



Peptoidbasierte HDAC6-Inhibitoren
und α -Aminoxyoligopeptide –
Neuartige peptidomimetische
Substanzklassen mit
Antitumoraktivität

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Daniela Diedrich

aus Duderstadt

Düsseldorf, Dezember 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

Referent: Prof. Dr. Thomas Kurz

Korreferent: JProf. Dr. Finn K. Hansen

Tag der mündlichen Prüfung: 04. Mai 2018

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbstständig 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 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, Dezember 2017

(Daniela Diedrich)

Die vorliegende Dissertation wurde im Zeitraum von Juni 2012 bis März 2017 am Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Kurz angefertigt. Zusätzlich wurde diese Arbeit von JProf. Dr. Finn Hansen betreut.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Thomas Kurz möchte ich herzlich danken für die Aufnahme in seinem Arbeitskreis, seine stets offene Tür, sein Interesse an meiner Arbeit und die Möglichkeit, die er mir gegeben hat, in seinem Arbeitskreis zu promovieren.

Zudem gilt mein besonderer Dank Herrn JProf. Dr. Finn K. Hansen, der diese Arbeit zusätzlich betreut hat. Ich danke ihm sehr für die Überlassung des interessanten Themas, seine engagierte Betreuung und seine Unterstützung während meiner Promotionszeit. Zudem danke ich ihm für die Übernahme des Korreferats.

Für die bioinformatischen und biologischen Untersuchungen möchte ich den Mitgliedern der Arbeitskreise von *Prof. Dr. Holger Gohlke*, *Prof. Dr. Matthias U. Kassack* und *Prof. Dr. Hauer* danken.

Für die analytischen Untersuchungen aus den Abteilungen der NMR-Spektroskopie, Massenspektroskopie und Elementaranalyse danke ich *Frau Maria Beuer*, *Herrn Peter Behm*, *Herrn Dr. Peter Tommes* und *Frau Gabriele Zerta*. Zudem danke ich *Dr. Steffen Lüdeke* und *Dr. Anja Rüther* für die Aufnahme der CD-Spektren und *Herrn Dr. Guido Reiß* und *Frau Dr. Astrid Höppner* für die Anfertigung der Röntgenstrukturanalysen.

Darüber hinaus möchte ich mich ganz herzlich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die angenehme Atmosphäre und ihre Hilfsbereitschaft bedanken. Danke für die produktive Zusammenarbeit, die wertvollen Impulse und die fachlichen Diskussionen sowie für die tolle Stimmung innerhalb und außerhalb der Uni. Mein Dank gilt meiner langjährigen Laborkollegin *Dr. Viktoria Krieger* sowie *Dr. Katharina Stenzel*, *Yodita Asfaha*, *Marc Pflieger*, *Tanja Knaab*, *Vitalij Woloschin*, *Leandro Avelar*, *Marcel Mackwitz*, *Alexander Berger*, *Petra Stahlke*, *Beate Lungerich*.

Allen Mitgliedern des Instituts für Pharmazeutische und Medizinische Chemie danke ich für die fortwährende Unterstützung und immer freundliche Arbeitsatmosphäre.

Ein besonders herzlicher Dank gilt meiner Familie, meinem Freund Lukas und meinen Freunden. Ihre nie endende Unterstützung, die stetige Motivation und ihr bedingungsloser Rückhalt haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Kumulative Teile (Publikationen)

Die Kapitel 3, 5 und 6 der vorliegenden Dissertation sind in kumulativer Form dargestellt. In Kapitel 3, 5 und 6 wird ein kurzer Überblick zur jeweiligen Publikation gegeben (Hintergrund, Zielsetzung und Zusammenfassung). Abschnitt 10 beinhaltet die originalen Veröffentlichungen sowie eine Darlegung der jeweils beigetragenden Anteile des Autors zu den Publikationen.

Teile der Dissertation sind bereits veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht:

Kapitel 3: Publikation I

D. Diedrich, A. Hamacher, C. G. W. Gertzen, L. A. Alves Avelar, G. J. Reiss, T. Kurz, H. Gohlke, M. U. Kassack and F. K. Hansen

Rational design and diversity-oriented synthesis of peptoid-based selective HDAC6 inhibitors

Chem. Commun. **2016**, 52, 3219-3222. DOI: [10.1039/c5cc10301k](https://doi.org/10.1039/c5cc10301k)

(Verbindungen aus Publikation I sind analog nummeriert und mit einem * markiert)

Kapitel 5: Publikation II

D. Diedrich, A. J. Moita, A. Rüther, B. Frieg, G. J. Reiss, A. Hoepfner, T. Kurz, H. Gohlke, S. Lüdeke, M. U. Kassack, and F. K. Hansen

Aminoxy oligopeptides: synthesis, secondary structure, and cytotoxicity of a new class of anticancer foldamers

Chem. Eur. J. **2016**, 22, 17600-17611. DOI: [10.1002/chem.201602521](https://doi.org/10.1002/chem.201602521)

(Verbindungen aus Publikation II sind analog nummeriert und mit einem ‡ markiert)

Kapitel 6: Publikation III

S. Bhatia, **D. Diedrich**, B. Frieg, S. Stein, B. Bopp, F. Lang, T. Zang, T. Kroeger, T. Ernst, G. Kögler, A. Krieg, S. Lüdeke, H. Kunkel, A. J. Rodrigues Moita, M. U. Kassack, V. Marquardt, F. V. Opitz, M. Oldenburg, M. Remke, F. Babor, M. Grez, A. Hochhaus, A. Borkhardt, G. Groth, L. Nagel-Steger, J. Jose, T. Kurz, H. Gohlke, F. K. Hansen, and J. Hauer.

Targeting HSP90 dimerization via the C-terminus is effective in imatinib resistant CML and lacks heat shock response induction

Blood, Accepted April 19, 2018. DOI: [10.1182/blood-2017-10-810986](https://doi.org/10.1182/blood-2017-10-810986)

(Verbindungen aus Publikation III sind analog nummeriert und mit einem # markiert)

Teile der Dissertation (Kapitel 4) entstammen aus einer Arbeiten, die für eine Veröffentlichung vorbereitet wird:

D. Diedrich, K. Stenzel, E. Hesping, Y. Antonova-Koch, T. Gebru, S. Duffy, G. Fisher, A. Schöler, S. Meister, T. Kurz, V. M. Avery, E. A. Winzeler, J. Held, K. T. Andrews, F. K. Hansen

One-pot, multi-component synthesis and structure-activity relationships of peptoid-based histone deacetylase (HDAC) inhibitors targeting malaria parasites

Eur. J. Med. Chem., Submitted April 2018.

Posterpräsentationen

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

α -Aminoxy peptides as α -helix mimetics: solid-phase synthesis and conformational investigation.

D. Diedrich, E. Ciglia, A. Rütter, T. Kurz, S. Lüdeke, H. Gohlke, F. K. Hansen
Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, 24.-26. Sept. 2014,
Frankfurt am Main.

α -Aminoxy oligopeptides: solid-phase synthesis, conformational investigation and anticancer activity

D. Diedrich, A. J. Rodrigues Moita, A. Rütter, T. Kurz, S. Lüdeke, M. U. Kassack, F. K. Hansen
Jahrestagung der deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, 23.-25. Sept. 2015,
Düsseldorf.

Multicomponent synthesis of peptoid-based selective HDAC6 inhibitors

D. Diedrich, A. Hamacher, C. G. W. Gertzen, L. A. Alves Avelar, G. J. Reiss, T. Kurz,
H. Gohlke, M. U. Kassack, F. K. Hansen
Frontiers in Medicinal Chemistry, 13.-16. März 2016,
Bonn

Abkürzungsverzeichnis

A2780	humane epitheliale Ovarialkarzinomzelllinie
AAV	allgemeine Arbeitsvorschrift
ACP	antitumoraktive Peptide (<i>Anticancer Peptides</i>)
ADP	Adenosindiphosphat
AML	akute myeloische Leukämie
AMP	antimikrobielle Peptide (<i>Antimicrobial Peptides</i>)
Äq.	Äquivalent(e)
ATP	Adenosintriphosphat
ber.	berechnet
Cal27	humane Plattenepithelkarzinomzelllinie der Zunge
CD	Circulardichroismus
CisR	cisplatinresistente Zelllinie
CML	chronische myeloische Leukämie
CPP	zellpenetrierende Peptide (<i>Cell-penetrating Peptides</i>)
CTCL	kutanes T-Zell-Lymphom
CTD	C-terminale Domäne
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
EA	Elementaranalyse
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur (<i>European Medicines Agency</i>)
Et ₃ N	Triethylamin
Exp.	Experiment
FDA	Lebens- und Arzneimittelbehörde (<i>Food and Drug Administration</i>)
gef.	gefunden
HAT	Histonacetyltransferase
hCD	humane katalytische Domäne (<i>human catalytic domain</i>)
HDAC	Histondeacetylase
HDACi	Histondeacetylaseinhibitor(en)

HDLP	<i>histone deacetylase-like protein</i>
HDM2	<i>human double minute 2 protein</i>
HEK293	humane embryonale Nierenzellen
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRMS	hochaufgelöste Massenspektroskopie
HSP90	Hitze-Schock-Protein 90 (<i>heat shock protein 90</i>)
HSP90i	Hitze-Schock-Protein 90 Inhibitor(en)
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
Ky5e510	Plattenepithelkarzinom der Speiseröhre
m	Molar
M	Mitteldomäne
MD	molekulardynamisch
MDR	arzneistoffinduzierte Mehrfachresistenz (<i>Multiple Drug Resistance</i>)
MeOH	Methanol
MKR	Multikomponentenreaktion
MM	multiples Myelom
MS 4 Å	Molekularsieb 4 Å
MST	MicroScale Thermophorese
mTOR	<i>mechanistic Target of Rapamycin</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
n. b.	nicht bestimmt
Na	Natrium
NAD ⁺	Nicotinsäureamidadenindinukleotid
NES	Nukleares Export Signal
Next A	Nexturastat A
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
NTD	<i>N</i> -terminale Domäne
PLI	Protein-Ligand-Interaktion(en)
PPI	Protein-Protein-Interaktion(en)
PTCL	peripheres T-Zell Lymphom
PTM	posttranslationale Modifikationen

RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
ROESY	<i>rotating-frame nuclear overhauser effect spectroscopy</i>
SC	Säulenchromatographie
SE14	Serin-Glutamin-enthaltendes Tetradecapeptid
SI	Selektivitätsindex
Smp.	Schmelzpunkt
SPS	Festphasensynthese (<i>solid phase synthesis</i>)
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Trifluorethanol
U-4CR	Ugi-4-Komponentenreaktion (<i>Ugi-4-component reaction</i>)
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VT-NMR	variable Temperatur-NMR
WHO	Weltgesundheitsorganisation
ZBG	zinkbindende Gruppe
zCD	katalytische Domäne des Zebrafischs (<i>zebra fish catalytic domain</i>)
ZnF-UBP	Zinkfinger Ubiquitinbindungsdomäne

Inhaltsverzeichnis

Kumulative Teile (Publikationen)	V
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Tumorerkrankungen	3
1.1.1 Tumorthherapie.....	5
1.1.1.1 Klassische Chemotherapie.....	5
1.1.1.2 Zielgerichtete Tumorthherapie (<i>Targeted Therapy</i>).....	7
1.1.2 Resistenzentwicklung bei der Tumorthherapie.....	9
1.2 Epigenetischer Therapieansatz.....	10
1.2.1 Histone und posttranslationale Histonmodifikationen.....	10
1.2.2 Acetylierung und Deacetylierung von Histonen.....	12
1.2.3 Histondeacetylasen (HDAC)	13
1.2.4 Histondeacetylaseinhibitoren (HDACi).....	15
1.2.5 HDAC6	17
1.2.5.1 Funktionen von HDAC6 und Relevanz für die Tumorgenese ...	18
1.2.5.2 HDAC6-Inhibitoren und ihre Entwicklung	20
1.3 Peptide und Peptidomimetika in der Tumorthherapie	24
1.3.1 Peptidomimetika	26
1.3.2 Antitumoral wirksame Peptide	27
1.3.3 Foldamere	30
1.3.3.1 α -Aminoxypeptide.....	31
1.3.3.2 α -Peptoide.....	33
2 Zielsetzung.....	37

3	Synthese peptoidbasierter HDAC6-Inhibitoren	38
3.1	Zielsetzung	38
3.2	Überlegungen zur Syntheseplanung.....	39
3.3	Zusammenfassung der Publikation I.....	41
4	5-Komponenten-1-Topf-Reaktion peptoidbasierter HDACi.....	43
4.1	Ausgangspunkt und Zielsetzung	43
4.2	Optimierung der Multikomponentensynthese.....	45
4.3	Synthese der peptoidbasierten HDAC-Inhibitoren	48
4.4	Biologische Evaluation der HDACi.....	48
4.4.1	Aktivitätsuntersuchung mittels MTT-Assay.....	49
4.4.2	Untersuchungen zur Inhibition der HDAC-Enzymaktivität	51
4.4.3	Untersuchungen der potentiellen Isoformselektivität	53
4.5	Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse	54
5	α-Aminoxypeptide als peptidomimetische Foldamere	57
5.1	Zielsetzung	57
5.2	Überlegungen zur Syntheseplanung.....	59
5.3	Zusammenfassung der Publikation II.....	60
6	α-Aminoxypeptide als C-terminale HSP90-Inhibitoren.....	63
6.1	Hitze-Shock-Protein 90 (HSP90).....	63
6.2	HSP90-Inhibitoren (HSP90i)	66
6.2.1	N-terminale HSP90-Inhibitoren (NTD HSP90i).....	66
6.2.2	C-terminale HSP90-Inhibitoren (CTD HSP90i).....	68
6.3	Zielsetzung	71
6.4	Zusammenfassung der Publikation III	72

7	Zusammenfassung und Ausblick.....	74
8	Summary and Outlook.....	90
9	Experimenteller Teil.....	104
9.1	Präparative Arbeitstechniken.....	104
9.2	Charakterisierungsmethoden.....	105
9.3	Allgemeine Arbeitsvorschrift (AAV): Synthese der HDACi 1a-q.....	106
9.4	Analytische Daten der Hydroxamsäuren 1a-q.....	107
10	Publikationen.....	124
10.1	Publikation I.....	124
10.2	Publikation II.....	145
10.3	Publikation III.....	173
11	Literaturverzeichnis.....	220

1 Einleitung

Die Entwicklung innovativer Wirkstoffe zur Behandlung von Tumorerkrankungen, die selektiv maligne Zellen adressieren, ist eine der größten Herausforderungen unserer Zeit. Trotz der enormen Fortschritte, die auf diesem Gebiet in den letzten Jahrzehnten erzielt wurden, sind Tumorerkrankungen, neben Herz-Kreislauf-Erkrankungen, die zweithäufigste Todesursache in den industriell entwickelten Ländern.¹ Nach Angaben der ‚*International Agency for Research on Cancer*‘ (IARC) der Weltgesundheitsorganisation (WHO) wurden im Jahr 2012 weltweit 14.1 Mio. Neuerkrankungen² gemeldet und ca. 8.2 Mio. Menschen sind aufgrund von Tumoren gestorben.^[1] Zu den am häufigsten diagnostizierten Tumorarten, die gleichzeitig für die meisten Todesfälle verantwortlich sind, gehören Brust-, Prostata-, Darm- und Lungentumoren.^{3[2]} Bis zum Jahr 2030 wird erwartet, dass diese Zahlen auf 21.7 Mio. Neuerkrankungen und 13 Mio. Todesfällen ansteigen.^[1] Neben den Hauptrisikofaktoren, zu denen Mangelernährung (ballaststoffarme Ernährung), Übergewicht, Bewegungsmangel, übermäßiger Tabak- sowie Alkoholkonsum zählen, hat auch die demographische Entwicklung (wachsende Bevölkerungszahl und steigende Lebenserwartung) einen wesentlichen Einfluss auf die zunehmende Morbidität.^[2] Da mit zunehmendem Alter die Funktionen der körpereigenen Zellreparaturmechanismen abnehmen und die Wahrscheinlichkeit fehlerhafter Zellteilung zunimmt, steigt das Risiko für die Entstehung von Tumoren. Trotz stetig verbesserter Diagnose- und Früherkennungsmöglichkeiten und beachtlichen Fortschritten in der Tumorthherapie, ist eine Heilung bzw. eine deutliche Verlängerung der Lebenszeit nur bei wenigen Tumoren möglich. Oftmals kann nur eine Teilremission, eine Linderung tumorbedingter Symptome oder eine begrenzte Lebenszeitverlängerung erzielt werden. Die Entwicklung arzneistoffinduzierter Resistenzen und die mangelnde Selektivität vieler Pharmaka verdeutlichen zudem den wachsenden Bedarf an innovativen Strategien für die Tumorthherapie und an nebenwirkungsarmen Antitumorwirkstoffen mit hoher Selektivität gegenüber Tumorzellen.

Durch die Aufklärung wichtiger biologischer Vorgänge, die zur Tumorentstehung beitragen, eröffnen sich vielversprechende neue Therapiemöglichkeiten. Neben der

¹ In Ländern mit geringem bis mittlerem Einkommen sind die häufigsten Todesursachen Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Infektions- und parasitäre Erkrankungen gefolgt von Tumorerkrankungen.^[2]

² Nicht-melanozytärer Hauttumore sind bei diesen Zahlen nicht berücksichtigt.^[2]

³ Die drei häufigsten Tumorarten in den Industrieländern sind bei Männern: Prostata, Lunge, Darm und bei Frauen: Brust, Darm, Lunge. In den Schwellen- und Entwicklungsländer sind es bei Männern: Lunge, Leber, Magen und bei Frauen: Brust, Gebärmutter und Lunge.^[2]

Akkumulation genetischer DNA-Defekte, finden im Verlauf der Tumorprogression auch Veränderungen auf epigenetischer Ebene statt.^[3,4] Störungen der epigenetischen Regulationsmechanismen können essentielle zelluläre Prozesse wie die Proliferation, Differenzierung und Apoptose negativ beeinflussen und so zur Tumorentstehung beitragen.^[5] Histondeacetylasen (HDAC), eine Enzymfamilie, die in bestimmten Tumoren überexprimiert ist, haben eine globale Regulationsfunktion bei vielen dieser Zellvorgänge und stellen ein attraktives Target der Wirkstoffentwicklung dar.^[6,7] HDAC-Inhibitoren (HDACi) greifen in die epigenetischen Regulationsmechanismen ein und können auf die charakteristischen Eigenschaften der Tumorzellen Einfluss nehmen.

Ein weiteres Ziel für die Entwicklung von Tumorthérapeutika ist das Hitze-Schock-Protein 90 (HSP90). Als Chaperon unterstützt es Klientproteine bei der korrekten Faltung in ihre funktionelle Konformation.^[8] Es ist an einer Reihe zellulärer Prozesse beteiligt und schützt Zellen vor intrazellulären Stress. Zu den Klientproteinen zählen dabei auch tumorassoziierte Proteine.^[9] HSP90 nimmt dadurch Einfluss auf die Entartung von Zellen und trägt zur Entstehung und zum Überleben von Tumorzellen bei. Zudem weist HSP90 in Tumorzellen häufig eine erhöhte Expression und Chaperonaktivität auf.^[10] HSP90-Inhibitoren (HSP90i) sind daher von großem therapeutischem Interesse und bieten vielversprechende Strategien zur Behandlung von Tumorerkrankungen.^[8-11]

Weiterhin bieten Peptide und ihre Analoga vielversprechende Einsatzmöglichkeiten als Antitumorwirkstoffe.^[12-14] Peptide besitzen dabei häufig neben einer guten Effektivität auch eine hohe Spezifität mit geringem Nebenwirkungspotential. Diese Faktoren machen Peptide zu attraktiven Kandidaten für die Wirkstoffentwicklung. Die guten Peptidwirkstoffe erweisen sich jedoch, aufgrund der geringen metabolischen Stabilität, der unzureichenden Bioverfügbarkeit und ihrer Konformationsflexibilität, häufig als weniger erfolgsversprechende Arzneistoffe.^[15] Die Entwicklung von Peptidanaloga (Peptidomimetika) ist daher von hohem pharmazeutischem Interesse. Beim Design von Peptidomimetika können durch den Einsatz von unnatürlichen Aminosäuren und Aminosäureanaloga die pharmazeutisch wichtigen Eigenschaften der natürlichen Peptide verbessert werden.^[16,17] Zusätzlich können essentielle und komplexe Sekundärstrukturen der ursprünglichen Peptidvorbilder häufig durch relativ kurze Peptidanaloga rekonstruiert und nachgeahmt werden.^[18-20]

Diese Arbeit befasst sich daher mit der Entwicklung und der Synthese neuartiger peptidomimetischer Substanzklassen mit antitumoraler Aktivität.

1.1 Tumorerkrankungen

Tumoren sind Ansammlungen von entarteten Gewebeneubildungen (Neoplasien), die durch Störungen der Kontrollmechanismen entstehen, die für die Regulierung des Zellwachstums notwendig sind.^[21] Die entarteten Zellen sind dabei häufig gekennzeichnet durch eine rapide Zellteilung und ein unkontrolliertes Wachstum. Die große Vielzahl an Tumorerkrankungen⁴ wird in systemische Erkrankungen des Lymphsystems (Lymphome), des Blutsystems (Leukämien) und in solide Tumoren eingeteilt.^[21] Die soliden Tumoren sind dabei nach der Lokalisation im menschlichen Körper benannt. Es wird dabei zwischen benignen (gutartigen) und malignen (bösartigen) Neoplasien unterschieden. Im Gegensatz zu den benignen Neoplasien sind maligne Tumoren invasiv. Sie wachsen in benachbarte Gewebe ein und zerstören dabei gesunde Zellen. Weiterhin neigen maligne Neoplasien zur Metastasierung, wobei Tochter Tumoren in entfernten Bereichen des Körpers gebildet werden.

Die Entstehung von Tumoren durch ein unkontrolliertes Wachstum entarteter Zellen ist ein komplexer Vorgang und das Resultat von Mutationen und Veränderungen, die auf genetischer oder epigenetischer Ebene stattfinden.^[22,23] Eine wesentliche Rolle spielen dabei Veränderungen an tumorrelevanten Genen, insbesondere den Tumorsuppressorgenen und Onkogenen.^[24] Die Tumorsuppressorgene greifen regulierend in den Zellzyklus und die Apoptose ein und verhindern die Transformation von gesunden zu entarteten Zellen. Onkogene hingegen fördern die Zellteilung und begünstigen den Übergang vom normalen Wachstumsverhalten der Zelle zum unkontrollierten malignen Zellwachstum. Ungleichgewichte bei der Expression der Gene bewirken Veränderungen der zellulären Signalverarbeitung und Störungen der Kontrollmechanismen des streng regulierten Zellzyklus. Entartete Zellen werden normalerweise vom Immunsystem erkannt und eliminiert. Tumorzellen besitzen aufgrund von Mutationen besondere Eigenschaften, wodurch sie diese Immunantworten umgehen können (Abb. 1.1).^[25]

⁴ Die Vielzahl an unterschiedlichen malignen Tumorerkrankungen wird umgangssprachlich auch unter dem Sammelbegriff ‚Krebs‘ zusammengefasst.

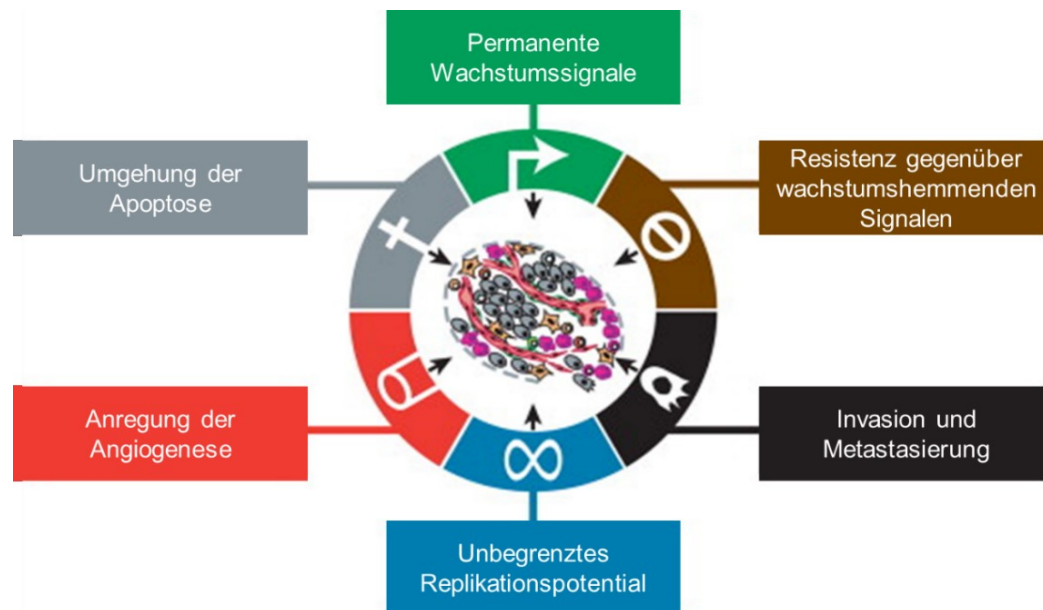


Abb. 1.1: Kennzeichen von Tumorzellen. (adapted with permission from Elsevier: *Cell* ^[25], copyright 2011).

Sie umgehen wachstumshemmende Signale und erhalten gleichzeitig permanent Wachstumssignale.^[25] Daraus resultieren eine schnelle Proliferation und ein unkontrolliertes Wachstum. Weiterhin ist die Apoptose sehr stark vermindert, so dass die Zellen trotz DNA-Schäden überleben und Defekte repliziert werden. Tumorzellen besitzen dabei ein unbegrenzt Replikationspotential. Um eine kontinuierliche Versorgung mit ausreichend Nährstoffen zu gewährleisten, kommt es ab einer bestimmten Tumorgroße zur Anregung der Gefäßneubildung (Angiogenese). Darüber hinaus sind maligne Zellen genetisch sehr instabil und besitzen ein hohes Anpassungsvermögen an die Gegebenheiten der Umgebung. Sie wachsen in fremde Gewebe ein und zerstören diese (Invasion) und können sich darüber hinaus über den Körper fortbewegen und in fremde Gewebe Metastasen ausbilden.^[25] Damit aus einer normalen Zelle eine Tumorzelle wird, müssen mehrere dieser Eigenschaften gleichzeitig auftreten.^[26,27] Kommt es zu einer Akkumulation mehrerer Merkmale, können die Defekte der Zellzyklusregulationsgene nicht mehr ausreichend behoben werden. Es kommt zu einem deregulierten Gleichgewicht zwischen Proliferation und Apoptose, das in Folge des Wachstumsvorteils eine Ausbreitung der transformierten Zellen und die Entstehung eines Tumors nach sich zieht.

1.1.1 Tumorthherapie

Eine diagnostizierte Tumorerkrankung kann auf unterschiedliche Weise behandelt werden. Die Tumorthherapie wird dabei individuell angepasst, je nach Art, Größe und Lokalisation des Tumors, Stadium und Fortschritt der Krankheit sowie dem Patienten selbst. Zu den therapeutischen Methoden zählen die chirurgische Entfernung solider Tumoren, die lokale Bestrahlung der Tumorzellen mit Röntgen- oder Gammastrahlen und die medikamentöse Behandlung (Chemotherapie). Unter den genannten Therapieformen hat die Chemotherapie die größte Bedeutung, da sie nicht lokal eingeschränkt ist, sondern die Therapeutika auf Tumorzellen im ganzen Körper wirken. Häufig wird die Chemotherapie zusätzlich nach einem erfolgreichen chirurgischen Eingriff oder nach einer Bestrahlung eingesetzt. Dadurch soll restliches Tumorgewebe vollständig eliminiert und ein erneutes Tumorwachstum verhindert werden. Bei Tumoren in fortgeschrittenen und metastasierten Stadien sowie bei nicht soliden Tumorerkrankungen ist die Chemotherapie meist die einzige mögliche Therapieform. Die medikamentösen Behandlungsmöglichkeiten werden in die klassische Chemotherapie und in die zielgerichteten Therapien (*Targeted Therapy*) unterteilt.

1.1.1.1 Klassische Chemotherapie

Konventionelle oder „klassische“ Chemotherapeutika sind zelltoxische Substanzen, sogenannte Zytostatika.^[28] Diese greifen störend in Stoffwechselprozesse und die Zellteilung ein, wodurch das Zellwachstum gehemmt und die betroffenen Zellen zerstört werden. Der wesentliche therapeutische Angriffspunkt der Zytostatika nutzt die stärkere Proliferation der Tumorzellen im Vergleich zum Zellwachstum normaler Gewebe.^[28] Die sich rasch teilenden Tumorzellen sind empfindlicher gegenüber den klassischen Chemotherapeutika und werden durch diese in ihrem Wachstum stärker gehemmt als die meisten gesunden Zellen. Es gibt verschiedene Substanzklassen, die ihre Wirkung auf unterschiedliche Weise erzielen. Einige der Verbindungen haben direkten Einfluss auf die DNA, indem sie an diese binden oder als „falsche“ Stoffwechselbausteine eingebaut werden, während andere Zytostatika Enzyme inhibieren, die bei der Zellteilung eine wichtige Rolle spielen.^[28] Die Tab. 1.1 gibt einen Überblick über ausgewählte Substanzklassen und ihre Wirkmechanismen, die in der klassischen Chemotherapie eingesetzt werden.^[28-30]

1.1 Tumorerkrankungen

Tab. 1.1: Ausgewählte Substanzklassen klassischer Chemotherapeutika.

Substanzklasse	Wirkprinzip
Antimetabolite	Natürliche Stoffwechselbausteinen werden durch ‚falsche‘ Substrate verdrängt und ersetzt. Dies beeinträchtigt wichtige Stoffwechselprozesse und die DNA-Replikation und stört die Synthese von Nucleinsäuren und Nukleotiden. Beispiele sind Purin- und Pyrimidinanaloga sowie Folsäureantagonisten.
DNA-Alkylanzien	Kovalente Bindungen an DNA-Basen führen zu Veränderungen (Quervernetzung, Strangbrüche und abnormale Basenpaarung). Die DNA-Replikation wird beeinträchtigt und somit die Zellteilung. Zu den Substanzklassen zählen Alkylsulfonate, Nitrosoharnstoffe, Platin-, Hydrazin- und <i>N</i> -Lost-Derivate.
Mitosehemmstoffe	Hemmung des Zellteilungsprozesses durch Beeinflussung des Spindelapparates über die Mikrotubulifunktion. Vinca-Alkaloide hemmen die Tubulinpolymerisation und hindern den Aufbau des Spindelapparates, Taxane hemmen die Depolymerisation. Durch beide Mechanismen wird der Spindelapparat negativ beeinflusst.
Topoisomerasehemmstoffe	Die DNA-Replikation bei der Zellteilung wird durch Topoisomerasen erleichtert, indem sie DNA-Stränge kurzfristig brechen und sie nach der Replikation erneut ligieren. Einzelstrang- (Topoisomerase I) und Doppelstrangbrüche (Topoisomerase II) werden unterschieden. Hemmung der Enzymaktivitäten führt zu vermehrten Strangbrüchen und der Zelltod tritt ein.
Antibiotikaderivate	Mehrere Mechanismen tragen zur zytostatischen Wirkung bei. Einige interkalieren mit der DNA und RNA und stören so die DNA/RNA-Synthese, andere induzieren durch Radikalbildung und Hemmung der Topoisomerase II DNA-Strangbrüche. Die wichtigsten Vertreter dieser Klasse sind die Anthracycline.

Die allermeisten dieser Zytostatika haben den Nachteil, dass sie nicht ausreichend tumorspezifisch wirksam sind. Sie unterscheiden nur unzureichend zwischen gesunden Zellen und Tumorgewebe, wodurch eine substanzielle Toxizität gegenüber gesunden Gewebe besteht. Hierbei werden insbesondere Zellen geschädigt, die ein ähnliches Zellteilungsvermögen aufweisen wie die entarteten Tumorzellen.^[30] Als Folge treten eine Reihe schwerer Nebenwirkungen auf.^[29] Unter anderen kann es zu Übelkeit, Erbrechen, Haarausfall, Schleimhautproblemen und Veränderungen des Blutbilds kommen. Bei einigen Zytostatika können Spätfolgen wie Unfruchtbarkeit, Organschäden und die Bildung von Zweittumoren auftreten. Die Ausprägung der Nebenwirkungen hängt, neben der individuellen Situation und dem Patienten, sehr stark vom Zytostatikum und der Dosierung ab. Letzteres lässt sich aufgrund der mangelnden Selektivität nur schwer

einstellen. Es werden zudem häufig Kombinationstherapien mehrerer Chemotherapeutika eingesetzt, um unerwünschte Arzneimittelauswirkungen gering zu halten. Ein Hauptziel der pharmazeutischen Forschung ist daher die Entwicklung von Arzneistoffen, die sich gezielt gegen entartete Tumorzellen richten, sogenannte *Targeted Therapies*.^[31–33]

1.1.1.2 Zielgerichtete Tumorthherapie (*Targeted Therapy*)

Anders als klassische Chemotherapeutika, die ihre Wirkung direkt antiproliferativ entfalten und so auch schnell wachsende gesunde Zellen beeinträchtigen, greifen gerichtete Therapeutika gezielt in molekulare Vorgänge auf Zellebene ein, die eine zentrale Rolle bei der Zellteilung und dem Wachstum von Tumoren spielen.^[34] Die Arzneimittel sollen möglichst spezifisch Tumorzellen adressieren und dadurch eine geringere Toxizität gegenüber gesunden Zellen und weniger Nebenwirkungen aufweisen.^[30] Als molekulare *Targets* dienen spezifische Angriffspunkte, durch die sich entartete Zellen von normalen Gewebe abgrenzen und die für die genetischen Veränderungen der Tumorzellen verantwortlich sind. Häufig sind davon Proteine betroffen, die an der Bildung und Weiterleitung von Wachstumssignalen oder an der Regulation der Differenzierung beteiligt sind. Durch unterschiedliche Wirkmechanismen kann in die gestörten Regulationsvorgänge maligner Zellen eingegriffen werden. So haben Wirkstoffe unter anderen die Neutralisation von Signalliganden (Wachstumsfaktoren), die Blockade der Ligand-Rezeptor-Interaktionen durch Besetzen der Rezeptorbindungsstellen oder die Unterbrechung der Signalweitergabe zum Ziel.^[35,36] Weiterhin können bestimmte Arzneistoffe die Ver- oder Entsorgungsprozesse der Tumorzellen beeinflussen, wodurch der Stoffwechsel der Zellen beeinträchtigt wird. Zu den bekanntesten zielgerichteten Therapeutika zählen monoklonale Antikörper, die an spezifische Zelloberflächenstrukturen von Tumorzellen binden und niedermolekulare Verbindungen (*Small Molecules*), die intrazellulär spezifische Signalübertragungswege blockieren.^[28,31] Zur Therapie von Tumoren mit hormonabhängigem Wachstum sind zudem Hemmstoffe der Hormonbiosynthese, Hormone oder Hormonrezeptorantagonisten integrale Bestandteile gerichteter Therapien.^[28,36] Eine Übersicht ausgewählter Wirkstoffklassen in der zielgerichteten Tumorthherapie gibt Tab. 1.2.^[28,33,35,36]

1.1 Tumorerkrankungen

Tab. 1.2: Ausgewählte Wirkstoffklassen zielgerichteter Tumorthérapien.

Wirkstoffklasse	Wirkmechanismus
Monoklonale Antikörper	Binden an spezifische Strukturen auf der Zelloberfläche (Antigene) und können auf unterschiedliche Weise wirken. Entweder werden Tumorzellen durch sie „markiert“ und es kommt zu einer Immunreaktion. Oder das Antigen ist ein Wachstumsfaktorrezeptor und wird für den Wachstumsfaktor blockiert, wodurch Zellteilung, Wachstum und Angiogenese beeinträchtigt werden. Zudem kann an den Antikörper noch ein zytotoxisches Fragment (Zytostatika, Radionuklid oder Toxin) gekoppelt sein, das nach der Bindung an das Antigen freigesetzt wird.
Signaltransduktionshemmer (<i>Small Molecules</i>)	Unterbrechung wichtiger Signalübertragungswege in der Tumorzelle durch Blockade zellinnerer Teile der Rezeptoren (Kinasen). Wichtigste Vertreter dieser Klasse sind die Tyrosinkinase, mTOR-Kinase- und Multikinaseinhibitoren.
Proteasomhemmer (<i>Small Molecules</i>)	Die Funktion des Proteasom-Enzymkomplexes wird gehemmt, wodurch wichtige Proteolyse-Prozesse, wie der Abbau fehlerhafter Proteine, unterdrückt werden, was zum Zellteilungsstopp und zur Apoptose führt.
Modulatoren der Genexpression (<i>Small Molecules</i>)	Modifizieren Proteinfunktionen, die eine Rolle bei der Regulation der Genexpression spielen (z.B. Histondeacetylaseinhibitoren)
Hormontherapien	Hemmen das Wachstum hormonempfindlicher Tumorzellen durch Blockade der Bildung oder Wirkung der für das Tumorstadium relevanten Hormone (z. B. bei Brust- und Prostata Tumoren)

Trotz der Fortschritte auf dem Gebiet der *Targeted Therapy* ist die gerichtete Therapie nur bei bestimmten Tumoren erfolgreich und in ihrer Anwendung eingeschränkt. Jeder Tumor weist unterschiedliche molekulare Merkmale und andere Eigenschaften auf. Dadurch steht nicht für jede Tumorerkrankung eine zielgerichtete Behandlung zur Verfügung. Ob ein Tumor die jeweiligen Zielstrukturen, gegen die sich die Wirkstoffe richten, vorweist und ob somit eine *Targeted Therapy* für die Behandlung in Frage kommt, muss individuell durch spezielle molekularbiologische Tests geprüft werden. Um eine höhere Wirksamkeit zu erzielen und die Behandlung so effizient wie möglich zu gestalten, werden zielgerichtete Wirkstoffe meist mit einer klassischen Chemotherapie kombiniert. Wie die klassische Chemotherapie ist auch diese Form der Therapie nicht frei von Nebenwirkungen. Die Ausprägung und Art der Nebenwirkungen ist hierbei stark vom jeweiligen Arzneistoff abhängig. Die unerwünschten Symptome treten in der Regel aber in geringeren Umfang auf, da die Wirkstoffe präziser gegen Tumorzellen gerichtet sind und gesunde Zellen weitgehend verschont bleiben.

1.1.2 Resistenzentwicklung bei der Tumorthherapie

Ein großes Problem der medikamentösen Therapieformen ist die Entwicklung von Resistenzen der Tumorzellen gegenüber den eingesetzten Arzneimitteln. Trotz der immer spezifischeren Chemotherapeutika sprechen viele Tumoren, insbesondere metastasierte Tumorarten, auf viele der gängigen Chemotherapien gar nicht oder nach einer bereits erfolgten Behandlung nicht mehr an.^[29] Eine Ursache dafür sind Resistenzen, die sich aufgrund der genetischen Instabilität und der hohen Anpassungsgabe der Tumorzellen an die Umgebungsbedingungen entwickeln können.^[37] Zusätzlich dazu kann eine arzneistoffinduzierte Mehrfachresistenz (*Multiple Drug Resistance* (MDR)) auftreten, bei der Tumoren simultane Resistenzen gegenüber strukturell und funktionell unterschiedlichen Chemotherapeutika besitzen oder entwickeln.^[38] Die Resistenzen schränken die Effektivität vieler Arzneimittel stark ein und sind eine der Hauptursachen für Misserfolge von Chemotherapien. Es gibt unterschiedliche Mechanismen, die zu einer arzneistoffinduzierten Mehrfachresistenz beitragen können, darunter der aktive Auswärtstransport der Zytostatika aus den Tumorzellen, eine beschleunigte enzymatische Inaktivierung der Wirkstoffe in der Zelle, Veränderungen der Genexpression und Aktivität von Zielmolekülen sowie eine vermehrte Expression MDR-assoziiierter und antiapoptotischer Gene.^[37,39,40] Die Erschließung neuer, wirksamer Therapiemöglichkeiten ist daher eine andauernde Herausforderung der pharmazeutischen Forschung.

1.2 Epigenetischer Therapieansatz

Auf dem Gebiet der Karzinogenese und der Prävention malignen Zellwachstums bieten Substanzen, die regulatorisch auf epigenetischer Ebene eingreifen, neue Möglichkeiten wirksame Therapien zu entwickeln.^[41] Die Epigenetik umfasst Regulationsmechanismen, die Veränderungen in der Genexpression bewirken, ohne dabei die DNA-Sequenz selbst zu verändern.^[41] Die Veränderungen können über die Zellteilung hinaus erhalten bleiben und legen durch spezifische Regulation der Genexpression im Verlauf der Differenzierung, Art und Funktion der Zellen fest. Es bilden sich verschiedene Zelltypen mit unterschiedlichsten Funktionen aus, denen die identischen genetischen Informationen zugrunde liegen. Die Gesamtheit der epigenetischen Regulationsmechanismen wird als Epigenom bezeichnet.^[42] Hierzu zählen unter anderem Nukleosomremodelling,^[43] DNA-Methylierung^[44], sowie Histonmodifikationen.^[45] Von diesen Regulationsmechanismen haben die Histonmodifikationen ein besonderes Interesse in der Tumorthherapie erlangt.^[45] Histonmodifikationen sind meist reversible Veränderungen. Durch Hinzufügen oder Entfernen chemischer Gruppen an die Aminosäurereste der Histone wird eine Änderung der Chromatinstruktur bewirkt, mit dem Ziel, dass die Transkription von Genen aktiviert bzw. deaktiviert wird.^[45] Störungen dieser Kontrollmechanismen führen zu abnormaler Aktivierung und Inhibierung verschiedener Signalwege und zu Fehlregulationen von Genen, die in der Differenzierung, Apoptose oder Zellzykluskontrolle involviert sind.^[41,42] Sie können so Ursache verschiedener Krankheiten sein und sind pathogenetisch von großer Bedeutung.^[46] Enzyme, die solche Histonmodifikationen katalysieren, stellen interessante Ziele bei der Entwicklung neuer Therapieansätze zur Behandlung von Tumorerkrankungen und zur Prävention malignem Zellwachstums dar.

1.2.1 Histone und posttranslationale Histonmodifikationen

Histonproteine spielen in der Epigenetik eine zentrale Rolle und sind als Bestandteile des Chromatins für die Verpackung der DNA zuständig (Abb. 1.2).^[47] Histone sind basische Proteine, die als Oktamere zusammen mit jeweils ca. 146 DNA-Basenpaaren die kleinste Untereinheit des Chromatin, das Nukleosom, bilden. Nukleosome sind über kurze DNA-Abschnitte miteinander verknüpft und bilden zusammen mit nicht an die DNA bindenden Proteinen das Chromatin. So liegt die DNA im Zellkern stark komprimiert und organisiert vor und ist jederzeit zugänglich und ablesbar.

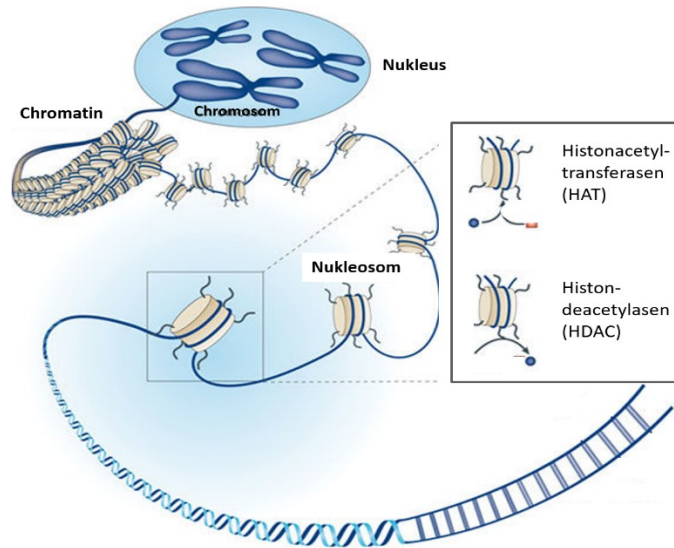


Abb. 1.2: Aufbau des Chromatins (adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: *Nature Reviews Drug Discovery* ^[42], copyright © 2012).

Reguliert wird die Zugänglichkeit der DNA über die aus dem Histonenkomplex herausragenden *N*-terminalen Regionen, die überwiegend aus basischen Aminosäuren (Lys, Arg) bestehen. Diese Enden stehen für posttranslationale Modifikationen (PTM) zur Verfügung, wodurch die Struktur des Chromatins beeinflusst wird und so zur Kontrolle der Transkription, DNA-Reparatur und Replikation beitragen (Abb. 1.3).^[48,49] Das Chromatin kann in einer offenen als auch in einer geschlossenen Konformation vorliegen. Die offene Konformation (Euchromatin) ist mit einer transkriptionellen Aktivität assoziiert, wohingegen die kondensierte Form (Heterochromatin) mit einer Stilllegung der Genexpression (*gene silencing*) einhergeht. Zu den posttranslationalen Modifikationen an Histonen zählen Methylierung (Arg, Lys), Acetylierung (Lys), Phosphorylierung (Ser, Thr), Ubiquinylierung und einige weitere Modifizierungen.^[45] PTMs stellen überwiegend reversible Prozesse dar, die meist durch zwei antagonistisch wirkende Enzymgruppen katalysiert werden.

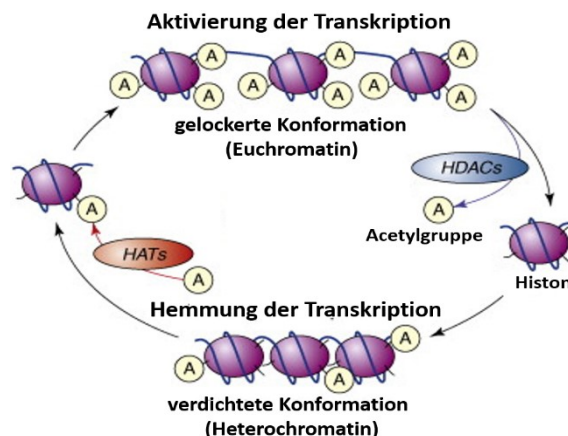


Abb. 1.3: Einfluss der HATs und HDACs auf die Chromatinstruktur und die Transkription (adapted with permission from Elsevier: *Trends in Neuroscience* ^[50], copyright © 2009).

