der HDAC1 Inhibition (**9d**:  $IC_{50} = 1157 \pm 206$  nM vs. **9h**:  $IC_{50} = 57 \pm 5$  nM). Hieraus leiten sich die Verbindungen **9h**, **10a** und **10e** als die potentesten und selektivsten HDAC1 Inhibitoren ab.

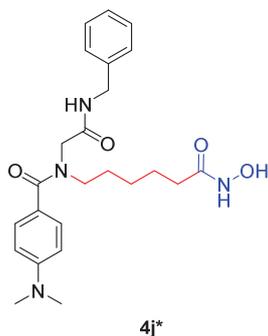
#### 4.8 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

Basierend auf der leichten HDAC1 Präferenz der peptoid-basierten Hydroxamsäuren aus Kapitel 3 entstand die Idee zur Synthese peptoid-basierter 2-Aminoanilide als selektive HDAC-Klasse I Inhibitoren. Durch die Untersuchung der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen der peptoid-basierten 2-Aminoanilide **9a-k** und **10a-f** konnten Verbindungen identifiziert werden, die im Vergleich zu den Referenzsubstanzen Vorinostat und Cisplatin vergleichbare oder bessere zytotoxische Eigenschaften aufweisen.



**Abbildung 59.** Die potentesten und selektivsten peptoid-basierten 2-Aminoanilide (abgebildet im angepassten Pharmakophormodell).

Darüber hinaus stellten sich die peptoid-basierten 2-Aminoanilide **9h** und **10a** als potente und selektive HDAC1 Inhibitoren heraus (Abbildung 59). Dies wird im Vergleich zu den peptoid-basierten Hydroxamsäuren aus Kapitel 3 deutlicher. Dort weist die „selektivste“ Verbindung **4j\*** einen Selektivitätsindex (SI HDAC1/6) von 11 auf (HDAC1: 25.0 nM, HDAC6: 280.8 nM, Abbildung 60).



**Abbildung 60.** Die selektivste peptoid-basierte Hydroxamsäure **4j\*** (Kapitel 3).

Die Selektivitätsindices (SI HDAC1/6) der Verbindungen **9h** und **10a** liegen bei >170 (**9h**) und >260 (**10a**). Weiterhin lässt sich zeigen, dass die Substitution mit einem Phenylrest in Position R<sup>3</sup> im Falle von **9h** zur Synthese selektiver HDAC1 und 2 Inhibitoren erfolgreich war.<sup>40</sup> So konnte durch die Phenylsubstitution bei **9d** im HDAC Enzym-Assay eine 20fach höhere HDAC1 Inhibition erzielt werden (**9d**: IC<sub>50</sub> = 1157 nM vs. **9h**: IC<sub>50</sub> = 57 nM). Ferner lässt sich feststellen, dass die peptoid-basierten 2-Aminoanilide (siehe **9h**, **10a**, **10b**, **10d** und

<sup>40</sup> Derzeit liegen zwar keine Daten an HDAC2 vor, jedoch wird aufgrund der hohen Homologie zu HDAC1 (97.8%) eine ähnliche Inhibition von HDAC2 erwartet.[112]

**10e**) im Vergleich zu den peptoid-basierten Hydroxamsäuren (siehe Kapitel 3) eine vergleichbare HDAC1 Inhibition aufweisen.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Substitution mit Fluor in beiden Verbindungsklassen zu einer Aktivitätsabnahme der HDAC-Inhibition führte. Weiterhin bewirkte die Substitution mit einem Phenylrest in Position R<sup>3</sup> bei den 2-Aminoaniliden **10a-f** einen Aktivitätsverlust im HDAC Ganzzell-Assay, zeigte jedoch im HDAC Enzym-Assay eine gleichbleibende HDAC1 Inhibition. Hieraus resultiert, dass die Substitution mit einer Phenylgruppe in Position R<sup>3</sup> keine sichtbare Auswirkung auf die HDAC1 Inhibition hat. Der Grund hierfür könnte die höhere Rigidität der Verbindungsklasse **10** vs. **9** sein. Demnach könnten die 2-Aminoanilide **10a-f** aufgrund ihres rigideren benzylichen Linkers bereits in der richtigen Konformation vorliegen um die Foot pocket zu erreichen. Der aliphatische Linker der 2-Aminoanilide **9a-k** ist hingegen flexibler und weist vermutlich nicht die ausreichende Konformation auf um die zinkbindende Gruppe in der Bindungstasche richtig zu positionieren und dort zu verweilen. Dies könnte erst durch die Substitution mit einem Phenylrest in Position R<sup>3</sup> ermöglicht werden.

Zusammenfassend handelt es sich bei den peptoid-basierten 2-Aminoaniliden **9a-k** und **10a-f** um potente und selektive HDAC-Inhibitoren. Insbesondere stellen die peptoid-basierten 2-Aminoanilide **9h** und **10a** sehr gute Ausgangspunkte dar um weitere Optimierungen der pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften durchzuführen. Zusätzlich wurde im Arbeitskreis *Kassack* bereits mit einer detaillierten biologischen Evaluation der Verbindungen **9h** und **10a** begonnen.

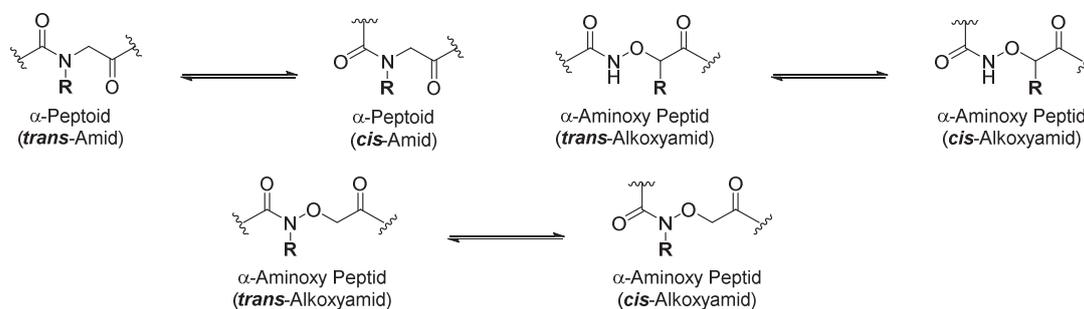
## 5. Synthese und Konformationsanalyse von $\alpha$ -Aminoxy Peptoiden

### 5.1 Zielsetzung

Alle Verbindungen, die aus der folgenden Publikation stammen und in den folgenden Kapiteln diskutiert werden, sind analog nummeriert und mit einem ' versehen.

### 5.1 Zielsetzung

Wie in den Kapiteln 3 und 4 beschrieben sind  $\alpha$ -Peptoide von einem flexiblen Rückgrat geprägt, dass sowohl *cis*- als auch *trans*-konfigurierte Amide aufweist (Abbildung 61). In Abhängigkeit von den Seitenketten ist dies stärker oder schwächer ausgeprägt. Dies hat zur Folge, dass die Sekundärstruktur von Oligomeren nicht nur durch das Rückgrat, sondern ebenfalls stark von der Seitenkette definiert wird. Aufgrund einer eingeschränkten Vielfalt an *cis*- und *trans*-induzierenden Seitenketten, ist somit die spezifische Adressierung von Proteinen erschwert. Um den Einfluss der Seitenketten zu reduzieren und eine rigidere Peptoidstruktur zu erzielen, war die Entwicklung und Untersuchung eines neuen Rückgrats hinsichtlich der strukturellen Eigenschaften geplant.



**Abbildung 61.** *Cis/trans*-Rotamere bei  $\alpha$ -Peptoiden,  $\alpha$ -Aminoxy-Peptiden und  $\alpha$ -Aminoxy-Peptoiden.

Basierend auf dem rigidem Rückgrat der  $\alpha$ -Aminoxy Peptide (siehe Kapitel 1.3.2), sollte in diesem Projekt die Amidgeometrie und Sekundärstruktur von  $\alpha$ -Aminoxy Peptoiden untersucht werden. Bei  $\alpha$ -Aminoxy Peptoiden handelt es sich um die direkten Peptoid-Analoga der  $\alpha$ -Aminoxy Peptide in denen die Seitenketten vom  $\alpha$ -Kohlenstoff auf das Alkoxyamid verschoben wurden (Abbildung 61). Um die Amidgeometrie und Sekundärstruktur von  $\alpha$ -Aminoxy Peptoiden zu analysieren, sollten zunächst Modellsubstanzen hergestellt und anschließend mittels NMR- und CD-Spektroskopie

hinsichtlich ihrer strukturellen Eigenschaften untersucht werden. Tiefergehende NMR-Experimente und röntgendiffraktometrische Analysen sollten im Arbeitskreis von *Prof. Dr. Janiak* (Heinrich-Heine-Universität, Institut für Anorganische Chemie) durchgeführt werden. Ferner sollte die Konformation der  $\alpha$ -Aminoxy Peptide mittels Molekulardynamik (MD)-Simulationen und einer Analyse der natürlichen Bindungorbitale (NBO) im Arbeitskreis von *Prof. Dr. Gohlke* (Heinrich-Heine-Universität, Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie) untersucht werden.

## 5.2 Zusammenfassung der Publikation

Die folgende Publikation ' $\alpha$ -Aminoxy Peptoids: A Unique Peptoid Backbone with a Preference for *Cis*-Amide Bonds' beschäftigt sich mit der Strukturaufklärung des neuartigen Peptoidrückgrats der  $\alpha$ -Aminoxy Peptide. Die Idee entstand auf der Grundlage einer veröffentlichten Arbeit von *Wu* und Mitarbeitern.[66] Hierbei konnte gezeigt werden, dass Vertreter der  $\alpha$ -Aminoxy Peptide durch eine rigide helikale Sekundärstruktur geprägt sind. Weiterhin konnten *Hansen* und Mitarbeiter 2016 zusätzlich anhand einer Kristallstruktur eines Oligomers belegen, dass  $\alpha$ -Aminoxy Peptide das Faltungsverhalten einer  $2_8$ -Helix aufweisen,[67] welches stark durch die Bildung von Wasserstoffbrücken geprägt ist.

$\alpha$ -Aminoxy Peptide weisen hingegen aufgrund ihrer *N*-Substitution keine Amidprotonen auf. Folglich ist eine Konformationsstabilisierung durch Wasserstoffbrücken nicht möglich. Hierauf basierend erfolgte nach einer erfolgreichen Synthese von Modellmonomeren mittels klassischer Alkylierung mit Alkylhalogeniden oder via Mitsunobu Reaktion eine detaillierte Konformationsanalyse des Peptoidrückgrats der  $\alpha$ -Aminoxy Peptoid-Monomere. Dies geschah mittels NMR-Spektroskopie, NBO-Analyse, MD-Simulationen und einer Röntgenstrukturanalyse.

In früheren Studien an  $\alpha$ -Peptoiden konnte gezeigt werden, dass die Art der Seitenkette einen starken Einfluss auf die Konformation und die Amidgeometrie des Peptoidrückgrats ausübt. Im Zuge dessen, wurden in der folgenden Publikation Monomere der  $\alpha$ -Aminoxy Peptide mit unterschiedlichen Seitenketten untersucht. Hierbei konnte in verschiedenen Lösungsmitteln und anschließenden Temperatur-NMR Experimenten die Präsenz zweier Konformere der  $\alpha$ -Aminoxy Peptide beobachtet werden. Das zweite Konformer wurde

dabei erst im Tieftemperaturbereich detektiert. Anhand tiefergehender NMR-Studien mittels 2D-NMR-Spektroskopie (NOESY) und einer Kristallstruktur eines Monomers, konnte die Amidgeometrie des Hauptkonformers identifiziert werden. Hierbei weist das Amid eine *cis*-Konformation auf. Diese *cis*-Präferenz ist insofern bemerkenswert, da  $\alpha$ -Aminoxy Peptide aufgrund ihres substituierten Stickstoffs keine Konformationsstabilisierung durch Wasserstoffbrücken erfahren. Im Vergleich dazu weisen  $\alpha$ -Peptide mit analogen Seitenketten bereits bei Raumtemperatur eine homogene Verteilung der *cis*- und *trans*-konfigurierten Amide auf.

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden oligomere Strukturen der  $\alpha$ -Aminoxy Peptide durch entsprechende Amidkupplungen der Monomere und anschließende Modifikationen der Termini synthetisiert. Diese wurden anhand von CD- und NMR-Spektroskopie, Röntgenstruktur- und NBO-Analyse, und MD-Simulationen untersucht. Mittels CD-Spektroskopie konnte keine eindeutige Information über das Vorliegen einer definierten Sekundärstruktur der oligomeren  $\alpha$ -Aminoxy Peptide gewonnen werden. In tiefergehenden NMR-Studien konnte jedoch anhand von NOE-Signalen der terminalen Amide gezeigt werden, dass die Oligomere ebenfalls *cis*-konfigurierte Amide aufweisen. Darüber hinaus wurde mittels einer Kristallstrukturanalyse eines Trimers die *cis*-Geometrie in allen Amidgruppen festgestellt. Eine Erklärung für das Vorliegen der *cis*-Amidgeometrie konnte durch die Analyse der natürlichen Bindungorbitale (NBO) erzielt werden. Demzufolge wird die *cis*-Amidgeometrie durch die Bildung eines achteckigen  $\delta$  Turns, welcher durch die  $C_{\alpha,i}$ - $H^{\delta} \cdots O=C_{i+1}$  Interaktion zwischen den Resten  $i \rightarrow i+1$  stabilisiert wird, erklärt. Eine weitergehende Konformationsanalyse erfolgte anhand von MD-Simulationen. Hierbei wurde gezeigt, dass  $\alpha$ -Aminoxy Peptide die Orientierung von spezifischen Seitenketten einer kanonischen  $\alpha$ -Helix imitieren können.

Zusammengefasst wird in der Publikation erstmalig die Amidgeometrie und Sekundärstruktur der  $\alpha$ -Aminoxy Peptide untersucht und diese als potentielle  $\alpha$ -Helixmimetika mit einer Präferenz für *cis*-Amidbindungen identifiziert. Ferner ermöglicht die einfache und leicht zugängliche Synthese der  $\alpha$ -Aminoxy Peptide die Einführung einer Vielzahl an Seitenketten. Aufgrund der einfachen Synthese, potentiellen Diversität und des

Faltungsverhaltens stellen  $\alpha$ -Aminoxy Peptide somit eine neue vielversprechende Klasse peptidomimetischer Foldamere dar.

### 5.3 Publikation

Die vorliegende Arbeit wurde veröffentlicht in: „Chemistry – A European Journal“

(Viktoria Krieger, Emanuele Ciglia, Roland Thoma, Vera Vasylyeva, Benedikt Frieg, Nader de Sousa Amadeu, Thomas Kurz, Christoph Janiak, Holger Gohlke, and Finn K. Hansen,  $\alpha$ -Aminoxy Peptoids: A Unique Peptoid Backbone with a Preference for *Cis*-Amide Bonds. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23* (15), 3699 – 3707)<sup>41</sup>

**Impact factor:** 5.317

**Eigener Anteil an der Arbeit:** 70%, Erstautorin, Durchführung der organischen Synthesen aller Oligomere und der Monomere **3'** und **7'**, Durchführung der CD-Experimente, Planung und Interpretation der NMR-Experimente (außer: Konzentrationsabhängigkeitsstudie des Monomers **3'**; VT-NMR von 2-((Benzylamino)oxy)-1-(piperidin-1-yl)ethan-1-on); VT-NMR des Oligomers **28'**; 2D-NOESY der Oligomere **28'** und **29'**; Bestimmung der Relaxationszeiten der Protonen des Hexamers **29'** und der Aktivierungsenergie), analytische Charakterisierung der Verbindungen, Mitarbeit an der Erstellung des Manuskriptes.

"Reprinted (adapted) with permission from John Wiley & Sons: Viktoria Krieger, Emanuele Ciglia, Roland Thoma, Vera Vasylyeva, Benedikt Frieg, Nader de Sousa Amadeu, Thomas Kurz, Christoph Janiak, Holger Gohlke, and Finn K. Hansen,  $\alpha$ -Aminoxy Peptoids: A Unique Peptoid Backbone with a Preference for *Cis*-Amide Bonds. In: 'Chemistry – A European Journal', *23* (15), 3699 – 3707, Copyright © 2017 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim."

---

<sup>41</sup> Die folglich aufgeführte Supporting Info stellt eine gekürzte Version dar. Die zur Publikation gehörende vollständige Supporting Info ist online zu finden unter: <http://dx.doi.org/10.1002/chem.201605100>.

## Helical Structures | Hot Paper |

  **$\alpha$ -Aminoxy Peptoids: A Unique Peptoid Backbone with a Preference for *cis*-Amide Bonds**Viktoria Krieger,<sup>[a]</sup> Emanuele Ciglia,<sup>[a]</sup> Roland Thoma,<sup>[b]</sup> Vera Vasylyeva,<sup>[b]</sup> Benedikt Frieg,<sup>[a]</sup> Nader de Sousa Amadeu,<sup>[b]</sup> Thomas Kurz,<sup>[a]</sup> Christoph Janiak,<sup>[b]</sup> Holger Gohlke,<sup>[a]</sup> and Finn K. Hansen<sup>\*[a, c]</sup>

**Abstract:**  $\alpha$ -Peptoids, or *N*-substituted glycine oligomers, are an important class of peptidomimetic foldamers with proteolytic stability. Nevertheless, the presence of *cis/trans*-amide bond conformers, which contribute to the high flexibility of  $\alpha$ -peptoids, is considered as a major drawback. A modified peptoid backbone with an improved control of the amide bond geometry could therefore help to overcome this limitation. Herein, we have performed the first thorough analysis of the folding propensities of  $\alpha$ -aminoxy peptoids (or *N*-substituted 2-aminoxyacetic acid oligomers). To this end, the amide bond geometry and the conformational properties of a series of model  $\alpha$ -aminoxy peptoids were investigated by using 1D and 2D NMR experiments, X-ray crys-

tallography, natural bond orbital (NBO) analysis, circular dichroism (CD) spectroscopy, and molecular dynamics (MD) simulations revealing a unique preference for *cis*-amide bonds even in the absence of *cis*-directing side chains. The conformational analysis based on the MD simulations revealed that  $\alpha$ -aminoxy peptoids can adopt helical conformations that can mimic the spatial arrangement of peptide side chains in a canonical  $\alpha$ -helix. Given their ease of synthesis and conformational properties,  $\alpha$ -aminoxy peptoids represent a new member of the peptoid family capable of controlling the amide isomerism while maintaining the potential for side-chain diversity.

**Introduction**

$\alpha$ -Peptoids, or oligomers of *N*-substituted glycine, have several advantages over peptides as potential bioactive compounds including proteolytic stability and increased cell permeability.<sup>[1,2]</sup> Peptoid libraries have been utilized as protein binding agents and as inhibitors of protein–protein interactions,<sup>[3–6]</sup> although primary screening hits identified from peptoid libraries have usually not displayed high activity or potency.<sup>[7]</sup> The major limitation of peptoids is the lack of conformational constraints due to the absence of internal hydrogen bonding, which may reduce their binding affinity to proteins. In contrast to peptides, a high degree of *cis*-amide bonds is observed in

$\alpha$ -peptoids.<sup>[8]</sup> The *cis*- and *trans*-amide conformations are almost isoenergetic for *N*-alkyl  $\alpha$ -peptoid monomers, and studies have shown that the nature of the side chain can significantly modulate the ratio of *cis/trans*-amide bond conformers.<sup>[9]</sup> Nevertheless,  $\alpha$ -peptoids can form stable, helical secondary structures when the *cis/trans*-amide isomerism is optimally controlled.

Similarly, it has been hypothesized that  $\beta$ -peptoids (*N*-alkyl  $\beta$ -alanines) can exhibit foldamer properties.<sup>[10–14]</sup> A recent study by Olsen and co-workers provided a high-resolution X-ray crystal structure of a  $\beta$ -peptoid hexamer containing strongly *cis*-inducing *N*-(*S*)-1-(1-naphthyl)ethyl side chains. The crystal structure disclosed an all-*cis*-amide bond geometry and a right-handed helical conformation with exactly three residues per turn and a helical pitch of 9.6–9.8 Å between the turns.<sup>[15]</sup> However, it is important to note that the amide bond geometry in  $\beta$ -peptoids is also highly dependent on the nature of the side chain.<sup>[16]</sup>

Thus far, the control of the folding properties of  $\alpha$ - and  $\beta$ -peptoids is mainly achieved by incorporation of specific *cis*- or *trans*-directing side chains. This focus on a small number of side chains comes at the expense of diversity.<sup>[7,17]</sup> Accordingly, it is worthwhile to address this limitation and to aim at the design of peptoid backbones with an improved control of the *cis/trans*-amide isomerism. In 2002, Shin and Park reported the preparation of  $\alpha$ -aminoxy peptoid pentamers, but the folding properties were not investigated.<sup>[18]</sup> The backbone-controlled secondary structures of  $\alpha$ -aminoxy peptides<sup>[19,20]</sup> prompted us

[a] V. Krieger, Dr. E. Ciglia, B. Frieg, Prof. Dr. T. Kurz, Prof. Dr. H. Gohlke, Prof. Dr. F. K. Hansen  
Institute of Pharmaceutical and Medicinal Chemistry  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Universitätsstrasse 1, 40225 Düsseldorf (Germany)

[b] R. Thoma, Dr. V. Vasylyeva, Dr. N. de Sousa Amadeu, Prof. Dr. C. Janiak  
Institute of Inorganic and Structural Chemistry  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Universitätsstrasse 1, 40225 Düsseldorf (Germany)

[c] Prof. Dr. F. K. Hansen  
Pharmaceutical/Medicinal Chemistry  
Institute of Pharmacy, Leipzig University  
Brüderstrasse 34, 04103 Leipzig (Germany)  
E-mail: finn.hansen@uni-leipzig.de

 Supporting information for this article can be found under:  
<http://dx.doi.org/10.1002/chem.201605100>.

to analyze the conformational properties of  $\alpha$ -aminoxy peptoids (or oxa-analogues of  $\beta$ -peptoids) in detail. In this work, we report the results of our study revealing a unique *cis*-amide bond preference of  $\alpha$ -aminoxy peptoids in comparison to other peptoid backbones.

## Results and Discussion

We first designed and synthesized a series of model  $\alpha$ -aminoxy peptoids utilizing an N-terminal acetyl and a C-terminal piperidyl cap group to investigate the influence of several side chains on the amide conformation (see the Supporting Information for synthetic details). To be consistent with the peptoid nomenclature, we use the terms "*cis*" and "*trans*" to describe the amide dihedral angle omega referring to the relative position of the backbone atoms (see Figure 1). As a consequence,

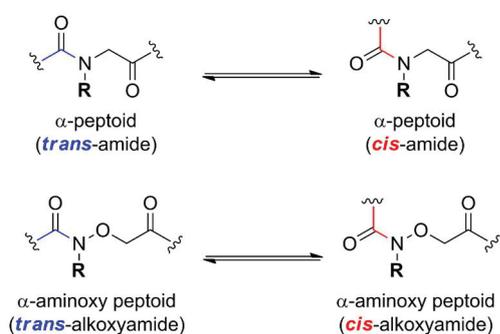


Figure 1. Selected peptoid backbones.

the *cis* conformer features an *E*-configured hydroxamate moiety, whereas the *trans* conformer corresponds to a *Z*-configured hydroxamate. The definition of all other relevant dihedral angles is outlined in Figure 2. The  $\alpha$ -aminoxy peptoids **1** and **3–5** were designed to investigate the *cis/trans* isomerism in the absence of strongly *cis*- or *trans*-directing side chains. Compound **2** was included due to its strongly *trans*-amide

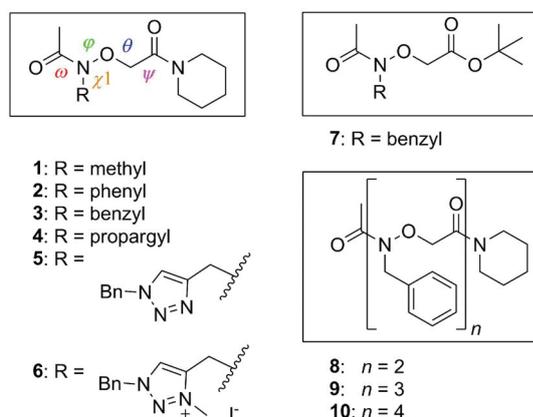


Figure 2.  $\alpha$ -Aminoxy peptoids investigated in this study. The relevant backbone dihedral angles are defined as follows:  $\omega = [\text{C}\alpha_{i-1}, \text{C}_{i-1}, \text{N}, \text{O}]$ ,  $\varphi = [\text{C}_{i-1}, \text{N}, \text{O}, \text{C}\alpha_i]$ ,  $\theta = [\text{N}, \text{O}, \text{C}\alpha_i, \text{C}_i]$ ,  $\psi = [\text{O}, \text{C}\alpha_i, \text{C}_i, \text{N}_{i+1}]$ , and  $\chi_1 = [\text{NC}\beta, \text{NC}\alpha, \text{N}, \text{O}]$ .

bond-inducing phenyl side chain.<sup>[21]</sup> The  $\alpha$ -aminoxy peptoid **6** served as a *cis*-promoting model compound due to the *cis*-directing triazolium side chain.<sup>[17]</sup> The model peptoid **7** containing a *tert*-butyl ester was incorporated to analyze an alternative C-terminal cap group. The  $\alpha$ -aminoxy peptoids **8–10** were synthesized as model compounds for oligomeric  $\alpha$ -aminoxy peptoids to study the conformational preference in oligomers (see the Supporting Information for synthetic details).

We next studied the conformational homogeneity of our model systems by using standard 1D NMR techniques at room temperature. <sup>1</sup>H NMR spectra of the peptoid monomers **1–6** were recorded in CDCl<sub>3</sub> at room temperature and revealed only a single set of NMR signals. However, some signals appeared broad. We therefore collected the <sup>1</sup>H spectra of the monomers **1–6** in [D<sub>3</sub>]acetonitrile, [D<sub>4</sub>]MeOH, D<sub>2</sub>O, and [D<sub>6</sub>]DMSO observing again some relatively broad signals in the case of the peptoids **1–5** (see the Supporting Information). These results prompted us to study the <sup>1</sup>H NMR spectra in more detail. We performed variable temperature (VT) NMR experiments on the  $\alpha$ -aminoxy peptoid **3** in CDCl<sub>3</sub>. Cooling caused the signals of compound **3** to split into two sets of sharp signals at  $-20$  and  $-30$  °C in ratios of 87:13 and 86:14, respectively (Figure S1 in the Supporting Information). In order to exclude that the second species arises from the piperidyl group, we repeated the VT NMR experiment with the model  $\alpha$ -aminoxy peptoid **7** containing a *tert*-butyl ester as the C-terminal cap. Compound **7** followed the same trend as observed for the  $\alpha$ -aminoxy peptoid **3** (Figure S2 in the Supporting Information). To study whether the additional NMR signals arise from aggregation, we recorded the <sup>1</sup>H NMR spectra of compound **3** at  $-30$  °C with varying concentrations (0.15–150 mM, Figure S3 in the Supporting Information), which showed no concentration dependency of the peak ratio. Interestingly, a VT NMR experiment with the deacetylated analogue of the  $\alpha$ -aminoxy peptoid **3** (i.e., 2-((benzylamino)oxy)-1-(piperidin-1-yl)ethan-1-one) did not show any additional conformational peaks (Figure S4 in the Supporting Information). Thus, we reasoned the presence of two sets of NMR signals might indicate the coexistence of two well-defined species that equilibrate slowly on the NMR time scale, for example, *cis/trans*-amide bond rotamers. This hypothesis was supported by detection of EXSY signals in a 2D NOESY experiment on compound **3** in CDCl<sub>3</sub> at  $-30$  °C (Figure S5 in the Supporting Information).<sup>[22]</sup> This behavior is typical for protons under significant chemical exchange on the saturation time scale and thus implies the existence of rotamers.<sup>[23]</sup> Subsequent <sup>1</sup>H NMR experiments with compounds **1**, **2**, and **4–6** at  $-30$  °C provided further evidence for the existence of *cis/trans*-amide bond conformers. In the case of compounds **1**, **4**, and **5** we observed a similar behavior as for compound **3** with ratios<sup>[24]</sup> of 84:16 (compound **1**), 84:16 (compound **4**), and 82:18 (compound **5**). Notably, the <sup>1</sup>H NMR spectrum of the peptoid **2** (containing a *trans*-directing side chain) revealed an increased amount of the minor conformer at  $-30$  °C in CDCl<sub>3</sub> (ratio of 65:35), whereas the spectrum of the  $\alpha$ -aminoxy peptoid **6** (containing a *cis*-directing side chain) showed well-defined peaks with no evidence for a significant population of another conformer. To study the conformational

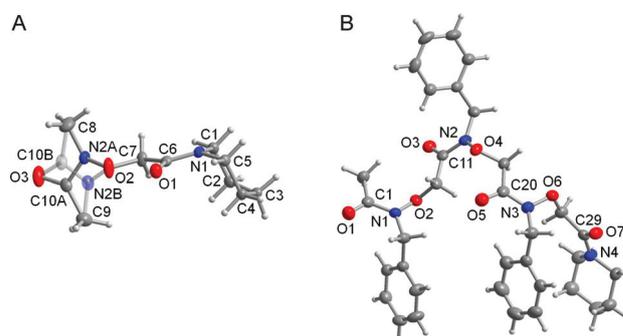
stability of longer peptoid sequences, the  $\alpha$ -aminoxy peptoid oligomers **8–10** were synthesized (see the Supporting Information). The  $^1\text{H}$  NMR spectra conducted in  $\text{CDCl}_3$ ,  $[\text{D}_3]\text{acetonitrile}$ , and  $[\text{D}_4]\text{MeOH}$  showed well-defined signals (see the Supporting Information for details). The  $^1\text{H}$  NMR spectra measured at  $-30^\circ\text{C}$  in  $\text{CDCl}_3$  revealed one major conformer in all cases. However, in the  $\alpha$ -aminoxy dipeptoid **8** a second conformational isomer was observed (ratio of 86:14). In the case of the  $\alpha$ -aminoxy tripeptoid **9** and the  $\alpha$ -aminoxy tetrapeptoid **10** only traces of side peaks were observed.

Because several model monomers and oligomers revealed the presence of two conformers, we performed comprehensive NMR experiments on the  $\alpha$ -aminoxy peptoid **3** in  $\text{CDCl}_3$  to determine the Arrhenius activation energy for the rotational barrier. For this purpose, the interconversion rate constants at the respective coalescence temperatures were measured by VT NMR experiments by using different NMR instruments. A plot of the temperature dependence of the interconversion rate constants afforded the Arrhenius activation energy ( $E_a = (42 \pm 2) \text{ kJ mol}^{-1}$ , see the Supporting Information for details).

In order to investigate whether  $\alpha$ -aminoxy peptoid monomers prefer *cis*- or *trans*-configured amide bonds, we decided to study the amide bond geometry of our model compounds in detail. Based on our observed side-chain dependency we assumed a *cis* preference in the case of our model  $\alpha$ -aminoxy peptoids. To confirm a preferred *cis*-amide bond configuration in solution, the torsion angle  $\omega$  was analyzed by 2D NMR spectroscopy. Compound **6** was chosen for recording a 2D NOESY NMR spectrum due to the absence of any additional conformational peaks. We observed a strong cross peak between the N-terminal acetyl group and the backbone methylene protons as well as a weak NOE between the acetyl and the side chain methylene protons (Figure S6 in the Supporting Information). We reasoned that a *cis*-configured amide ( $\omega \approx 0^\circ$ ) would fulfill these distance requirements, whereas a *trans*-configured amide ( $\omega \approx 180^\circ$ ) should show a stronger NOE between the acetyl and the side chain methylene protons. A 2D NOESY spectrum of the  $\alpha$ -aminoxy peptoid **3** at  $-30^\circ\text{C}$  revealed a strong cross peak between the N-terminal acetyl group and the backbone methylene protons for the major conformer, which indicates a *cis*-amide bond geometry (Figure S7 in the Supporting Information). Notably, our results are in good agreement with data reported from Grel and co-workers who showed that simple alkoxyamides prefer *cis*-amide bonds in the absence of hydrogen bonds.<sup>[25]</sup> The above-mentioned data suggest that the  $\alpha$ -aminoxy peptoid monomers **1** and **3–6** possess a strong preference for *cis*-configured amide bonds. In particular, it is worth noting that the model compounds **1** and **3–5** are showing a significant preference for *cis*-amide bonds (>80%) even in the absence of any *cis*-directing side chains. In contrast,  $\alpha$ -peptoids bearing identical cap groups and side chains revealed inhomogeneous mixtures of *cis/trans* rotamers or even a preference for *trans*-amide bonds (Figure S8 in the Supporting Information).

Fortunately, we were able to obtain X-ray quality crystals of the  $\alpha$ -aminoxy peptoid monomer **1** and the tripeptoid **9** by slow evaporation from a  $\text{CDCl}_3$  solution. The X-ray structure

analysis of the  $\alpha$ -aminoxy peptoid **1** proved a *cis*-amide configuration in the solid state. Although the *N*-methylacetamide group in the  $\alpha$ -aminoxy peptoid **1** was disordered in the crystal structure, it is important to note that the amide is *cis*-configured in both the A and B component (Figure 3). The X-ray

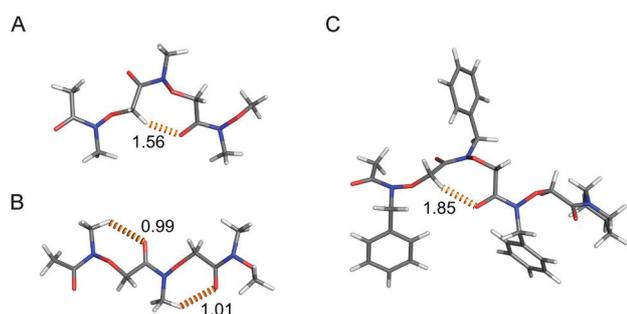


**Figure 3.** Thermal ellipsoid plots of A) the  $\alpha$ -aminoxy peptoid **1** and B) the  $\alpha$ -aminoxy tripeptoid **9** (50% probability for compound **1**, 70% probability for compound **9**, hydrogen atoms with arbitrary radii). The N and C(=O) atom of the *N*-methylacetamide group in compound **1** is disordered in a  $C_2$ -type ( $180^\circ$ ) rotation around the O3–O2 connector with equal occupancy (see the Supporting Information for further details). One of the disordered positions is shown semi-transparent.

structure of the  $\alpha$ -aminoxy tripeptoid **9** revealed an all-*cis*-amide geometry (Figure 3). The observed torsion angles are summarized in Table S1 in the Supporting Information. Interestingly, the N-terminal (*i*) and the internal (*i*+1) monomer disclosed almost identical backbone torsion angles, whereas the C-terminal monomer (*i*+2) showed different torsion angles. This phenomenon can be explained by packing effects in the solid state (see the Supporting Information for a detailed discussion). The X-ray structure shows the trimer adopting a zigzag conformation in which the *i* and the *i*+2 side chains are oriented on the same side of the backbone, whereas the *i*+1 benzyl group points in the opposite direction.

On the first view, the *cis* preference of  $\alpha$ -aminoxy peptoids is somewhat surprising keeping in mind that  $\alpha$ -aminoxy peptides preferentially adopt *trans*-amide bonds.<sup>[26]</sup> However, we and others showed that the secondary structure in  $\alpha$ -aminoxy peptides is primarily stabilized by eight-membered ring hydrogen bonds between the C=O<sub>*i*</sub> and the N–H<sub>*i*+2</sub> moieties, which are not possible in the case of  $\alpha$ -aminoxy peptoids.<sup>[19,20,26]</sup> Thus, in order to further investigate the *cis*-amide preference in  $\alpha$ -aminoxy peptoids, we performed a natural bond orbital (NBO) analysis on all-methyl model  $\alpha$ -aminoxy peptoids in *cis*- and *trans*-amide configurations (Figures 4A and B) as well as the *cis*-amide  $\alpha$ -aminoxy tripeptoid **9** (Figure 4C).

For the model  $\alpha$ -aminoxy peptoid in a *cis*-amide configuration, the NBO analysis revealed  $\text{C}\alpha_{i-1}\text{H}\cdots\text{O}=\text{C}_{i+1}$  donor–acceptor interactions, which results in an eight-membered  $\delta$  turn according to the classification by Toniolo and Benedetti<sup>[27]</sup> (Figure 4A); the second-order perturbation theory analysis in the NBO basis revealed a mean donor–acceptor stabilization energy of  $1.56 \text{ kcal mol}^{-1}$  (Figures 4A and S9A in the Supporting Information). The  $\text{C}\alpha$  hydrogen atom involved in the  $\text{C}\alpha$ -



**Figure 4.** Results from the natural bond orbital analysis. A,B) HF/6-31G\*-optimized structures from an all-methyl model compound in a A) *cis* and B) *trans* configuration. C) HF/6-31G\*-optimized structure of the  $\alpha$ -aminoxy tripeptoid **9** in a *cis* configuration. In A–C) the orange dotted lines depict donor–acceptor interactions. The labels depict the donor–acceptor stabilization energies (in [kcal mol<sup>-1</sup>]) averaged over the two respective oxygen lone pairs, determined by the second-order perturbation theory analysis.

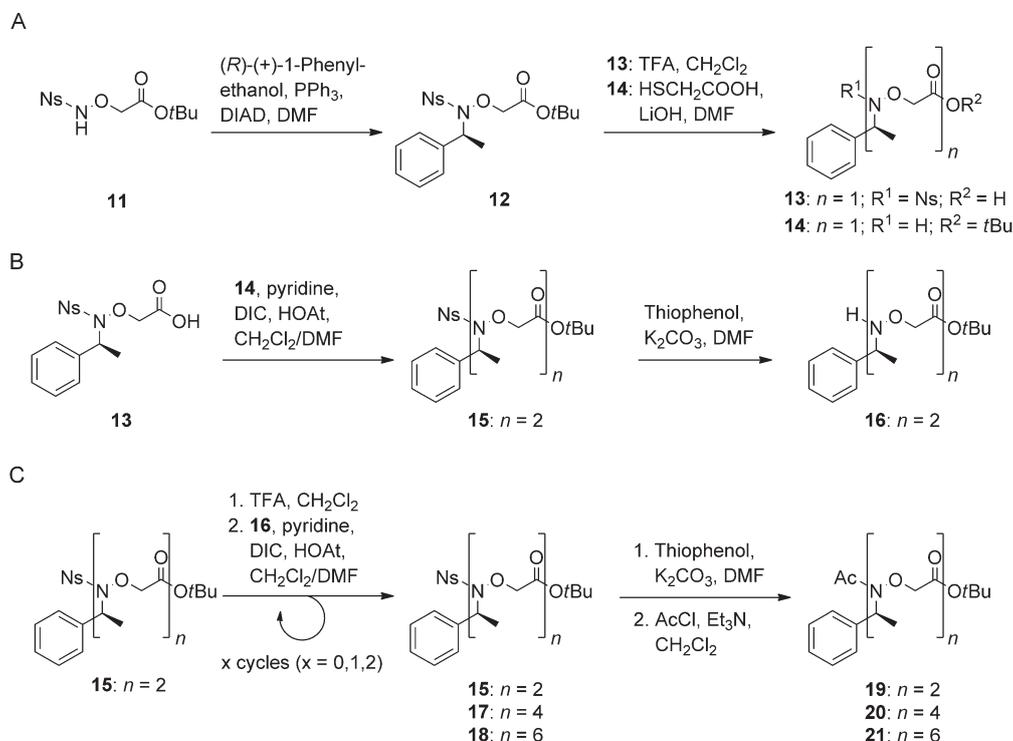
H $\cdots$ O=C interaction is more electron deficient than the geminal, non-involved hydrogen atom (0.2458 au in C $\alpha$ –H $\cdots$ O=C vs. 0.2281 au in C $\alpha$ –H; Figure S9A in the Supporting Information), indicating that electrons are delocalized through the C $\alpha$ –H $\cdots$ O=C interaction. The stabilization energy computed herein is close to the absolute value of the lower limit of the electronic association energy  $D_e$  of 2.1 kcal mol<sup>-1</sup> computed for *N,N*-dimethylformamide dimers associated through C–H $\cdots$ O=C hydrogen bonds.<sup>[28]</sup> The C $\alpha$  $\cdots$ O distance of 3.1 Å coincides with expectations of distances of weak hydrogen bonds.<sup>[29]</sup> As to the *trans* configuration, no C $\alpha$ –H $\cdots$ O=C interaction was revealed by

the NBO analysis but rather a C $\omega$ <sub>*r*</sub>–H $\cdots$ O=C<sub>*i*</sub> interaction within the same residue (Figure 4B); the latter interaction (stabilization energy:  $\approx$ 1.00 kcal mol<sup>-1</sup>) is weaker than the C $\alpha$ <sub>*r*</sub>–H $\cdots$ O=C<sub>*i+1*</sub> one (Figures 4A and B as well as S9A and B in the Supporting Information).

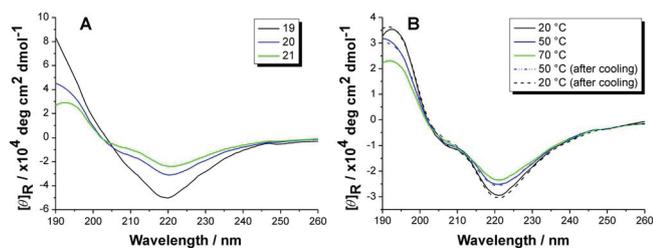
In agreement with results from the all-methyl model peptoid in the *cis* configuration, the NBO analysis also revealed the eight-membered  $\delta$  turn in the *cis*-amide  $\alpha$ -aminoxy tripeptoid **9** (Figure 4C). Herein, the donor–acceptor stabilization energy is stronger than in the model peptoid (1.85 kcal mol<sup>-1</sup> in compound **9** vs. 1.56 kcal mol<sup>-1</sup> in the model peptoid; Figures 4A and C as well as S9A and C in the Supporting Information). This might be explained by the electron-pushing effect of the benzyl side chains, leading to the amide oxygen atom being more negatively charged ( $-0.7269$  au for compound **9** vs.  $-0.6980$  au for the model peptoid; Figures S9A and C in the Supporting Information).

Taken together, by means of NBO calculations, we found stabilizing donor–acceptor interactions for both the *cis* and *trans* configurations. The formation of an eight-membered  $\delta$  turn between the residues  $i \rightarrow i+1$  in the *cis* configuration is accompanied by a favorable stabilization energy for C $\alpha$ <sub>*r*</sub>–H $\cdots$ O=C<sub>*i+1*</sub> interactions, which could explain the *cis*-amide bond preference for  $\alpha$ -aminoxy peptoids. Note that, to the best of our knowledge, no unambiguous report has become available so far for the occurrence of a  $\delta$  turn in a linear peptide.<sup>[30]</sup>

To gain further insight into the potential folding propensities of oligomers we decided to synthesize oligomers featuring  $\alpha$ -chiral side chains (Scheme 1). Circular dichroism (CD) spec-



**Scheme 1.** Synthesis of the  $\alpha$ -aminoxy peptoids **19–21** containing  $\alpha$ -chiral aromatic side chains (Ns = 2-nitrobenzenesulfonyl, *t*Bu = *tert*-butyl, DIAD = diisopropyl azodicarboxylate, TFA = trifluoroacetic acid, DIC = diisopropylcarbodiimide, Ac = acetyl).



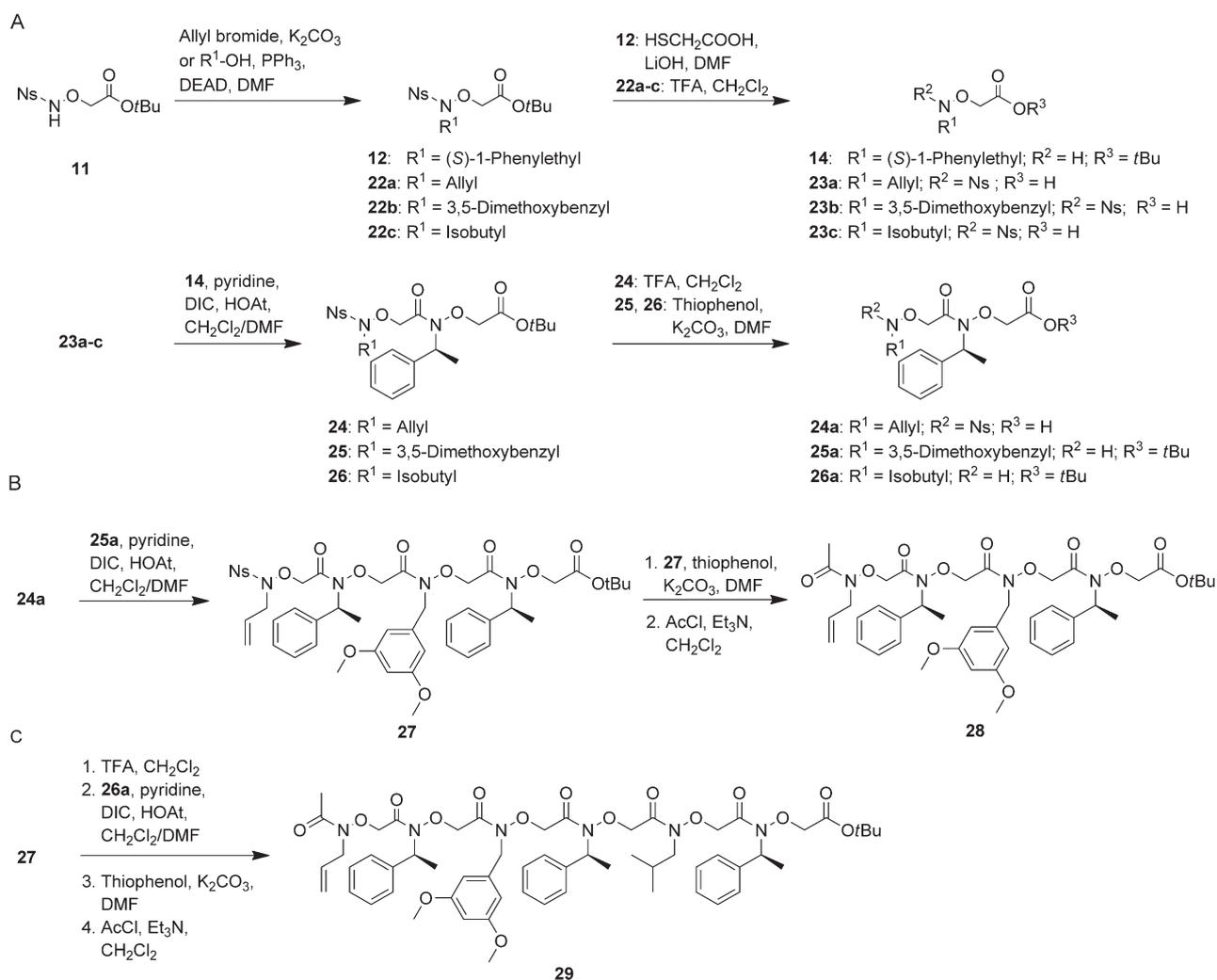
**Figure 5.** A) CD spectra of compounds **19–21** in acetonitrile (50  $\mu\text{M}$ ) at 25  $^{\circ}\text{C}$ . B) CD spectra of compound **21** at varying temperatures in acetonitrile (50  $\mu\text{M}$ ) (data are expressed in terms of per-residue molar ellipticity (in  $[\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}]$ )).

trospectroscopy has been extensively used to study the secondary structure of  $\alpha$ -peptoids. Figure 5 shows the CD spectra of the  $\alpha$ -aminoxy peptoids **19–21** in acetonitrile. The CD spectra of compounds **19–21** reveal a characteristic minimum around  $\lambda = 220$  nm. Somewhat surprisingly, the intensity of the minimum near  $\lambda = 220$  nm decreased with an increasing chain length of the  $\alpha$ -aminoxy peptoids. This phenomenon might indicate that this signal is not caused by secondary structure formation but is related to the *N*-(*S*)-1-phenylethyl-containing amide motif itself.<sup>[11,15]</sup> To verify this hypothesis we synthesized an acetylated monomer containing the *N*-(*S*)-1-phenylethyl group (see the Supporting Information). The CD spectrum of this  $\alpha$ -chiral monomer disclosed a strong minimum at around  $\lambda = 220$  nm (Figure S10 in the Supporting Information). Based on this result it appears unlikely that the minimum at  $\lambda = 220$  nm is related to secondary structure formation as simple monomers would not be expected to adopt an ordered conformation. On the other hand, starting at the length of a tetramer a shoulder appeared at  $\lambda = 209$  nm. It could be speculated that this minimum at  $\lambda = 209$  nm might be indicative of a length-dependent secondary structure formation. Because characteristic CD signals do not necessarily need to be indicative of a folding event,<sup>[31]</sup> further studies on longer oligomers will be required to investigate the nature of the minimum near  $\lambda = 209$  nm in more detail. However, to study the thermostability of the observed CD spectral bands, we collected CD spectra of the hexamer **21** at temperatures in the temperature range 20–70  $^{\circ}\text{C}$ . As can be seen in Figure 5B, the hexamer **21** shows only a small reduction in the ellipticity and no change in the shape until 70  $^{\circ}\text{C}$ , denoting the thermal stability of the CD spectral bands.

It is not possible to identify the secondary structure of novel peptidomimetics in solution by solely analyzing CD spectra. We therefore designed and synthesized the tetramer **28** and the hexamer **29** in order to perform additional conformational studies. Based on the X-ray analysis of the tripeptoid **9**, we speculated that  $\alpha$ -aminoxy peptoids can adopt a conformation in which the *i*, *i*+2, and *i*+4 side chains are located on one side of the peptoid face, whereas the *i*+1, *i*+3, and *i*+5 side chains are located on the opposite side. Thus, we designed the hexamer **29** containing  $\alpha$ -chiral, aromatic side chains at the *i*+1, *i*+3, and *i*+5 positions to create an “aromatic face”, which is known to stabilize peptoid helices.<sup>[32]</sup> Three structurally diverse side chains were chosen for the *i*, *i*+2, and *i*+4 in order to minimize overlapping NMR signals. The tetramer **28** repre-

sents a simplified and truncated analogue of compound **29**. The synthesis of the oligomers **28** and **29** is outlined in Scheme 2 (see the Supporting Information for synthetic details). Briefly, we prepared a set of dimeric building blocks (Scheme 2A), which were subsequently assembled to the desired oligomers by amide coupling reactions followed by deprotection and acetylation of the *N*-terminal aminoxy moiety (Schemes 2B and C). We conducted 2D NOESY experiments on compounds **28** and **29** to gain further insights into the amide bond geometry and the secondary structure of oligomeric  $\alpha$ -aminoxy peptoids. When analyzing the tetramer **28** we observed a strong cross peak between the *N*-terminal acetyl group and the backbone methylene group of the *N*-terminal monomer (*i*) as well as a strong cross peak between the backbone protons of the monomers *i*+2 and *i*+3 indicating a *cis*-amide geometry for the C- and *N*-terminal amide bonds (Figure S11 in the Supporting Information). However, no cross peaks could be observed for the internal amides. Moreover, no further distinct inter-residue NOEs could be detected. In the case of the hexamer **29**, a clear NOE was found for the C-terminal amide suggesting a *cis*-amide geometry (Figure S12 in the Supporting Information). Unfortunately, no inter-residual NOESY cross peaks could be detected. This issue was further investigated by a proton inversion-recovery experiment (Table S2 in the Supporting Information), revealing significant differences in the longitudinal relaxation times of backbone and side-chain protons, which can affect cross relaxation. Notably, a VT NMR experiment on compound **28** revealed no indications for the presence of *cis/trans*-amide bond rotamers (Figure S13 in the Supporting Information). The CD spectra of compounds **28** and **29** in acetonitrile (Figure S14 in the Supporting Information) look very similar when compared to the spectra of compounds **19–21** (Figure 5).

Because our CD and NMR data are insufficient to verify the presence of distinct secondary structures, we performed comprehensive computational studies to investigate the conformational preferences of  $\alpha$ -aminoxy peptoids and their potential as helix mimetics. The backbone torsion angles  $\varphi$ ,  $\theta$ ,  $\omega$ , and  $\psi$  (Figure 2) are critical for an accurate description of the conformational preferences. We parameterized  $\varphi$  and  $\theta$  for molecular dynamics (MD) simulations at the molecular mechanics level based on ab-initio calculations (Figures 2 and S15 in the Supporting Information). Fitting of the molecular mechanics energy against the ab-initio energy for the angles  $\varphi$  and  $\theta$  provided very good correlations [ $R^2 \geq 0.95$  (Figure S15 in the Supporting Information)]. For the backbone torsion angles  $\omega$  and  $\psi$  (Figure 2), molecular mechanics energies using the parameters of the GAFF force field (see the Supporting Information) already yielded a very good agreement with the ab-initio energies [ $R^2 = 0.99$  (Figure S16 in the Supporting Information)]. The energy minima identified for the torsion potentials of the angles  $\varphi$ ,  $\theta$ ,  $\omega$ , and  $\psi$  showed good agreement with the torsion angles found in the crystal structure of the  $\alpha$ -aminoxy peptoids **1** and **9** (Figures S15 and S16 as well as Table S3 in the Supporting Information). Hence, the torsion angle parameters accurately reproduce the relative energies of the backbone dihedral angles of  $\alpha$ -aminoxy peptoids.

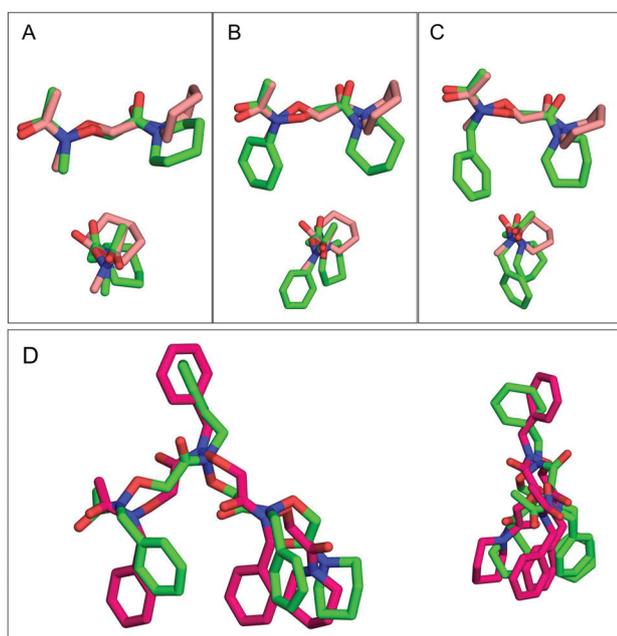


**Scheme 2.** Synthesis of the tetramer **28** and the hexamer **29** (DEAD = diethyl azodicarboxylate, HOAt = 1-hydroxy-7-azabenzotriazole).