1.2.2 Acetylierung und Deacetylierung von Histonen

Die am besten charakterisierte und untersuchte Modifikation der Histone stellt die reversible Acetylierung bzw. Deacetylierung der Lysinreste am *N*-Terminus der Histone dar.^[51] Reguliert wird das dynamische Gleichgewicht des Acetylierungsstatus in den Zellen durch zwei antagonistisch wirksame Proteinfamilien: Histonacetyltransferasen (HATs) und Histondeacetylasen (HDACs) (Abb. 1.4).

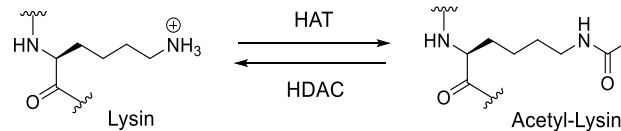


Abb. 1.4: Gleichgewichtsreaktion katalysiert durch HAT und HDAC.

Unter physiologischen Bedingungen liegen die deacetylierten Lysinreste der Histone protoniert vor und tragen eine positive Gesamtladung. Dadurch sind Histone in der Lage starke elektrostatische Wechselwirkungen mit dem negativen Phosphatrückgrat der DNA einzugehen, wodurch das Chromatin in einer transkriptionell inaktiven und kondensierten Form vorliegt (Abb. 1.3). Histonacetyltransferasen (HAT) übertragen Acetylgruppen von acetylierten Coenzym A (Acetyl-CoA) auf die endständige Aminofunktion von Lysinresten der Histone.^[51] Hierdurch wird die positive Ladung kompensiert, die Wechselwirkungen nehmen ab und die dicht verpackte Chromatinstruktur wird durch Entspiralisierung aufgelockert. Die DNA ist in dieser relaxierten Chromatinstruktur für Transkriptionsfaktoren leichter zugänglich und die Genexpression wird aktiviert. Histondeacetylasen, die Gegenspieler der HATs, katalysieren die Entfernung von Acetylgruppen.^[51] Dies resultiert in einer Freisetzung positiver Ladungen und somit zu einer Erhöhung der ionischen Wechselwirkungen zwischen den positiven Histonen und der negativ geladenen DNA. Es bildet sich eine dicht gepackte Chromatinstruktur aus, die für die Transkriptionsmaschinerie schwerer zugänglich ist und eine Repression der Transkription bewirkt. HATs und HDACs regulieren somit die Genexpression über eine Änderung der Chromatinstruktur. Besteht ein Ungleichgewicht zwischen HDACs und HATs, wird das zellspezifische Genexpressionsmuster gestört und wichtige zelluläre Prozesse werden beeinträchtigt. Durch HDAC-Überexpression kann es zum Beispiel zur transkriptionellen Stilllegung von Tumorsuppressorgenen kommen, wodurch eine Entartung der Zellen ausgelöst werden kann.^[5] Die Überexpression von HDACs konnte in einer Reihe verschiedener Tumoren beobachtet werden.^[52–57] Durch die Inhibierung von HDACs kann eine Reexpression stillgelegter Gene erzielt werden, wodurch HDAC-Inhibitoren interessante Ansätze für epigenetische Therapien darstellen.

1.2.3 Histondeacetylasen (HDAC)

Zur Familie der HDAC-Proteine zählen 18 humane Enzyme, die aufgrund ihrer Domänenstruktur, Größe, zellulärer Lokalisation und ihrer Sequenzähnlichkeit zu den homologen Hefeproteinen in vier Klassen unterteilt werden (Abb. 1.5).^[57] Es kann hierbei zwischen den sogenannten ‘klassischen HDACs’ und den Sirtuinen unterschieden werden. Die zur Klasse III zugehörigen Sirtuine 1-7 weisen einen vom Cofaktor Nicotinsäureamidadenindinukleotid (NAD⁺) abhängigen Katalysemechanismus auf und unterscheiden sich auch strukturell von den übrigen HDACs.^[58] Die elf als klassische Histondeacetylasen bekannten Enzyme sind hingegen zinkabhängig und werden weiter in die Klassen I, II und IV unterteilt.^[57] Zur Klasse I gehören die relativ kleinen Enzyme (40- 55 kDa, HDAC1, 2 , 3, 8), die vorwiegend im Nukleus lokalisiert sind und ubiquitär in allen Zellen exprimiert werden.^[52] In Klasse II sind größere Enzyme (100-130 kDa), deren Expression auf bestimmte Zelltypen beschränkt ist und die aufgrund von Sequenzabweichungen und Domänenorganisation in zwei Unterklassen eingeteilt werden. Die Enzyme der Subklasse IIa (HDAC4, 5, 7, 9) besitzen eine große N-terminale Domäne und bewegen sich zwischen Zytoplasma und dem Zellkern.^[57] Klasse IIb (HDAC6, 10) sind überwiegend zytoplasmisch lokalisiert. HDAC6 besitzt zwei katalytische Domänen und HDAC10⁵ eine katalytische Domäne am N-Terminus und eine zweite unvollständige am C-Terminus. HDAC11⁶ repräsentiert die Klasse IV. Es weist Sequenzhomologien zu Klasse I und II auf und kann daher nicht eindeutig einer Klassen zugewiesen werden.^[59]

Klasse	Isoform	Domänenstruktur	Katalyse	Lokalisation
I	1		Zn ²⁺	Nukleus
	2			
	3			
	8			
IIa	4		Zn ²⁺	Nukleus und Zytoplasma
	5			
	7			
	9			
IIb	6		Zn ²⁺	Zytoplasma
	10			
III	Sirtuine 1-7		NAD ⁺	variabel
IV	11		Zn ²⁺	Nukleus und Zytoplasma

Abb. 1.5: Einteilung der HDAC-Klassen und ihre Domänenstruktur.

⁵ Hai et al. zeigten, dass HDAC10 als Polyamindeacetalase (PDAC) von Spermidinen agiert und bei der Autophagy zum Überleben von Tumorzellen beitragen kann.^[259]

⁶ Barinka et al. entdeckten, dass HDAC11 Acylgruppen der Lysinreste von Fettsäuren entfernt. Die Fettsäuredeacetylase (FDAC) zeigte dabei eine Präferenz für längere Fettsäureketten (C8-C18).^[260]

Das aktive Zentrum der zinkabhängigen HDACs besteht aus einer zylindrischen Tasche, an dessen Ende, neben dem Zinkion, noch ein einzelnes Wassermolekül sitzt, welches mit dem zu modifizierenden Lysinsubstrat interagiert. Bereits 1999 postulierten *Finnin* und Mitarbeiter einen katalytischen Mechanismus der Deacetylierung durch Histone anhand des Enzyms HDLP (*histone deacetylase-like protein*) aus dem Bakterium *Aquifex aeolicus*, das eine 35% Sequenzhomologie zu HDAC1 aufweist.^[60] Im Jahr 2016 konnten *Hai* und *Christianson* den vorgeschlagenen Mechanismus von *Finnin* durch die Aufklärung der Kristallstruktur von HDAC6 mit verschiedenen Substraten bestätigen.^[61] Es konnte gezeigt werden, dass die katalytische Domäne 2 (*catalytic domain 2*, CD2) der Zebrafisch-HDAC6 (zCD2) große Ähnlichkeit zur CD2 der humanen HDAC6 (hCD2) aufweist. Die Forscher konnten anhand von Momentaufnahmen wichtiger Katalyseschritte wesentlich zur Aufklärung des Katalysemechanismus beitragen (Abb. 1.6).

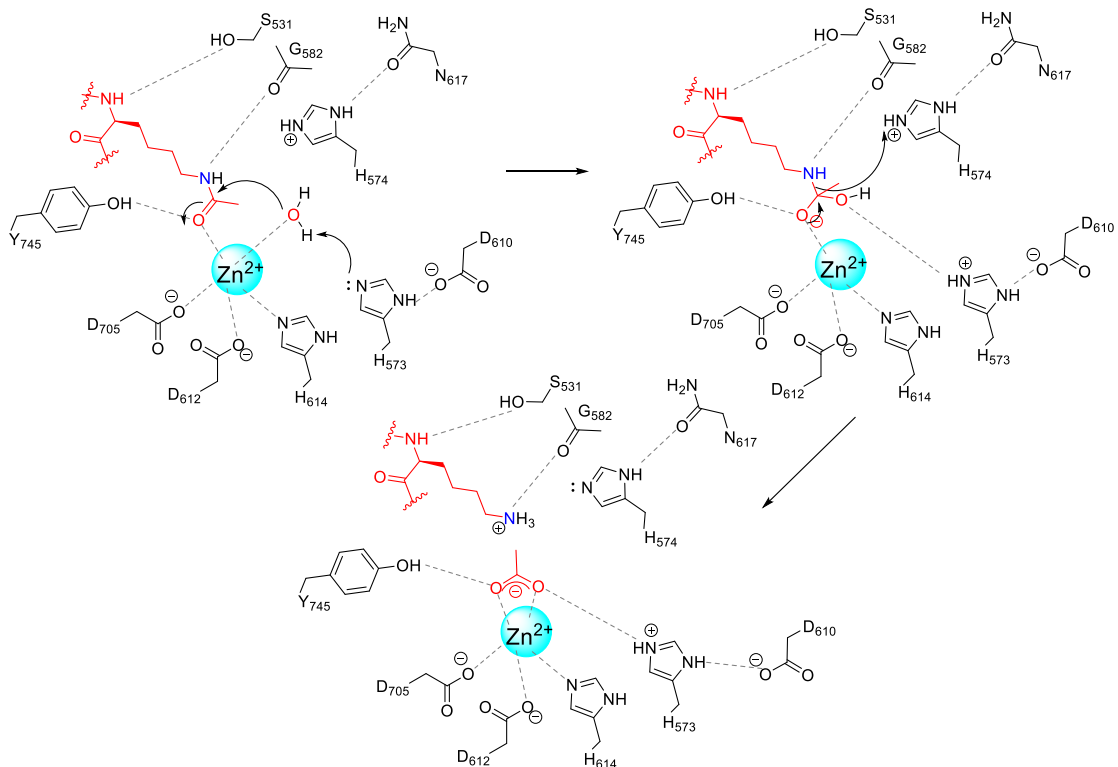


Abb. 1.6: Schritte des Katalysemechanismus von HDAC6 zCD2 nach *Hai* und *Christianson*.^[61]

Neben einem Serin (S531) und einem Glycin (G582), die Wasserstoffbrücken zu den Stickstoffatomen des Substrats ausbilden, koordiniert der Carbonylsauerstoff des Acetyllysins an eine freie Koordinationsstelle am Zinkion. Außerdem interagiert die Carbonylfunktion mit dem Tyrosinrest (Y745). Diese Koordinationen erhöhen die Elektrophilie des Substrats für einen nukleophilen Angriff und verhindern zusätzlich, dass das Wasser im aktiven Zentrum des Enzyms verdrängt wird. Das Histidin (H573)

fungiert als Base und aktiviert das Wassermolekül durch Deprotonierung, so dass dieses im Anschluss nukleophil am Carbonylkohlenstoff des Acetyllysins angreifen kann, was in einer tetraedrisch koordinierten Zwischenstufe resultiert. Das Oxyanion wird durch eine Wasserstoffbrücke zu Y745 und durch das Zinkion komplexiert, während die Hydroxygruppe etwas weiter vom Zinkion entfernt ist und lediglich mit H573 interagiert. Durch Spaltung des Intermediats wird Lysin in seiner protonierten Form freigegeben, während das Acetat anschließend als symmetrischer zweizähniger Ligand das Zinkion koordiniert.

1.2.4 Histondeacetylaseinhibitoren (HDACi)

Die Möglichkeit auf epigenetischer Ebene regulatorisch auf die Genexpressions-machinerie einzugreifen, macht HDAC-inhibierende Substanzen zu potentiellen Wirkstoffkandidaten zur Bekämpfung von Tumorerkrankungen. In den letzten Jahrzehnten wurde eine Vielzahl von HDACi identifiziert und entwickelt, von denen die meisten bei Tumorerkrankungen Anwendung finden.^[62-64] Die Aktivität dieser Substanzen beruht vorwiegend auf der Bindung des Zinkions im aktiven Zentrum der Enzyme. Die Hemmung von HDACs führt durch Hyperacetylierung der Histone zu einer Wiederherstellung des Acetylierungsgleichgewichts. Dabei kommt es zu einer Reexpression inhibierter Gene und zur vermehrten Transkription regulatorischer Proteine, die Zelldifferenzierung, Zellzyklusarrest und Apoptose induzieren, sowie Tumorprogression und Angiogenese inhibieren.^[64,65] Neben dem Acetylierungsgleichgewicht von Histonen wird auch das von Nicht-Histonproteinen reguliert, die unter anderem auch direkten Einfluss auf apoptotische Signalwege haben können.^[66-69] Durch Reacetylierung von Nicht-Histonproteinen kann die Expression antiapoptotisch wirkender Gene gehemmt werden.^[68,70] Es kommt zum Zellzyklusarrest und die Apoptose wird induziert. Das aktive Zentrum der HDACs ist stark konserviert und weist grundlegende strukturelle Gemeinsamkeiten auf, die für das Inhibitor-design zu beachten sind. Das daraus resultierende Pharmakophormodell besteht im Wesentlichen aus drei Hauptstrukturelementen, die für die effektive Bindung des Inhibitors im Enzym verantwortlich sind (Abb. 1.7).^[51,71] Um das Zinkion zu chelatisieren, wird eine zinkbindende Gruppe (ZBG) benötigt. Anhand der chemischen Struktur dieser Gruppe werden die Inhibitoren in unterschiedliche Klassen eingeteilt. Zu den Inhibitor-klassen zählen Hydroxamsäuren, kurz-kettige aliphatische Carbonsäuren, 2-Aminoanilide, elektrophile Ketone und Thiol-derivate.^[51,72] Zusätzlich sind zyklische Peptide eine weitere Inhibitor-klasse, bei der die

Einteilung jedoch nicht aufgrund der zinkbindenden Gruppe erfolgt. Die ZBG ist durch eine Verbindungseinheit (*Linker*) mit einem hydrophoben Rest (*Cap*) am anderen Ende verbunden. Der Linker interagiert dabei mit dem hydrophoben Kanal des Katalysezentrums und die *Cap* dient der Erkennung und Interaktion mit dem Eingangsbereich des aktiven Zentrums des Enzyms.

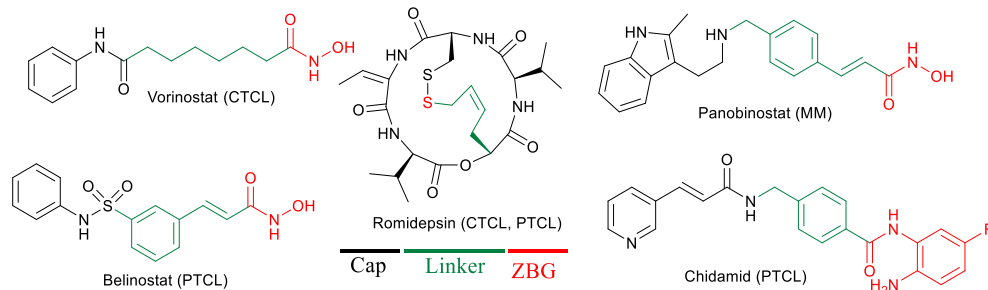


Abb. 1.7: Allgemeines Pharmakophormodell und zugelassene HDACi.

Bisher wurden vier HDACi (Vorinostat, Romidepsin, Belinostat, Panobinostat) durch die *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassen (Abb. 1.7). Vorinostat erhielt 2006 als erster HDAC-Inhibitor die Zulassung. Dieser hydroxamsäurebasierte Inhibitor wird zur Behandlung des kutanen T-Zell-Lymphoms (CTCL) eingesetzt.^[73] Romidepsin wurde 2009 für dieselbe Indikation zugelassen und erhielt 2011 zusätzlich die Zulassung zur Behandlung des peripheren T-Zell-Lymphoms (PTCL).^[74] Romidepsin ist ein natürlich vorkommendes zyklisches Tetrapeptid, das aus dem Bakterium *Chromobacterium violaceum* isoliert wird. Es wird *in vivo* durch die Spaltung einer intramolekularen Disulfidbrücke in seine aktive Thiolform überführt. Mit Belinostat (2014, PTCL) und Panobinostat (2015) erhielten noch zwei weitere hydroxamsäurebasierte Inhibitoren die Zulassung.^[75,76] Panobinostat ist gleichzeitig der erste HDAC-Inhibitor der die Zulassung auch in Europa erhielt. In Kombination mit Bortezomib und Dexamethason wird es zur Behandlung des Multiplen Myeloms (MM) eingesetzt.^[77] Die Vertreter der Hydroxamsäuren befinden sich zusätzlich in klinischen Studien zur Therapie unterschiedlicher Tumorarten.^[78] In China wurde 2015 außerdem der benzamidbasierte Inhibitor Chidamid zur Behandlung des peripheren T-Zell-Lymphoms zugelassen.^[79] Neben dem Einsatz von HDAC-Inhibitoren bei Tumorerkrankungen wird die Wirkung von HDACi weiterhin bei unterschiedlichen neurodegenerativen Erkrankungen (darunter Morbus Parkinson und Chorea Huntington) sowie viralen und parasitären Infektionskrankheiten (z. B. HIV, Malaria und Schistosomiasis) untersucht.^[80–84]

Bei den bisher bekannten HDAC-Inhibitoren handelt es sich überwiegend um Pan-Inhibitoren, die unspezifisch auf mehrere Mitglieder der Enzymklasse wirken.^[85] Es wird vermutet, dass die mangelnde Selektivität im Zusammenhang mit einem erhöhten Nebenwirkungspotential steht.^[86] Durch gleichzeitige Inhibition mehrerer HDACs kommt es zu Nebenwirkungen wie Herzrhythmusstörungen, Magen-Darm-Beschwerden, Müdigkeit oder Appetitlosigkeit.^[87] Ein Grund hierfür könnte der pleiotropischer Effekt der HDACs sein.^[88,89] So können durch die HDAC-Hemmung und dessen Einfluss auf posttranslationale Modifikation, neben Tumorzellen auch andere essentielle Proteine in gesunden Zellen beeinflusst und verändert werden.^[90] Bislang zeigen nur wenige HDACi klassen- oder isoformspezifische Inhibitorwirkungen.^[91,92] Um die allgemeine Toxizität auf den Körper zu verringern und das Nutzen-Risiko-Profil dieser Wirkstoffklasse zu verbessern, ist es von Bedeutung isoformselektive Hemmstoffe zu entwickeln.^[72] Die Aufklärung der Beiträge der einzelnen Isoformen zur Tumorgenese kann dabei helfen neue Therapieansätze zu ermöglichen. Die Entwicklung selektiver HDAC6-Inhibitoren ist dabei von besonders großem Interesse.^[88] HDAC6 nimmt eine Sonderstellung unter den Histondeacetylasen ein und besitzt neben Histonen eine Reihe weiterer Substrate, die bei wichtigen Prozessen der Tumorprogression involviert sind.^[69]

1.2.5 HDAC6

Im Vergleich zu den anderen Isoenzymen weist HDAC6 strukturelle Besonderheiten auf (Abb. 1.8).^[93,94] HDAC6 ist die einzige Histondeacetylase, die zwei katalytisch aktive Deacetylasedomänen besitzt, welche unabhängig voneinander zur Gesamtaktivität des Proteins beitragen. Die Deacetylasedomäne 1 (CD1) ist hierbei hoch spezifisch für Substrate, die C-terminale Acetyllysinreste vorweisen, wohingegen die katalytische Domäne 2 (CD2) eine weite Substratspezifität besitzt.^[61] Zudem liegt am C-terminalen Ende eine Zinkfingerbindungsdomäne (ZnF-UBP), welche das Enzym zur Ubiquitinbindung befähigt.^[95] Zusätzlich dazu existieren zwei weitere Domänen NES (Nukleares Export Signal) und SE14 (bestehend aus acht aufeinander folgenden Ser-Glu-enthaltenen Tetradecapeptiden), die zur Lokalisation im Zytoplasma beitragen.^[96,97] Das kurze leucinreiche Motiv NES ist für den Transport aus dem Nukleus verantwortlich und befindet sich am N-terminalen Ende und die SE14-Domäne dient als zytoplasmischer Anker. SE14 kommt nur in der humanen HDAC6 vor und liegt zwischen der zweiten katalytischen Domäne und dem Zinkfingermotiv.



Abb. 1.8: Domänenstruktur von HDAC6.

Viele HDACs liegen in Multiproteinkomplexen vor, da für die Aktivität der HDAC-Enzyme mehr als eine HDAC-Domäne benötigt wird.^[98] Anders verhält sich HDAC6, das, aufgrund der zwei unabhängigen Domänen, nicht zwingend in einem Proteinkomplex vorliegen muss, um seine Funktion auszuüben. Neben den Histonen besitzt HDAC6 zusätzlich eine Reihe von Nicht-Histonsubstraten, die im Zytoplasma lokalisiert sind, als Zielproteine.^[94,97]

1.2.5.1 Funktionen von HDAC6 und Relevanz für die Tumorgnese

Zu den Substraten von HDAC6 zählen unter anderen α -Tubulin,^[99,100] Cortactin^[101,102] und HSP90.^[103,104] Diese Proteine sind an vielen zellulären Funktionen wie Zellmotilität, Zellmigration und Angiogenese sowie an Chaperonfunktionen beteiligt, wodurch HDAC6 einen wichtigen Schlüsselregulator darstellt.^[93,105] Die Regulation des Acetylierungsstatus von α -Tubulin ist eine der Hauptfunktionen von HDAC6.^[99,106] Zusammen mit β -Tubulin bildet α -Tubulin ein Heterodimer, das die Grundeinheit der Mikrotubuli bildet. Die Mikrotubuli bilden eine Art bewegliches Transportsystem, das eine wichtige Funktion bei intrazellulären Signalkaskaden, der Zellteilung und der Zellmotilität übernimmt. Die Stabilität der Mikrotubuli wird über den Acetylierungsgrad an Lysin40 bestimmt, wobei eine Deacetylierung mit einer erhöhten Zellmotilität einhergeht.^[99] Durch die Inhibition von HDAC6 kommt es zu einer Hyperacetylierung von α -Tubulin und damit zu einer verringerten Zellmotilität. Dieser Effekt zeigt sich auch bei Cortactin, einem weiteren HDAC6-Substrat, dessen Acetylierungsgrad ebenfalls die Zellmotilität beeinflusst.^[102] Im deacetylierten Zustand bewirkt Cortactin durch die Anlagerung von F-Aktin eine Verlängerung der Aktinfilamente. Diese sind neben der Zellmobilität auch für Ausbildung und Stabilisierung einer Zellform sowie den intrazellulären Transport von Bedeutung.^[107] Neben diesen Substraten wurde HDAC6 auch gebunden an das molekulare Chaperon HSP90 vorgefunden.^[103,104] Das Chaperon unterstützt Klientproteine bei der korrekten Faltung und verhindert deren Degradation durch das Proteasom.^[8] Die Chaperonaktivität wird durch Acetylierung von Lys294 in der Untereinheit HSP90 α reguliert.^[104] HDAC6 deacetyliert HSP90 und überführt es in

seine aktive Form, in der es Cochaperone bindet und so die korrekte Faltung von Klientproteinen ermöglicht. Inhibierung von HDAC6 führt zur acetylierten Form von HSP90, in der es seine Funktion nicht mehr aufnehmen kann. Die inaktivierte Form interagiert stattdessen mit anderen Cochaperonen wie HSP70, die den Transport der Klientproteine zum Proteasom vermitteln, wo diese abgebaut werden.^[103] Zu den Klientproteinen von HSP90 zählen unter anderen eine Reihe von tumorassoziierten Signalproteinen, die für das Wachstum und Überleben von Tumorzellen von Bedeutung sind.^[9] Inhibierung von HDAC6 führt zum Verlust der Chaperonaktivität von HSP90 und hat somit indirekten Einfluss auf Signalproteine der Tumorprogression, die über HSP90 modifiziert werden.

Eine weitere Funktion von HDAC6 ist die Verminderung von intrazellulären Stress, der durch Akkumulation fehlgefalteter Proteine im Zytoplasma entsteht und in der Zelle apoptotische Signalwege auslöst.^[108,109] Durch das Ubiquitin-Proteasom-System werden fehlgefaltete Proteine erkannt und abgebaut, wodurch intrazellulärer Stress vermieden wird.^[110] Ist eine angemessene Proteindegradation ubiquitiniertes Proteine durch das Proteasom nicht mehr möglich, kann der Abbau auch über das Aggresom, das eine Ansammlung fehlerhafter Proteine darstellt, erfolgen.^[111] Über die Zinkfingerdomäne bindet HDAC6 ubiquitiniertes Proteine und geht gleichzeitig eine Bindung mit dem Motorprotein Dynein ein, welches mit den Mikrotubuli assoziiert ist.^[108,112] Entlang der Mikrotubuli werden die Proteine zum Aggresom transportiert, wo sie von Autophagosomen aufgenommen und anschließend als Lysosom fusioniert, abgebaut werden.^[113] In diesem Zusammenhang kann eine Hemmung von HDAC6 durch den zellulären Stress zur Induktion apoptotischer Signalwege führen.

Zusammengefasst ist HDAC6 in einer Vielzahl zellulärer Prozesse involviert. Es reduziert zellulären Stress, beeinflusst die Adhäsion von Zellen, trägt zur Zellmotilität bei und unterstützt Abläufe die bei der Angiogenese und der Proliferation von Zellen von Bedeutung sind. In Tumorzellen, die eine erhöhte Proliferation und die Fähigkeit zur Metastasierung vorweisen, sind diese Eigenschaften stark erhöht. In einigen Tumorarten konnte so eine Überexpression von HDAC6 nachgewiesen werden.^[57,93] HDAC6 liegt unter anderen in bestimmten Brusttumoren, beim multiplen Myelom und bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) überexprimiert vor.^[57,93]

Tierversuche mit HDAC6-Knockout-Mäusen zeigen, dass die Säugetiere auch ohne HDAC6 lebensfähig sind.^[57,98] Die Abwesenheit von HDAC6 führt zu einer leicht

erhöhten Knochendichte und zu Hyperacetylierung von α -Tubulin und HSP90.^[98] Dies lässt darauf schließen, dass eine Inhibierung dieses Enzym mit einer geringeren Toxizität assoziiert ist⁷ und die Vitalität normaler Zellen nur wenig beeinflusst wird, da die Hauptwirkung bei malignen Zellen mit gesteigertem Stoffwechsel zur Geltung kommt. Die Hemmung von HDAC6 stellt somit ein attraktives Ziel für neue Therapieansätze dar, so dass die Entwicklung von HDAC6i Gegenstand intensiver Forschung ist.^[80,88,114]

1.2.5.2 HDAC6-Inhibitoren und ihre Entwicklung

Obwohl die HDAC6-Kristallstruktur erst kürzlich aufgeklärt wurde, konnten in den letzten Jahren einige selektive HDAC6-Inhibitoren entwickelt werden (Abb. 1.9).

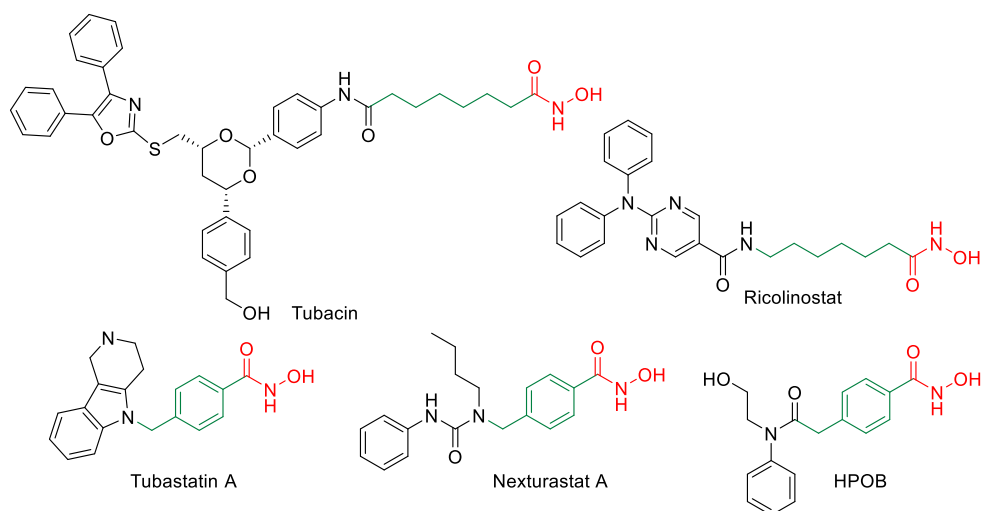


Abb. 1.9: Übersicht der wichtigsten HDAC6-Inhibitoren.

Im Jahr 2003 entdeckten Haggarty und Mitarbeiter in einem *High-Throughput-Screening* mit insgesamt 7392 Verbindungen den ersten selektiven HDAC6-Inhibitor Tubacin (Abb. 1.9, $IC_{50}(\text{HDAC6}): 4 \text{ nM}$).^[80,115] Tubacin (*tubulin acetylation inducer*) bewirkt die Acetylierung von α -Tubulin, ohne dabei den Acetylierungsgrad der Histone, das Genexpressionsmuster oder die Zellzyklusprogression zu beeinflussen.^[115] Die Tubulindeacetylaseaktivität von HDAC6 wird als Selektivitätsindiz verstanden. Des Weiteren wurden bei der Behandlung des Multiplen Myeloms ein synergistischer Effekt in Kombination mit Bortezomib beobachtet.^[116] Dabei war eine Hemmung der Zellmobilität und eine Akkumulation ubiquitiniertes Proteine zu beobachten, die zur Steigerung der Apoptoseinduktion führt. Tubacin zeigte dabei keine zytotoxischen Effekte auf gesunde hämatologische Zellen.^[116]

⁷HDAC1-Knockout-Mäuse sind im Gegensatz zu den Tieren in denen HDAC6 fehlt, nicht lebensfähig.

Tubastatin A ($IC_{50}(\text{HDAC6}): 15 \text{ nM}$) ist ein weiterer HDAC6i.^[80,117] Tubastatin A besitzt eine Hydroxamsäure als ZBG, eine trizyklische *Cap*-Gruppe und einen Benzyl linker (Abb. 1.9). Der HDAC6i wurde anhand eines strukturbasierten Designs ausgehend von Homologiemodellen (HDAC6, HDAC1) entwickelt.^[117] Im Vergleich zu HDAC1 weist HDAC6 einen flacheren Eingangsbereich der Bindungstasche und einen breiteren Tunnel auf. Diese strukturellen Erkenntnisse wurden zur Selektivitätssteigerung genutzt, in dem Substanzen mit großen *Cap*-Gruppen synthetisiert wurden. Eine zusätzliche Betrachtung verschiedener Linker ergab, dass durch den Einsatz eines Benzyl linkers ebenfalls die Präferenz für HDAC6 als Target gefördert wird.^[117]

Neben großen *Caps* können auch Verzweigungen innerhalb der *Cap*-Gruppe eine Steigerung der Aktivität und Selektivität für HDAC6 bewirken. Nexturastat A (Next A; $IC_{50}(\text{HDAC6}): 5 \text{ nM}$) und HPOB⁸ ($IC_{50}(\text{HDAC6}): 56 \text{ nM}$) sind zwei weitere potente und selektive HDAC6-Hemmstoffe (Abb. 1.9).^[80,114,118] Beide Verbindungen haben eine verzweigte *Cap*-Gruppe, einen Benzyl linker und gehören zu den hydroxamsäurebasierten Inhibitoren. Next A besitzt eine verzweigte harnstoffbasierte *Cap* mit einem Phenyl- und einem *n*-Butylrest an den Stickstoffatomen des Harnstoffmotivs. Ein Vergleich der Strukturen der Inhibitorbindung mit HDAC-Isoformen zeigt wesentliche Merkmale auf, die die Inhibitorselektivität beeinflussen (Abb. 1.10).^[119] HDAC6 hat eine einzigartige Position der Helix H25 und eine spezifische Konformation der darauffolgenden *Loop*. Dadurch besitzt nur HDAC6 eine große, offene Seitentasche (*Basin*, $\sim 14 \text{ \AA}$). Zudem weist HDAC6 einen abgesenkten Eingangsbereich (*Rim*) zwischen der *Basin* und dem Lysinbindungskanal auf, in dem der Phenylrest der *Cap* von Next A bindet (Abb. 1.10 C). Das rigide Nexturastat A weist einen 90° Winkel zwischen dem benzyllischen Linker und der Harnstoff-Phenyl-*Cap* auf. Dies ist verantwortlich dafür, dass der benzyllische Linker ausreichend tief in den Tunnel hineinragen kann, um das Zinkion im aktiven Zentrum zu komplexieren (Abb. 1.10 C).^[119] In anderen Isoformen ist die Inhibitorbindung durch sperrige Aminosäureseitenketten, die die Seitentasche belegen oder durch einen erhöhten Eingangsbereich, eingeschränkt (Abb. 1.10 B). Dadurch wird die Interaktion der ZBG mit dem Zinkion im aktiven Zentrum verhindert. Aufgrund dieser isoformspezifischen, strukturellen Besonderheiten bietet nur HDAC6 genügend Platz in diesen Regionen und erlaubt eine ausreichend feste Bindung von Next A und anderen selektiven HDAC6i.^[119]

⁸ *N*-Hydroxy-4-(2-((2-hydroxyethyl)(phenyl)amino)-2-oxoethyl)benzamid (HPOB)

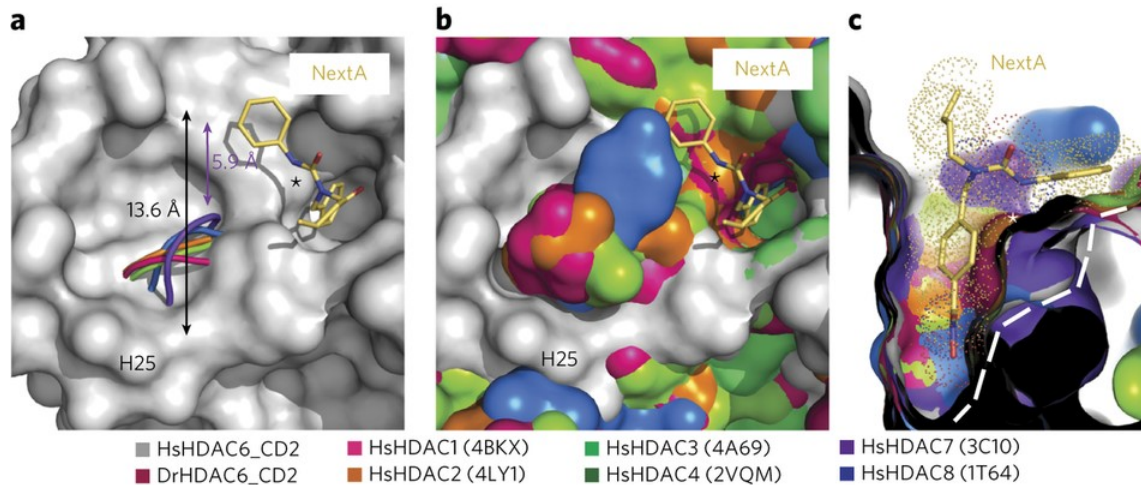


Abb. 1.10: HDAC6-spezifische Inhibitorbindung. Überlagerung der HDAC-Isoformen mit der Zebrafisch DrHDAC6_CD2 (dunkelrot) und dem Homologiemodell der humanen HsHDAC6_CD2 (grau). HsHDAC6_CD2 ist dabei als 3D-Oberfläche, alle anderen Isoformen als Cartoonmodell dargestellt. (A) Die Pfeile zeigen die Größe der *Basin* in HDAC6 (schwarz) und HDAC7 (violett) an. Die HDAC6 Helix H25 ist markiert. Der *Rim*, der eine selektive Bindung des Inhibitors erlaubt, ist mit einem Stern markiert. (B) Überlagerung der Isoformen als 3D-Oberflächenmodelle. (C) Querschnitt des Lysinbindungskanals. Der abgesenkte *Rim* für HDAC6 und 8 ist durch eine weißgestichelte Linie dargestellt. (Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: *Nature Chemical Biology* ^[119], copyright © 2016)

Eine andere Erklärung, die für eine HDAC6-Selektivität verantwortlich sein könnte, wird durch den Inhibitor HPOB verdeutlicht. Anders als bei unspezifischen Hydroxamsäureinhibitoren (z.B. Vorinostat), die dazu tendieren das Zinkion als zweizähligen Liganden⁹ zu koordinieren und das an Zink gebundene Wasser verdrängen, wird bei HPOB eine alternative Bindungskoordination beobachtet (Abb. 1.11).^[61] Aufgrund des sterischen Anspruchs des kürzeren Linkers wird eine Annäherung der Hydroxamatgruppe an das Zink verhindert, so dass HPOB nur über die Hydroxygruppe der Hydroxamsäure bindet (Abb. 1.11 C). Dadurch wird das an Zink gebundene Wasser im aktiven Zentrum nicht verdrängt, sondern durch den Carbonylsauerstoff der Hydroxamsäure über eine Wasserstoffbrücke gebunden (Abb. 1.11 C). Zusätzlich ist durch den kurzen Linker von HPOB möglicherweise eine Interaktion der *Cap* mit den *Hotspots* von *Loop* L1 (D460-P484) gehindert (Abb. 1.11 A). Diese Interaktion scheint für die Bindung zu HDACs der Klasse I (HDAC1-3) wesentlich bedeutender zu sein und könnte eine mögliche Erklärung für die Selektivität für HDAC6 darstellen.^[61]

⁹ Die Koordination des Zn-Ions erfolgt über die C=O- und die OH-Gruppe der Hydroxamsäure

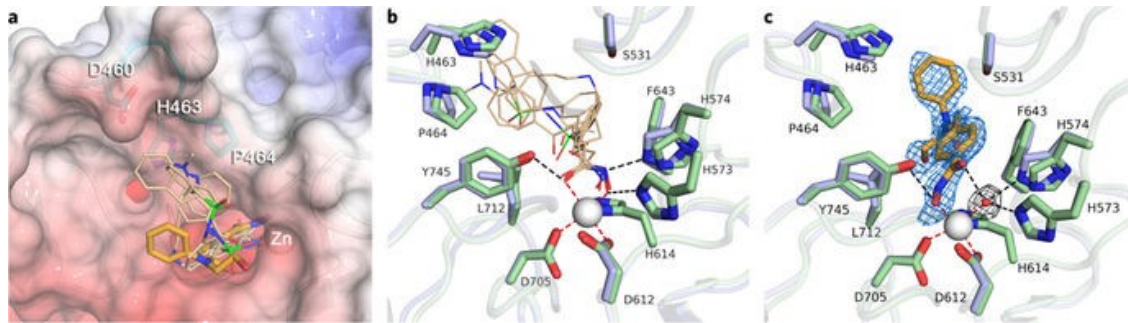


Abb. 1.11: Inhibitorbindungen mit der zCD2. (A) Überlagerung von Pan-Inhibitoren (beige) und HPOB (gelb) mit zCD2. Der *Hotspot Loop* L1 (cyan) interagiert bei Pan-Inhibitoren mit der *Cap*. (B) Darstellung der Zinkbindung mit unspezifischen Pan-Inhibitoren und (C) mit HPOB. Im Vergleich sind zCD2 (hellblau) und hCD2 (hellgrün) gezeigt. Die Metallkoordination (rot) und Wasserstoffbrückenbindungen (schwarz) sind als gestrichelte Linien dargestellt. (Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: *Nature Chemical Biology* ^[61], copyright © 2016)

Der bisher erfolgversprechendste präferenzielle HDAC6-Inhibitor ist Ricolinostat (Abb. 1.9, $IC_{50}(\text{HDAC6}): 5 \text{ nM}$), der eine große trizyklische *Cap*-Gruppe besitzt.^[80,120] Neben einer Präferenz für HDAC6 zeigt der Hemmstoff auch eine Aktivität gegenüber HDACs der Klasse I¹⁰. Dies könnte auf den Einsatz eines aliphatischen Linkers anstelle des HDAC6-selektivitätsfördernden Benzyllinkers zurückzuführen sein. Im Vergleich zu unselektiven Inhibitoren zeigt Ricolinostat ein gutes Nebenwirkungsprofil, da bei der Behandlung mit diesem Inhibitor eine geringere allgemeine Toxizität auf Zellen auftritt. Derzeit befindet sich Ricolinostat in klinischen Studien in Kombination mit Bortezomib und Dexamethason^[121] bzw. Lenalidomid und Dexamethason^[122] zur Behandlung des Multiplen Myeloms. Zusätzlich wird die Wirksamkeit von Ricolinostat gegenüber Lymphomen in klinischen Studien untersucht.^[123]

Zusammenfassend können diese strukturellen Besonderheiten, die HDAC6 vorweist, als Basis für das Design von HDAC6-spezifischen Inhibitor herangezogen werden. Durch Einsatz von benzylischen Linkern, Verzweigungen in der *Cap*-Gruppe, sowie großen sperrigen *Cap*-Gruppen, kann eine Selektivitätssteigerung für HDAC6 erzielt werden. Dies bietet interessante Ansätze für die Synthese von selektiven HDAC6-Inhibitoren.

¹⁰ Die Aktivität gegenüber HDAC1,2,3 ist um >10fach geringer als gegenüber HDAC6

1.3 Peptide und Peptidomimetika in der Tumorthherapie

Natürliche Proteine¹¹ sind im menschlichen Körper an zahlreichen biologischen Prozessen beteiligt. Obwohl sie lediglich aus den 23 proteinogenen Aminosäuren¹² aufgebaut sind,^[124] weisen Peptide eine hohe strukturelle Diversität auf. Sie besitzen dabei sehr unterschiedliche Eigenschaften und übernehmen vielfältige Funktionen, wodurch sie ein breites Anwendungsspektrum in verschiedenen Forschungsbereichen finden. Ihre hohe Effektivität und Spezifität, sowie eine geringe Immunogenität und Toxizität machen Peptide zu attraktiven Kandidaten für neuartige Wirkstoffe zur Behandlung sehr unterschiedlicher Krankheiten, darunter Tumorerkrankungen.^[125–127] Die Eigenschaften der Peptide werden dabei durch charakteristische Faltung in eine definierte räumliche Struktur bestimmt. Die globale Peptidstruktur kann hierbei in die Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur unterteilt werden (Abb. 1.12). Die Primärstruktur beschreibt die lineare Abfolge der Aminosäuren, aus denen sich das Peptid zusammensetzt. Durch intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Resten der Aminosäuresequenz bilden sich definierte Sekundärstrukturen aus, zu denen α -Helices und β -Faltblätter zählen.^[128] Die übergeordnete räumliche Anordnung einzelner Polypeptidketten wird durch die Tertiärstruktur beschrieben, welche aus aufeinanderfolgenden Sekundärstrukturelementen besteht. Die Tertiärstruktur wird durch kovalente Disulfidbrücken sowie nichtkovalente Ionenbindungen, Wasserstoffbrücken und hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert.^[129] Besteht ein Proteinkomplex dabei aus mehreren Proteinuntereinheiten (Tertiärstrukturen) handelt es sich hierbei um die Quartärstruktur des Proteins.

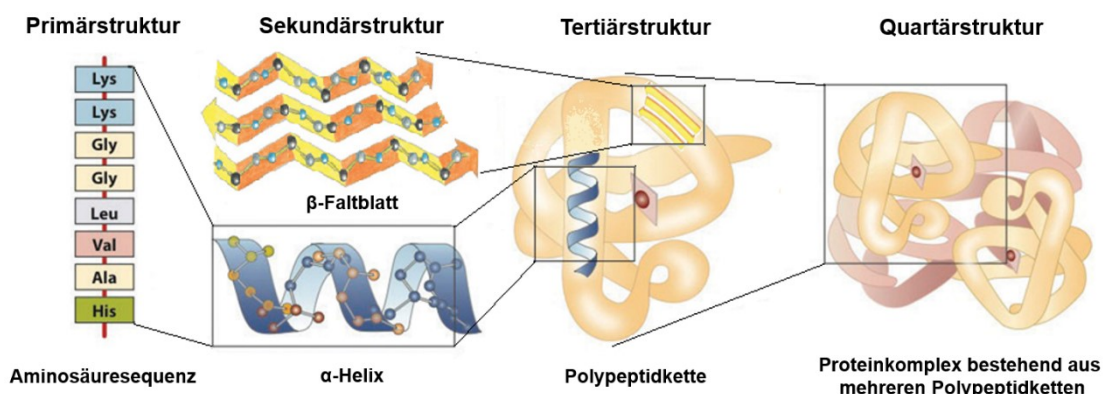


Abb. 1.12: Vier Strukturebenen aus denen Proteine aufgebaut sind. (Modifiziert nach ^[130]).

¹¹ Peptide bestehen aus ca. 30-50 Aminosäuren, längere Sequenzen werden als Proteinen bezeichnet.

¹² Dazu zählen die 20 kanonischen Aminosäuren und 3 nichtkanonische Aminosäuren.