Subsequently, we performed MD simulations of the  $\alpha$ -aminoxy peptoids **1** (3.5  $\mu\text{s}$  length), **2** and **3** (3  $\mu\text{s}$  length each), and **9** (3.5  $\mu\text{s}$  length) in explicit chloroform. Choosing this solvent allows for a direct comparison of the simulation results with the NMR data (see above). The MD simulations reached equilibrium with respect to conformational preferences of the angles  $\varphi$ ,  $\theta$ , and  $\psi$ , as indicated by highly symmetric torsion angle distributions (Figures S17, S18, and S19 in the Supporting Information) and frequent transitions between energetically preferred states (Figures S20, S21, and S22 in the Supporting Information). In contrast, for the  $\alpha$ -aminoxy peptoids **1**, **2**, or **3** started either with a *cis*- or *trans*-amide conformation, a transition in the  $\omega$  torsion angle between the two conformers was not observed, which is in line with an energetic barrier separating the two conformers (Figure S16 in the Supporting Information for the *N*-ethoxyformamide model compound; Figure S23 in the Supporting Information for the  $\alpha$ -aminoxy peptoid **30** (*N,N*-dimethyl-2-((*N*-methylacetamido)-oxy)acetamide) for probing the effect of an acetyl cap group and an *N*-methyl side chain) and previous work.<sup>[33]</sup> In addition, our calculations show that the *cis* conformer is preferred over the *trans* conformer by

approximately 2.8 kcal mol<sup>-1</sup> for peptoid **30**, whereas the *cis* and *trans* conformers are virtually isoenergetic for the *N*-ethoxyformamide model compound (Figures S23 and S16 in the Supporting Information, respectively), which is consistent with *cis/trans* energy differences of up to 1.4 kcal mol<sup>-1</sup> in regular (not  $\alpha$ -aminoxy) peptoids, as reported by Yoo and Kirshenbaum.<sup>[9]</sup> These findings also agree with the above-described NMR experiments and the crystal structure analyses. Finally, the distributions of the backbone torsion angles of the monomeric  $\alpha$ -aminoxy peptoids **1**, **2**, and **3** observed in the MD simulations showed a very good to good agreement with the torsion angle values found in the crystal structures of the  $\alpha$ -aminoxy peptoids **1** and **9** (Figures S17, S18, and S19 as well as Table S3 in the Supporting Information). The relative free energies of the  $\alpha$ -aminoxy peptoid **1** as a function of the backbone dihedral angles  $\varphi$ ,  $\theta$ , and  $\psi$  computed from the frequency of occurrence of the conformations during the MD simulations allowed us to identify the preferred backbone conformations of the  $\alpha$ -aminoxy peptoid **1** (Figure S24 in the Supporting Information); given the almost identical torsion angle distributions (Figures S17, S18, and S19 in the Supporting Information), simi-

lar conformations are expected to be favorable also for the other  $\alpha$ -aminoxy peptoids. The lack of mirror symmetry in the  $\theta/\varphi$  and  $\theta/\psi$  projections of the relative free energy is compatible with the observation that the amide nitrogen atom shows a certain degree of pyramidalization, which is in agreement with findings of Jordan and co-workers, leading to a transient chirality.<sup>[33]</sup> Superimposing the low-energy conformations of the  $\alpha$ -aminoxy peptoids **1**, **2**, and **3** extracted from the respective MD simulations onto the crystal structure of the  $\alpha$ -aminoxy peptoid **1** results in backbone-atom root mean square deviations (RMSD)  $\leq 0.6$  Å (Figure 6A–C). Similarly, overlaying a low-energy conformation of the  $\alpha$ -aminoxy peptoid **9** onto the crystal structure of the same compound results in a backbone-atom RMSD value of 1.2 Å (Figure 6D). These results show that the MD simulations yield low-energy conformations of  $\alpha$ -aminoxy peptoids that are in very good agreement with the experimentally determined structures.



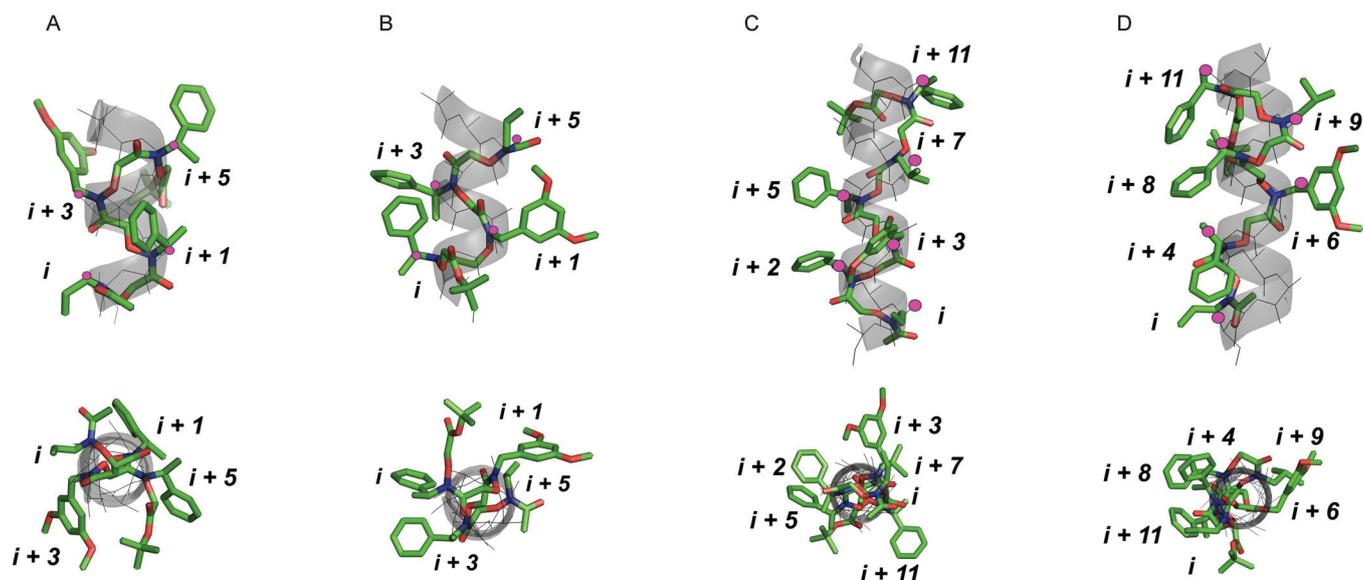
**Figure 6.** A–C) Overlay of the low-energy conformations of the  $\alpha$ -aminoxy peptoids **1**, **2**, and **3** obtained from MD simulations (green) onto the crystal structure of the  $\alpha$ -aminoxy peptoid **1** (pink), resulting in RMSD values of the backbone atoms of 0.57, 0.60, and 0.59 Å for compounds **1**, **2**, and **3**, respectively. In the lower panel, the overlays are rotated by 90°. D) Overlay of a low-energy conformation of the  $\alpha$ -aminoxy peptoid **9** obtained from MD simulations (green) onto the crystal structure of the  $\alpha$ -aminoxy peptoid **9** (magenta), resulting in an RMSD value of the backbone atoms of 1.2 Å. In the right panel, the overlay is rotated by 90°.

We used the thus validated setup of MD simulations to investigate the conformational properties of the more complex tetrameric (compound **28**) and hexameric (compound **29**)  $\alpha$ -aminoxy peptoids. MD simulations of compounds **28** (3.5  $\mu$ s length) and **29** (2  $\mu$ s length) in explicit chloroform again yielded distributions of backbone torsion angles that are in very good agreement with the values of the crystal structures of the  $\alpha$ -aminoxy peptoids **1** and **9**, and are similar to those obtained with the  $\alpha$ -aminoxy peptoids **1**, **2**, and **3** (data not

shown). The conformational ensembles obtained by the MD simulations of the  $\alpha$ -aminoxy peptoids **28** and **29** were clustered according to the RMSD values. The four most populated clusters that account for 71% (for the  $\alpha$ -aminoxy peptoid **28**) and 64% (for the  $\alpha$ -aminoxy peptoid **29**) of the MD ensembles were further analyzed. Overlaying the C $\beta$  atoms of the  $\alpha$ -aminoxy peptoid **28** onto the C $\beta$  atoms of a canonical  $\alpha$ -helix shows that the  $\alpha$ -aminoxy peptoid scaffold can closely mimic the spatial arrangement of the peptide side chains at the positions  $i$ ,  $i+1$ ,  $i+3$ , and  $i+5$ . When the N terminus of the peptoid is oriented toward the C terminus of the helix, the RMSD value of the coordinates of the respective atom pairs is 0.5 Å (Figure 7A). When the peptoid is oriented in the opposite direction, the RMSD value is 0.7 Å (Figure 7B). Overlaying the C $\beta$  atoms of the peptoid **29** with the C $\beta$  atoms of a canonical  $\alpha$ -helix shows that the  $\alpha$ -aminoxy peptoid scaffold can also address an  $i$ ,  $i+2$ ,  $i+3$ ,  $i+5$ ,  $i+7$ ,  $i+11$  amino acid pattern when the N terminus of the peptoid is oriented toward the C terminus of the helix (Figure 7C), and alternatively an  $i$ ,  $i+4$ ,  $i+6$ ,  $i+8$ ,  $i+9$ ,  $i+11$  pattern when the peptoid is oriented in the opposite direction (Figure 7D). The RMSD value of the coordinates of the respective atom pairs is 1.1 Å in both cases. In summary, the conformational analysis based on the MD simulations reveals that  $\alpha$ -aminoxy peptoids adopt conformations that can mimic  $i$ ,  $i+1$ ,  $i+3$ ,  $i+5$ ;  $i$ ,  $i+2$ ,  $i+3$ ,  $i+5$ ,  $i+7$ ,  $i+11$ ; and  $i$ ,  $i+4$ ,  $i+6$ ,  $i+8$ ,  $i+9$ ,  $i+11$  patterns of substituent orientations with respect to an  $\alpha$ -helix.

## Conclusion

We have performed the first thorough analysis of the folding propensities of  $\alpha$ -aminoxy peptoids. To this end, we designed and synthesized a series of model  $\alpha$ -aminoxy peptoids utilizing well-established cap groups to investigate the influence of several side chains on the amide conformation and secondary structure. Interestingly, for  $\alpha$ -aminoxy peptoids we observed a unique preference for *cis*-amide bonds in comparison to other peptoid backbones. The formation of an eight-membered  $\delta$  turn that is stabilized by C $\alpha_i$ -H...O=C $_{i+1}$  interactions between the residues  $i \rightarrow i+1$  in the *cis* configuration might explain the *cis*-amide preference of  $\alpha$ -aminoxy peptoids. MD simulations suggest that  $\alpha$ -aminoxy oligopeptoids can fold into a distinct secondary structure closely mimicking the spatial arrangement of peptide side chains in a canonical  $\alpha$ -helix. It is worth noting that  $\alpha$ -aminoxy peptoid monomers can be easily prepared from the readily available starting material **11** either by classical alkylation with alkyl halides or by a Mitsunobu reaction. This efficient monomer synthesis may therefore allow for the preparation of  $\alpha$ -aminoxy peptoid libraries with a large chemical diversity in the future. Given their ease of synthesis, their structural diversity, and their conformational properties,  $\alpha$ -aminoxy peptoids represent a promising new class of peptidomimetic foldamers that may be highly useful in a variety of novel applications such as material sciences and medicinal chemistry. In conclusion,  $\alpha$ -aminoxy peptoids were introduced as a new peptoid backbone capable of controlling the amide



**Figure 7.** Overlay of the C $\beta$  atoms of low-energy conformations of the  $\alpha$ -aminoxy peptoids **28** (A and B) and **29** (C and D) onto the C $\beta$  atoms of a canonical  $\alpha$ -helix (indicated by the pink spheres). In the case of the  $\alpha$ -aminoxy peptoid **28**, the scaffold can closely mimic the spatial arrangement of the peptide side chains at the positions  $i$ ,  $i+1$ ,  $i+3$ ,  $i+5$ , with an RMSD value of the coordinates of the respective atom pairs of 0.5 Å when the N terminus of the  $\alpha$ -aminoxy peptoid is oriented toward the C terminus of the helix, and of 0.7 Å when the  $\alpha$ -aminoxy peptoid is oriented in the opposite direction (A and B, respectively). In the case of the  $\alpha$ -aminoxy peptoid **29**, the scaffold can closely mimic the spatial arrangement of peptide side chains at the positions  $i$ ,  $i+2$ ,  $i+3$ ,  $i+5$ ,  $i+7$ ,  $i+11$  when the N terminus of the  $\alpha$ -aminoxy peptoid is oriented toward the C terminus of the helix (C), and the positions  $i$ ,  $i+4$ ,  $i+6$ ,  $i+8$ ,  $i+9$ ,  $i+11$  when the  $\alpha$ -aminoxy peptoid is oriented in the opposite direction (D), with an RMSD value of 1.1 Å in both cases.

isomerism while maintaining the potential for side-chain diversity.

## Experimental Section

See the Supporting Information for experimental details. CCDC 1508156 (**1**) and 1508157 (**9**) contain the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge from The Cambridge Crystallographic Data Centre via [www.ccdc.cam.ac.uk/data\\_request/cif](http://www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif).

## Acknowledgements

This work was supported by funds from the Fonds der Chemischen Industrie (to F.K.H.). The Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) is acknowledged for funds used to purchase the UHR-TOF maXis 4G, Bruker Daltonics, Bremen HRMS instrument used in this research. Financial support by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) for funds (INST 208/704-1 FUGG to H.G.) to purchase the hybrid computer cluster used in this study is gratefully acknowledged. Computational support and infrastructure was provided by the "Center for Information and Media Technology" (ZIM) at the Heinrich Heine University Düsseldorf (HHU). We thank the Institute of Physical Biology at the HHU for providing us access to the CD spectrometer.

**Keywords:** aminoxy peptoids • conformational analysis • foldamers • peptidomimetics • peptoids

[1] S. M. Miller, R. J. Simon, S. Ng, R. N. Zuckermann, J. M. Kerr, W. H. Moos, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 2657–2662.

- [2] Y.-U. Kwon, T. Kodadek, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 1508–1509.  
 [3] M. M. Reddy, K. Bachhawat-Sikder, T. Kodadek, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 1127–1137.  
 [4] P. G. Alluri, M. M. Reddy, K. Bachhawat-Sikder, H. J. Olivos, T. Kodadek, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13995–14004.  
 [5] T. Hara, S. R. Durell, M. C. Myers, D. H. Appella, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1995–2004.  
 [6] I. M. Mándity, F. Fülöp, *Expert Opin. Drug Discovery* **2015**, *10*, 1163–1177.  
 [7] S. Suwal, T. Kodadek, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 2088–2092.  
 [8] J. A. Hodges, R. T. Raines, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4695–4697.  
 [9] B. Yoo, K. Kirshenbaum, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 714–721.  
 [10] C. Baldauf, R. Günther, H.-J. Hofmann, *Phys. Biol.* **2006**, *3*, S1–S9.  
 [11] A. S. Norgren, S. Zhang, P. I. Arvidsson, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4533–4536.  
 [12] C. A. Olsen, M. Lambert, M. Witt, H. Franzyk, J. W. Jaroszewski, *Amino Acids* **2008**, *34*, 465–471.  
 [13] C. A. Olsen, H. L. Ziegler, H. M. Nielsen, N. Frimodt-Møller, J. W. Jaroszewski, H. Franzyk, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1356–1360.  
 [14] O. Roy, S. Faure, V. Thery, C. Didierjean, C. Taillefumier, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 921–924.  
 [15] J. S. Laursen, P. Harris, P. Fristrup, C. A. Olsen, *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 7013.  
 [16] J. S. Laursen, J. Engel-Andreasen, P. Fristrup, P. Harris, C. A. Olsen, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 2835–2844.  
 [17] C. Caumes, O. Roy, S. Faure, C. Taillefumier, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 9553–9556.  
 [18] I. Shin, K. Park, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 869–872.  
 [19] X. Li, Y.-D. Wu, D. Yang, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1428–1438.  
 [20] X. Li, D. Yang, *Chem. Commun.* **2006**, *32*, 3367–3379.  
 [21] N. H. Shah, G. L. Butterfoss, K. Nguyen, B. Yoo, R. Bonneau, D. L. Rabenstein, K. Kirshenbaum, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 16622–16632.  
 [22] a) B. H. Meier, R. R. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 6441–6442;  
 b) C. L. Perrin, T. J. Dwyer, *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 935–967.  
 [23] D. X. Hu, P. Grice, S. V. Ley, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 5198–5202.  
 [24] All ratios were calculated by integrating and averaging at least three <sup>1</sup>H NMR signals at 15 mM concentration.  
 [25] P. Le Grel, A. Salaün, C. Mocquet, B. L. Grel, T. Roisnel, M. Potel, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 8756–8767.

- [26] a) D. Diedrich, A. J. Rodrigues Moita, A. R  ther, B. Frieg, G. J. Reiss, A. Hoepfner, T. Kurz, H. Gohlke, S. L  deke, M. U. Kassack, F. K. Hansen, *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 17600–17611; b) B. Draghici, F. K. Hansen, A.-M. Buciumas, B. E.-D. M. El-Gendy, E. Todadze, A. R. Katritzky, *RSC Adv.* **2011**, *1*, 602–606; c) D. Yang, G. J. Liu, Y. Hao, W. Li, Z. M. Dong, D. W. Zhang, N. Y. Zhu, *Chem. Asian J.* **2010**, *5*, 1356–1363.
- [27] C. Toniolo, E. Benedetti, *Crit. Rev. Biochem.* **1980**, *9*, 1–44.
- [28] R. Vargas, J. Garza, D. A. Dixon, B. P. Hay, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4750–4755.
- [29] C. Bissantz, B. Kuhn, M. Stahl, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 5061–5084.
- [30] C. Toniolo, M. Crisma, A. Moretto, C. Peggion, F. Formaggio, C. Alem  n, C. Catiuela, C. Ramakrishnan, P. Balaram, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 13866–13877.
- [31] A. Glättli, X. Daura, D. Seebach, W. F. van Gunsteren, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12972–12978.
- [32] C. W. Wu, T. J. Sanborn, K. Huang, R. N. Zuckermann, A. E. Barron, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6778–6784.
- [33] P. A. Jordan, B. Paul, G. L. Butterfoss, P. D. Renfrew, R. Bonneau, K. Kirshenbaum, *Biopolymers* **2011**, *96*, 617–626.

---

Manuscript received: November 1, 2016

Accepted Article published: January 16, 2017

Final Article published: February 13, 2017

---

# CHEMISTRY

## A **European** Journal

### Supporting Information

#### **$\alpha$ -Aminoxy Peptoids: A Unique Peptoid Backbone with a Preference for *cis*-Amide Bonds**

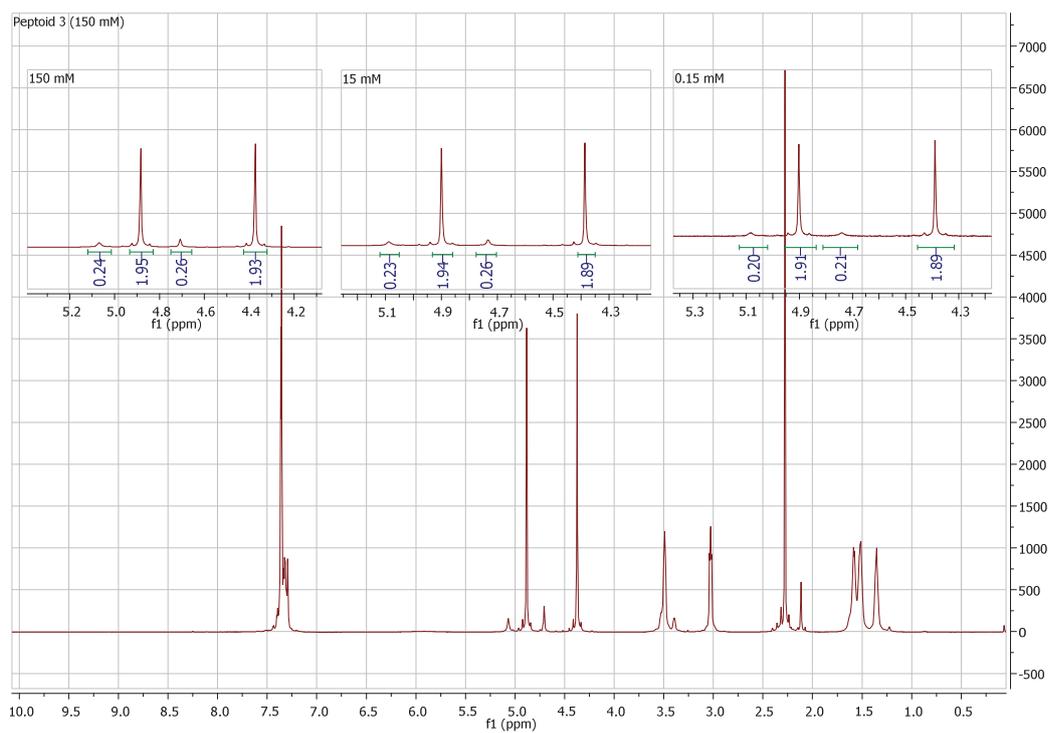
Viktoria Krieger,<sup>[a]</sup> Emanuele Ciglia,<sup>[a]</sup> Roland Thoma,<sup>[b]</sup> Vera Vasylyeva,<sup>[b]</sup> Benedikt Frieg,<sup>[a]</sup> Nader de Sousa Amadeu,<sup>[b]</sup> Thomas Kurz,<sup>[a]</sup> Christoph Janiak,<sup>[b]</sup> Holger Gohlke,<sup>[a]</sup> and Finn K. Hansen<sup>\*[a, c]</sup>

chem\_201605100\_sm\_miscellaneous\_information.pdf

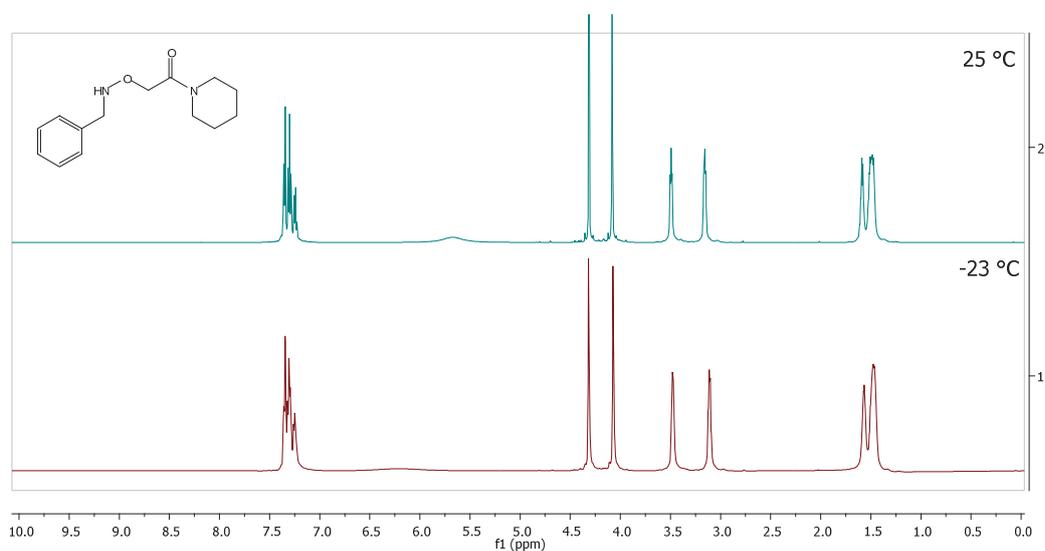
## Table of Contents

1. Supplemental Figures and Tables .....	2
2. General Methods .....	23
3. Synthetic protocols, general procedures and compound characterization data of $\alpha$ -aminoxy peptoids .....	24
4. Compound characterization data of intermediates .....	39
5. References .....	49

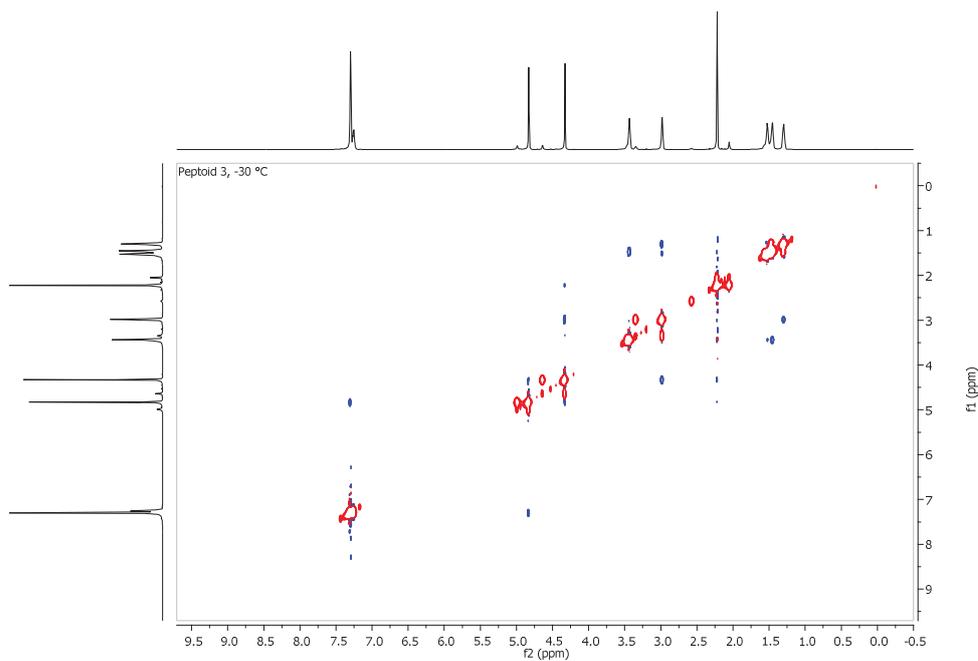




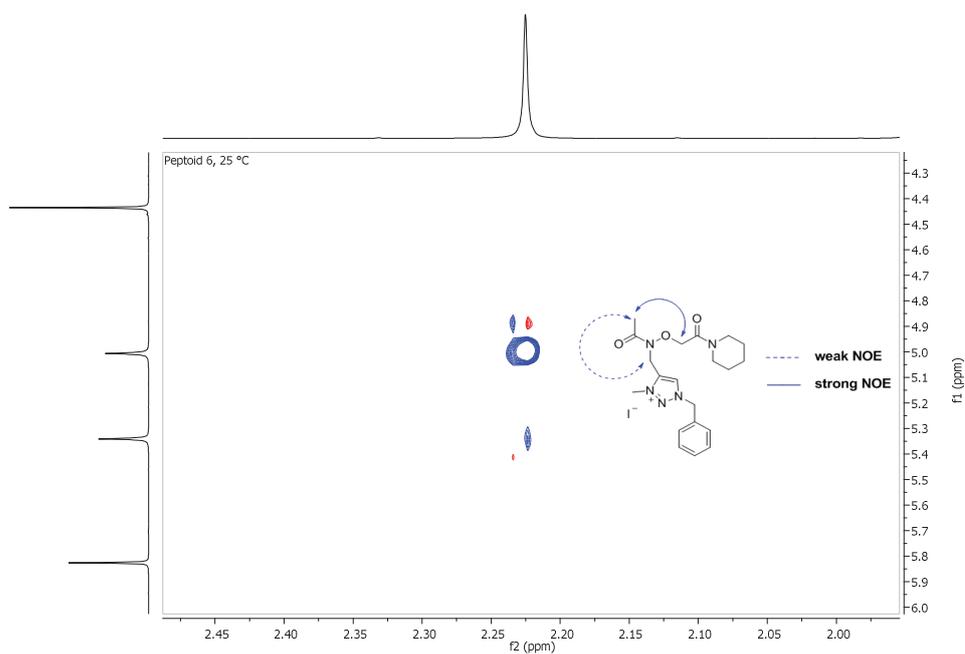
**Figure S3.** Concentration dependency  $^1\text{H}$  NMR of  $\alpha$ -aminoxy peptoid **3** at 150 mM, 15 mM and 0.15 mM at  $-30^\circ\text{C}$ .



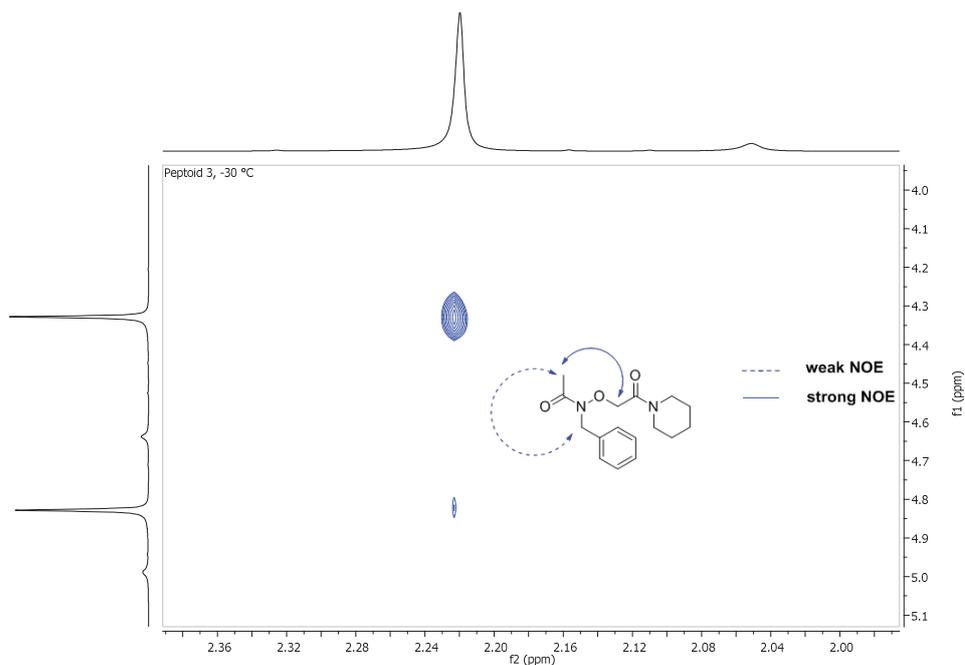
**Figure S4.**  $^1\text{H}$  NMR of (2-((benzylamino)oxy)-1-(piperidin-1-yl)ethan-1-one) (15 mM) in  $\text{CDCl}_3$  at  $25^\circ\text{C}$  and  $-23^\circ\text{C}$ .



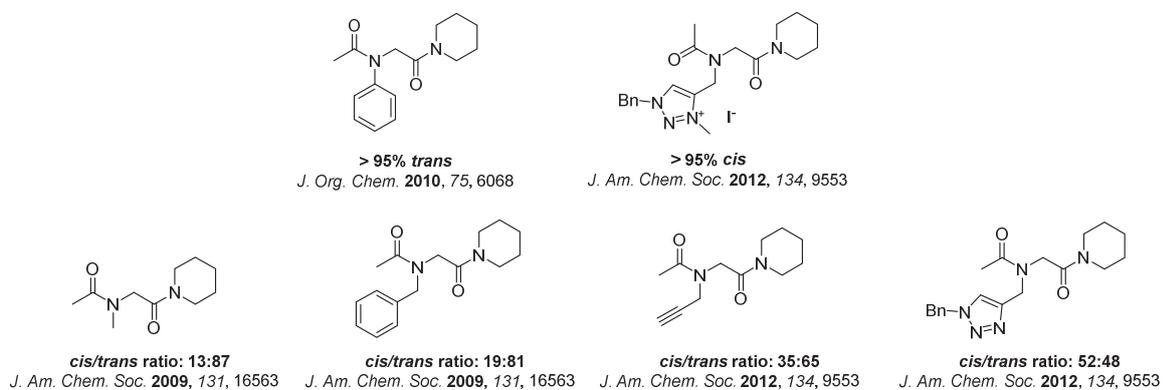
**Figure S5.** 2D NOESY of  $\alpha$ -aminoxy peptoid **3** in  $\text{CDCl}_3$  at  $-30^\circ\text{C}$  (full spectrum).



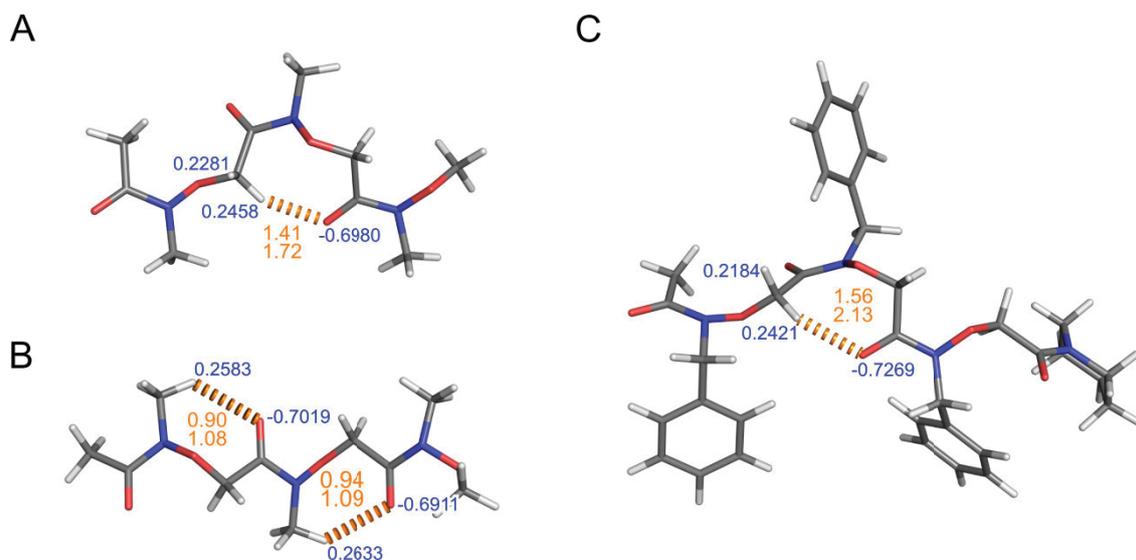
**Figure S6.** Expansion of the 2D NOESY of  $\alpha$ -aminoxy peptoid **6** in  $\text{CDCl}_3$  at  $25^\circ\text{C}$ .



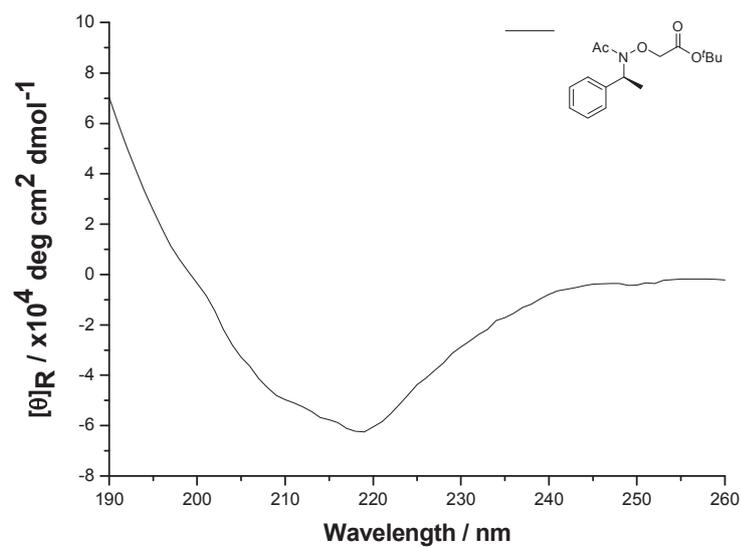
**Figure S7.** Expansion of the 2D NOESY of  $\alpha$ -aminoxy peptoid **3** in  $\text{CDCl}_3$  at  $-30^\circ\text{C}$  (for full spectrum see page S5).



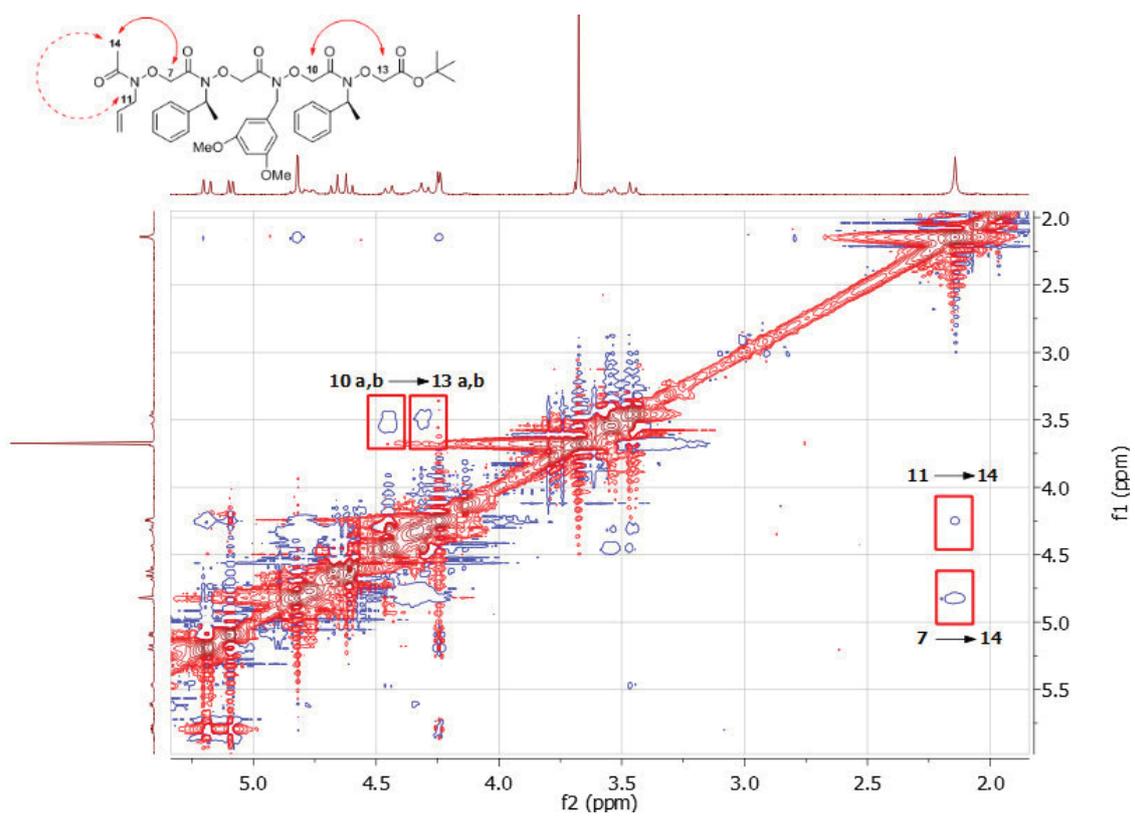
**Figure S8.** Literature values for *cis/trans* ratios of the corresponding  $\alpha$ -peptoids with the side chains used in this study.



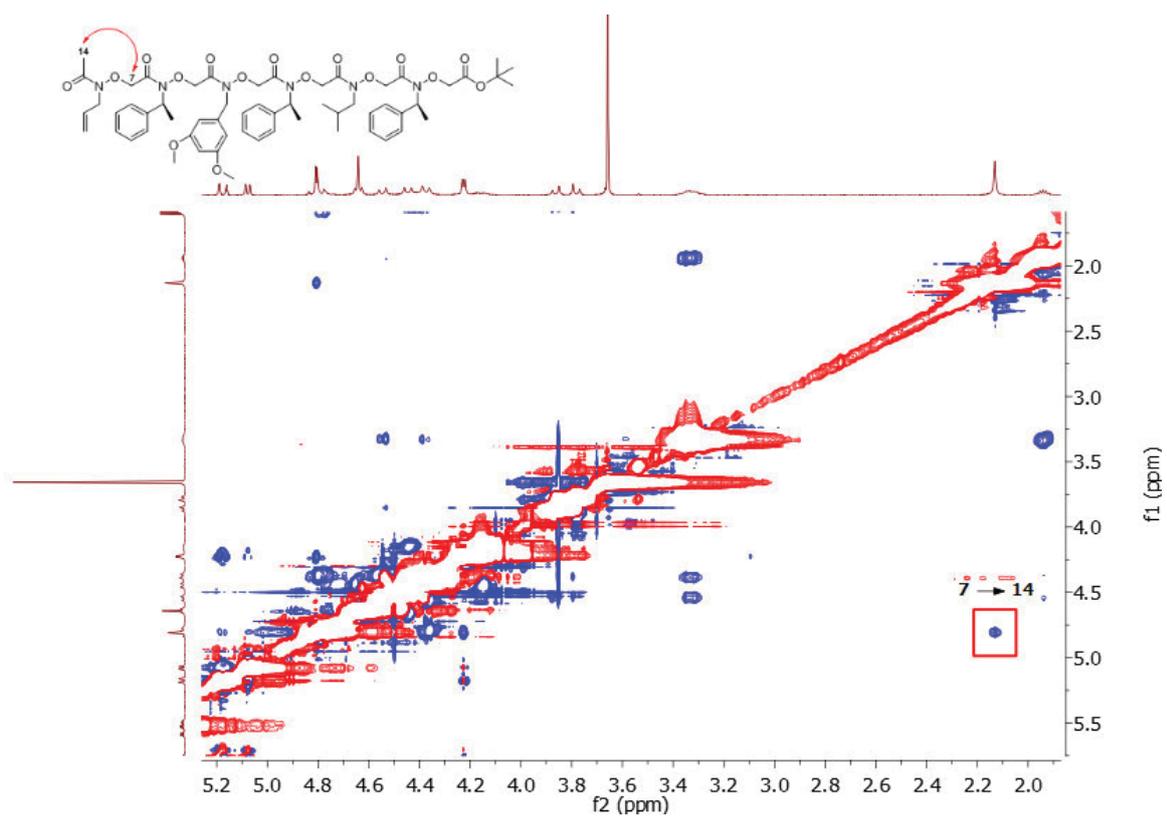
**Figure S9.** Results from natural bond orbital analysis: (A), (B) HF/6-31G\*-optimized structures from an all-methyl model compound in *cis* (A) and *trans* (B) configuration. (C) HF/6-31G\*-optimized structure of  $\alpha$ -aminoxy tripeptoid **9** in *cis* configuration. In (A – C) the orange dotted lines depict donor-acceptor interactions. The orange labels depict the donor-acceptor stabilization energies (in kcal mol<sup>-1</sup>) for both oxygen lone pairs, determined by the second-order perturbation theory analysis. The blue labels depict the natural charge (in au) determined by natural population analysis.



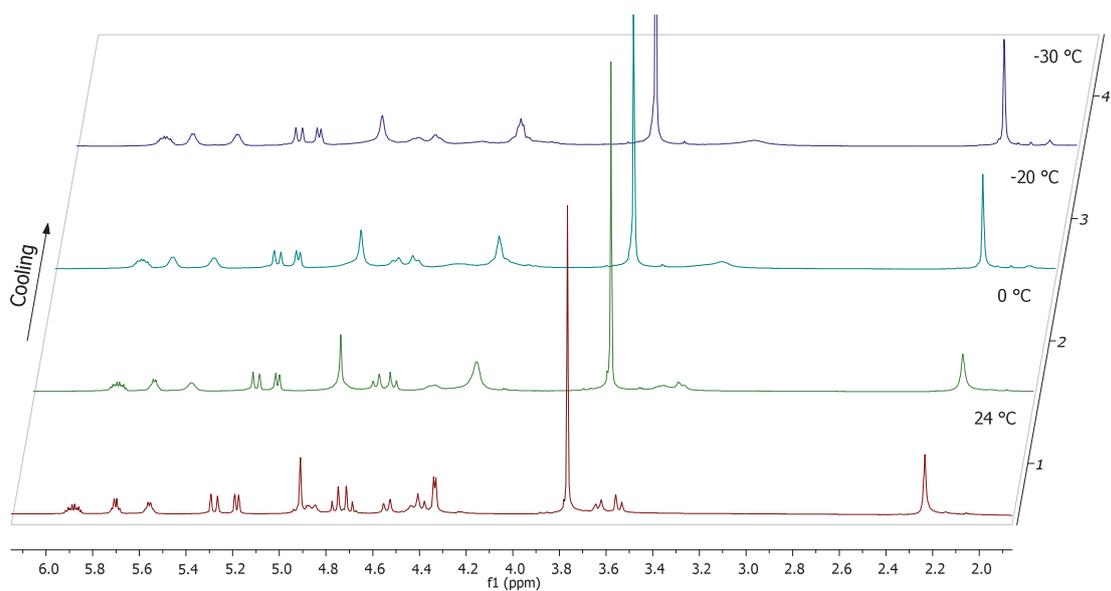
**Figure S10.** CD spectra of *tert*-butyl (*S*)-2-((*N*-(1-phenylethyl)acetamido)oxy)acetate (50  $\mu\text{M}$ ) in acetonitrile at room temperature. Data are expressed in terms of per-residue molar ellipticity ( $\text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ ).



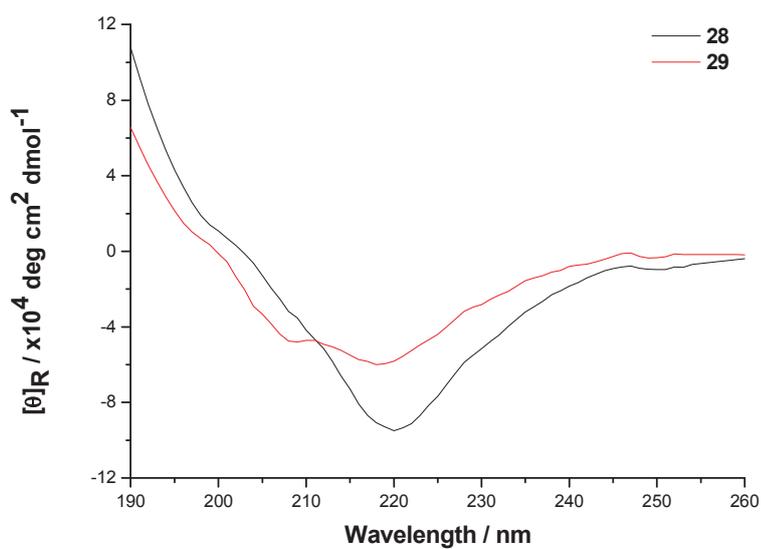
**Figure S11.** Expansion of the 2D NOESY of  $\alpha$ -aminoxy peptoid **28** in  $\text{CDCl}_3$  at room temperature.



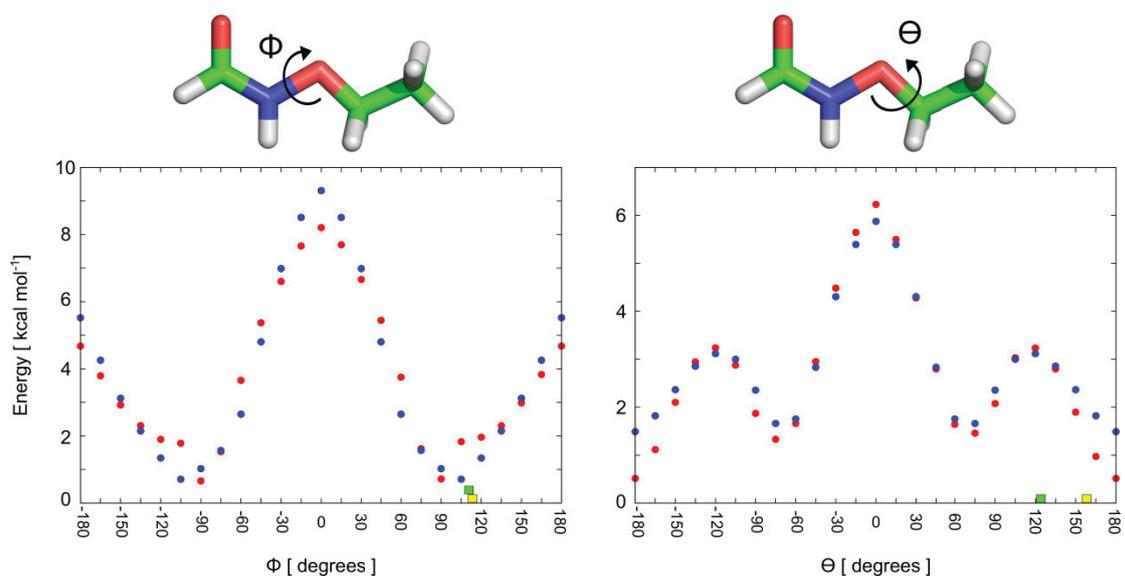
**Figure S12.** Expansion of the 2D NOESY of  $\alpha$ -aminoxy peptoid **29** in  $\text{CDCl}_3$  at room temperature.



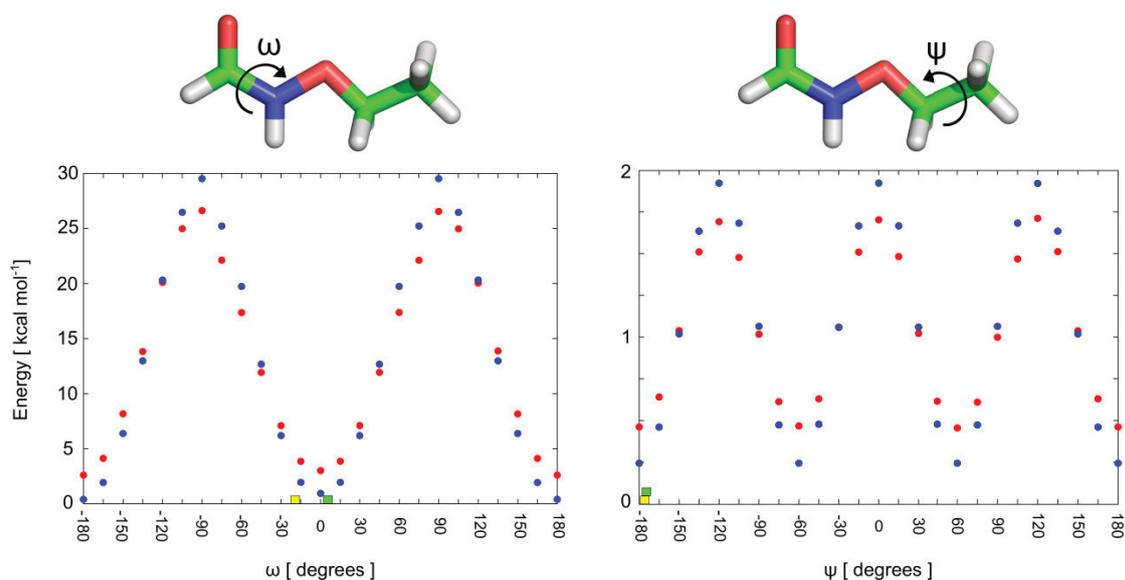
**Figure S13.** VT-NMR of  $\alpha$ -aminoxy peptoid **28** (15 mM) in  $\text{CDCl}_3$ .



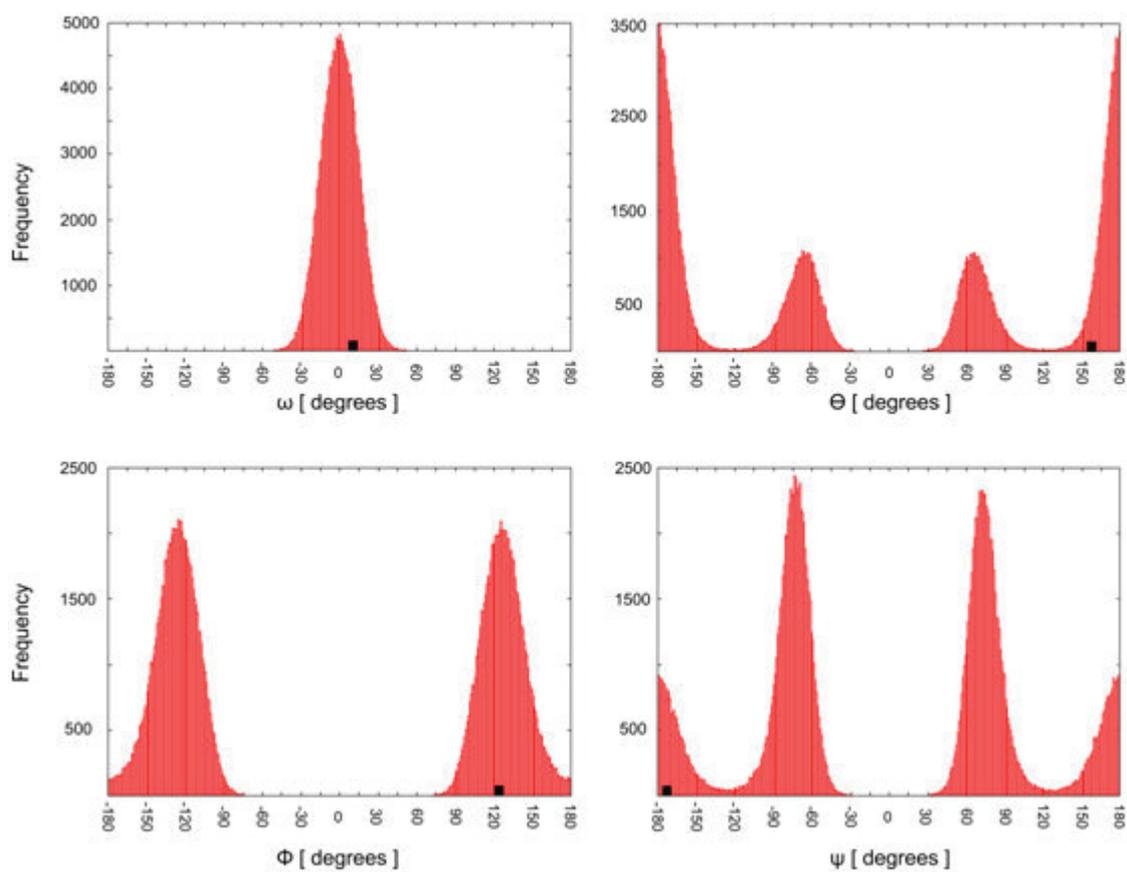
**Figure S14.** CD spectra of  $\alpha$ -aminoxy peptoids **28** and **29** (50  $\mu\text{M}$ ) in acetonitrile at room temperature. Data are expressed in terms of per-residue molar ellipticity ( $\text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ ).