Spezifische räumliche Strukturen und Seitenketten von Proteinen spielen bei der molekularen Erkennung, auf Ebene von Protein-Ligand-Interaktionen (PLI) und Protein-Protein-Interaktionen (PPI) eine wesentliche Rolle.^[131,132] PLIs und PPIs sind hierbei essentiell für viele zelluläre Regulationsprozesse, bei denen die biologischen Funktionen durch Veränderung der Proteineigenschaften (z.B. Enzymaktivität oder Bindungseigenschaften) beeinflusst werden.^[16] Als PPIs werden nichtkovalente Wechselwirkungen zwischen zwei oder mehreren Proteinen bezeichnet, die durch Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatische Interaktionen oder van-der-Waals-Kräfte zustande kommen. Die Wechselwirkungen erstrecken sich dabei meist über sehr ausgedehnte und flache Proteininteraktionsflächen.^[133] Diese weisen nur selten definierte Bindungstaschen auf, wodurch eine gezielte Adressierung von PPIs erschwert wird. Untersuchungen zeigen jedoch, dass sich die essentiellen Interaktionsbereiche häufig auf einige wenige aus der Oberfläche herausragende Aminosäurereste, sogenannte *hot spots*, beschränken.^[134,135] Die *hot spots* befinden sich häufig in strukturell konservierten Regionen, in denen α -Helices und β -Faltblätter einen wesentlichen Anteil ausmachen.^[135,136] Die Identifizierung essentieller funktioneller Gruppen von natürlichen Peptiden/Proteinen und die Entwicklung synthetischer bioaktiver Peptide, die diese *hot spots* gezielt adressieren und wesentliche Sekundärstrukturelemente der Peptidvorbilder nachbilden, ermöglichen es, PPIs mit hoher Spezifität und Affinität zu inhibieren.^[135,137] Peptide können als Modulatoren von PPIs zur Aufklärung zellulärer Prozesse beitragen und gelten somit als vielversprechende therapeutische Ansatzpunkte in der Wirkstoffforschung.^[134,138] Sie weisen jedoch einige wesentliche Nachteile auf. Der Einsatz der Peptide wird durch ihre geringe metabolische Stabilität, unzureichende Bioverfügbarkeiten, eine schlechte Membranpermeabilität und ihre Konformationsflexibilität stark eingeschränkt.^[139] Die ausgeprägte Konformationsflexibilität, vor allem bei linearen Peptiden, kann mitunter zu einem Selektivitätsverlust führen, wodurch Interaktionen mit anderen als der gewünschten Zielstruktur erfolgen und Nebeneffekte auftreten.^[139] Ein Bereich der medizinisch-chemischen Forschung befasst sich mit systematischen Modifikationen der natürlichen Peptidstruktur. Die Peptidstruktur soll dabei so abgewandelt werden, dass zwar die räumliche Struktur und die molekularen Erkennungseigenschaften des natürlichen Peptidvorbildes erhalten bleiben, die Nachteile jedoch reduziert werden. Dieser Ansatz erlaubt die Entwicklung klinisch nutzbarer, peptidanaloger Wirkstoffe (Peptidomimetika), die natürliche Peptide imitieren und analog zu diesen an Zielstrukturen binden und/oder Einsatz als Enzyminhibitoren finden.

1.3.1 Peptidomimetika

In den letzten Jahrzehnten haben Peptidomimetika in der Wirkstoffforschung zunehmend an Bedeutung gewonnen. Hierbei handelt es sich um niedermolekulare synthetische Verbindungen, die durch alternative chemische Grundstrukturen die Sekundärstruktur und die Wirkungsweise von natürlichen Peptidvorbildern imitieren.^[17] Die pharmakokinetischen Eigenschaften sind dabei im Vergleich zu nativen Peptiden meist verbessert. Im Wesentlichen werden beim Design von Peptidomimetika die essentiellen strukturellen Elemente nachempfunden, die für die biologische Aktivität des natürlichen Peptids verantwortlich sind und dieses zur Wechselwirkung mit seinem Interaktionspartner befähigen.^[140] Dadurch sind Peptidomimetika als Liganden in der Lage die biologische Aktivität auf Rezeptorebene nachzuahmen (Agonist) oder zu blockieren (Antagonist) und als Modulatoren von PPIs zu agieren. Die Peptidomimetika besitzen meist eine fixierte räumliche Konformation und tragen diverse Seitenketten- und Rückgratmodifikationen.^[16,139] Eine Einteilung der Peptidomimetika in unterschiedliche Klassen erfolgt nach *Grossmann* und Mitarbeiter anhand der Ähnlichkeit zur natürlichen Peptidstruktur (Tab. 1.3).^[16]

Tab. 1.3: Klassifizierung von Peptidomimetika nach *Grossmann*.

Peptidomimetika	
Peptide natürliche Peptidsequenzen, die von Proteinen und (nicht)ribosomalen Peptiden abgeleitet sind	
Klasse A – modifizierte Peptide Peptide, die hauptsächlich aus α -Aminosäuren bestehen und nur wenige Modifikationen vorweisen	peptidartig
Klasse B – modifizierte Peptide / Foldamere Peptide mit vielen Rückgrat- und Seitenkettenmodifikationen, einschließlich Foldamere	
Klasse C – Strukturmimetika niedermolekulare Verbindungen, deren Substituenten in Analogie zu Peptidseitenketten ausgerichtet sind	niedermolekular
Klasse D – mechanistische Mimetika niedermolekulare Verbindungen, die die Wirkungsweise eines biologisch aktiven Peptides imitieren	

Klasse A und B stellen hierbei peptidartige Strukturen dar, die sich durch wenige (Klasse A) bis vielen (Klasse B) Rückgrat- und Seitenkettenmodifikationen auszeichnen und große Analogien zur natürlichen Peptidstruktur vorweisen. Dahingegen besitzen Peptidomimetika der Klassen C und D nur noch eine geringe Ähnlichkeit zur natürlichen Peptidstruktur. Es handelt sich um niedermolekulare Verbindungen, deren Substituenten peptidische Seitenketten imitieren (Klasse C) oder die die Wirkungsweise eines biologisch aktiven Peptids nachahmen (Klasse D). Peptidomimetika, insbesondere α -helikale Foldamere, können unter anderen genutzt werden um wichtige PPI zu modulieren.^[18,19] Zusätzlich finden sie Anwendung als Analoga von antimikrobiellen Peptiden (AMPs)^[141] oder antitumoraktiven Peptiden (ACPs),^[142] die mit biologischen Membranen interagieren. Peptidomimetika bieten so ein breites Anwendungsspektrum für tumortheraeutische Applikationen.

1.3.2 Antitumoral wirksame Peptide

Neben der Modulation von Protein-Protein-Interaktionen gelten antitumoraktive Peptide (*Anticancer Peptides*, ACPs) als vielversprechende Verbindungen auf dem Gebiet der peptidbasierten Wirkstoffforschung.^[126,142–144] ACPs stellen Peptide dar, die eine biologische Aktivität gegenüber Tumorzellen vorweisen. Sie finden ihren Ursprung in der Erforschung antimikrobieller Peptide (AMPs).¹³ Als Bestandteil des angeborenen Immunsystems stellen AMPs eine natürliche Schutzbarriere gegenüber potentiellen Krankheitserregern dar. Sie sind dabei nahezu in allen Lebensformen weitverbreitet und kommen in Bakterien, Pilzen, der Tier- und Pflanzenwelt als auch im Menschen vor.^[145] Neben der antimikrobiellen Aktivität gegenüber gramnegativen und grampositiven Bakterien erstreckt sich das breite Wirkspektrum der AMPs auch auf Pilze, Viren und Parasiten.^[146,147] Einige AMPs zeigen darüber hinaus eine biologische Aktivität gegenüber Tumorzellen und werden dementsprechend als *Anticancer Peptides* (ACPs) bezeichnet.^[143] Im Allgemeinen handelt es sich bei ACPs zumeist um kurze, unmodifizierte Oligopeptide mit einer positiven Nettoladung, die aus 12-50 Aminosäureresten aufgebaut sind.^[144] Neben vielen basischen Aminosäuren wie Lysin, Arginin und Histidin, weisen ACPs häufig auch einen hohen Anteil an hydrophoben Seitenketten auf. Aufgrund ihrer geringen Länge sind ACPs meist relativ flexibel und liegen in

¹³ Antimikrobielle Peptide werden auch als *host defence peptides* (HDPs) bezeichnet, da sie neben den antimikrobiellen Eigenschaften noch weitere Funktionen übernehmen. Darunter konnte eine immunregulierende Wirkung sowie eine antiinflammatorische Wirksamkeit beobachtet werden.^[147]

wässriger Umgebung überwiegend unstrukturiert vor. Bei der Interaktion mit einer biologischen Membran bilden sie amphiphile Konformationen aus, die definierte hydrophile und hydrophobe Bereiche aufweisen.^[148,149] Die biologische Aktivität der Peptide beruht hierbei im Wesentlichen auf der amphiphilen Struktur. Darüber hinaus spielen peptidbasierte Parameter wie Sequenzlänge, Nettoladung, Konformation und Hydrophobizität eine entscheidende Rolle für die biologischen Eigenschaften und die Aktivität der ACPs.^[145] So machen insbesondere kationische α -helikale Peptide einen Großteil der *Anticancer Peptides* aus.^[150] Aufgrund der hohen Sequenz- und Strukturvariabilität gibt es bisher keine einheitliche Klassifizierung von ACPs. Es existieren unterschiedliche Einteilungen basierend auf biophysikalischen und chemischen Eigenschaften, der Herkunft oder den strukturellen Merkmalen der Peptide. Am verbreitetsten ist die Klassifizierung nach Sekundärstrukturen, wobei die Unterteilung in vier Gruppen erfolgt.^[151] Hierzu zählen lineare α -helikale Peptide, ACPs mit ausgedehnten Sekundärstrukturen wie β -Faltblätter, gemischten Peptidstrukturen und undefinierten Strukturen.

Der exakte Mechanismus, nach dem ACPs ihre Wirkung entfalten, ist bisher nicht vollständig aufgeklärt. Prinzipiell kann jedoch zwischen zwei Wirkmechanismen unterschieden werden. Demnach zeigen *Anticancer Peptides* entweder einen direkten membranschädigenden Effekt oder entfalten ihre Aktivität durch die Adressierung intrazellulärer Ziele.^[144,148] Einen wesentlichen Schlüsselschritt beider Mechanismen stellt hierbei die initiale elektrostatische Anziehung zwischen kationischen Bereichen der ACPs und anionischen Komponenten auf der Zelloberfläche dar. Nach Anlagerung der Peptide an die Membran kommt es zu einer Änderung der räumlichen Anordnung. Hierdurch bilden sich amphiphile Sekundärstrukturen aus, die es den Peptiden ermöglichen, weiter mit der Membran einzugehen. Die meisten ACPs zeigen vorrangig eine membranolytische Aktivität. Hierbei inserieren die Peptide in die Lipiddoppelschicht und es kommt ab einer bestimmten Konzentration zu einer Membranschädigung.^[152] Der Prozess der Membranpermeabilisierung kann durch mehrere Interaktionsmodelle beschrieben werden (Abb. 1.13).^[148,153] Im *barrel-stave* Modell durchspannen aggregierte Peptide die Membran vollständig und formen transmembrane Poren (Abb. 1.13 A). Die hydrophilen Bereiche der Peptide zeigen hierbei ins Lumen der Pore, während hydrophobe Peptidregionen mit den hydrophoben Kernbereichen der Lipiddoppelschicht interagieren und die Pore stabilisieren. Eine Variation dieser Modellvorstellung stellt das *torodial-pore* Modell dar (Abb. 1.13 B). Im Gegensatz zum *barrel-stave* Mechanismus sind an der Porenbildung neben den hydrophilen Peptidbereichen auch die hydrophilen

Kopfgruppen der Lipide beteiligt. Entscheidend hierbei sind in erster Linie die elektrostatischen Interaktionen zwischen den ACPs und der Membran. Hydrophobe Wechselwirkungen, die beim *barrel-stave* Modell essentiell sind, haben beim *torodial-pore* Modell nur eine untergeordnete Relevanz. Eine weitere Art der Permeabilisierung wird durch das *carpet* Modell repräsentiert, bei dem sich ACPs flächendeckend ‚teppichartig‘ parallel an die Membranoberfläche anlagern (Abb. 1.13 C). Beim Überschreiten einer bestimmten Peptidkonzentration wird die Membranintegrität detergensartig destabilisiert und die Lipiddoppelschicht löst sich auf.

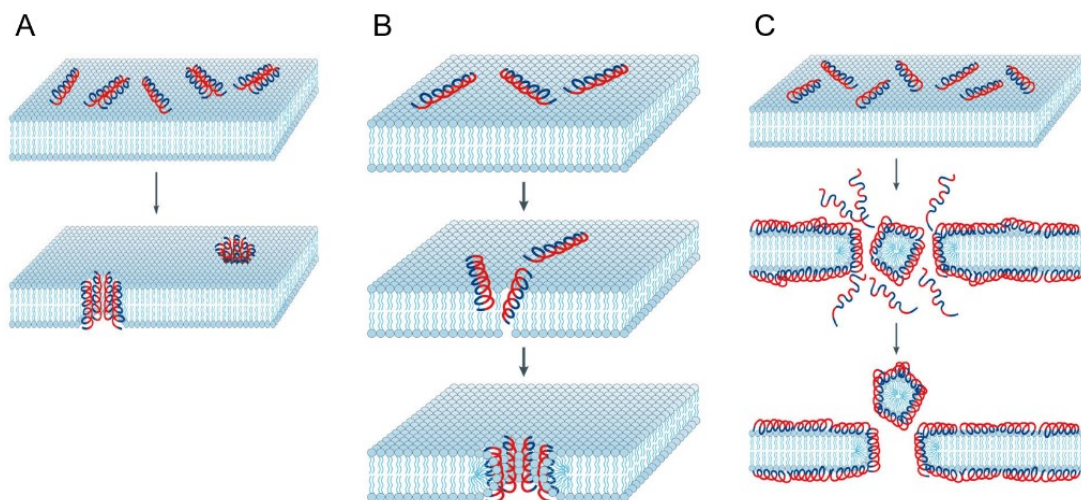


Abb. 1.13: Modelle der Membranpermeabilisierung durch *Anticancer Peptides*. Nach initialer Bindung können ACPs die Biomembran auf unterschiedliche Weise permeabilisieren: **(A)** *barrel-stave* Modell; **(B)** *torodial-pore* Modell und **(C)** *carpet* Modell. Hydrophobe Bereiche sind blau und hydrophile Bereiche rot dargestellt. (modified by permission from Macmillan Publishers Ltd: *Nature Reviews Microbiology* ^[153], copyright (2005)).

Neben membranolytischen Effekten können ACPs den Zelltod auch durch die Adressierung intrazellulärer Prozesse auslösen. Unter anderen werden dabei die Inhibition der Protein-, Nucleinsäure- und Zellwandsynthese, Bindungen an Rezeptormoleküle, Modulation von PPIs und eine Reduktion der Membranfluidität als potentielle intrazelluläre Ziele diskutiert.^[148,154] Weiterhin sind kombinierte Wirkmechanismen aus Permeabilisierung und Inhibition zellulärer Prozesse denkbar. Über welchen Mechanismus ACPs mit Membranen interagieren, hängt stark von den Eigenschaften des Peptids als auch von der Zusammensetzung der Biomembran ab.

Die selektive Toxizität der ACPs gegenüber Tumorzellen ist auf die unterschiedliche Membranzusammensetzung von normalen und Tumorzellen zurückzuführen. So bestehen normale Zellen überwiegend aus zwitterionischen Phospholipiden¹⁴ und Sterolen und besitzen eine neutrale Membranoberfläche.^[143] Dahingegen tragen die Membranen einiger Tumorzelllinien eine negative Nettoladung aufgrund erhöhter Expressionen von anionischen Membranmolekülen wie *O*-glykosylierte Mucine¹⁵ und Phosphatidylserine.^[155,156] Die negative Membranoberfläche ermöglicht hierbei eine elektrostatische Interaktion mit den meist positiv geladenen ACPs und stellt einen wesentlichen Faktor für die selektive Toxizität gegenüber Tumorzellen dar. Darüber hinaus führt eine größere Anzahl an Mikrovilli (fadenförmige Zellfortsätze) zu einer Oberflächenvergrößerung der Tumorzellmembran, wodurch die Bindungsaffinität für ACPs erhöht und deren Tumorselektivität unterstützt wird.^[143,157] Weitere Faktoren, die zur Adressierung von Tumorzellen durch ACPs beitragen, umfassen die erhöhte Membranfluidität und das negative Membranpotential von Tumorzellen.^[143,158,159] Zellmembranen normaler Zellen enthalten meist einen hohen Anteil an Cholesterol, welches die Membranfluidität reguliert.^[160] Tumorzellmembranen weisen hingegen einen geringeren Cholesterolgehalt auf, wodurch diese anfälliger für eine Insertion von ACPs sind und eine Membrandestabilisierung begünstigt wird.^[158,159] Durch die selektive Adressierung von Tumorzellmembranen und die einzigartigen Wirkmechanismen stellen ACPs potentielle Wirkstoffkandidaten für Tumortherapieansätze dar.

1.3.3 Foldamere

Foldamere stellen interessante Vertreter unter den Peptidomimetika dar und werden gemäß *Grossmann* in die Klasse B eingeteilt. Sie sind unnatürliche, synthetische Oligomere, die eine starke Tendenz für rigide und wohldefinierte Konformationen vorweisen und so die Struktur und Funktion natürlicher Peptidvorbilder imitieren können.^[18,20] Stabilisiert wird die Sekundärstruktur durch nichtkovalente Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen zwischen räumlich nahen Resten. Die Hauptvorteile der Foldamere sind dabei ihre synthetische Zugänglichkeit, die eine Vielzahl an diversen Modifikationen erlaubt, sowie ihre vorhersagbaren und stabilen

¹⁴ Membrankomponenten normaler Zellen sind überwiegend zwitterionische Phosphatidylcholine, Phosphatidylethanolamine und Spingomyeline.^[143]

¹⁵ Mucine sind Glykoproteine mit hohen Molekulargewichten, an deren Ser- und Thr-Seitenketten Oligosaccharide gebunden sind. Durch Sialyl- oder Sulfatgruppen tragen sie oft negative Ladungen.^[156]

Faltungseigenschaften.^[18,20] Hierbei reichen meist schon wenige Monomereinheiten um eine definierte Sekundärstruktur auszubilden.¹⁶ Zusätzlich sind die künstlichen Rückgratstrukturen im Vergleich zur Peptidstruktur meist sehr protolysebeständig. Dadurch sind Foldamere interessante Kandidaten, um die biologische Aktivität natürlicher Peptide zu reproduzieren und als Modulatoren von PPIs zu agieren.

1.3.3.1 α -Aminoxypeptide

Die α -Aminoxypeptide stellen eine vielversprechende Verbindungsklasse unter den Foldameren dar und gehören gemäß der Einteilung nach *Grossmann* zur Klasse B der Peptidomimetika. Hierbei handelt es sich um Oxa-Analoga von β -Peptiden, bei denen die β -Methyleneinheit durch ein Sauerstoffatom ausgetauscht ist (Abb. 1.14).

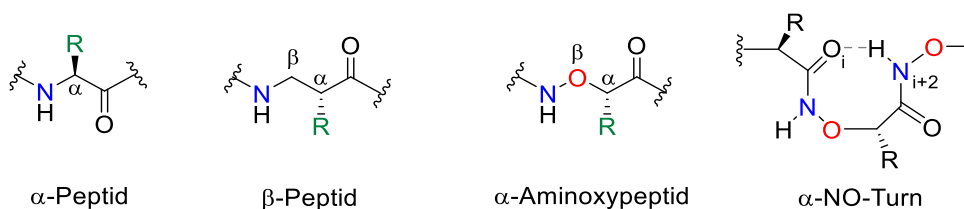


Abb. 1.14: Struktur nativer α -Peptide, β -Peptide und α -Aminoxypeptide sowie α -NO-Turns.

α -Aminoxypeptide wurden erstmals durch *Yang* und Mitarbeiter beschrieben.^[161] Die Wissenschaftler konnten zeigen, dass α -Aminoxypeptide eine erhöhte metabolische Stabilität gegenüber Proteolyse besitzen und sich durch ein rigides Peptidrückgrat auszeichnen.^[162,163] Die Rigidität resultiert aus der Abstoßung freier Elektronenpaare von Stickstoff- und Sauerstoffatomen, durch die α -Aminoxypeptide eine bemerkenswerte Konformationsstabilität aufweisen. Die Sekundärstruktur homochiraler α -Aminoxypeptide wird dabei durch intramolekulare achtgliedrige Wasserstoffbrückenbindungen, sogenannten α -NO-Turns, stabilisiert, die sich zwischen dem Carbonylsauerstoff (C=O_i) und dem Aminoxyamidproton (NH_{i+2}) des räumlich benachbarten Restes ausbilden (Abb. 1.14). Durch computergestützte Simulationen wurde eine rechtsgängige 1.8₈-helikale Konformation vorhergesagt, die sich aus aufeinanderfolgenden α -NO-Turns zusammensetzt.^[164,165] Hierbei konnten bereits für kurze Oligomere wie Dipeptidamide stabile Konformationen beobachtet werden. Darüber hinaus ist die Sekundärstruktur der α -Aminoxypeptide unabhängig von der Art der Seitenketten innerhalb der Peptidsequenz.^[166] Durch Circular dichroismus (CD)-spektroskopischen Untersuchungen

¹⁶ Bei nativen α -Peptide werden meist mehr als zehn Aminosäurereste für eine definierte Sekundärstruktur benötigt.^[168]

konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Konformation sowohl in organischen Lösungsmitteln als auch in saurer bis neutraler wässriger Umgebung stabil bleibt.^[167] α -Aminoxysäuren stellen daher wichtige peptidomimetische Bausteine für biologische Applikationen dar.^[168,169] So entwickelten *Zhang* und Mitarbeiter guanidinreiche zellpenetrierende Peptide (*cell-penetrating peptides*, CPPs) basierend auf α -Aminoxysäuren (Abb. 1.15).^[170] Die aus L- α -Aminosäuren und D- α -Aminoxysäuren bestehenden Hybride wiesen eine geringe Toxizität und eine hohe Serumresistenz auf. Zellpenetrierende α -Aminoxypeptidanaloga stellen potentielle Trägerpeptide für membranimpermeable Moleküle ins Zytosol dar und können als Werkzeuge für *in vivo* Applikationen genutzt werden.

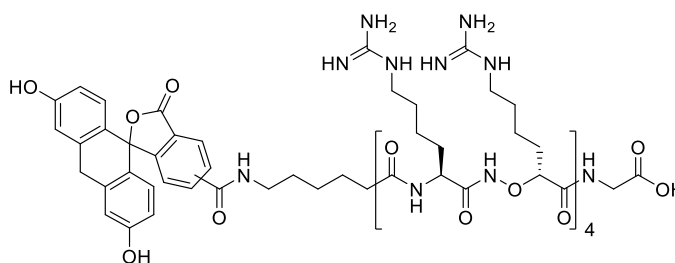


Abb. 1.15: Guanidinreiches zellpenetrierendes Peptid basierend auf α -Aminoxysäuren.

Yang und *Wu* entdeckten zudem, dass α -Aminoxysäureamide azider sind als übliche Amidgruppen und effiziente Wasserstoffbrückendonatoren bei Interaktionen mit Anionen darstellen. Die Wissenschaftler entwickelten synthetische Systeme, die in der Lage sind biologische Funktionen von Chloridionenkanälen nachzuahmen.^[171–174] Im Organismus vermitteln Chloridionenkanäle den Transport von Chloridionen durch die Zellmembran und spielen eine wesentliche Rolle bei der Regulation des Membranpotentials, des transepithelialen Transports, des Zellvolumens und des intrazellulären pH-Wertes.^[175] Fehlfunktionen von Ionenkanälen können zu schweren Erkrankungen führen, darunter Mukoviszidose, Nierensteine, Myotonie und Epilepsie.^[176] Die hohe Spezifität der Chloridionenkanäle im Organismus beruht darauf, dass Chloridionen vollständig desolvatisiert vorliegen und ausschließlich über Wasserstoffbrücken gebunden sind.^[177] *Wu* und *Yang* entwickelten sowohl zyklische als auch azyklische Anionenrezeptoren, die starke Affinitäten und hohe (Enantio-)Selektivitäten für Chloridionen und chirale Carboxylationen zeigen. Die zyklischen Chloridionenrezeptoren bestehen dabei aus D- und L- α -Aminoxysäuren, die eine gebogene Konformation aus heterochiralen α -NO-Turns einnehmen (Abb. 1.16 A, links), oder stellen Hybride aus D- α -Aminoxysäuren und D- α -Aminosäuren dar, welche aus alternierenden Siebenringen (γ -Turns) und Achtringen

(α -NO-Turns) aufgebaut sind (Abb. 1.16 A, rechts). Bei Zyklisierung bilden sich Konformationen aus, die im Inneren zylindrische Hohlräume aufweisen, welche Gastmoleküle aufnehmen können. Die azyklische Anionenrezeptoren enthalten dabei eine Isophthalamideinheit, an die beidseitig zwei α -Aminoxysäurereste gebunden sind (Abb. 1.16 B, links).^[173] Beim Austausch des Isophthalamids gegen ein Pyridinanalogen wurde eine Selektivität für chirale Carboxylationen anstelle von Chloridionen beobachtet (Abb. 1.16 B, rechts).^[174] Der Vorteil der Chloridselektivität wurde zudem genutzt um künstliche Ionenkanäle zu konstruieren, die den Transport von Chloridionen entlang der Lipiddoppelschicht ermöglichen. So bieten α -Aminoxysäuren Anwendungsmöglichkeiten bei der Ionenerkennung und bei Transportprozessen in lebenden Organismen.

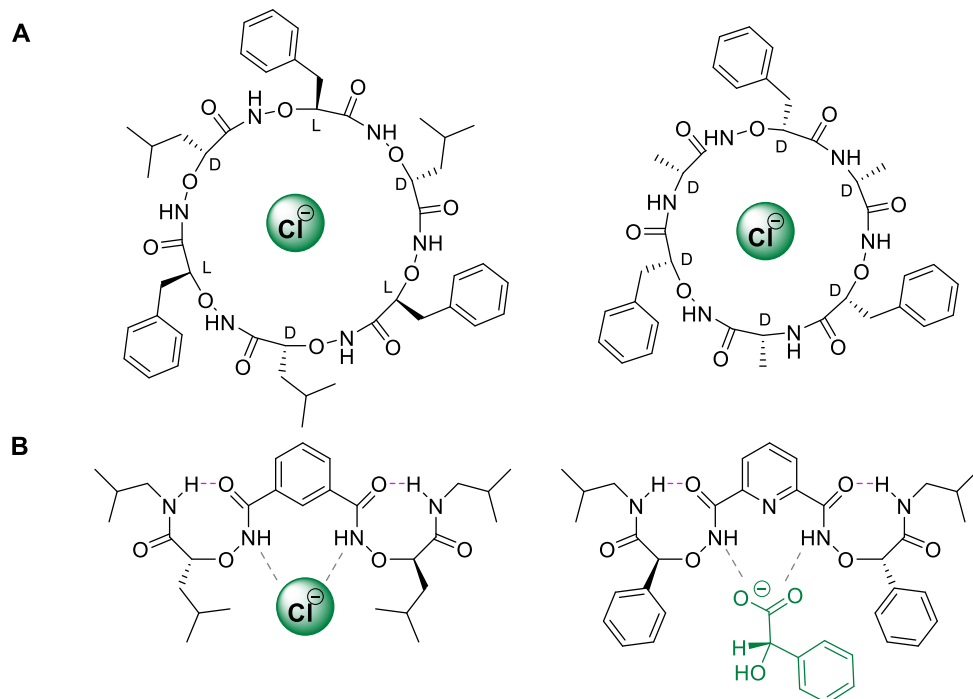


Abb. 1.16: Zyklische und azyklische Anionenrezeptoren bestehend aus α -Aminoxysäuren.

1.3.3.2 α -Peptide

Eine weitere wichtige Gruppe peptidomimetischer Foldamere der Klasse B stellen α -Peptide dar, die auch als *N*-substituierte Oligoglycine bezeichnet werden. Sie leiten sich von den natürlich vorkommenden α -Peptiden ab, bei denen die Seitenkette vom α -Kohlenstoff auf den benachbarten Amidstickstoff verschoben ist (Abb. 1.17).

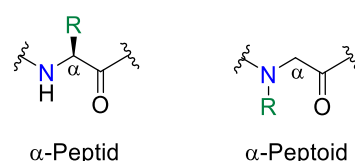


Abb. 1.17: Struktur nativer α -Peptide sowie daraus abgeleitete α -Peptoid.

Im Gegensatz zu den α -Peptiden stellen α -Peptoide achirale Verbindungen dar. Sie sind hierdurch relativ einfach zugänglich¹⁷ und erlauben eine hohe chemische Variabilität an Seitenkettenmodifikationen.^[178,179] Peptoide besitzen als potentielle bioaktive Verbindungen wesentliche Vorteile gegenüber nativen Peptiden. So wurde gezeigt, dass sie eine erhöhte Zellpermeabilität sowie eine proteolytische Stabilität vorweisen.^[180,181] Sie erfahren aufgrund des fehlenden Amidprotons jedoch keine Konformationsstabilisierung durch interne Wasserstoffbrückenbindungen. Tertiäre Amide weisen zudem einen relativ geringen Energieunterschied zwischen den zwei möglichen Isomeren auf, wodurch Peptoide sowohl in der *cis*- als auch *trans*-Amidkonfiguration vorliegen. Dies führt zur hohen konformationellen Flexibilität der Peptoide und erschwert gleichzeitig die Bildung stabiler Peptoidfoldamere. Stabile helikale Strukturen konnten jedoch bereits bei Peptoidpentameren beobachtet werden. Die Stabilität der Sekundärstruktur hängt dabei stark von den jeweiligen Seitenketten ab.^[182] Durch die Wahl geeigneter Seitenketten können über sterische und elektronische Wechselwirkungen stabile Sekundärstrukturen induziert werden. Es existieren sowohl *cis*-induzierende Seitenketten, zu denen sperrige *N*-1-Naphthylethyl-^[183] und *tert*-Butyl-^[184] sowie Triazolium-Substituenten^[185] zählen, als auch Seitenketten mit *N*-Aryl-^[186] und *N*-Alkoxyamidresten,^[187] die bevorzugt eine *trans*-Konfiguration hervorrufen. Ausschließlich aus *cis*-Amidbindungen aufgebaute Peptoidoligomere weisen eine rechtsgängige Helix auf, die der Polyprolin-Typ I Helix ähnelt, während Vertreter, die aus *trans*-Amidbindungen bestehen, linksgängige Helices des Polyprolin-Typ II ausbilden.^[184] Peptoide wurde bereits in verschiedenen Bereichen eingesetzt, unter denen sich auch einige Applikationen befinden, die tumorassoziierte Prozesse adressieren.^[188-191] So entwickelten *Appella* und Mitarbeiter peptoidbasierte Inhibitoren der p53-HDM2-Interaktion.^[190] Das Tumorsuppressorprotein p53 reguliert in seiner aktiven Form den Zellzyklus sowie die Apoptose und verhindert so die Entstehung von Tumoren. Inaktivierung von p53 führt entsprechend zu unkontrolliertem Zellwachstum und zur Proliferation. Die Überexpression des *human double minute 2* (HDM2) Proteins, das an p53 bindet und dieses inaktiviert, steht in Verbindung mit aggressivem Tumorwachstum und Zytostatikaresistenzen.^[192] HDM2-Inhibitoren stellen wichtige Ansatzpunkte in der Tumorthherapie dar, wodurch die Reaktivierung der p53-Funktion erzielt werden kann, was zur Tumorprävention beigetragen wird. Anhand eines strukturbasierten

¹⁷ Die Submonomermethode ermöglicht die Synthese von Peptoiden in zwei Schritten an fester Phase. Zunächst erfolgt mit Bromessigsäure die Acylierung einesamins, der eine nukleophile Substitution mit einem weiteren Amin folgt. Prinzipiell kann jedes beliebige primäre Amin eingesetzt werden.

Designs entwickelten Appella und Mitarbeiter helikale Peptide, die eine ähnliche Anordnung der *hot spots* (Phe, Trp, Leu) der p53-Helix vorweisen und so die Interaktion zwischen p53 und HDM2 inhibieren (Abb. 1.18). Eine Windung der Peptidhelix besteht dabei aus nur drei Resten, anstatt wie bei der p53-Peptidhelix aus 3.6 Aminosäureresten. Zudem weisen die Peptoidseitenketten einen abweichenden Winkel auf. Um die relative Orientierung der drei *hot spots* der p53-Helix zu reproduzieren, wurde daher die Sequenz um einen Rest verkürzt und die Seitenketten um eine Methyleninheit verlängert. Durch weitere Modifikationen konnte die Wasserlöslichkeit (Phosphonat- und Sulfonamidreste), Hydrophobizität (*p*-Nitrobenzylsubstituent) sowie Bindungsaffinität (6-Chlorindolseitenketten) der Peptide erhöht werden. Mit Peptoid PS 13 wurde so ein potenter p53-HDM2-Inhibitor mit einer Aktivität im niedrigen mikromolaren Bereich entwickelt (Abb. 1.18).

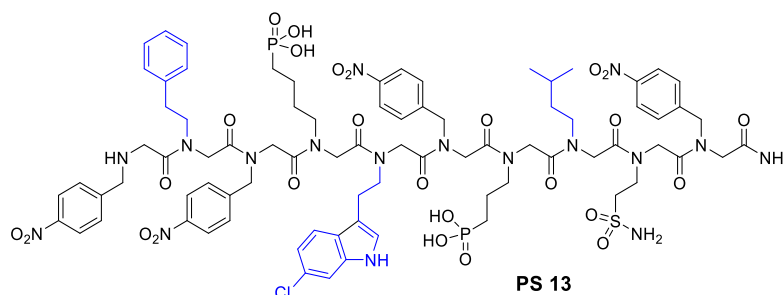


Abb. 1.18: Peptoidbasierter p53-HDM2-Inhibitor mit *hot spot* Aminosäureresten (blau).

Weiterhin identifizierten Kodadek und Mitarbeiter in einem Screening von 300.000 Peptoidnonameren, Peptide die *in vivo* selektiv an den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor Rezeptor 2 (VEGFR2) mit Affinitäten im niedrigen mikromolaren Bereich binden.^[189] Die Bindung des Wachstumsfaktors VEGF an den Rezeptor VEGFR2 spielt eine entscheidende Rolle bei der Angiogenese und die Inhibition der Hormon-Rezeptor-Interaktion repräsentiert eine Strategie in der Tumorthherapie (insbesondere solider Tumoren).^[193] Die durch Kodadek entdeckten Peptide, die zumeist *N*-Lys-, *N*-Leu- sowie aromatische Seitenketten enthalten, erwiesen sich in einem zellbasierten Assay zur VEGFR2-Autophosphorylierung¹⁸ jedoch als nur schwache VEGFR2-Antagonisten. Die Autoren entwickelten auf der Grundlage, dass VEGFR2 als Dimer vorliegt, Homodimere der Peptoidliganden. Peptoid GU40C4 erwies sich als potentieller VEGFR2-Antagonist mit einer Inhibition im niedrigen mikromolaren Bereich (Abb. 1.19). Die Verbindung zeigte zudem im Mausmodell eine Aktivität *in vivo*.^[189] Durch den Inhibitor reduzierte sich das Tumorwachstum um ein Fünffaches.

¹⁸ Autophosphorylierung der Kinasedomäne von VEGFR2 stellt einen frühen Schritt der Angiogenese dar und erfolgt nach Bindung von VEGF.^[193]

1.3 Peptide und Peptidomimetika in der Tumorthherapie

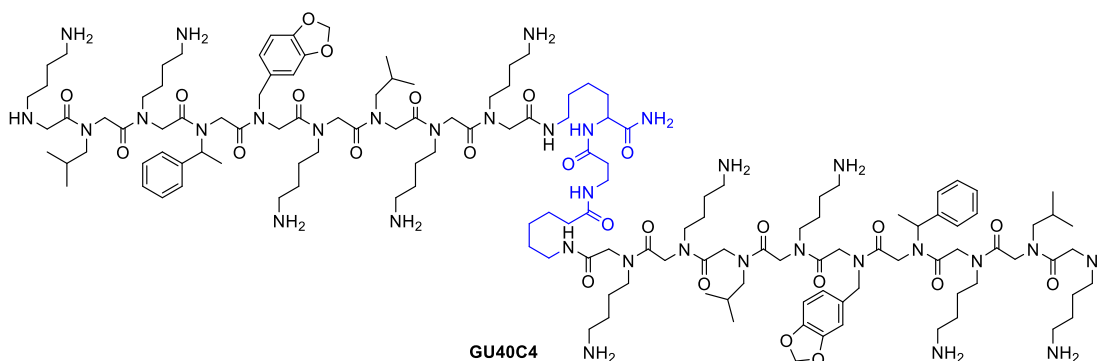


Abb. 1.19: Peptoid GU40C4 (Linker in blau).

Eine weitere Peptoidapplikation wird von *Barron* und Mitarbeitern beschrieben. Inspiriert durch Magainin 2 entwickelten sie kationische, amphiphile Peptide und untersuchten deren biologische Aktivität (Abb. 1.20).^[142,191] Die Peptide zeigten dabei eine antimikrobielle Aktivität gegenüber grampositiven (*Bacillus subtilis*) und gramnegativen (*Escherichia coli*) Bakterien.^[191] Zusätzlich konnten zytotoxische Aktivitäten im niedrigen mikromolaren Bereich gegenüber humanen Tumorzelllinien beobachtet werden.^[142] Einige Peptide zeigten dabei eine moderate Selektivität gegenüber Tumorzellen. Die kationische, amphiphile Natur und eine bestimmte Kettenlänge waren hierbei entscheidend für die antitumorale Aktivität der Peptide. Zusätzlich konnte in einer Xenograft Mausmodellstudie mit humanen Brusttumoren die *in vivo* Effizienz der Peptide bestätigt werden.

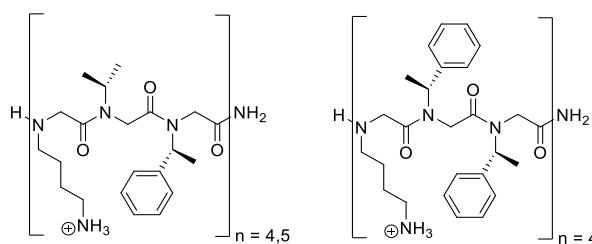


Abb. 1.20: Peptoid-Analoga des helikalen antitumoralen Peptides Magainin 2.

Die aufgeführten Beispiele zeigen den erfolgreichen Einsatz von α -Aminoxypeptiden und α -Peptoiden und verdeutlichen das Potential dieser Substanzen für biomedizinische und tumortherapeutische Applikationen, wo sie Anwendung als Inhibitoren von PPIs oder als antitumoraktive Peptidomimetika finden können.

2 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung und die Synthese neuer peptidanaloger Substanzklassen mit antitumorale Aktivität, sowie die Untersuchung ihrer Eigenschaften und die Aufstellung von Strukturaktivitätsbeziehungen. Hierzu sollen natürliche Bausteine peptidischer Vorbilder und Leitstrukturen gezielt durch α -Peptide oder α -Aminoxypeptide (Abb. 2.1) ausgetauscht werden. Sie sollen als Peptidanaloga dienen und so die Entwicklung neuer bioaktiver Substanzklassen ermöglichen, mit potentiell verbesserten pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften als die peptidischen Vorbilder. Zwei Ansätze sollen dazu verfolgt werden.

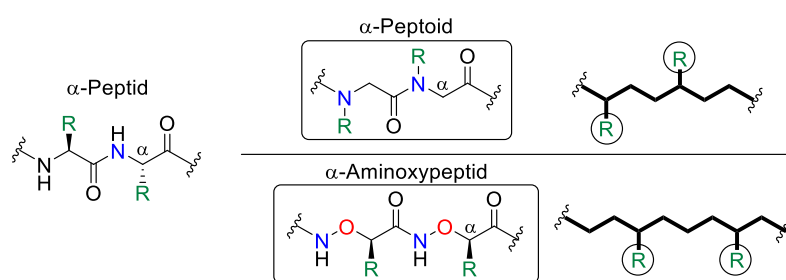


Abb. 2.1: Peptidanaloga. Links: natives α -Peptid; rechts: in der Arbeit verwendete peptidomimetische Analoga und schematische Darstellung des Rückgrats mit Seitenkettenorientierung.

Im ersten Teil der Dissertation stehen die Synthese und die biologische Evaluation peptoidbasierter HDAC-Inhibitoren im Vordergrund. Diese sollen präferentiell für HDAC6 wirken, das ein attraktives Ziel für die Tumorthherapie darstellt.^[93,105] Hierzu soll eine Synthesestrategie entwickelt werden, die den diversitätsorientierten Zugang zu einer kleinen Substanzbibliothek ermöglicht (Kapitel 3, Publikation I). Basierend auf den Ergebnissen der biologischen Evaluation dieser Verbindungen sollen die Strukturaktivitätsbeziehungen der peptoidbasierten HDAC-Inhibitoren tiefergehend untersucht werden. Dazu sollen weitere Derivate dieser Substanzklasse synthetisiert und Inhibitoren mit verbesserter Antitumoraktivität entwickelt werden (Kapitel 4). Zudem steht außerdem die Entwicklung einer 1-Topf-Synthesevariante im Fokus.

Der zweite Teil der Arbeit befasst sich mit der Entwicklung einer Synthesestrategie zur Darstellung von α -Aminoxyoligopeptiden (Kapitel 5, Publikation II). Durch Festphasensynthese sollen Oligopeptide synthetisiert werden, die anschließend auf ihre Faltungseigenschaften und ihren Nutzen als bioaktive, peptidomimetische Foldamere hin untersucht werden sollen. Basierend auf diesen Ergebnissen sollen α -Aminoxypeptide zudem als Strukturmetika herangezogen werden. Dabei soll deren Einsatz als Inhibitoren für die Protein-Protein-Interaktion der C-terminalen Dimerisierung von HSP90 untersucht werden (Kapitel 6, Publikation III).

3 Synthese peptoidbasierter HDAC6-Inhibitoren

In diesem Kapitel werden die Zielsetzung, Überlegungen zur Synthese und eine Zusammenfassung der Publikation I dargestellt. Alle Verbindungen, die aus der Publikation I stammen, sind analog nummeriert und mit einem * markiert. Kapitel 10.1 beinhaltet die vollständige Veröffentlichung sowie eine Darlegung der beigetragenen Anteile des Autors zu der Publikation I.

3.1 Zielsetzung

In Anlehnung an Arbeiten von *Fairlie* und Mitarbeitern über peptidbasierte HDACi **1*** sollten peptidomimetische Analoga **2*** entwickelt werden (Abb. 3.1).^[194] Hierfür dienten die dort beschriebenen linearen Tripeptidmimetika **1*** als Leitstruktur, die von dem natürlich vorkommenden zyklischen Tetrapeptid Trapoxin B abgeleitet sind und in einer mehrstufigen stereoselektiven Synthese hergestellt wurden. Die peptidbasierten HDACi **1*** zeigten eine hohe Aktivität gegenüber Tumorzelllinien. Dabei wiesen einige der Verbindungen eine Präferenz für die Inhibierung von HDAC6 auf, das als attraktives Target für die Entwicklung von Wirkstoffen zur Tumorthherapie gilt.^[195] Auf Grundlage dieser Erkenntnisse sollten peptoidbasierte HDAC6i **2*** über eine diversitätsorientierte Synthesestrategie dargestellt werden.

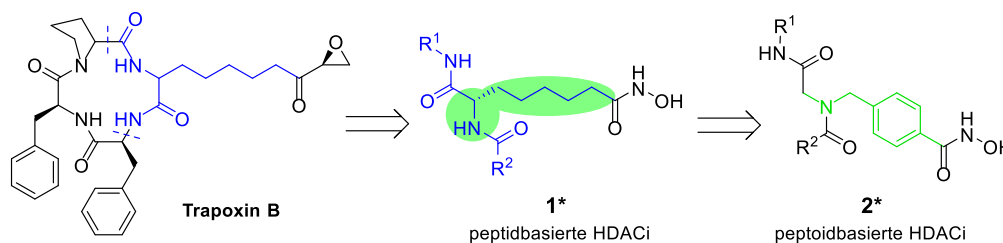


Abb. 3.1: Design der peptoidbasierten HDAC-Inhibitoren **2*** durch Modifikation der durch *Fairlie* beschriebenen peptidbasierten HDACi **1***.

In diesem Projekt sollten zwei wesentliche Modifikationen an der Leitstruktur **1*** vorgenommen werden, um die pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften der HDACi zu verbessern (Abb. 3.1). Die erste Modifikation sollte einen Transfer der Seitenkette (Linker) vom α -Kohlenstoff auf den benachbarten Stickstoff beinhalten. Dadurch besitzen die Verbindungen keine Stereozentren mehr und eine damit verbundene aufwendige stereoselektive Synthesestrategie kann vermieden werden. Außerdem erfolgt hierdurch der Wechsel von der peptidischen hin zur peptoidischen Struktur. Diese Peptoidrückgratstruktur weist im Vergleich zu den peptischen Analoga eine potentiell höhere Stabilität gegenüber Proteolyse auf.^[180] In einer zweiten

Modifikation sollte der Austausch des klassischen aliphatischen durch einen benzyllischen Linker erfolgen. Der Einsatz eines Benzyllinkers beim Design von HDAC-Inhibitoren steht im Zusammenhang mit einer erhöhten Präferenz für HDAC6 als Target.^[80,117] In einem Homologiemodell, in dem die katalytische Domäne II (CDII) von HDAC6 mit HDAC1 verglichen wurde, konnte gezeigt werden, dass HDAC6 einen wesentlich breiteren Bindungskanal und eine größere und offenere Erkennungsregion aufweist als HDAC1.^[117] Die größere und offenere Erkennungsregion erlaubt bei dem Design von HDAC6i außerdem den Einsatz von verzweigten und sperrigen hydrophoben *Caps*.¹⁹ Die Verwendung eines Benzyllinkers sollte zudem eine gezieltere Adressierung des breiteren Bindungskanals von HDAC6 ermöglichen. Ein besonderes Augenmerk lag hierbei auf der Entwicklung einer vielseitig nutzbaren und chemisch wenig aufwendigen Synthesemethode, mit der eine Reihe unterschiedlichster Verbindungen dargestellt werden kann.

Alle synthetisierten Verbindungen sollten im Arbeitskreis von *Prof. Dr. Kassack* (Universität Düsseldorf) auf ihre Zytotoxizität und zusätzlich auf ihre Inhibition der HDAC-Enzymaktivität in einem zellbasierten HDAC-Assay *in vitro* untersucht werden. Nach Identifizierung potenter HDAC-Inhibitoren sollten die besten Vertreter der Substanzklasse weiterführenden biologischen Untersuchungen unterzogen werden. Dazu sollten ihre Aktivitäten gegenüber ausgewählten HDAC-Isoformen getestet und Kombinationsstudien mit Cisplatin durchgeführt werden. Ferner sollten im Arbeitskreis von *Prof. Dr. Gohlke* (Universität Düsseldorf) die Bindungsmodi ausgewählter Verbindungen in Dockingstudien analysiert werden.