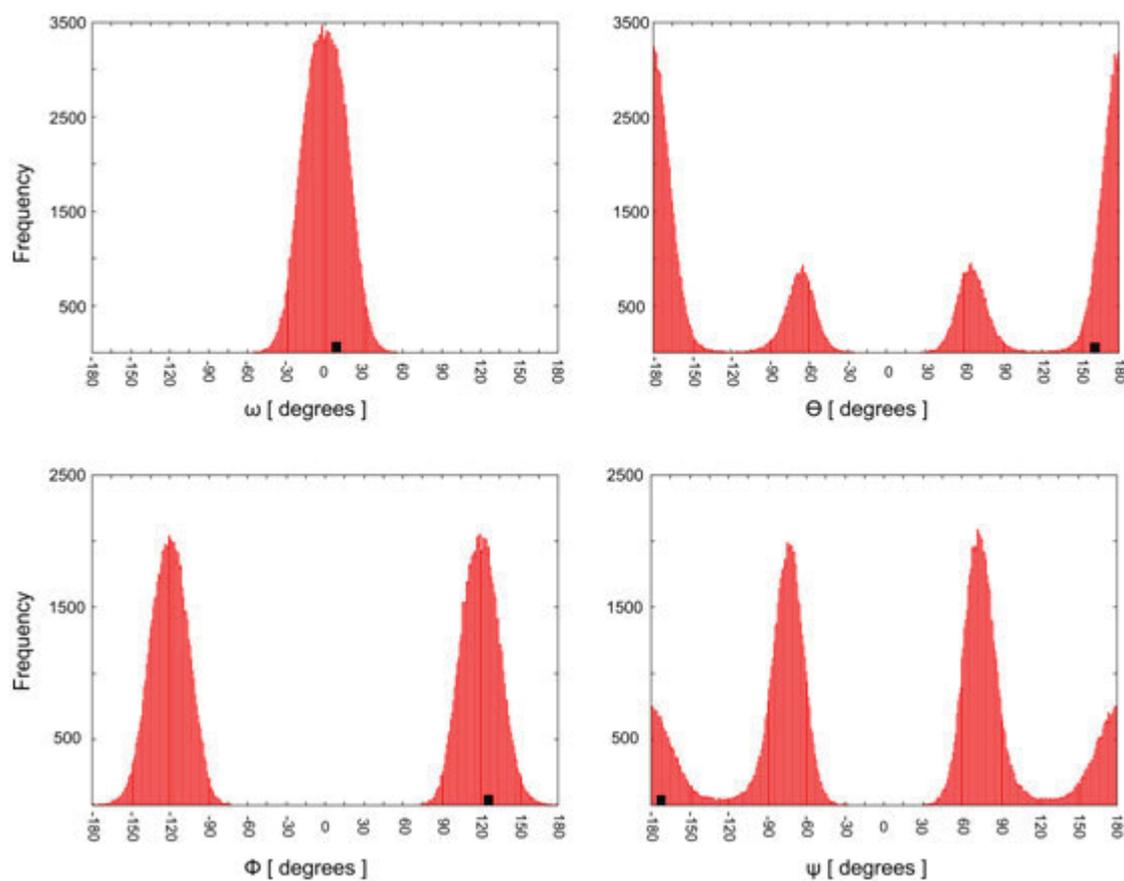
**Figure S15.** The blue (red) points represent the relative MP2/6-31G\* (molecular mechanics) energy of the *N*-ethoxyformamide model compound calculated from *ab initio* calculations (utilizing the new force field parameters generated, together with the general AMBER force field (GAFF)) for constrained  $\phi$  and  $\theta$  torsion angles in the range  $[180^\circ, -180^\circ]$  at intervals of  $15^\circ$  (see Experimental Section in the main text). The correlation of the molecular mechanics energy with respect to the MP2/6-31G\* energy for angles  $\phi$  and  $\theta$  provided correlation coefficients ( $R^2$ ) of 0.95 and 0.98, respectively. The yellow (green) square indicates the average torsion angle value found in the crystal structure of  $\alpha$ -aminoxy peptoid **1** (**9**).



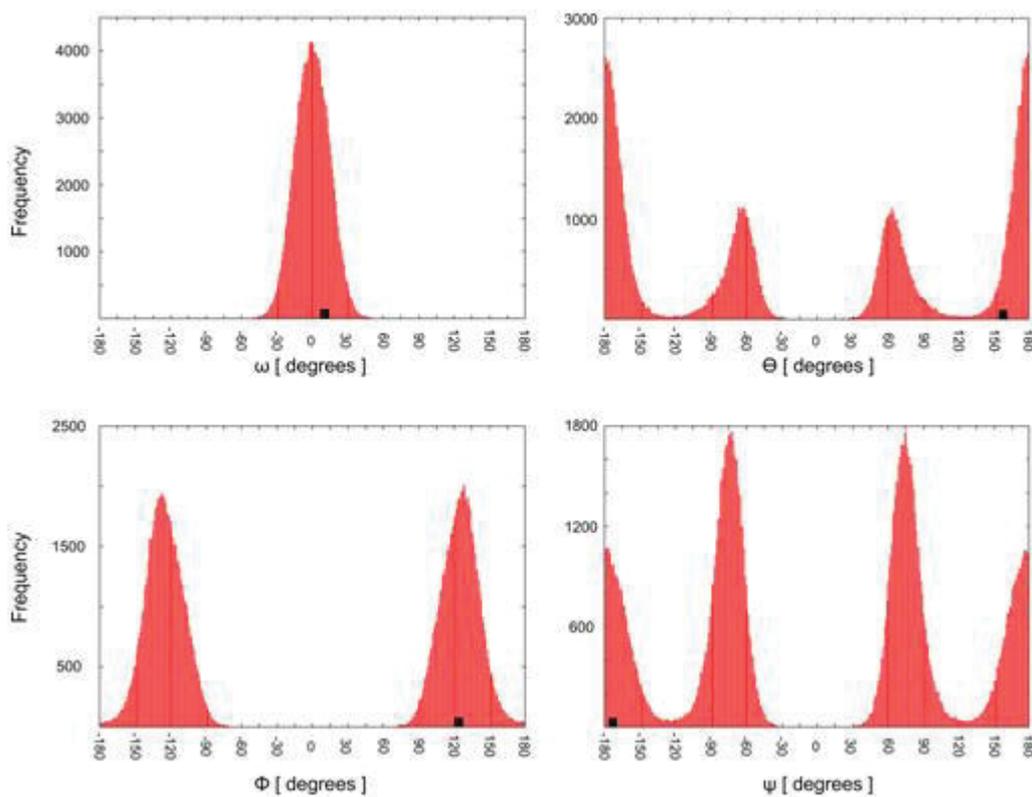
**Figure S16.** The blue (red) points represent the relative MP2/6-31G\* (molecular mechanics) energy of the *N*-ethoxyformamide model compound calculated from *ab initio* calculations (utilizing the parameters of the general AMBER force field (GAFF)) for constrained  $\omega$  and  $\psi$  torsion angles in the range  $[180^\circ, -180^\circ]$  at intervals of  $15^\circ$  (see Experimental Section in the main text). The correlation of the molecular mechanics energy with respect to the MP2/6-31G\* energy for angles  $\omega$  and  $\psi$  provided correlation coefficients ( $R^2$ ) of 0.99 for both angles. The yellow (green) square indicates the average torsion angle value found in the crystal structure of  $\alpha$ -aminoxy peptoid **1** (**9**).



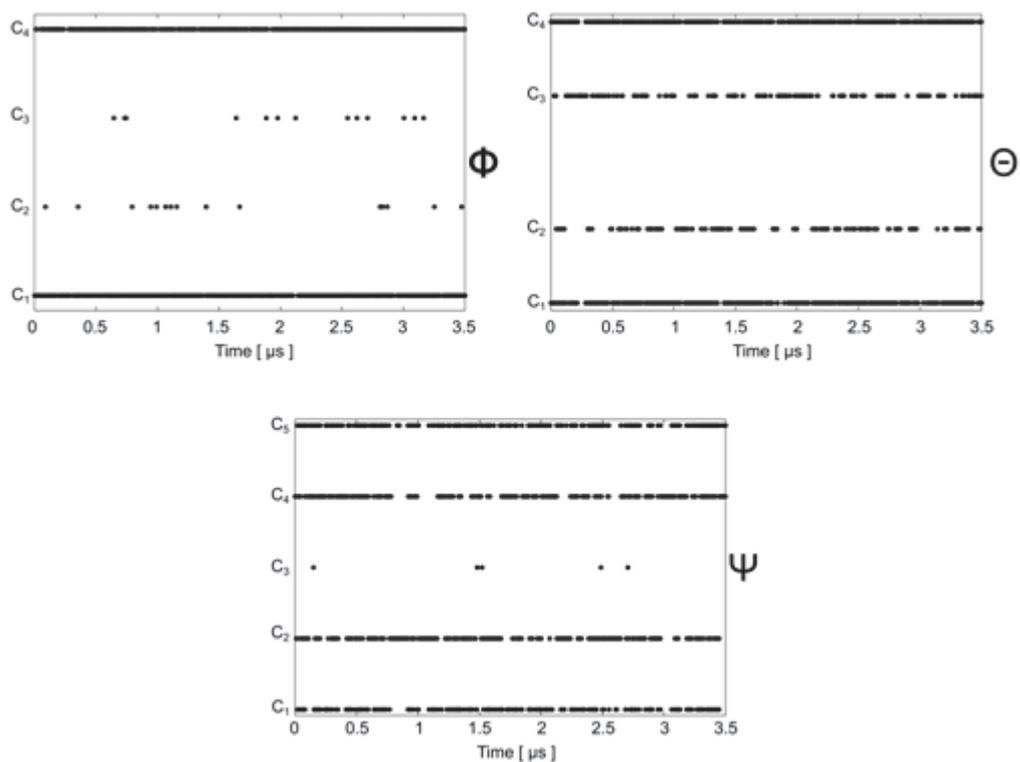
**Figure S17.** Frequency distribution of conformations with respect to the backbone torsion angles observed in 3.5  $\mu$ s of MD simulations of  $\alpha$ -aminoxy peptoid **1** in explicit chloroform. The black rectangles indicate the values of torsion angles found in the crystal structure of  $\alpha$ -aminoxy peptoid **1**.



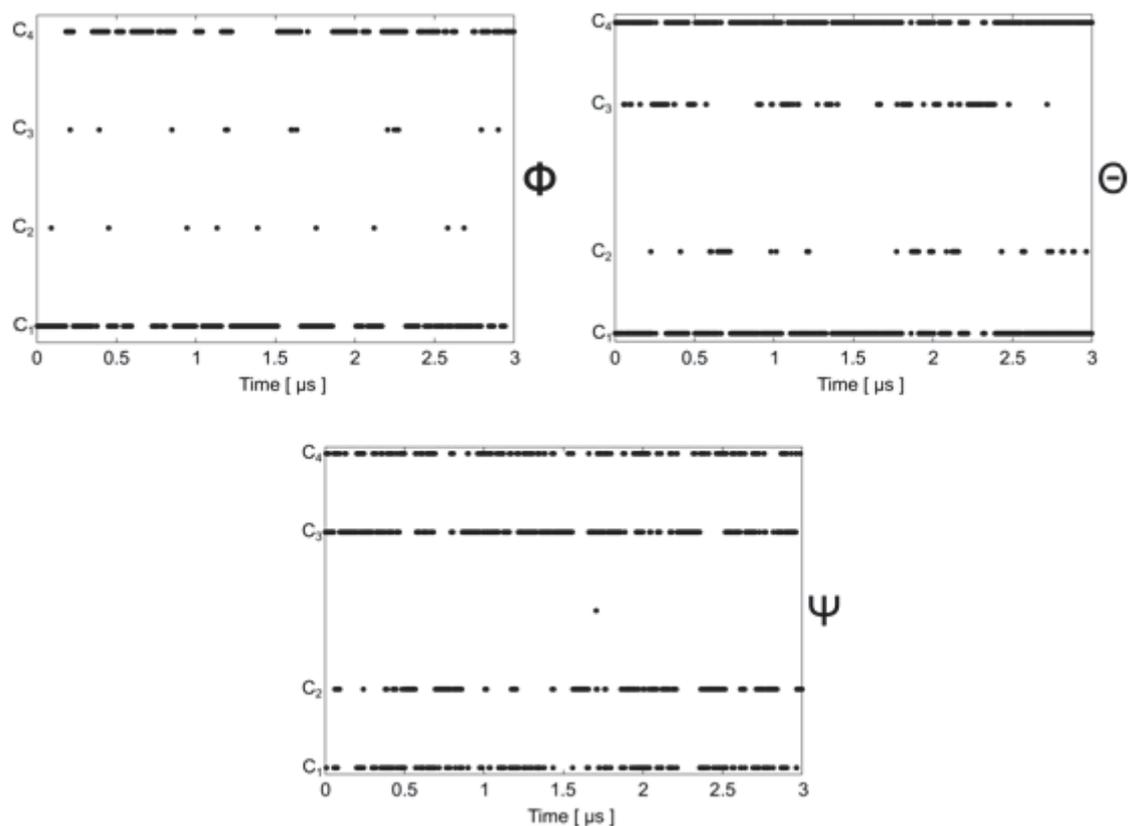
**Figure S18.** Frequency distribution of conformations with respect to the backbone torsion angles observed in 3  $\mu$ s of MD simulations of  $\alpha$ -aminoxy peptoid **2** in explicit chloroform. The black rectangles indicate the values of torsion angles found in the crystal structure of  $\alpha$ -aminoxy peptoid **1**.



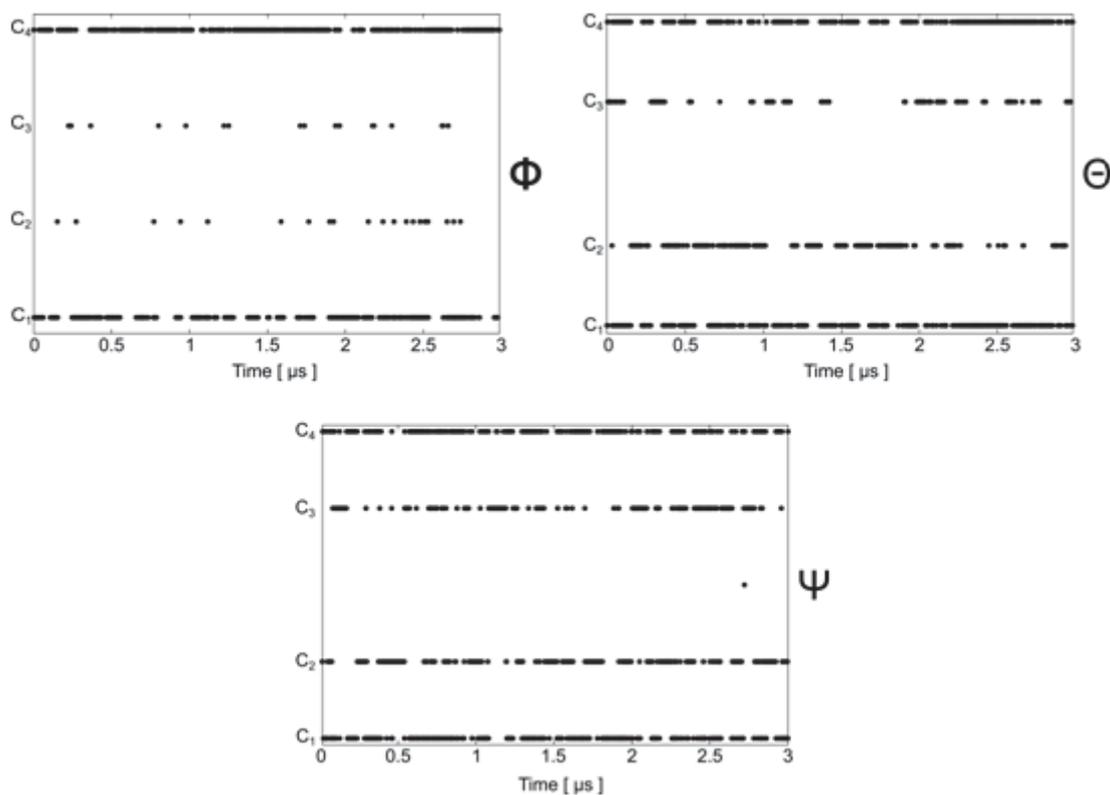
**Figure S19.** Frequency distribution of conformations with respect to the backbone torsion angles observed in 3  $\mu$ s of MD simulations of  $\alpha$ -aminoxy peptoid **3** in explicit chloroform. The black rectangles indicate the values of torsion angles found in the crystal structure of  $\alpha$ -aminoxy peptoid **1**.



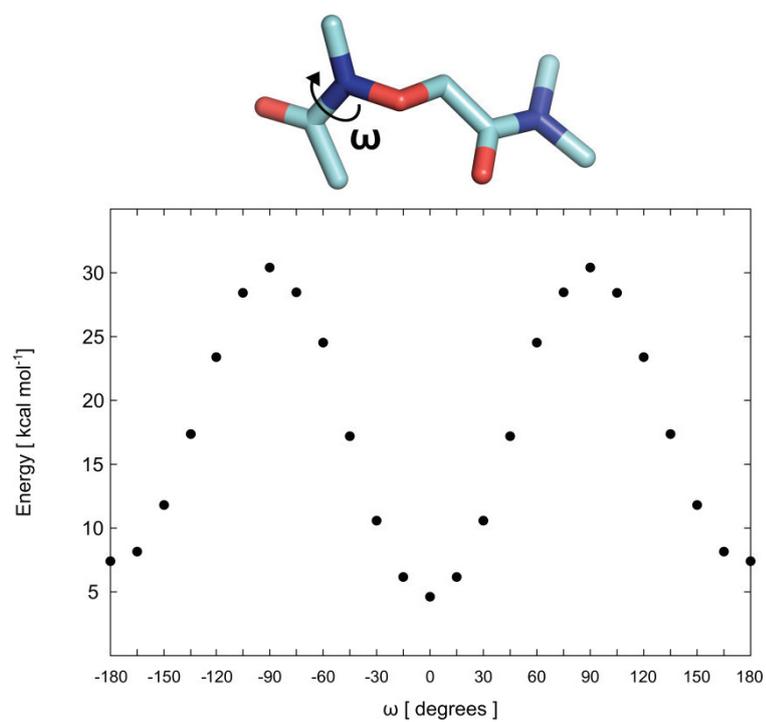
**Figure S20.** Dihedral angle populations as a function of the simulation time observed during MD simulations of 3.5  $\mu\text{s}$  length of  $\alpha$ -aminoxy peptoid **1** in explicit chloroform. The respective populations describe dihedral angle intervals as follow: Angle  $\phi$   $C_1$ :  $[-180; -90]$ ,  $C_2$ :  $(-90; 0)$ ,  $C_3$ :  $[0; 90)$ ,  $C_4$ :  $[90; 180]$ ; Angle  $\theta$   $C_1$ :  $[-180; -105]$ ,  $C_2$ :  $(-105; -30]$ ,  $C_3$ :  $[30; 105)$ ,  $C_4$ :  $[105; 180]$ ; Angle  $\psi$   $C_1$ :  $[-180; -108]$ ,  $C_2$ :  $(-108; -36]$ ,  $C_3$ :  $(-36; 36)$ ,  $C_4$ :  $[36; 108)$ ,  $C_5$ :  $[108; 180]$ .



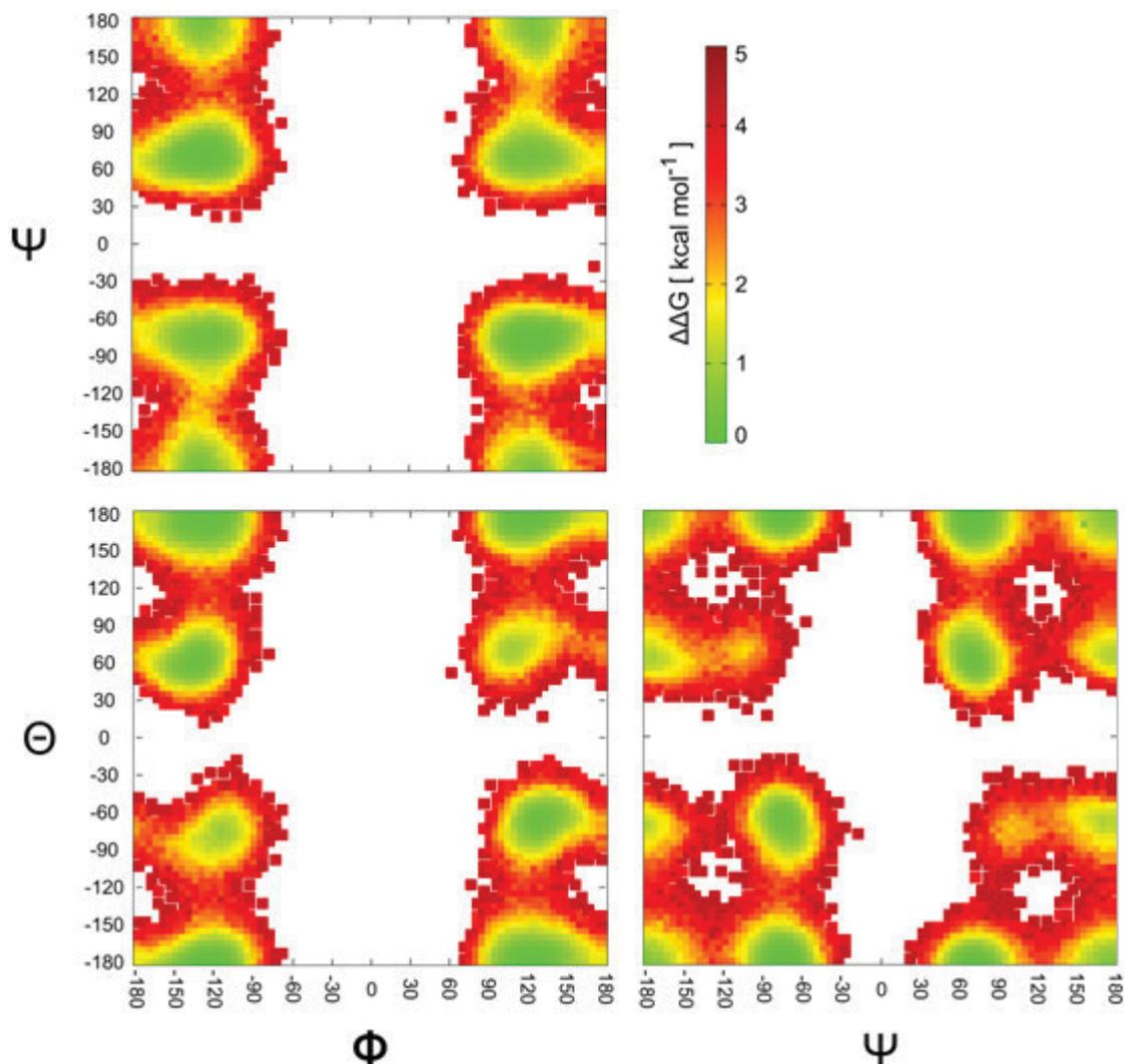
**Figure S21.** Dihedral angle populations as a function of the simulation time observed during MD simulations of 3  $\mu\text{s}$  length of  $\alpha$ -aminoxy peptoid **2** in explicit chloroform. The respective populations describe dihedral angle intervals as follow: Angle  $\phi$  C<sub>1</sub>: [-180; -90], C<sub>2</sub>: (-90; 0), C<sub>3</sub>: [0; 90), C<sub>4</sub>: [90; 180]; Angle  $\theta$  C<sub>1</sub>: [-180; -105], C<sub>2</sub>: (-105; -30), C<sub>3</sub>: [30; 105), C<sub>4</sub>: [105; 180]; Angle  $\psi$  C<sub>1</sub>: [-180; -108], C<sub>2</sub>: (-108; -36), C<sub>3</sub>: (-36; 36), C<sub>4</sub>: [36; 108), C<sub>5</sub>: [108; 180].



**Figure S22.** Dihedral angle populations as a function of the simulation time observed during MD simulations of 3  $\mu\text{s}$  length of  $\alpha$ -aminoxy peptoid **3** in explicit chloroform. The respective populations describe dihedral angle intervals as follow: Angle  $\phi$   $C_1$ :  $[-180; -90]$ ,  $C_2$ :  $(-90; 0)$ ,  $C_3$ :  $[0; 90]$ ,  $C_4$ :  $[90; 180]$ ; Angle  $\theta$   $C_1$ :  $[-180; -105]$ ,  $C_2$ :  $(-105; -30)$ ,  $C_3$ :  $[30; 105]$ ,  $C_4$ :  $[105; 180]$ ; Angle  $\psi$   $C_1$ :  $[-180; -108]$ ,  $C_2$ :  $(-108; -36)$ ,  $C_3$ :  $(-36; 36)$ ,  $C_4$ :  $[36; 108]$ ,  $C_5$ :  $[108; 180]$ .



**Figure S23.** Relative MP2/6-31G\* energy of *N,N*-dimethyl-2-((*N*-methylacetamido)-oxy)acetamide ( $\alpha$ -aminoxy peptoid **30**) calculated for the constrained  $\omega$  angle in the range  $[-180^\circ, 180^\circ]$  at intervals of  $15^\circ$ .



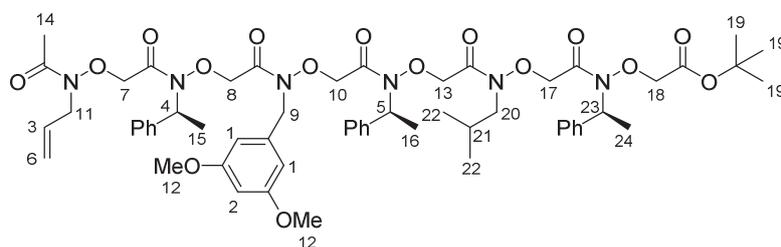
**Figure S24.** Relative free energies of  $\alpha$ -aminoxy peptoid **1** as a function of the backbone dihedral angles  $\phi$ ,  $\theta$ , and  $\psi$ . The relative free energy of each conformation is calculated from the frequency of the conformation's occurrence during a MD simulation of 3.5  $\mu$ s length in explicit chloroform via  $\Delta G = -RT \ln P_x/P_{ref}$ , (where  $R$  is the gas constant,  $T = 300$  K,  $P_x$  is the frequency of occurrence of conformation  $x$ , and  $P_{ref}$  is the frequency of occurrence of the most frequently represented conformation). The white spots indicate combinations of backbone dihedral angles not found during the MD simulation.

**Table S1.** Dihedral angles of  $\alpha$ -aminoxy tripeptoid **9** crystal structure.

monomer	$\omega$	$\varphi$	$\phi$	$\psi$	$\chi_1$
<i>N</i> -terminal ( <i>i</i> )	-1.0	108.3	-138.0	-168.9	-81.7
internal ( <i>i</i> +1)	-10.4	107.1	-133.6	-179.7	-82.4
<i>C</i> -terminal ( <i>i</i> +2)	8.1	-117.5	-91.7	169.1	-94.8

**Table S2.** Proton longitudinal relaxation time  $T_1$  at 298 K of  $\alpha$ -aminoxy peptoid **29**. The

longitudinal relaxation time was acquired on a Bruker DRX 500 MHz NMR spectrometer by using inversion recovery with evolution delays  $\tau$  between 10  $\mu$ s and 5 s. Table S2 shows the obtained relaxation time in seconds. Estimation of  $T_1$  was done by using the relation  $T_1 = \frac{\tau(0)}{\ln(2)}$ . In this relation  $\tau(0)$  represents the evolution delay with peak integral of zero. These data are in good agreement with the obtained relaxation times by fitting the data to  $M_z = M_0(1 - 2\exp(-\frac{\tau}{T_1}))$ .

**29**

Proton	$T_1$ [s]
1	1.6
2	1.6
3	2.2
4, 5, 23*	1.1
6	1.4
Backbone* (7, 8, 10, 13, 17, 18)	0.4
11	0.9
12	1.0
14	1.3
15, 16, 24*	0.6
19	0.9
20, 21*	0.4
22	0.7

\* Values were obtained from a mean integral.

**Table S3.** Dihedral angles in crystal structures of  $\alpha$ -aminoxy peptoid **1** and  $\alpha$ -aminoxy tripeptoid **9** and preferred angles according to *ab initio* calculations (Figure S14 and S15).<sup>[a]</sup>

<b>Cpd</b>	<b>monomer</b>	$\varphi$ (X-ray)	$\varphi$ (calc.)	$\theta$ (X-ray)	$\theta$ (calc.)	$\omega$ (X-ray)	$\omega$ (calc.)	$\psi$ (X-ray)	$\psi$ (calc.)
<b>9</b>	<i>N</i> -terminal ( <i>i</i> )	108.3		-138.0		-1.0		-168.9	
<b>9</b>	internal ( <i>i</i> +1)	107.1	105	-133.6	60/180	-10.4	0/180	-179.7	60/180
<b>9</b>	<i>C</i> -terminal ( <i>i</i> +2)	-117.5		-91.7		8.07		169.1	
<b>1</b>	A-form	120.5	105	165.8	60/180	-23.2	0/180	-176.4	60/180
<b>1</b>	B-form	-112.2		-152.4		20.8		-176.4	

<sup>[a]</sup> In degrees.

## 2. General Methods

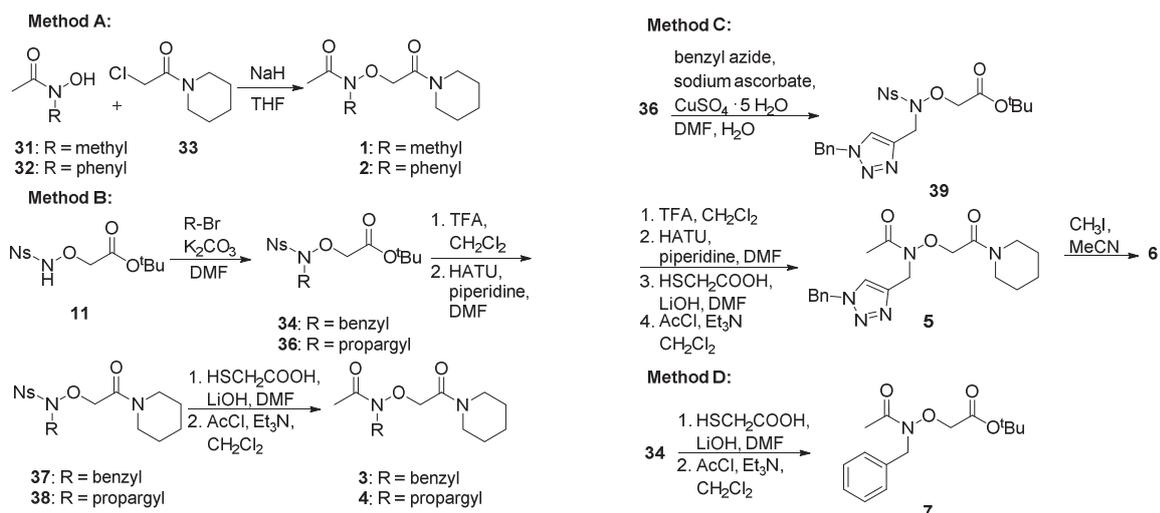
All solvents and chemicals were used as purchased without further purification. The progress of all reactions was monitored on silica gel plates (with fluorescence indicator UV254). Flash column chromatography was carried out using prepacked silica cartridge. Melting points (M.p.) were taken in open capillaries and are uncorrected.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  spectra for compound characterization were recorded using a 300 MHz spectrometer (300.13 MHz for  $^1\text{H}$ ; 75.47 MHz for  $^{13}\text{C}$ ) and a 600 MHz spectrometer (600.22 MHz for  $^1\text{H}$ ; 150.92 MHz for  $^{13}\text{C}$ ) using the solvents stated. NMR measurements for conformational investigations were carried out on a Bruker AVANCE DRX-200 NMR spectrometer operating at 200 MHz for  $^1\text{H}$  equipped with a TBI probe, Bruker AVANCE DRX-500 NMR spectrometer operating at 500 MHz for  $^1\text{H}$  equipped with a BBO probe and on a Bruker AVANCE III NMR spectrometer operating at 600 MHz for  $^1\text{H}$  equipped with a SEI probe with z-gradient coils by using the stated solvents. The temperature sensor was calibrated using methanol as described by *van Geet*.<sup>[1]</sup> Chemical shifts are given in parts million (ppm), ( $\delta$  relative to residual solvent peak for  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  or to external standard tetramethylsilane). Elemental analysis was performed on a Perkin Elmer PE 2400 CHN elemental analyzer. UHR-TOF mass spectra were obtained by electrospray ionization (ESI). The starting materials *N*-hydroxy-*N*-methylacetamide (**31**),<sup>[2]</sup> *N*-hydroxy-*N*-phenylacetamide (**32**),<sup>[3]</sup> 2-chloro-1-(piperidin-1-yl)ethanone (**33**),<sup>[4]</sup> *tert*-butyl 2-((2-nitrophenylsulfonamido)-oxy)acetate (**11**),<sup>[5]</sup> *tert*-butyl 2-(((*N*-benzyl-2-nitrophenyl)sulfonamido)oxy)acetate (**34**),<sup>[5]</sup> *tert*-butyl 2-((benzylamino)oxy)acetate (**35**),<sup>[5]</sup> *tert*-butyl 2-(((*N*-allyl-2-nitrophenyl)sulfonamido)oxy)acetate (**22a**)<sup>[5]</sup> and benzyl azide<sup>[6]</sup> were prepared according to known procedures.

### 3. Synthetic protocols, general procedures and compound characterization data of $\alpha$ -aminoxy peptoids

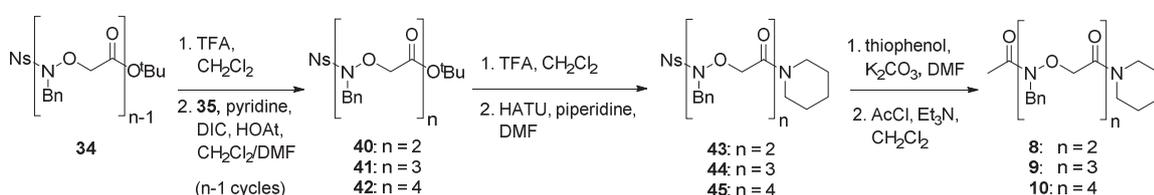
#### Synthetic protocols for $\alpha$ -aminoxy peptoids 1-10

The synthesis of model peptoids **1-10** is summarized in Scheme S1,2. Peptoids **1** and **2** were obtained by *O*-alkylation of the *N*-substituted acetohydroxamic acids **31**, **32** (Scheme S1, Method A). Peptoids **3** and **4** were prepared from the readily available starting material **11** (Scheme S1, Method B). The desired side chain was introduced by *N*-alkylation. Deprotection of the *tert*-butyl group and subsequent HATU-mediated amide coupling reaction with piperidine provided the desired C-terminal capping group. Model peptoids **3** and **4** were subsequently prepared by deprotection of the Nosyl (Ns) group followed by acetylation of the N-terminal aminoxy moiety. Monomers **5** and **6** were synthesized starting from the propargyl derivative **36**. The copper(I)-catalysed 1,3-dipolar Huisgen cycloaddition reaction of **36** with benzyl azide afforded the triazole derivative **39** (Scheme S1, Method C). Introduction of the piperidine and acetyl capping groups furnished model peptoid **5**. Finally, methylation of **5** yielded the triazolium peptoid **6**. Model peptoid **7** containing a *tert*-butyl ester as the C-terminal cap was synthesized from intermediate **34** by deprotection of the Ns group followed by acetylation (Scheme S1, Method D).

Peptoid oligomers were obtained from monomer **34** by methods similar to those reported by Shin and Park<sup>[3]</sup> (Scheme S2). Iterative cycles of deprotection of the *tert*-butyl group followed by amide coupling reaction with *tert*-butyl 2-((benzylamino)oxy)acetate **35** provided oligomers **40-42**. Conversion of the termini into N-terminal acetyl and C-terminal piperidinyl capping groups afforded the model oligomers **8-10**. The synthesis of all other model peptoids is summarized in Scheme 1,2 (main article).



**Scheme S1.** Synthesis of monomers 1-7.



**Scheme S2.** Synthesis of oligomers 8-10.

## General procedures

### General procedure A for the synthesis of peptoids 1,2 by *O*-alkylation.

NaH (1.2 equiv., 60% in mineral oil) was added to a solution of the respective *N*-substituted acetohydroxamic acid **31**, **32** (1 equiv.) in dry THF (20 mL) at 0°C under argon. The reaction mixture was stirred for 30 min at 0°C and 2-chloro-1-(piperidin-1-yl)ethanone **33** (1.1 equiv.) was added. After stirring overnight at room temperature, the reaction mixture was evaporated under reduced pressure and directly purified by flash column chromatography using hexane:ethyl acetate as eluent (gradient).

### General procedure B for the introduction of the C-terminal piperidinyl cap group.

The respective C-terminal *tert*-butyl ester was dissolved in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 mL per mmol). Trifluoroacetic acid (TFA, 3 mL per mmol) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h. The reaction mixture was evaporated under vacuum, toluene (10

mL) was added and the solution was concentrated. This procedure was repeated twice and the residue was dried under vacuum to give the corresponding crude acids (quantitative yields). The respective crude acid was dissolved in DMF (10 mL) and HATU (1.2 equiv.) was added. After 5 min, piperidine (4 equiv.) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 5 h under argon and diluted with ethyl acetate (30 mL). The mixture was washed with a saturated solution of NaHCO<sub>3</sub> (2 x 20 mL), water (1 x 20 mL) and brine (1 x 20 mL). The organic layer was dried over sodium sulfate and concentrated under vacuum. The crude product was purified by flash column chromatography using hexane:ethyl acetate as eluent (gradient).

**General procedure C for the introduction of the N-terminal acetyl group in  $\alpha$ -aminoxy peptoid monomers 3-7.**

Thioglycolic acid (2 equiv.) and solid LiOH (10 equiv.) were added to a solution of the respective Ns-protected intermediate (1 equiv.) in DMF (10 mL). The reaction mixture was stirred for 1 h at room temperature and then diluted with water (30 mL). The mixture was extracted with ethyl acetate (3 x 15 mL). The combined organic layers were extracted with a saturated solution of NaHCO<sub>3</sub> (3 x 20 mL), water (1 x 20 mL), brine (1 x 20 mL) and dried over sodium sulfate. The mixture was concentrated under reduced pressure to give the crude deprotected aminoxy compound. Acetyl chloride (2 equiv.) was added to solution of the deprotected aminoxy compound and triethylamine (2 equiv.) in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL). The reaction was stirred for 2 h at room temperature under argon, evaporated under reduced pressure and directly purified by flash column chromatography using hexane:ethyl acetate as eluent (gradient).

**General procedure D for the preparation of oligomers 40-42, 15, 17, 18, 24-27.**

To a stirred solution of **35**, **14**, **16**, **23a-c**, **25a** or **26a** (1 equiv.), pyridine (2 equiv.) and the respective carboxylic acid (1.2 equiv.), obtained in quantitative yield from the corresponding *tert*-butyl ester according to general procedure B in DMF/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1, 20 mL) was added DIC (1.2 equiv.) and HOAt (1.2 equiv.) at room temperature. The reaction mixture was stirred over night and diluted with ethyl acetate (30 mL). The mixture was extracted with a saturated solution of NaHCO<sub>3</sub> (2 x 20 mL), water (1 x 20 mL) and brine (1 x 20 mL). The organic layer was dried over sodium sulfate and concentrated under vacuum. The crude product was purified by flash column chromatography using hexane:ethyl acetate as eluent (gradient).

**General procedure E for the introduction of the N-terminal acetyl group in oligomers 8-10, 19-21, 28.**

Thiophenol (2.5 equiv.) was added to a suspension of the respective intermediate **43-45**, **15**, **17**, **18** and **27** (1 equiv.) and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4 equiv.) in DMF (10 mL) at room temperature. The reaction mixture was stirred at room temperature under argon for 3 h and diluted with water (20 mL). The mixture was extracted with ethyl acetate (3 x 10 mL). The combined organic layers were extracted with a saturated solution of NaHCO<sub>3</sub> (3 x 10 mL), water (1 x 10 mL) and brine (1 x 10 mL). The organic layer was dried over sodium sulfate and concentrated under vacuum. The crude product was purified by flash column chromatography using hexane:ethyl acetate as eluent (gradient) to give the deprotected aminoxy intermediates. The subsequent acetylation was directly performed as described under general procedure C.

**General procedure F for the synthesis of  $\alpha$ -aminoxy peptoids 12, 22b, 22c by Mitsunobu reaction.**

To a stirred solution of compound **11**, PPh<sub>3</sub> (1.2 equiv.) and the respective alcohol (1.0 equiv.) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> was added DIAD (1.2 equiv.) at room temperature. The reaction was stirred for

16 h, concentrated and directly purified by flash column chromatography using hexane:ethyl acetate as eluent (gradient).

#### **General procedure G for the N-alkylation of $\alpha$ -aminoxy peptoids **34**, **22a** and **36**.**

To a suspension of compound **11** and  $K_2CO_3$  (2.0 equiv.) in DMF was added the respective alkyl bromide (1.0 equiv.) at room temperature. After 2 h the mixture was diluted with ethyl acetate and washed with  $H_2O$  and brine, dried and concentrated in vacuo.

#### **General procedure H for the preparation of oligomers **20** and **28**.**

The respective C-terminal *tert*-butyl ester (**15** or **24**) was dissolved in dry  $CH_2Cl_2$  (3 mL per mmol). Trifluoroacetic acid (TFA, 3 mL per mmol) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h. The reaction mixture was evaporated under vacuum, toluene (10 mL) was added and the solution was concentrated. This procedure was repeated twice and the residue was dried under vacuum to give the corresponding crude acid (quantitative yield). The respective crude acid was added to a stirred solution of **16** or **25a** (1 equiv.) and pyridine (2 equiv.) in DMF/ $CH_2Cl_2$  (1:1, 20 mL). Afterwards DIC (1.2 equiv.) and HOAt (1.2 equiv.) were added at room temperature. The reaction mixture was stirred overnight and diluted with ethyl acetate (30 mL). The mixture was extracted with a saturated solution of  $NaHCO_3$  (2 x 20 mL), water (1 x 20 mL) and brine (1 x 20 mL). The organic layer was dried over sodium sulfate and concentrated under vacuum. The crude product was purified by flash column chromatography using hexane:ethyl acetate as eluent (gradient). Thiophenol (2.5 equiv.) was added to a suspension of **17** or **27** (1 equiv.) and  $K_2CO_3$  (4 equiv.) in DMF (10 mL) at room temperature. The reaction mixture was stirred at room temperature under argon for 3 h and diluted with water (20 mL). The mixture was extracted with ethyl acetate (3 x 10 mL). The combined organic layers were extracted with a saturated solution of  $NaHCO_3$  (3 x 10 mL), water (1 x 10 mL) and brine (1 x 10 mL). The organic layer

was dried over sodium sulfate and concentrated under vacuum. The crude product was purified by flash column chromatography using hexane:ethyl acetate as eluent (gradient) to give the deprotected aminoxy intermediate. The subsequent acetylation was directly performed as described under general procedure C gaining the tetramers **20** and **28**.

### **General procedure I for the preparation of oligomers 21 and 29.**

The respective C-terminal *tert*-butyl ester (**17** or **27**) was dissolved in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 mL per mmol). Trifluoroacetic acid (TFA, 3 mL per mmol) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h. The reaction mixture was evaporated under vacuum, toluene (10 mL) was added and the solution was concentrated. This procedure was repeated twice and the residue was dried under vacuum to give the corresponding crude acid (quantitative yield). The respective crude acid was added to a stirred solution of **16** or **26a** (1 equiv.) and pyridine (2 equiv.) in DMF/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1, 20 mL). Afterwards DIC (1.2 equiv.) and HOAt (1.2 equiv.) were added at room temperature. The reaction mixture was stirred over night and diluted with ethyl acetate (30 mL). The mixture was extracted with a saturated solution of NaHCO<sub>3</sub> (2 x 20 mL), water (1 x 20 mL) and brine (1 x 20 mL). The organic layer was dried over sodium sulfate and concentrated under vacuum. The crude product was purified by flash column chromatography using hexane:ethyl acetate as eluent (gradient). Thiophenol (2.5 equiv.) was added to a suspension of the respective Ns-protected analogs of **21** or **29** (1 equiv.) and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4 equiv.) in DMF (10 mL) at room temperature. The reaction mixture was stirred at room temperature under argon for 3 h and diluted with water (20 mL). The mixture was extracted with ethyl acetate (3 x 10 mL). The combined organic layers were extracted with a saturated solution of NaHCO<sub>3</sub> (3 x 10 mL), water (1 x 10 mL) and brine (1 x 10 mL). The organic layer was dried over sodium sulfate and concentrated under vacuum. The crude product was purified by flash column chromatography using hexane:ethyl acetate as eluent (gradient) to give the deprotected aminoxy intermediate. The subsequent acetylation

was directly performed as described under general procedure C gaining the hexamers **21** and **29**.

### Compound characterization data of $\alpha$ -aminoxy peptoids

***N*-Methyl-*N*-(2-oxo-2-(piperidin-1-yl)ethoxy)acetamide (1).** Compound **1** was prepared from **31** (0.492 g, 5.52 mmol) and **33** (0.982 g, 6.08 mmol) according to general procedure A. Flash column chromatography on silica gel using hexane:ethyl acetate as eluent (gradient) afforded **1** (0.792 g, 3.70 mmol, 67% yield) as white microcrystals; m.p. 56°C;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 4.54 (s, 2H,  $\text{OCH}_2$ ), 3.63 – 3.54 (m, 2H,  $\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2$ ), 3.43 – 3.34 (m, 2H,  $\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2$ ), 3.26 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 2.17 (s, 3H,  $\text{NAc}$ ), 1.71 – 1.64 (m, 2H,  $\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2$ ), 1.63 – 1.55 (m, 4H,  $\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 172.97, 164.66, 72.67, 46.17, 42.85, 33.67, 26.36, 25.33, 24.28, 20.43; elemental analysis calcd (%) for  $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$ : C 56.06, H 8.47, N 13.07; found: C 55.80, H 8.35, N 12.92.

***N*-(2-oxo-2-(piperidin-1-yl)ethoxy)-*N*-phenylacetamide (2).** Compound **2** was prepared from **32** (0.309 g, 2.04 mmol) and **33** (0.363 g, 2.25 mmol) according to general procedure A. Flash column chromatography on silica gel using hexane:ethyl acetate as eluent (gradient) afforded **2** (0.311 g, 1.13 mmol, 55% yield) as yellow oil;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 7.48 – 7.39 (m, 4H, *o*- $\text{C}_6\text{H}_5$  and *m*- $\text{C}_6\text{H}_5$ ), 7.34 – 7.28 (m, 1H, *p*- $\text{C}_6\text{H}_5$ ), 4.55 (s, 2H,  $\text{OCH}_2$ ), 3.53 – 3.43 (m, 2H,  $\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2$ ), 3.38 – 3.27 (m, 2H,  $\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2$ ), 2.22 (s, 3H,  $\text{NAc}$ ), 1.63 – 1.58 (m, 2H,  $\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2$ ), 1.54 – 1.47 (m, 4H,  $\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 169.73, 164.42, 138.65, 129.13, 127.79, 125.01, 72.66, 46.32, 42.78, 26.30, 25.28, 24.29, 21.90; HRMS (ESI):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_3$  [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ : 277.15475; found: 277.15467.

***N*-Benzyl-*N*-(2-oxo-2-(piperidin-1-yl)ethoxy)acetamide (3).** Compound **3** was prepared from **37** (0.50 g, 1.15 mmol) according to general procedure C. Flash column chromatography on silica gel using hexane:ethyl acetate as eluent (gradient) afforded **3** (0.225 g, 0.78 mmol, 68% yield) as white solid; m.p. 45°C; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.35 – 7.27 (m, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 4.88 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>), 4.41 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>), 3.52 – 3.46 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 3.18 – 3.08 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 2.23 (s, 3H, NAc), 1.64 – 1.56 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 1.55 – 1.48 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 1.44 – 1.34 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 173.20, 164.89, 136.70, 128.99, 128.73, 128.11, 74.32, 51.04, 46.55, 43.24, 26.61, 25.71, 24.66, 21.20; elemental analysis calcd (%) for C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: C 66.18, H 7.64, N 9.65; found: C 66.12, H 7.64, N 9.58.

***N*-(2-oxo-2-(piperidin-1-yl)ethoxy)-*N*-(prop-2-yn-1-yl)acetamide (4).** Compound **4** was prepared from **38** (0.381 g, 1.0 mmol) according to general procedure C. Flash column chromatography on silica gel using hexane:ethyl acetate as eluent (gradient) afforded **4** (0.122 g, 0.51 mmol, 51% yield) as colorless oil; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 4.70 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.47 (d, *J* = 2.6 Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>CCH), 3.52 – 3.58 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 3.42 – 3.36 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 2.26 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>CCH), 2.21 (s, 3H, NAc), 1.69 – 1.64 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 1.63 – 1.55 (m, 4H, NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 173.47, 164.65, 78.08, 74.26, 72.13, 46.26, 42.94, 37.40, 26.41, 25.38, 24.33, 20.75; elemental analysis calcd (%) for C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: C 60.49, H 7.61, N 11.76; found: C 60.80, H 7.28, N 11.56.

***N*-((1-Benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-*N*-(2-oxo-2-(piperidin-1-yl)ethoxy)-acetamide (5).** Compound **5** was prepared from **39** (1.48 g, 2.94 mmol) according to general procedure B to yield *N*-((1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-2-nitro-*N*-(2-oxo-2-(piperidin-1-yl)ethoxy)benzenesulfonamide (0.950 g, 1.85 mmol, 63%). Subsequently, *N*-((1-

benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-2-nitro-*N*-(2-oxo-2-(piperidin-1-yl)ethoxy)benzenesulfonamide (0.950 g, 1.85 mmol) was subjected to general procedure C. Flash column chromatography on silica gel using hexane:ethyl acetate as eluent (gradient) afforded **5** (0.450 g, 1.04 mmol, 56% yield) as colorless oil; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.53 (s, 1H, C=CHN), 7.39 – 7.32 (m, 3H, *m*-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> and *p*-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 7.29 – 7.23 (m, 2H, *o*-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 5.49 (s, 2H, PhCH<sub>2</sub>), 4.92 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>), 4.62 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>), 3.55 – 3.49 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 3.36 – 3.29 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 2.20 (s, 3H, NAc), 1.66 – 1.61 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 1.57 – 1.50 (m, 4H, NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 172.91, 164.56, 143.39, 134.43, 129.11, 128.79, 128.13, 123.14, 73.55, 54.21, 46.24, 42.86, 26.34, 25.38, 24.32, 20.75; HRMS (ESI): *m/z* calcd for C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 372.2035; found: 372.2030.

**1-Benzyl-3-methyl-4-((*N*-(2-oxo-2-(piperidin-1-yl)ethoxy)acetamido)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-3-ium iodide (6).** Methyl iodide (0.710 g, 5 mmol) was added dropwise to a solution of peptoid **5** (0.124 g, 0.333 mmol) in dry acetonitrile (5 mL). The reaction mixture was stirred for 18 h at 70°C and subsequently evaporated under reduced pressure. The crude product was directly purified by flash column chromatography on silica gel using CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:methanol (95:5) as eluent to provide **6** (0.075 g, 0.150 mmol, 45% yield) as yellow oil; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 9.22 (s, 1H, C=CHN), 7.58 – 7.52 (m, 2H, *m*-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 7.47 – 7.42 (m, 3H, *o*-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> and *p*-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 5.81 (s, 2H, PhCH<sub>2</sub>), 5.38 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>), 5.05 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.44 (s, 3H, N<sup>+</sup>CH<sub>3</sub>), 3.51 – 3.45 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 3.42 – 3.36 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 2.27 (s, 3H, NAc), 1.68 – 1.61 (m, 4H, NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 1.57 – 1.51 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 174.59, 165.14, 140.03, 131.24, 130.91, 130.06, 129.59, 129.51, 74.83, 57.69, 46.03, 42.77, 41.16, 39.53, 26.32, 25.37, 24.18, 20.91; HRMS (ESI): *m/z* calcd for C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub> [M]<sup>+</sup>: 386.21917; found: 386.21867.

***tert*-Butyl 2-((*N*-benzylacetamido)oxy)acetate (7).** Compound **7** was prepared from **34** (0.997 g, 2.36 mmol) according to general procedure E. Flash column chromatography on silica gel using hexane:ethyl acetate as eluent (gradient) afforded **7** (0.560 g, 2.01 mmol, 85% yield) as yellowish solid; m.p. 61 – 62°C; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.35 – 7.26 (m, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 4.86 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>), 4.24 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>), 2.23 (s, 3H, NAc), 1.45 (s, 9H, *t*Bu); <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 173.39, 166.88, 136.44, 128.59, 128.42, 127.69, 82.62, 73.01, 51.15, 28.03, 20.92; elemental analysis calcd (%) for C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>4</sub>: C 64.50, H 7.58, N 5.01; found: C 64.78, H 7.82, N 4.92.

***N*-Benzyl-2-((*N*-benzylacetamido)oxy)-*N*-(2-oxo-2-(piperidin-1-yl)ethoxy)acetamide (8).** Compound **8** was prepared from **43** (0.263 g, 0.441 mmol) according to general procedure E. Flash column chromatography on silica gel using hexane:ethyl acetate as eluent (gradient) afforded **8** (0.074 g, 0.163 mmol, 37% yield) as colorless oil; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.32 – 7.14 (m, 10H, 2 x C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 4.83 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.75 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>), 4.67 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.07 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>), 3.41 – 3.35 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 2.91 – 2.79 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 2.18 (s, 3H, NAc), 1.55 – 1.47 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 1.46 – 1.38 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 1.30 – 1.23 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 173.30, 169.55, 164.04, 136.77, 135.67, 128.69, 128.58, 128.52, 128.48, 127.99, 127.50, 73.19, 73.17, 51.14, 51.13, 45.75, 42.81, 26.13, 25.25, 24.20, 20.95; HRMS (ESI): *m/z* calcd for C<sub>25</sub>H<sub>32</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 454.2340; found: 454.2336.

***N*-Benzyl-*N*-(2-(benzyl(2-oxo-2-(piperidin-1-yl)ethoxy)amino)-2-oxoethoxy)-2-((*N*-benzylacetamido)oxy)acetamide (9).** Compound **9** was prepared from **44** (0.268 g, 0.353 mmol) according to general procedure E. Flash column chromatography on silica gel using hexane:ethyl acetate as eluent (gradient) afforded **9** (0.093 g, 0.15 mmol, 43% yield) as colorless oil; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.41 – 7.17 (m, 15H, 3 x C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 4.91 (s, 2H,

OCH<sub>2</sub>), 4.91 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>), 4.85 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>), 4.78 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>), 4.70 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.09 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>), 3.50 – 3.40 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 2.97 – 2.84 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 2.25 (s, 3H, NAc), 1.62 – 1.54 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 1.52 – 1.44 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 1.38 – 1.30 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 173.28, 170.19, 169.51, 163.98, 136.66, 136.08, 135.65, 128.75, 128.62, 128.52, 128.48, 128.38, 128.07, 127.75, 127.51, 73.13, 72.50, 72.25, 51.11, 50.88, 45.69, 42.84, 26.13, 25.25, 24.18, 20.94; HRMS (ESI): *m/z* calcd for C<sub>34</sub>H<sub>41</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 617.2981; found: 617.2970.

***N*-benzyl-*N*-(2-(benzyl(2-oxo-2-(piperidin-1-yl)ethoxy)amino)-2-oxoethoxy)-2-((*N*-benzyl-2-((*N*-benzylacetamido)oxy)acetamido)oxy)acetamide (10).** Compound **10** was prepared from **45** (0.084 g, 0.114 mmol) according to general procedure E. Flash column chromatography on silica gel using hexane:ethyl acetate as eluent (gradient) afforded **10** (0.083 g, 0.106 mmol, 61% yield) as colorless oil; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.29 – 7.12 (m, 20H, 4 x C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 4.83 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.81 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>), 4.79 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>), 4.79 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.76 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>), 4.71 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.66 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>), 4.02 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>), 3.38 – 3.36 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 2.88 – 2.79 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 2.16 (s, 3H, NAc), 1.52 – 1.48 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 1.44 – 1.39 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 1.29 – 1.24 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 169.01, 168.68, 162.95, 135.62, 134.99, 134.80, 134.59, 127.77, 127.65, 127.56, 127.44, 127.42, 127.26, 127.09, 126.81, 126.78, 126.48, 72.10, 71.21, 71.10, 70.66, 50.03, 49.56, 49.26, 44.65, 41.81, 25.09, 24.21, 23.13, 19.88; HRMS (ESI): *m/z* calcd for C<sub>43</sub>H<sub>50</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 780.36071; found: 780.36030.

***tert*-Butyl (*S*)-2-((*N*-(1-phenylethyl)acetamido)oxy)acetate (*N*-ac-14).** Compound ***N*-ac-14** was prepared from **14** (0.05 g, 0.21 mmol) according to general procedure C. Flash column chromatography on silica gel using hexane:ethyl acetate as eluent (gradient) afforded

***N*-ac-14** (0.04 g, 0.15 mmol, 71% yield) as yellow oil;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7.45 - 7.27$  (m, 5H,  $\text{C}_6\text{H}_5$ ), 5.72 – 5.64 (m, 1H,  $\text{NCHCH}_3$ ), 4.10 (d,  $J = 15.0$  Hz, 1H,  $\text{OCH(H)}$ ), 3.78 (d,  $J = 14.4$  Hz, 1H,  $\text{OCH(H)}$ ), 2.18 (s, 3H,  $\text{NAc}$ ), 1.63 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H,  $\text{NCHCH}_3$ ), 1.43 (s, 9H, *t*Bu);  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 173.89, 166.47, 140.05, 128.62, 128.05, 127.95, 82.56, 74.58, 55.79, 28.14, 21.12, 16.05$ ; HRMS (ESI):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{NO}_4$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 294.1700; found: 294.1700.

***tert*-Butyl (S)-3-acetyl-6-oxo-2-phenyl-7-((S)-1-phenylethyl)-4,8-dioxa-3,7-diazadecan-10-oate (19)**. Compound **19** was prepared from **15** (0.10 g, 0.23 mmol) according to general procedure E. Flash column chromatography on silica gel using hexane:ethyl acetate as eluent (gradient) afforded **19** (0.095 g, 0.20 mmol, 87% yield) as white foam;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7.47 - 7.20$  (m, 10H, 2x  $\text{C}_6\text{H}_5$ ), 5.76 – 5.69 (m, 1H,  $\text{NCHCH}_3$ ), 5.58 – 5.55 (m, 1H,  $\text{NCHCH}_3$ ), 4.56 (d,  $J = 15.6$  Hz, 1H,  $\text{OCH(H)}$ ), 3.98 – 3.96 (m, 1H,  $\text{OCH(H)}$ ), 3.38 (bs, 2H,  $\text{OCH}_2$ ), 2.20 (s, 3H,  $\text{NAc}$ ), 1.65 (d,  $J = 7.0$  Hz, 3H,  $\text{NCHCH}_3$ ), 1.57 (d,  $J = 7.0$  Hz, 3H,  $\text{NCHCH}_3$ ), 1.40 (s, 9H, *t*Bu);  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 173.57, 169.87, 165.80, 140.06, 138.98, 128.59, 128.49, 128.25, 128.11, 127.89, 127.75, 82.60, 75.06, 74.04, 56.04, 55.37, 27.99, 21.22, 15.68, 15.26$ ; HRMS (ESI):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{26}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{O}_6$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 471.2494; found: 471.2490.

***tert*-Butyl (S)-3-acetyl-6,10,14-trioxo-2-phenyl-7,11,15-tris((S)-1-phenylethyl)-4,8,12,16-tetraoxa-3,7,11,15-tetrazaoctadecan-18-oate (20)**. Compound **20** was prepared from **17** (0.16 g, 0.16 mmol) according to general procedure E. Flash column chromatography on silica gel using hexane:ethyl acetate as eluent (gradient) afforded **20** (0.054 g, 0.07 mmol, 44% yield) as white foam;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7.47 - 7.21$  (m, 20H, 4x  $\text{C}_6\text{H}_5$ ), 5.72 – 5.71 (m, 1H,  $\text{NCHCH}_3$ ), 5.59 – 5.58 (m, 1H,  $\text{NCHCH}_3$ ), 5.51 – 5.49 (m, 2H, 2x  $\text{NCHCH}_3$ ), 4.63 (d,  $J = 15.6$  Hz, 1H,  $\text{OCH(H)}$ ), 4.05 – 3.97 (m, 2H, 2x  $\text{OCH(H)}$ ), 3.83 – 3.80

(m, 2H, 2x OCH(*H*)), 3.65 (d, *J* = 14.5 Hz, 1H, OCH(*H*)), 3.29 – 3.28 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>), 2.20 (s, 3H, NAc), 1.65 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, NCHCH<sub>3</sub>), 1.61 – 1.58 (m, 9H, 3x NCHCH<sub>3</sub>), 1.43 (s, 9H, *t*Bu); <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 177.74, 172.23, 169.42, 169.31, 165.63, 139.98, 139.30, 139.24, 138.91, 128.63, 128.57, 128.17, 128.11, 128.07, 128.04, 127.96, 127.82, 82.60, 75.07, 74.38, 73.67, 56.12, 55.94, 28.03, 21.28; HRMS (ESI): *m/z* calcd for C<sub>46</sub>H<sub>57</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 825.4066; found: 825.4069.

***tert*-Butyl (S)-3-acetyl-6,10,14,18,22-pentaoxo-2-phenyl-7,11,15,19,23-pentakis-((S)-1-phenylethyl)-4,8,12,16,20,24-hexaoxa-3,7,11,15,19,23-hexaazahexa-cosan-26-oate (21).** Compound **21** was prepared from **18** (0.30 g, 0.23 mmol) according to general procedure E. Flash column chromatography on silica gel using hexane:ethyl acetate as eluent (gradient) afforded **21** (0.17 g, 0.15 mmol, 65% yield) as white foam; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.47 – 7.22 (m, 30H, 6x C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 5.73 – 5.70 (m, 1H, NCHCH<sub>3</sub>), 5.59 – 5.50 (m, 5H, 5x NCHCH<sub>3</sub>), 4.64 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H, OCH(*H*)), 4.09 – 3.66 (m, 9H, 4x OCH(*H*), 5x OCH(*H*)), 3.33 – 3.27 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>), 2.20 (s, 3H, NAc), 1.65 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, NCHCH<sub>3</sub>), 1.62 – 1.59 (m, 15H, 5x NCHCH<sub>3</sub>), 1.44 (s, 9H, *t*Bu); <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 173.81, 170.00, 169.60, 169.43, 165.76, 140.10, 139.37, 139.32, 139.28, 139.19, 139.03, 128.77, 128.75, 128.73, 128.68, 128.39, 128.35, 128.32, 128.28, 128.24, 128.19, 128.07, 127.90, 82.75, 75.21, 74.98, 74.64, 74.60, 74.45, 73.75, 56.26, 56.25, 56.22, 56.13, 56.02, 55.53, 28.16, 21.39, 15.97, 15.66, 15.62, 15.54, 15.48, 15.44; HRMS (ESI): *m/z* calcd for C<sub>66</sub>H<sub>79</sub>N<sub>6</sub>O<sub>14</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 1179.5649; found: 1179.5649.

***tert*-Butyl 16-acetyl-8-(3,5-dimethoxybenzyl)-5,9,13-trioxo-4,12-bis((S)-1-phenylethyl)-3,7,11,15-tetraoxa-4,8,12,16-tetraazanonadec-18-enoate (28).** Compound **28** was prepared from **27** (0.20 g, 0.21 mmol) according to general procedure H. Flash column chromatography on silica gel using hexane:ethyl acetate as eluent (gradient) afforded **28** (0.60

g, 0.07 mmol, 33% yield) as white foam;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 7.46 – 7.22 (m, 10H, 2x  $\text{C}_6\text{H}_5$ ), 6.43 (d,  $J$  = 2.2 Hz, 2H,  $\text{C}_6\text{H}(1)\text{H}(5)$ ), 6.34 (t,  $J$  = 2.2 Hz, 1H,  $\text{C}_6\text{H}(3)$ ), 5.89 – 5.83 (m, 1H,  $\text{NCH}_2\text{CHCH}_2$ ), 5.68 (q,  $J$  = 7.0 Hz, 1H,  $\text{NCHCH}_3$ ), 5.53 (q,  $J$  = 6.8 Hz, 1H,  $\text{NCHCH}_3$ ), 5.27 – 5.24 (m, 1H,  $\text{NCH}_2\text{CHCH}(\text{H})$ ), 5.17 – 5.15 (m, 1H,  $\text{NCH}_2\text{CHCH}(\text{H})$ ), 4.92 – 4.86 (m, 2H,  $\text{OCH}_2$ ), 4.85 – 4.82 (m, 1H,  $\text{OCH}(\text{H})$ ), 4.74 (d,  $J$  = 15.7 Hz, 1H,  $\text{NCH}(\text{H})$ ), 4.68 (d,  $J$  = 15.7 Hz, 1H,  $\text{NCH}(\text{H})$ ), 4.52 (d,  $J$  = 16.5 Hz, 1H,  $\text{OCH}(\text{H})$ ), 4.41 – 4.36 (m, 2H, 1x  $\text{OCH}(\text{H})$ , 1x  $\text{OCH}(\text{H})$ ), 4.31 (d,  $J$  = 5.9 Hz, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CHCH}_2$ ), 3.74 (s, 6H, 2x  $\text{OCH}_3$ ), 3.61 (d,  $J$  = 15.4 Hz, 1H,  $\text{OCH}(\text{H})$ ), 3.52 (d,  $J$  = 15.4 Hz, 1H,  $\text{OCH}(\text{H})$ ), 2.21 (s, 3H,  $\text{NAc}$ ), 1.68 (d,  $J$  = 7.1 Hz, 3H,  $\text{NCHCH}_3$ ), 1.57 (d,  $J$  = 7.1 Hz, 3H,  $\text{NCHCH}_3$ ), 1.41 (s, 9H,  $t\text{Bu}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 170.87, 170.67, 169.73, 166.27, 161.17, 139.60, 139.10, 138.47, 132.39, 128.80, 128.69, 128.27, 128.14, 128.10, 127.81, 118.45, 106.35, 99.73, 82.90, 75.02, 73.97, 73.41, 72.34, 56.59, 56.51, 55.44, 51.18, 28.08, 20.96, 16.01, 15.60; HRMS (ESI):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{42}\text{H}_{55}\text{N}_4\text{O}_{12}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 807.3815; found: 807.3811.

***tert*-Butyl 24-acetyl-16-(3,5-dimethoxybenzyl)-8-isobutyl-5,9,13,17,21-penta-oxo-4,12,20-tris((*S*)-1-phenylethyl)-3,7,11,15,19,23-hexaoxa-4,8,12,16,20,24-hexaazaheptacos-26-enoate (29).** Compound **29** was prepared from the Ns-protected analog of **29** (0.30 g, 0.24 mmol) according to general procedure I. Flash column chromatography on silica gel using hexane:ethyl acetate as eluent (gradient) afforded **29** (0.13 g, 0.11 mmol, 46% yield) as colourless foam;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 7.44 – 7.22 (m, 15H, 3x  $\text{C}_6\text{H}_5$ ), 6.43 (d,  $J$  = 2.2 Hz, 2H,  $\text{C}_6\text{H}(1)\text{H}(5)$ ), 6.34 (t,  $J$  = 2.2 Hz, 1H,  $\text{C}_6\text{H}(3)$ ), 5.88 – 5.81 (m, 1H,  $\text{NCH}_2\text{CHCH}_2$ ), 5.65 (q,  $J$  = 7.0 Hz, 1H,  $\text{NCHCH}_3$ ), 5.61 – 5.54 (m, 2H, 2x  $\text{NCHCH}_3$ ), 5.26 – 5.23 (m, 1H,  $\text{NCH}_2\text{CHCH}(\text{H})$ ), 5.15 – 5.13 (m, 1H,  $\text{NCH}_2\text{CHCH}(\text{H})$ ), 4.90 – 4.84 (m, 3H,  $\text{OCH}_2$ ,  $\text{OCH}(\text{H})$ ), 4.72 – 4.69 (m, 3H,  $\text{OCH}(\text{H})$ ,  $\text{NCH}_2\text{OCH}_2$ ), 4.61 (d,  $J$  = 16.2 Hz, 1H,  $\text{OCH}(\text{H})$ ), 4.53 – 4.43 (m, 4H, 3x  $\text{OCH}(\text{H})$ ,  $\text{OCH}(\text{H})$ ), 4.29 (d,  $J$  = 5.9 Hz, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CHCH}_2$ ), 4.24 – 4.21 (m, 1H,  $\text{OCH}(\text{H})$ ), 3.93 (d,  $J$  = 15.6 Hz, 1H,  $\text{OCH}(\text{H})$ ), 3.85 (d,

$J = 15.6$  Hz, 1H, OCH(*H*)), 3.72 (s, 6H, 2x OCH<sub>3</sub>), 3.44 – 3.35 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.20 (s, 3H, NAc), 2.04 – 1.97 (m, 1H, NCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.66 (d,  $J = 7.1$  Hz, 3H, NCHCH<sub>3</sub>), 1.63 – 1.61 (m, 6H, 2x NCHCH<sub>3</sub>), 1.41 (s, 9H, *t*Bu), 0.85 (t,  $J = 6.5$  Hz, 6H, NCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 170.85, 170.76, 169.65, 168.90, 166.45, 161.02, 139.55, 139.30, 138.19, 132.38, 128.85, 128.69, 128.31, 128.13, 128.09, 128.03, 127.71, 118.44, 106.49, 99.94, 83.07, 75.07, 74.28, 74.09, 73.37, 71.90, 71.38, 56.64, 55.41, 50.26, 28.09, 26.46, 20.93, 20.05, 20.03, 16.11, 15.94, 15.68$ ; HRMS (ESI):  $m/z$  calcd for C<sub>58</sub>H<sub>77</sub>N<sub>6</sub>O<sub>16</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 1113.5388; found: 1113.5391.

#### 4. Compound characterization data of intermediates

***tert*-Butyl (S)-2-(((2-nitro-*N*-(1-phenylethyl)phenyl)sulfonamido)oxy)acetate (12).**

Compound **12** was prepared from **11** (11 g, 0.033 mmol) according to general procedure F. Flash column chromatography on silica gel using hexane:ethyl acetate as eluent (gradient) afforded **12** (11.64 g, 0.027 mmol, 82% yield) as colourless oil;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 8.44 – 7.23 (m, 9H, Ns,  $\text{C}_6\text{H}_5$ ), 5.24 – 4.98 (m, 1H,  $\text{NCHCH}_3$ ), 4.41 – 4.25 (m, 1H,  $\text{OCH(H)}$ ), 4.14 – 3.59 (m, 1H,  $\text{OCH(H)}$ ), 1.50 – 1.45 (bs, 12H,  $\text{NCHCH}_3$ , *t*Bu);  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 166.62, 148.76, 134.60, 131.33, 129.18, 128.52, 128.23, 123.52, 82.45, 76.15, 60.43, 28.16, 13.82; HRMS (ESI):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$  [ $\text{M}+\text{NH}_4$ ] $^+$ : 454.1645; found: 454.1642.

***tert*-Butyl (S)-3-((2-nitrophenyl)sulfonyl)-6-oxo-2-phenyl-7-((S)-1-phenyl ethyl)-4,8-dioxa-3,7-diazadecan-10-oate (15).** Compound **15** was prepared from **13** (7.75 g, 0.020 mol) and compound **14** (4.15 g, 0.017 mol) according to general procedure D. Flash column chromatography on silica gel using hexane:ethyl acetate as eluent (gradient) afforded **15** (7.98 g, 0.013 mmol, 75% yield) as yellow foam;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 8.53 – 7.18 (m, 14H, Ns, 2x  $\text{C}_6\text{H}_5$ ), 5.66 – 5.52 (m, 1H,  $\text{NCHCH}_3$ ), 5.23 – 5.05 (m, 1H,  $\text{NCHCH}_3$ ), 4.86 – 4.67 (m, 1H,  $\text{OCH(H)}$ ), 4.25 – 3.58 (m, 3H, 1x  $\text{OCH(H)}$ , 2x  $\text{OCH(H)}$ ), 1.63 – 1.60 (m, 3H,  $\text{NCHCH}_3$ ), 1.54 – 1.41 (m, 12H,  $\text{NCHCH}_3$ , *t*Bu);  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 170.06, 165.95, 148.76, 139.23, 134.54, 131.36, 129.24, 128.72, 128.52, 128.40, 128.17, 127.97, 123.41, 82.82, 74.51, 56.24, 54.34, 28.09, 15.64, 13.67; HRMS (ESI):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{30}\text{H}_{36}\text{N}_3\text{O}_9\text{S}$  [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ : 614.2166; found: 614.2167.

***tert*-Butyl (S)-6-oxo-2-phenyl-7-((S)-1-phenylethyl)-4,8-dioxa-3,7-diaza decan-10-oate (16).** Compound **16** was prepared from **15** (2.83 g, 4.61 mmol) according to general

procedure E. Flash column chromatography on silica gel using hexane:ethyl acetate as eluent (gradient) afforded **16** (1.61 g, 3.77 mmol, 82% yield) as yellowish oil;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7.45 - 7.22$  (m, 10H,  $2 \times \text{C}_6\text{H}_5$ ), 5.63 (q,  $J = 7.0$  Hz, 1H,  $\text{NCHCH}_3$ ), 4.54 (d,  $J = 16.7$  Hz, 1H,  $\text{OCH(H)}$ ), 4.42 (d,  $J = 16.7$  Hz, 1H,  $\text{OCH(H)}$ ), 4.22 (q,  $J = 6.7$  Hz, 1H,  $\text{NHCHCH}_3$ ), 4.01 (d,  $J = 15.1$  Hz, 1H,  $\text{OCH(H)}$ ), 3.73 (d,  $J = 15.1$  Hz, 1H,  $\text{OCH(H)}$ ), 1.62 (d,  $J = 7.1$  Hz, 3H,  $\text{NCHCH}_3$ ), 1.41 (s, 9H, *t*Bu), 1.36 (d,  $J = 6.7$  Hz, 3H,  $\text{NCHCH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 174.06, 166.24, 143.01, 72.76, 60.42, 56.36, 28.12, 20.08, 15.76$ ; HRMS (ESI):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_5$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 429.2385; found: 429.2384.

***tert*-Butyl 2-(((*N*-(3,5-dimethoxybenzyl)-2-nitrophenyl)sulfonamido)oxy) acetate (22b).** Compound **22b** was prepared from **11** (6.61 g, 19.9 mmol) according to general procedure F. Flash column chromatography on silica gel using hexane:ethyl acetate as eluent (gradient) afforded **22b** (7.13 g, 14.8 mmol, 74% yield) as white solid; m.p.  $107^\circ\text{C}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 8.31$  (dd,  $J = 7.9, 1.3$  Hz, 1H, *NsH*), 7.80 (td,  $J = 7.7, 1.4$  Hz, 1H, *NsH*), 7.75 (td,  $J = 7.7, 1.2$  Hz, 1H, *NsH*), 7.58 (dd,  $J = 7.8, 1.2$  Hz, 1H, *NsH*), 6.51 (d,  $J = 2.2$  Hz, 2H,  $\text{CH(2)H(6)}$ ), 6.39 (t,  $J = 2.2$  Hz, 1H,  $\text{CH(4)}$ ), 4.38 – 4.26 (m, 4H,  $\text{OCH}_2$ ,  $\text{NCH}_2$ ), 3.77 (s, 6H,  $(\text{OCH}_3)_2$ ), 1.42 (s, 9H, *t*Bu);  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 166.67, 160.98, 149.74, 136.13, 135.18, 133.72, 131.36, 126.18, 123.60, 107.39, 100.95, 82.48, 75.25, 57.34, 55.52, 28.12$ ; elemental analysis calcd (%) for  $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_9\text{S}$ : C 52.28, H 5.43, N 5.81; found: C 52.42, H 5.41, N 5.78.

***tert*-Butyl 2-(((*N*-isobutyl-2-nitrophenyl)sulfonamido)oxy)acetate (22c).** Compound **22c** was prepared from **11** (6.32 g, 0.019 mmol) according to general procedure F. Flash column chromatography on silica gel using hexane:ethyl acetate as eluent (gradient) afforded **22c** (6.46 g, 0.017 mmol, 89% yield) as white solid; m.p.  $50^\circ\text{C}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 8.24$  (dd,  $J = 7.9, 1.5$  Hz, 1H, *NsH*), 7.78 (td,  $J = 7.7, 1.5$  Hz, 1H, *NsH*), 7.74 (td,  $J = 7.7,$

1.4 Hz, 1H, NsH), 7.54 (dd,  $J = 7.8, 1.3$  Hz, 1H, NsH), 4.62 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>), 3.03 – 2.84 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.04 – 1.98 (m, 1H, NCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.49 (s, 9H, *t*Bu), 0.97 (d,  $J = 6.7$  Hz, 6H, NCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 166.95, 149.94, 135.11, 133.29, 131.16, 125.59, 123.53, 82.65, 75.04, 61.00, 28.20, 26.19, 20.26$ ; elemental analysis calcd (%) for C<sub>16</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>S: C 49.47, H 6.23, N 7.21; found: C 49.21, H 6.09, N 7.25.

***tert*-Butyl (S)-8-((2-nitrophenyl)sulfonyl)-5-oxo-4-(1-phenylethyl)-3,7-dioxa-4,8-diazaundec-10-enoate (24).** Compound **24** was prepared from **23a** (0.11 g, 0.34 mmol) and compound **14** (0.07 g, 0.28 mmol) according to general procedure D. Flash column chromatography on silica gel using hexane:ethyl acetate as eluent (gradient) afforded **24** (0.07 g, 0.12 mmol, 43% yield) as yellowish oil; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 8.33$  (dd,  $J = 7.6, 1.6$  Hz, 1H, NsH), 7.80 – 7.74 (m, 2H, NsH), 7.55 (dd,  $J = 7.4, 1.6$  Hz, 1H, NsH), 7.43 – 7.28 (m, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 5.89 – 5.82 (m, 1H, NCH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>), 5.65 (q,  $J = 6.9$  Hz, 1H, NCHCH<sub>3</sub>), 5.31 – 5.28 (m, 1H, NCH<sub>2</sub>CHCH(H)), 5.21 – 5.19 (m, 1H, NCH<sub>2</sub>CHCH(H)), 4.99 (d,  $J = 15.9$  Hz, 1H, OCH(H)), 4.95 (d,  $J = 15.9$  Hz, 1H, OCH(H)), 4.06 (d,  $J = 15.2$  Hz, 1H, OCH(H)), 3.98 – 3.84 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>), 3.80 (d,  $J = 15.2$  Hz, 1H, OCH(H)), 1.64 (d,  $J = 7.1$  Hz, 3H, NCHCH<sub>3</sub>), 1.43 (s, 9H, *t*Bu); <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 170.52, 166.08, 149.68, 139.23, 135.17, 133.63, 131.37, 130.56, 128.70, 128.13, 127.91, 126.01, 123.48, 121.11, 118.14, 82.88, 75.89, 74.71, 56.37, 56.12, 28.05, 15.69$ ; HRMS (ESI):  $m/z$  calcd for C<sub>25</sub>H<sub>32</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>S [M+H]<sup>+</sup>: 550.1855; found: 550.1854.

***tert*-Butyl (S)-1-(3,5-dimethoxyphenyl)-2-((2-nitrophenyl)sulfonyl)-5-oxo-6-(1-phenylethyl)-3,7-dioxa-2,6-diazanonan-9-oate (25).** Compound **25** was prepared from **23b** (7.30 g, 17.12 mmol) and compound **14** (3.58 g, 14.27 mmol) according to general procedure D. Flash column chromatography on silica gel using hexane:ethyl acetate as eluent (gradient) afforded **25** (2.32 g, 3.52 mmol, 25% yield) as yellowish oil; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$

= 8.37 – 8.34 (m, 1H, NsH), 7.82 – 7.73 (m, 2H, NsH), 7.59 – 7.56 (m, 1H, NsH), 7.39 – 7.28 (m, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 6.53 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H, C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>), 6.37 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H, C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>), 5.57 (q, *J* = 6.9 Hz, 1H, NCHCH<sub>3</sub>), 4.70 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H, OCH(H)), 4.61 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H, OCH(H)), 4.33 (bs, 2H, NCH<sub>2</sub>), 3.87 (d, *J* = 15.3 Hz, 1H, OCH(H)), 3.74 (s, 6H, (OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.62 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H, OCH(H)), 1.58 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, NCHCH<sub>3</sub>), 1.41 (s, 9H, *t*Bu); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 170.16, 165.95, 160.93, 149.71, 139.21, 136.09, 135.13, 133.79, 131.50, 128.70, 128.13, 127.92, 126.28, 123.54, 107.48, 101.11, 82.80, 76.01, 74.59, 57.35, 56.26, 55.47, 28.05, 15.61; HRMS (ESI): *m/z* calcd for C<sub>31</sub>H<sub>38</sub>N<sub>3</sub>O<sub>11</sub>S [M+H]<sup>+</sup>: 660.2230; found: 660.2222.

***tert*-Butyl (S)-10-methyl-8-((2-nitrophenyl)sulfonyl)-5-oxo-4-(1-phenylethyl)-3,7-dioxa-4,8-diazaundecanoate (26).** Compound **26** was prepared from **23c** (2.58 g, 7.77 mmol) and compound **14** (1.63 g, 6.48 mmol) according to general procedure D. Flash column chromatography on silica gel using hexane:ethyl acetate as eluent (gradient) afforded **26** (3.05 g, 5.39 mmol, 83% yield) as yellowish oil; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.35 – 8.32 (m, 1H, NsH), 7.80 – 7.73 (m, 2H, NsH), 7.55 – 7.52 (m, 1H, NsH), 7.46 – 7.30 (m, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 5.68 (q, *J* = 7.0 Hz, 1H, NCHCH<sub>3</sub>), 5.04 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.08 (d, *J* = 15.3 Hz, 1H, OCH(H)), 3.83 (d, *J* = 15.3 Hz, 1H, OCH(H)), 2.96 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.07 – 1.94 (m, 1H, NCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.66 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H, NCHCH<sub>3</sub>), 1.43 (s, 9H, *t*Bu), 0.98 – 0.95 (m, 6H, NCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 170.56, 166.15, 149.88, 139.29, 135.04, 133.48, 131.27, 128.75, 128.17, 127.95, 125.62, 123.41, 82.93, 75.71, 74.70, 60.96, 56.37, 28.08, 26.17, 20.28, 15.71; HRMS (ESI): *m/z* calcd for C<sub>26</sub>H<sub>36</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>S [M+H]<sup>+</sup>: 566.2171; found: 566.2167.

***tert*-Butyl 2-(((2-nitro-*N*-(prop-2-yn-1-yl)phenyl)sulfonamido)oxy)acetate (36).** Propargyl bromide solution (80% wt. in toluene, 0.49 g, 3.3 mmol) was added at room

temperature to a suspension of  $K_2CO_3$  (0.83 g, 6 mmol) and *tert*-butyl 2-((2-nitrophenylsulfonamido)oxy)acetate **11** (1 g, 3 mmol) in dry DMF (20 mL). The reaction mixture was stirred for 5 h and diluted with ethyl acetate (50 mL). The mixture was extracted with water (1 x 20 mL) and brine (1 x 20 mL). The organic layer was dried over sodium sulfate and concentrated under vacuum. Flash column chromatography on silica gel using hexane:ethyl acetate as eluent (gradient) afforded **36** (0.87 g, 2.35 mmol, 78% yield) as white solid; m.p. 111-113°C;  $^1H$  NMR (600 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 8.24 (dd,  $J$  = 8.0, 1.4 Hz, 1H, *NsH*), 7.84 – 7.77 (m, 1H, *NsH*), 7.76 – 7.70 (m, 1H, *NsH*), 7.57 (dd,  $J$  = 7.8, 1.3 Hz, 1H, *NsH*), 4.66 (s, 2H,  $OCH_2$ ), 4.42 (s, 2H,  $NCH_2CCH$ ), 1.98 (t,  $J$  = 2.5 Hz, 1H,  $NCH_2CCH$ ), 1.50 (s, 9H, *tBu*);  $^{13}C$  NMR (151 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 167.38, 149.75, 135.27, 133.51, 131.08, 126.43, 123.61, 82.64, 75.24, 74.94, 73.93, 43.02, 28.10; elemental analysis calcd (%) for  $C_{15}H_{18}N_2O_7S$ : C 48.64, H 4.90, N 7.56; found: C 48.84, H 4.84, N 7.54.

***N*-Benzyl-2-nitro-*N*-(2-oxo-2-(piperidin-1-yl)ethoxy)benzenesulfonamide (37).**

Compound **37** was prepared from **34** (0.70 g, 1.66 mmol) according to general procedure B. Flash column chromatography on silica gel using hexane:ethyl acetate as eluent (gradient) afforded **37** (0.450 g, 1.04 mmol, 63% yield) as white solid; m.p. 153-155°C;  $^1H$  NMR (600 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 8.34 (dd,  $J$  = 7.6, 1.7 Hz, 1H, *NsH*), 7.83 – 7.72 (m, 2H, *NsH*), 7.58 (dd,  $J$  = 7.6, 1.6 Hz, 1H, *NsH*), 7.43 – 7.27 (m, 5H,  $C_6H_5$ ), 4.38 (s, 4H,  $NCH_2$  and  $OCH_2$ ), 3.48 – 3.35 (m, 2H,  $NCH_2(CH_2)_3CH_2$ ), 3.02 – 2.93 (m, 2H,  $NCH_2(CH_2)_3CH_2$ ), 1.60 – 1.53 (m, 2H,  $NCH_2(CH_2)_3CH_2$ ), 1.52 – 1.44 (m, 2H,  $NCH_2(CH_2)_3CH_2$ ), 1.43 – 1.34 (m, 2H,  $NCH_2(CH_2)_3CH_2$ );  $^{13}C$  NMR (151 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 164.27, 149.58, 135.00, 133.99, 133.81, 131.42, 129.80, 128.60, 128.38, 126.08, 123.38, 75.16, 56.99, 45.64, 42.63, 26.15, 25.32, 24.32; elemental analysis calcd (%) for  $C_{20}H_{23}N_3O_6S$ : C 55.42, H 5.35, N 9.69; found: C 55.36, H 5.22, N 9.59.

**2-Nitro-*N*-(2-oxo-2-(piperidin-1-yl)ethoxy)-*N*-(prop-2-yn-1-yl)benzenesulfonamide (38).** Compound **38** was prepared from **36** (1.03 g, 2.77 mmol) according to general procedure B. Flash column chromatography on silica gel using hexane:ethyl acetate as eluent (gradient) afforded **38** (0.580 g, 1.52 mmol, 55% yield) as slight yellowish solid; m.p. 135°C; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.28 – 8.25 (m, 1H, NsH), 7.82 – 7.70 (m, 2H, NsH), 7.58 – 7.55 (m, 1H, NsH), 4.89 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.44 (bs, 2H, NCH<sub>2</sub>), 3.57 – 3.54 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 3.31-3.28 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 2.00 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>C≡CH), 1.69 – 1.58 (m, 6H, NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 169.36, 165.26, 135.35, 133.78, 131.32, 126.54, 123.72, 75.66, 75.36, 74.04, 45.88, 43.08, 26.41, 25.51, 24.48; HRMS (ESI): *m/z* calcd for C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S [M+H]<sup>+</sup>: 382.1070; found: 382.1067.

***tert*-Butyl 2-((*N*-((1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-2-nitrophenyl-sulfonamido)oxy)acetate (39).** Compound **36** (0.844 g, 2.28 mmol) and benzyl azide (0.607 g, 4.56 mmol) were dissolved in a mixture of DMF (20 mL) and H<sub>2</sub>O (5 mL). Copper sulfate pentahydrate (0.114 g, 0.456 mmol) and sodium ascorbate (0.181 g, 0.912 mmol) were added and the mixture was stirred at room temperature for 3 days. The solvents were removed under reduced pressure and the residue was dried under vacuum. The crude product was directly purified by flash column chromatography on silica gel using hexane:ethyl acetate as eluent (gradient) to yield **39** (0.680 g, 1.35 mmol, 59% yield) as white solid; m.p. 103°C; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.20 (dd, *J* = 7.6, 1.8 Hz, 1H, NsH), 7.68 – 7.60 (m, 2H, NsH), 7.52 (s, 1H), 7.43 (dd, *J* = 7.5, 1.7 Hz, 1H, NsH), 7.39 – 7.34 (m, 3H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 7.25 – 7.20 (m, 2H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 5.43 (s, 2H, CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 4.71 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.43 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>), 1.45 (s, 9H, *t*Bu); <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 167.15, 149.58, 140.87, 134.94, 134.41, 133.45, 131.06, 129.12, 128.81, 128.10, 125.97, 123.91, 123.35, 82.47, 74.82, 54.13, 48.83, 28.06; elemental

analysis calcd (%) for C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>S: C 52.48, H 5.00, N 13.91; found: C 52.53, H 5.03, N 13.83.

***tert*-Butyl 6-benzyl-2-((2-nitrophenyl)sulfonyl)-5-oxo-1-phenyl-3,7-dioxa-2,6-diazanonan-9-oate (40).** Compound **40** was prepared from **34** (3.32 g, 7.86 mmol) and **35** (1.55 g, 6.55 mmol) according to general procedure D. Flash column chromatography on silica gel using hexane:ethyl acetate as eluent (gradient) afforded **40** (2.64 g, 4.51 mmol, 69% yield) as colorless oil; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.39 – 8.35 (m, 1H, NsH), 7.82 – 7.73 (m, 2H, NsH), 7.60 – 7.55 (m, 1H, NsH), 7.42– 7.20 (m, 10H, 2 x C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 4.77 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>), 4.63 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>), 4.39 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.02 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>), 1.42 (s, 9H, *t*Bu); <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 169.53, 166.28, 149.63, 135.64, 135.01, 133.85, 133.78, 131.39, 129.85, 128.63, 128.59, 128.35, 127.87, 126.03, 123.39, 82.85, 75.44, 72.95, 57.14, 51.29, 27.99; elemental analysis calcd (%) for C<sub>28</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>S: C 57.43, H 5.34, N 7.18; found: C 57.35, H 5.44, N 7.07.

***tert*-Butyl 6,10-dibenzyl-2-((2-nitrophenyl)sulfonyl)-5,9-dioxo-1-phenyl-3,7, 11-trioxa-2,6,10-triazatridecan-13-oate (41).** Compound **41** was prepared from **35** (0.327 g, 1.38 mmol) and **40** (0.966 g, 1.65 mmol) according to general procedure D. Flash column chromatography on silica gel using hexane:ethyl acetate as eluent (gradient) afforded **41** (0.545 g, 0.728 mmol, 53% yield) as colorless oil; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.42 – 8.35 (m, 1H, NsH), 7.80 – 7.71 (m, 2H, NsH), 7.59 – 7.53 (m, 1H, NsH), 7.40 – 7.24 (m, 15H, 3 x C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 4.81 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>), 4.76 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>), 4.69 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.63 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.40 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>), 3.98 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>), 1.43 (s, 9H, *t*Bu); <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 169.71, 169.38, 166.48, 149.59, 135.94, 135.61, 134.94, 133.86, 133.82, 131.39, 129.79, 128.72, 128.58, 128.52, 128.39, 128.31, 128.00, 127.76, 126.12, 123.34, 82.93, 75.49,

73.16, 72.06, 57.11, 51.17, 28.01; HRMS (ESI):  $m/z$  calcd for  $C_{37}H_{41}N_4O_{11}S$   $[M+H]^+$ : 749.2489; found: 749.2487.

***tert*-Butyl 6, 10, 14-tribenzyl-2-((2-nitrophenyl)sulfonyl)-5, 9, 13-trioxo-1-phenyl-3, 7, 11, 15-tetraoxa-2, 6, 10, 14-tetraazaheptadecan-17-oate (42).** Compound **42** was prepared from **35** (0.287 g, 1.21 mmol) and **41** (1 g, 1.45 mmol) according to general procedure D. Flash column chromatography on silica gel using hexane:ethyl acetate as eluent (gradient) afforded **42** (0.383 g, 0.42 mmol, 35% yield) as white solid; m.p. 58 – 59°C;  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 8.33 – 8.31 (m, 1H, *NsH*) 7.70 – 7.64 (m, 2H, *NsH*), 7.49 – 7.47 (m, 1H, *NsH*), 7.31 – 7.16 (m, 20H, 4 x  $C_6H_5$ ), 4.75 (s, 2H,  $OCH_2$ ), 4.74 (s, 2H,  $NCH_2$ ), 4.69 (s, 2H,  $OCH_2$ ), 4.68 (s, 2H,  $NCH_2$ ), 4.62 (bs, 2H,  $NCH_2$ ), 4.59 (s, 2H,  $OCH_2$ ), 4.33 (bs, 2H,  $NCH_2$ ), 3.88 (s, 2H,  $OCH_2$ ), 1.35 (s, 9H, *t*Bu);  $^{13}C$  NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 170.33, 170.14, 169.77, 167.01, 149.95, 136.41, 136.30, 136.00, 135.33, 134.33, 134.19, 131.81, 130.20, 129.16, 129.10, 129.00, 128.93, 128.90, 128.79, 128.73, 128.45, 128.31, 128.10, 126.55, 123.71, 83.37, 75.94, 73.46, 72.51, 72.16, 57.46, 51.47, 51.14, 28.42; elemental analysis calcd (%) for  $C_{46}H_{49}N_5O_{13}S$ : C 60.58, H 5.42, N 7.68; found: C 60.34, H 5.51, N 7.40.

***N*-benzyl-2-(((*N*-benzyl-2-nitrophenyl)sulfonamido)oxy)-*N*-(2-oxo-2-(piperidin-1-yl)ethoxy)acetamide (43).** Compound **43** was prepared from **40** (1.25 g, 2.14 mmol) according to general procedure B. Flash column chromatography on silica gel using hexane:ethyl acetate as eluent (gradient) afforded **43** (0.98 g, 1.64 mmol, 77% yield) as white foam;  $^1H$  NMR (600 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 8.34 (dd,  $J$  = 7.8, 1.6 Hz, 1H, *NsH*), 7.83 – 7.73 (m, 2H, *NsH*), 7.59 (dd,  $J$  = 7.8, 1.4 Hz, 1H, *NsH*), 7.42 – 7.25 (m, 10H, 2 x  $C_6H_5$ ), 4.80 (s, 2H,  $NCH_2$ ), 4.59 (s, 2H,  $OCH_2$ ), 4.40 (s, 2H,  $OCH_2$ ), 4.25 (s, 2H,  $NCH_2$ ), 3.50 – 3.41 (m, 2H,  $NCH_2(CH_2)_3CH_2$ ), 3.02 (s, 2H,  $NCH_2(CH_2)_3CH_2$ ), 1.60 – 1.54 (m, 2H,  $NCH_2(CH_2)_3CH_2$ ),

1.53 – 1.45 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 1.41 – 1.32 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 164.19, 149.65, 135.63, 135.04, 133.78, 133.63, 131.40, 129.85, 128.61, 128.58, 128.46, 128.36, 127.82, 126.00, 123.44, 75.18, 73.86, 57.17, 50.87, 45.91, 42.83, 26.11, 25.26, 24.24; HRMS (ESI): *m/z* calcd for C<sub>29</sub>H<sub>33</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>S [M+H]<sup>+</sup>: 597.2016; found: 597.2014.

***N*-benzyl-*N*-(2-benzyl(2-oxo-2-(piperidin-1-yl)ethoxy)amino)-2-oxoethoxy)-2-(((*N*-benzyl-2-nitrophenyl)sulfonamido)oxy)acetamide (44).** Compound **44** was prepared from **41** (0.17 g, 0.23 mmol) according to general procedure B. Flash column chromatography on silica gel using hexane:ethyl acetate as eluent (gradient) afforded **44** (0.128 g, 0.17 mmol, 74% yield) as colourless oil; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.37 (dd, *J* = 7.8, 1.5 Hz, 1H, NsH), 7.78 (td, *J* = 7.7, 1.6 Hz, 1H, NsH), 7.75 (td, *J* = 7.7, 1.4 Hz, 1H, NsH), 7.57 (dd, *J* = 7.7, 1.4 Hz, 1H, NsH), 7.38 – 7.25 (m, 15H, 3x C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 4.82 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>), 4.81 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>), 4.67 (bs, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.63 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.40 (bs, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.18 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>), 3.46 – 3.44 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 2.98 – 2.91 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 1.58 – 1.31 (m, 6H, NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 171.02, 164.31, 149.77, 136.08, 135.85, 135.14, 133.83, 131.56, 129.92, 128.82, 128.76, 128.70, 128.67, 128.51, 128.09, 127.86, 126.20, 123.52, 75.59, 73.44, 73.35, 57.29, 51.29, 45.80, 42.90, 26.20, 25.39, 24.34; HRMS (ESI): *m/z* calcd for C<sub>38</sub>H<sub>42</sub>N<sub>5</sub>O<sub>10</sub>S [M+H]<sup>+</sup>: 760.2648; found: 760.2647.

***N*-benzyl-*N*-(2-(benzyl(2-oxo-2-(piperidin-1-yl)ethoxy)amino)-2-oxoethoxy)-2-(((*N*-benzyl-2-nitrophenyl)sulfonamido)oxy)acetamido)oxy)-acetamide (45).** Compound **45** was prepared from **42** (0.233 g, 0.26 mmol) according to general procedure B. Flash column chromatography on silica gel using hexane:ethyl acetate as eluent (gradient) afforded **45** (0.2 g, 0.22 mmol, 62% yield) as white foam; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.31 (dd, *J* = 7.6, 1.5 Hz, 1H, NsH), 7.71 – 7.64 (m, 2H, NsH), 7.49 (dd, *J* = 7.6, 1.4 Hz, 1H,

NsH), 7.31 – 7.18 (m, 20H, 4 x C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 4.76 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.74 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>), 4.72 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.70 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>), 4.62 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>), 4.62 (bs, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.32 (bs, 2H, NCH<sub>2</sub>), 4.04 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>), 3.38 – 3.36 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 2.88 – 2.80 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 1.52 – 1.23 (m, 6H, NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 170.55, 163.09, 148.50, 135.05, 134.82, 134.69, 133.93, 132.84, 132.69, 130.41, 128.74, 127.69, 127.62, 127.59, 127.50, 127.47, 127.42, 127.33, 126.97, 126.74, 126.69, 125.08, 122.29, 74.52, 72.07, 71.69, 71.20, 56.04, 44.61, 41.76, 25.04, 24.21, 23.16; HRMS (ESI): *m/z* calcd for C<sub>47</sub>H<sub>51</sub>N<sub>6</sub>O<sub>12</sub>S [M+H]<sup>+</sup>: 923.3283; found: 923.3280.

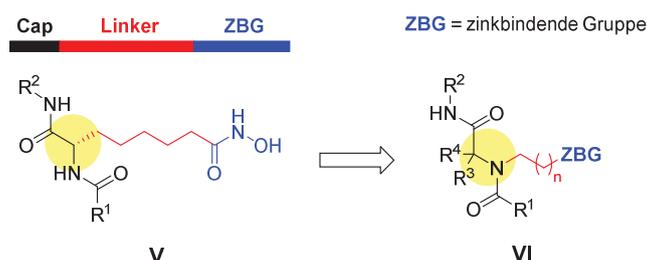
## 5. References

- [1] A. L. van Geet, *Anal. Chem.* **1970**, *42*, 679 – 680.
- [2] G. Schäfer, J. W. Bode, *Angewandte Chemie – International Edition* **2011**, *50*, 10913 – 10916.
- [3] B. L. K. Mangoldt, P. E. Hanna, *J. Med. Chem.* **1982**, *25*, 630 – 638.
- [4] H. Seguin, D. Gardette, M.-F. Moreau, J.-C. Madelmont, J.-C. Gramain, *Synthetic Communications* **1998**, *28*, 4257 – 4272.
- [5] I. Shin, K. Park, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 869 – 872.
- [6] L. Campbell-Verduyn, P. H. Elsinga, L. Mirfeizi, R. A. Dierckx, B. L. Feringa, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 3461 – 3463.

## 6. Zusammenfassung

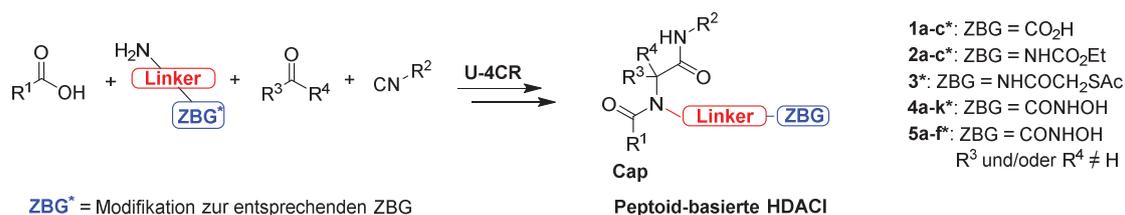
In der vorliegenden Dissertation wird die Synthese, Konformationsanalyse und biologische Evaluation neuartiger antitumoraktiver Peptoid-Derivate behandelt.

Inhibitoren von Histondeacetylasen (HDACI) repräsentieren dabei vielversprechende Kandidaten zur Therapie diverser Tumorerkrankungen. Das erste Projekt dieser Arbeit entstand in Anlehnung an eine Arbeit von Fairlie und Mitarbeitern zu den peptid-basierten HDAC-Inhibitoren (V).[83] Durch gezielte Strukturmodifikationen wurden aus den peptid-basierten HDACI (V) eine neuartige Klasse peptoid-basierter HDACI vom Typ VI mit verschiedenen zinkbindenden Gruppen entwickelt (Abbildung 62). Dies geschah durch ein Verschieben der Seitenkette vom  $\alpha$ -Kohlenstoff auf den Amidstickstoff. Die peptoid-basierten HDACI (VI) bieten potentielle Vorteile hinsichtlich einer chemisch weniger aufwendigen Synthese, der großen Varianz an möglichen Cap-Gruppen sowie Linkern und einer erhöhten Proteolysestabilität.



**Abbildung 62.** Peptid- und peptoid-basierte HDAC-Inhibitoren V und VI.

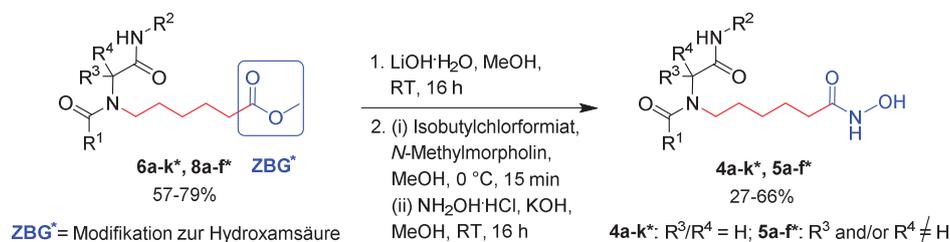
Die Synthese der peptoid-basierten HDACI erfolgte mittels der Ugi-4-Komponenten Reaktion (U-4CR, Abbildung 63). Bei der U-4CR handelt es sich um eine Mehrkomponentenreaktion, bestehend aus einer Carbonsäure, einem Amin, einer Carbonylkomponente und einem Isocyanid. Aus der U-4CR resultierten die Vorstufen der peptoid-basierten HDACI. Nach anschließenden Modifikationen der Vorstufen zu den entsprechenden zinkbindenden Gruppen wurden die peptoid-basierten HDACI **1-5\*** erhalten (Abbildung 63).



**Abbildung 63.** Synthese der peptoid-basierten HDACI mittels der U-4CR.

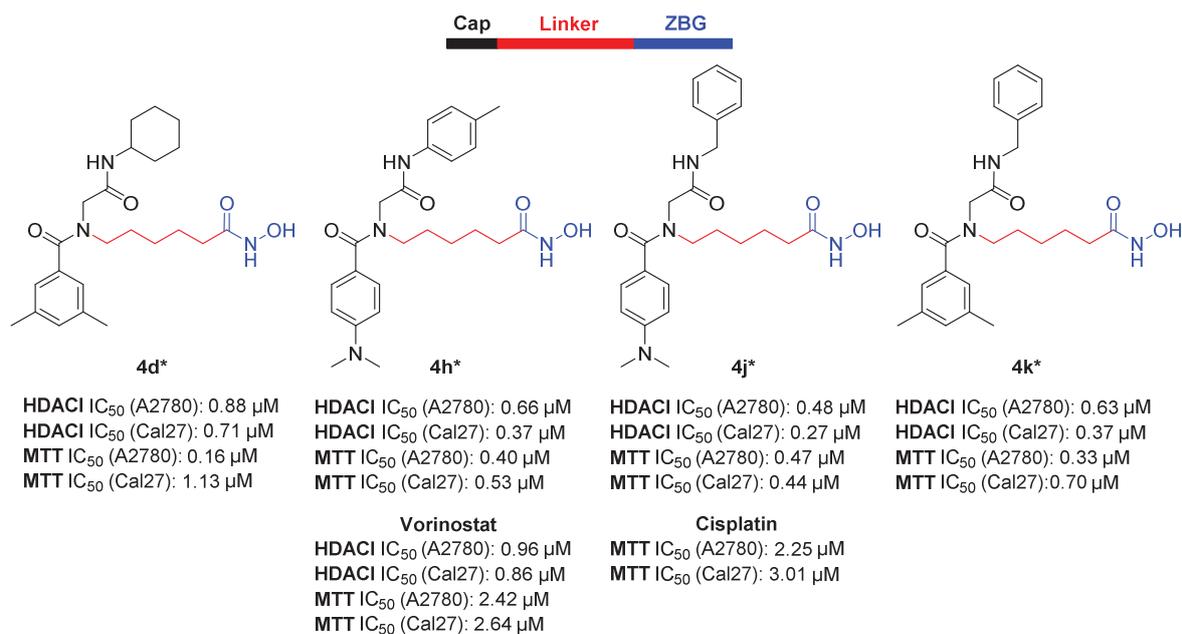
Die Prototypen, von allen in diesem Projekt synthetisierten zinkbindenden Gruppen, wurden anschließend im Arbeitskreis *Kassack* (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie) hinsichtlich ihrer Zytotoxizität und HDAC-Inhibition im MTT- und zellulären HDAC-Assay untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass der Vertreter der peptoid-basierten Hydroxamsäuren die höchste Zytotoxizität und HDAC-Inhibition aufwies, weshalb der Fokus auf die Synthese weiterer peptoid-basierter Hydroxamsäuren gelegt wurde. Durch die gezielte Variation der Cap in den Positionen R<sup>1</sup>-R<sup>4</sup> sollten Verbindungen mit einer verbesserten HDAC-Aktivität synthetisiert werden (Abbildung 63).

Die Synthese der peptoid-basierten Hydroxamsäuren **4a-k\*** und **5a-f\*** erfolgte ausgehend von den Vorstufen **6a-k\*** (**4a-k\***) und **8a-f\*** (**5a-f\***), welche mittels der U-4CR hergestellt wurden (Abbildung 63). Nach einer basischen Hydrolyse der Vorstufen **6a-k\*** und **8a-f\*** mit Lithiumhydroxid Monohydrat resultierten die entsprechenden Carbonsäuren. Durch die Aktivierung der Carbonsäuren mit Isobutylchlorformiat und *N*-Methylmorpholin entstanden die entsprechenden gemischten Anhydride. Anschließend konnten nach einer Umsetzung mit Hydroxylamin die peptoid-basierten Hydroxamsäuren **4a-k\*** und **5a-f\*** in Ausbeuten von 27 – 66% erhalten werden (Schema 17).



**Schema 17.** Synthese der peptoid-basierten Hydroxamsäuren **4a-k\*** und **5a-f\***.

Im Anschluss an die Synthese der peptoid-basierten Hydroxamsäuren **4a-k\*** und **5a-f\*** erfolgte die Untersuchung der Zytotoxizität und HDAC-Inhibition im MTT- und zellulären HDAC-Assay. Hierbei konnten die Verbindungen **4d\***, **h\***, **j\*** und **k\*** als die vielversprechendsten HDACI mit IC<sub>50</sub>-Werten im nanomolaren Bereich identifiziert werden (Abbildung 64).



**Abbildung 64.** HDAC-Inhibition und Zytotoxizität der vielversprechendsten peptoid-basierten Hydroxamsäuren.

Im Arbeitskreis *Jung* (Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Institut für Pharmazeutische Wissenschaften) und Arbeitskreis *Dekker* (Reichsuniversität Groningen, Institut für Chemische und Pharmazeutische Biologie) wurden tieferegehende biologische Untersuchungen im HDAC Enzym-Assay an den rekombinanten HDAC-Isoformen 1-3, 6 und 8 durchgeführt. Dabei ließ sich in den Fällen von **4d\***, **j\*** und **k\*** eine moderate Präferenz für die Inhibition von HDAC1 über HDAC6 feststellen (Tabelle 7).

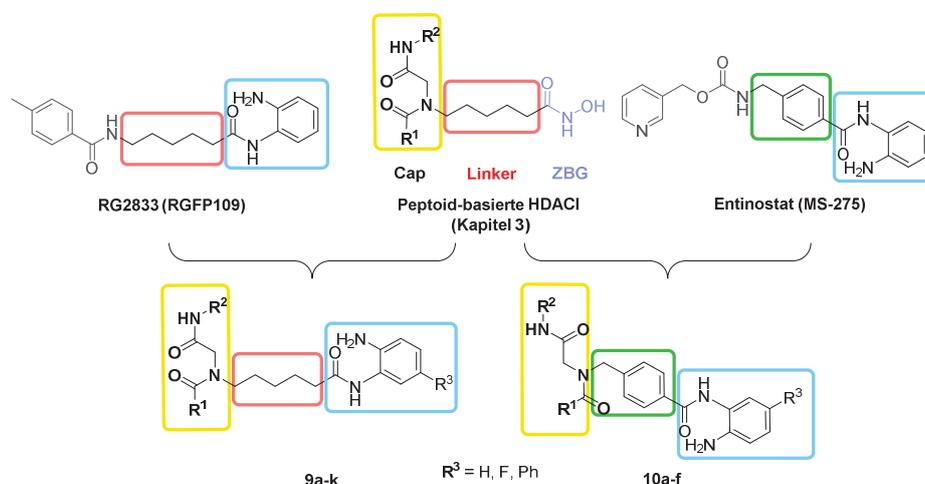
**Tabelle 7.** Hemmung der HDAC-Inhibition durch die Verbindungen **4d\***, **h\***, **j\*** und **k\*** an den rekombinanten HDAC-Isoformen 1-3, 6 und 8.

Verbindung	IC <sub>50</sub> [nM]				
	HDAC1	HDAC2	HDAC3	HDAC6	HDAC8
<b>4d*</b>	27.4±4.6	84±3.5	60±3.0	214±23.4	7400±2970
<b>4h*</b>	96.4±19.7	146±6.2	16±0.8	106±14.2	6760±1050
<b>4j*</b>	25.0±9.2	66±2.4	6.5±0.6	281±36.8	2750±220
<b>4k*</b>	24.7±7.1	61±3.1	26±1.9	135±12.7	7330±770
<b>Vorinostat</b>	45±8	200±5	13±1	108±11	1260±210

Für Verbindung **4j\*** konnte im Hyperacetylierungs-Assay zudem eine erhöhte Acetylierung der natürlichen HDAC-Substrate,  $\alpha$ -Tubulin und Histon H3, beobachtet werden. Ferner wurde in Kombinationsstudien mit Cisplatin eine Sensitivierung der Cisplatin-resistenten Zelllinie Cal27CisR gegenüber Cisplatin erzielt.