3.2 Überlegungen zur Synthesepaltung

In Hinblick auf die geplanten Strukturmodifikationen sollte eine geeignete Synthesestrategie entwickelt werden, die eine hohe strukturelle Vielfalt der darzustellenden Verbindungen ermöglicht. Eine retrosynthetische Analyse des Zielmoleküls ergab vier mögliche Schnittstellen. Basierend auf in der Literatur beschriebene Synthesen von Peptoiden, kommen daher grundsätzlich zwei mögliche Synthesewege für Darstellung der gewünschten Zielverbindungen in Betracht (Abb. 3.2).

¹⁹ Die Röntgenstrukturanalysen der hCDII der humanen HDAC6 und die der zCDI und zCDII der Zebrafisch HDAC6 von *Hai* und *Christiansen* aus dem Jahr 2016 bestätigen diese Annahmen.^[61] Zum Zeitpunkt dieser Arbeit standen diese Erkenntnisse jedoch noch nicht fest.

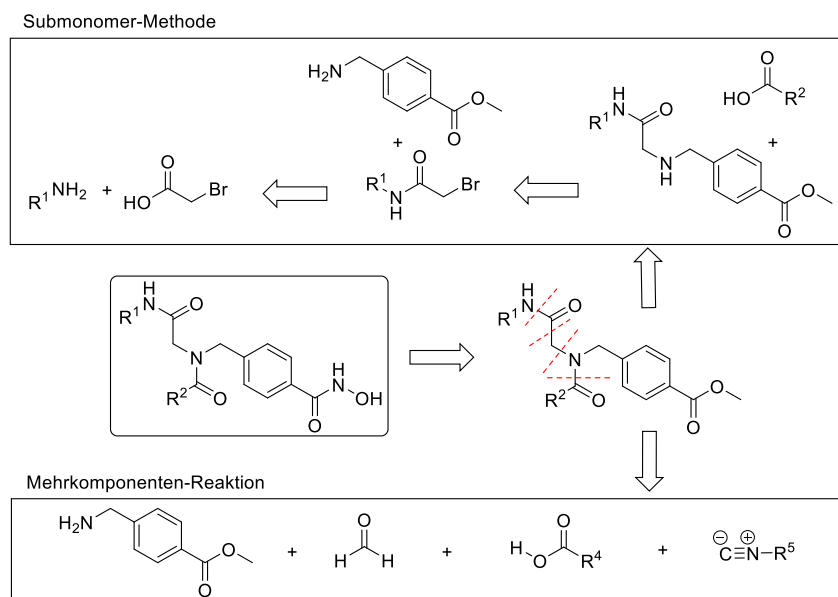


Abb. 3.2: Mögliche Synthesemethoden zur Darstellung der geplanten Zielmoleküle.

Eine Möglichkeit stellt die durch *Zuckermann*^[178] beschriebene Submonomermethode²⁰ dar. Diese Syntheseoption bietet den Vorteil, dass nahezu jedes beliebige primäre Amin als Baustein verwendet werden kann. Zusätzlich bietet sich die Möglichkeit zur Variation des Restes R^2 . Jedoch weist diese Methode auch Nachteile auf. Bei dieser Strategie ist bereits zu Beginn der Synthese der Rest R^1 festgelegt und kann während der Synthese nicht mehr variiert werden. Ein weiterer Nachteil ist die Anzahl der Reaktions- und Reinigungsschritte. Diese klassische chemische Synthese besteht aus der Umsetzung von einem oder zwei Molekülen zu einem Produkt und der Aufbau der Zielverbindung erfolgt über eine Reihe stufenweise ablaufender Reaktionen, an die sich Reinigungs- und Isolierungsschritte anschließen. Im Gegensatz dazu bietet die zweite Methode über eine Mehrkomponentenreaktion (MKR) einige wesentliche Vorteile. MKRs sind 1-Topf-Syntheseverfahren, bei denen teilweise hochkomplexe molekulare Systeme aufgebaut werden. Dabei reagieren mindestens drei Reaktanden in einem Reaktionsgefäß miteinander und das gebildete Produkt enthält wesentliche Teile eines jeden Edukts. Die Ugi-4-Komponentenreaktion (*Ugi-4-Component Reaction*, U-4CR), bei der ein Amin, eine Carbonsäure, eine Carbonylverbindung und ein Isocyanid miteinander reagieren, ist die bekannteste und vielseitigste MKR. Nach retrosynthetischer Analyse kam auch die

²⁰ Die Submonomermethode besteht aus zwei Schritten. Schritt 1 umfasst eine Acylierung bei der meist eine durch Diisopropylcarbodiimid (DIC) aktivierte Halogenessigsäure mit einem Amin reagiert und in Schritt 2 wird das Halogen durch ein Amin substituiert und dadurch das *N*-substituierte Glycinderivat gebildet.

U-4CR für die Synthese der gewünschten Zielverbindungen in Betracht. Die vier Reaktanden reagieren in einer Kondensationsreaktion über eine Sequenz von Teilschritten²¹ zu einem einzigen peptidähnlichen Produkt. Hierbei werden insgesamt vier neue chemische Bindungen geformt, die zur Bildung des Produktes führen und lediglich nur ein Molekül Wasser eliminiert. Außerdem treten durch die festgelegte Teilreaktionssequenz kaum Nebenprodukte auf. Dies macht die U-4CR zu einer sehr atomökonomischen Reaktion. Weiterhin wird die Effizienz der Reaktion dadurch verdeutlicht, dass Isolierungs- und Aufarbeitungsschritte von Zwischenprodukten entfallen. Es ist somit lediglich ein geringer Reinigungs- und Zeitaufwand für die Umsetzung zum Produkt nötig, wodurch einerseits deutlich Ressourcen eingespart werden können und andererseits meist auch höhere Ausbeuten resultieren. Ein weiterer wichtiger Vorteil der U-4CR ist die sehr große Eduktvielfalt. Die Reste an den einzelnen Komponenten können vielfältig variiert werden und auch sterisch stark anspruchsvolle Edukte können reagieren. Dadurch lässt sich mit geringen Material- und Zeitaufwand eine hochdiverse Anzahl von pharmakologisch interessanten Produkten synthetisieren. Aufgrund der beschriebenen Vorteile der U-4CR gegenüber der Submonomermethode, sollte die Synthesestrategie über eine Ugi-4-Komponentenreaktion erfolgen. Diese sollte einen effizienten Zugang zu einer Substanzbibliothek mit großer struktureller Diversität ermöglichen.

3.3 Zusammenfassung der Publikation I

In der Publikation I werden die Synthese und die biologische Aktivität einer neuartigen Klasse an HDAC6-Inhibitoren vorgestellt. In Anlehnung an Arbeiten von *Fairlie* über peptidbasierte HDACi wurden durch einen Transfer der Seitenketten vom α -Kohlenstoff auf den benachbarten Amidstickstoff und durch den Austausch des aliphatischen gegen einen benzyllischen Linkers peptoidbasierte HDACi mit erhöhter Selektivität für HDAC6 entwickelt. Die zweistufige Synthese erfolgte über eine Ugi-4-Komponentenreaktion mit anschließender Hydroxylaminolyse der Zwischenstufen zu den entsprechenden Hydroxamsäuren. Diese effiziente und diversitätsorientierte Syntheseroute erlaubte die Darstellung einer kleinen Substanzbibliothek an strukturell vielfältigen Vertretern dieser Verbindungsklasse. Untersuchungen der Zytotoxizität im MTT-Assay sowie der HDAC-Inhibition in einem zellbasierten HDAC-Assay zeigten, dass insbesondere Verbindungen

²¹ Die Teilreaktionsschritte befinden sich in einem chemischen Gleichgewicht, wobei irreversible Teilreaktionen besonders günstig sind.

mit 4-Dimethylaminophenylsubstituenten aktive Vertreter dieser Substanzklasse sind. Tiefergehende biologische Untersuchungen der vielversprechendsten Verbindungen ergaben im HDAC-Enzymassay eine Präferenz für die Inhibition von HDAC6 gegenüber anderen HDAC-Isoformen. Die HDAC6-Inhibition konnte zusätzlich durch Hyperacetylierung des natürlichen HDAC6-Substrates α -Tubulin mittels Western Blot bestätigt werden. In Kombinationsstudien mit Cisplatin konnte zudem eine chemosensibilisierende Wirkung nachgewiesen werden. Ferner ergaben NMR-spektroskopische Untersuchungen das Vorliegen von Rotameren. Dabei erwies sich die *cis*-Amidbindung als die bevorzugte Konformation. Im Rahmen von Dockingstudien wurden die Bindungsmodi beider Rotamere in HDAC2, HDAC4 und HDAC6 untersucht. Dabei wurde unabhängig von der Verbindung und dem Rotamer HDAC6 bevorzugt gebunden. Im Fall des 4-Dimethylaminophenylderivats konnte eine präferierte Bindung des *trans*-Rotamers für HDAC6 festgestellt werden.

Zusammenfassend werden Einblicke in die Synthese, Strukturaktivitätsbeziehungen und Struktureigenschaften von peptoidbasierten Hydroxamsäuren gegeben, die eine neuartige Substanzklasse an potenten und selektiven HDAC6-Inhibitoren darstellen. Die HDACi zeigen eine bemerkenswerte Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen und repräsentieren daher einen wertvollen Ausgangspunkt für die Entwicklung weiterer HDAC-Inhibitoren mit verbesserter Antitumoraktivität.

4 5-Komponenten-1-Topf-Reaktion peptoidbasierter HDACi

4.1 Ausgangspunkt und Zielsetzung

In Kapitel 3 (Publikation I) wurden peptoidbasierte Hydroxamsäuren als potente HDAC6-Inhibitoren identifiziert. Basierend auf den Ergebnissen zur Untersuchung der Zytotoxizität und der HDAC-Inhibition im zellbasierten als auch im enzymbasierten HDAC-Assay sollten in diesem Abschnitt weitere Derivate mit peptoidbasierter *Cap* synthetisiert werden. Hierdurch sollten tiefergehende Einblicke in die Strukturaktivitätsbeziehungen dieser Substanzklasse erhalten werden. Als Leitstrukturen wurden die beiden HDAC-Inhibitoren **2i*** und **2f*** herangezogen (Abb. 4.1). Diese Verbindungen besitzen als Strukturmotiv beide eine Cyclohexylrest, der sich als aktivitätsfördernd erwiesen hat. Zusätzlich tragen die Verbindungen entweder einen 4-Dimethylamino-benzoyl- (die bisher potenteste Verbindung **2i***) oder einen 3,5-Dimethylbenzoyl-substituenten (die bisher selektivste Verbindung **2f***).²² Beide Inhibitoren zeigten sowohl im Zytotoxizitätsassay, als auch bei der Inhibition der Enzymaktivität im zellbasierten HDAC-Assay gute Aktivitäten und sind präferenzielle HDAC6-Inhibitoren.

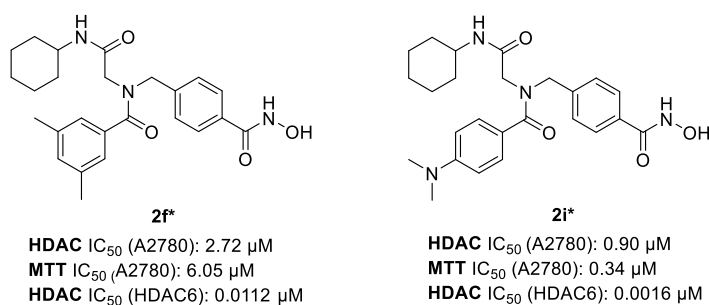


Abb. 4.1: HDAC-Inhibition und Zytotoxizität der HDAC-Inhibitoren **2f*** und **2i***.

²² Im Bezug zur HDAC6-Inhibition ergaben sich für Verbindung **2f*** Selektivitätsindices (SI) von 390 gegenüber HDAC2, >893 gegenüber HDAC4 und 38 gegenüber HDAC11. Die SI von **2i*** lagen im bei 126 (HDAC2), >6289 (HDAC4) und 40 (HDAC11). $SI = IC_{50}(HDAC2/4/11)/IC_{50}(HDAC6)$.

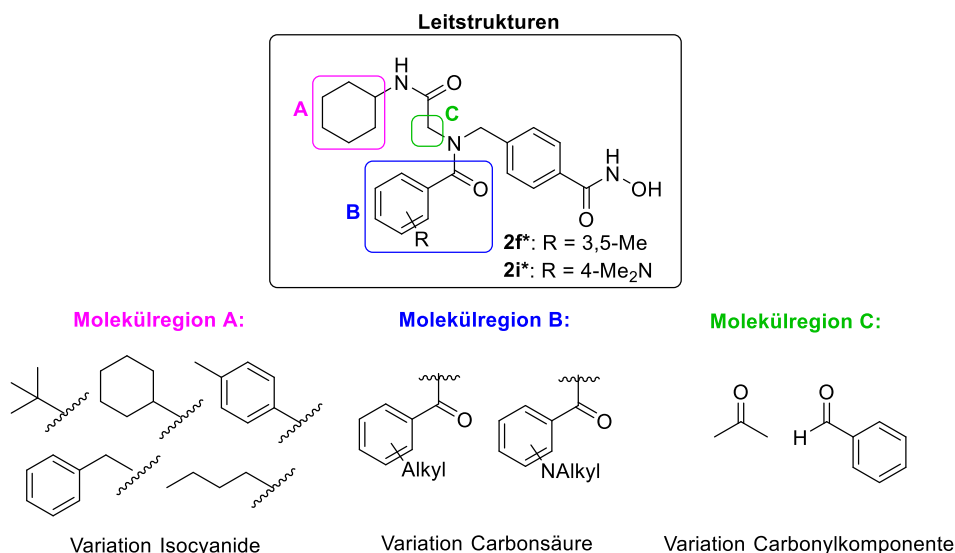


Abb. 4.2: Leitstrukturen und geplante Modifikationen in den Molekülregionen A, B und C.

Es sollten umfangreiche Strukturmodifikationen in den drei Molekülregionen A, B und C erfolgen (Abb. 4.2). Dazu sollten im Einzelnen folgende Veränderungen vorgenommen werden:

- Molekülregion A: Die Substituenten in Molekülregion A sollten umfangreich variiert werden, um die Strukturaktivitätsbeziehungen der Reste in dieser Molekülregion eingehend zu untersuchen. Dazu sollten insgesamt die fünf Isocyanide *t*-Butyl-, *c*-Hexyl-, 4-Tolyl-, *n*-Butyl- und Benzylisocyanid verwendet werden.
- Molekülregion B: Es sollten unterschiedlich alkylsubstituierte Benzoesäuren eingesetzt werden, um zu untersuchen, wie sich Alkylresten an verschiedenen Positionen auf die Aktivität der Verbindungen auswirken. Zusätzlich sollte der Einfluss des Dimethylaminorestes untersucht werden. Dazu sollten Derivaten mit *meta*- und *para*-Dimethylaminobenzoylsubstituenten synthetisiert werden.
- Molekülregion C: Es sollten außerdem einige Derivate durch Variation der Carbonylverbindung hergestellt werden. Die so erhaltenen Derivate sind in der Molekülregion C zusätzlich substituiert und sollten auf ihre Aktivitätsauswirkungen untersucht werden.

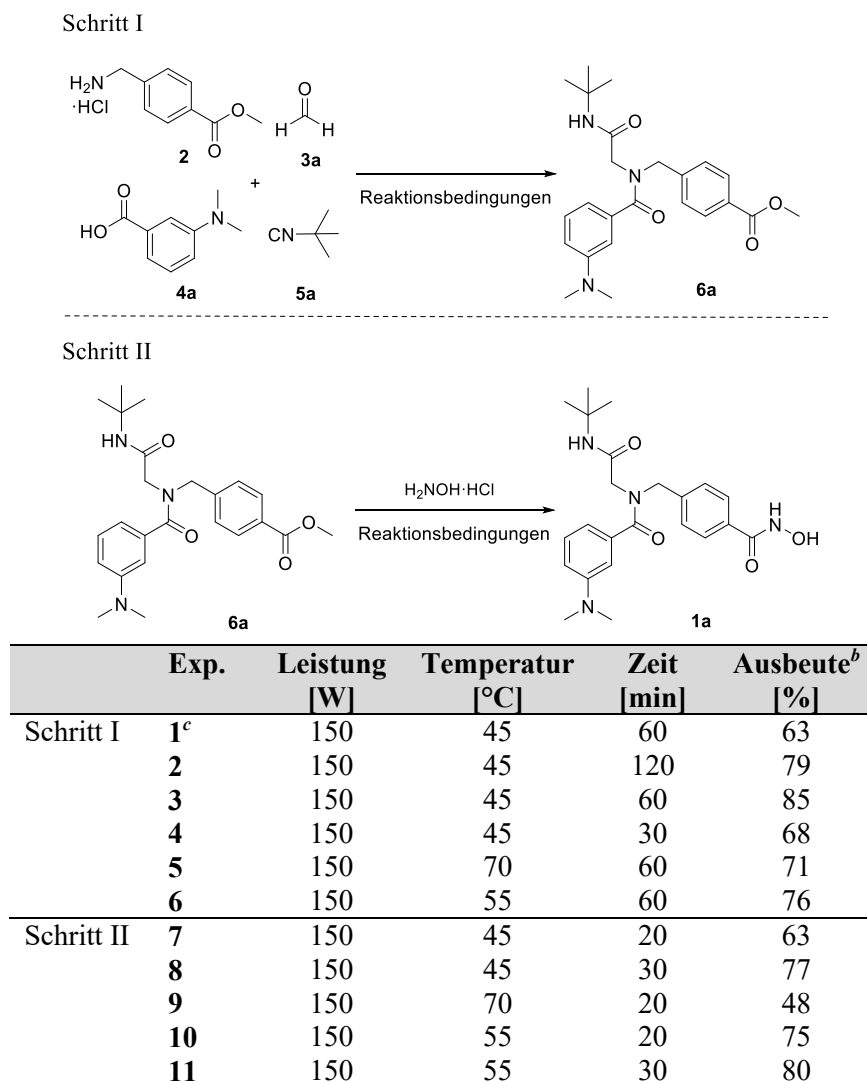
Im vorangegangenen Kapitel wurde zur Gewinnung der peptoidbasierten HDAC-Inhibitoren eine zweistufige Syntheseroute herangezogen. Diese Strategie erfolgte zunächst über eine Ugi-4-Komponentenreaktion, bei der nach flashsäulenchromatographischer Reinigung ein Methylesterderivat als Vorstufe erhalten wurde. Dieser Methylester wurde in einer Folgereaktion über eine Hydroxylaminolyse zur gewünschten Hydroxamsäure umgesetzt. Beide Schritte erforderten hierbei relativ lange Reaktionszeiten.²³ Durch Modifikationen der ursprünglichen Methode sollte ein zeiteffizienterer und ressourcensparender Syntheseweg entwickelt werden, der die Darstellung der Zielverbindung mit einer verbesserten Gesamteffizienz und erhöhten Ausbeuten ermöglicht. Zur weiteren Optimierung sollte dazu eine mikrowellenunterstützte 5-Komponenten-1-Topf-Synthesevariante entwickelt werden.²⁴ Abschließend sollten alle Verbindungen im Arbeitskreis von *Prof. Kassack* auf ihre Zytotoxizität im MTT-Assay und ihre HDAC-Inhibition in einem zellbasierten HDAC-Assay untersucht werden. Ferner sollte die Inhibition gegenüber den Isoformen HDAC1 und HDAC6 in einem HDAC-Enzymassay untersucht werden.

4.2 Optimierung der Multikomponentensynthese

Um die Synthesestrategie weiter zu optimieren, wurden zunächst die beiden bekannten Syntheseschritte des zweistufigen Verfahrens aus Kapitel 3 unabhängig voneinander betrachtet und untersucht. Ausgehend von Testverbindung **1a** wurden dazu unterschiedliche Reaktionsbedingungen untersucht (Tab. 4.1). Als Ausgangsbedingungen für die U-4CR (Schritt I) wurden die optimierten Reaktionsbedingungen aus Kapitel 3 gewählt, sodass alle mikrowellenunterstützten Reaktionen in wasserfreiem Methanol und unter Zugabe von zerstoßenem Molekularsieb 4 Å (MS 4 Å) erfolgten. Hierzu wurde ein geringer Überschuss an 4-Aminomethylbenzoesäuremethylester Hydrochlorid (1.2 Äq.) und Paraformaldehyd (1.2 Äq.) eingesetzt und die Reaktion wurde bei einer Konzentration der Carbonsäure **4a** und des Isocyanid **5a** von 0.5 M durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tab. 4.1 zusammengefasst.

²³ Die Ugi-4-Komponentenreaktion aus dem vorangegangenen Kapitel erfolgte bei einer Reaktionszeit von 72 h, während die Reaktionszeit der Hydroxylaminolyse 16 h betrug.

²⁴ Der wesentliche Vorteil der Mikrowelle besteht in der gleichmäßigeren Energieverteilung. Dies führt zu verringerten Reaktionszeiten und zu einem reduzierten Energiebedarf.

Tab. 4.1: Reaktionsoptimierung der mikrowellenunterstützten Multikomponentenreaktion.

[a] Der Fortschritt aller Reaktionen wurde mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt. [b] Die angegebenen Ausbeute wurde nach säulenchromatographischer Reinigung ermittelt. [c] Alle vier Komponenten wurden zeitgleich zur Reaktion zugesetzt.

In einer ersten mikrowellengestützten Synthese wurden alle vier Komponenten und Triethylamin zeitgleich dem Reaktionsansatz hinzugefügt und die Reaktion wurde bei 45°C für 60 min. unter Mikrowelleneinstrahlung gerührt (150 W). Das gewünschte Produkt konnte in einer moderaten Ausbeute von 63% isoliert werden (Tab. 4.1, Exp. 1). Da der vollständige Umsatz zum Produkt der U-4CR für eine erfolgreiche 1-Topf-Variante entscheidend ist, wurde die 4-Komponentenreaktion weiter optimiert. Bei der U-4CR ist die Bildung eines Imins²⁵ als Zwischenstufe ein wesentlicher Schlüsselschritt. So wurde der Fokus zunächst darauf gelegt, die Edukte unter Mikrowellenbedingungen

²⁵ Ein nicht kompletter Umsatz der Carbonylkomponente würde bei der Zugabe von Hydroxylamin zu Nebenprodukten wie z.B. dem Oximderivat führen.

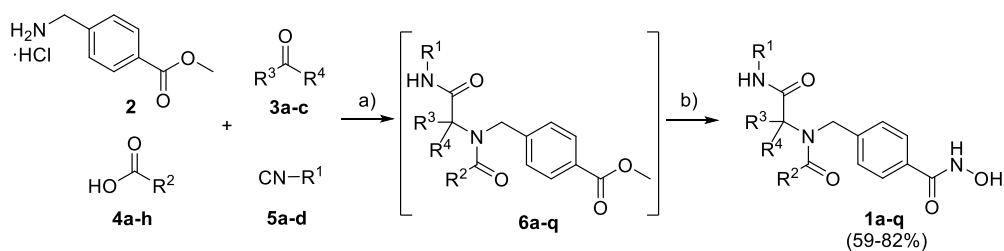
vollständig zum Imin umzusetzen. Das Aminhydrochlorid **2**, Paraformaldehyd, Triethylamin und zerstoßenes Molekularsieb wurden dazu in wasserfreiem Methanol suspendiert und bei 45°C in der Mikrowelle (150 W) gerührt. Der Fortschritt der Iminbildung wurde nach unterschiedlichen Zeiten (2, 5, 10 und 20 min.) mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt. Nach einer Reaktionszeit von 20 min. war die Umsetzung zum Imin vollständig. Entsprechend erfolgte bei allen weiteren Reaktionen zunächst eine Voraktivierung zum Imin bei 45°C für 20 min., bevor die Carbonsäure- und Isocyanidkomponente hinzugefügt wurden. Anschließend wurde die Reaktion bei verschiedenen Temperaturen und Reaktionszeiten untersucht (Schritt I, Tab. 4.1, Exp. 2-6). Das beste Ergebnis wurde bei 45°C und einer Reaktionszeit von 60 min. erzielt (Exp. 3). Produkt **1a** konnte bei diesen Bedingungen in einer guten Ausbeute von 85% erhalten werden.

Anschließend wurden die Reaktionsbedingungen der Hydroxylaminolyse (Schritt II) unabhängig von der U-4CR untersucht. Hierzu wurde der zuvor säulenchromatographisch gereinigte Methylester **6a** bei unterschiedlichen Reaktionszeiten und -temperaturen unter Mikrowelleneinstrahlung (150 W) mit einer frisch hergestellten Hydroxylaminlösung umgesetzt. Die Hydroxylaminolyse bei 45°C und einer Reaktionszeit von 20 min. lieferte die Hydroxamsäure **1a** in einer Ausbeute von 63% (Exp.7). Eine geringe Erhöhung der Temperatur von 45°C (Exp. 7, 63%) auf 55°C (Exp. 10, 75%) und eine Verlängerung der Reaktionszeit von 20 min. (Exp. 7, 63%) auf 30 min. (Exp. 8, 77%) resultierten jeweils in einem Anstieg der Ausbeute. Im Gegensatz dazu, hatte eine weitere Temperaturerhöhung auf 70°C eine Verschlechterung der Ausbeute (Exp. 9, 48%) zur Folge. Die optimalen Bedingungen für die Hydroxylaminolyse wurden bei einer Temperatur von 55°C und eine Reaktionszeit von 30 min. erzielt. Hierbei konnte die Zielverbindung in einer Ausbeute von 80% erhalten werden (Exp. 11).

Abschließend wurden die unabhängig voneinander optimierten Bedingungen für beiden Schritte (Schritt I: U-4CR, Schritt II: Hydroxylaminolyse) miteinander kombiniert. Hierbei wurde das Zwischenprodukt nicht isoliert und gereinigt, so dass die Synthese in einem 1-Topf-Verfahren erfolgte. Die sequentielle Durchführung beider Schritte in einem Reaktionsgefäß und unter Mikrowelleneinstrahlung lieferte das gewünschte Zielmolekül nach säulenchromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 72% und in einer Reaktionszeit von unter zwei Stunden. Damit konnte eine zeiteffektivere Variante der diversitätsorientierte Synthese von peptoidbasierten HDACi entwickelt werden.

4.3 Synthese der peptoidbasierten HDAC-Inhibitoren

Das erfolgreich optimierte 5-Komponenten-1-Topf-Verfahren über eine sequentielle Ugi-4CR und Hydroxylaminolyse, konnte nun für die Synthese der Zielverbindungen genutzt werden. Die HDACi **1a-q** konnten alle nach säulenchromatographischer Reinigung in guten Ausbeuten von 59-82% erhalten werden (Schema 4.1).



Schema 4.1: Mikrowellengestützte sequentielle 5-Komponenten-1-Topf-Reaktion der HDACi **1a-q**. a) (i) **2**, **3a-c**, Et₃N, MeOH, 4 Å MS, 150 W, 45°C, 20 min; (ii) R¹-NC **5a-d**, R²-COOH **4a-h**, 150 W, 45°C, 60 min; (b) H₂NOH·HCl, Na, MeOH, 150 W, 55°C, 30 min.

Zusammenfassend erlaubte diese Methode eine kosten- und zeiteffiziente Variante zur Synthese einer Reihe von peptoidbasierten Hydroxamsäurederivaten mit unterschiedlichsten Strukturmodifikationen (Abb. 4.3).

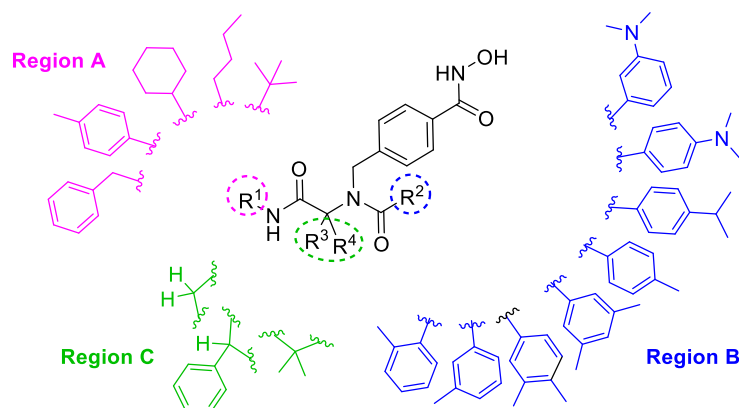


Abb. 4.3: Durchgeführte Variation der Reste R¹-R⁴ in den Molekülregionen A-C.

4.4 Biologische Evaluation der HDACi

Im Anschluss wurden die im Rahmen dieses Projektes hergestellten Verbindungen **1a-q** im Arbeitskreis von *Prof. Dr. Kassack* (Institut für Medizinische und Pharmazeutische Chemie, Universität Düsseldorf) hinsichtlich ihrer Zytotoxizität in einem MTT-Assay und ihre HDAC-Inhibition in einem zellbasierten HDAC-Assay untersucht. Zusätzlich

wurden Untersuchungen zur Inhibierung der Enzymaktivitäten in einem HDAC-Enzymassay an den rekombinanten Enzymen HDAC1 und HDAC6 von *Dr. Katharina Stenzel* (Institut für Medizinische und Pharmazeutische Chemie, Universität Düsseldorf) durchgeführt.

4.4.1 Aktivitätsuntersuchung mittels MTT-Assay

Zur Bestimmung der Zytotoxizität wurde ein MTT-Assay an humanen Tumorzelllinien durchgeführt. Benannt ist der Test nach dem wasserlöslichen gelben Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT), der in den Mitochondrien der Zellen zu einem blauvioletten, wasserunlöslichen Formazanderivat reduziert wird (Abb. 4.4).

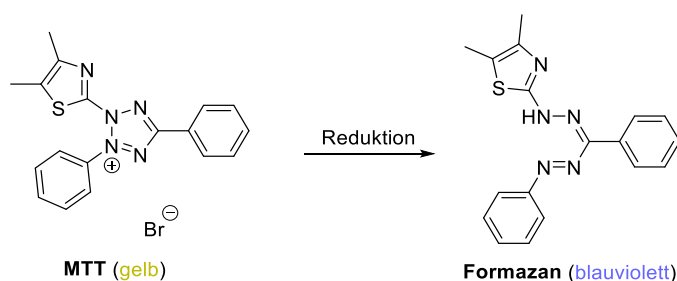


Abb. 4.4: Reduktion des Tetrazoliumsalses MTT zum blauvioletten Formazan.

Die Reaktion wird nur in stoffwechselaktiven Zellen katalysiert, bei geschädigten Zellen kommt es nicht zur Reduktion. So kann durch kolorimetrischer Methoden, anhand der Intensität des blauvioletten Farbstoffs, die Viabilität der Zellen bzw. das Ausmaß der Zellschädigung durch die Testsubstanz bestimmt werden. Der MTT-Test wurde an den humanen Tumorzelllinien A2780 und Cal27²⁶ und den entsprechenden cisplatin-resistenten Subzelllinien A2780 CisR und Cal27 CisR durchgeführt. Dazu wurden die Zellen zunächst *in vitro* mit den potentiell zytotoxischen Testsubstanzen inkubiert und anschließend mit MTT behandelt, bevor die Zellviabilität in Abhängigkeit von der Intensität des Farbstoffes bestimmt wurde. Ermittelt wurde hierbei die mittlere inhibitorische Konzentration (IC₅₀) der Substanzen. Dieser Wert gibt die Konzentration der Testsubstanz wieder, bei der die Viabilität der Zellen um das Halbmaximale reduziert wurde. Vorinostat und Cisplatin wurden als Referenzsubstanzen herangezogen. Die Ergebnisse des MTT-Assays sind in Tab. 4.2 wiedergegeben.

²⁶ A2780: Zelllinie des humanen epithelialen Ovarialkarzinom; Cal27: Zelllinie des humanen Plattenepithelkarzinoms der Zunge.

Tab. 4.2: Zytotoxische Aktivität (MTT) der Verbindungen **1a-q**.

Verbindung	R ¹	R ²	R ³ , R ⁴	MTT IC ₅₀ [μM]			
				A2780	A2780CisR	Cal27	Cal27CisR
1a	<i>t</i> -Bu	3-Me ₂ N-Ph	H, H	6.60	36.4	15.3	32.2
1b	4-Tolyl	3-Me ₂ N-Ph	H, H	3.52	15.5	8.48	23.9
1c	4-Tolyl	3,5-Me-Ph	H, H	10.0	14.2	n. b.	n. b.
1d	<i>c</i> -Hex	3-Me ₂ N-Ph	H, H	3.50	18.2	10.2	23.7
1e	<i>c</i> -Hex	2-Me-Ph	H, H	6.54	39.9	21.8	2.39
1f	<i>c</i> -Hex	3-Me-Ph	H, H	3.61	22.9	9.82	255
1g	<i>c</i> -Hex	3,4-Me-Ph	H, H	2.98	7.14	8.55	11.9
1h	<i>c</i> -Hex	4-Me-Ph	H, H	0.69	4.08	6.13	2.58
1i	<i>c</i> -Hex	4- <i>i</i> Pr-Ph	H, H	0.57	4.21	4.84	4.56
1j	<i>c</i> -Hex	4-Me ₂ N-Ph	Me, Me	23.8	54.6	48.4	30.8
1k	<i>c</i> -Hex	4-Me ₂ N-Ph	H, Ph	37.0	64.8	41.1	34.0
1l	<i>n</i> -Bu	3-Me ₂ N-Ph	H, H	3.97	37.5	12.6	5.63
1m	<i>n</i> -Bu	3,5-Me-Ph	H, H	2.35	8.09	6.85	10.7
1n	<i>n</i> -Bu	4-Me ₂ N-Ph	H, H	0.28	3.74	1.95	4.86
1o	Bn	3-Me ₂ N-Ph	H, H	0.96	7.02	6.54	8.54
1p	Bn	3,5-Me-Ph	H, H	0.30	3.86	3.43	158
1q	Bn	4-Me ₂ N-Ph	H, H	0.95	0.46	0.56	0.66
		Vorinostat^a		2.42	3.12	2.64	2.08
		Cisplatin		2.25	17.2	1.61	33.1

Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus drei Experimenten. Die Standardabweichung liegt <10% des Mittelwerts. n. b. = nicht bestimmt. ^a Daten für Vorinostat stammen aus der Publikation I.

Im MTT-Assay konnte gezeigt werden, dass alle peptoidbasierten Verbindungen²⁷ die Viabilität der getesteten Tumorzellen beeinträchtigen und die IC₅₀-Werte im niedrigen mikro- bis nanomolaren Bereich liegen. Die Testsubstanzen weisen in der Zelllinie A2780 im Vergleich zur Zelllinie Cal27 eine stärkere Zytotoxizität auf. Dabei ist bei den cisplatinresistenten Subzelllinien (CisR) tendenziell ein schwächerer Einfluss auf die Zellviabilität zu beobachten. Verbindungen mit zusätzlichen Substituenten in Position R³ und R⁴ (**1j** und **1k**) zeigen im Vergleich zu den restlichen Testsubstanzen einen verringerten zytotoxischen Effekt. Sie sind deutlich weniger zytotoxisch als die Referenzsubstanzen Cisplatin und Vorinostat. Dahingegen ist festzustellen, dass Derivate mit einem Benzylsubstituenten in Position R¹ (**1o**, **1p** und **1q**) und/oder einem *para*-substituierten Phenylrest in Position R² (**1h**, **1i**, **1n** und **1q**) einen starken Einfluss auf die Zellviabilität haben. Insbesondere Verbindung **1q** zeigt einen starken zytotoxischen Effekt und weist in allen Zelllinien niedrigere IC₅₀-Werte auf als die beiden Referenzsubstanzen (**1q**: A2780 = 0.60 μM, A2780 CisR = 0.46 μM, Cal27 = 0.56 μM, Cal27 CisR = 0.66 μM).

²⁷ Verbindung **1j** und **1k** werden strenggenommen nicht zu den peptoidbasierten HDACi gezählt, da sie zusätzliche Substituenten in Molekülregion C tragen.

4.4.2 Untersuchungen zur Inhibition der HDAC-Enzymaktivität

Zur Bestimmung der Inhibition der Enzymaktivität von Histondeacetylasen wurde ein zweistufiger, zellbasierter Pan-HDAC-Assay an humanen Tumorzelllinien (A2780 und Cal27) durchgeführt. Das Prinzip beruht dabei auf der Deacetylierungsaktivität von HDACs, bei der Acetylgruppen eines ϵ -acetylierten Lysinsubstrats entfernt werden (Abb. 4.5). Anschließend erfolgt bei Spaltung des Substrats durch Trypsin die Freisetzung eines Fluorophors. Als zellpermeables Substrat wurde Boc-Lys(ϵ -Ac)-AMC verwendet, an das der Fluorophor AMC²⁸ gekoppelt ist (Abb. 4.5).

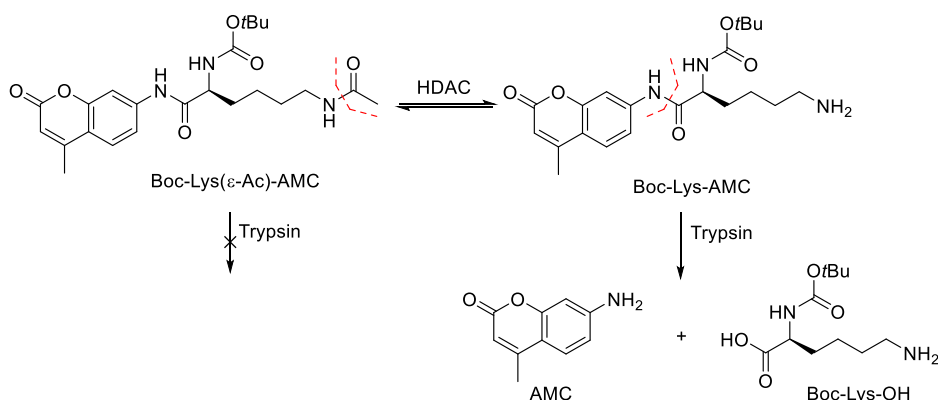


Abb. 4.5: Prinzip des zweistufigen, zellbasierten HDAC-Assays.

Nachdem die Zellen zunächst mit steigenden Konzentrationen der Testsubstanzen inkubiert und daraufhin mit dem Substrat versetzt wurden, kommt es zur Deacetylierung des Substrates durch die HDACs. Anschließend erfolgt die Zugabe einer Quenchlösung.²⁹ Hierbei wird das deacetylierte Substratintermediat mit Hilfe von Trypsin³⁰ gespalten, wodurch der Fluorophor AMC freigesetzt wird (Abb. 4.5). Durch fluorometrische Methoden kann dann, anhand der Intensität der gemessenen Photoemission von AMC (Anregungswellenlänge bei $\lambda_{\text{ex}} = 390$ nm, Emissionswellenlänge bei $\lambda_{\text{em}} = 460$ nm), die Inhibition der HDAC-Enzymaktivität durch die Testsubstanz bestimmt werden. Es wurde die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) der Substanzen ermittelt. Dieser Wert gibt die Konzentration der Testsubstanz an, bei der eine halbmaximale Reduzierung der HDAC-Aktivität zu beobachten ist. Die Ergebnisse des HDAC-Assays sind in Tab. 4.3 zusammengefasst.

²⁸ 7-Amino-4-Methylcoumarin

²⁹ Die Quenchlösung bestehend aus 25 mM Tris-HCl (pH 8), 137 nM NaCl, 2.7 nM KCl, 1 mM MgCl₂, 1% NP40, 2.0 mg/mL Trypsin und 10 μ M Vorinostat.

³⁰ Trypsin ist ein proteolytisches Enzym (Protease), das Peptide nach basischen Aminosäuren spaltet.

Tab. 4.3: Inhibition der HDAC-Aktivität (HDAC) der Verbindungen **1a-q**.

Verbindung	R ¹	R ²	R ³ , R ⁴	HDAC IC ₅₀ [μM]			
				A2780	A2780CisR	Cal27	Cal27CisR
1a	<i>t</i> -Bu	3-Me ₂ N-Ph	H, H	9.12	8.52	8.20	9.71
1b	4-Tolyl	3-Me ₂ N-Ph	H, H	2.44	2.07	2.16	4.31
1c	4-Tolyl	3,5-Me-Ph	H, H	3.24	2.13	n. b.	n. b.
1d	<i>c</i> -Hex	3-Me ₂ N-Ph	H, H	4.97	4.38	4.47	4.45
1e	<i>c</i> -Hex	2-Me-Ph	H, H	12.1	14.5	9.92	12.5
1f	<i>c</i> -Hex	3-Me-Ph	H, H	4.17	4.41	3.61	3.34
1g	<i>c</i> -Hex	3,4-Me-Ph	H, H	3.54	3.67	3.92	2.93
1h	<i>c</i> -Hex	4-Me-Ph	H, H	1.62	1.50	1.67	1.51
1i	<i>c</i> -Hex	4- <i>i</i> Pr-Ph	H, H	1.22	1.28	1.12	1.12
1j	<i>c</i> -Hex	4-Me ₂ N-Ph	Me, Me	9.95	7.25	8.68	7.81
1k	<i>c</i> -Hex	4-Me ₂ N-Ph	H, Ph	10.7	11.8	12.6	8.06
1l	<i>n</i> -Bu	3-Me ₂ N-Ph	H, H	7.88	6.94	6.56	5.61
1m	<i>n</i> -Bu	3,5-Me-Ph	H, H	3.37	3.43	3.52	3.12
1n	<i>n</i> -Bu	4-Me ₂ N-Ph	H, H	0.60	0.75	0.58	0.54
1o	Bn	3-Me ₂ N-Ph	H, H	1.23	1.22	1.21	1.30
1p	Bn	3,5-Me-Ph	H, H	0.96	1.03	0.91	0.92
1q	Bn	4-Me ₂ N-Ph	H, H	0.24	0.24	0.17	0.19
Vorinostat				0.97	0.91	0.93	0.99

Die Werte entsprechen dem Durchschnitt aus drei Experimenten. Die Standardabweichung liegt <10% des Durchschnitts. n. b. = nicht bestimmt.

Die Verbindungen zeigen für beide Tumorzelllinien (A2780 und Cal27) eine ähnlich starke Hemmung der HDAC-Aktivität, mit IC₅₀-Werten im niedrigen mikromolaren bis nanomolaren Bereich. Die Testsubstanzen weisen dabei vergleichbare Aktivitäten sowohl in den unbehandelten Zellen als auch in den cisplatinresistenten Subzelllinien auf. Weiterhin stützen die Ergebnisse des zellbasierten HDAC-Assays die Strukturaktivitätsabstufungen, die sich bereits im Zytotoxizitätstest abgezeichnet haben. So führen zusätzliche Substituenten in Position R³ und R⁴ (**1j** und **1k**) zu einer Verminderung der HDAC-Inhibition (**1j**: A2780 = 9.95 μM, Cal27 = 8.68 μM; **1k**: A2780 = 10.7 μM, Cal27 = 12.6 μM). Eine Aktivitätsabnahme ist außerdem bei einem *ortho*-methylsubstituierten Phenylrest in Position R² (**1e** vs. **1f** und **1h**) zu beobachten. Dahingegen lässt sich eine gesteigerte HDAC-Inhibition bei Derivaten mit Benzylgruppe in Position R¹ (**1o**, **1p** und **1q**) und/oder *para*-substituierten Phenylresten an R² (**1h**, **1i**, **1n** und **1q**) feststellen. Insbesondere Verbindungen **1n** und **1q**, die eine 4-Dimethylaminophenylgruppe tragen, sind bemerkenswerte HDAC-Inhibitoren und besitzen niedrige IC₅₀-Werte (**1n**: A2780 = 0.60 μM, Cal27 = 0.58 μM; **1q**: A2780 = 0.24 μM, Cal27 = 0.17 μM), die vergleichbar oder besser sind als die Referenzwerte von Vorinostat.

4.4.3 Untersuchungen der potentiellen Isoformselektivität

In einem HDAC-Enzymassay wurde die inhibierende Wirkung der Verbindungen gegenüber zwei HDAC-Isoformen untersucht. Für die Testungen wurden dazu die Enzyme HDAC1 und HDAC6 verwendet, um eine potentielle Subtypselektivität für HDAC6 feststellen zu können. HDAC1 diente hierbei als Kontrollisoenzym der Klasse I. Die rekombinanten Enzyme wurden zunächst mit steigenden Konzentrationen der Testsubstanzen und mit dem synthetisch hergestellten Substrat Cbz-Lys(ϵ -Ac)-AMC inkubiert (Abb. 4.6). Nach Deacetylierung des Substrats durch HDACs, erfolgt durch Zugabe von Trypsin anschließend die Spaltung des Substratintermediats Cbz-Lys-AMC unter Freisetzung des Fluorophors AMC (Abb. 4.6). Anhand der gemessenen Intensität der Fluoreszenz von AMC, kann daraufhin die HDAC-Inhibition der Testsubstanz (IC_{50} -Wert) ermittelt werden.

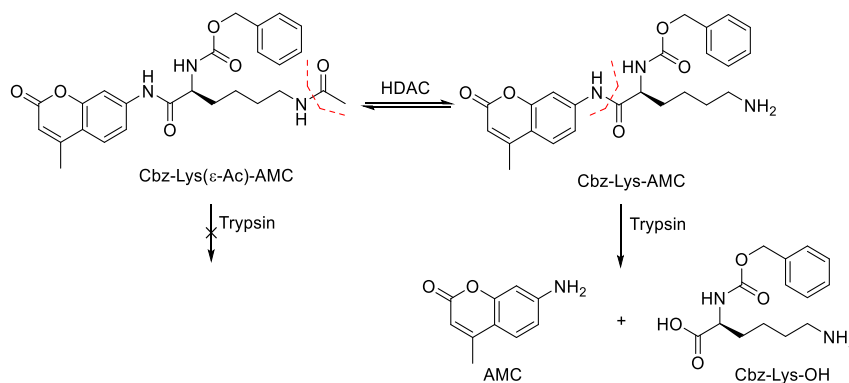


Abb. 4.6: Prinzip des zweistufigen fluoreszenzbasierten HDAC-Enzymassays.

Verbindung **1n**, **1o** und **1p** sowie die HDACi **2f*** und **2i***, die als Leitstrukturen dienten, wurden an den rekombinanten Enzymen HDAC1 und HDAC6 auf ihre Enzymhemmung getestet. Die Testergebnisse sind im Vergleich zu Vorinostat in Tab. 4.4 dargestellt.

Tab. 4.4: Inhibition der Enzymaktivität (HDAC) gegenüber HDAC1 und HDAC6.