Zusätzlich zu den biologischen Untersuchungen ließen sich im Falle der peptoid-basierten HDACI zwei Sets an NMR-Signalen mittels Kernresonanzspektroskopie feststellen. Nähere Untersuchungen dieses Phänomens erfolgten anschließend mittels variabler Temperatur (VT-) NMRs im Tief- und Hochtemperaturbereich. Hierdurch wurde festgestellt, dass die peptoid-basierten HDACI in nahezu gleichen Anteilen als *cis*- und *trans*-Rotamere vorliegen. Durch eine Kooperation mit dem Arbeitskreis *Gohlke* (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie) konnten im Rahmen von Dockingstudien die Bindungsmodi der zwei potentesten Verbindungen **4j\*** und **4k\*** in HDAC1 und 6 untersucht werden. Im Falle des *cis*-Rotamers beider Verbindungen wurde eine bevorzugte Bindung in HDAC1 beobachtet, wohingegen das *trans*-Rotamer der Verbindung **4j\*** eine höhere Affinität zu HDAC6 aufwies. Im Falle der Verbindung **4k\*** konnte keine bevorzugte Konformation für die Bindung von HDAC6 ermittelt werden.

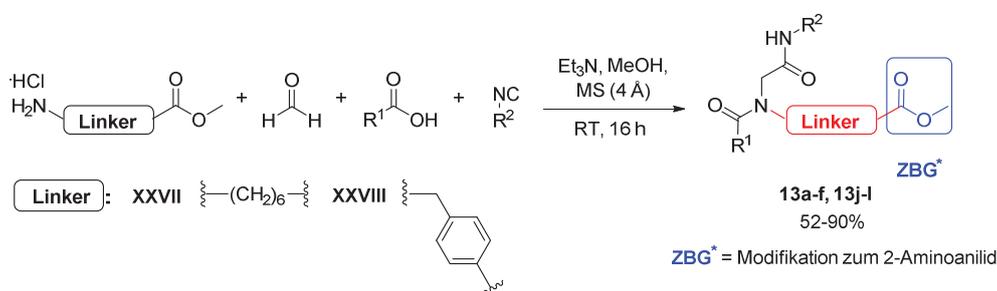
Zusammenfassend ließ sich in diesem Projekt die peptoid-basierte Hydroxamsäure **4j\*** als der vielversprechendste Vertreter dieser neuen HDACI Klasse mit einer moderaten Präferenz für HDAC1 über HDAC6 identifizieren. Da sich, aufgrund der vielfältigen Nebenwirkungen von unselektiven HDACI, der Trend aktuell in Richtung selektiver HDACI entwickelt, sollten im zweiten Projekt dieser Arbeit peptoid-basierte 2-Aminoanilide entwickelt werden. 2-Aminoanilide werden in der Literatur als selektive Verbindungen für HDACs der Klasse I beschrieben. Hierzu erfolgte die Hybridisierung der Struktur der peptoid-basierten HDACI (Kapitel 3) jeweils mit RG2833 (RGFP109) und Entinostat (MS-275) mit dem Ziel, eine höhere Selektivität für HDAC1 über HDAC6 zu erreichen (Abbildung 65).



**Abbildung 65.** Hybridisierung der peptoid-basierten HDACI (Kapitel 3) mit RG2833 und Entinostat.

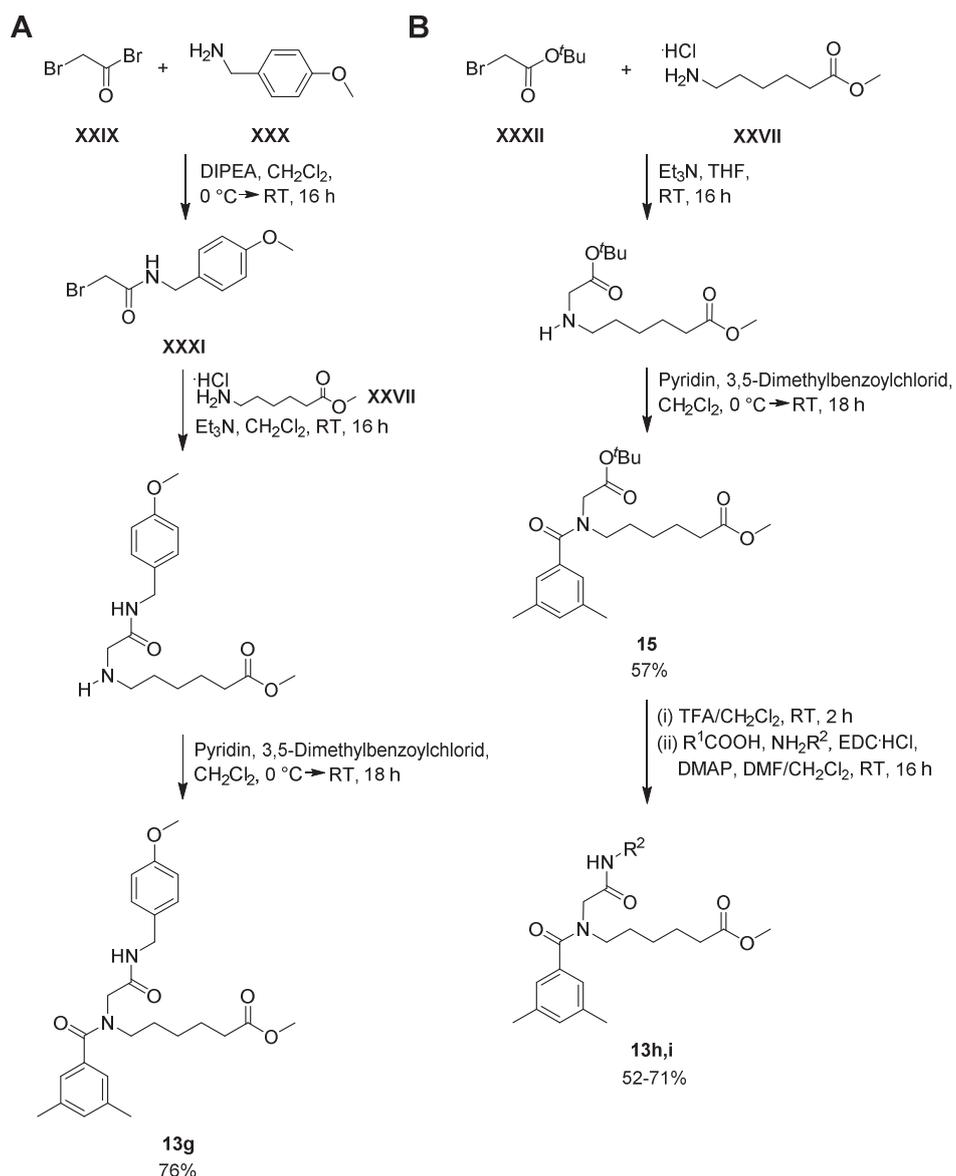
RG2833 (RGFP109) befindet sich derzeit in einer Phase I Studie zur Therapie der Friedreich-Ataxie, wohingegen Entinostat (MS-275) unter anderem in einer Phase III Studie zur Therapie des Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinoms in der Kombination mit dem Aromatasehemmer Exemestan untersucht wird. Die zusätzliche Substitution in Position R<sup>3</sup> sollte dabei in einer verbesserten HDAC1/2 Inhibition resultieren.

Die Synthese der peptoid-basierten 2-Aminoanilide **9a-k** und **10a-f** erfolgte dabei auf drei unterschiedlichen Wegen. Die Zwischenstufen **13a-f** und **13j-l** konnten mittels der Ugi-4-Komponenten Reaktion (U-4CR, Weg I) in Ausbeuten von 52 – 90% synthetisiert werden (Schema 18).



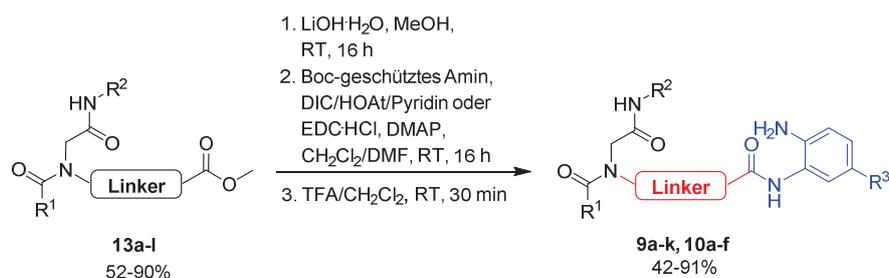
**Schema 18.** Synthese der Zwischenstufen **13a-f** und **13j-l** mittels U-4CR (I).

Die Zwischenstufen **13g** und **13h,i** wurden mittels der Submonomermethode II (**13g**) und III (**13h,i**) synthetisiert. Die Submonomermethode III ließ sich mittels geringfügiger Modifikationen aus der Submonomermethode II entwickeln (Schema 19). Durch nukleophile Substitutions- und Acylierungsreaktionen mit den entsprechenden Aminen und 3,5-Dimethylbenzoylchlorid entstanden die Methylester **13g** und **13h,i** (Schema 19).



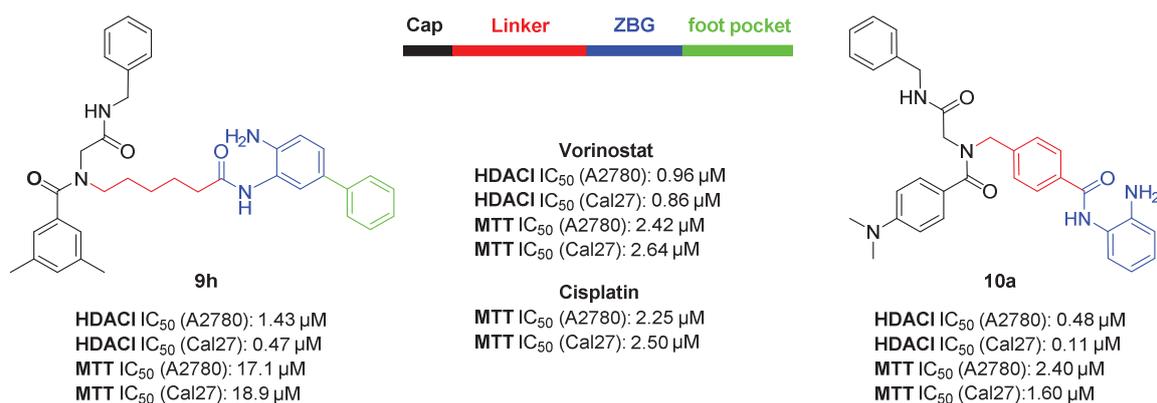
**Schema 19.** Synthese der Zwischenstufen **13g** und **13h,i** mittels der Submonomermethode II (A) und III (B).

Nach einer basischen Hydrolyse der Zwischenstufen **13a-i** mit Lithiumhydroxid Monohydrat, folgte in mehreren Amidkupplungsreaktionen die Umsetzung der entstandenen Carbonsäuren mit den entsprechenden Boc-geschützten 1,2-Phenylendiaminderivaten. Aus der anschließenden säurekatalysierten Boc-Entschützung mit Trifluoressigsäure in Dichlormethan resultierten die peptoid-basierten 2-Aminoanilide **9a-k** und **10a-f** in Ausbeuten von 42 – 91% (Schema 20).



**Schema 20.** Synthese der peptoid-basierten 2-Aminoanilide **9a-k** und **10a-f**.

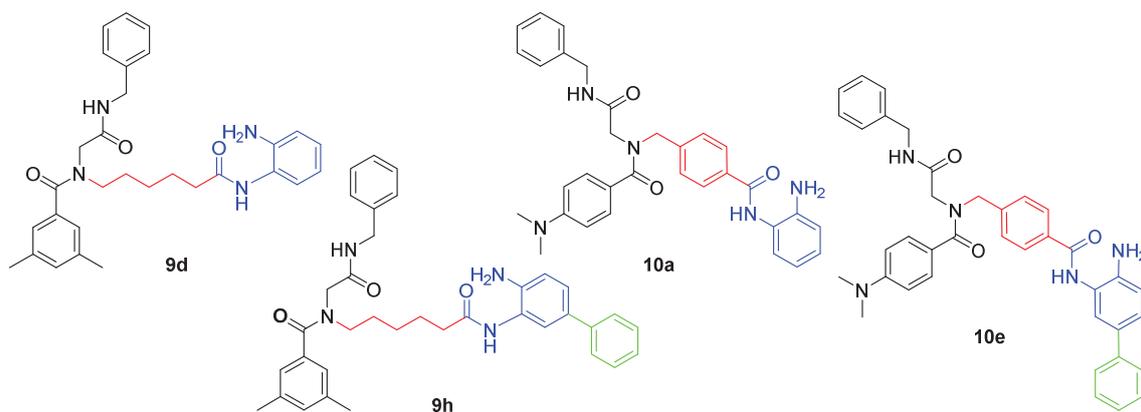
Die Verbindungen **9a-k** und **10a-f** wurden anschließend auf ihre Zytotoxizität im MTT-Assay und HDAC-Inhibition im Ganzzell-Assay untersucht. Dabei wiesen die benzyl-substituierten 2-Aminoanilide **10a-f** im Vergleich zu den alkyl-substituierten 2-Aminoaniliden **9a-k** höhere Zytotoxizitäten auf. Hinsichtlich der HDAC-Inhibition konnten die peptoid-basierten 2-Aminoanilide **9h** und **10a** als die aktivsten Vertreter mit IC<sub>50</sub>-Werten im mikro- bis nanomolaren Bereich identifiziert werden (Abbildung 66).



**Abbildung 66.** HDAC-Inhibition und Zytotoxizität der vielversprechendsten peptoid-basierten 2-Aminoanilide **9h** und **10a**.

Alle synthetisierten HDACI wurden im HDAC Enzym-Assay hinsichtlich der Inhibition von HDAC1 und HDAC6 untersucht. Die Hit-Verbindungen **9h** und **10a** zeigten mit Selektivitätsindices (SI HDAC1/6) von >170 (**9h**) und >260 (**10a**) eine potente und selektive Inhibition von HDAC1 im Vergleich zu HDAC6. Weiterhin konnte durch die Phenylsubstitution in Position R<sup>3</sup> im Falle von **9h** eine 20fach stärkere HDAC1 Inhibition erzielt werden (**9d** (R<sup>3</sup> = H): IC<sub>50</sub> = 1157 nM, **9h** (R<sup>3</sup> = Ph): IC<sub>50</sub> = 57 nM, Tabelle 8), wohingegen bei den benzyl-substituierten 2-Aminoaniliden keine Verbesserung der HDAC1 Inhibition durch eine zusätzliche Phenylsubstitution zu beobachten war (**10a** (R<sup>3</sup> = H): IC<sub>50</sub> = 38 nM, **10e** (R<sup>3</sup> = Ph): IC<sub>50</sub> = 39 nM).

**Tabelle 8.** Hemmung der HDAC-Inhibition durch die Verbindungen **9d**, **h** und **10a**, **e** an den rekombinanten HDAC-Isoformen 1 und 6.



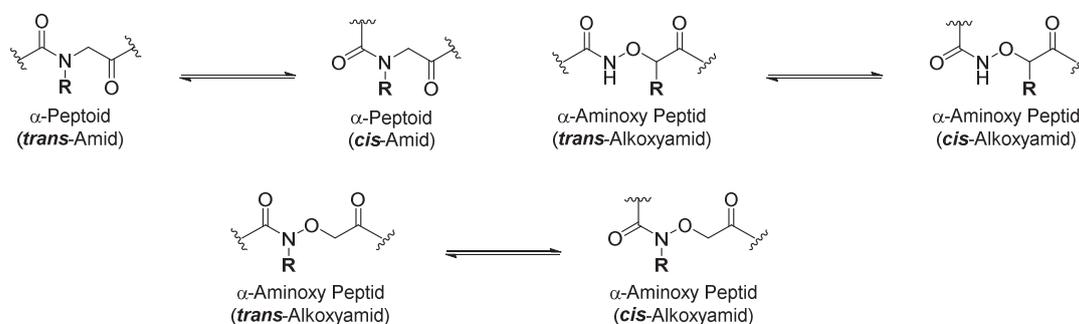
Verbindung	IC <sub>50</sub> [nM]		SI 1/6 <sup>a</sup>
	HDAC1	HDAC6	
<b>9d</b>	1157±206	>10000	>9
<b>9h</b>	57±5	>10000	>175
<b>10a</b>	38±12	>10000	>263
<b>10e</b>	39±11	>10000	>256
<b>Vorinostat</b>	111±15	102±9	1

<sup>a</sup>SI 1/6: Selektivitätsindex für HDAC1 über HDAC6 (SI 1/6 = IC<sub>50</sub> (HDAC6)/IC<sub>50</sub> (HDAC1)).

Wie zuvor bereits bei den peptoid-basierten Hydroxamsäuren (Kapitel 3) beschrieben, wurden in den NMR-Spektren der peptoid-basierten 2-Aminoanilide ebenfalls zwei Sets an NMR-Signalen festgestellt und im Tief- und Hochtemperaturbereich als *cis*- und *trans*-Rotamere identifiziert. Derzeit werden im Arbeitskreis *Gohlke* die Bindungsmodi der vielversprechendsten Verbindungen **9h** und **10a** analysiert sowie im Arbeitskreis *Kassack* mit beiden Substanzen tiefergehende biologische Untersuchungen durchgeführt.

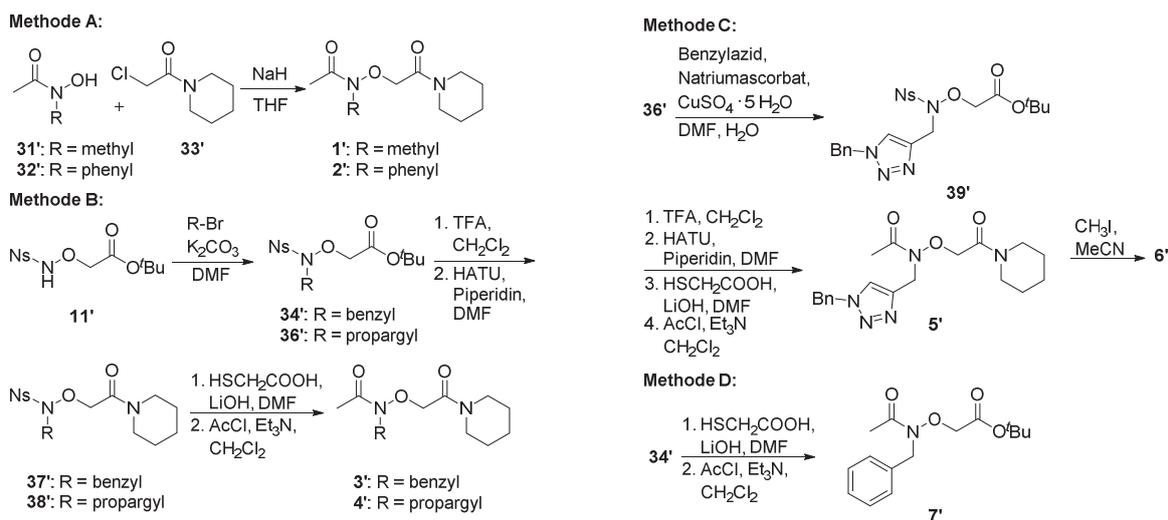
Neben den bereits erwähnten vielfältigen Vorteilen sind die  $\alpha$ -Peptide durch das Phänomen einer flexiblen Amidgeometrie geprägt. Zusätzlich konnte im Falle der  $\alpha$ -Peptide durch verschiedene Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass die Seitenkette einen starken Einfluss auf die Konformation ausübt (Abbildung 67). Diese Einschränkung spielt nicht nur in der Anwendung als Cap bei den peptoid-basierten HDACi (siehe Kapitel 3 und 4), sondern auch in der Anwendung von Peptoid-Oligomeren als  $\alpha$ -Helixmimetika eine wichtige Rolle. So kann sich eine hohe Flexibilität, beispielsweise in der Inhibition von Protein-Protein-Interaktionen, nachteilig auf die Bindungsaffinität zu einem biologischen Target auswirken. Daher wäre ein modifiziertes Peptoid-Rückgrat mit einer rigideren Amidgeometrie von

Vorteil. Mit dem Ziel ein verbessertes Peptoid-Rückgrat zu identifizieren, wurde im dritten Projekt dieser Arbeit die Klasse der  $\alpha$ -Aminoxy-Peptoide hinsichtlich der vorliegenden Amidgeometrie und Sekundärstruktur untersucht.  $\alpha$ -Aminoxy-Peptoide entstehen aus  $\alpha$ -Aminoxy-Peptiden durch ein Verschieben der Seitenkette vom  $\alpha$ -Kohlenstoff auf den Alkoxyamidstickstoff (Abbildung 67). Die  $\alpha$ -Aminoxy-Peptide erfahren durch Wasserstoffbrücken eine Konformations-stabilisierung, welches zu einer Ausbildung einer  $2_8$ -Helix mit *trans*-Amidbindungen führt.[67] Im Gegensatz dazu weisen  $\alpha$ -Aminoxy-Peptoide keine Amidprotonen auf, weshalb eine Stabilisierung der Konformation durch Wasserstoffbrücken nicht möglich ist. Abstoßungseffekte der beiden Sauerstoffatome der Alkoxyamidbindung könnten jedoch zu einer *cis*-Präferenz führen und somit im Vergleich zu anderen Peptoiden in einem rigideren Rückgrat resultieren.



**Abbildung 67.** *Cis/trans*-Rotamere bei  $\alpha$ -Peptoiden,  $\alpha$ -Aminoxy-Peptiden und  $\alpha$ -Aminoxy-Peptoiden.

Um diese Arbeitshypothesen zu überprüfen, wurden im dritten Projekt dieser Arbeit Modellsubstanzen der  $\alpha$ -Aminoxy Peptoide mit verschiedenen Seitenketten hergestellt. Durch klassische Alkylierungen mit Alkylhalogeniden und dem Einsatz einer Base oder via Mitsunobu Reaktionen und entsprechende Modifikationen der Termini resultierten gemäß Schema 21 die Monomere **1'-7'**.



**Schema 21.** Synthese der Monomere **1'-7'** (modifiziert aus Krieger, V. et al. [113]).

Anschließend erfolgte eine detaillierte Untersuchung aller Monomere mittels NMR-Spektroskopie hinsichtlich der Amidgeometrie. Anhand diverser VT-NMR Experimente im Tieftemperaturbereich konnte die Anwesenheit von zwei Konformeren detektiert und als *cis*- und *trans*-Rotamere identifiziert werden. Dabei stellte in allen Monomeren das *cis*-Konformer das Hauptkonformer dar. Durch eine Kooperation mit dem Arbeitskreis *Janiak* (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Institut für Anorganische Chemie und Strukturchemie) wurde die *cis*-Amid Konformation zusätzlich anhand einer Kristallstruktur eines Monomers bestätigt.

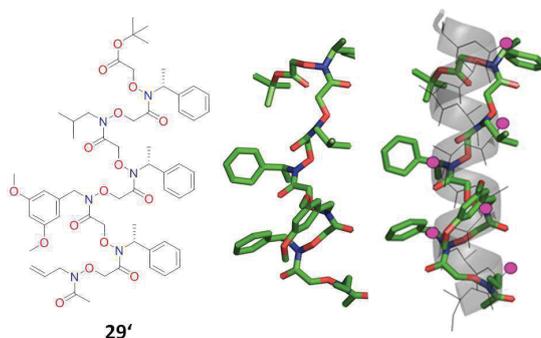
Im Anschluss daran wurden Oligomere der  $\alpha$ -Aminoxy-Peptide durch Amidkupplungen der entsprechenden Monomere und Modifikationen der Termini synthetisiert. Die Untersuchung der bevorzugten Amidgeometrie und Sekundärstruktur der oligomeren  $\alpha$ -Aminoxy-Peptide erfolgte mittels CD<sup>42</sup>- und NMR<sup>43</sup>-Spektroskopie, NBO-Analyse<sup>44</sup> und molekulardynamischen (MD-) Simulationen. Mittels CD-Spektroskopie konnten keine eindeutigen Informationen zum Faltungsverhalten der oligomeren  $\alpha$ -Aminoxy-Peptide generiert werden. Jedoch ließ sich im 2D-NOESY-Spektrum eines Tetramers die *cis*-Amid Konformation der *N*- und *C*-terminalen Amide nachweisen. Dies wurde ebenfalls durch eine Röntgenstrukturanalyse

<sup>42</sup> Die **CD (Circulardichroismus)-Spektroskopie** dient der Aufklärung der Sekundärstruktur von Verbindungen.

<sup>43</sup> Die **NMR (nuclear magnetic resonance)-Spektroskopie** dient der Untersuchung der elektronischen Umgebung einzelner Atome sowie der Wechselwirkungen mit benachbarten Atomen.

<sup>44</sup> Bei der **NBO (natural bond orbital)-Analyse** handelt es sich um die Methode der natürlichen Bindungorbitale, in der die Elektronendichte analysiert wird.

eines Trimers bestätigt. Die präferierte *cis*-Amidgeometrie könnte hierbei durch die Ausbildung eines achtegliedrigen  $\delta$  Turns, stabilisiert durch  $C_{\alpha,i}-H \cdots O=C_{i+1}$  Interaktionen zwischen den Resten  $i \rightarrow i+1$ , begründet sein. MD-Simulationen zeigten weiterhin, dass die Seitenketten des Hexamers **29'** die Orientierung verschiedener Seitenketten einer kanonischen  $\alpha$ -Helix nachahmen können (Abbildung 68).



**Abbildung 68.** Faltungsverhalten gemäß MD-Simulationen und Orientierung der Seitenketten des  $\alpha$ -Aminoxy Peptoid Hexamers **29'** im Vergleich zu einer kanonischen  $\alpha$ -Helix (modifiziert aus Krieger, V. et al.[113]).

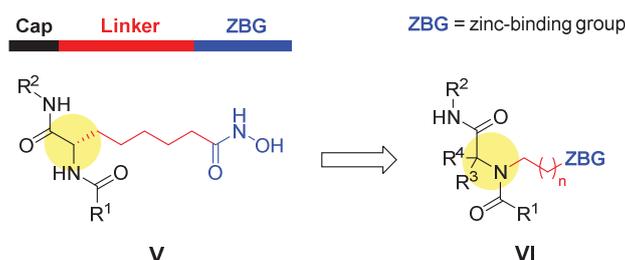
Insgesamt stellen die  $\alpha$ -Aminoxy Peptoide, aufgrund der einfachen Synthese, der potentiellen Diversität und der hohen Präferenz für *cis*-Amidbindungen im Vergleich zu anderen Peptoid-Derivaten, somit eine neue und vielversprechende Klasse peptidomimetischer Foldamere dar.

Zusammenfassend konnten in dieser Dissertation neuartige Erkenntnisse zur Konformation und zu Anwendungsmöglichkeiten von Peptoiden gewonnen werden. Zum einen wurden präferentielle (Kapitel 3) sowie selektive (Kapitel 4) Inhibitoren der HDAC-Klasse I mit peptoid-basierter Cap entwickelt. Zum anderen konnte in Form der  $\alpha$ -Aminoxy Peptoide ein neues Peptoid-Rückgrat mit einer verbesserten Rigidität identifiziert werden, welches die Möglichkeit bietet, die Amidgeometrie zu kontrollieren ohne das Potenzial der Seitenketten-Diversität zu verlieren (Kapitel 5).

## 7. Summary

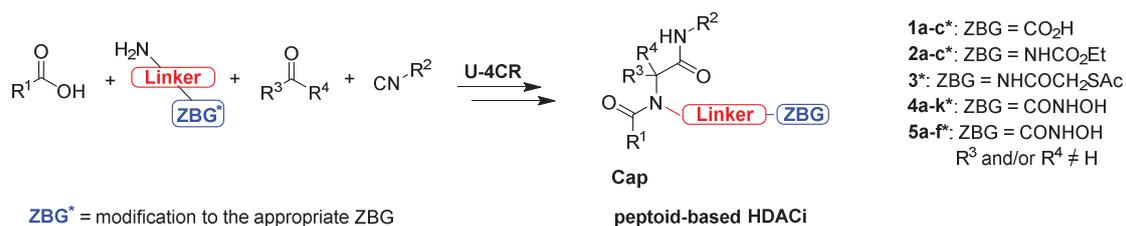
The present work deals with the synthesis, conformational analysis and biological evaluation of novel antitumor active peptoid derivatives.

Thereby, histone deacetylase inhibitors (HDACi) represent promising candidates for the therapy of various cancer types. The first project of this work was inspired by the peptide-based HDAC inhibitors (**V**) which were reported in 2006 by Fairlie and coworkers.[83] A novel class of peptoid-based HDACi of type **VI** with different zinc-binding groups was developed by performing systematic structural modifications of the peptide-based HDACi (**V**) (Figure 1). This was realized through a side chain shift from the  $\alpha$ -carbon to the amide nitrogen. The peptoid-based HDACi (**VI**) offer potential advantages with regard to a less complex synthesis, a great variety of possible cap groups, as well as linkers and an increased stability against proteolysis.



**Figure 1.** Peptide- und peptoid-based HDAC inhibitors **V** and **VI**.

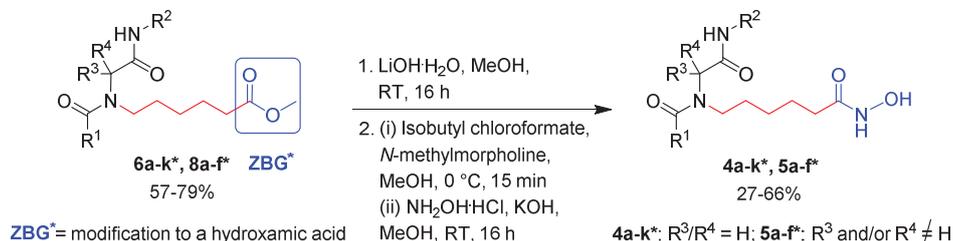
The synthesis of the peptoid-based HDACi of type **VI** was carried out via the Ugi-4-component reaction (U-4CR). The U-4CR is a multicomponent reaction consisting of a carboxylic acid, an amine, a carbonyl component, and an isocyanide. The intermediates of the peptoid-based HDACi were synthesized using the U-4CR. The introduction of different ZBGs was achieved by performing suitable post-Ugi transformations or by utilizing appropriately modified amine components to obtain the peptoid-based HDACi **1-5\*** (Figure 2).



**Figure 2.** Synthesis of the peptoid-based HDACi via Ugi-4CR.

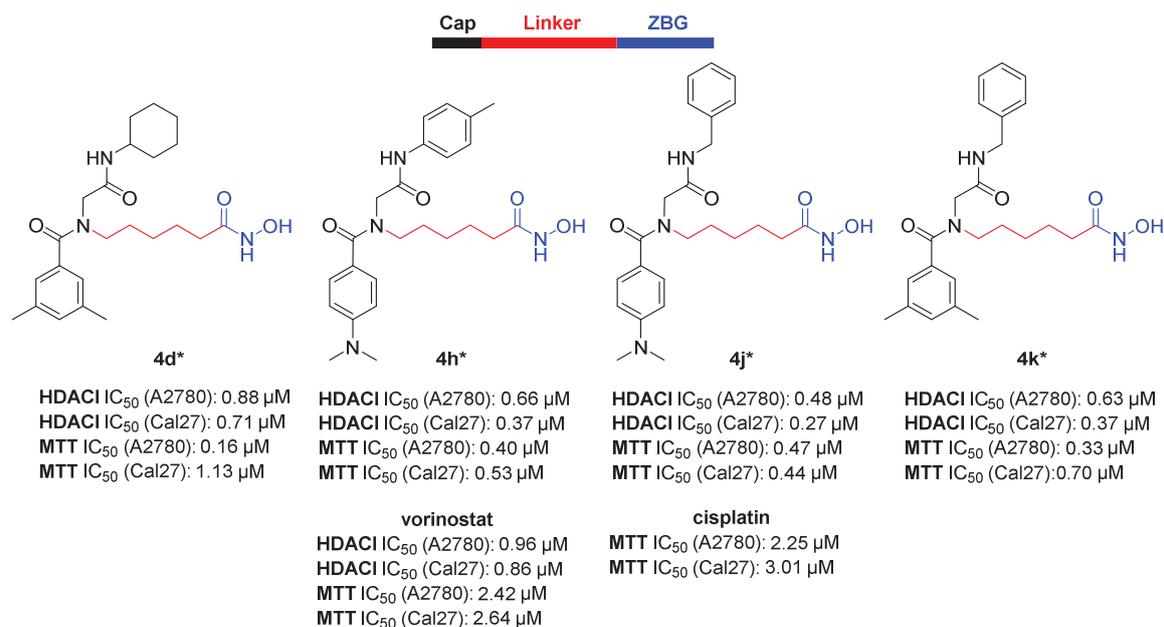
Prototypes of all in the first project of this work synthesized zinc-binding groups were biologically evaluated in the *Kassack lab* (Heinrich-Heine-University Düsseldorf, Institute for Pharmaceutical and Medical Chemistry) with regard to their cytotoxicity and HDAC inhibition in an MTT and a cellular HDAC assay. The screening revealed the highest cytotoxicity and HDAC inhibition values in the case of the representative of the peptoid-based hydroxamic acids. Thus, the synthesis was focused on further peptoid-based hydroxamic acids. Through a systematic variation of the cap in the positions R<sup>1</sup>-R<sup>4</sup>, compounds with an improved HDAC activity should be synthesized (Figure 2).

The synthesis of the peptoid-based hydroxamic acids **4a-k\*** and **5a-f\*** was accomplished using the intermediates **6a-k\*** (**4a-k\***) and **8a-f\*** (**5a-f\***), which were synthesized via the U4CR (Figure 2). Subsequently, they were hydrolyzed to the appropriate carboxylic acids (Scheme 1) using lithium hydroxide monohydrate. Through the activation of the carboxylic acid with isobutyl chloroformate and *N*-methylmorpholine to the mixed anhydride and a subsequent treatment with hydroxylamine, the peptoid-based hydroxamic acids **4a-k\*** and **5a-f\*** were prepared in 27 – 66% yield (Scheme 1).



**Scheme 1.** Synthesis of the peptoid-based hydroxamic acids **4a-k\*** and **5a-f\***.

Subsequently, the peptoid-based hydroxamic acids **4a-k\*** and **5a-f\*** were tested in the *Kassack lab* with regard to their cytotoxicity and HDAC inhibition in an MTT and a cellular HDAC assay. Here, the compounds **4d\***, **h\***, **j\***, and **k\*** were identified as the most promising HDACi with IC<sub>50</sub> values in the nanomolar range (Figure 3).



**Figure 3.** HDAC inhibition and cytotoxicity of the most promising peptoid-based hydroxamic acids.

Further biological investigations on the inhibition of the recombinant HDAC isoforms 1-3, 6, and 8 were carried out in the *Jung lab* (Albert-Ludwigs-University Freiburg, Institute for Pharmaceutical Sciences) and in the *Dekker lab* (University of Groningen, Department of Chemical and Pharmaceutical Biology). In the case of **4d\***, **j\***, and **k\*** a moderate preference for the inhibition of HDAC1 over HDAC6 was observed (Table 1).

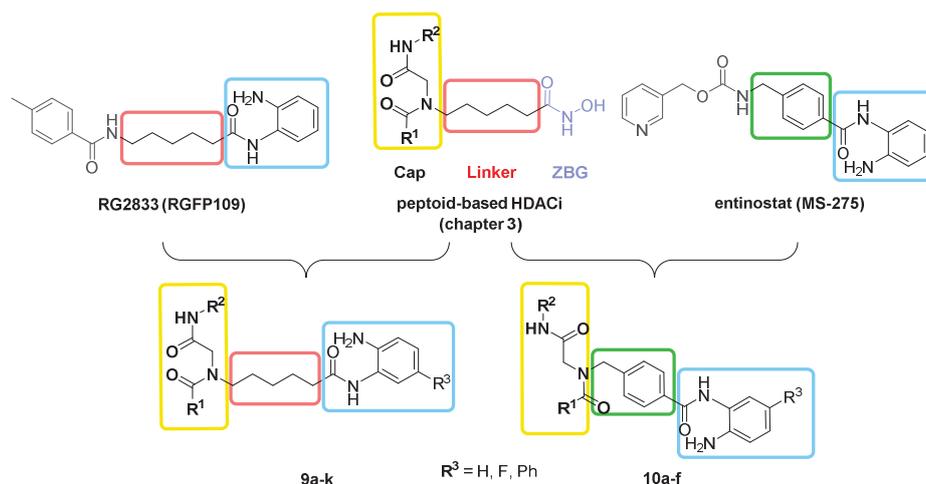
**Table 1.** Inhibition activities of the compounds **4d\***, **h\***, **j\***, and **k\*** against the recombinant HDAC isoforms 1-3, 6, and 8.

comp	IC <sub>50</sub> [nM]				
	HDAC1	HDAC2	HDAC3	HDAC6	HDAC8
<b>4d*</b>	27.4±4.6	84±3.5	60±3.0	214±23.4	7400±2970
<b>4h*</b>	96.4±19.7	146±6.2	16±0.8	106±14.2	6760±1050
<b>4j*</b>	25.0±9.2	66±2.4	6.5±0.6	281±36.8	2750±220
<b>4k*</b>	24.7±7.1	61±3.1	26±1.9	135±12.7	7330±770
<b>vorinostat</b>	45±8	200±5	13±1	108±11	1260±210

Moreover, compound **4j\*** was shown to cause an increased acetylation of the natural HDAC substrates  $\alpha$ -tubulin and histone H3 in a hyperacetylation assay. Furthermore, a resensitization of the cisplatin-resistant cell-line Cal27CisR against cisplatin was achieved in combination studies of **4j\*** with cisplatin.

In addition to the biological investigations, two sets of NMR signals were detected by nuclear resonance spectroscopy in the case of peptoid-based HDACi. These were subsequently analyzed in the low- and high temperature range using variable temperature (VT) NMR. It was discovered, that the peptoid-based HDACi are present in almost the same ratio as *cis*- and *trans*-rotamers. Through a cooperation with the *Gohlke lab* (Heinrich-Heine-University Düsseldorf, Institute for Pharmaceutical und Medicinal Chemistry) the binding modes of the two most potent compounds **4j\*** and **4k\*** in HDAC1 and 6 were analyzed. In the case of the *cis*-rotamers of both compounds a preferred binding to HDAC1 was observed, whereas the *trans*-rotamer of compound **4j\*** showed a higher affinity to HDAC6. In the case of **4k\*** no conformation showed a preferred binding to HDAC6.

In summary, the peptoid-based hydroxamic acid **4j\*** was identified in the first project as the most promising compound of this new HDACi class with a moderate preference for HDAC1 over HDAC6. Due to the various side effects of unselective HDACi, a trend towards the development of class- or isoform-selective HDACi is observed. Therefore, peptoid-based 2-aminoanilides should be synthesized in the second project of this work. 2-Aminoanilides are described in the literature as selective compounds for class I HDACs. For that purpose, the structure of the peptoid-based HDACi was hybridized with RG2833 (RGFP109) and entinostat (MS-275) respectively, with the aim to achieve a higher selectivity for HDAC1 over HDAC6 (Figure 4).

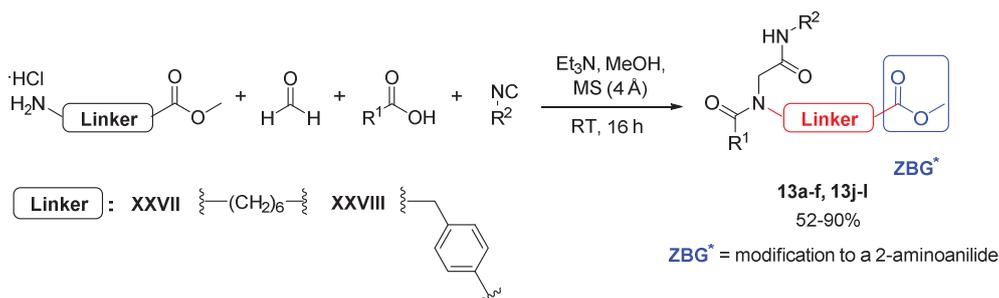


**Figure 4.** Hybridization of the peptoid-based HDACi (chapter 3) with RG2833 and entinostat.

RG2833 (RGFP109) is currently in a phase I study for the treatment of the friedreich-ataxie, whereas entinostat (MS-275) amongst others is studied in a phase III study for the treatment

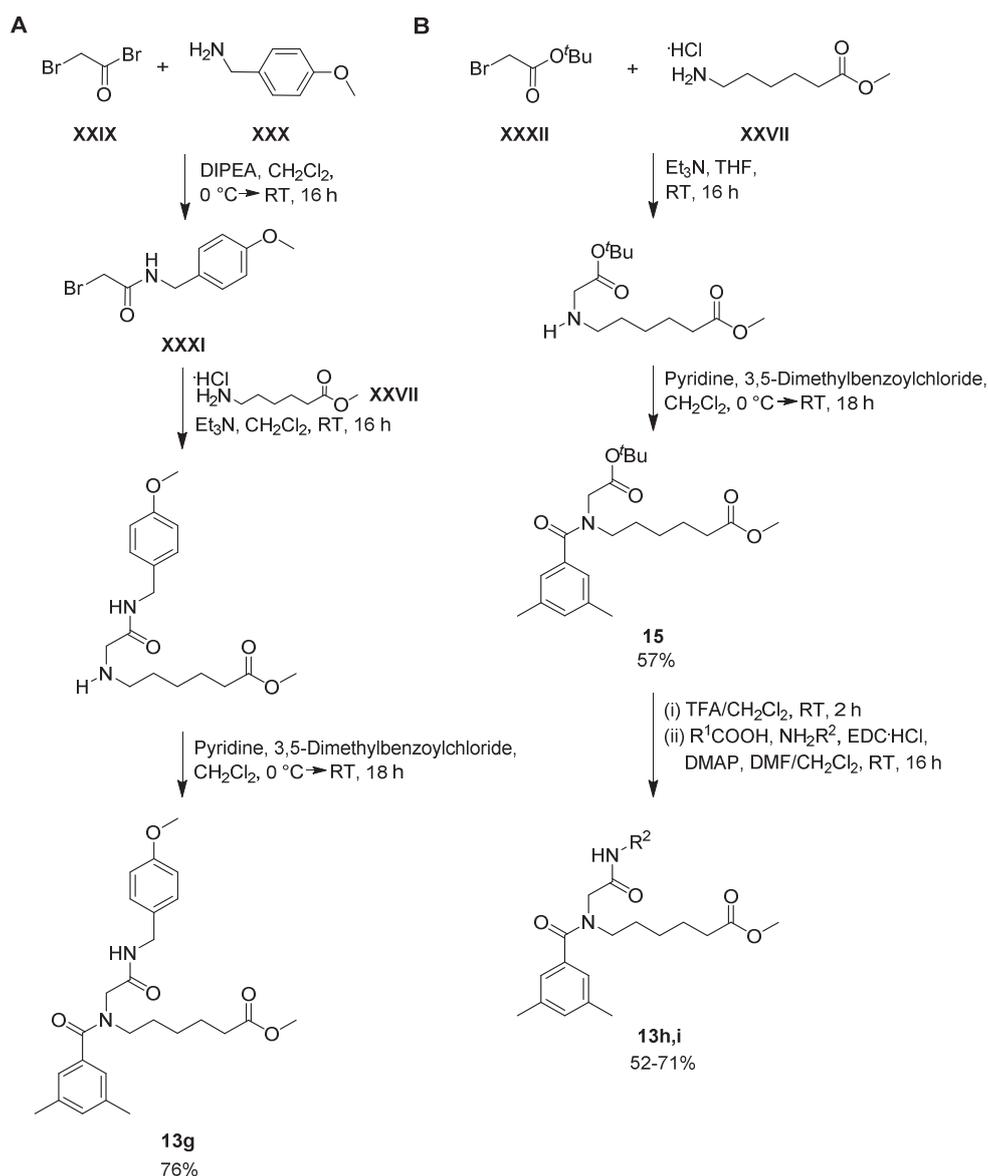
of the hormone-receptor-positive breast cancer in combination with the aromatase inhibitor exemestane. The additional substitution in position R<sup>3</sup> should lead to an improved HDAC1/2 inhibition.

The synthesis of the peptoid-based 2-aminoanilides **9a-k** and **10a-f** was performed using three different synthetic routes. The intermediates **13a-f** and **13j-l** were synthesized in 52–90% yield using the Ugi-4-component reaction (U-4CR, synthetic route I) (Scheme 2).



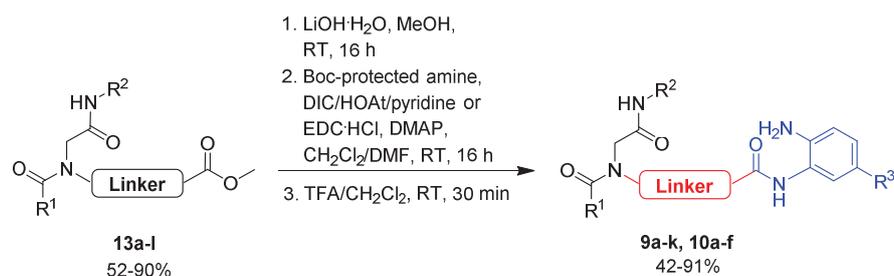
**Scheme 2.** Synthesis of the intermediates **13a-f** and **13j-l** using U-4CR (I).

The intermediates **13g** and **13h,i** were prepared using the submonomer approach II (**13g**) and III (**13h,i**). The submonomer approach III was developed out of the submonomer approach II by slight modifications (Scheme 3). Via nucleophilic substitutions and acylation reactions with the appropriate amines and 3,5-dimethylbenzoyl chloride, the methyl esters **13g** and **13h,i** were synthesized (Scheme 3).



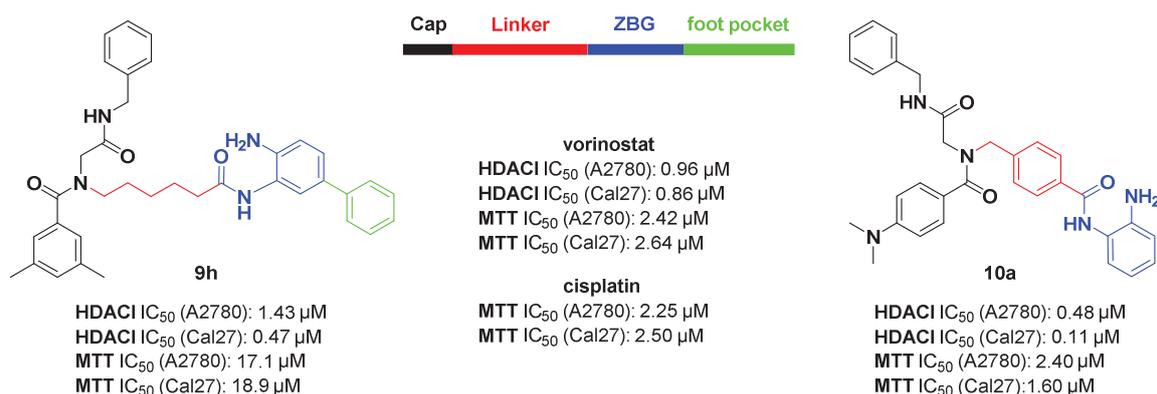
**Scheme 3.** Synthesis of the intermediates **13g** and **13h,i** using the submonomer approach II (A) and III (B).

Afterwards, the intermediates **13a-i** were hydrolyzed using lithium hydroxide monohydrate. The generated carboxylic acids were subsequently subjected to amide coupling reactions with the appropriate Boc-protected 1,2-phenyldiamine derivatives. After an acid-catalyzed Boc-deprotection with trifluoroacetic acid in dichloromethane the resulting peptoid-based 2-aminoanilides **9a-k** and **10a-f** were isolated in 42 – 91% yield (Scheme 4).



**Scheme 4.** Synthesis of the peptoid-based 2-aminoanilides **9a-k** and **10a-f**.

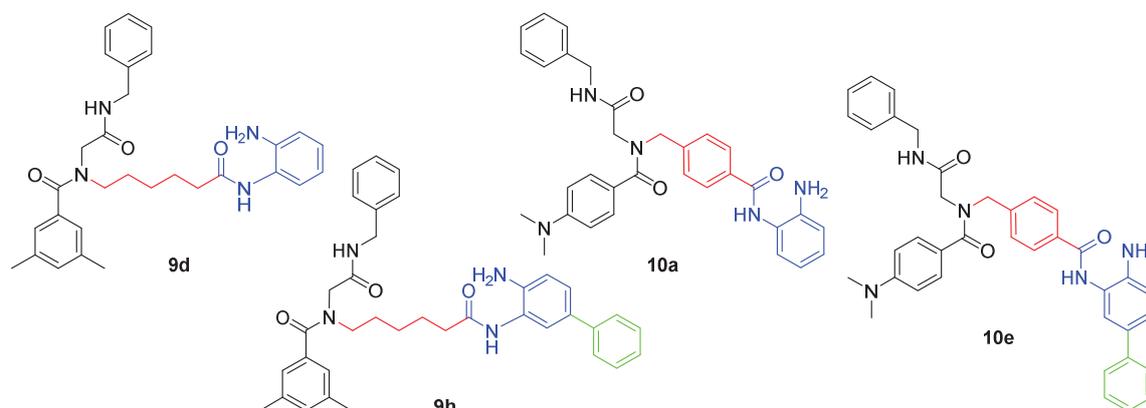
Subsequently, compounds **9a-k** and **10a-f** were biologically evaluated in regard to their cytotoxicity and HDAC inhibition in an MTT and a cellular HDAC assay. The benzyl-substituted 2-aminoanilides **10a-f** featured higher cytotoxicities compared to the alkyl-substituted 2-aminoanilides **9a-k**. According to the HDAC inhibition, the peptoid-based 2-aminoanilides **9h** and **10a** were identified as the most active compounds with IC<sub>50</sub> values in the micro- to nanomolar range (Figure 5).



**Figure 5.** HDAC inhibition and cytotoxicity of the most promising peptoid-based 2-aminoanilides **9h** and **10a**.

All synthesized HDACi were analyzed with regard to their inhibition of the recombinant HDAC1 and HDAC6 in an HDAC enzyme assay. The hit compounds **9h** and **10a** showed a potent and selective inhibition of HDAC1 over HDAC6 with selectivity indices (SI HDAC1/6) of >170 (**9h**) and >260 (**10a**). Furthermore, the additional substitution in position R<sup>3</sup> resulted in the case of **9h** in a 20 fold higher HDAC1 inhibition (**9d** (R<sup>3</sup> = H): IC<sub>50</sub> = 1157 nM, **9h** (R<sup>3</sup> = Ph): IC<sub>50</sub> = 57 nM, Table 8), whereas in the case of the benzyl-substituted 2-aminoanilides no further improvement of the HDAC1 inhibition was achieved through the additional phenyl substitution (**10a** (R<sup>3</sup> = H): IC<sub>50</sub> = 38 nM, **10e** (R<sup>3</sup> = Ph): IC<sub>50</sub> = 39 nM).

**Table 2.** Inhibition activities of the compounds **9d**, **h** and **10a**, **e** against the recombinant HDAC isoforms 1 and 6.



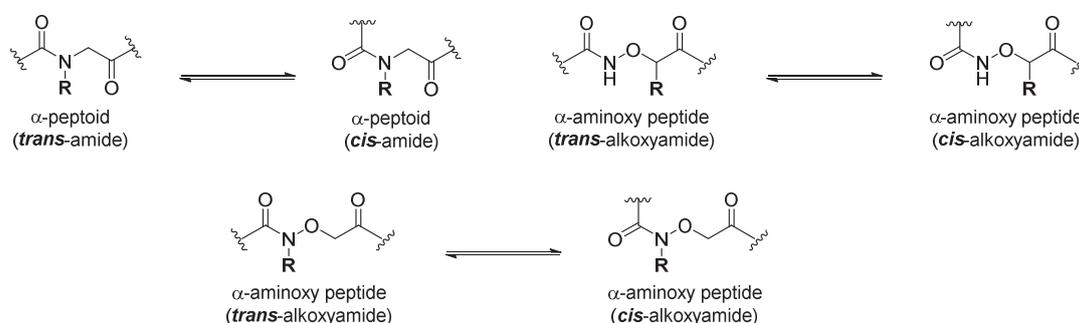
comp	IC <sub>50</sub> [nM]		SI 1/6 <sup>a</sup>
	HDAC1	HDAC6	
<b>9d</b>	1157±206	>10000	>9
<b>9h</b>	57±5	>10000	>175
<b>10a</b>	38±12	>10000	>263
<b>10e</b>	39±11	>10000	>256
<b>vorinostat</b>	111±15	102±9	1

<sup>a</sup>SI 1/6: Selectivity index for HDAC1 over HDAC6 (SI 1/6 = IC<sub>50</sub> (HDAC6)/IC<sub>50</sub> (HDAC1)).

As previously described in the case of the peptoid-based hydroxamic acids (chapter 3), two sets of NMR signals were also detected in the NMR spectra of the peptoid-based 2-aminoanilides. Additional VT NMR experiments confirmed the presence of *cis*- and *trans*-rotamers. Currently, the most promising compounds **9h** and **10a** are analyzed regarding their binding modes in the *Gohlke lab*. Furthermore, a more profound investigation of the biological properties of these hit compounds is ongoing in the *Kassack lab*.

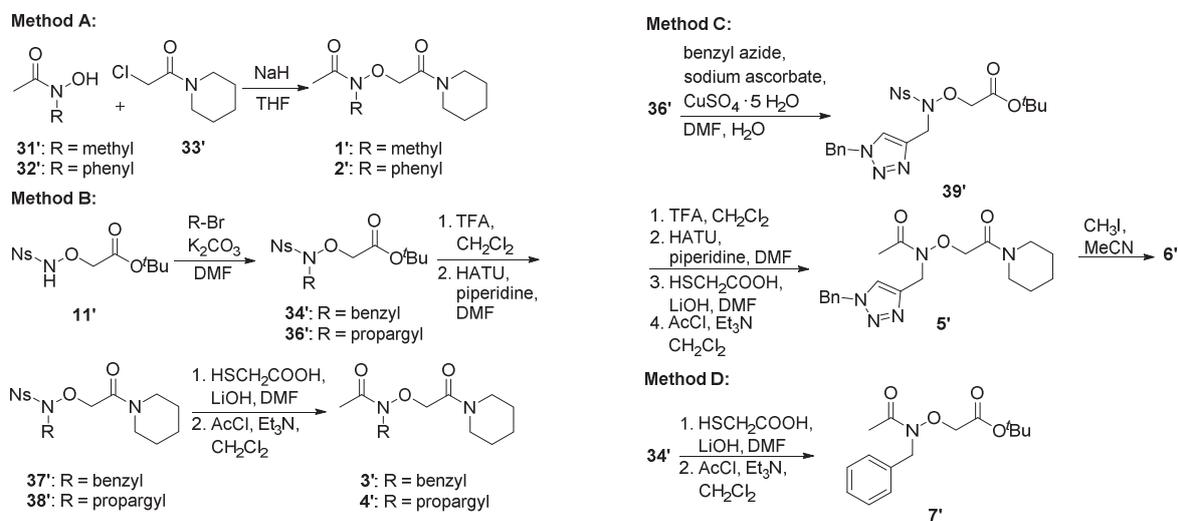
Besides the already mentioned versatile advantages of  $\alpha$ -peptoids, they are also affected by the phenomenon of a flexible amide geometry. Additionally, in the case of  $\alpha$ -peptoids different working groups showed, that the side chain has a strong influence on the amide bond geometry and thus on the secondary structure (Figure 6). This restriction plays not only an important role in the application as a cap group in the case of peptoid-based HDACi (see chapter 3 and 4), but also in the application of peptoid oligomers as  $\alpha$ -helix mimetics. Therefore the high flexibility can affect the binding affinity to a biological target, e. g. the modulation of protein-protein-interactions in an unfavorable way. Hence, a modified peptoid backbone with a more rigid amide geometry would be advantageous. Aiming at the

identification of an improved peptoid backbone, the class of  $\alpha$ -aminoxy peptoids was analyzed in the third project of this work with regard to its amide geometry and secondary structure.  $\alpha$ -Aminoxy peptoids are obtained from  $\alpha$ -aminoxy peptides through a shift of the side chain from the  $\alpha$ -carbon to the alkoxyamide nitrogen (Figure 6).  $\alpha$ -Aminoxy peptides experience a stabilization of their secondary structure through 8-membered ring hydrogen bonds, which leads to the development of a  $2_8$ -helix with *trans*-amide bonds.[67] On the one hand,  $\alpha$ -aminoxy peptoids do not feature amide protons. Consequently, conformation stabilization through hydrogen bonds is not possible. On the other hand, repulsion effects of the two oxygen atoms of the alkoxyamide bond could lead to a *cis*-amide preference and in comparison to other peptoids result in a more rigid backbone.



**Figure 6.** *Cis/trans*-rotamers of  $\alpha$ -peptoids,  $\alpha$ -aminoxy-peptides and  $\alpha$ -aminoxy-peptoids.

To prove this working hypothesis, model  $\alpha$ -aminoxy peptoids with different side chains were synthesized. Monomers **1'-7'** were prepared according to scheme 5 via classical alkylation reactions with alkyl halides in the presence of a base or via Mitsunobu reactions followed by appropriate modifications of the termini.



**Scheme 5.** Synthesis of the monomers **1'-7'** (modified from Krieger, V. et al.[113]).

Subsequently, a detailed investigation of all monomers with regard to their amide geometry was performed via NMR spectroscopy. Using VT NMR experiments in the low temperature range, the presence of two distinct species was detected and identified as *cis*- and *trans*-rotamers. Notably, the *cis*-conformer represented the major conformer in all monomers. Through a cooperation with the *Janiak lab* (Heinrich-Heine-University, Institute for Inorganic Chemistry and Structural Chemistry) the preferred *cis*-amide conformation was additionally confirmed on the basis of a crystal structure of one monomer.

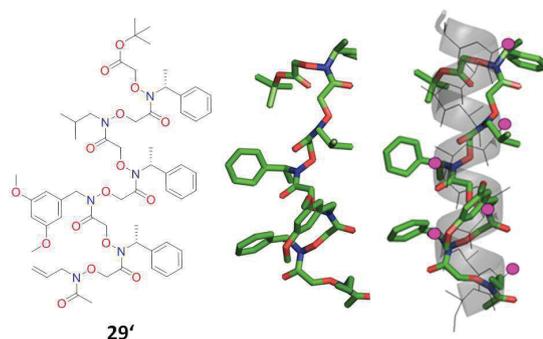
Afterwards, oligomers of  $\alpha$ -aminoxy peptoids were synthesized through amide couplings of the appropriate monomers and subsequent modifications of the *N*- and *C*-terminal positions. The preferred amide geometry and secondary structure of the oligomeric  $\alpha$ -aminoxy peptoids was analyzed via CD<sup>45</sup> and NMR<sup>46</sup> spectroscopy, NBO analysis<sup>47</sup> and molecular dynamics (MD) simulations. Using CD spectroscopy no unambiguous information about the folding behavior of the oligomeric  $\alpha$ -aminoxy peptoids was obtained. Nevertheless, it was possible to prove a *cis*-amide conformation of the *N*- and *C*-terminal amides in a 2D-NOESY spectrum of one tetramer. This *cis*-conformation was further confirmed through an X-ray structure analysis of one trimer. The preferred *cis*-amide geometry could potentially be explained through the development of an eight-membered  $\delta$  turn, stabilized by  $C_{\alpha,i}-H\cdots O=C_{i+1}$  interactions between the residues  $i \rightarrow i+1$ . Furthermore, MD simulations revealed that the side chains of the hexamer **29'** can mimic the orientation of different side chains of a canonical  $\alpha$ -helix (Figure 7).

---

<sup>45</sup> The **CD (circular dichroism) spectroscopy** is used in the identification of the secondary structure or conformation of chiral molecules.

<sup>46</sup> The **NMR (nuclear magnetic resonance) spectroscopy** is a method to study the electronic environment of atoms, as well as the interaction between atoms.

<sup>47</sup> The **NBO (natural bond orbital) analysis** is used to analyze the electron density of molecules.



**Figure 7.** Folding behaviour according to MD simulations and side chain orientation of the  $\alpha$ -aminoxy peptoid hexamer **29'** in comparison to a canonical  $\alpha$ -helix (modified from Krieger, V. et al.[113]).

Taken together, due to a facile synthesis, the potential side chain diversity and the high preference for *cis*-amide bonds in contrast to other peptoid derivatives,  $\alpha$ -aminoxy peptoids represent a new and promising class of peptidomimetic foldamers.

In summary, novel insights into the conformation and possible applications of peptoids were obtained in this dissertation. On the one hand novel peptoid-based preferential (chapter 3) as well as selective (chapter 4) inhibitors of class I HDACs were developed. On the other hand,  $\alpha$ -aminoxy peptoids were introduced as a new peptoid backbone capable of controlling the amide isomerism while maintaining the potential for side-chain diversity (chapter 5).

## **8. Experimenteller Teil**

### **8.1 Geräteverzeichnis und Analysemethoden**

#### **8.1.1 Schmelzpunkte**

Die unkorrigierten Schmelzpunkte wurden an der Schmelzpunktapparatur Stuart SMP11 bestimmt.

#### **8.1.2 <sup>1</sup>H NMR-Spektren**

Bruker Avance III 300 (300 MHz), DRX 500 (500 MHz) und III 600 (600 MHz) (chemische Verschiebung  $\delta$  relativ zu den verwendeten undeuterten Lösungsmittelanteilen in ppm, Ermittlung der Protonenverhältnisse durch Integration, Abkürzungen der Signalmultiplizitäten: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett und m = Multiplett, sonstige Abkürzungen: b = breit, Angabe der Kopplungskonstanten  $J$  in Hz). Bei den mit einem Sternchen (\*) gekennzeichneten <sup>1</sup>H NMR-Signalen handelt es sich um NMR-Signale des Nebenrotamers. Die Kopplungskonstante bezieht sich auf das Hauptrotamer.

#### **8.1.3 <sup>13</sup>C NMR-Spektren**

Bruker Avance III 300 (75 MHz), DRX 500 (126 MHz) und III 600 (151 MHz) (chemische Verschiebung  $\delta$  relativ zu den verwendeten undeuterten Lösungsmittelanteilen in ppm).

#### **8.1.4 Elementaranalysen**

Perkin Elmer PE 2400 CHN Elemental Analyzer oder Vario MICRO Cube Elemental Analyzer gemessen.

#### **8.1.5 Massenspektren (ESI-HRMS)**

Durchführung der massenspektrometrischen Bestimmungen mit dem Massenspektrometer Bruker Daltonics UHR-QTOF maXis 4G unter Angabe des protonierten Moleküliions  $M$  als  $[M+H]^+$  in  $m/z = \text{Masse/Ladungsverhältnis}$ .

#### **8.1.6 Trockenmittel für organische Phasen**

Als Trockenmittel wurde wasserfreies Natrium- oder Magnesiumsulfat benutzt.

### **8.1.7 Dünnschichtchromatographie**

Für die dünnschichtchromatographischen Untersuchungen wurden mit Kieselgel 60 und einem Fluoreszenzindikator  $F_{254}$  beschichtete DC-Aluminiumplatten der Firma Macherey-Nagel verwendet (Kammersättigung, 6 cm Laufstrecke, Detektion durch Fluoreszenzlöschung bei UV-Licht der Wellenlänge 254 nm oder durch Anfärben mit wässriger Kaliumpermanganat-Lösung).

### **8.1.8 Säulenchromatographie**

Die säulenchromatographischen Reinigungen wurden manuell oder mittels der Flash-Chromatographie an einem Combi Flash® Rf 200 mit RediSep™Rf –Kartuschen durchgeführt. Bei der manuellen Durchführung der Säulenchromatographie wurde mit dem Kieselgel 60 (0,04-0,063 mm/230–400 mesh, Porengröße 60 Å) der Firma Macherey-Nagel oder Fluka gearbeitet.

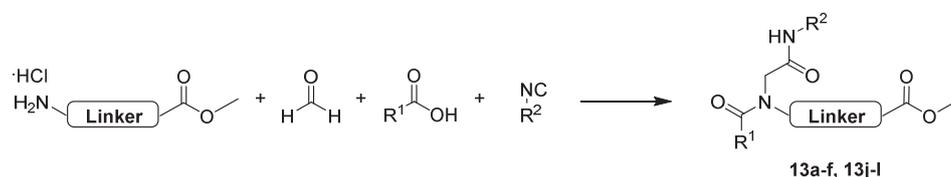
### **8.1.9 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)**

Bei der Hochleistungsflüssigchromatographie wurde entweder ein Varian ProStar 210 System mit Varian ProStar Pumpe 210 und Varian ProStar 320 UV-Detektor oder ein AZURA Analytical HPLC System mit AZURA P 6.1L Pumpe und Smartline UV-Detektor 2600 VIS LWL verwendet. Die analytischen HPLC-Untersuchungen wurden an der Phenomenex Luna C-18(2) (250 mm x 4,6 mm, Partikelgröße 5 µm) mit einer vorgeschalteten Phenomenex Security Guard C-18 (4 mm x 3,0 mm) verwendet. Die UV Absorption wurde bei 254 nm und einem linearen Gradienten von 10 % Acetonitril (+0.1% TFA) in Wasser (+0.1% TFA) bis 100 % Acetonitril (+0.1% TFA) in 20 min, Flussrate 1 ml/min, detektiert. Die Reinheit der Produkte war  $\geq 95\%$ .

## 8.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV) und analytische Daten

### 8.2.1 2-Aminoanilide und Vorstufen (Kapitel 4)

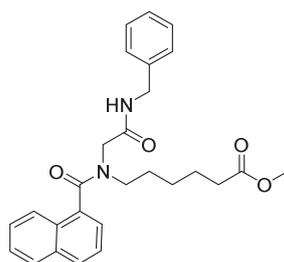
#### AAV1: Synthese der Verbindungen 13a-f<sup>48</sup> und 13j-l



Eine Mischung bestehend aus der jeweiligen Aminkomponente (0.8 mmol, 1.2 Äquiv.), Paraformaldehyd (25 mg, 0.8 mmol, 1.2 Äquiv.), Triethylamin (116  $\mu$ l, 0.8 mmol, 1.2 Äquiv.) und zerstoßenem Molekularsieb (MS) (150 mg, 4 Å) wird in trockenem Methanol (2 mL, 0.5 M) für 30 min bei RT gerührt. Anschließend wird die jeweilige Carbonsäure (1.0 mmol, 1.0 Äquiv.) und nach weiteren 10 min das entsprechende Isocyanid (1.0 mmol, 1.0 Äquiv.) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wird für 24 h bei RT gerührt. Anschließend wird die Reaktionslösung filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie (*n*-Hexan:EtOAc, Gradient: 100:00  $\rightarrow$  50:50 in 30 min) gereinigt und aus Ethylacetat und *n*-Hexan ausgefällt.

<sup>48</sup> Die Datenblätter der Verbindungen **13a-e** sind in der SI im Kapitel 3 enthalten. Dabei entspricht **13a** (**6a**<sup>\*</sup>), **13b** (**6e**<sup>\*</sup>), **13c** (**6j**<sup>\*</sup>), **13d** (**6k**<sup>\*</sup>) und **13e** (**6b**<sup>\*</sup>).

## Methyl-6-(N-(2-(benzylamino)-2-oxoethyl)-1-naphthamido)hexanoat (13f)



Hergestellt aus 1-Naphthoesäure (344 mg, 2.0 mmol, 1 Äquiv.) und Benzylisocyanid (244  $\mu$ l, 2.0 mmol, 1 Äquiv.) nach AAV1.

<b>Chemische Formel</b>	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>
<b>Molare Masse</b>	446.55 g/mol
<b>Ausbeute</b>	90% eines weißen Feststoffs
<b>Schmelzpunkt</b>	91 °C

### <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)

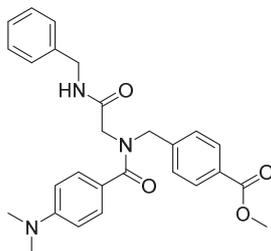
$\delta$  (ppm): 8.57/8.22\* (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 8.23 – 7.05 (m, 12H), 4.48 – 2.99 (m, 9H), 2.37\*/2.06 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.70 – 0.91 (m, 6H)

### <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)

$\delta$  (ppm): 173.36, 173.07, 170.04, 168.17, 167.90, 139.34, 139.01, 134.65, 134.47, 132.98, 132.82, 129.23, 128.91, 128.64, 128.62, 128.29, 128.21, 128.14, 127.24, 127.17, 126.90, 126.80, 126.45, 126.41, 125.32, 124.64, 125.20, 125.17, 123.57, 123.49, 51.21, 51.10, 50.86, 49.24, 47.12, 45.59, 42.20, 42.03, 33.24, 32.81, 27.30, 26.35, 26.01, 25.12, 24.26, 23.69

<b>CHN</b>	Gesucht (%):	C 72.62, H 6.77, N 6.27
	Gefunden (%):	C 72.55, H 6.88, N 6.14

**Methyl-4-((N-(2-(benzylamino)-2-oxoethyl)-4-(dimethylamino)benzamido)methyl)-benzoat (13j)**



Hergestellt aus 4-Dimethylaminobenzoesäure (164 mg, 1.0 mmol, 1 Äquiv.) und Benzylisocyanid (121 µl, 1.0 mmol, 1 Äquiv.) nach AAV1.

<b>Chemische Formel</b>	C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>
<b>Molare Masse</b>	459.55 g/mol
<b>Ausbeute</b>	68% eines weißen Feststoffs
<b>Schmelzpunkt</b>	131 °C

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

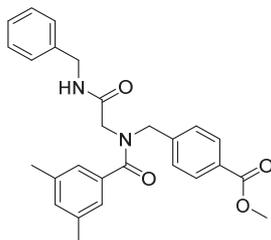
δ (ppm): 8.49 – 8.41 (m, 1H), 7.96 – 6.64 (m, 13H), 4.71 (bs, 2H), 4.30 (d, *J* = 5.8 Hz), 3.92 (bs, 2H), 3.85 (s, 3H), 2.93 (s, 6H)

**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 171.76, 168.13, 166.07, 151.24, 143.29, 139.20, 129.42, 128.59, 128.47, 128.27, 127.97, 127.27, 126.84, 121.97, 110.93, 52.10, 51.51, 49.31, 42.12, 39.71

<b>CHN</b>	Gesucht (%):	C 70.57, H 6.36, N 9.14
	Gefunden (%):	C 70.44, H 6.45, N 9.04

**Methyl-4-((N-(2-(benzylamino)-2-oxoethyl)-3,5-dimethylbenzamido)methyl)-benzoat (13k)**



Hergestellt aus 3,5-Dimethylbenzoesäure (149 mg, 1.0 mmol, 1 Äquiv.) und Benzylisocyanid (121  $\mu$ l, 1.0 mmol, 1 Äquiv.) nach AAV1.

<b>Chemische Formel</b>	C <sub>27</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>
<b>Molare Masse</b>	444.53 g/mol
<b>Ausbeute</b>	73% eines weißen Feststoffs
<b>Schmelzpunkt</b>	82 °C

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

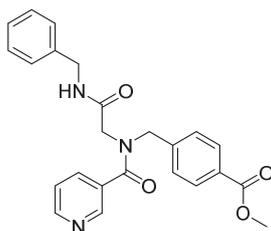
$\delta$  (ppm): 8.45<sup>\*</sup>/8.40 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 7.97 – 7.01 (m, 1H), 4.73/4.60<sup>\*</sup> (s, 2H), 4.33<sup>\*</sup>/4.28 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 4.02<sup>\*</sup>/3.82 (s, 2H), 3.86 (s, 3H), 2.26/2.24<sup>\*</sup> (s, 6H)

**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

$\delta$  (ppm): 171.64, 167.76, 167.62, 166.08, 165.99, 142.97, 142.78, 139.28, 139.07, 137.59, 135.92, 135.76, 130.85, 129.51, 129.41, 128.66, 128.50, 128.30, 128.26, 127.93, 127.24, 127.16, 126.90, 126.77, 124.11, 53.29, 52.12, 51.17, 48.81, 47.68, 42.18, 42.08, 20.77

<b>CHN</b>	Gesucht (%):	C 72.95, H 6.35, N 6.30
	Gefunden (%):	C 72.97, H 6.35, N 6.21

## Methyl-4-((N-(2-(benzylamino)-2-oxoethyl)nicotinamido)methyl)benzoat (13I)



Hergestellt aus Nicotinsäure (246 mg, 2.0 mmol, 1 Äquiv.) und Benzylisocyanid (244  $\mu$ l, 2.0 mmol, 1 Äquiv.) nach AAV1.

<b>Chemische Formel</b>	C <sub>24</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>
<b>Molare Masse</b>	417.47 g/mol
<b>Ausbeute</b>	78% eines weißen Feststoffs
<b>Schmelzpunkt</b>	105 °C

### <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)

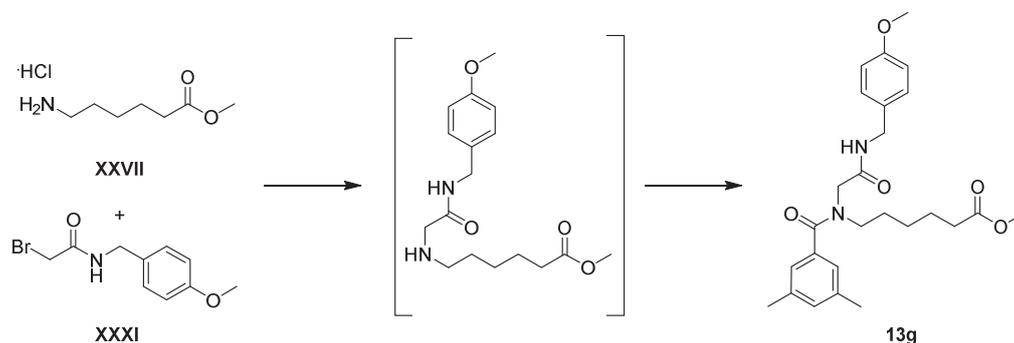
$\delta$  (ppm): 8.69 – 7.12 (m, 14H), 4.74/4.64\* (s, 2H), 4.34\*/4.24 (d,  $J = 5.7$  Hz, 2H), 4.09\*/3.89 (s, 2H), 3.86 (s, 3H)

### <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)

$\delta$  (ppm): 169.60, 169.35, 167.58, 167.39, 166.10, 165.98, 150.64, 150.49, 147.43, 147.03, 142.61, 142.42, 139.24, 138.81, 134.51, 134.36, 131.89, 131.63, 129.56, 129.39, 128.75, 128.57, 128.31, 128.02, 127.22, 126.92, 126.80, 123.56, 123.42, 53.43, 52.14, 51.39, 49.24, 48.33, 42.25, 42.12

<b>CHN</b>	Gesucht (%):	C 69.05, H 5.55, N 10.07
	Gefunden (%):	C 68.84, H 5.72, N 9.76

**Methyl-6-(*N*-(2-((4-methoxybenzyl)amino)-2-oxoethyl)-3,5-dimethylbenzamido)-hexanoat (13g)**



Verbindung **XXVII** (1.8 g, 9.9 mmol, 1 Äquiv.) wird in Dichlormethan (30 mL) bei 0 °C gelöst und mit Triethylamin (2.8 ml, 19.8 mmol, 2 Äquiv.) versetzt. Anschließend wird Verbindung **XXXI** (2.6 g, 9.9 mmol, 1 Äquiv.) hinzugegeben und 16 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wird mit Dichlormethan (3 x 30 mL) extrahiert, mit Wasser (3 x 30 mL) und gesättigter NaCl-Lösung (3 x 30 mL) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Anschließend wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt. Das sekundäre Amin (2.3 g, 7.0 mmol, 1.2 Äquiv.) wird direkt weiter mit Pyridin (566 µL, 7.0 mmol, 1.2 Äquiv.) in Dichlormethan bei 0 °C versetzt. Anschließend wird 3,5-Dimethylbenzoylchlorid (864 µL, 5.8 mmol, 1 Äquiv.) zur Reaktionslösung hinzugegeben und 16 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wird mit Dichlormethan (3 x 20 mL) extrahiert und mit Wasser (3 x 20 mL) und 1M Salzsäure (3 x 10 mL) gewaschen. Anschließend wird die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt. Das Produkt wird aus Ethylacetat und *n*-Hexan ausgefällt.

<b>Chemische Formel</b>	C <sub>26</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
<b>Molare Masse</b>	454.57 g/mol
<b>Ausbeute</b>	57% eines weißen Feststoffs
<b>Schmelzpunkt</b>	59 °C

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 8.35 – 8.34 (m, 1H), 7.21 – 6.85 (m, 7H), 4.25<sup>\*</sup>/4.19 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H), 4.04<sup>\*</sup>/3.81 (s, 2H), 3.72 (s, 3H), 3.59/3.56<sup>\*</sup> (s, 3H), 3.36 – 3.15 (m, 2H), 2.33 – 2.18 (m, 8H), 1.56 – 1.04 (m, 6H)

**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

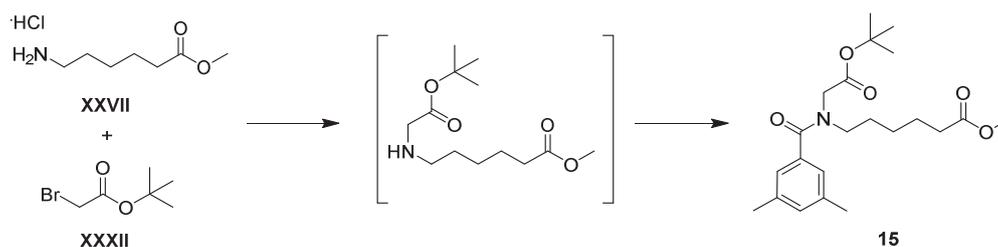
δ (ppm): 173.34, 173.17, 171.08, 168.02, 158.26, 158.19, 137.44, 137.39,  
136.69, 136.49, 131.36, 131.16, 130.45, 128.64, 128.51, 123.99,  
113.66, 55.05, 51.37, 51.17, 49.52, 47.49, 45.61, 41.62, 41.53,  
33.19, 32.97, 27.30, 26.09, 25.83, 25.25, 24.24, 23.79, 20.75

**CHN**

Gesucht (%): C 68.70, H 7.54, N 6.16

Gefunden (%): C 68.67, H 7.75, N 6.23

## Methyl-(*N*-(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)-3,5-dimethylbenzamido)hexanoat (15)



Verbindung **XXVII** (2.9 g, 16.1 mmol, 1 Äquiv.) wird in Tetrahydrofuran (30 mL) gelöst, mit Triethylamin (4.5 mL, 32.2 mmol, 2 Äquiv.) versetzt und 10 min bei RT gerührt. Anschließend wird Verbindung **XXXII** (2.4 mL, 16.1 mmol, 1 Äquiv.) hinzugegeben und 16 h bei RT gerührt. Die Lösung wird daraufhin filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt. Das sekundäre Amin (3.76 g, 14.5 mmol, 1.2 Äquiv.) wird direkt mit Pyridin (1.2 mL, 14.5 mmol, 1.2 Äquiv.) in Dichlormethan (20 mL) bei 0 °C versetzt. Anschließend wird 3,5-Dimethylbenzoylchlorid (1.8 mL, 12.1 mmol, 1 Äquiv.) hinzugegeben und 18 h bei RT gerührt. Nach Abschluss der Reaktion wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie (*n*-Hexan:EtOAc, Gradient: 100:00 → 50:50 in 30 min) gereinigt.

**Chemische Formel** C<sub>22</sub>H<sub>33</sub>NO<sub>5</sub>  
**Molare Masse** 391.51 g/mol  
**Ausbeute** 57% eines farblosen Öls

### <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ (ppm): 6.96 – 6.92 (m, 3H), 4.04/3.78\* (s, 2H), 3.61\*/3.59 (s, 3H), 3.45\*/3.22 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.30 – 2.16 (m, 8H), 1.66 – 1.10 (m, 15H)

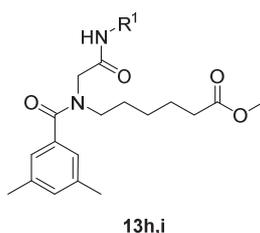
### <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ (ppm): 174.01, 173.72, 172.43, 172.36, 168.72, 168.26, 138.02, 136.32, 136.02, 131.02, 130.98, 124.15, 123.99, 82.10, 81.69, 51.93, 51.43, 49.88, 47.33, 46.53, 33.89, 33.67, 28.12, 28.08, 27.96, 26.82, 26.46, 25.92, 24.69, 24.31, 21.17

**HRMS (ESI) [M+H]<sup>+</sup>** 392.2434, berechnet für C<sub>22</sub>H<sub>34</sub>NO<sub>5</sub>: 392.2431

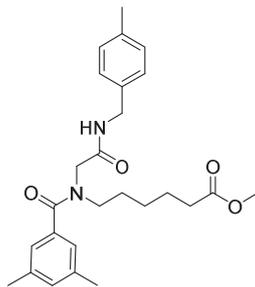
**HPLC** *t*<sub>R</sub> = 19.68 min, 97.6% Reinheit

## AAV2: Synthese der Verbindungen 13h,i



Die Verbindung **15** (984 mg, 2.5 mmol, 1 Äquiv.) wird mit 20%iger TFA-Lösung in Dichlormethan (6 mL) versetzt und 2 h bei RT gerührt. Nach Reaktionsende wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Reaktionsrückstand wird mit Toluol (2 x 3 mL) aufgeschlämmt und unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeeengt. Die Carbonsäure wird in quantitativer Ausbeute (839 mg, 2.5 mmol) erhalten und direkt weiter umgesetzt. Ein Teil des Rückstands (360 mg, 1.1 mmol, 1 Äquiv.) wird in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/DMF (1:1, v/v, 5 mL) aufgenommen und mit EDC·HCl (205 mg, 2.2 mmol, 2 Äquiv.) und DMAP (52 mg, 0.4 mmol, 0.4 Äquiv.) versetzt. Zuletzt wird das entsprechende Amin (1.1 mmol, 1 Äquiv.) hinzugegeben und 16 h bei RT gerührt. Anschließend wird die Lösung mit Ethylacetat (3 x 20 mL) extrahiert, mit gesättigter NaCl-Lösung (3 x 20 mL) gewaschen und die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt und der Reaktionsrückstand mithilfe der Flashchromatographie (*n*-Hexan:EtOAc, Gradient: 100:00 → 50:50 in 30 min) gereinigt. Das Produkt wird anschließend aus Ethylacetat und *n*-Hexan ausgefällt.

**Methyl-6-(3,5-dimethyl-N-(2-((4-methylbenzyl)amino)-2-oxoethyl)benzamido)-hexanoat (13h)**



Hergestellt aus **15** (492 mg, 1.3 mmol, 1 Äquiv.) und 4-Methylbenzylamin (136  $\mu$ l, 1.1 mmol, 1 Äquiv.) nach AAV2.

<b>Chemische Formel</b>	C <sub>26</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>
<b>Molare Masse</b>	438.57 g/mol
<b>Ausbeute</b>	71% eines weißen Feststoffs
<b>Schmelzpunkt</b>	78 °C

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

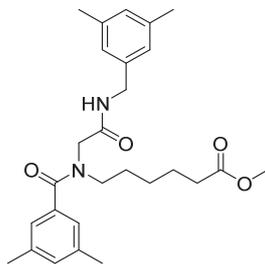
$\delta$  (ppm): 8.37 – 8.36 (m, 1H), 7.18 – 6.91 (m, 7H), 4.27<sup>\*</sup>/4.22 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H), 4.05<sup>\*</sup>/3.82 (s, 2H), 3.59/3.56<sup>\*</sup> (s, 3H), 3.36 – 3.16 (m, 2H), 2.33 – 2.18 (m, 11H), 1.56 – 1.05 (m, 6H)

**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

$\delta$  (ppm): 173.34, 173.17, 171.09, 168.10, 168.07, 137.44, 137.41, 136.70, 136.48, 136.38, 136.16, 135.93, 135.77, 130.45, 128.80, 127.25, 127.17, 123.99, 51.37, 51.17, 51.15, 49.53, 47.51, 45.62, 41.91, 41.83, 33.20, 32.97, 27.30, 26.09, 25.84, 25.26, 24.24, 23.79, 20.75, 20.65

<b>CHN</b>	Gesucht (%):	C 71.21, H 7.81, N 6.39
	Gefunden (%):	C 71.28, H 8.00, N 6.19

**Methyl-6-(N-(2-((3,5-dimethylbenzyl)amino)-2-oxoethyl)-3,5-dimethylbenz-amido)hexanoat (13i)**



Hergestellt aus **15** (492 mg, 1.3 mmol, 1 Äquiv.) und 3,5-Dimethylbenzylamin (154  $\mu$ l, 1.1 mmol, 1 Äquiv.) nach AAV2.

<b>Chemische Formel</b>	C <sub>27</sub> H <sub>36</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>
<b>Molare Masse</b>	452.60 g/mol
<b>Ausbeute</b>	52% eines weißen Feststoffs
<b>Schmelzpunkt</b>	83 °C

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

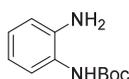
$\delta$  (ppm): 8.35 – 8.34 (m, 1H), 7.06 – 6.81 (m, 6H), 4.25<sup>\*</sup>/4.19 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H), 4.06<sup>\*</sup>/3.83 (s, 2H), 3.59/3.55<sup>\*</sup> (s, 3H), 3.36 – 3.16 (m, 2H), 2.33 – 2.18 (m, 14H), 1.56 – 1.05 (m, 6H)

**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

$\delta$  (ppm): 173.32, 173.16, 171.10, 168.07, 139.18, 138.92, 137.45, 137.37, 137.23, 137.16, 136.66, 136.50, 130.45, 128.27, 128.11, 125.20, 124.99, 124.04, 51.38, 51.17, 51.14, 49.54, 47.54, 45.55, 42.19, 42.01, 33.20, 32.97, 27.30, 26.07, 25.86, 25.27, 24.23, 23.79, 20.89, 20.73

<b>CHN</b>	Gesucht (%):	C 71.65, H 8.02, N 6.19
	Gefunden (%):	C 71.49, H 8.11, N 6.11

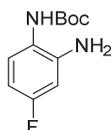
### Synthese des Boc-geschützten 1,2-Phenylendiamins XX



XX

1,2-Phenylendiamin (3.3 g, 30 mmol, 5 Äquiv.) wird in Dichlormethan (20 mL) gelöst und auf 0 °C in einem Eisbad gekühlt. Di-*tert*-butyldicarbonat (1.3 g, 6 mmol, 1 Äquiv.) wird ebenfalls in Dichlormethan (15 mL) gelöst und langsam hinzugegeben. Die Reaktionslösung wird für 16 h bei RT gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie (*n*-Hexan:EtOAc, Gradient: 100:00 → 70:30 in 25 min) gereinigt und in 91%iger Ausbeute erhalten. Die Identität wird anhand eines <sup>1</sup>H NMRs im Vergleich zur Literatur bestätigt.[114]

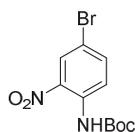
### Synthese des Boc-geschützten 1,2-Phenylendiaminderivats XXII



XXII

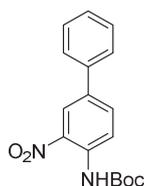
3,4-Diamino-1-fluorbenzol (3.15 g, 25 mmol, 5 Äquiv.) wird in Acetonitril (50 mL) gelöst. Di-*tert*-butyldicarbonat (1.10 g, 5 mmol, 1 Äquiv.), ebenfalls in Acetonitril (5 mL) gelöst, wird zum Amin hinzugegeben. Die Reaktion wird 16 h bei 50 °C gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt mittels Flashchromatographie (*n*-Hexan:EtOAc, Gradient: 100:00 → 70:30 in 25 min) gereinigt. Das Boc-geschützte Amin **XXII** wird in 99%iger Ausbeute erhalten. Die Identität wird anhand eines <sup>1</sup>H NMRs im Vergleich zur Literatur bestätigt.[115]

## Synthese des Boc-geschützten 1,2-Phenylendiaminderivats XXIV



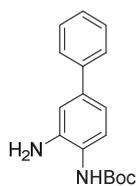
XXIV

4-Brom-2-nitroanilin (1 g, 4.61 mmol, 1 Äquiv.) wird in Tetrahydrofuran (5 mL) gelöst und mit Triethylamin (639  $\mu$ L, 4.61 mmol, 1 Äquiv.) versetzt. Anschließend wird Di-*tert*-butyldicarbonat (1.06 g, 4.61 mmol, 1 Äquiv.) zur Reaktionslösung hinzugegeben und 24 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abschluss der Reaktion wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie (*n*-Hexan:EtOAc, Gradient: 100:00  $\rightarrow$  70:30 in 25 min) gereinigt und in 50%iger Ausbeute erhalten. Die Identität wird anhand eines  $^1\text{H}$  NMRs im Vergleich zur Literatur bestätigt.[90, 116]



XXV

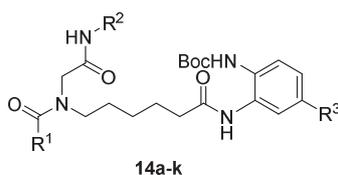
Verbindung **XXIV** (1.3 g, 4.0 mmol, 1 Äquiv.) wird in Toluol (9 mL) gelöst. Anschließend wird Phenylboronsäure (546 mg, 4.5 mmol, 1.1 Äquiv.), gelöst in Ethanol (5 mL), und 5.1 mL einer 2M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung hinzugegeben. Die Reaktionslösung wird 5 min mit einem Stickstoffstrom entgast. Zuletzt wird  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (282 mg, 0.2 mmol, 5 mmol%), in 5 mL Ethanol suspendiert, hinzugegeben und das Reaktionsgemisch 3 h refluxiert. Die Reaktionslösung wird mit 10 mL Ethylacetat verdünnt, mit Wasser (3 x 20 mL) und gesättigter NaCl-Lösung (3 x 20 mL) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Anschließend wird über Kieselgur filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt. Das Produkt **XXV** wird in 95%iger Ausbeute aus Methanol ausgefällt und die Identität mittels eines  $^1\text{H}$  NMRs im Vergleich zur Literatur bestätigt.[117]



**XXVI**

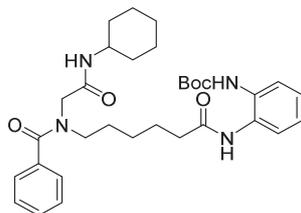
Das Biphenyledukt **XXV** (1.3 mg, 4.0 mmol, 1 Äquiv.) wird in Methanol (40 mL) gelöst und mit Pd/C (126 mg, 10% wt) versetzt. Die Reaktion wird unter Wasserstoffatmosphäre 16 h bei RT gerührt. Nach Reaktionsende wird die Lösung über Kieselgur filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Boc-geschützte Amin **XXVI** wird in quantitativer Ausbeute erhalten. Die Identität wird anhand eines  $^1\text{H}$  NMRs im Vergleich zur Literatur bestätigt.[117]

### AAV3: Synthese der Verbindungen 14a-k



Lithiumhydroxid Monohydrat (92 mg, 2.20 mmol, 2 Äquiv.) wird zum entsprechenden in Methanol (5 mL) gelösten Ester **13a-i** (1.10 mmol, 1 Äquiv.) gegeben und das Reaktionsgemisch für 16 h bei RT gerührt. Nach Abschluss der Reaktion wird die Lösung mit 1M Salzsäure auf pH ~ 1 angesäuert, mit Ethylacetat (3 x 20 mL) extrahiert und mit gesättigter NaCl-Lösung (3 x 20 mL) gewaschen. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt. Das entsprechende Boc-geschützte 1,2-Phenylen-diaminderivat (0.92 mmol, 1 Äquiv.) wird in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/DMF (1:1, v/v, 10 mL) gelöst und mit Pyridin (149 µL, 1.84 mmol, 2 Äquiv.) versetzt. Anschließend wird bei 0 °C die entsprechende Carbonsäure (1.10 mmol, 1.2 Äquiv.), DIC (170 µL, 1.10 mmol, 1.2 Äquiv.) und HOAt (150 mg, 1.10 mmol, 1.2 Äquiv.) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch für 24 h bei RT gerührt. Nach Reaktionsende wird die Lösung mit Wasser (10 mL) versetzt und mit Ethylacetat (3 x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter NaCl-Lösung (3 x 20 mL) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie (*n*-Hexan:EtOAc, Gradient: 100:00 → 40:60 in 30 min) gereinigt und aus Ethylacetat und *n*-Hexan ausgefällt.

**tert-Butyl-(2-(6-(N-(2-(cyclohexylamino)-2-oxoethyl)benzamido)hexanamido)-phenyl)carbamate (14a)**



Hergestellt aus **6a\*** (558 mg, 1.49 mmol, 1.2 Äquiv.) und dem Boc-geschützten 1,2-Phenylendiamin **XX** (258 mg, 1.24 mmol, 1 Äquiv.) nach AAV3.

<b>Chemische Formel</b>	C <sub>32</sub> H <sub>44</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>
<b>Molare Masse</b>	564.73 g/mol
<b>Ausbeute</b>	71% eines weißen Feststoffs
<b>Schmelzpunkt</b>	94 °C

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 9.44/9.37\* (s, 1H), 8.34/8.30\* (s, 1H), 7.80 – 7.76 (m, 1H), 7.53 – 7.05 (m, 8H), 4.01\*/3.74 (s, 2H), 3.57 – 3.51 (m, 1H), 3.38 – 3.16 (m, 2H), 2.37/2.25\* (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.76 – 1.08 (m, 25H)

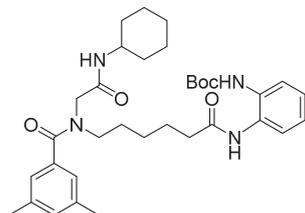
**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 171.72, 171.52, 170.91, 170.83, 167.01, 166.83, 153.06, 153.02, 136.82, 136.63, 131.06, 131.03, 129.65, 129.60, 129.13, 128.32, 128.19, 126.46, 126.34, 125.00, 124.82, 123.83, 123.61, 79.33, 51.43, 49.58, 47.59, 47.27, 45.84, 45.72, 35.91, 35.73, 32.44, 32.23, 28.05, 27.53, 26.38, 26.23, 26.00, 25.93, 25.49, 25.20, 25.14, 25.05, 24.65, 24.54, 24.45, 24.29

**HRMS (ESI) [M+H]<sup>+</sup>** 565.3386, berechnet für C<sub>32</sub>H<sub>45</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>: 565.3384

**HPLC** *t*<sub>R</sub> = 17.92 min, 96.6% Reinheit

**tert-Butyl-(2-(6-(N-(2-(cyclohexylamino)-2-oxoethyl)-3,5-dimethylbenzamido)-hexanamido)phenyl)carbamate (14b)**



Hergestellt aus **6e\*** (334 mg, 0.75 mmol, 1.2 Äquiv.) und dem Boc-geschützten 1,2-Phenylendiamin **XX** (130 mg, 0.63 mmol, 1 Äquiv.) nach AAV3.

<b>Chemische Formel</b>	C <sub>34</sub> H <sub>48</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>
<b>Molare Masse</b>	592.78 g/mol
<b>Ausbeute</b>	70% eines weißen Feststoffs
<b>Schmelzpunkt</b>	88 °C

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 9.41/9.34\* (s, 1H), 8.30/8.27\* (s, 1H), 7.74 – 7.69 (m, 1H), 7.54 – 6.92 (m, 7H), 3.99\*/3.73 (s, 2H), 3.60 – 3.50 (m, 1H), 3.37 – 3.17 (m, 2H), 2.37 – 2.24 (m, 8H), 1.76 – 1.10 (m, 25H)

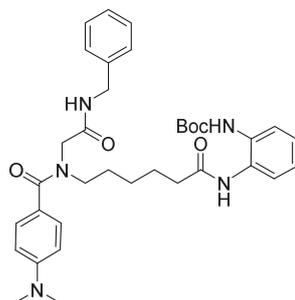
**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 171.57, 171.42, 170.94, 167.02, 166.83, 152.95, 137.31, 137.20, 136.75, 136.57, 131.00, 130.26, 129.59, 124.87, 124.67, 123.87, 123.71, 123.50, 79.21, 51.32, 49.35, 47.51, 47.12, 45.74, 35.80, 32.17, 27.95, 27.44, 26.23, 25.91, 25.40, 25.06, 24.92, 24.60, 24.34, 20.63.

**HRMS (ESI) [M+H]<sup>+</sup>** 593.3700, berechnet für C<sub>34</sub>H<sub>49</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>: 593.3697

**HPLC** *t*<sub>R</sub> = 19.45 min, 97.5% Reinheit

**tert-Butyl-(2-(6-(N-(2-(benzylamino)-2-oxoethyl)-4-(dimethylamino)benzamido)-hexanamido)phenyl)carbamate (14c)**



Hergestellt aus **6j\*** (192 mg, 0.45 mmol, 1.2 Äquiv.) und dem Boc-geschützten 1,2-Phenylendiamin **XX** (78 mg, 0.38 mmol, 1 Äquiv.) nach AAV3.

<b>Chemische Formel</b>	C <sub>36</sub> H <sub>45</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>
<b>Molare Masse</b>	615.78 g/mol
<b>Ausbeute</b>	56% eines weißen Feststoffs
<b>Schmelzpunkt</b>	94 °C

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 9.43 (s, 1H), 8.45 (bs, 1H), 8.33 (s, 1H), 7.55 – 6.64 (m, 13H), 4.31 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.98 (bs, 2H), 3.35 – 3.33 (m, 2H), 2.38 – 2.29 (m, 2H), 1.59 – 1.25 (m, 15H)

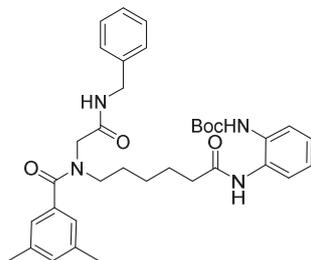
**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 171.54, 171.24, 168.46, 152.95, 150.85, 139.25, 130.99, 129.58, 128.43, 128.26, 128.11, 127.14, 126.65, 124.87, 124.66, 123.71, 123.48, 122.96, 110.83, 79.22, 42.05, 35.78, 33.46, 27.96, 25.75, 24.81, 24.08

**HRMS (ESI) [M+H]<sup>+</sup>** 616.3496, berechnet für C<sub>36</sub>H<sub>46</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>: 616.3493

**HPLC** *t*<sub>R</sub> = 13.97 min, 95.2% Reinheit

**tert-Butyl-(2-(6-(N-(2-(benzylamino)-2-oxoethyl)-3,5-dimethylbenzamido)hexan-amido)phenyl)carbamate (14d)**



Hergestellt aus **6k\*** (484 mg, 1.18 mmol, 1.2 Äquiv.) und dem Boc-geschützten 1,2-Phenylendiamin **XX** (204 mg, 0.98 mmol, 1 Äquiv.) nach AAV3.

<b>Chemische Formel</b>	C <sub>36</sub> H <sub>44</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>
<b>Molare Masse</b>	614.79 g/mol
<b>Ausbeute</b>	61% eines weißen Feststoffs
<b>Schmelzpunkt</b>	73 °C

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 9.44/9.38\* (s, 1H), 8.42 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 8.34/8.30\* (s, 1H), 7.53 – 6.92 (m, 12H), 4.33\*/4.27 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H), 4.07\*/3.85 (s, 2H), 3.40 – 3.18 (m, 2H), 2.38 – 2.21 (m, 2H), 1.68 – 1.12 (m, 15H)

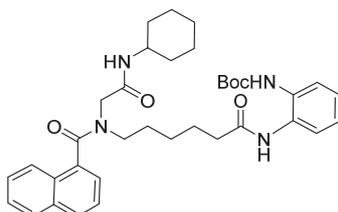
**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 171.73, 171.54, 171.13, 171.08, 168.20, 153.07, 153.03, 139.44, 139.20, 137.44, 137.42, 136.71, 136.47, 131.07, 131.04, 130.49, 130.46, 129.66, 129.63, 128.28, 128.25, 127.24, 127.16, 126.86, 126.73, 125.00, 124.82, 124.01, 123.98, 123.84, 123.62, 79.34, 79.31, 51.41, 49.68, 47.54, 45.78, 42.17, 42.07, 35.91, 35.77, 28.05, 27.62, 26.31, 26.00, 25.46, 25.04, 24.78, 24.69, 20.77

**HRMS (ESI) [M+H]<sup>+</sup>** 601.3385, berechnet für C<sub>36</sub>H<sub>45</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>: 601.3384

**HPLC** *t*<sub>R</sub> = 17.40 min, 95.4% Reinheit

**tert-Butyl-(2-(6-(N-(2-(cyclohexylamino)-2-oxoethyl)-1-naphthamido)hexanamido)-phenyl)carbamate (14e)**



Hergestellt aus **6b\*** (316 mg, 0.51 mmol, 1.2 Äquiv.) und dem Boc-geschützten 1,2-Phenylendiamin **XX** (89 mg, 0.43 mmol, 1 Äquiv.) nach AAV3.

<b>Chemische Formel</b>	C <sub>36</sub> H <sub>46</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>
<b>Molare Masse</b>	614.79 g/mol
<b>Ausbeute</b>	57% eines weißen Feststoffs
<b>Schmelzpunkt</b>	89 °C

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 9.47<sup>\*</sup>/9.30 (s, 1H), 8.36<sup>\*</sup>/8.26 (s, 1H), 8.19 – 7.04 (m, 12H), 4.47 – 2.97 (m, 5H), 2.42<sup>\*</sup>/2.16 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.81 – 0.94 (m, 25H)

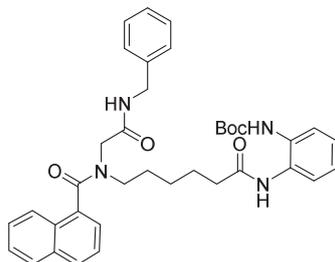
**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 171.74, 171.45, 170.00, 169.98, 166.84, 166.74, 153.09, 153.00, 134.81, 134.54, 132.97, 132.79, 131.08, 130.99, 129.69, 129.60, 129.20, 128.97, 128.59, 128.56, 128.26, 128.12, 126.82, 126.45, 126.32, 125.38, 125.20, 125.14, 125.01, 124.99, 124.86, 124.77, 124.69, 123.86, 123.83, 123.57, 123.39, 79.35, 79.28, 50.93, 49.11, 47.72, 47.46, 46.74, 45.72, 35.95, 35.66, 32.54, 32.15, 28.07, 28.01, 27.53, 26.58, 26.17, 25.38, 25.23, 25.10, 25.06, 24.61, 24.56, 24.37

**HRMS (ESI) [M+H]<sup>+</sup>** 615.3550, berechnet für C<sub>36</sub>H<sub>47</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>: 615.3541

**HPLC** *t*<sub>R</sub> = 19.94 min, 96.2% Reinheit

**tert-Butyl-(2-(6-(N-(2-(benzylamino)-2-oxoethyl)-1-naphthamido)hexanamido)-phenyl)carbammat (14f)**



Hergestellt aus **13f** (325 mg, 0.73 mmol, 1.2 Äquiv.) und dem Boc-geschützten 1,2-Phenylendiamin **XX** (127 mg, 0.61 mmol, 1 Äquiv.) nach AAV3.

<b>Chemische Formel</b>	$C_{37}H_{42}N_4O_5$
<b>Molare Masse</b>	622.77 g/mol
<b>Ausbeute</b>	71% eines weißen Feststoffs
<b>Schmelzpunkt</b>	93 °C

**$^1H$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )**

$\delta$  (ppm): 9.47<sup>\*</sup>/9.31 (s, 1H), 8.58/8.23<sup>\*</sup> (t,  $J = 5.9$  Hz), 8.36<sup>\*</sup>/8.27 (s, 1H), 8.16 – 7.04 (m, 17H), 4.51 – 3.02 (m, 6H), 2.42<sup>\*</sup>/2.15 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 1.75 – 0.98 (m, 15H)

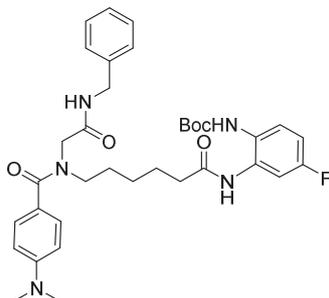
**$^{13}C$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )**

$\delta$  (ppm): 171.75, 171.46, 170.07, 170.03, 168.17, 167.90, 153.10, 153.01, 139.34, 139.02, 134.68, 134.48, 132.99, 132.82, 131.09, 131.00, 129.69, 129.60, 129.24, 128.93, 128.66, 128.62, 128.30, 128.22, 128.15, 127.26, 127.18, 126.91, 126.82, 126.46, 126.40, 125.33, 125.19, 125.17, 125.00, 124.87, 124.78, 124.63, 123.86, 123.84, 123.58, 123.46, 79.36, 79.29, 50.92, 49.38, 47.10, 45.76, 42.22, 42.05, 35.96, 35.68, 28.08, 28.01, 27.62, 26.56, 26.17, 25.39, 25.06, 24.61

**HRMS (ESI) [M+H]<sup>+</sup>** 565.3386, berechnet für  $C_{32}H_{45}N_4O_5$ : 565.3384

**HPLC**  $t_R = 18.66$  min, 96.2% Reinheit

**tert-Butyl-(2-(6-(N-(2-(benzylamino)-2-oxoethyl)-4-(dimethylamino)benzamido)-hexanamido)-4-fluorophenyl)carbammat (14g)**



Hergestellt aus **6j\*** (294 mg, 0.69 mmol, 1.2 Äquiv.) und dem Boc-geschützten 1,2-Phenylendiaminderivat **XXII** (130 mg, 0.58 mmol, 1 Äquiv.) nach AAV3.

<b>Chemische Formel</b>	C <sub>35</sub> H <sub>44</sub> FN <sub>5</sub> O <sub>5</sub>
<b>Molare Masse</b>	633.33 g/mol
<b>Ausbeute</b>	70% eines weißen Feststoffs
<b>Schmelzpunkt</b>	85 °C

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 9.36 (s, 1H), 8.51 – 8.38 (m, 2H), 7.50 – 6.63 (m, 12H), 4.31 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 3.98 (bs, 2H), 2.92 (s, 6H), 2.38 – 2.30 (m, 2H), 1.58 – 1.17 (m, 15H)

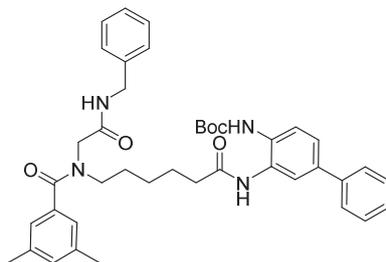
**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 171.57, 171.28, 168.52, 159.17, 157.26, 153.29, 150.88, 139.29, 131.89, 128.31, 128.17, 127.18, 126.70, 126.15, 125.74, 122.95, 110.86, 110.70, 79.34, 42.07, 35.96, 28.00, 27.15, 25.84, 24.70

**HRMS (ESI) [M+H]<sup>+</sup>** 634.3410, berechnet für C<sub>35</sub>H<sub>45</sub>FN<sub>5</sub>O<sub>5</sub>: 634.3399

**HPLC** *t*<sub>R</sub> = 14.65 min, 95.0% Reinheit

**tert-Butyl-(3-(6-(N-(2-(benzylamino)-2-oxoethyl)-3,5-dimethylbenzamido)hexan-amido)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)carbamate (14h)**



Hergestellt aus **6k\*** (239 mg, 0.54 mmol, 1.2 Äquiv.) und dem Boc-geschützten 1,2-Phenylendiaminderivat **XXVI** (128 mg, 0.45 mmol, 1 Äquiv.) nach AAV3.

<b>Chemische Formel</b>	C <sub>41</sub> H <sub>48</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>
<b>Molare Masse</b>	676.86 g/mol
<b>Ausbeute</b>	68% eines rosa Feststoffs
<b>Schmelzpunkt</b>	138 °C

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 9.52/9.45\* (s, 1H), 8.47 – 8.43 (m, 2H), 7.77 – 6.92 (m, 16H), 4.34\*/4.27 (d, *J* = 5.2 Hz, 2H), 4.09\*/3.86 (s, 2H), 3.41 – 3.22 (m, 2H), 2.42 – 2.20 (m, 2H), 1.67 – 1.15 (m, 15H)

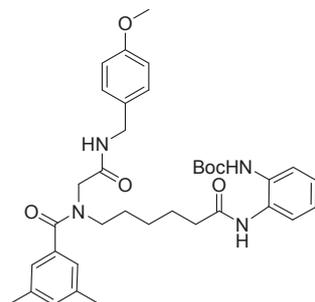
**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 171.87, 171.69, 171.14, 171.10, 168.20, 168.17, 153.05, 153.02, 139.44, 139.20, 137.41, 136.70, 136.47, 135.62, 130.46, 130.39, 129.87, 128.95, 128.27, 128.25, 127.28, 127.24, 127.16, 126.85, 126.73, 126.33, 124.02, 123.98, 123.84, 123.84, 123.18, 122.83, 79.50, 51.42, 49.69, 47.56, 45.79, 42.17, 42.08, 35.98, 35.85, 28.07, 27.65, 26.33, 26.04, 25.52, 25.00, 24.67, 20.76

**HRMS (ESI) [M+H]<sup>+</sup>** 677.3702, berechnet für C<sub>41</sub>H<sub>49</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>: 677.3697

<b>CHN</b>	Gesucht (%):	C 72.76, H 7.15, N 8.28
	Gefunden (%):	C 72.52, H 7.36, N 7.99

**tert-Butyl-(2-(6-(N-(2-((4-methoxybenzyl)amino)-2-oxoethyl)-3,5-dimethylbenz-amido)hexanamido)phenyl)carbamate (14i)**



Hergestellt aus **13g** (352 mg, 0.80 mmol, 1.2 Äquiv.) und dem Boc-geschützten 1,2-Phenylendiamin **XX** (139 mg, 0.67 mmol, 1 Äquiv.) nach AAV3.