Verbindung	R ¹	R ²	R ³ , R ⁴	HDAC IC ₅₀ [nM]	
				HDAC1	HDAC6
1n	<i>n</i> -Bu	4-Me ₂ N-Ph	H, H	306 ± 32	9 ± 1
1p	Bn	3,5-Me-Ph	H, H	423 ± 39	121 ± 13
1q	Bn	4-Me ₂ N-Ph	H, H	11 ± 5	11 ± 8
2f*	<i>c</i> -Hex	3,5-Me-Ph	H, H	346 ± 71	32 ± 6
2i*	<i>c</i> -Hex	4-Me ₂ N-Ph	H, H	43 ± 11	16 ± 4
Vorinostat				56 ± 9	49 ± 6

Die Werte entsprechen dem Durchschnitt aus drei Experimenten.³¹

³¹ In Publikation I wurde durch die Firma *Reaction Biology Corporation* (Malvern, PA, USA) ein abweichender HDAC-Enzymassay mit dem Substrat (Arg-His-Lys-Lys(Ac)-AMC) durchgeführt. Da die ermittelten IC_{50} -Werte für die HDAC-Inhibition vom Assay abhängig sind, weichen die hier angegebenen HDAC-Inhibitionswerte von **2f*** und **2i*** von denen in der Publikation I ab.

Im HDAC-Enzymassay konnte festgestellt werden, dass die getesteten Verbindungen eine stärkere Inhibition von HDAC6 zeigen im Vergleich zur Enzymhemmung von HDAC1. Somit haben die peptoidbasierten Hydroxamsäuren eine Präferenz für HDAC6. Eine Ausnahme bildet Verbindung **1q**, die vergleichbar hohe Aktivitäten gegenüber HDAC1 und HDAC6 aufweist und ähnlich wie die Referenzsubstanz Vorinostat (Pan-Inhibitor) keine Isoformpräferenz zeigt.

Anhand der Ergebnisse können weiterhin Aussagen zur Strukturaktivitätsbeziehung getroffen werden. So ist beim Austausch von Rest R² von 4-Dimethylaminophenyl gegen 3,5-Dimethylphenyl eine Reduzierung der Inhibition von HDAC1 zu beobachten (**1p**: IC₅₀ = 423 nM vs. **1q**: IC₅₀ = 11 nM; **2f**^{*}: IC₅₀ = 346 nM vs. **2i**^{*}: IC₅₀ = 43 nM). Während sich bei den Benzylderivaten zusätzlich auch eine Minderung der HDAC6-Aktivität zeigte (**1p**: IC₅₀ = 121 nM vs. **1q**: IC₅₀ = 11 nM), wurde diese bei den Cyclohexylderivaten erhalten (**2f**^{*}: IC₅₀ = 32 nM vs. **2i**^{*}: IC₅₀ = 16 nM).

Ein Vergleich der Verbindungen **1n**, **1q** und **2i**^{*} zeigt, dass ein 4-Dimethylaminophenylrest in Position R² zu sehr potenten HDAC6-Inhibitoren führt. Während dabei die HDAC6-Inhibition vergleichbar stark ist (**1n**: IC₅₀ = 9 nM; **1q**: IC₅₀ = 11 nM; **2i**^{*}: IC₅₀ = 16 nM), wird eine Minderung der HDAC1-Aktivität in Abhängigkeit vom Rest R¹ beobachtet. Dabei nimmt die HDAC1-Inhibition in der Reihenfolge vom Benzyl- (**1q**) über den Cyclohexyl- (**2i**^{*}) zum *n*-Butylrest (**1n**) ab. Folglich steigt in umgekehrter Reihenfolge auch die Selektivität für HDAC6.

Insgesamt zeigt die peptoidbasierte Hydroxamsäure **1n** die am stärksten ausgeprägte Subtypeselektivität für HDAC6. Im Vergleich zu HDAC1 weist **1n** eine 34fach höhere Aktivität für HDAC6 auf. Zusätzlich konnte für **1n** die stärkste HDAC6-Inhibition (IC₅₀ = 9 nM) beobachtet werden. Verbindung **1n** konnte somit als ein potenter und präferentieller HDAC6-Inhibitor identifiziert werden.

4.5 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

Basierend auf den Ergebnissen der biologischen Evaluation der peptoidbasierten präferentiellen HDAC6-Inhibitoren aus Kapitel 3 wurden ausgehend von den Strukturen der vielversprechendsten Hydroxamsäuren (**2f**^{*}, **2i**^{*}) weitere Derivate dieser Substanzklasse hergestellt. Weiterentwicklung der ursprünglichen zweistufigen Syntheseroute (U-4CR und Hydroxylaminolyse, Kapitel 3) zu der mikrowellenunterstützten 5-Komponenten-1-Topf-Variante erlaubte die Synthese der Verbindungen **1a-q** in erhöhten Ausbeuten und mit einer verbesserten Gesamteffizienz.

Bei Untersuchungen der Strukturaktivitätsbeziehungen der peptoidbasierten Hydroxamsäuren **1a-q** konnten Verbindungen identifiziert werden, die im Vergleich zu den Referenzsubstanzen Cisplatin und Vorinostat vergleichbare oder bessere zytotoxische Eigenschaften aufweisen. Hierbei zeigten die Verbindungen **1a-q** überwiegend bessere antitumorale Aktivitäten als die Vertreter der vorangegangenen Substanzbibliothek. Ferner weisen die peptoidbasierten Verbindungen eine starke Hemmung der HDAC-Aktivität im zellbasierten HDAC-Assay auf. **1n** und **1q** erwiesen sich als die beiden aktivsten Verbindung (Abb. 4.7).

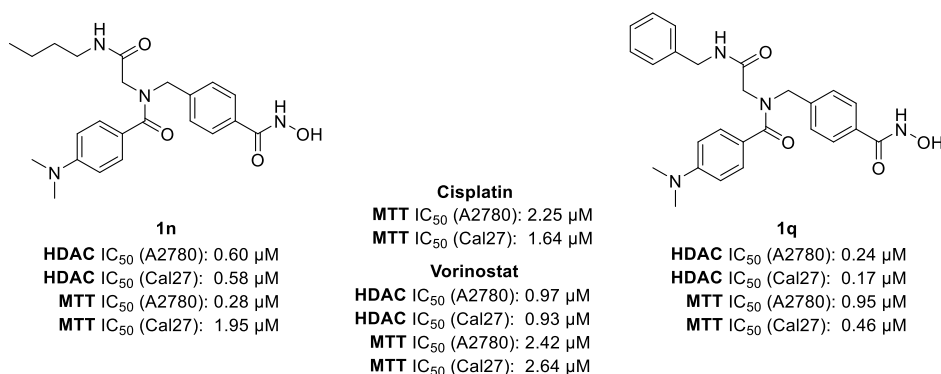


Abb. 4.7: Die potentesten Verbindungen im MTT-Test und im zellbasierten HDAC-Assay.

Weiterhin stellte sich die peptoidbasierte Hydroxamsäure **1n** als ein potenter und selektiver HDAC6-Inhibitor heraus (Abb. 4.8). Während Verbindung **2f*** aus Kapitel 3 mit einem Selektivitätsindex (SI 1/6) von 11 die stärkste Präferenz für HDAC6 vorwies (HDAC1: IC₅₀ = 346 nM; HDAC6: IC₅₀ = 32 nM), hat **1n** einen Selektivitätsindex von 34 und eine gesteigerte Aktivität gegenüber HDAC6 (HDAC1: IC₅₀ = 306 nM; HDAC6: IC₅₀ = 9 nM).

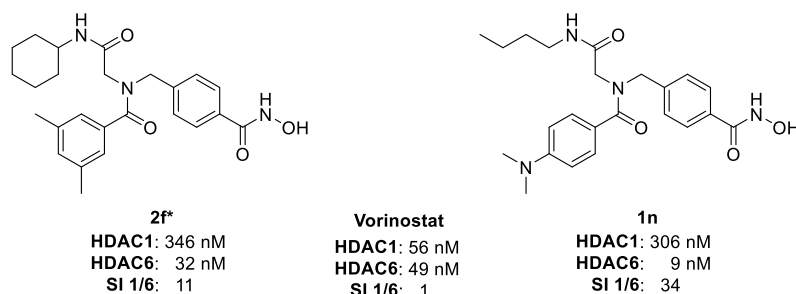


Abb. 4.8: Die selektivsten peptoidbasierte Hydroxamsäuren **2i*** (Kapitel 3) und **1n**.

Außerdem konnten Tendenzen zur Strukturaktivitätsbeziehung der hergestellten HDAC-Inhibitoren ableitet werden. So konnte durch Einführung einer Benzyl- oder *n*-Butylgruppe in R¹ eine Aktivitätszunahme sowohl bei der Zytotoxizität als auch bei der HDAC-

Inhibition beobachtet werden. Der Einsatz einer *n*-Butylgruppe erwies sich dabei zusätzlich als selektivitätssteigernd für die HDAC6-Hemmung. Flexiblere Reste (Bn, *n*-Bu) wirken sich an dieser Position positiv auf die zytotoxischen und inhibitorischen Eigenschaften der Verbindungen aus, während rigidere Reste (*t*-Bu) sich als weniger geeignet herausstellten. Bezogen auf den Substituenten an Position R² zeigten *para*-substituierte Phenylderivate einen Anstieg bei den Aktivitäten. Insbesondere peptoidbasierte Hydroxamsäuren mit 4-Dimethylaminophenylrest stellen potente Vertreter dieser Substanzklasse dar. Dahingegen führten zusätzliche Substituenten in Position R³ und R⁴ (**1j** und **1k**) zu einer Verminderung der HDAC-Inhibition und zu einem verringerten zytotoxischen Effekt.

Zusammenfassend handelt es sich bei den peptoidbasierten Hydroxamsäuren um eine vielversprechende neue Substanzklasse, die potente HDAC-Inhibitoren darstellen. In dieser Arbeit stellt insbesondere die peptoidbasierte Hydroxamsäure **1n** einen guten Ausgangspunkt dar, um weitere Strukturoptimierungen zur Steigerung der HDAC6-Selektivität durchzuführen und die pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften zu verbessern.

5 α -Aminoxypeptide als peptidomimetische Foldamere

In diesem Kapitel werden die Zielsetzung, Überlegungen zur Synthese und eine Zusammenfassung der Publikation II dargestellt. Alle Verbindungen, die aus der Publikation II stammen, sind analog nummeriert und mit einem ‡ markiert. Kapitel 10.2 beinhaltet die vollständige Veröffentlichung sowie eine Darlegung der beigetragenen Anteile des Autors zu der Publikation II.

5.1 Zielsetzung

Wie in Kapitel 1.3 beschrieben, stellen die unzureichende Bioverfügbarkeit und die geringe metabolische Stabilität wesentliche Nachteile dar, die Peptide zu weniger erfolgsversprechende Wirkstoffkandidaten machen. Bei der Anwendung von Peptiden als α -Helixmimetika, z.B. zur spezifischen Adressierung von Proteinen, kann sich insbesondere die hohe Rückgratflexibilität nachteilig auf die Bindungsaffinitäten zu einem biologischen Target auswirken. Bei der Entwicklung von peptidomimetischen Foldameren ist daher die Wahl einer rigideren Rückgratstruktur mit verbesserter Proteolysestabilität vorteilhaft. Basierend auf Arbeiten von *Yang* und Mitarbeiter^[161,164–167] wurden in diesem Projekt α -Aminoxypeptide (**1**‡) als Peptidanaloga für die Synthese peptidomimetischer Foldamere ausgewählt (Abb. 5.1). Homochirale α -Aminoxyoligomere können durch intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen, sogenannte α -NO-Turns, helikale Konformationen einnehmen, die bereits für kurze Dipeptidamide beobachtet wurden.^[164,165] Die α -Aminoxypeptide besitzen darüber hinaus eine bemerkenswerte Konformationsstabilität und weisen eine erhöhte metabolische Stabilität gegenüber enzymatischen Abbau auf.^[162,163] Diese Eigenschaften machen α -Aminoxypeptide zu einer vielversprechenden Substanzklasse für die Synthese von Foldameren.^[168,169] Die helikale Struktur konnte bisher nur für kurze Modelpeptide untersucht werden. Grund ist der eingeschränkte Zugang zu längeren α -Aminoxyoligopeptiden in Lösung, der auch eine mögliche pharmazeutische Anwendung der α -Aminoxypeptide erschwert.

Ziel dieses Projekts war die Entwicklung einer Synthesestrategie, die die Darstellung auch längerer α -Aminoxyoligopeptide in guter Ausbeute und Reinheit erlaubt. Dazu sollten Vertreter mit unterschiedlichen Längen und verschiedenen Seitenkettenmodifikationen dargestellt werden. Weiterhin sollten zwei verschiedene *N*-terminale *Caps* eingesetzt werden. Diese Strukturmodifikationen sollten erste Einblicke in die Strukturaktivitätsbeziehungen dieser Verbindungsklasse geben (Abb. 5.1).

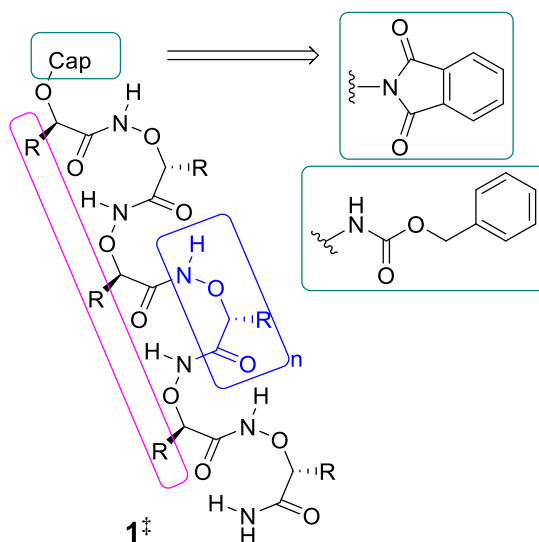


Abb. 5.1: Struktur der α -Aminoxypeptide **1** und geplante Modifikationen. Blau: unterschiedliche Länge der Oligomere; grün: Variationen der *N*-terminalen Cap; rot: verschiedene Seitenkettenmodifikationen.

Die Sekundärstruktur der α -Aminoxypeptide, die Orientierung der Seitenketten und die Frage, ob diese Substanzklasse geeignet ist, bestimmte Positionen auf bekannten, natürlichen helikalen Strukturen nachzuahmen, sollten durch die Zusammenarbeit mit kooperierenden Arbeitsgruppen aufgeklärt werden. Anhand von Kristallstrukturanalyse (*Dr. Höppner*, Proteinkristallographie und Röntgenstrukturanalyse und *Dr. Reiß*, Anorganische Chemie und Strukturchemie, Universität Düsseldorf) molekular-dynamischen (MD)-Simulationen (Arbeitskreis *Prof. Dr. Gohlke*, Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Universität Düsseldorf) sowie zweidimensionaler NMR-Spektroskopie und Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie (Arbeitskreis *Dr. Lüdeke*, Pharmazeutische Wissenschaften, Universität Freiburg) sollten die strukturellen Eigenschaften der α -Aminoxyligopeptide untersucht werden.

Abschließend sollten die synthetisierten α -Aminoxyligopeptide im Arbeitskreis von *Prof. Dr. Kassack* (Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Universität Düsseldorf) auf ihre Zytotoxizität in einem MTT-Assay *in vitro* untersucht werden. Um Einblicke in den Wirkmechanismus dieser Substanzklasse zu erhalten, sollten ausgewählte Testverbindungen zusätzlich auf ihrer membranschädigende Wirkung und eine mögliche Induktion der Apoptose hin untersucht werden.

5.2 Überlegungen zur Syntheseplanung

In der Literatur werden zum Aufbau von längeren α -Aminoxypeptiden oder α -Aminoxyhybridpeptiden³² unterschiedliche Methoden beschrieben. Die Synthese erfolgt dabei in Lösung^[165–167] oder durch Festphasensynthese^[163] (*solid phase synthesis*, SPS). Daneben sind Synthesestrategien bekannt, bei denen zuvor in Lösung synthetisierte Peptidfragmente, anschließend in Lösung oder an fester Phase verknüpft werden.^[170,171,196] Für die Amidknüpfungsreaktion werden verschiedene Kombinationen von Kupplungsreagenzien wie BOP-HOBt-NEM, HBTU-HOBt-NEM, DIC-HOAt,^[163] EDCI-HOBt,^[165,166,196] EDCI-HOAt,^[167,171] oder HBTU-HOBt-DIPEA,^[170] verwendet. Bei den beschriebenen Methoden sind dabei häufig lange Reaktionszeiten erforderlich, bei denen die Oligopeptide nur in geringen bis moderaten Ausbeuten erhalten werden. Durch den aziden Charakter des alkoxyamidgebundenen Protons der Aminoxygruppe wurde zudem die Bildung *N*-überacylierten Produkten beobachtet.^[197,198] Die *N*-überacetylierten Produkte treten insbesondere dann auf, wenn im Aktivierungssystem eine stärkere Base eingesetzt oder die Base im größeren Überschuss zugesetzt wird.^[198]

Bei der Synthese von α -Aminoxyoligopeptiden in Lösung sind viele Reinigungs- und Isolierungsschritte und verhältnismäßig lange Reaktionszeiten erforderlich. Die Auswirkungen einer langsamen Amidknüpfungsreaktion machen sich insbesondere bei sehr langen Peptidsequenzen bemerkbar, da diese in Lösung dazu neigen nur noch in sehr geringen Ausbeuten zu entstehen. Je länger die Peptidsequenzen werden und je komplexer die einzuführenden Seitenkettenreste dabei sind, desto aufwendiger und schwieriger werden die Synthese und Reinigung der Oligopeptide und es sind sehr lange Kupplungszeiten und ein erhöhter Materialaufwand notwendig. Hierbei kann insbesondere die Synthese längerer Peptidsequenzen mit sich wiederholenden aliphatischen Resten wie Alanin, Valin, Leucin oder Isoleucin schwierig sein.^[96,97] Sogenannte ‚*Difficult Peptides*‘ neigen dazu bei der Peptidsynthese Aggregate zu bilden, die über nichtkovalente Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb der Peptidsequenz stabilisiert werden.^[200,201]

Neben der Synthese in Lösung ist die festphasengebundene Peptidsynthese die wichtigste Methode auf chemischen Wege definierte Peptidsequenzen aufzubauen. Die erste SPS-

³² Hybridpeptide bestehen neben α -Aminoxysäuren noch aus weiteren peptidanalogen Synthesebausteinen und/oder natürlichen Aminosäuren.

Methode zur Synthese von α -Aminoxyoligopeptiden wurde von *Shin* und Mitarbeiter beschrieben.^[163] Der Aufbau der Oligopeptide erfolgte hierbei über Kupplung von monomeren α -Aminoxy-säuren. Es wurden dabei α -Aminoxypeptide bis zu einer Länge von Pentameren in Rohreinheiten von 40-65% synthetisiert. Die SPS-Methode bietet wesentliche Vorteile gegenüber der Synthese in Lösung. So können überschüssige Reagenzien und nicht gebundene Nebenprodukte einfach durch mehrmals wiederholte Waschschriffe vom Harz gewaschen werden. Eine orthogonale Schutzgruppenchemie der Seitenkettenfunktionalitäten sowie der C- und N-terminalen Enden der Aminosäureanaloge erlaubt dabei einen sequentiellen Aufbau des Zielmoleküls durch repetitive Entschützungs-, Wasch- und Kupplungsschriffe. Aufwändige Isolierungsschriffe von Zwischenstufen sind dabei nicht erforderlich. Die Kupplungsreagenzien werden dazu im Überschuss eingesetzt, um einen möglichst quantitativen Umsatz zur gewünschten Sequenz zu gewährleisten. Hierdurch kann die Wahrscheinlichkeit von Fehlsequenzen reduziert und eine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit erzielt werden. Die gewünschte Zielsequenz soll dabei in einer hohen Reinheit und in einer guten Ausbeute gewonnen werden. Zusätzlich ergibt sich durch die Möglichkeit der Automatisierung der Festphasenmethode und damit verbundenen eine Senkung des finanziellen Aufwandes ein weiterer Vorteil gegenüber der klassischen Synthese in Lösung.

Um eine Steigerung der Effizienz des Syntheseprozesses zu erreichen, sollte in diesem Projekt eine Synthesestrategie aus einer Kombination aus Synthese in Lösung und Festphasensynthese verfolgt werden. Dazu sollten zunächst in Lösung α -Aminoxydipeptide hergestellt werden. Im Anschluss sollten die Dimere dann an fester Phase zu den α -Aminoxyoligopeptiden gewünschter Länge verknüpft werden. Durch die Wahl von α -Aminoxydipeptiden als Kupplungseinheit wird dabei die Anzahl der Reaktionsschriffe halbiert und damit die Synthesezeit verkürzt. Um die Wahrscheinlichkeit der N-Überacylierung, die mit steigender Basizität der Reaktionslösung zunimmt, niedrig zu halten, sollte außerdem ein möglichst geringer Anteil an Aktivierungsbase eingesetzt werden. Diese Maßnahmen sollten die Synthese längerer Oligomere in guten Ausbeuten und hohen Reinheiten ermöglichen.

5.3 Zusammenfassung der Publikation II

In der Publikation II werden die Synthese, das Faltungsverhalten und die biologische Aktivität von α -Aminoxyoligopeptiden vorgestellt. Basierend auf Arbeiten von *Yang* und

Mitarbeitern in denen gezeigt werden konnte, dass α -Aminoxypeptide über Wasserstoffbrückenbindungen rigide helikale Sekundärstrukturen ausbilden können und eine erhöhte Stabilität gegenüber enzymatischen Abbau vorweisen, wurden α -Aminoxypeptide als geeignete Kandidaten für die Entwicklung peptidomimetischer Foldamere gewählt.

Um einen verbesserten Zugang auch zu längeren Oligopeptiden zu erhalten, wurde eine Synthesestrategie verfolgt, die sowohl Reaktionsschritte in Lösung als auch festphasengebundene Peptidsynthese beinhaltet. Ausgehend von L- α -Aminosäuren wurden zunächst in Lösung die korrespondierenden D- α -Aminoxysäuren nach literaturbekannten Vorschriften synthetisiert, die daraufhin über eine Amidkupplungsreaktion mittels EDC·HCl/HOBt zu α -Aminoxydipeptidsäuren verknüpft wurden. Anschließend erfolgte durch Festphasensynthese mit den Dimeren und den Kupplungsreagenziensystem BOP/HOBt/NEM die Synthese der Oligopeptide. Anhand dieser Methode, bestehend aus einer Kombination aus Chemie in Lösung und Festphasensynthese, konnten auch längere α -Aminoxyoligopeptide in guter Ausbeute und hoher Reinheit synthetisiert werden.

Untersuchungen der Zytotoxizität im MTT-Assay gegenüber Tumorzelllinien und normalen Zellen zeigten, dass insbesondere die α -Aminoxydecapeptide eine bemerkenswerte Antitumoraktivität vorweisen und die potentesten Vertreter dieser Substanzklasse darstellen. Hierbei konnte eine moderate Selektivität der Verbindungen für Tumorzellen im Vergleich zu gesunden Zellen festgestellt werden.

Anhand der Kristallstruktur eines α -Aminoxyhexapeptids sowie mittels Molekularer Modellierung, 2D NMR-Spektroskopie, molekulardynamischer (MD) Simulationen und CD-Spektroskopie konnte die Konformation der α -Aminoxypeptide aufgeklärt werden. Bei den α -Aminoxypeptide liegt sowohl im Festkörper als auch in organischen Lösungsmitteln eine rechtshändige 2_8 -Helix als bevorzugte Konformation vor. Im wässrigen Milieu hingegen konnte ein pH-Wert abhängiges Gleichgewicht zwischen der 2_8 -Helix im sauren pH-Bereich und einer weiteren Konformation beobachtet werden. Molekulare Modellierungen zeigten zudem, dass α -Aminoxypeptide die Orientierung von Seitenketten von kanonischen α -Helices und 3_{10} -Helices nachahmen können.

Um den Wirkmechanismus der α -Aminoxypeptide zu untersuchen, wurden ausgewählte Verbindungen auf ihre membranschädigende Wirkung und auf ihre Fähigkeit zur Apoptoseinduktion getestet. Unterstützend dazu wurden CD-spektroskopische Untersuchungen in Gegenwart von Liposomen durchgeführt. Hierbei konnte gezeigt werden,

dass α -Aminoxydecapeptide eine höhere Faltungstendenz vorweisen eine 2_8 -helikale Konformation anzunehmen. Die Faltung in die 2_8 -Helix in einer Membranumgebung kann somit als mögliche Ursache für die beobachtete membranolytische Aktivität dieser Verbindungen herangezogen werden.

Zusammenfassend wurden Einblicke in die Synthese, Struktureigenschaften und biologische Aktivität von α -Aminoxypeptiden gegeben, die eine neuartige Klasse peptidomimetischer Foldamere darstellen. Die als bevorzugte Konformation identifizierte rechtsgängige 2_8 -Helix ist dabei in der Lage die räumliche Anordnung der Seitenketten von α -Helices und 3_{10} -Helices nachzuahmen. Einige Verbindungen zeigten bemerkenswerte Zytotoxizitäten gegenüber Tumorzelllinien und einen geringeren zytotoxischen Effekt auf gesunde Zellen. CD-spektroskopische Untersuchungen in Gegenwart von Liposomen ergaben, dass längere α -Aminoxyoligopeptide ein erhöhtes Faltungsvermögen für die 2_8 -Helix vorweisen und dass diese Konformation membran-schädigende Effekte hervorrufen könnte, die für diese Verbindungen beobachtet wurden. Aufgrund dieser neuen Erkenntnisse repräsentieren α -Aminoxyoligopeptide eine wertvolle Substanzklasse für die Entwicklung von Strukturmetika mit potentieller Anwendung als Inhibitoren von Protein-Protein-Interaktionen oder als antitumoraktive Foldamere, die Analoga von ACPs darstellen.

6 α -Aminoxypeptide als C-terminale HSP90-Inhibitoren

In diesem Kapitel werden die theoretischen Grundlagen, die Zielsetzung und eine Zusammenfassung der Publikation III dargestellt. Alle Verbindungen, die aus der Publikation III stammen, sind analog nummeriert und mit einem # markiert. Kapitel 10.3 beinhaltet die vollständige Veröffentlichung sowie eine Darlegung der beigetragenen Anteile des Autors zu der Publikation III.

Im vorangegangenen Kapitel 5 (Publikation II) wurden α -Aminoxyoligopeptide als neue Klasse peptidomimetischer Foldamere identifiziert. Als bevorzugte Konformation ergab sich dabei eine rechtsgängige 2_8 -Helix, die in der Lage ist, die räumliche Orientierung der Seitenketten von α -Helices und 3_{10} -Helices nachzuahmen. α -Aminoxyoligopeptide stellen daher eine interessante Substanzklasse für die Entwicklung von Strukturmimetika als PPI-Inhibitoren dar. Ein attraktives Ziel für der Entwicklung von Tumorthapeutika ist die C-terminale Dimerisierungsdomäne des Hitze-Shock-Proteins 90 (HSP90). Daher sollten α -Aminoxypeptide als potente Helixmimetika herangezogen und deren Einsatz als Inhibitoren der Dimerisierung von HSP90 untersucht werden.

6.1 Hitze-Shock-Protein 90 (HSP90)

Die Hitze-Schock-Proteine (*heat shock proteins*, HSPs) gehören zu einer großen Proteinfamilie von evolutionär hochkonservierten molekularen Chaperonen. Die Hauptaufgabe der HSPs besteht darin, andere Proteine, sogenannte Klientproteine, bei der korrekten Faltung zu unterstützen und sie in ihre funktionelle Konformation zu überführen.^[202] Dadurch sind sie an vielen zellulären Prozessen wie Proliferation, Differenzierung und Progression beteiligt. HSPs sind dabei für die Stabilisierung der Klientproteine verantwortlich und verhindern eine Aggregation fehlerhaft gefalteter Proteine. Sie schützen so die Zellen vor dem daraus resultierenden intrazellulären Stress. Eine weitere Funktion der Hitze-Schock-Proteine besteht im Transport von Proteinen durch die Zellmembran ins Innere der Zellen.^[203] Für den Transport müssen die Proteine als lange, unpolare Peptidketten vorliegen und anschließend in ihre native Konformation zurückgefaltet werden, um ihre Funktion aufzunehmen.^[204]

In der Familie der HSPs ist das 90 kDa große Hitze-Schock-Protein (HSP90) eines der bekanntesten Proteine. Es hat eine wesentliche Funktion bei der Proteinfaltung und reguliert wie bereits erwähnt die Struktur, Stabilität und Funktion von mehr als 300 Klientproteinen.^[205,206] Unter diesen Proteinen befinden sich Kinasen, Steroidhormonrezeptoren und Transkriptionsfaktoren, die Prozesse wie Proliferation, Signaltransduktion, Proteintransport, Chromatinremodelling und das Zellüberleben steuern.^[11,207-210] Diese Klientproteine sind in Tumorzellen häufig mutiert und/oder überexprimiert. Bis zu 25% der HSP90-abhängigen Klientproteine stellen hierbei Onkoproteine dar, die in tumorassoziierte Prozesse wie Angiogenese, Metastasierung und unkontrolliertes Zellwachstum involviert sind.^[9,210] Zusätzlich liegt HSP90 in vielen Tumorarten überexprimiert vor. Es kann so Onkoproteine stabilisieren und sie vor Stress schützen.^[10,209] HSP90 trägt dadurch zur Proliferation und zum Überleben von Tumorzellen bei. Es ist daher von großem therapeutischem Interesse und bietet vielversprechende Strategien zur Behandlung von Tumorerkrankungen.^[8-11,209,211]

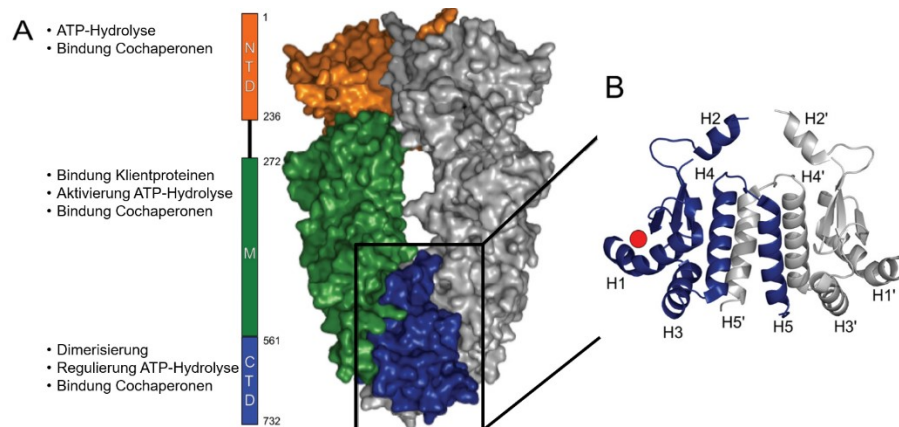


Abb. 6.1: HSP90-Aufbau. (A) Einteilung der Domänen und ihre Funktion; (B) Darstellung des *four helix bundle* über das die Dimerisierung von HSP90 erfolgt (Modifiziert nach ^[212]).

HSP90 ist ein flexibles Homodimer und macht 1-2% der Gesamtproteinmenge in einer normalen Zelle aus.^[8,208] Die Monomereinheiten lassen sich in drei funktionelle Untereinheiten einteilen (Abb. 6.1 A).^[213] An der N-terminale Domäne (NTD) erfolgt die Bindung sowie Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP), die für die Aktivität des Chaperons erforderlich sind. Die C-terminale Domäne (CTD) vermittelt die Dimerisierung von HSP90. An der Dimerisierung sind dabei jeweils zwei α -Helices der beiden Monomere beteiligt, die zusammen ein Bündel aus vier Helices (*four helix bundle*) bilden (Abb. 6.1 B).^[213,214] Zudem werden über den C-Terminus die Aktivität der ATPase und die Anlagerung von Cochaperonen reguliert. Verbunden sind die beiden endständigen Domänen über eine Mitteldomäne (M), welche wesentlich an der

Erkennung von Klientproteinen und der ATP-Hydrolyse beteiligt ist. Für die Chaperonaktivität von HSP90 ist die Bindung und Hydrolyse von ATP essentiell.^[215] Bei der Proteinfaltung werden so erforderliche Konformationsänderungen des Chaperons ermöglicht. Zunächst findet dabei die Anlagerung eines ungefalteten Proteins in die geöffnete Form des Dimers statt (Abb. 6.2). Anschließend binden zwei Moleküle ATP an die ATP-Bindestellen am *N*-Terminus von HSP90. Es kommt zu einer Konformationsänderung, bei der sich die Enden der *N*-Termini annähern und das Klientprotein im Inneren des Chaperons eingeschlossen wird. In der metastabilen, verdrillten Konformation erfolgt nun im Bereich der Mitteldomäne die Proteinfaltung. Zudem kommt es zur ATP-Hydrolyse. Durch die Abspaltung des γ -Phosphats von ATP zu ADP, öffnet sich HSP90 wieder und das fertig gefaltete Protein wird freigesetzt. Nach Abspaltung von ADP nimmt das HSP90-Homodimer wieder die ursprüngliche, geöffnete Konformation ein und steht für einen weiteren Proteinfaltungszyklus zur Verfügung. Zunächst wurde angenommen, dass die CTD permanent dimerisiert vorliegt und der Mechanismus so vergleichbar ist mit einer sich öffnen und schließenden Klammer.^[213] *Ratzke* und Mitarbeiter zeigten jedoch, dass sich die CTD ebenfalls öffnet und schließt.^[216] Das Dimer bewegt sich somit in einem Gleichgewicht zwischen C- und N-terminaler Dimerisierung (Abb. 6.2 links). Schließt sich ein Terminus, öffnet sich im Gegenzug der andere. Die Zustände werden dabei im Wesentlichen durch die Anwesenheit von ATP und ADP bestimmt. Durch diese Erkenntnisse eröffnen sich neue mechanistische Aspekte der Chaperonaktivität, die Strategien zur Inhibierung der HSP90-Funktion ermöglichen.

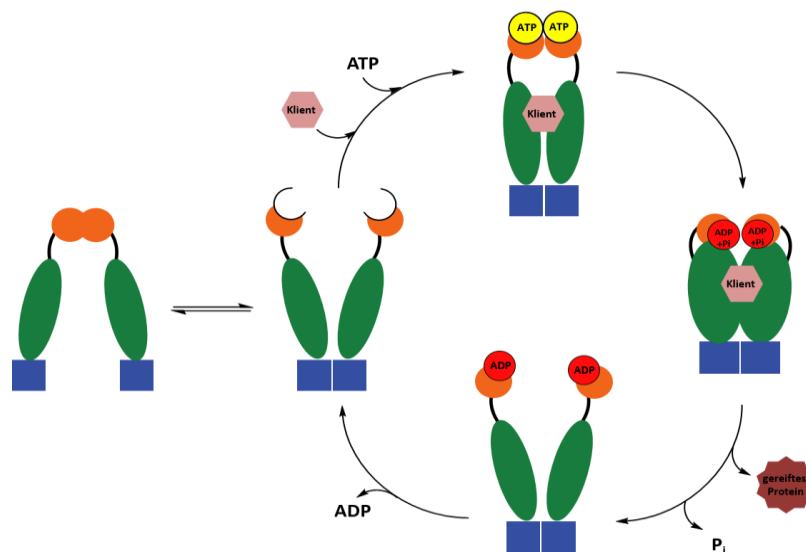


Abb. 6.2: Schematische Darstellung der HSP90-Proteinfaltung (*modifiziert nach* ^[11,216]). Die einzelnen Domänen sind wie folgt dargestellt: NTD (orange), MD (grün) und CTD (blau).

6.2 HSP90-Inhibitoren (HSP90i)

Eine Inhibition von HSP90 kann auf unterschiedliche Weise positiv genutzt werden. So bietet die HSP90-Überexpression in Tumorzellen einen möglichen Ansatzpunkt. Tumorzellen sind im Vergleich zu normalen Zellen sensitiver gegenüber HSP90-Inhibitoren und können so gezielter angegriffen werden.^[217] Durch die Inhibition von HSP90 werden Klientproteine nicht mehr in ihre funktionelle Konformation gefaltet und es kommt zur Degradierung. Die Aktivität HSP90-abhängiger Onkoproteine wird gehemmt und tumorassoziierte Prozesse werden unterbrochen, so dass das Tumorstadium nicht aufrechterhalten werden kann und die Apoptose ausgelöst wird. Eine andere Möglichkeit besteht im Nutzen von Synergien von HSP90i und anderen Chemotherapeutika.^[218,219] Durch die Behandlung mit Zytostatika werden Tumorzellen vorsätzlich einem erhöhten Maß an zellulären Stress ausgesetzt. Um die Zellen vor Stress zu schützen, wird vermehrt HSP90 exprimiert. Dies kann die Wirkung von Zytostatika verringern und zu Arzneimittelresistenzen führen.^[219] Durch die Inhibition von HSP90, kann die Wirksamkeit der Zytostatika aufrechterhalten werden. HSP90-Inhibitoren bieten daher potentielle Ansätze für die Tumorthherapie. Die Funktion von HSP90 kann dabei über die *N*-terminale oder über die *C*-terminale Domäne inhibiert werden.

6.2.1 *N*-terminale HSP90-Inhibitoren (NTD HSP90i)

Zu den ersten HSP90-Inhibitoren zählen die Naturstoffe Geldanamycin (GM) und Radicol (RD) (Abb. 6.3). Kristallstrukturanalysen zeigten, dass diese Naturstoffe als kompetitive Inhibitoren der ATP-Bindungstasche der *N*-terminalen Domäne von HSP90 agieren.^[220] Beide Inhibitoren weisen jedoch ein ungünstiges Nebenwirkungspotential und eine unzureichende Wasserlöslichkeit auf und konnten sich aus diesen Gründen nicht als Arzneimittelkandidaten durchsetzen. Um die pharmakologischen Eigenschaften von Geldanamycin zu verbessern, wurden weitere Derivate dieses Typs entwickelt (Abb. 6.3 A).^[221] 17-*N*-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) wurde hierbei als erster HSP90i in der Klinik getestet und wies eine vergleichbare HSP90-Inhibition auf wie GM.^[222] Die Affinität von 17-AAG für HSP90 war dabei in Tumorzellen 100-fach höher als in gesunden Zellen.^[217] Aufgrund starker Hepatotoxizitäten benzochinon-basierter Inhibitoren wurden klinische Studien mit GM und verwandten Derivaten jedoch eingestellt.^[113] Basierend auf Cokristallstrukturen von HSP90 mit GM, RD und ADP wurden Resorcin und Purin als alternative Strukturelemente für HSP90i identifiziert und resorcin- (Abb. 6.3 B) und purinbasierte (Abb. 6.3 C) HSP90i entwickelt.^[224,225]

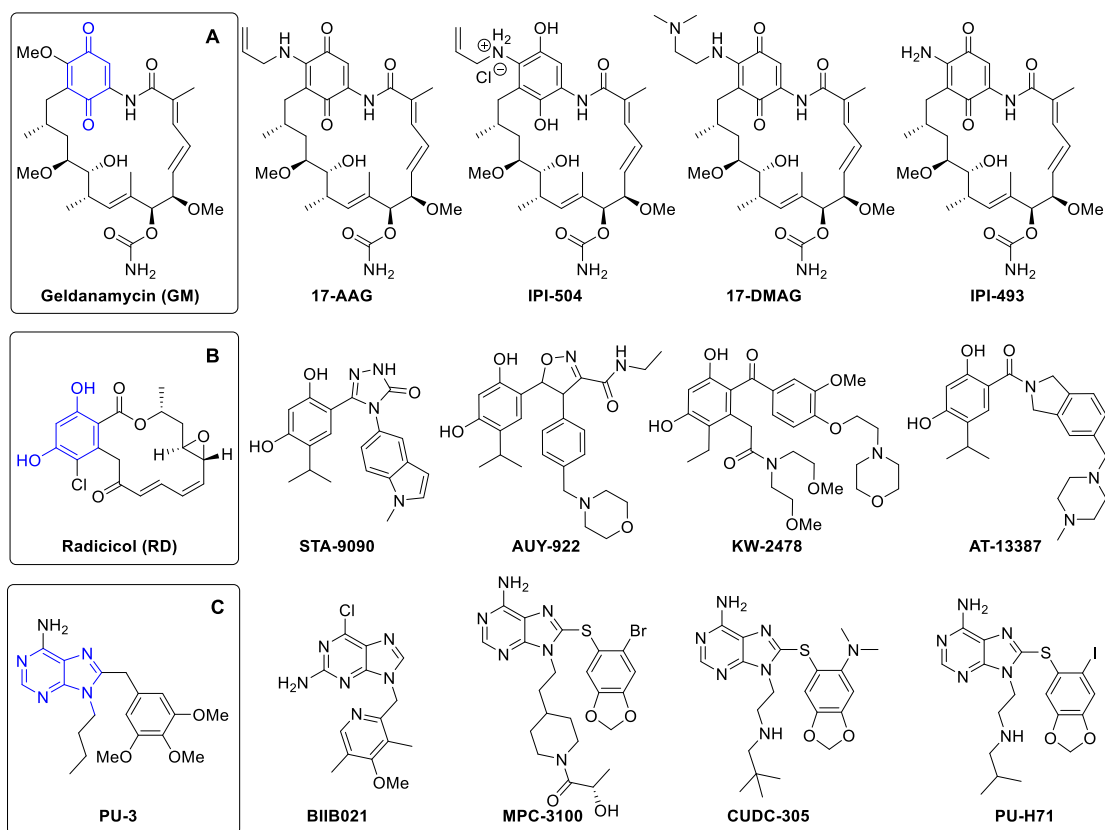


Abb. 6.3: *N*-terminale HSP90-Inhibitoren. (A) Geldanamycin und Benzochinonderivate; (B) Radicol und Resorcinderivate und (C) PU-3 und purinbasierte Analoga.

Obwohl bislang siebzehn HSP90i in klinischen Studien getestet wurden, hat bisher kein Inhibitor eine Zulassung durch die FDA oder EMA erhalten.^[206,226] Die aktuell in Studien getesteten HSP90i binden alle an die *N*-terminale ATP-Bindetasche und weisen höhere Affinitäten auf als das natürliche Nukleotid.^[9,218] Da ATP in Zellen weit verbreitet ist, weisen gegen ATP-Bindungstaschen gerichtete Inhibitoren häufig unerwünschte Wirkungen auf. Zudem lösen sie einen Resistenzmechanismus in Tumorzellen aus, der als Hitze-Shock-Antwort (*heat shock response*, HSR) bezeichnet wird.^[8,9,227] Dieser Überlebensmechanismus wird als Antwort auf eine *N*-terminale HSP90-Inhibition induziert, wodurch andere Hitze-Schock-Proteine (z.B. HSP70, HSP40 und HSP27) vermehrt exprimiert werden, um das Überleben der Zelle zu sichern.^[228,229] Dadurch wird die Wirksamkeit von HSP90i stark vermindert. Die unzureichende Selektivität sowie die Induktion von HSR sind wesentliche Gründe für das Fehlschlagen von NTD HSP90-Inhibitoren in fortgeschrittenen klinischen Studien.^[8] Eine Herausforderung in der Forschung ist die Entwicklung verbesserter HSP90i. *C*-terminale HSP90-Inhibitoren sind hierbei von besonderem Interesse.^[8,222,229,230] Anders als NTD HSP90i induzieren sie keine HSR.^[231,232]

6.2.2 C-terminale HSP90-Inhibitoren (CTD HSP90i)

Im Jahr 2000 entdeckten *Neckers* und Mitarbeiter mit dem Cumarinantibiotikum Novobiocin³³ (NB, Abb. 6.4) den ersten C-terminalen Inhibitor, der gegenüber SKBr3-Zellen³⁴ eine schwache antiproliferative Aktivität (700 μ M) durch HSP90-Inhibition zeigte.^[233,234] Im Gegensatz zu bisherigen Inhibitoren, bindet Novobiocin an die ATP-Bindestelle der CTD von HSP90. Zudem konnte gezeigt werden, dass NB an eine Domäne von HSP90 bindet, die für die Dimerisierung und die Bindung von Cochaperonen entscheidend ist.^[234] Um die Aktivität von Novobiocin zu verbessern wurden die Strukturaktivitätsbeziehungen umfangreich untersucht und NB-Derivate mit erhöhter antiproliferative Aktivität gegenüber Tumorzellen entwickelt (Abb. 6.4, DHN1 und DHN2).^[235] Neben dem Cumarinkern enthält Novobiocin als weitere Strukturen den Zucker Noviose und eine Benzamidseitenkette. SAR-Untersuchungen zu diesen Strukturelementen ergaben, dass zyklische und azyklische Azaanaloga wie Methylpiperidin (NA1) und Dimethylpropylamin (NA2) anstelle der Noviose,^[236,237] Biphenyl- (KU-820), Stilben- (KU-4) und Phenylcyclohexylsurrogate (KU-15a) für den Cumarinkern^[238–240] und 2-Indol- (KU-46) sowie Biarylringssysteme mit Methoxyresten (KU-33)^[241] als alternative Strukturen für das Benzamid eingesetzt werden können. Dabei konnten wirksame Inhibitoren entwickelt werden (Abb. 6.4). Neben Novobiocin und verwandten Analoga stellen das Chroman Epigallocatechingallat (EGCG),^[242] das Flavanonol Silybin,^[243] das Taxan Taxol^[244] und Cisplatin^[245,246] weitere C-terminale HSP90i dar (Abb. 6.5). Einige Derivate dieser Verbindungen sind hierbei potente HSP90-Inhibitoren.^[243,247,248]

³³ Novobiocin gehört ursprünglich zur Wirkstoffklasse der Aminocumarin-Antibiotika, die durch Inhibition der bakteriellen DNA Gyrase die Zellteilung von Bakterien hemmen.

³⁴ Östrogenrezeptor negative (estrogen receptor negative, ER-) Brusttumorzelllinie, in der der Wachstumsfaktor HER2 (*human epidermal growth factor receptor positiv*, HER2+) überexprimiert vorliegt. Diese Rezeptoren stellen HSP90-anhängige Klientproteine dar und können durch HSP90i herunterreguliert werden.