<b>Chemische Formel</b>	C <sub>36</sub> H <sub>46</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>
<b>Molare Masse</b>	630.79 g/mol
<b>Ausbeute</b>	60% eines weißen Feststoffs
<b>Schmelzpunkt</b>	77 °C

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 9.44/9.38\* (s, 1H), 8.35 – 8.30 (m, 2H), 7.53 – 6.85 (m, 11H), 4.26\*/4.19 (d, *J* = 4.8 Hz, 2H), 4.05\*/3.82 (s, 2H), 3.71 (s, 3H), 3.39 – 3.20 (m, 2H), 2.38 – 2.21 (m, 8H), 1.64 – 1.12 (m, 15H)

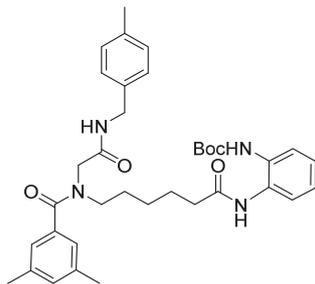
**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 171.73, 171.55, 171.11, 171.07, 168.02, 167.99, 158.27, 158.20, 153.06, 137.44, 137.40, 136.70, 136.49, 131.34, 131.15, 131.07, 130.46, 129.65, 128.65, 128.51, 125.00, 124.82, 123.99, 123.83, 123.61, 113.67, 79.33, 79.31, 55.04, 51.40, 49.65, 47.48, 45.75, 41.63, 41.55, 35.91, 35.77, 28.05, 27.60, 26.30, 25.99, 25.47, 25.04, 24.69, 20.76

**HRMS (ESI) [M+H]<sup>+</sup>** 631.3489, berechnet für C<sub>36</sub>H<sub>46</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>: 631.3490

**HPLC** *t*<sub>R</sub> = 18.48 min, 99.5% Reinheit

**tert-Butyl-(2-(6-(3,5-dimethyl-N-(2-((4-methylbenzyl)amino)-2-oxoethyl)benz-amido)hexanamido)phenyl)carbamate (14j)**



Hergestellt aus **13h** (242 mg, 0.57 mmol, 1.2 Äquiv.) und dem Boc-geschützten 1,2-Phenylendiamin **XX** (100 mg, 0.48 mmol, 1 Äquiv.) nach AAV3.

<b>Chemische Formel</b>	C <sub>36</sub> H <sub>46</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>
<b>Molare Masse</b>	614.79 g/mol
<b>Ausbeute</b>	60% eines weißen Feststoffs
<b>Schmelzpunkt</b>	78 °C

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 9.45/9.38\* (s, 1H), 8.37 – 8.30 (m, 2H), 7.54 – 6.92 (m, 11H), 4.28\*/4.22 (d, *J* = 5.3 Hz, 2H), 4.06\*/3.83 (s, 2H), 3.40 – 3.19 (m, 2H), 2.38 – 2.21 (m, 11H), 1.64 – 1.12 (m, 15H)

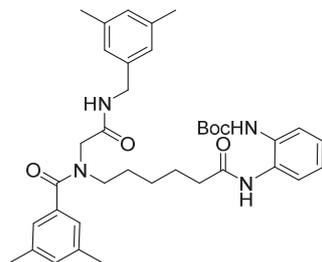
**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 171.73, 171.54, 171.11, 171.08, 168.09, 168.05, 153.06, 153.03, 137.44, 137.40, 136.71, 136.48, 136.38, 136.16, 135.93, 135.77, 131.07, 131.04, 130.47, 130.46, 129.65, 129.62, 128.80, 127.25, 127.18, 124.99, 124.81, 123.99, 123.83, 123.62, 79.33, 79.30, 51.40, 49.65, 47.49, 45.76, 41.92, 41.85, 35.91, 35.78, 28.05, 27.60, 26.30, 26.00, 25.47, 25.04, 24.70, 20.75, 20.64

**HRMS (ESI) [M+H]<sup>+</sup>** 615.3547, berechnet für C<sub>36</sub>H<sub>47</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>: 615.3541

<b>CHN</b>	Gesucht (%):	C 70.33, H 7.54, N 9.11
	Gefunden (%):	C 70.08, H 7.63, N 8.83

**tert-Butyl-(2-(6-(N-(2-((3,5-dimethylbenzyl)amino)-2-oxoethyl)-3,5-dimethylbenz-amido)hexanamido)phenyl)carbamate (14k)**



Hergestellt aus **13i** (193 mg, 0.44 mmol, 1.2 Äquiv.) und dem Boc-geschützten 1,2-Phenylendiamin **XX** (77 mg, 0.37 mmol, 1 Äquiv.) nach AAV3.

<b>Chemische Formel</b>	C <sub>37</sub> H <sub>48</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>
<b>Molare Masse</b>	628.81 g/mol
<b>Ausbeute</b>	59% eines weißen Feststoffs
<b>Schmelzpunkt</b>	75 °C

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 9.44/9.38\* (s, 1H), 8.36 – 8.30 (m, 2H), 7.53 – 6.81 (m, 10H), 4.25\*/4.19 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H), 4.07\*/3.84 (s, 2H), 3.39 – 3.21 (m, 2H), 2.37 – 2.21 (m, 14H), 1.64 – 1.13 (m, 15H)

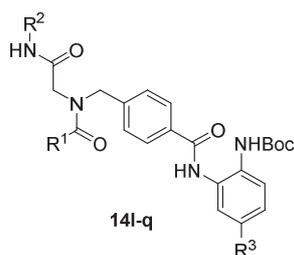
**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 171.71, 171.52, 171.10, 171.07, 168.06, 153.06, 153.04, 139.17, 138.91, 137.44, 137.37, 137.22, 137.16, 136.67, 136.49, 131.05, 130.48, 130.46, 129.64, 128.27, 128.11, 125.20, 124.99, 124.81, 124.03, 123.83, 123.61, 79.33, 79.31, 51.40, 49.66, 47.51, 45.68, 42.19, 42.02, 35.90, 35.77, 28.04, 27.60, 26.28, 26.01, 25.48, 25.02, 24.68, 20.89, 20.75, 20.72

**HRMS (ESI) [M+H]<sup>+</sup>** 629.3697, berechnet für C<sub>37</sub>H<sub>49</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>: 629.3697

**HPLC** *t*<sub>R</sub> = 18.92 min, 98.2% Reinheit

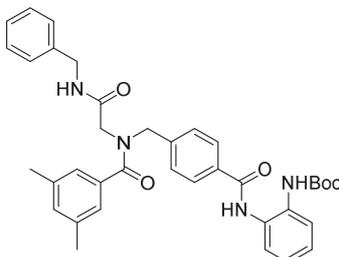
#### AAV4: Synthese der Verbindungen 14l-q



Lithiumhydroxid Monohydrat (211 mg, 5.04 mmol, 4 Äquiv.) wird zum entsprechenden in Tetrahydrofuran (5 mL) gelösten Ester **13j-I** (1.30 mmol, 1 Äquiv.) gegeben und das Reaktionsgemisch für 16 h bei RT gerührt. Anschließend wird die Lösung mit 1M Salzsäure auf pH ~ 1 angesäuert, mit Ethylacetat (3 x 20 mL) extrahiert und mit gesättigter NaCl-Lösung (3 x 20 mL) gewaschen. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt. Zu der entsprechenden Carbonsäure (0.60 mmol, 1 Äquiv.), gelöst in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/DMF (1:1, v/v, 10 mL), wird EDC·HCl (218 mg, 1.10 mmol, 2 Äquiv.) und DMAP (28 mg, 0.40 mmol, 0.4 Äquiv.) gegeben und 10 min gerührt. Anschließend wird das entsprechende Boc-geschützte 1,2-Phenylendiaminderivat (0.60 mmol, 1 Äquiv.) zur Reaktionslösung gegeben und 24 h bei RT gerührt. Nach Reaktionsende wird die Lösung mit Wasser (10 mL) versetzt und mit Ethylacetat (3 x 20 mL) extrahiert. Anschließend werden die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter NaCl-Lösung (3 x 20 mL) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie (*n*-Hexan:EtOAc, Gradient: 100:00 → 40:60 in 30 min) gereinigt und aus Ethylacetat und *n*-Hexan ausgefällt.



**tert-Butyl-(2-(4-((N-(2-(benzylamino)-2-oxoethyl)-3,5-dimethylbenzamido)methyl)-benzamido)phenyl)carbamat (14m)**



Hergestellt aus **13k** (334 mg, 0.75 mmol, 1.2 Äquiv.) und dem Boc-geschützten 1,2-Phenylendiamin **XX** (130 mg, 0.63 mmol, 1 Äquiv.) nach AAV4.

<b>Chemische Formel</b>	C <sub>37</sub> H <sub>40</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>
<b>Molare Masse</b>	620.75 g/mol
<b>Ausbeute</b>	62% eines weißen Feststoffs
<b>Schmelzpunkt</b>	122 °C

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 9.84 (s, 1H), 8.68 (s, 1H), 8.46<sup>\*</sup>/8.41 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 7.97 – 7.03 (m, 16H), 4.74/4.61<sup>\*</sup> (s, 2H), 4.34<sup>\*</sup>/4.29 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 4.02<sup>\*</sup>/3.82 (s, 2H), 2.25 (s, 6H), 1.45 (s, 9H)

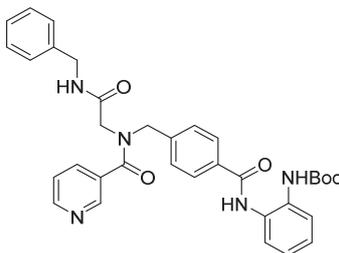
**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 171.63, 171.60, 167.78, 167.64, 165.10, 164.96, 153.46, 141.35, 141.06, 139.30, 139.10, 137.61, 136.01, 135.85, 133.31, 133.18, 131.76, 131.73, 130.90, 130.84, 129.73, 128.31, 128.27, 127.98, 127.86, 127.83, 127.25, 127.16, 127.03, 126.91, 126.78, 126.06, 126.02, 125.62, 124.11, 124.08, 123.85, 79.65, 53.21, 51.06, 48.68, 47.53, 42.19, 42.09, 28.03, 20.79

**HRMS (ESI) [M+H]<sup>+</sup>** 621.3067, berechnet für C<sub>37</sub>H<sub>41</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>: 621.3071

<b>CHN</b>	Gesucht (%):	C 71.59, H 6.50, N 9.03
	Gefunden (%):	C 71.16, H 6.71, N 8.76

**tert-Butyl-(2-(4-((N-(2-(benzylamino)-2-oxoethyl)nicotinamido)methyl)benz-amido)phenyl)carbamate (14n)**



Hergestellt aus **13I** (210 mg, 0.52 mmol, 1.2 Äquiv.) und dem Boc-geschützten 1,2-Phenylendiamin **XX** (90 mg, 0.43 mmol, 1 Äquiv.) nach AAV4.

<b>Chemische Formel</b>	C <sub>34</sub> H <sub>35</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>
<b>Molare Masse</b>	593.68 g/mol
<b>Ausbeute</b>	25% eines weißen Feststoffs
<b>Schmelzpunkt</b>	115 °C

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 9.85 (s, 1H), 8.69 – 8.13 (m, 19H), 4.76/4.66\* (s, 2H), 4.35\*/4.25 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H), 4.09\*/3.89 (s, 2H), 1.44 (s, 9H)

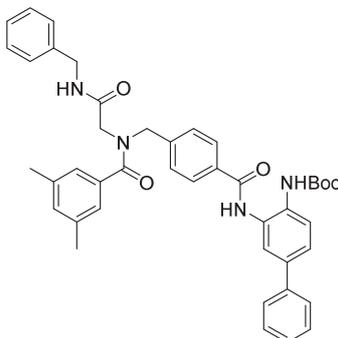
**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 169.54, 169.31, 167.58, 167.39, 165.09, 164.96, 153.44, 150.70, 150.47, 147.41, 147.10, 140.98, 140.68, 139.26, 138.83, 134.48, 134.42, 133.42, 133.22, 131.95, 131.76, 129.69, 128.32, 128.05, 127.89, 127.84, 127.23, 127.16, 126.92, 126.79, 126.05, 125.63, 124.08, 123.82, 123.57, 123.43, 79.65, 53.35, 51.27, 49.14, 48.19, 42.25, 42.11, 28.03

**HRMS (ESI) [M+H]<sup>+</sup>** 594.2708, berechnet für C<sub>34</sub>H<sub>36</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>: 594.2711

**HPLC** *t*<sub>R</sub> = 13.48 min, 96.1% Reinheit

**tert-Butyl-(3-(4-((N-(2-(benzylamino)-2-oxoethyl)-3,5-dimethylbenzamido)methyl)-benzamido)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)carbamat (14o)**



Hergestellt aus **13k** (226 mg, 0.52 mmol, 1.2 Äquiv.) und dem Boc-geschützten 1,2-Phenylendiaminderivat **XXVI** (123 mg, 0.43 mmol, 1 Äquiv.) nach AAV4.

<b>Chemische Formel</b>	C <sub>43</sub> H <sub>44</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>
<b>Molare Masse</b>	696.85 g/mol
<b>Ausbeute</b>	65% eines rosa Feststoffs
<b>Schmelzpunkt</b>	199 °C

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 9.93 (s, 1H), 8.78 (s, 1H), 8.46<sup>\*</sup>/8.42 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.99 – 7.03 (m, 20H), 4.75/4.62<sup>\*</sup> (s, 2H), 4.34<sup>\*</sup>/4.29 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 4.02<sup>\*</sup>/3.82 (s, 2H), 2.25 (s, 6H), 1.47 (s, 9H)

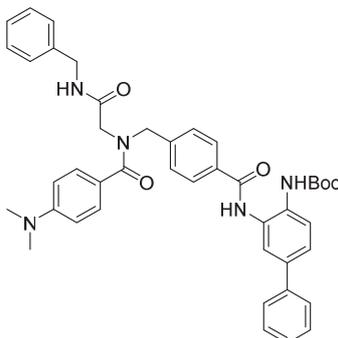
**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 171.62, 171.61, 167.78, 167.65, 165.28, 165.12, 153.41, 141.42, 141.11, 139.32, 139.10, 137.62, 136.01, 135.85, 133.29, 133.15, 131.20, 131.15, 130.90, 130.84, 129.90, 128.99, 128.31, 128.27, 128.05, 127.92, 127.83, 127.36, 127.25, 127.17, 127.04, 126.91, 126.77, 126.37, 124.12, 124.08, 123.82, 79.79, 53.24, 51.08, 48.71, 47.55, 42.19, 42.09, 28.04, 20.79

**HRMS (ESI) [M+H]<sup>+</sup>** 697.3380, berechnet für C<sub>43</sub>H<sub>45</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>: 697.3384

**HPLC** *t*<sub>R</sub> = 20.30 min, 98.0% Reinheit

**tert-Butyl-(3-(4-((N-(2-(benzylamino)-2-oxoethyl)-4-(dimethylamino)benzamido)-methyl)benzamido)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)carbamate (14p)**



Hergestellt aus **13j** (239 mg, 0.54 mmol, 1.2 Äquiv.) und dem Boc-geschützten 1,2-Phenylendiaminderivat **XXVI** (128 mg, 0.45 mmol, 1 Äquiv.) nach AAV4.

<b>Chemische Formel</b>	C <sub>43</sub> H <sub>45</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>
<b>Molare Masse</b>	711.34 g/mol
<b>Ausbeute</b>	65% eines rosa Feststoffs
<b>Schmelzpunkt</b>	203 °C

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 9.93 (s, 1H), 8.77 (s, 1H), 8.52 – 8.43 (m, 1H), 7.99 – 6.66 (m, 21H), 4.74 (bs, 2H), 4.32 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.93 (bs, 2H), 2.94 (s, 6H), 1.47 (s, 9H)

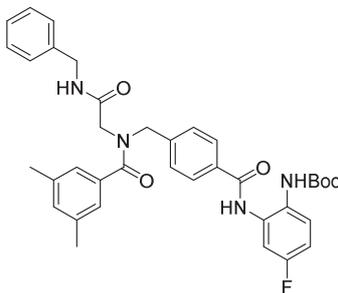
**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 171.77, 168.18, 165.28, 153.40, 151.27, 141.71, 139.32, 135.83, 133.12, 131.20, 129.88, 128.99, 128.60, 128.30, 127.98, 127.94, 127.37, 127.30, 126.86, 126.37, 124.12, 124.05, 123.83, 110.96, 79.80, 42.14, 28.05

**HRMS (ESI) [M+H]<sup>+</sup>** 712.3490, berechnet für C<sub>43</sub>H<sub>46</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>: 712.3493

<b>CHN</b>	Gesucht (%):	C 72.55, H 6.37, N 9.84
	Gefunden (%):	C 72.28, H 6.40, N 9.71

**tert-Butyl-(2-(4-((N-(2-(benzylamino)-2-oxoethyl)-3,5-dimethylbenzamido)-methyl)benzamido)-4-fluorophenyl)carbamat (14q)**



Hergestellt aus **13k** (325 mg, 0.75 mmol, 1.2 Äquiv.) und dem Boc-geschützten 1,2-Phenylendiaminderivat **XXII** (141 mg, 0.63 mmol, 1 Äquiv.) nach AAV4.

<b>Chemische Formel</b>	C <sub>37</sub> H <sub>39</sub> FN <sub>4</sub> O <sub>5</sub>
<b>Molare Masse</b>	638.74 g/mol
<b>Ausbeute</b>	65% eines weißen Feststoffs
<b>Schmelzpunkt</b>	191 °C

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 9.82 (s, 1H), 8.79 (bs, 1H), 8.46<sup>\*</sup>/8.41 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 7.95 – 7.03 (m, 15H), 4.74/4.61<sup>\*</sup> (s, 2H), 4.33<sup>\*</sup>/4.28 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 4.01<sup>\*</sup>/3.81 (s, 2H), 2.25 (s, 6H), 1.45 (s, 9H)

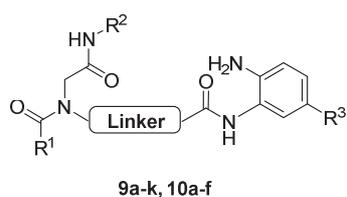
**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 171.61, 167.78, 167.63, 165.09, 164.92, 159.16, 157.57, 153.70, 141.58, 141.29, 139.31, 139.10, 137.62, 136.00, 135.83, 133.14, 133.01, 131.84, 131.77, 130.91, 130.85, 128.31, 128.27, 127.98, 127.85, 127.34, 127.25, 127.17, 127.06, 126.91, 126.78, 125.89, 124.08, 111.97, 111.89, 111.81, 111.72, 111.64, 79.74, 53.22, 51.09, 48.71, 47.56, 42.19, 42.09, 28.03, 20.79

**HRMS (ESI) [M+H]<sup>+</sup>** 639.2979, berechnet für C<sub>37</sub>H<sub>40</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>5</sub>: 639.2977

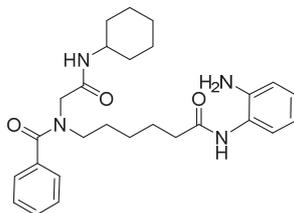
<b>CHN</b>	Gesucht (%):	C 69.58, H 6.15, N 8.77
	Gefunden (%):	C 69.81, H 6.21, N 8.78

## AAV5: Synthese der Verbindungen 9a-k, 10a-f



Die entsprechende Boc-geschützte Verbindung **14a-q** (0.08 mmol, 1 Äquiv.) wird in 15%iger TFA-Lösung in Dichlormethan (5 mL) gelöst und 30 min bei RT gerührt. Nach dem Reaktionsende wird tropfenweise gesättigte Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung hinzugegeben bis keine Blasenbildung mehr erfolgt. Die Reaktionslösung wird mit Dichlormethan (3 x 15 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 1M Natriumhydroxid-Lösung (3 x 10 mL) und gesättigter NaCl-Lösung (3 x 10 mL) gewaschen. Anschließend wird über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt. Das Produkt wird aus Ethylacetat und *n*-Hexan ausgefällt.

***N*-(6-((2-Aminophenyl)amino)-6-oxohexyl)-*N*-(2-(cyclohexylamino)-2-oxoethyl)-benzamid (9a)**



Hergestellt aus **14a** (190 mg, 0.34 mmol, 1 Äquiv.) und 15%iger TFA-Lösung in Dichlormethan (15 mL) nach AAV5.

<b>Chemische Formel</b>	C <sub>27</sub> H <sub>36</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>
<b>Molare Masse</b>	464.61 g/mol
<b>Ausbeute</b>	52% eines weißen Feststoffs
<b>Schmelzpunkt</b>	144 °C

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 9.11/9.04\* (s, 1H), 7.81 – 6.52 (m, 10H), 4.81/4.78\* (s, 2H), 4.01\*/3.74 (s, 2H), 3.56 – 3.16 (m, 3H), 2.33/2.22\* (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.75 – 1.07 (m, 16H)

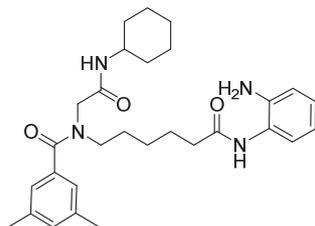
**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 171.24, 171.05, 167.10, 141.94, 136.85, 129.23, 129.21, 128.41, 128.27, 126.52, 126.42, 125.78, 125.35, 123.61, 116.25, 115.97, 51.47, 49.63, 47.67, 47.28, 45.86, 35.79, 35.62, 32.48, 32.28, 27.57, 26.43, 26.18, 25.67, 25.25, 24.87, 24.59, 24.50

**HRMS (ESI) [M+H]<sup>+</sup>** 465.2868, berechnet für C<sub>27</sub>H<sub>37</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>: 465.2860

**HPLC** *t*<sub>R</sub> = 11.81 min, 98.5% Reinheit

***N*-(6-((2-Aminophenyl)amino)-6-oxohexyl)-*N*-(2-(cyclohexylamino)-2-oxoethyl)-3,5-dimethylbenzamid (9b)**



Hergestellt aus **14b** (50 mg, 0.08 mmol, 1 Äquiv.) und 15%iger TFA-Lösung in Dichlormethan (5 mL) nach AAV5.

<b>Chemische Formel</b>	C <sub>29</sub> H <sub>40</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>
<b>Molare Masse</b>	492.66 g/mol
<b>Ausbeute</b>	63% eines weißen Feststoffs
<b>Schmelzpunkt</b>	85 °C

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 9.09/9.02\* (s, 1H), 7.78\*/7.74 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.16 – 6.51 (m, 7H), 4.81/4.78\* (s, 2H), 3.98\*/3.73 (s, 2H), 3.58 – 3.49 (m, 1H), 3.37 – 3.16 (m, 2H), 2.34 – 2.24 (m, 8H), 1.75 – 1.09 (m, 16H)

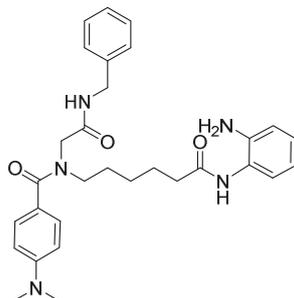
**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 171.13, 171.05, 167.17, 141.89, 141.86, 137.52, 137.51, 137.34, 136.82, 133.06, 130.41, 125.72, 125.69, 125.29, 125.22, 124.00, 123.96, 123.58, 116.16, 115.89, 51.35, 51.34, 47.61, 47.56, 45.88, 45.84, 35.74, 35.62, 32.45, 32.30, 27.53, 27.26, 26.35, 26.16, 25.64, 25.62, 25.20, 25.15, 24.86, 24.83, 24.55, 24.48, 20.79

**HRMS (ESI) [M+H]<sup>+</sup>** 493.3178, berechnet für C<sub>29</sub>H<sub>40</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>: 493.3173

**HPLC** *t*<sub>R</sub> = 12.58 min, 98.6% Reinheit

***N*-6-((2-Aminophenyl)amino)-6-oxohexyl)-*N*-(2-(benzylamino)-2-oxoethyl)-4-(dimethylamino)benzamid (9c)**



Hergestellt aus **14c** (90 mg, 0.15 mmol, 1 Äquiv.) und 15%iger TFA-Lösung in Dichlormethan (10 mL) nach AAV5.

<b>Chemische Formel</b>	C <sub>30</sub> H <sub>37</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>
<b>Molare Masse</b>	515.66 g/mol
<b>Ausbeute</b>	42% eines weißen Feststoffs
<b>Schmelzpunkt</b>	139 °C

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 9.22 (bs, 1H), 8.54 (bs, 1H), 7.33 – 6.51 (m, 13H), 4.85 (s, 2H), 4.31 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H), 4.00 (m, 2H), 2.92 (s, 6H), 2.30 (m, 2H), 1.60 – 1.15 (m, 6H)

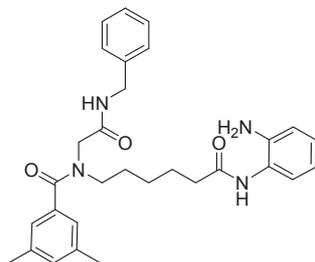
**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 171.34, 171.07, 168.62, 150.92, 141.81, 139.41, 128.43, 128.25, 127.24, 126.78, 125.56, 125.16, 123.64, 116.07, 115.84, 110.92, 42.11, 40.06, 39.76, 35.63, 25.98, 25.52, 25.05

**HRMS (ESI) [M+H]<sup>+</sup>** 516.2971, berechnet für C<sub>30</sub>H<sub>38</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>: 516.2969

**HPLC** *t*<sub>R</sub> = 9.30 min, 95.1% Reinheit

***N*-(6-((2-Aminophenyl)amino)-6-oxohexyl)-*N*-(2-(benzylamino)-2-oxoethyl)-3,5-dimethylbenzamid (9d)**



Hergestellt aus **14d** (150 mg, 0.16 mmol, 1 Äquiv.) und 15%iger TFA-Lösung in Dichlormethan (10 mL) nach AAV5.

<b>Chemische Formel</b>	C <sub>30</sub> H <sub>36</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>
<b>Molare Masse</b>	500.64 g/mol
<b>Ausbeute</b>	60% eines weißen Feststoffs
<b>Schmelzpunkt</b>	147 °C

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 9.11/9.05\* (s, 1H), 8.44 – 8.43 (m, 1H), 7.32 – 6.52 (m, 12H), 4.82/4.79\* (s, 2H), 4.34\*/4.27 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 4.08\*/3.86 (s, 2H), 3.40 – 3.20 (m, 2H), 2.35 – 2.22 (m, 8H), 1.64 – 1.12 (m, 6H)

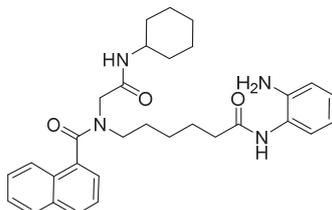
**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 171.10, 170.93, 168.21, 141.88, 141.85, 139.44, 139.21, 137.46, 137.42, 136.72, 136.48, 130.50, 130.45, 128.28, 128.25, 127.23, 127.15, 126.86, 126.74, 125.67, 125.26, 125.21, 124.04, 123.98, 123.59, 123.54, 116.15, 115.88, 51.38, 49.68, 47.52, 45.76, 42.17, 42.07, 35.73, 35.62, 27.62, 26.32, 26.14, 25.61, 25.18, 24.84, 20.78

**HRMS (ESI) [M+H]<sup>+</sup>** 501.2866, berechnet für C<sub>30</sub>H<sub>37</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>: 501.2860

**HPLC** *t*<sub>R</sub> = 12.83 min, 96.4% Reinheit

***N*-(6-((2-Aminophenyl)amino)-6-oxohexyl)-*N*-(2-(cyclohexylamino)-2-oxoethyl)-1-naphthamid (9e)**



Hergestellt aus **14e** (100 mg, 0.16 mmol, 1 Äquiv.) und 15%iger TFA-Lösung in Dichlormethan (10 mL) nach AAV5.

<b>Chemische Formel</b>	C <sub>31</sub> H <sub>38</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>
<b>Molare Masse</b>	514.67 g/mol
<b>Ausbeute</b>	80% eines weißen Feststoffs
<b>Schmelzpunkt</b>	171 °C

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 9.12<sup>\*</sup>/8.98 (s, 1H), 8.21 – 6.51 (m, 12H), 4.83<sup>\*</sup>/4.76 (s, 2H), 4.48 – 2.97 (m, 5H), 2.38<sup>\*</sup>/2.13 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.82 – 0.94 (m, 16H)

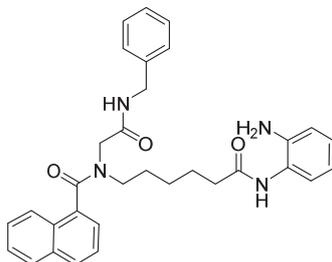
**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 171.11, 170.85, 170.02, 169.99, 166.85, 166.74, 141.88, 141.81, 134.83, 134.56, 132.96, 132.77, 129.20, 128.97, 128.55, 128.23, 128.12, 126.82, 126.46, 126.32, 125.66, 125.39, 125.28, 125.25, 125.19, 125.14, 124.72, 123.58, 123.50, 123.44, 116.15, 116.13, 115.88, 115.86, 50.91, 49.07, 47.72, 47.46, 46.67, 45.69, 35.76, 35.50, 32.53, 32.15, 27.50, 26.58, 26.30, 25.51, 25.23, 25.18, 25.10, 24.76, 24.55, 24.38

**HRMS (ESI) [M+H]<sup>+</sup>** 515.3021, berechnet für C<sub>31</sub>H<sub>39</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>: 515.3017

**HPLC** *t*<sub>R</sub> = 13.10 min, 98.4% Reinheit

***N*-(6-((2-Aminophenyl)amino)-6-oxohexyl)-*N*-(2-(benzylamino)-2-oxoethyl)-1-naphthamid (9f)**



Hergestellt aus **14f** (120 mg, 0.19 mmol, 1 Äquiv.) und 15%iger TFA-Lösung in Dichlormethan (10 mL) nach AAV5.

<b>Chemische Formel</b>	C <sub>32</sub> H <sub>34</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>
<b>Molare Masse</b>	522.65 g/mol
<b>Ausbeute</b>	81% eines weißen Feststoffs
<b>Schmelzpunkt</b>	148 °C

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 9.13<sup>\*</sup>/8.98 (m, 1H), 8.58/8.23<sup>\*</sup> (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 8.17 – 6.51 (m, 16H), 4.83<sup>\*</sup>/4.76 (s, 2H), 4.52 – 3.01 (m, 6H), 2.39<sup>\*</sup>/2.14 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.75 – 0.97 (m, 6H)

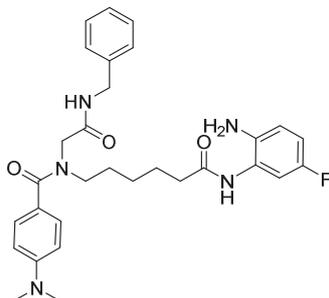
**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 171.12, 170.86, 170.08, 170.04, 168.18, 167.91, 141.89, 141.82, 139.34, 139.02, 134.70, 134.50, 132.80, 131.48, 129.23, 128.64, 128.61, 128.31, 128.23, 127.25, 127.17, 126.84, 126.81, 126.47, 126.40, 125.69, 125.67, 125.33, 125.29, 125.24, 125.21, 123.59, 123.58, 123.50, 116.14, 115.89, 52.10, 50.90, 49.34, 47.03, 42.21, 42.04, 35.76, 35.51, 27.59, 26.55, 26.30, 25.52, 25.18, 24.77

**HRMS (ESI) [M+H]<sup>+</sup>** 523.2702, berechnet für C<sub>32</sub>H<sub>35</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>: 523.2704

**HPLC** *t*<sub>R</sub> = 12.73 min, 97.7% Reinheit

***N*-(6-((2-Amino-5-fluorphenyl)amino)-6-oxohexyl)-*N*-(2-(benzylamino)-2-oxoethyl)-4-(dimethylamino)benzamid (9g)**



Hergestellt aus **14g** (70 mg, 0.11 mmol, 1 Äquiv.) und 15%iger TFA-Lösung in Dichlormethan (10 mL) nach AAV5.

<b>Chemische Formel</b>	C <sub>30</sub> H <sub>36</sub> FN <sub>5</sub> O <sub>3</sub>
<b>Molare Masse</b>	533.65 g/mol
<b>Ausbeute</b>	70% eines grauen Feststoffs
<b>Schmelzpunkt</b>	76 °C

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 9.08 (s, 1H), 8.45 (s, 1H), 7.33 – 6.64 (m, 12H), 4.77 (s, 2H), 4.31 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H), 4.06 – 3.92 (m, 2H), 2.92 (s, 6H), 2.36 – 2.28 (m, 2H), 1.58 – 1.15 (m, 6H)

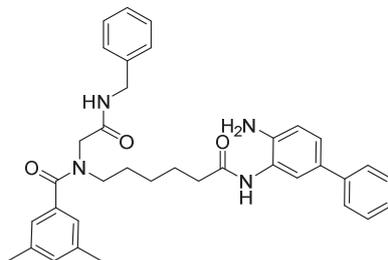
**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 171.34, 171.21, 168.60, 154.48, 152.96, 150.92, 139.37, 137.17, 128.41, 128.25, 127.24, 126.79, 124.40, 124.34, 122.98, 116.09, 116.03, 111.38, 111.24, 110.90, 110.63, 110.46, 110.41, 42.10, 40.06, 39.74, 35.80, 25.99, 24.95, 23.29

**HRMS (ESI) [M+H]<sup>+</sup>** 534.2882, berechnet für C<sub>30</sub>H<sub>37</sub>FN<sub>5</sub>O<sub>3</sub>: 534.2875

**HPLC** *t*<sub>R</sub> = 10.38 min, 95.9% Reinheit

***N*-(6-((4-Amino-[1,1'-biphenyl]-3-yl)amino)-6-oxohexyl)-*N*-(2-(benzylamino)-2-oxoethyl)-3,5-dimethylbenzamid (9h)**



Hergestellt aus **14h** (126 mg, 0.19 mmol, 1 Äquiv.) und 15%iger TFA-Lösung in Dichlormethan (10 mL) nach AAV5.

<b>Chemische Formel</b>	C <sub>36</sub> H <sub>40</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>
<b>Molare Masse</b>	576.74 g/mol
<b>Ausbeute</b>	79% eines braunen Feststoffs
<b>Schmelzpunkt</b>	92 °C

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 9.18/9.11\* (s, 1H), 8.47 – 8.39 (m, 1H), 7.56 – 6.80 (m, 16H), 5.03/5.00\* (s, 2H), 4.34\*/4.28 (d, *J* = 5.3 Hz, 2H), 4.09\*/3.87 (s, 2H), 3.42 – 3.21 (m, 2H), 2.39 – 2.21 (m, 8H), 1.67 – 1.14 (m, 6H)

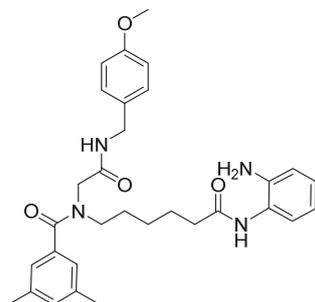
**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 171.28, 171.25, 171.14, 171.10, 168.21, 168.19, 141.40, 140.34, 139.44, 139.20, 137.44, 137.41, 136.72, 136.47, 130.48, 130.44, 128.75, 128.27, 128.25, 128.08, 127.23, 127.14, 126.85, 126.73, 125.96, 125.50, 124.04, 123.98, 123.87, 123.82, 123.28, 123.25, 116.22, 51.40, 49.68, 47.53, 45.78, 42.17, 42.07, 35.81, 35.69, 27.65, 26.34, 26.17, 25.64, 25.14, 24.82, 20.77

**HRMS (ESI) [M+H]<sup>+</sup>** 577.3175, berechnet für C<sub>36</sub>H<sub>40</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>: 577.3173

**HPLC** *t*<sub>R</sub> = 14.68 min, 98.6% Reinheit

***N*-(6-((2-Aminophenyl)amino)-6-oxohexyl)-*N*-(2-((4-methoxybenzyl)amino)-2-oxoethyl)-3,5-dimethylbenzamid (9i)**



Hergestellt aus **14i** (47 mg, 0.07 mmol, 1 Äquiv.) und 15%iger TFA-Lösung in Dichlormethan (5 mL) nach AAV5.

<b>Chemische Formel</b>	C <sub>31</sub> H <sub>38</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>
<b>Molare Masse</b>	530.67 g/mol
<b>Ausbeute</b>	57% eines grauen Feststoffs
<b>Schmelzpunkt</b>	168 °C

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 9.08/9.02\* (s, 1H), 8.36 – 8.29 (m, 1H), 7.22 – 6.51 (m, 11H), 4.80/4.77\* (s, 2H), 4.26\*/4.20 (d, *J* = 4.7 Hz, 2H), 4.06\*/3.83, 3.72 (s, 3H), 3.42 – 3.17 (m, 2H), 2.34 – 2.21 (m, 8H), 1.63 – 1.09 (m, 6H)

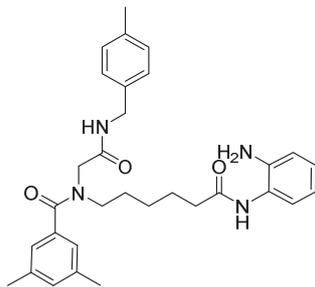
**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 171.04, 170.87, 167.96, 158.19, 141.76, 137.33, 130.36, 128.55, 128.44, 125.56, 125.14, 123.94, 123.55, 116.09, 115.83, 113.63, 55.01, 51.35, 49.58, 47.43, 45.67, 41.58, 41.53, 35.67, 35.57, 27.55, 26.26, 26.07, 25.57, 25.08, 24.76, 20.69

**HRMS (ESI) [M+H]<sup>+</sup>** 531.2968, berechnet für C<sub>31</sub>H<sub>38</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>: 531.2966

**HPLC** *t*<sub>R</sub> = 12.17 min, 96.7% Reinheit

***N*-6-((2-Aminophenyl)amino)-6-oxohexyl)-3,5-dimethyl-*N*-(2-((4-methylbenzyl)amino)-2-oxoethyl)benzamid (9j)**



Hergestellt aus **14j** (140 mg, 0.23 mmol, 1 Äquiv.) und 15%iger TFA-Lösung in Dichlormethan (10 mL) nach AAV5.

<b>Chemische Formel</b>	C <sub>31</sub> H <sub>38</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>
<b>Molare Masse</b>	514.67 g/mol
<b>Ausbeute</b>	91% eines weißen Feststoffs
<b>Schmelzpunkt</b>	81 °C

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 9.10/9.03\* (s, 1H), 8.38 – 8.37 (m, 1H), 7.17 – 6.52 (m, 11H), 4.82 – 4.79 (m, 2H), 4.28\*/4.22 (d, *J* = 5.2 Hz, 2H), 4.07\*/3.84, 3.40 – 3.19 (m, 2H), 2.35 – 2.22 (m, 11H) 1.64 – 1.12 (m, 6H)

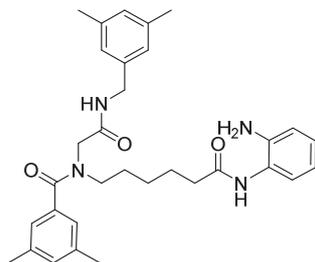
**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 171.11, 170.93, 168.11, 141.87, 141.85, 137.46, 137.41, 136.72, 136.38, 136.16, 135.93, 135.77, 130.49, 130.45, 128.81, 127.25, 127.17, 125.67, 125.26, 125.20, 124.03, 123.98, 123.58, 123.55, 116.15, 115.89, 51.38, 49.65, 47.46, 45.75, 41.92, 41.85, 35.74, 35.62, 27.61, 26.32, 26.14, 25.62, 25.18, 24.84, 20.76, 20.65

**HRMS (ESI) [M+H]<sup>+</sup>** 515.3021, berechnet für C<sub>31</sub>H<sub>38</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>: 515.3017

**HPLC** *t*<sub>R</sub> = 13.07 min, 96.1% Reinheit

***N*-(6-((2-Aminophenyl)amino)-6-oxohexyl)-*N*-(2-((3,5-dimethylbenzyl)amino)-2-oxoethyl)-3,5-dimethylbenzamid (9k)**



Hergestellt aus **14k** (110 mg, 0.17 mmol, 1 Äquiv.) und 15%iger TFA-Lösung in Dichlormethan (10 mL) nach AAV5.

<b>Chemische Formel</b>	C <sub>32</sub> H <sub>40</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>
<b>Molare Masse</b>	528.70 g/mol
<b>Ausbeute</b>	82% eines weißen Feststoffs
<b>Schmelzpunkt</b>	83 °C

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 9.10/9.03\* (s, 1H), 8.36 – 8.35 (m, 1H), 7.17 – 6.52 (m, 10H), 4.81/4.78\* (s, 2H), 4.25\*/4.19 (d, *J* = 4.2 Hz, 2H), 4.07\*/3.84 (s, 2H), 3.39 – 3.21 (m, 2H), 2.34 – 2.21 (m, 14H), 1.63 – 1.12 (m, 6H)

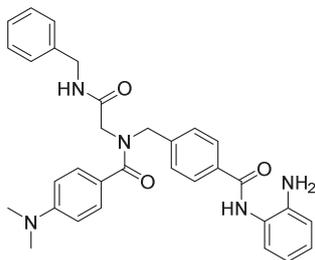
**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 171.09, 170.91, 168.08, 141.86, 139.18, 138.92, 137.46, 137.38, 137.23, 137.17, 136.68, 136.50, 130.48, 130.44, 128.28, 128.12, 125.66, 125.26, 125.20, 124.99, 124.03, 123.58, 123.54, 116.15, 115.88, 51.38, 49.66, 47.50, 45.68, 42.19, 42.02, 35.72, 35.61, 27.61, 26.30, 26.15, 25.62, 25.16, 24.83, 20.90, 20.78, 20.73

**HRMS (ESI) [M+H]<sup>+</sup>** 529.3178, berechnet für C<sub>32</sub>H<sub>40</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>: 529.3173

**HPLC** *t*<sub>R</sub> = 13.82 min, 96.0% Reinheit

***N*-4-((2-Aminophenyl)carbamoyl)benzyl)-*N*-(2-(benzylamino)-2-oxoethyl)-4-(dimethylamino)benzamid (10a)**



Hergestellt aus **14l** (140 mg, 0.22 mmol, 1 Äquiv.) und 15%iger TFA-Lösung in Dichlormethan (10 mL) nach AAV5.

<b>Chemische Formel</b>	C <sub>32</sub> H <sub>33</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>
<b>Molare Masse</b>	535.65 g/mol
<b>Ausbeute</b>	82% eines weißen Feststoffs
<b>Schmelzpunkt</b>	128 °C

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 9.64 (s, 1H), 8.47 – 8.41 (m, 1H), 8.00 – 6.60 (m, 17H), 4.88 (s, 2H), 4.73 (s, 2H), 4.33 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H), 3.93 (s, 2H), 2.94 (s, 6H)

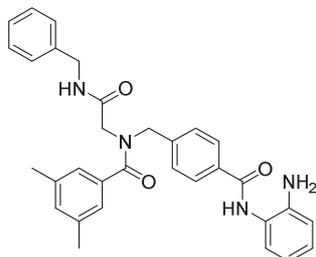
**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 171.69, 168.09, 164.97, 151.19, 143.03, 140.98, 139.18, 133.49, 128.51, 128.21, 128.00, 127.20, 126.76, 126.57, 126.39, 123.31, 116.22, 116.09, 110.91, 42.09

**HRMS (ESI) [M+H]<sup>+</sup>** 536.2654, berechnet für C<sub>32</sub>H<sub>34</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>: 536.2656

**HPLC** *t*<sub>R</sub> = 9.98 min, 95.8% Reinheit

***N*-(4-((2-Aminophenyl)carbamoyl)benzyl)-*N*-(2-(benzylamino)-2-oxoethyl)-3,5-dimethylbenzamid (10b)**



Hergestellt aus **14m** (140 mg, 0.23 mmol, 1 Äquiv.) und 15%iger TFA-Lösung in Dichlormethan (10 mL) nach AAV5.

<b>Chemische Formel</b>	C <sub>32</sub> H <sub>32</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>
<b>Molare Masse</b>	520.63 g/mol
<b>Ausbeute</b>	74% eines weißen Feststoffs
<b>Schmelzpunkt</b>	110 °C

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 9.67 – 9.66 (m, 1H), 8.46<sup>\*</sup>/8.42 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 7.99 – 6.59 (m, 16H), 4.90 (s, 2H), 4.73/4.60<sup>\*</sup> (s, 2H), 4.34<sup>\*</sup>/4.29 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 4.01<sup>\*</sup>/3.81 (s, 2H), 2.26 – 2.25 (m, 6H)

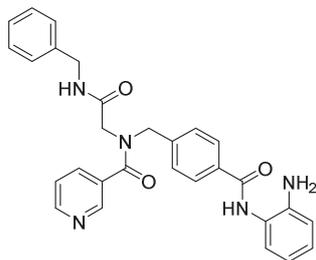
**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 171.61, 171.59, 167.79, 167.64, 165.05, 164.90, 143.18, 143.13, 140.77, 140.44, 139.30, 139.11, 137.64, 137.61, 136.02, 135.86, 133.68, 133.56, 130.90, 130.83, 128.32, 128.28, 128.19, 128.05, 127.63, 127.24, 127.16, 126.91, 126.83, 126.78, 126.68, 126.49, 124.14, 124.08, 123.31, 123.26, 116.25, 116.13, 53.20, 50.99, 48.67, 47.43, 42.19, 42.09, 28.03, 20.79

**HRMS (ESI) [M+H]<sup>+</sup>** 536521.2551, berechnet für C<sub>32</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>: 521.2547

**HPLC** *t*<sub>R</sub> = 13.08 min, 95.2% Reinheit

***N*-(4-((2-Aminophenyl)carbamoyl)benzyl)-*N*-(2-(benzylamino)-2-oxoethyl)nicotinamid (10c)**



Hergestellt aus **14n** (50 mg, 0.08 mmol, 1 Äquiv.) und 15%iger TFA-Lösung in Dichlormethan (5 mL) nach AAV5.

<b>Chemische Formel</b>	C <sub>29</sub> H <sub>27</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>
<b>Molare Masse</b>	493.57 g/mol
<b>Ausbeute</b>	75% eines weißen Feststoffs
<b>Schmelzpunkt</b>	120 °C

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 9.68 (s, 1H), 8.69 – 6.59 (m, 18H), 4.90 (s, 2H), 4.75/4.65\* (s, 2H), 4.35\*/4.26 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H), 4.09\*/3.89 (s, 2H)

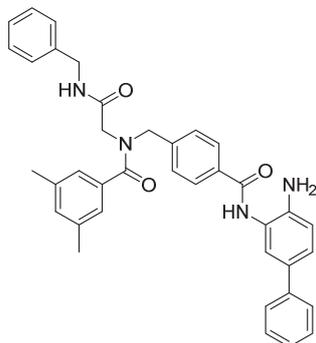
**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 169.53, 169.32, 167.60, 167.40, 165.03, 164.90, 150.69, 150.47, 147.41, 147.11, 143.16, 140.41, 140.13, 139.26, 138.84, 134.49, 133.77, 133.60, 131.97, 131.65, 128.33, 128.30, 128.25, 128.03, 127.70, 127.22, 127.17, 126.93, 126.80, 126.72, 126.51, 123.59, 123.44, 123.32, 123.25, 116.27, 116.14, 53.36, 51.22, 49.13, 48.15, 42.25, 42.12

**HRMS (ESI) [M+H]<sup>+</sup>** 494.2192, berechnet für C<sub>29</sub>H<sub>28</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>: 494.2187

**HPLC** *t*<sub>R</sub> = 8.87 min, 95.4% Reinheit

***N*-(4-((4-Amino-[1,1'-biphenyl]-3-yl)carbamoyl)benzyl)-*N*-(2-(benzylamino)-2-oxoethyl)-3,5-dimethylbenzamid (10d)**



Hergestellt aus **14o** (120 mg, 0.17 mmol, 1 Äquiv.) und 15%iger TFA-Lösung in Dichlormethan (10 mL) nach AAV5.

<b>Chemische Formel</b>	C <sub>38</sub> H <sub>36</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>
<b>Molare Masse</b>	596.73 g/mol
<b>Ausbeute</b>	65% eines weiß/rosa Feststoffs
<b>Schmelzpunkt</b>	124 °C

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 9.76<sup>\*</sup>/9.75 (s, 1H), 8.47<sup>\*</sup>/8.43 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.03 – 6.87 (m, 20H), 5.11 (s, 2H), 4.74/4.62<sup>\*</sup> (s, 2H), 4.34<sup>\*</sup>/4.29 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H), 4.02<sup>\*</sup>/3.82 (s, 2H), 2.25 (s, 6H)

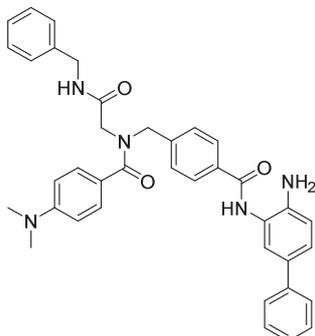
**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 171.62, 171.60, 167.80, 167.65, 165.22, 165.14, 142.84, 142.77, 140.85, 140.19, 139.31, 139.11, 137.62, 136.03, 135.85, 133.68, 133.54, 130.91, 130.84, 128.80, 128.32, 128.28, 128.25, 128.14, 128.10, 127.64, 127.25, 127.16, 126.91, 126.84, 126.78, 126.02, 125.50, 124.82, 124.76, 124.71, 124.15, 124.09, 123.59, 123.52, 116.52, 53.23, 51.02, 48.70, 47.46, 42.19, 42.09, 20.79

**HRMS (ESI) [M+H]<sup>+</sup>** 597.2859, berechnet für C<sub>38</sub>H<sub>37</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>: 597.2860

**HPLC** *t*<sub>R</sub> = 15.75 min, 97.6% Reinheit

***N*-(4-((4-Amino-[1,1'-biphenyl]-3-yl)carbamoyl)benzyl)-*N*-(2-(benzylamino)-2-oxoethyl)-4-(dimethylamino)benzamid (10e)**



Hergestellt aus **14p** (140 mg, 0.20 mmol, 1 Äquiv.) und 15%iger TFA-Lösung in Dichlormethan (10 mL) nach AAV5.

<b>Chemische Formel</b>	C <sub>38</sub> H <sub>37</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>
<b>Molare Masse</b>	611.75 g/mol
<b>Ausbeute</b>	75% eines rosa Feststoffs
<b>Schmelzpunkt</b>	122 °C

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 9.74 (s, 1H), 8.48 (bs, 1H), 8.02 – 6.65 (m, 21H), 5.10 (s, 2H), 4.73 (bs, 2H), 4.32 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.93 (bs, 2H), 2.94 (s, 6H)

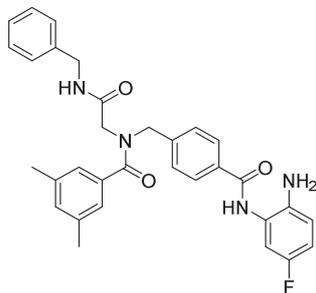
**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 171.76, 168.19, 165.20, 151.26, 142.79, 141.14, 140.19, 139.25, 133.49, 128.81, 128.60, 128.30, 128.14, 127.28, 126.86, 126.03, 125.51, 124.79, 124.72, 123.57, 116.52, 110.96, 42.14

**HRMS (ESI) [M+H]<sup>+</sup>** 612.2967, berechnet für C<sub>38</sub>H<sub>37</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>: 612.2969

**HPLC** *t*<sub>R</sub> = 12.75 min, 95.8% Reinheit

***N*-(4-((2-Amino-5-fluorphenyl)carbamoyl)benzyl)-*N*-(2-(benzylamino)-2-oxo-ethyl)-3,5-dimethylbenzamid (10f)**



Hergestellt aus **14q** (100 mg, 0.16 mmol, 1 Äquiv.) und 15%iger TFA-Lösung in Dichlormethan (10 mL) nach AAV5.