6 α -Aminoxypeptide als C-terminale HSP90-Inhibitoren

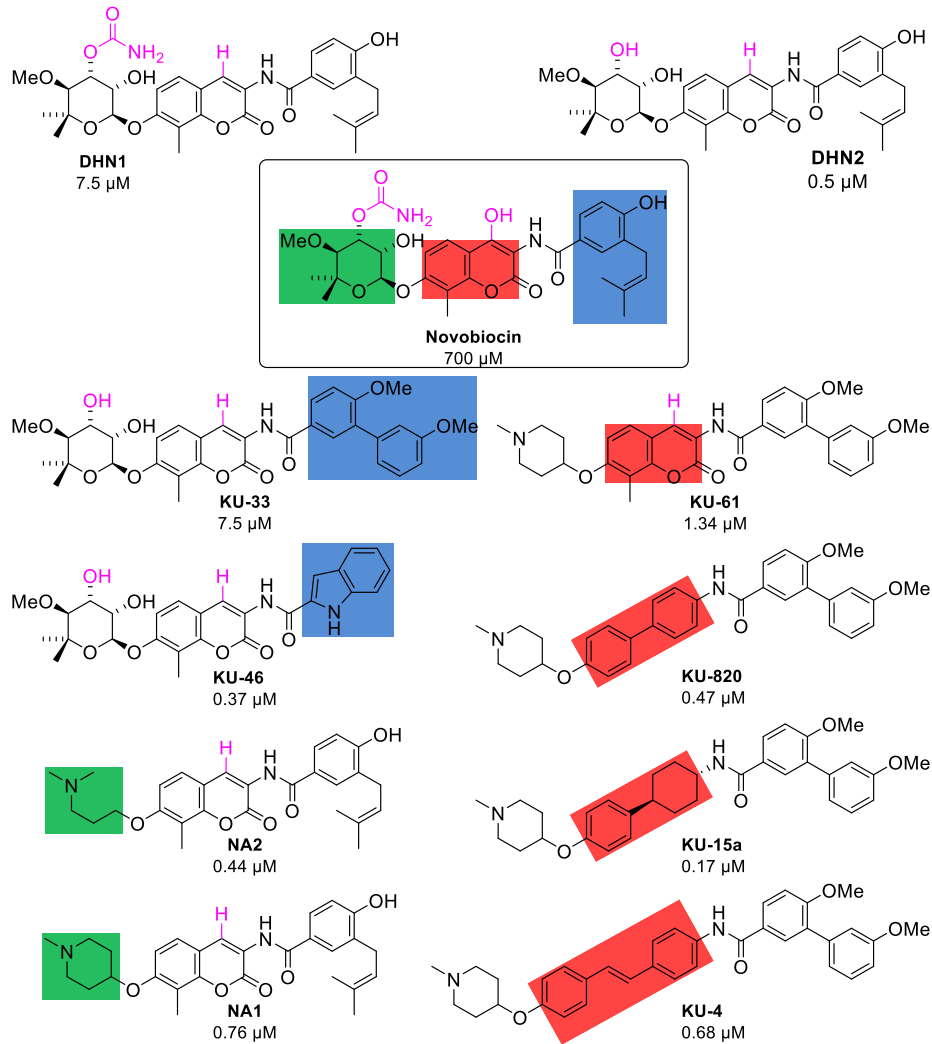


Abb. 6.4: C-terminale HSP90-Inhibitor Novobiocin und Derivate sowie deren antiproliferativen Aktivitäten gegenüber der Brusttumorzelllinie SKBr3 (IC_{50}).

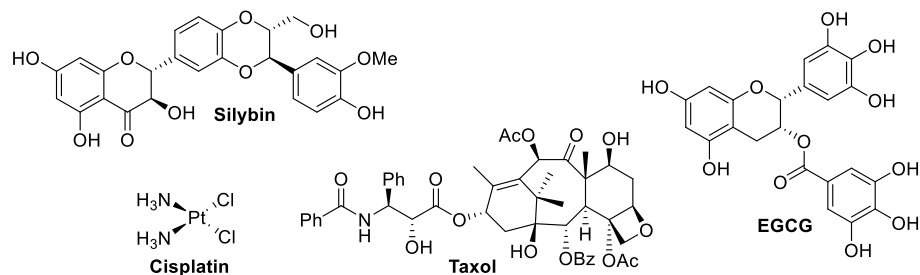


Abb. 6.5: Weitere C-terminale HSP90-Inhibitoren.

Anders als NTD HSP90i induzieren C-terminale HSP90-Inhibitoren keine HSR.^[232] Sie stehen somit nicht mit einer erhöhten Expression weiterer Hitze-Schock-Proteine in Zusammenhang. CTD-Inhibitoren bieten daher einen verbesserten Ansatz um HSP90 selektiv zu inhibieren, ohne dabei Signalwege der HSR-Maschinerie zu beeinflussen. Bisher konnte jedoch noch kein CTD HSP90i eine klinische Studie erreichen. Zudem

wurde für keinen CTD HSP90i berichtet, dass er die Protein-Protein-Interaktion der C-terminalen Dimerisierung von HSP90 adressiert. Gohlke und Groth zeigten, dass Proteininteraktionen innerhalb der *four helix bundle* im Endbereich der CTD von HSP90 essentiell für die Dimerisierung des Proteins sind und somit unerlässlich für dessen Chaperonaktivität. Die Forscher identifizierten *hot spot* Aminosäuren (I688, Y689, I692, L696) in der Interaktionsfläche der CTD, die für die Entwicklung von HSP90-Modulatoren herangezogen werden können (Abb. 6.7).^[249] Zusammen mit Jose und Mitarbeitern entwickelten sie Peptide, die in der Lage sind, die Helix H5 in der CTD von HSP90 nachzuahmen.^[250] Die peptidischen Inhibitoren adressieren dabei HSP90 vermutlich über die Protein-Protein-Interaktion der Dimerisierung in der CTD. Anhand eines Dimerisierungsassays basierend auf der Autodisplaytechnologie konnte eine HSP90-inhibierende Aktivität der Peptide *in vitro* nachgewiesen werden. Durch MicroScale Thermophorese (MST)-Messungen konnte zudem für die peptidischen Inhibitoren eine Affinität gegenüber der CTD von HSP90 im mikromolaren Bereich beobachtet werden. Wesentliche Nachteile der Peptiden schränken deren Einsatz als Arzneimittelkandidaten jedoch stark ein, so dass diese Inhibitoren für eine biologische Anwendung weiter optimiert werden müssen. Die Entwicklung von peptidomimetischen HSP90-Inhibitoren, die die CTD Dimerisierungsdomäne durch die Nachahmung von *hot spot* Aminosäuren adressieren und so auf der Ebene von Protein-Protein-Interaktionen agieren, bietet einen neuen vielversprechenden Ansatz, um die Chaperonaktivität von HSP90 zu hemmen, ohne dabei die HSR-Maschinerie zu beeinflussen.

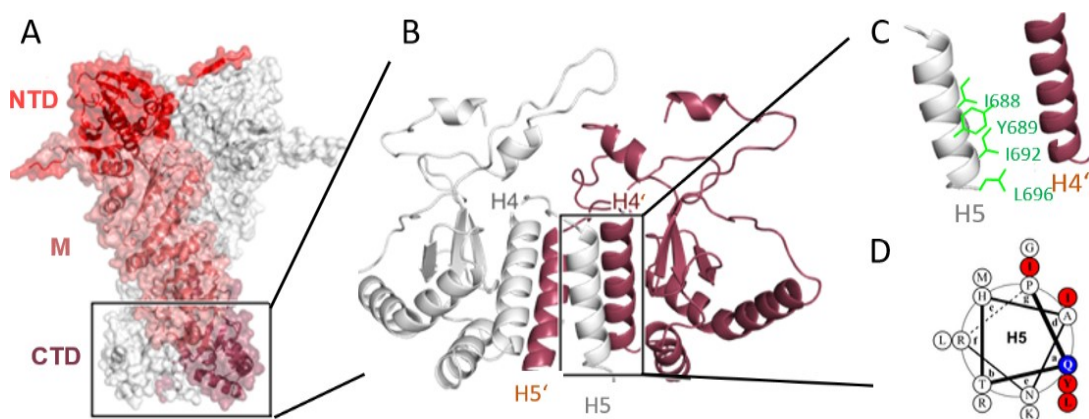


Abb. 6.6: *hot spots* und *cold spots*. (A) Homologiemodell von HSP90. (B) Vergrößerung der CTD; (C) Detailansicht der Interaktion zwischen Helix H5 und H4' und *hot spots* (grün) auf der Helix H5; (D) Darstellung der Helix H5 als Helixrad und Position der *hot spots* (rot) und *cold spots* (blau).

Im Anschluss an die Synthese sollte in Zusammenarbeit mit weiteren Arbeitsgruppen die Sekundärstruktur der synthetisierten α -Aminoxyhexapeptide aufgeklärt werden. Um zu prüfen, ob die Verbindungen die erforderliche Sekundärstruktur einnehmen, sollten durch CD-Spektroskopie (AK *Lüdeke*, Pharmazeutische Wissenschaften, Universität Freiburg) und NMR-Spektroskopie die strukturellen Eigenschaften der α -Aminoxyhexapeptide aufgeklärt werden. Im Arbeitskreis *Gohlke* (Medizinische und Pharmazeutische Chemie, Universität Düsseldorf) sollte zudem der Bindungsmechanismus untersucht werden. Durch MD-Simulationen und Berechnungen der effektiven Bindungsenergie sollte eine mögliche CTD-Bindung ermittelt werden.

Weiterhin sollten die Zielverbindungen in den Arbeitskreisen *Hauer* und *Remke* (Klinik für Kinderonkologie, Hämatologie und klinische Immunologie, Universität Düsseldorf), *Jose* (Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Uni Münster), *Grez* (Institut für Tumorbiologie und Experimentelle Therapie, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt) und *Kassack* (Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Düsseldorf) ausführlich auf ihre biologischen Eigenschaften hin evaluiert werden. Dazu sollten die α -Aminoxyhexapeptide auf ihre Zytotoxizität und auf ihre Inhibition der HSP90-Aktivität *in vitro* und *in vivo* untersucht werden. Darüber hinaus sollten die Verbindungen auf ihre spezifische Bindung an die CTD hin getestet werden.

6.4 Zusammenfassung der Publikation III

In der Publikation III werden neue, vielversprechende peptidomimetische Inhibitoren vorgestellt, die die C-terminale Dimerisierungsdomäne (CTD) des Chaperonproteins HSP90 adressieren. Für das rationale Design der Helixmimetika wurden die von *Gohlke* und *Groth* identifizierten *hot spot* Aminosäuren in der Interaktionsfläche der C-terminalen Dimerisierungsdomäne von HSP90 herangezogen.^[249] Basierend auf den Erkenntnissen, dass α -Aminoxyoligopeptide eine 2_8 -helikale Konformation einnehmen und in der Lage sind, die räumliche Orientierung der Seitenketten von α -Helices nachzuahmen, wurden zwei α -Aminoxyhexapeptide entwickelt, die entsprechende Seitenkettenreste der wechselwirkenden *hot spot* Aminosäuren tragen.

Die Synthese der gewünschten α -Aminoxyhexapeptide erfolgte über die zuvor entwickelte Synthesestrategie bestehend aus einer Kombination aus Reaktionsschritten in Lösung und Festphasensynthese. Zunächst wurden dazu in Lösung Monomer- und Dimerbausteine hergestellt. Diese wurden dann durch Festphasensynthese mit den Kupplungsreagenzien BOP/HOBt/NEM zu den α -Aminoxyhexapeptide verknüpft.

2D NMR- und CD-spektroskopische Untersuchungen ergaben, dass die α -Aminoxyhexapeptide in die gewünschte 2_8 -helikale Konformation falten. Die Verbindungen sollten so in der Lage sein, die erforderliche Sekundärstruktur einzunehmen und die Orientierung der *hot spots* für die Inhibierung der HSP90-Dimerisierung zu imitieren.

Einblicke in den Bindungsmechanismus der Verbindungen wurden durch molekulardynamische (MD)-Simulationen und Berechnungen der effektiven Bindungsenergie erhalten. Hierbei wurde beobachtet, dass die α -Aminoxyhexapeptide an die CTD binden und dass sie die *hot spots* der Helix H5 von HSP90 nachahmen können.

Weiterhin wurden die biologischen Eigenschaften der α -Aminoxyhexapeptide ausführlich untersucht. In einem zellbasierten Luciferase-Rückfaltungs-Assay zeigten die Verbindungen dabei *in vitro* eine Inhibition von HSP90. In einem Dimerisierungsassays basierend auf der Autodisplay-Technologie konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Verbindungen die HSP90-Dimerisierung inhibieren können. Bei MicroScale Thermophorese (MST)-Messungen mit der CTD von HSP90 konnte zudem eine Bindung an die C-terminalen Domäne beobachtet werden. Tiefergehende biologische Untersuchungen wurden mit der effizienteren Verbindung (bezeichnet als Aminoxyron) durchgeführt. Aminoxyron zeigte hierbei eine antiproliferative und zytotoxische Aktivität gegenüber humanen myeloischen Leukämiezelllinien und induzierte einen Zellzyklusarrest und eine frühe Differenzierung. Es konnten dabei sowohl in sensitiven als auch in imatinibresistenten CML-Zelllinien vergleichbare Aktivitäten beobachtet werden. Zusätzlich konnte in einer Luciferase-Xenograft Mausmodellstudie mit der humanen CML-Zelllinie K562 die *in vivo* Effizienz der Verbindung bestätigt werden. Aminoxyron löst dabei *in vitro* und *in vivo* keine HSR aus.

Zusammenfassend repräsentieren die entwickelten α -Aminoxyhexapeptide die ersten Peptidomimetika, die die Funktion von HSP90 über eine spezifische Bindung an die C-terminale Domäne von HSP90 blockieren und dadurch die Dimerisierung des Chaperonproteins inhibieren. Der HSP90-CTDi Aminoxyron löst dabei *in vitro* und *in vivo* keine Hitzeschockantwort aus und zeigt sowohl gegenüber sensitiven als auch imatinibresistenten CML-Zellen und in soliden Tumorzelllinien vielversprechende Aktivitäten. Somit sind α -Aminoxyoligopeptide eine wertvolle Substanzklasse für die Entwicklung von Helixmimetika zur Inhibition von Protein-Protein-Interaktionen.

7 Zusammenfassung und Ausblick

Trotz enormer Fortschritte im Bereich der Tumorthherapie sind Tumorerkrankungen nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in den industriell entwickelten Ländern. Der Bedarf an innovativen Strategien zur Behandlung von Tumorerkrankungen und die Entwicklung neuartiger, selektiver Antitumorwirkstoffe sind aktuelle Herausforderungen in der pharmazeutischen Forschung. Die Aufklärung wichtiger biologischer Prozesse eröffnet hierbei neue Therapiemöglichkeiten. So übernehmen Histondeacetylasen eine globale Regulationsfunktion bei tumorrelevanten Prozessen und Inhibitoren von Histondeacetylasen (HDACi) stellen attraktive Kandidaten zur Behandlung diverser Tumorerkrankungen dar.^[6,7] Ein weiteres Ziel für die Entwicklung von Tumorthapeutika ist das Chaperon Hitze-Schock-Protein 90 (HSP90). Es unterstützt Klientproteine, darunter Onkoproteine, bei der korrekten Faltung und schützt Zellen vor Stress.^[8] Hierbei ist es an einer Reihe tumorrelevanter Prozesse beteiligt.^[9] HSP90i bieten daher Strategien zur Behandlung von Tumoren.^[8-11] Interessante Einsatzmöglichkeiten als Antitumorwirkstoffe bieten außerdem Peptidanaloga (Peptidomimetika).^[12-14] Durch den Einsatz von unnatürlichen Aminosäuren und Aminosäureanaloga können die attraktiven Eigenschaften der natürlichen Peptidvorbilder nachgeahmt und gleichzeitig Nachteile wie die geringe proteolytische Stabilität und die Konformationsflexibilität umgangen werden.^[16,17] In dieser Arbeit wurden die Synthese und die Eigenschaften von zwei neuartigen peptidanalogen Substanzklassen mit potentieller antitumoraler Aktivität untersucht.

Der erste Teil der Arbeit befasste sich mit der Synthese, der biologischen Evaluation und den Struktureigenschaften einer neuartigen Klasse an HDAC6-Inhibitoren. In Anlehnung an Arbeiten von Fairlie und Mitarbeiter über peptidbasierte HDACi (**1**^{*}), wurden durch gezielte Strukturmodifikationen peptidbasierten HDAC6-Inhibitoren (**2**^{*}) entwickelt (Abb. 7.1).^[9,10] Die Peptidrückgratstruktur, die durch Verschiebung der Seitenkette vom α -Kohlenstoff auf den benachbarten Amidstickstoff erhalten wurde, bietet potentielle Vorteile wie eine erhöhte proteolytische Stabilität und die Möglichkeit einer diversitätsorientierten Syntheseroute. Eine Selektivitätssteigerung für HDAC6 wurde durch den Austausch des klassischen aliphatischen gegen einen benzyllischen Linker und durch eine verzweigte *Cap*-Struktur angestrebt.

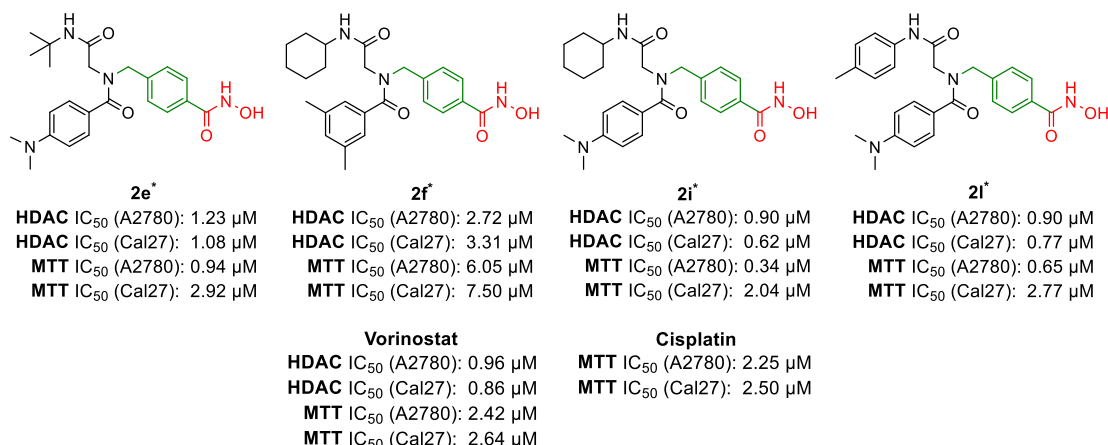


Abb. 7.3: Zytotoxizität (MTT) und HDAC-Inhibition (HDAC) der besten Verbindungen.

Bei tiefergehenden biologischen Untersuchungen mit den Hydroxamsäuren **2e***, **2f***, **2i*** und **2l*** wurde in einem HDAC-Enzymassay an den rekombinanten HDAC 2, 4, 6 und 11 eine Präferenz für die Inhibition von HDAC6 gegenüber anderen HDAC-Isoformen festgestellt (Tab. 7.1). **2i*** erwies sich hierbei als potenter HDACi mit einer HDAC6-Inhibition von 1.59 nM (IC₅₀). Außerdem zeigte Verbindung **2f*** ein vielversprechendes Selektivitätsprofil.

Tab. 7.1: HDAC-Inhibition an den rekombinanten HDAC-Isoformen 2, 4, 6 und 11.

Verbindung	IC ₅₀ [nM]				Selektivitätsindices ^a		
	HDAC2	HDAC4	HDAC6	HDAC11	SI 2/6	SI 4/6	SI 11/6
2e*	799	>10000	6.52	227	123	>1533	35
2f*	4366	>10000	11.2	421	391	>896	38
2i*	200	>10000	1.59	63.2	125	>6250	40
2l*	623	4377	2.84	25.0	228	>1563	9
TSA	18.9	nd	3.18	17.8	4	-	4
TMP269	nd	169	nd	nd	-	-	-

Die Daten zur Inhibitionen der HDAC-Isoformen wurden durch die Firma *Reaction Biology Corporation* (Malvern, PA, USA) ermittelt. ^aSelektivitätsindex (SI) für HDAC6 über HDAC2, HDAC4 oder HDAC11 (z.B. SI 1/6 = IC₅₀(HDAC1)/IC₅₀(HDAC6)).

In einem im Arbeitskreis von *Prof. Dr. Kassack* durchgeführten Hyperacetylierungsassay wurde weiterhin mittels Western Blot eine Überacetylierung des natürlichen HDAC6-Substrats α -Tubulin beobachtet, wodurch die HDAC6-Inhibition zusätzlich bestätigt wird. Zudem konnte an der Zelllinie Cal27 CisR³⁵ in Kombinationsstudien mit Cisplatin eine Chemosensibilisierung gegenüber Cisplatin nachgewiesen werden.

³⁵ Cisplatinresistente Zelllinie des Plattenepithelkarzinoms der Zunge

Ferner konnten für die peptoidbasierten Hydroxamsäuren **2a^{*}-d^{*}**, **f^{*}-h^{*}**, **j^{*}-k^{*}** bei Raumtemperatur und für die Verbindungen **2e^{*}**, **2i^{*}** und **2l^{*}** bei -30°C zwei NMR-Signalsätze mittels Kernresonanzspektroskopie (NMR) beobachtet werden. Die HDACi **2f^{*}** und **2i^{*}** wurden für Untersuchungen dieses Phänomens herangezogen. Durch variable Temperatur-NMR (VT-NMR) Experimente im Tief- und Hochtemperaturbereich konnte festgestellt werden, dass peptoidbasierte Hydroxamsäuren in Lösung als *cis*- und *trans*-Rotamere vorliegen. Beim Hauptkonformer konnte eine Hochfeldverschiebung der Methylengruppen beobachtet werden. Diese Verschiebung tritt beim *cis*-Rotamer aufgrund einer Abschirmung der Methylengruppen durch den Arylring (R²) auf.^[251] Hierdurch wurde die *cis*-Amidgeometrie als bevorzugte Konformation identifiziert. Die von *Dr. Reiß* (Anorganische Chemie und Strukturchemie, Universität Düsseldorf) durchgeführte Röntgenstrukturanalyse von **2f^{*}** unterstützt diese Annahme. Die Kristallstruktur von **2f^{*}** bestätigte das Vorliegen einer *cis*-Amidgeometrie im festen Zustand. Im Arbeitskreis von *Prof. Dr. Gohlke* (Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Universität Düsseldorf) wurden abschließend die Bindungsmodi der Hydroxamsäuren **2f^{*}** und **2i^{*}** untersucht. In Rahmen von Dockingstudien in HDAC2, HDAC4 als auch in HDAC6 konnte unabhängig von der Verbindung (**2f^{*}** oder **2i^{*}**) und dem Rotamer (*cis* oder *trans*) eine bevorzugte Bindung in HDAC6 festgestellt werden. Darüber hinaus konnte für Verbindung **2f^{*}** eine erhöhte Affinität für die Bindung des *trans*-Rotamers in HDAC6 beobachtet werden.

Zusammengefasst konnte in diesem Projekt mit den peptoidbasierten Hydroxamsäuren eine neuartige Substanzklasse von potenten und präferentiellen HDAC6-Inhibitoren entwickelt werden. Die Verbindungen **2f^{*}** und **2i^{*}** stellten hierbei die vielversprechendsten Vertreter innerhalb dieser Substanzbibliothek dar. Die Strukturen der peptoidbasierten Hydroxamsäuren **2f^{*}** und **2i^{*}** wurden daher als Ausgangspunkt gewählt, um weitere Derivate dieser Substanzklasse herzustellen. Hierzu wurden umfangreiche Strukturmodifikationen in den Molekülbereichen A-C vorgenommen (Abb. 7.4). Im Einzelnen wurden dazu der Rest R¹ in Molekülregion A umfassend variiert, eine Reihe von unterschiedlich alkylierten und *N*-alkylierten Benzoesäuren in Region B (R²) eingesetzt, sowie einige Derivate mit zusätzliche Substituenten in Region C (R³/R⁴) synthetisiert. Durch diese Variationen sollten Verbindungen mit verbesserter Antitumoraktivität synthetisiert und tiefere Einblicke in die Strukturaktivitätsbeziehungen der peptoidbasierten HDACi ermöglicht werden.

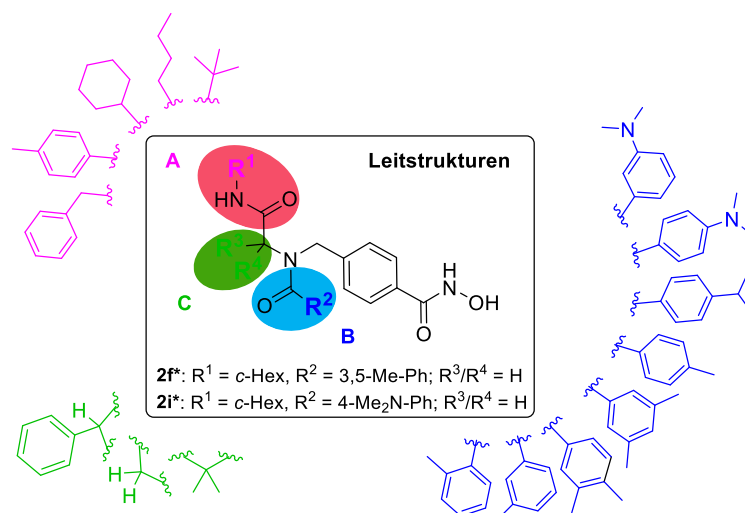
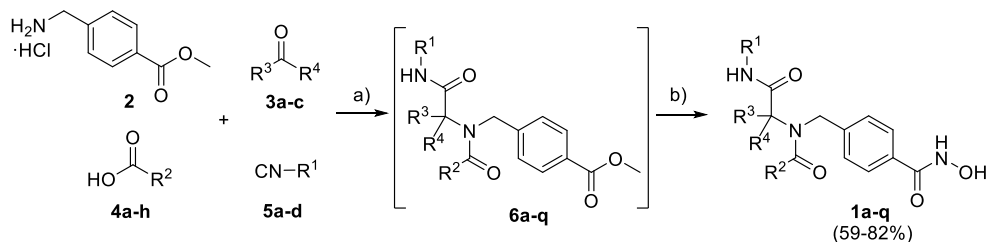


Abb. 7.4: Leitstrukturen und durchgeführte Variationen der Reste R^1 - R^4 in den Regionen A-C.

Die Synthese erfolgte über eine mikrowellengestützte 5-Komponenten-1-Topf-Synthese, die eine weiterentwickelte Variante der ursprünglichen zweistufigen Syntheseroute (Kapitel 3) darstellt. Zur Entwicklung dieser 1-Topf-Methode wurden zunächst die beiden bekannten Teilreaktionen (Schritt I: U-4CR, Schritt II: Hydroxylaminolyse) unabhängig voneinander betrachtet und bei unterschiedlichen Reaktionstemperaturen und -zeiten unter Mikrowelleneinstrahlung untersucht. Als optimale Bedingungen konnten für die U-4CR eine Temperatur von 45°C und eine Reaktionszeit von 60 min. und bei der Hydroxylaminolyse 55°C und eine Zeit von 30 min. ermittelt werden. Abschließend wurden die optimierten Bedingungen beider Syntheseschritte kombiniert. Die in einem Reaktionsgefäß (1-Topf-Verfahren) sequentiell durchgeführte U-4CR und Hydroxylaminolyse erfolgten dabei ohne Isolierung und Reinigung des Zwischenprodukts. Diese erfolgreich optimierte 5-Komponenten-1-Topf-Variante erlaubte eine zeiteffiziente und ressourcensparende Synthese der HDACi **1a-q** in guten Ausbeuten von 59-82% und einer Gesamtreaktionszeit von unter zwei Stunden (Schema 7.1).



Schema 7.1: Mikrowellenunterstützte 5-Komponenten-1-Topf-Synthese der HDACi **1a-q**. a) (i) **2**, **3a-c**, Et₃N, MeOH, 4 Å MS, 150 W, 45°C, 20 min; (ii) R^1 -NC **5a-d**, R^2 -COOH **4a-h**, 150 W, 45°C, 60 min; (b) H₂NOH·HCl, Na, MeOH, 150 W, 55°C, 30 min.

Die Verbindungen **1a-q** wurden anschließend im Arbeitskreis *Kassack* hinsichtlich ihrer Zytotoxizität und ihrer HDAC-inhibierenden Wirkung untersucht. Die meisten peptoidbasierten Hydroxamsäuren **1a-q** wiesen dabei vergleichbare oder bessere zytotoxische Eigenschaften und HDAC-Inhibitionen auf als die Referenzsubstanzen Cisplatin und Vorinostat. Zudem zeigten einige der HDACi **1a-q** verbesserte Anti-tumoraktivitäten im Vergleich zu der ersten Substanzbibliothek (**2a^{*}-1^{*}**). Peptoidbasierte Hydroxamsäuren mit einem 4-Dimethylaminophenylrest in R² (**1n**, **1q**, Abb. 7.5) und/oder Benzylsubstituenten in R¹ (u.a. **1p**, **1q**, Abb. 7.5) erwiesen sich als besonders potente Vertreter dieser Substanzklasse. Zusätzliche Substituenten in Position R³ und R⁴ hingegen führten zu einer verminderten HDAC-Inhibition und Zytotoxizität (siehe **1j** und **1k**, Tab. 4.2 und Tab. 4.3). In Bezug auf die HDAC-Inhibition wurden **1n**, **1p** und **1q** als sehr potente Verbindungen mit IC₅₀-Werten im submikromolaren Bereich identifiziert (Abb. 7.5).

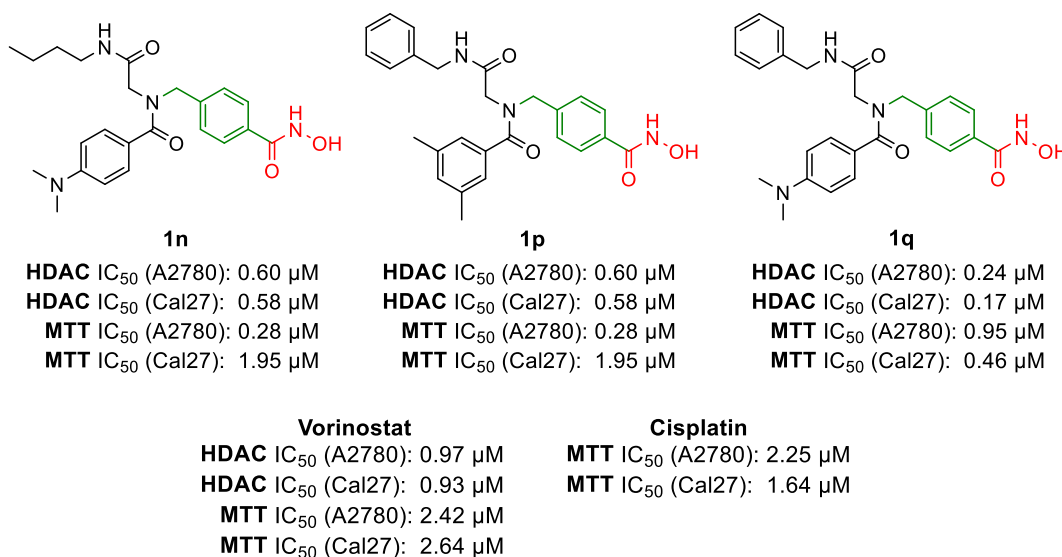


Abb. 7.5: HDAC-Inhibition und Zytotoxizität der potentesten Verbindungen **1n**, **1p** und **1q**.

Die Verbindungen **1n**, **1p** und **1q** sowie die HDACi **2f^{*}** und **2i^{*}** wurden zudem in einem HDAC-Enzymassay hinsichtlich ihrer inhibierenden Aktivität gegenüber HDAC1 und HDAC6 untersucht (Tab. 7.2). Mit einem Selektivitätsindex (SI 1/6) von 34 und einem IC₅₀-Wert von 9 nM konnte die peptoidbasierte Hydroxamsäure **1n** als potenter und präferentieller HDAC6-Inhibitor identifiziert werden. Der HDACi **1q** wies eine vergleichbar hohe Inhibition von HDAC1 und HDAC6 auf und zeigte somit ähnlich wie die Referenzsubstanz Vorinostat keine Isoformpräferenz. Auch die beobachteten starken Zytotoxizitäten von **1q** sind im Einklang mit der unselektiven Inhibition mehrerer HDACs (Abb. 7.5).

Tab. 7.2: Inhibition der Enzymaktivität von HDAC1 und HDAC6.

Verbindung	R ¹	R ²	HDAC IC ₅₀ [nM]		SI 1/6
			HDAC1	HDAC6	
1n	<i>n</i> -Bu	4-Me ₂ N-Ph	306 ± 32	9 ± 1	34
1p	Bn	3,5-Me-Ph	423 ± 39	121 ± 13	4
1q	Bn	4-Me ₂ N-Ph	11 ± 5	11 ± 8	1
2f*	<i>c</i> -Hex	3,5-Me-Ph	346 ± 71	32 ± 6	11
2i*	<i>c</i> -Hex	4-Me ₂ N-Ph	43 ± 11	16 ± 4	3
Vorinostat			56 ± 9	49 ± 6	1

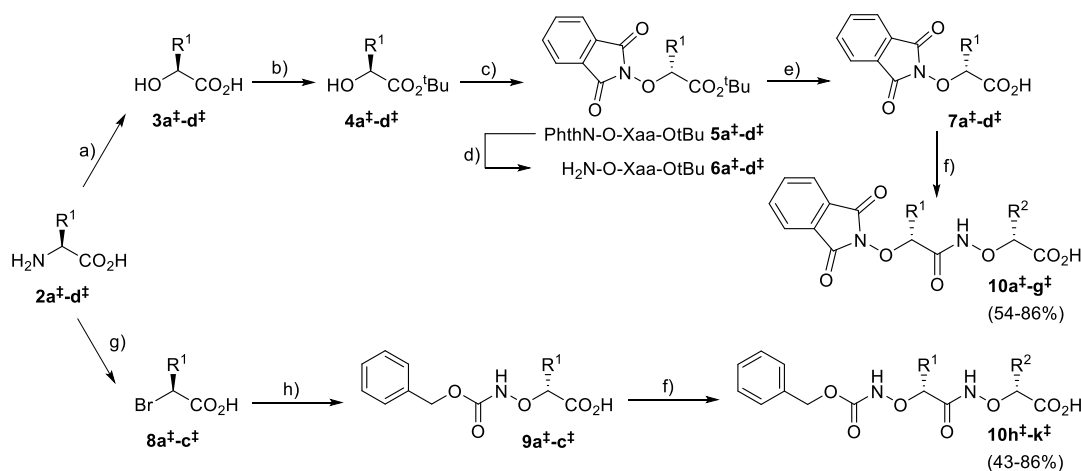
SI 1/6: Selektivitätsindex für HDAC6 über HDAC1 (SI 1/6 = IC₅₀(HDAC6)/ IC₅₀(HDAC1)).

Insgesamt erwiesen sich peptoidbasierte Hydroxamsäuren mit einem 4-Dimethylamino-phenylrest in Position R² (**1n**, **1q** und **2i***) als sehr potente HDAC6-Inhibitoren (**1n**: 9 nM; **1q**: 11 nM; **2i***: 16 nM). Bei diesen Verbindungen konnte zudem eine Minderung der HDAC1-Inhibition in Abhängigkeit von Rest R¹ (Bn > *c*-Hex > *n*-Bu) beobachtet werden (**1q**: 11 nM > **2i***: 43 nM > **1n**: 306 nM). Der Butylrest erwies sich hierbei als selektivitätsfördernd für HDAC6 (**1n**: SI 1/6 = 34). Eine Reduzierung der HDAC1-Inhibition konnte außerdem beim Austausch von 4-Dimethylaminophenyl gegen 3,5-Dimethylphenyl in Position R² festgestellt werden (**1q**: 11 nM vs. **1p**: 423 nM und **2i***: 43 nM vs. **2f***: 346 nM). Hier zeigten Benzylderivate zusätzlich eine Minderung der HDAC6-Inhibition (**1q**: 11 nM vs. **1p**: 121 nM), während diese bei Cyclohexylderivaten erhalten blieb (**2i***: 16 nM vs. **2f***: 32 nM).

Zusammenfassend handelt es sich bei den peptoidbasierten Hydroxamsäuren um eine neuartige Substanzklasse an vielversprechenden HDAC-Inhibitoren. Durch geeignete Variation der einzelnen Substituenten oder durch Austausch von Teilstrukturen ist es hierbei möglich, die Selektivität hinsichtlich einer HDAC-Subklasse zu modulieren. Dies wurde bereits in anderen Arbeiten angewendet. Unter anderen wurden durch den Austausch der ZBG selektive Inhibitoren der HDAC-Klasse I entwickelt, die keine HDAC6-Inhibition aufweisen.^[252] In diesem Projekt stellt insbesondere die peptoidbasierte Hydroxamsäure **1n** einen guten Ausgangspunkt dar, um weitere Strukturoptimierungen durchzuführen um die HDAC6-Selektivität zu steigern und die pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften dieser Substanzklasse zu verbessern.

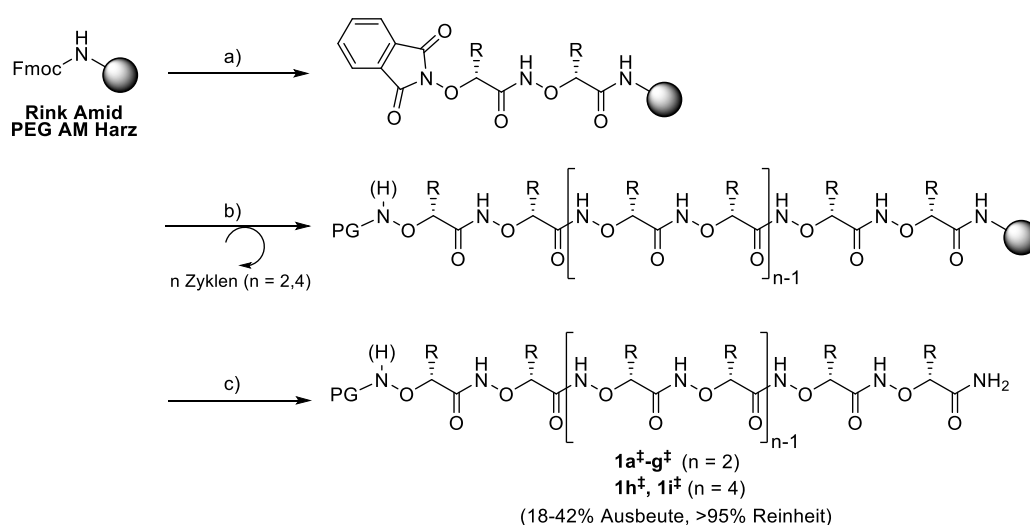
Der zweite Teil der Arbeit befasste sich mit α -Aminoxyoligopeptiden als eine neuartige Klasse peptidomimetischer Foldamere mit zytotoxischen Eigenschaften. Es wurden die Synthese, die biologische Aktivität und die Struktureigenschaften dieser Substanzklasse untersucht. Veröffentlichte Forschungsergebnisse von *Yang* und Mitarbeiter zeigen, dass α -Aminoxypeptide stabile helikale Konformationen einnehmen können und eine hohe Proteolysestabilität besitzen.^[161,163–165,168,253,254] Auf Grundlage dieser Erkenntnisse wurden α -Aminoxyoligopeptide als peptidanalogue Substanzklasse für die Synthese peptidomimetischer Foldamere gewählt.

Da bekannt ist, dass die Synthese längerer Peptidsequenzen mit sich wiederholenden aliphatischen Seitenketten wie *sec*-Butyl schwierig sein kann,^[199] wurde nach einem verbesserten Zugang zu längeren Oligopeptiden gesucht. Dabei wurde eine Strategie verfolgt, die aus einer Kombination aus Synthese in Lösung und Festphasensynthese bestand. Nach literaturbekannten Vorschriften wurden in Lösung ausgehend von L- α -Aminosäuren zunächst Phthaloyl- (Phth, **5a[‡]-d[‡]**)^[166] und Benzyloxycarbonylgeschützte (Cbz, **9a[‡]-c[‡]**)^[255,256] D- α -Aminoxysäuren synthetisiert (Schema 7.2). Dann wurden die N-terminalgeschützten D- α -Aminoxysäuren (**5a[‡]-d[‡]**, **9a[‡]-c[‡]**) mittels EDC·HCl/HOBt mit C-terminalgeschützten D- α -Aminoxysäuren (**6a[‡]-d[‡]**) verknüpft. Die α -Aminoxydipeptidsäuren **10a[‡]-k[‡]** wurden abschließend durch Entschützung mit TFA/DCM erhalten.



Schema 7.2: Synthese der α -Aminoxydipeptide **10a[‡]-k[‡]**. a) NaNO₂, H₂SO₄, -10°C→RT, 16 h; b) (i) AcCl, 60°C, 5 h; (ii) *t*BuOH, DCC, DMAP, DCM, RT, 16 h; (iii) K₂CO₃, MeOH, RT, 12 h; c) PhthN-OH, PPh₃, DIAD, THF, 0°C→RT, 16 h; d) H₂N-NH₂·H₂O, MeOH, RT, 1.5 h; (e) TFA/DCM (1:1), RT, 1 h; f) (i) **6a[‡]-d[‡]**, EDC·HCl, HOBt, DCM, RT, 16 h; (ii) TFA/DCM (1:1), RT, 1 h; g) NaNO₂, KBr, H₂SO₄, -10°C→RT, 16 h; h) CbzNH-OH, NaH, THF, RT, 16 h.

Die Synthese der α -Aminoxyoligopeptide (Hexamere und Decamere) erfolgte dann durch Festphasensynthese mit den Dipeptidbausteinen $10a^{\ddagger}$ - k^{\ddagger} (Schema 7.3). Ein Vergleich verschiedener Kupplungsreagenzien zeigte, dass HOBt/BOP/NEM ein geeignetes Kupplungssystem für die festphasengebundene Amidkupplungsreaktion darstellt. Anhand dieser Synthesestrategie, bestehend aus einer Kombination aus Synthese in Lösung und Festphasensynthese, konnten neun α -Aminoxyoligopeptide $1a^{\ddagger}$ - i^{\ddagger} in Ausbeuten von 18-42% und Reinheiten von >95% hergestellt werden (Schema 7.3). $1h^{\ddagger}$ und $1i^{\ddagger}$ sind die bisher längsten bekannten α -Aminoxyoligopeptide.



Schema 7.3: Festphasensynthese der α -Aminoxypeptide $1a^{\ddagger}$ - i^{\ddagger} . a) (i) 20% Piperidin in DMF, RT, 2 x 15 min; (ii) Phth- NO Xaa- NO Xaa-OH, BOP, HOBt, NEM in DMF, RT 24 h; b) 5% Hydrazinhydrat in MeOH, RT, 2 x 15 min; (ii) PG- NO Xaa- NO Xaa-OH, BOP, HOBt, NEM in DMF, RT, 24 h; c) TFA/TES (98:2, v:v), RT, 1.5 h.

Im Anschluss an die Synthese wurden die α -Aminoxypeptide $1a^{\ddagger}$ - i^{\ddagger} im Arbeitskreis *Kassack* auf ihre zytotoxische Aktivität gegenüber den Tumorzelllinien Kyse510³⁶ und A2780³⁷ sowie den cisplatinresistenten Zellen Kyse510 CisR und A2780 CisR in einem MTT-Assay untersucht. Das Hexamer $1e^{\ddagger}$ sowie die Decamere $1i^{\ddagger}$ und $1h^{\ddagger}$ konnten hierbei als vielversprechende Vertreter dieser Substanzklasse identifiziert werden (Abb. 7.6). Die Verbindungen weisen IC₅₀-Werte im niedrigen mikromolaren Bereich auf und besitzen vergleichbare Zytotoxizitäten wie die Referenzsubstanz Cisplatin. Im Vergleich zu Hexapeptiden wurde eine gesteigerte Zytotoxizität für die Decamere festgestellt. Weiterhin wurde eine bis zu 10fach erhöhte Zytotoxizität beim Austausch der Phthaloyl-

³⁶ Plattenepithelkarzinom der Speiseröhre

³⁷ Epitheliales Ovarialkarzinom

(Phth, **1d**[‡]) gegen eine Benzyloxycarbonylgruppe (Cbz, **1e**[‡]) beobachtet (**1d**[‡]: MTT(Kyse510) = 58.0 μ M, MTT(A2780) = 57.5 μ M vs. **1e**[‡]: MTT(Kyse510) = 5.7 μ M, MTT(A2780) = 7.5 μ M; Publikation II Tab. 3[‡]). Um die Selektivität der Verbindungen für Tumorzellen im Vergleich zu normalen Zellen zu prüfen, wurde die Zytotoxizität gegenüber humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293) untersucht. Die vielversprechendsten Verbindungen **1e**[‡], **1h**[‡] und **1i**[‡] zeigten einen geringeren zytotoxischen Effekt auf normale Zellen als gegenüber den Tumorzelllinien Kyse510 und A2780 (Abb. 7.6).

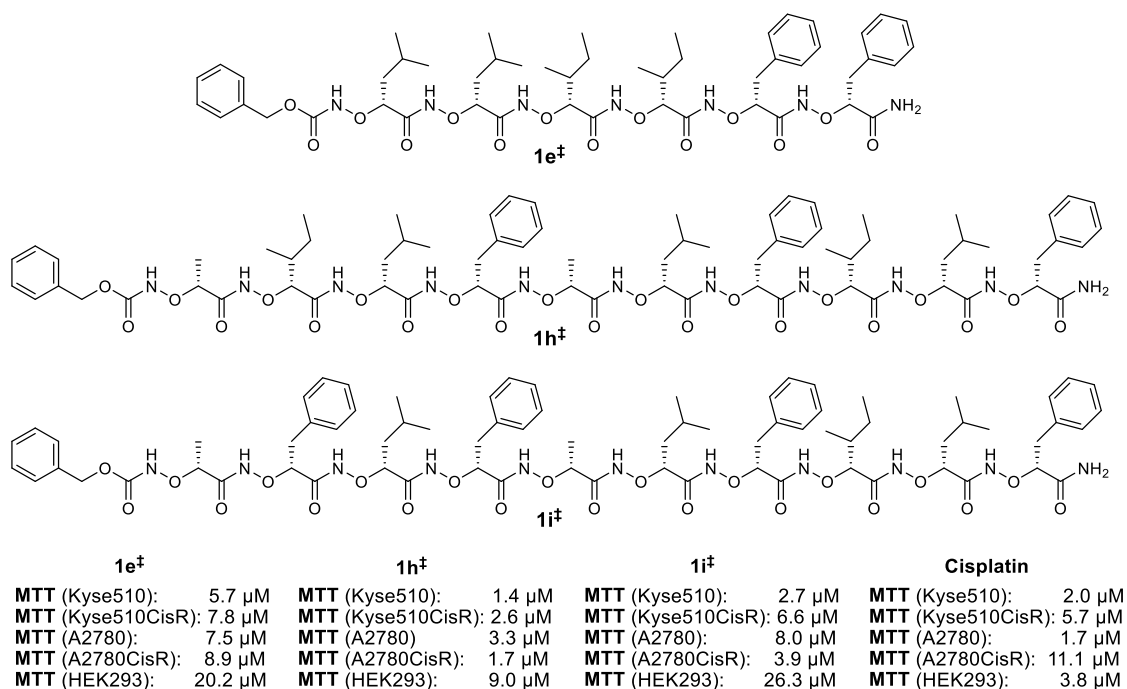


Abb. 7.6: Zytotoxizität der α -Aminooxyoligopeptide **1e**[‡] (Hexamer), **1h**[‡] und **1i**[‡] (Dekamere).