<b>Chemische Formel</b>	C <sub>32</sub> H <sub>31</sub> FN <sub>4</sub> O <sub>3</sub>
<b>Molare Masse</b>	538.62 g/mol
<b>Ausbeute</b>	88% eines weißen Feststoffs
<b>Schmelzpunkt</b>	211 °C

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 9.68<sup>\*</sup>/9.66 (s, 1H), 8.46<sup>\*</sup>/8.42 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 7.98 – 6.77 (m, 15H), 4.85 (s, 2H), 4.74/4.61<sup>\*</sup> (s, 2H), 4.34<sup>\*</sup>/4.29 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H), 4.01<sup>\*</sup>/3.81 (s, 2H), 2.25 (s, 6H)

**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

δ (ppm): 171.60, 167.78, 167.64, 165.15, 164.99, 154.56, 153.02, 141.04, 140.71, 139.31, 139.10, 138.99, 138.91, 137.64, 137.62, 136.01, 135.84, 133.45, 133.33, 130.91, 130.84, 128.32, 128.28, 128.23, 128.08, 127.67, 127.25, 127.16, 126.91, 126.88, 126.78, 124.14, 124.09, 116.62, 116.57, 112.65, 112.57, 112.44, 112.35, 112.29, 112.19, 53.21, 51.03, 48.69, 47.45, 42.19, 42.09, 20.79

**HRMS (ESI) [M+H]<sup>+</sup>** 539.2450, berechnet für C<sub>32</sub>H<sub>32</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>3</sub>: 539.2453

**HPLC** *t*<sub>R</sub> = 13.60 min, 95.1% Reinheit

## **ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abbildung 1. Von den Histonen zu den Chromosomen.....	1
Abbildung 2. Das Gleichgewicht zwischen HAT und HDAC.....	2
Abbildung 3. Einfluss der HATs, HDACs und HDAC-Inhibitoren (HDACI) auf die Transkription (modifiziert nach [8]).....	3
Abbildung 4. Gliederung der HDACs.[11].....	4
Abbildung 5. Die dreidimensionale Struktur der HDACs am Beispiel von HDAC6 ( <i>Danio rerio</i> , PDB: 5EFK).....	5
Abbildung 6. Vorgeschlagener katalytischer Mechanismus der Deacetylierung von Acetyl-Lysin im katalytischen Zentrum der HDLP (histone-deacetylase-like protein).[12] .....	6
Abbildung 7. Deacetylierungsschritt im vorgeschlagenen katalytischen Mechanismus bei HDLP (histone-deacetylase-like protein) (A) und bei HDAC6 zCD2 (B).[12, 16] .....	6
Abbildung 8. Allgemeines Pharmakophormodell der HDACI am Beispiel von Vorinostat.[7, 28] .....	8
Abbildung 9. Bindungsmodus von Vorinostat (SAHA) im katalytischen Zentrum des histone-deacetylase-like proteins. ....	9
Abbildung 10. Die Entwicklung von Vorinostat (SAHA).[32].....	9
Abbildung 11. Ausgewählte Vertreter der Hydroxamsäuren.[7].....	10
Abbildung 12. Carbonsäuren mit HDAC-inhibitorischer Aktivität.[7] .....	11
Abbildung 13. Zinkbindung durch elektrophile Ketone.[34].....	11
Abbildung 14. Kristallstruktur eines Trifluormethylketons im Komplex mit FB188 HDAH (PDB: 2GH6).....	11
Abbildung 15. Erster Vertreter (I) der elektrophilen Ketone.[34] .....	12
Abbildung 16. Zinkchelatisierende Thiole und Thiolderivate. ....	13
Abbildung 17. Erste Vertreter der 2-Aminoanilide .....	13
Abbildung 18. Bekannte zyklische Peptide als HDAC-Inhibitoren. ....	14
Abbildung 19. Ausgewählte HDAC-Inhibitoren dargestellt anhand des Pharmakophormodells.[28].....	15
Abbildung 20. Einige Wirkstoffe in klinischen Studien. ....	16
Abbildung 21. Darstellung der sub-pockets in der Bindungstasche (A = side pocket (HDAC6, PDB: 5EDU), B = lower pocket (HDAC4, PDB: 4CBT), C = foot pocket (HDAC2, PDB: 3MAX)).	16

Abbildung 22. Drei verschiedene Ebenen der räumlichen Struktur eines Proteins. (Tertiärstruktur: HDAC6 des Zebrafisches (PDB: 5EFK), Sekundärstruktur: $\alpha$ -Helix (PDB: 1BXL) und $\beta$ -Faltblatt (PDB: 4R80)) .....	18
Abbildung 23. $\alpha$ - und $\beta$ -Peptide abgeleitet von den entsprechenden Peptidstrukturen.....	20
Abbildung 24. Darstellung der <i>cis</i> - und <i>trans</i> -konfigurierten Amide in $\alpha$ -Peptiden/Peptoiden.....	21
Abbildung 25. $\omega$ -Amidwinkel in einem $\alpha$ -Peptid. ....	21
Abbildung 26. $\alpha$ -Aminoxy Peptide und Peptide.....	22
Abbildung 27. Mögliche Variationen der triazoliumartigen Seitenkette.[71] .....	23
Abbildung 28. Geometrie der Amidbindungen in Peptiden und Peptoiden.[72] .....	23
Abbildung 29. Elektronische Abstoßkräfte im <i>N</i> -Aryl Peptoid.[72] .....	24
Abbildung 30. Magainin-2 und antimikrobielles Peptoidanalogon von Magainin-2 (Ausschnitt). ....	25
Abbildung 31. Wildtyp p53 (16-26) (A) und ein peptoid-basiertes Analogon von p53 (B).....	26
Abbildung 32. Anzahl der Veröffentlichungen zu Peptoiden in den vergangenen Jahren.[82].....	26
Abbildung 33. Modifikation der peptid-basierten HDACI ( <b>V</b> ) zu peptoid-basierten HDACI ( <b>VI</b> ) aus dem Naturstoff Trapoxin B .....	28
Abbildung 34. Auflistung der zu synthetisierenden zinkbindenden Gruppen.....	29
Abbildung 35. Peptoid-basierte HDAC-Inhibitoren.....	30
Abbildung 36. Peptoid-basierte Hydroxamsäure-Derivate <b>4d*</b> , <b>4h*</b> , <b>4j*</b> und <b>4k*</b> .....	30
Abbildung 37. Struktureller Vergleich der HDAC-Inhibitoren.[86] .....	65
Abbildung 38. Entinostat (MS-275) und Entinostat-Analoga <b>VII</b> , <b>VIII</b> und <b>IX</b> .[52, 86] .....	65
Abbildung 39. Oberflächendarstellung des ~11 Å langen Bindungskanals und der ~14 Å großen foot pocket von HDAC2 (PDB: 3MAX).....	66
Abbildung 40. Entinostat (MS-275) und ein Thienylanalogon ( <b>X</b> ) von Entinostat.[88] .....	66
Abbildung 41. Pharmakophormodell für selektive HDAC1 und 2 Inhibitoren vom 2-Aminoanilidtyp.[90] .....	67
Abbildung 42. Stereoansicht der Elektronendichte im aktiven Zentrum von HDAC2 für Vorinostat (links; PDB: 4LXZ) und ein <i>para</i> -arylsubstituiertes 2-Aminoanilid (rechts; PDB: 4LY1).[91].....	68

Abbildung 43. Umstrukturierung der umliegenden Aminosäuren in der FP bei der Bindung eines 2-Aminophenylanilids (gelb) und Vorinostat (pink) in HDAC2 (PDB: 4LXZ).[91] .....	69
Abbildung 44. Intramolekulare Wasserstoffbrücke (links) und neugeknüpfte Wasserstoffbrücken zu den Histidinen His-145 und His-146 im aktiven Zentrum von HDAC2 (rechts; PDB: 4LXZ).[91].....	69
Abbildung 45. 2-Aminoanilide in fortgeschrittenen klinischen Studien .....	70
Abbildung 46. Hybridisierung der HDACi RG2833 und Entinostat mit den peptoid-basierten HDACi (Kapitel 3).....	71
Abbildung 47. Variationen der Linkerregion und der Reste R <sup>1</sup> , R <sup>2</sup> und R <sup>3</sup> .....	74
Abbildung 48. Einführung des Restes R <sup>3</sup> .....	77
Abbildung 49. Mögliche Variationen des Peptoidgerüsts.....	79
Abbildung 50. Durchgeführte Variationen der Reste R <sup>1</sup> , R <sup>2</sup> , R <sup>3</sup> und der Linkerregion. ....	89
Abbildung 51. <sup>1</sup> H (600 MHz) und <sup>13</sup> C NMR (151 MHz) Spektrum der Verbindung <b>10b</b> in DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> .....	90
Abbildung 52. <sup>1</sup> H (500 MHz) und <sup>13</sup> C NMR (126 MHz) der Verbindung <b>10a</b> in DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> .....	91
Abbildung 53. VT-NMR (25-90 °C, 600 MHz) in DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> (links) von <b>10b</b> und VT-NMR (25-(-15 °C), 600 MHz) von <b>10a</b> in CDCl <sub>3</sub> (rechts).....	92
Abbildung 54. Reduzierter partieller Doppelbindungscharakter des 4-Dimethylamino-substituierten 2-Aminoanilids <b>10a</b> .....	93
Abbildung 55. Reduktion des wasserlöslichen Farbstoffs MTT. ....	94
Abbildung 56. Untersuchte 2-Aminoanilide <b>9a-h</b> , <b>9i-k</b> und <b>10a-f</b> .....	95
Abbildung 57. Fluoreszenzbasierter HDAC Ganzzell-Assay.....	96
Abbildung 58. Fluoreszenzbasierter HDAC Enzym-Assay. ....	99
Abbildung 59. Die potentesten und selektivsten peptoid-basierten 2-Aminoanilide (abgebildet im angepassten Pharmakophormodell). ....	101
Abbildung 60. Die selektivste peptoid-basierte Hydroxamsäure <b>4j*</b> (Kapitel 3).....	101
Abbildung 61. <i>Cis/trans</i> -Rotamere bei α-Peptoiden, α-Aminoxy-Peptiden und α-Aminoxy-Peptiden. ....	103
Abbildung 62. Peptid- und peptoid-basierte HDAC-Inhibitoren <b>V</b> und <b>VI</b> .....	166
Abbildung 63. Synthese der peptoid-basierten HDACi mittels der U-4CR. ....	166
Abbildung 64. HDAC-Inhibition und Zytotoxizität der vielversprechendsten peptoid-basierten Hydroxamsäuren. ....	168

Abbildung 65. Hybridisierung der peptoid-basierten HDACi (Kapitel 3) mit RG2833 und Entinostat .....	169
Abbildung 66. HDAC-Inhibition und Zytotoxizität der vielversprechendsten peptoid-basierten 2-Aminoanilide <b>9h</b> und <b>10a</b> .....	172
Abbildung 67. <i>Cis/trans</i> -Rotamere bei $\alpha$ -Peptoiden, $\alpha$ -Aminoxy-Peptiden und $\alpha$ -Aminoxy-Peptoiden .....	174
Abbildung 68. Faltungsverhalten gemäß MD-Simulationen und Orientierung der Seitenketten des $\alpha$ -Aminoxy Peptoid Hexamers <b>29'</b> im Vergleich zu einer kanonischen $\alpha$ -Helix (modifiziert aus Krieger, V. et al.[113]). .....	176
Figure 1. Peptide- und peptoid-based HDAC inhibitors <b>V</b> and <b>VI</b> .....	177
Figure 2. Synthesis of the peptoid-based HDACi via Ugi-4CR.....	177
Figure 3. HDAC inhibition and cytotoxicity of the most promising peptoid-based hydroxamic acids.....	179
Figure 4. Hybridization of the peptoid-based HDACi (chapter 3) with RG2833 and entinostat.....	180
Figure 5. HDAC inhibition and cytotoxicity of the most promising peptoid-based 2-aminoanilides <b>9h</b> and <b>10a</b> .....	183
Figure 6. <i>Cis/trans</i> -rotamers of $\alpha$ -peptoids, $\alpha$ -aminoxy-peptides and $\alpha$ -aminoxy-peptoids.....	185
Figure 7. Folding behaviour according to MD simulations and side chain orientation of the $\alpha$ -aminoxy peptoid hexamer <b>29'</b> in comparison to a canonical $\alpha$ -helix (modified from Krieger, V. et al.[113]).....	187

## VERZEICHNIS DER SCHEMATA

Schema 1. Erste Schritte der retrosynthetischen Analyse des Zielmoleküls .....	72
Schema 2. Retrosynthetische Analyse der peptoid-basierten 2-Aminoanilide <b>9a-k</b> und <b>10a-f</b> anhand der Ugi-4-Komponenten Reaktion <b>I</b> und der Submonomermethoden <b>II</b> und <b>III</b> .....	73
Schema 3. Schritt 1 und 2 der Submonomermethode an der festen Phase. ....	75
Schema 4. Schritt 1 und 2 der Submonomermethode in der flüssigen Phase .....	75
Schema 5. Isonitrilsynthese mittels KOH und Chloroform – Carbylamin Reaktion.[101] .....	76
Schema 6. Synthese von Isocyaniden mittels Triphenylphosphin und Iod.[102] .....	77
Schema 7. Schematische Darstellung des Suzuki-Mechanismus.....	78
Schema 8. Synthese der Boc-geschützten 1,2-Phenylendiaminderivate <b>XX</b> , <b>XXII</b> und <b>XXVI</b> ... ..	80
Schema 9. Synthese der peptoid-basierten Schlüsselintermediate <b>13a-f</b> und <b>13j-l</b> .....	82
Schema 10. Synthese der peptoid-basierten Carbonsäuren <b>11a-f</b> und <b>11j-l</b> .....	82
Schema 11. Synthese der Boc-geschützten peptoid-basierten 2-Aminoanilide <b>14a-h</b> und <b>14l-q</b> .....	83
Schema 12. Synthese der peptoid-basierten 2-Aminoanilide <b>9a-h</b> und <b>10a-f</b> .....	84
Schema 13. Synthese des peptoid-basierten 2-Aminoanilids <b>9i</b> .....	85
Schema 14. Synthese des Peptoids <b>13g</b> .....	86
Schema 15. Synthese des peptoid-basierten 2-Aminoanilids <b>9i</b> .....	87
Schema 16. Synthese der peptoid-basierten 2-Aminoanilide <b>9j,k</b> .....	88
Schema 17. Synthese der peptoid-basierten Hydroxamsäuren <b>4a-k*</b> und <b>5a-f*</b> .....	167
Schema 18. Synthese der Zwischenstufen <b>13a-f</b> und <b>13j-l</b> mittels U-4CR ( <b>I</b> ). ....	170
Schema 19. Synthese der Zwischenstufen <b>13g</b> und <b>13h,i</b> mittels der Submonomermethode <b>II</b> ( <b>A</b> ) und <b>III</b> ( <b>B</b> ). ....	171
Schema 20. Synthese der peptoid-basierten 2-Aminoanilide <b>9a-k</b> und <b>10a-f</b> .....	172
Schema 21. Synthese der Monomere <b>1'-7'</b> (modifiziert aus Krieger, V. et al. [113]). .....	175
Scheme 1. Synthesis of the peptoid-based hydroxamic acids <b>4a-k*</b> and <b>5a-f*</b> .....	178
Scheme 2. Synthesis of the intermediates <b>13a-f</b> and <b>13j-l</b> using U-4CR ( <b>I</b> ).....	181
Scheme 3. Synthesis of the intermediates <b>13g</b> and <b>13h,i</b> using the submonomer approach <b>II</b> ( <b>A</b> ) and <b>III</b> ( <b>B</b> ).....	182
Scheme 4. Synthesis of the peptoid-based 2-aminoanilides <b>9a-k</b> and <b>10a-f</b> .....	183
Scheme 5. Synthesis of the monomers <b>1'-7'</b> (taken from Krieger, V. et al.[113]).....	185

## **TABELLENVERZEICHNIS**

Tabelle 1. HDACs.[9].....	4
Tabelle 2. Überexpression der HDACs in Tumorgeweben.[25].....	7
Tabelle 3. Einteilung der Peptidomimetika.[60] .....	19
Tabelle 4. Ergebnisse des MTT Zellviabilitäts-Assays.....	95
Tabelle 5. Ergebnisse der HDAC-Inhibition im Ganzzell-Assay. ....	97
Tabelle 6. Ergebnisse des HDAC Enzym-Assays .....	99
Tabelle 7. Hemmung der HDAC-Inhibition durch die Verbindungen <b>4d*</b> , <b>h*</b> , <b>j*</b> und <b>k*</b> an den rekombinanten HDAC-Isoformen 1-3, 6 und 8. ....	168
Tabelle 8. Hemmung der HDAC-Inhibition durch die Verbindungen <b>9d</b> , <b>h</b> und <b>10a</b> , <b>e</b> an den rekombinanten HDAC-Isoformen 1 und 6.....	173
Table 1. Inhibition activities of the compounds <b>4d*</b> , <b>h*</b> , <b>j*</b> , and <b>k*</b> against the recombinant HDAC isoforms 1-3, 6, and 8.....	179
Table 2. Inhibition activities of the compounds <b>9d</b> , <b>h</b> and <b>10a</b> , <b>e</b> against the recombinant HDAC isoforms 1 and 6.....	184

## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Dawson, M. A.; Kouzarides, T., Cancer Epigenetics: From Mechanism To Therapy. *Cell* **2012**, *150* (1), 12 – 27.
- [2] Egger, G.; Liang, G.; Aparicio, A.; Jones, P. A., Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* **2004**, *429* (6990), 457 – 463.
- [3] Arnaudo, A. M.; Garcia, B. A., Proteomic characterization of novel histone post-translational modifications. *Epigenetics & Chromatin* **2013**, *6* (24), 1 – 7.
- [4] a) Peterson, C. L.; Laniel, M.-A., Histones and histone modifications. *Curr. Biol.* **2004**, *14* (14), 546 – 551. b) Berger, S. L., Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2002**, *12* (2), 142 – 148. c) Strahl, B. D.; Allis, C. D., The language of covalent histone modifications. *Nature* **2000**, *403* (6765), 41 – 45.
- [5] Bolden, J. E.; Peart, M. J.; Johnstone, R. W., Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5* (9), 769 – 784.
- [6] Arrowsmith, C. H.; Bountra, C.; Fish, P. V.; Kevin Lee, K.; Schapira, M., Epigenetic protein families: a new frontier for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2012**, *11* (5), 384 – 400.
- [7] a) Heinke, R.; Sippl, W., Entwicklung von Histon-Deacetylaseinhibitoren. *Pharm. Unserer Zeit* **2010**, *39*, 183 – 189. b) Jose, B.; Oniki, Y.; Kato, T.; Nishino, N.; Sumida, Y.; Yoshida, M., Novel histone deacetylase inhibitors: cyclic tetrapeptide with trifluoromethyl and pentafluoroethyl ketones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14* (21), 5343 – 5346. c) Kijima, M.; Yoshida, M.; Sugitae, K.; Horinouchi, S.; Beppu, T., Trapoxin, an Antitumor Cyclic Tetrapeptide, Is an Irreversible Inhibitor of Mammalian Histone Deacetylase. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268* (30), 22429 – 22435.
- [8] "Reprinted from Trends in Neurosciences, 32, Chuang, D.-M.; Leng, Y.; Marinova, Z.; Kim, H.- J.; Chiu, C.-T., Multiple roles of HDAC inhibition in neurodegenerative conditions, 591 – 601, Copyright (2009), with permission from Elsevier."
- [9] Lane, A. A.; Chabner, B. A., Histone Deacetylase Inhibitors in Cancer Therapy. *J. Clin. Oncol.* **2009**, *27* (32), 5459 – 5468.

- [10] Witt, O.; Deubzer, H. E.; Milde, T.; Oehme, I., HDAC family: What are the cancer relevant targets? *Cancer Lett.* **2009**, *277* (1), 8 – 21.
- [11] Wagner, F. F.; Weiwer, M.; Lewis, M. C.; Holson, E. B., Small Molecule Inhibitors of Zinc-dependent Histone Deacetylases. *Neurotherapeutics* **2013**, *10* (4), 589 – 604.
- [12] Finnin, M. S.; Donigian, J. R.; Coher, A.; Richon, V. M.; Rifkind, R. A.; Marks, P. A.; Breslow, R.; Pavletich, N. P., Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature* **1999**, *401* (6749), 188 – 193.
- [13] Nielsen, T. K.; Hildmann, C.; Dickmanns, A.; Schwienhorst, A.; Ficner, R., Crystal Structure of a Bacterial Class 2 Histone Deacetylase Homologue. *J. Mol. Biol.* **2005**, *354* (1), 107 – 120.
- [14] a) Bressi, J. C.; Jennings, A. J.; Skene, R.; Wu, Y.; Melkus, R.; De Jong, R.; O'Connell, S.; Grimshaw, C. E.; Navre, M.; Gangloff, A. R., Exploration of the HDAC2 foot pocket: Synthesis and SAR of substituted N-(2-aminophenyl)benzamides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20* (10), 3142 – 3145. b) Millard, C. J.; Watson, P. J.; Celardo, I.; Gordiyenko, Y.; Cowley, S. M.; Robinson, C. V.; Fairall, L.; Schwabe, J. W. R., Class I HDACs Share a Common Mechanism of Regulation by Inositol Phosphates. *Mol. Cell* **2013**, *51* (1), 57 – 67.
- [15] Bottomley, M. J.; Lo Surdo, P.; Di Giovine, P.; Cirillo, A.; Scarpelli, R.; Ferrigno, F.; Jones, P.; Neddermann, P.; De Francesco, R.; Steinkuhler, C.; Gallinari, P.; Carfi, A., Structural and functional analysis of the human HDAC4 catalytic domain reveals a regulatory structural zinc-binding domain. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283* (39), 26694 – 26704.
- [16] Hai, Y.; Christianson, D. W., Histone deacetylase 6 structure and molecular basis of catalysis and inhibition. *Nature Chemical Biology* **2016**, *12*, 741 – 747.
- [17] Schuetz, A.; Min, J.; Allali-Hassani, A.; Schapira, M.; Shuen, M.; Loppnau, P.; Mazitschek, R.; Kwiatkowski, N. P.; Lewis, T. A.; Maglathin, R. L.; McLean, T. H.; Bochkarev, A.; Plotnikov, A. N.; Vedadi, M.; Arrowsmith, C. H., Human HDAC7 harbors a class IIa histone deacetylase specific zinc binding motif and cryptic deacetylase activity. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283* (17), 11355 – 11363.

- [18] Somoza, J. R.; Skene, R. J.; Katz, B. A.; Mol, C.; Ho, J. D.; Jennings, A. J.; Luong, C.; Arvai, A.; Buggy, J. J.; Chi, E.; Tang, J.; Sang, B. C.; Verner, E.; Wynands, R.; Leahy, E. M.; Dougan, D. R.; Snell, G.; Navre, M.; Knuth, M. W.; Swanson, R. V.; McRee, D. E.; Tari, L. W., Structural snapshots of human HDAC8 provide insights into the class I histone deacetylases. *Structure* **2004**, *12* (7), 1325 - 1334.
- [19] Shoba, B.; Lwin, Z. M.; Ling, L. S.; Bay, B.-H.; Yip, G. W.; Kumar, S. D., Function of Sirtuins in Biological Tissues. *Anat. Rec. (Hoboken)* **2009**, *292* (4), 536 – 543.
- [20] Dowling, D. P.; Di Costanzo, L.; Gennadios, H. A.; Christianson, D. W., Evolution of the arginase fold and functional diversity. *Cell Mol. Life Sci.* **2008**, *65* (13), 2039 – 2055.
- [21] Khabele, D.; Son, D. S.; Parl, A. K.; Goldberg, G. L.; Augenlicht, L. H.; Mariadason, J. M.; Rice, V. M., Drug-induced inactivation or gene silencing of class I histone deacetylases suppresses ovarian cancer cell growth: implications for therapy. *Cancer Biol. Ther.* **2007**, *6* (5), 795 – 801.
- [22] Abbas, A.; Gupta, S., The Role of Histone Deacetylases in Prostate Cancer. *Epigenetics* **2008**, *3* (6), 300 – 309.
- [23] Bertrand, P., Inside HDAC with HDAC inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45* (6), 2095 – 2116.
- [24] Chakrabarti, A.; Oehme, I.; Witt, O.; Oliveira, G.; Sippl, W.; Romier, C.; Pierce, R. J. Jung, M., HDAC8: a multifaceted target for therapeutic interventions. *Trends in Pharmacological Sciences* **2015**, *36* (7), 481 – 492.
- [25] a) Weichert, W., HDAC expression and clinical prognosis in human malignancies. *Cancer Letters* **2009**, *280* (2), 168 – 176. b) West, A. C.; Johnstone, R. W., New and Emerging HDAC inhibitors for cancer treatment. *J. Clin. Invest.* **2014**, *124* (1), 30 – 39.
- [26] a) Fischer, A., HDAC-Inhibitoren als Therapie für neuronale Erkrankungen. *Pharm. Unserer Zeit* **2010**, *39* (3), 204 – 209. b) Kazantsev, A.; Thompson, L. M., Therapeutic application of histone deacetylase inhibitors for central nervous system disorders. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7* (10), 854 – 868. c) Shen, S.; Benoy, V.; Bergman, J. A.; Kalin, J. H.; Frojuello, M.; Vistoli, G.; Haeck, W.; van den Bosch, L.; Kozikowski, A. P., Bicyclic-Capped Histone

- Deacetylase 6 Inhibitors with Improved Activity in a Model of Axonal Charcot–Marie–Tooth Disease. *ACS Chem. Neurosci.* **2016**, *7* (2), 240 – 258.
- [27] a) Archin, N. M.; Liberty, A. L.; Kashuba, A. D.; Choudhary, S. K.; Kuruc, J. D.; Crooks, A. M.; Parker, D. C.; Anderson, E. M.; Kearney, M. F.; Strain, M. C.; Richman, D. D.; Hudgens, M. G.; Bosch, R. J.; Coffin, J. M.; Eron, J. J.; Hazuda, D. J.; Margolis, D. M., Administration of vorinostat disrupts HIV-1 latency in patients on antiretroviral therapy. *Nature* **2012**, *487* (7408), 482 – 485. b) Hansen, F. K.; Skinner-Adams, T. S.; Duffy, S.; Marek, L.; Sumanadasa, S. D. M.; Kuna, K.; Held, J.; Avery, V. M.; Andrews, K. T.; Kurz, T., Synthesis, antimalarial properties, and SAR studies of alkoxyurea-based HDAC inhibitors. *Chem. Med. Chem.* **2014**, *9*, 665 – 670. c) Mwakwari, S. C.; Patil, V.; Guerrant, W.; Oyelere, A. K., Macrocyclic Histone Deacetylase Inhibitors. *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, *10* (14), 1423 – 1440.
- [28] Chen, Y.-d.; Jiang, Y.-J.; Zhou, J.-W.; Yu, Q.-S.; You, Q.-D., Identification of ligand features essential for HDACs inhibitors by pharmacophore modeling. *J. Mol. Graph. Model.* **2008**, *26* (7), 1160 – 1168.
- [29] Sato, T.; Friend, C.; De Harven, E., Ultrastructural Changes in Friend Erythroleukemia Cells Treated with Dimethyl Sulfoxide. *Cancer Research* **1971**, *31*, 1402 – 1417.
- [30] Leder, A.; Orkin, S.; Leder, P., Differentiation of Erythroleukemic Cells in the Presence of Inhibitors of DNA Synthesis. *Science* **1975**, *190* (4217), 893 – 894.
- [31] a) Yoshida, M.; Kijima, M.; Akita, M.; Beppu, T., Potent and Specific Inhibition of Mammalian Histone Deacetylase Both *in Vivo* and *in Vitro* by Trichostatin A. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265* (28), 17174 – 17179. b) Sanderson, L.; Taylor, G. W.; Aboagye, E. O.; Alao, J. P.; Latigo, J. R.; Coombes, R. C.; Vigushin, D. M., Plasma Pharmacokinetics and metabolism of the histone deacetylase inhibitor Trichostatin A after intraperitoneal administration to mice. *Drug. Metab. Dispos.* **2004**, *32* (10), 1132 – 1138. c) Olaharski, A. J.; Ji, Z.; Woo, J. Y.; Lim, S.; Hubbard, A. E.; Zhang, L.; Smith, M. T., The histone deacetylase inhibitor trichostatin A has genotoxic effects in human lymphoblasts *in vitro*. *Toxicol. Sci.* **2006**, *93* (2), 341 – 347. d) Tsuji, N.; Kobayashi, M.; Nagashima, K.;

- Wakisaka, Y.; Koizumi, K., A new antifungal antibiotic, trichostatin. *J. Antibiot.* **1976**, *29* (1), 1 – 6.
- [32] Marks, P. A.; Breslow, R., Dimethyl sulfoxide to vorinostat: development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug. *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25* (1), 84 – 90.
- [33] a) Ganesan, A., Macrocyclic Inhibitors of Zinc-dependent Histone Deacetylases (HDACs). In *Macrocycles in Drug Discovery*; Levin, J. I., Eds.; The Royal Society of Chemistry, 2015; pp 110 – 116. b) Balunas, M. J.; Pavlik, C. M.; Gerwick, W. H., Santacruzamate A Compositions and Analogs and Methods of Use, Publication Date 2014/01/30. US. Patent WO 2014/018913 A2. c) Lombardi, P. M.; Cole, K. E.; Dowling, D. P.; Christianson, D. W., Structure, mechanism, and inhibition of histone deacetylases and related metalloenzymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2011**, *21* (6), 735 – 743.
- [34] Miller, T. A.; Witter, D. J.; Belvedere, S., Histone Deacetylase Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2003**, *46* (24), 5097 – 5116.
- [35] Nielsen, T. K.; Hildmann, C.; Riester, D.; Wegener, D.; Schwienhorst, A.; Ficner, R., Complex structure of a bacterial class 2 histone deacetylase homologue with a trifluoromethylketone inhibitor. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2007**, *63* (4), 270 – 273.
- [36] Furumai, M.; Matsuyama, A.; Kobashi, N.; Lee, K.-H.; Nishiyama, M.; Nakajima, H.; Tanaka, A.; Komatsu, Y.; Nishino, N.; Yoshida, M.; Horinouchi, S., FK228 (Depsipeptide) as a Natural Prodrug That Inhibits Class I Histone Deacetylases. *Cancer Res.* **2002**, *62* (17), 4916 – 4921.
- [37] Suzuki, T.; Kouketsu, A.; Matsuura, A.; Kohara, A.; Ninomiya, S.-i.; Kohda, K. Miyata, N., Thiol-based SAHA analogues as potent histone deacetylase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14* (12), 3313 – 3317.
- [38] VanderMolen, K. M.; McCulloch, W.; Pearce, C. J.; Oberlies, N. H., Romidepsin (Istodax, NSC 630176, FR901228, FK228, depsipeptide): a natural product recently approved for cutaneous T-cell lymphoma. *J. Antibiot. (Tokyo)* **2011**, *64* (8), 525 - 531.
- [39] Suzuki, T.; Nagano, Y.; Kouketsu, A.; Matsuura, A.; Maruyama, S.; Kurotaki, M.; Nakagawa, H.; Miyata, N., Novel Inhibitors of Human Histone Deacetylases:

- Design, Synthesis, Enzyme Inhibition, and Cancer Cell Growth Inhibition of SAHA-Based Non-hydroxamates. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (4), 1019 – 1032.
- [40] Riva, L.; Blanes, S. M.; Dauser, R.; Nuchtern, J. G.; McGuffey, L.; Berg, S. L., Pharmacokinetics and Cerebrospinal Fluid Penetration of CI-994 (*N*-Acetyldinaline) in the Nonhuman Primate. *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 994 – 997.
- [41] Bressi, J. C.; Jennings, A. J.; Skene, R.; Wu, Y.; Melkus, R.; De Jong, R.; O'Connell, S.; Grimshaw, C. E.; Navre, M.; Gangloff, A. R., Exploration of the HDAC2 foot pocket: Synthesis and SAR of substituted *N*-(2-aminophenyl)benzamides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20* (10), 3142 – 3145.
- [42] Hu, E.; Dul, E.; Sung, C.-M.; Chen, Z.; Kirkpatrick, R.; Zhang, G.-F.; Johanson, K.; Liu, R.; Lago, A.; Hofmann, G.; Macarron, R.; De los Frailes, M.; Perez, P.; Krawiec, J.; Winkler, J.; Jaye, M., Identification of novel isoform-selective inhibitors within class I histone deacetylases. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, *307* (2), 720 – 728.
- [43] Fournel, M.; Bonfils, C.; Hou, Y.; Yan, P. T.; Trachy-Bourget, M. C.; Kalita, A.; Liu, J.; Lu, A. H.; Zhou, N. Z.; Robert, M. F.; Gillespie, J.; Wang, J. J.; Ste-Croix, H.; Rahil, J.; Lefebvre, S.; Moradei, O.; Delorme, D.; MacLeod, A. R.; Besterman, J. M.; Li, Z., Mgcd0103, a novel isotype-selective histone deacetylase inhibitor, has broad spectrum antitumor activity *in vitro* and *in vivo*. *Mol. Cancer Ther.* **2008**, *7* (4), 759 – 768.
- [44] Qiao, Z.; Ren, S.; Li, W.; Wang, X.; He, M.; Guo, Y.; Sun, L.; He, Y.; Ge, Y.; Yu, Q., Chidamide, a novel histone deacetylase inhibitor, synergistically enhances gemcitabine cytotoxicity in pancreatic cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, *434* (1), 95 – 101.
- [45] ClinicalTrials.gov database. URL: <https://clinicaltrials.gov> (21.07.2016)
- [46] Yardley, D. A.; Ismail-Khan, R. R.; Melichar, B.; Lichinitser, M.; Munster, P. N.; Klein, P. M.; Cruickshank, S.; Miller, K. D.; Lee, M. J.; Trepel, J. B., Randomized Phase II, Double-Blind, Placebo-Controlled Study of Exemestane With or Without Entinostat in Postmenopausal Women With Locally Recurrent or Metastatic Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer Progressing on

- Treatment With a Nonsteroidal Aromatase Inhibitor. *J. Clin. Oncol.* **2013**, *31* (17), 2128 – 2135.
- [47] Bieliauskas, A. V.; Pflum, M. K. H., Isoform-selective histone deacetylase inhibitors. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37* (7), 1402 – 1413.
- [48] a) Regna, N. L.; Reilly, C. M., Isoform-Selective HDAC Inhibition in Autoimmune Disease. *J. Clin. Cell. Immunol.* **2014**, *5* (2), 1 – 8. b) Wu, D.; Huang, Q.; Zhang, Y.; Zhang, Q.; Liu, Q.; Gao, J.; Cao, Z.; Zhu, R., Screening of selective histone deacetylase inhibitors by proteochemometric modeling. *BMC Bioinformatics* **2012**, *13* (212), 1 – 9.
- [49] a) Butler, K. V.; Kalin, J.; Brochier, C.; Vistoli, G.; Langley, B.; Kozikowski, A. P., Rational design and simple chemistry yield a superior, neuroprotective HDAC6 inhibitor, tubastatin A. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (31), 10842 – 10846. b) Miyake, Y.; Keusch, J. J.; Wang, L.; Saito, M.; Hess, D.; Wang, X.; Melancon, B. J.; Helquist, P.; Gut, H.; Matthias, P., Structural insights into HDAC6 tubulin deacetylation and its selective inhibition. *Nat. Chem. Biol.* **2016**, *12* (9), 748 – 754.
- [50] Melesina, J.; Robaa, D.; Pierce, R. J.; Romier, C.; Sippl, W., Homology modeling of parasite histone deacetylases to guide the structure-based design of selective inhibitors. *J. Mol. Graph. Model.* **2015**, *62*, 342 – 361.
- [51] Bürli, R. W.; Luckhurst, C. A.; Aziz, O.; Matthews, K. L.; Dawn Yates, D.; Lyons, K. A.; Maria Beconi, M.; McAllister, G.; Breccia, P.; Stott, A. J.; Penrose, S. D.; Wall, M.; Lamers, M.; Leonard, P.; Ilka Müller, I.; Richardson, C. M.; Jarvis, R.; Stones, L.; Hughes, S.; Wishart, G.; Haughan, A. F.; O’Connell, C.; Mead, T.; McNeil, H.; Vann, J.; Mangette, J.; Maillard, M.; Beaumont, V.; Munoz-Sanjuan, I.; Dominguez, C., Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Potent and Selective Class IIa Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitors as a Potential Therapy for Huntington’s Disease. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (24), 9934 – 9954.
- [52] Methot, J. L.; Chakravarty, P. K.; Chenard, M.; Close, J.; Cruz, J. C.; Dahlberg, W. K.; Fleming, J.; Hamblett, C. L.; Hamill, J. E.; Harrington, P.; Harsch, A.; Heidebrecht, R.; Hughes, B.; Jung, J.; Kenific, C. M.; Kral, A. M.; Meinke, P. T.; Middleton, R. E.; Ozerova, N.; Sloman, D. L.; Stanton, M. G.; Szewczak, A. A.;

- Tyagarajan, S.; Witter, D. J.; Secrist, J. P.; Miller, T. A., Exploration of the internal cavity of histone deacetylase (HDAC) with selective HDAC1/HDAC2 inhibitors (SHI-1:2). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18* (3), 973 – 978.
- [53] Shen, S.; Kozikowski, A. P., Why Hydroxamates May Not Be the Best Histone Deacetylase Inhibitors – What Some May Have Forgotten or Would Rather Forget? *ChemMedChem* **2016**, *11* (1), 15 – 21.
- [54] a) Ames, B. N., The detection of chemical mutagens with enteric bacteria, in A. Hollaender (ed.) *Chemical Mutagens, Principles and Methods for Their Detection*, Vol. I, Plenum Press, New York, **1971**, pp. 267--282. b) Wang, C. Y., Mutagenicity of Hydroxamic acids for *Salmonella typhimurium*. *Mutat. Res.* **1977**, *56* (1), 7 – 12; c) Wang, C. Y.; Lee, L. H., Mutagenicity and Antibacterial Activity of Hydroxamic Acids. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **1977**, *11* (4), 753 – 755.
- [55] Skipper, P. L.; Tannenbaum, S. R.; Thilly, W. G.; Furth, E. E.; Bishop, W. W., Mutagenicity of Hydroxamic Acids and the Probable Involvement of Carbamoylation. *Cancer Research* **1980**, *40* (12), 4704 – 4708.
- [56] Pelton, J. T.; McLean, L. R., Spectroscopic Methods for Analysis of Protein Secondary Structure. *Anal. Biochem.* **2000**, *277* (2), 167 – 176.
- [57] Wójcik, P.; Berlicki, L., Peptide-based inhibitors of protein–protein interactions. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26* (3), 707 – 713.
- [58] Zerbe, B. S.; Hall, D. R.; Vajda, S.; Whity, A.; Kozakov, D., Relationship between Hot Spot Residues and Ligand Binding Hot Spots in Protein-Protein Interfaces. *Chem. Inf. Model* **2012**, *52* (8), 2236 – 2244.
- [59] Vagner, J.; Qu, H.; J. Hruby, V. J., Peptidomimetics, a synthetic tool of drug discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12* (3), 292 – 296.
- [60] Pelay-Gimeno, M.; Glas, A.; Koch, O.; N. Grossmann, T. N., Strukturbasierte Entwicklung von Protein-Protein-Interaktionsinhibitoren: Stabilisierung und Nachahmung von Peptidliganden. *Angew. Chem.* **2015**, *127* (31), 9022 – 9054.
- [61] Crapster, J. A.; Stringer, J. R.; Guzei, I. A.; Blackwell, H. E., Design and Conformational Analysis of Peptoids Containing N-Hydroxy Amides Reveals a Unique Sheet-Like Secondary Structure. *Biopolymers (Peptide Science)* **2011**, *96* (5), 604 – 616.

- [62] a) Baldauf, C.; Günther, R.; Hofmann, H. J., Helices in peptoids of alpha- and beta-peptides. *Phys Biol.* **2006**, *3* (1), 1 – 9. b) Jordan, P. A.; Paul, B.; Butterfoss, G. L.; Renfrew, P. D.; Bonneau, R.; Kirshenbaum, K., Oligo(*N*-alkoxy glycines): Trans Substantiating Peptoid Conformations. *Biopolymers (PeptideScience)* **2011**, *96* (5), 617 – 626. c) Miller, S. M.; Simon, R. J.; Ng, S.; Zuckermann, R. N.; Kerr, J. M.; Moos, W. H., Proteolytic Studies of Homologous Peptide and *N*-Substituted Glycine Peptoid Oligomers. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4* (22), 2657 – 2662.
- [63] a) Hodges, J. A.; Raines, R. T., Energetics of an  $n \rightarrow \pi^*$  Interaction that Impacts Protein Structure. *Org. Lett.* **2006**, *8* (21), 4695 – 4697. b) Zhang, J.; Germann, M. W., Characterization of Secondary Amide Peptide Bonds Isomerization: Thermodynamics and Kinetics from 2D NMR Spectroscopy. *Biopolymers* **2011**, *95* (11), 755 – 762. c) Sewald, N.; Jakubke, H.-D., Peptides: Chemistry and Biology **2009**, ISBN: 978-3-527-31867-4, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, p 7.
- [64] Yoo, B.; Kirshenbaum, K., Peptoid architectures: elaboration, actuation, and application. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12* (6), 714 – 721.
- [65] Laursen, J. S.; Harris, P.; Fristrup, P.; Olsen, C. A., Triangular prism-shaped  $\beta$ -peptoid helices as unique biomimetic scaffolds. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 7013.
- [66] a) Li, X.; Yang, D., Peptides of aminoxy acids as foldamers. *Chem. Commun.* **2006**, *32*, 3367 – 3379. b) Li, X.; Wu, Y.-D.; Yang, D.,  $\alpha$ -Aminoxy Acids: New Possibilities from Foldamers to Anion Receptors and Channels *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41* (10), 1428 – 1438. c) Yang, D.; Qu, J.; Li, B.; Ng, F.-F.; Wang, X.-C.; Cheung, K.-K.; Wang, D.-P.; Wu, Y.-D., Novel Turns and Helices in Peptides of Chiral  $\alpha$ -Aminoxy Acids. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121* (3), 589 – 590.
- [67] Diedrich, D.; Rodrigues Moita, A. J.; Rütger, A.; Frieg, B.; Reiss, G. J.; Hoepfner, A.; Kurz, T.; Gohlke, H.; Lüdeke, S.; Kassack, M. U.; Hansen, F. K.,  $\alpha$ - Aminoxy Oligopeptides: Synthesis, Secondary Structure, and Cytotoxicity of a New Class of Anticancer Foldamers. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22* (49), 17600 – 17611.
- [68] Shin, I.; Park, K., Solution-Phase Synthesis of Aminoxy Peptoids in the *C* to *N* and *N* to *C* Directions. *Org. Lett.* **2002**, *4* (6), 869 – 872.
- [69] a) Armand, P.; Kirshenbaum, K.; Falicov, A.; Dunbrack, R. L.; Dill, K. A.; Zuckermann, R. N.; Cohen, F. E., Chiral *N*-substituted glycines can form stable

- helical conformations. *Folding Des.* **1997**, *2* (6), 369 – 375. b) Kirshenbaum, K.; Barron, A. E.; Goldsmith, R. A.; Armand, P.; Bradley, E. K.; Troung, K. T. V.; Dill, K. A.; Cohen, F. E.; Zuckermann, R. N., Sequence-specific polypeptoids: A diverse family of heteropolymers with stable secondary structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95* (8), 4303 – 4308.
- [70] O. Roy, O.; Caumes, C.; Esvan, Y.; Didierjean, C.; Faure, S.; Taillefumier, C., The *tert*-Butyl Side Chain: A Powerful Means to Lock Peptoid Amide Bonds in the Cis Conformation. *Org. Lett.* **2013**, *15* (9), 2246 – 2249.
- [71] Caumes, C.; Roy, O.; Faure, S.; Taillefumier, C., The Click Triazolium Peptoid Side Chain: A Strong *cis*-Amide Inducer Enabling Chemical Diversity. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (23), 9553 – 9556.
- [72] Shah, N. H.; Butterfoss, G. L.; Nguyen, K.; Yoo, B.; Bonneau, R.; Rabenstein, D. L.; Kirshenbaum, K., Oligo(*N*-aryl glycines): A New Twist on Structured Peptoids. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (49), 16622 – 16632.
- [73] Jordan, P. A.; Paul, B.; Butterfoss, G. L.; Renfrew, P. D.; Bonneau, R.; Kirshenbaum, K., Oligo(*N*-alkoxy glycines): *Trans* Substantiating Peptoid Conformations. *Biopolymers (Peptide Science)* **2011**, *96* (5), 617 – 626.
- [74] a) Ham, H. O.; Park, S. H.; Kurutz, J. W.; Igal G. Szleifer, I. G.; Messersmith, P. B., Antifouling Glycocalyx-Mimetic Peptoids. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (35), 13015 – 13022. b) Lau, K. H. A.; Sileika, T. S.; Park, S. H.; Sousa, A. M. L.; Burch, P.; Szleifer, I.; Messersmith, P. B., Molecular Design of Antifouling Polymer Brushes Using Sequence-Specific Peptoids. *Adv. Mater. Interfaces* **2015**, *2* (1), 1400225.
- [75] a) Fowler, S. A.; Blackwell, H. E., Structure–function relationships in peptoids: Recent advances toward deciphering the structural requirements for biological function. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7* (8), 1508 – 1524. b) Hancock, R. E. W.; Diamond, G., The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends in Microbiology* **2000**, *8* (9), 402 – 410.
- [76] Miller, S. M.; Simon, R. J.; Ng, S.; Zuckermann, R. N.; Kerr, J. M.; Moos, W. H., Comparison of the Proteolytic Susceptibilities of Homologous L-Amino Acid, D-Amino Acid, and N-Substituted Glycine Peptide and Peptoid Oligomers. *Drug Dev. Res.* **1995**, *35* (1), 20 – 32.

- [77] Goodson, B.; Ehrhardt, A.; Ng, S.; Nuss, J.; Johnson, K.; Giedlin, M.; Yamamoto, R.; Moos, W. H.; Krebber, A.; Ladner, M.; Giacona, M. B.; Vitt, C.; Winter, J., Characterization of Novel Antimicrobial Peptoids. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43* (6), 1429 – 1434.
- [78] Patch, J. A.; Barron, A. E., Helical Peptoid Mimics of Magainin-2 Amide. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (40), 12092 – 12093.
- [79] Kapoor, R.; Eimerman, P. R.; Hardy, J. W.; Cirillo, J. D.; Contag, C. H.; Barron, A. E., Efficacy of Antimicrobial Peptoids against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55* (6), 3058 – 3062.
- [80] a) Elgersma, R. C.; Mulder, G. E.; Kruijtz, J. A. W.; Posthuma, G.; Rijkers, D. T. S.; Liskamp, R. M. J., Transformation of the amyloidogenic peptide amylin(20–29) into its corresponding peptoid and retropeptoid: Access to both an amyloidinhibitor and template for self-assembled supramolecular tapes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17* (7), 1837 – 1842. b) Qiu, W. Q.; Wallack, M.; Dean, M.; Liebson, E.; Mwamburi, M.; Zhu, H., Association between Amylin and Amyloid- $\beta$  Peptides in Plasma in the Context of Apolipoprotein E4 Allele. *PLoS ONE* **2014**, *9* (2), 1 – 7.
- [81] Hara, T.; Durell, S. R.; Myers, M. C.; Appella, D. H., Probing the structural requirements of peptoids that inhibit HDM2-p53 interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (6), 1995 – 2004.
- [82] Elsevier's Scopus abstract and citation database. URL: <https://www.scopus.com/> (11.08.16)
- [83] Kahnberg, P.; Lucke, A. J.; Glenn, M. P.; Boyle, G. M.; Tyndall, J. D. A.; Parsons, P. G.; Fairlie, D. P., Design, Synthesis, Potency, and Cytoselectivity of Anticancer Agents Derived by Parallel Synthesis from  $\alpha$ -Aminosuberic Acid. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (26), 7611 – 7622.
- [84] Gromek, S. M.; deMayo, J. A.; Maxwell, A. T.; West, A. M.; Christopher M. Pavlik, C. M.; Zhao, Z.; Li, J.; Wiemer, A. J.; Zweifach, A.; Balunas, M. J., Synthesis and biological evaluation of santacruzamate A analogues for anti-proliferative and immunomodulatory activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24* (21), 5183 – 5196.

- [85] a) Suzuki, T.; Ando, T.; Tsuchiya, K.; Nakanishi, O.; Saito, A.; Yamashita, T.; Shiraishi, Y.; Tanaka, E., Benzamide derivatives, useful as cell differentiation inducers Eur. Patent 847992, **1997**. b) Saito, A.; Yamashita, T.; Mariko, Y.; Nosaka, Y.; Tsuchiya, K.; Ando, T.; Suzuki, T.; Tsuruo, T.; Nakanishi, O., A synthetic inhibitor of histone deacetylase, MS-27-275, with marked in vivo antitumor activity against human tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96* (8), 4592 – 4597.
- [86] Suzuki, T.; Ando, T.; Tsuchiya, K.; Fukazawa, N., Synthesis and Histone Deacetylase Inhibitory Activity of New Benzamide Derivatives. *J. Med. Chem.* **1999**, *42* (15), 3001 – 3003.
- [87] a) Wang, D.-F.; Wiest, O.; Helquist, P.; Lan-Hargest, H.-Y.; Wiech, N. L., On the Function of the 14 Å Long Internal Cavity of Histone Deacetylase-Like Protein: Implications for the Design of Histone Deacetylase Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (13), 3409 – 3417. b) Haider, S.; Joseph, C. G.; Neidle, S.; Fierke, C. A.; Fuchter, M. J., On the function of the internal cavity of histone deacetylase protein 8: R37 is a crucial residue for catalysis. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21* (7), 2129 – 2132. c) Bieliauskas, A. V.; Pflum, M. K. H., Isoform-selective histone deacetylase inhibitors. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37* (7), 1402 – 1413. d) Nielsen, T. K.; Hildmann, C.; Dickmanns, A.; Schwienhorst, A.; Ficner, R., Crystal Structure of a Bacterial Class 2 Histone Deacetylase Homologue. *J. Mol. Biol.* **2005**, *354* (1), 107 – 120.
- [88] Moradei, O. M.; Mallais, T. C.; Frechette, S.; Paquin, I.; Tessier, P. E.; Leit, S. M.; Fournel, M.; Bonfils, C.; Trachy-Bourget, M.-C.; Liu, J.; Yan, T. P.; Lu, A.-H.; Rahil, J.; Wang, J.; Lefebvre, S.; Li, Z.; Vaisburg, A. F.; Besterman, J. M., Novel Aminophenyl Benzamide-Type Histone Deacetylase Inhibitors with Enhanced Potency and Selectivity. *J. Med. Chem.* **2007**, *50* (23), 5543 – 5546.
- [89] Vannini, A.; Volpari, C.; Filocamo, G.; Casavola, E. C.; Brunetti, M.; Renzoni, D.; Chakravarty, P.; Paolini, C.; De Francesco, R.; Gallinari, P.; Steinkühler, C.; Di Marco, S., Crystal structure of a eukaryotic zinc-dependent histone deacetylase, human HDAC8, complexed with a hydroxamic acid inhibitor. *S. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101* (42), 15064 – 15069.

- [90] Witter, D. J.; Harrington, P.; Kevin J. Wilson, K. J.; Chenard, M.; Fleming, J. C.; Haines, B.; Kral, A. M.; Secrist, J. P.; Miller, T. A., Optimization of biaryl Selective HDAC1&2 Inhibitors (SHI-1:2). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18* (2), 726 – 731.
- [91] "This research was originally published in the Journal of Biological Chemistry. Lauffer, B. E. L.; Mintzer, R.; Fong, R.; Mukund, S.; Tam, C.; Zilberleyb, I.; Flicke, B.; Ritscher, A.; Fedorowicz, G.; Vallero, R.; Ortwine, D. F.; Gunzner, J.; Modrusan, Z.; Neumann, L.; Koth, C. M.; Lupardus, P. J.; Kaminker, J. S.; Heise, C. E.; Steiner, P. Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitor Kinetic Rate Constants Correlate with Cellular Histone Acetylation but Not Transcription and Cell Viability. *J. Biol. Chem.* 2013; 288:26926 – 26943. © the American Society for Biochemistry and Molecular Biology."
- [92] Chou, C. J.; Herman, D.; Gottesfeld, J. M., Pimelic Diphenylamide 106 Is a Slow, Tight-binding Inhibitor of Class I Histone Deacetylases. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283* (51), 35402 – 35409.
- [93] Methot, J. L.; Hoffman, D. M.; Witter, D. J.; Stanton, M. G.; Harrington, P.; Hamblett, C.; Siliphaivanh, P.; Wilson, K.; Hubbs, J.; Heidebrecht, R.; Kral, A. M.; Ozerova, N.; Fleming, J. C.; Wang, H.; Szewczak, A. A.; Middleton, R. E.; Hughes, B.; Cruz, J. C.; Haines, B. B.; Chenard, M.; Kenific, C. M.; Harsch, A.; J. Secrist, P.; Miller, T. A., Delayed and Prolonged Histone Hyperacetylation with a Selective HDAC1/HDAC2 Inhibitor. *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, *5* (4), 340 – 345.
- [94] Rai, M.; Soragni, E.; Chou, C. J.; Barnes, G.; Jones, S.; Rusche, J. R.; Gottesfeld, J. M.; Pandolfo, M., Two New Pimelic Diphenylamide HDAC Inhibitors Induce Sustained Frataxin Upregulation in Cells from Friedreich's Ataxia Patients and in a Mouse Model. *PLoS ONE* **2010**, *5* (1), e8825.
- [95] Ugi, I., The  $\alpha$ -Addition of Immonium Ions and Anions to Isonitriles Accompanied by Secondary Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1962**, *1* (1), 8 – 21.
- [96] Zuckermann, R. N.; Kerr, J. M.; Kent, S. B. H.; Moos, W. H., Efficient Method for the Preparation of Peptoids [Oligo(N-substituted glycines)] by

- Submonomer Solid-Phase Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114* (26), 10646 – 10647.
- [97] Hjelmggaard, T.; Faure, S.; Caumes, C.; De Santis, E.; Edwards, A. A.; Taillefumier, C., Convenient Solution-Phase Synthesis and Conformational Studies of Novel Linear and Cyclic  $\alpha,\beta$ -Alternating Peptoids. *Org. Lett.* **2009**, *11* (18), 4100 – 4103.
- [98] Lieke, W., Ueber das Cyanallyl. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1859**, *112* (3), 316 – 321.
- [99] Ugi, I.; Meyr, R., Neue Darstellungsmethode für Isonitrile. *Angew. Chem.* **1958**, *70* (22-23), 702 – 703.
- [100] Schuster, R. E.; Scott, J. E.; Casanova, Jr. J., Methyl Isocyanide. *Org. Synth.* **1966**, *46*, 75.
- [101] Uhl, W.; Kyriatsoulis, A., Isonitril-Reaktion. *Namen- und Schlagwortreaktionen in der Organischen Chemie* **1984**, ISBN 978-3-663-02002-8, Vieweg+Teubner Verlag, p 216 – 218.
- [102] Wang, X.; Wang, Q.-G.; Luo, Q.-L., Synthesis of Isonitriles from N-Substituted Formamides Using Triphenylphosphine and Iodine. *Synthesis* **2015**, *47* (01), 49 – 54.
- [103] Miyaura, N.; Yanagi, T.; Suzuki, A., The Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reaction of Phenylboronic Acid with Haloarenes in the Presence of Bases. *Synthetic Communications* **1981**, *11* (7), 513 – 519.
- [104] a) Mangunuru, H. P. R.; Yang, H.; Wang, G., Synthesis of peptoid based small molecular gelators by a multiple component reaction. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (40), 4489 – 4491. b) Marcaccini, S.; Torroba, T., The use of the Ugi four-component condensation. *Nature Protocols* **2007**, *2* (3), 632 – 639.
- [105] a) Breitmaier, E., *Vom NMR-Spektrum zur Strukturformel org. Verbindungen* **1992**, ISBN 978-3-519-13506-7, B. G. Teubner Stuttgart, p 176 – 177. b) Friebolin, H., Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie: Eine Einführung **2013**, ISBN 978-3-527-33492-6, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, p 321 – 328.
- [106] Cai, J.; Wie, H.; Hong, K. H.; Wu, X.; Cao, M.; Zong, X.; Li, L.; Sun, C.; Chen, J.; Ji, M., Discovery and preliminary evaluation of 2-aminobenzamide and

- hydroxamate derivatives containing 1,2,4-oxadiazole moiety as potent histone deacetylase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *96*, 1 – 13.
- [107] Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65* (1-2), 55 – 63. b) Berridge, M. V.; Tan, A. S., Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, *303* (2), 474 – 482.
- [108] Ciossek, T.; Julius, H.; Wieland, H.; Maier, T.; Beckers, T. A., A homogeneous cellular histone deacetylase assay suitable for compound profiling and robotic screening. *Anal. Biochem.* **2008**, *372* (1), 72 – 81.
- [109] Bonfils, C.; Kalita, A.; Dubay, M.; Siu, L. L.; Carducci, M. A.; Reid, G.; Martell, R. E.; Besterman, J. M.; Li, Z., Evaluation of the pharmacodynamic effects of MGCD0103 from preclinical models to human using a novel HDAC enzyme assay. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14* (11), 3441 – 3449.
- [110] Heltweg, B.; Trapp, J.; Jung, M., In vitro assays for the determination of histone deacetylase activity. *Methods* **2005**, *36*, 332–337.
- [111] Olsen, C. A.; Montero, A.; Leman, L. J.; Ghadiri, M. R., Macrocyclic Peptoid–Peptide Hybrids as Inhibitors of Class I Histone Deacetylases. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3* (9), 749 – 753.
- [112] Zhou, J.; Li, M.; Chen, N.; Wang, S.; Luo, H.-B.; Zhang, Y.; Wu, R., Computational Design of a Time-Dependent Histone Deacetylase 2 Selective Inhibitor. *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10* (3), 687 – 692.
- [113] Krieger, V.; Ciglia, E.; Thoma, R.; Vasylyeva, V.; Frieg, B.; de Sousa Amadeu, N.; Kurz, T.; Janiak, C.; Gohlke, H.; Hansen, F. K.,  $\alpha$ -Aminoxy Peptoids: A Unique Peptoid Backbone with a Preference for *Cis*-Amide Bonds. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23* (15), 3699–3707.
- [114] Wang, Y. J.; Szantai-Kis, D. M.; Petersson, E. J., Chemoselective modifications for the traceless ligation of thioamide-containing peptides and proteins. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 6262 – 6269.

- [115] Ohlmeyer, M.; Bohnstedt, A.; Kingsbury, C.; Ho, K.-K.; Quintero, J.; You, M.; Park, H.; Lu, Y., Purine and imidazopyridine derivatives for immunosuppression. Publication Date 2006/10/12. US. Patent WO2006108103 A1.
- [116] Reddy, B. J.; Reddy, M. C. S., Synthesis, Characterization and antibacterial evaluation of few 2,3-substituted quinoxalines. *J. Chil. Chem. Soc.* **2010**, *55* (4), 483 – 485.
- [117] Berk, S.; Close, J.; Hamblett, C.; Heidebrecht, R.; Kattar, S.; Kliman, L.; Mampreian, D.; Methot, J.; Miller, T.; Sloman, D.; Stanton, M.; Tempest, P.; Zabierek, A., Spirocyclic compounds. Publication Date 2007/05/24. US. Patent US20070117824 A1.