Die Sekundärstruktur der α -Aminooxypeptide wurde mittels Röntgenstrukturanalyse, Molekularer Modellierung, NMR-Spektroskopie, molekulardynamischen (MD) Simulationen und CD-Spektroskopie untersucht. In Zusammenarbeit mit *Dr. Höppner* (Proteinkristallographie und Röntgenstrukturanalyse, Universität Düsseldorf) und *Dr. Reiß* wurde die Kristallstruktur von **1b**[‡] aufgeklärt. Hierbei konnte eine rechtsgängige 2_8 -helikale Konformation im Festkörper nachgewiesen werden, bei der pro Windung genau zwei α -Aminooxysäurereste notwendig sind und die eine Ganghöhe von 5.8 Å ausweist (Abb. 7.7 A und B). Die 2_8 -Helix ist dabei im Vergleich zu konventionellen Helices (α -Helix, 3_{10} -Helix) verhältnismäßig flach. In der Kristallpackung wurde eine durch Wasserstoffbrückenbindungen verursachte Kopf-zu-Fuß-Verknüpfung benachbarter Moleküle beobachtet. Hieraus resultiert eine Zick-Zack-Orientierung der Peptidketten, bei denen die Seitenketten von aneinandergrenzenden Zick-Zack-Peptidketten

miteinander wechselwirken. Die Sekundärstruktur ist stabilisiert durch aufeinanderfolgende achtgliedrige Ringe (multiple α -NO-Turns), die durch intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen entstehen. Die Seitenketten von $\mathbf{1b}^\ddagger$ liegen dabei abwechselnd auf gegenüberliegenden Seiten der 2_8 -Helix. Im Arbeitskreis *Gohlke* durchgeführte molekulare Modellierungen zeigten, dass die Seitenketten des Hexamers $\mathbf{1b}^\ddagger$ die Orientierung verschiedener Seitenketten von kanonischen α -Helices und 3_{10} -Helices nachahmen können (Abb. 7.7 C).

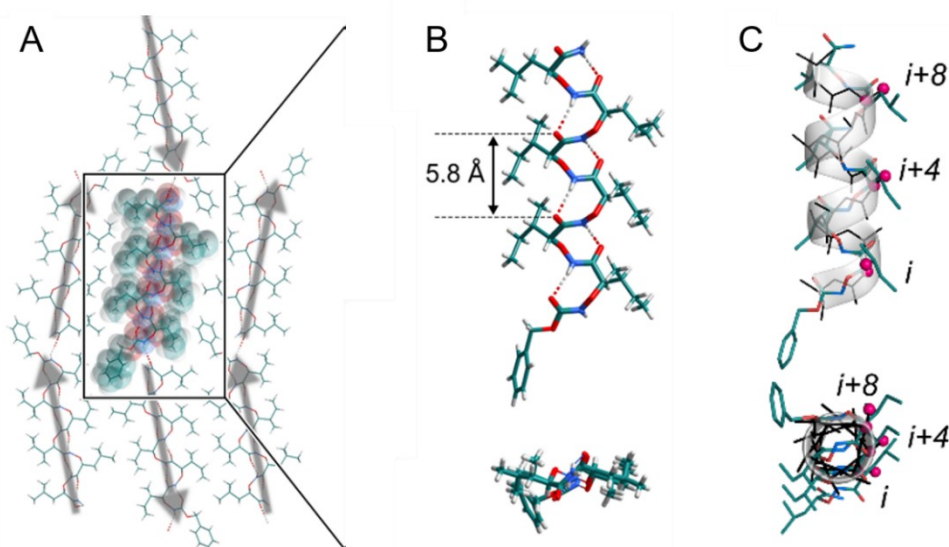


Abb. 7.7: Kristallstruktur von $\mathbf{1b}^\ddagger$ (Cbz-^{NO}Ile-^{NO}Ile-^{NO}Ile-^{NO}Ile-^{NO}Leu-^{NO}Leu-NH₂). (A) Kristallpackung von $\mathbf{1b}^\ddagger$. Die Orientierung der Hexamere (C-Terminus→N-Terminus) ist durch Pfeile angedeutet; (B) Detailaufnahme von $\mathbf{1b}^\ddagger$ in der Seitenansicht (oben, C-Terminus ist oben) und um 90° gedreht (unten, C-Terminus ist dem Betrachter zugewandt); (C) Orientierung der Seitenketten von $\mathbf{1b}^\ddagger$ im Vergleich zu einer kanonischen α -Helix (oben: Seitenansicht, unten: um 90° gedreht).

Anhand von NMR-Spektroskopie (ROESY) sowie MD-Simulationen in Chloroform (Arbeitskreis *Gohlke*) und CD-spektroskopischen Untersuchungen in Trifluorethanol (TFE) und Acetonitril (Arbeitsgruppe von *Dr. Lüdeke*, Pharmazeutische Wissenschaften, Universität Freiburg) konnte in organischen Lösungsmitteln ebenfalls eine 2_8 -Helix als bevorzugte Konformation identifiziert werden. In Übereinstimmung mit früheren Arbeiten^[165] wurde in 2D ROESY-Spektren ein charakteristisches ROE-Signalmuster für repetitive α -NO-Turns beobachtet. Hierbei zeigte jedes interne α -Aminoxyproton (NH_{*i*}) zum eigenen α -Methinproton (C _{α} H_{*i*}) ein starkes und zum benachbarten Rückgratmethinproton (C _{α} H_{*i-1*}) ein schwächeres ROE-Signal. Die Konformation einer 2_8 -Helix mit sich wiederholenden α -NO-Turns konnte durch MD-Simulationen in Chloroform und CD-Spektroskopie in Trifluorethanol und Acetonitril bestätigt werden. Im wässrigen

Milieu hingegen wurde ein pH-abhängiges Gleichgewicht zwischen der 2_8 -Helix im sauren pH-Bereich und einer weiteren Konformation beobachtet. Hierbei konnte für den Übergang zwischen den beiden Konformationen ein theoretischer pKs von 8.2 ermittelt werden (Abb. 7.8).

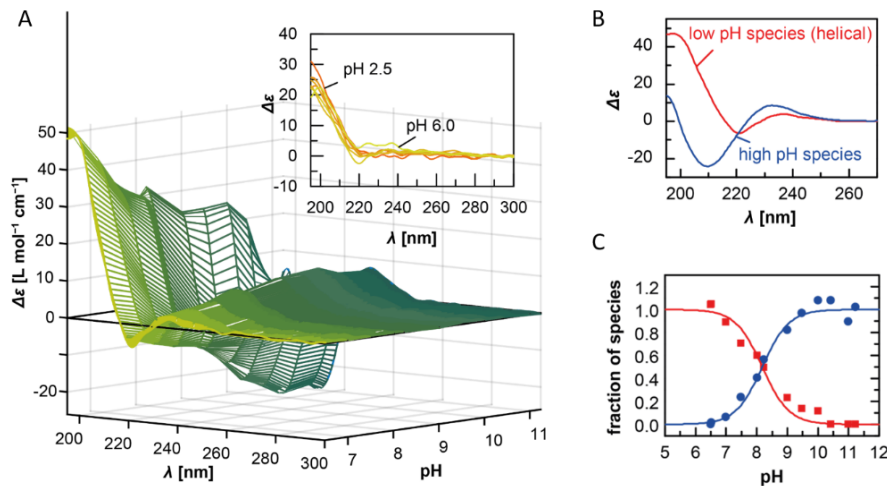


Abb. 7.8: pH-abhängiges CD-Spektrum ($1g^{\ddagger}$) und CD-Spektren beteiligter Konformationen. (A) 3D-Darstellung der CD-Spektren von $1g^{\ddagger}$ im pH-Bereich 6.5-11.2 (großes Bild) und im Bereich $pH < 6.5$ (kleines Bild); (B) Reine Spektren der zwei beteiligten Konformationen; (C) Korrespondierende Titrationskurven.

Um erste Einblicke in den Wirkmechanismus von α -Aminoxyoligopeptiden zu erhalten, wurden die Decamere ($1h^{\ddagger}$, $1i^{\ddagger}$) und ausgewählte Hexamere ($1b^{\ddagger}$, $1f^{\ddagger}$, $1g^{\ddagger}$) in der Arbeitsgruppe *Kassack* auf ihre membranschädigende Wirkung und auf ihre Fähigkeit zur Apoptoseinduktion getestet. Während für die Decamere mit steigender Konzentration (2 μ M auf 5 μ M) eine erhöhte membranschädigende Wirkung beobachtet wurde, zeigten die Hexamere (50 μ M) keine signifikante Änderung der Membranschädigung. Um zu klären, ob die Kettenlänge Auswirkungen auf den Wirkmechanismus und das Faltungsverhalten der α -Aminoxypeptide hat, wurden CD-Spektren in Gegenwart von Liposomen als Modellmembran in der Arbeitsgruppe *Lüdeke* aufgenommen. Die α -Aminoxydecapeptide zeigten in Membranumgebung eine erhöhte Tendenz zur Faltung in die 2_8 -Helix. Die membranschädigende Wirkung der α -Aminoxydecapeptide könnte so im Zusammenhang stehen mit der gesteigerten Fähigkeit eine geordnete 2_8 -helikale Konformation anzunehmen.

Zusammenfassend handelt es sich bei α -Aminoxypeptiden um eine neuartige Klasse an peptidomimetischen Foldameren mit bemerkenswerter Zytotoxizität gegenüber Tumorzelllinien. Sie bilden stabile 2_8 -Helices aus, durch die die Seitenkettenorientierung

von α -Helices und 3_{10} -Helices imitiert werden kann. α -Aminoxyoligopeptide sind somit interessante Kandidaten für das Design von Sekundärstrukturmimetika und können für die Entwicklung von Modulatoren für Protein-Protein-Interaktionen herangezogen werden. Ein attraktives Zielprotein in der Tumorthherapie stellt HSP90 dar. Als Chaperon faltet es Klientproteine, darunter Onkoproteine, in ihre korrekte Konformation.^[8,9] Zudem weist es in Tumorzellen häufig eine erhöhte Expression auf.^[10] HSP90 ist so an tumorassoziierten Prozessen beteiligt und trägt zur Entartung von Zellen bei. Die in klinischen Studien getesteten HSP90i adressieren alle die ATP-Bindetasche am *N*-Terminus des Proteins und lösen einen Überlebensmechanismus in Tumorzellen aus, der als *heat shock response* (HSR) bekannt ist.^[8,9,227] Die Wirksamkeit der Inhibitoren wird so stark vermindert. HSP90i, die die *C*-terminale Dimerisierungsdomäne adressieren, lösen keinen HSR aus und stellen Alternativen für die Entwicklung von Tumorthapeutika dar.^[8,222] Gohlke und Groth zeigten, dass Protein-Protein-Interaktionen in der CTD von HSP90 essentiell für die Dimerisierung sind und identifizierten *hot spot* Aminosäuren (I688, Y689, I692, L696, Abb. 7.9) in der Proteininteraktionsfläche.^[249] Zusammen mit der Arbeitsgruppe Jose entwickelten sie erste peptidische HSP90i, die an die CTD binden.^[250] Peptide weisen als Arzneimittel jedoch wesentliche Nachteile auf. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden in diesem Projekt peptidomimetische Inhibitoren entwickelt, die die *C*-terminale Dimerisierungsdomäne von HSP90 adressieren. Für das rationale Design der Helixmimetika wurden die *hot spots* herangezogen und zwei α -Aminoxyhexapeptide **1[#]** und **2[#]** entworfen, die entsprechende Surrogate der *hot spot* Aminosäuren tragen (Abb. 7.9).

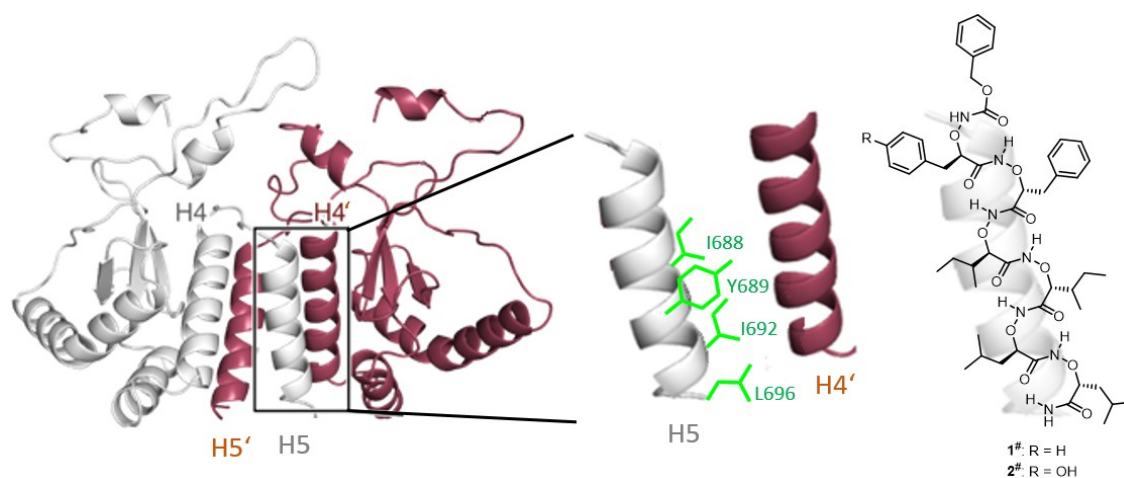
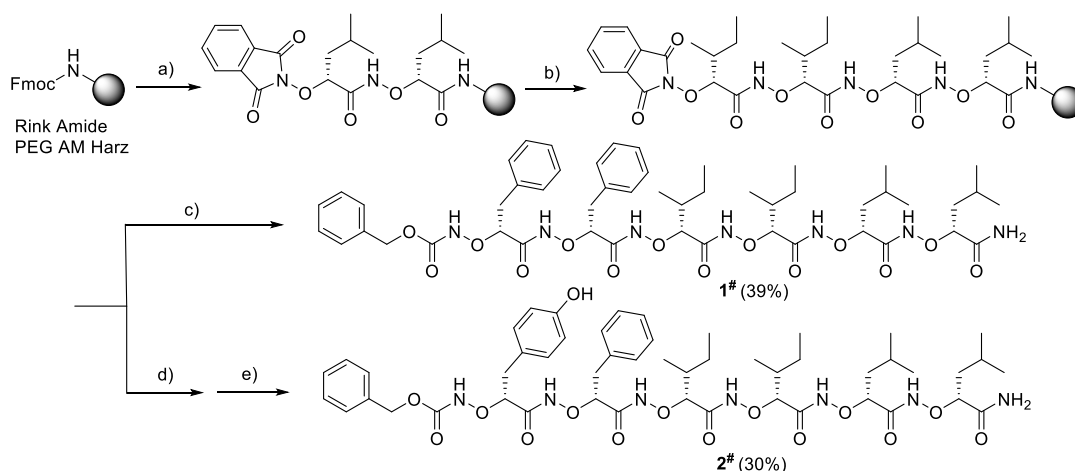


Abb. 7.9: *hot spots* in der CTD-Interaktionsfläche von HSP90 und Inhibitor-Design.

Die Synthese der α -Aminoxyhexapeptide **1[#]** und **2[#]** erfolgte über die zuvor entwickelte Synthesestrategie bestehend aus einer Kombination aus Reaktionsschritten in Lösung und Festphasensynthese.^[257] Hierzu wurden zunächst anhand von literaturbekannten Vorschriften in Lösung Monomer- und Dimerbausteine hergestellt.^[166,255–258] Die Hexapeptide **1[#]** und **2[#]** wurden dann durch Festphasensynthese aus den Monomeren bzw. Dimeren in Gegenwart von BOP/HOBt/NEM als Kupplungssystem dargestellt. Anders als bei **1[#]** wurden bei **2[#]** die letzten beiden Aminosäuren als Monomere eingefügt. Nach semipräparativer RP-HPLC wurden **1[#]** und **2[#]** in Ausbeuten von 39% (**1[#]**) und 30% (**2[#]**) und Reinheiten von >95% erhalten (Schema 7.4).



Schema 7.4: Festphasensynthese der α -Aminoxyhexapeptide **1[#]** und **2[#]**. a) (i) 20% Piperidin in DMF, RT, 2 x 15 min; (ii) Phth-^{NO}Leu-^{NO}Leu-OH, BOP, HOBt, NEM in DMF, RT, 24 h; b) 5% Hydrazinhydrat in MeOH, RT, 2 x 15 min; (ii) Phth-^{NO}Ile-^{NO}Ile-OH, BOP, HOBt, NEM in DMF, RT, 24 h; c) (i) 5% Hydrazinhydrat in MeOH, RT, 2 x 15 min; (ii) Cbz-^{NO}Phe-^{NO}Phe-OH, BOP, HOBt, NEM in DMF, RT, 24 h; (iii) TFA/TES (98:2, v:v), RT, 1.5 h; d) (i) 5% Hydrazinhydrat in MeOH, RT, 2 x 15 min; (ii) Phth-^{NO}Phe-OH, BOP, HOBt, NEM in DMF, RT, 24 h; e) 5% Hydrazinhydrat in MeOH, RT, 2 x 15 min; (ii) Cbz-^{NO}Tyr(*t*Bu)-OH, BOP, HOBt, NEM in DMF, RT, 24 h; (iii) TFA/TES (98:2, v:v), RT, 1.5 h.

Anhand von CD-Spektroskopie (Arbeitskreis *Lüdeke*) und 2D NMR-Spektroskopie (ROESY) wurde für die α -Aminoxyhexapeptide **1[#]** und **2[#]** die gewünschte 2_8 -Helix als bevorzugte Konformation identifiziert. In 2D ROESY-Spektren konnte ein für repetitive α -NO-Turns charakteristisches ROE-Signalmuster beobachtet werden.^[165] Interne α -Aminoxyprotonen (NH_{*i*}) zeigten dabei zum eigenen α -Methinproton (C_{*a*}H_{*i*}) ein starkes und zum benachbarten Rückgratmethinproton (C_{*a*}H_{*i-1*}) ein schwächeres ROE-Signal. Die Konformation einer 2_8 -Helix mit sich wiederholenden α -NO-Turns konnte durch CD-Spektren in Trifluorethanol und Natriumphosphatpuffer (pH 7) bestätigt werden. Die Zielverbindungen **1[#]** und **2[#]** sind damit in der Lage, die erforderliche Sekundärstruktur einzunehmen. Sie können so die Orientierung der *hot spots* in der CTD von HSP90 nachahmen und somit die Dimerisierung inhibieren.

Um Einblicke in den Bindungsmechanismus der α -Aminoxyhexapeptide zu erhalten, wurden im Arbeitskreis *Gohlke* molekulardynamische (MD)-Simulationen und Berechnungen zur effektiven Bindungsenergie durchgeführt. Hierbei konnte beobachtet werden, dass die α -Aminoxyhexapeptide an die CTD binden und *hot spot* Aminosäurereste der Helix H5 von HSP90 nachahmen können.

Weiterhin wurden die biologischen Eigenschaften der Hexapeptide **1[#]** und **2[#]** ausführlich untersucht. In einem Autodisplay-Dimerisierungsassay (in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von *Prof. Dr. Jose*, Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Universität Münster) konnte hierbei beobachtet werden, dass die Hexapeptide die HSP90-Dimerisierung inhibieren. Im Arbeitskreis *Jose* durchgeführte MicroScale Thermophorese (MST)-Messungen mit der CTD von HSP90 ergaben zudem, dass **1[#]** und **2[#]** an die C-terminalen Domäne von HSP90 binden können (**1[#]**: $K_D = 27.4 \mu\text{M}$; **2[#]**: $K_D = 44.2 \mu\text{M}$). Die Wirksamkeit von **1[#]** und **2[#]** gegenüber HSP90 konnte weiterhin in einem zellbasierten Luciferase-Rückfaltungs-Assay (durchgeführt in der Arbeitsgruppe von *Prof. Dr. Hauer*, Klinik für Kinderonkologie, Hämatologie und klinische Immunologie, Düsseldorf) an der CML-Zelllinie K562 *in vitro* bestätigt werden. Die Zytotoxizität der Verbindungen wurde in Viabilitätsassays gegenüber myeloische Leukämiezellen (Arbeitsgruppe *Hauer*) und solide Tumorzelllinien (Arbeitskreis *Kassack*) getestet (Tab. 7.3). **1[#]** erwies sich als das vielversprechendere Aminoxyhexapeptid (z.B. **1[#]**: $IC_{50}(\text{K562}) = 5.72 \mu\text{M}$; **2[#]**: $IC_{50}(\text{K562}) = 16.8 \mu\text{M}$). Zudem zeigte **1[#]** (genannt Aminoxyrone) im Autodisplay-Dimerisierungsassay, bei MST-Messungen sowie im Luciferase-Rückfaltungs-Assay eine höhere Effizienz als **2[#]**. Im Arbeitskreis *Hauer* wurden tiefergehende biologische Untersuchungen daraufhin mit Aminoxyrone (**1[#]**) durchgeführt. **1[#]** zeigte dabei antiproliferative und zytotoxische Aktivitäten gegenüber humanen myeloischen Leukämiezelllinien (K562, KCL22, HL60, Mutz-2) und induzierte Zellzyklusarrest und eine frühe Zelldifferenzierung. Dabei wurden in sensitiven CML-Zellen (K562, KCL22) als auch in den imatinibresistenten Subzelllinien (K562r, KCL22r)³⁸ vergleichbare Aktivitäten beobachtet (Tab. 7.3, $IC_{50}(\text{K562}) = 5.72 \mu\text{M}$ vs. $IC_{50}(\text{K562r}) = 6.24 \mu\text{M}$; $IC_{50}(\text{KCL22}) = 2.74 \mu\text{M}$ vs. $IC_{50}(\text{KCL22r}) = 2.86 \mu\text{M}$). Darüber hinaus zeigte **1[#]** in imatinibresistenten Ba/F3-Zellen, in denen klinisch relevante Mutationen des Gens BCR-ABL1 (T315I, M351T und

³⁸ Zur Generierung der imatinibresistenten Zelllinien K562r und KCL22r wurden die sensitiven Zellen K562 und KCL22 zuvor mit Imatinib behandelt.

E255K) vorliegen, ähnliche Aktivitäten (Tab. 7.3).³⁹ Im Arbeitskreis von *Dr. Grez* (Institut für Tumorbilogie und experimentelle Therapie, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt) konnte zusätzlich in einer Luciferase-Xenograft Mausmodellstudie mit der CML-Zelllinie K562 die *in vivo* Effizienz von Aminoxyrone bestätigt werden. Hierbei konnte nach Gabe von **1[#]** eine signifikante Reduzierung des Tumorwachstums beobachtet werden. Aminoxyrone löst zudem *in vitro* und *in vivo* keine Hitzeschockantwort aus.

Tab. 7.3: Inhibition des Zellwachstums (IC₅₀) durch Aminoxyrone (**1[#]**).

Zelllinie	Ursprung	IC ₅₀ [μM]
K562 & K562r	CML (BCR-ABL ⁺)	5.72 & 6.24
HL60	AML (BCR-ABL ⁻)	7.17
KCL22 & KCL22r	CML (BCR-ABL ⁺)	2.74 & 2.86
Mutz-2	AML (BCR-ABL ⁻)	10.10
BA/F3 (T315I)	Murine pro B Zellen (BCR-ABL ⁺)	3.02
BA/F3 (M351T)	Murine pro B Zellen (BCR-ABL ⁺)	3.11
BA/F3 (E255K)	Murine pro B Zellen (BCR-ABL ⁺)	3.02
A2780 & A2780CisR	Ovarialkarzinom	7.1 & 5.8
Kyse510 & Kyse510CisR	Speiseröhrenkarzinom	2.9 & 6.9

Zusammenfassend wurden erste Einblicke in die biologische Anwendung von α -Aminoxyoligopeptiden als PPI-Inhibitoren gegeben. Die Verbindungen **1[#]** und **2[#]** repräsentieren die ersten Peptidomimetika, die die Funktion von HSP90 über eine spezifische Bindung an die C-terminale Domäne von HSP90 blockieren und dadurch die Dimerisierung des Chaperonproteins inhibieren. Der HSP90-CTDi Aminoxyrone (**1[#]**) löst dabei *in vitro* und *in vivo* keine HSR aus und zeigt sowohl in sensitiven Zellen als auch imatinibresistenten CML-Zelllinien vergleichbar gute Aktivitäten. Somit stellen α -Aminoxypeptide eine wertvolle Substanzklasse für die Entwicklung von Helixmimetika für die Inhibition von Protein-Protein-Interaktionen dar.

Zusammengefasst wurden in dieser Dissertation mit den peptidbasierten HDAC6-Inhibitoren (Kapitel 3 und Kapitel 4) und den α -Aminoxyoligopeptiden (Kapitel 5 und Kapitel 6) zwei neuartige peptidomimetische Substanzklassen entwickelt, die bemerkenswerte antitumorale Aktivitäten aufweisen und potentielle Anwendungen in der Tumorthherapie ermöglichen.

³⁹ BCR-ABL1 ist ein Onkofusionsprotein, das eine wesentliche Rolle bei der CML-Pathogenese spielt. Es entsteht durch Translokation der Gene ABL1 und BCR. Durch Punktmutationen der ABL1-Kinase können Klone entstehen, die gegenüber Tyrosinkinaseinhibitoren wie Imatinib resistent sind.

8 Summary and Outlook

Despite enormous advances in the area of tumor therapy, cancer is still the second leading cause of death in high-income countries, following cardiovascular diseases. Thus, innovative strategies for the treatment of cancer as well as the development of new cancer drug candidates, that are selective for cancer cells, are urgently needed to decrease side effects and overcome drug resistance mechanism of current anticancer agents. Elucidation of fundamental biological processes that are involved in the development and progression of cancer enable new approaches and targets for cancer therapies. Histone deacetylases (HDAC) regulate important cellular functions in cancer-related processes such as cell proliferation, cell-cycle arrest and apoptosis. Thus, inhibitors of histone deacetylases (HDACi) are among the most promising candidates for the treatment of various cancers.^[6,7] Another target for cancer therapy is heat shock protein 90 (HSP90), due to its involvement in regulatory processes.^[9] HSP90 acts as a molecular chaperon and ensuring correct folding of client proteins, among them several oncogenic proteins.^[8] HSP90i provide attractive approaches for targeting cancer cells.^[8-11] Furthermore, peptide analogues (peptidomimetics) offer interesting applications as antitumor agents.^[12-14] Peptidomimetics imitate essential elements and/or secondary structures of natural occurring peptides and therefore are able to mimic their biological properties.^[16,17] Amino acid analogues (peptidomimetics) feature several advantages over native peptides, such as the synthetic accessibility, amenability to modifications and the predictability and stability of their folding behaviour. This thesis focused on the synthesis, conformational analysis and biological properties of novel antitumor active peptidomimetics.

The first project of this work dealt with the synthesis, biological evaluation and structural properties of a novel class of HDAC6 inhibitors. Based on peptide-based HDACi (**1**^{*}) described by *Fairlie* and co-workers,^[9,10] peptoid-based HDAC6i (**2**^{*}) were developed by performing systematic structural modifications (Fig. 8.1). The peptoid backbone, which is achieved by a side chain shift from the α -carbon to the neighbouring amide nitrogen, feature several advantages over peptides including proteolytic stability and increased cell permeability. Additionally, it also allowed a diversity-oriented synthesis of the target compounds. The selectivity for HDAC6 should be increased by incorporation of a benzylic instead of the classical aliphatic linker and through the peptoid-based branched structure of the cap group.

2e*, **2f***, **2i*** and **2l*** were selected for further biological investigations. In HDAC enzyme assays against the recombinant HDACs 2, 4, 6 and 11, a preference for the inhibition of HDAC6 against other HDAC isoforms was observed (Tab. 8.1). **2i*** was found to be the most potent HDAC6 inhibitor (IC₅₀: 1.59 nM). In addition, the peptoid-based HDACi **2f*** showed a promising selectivity profile.

Tab. 8.1: Inhibitory activities of **2e***, **2f***, **2i*** and **2l*** against HDAC isoforms 2, 4, 6 and 11.

compound	IC ₅₀ [nM]				selectivity indices ^a		
	HDAC2	HDAC4	HDAC6	HDAC11	SI 2/6	SI 4/6	SI 11/6
2e*	799	>10000	6.52	227	123	>1533	35
2f*	4366	>10000	11.2	421	391	>896	38
2i*	200	>10000	1.59	63.2	125	>6250	40
2l*	623	4377	2.84	25.0	228	>1563	9
TSA	18.9	nd	3.18	17.8	4	-	4
TMP269	nd	169	nd	nd	-	-	-

The inhibition of HDAC isoforms was determined by *Reaction Biology Corporation* (Malvern, PA, USA). ^aSelectivity index (SI) of HDAC6 over HDAC2, HDAC4 or HDAC11 (e.g. SI 1/6 = IC₅₀(HDAC1)/IC₅₀(HDAC6)).

The HDAC6 inhibition of compounds **2e***, **2f***, **2i*** and **2l*** was further validated in the *Kassack* lab by investigating the acetylation status of the natural HDAC6-substrate α -tubulin. The results of a western blot revealed that **2e***, **2f***, **2i*** and **2l*** caused α -tubulin hyperacetylation and thus confirmed the HDAC6 inhibitory effect of these compounds in a cellular environment. Furthermore, the peptoid-based HDACi showed chemosensibilizing properties in combination studies with cisplatin, where the most potent HDACi **2i*** completely reverted the resistance towards cisplatin in the cisplatin-resistant cell line Cal27⁴⁰ CisR.

NMR spectra of **2a*-d***, **f*-h***, **j*-k*** at room temperature and **2e***, **2i*** and **2l*** at -30°C displayed the presence of two sets of NMR signals. Thus, **2f*** and **2i*** were selected to analyse this phenomenon. Variable temperature NMR studies (VT-NMR) in the low- and high-temperature range revealed the occurrence of *cis/trans* amide bond rotamers in peptoid-based hydroxamic acids. A strong upfield-shift of the methylene resonance signals was observed in the case of the major conformer. Due to shielding by the aryl ring (R²), this upfield-shift only is possible for the *cis*-rotamer, indicating a *cis* amide bond preference.^[251] This purpose was supported by a X-ray crystal structure performed by *Dr. Reiß* (Inorganic Chemistry and Structural Chemistry, University Düsseldorf). The crystal

⁴⁰ Tongue squamous cancer cell line

structure of **2f*** confirmed the *cis* amide bond geometry in the solid state. In cooperation with the group of *Prof. Dr. Gohlke* (Pharmaceutical and Medical Chemistry, University of Duesseldorf), the binding modes of HDACi **2f*** and **2i*** were analyzed. Both the *cis*- and *trans*-rotamers of **2f*** and **2i*** were investigated by docking studies with HDAC2, HDAC4 and HDAC6. Regardless of which compound (**2f*** or **2i***) and rotamer (*cis* or *trans*), a preferred binding in HDAC6 could be observed. Moreover, the *trans*-rotamer of **2f*** showed a higher affinity to bind in HDAC6 than its corresponding *cis*-rotamer.

In summary, in the first project the peptoid-based hydroxamic acids were developed as a novel class of potent and preferential HDAC6 inhibitors. Among this library of peptoid-based HDACi, compounds **2f*** and **2i*** represent the most promising derivatives. Thus, HDACi **2f*** and **2i*** were selected as lead structures for the preparation of further peptoid-based hydroxamic acids with improved HDAC activity and cytotoxic properties. For this purpose, systematic structural modifications were implemented in the regions A-C (Fig. 8.4). In detail, the substituent in position R¹ (region A) was extensively varied, a number of different alkylated and *N*-alkylated benzoic acids were used in region B (R²) and several derivatives with additional substituents in region C (R³/R⁴) were synthesized. These variations should also enable deeper insights into the structure-activity relationships of this class of peptoid-based HDACi.

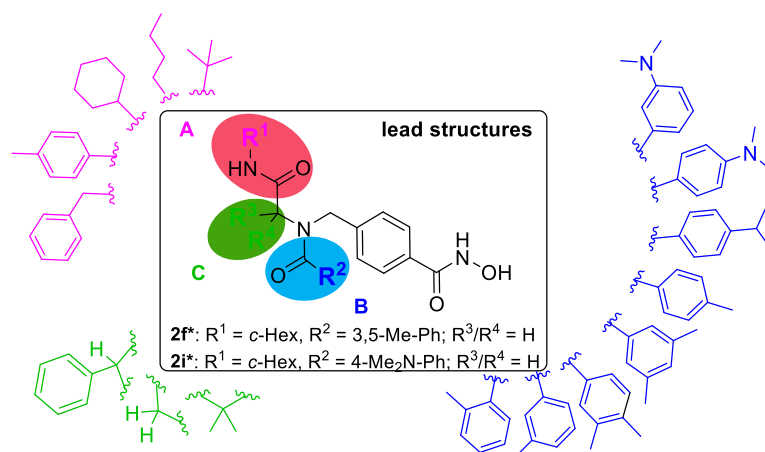
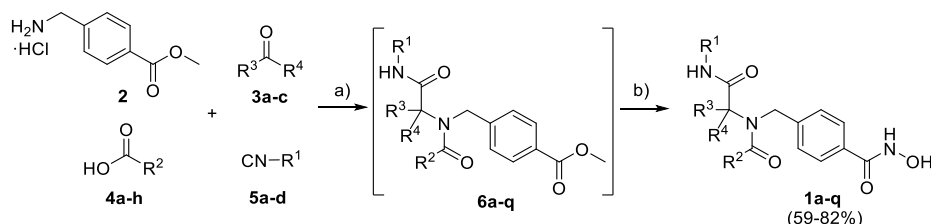


Fig. 8.4: Lead structures and variations implemented of the residues R¹-R⁴ in region A-C.

In order to improve the overall efficiency of the previously described two-step multicomponent synthesis (chapter 5), a microwave-assisted one-pot five component approach was developed. For this purpose, several reaction conditions were investigated independently for both steps (step I: U-4CR, step II: hydroxylaminolysis) under microwave irradiation. For the U-4CR the best results were achieved at 45 °C and 60 min and in the case of the hydroxylaminolysis, a temperature of 55 °C and a reaction time of

30 min could be determined as the most appropriate conditions. Finally, in the last step the optimized conditions for both steps were combined in a one-pot reaction without isolation and purification of the Ugi product. This optimized microwave-assisted five component one-pot approach via a sequential U-4CR and hydroxylaminolysis was then used for the preparation of the desired peptoid-based HDACi **1a-q**, that could be obtained in 59-82% yield in less than 2 hours (Scheme 8.1). This one-pot multicomponent synthesis is a time-efficient and resource-saving approach for preparation of peptoid-based HDACi.



Scheme 8.1: Microwave-assisted five component one-pot synthesis of HDACi **1a-q**. a) (i) **2**, **3a-c**, Et₃N, MeOH, 4 Å MS, 150 W, 45°C, 20 min; (ii) R¹-NC **5a-d**, R²-COOH **4a-h**, 150 W, 45°C, 60 min; (b) H₂NOH·HCl, Na, MeOH, 150 W, 55°C, 30 min.

Subsequently, compounds **1a-q** were tested in the *Kassack* lab for their cytotoxicity in a MTT assay and their HDAC inhibitory activity in a whole cell HDAC assay. Most peptoid-based hydroxamic acids **1a-q** showed comparable or even better cytotoxic properties and HDAC inhibition than the reference compounds cisplatin and vorinostat. In addition, the HDACi **1a-q** exhibited improved anticancer activities compared with the first library of HDAC inhibitors (**2a^{*}-I^{*}**). Notably, peptoid-based hydroxamic acids with a 4-dimethylaminophenyl residue in position R² (**1n**, **1q**, Fig. 8.5) and/or benzyl substituent in position R¹ (**1p**, **1q**, Fig. 8.5) represent potent HDAC inhibitors. On the other hand, additional substituents in position R³ and R⁴ resulted in decreased HDAC inhibition and cytotoxicity (see **1k** and **1k**, Table 6.2 and 6.3). According to the HDAC inhibition, **1n**, **1p** and **1q** were identified as the most active compounds with IC₅₀ values in the submicromolar range (Fig. 8.5).

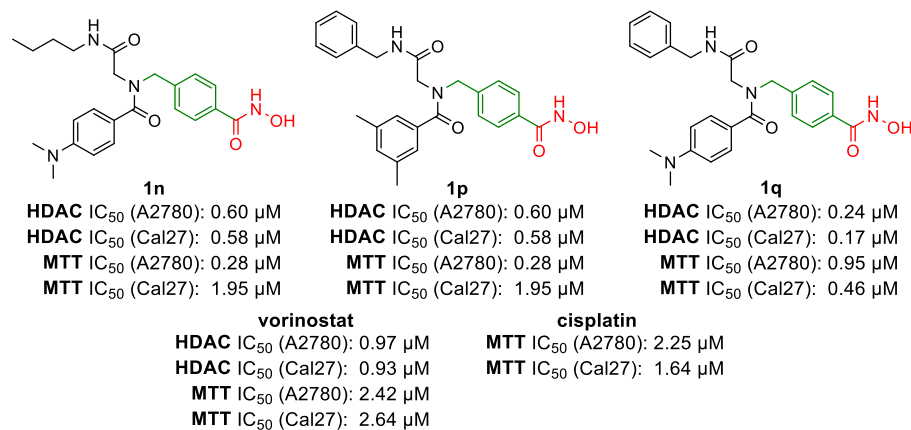


Fig. 8.5: HDAC inhibition and cytotoxicity of the most promising compounds **1n**, **1p** and **1q**.

1n, **1p** and **1q** as well as HDACi **2f*** and **2i*** were tested for their inhibition against the recombinant HDAC1 and HDAC6 in HDAC enzyme assays (Tab. 8.2). **1n** could be identified as a potent and preferential HDAC6 inhibitor with a selectivity index (SI 1/6) of 34 and an IC₅₀ value of 9 nM. Furthermore, HDACi **1q** exhibited comparable high activities against HDAC1 and HDAC6 and showed no isoform-preference similar to the reference compound vorinostat. Thus, the observed strong cytotoxicities of **1q** are in agreement with an unselective inhibition of several HDACs (Fig. 8.5).

Tab. 8.2: Inhibitory activities of **1n**, **1p**, **1q**, **2f*** and **2i*** against HDAC1 and HDAC6.

compound	R ¹	R ²	HDAC IC ₅₀ [nM]		SI 1/6
			HDAC1	HDAC6	
1n	<i>n</i> -Bu	4-Me ₂ N-Ph	306 ± 32	9 ± 1	34
1p	Bn	3,5-Me-Ph	423 ± 39	121 ± 13	4
1q	Bn	4-Me ₂ N-Ph	11 ± 5	11 ± 8	1
2f*	<i>c</i> -Hex	3,5-Me-Ph	346 ± 71	32 ± 6	11
2i*	<i>c</i> -Hex	4-Me ₂ N-Ph	43 ± 11	16 ± 4	3
vorinostat			56 ± 9	49 ± 6	1

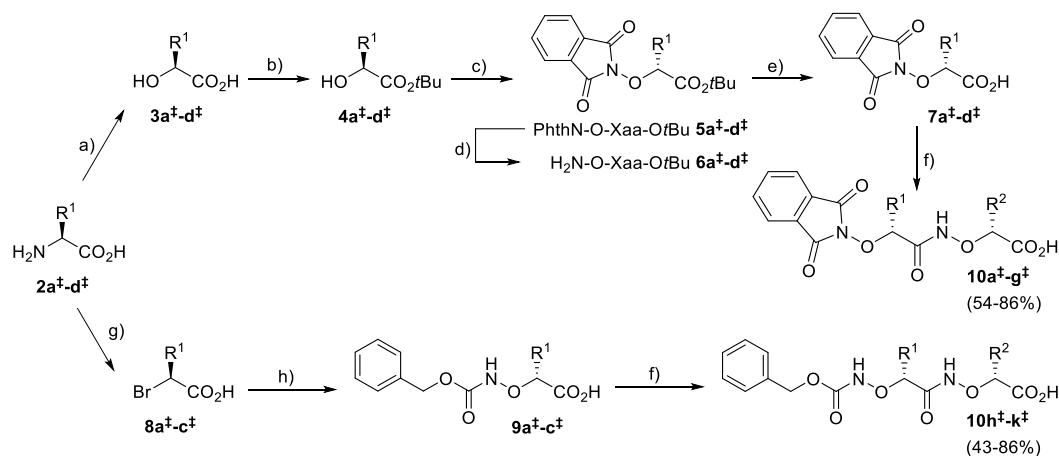
SI 1/6: Selectivity index of HDAC6 over HDAC1 (SI 1/6 = IC₅₀(HDAC6)/ IC₅₀(HDAC1)).

Notably, peptoid-based HDACi with a 4-dimethylaminophenyl residue in position R² (**1n**, **1q** and **2i***) displayed very potent HDAC6 activities (**1n**: 9nM, **1q**: 11nM, **2f***: 16nM). Among these compounds, a reduction of the HDAC1 inhibitory effect could be observed according to their R¹ residue in the order benzyl > cyclohexyl > *n*-butyl (**1q**: 11 nM > **2i***: 43 nM > **1n**: 306 nM). Notably, a *n*-butyl moiety achieved a remarkable improvement of HDAC6 selectivity (**1n**: SI 1/6 = 34). Replacement of the 4-dimethylaminophenyl by a 3,5-dimethylphenyl substituent in position R² led to an decreased HDAC1 inhibition (**1q**: 11 nM vs. **1p**: 423 nM and **2i***: 43 nM vs. **2f***: 346 nM). However, benzyl derivatives showed a reduction of the HDAC6 inhibition (**1q**: 11 nM vs. **1p**: 121 nM), whereas the potency could be retained in the case of cyclohexyl HDACi (**2i***: 16 nM vs. **2f***: 32 nM).

Taken together, peptoid-based hydroxamic acids represent a novel class of promising HDAC inhibitors. The selectivity may be modulate with regard to a specific HDAC subclass by the suitable variation of individual substituents or exchange of structural moieties. This has already been successfully applied in other research projects. Among others, peptoid-based selective class I HDACi were developed. The replacement of the hydroxamate moiety by a 2-aminoanilide-based ZBG led to compounds that showed no significant inhibition of HDAC6.^[252] In this thesis, **1n** represents a valuable lead structure for future efforts towards the structure-based design of novel HDACi with increased selectivity for HDAC6 and optimized pharmacokinetic and pharmacodynamic properties.

The second part of this thesis focused on α -aminoxy oligopeptides as a novel class of peptidomimetic foldamers with cytotoxic properties. To this end, the synthesis, biological and structural properties of α -aminoxy oligopeptides were investigated. Oligopeptides constructed from α -aminoxy acids adopt remarkable stable helical conformations and are resistant to enzymatic degradation, which have been demonstrated by Yang and coworkers.^[161,163–165,168,253,254] Thus, α -aminoxy oligopeptides were chosen as promising peptide analogs for the synthesis of peptidomimetic foldamers.

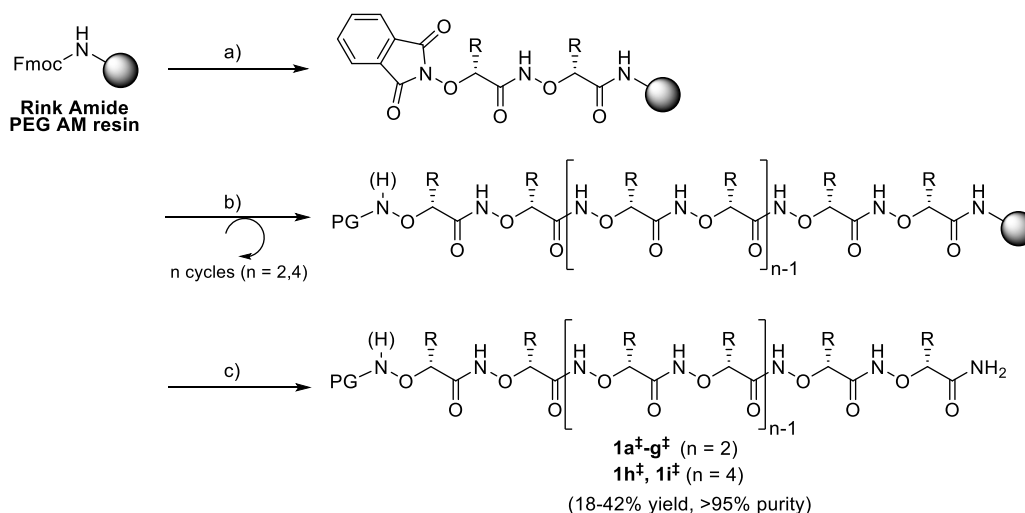
The synthesis of longer peptide sequences containing repetitive aliphatic side chains, such as *sec*-butyl, can be difficult, which has been shown previously.^[199] In order to gain an improved synthetic access to longer α -aminoxy oligopeptides, a straightforward combination of solution- and solid-phase supported methods were used. First, a series of phthaloyl- (Phth, **5a[‡]-d[‡]**)^[166] and carboxybenzyl-protected (Cbz, **9a[‡]-c[‡]**)^[255,256] D- α -aminoxy acids were synthesized from their respective L- α -amino acids according to literature procedures (Scheme 8.2). Dimeric building blocks were then synthesized in solution by a EDC·HCl/HOBt mediated amide coupling reaction of *N*-protected D- α -aminoxy acids (**5a[‡]-d[‡]**, **9a[‡]-c[‡]**) and derivatives with a free aminoxy group (**6a[‡]-d[‡]**, H₂N-^{NO}Xaa-O*t*Bu). The desired unprotected α -aminoxy dipeptide acids **10a[‡]-k[‡]** were subsequently obtained by treatment with TFA/DCM.



Scheme 8.2: Synthesis of α -aminoxy dipeptides **10a[‡]-k[‡]**. a) NaNO₂, H₂SO₄, -10°C→rt, 16 h; b) (i) AcCl, 60°C, 5 h; (ii) *t*BuOH, DCC, DMAP, DCM, rt, 16 h; (iii) K₂CO₃, MeOH, rt, 12 h; c) PhthN-OH, PPh₃, DIAD, THF, 0°C→rt, 16 h; d) H₂N-NH₂·H₂O, MeOH, rt, 1.5 h; e) TFA/DCM (1:1), rt, 1 h; f) (i) **6a[‡]-d[‡]**, EDC·HCl, HOBt, DCM, rt, 16 h; (ii) TFA/DCM (1:1), RT, 1 h; g) NaNO₂, KBr, H₂SO₄, -10°C→RT, 16 h; h) CbzNH-OH, NaH, THF, RT, 16 h.

The α -aminoxy oligopeptides (hexamers and decamers) were then synthesized by solid-phase synthesis using α -aminoxy dipeptide acids **10a[‡]-k[‡]** as building blocks (Scheme 8.3). An investigation of several well-established coupling reagents revealed

HOBt/BOP/NEM as the most appropriate coupling system for the solid-phase supported amide coupling reaction. This synthetic strategy consisting of a combination of solution- and solid-phase-supported methods was then used to prepare nine α -aminoxy oligopeptides **1a[‡]-i[‡]** in 18-42% isolated yield and purities greater than 95% (Scheme 8.3). Notably, decamers **1h[‡]** and **1i[‡]** represent the longest α -aminoxy peptides reported so far.



Scheme 8.3: Solid-phase synthesis of α -aminoxy peptides **1a[‡]-i[‡]**. a) (i) 20% piperidine in DMF, rt, 2 x 15 min; (ii) Phth-^{NO}Xaa-^{NO}Xaa-OH, BOP, HOBt, NEM in DMF, rt 24 h; b) 5% hydrazine hydrate in MeOH, rt, 2 x 15 min; (ii) PG-^{NO}Xaa-^{NO}Xaa-OH, BOP, HOBt, NEM in DMF, rt, 24 h; c) TFA/TES (98:2, v:v), rt, 1.5 h.

The α -aminoxy peptides **1a[‡]-i[‡]** were tested in the *Kassack* lab for their cytotoxic activity against the cancer cell lines Kyse510 and A2780 and their cisplatin resistant subclones Kyse510 CisR⁴¹ and A2780 CisR⁴². The hexamer **1e[‡]** and the decamers **1i[‡]** and **1h[‡]** were identified as the most promising compounds with IC₅₀ values in the low micromolar range, which showed similar cytotoxicities than the reference cisplatin (Fig. 8.6). Interestingly an increased cytotoxicity was observed for the decamers compared to hexamers. Furthermore, the replacement of the phthaloyl (Phth, **1d[‡]**) by a carboxybenzyl protecting group (Cbz, **1e[‡]**) led to a up to tenfold increase in the anticancer activity (**1d[‡]**: MTT(Kyse510) = 58.0 μ M, MTT(A2780) = 57.5 μ M vs. **1e[‡]**: MTT(Kyse510) = 5.7 μ M, MTT(A2780) = 7.5 μ M; publication II Tab. 3[‡]). In order to probe the selectivity of α -aminoxy peptides **1a[‡]-i[‡]** for cancer cells, the cytotoxicity of **1a[‡]-i[‡]** was investigated against human embryonic kidney cells (HEK293). Remarkably, the most potent α -aminoxy peptides **1e[‡]**, **1h[‡]** and **1i[‡]** are less toxic to normal cells than to the cancer cell lines Kyse510 and A2780 (Fig. 8.6).

⁴¹ Esophageal squamous cancer cell line

⁴² Ovarian cancer cell line

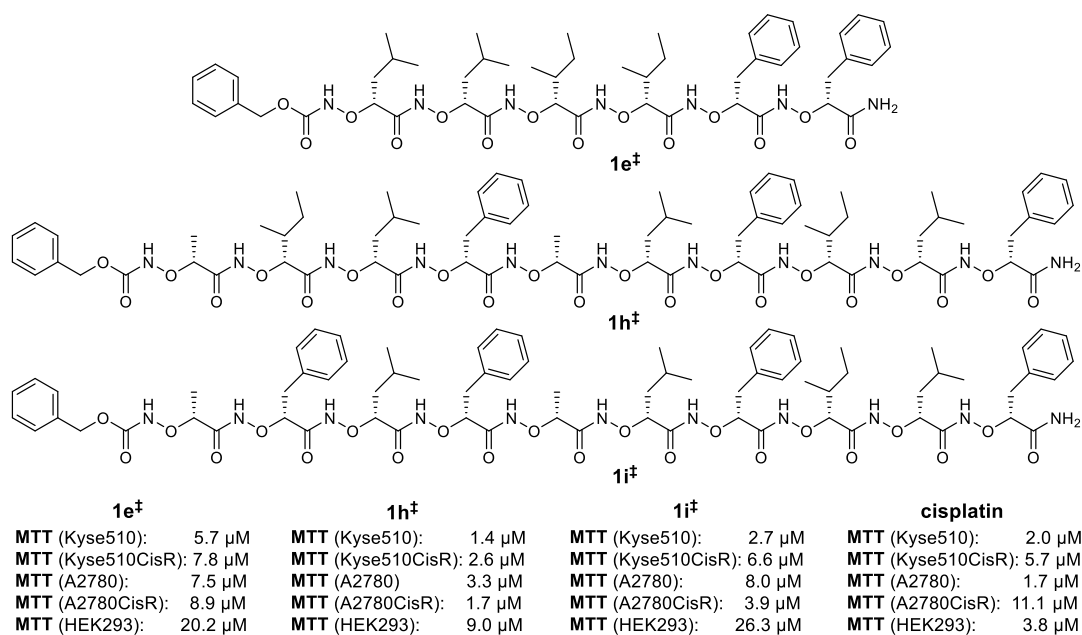


Fig. 8.6: Cytotoxicity of α -aminoxy oligopeptide **1e[‡]** (hexamer), **1h[‡]** and **1i[‡]** (decamers).

In addition, the secondary structure of the α -aminoxy peptides was analyzed via X-ray crystallography, molecular modeling, NMR spectroscopy, molecular dynamics (MD) simulations and CD spectroscopy. The X-ray crystal structure of the α -aminoxy peptide **1b[‡]** was solved in cooperation with *Dr. Höppner* (X-ray facility and crystal farm, University of Düsseldorf) and *Dr. Reiß*. It revealed a right-handed 2_8 -helix with precisely two residues per turn and a helical pitch of 5.8 Å (Fig. 8.7 A and B) in the solid state. The 2_8 -helix is rather flat compared to conventional helices, such as α -helices or 3_{10} -helices. In the crystal packing, adjacent molecules are head-to-tail connected by hydrogen bonds resulting in a zig-zag orientation of peptide chains. The side chains of neighboring zig-zag chains interlock with each other. The secondary structure is stabilized by the formation of consecutive eight-membered rings via intramolecular hydrogen bonding, leading to multiple α -NO-turns. The side chains of the α -aminoxy peptide **1b[‡]** alternate on opposite sides of the 2_8 -helix. Additionally, molecular dynamic (MD) simulations conducted by the *Gohlke* lab showed that side chains of the hexamer **1b[‡]** can mimic the substitution pattern of canonical α -helices and 3_{10} -helices (Fig. 8.7 C).

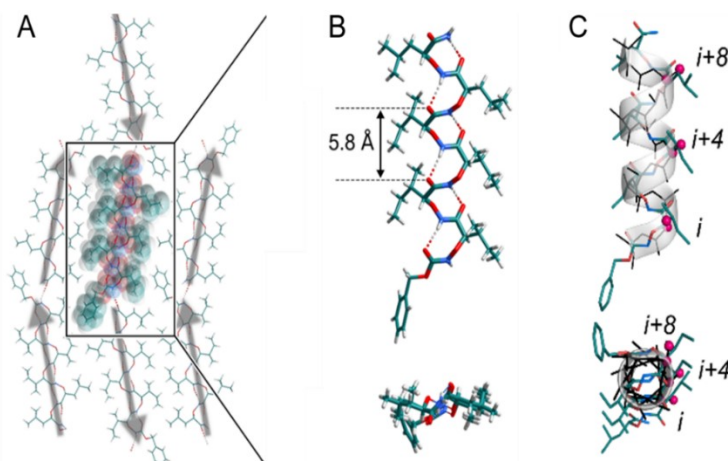


Fig. 8.7: X-ray structure of $1b^{\ddagger}$. (A) crystal packing of $1b^{\ddagger}$. Arrows denote the orientation of the α -aminoxy hexapeptides ($C \rightarrow N$ -terminus); (B) Close-up view of $1b^{\ddagger}$ in side view (top, C -terminus at the top) and rotated by 90° (bottom, C -terminus oriented towards the viewer); (C) Orientation of side chains of $1b^{\ddagger}$ overlaid onto a canonical α -helix in side view (top) and rotated by 90° (bottom).

Furthermore, 2D NMR spectroscopy (ROESY) and MD simulations in chloroform (Gohlke lab) as well as CD spectroscopy in trifluoroethanol (TFE) and acetonitrile (MeCN) (group of Dr. Lüdeke, Pharmaceutical science, University of Freiburg) were performed. The 2_8 -helix was identified as the predominant conformation in organic solvents. In agreement with previously published data, a ROE signal pattern characteristic for repetitive α -NO-turns was observed in 2D ROESY spectra.^[165] Each internal α -aminoxy proton (NH_i) showed a strong ROE to its own α -methine proton ($C_\alpha H_i$) and a weaker ROE cross-peak to the neighboring backbone methine proton ($C_\alpha H_{i-1}$). In organic solvents, a 2_8 -helical conformation with repetitive α -NO turns was confirmed by MD simulations in chloroform and CD spectroscopy in TFE and MeCN. However, in an aqueous environment, a pH-dependent equilibrium between the 2_8 -helix and another conformation was observed. A theoretical transition pK_a of 8.2 between the 2_8 -helix and a disorderd structure could be determined (Fig. 8.8).

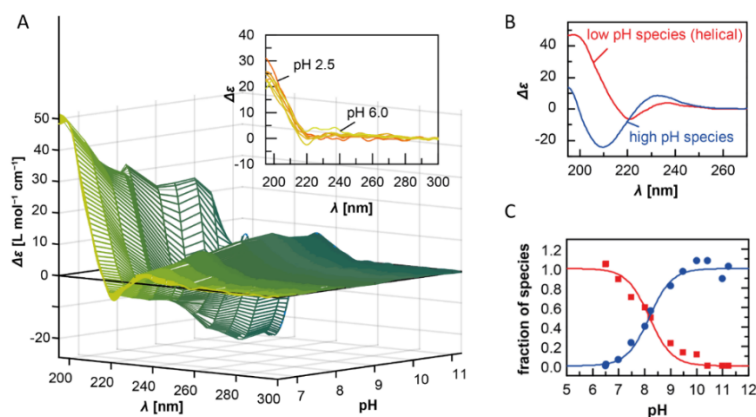


Fig. 8.8: pH-dependent CD spectra of $1g^{\ddagger}$ and pure CD spectra of involved species. (A) 3D representation of recorded CD spectra of $1g^{\ddagger}$ from pH 6.5-11.2 (big picture) and pH 2.5-6.0 (inset); (B) pure spectra of the two involved conformations; (C) corresponding titration curves.

In order to gain insight to the mode of action of α -aminoxy peptides, decamers (**1h**[‡], **1i**[‡]) and selected hexamers (**1b**[‡], **1f**[‡], **1g**[‡]) were tested in the *Kassack* lab for their membrane damaging effects and their ability to induce apoptosis. Whereas the decamers significantly increased the membrane damage with increasing concentrations (2 μ M to 5 μ M), hexamers (50 μ M) showed no change in membrane damage. To determine whether the chain length of the α -aminoxy peptides contributes to the degree of folding and thereby correlates with their preferred mode of action, CD measurements in the presence of liposomes as a model for membranes were performed in the *Lüdeke* lab. Notably, decamers of α -aminoxy peptides showed an increased propensity to fold into the 2_8 -helix in a membrane environment. Thus, the membranolytic properties of the decamers **1h**[‡] and **1i**[‡] may partly be associated with an increased ability to adopt ordered helical structures.

Taken together, this project revealed that α -aminoxy peptides represent a new and promising class of peptidomimetic foldamers with remarkable cytotoxic properties against a panel of tumor cell lines. The α -aminoxy peptides can adopt a unique stable 2_8 -helical conformation that can mimic the spatial arrangement of the peptide side chains in α -helices and 3_{10} -helices. α -Aminoxy peptides thus represent valuable compounds that may enable the development of peptidomimetics with potential applications as modulators of protein-protein interactions. An attractive protein target for cancer therapy is heat shock protein 90 (HSP90). The molecular chaperone facilitates the correct folding of client proteins, among them oncogenic proteins and HSP90 is therefore involved in cancer-associated processes.^[8,9] Furthermore, HSP90 expression is highly enriched in several cancer types and HSP90 can contribute to the malignant transformation of cells.^[10] The majority of known HSP90 inhibitors (HSP90i) target the ATP binding pocket in HSP90's *N*-terminal domain and thereby initiate a survival mechanism in cancer cells referred to as heat shock response (HSR).^[8,9,227] This HSR potentially weakens the efficacy of these HSP90 inhibitors. Compounds that interact with the *C*-terminal dimerization domain (CTD) could circumvent this stress response. Thus, inhibition of HSP90 via its *C*-terminus is an attractive approach for cancer therapy.^[8,222] The CTD dimerization interface is formed by a characteristic four helix bundle. Recently, *Gohlke* and *Groth* resolved hot spots in the HSP90 CTD dimerization interface (I688, Y689, I692, L696, Fig. 8.9).^[249] Together with the *Jose* lab they identified the first peptidic inhibitors shown to bind to the CTD.^[250] However, peptides feature several drawbacks as drugs. Based on this knowledge, α -aminoxy peptides were used for the development of peptidomimetic HSP90 CTD dimerization inhibitors. The hot spot amino acids were used

for the structure-based design of the inhibitors and two α -aminoxy hexapeptides **1[#]** and **2[#]** that possess appropriate side chains to mimic the hot spots were designed (Fig. 8.9).

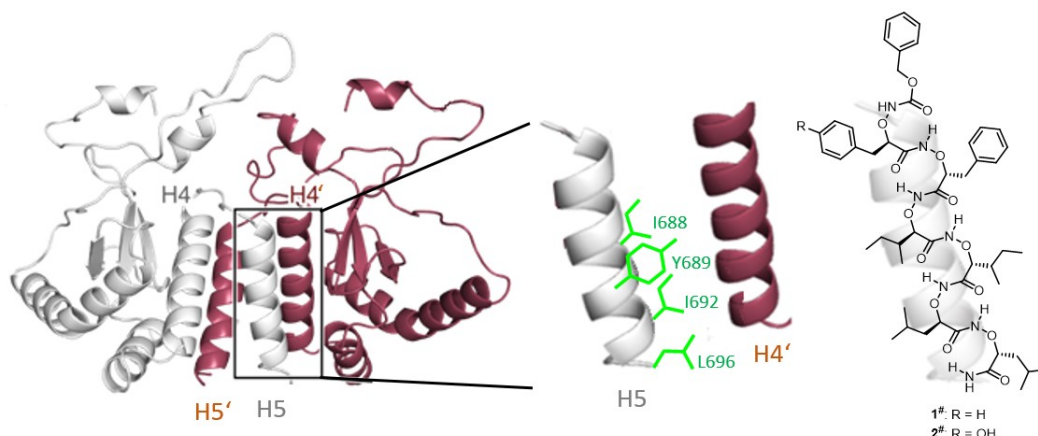
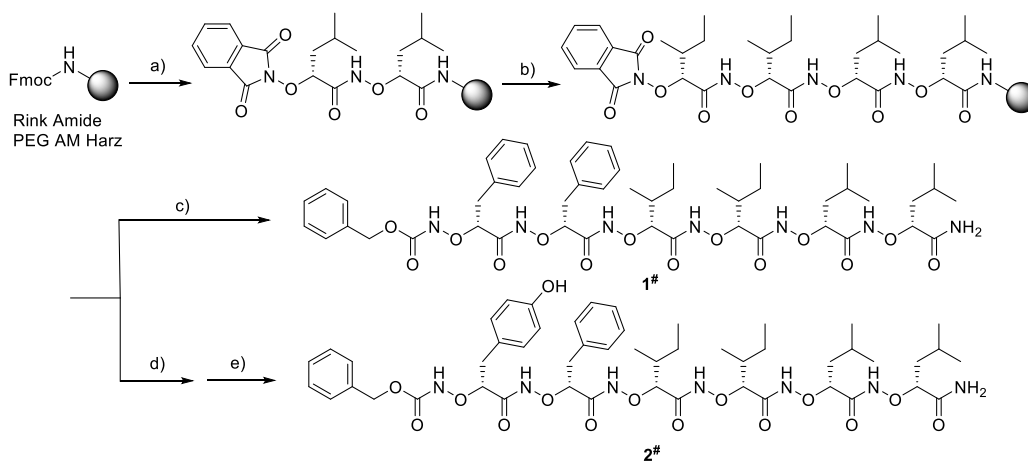


Fig. 8.9: Hot spot residue located at the CTD-interface of helix H5 and inhibitor design.

A combination of solution- and solid-phase supported methods was used for the synthesis of α -aminoxy hexapeptides **1[#]** and **2[#]**.^[257] Initially, a series of monomeric and dimeric building blocks were prepared in solution according to previously described literature protocols.^[166,255–258] The target compounds **1[#]** and **2[#]** were then prepared via solid-phase synthesis using α -aminoxy acids and α -aminoxy dipeptide acids as building blocks in the presence of BOP/HOBt/NEM as the coupling system. In the case of **2[#]** the final two α -aminoxy acids were coupled as monomers. The desired hexapeptides were purified by semipreparative RP-HPLC to >95% purity and were obtained in 39% (**1[#]**) and 30% (**2[#]**) isolated yield (Scheme 8.4).



Scheme 8.4: Solid-phase synthesis of α -aminoxy hexapeptides **1[#]** and **2[#]**. a) (i) 20% piperidine in DMF, rt, 2 x 15 min; (ii) Phth-^{NO}Leu-^{NO}Leu-OH, BOP, HOBt, NEM in DMF, rt, 24 h; b) 5% hydrazine hydrate in MeOH, rt, 2 x 15 min; (ii) Phth-^{NO}Ile-^{NO}Ile-OH, BOP, HOBt, NEM in DMF, rt, 24 h; c) (i) 5% hydrazine hydrate in MeOH, rt, 2 x 15 min; (ii) Cbz-^{NO}Phe-^{NO}Phe-OH, BOP, HOBt, NEM in DMF, rt, 24 h; (iii) TFA/TES (98:2, v:v), rt, 1.5 h; d) (i) 5% hydrazine hydrate in MeOH, rt, 2 x 15 min; (ii) Phth-^{NO}Phe-OH, BOP, HOBt, NEM in DMF, rt, 24 h; e) 5% hydrazine hydrate in MeOH, rt, 2 x 15 min; (ii) Cbz-^{NO}Tyr(*t*Bu)-OH, BOP, HOBt, NEM in DMF, rt, 24 h; (iii) TFA/TES (98:2, v:v), rt, 1.5 h.

Investigation of the conformational properties by CD spectroscopy (*Lüdeke* lab) and 2D NMR spectroscopy (ROESY) confirmed that the α -aminoxy hexapeptides **1[#]** and **2[#]** are able to fold into the desired 2_8 -helix. In agreement with previously published data, a ROE signal pattern characteristic for repetitive α -NO-turns was observed in the 2D ROESY spectra.^[165] Each internal α -aminoxy proton (NH_i) showed a strong ROE signal to its own α -methine proton ($\text{C}_\alpha\text{H}_i$) and a weaker ROE cross-peak to the neighboring backbone methine proton ($\text{C}_\alpha\text{H}_{i-1}$). The 2_8 -helical conformation was also confirmed by CD spectroscopy in trifluoroethanol and sodium phosphate buffer (pH 7). Thus, the target compounds **1[#]** and **2[#]** are able to adopt the required secondary structure to mimic the orientation of the HSP90 CTD dimerization hot spots.

To provide a structural model of the binding mode of the α -aminoxy hexapeptides at the HSP90 CTD, MD simulations and effective binding energy calculations were performed in the *Gohlke* lab. The computational results suggest that the compounds bind to the HSP90 CTD dimerization interface and can mimic hot spots on helix H5.

Additionally, the biological properties of **1[#]** and **2[#]** were investigated extensively. A dimerization assay based on the autodisplay technology (performed in the group of *Prof. Dr. Jose*, Pharmaceutical and Medical Chemistry, University Münster) showed that the compounds can inhibit HSP90 dimer formation. Furthermore, binding of hexapeptides **1[#]** and **2[#]** to the C-terminal dimerization domain of HSP90 was confirmed by microscale thermophoresis measurements (*Jose* lab) with the CTD of HSP90 (**1[#]**: $K_D = 27.4 \mu\text{M}$, **2[#]**: $K_D = 44.2 \mu\text{M}$). The efficacy of **1[#]** and **2[#]** to inhibit HSP90 was also analyzed *in vitro* in a cell-based luciferase refolding assay using the CML cell line K562 (group of *Prof. Dr. Hauer*, Department of Pediatric Oncology, Hematology and Clinical Immunology, Düsseldorf). The cytotoxicity of the compounds was tested in viability assays against myeloid leukemia cells (*Hauer* lab) and solid tumor cell lines (*Kassack* lab, Tab. 8.3). Compound **1[#]** ($\text{IC}_{50}(\text{K562}) = 5.72 \mu\text{M}$) represent the more promising hexapeptide compared to **2[#]** ($\text{IC}_{50}(\text{K562}) = 16.8 \mu\text{M}$). In addition, **1[#]** (termed aminoxyrone) showed higher efficacy in the autodisplay dimerization assay, MST and luciferase refolding assay. Hence, aminoxyrone was selected for further biological experiments performed in the *Hauer* lab. **1[#]** exhibited anti-proliferative and cytotoxic activity in several human myeloid leukemic cell lines (K562, KCL22, HL60, Mutz-2) and induced cell cycle arrest and early differentiation. Notably, imatinib-resistant⁴³ CML cell lines (K562r, KCL22r) was equally

⁴³ Sensitive K562 and KCL22 cells were treated with imatinib to generate imatinib-resistant K562r and KCL22r.

sensitive to **1[#]** as compared to imatinib-sensitive cell lines (K562, KCL22) ($IC_{50}(\text{K562}) = 5.72 \mu\text{M}$ vs. $IC_{50}(\text{K562r}) = 6.24 \mu\text{M}$; $IC_{50}(\text{KCL22}) = 2.74 \mu\text{M}$ vs. $IC_{50}(\text{KCL22r}) = 2.86 \mu\text{M}$, Tab. 8.3). In addition, **1[#]** showed comparable activities in imatinib-resistant Ba/F3 cell lines expressing clinically relevant BCR-ABL1⁴⁴ mutant isoforms (T315I, M351T and E255K, Tab. 8.3). Furthermore, a luciferase xenograft tumor model using human CML cell line K562 confirmed the *in vivo* efficacy of aminoxyrone (lab of *Dr. Grez* (Institute for Tumor Biology and Experimental Therapy, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt). Notably, **1[#]** significantly reduced tumor burden with respect to the tumor weight. Also, aminoxyrone does not induce HSR *in vitro* and *in vivo*.

Tab. 8.3: Growth inhibition (IC_{50}) by aminoxyrone (**1[#]**).

cell line	origin	IC_{50} [μM]
K562 & K562r	CML (BCR-ABL ⁺)	5.72 & 6.24
HL60	AML (BCR-ABL ⁻)	7.17
KCL22 & KCL22r	CML (BCR-ABL ⁺)	2.74 & 2.86
Mutz-2	AML (BCR-ABL ⁻)	10.10
BA/F3 (T315I)	murine pro B cells (BCR-ABL ⁺)	3.02
BA/F3 (M351T)	murine pro B cells (BCR-ABL ⁺)	3.11
BA/F3 (E255K)	murine pro B cells (BCR-ABL ⁺)	3.02
A2780 & A2780CisR	ovarian carcinoma	7.1 & 5.8
Kyse510 & Kyse510CisR	esophageal carcinoma	2.9 & 6.9

Taken together, this study provides initial insights into the biological application of α -aminoxy peptides as PPI inhibitors. The α -aminoxy hexapeptides **1[#]** and **2[#]** represent the first peptidomimetic HSP90 inhibitors that target the HSP90 dimerization via specific binding to its C-terminal domain (CTD). The HSP90 CTDi aminoxyrone (**1[#]**) does not induce HSR *in vitro* and *in vivo* and exhibited comparable high activities against sensitive CML cells and imatinib-resistant cell lines. Thus, α -aminoxy peptides represent valuable α -helix mimetics with potential applications as PPI modulators.

In summary, peptoid-based HDAC6 inhibitors (chapter 3 and chapter 4) and α -aminoxy oligopeptides (chapter 5 and chapter 6) have been discovered as two novel classes of peptidomimetics with potent antitumor activities. These compounds may ultimately offer new perspectives and applications in tumor therapy.

⁴⁴ The BCR-ABL1 oncogenic fusion protein plays a critical role in the pathogenesis of CML. It is formed by translocation of the genes ABL1 and BCR. Mutations of ABL1 kinase can lead to clones that are resistant to common tyrosine kinase inhibitors such as imatinib.

9 Experimenteller Teil

9.1 Präparative Arbeitstechniken

Reagenzien, Lösungsmittel und Trockenmittel

Die verwendeten Reagenzien stammen von *Acros Organics*, *Fluka*, *Merck*, *Alfa Aesar*, *Sigma-Aldrich* und *Carbolution Chemicals*. Über *Acros* wurde trockenes Methanol (MeOH) über Molekularsieb (4 Å) bezogen. Bei Extraktionen wurde als Trockenmittel für organische Phasen wasserfreies Natriumsulfat verwendet.

Dünnschichtchromatographie (DC)

Es wurden fertige DC-Aluminiumplatten, beschichtet mit 0.2 mm Kieselgel 60 und Fluoreszenzindikator F₂₅₄, der Firma *Macherey-Magel* verwendet. Die dünnschichtchromatographischen Untersuchungen wurden unter Kammersättigung über eine Laufstrecke von 6 cm durchgeführt. Die Detektion der Substanzen erfolgte durch Fluoreszenzlöschung unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm oder durch Anfärben mit einer wässrigen Kaliumpermanganatlösung.

Säulenchromatographie (SC)

Die säulenchromatographische Reinigung erfolgte manuell oder an einem Flash-Chromatographiesystem Combi Flash[®] Rf 200 der Firma *Teledyne Isco* mit RediSep[™]Rf Fertigkartuschen. Bei der manuellen Durchführung wurden die zu trennenden Substanzen entweder in wenig Lösungsmittel gelöst oder nach Aufziehen auf Kieselgel auf die Säule aufgetragen. Chromatographiert wurde über Kieselgel 60 von *Macherey-Nagel* oder *Fluka* bei einem manuell angelegten leichten Überdruck.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Alle analytischen HPLC-Untersuchungen wurden mittels *reversed-phase* Hochleistungsflüssigkeitschromatographie RP-HPLC an einem System der Firma *Varian* (Autosampler Prostar 410, Pumpe Prostar 210, UV-Detektor Prostar 330) unter Verwendung einer *Phenomenex* Luna 5u C-18(2) (250 x 4.6 mm, Partikelgröße 1.8 µm) mit vorgeschalteter *Phenomenex* Security Guard[®] C18 (4.0 mm x 3.0 mm) durchgeführt. Die UV-Absorption wurde bei 254 nm bei einem linearen Gradienten von 10% B auf 100% B in 20 min und einer Flussrate von 1 ml/min detektiert mit Eluent A (0.1% TFA in Wasser) und Eluent B (0.1% TFA in Acetonitril).

Mikrowellensynthese

Mikrowellunterstützte Reaktionen erfolgten in einer Discover Mikrowelle der Firma *CEM*. Reaktionen wurde in Mikrowellengefäße (10 ml) mit Septum durchgeführt.

9.2 Charakterisierungsmethoden

Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

Die NMR-Spektren wurden an Spektrometern der Firma *Bruker* (*Avance III 300*, *Avance DRX 500* oder *Avance III 600*) aufgenommen. Die chemische Verschiebung der Signale wurde in Einheiten der δ -Skala registriert (TMS = 0 ppm). Als interner Standard dienten die Resonanzsignale der Restprotonen der verwendeten deuterierten Lösungsmittel: CDCl_3 : 7.26 ppm ($^1\text{H-NMR}$) und 77.16 ppm ($^{13}\text{C-NMR}$) und $\text{DMSO-}d_6$: 2.50 ppm ($^1\text{H-NMR}$) und 39.52 ppm ($^{13}\text{C-NMR}$). Die Multipllettstruktur der $^1\text{H-NMR}$ -Signale ist jeweils angegeben und wurde nach den folgenden Abkürzungen charakterisiert: Singulett (s), breites Singulett (s_{br}), Dublett (d), Triplett (t), Quartett (q) und Multipllett (m). Ermittelte Kopplungskonstanten (J) wurden in der Einheit Hertz (Hz) angegeben. Bei $^{13}\text{C-NMR}$ -Signalen handelt es sich aufgrund der Breitbandentkopplung um Singulett. Die Signalzuordnung erfolgte teilweise mit Hilfe von COSY-, HSQC- und HMBC-Spektren. $^1\text{H-NMR}$ -Signale die von Nebenrotameren stammen, sind mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet.

Elementaranalyse (EA)

Elementaranalysen wurden an Geräten der Firmen *Perkin* (Elmer PE 2400 CHN Elemental Analyzer) oder *Vario* (MICRO Cube Elemental Analyzer) gemessen.

Massenspektroskopie (HRMS-ESI)

Die Aufnahme hochaufgelöster Massenspektren (HRMS) erfolgte an einem *Bruker* Daltonics UHR-QTOF maXis 4G Massenspektrometer. Angegeben sind die protonierten Molekülionenpeaks $[\text{M}+\text{H}]^+$ im Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z).

Schmelzpunktbestimmung

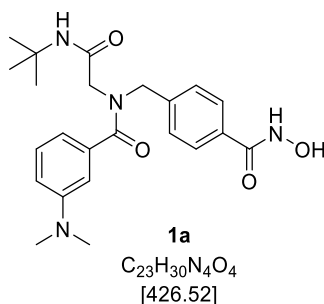
Schmelzpunkte (Smp.) wurden an einer Schmelzpunktapparatur *Stuart* SMP11 bestimmt und sind unkorrigiert.

9.3 Allgemeine Arbeitsvorschrift (AAV): Synthese der HDACi 1a-q

Ein Gemisch aus 4-Aminomethylbenzoesäuremethylesterhydrochlorid (121 mg, 0.6 mmol, 1.2 Äq.), der entsprechenden Carbonylverbindung (0.6 mmol, 1.2 Äq.), Triethylamin (83 μ l, 0.6 mmol, 1.2 Äq.) und zerstoßenem Molekularsieb 4 Å (50 mg) in trockenem Methanol (1 ml, 0.5 M) wurde in ein Mikrowellengefäß (10 ml) gegeben und mit einem Silikonseptum verschlossen. Das Reaktionsgemisch wurde in den Mikrowellenreaktor gestellt und für 20 min bei 45°C (150 W) unter mittlerer Geschwindigkeit gerührt. Anschließend wurden die entsprechende Carbonsäure (0.5 mmol, 1.0 Äq.) und das jeweilige Isocyanid (0.5 mmol, 1.0 Äq.) hinzugefügt und das Reaktionsgemisch wurde bei 45°C für weitere 60 min (150 W) gerührt. Eine Lösung aus Hydroxylaminhydrochlorid (348 mg, 5.0 mmol, 10 Äq.) und eine aus Methanol (8 ml) und Natrium (175 mg, 7.5 mmol, 7.5 Äq.) frisch hergestellte Natriummethanolatlösung wurden hinzugegeben und bei 55°C für 30 min (150 W) in der Mikrowelle gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch filtriert und das Lösungsmittel unter verminderten Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Wasser (15 ml) suspendiert und mit 4 M Salzsäure neutralisiert (pH 7-8). Die Lösung wurde mit Ethylacetat extrahiert (3 x 20 ml), vereinigte organische Phasen über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde unter verminderten Druck entfernt. Abschließend wurde das Rohprodukt flashsäulenchromatographisch gereinigt (DCM / DCM:MeOH (70:30), Gradient: 90:10 \rightarrow 70:30 in 20 min) und die gewünschte Zielverbindung aus Ethylacetat und Hexan ausgefällt.

9.4 Analytische Daten der Hydroxamsäuren 1a-q

N-(2-(*tert*-Butylamino)-2-oxoethyl)-3-(dimethylamino)-*N*-(4-(hydroxycarbonyl)-benzyl)benzamid (1a)



Synthetisiert aus Paraformaldehyd (18.0 mg, 0.6 mmol, 1.2 Äq.), 3-Dimethylamino-benzoesäure (82.6 mg, 0.5 mmol, 1.0 Äq.) und *tert*-Butylisocyanid (56.2 µl, 0.5 mmol, 1.0 Äq.) nach AAV1.

Analytische Daten:

Ausbeute: 72% eines farblosen Feststoffs

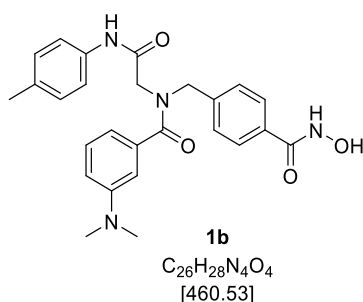
Schmelzpunkt: 138°C

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ: 11.20 (s, 1H), 9.02 (s, 1H), 7.85-7.64 (m, 2H), 7.52- 7.41 (m, 1H), 7.41-7.26 (m, 2H), 7.27-7.15 (m, 1H), 6.85-6.57 (m, 3H), 4.61/4.51* (s, 2H), 3.88*/3.67 (s, 2H), 2.89/2.78* (s, 6H), 1.25*/1.21 (2 s, 9H) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, , DMSO-*d*₆): δ: 171.9, 167.1, 166.6, 164.0, 150.0, 140.55, 136.7, 136.6, 131.7, 129.0, 129.0, 127.7, 127.2, 127.1, 126.7, 114.2, 113.8, 113.2, 110.1, 109.7, 52.9, 51.2, 50.3, 50.2, 48.5, 47.3, 39.9, 28.6, 28.4 ppm.

HPLC (10→100% B in 20 min): *t*_R: 8.68 min, 96.4% Reinheit.

HRMS (ESI) m/z: ber. 427.2340, gef. 427.2342 [M+H]⁺.

3-(Dimethylamino)-N-(4-(hydroxycarbonyl)benzyl)-N-(2-oxo-2-(4-tolylamino)-ethyl)benzamid (1b)

Synthetisiert aus Paraformaldehyd (18.0 mg, 0.6 mmol, 1.2 Äq.), 3-Dimethylamino-benzoesäure (82.6 mg, 0.5 mmol, 1.0 Äq.) und 4-Tolylisocyanid (62.6 µl, 0.5 mmol, 1.0 Äq.) nach AAV1.

Analytische Daten:

Ausbeute: 68% eines farblosen Feststoffs

Schmelzpunkt: 169°C

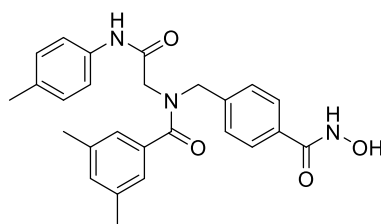
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ: 11.18 (s, 1H), 9.94*/9.80 (s, 1H), 9.03 (s, 1H), 7.86-7.67 (m, 2H), 7.57-7.31 (m, 4H), 7.30-7.17 (m, 1H), 7.18-7.03 (m, 2H), 6.85-6.58 (m, 3H), 4.72/4.62* (s, 2H), 4.12*/3.94 (s, 2H), 3.01 (s, 6H), 2.83*/2.25 (s, 3H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ: 171.9, 166.6, 166.1, 163.9, 149.9, 140.5, 136.5, 136.3, 135.9, 132.35, 132.0, 131.7, 127.6, 127.1, 127.0, 126.6, 119.2, 119.0, 113.9, 113.8, 113.2, 109.7, 53.15, 51.5, 48.6, 48.1, 39.9, 39.5, 20.3 ppm.

HPLC (10→100% B in 20 min): *t*_R: 10.33 min, 96.2% Reinheit.

HRMS (ESI) m/z: ber. 461.2183, gef. 461.2181 [M+H]⁺.

***N*-(4-(Hydroxycarbamoyl)benzyl)-3,5-dimethyl-*N*-(2-oxo-2-(4-tolylamino)ethyl)-benzamide (1c)**



1c
 $C_{26}H_{27}N_3O_4$
 [445.52]

Synthetisiert aus Paraformaldehyd (18.0 mg, 0.6 mmol, 1.2 Äq.), 3,5-Methylbenzoesäure (75.1 mg, 0.5 mmol, 1.0 Äq.) und 4-Tolylisocyanid (62.8 μ l, 0.5 mmol, 1.0 Äq.) nach AAV1.

Analytische Daten:

Ausbeute: 76% eines farblosen Feststoffs

Schmelzpunkt: 183°C

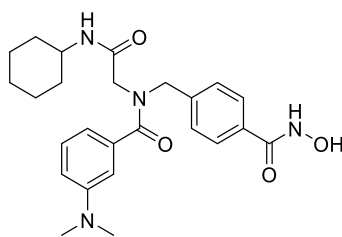
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6): δ : 11.21 (s, 1H), 9.93*/9.77 (s, 1H), 9.03 (s, 1H), 7.84-7.67 (m, 2H), 7.55-7.25 (m, 4H), 7.20-6.93 (m, 5H), 4.72/4.58* (s, 2H), 4.10*/3.92 (s, 2H), 2.24 (s, 9H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, DMSO- d_6): δ : 171.7, 166.55, 166.1, 164.0, 140.6, 140.4, 137.7, 137.6, 136.4, 136.0, 135.9, 135.8, 132.5, 132.1, 131.8, 131.7, 130.9, 130.8, 129.15, 127.7, 127.2, 127.1, 126.9, 124.1, 124.1, 119.3, 119.0, 53.2, 51.7, 48.7, 48.1, 20.8, 20.4 ppm.

HPLC (10→100% B in 20 min): t_R : 14.57 min, 99.4% Reinheit.

HRMS (ESI) m/z: ber. 446.2074, gef. 446.2077 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

***N*-(2-(Cyclohexylamino)-2-oxoethyl)-3-(dimethylamino)-*N*-(4-(hydroxycarbonyl)-benzyl)benzamide (1d)**



1d
 $C_{25}H_{32}N_4O_4$
 [452.56]

Synthetisiert aus Paraformaldehyd (18.0 mg, 0.6 mmol, 1.2 Äq.), 3-Dimethylamino-benzoesäure (82.6 mg, 0.5 mmol, 1.0 Äq.) und Cyclohexylisocyanid (62.0 μ l, 0.5 mmol, 1.0 Äq.) nach AAV1.

Analytische Daten:

Ausbeute: 66% eines weißen Feststoffs

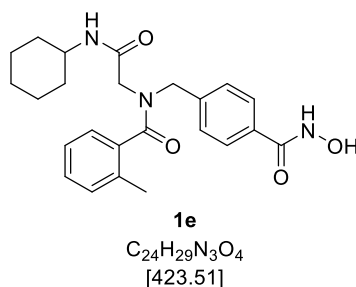
Schmelzpunkt: 146°C

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6): δ : 11.20 (s, 1H), 9.03 (s, 1H), 7.86-7.64 (m, 3H), 7.51-7.28 (m, 2H), 7.28-7.12 (m, 1H), 6.89-6.55 (m, 3H), 4.64/4.54* (2 x s, 2H), 3.90*/3.70 (2 x s, 2H), 3.64-3.45 (m, 1H), 2.89/2.79* (2 x s, 6H), 1.81-1.47 (m, 5H), 1.37-0.99 (m, 5H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, DMSO- d_6): δ : 171.9, 166.7, 166.4, 164.0, 163.8, 150.0, 140.5, 136.6, 136.5, 131.7, 129.0, 127.7, 127.2, 127.1, 126.7, 114.1, 113.75, 113.2, 110.05, 109.7, 53.0, 50.9, 48.5, 47.7, 47.15, 39.9, 32.4, 32.3, 25.1, 24.4 ppm.

HPLC (10 \rightarrow 100% B in 20 min): t_R : 9.53 min, 98.2% Reinheit.

HRMS (ESI) m/z: ber. 453.2496, gef. 453.2502 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

***N*-(2-(Cyclohexylamino)-2-oxoethyl)-*N*-(4-(hydroxycarbonyl)benzyl)-2-methylbenzamide (1e)**

Synthetisiert aus Paraformaldehyd (18.0 mg, 0.6 mmol, 1.2 Äq.), 2-Methyl-benzoesäure (68.1 mg, 0.5 mmol, 1.0 Äq.) und Cyclohexylisocyanid (62.0 µl, 0.5 mmol, 1.0 Äq.) nach AAV1.

Analytische Daten:

Ausbeute: 69% eines farblosen Feststoffs

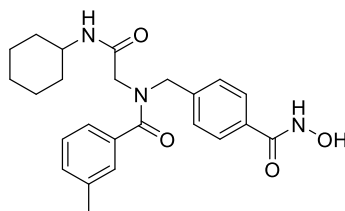
Schmelzpunkt: 142°C

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ: 11.19 (s, 1H), 9.03 (s, 1H), 7.85-7.54 (m, 3H), 7.46-7.35 (m, 1H), 7.35-7.12 (m, 5H), 4.68*/4.35 (s, 2H), 3.89*/3.57 (s, 2H), 3.59-3.46 (m, 1H), 2.32*/2.23 (s, 3H), 1.91-1.44 (m, 5H), 1.34-0.91 (m, 5H) ppm.

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ: 171.1, 171.05, 166.2, 166.2, 163.95, 163.8, 140.6, 139.8, 136.1, 135.95, 134.3, 134.0, 131.9, 131.8, 130.25, 130.2, 128.75, 127.8, 127.2, 127.1, 127.0, 125.7, 125.65, 125.55, 125.5, 52.0, 50.3, 48.1, 47.7, 47.6, 46.2, 39.5, 32.4, 32.2, 25.2, 25.1, 24.5, 24.4, 18.6, 18.6 ppm.

HPLC (10→100% B in 20 min): *t*_R: 12.71 min, 98.8% Reinheit.

HRMS (ESI) m/z: ber. 424.223, gef. 424.2228 [M+H]⁺.

***N*-(2-(Cyclohexylamino)-2-oxoethyl)-*N*-(4-(hydroxycarbonyl)benzyl)-3-methylbenzamide (1f)**

1f
C₂₄H₂₉N₃O₄
[423.51]

Synthetisiert aus Paraformaldehyd (18.0 mg, 0.6 mmol, 1.2 Äq.), 3-Methyl-benzoesäure (68.1 mg, 0.5 mmol, 1.0 Äq.) und Cyclohexylisocyanid (62.0 µl, 0.5 mmol, 1.0 Äq.) nach AAV1.

Analytische Daten:

Ausbeute: 69% eines farblosen Feststoffs

Schmelzpunkt: 164°C

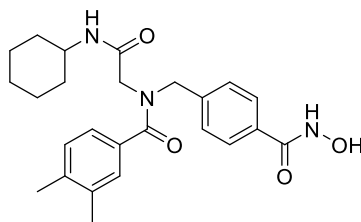
¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ: 11.21 (s, 1H), 9.03 (s, 1H), 7.83-7.66 (m, 3H), 7.42-7.37 (m, 1H), 7.34-7.17 (m, 5H), 4.66/4.52* (s, 2H), 3.90*/3.68 (s, 2H), 3.61-3.48 (m, 1H), 2.32/2.30* (s, 3H), 1.81-1.47 (m, 5H), 1.35-0.97 (m, 5H) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ: 171.5, 166.6, 166.3, 164.1, 164.0, 140.5, 140.2, 137.85, 137.7, 136.1, 135.9, 131.7, 130.1, 128.25, 127.7, 127.25, 127.1, 127.0, 126.85, 123.65, 53.0, 51.0, 48.7, 47.6, 45.9, 39.5, 32.4, 32.25, 25.1, 24.5, 24.4, 20.9 ppm.

HPLC (10→100% B in 20 min): *t*_R: 13.00 min, 99.3% Reinheit.

HRMS (ESI) m/z: ber. 424.2231, gef. 424.2233 [M+H]⁺.

***N*-(2-(Cyclohexylamino)-2-oxoethyl)-*N*-(4-(hydroxycarbonyl)benzyl)-3,4-dimethylbenzamide (1g)**



1g
 $C_{25}H_{31}N_3O_4$
 [437.54]

Synthetisiert aus Paraformaldehyd (18.0 mg, 0.6 mmol, 1.2 Äq.), 3,4-Dimethylbenzoesäure (75.1 mg, 0.5 mmol, 1.0 Äq.) und Cyclohexylisocyanid (62.0 μ l, 0.5 mmol, 1.0 Äq.) nach AAV1.

Analytische Daten:

Ausbeute: 80% eines farblosen Feststoffs

Schmelzpunkt: 146°C

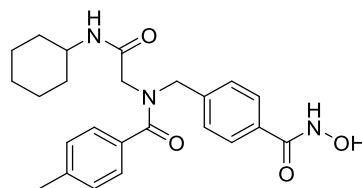
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6): δ : 11.20 (s, 1H), 9.02 (s, 1H), 7.92-7.63 (m, 3H), 7.51-7.01 (m, 5H), 4.64/4.53* (s, 2H), 3.88*/3.68 (s, 2H), 3.63-3.45 (m, 1H), 2.23*/2.22 (s, 6H), 1.81-1.44 (m, 5H), 1.37-0.98 (m, 5H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6): δ : 171.4, 166.6, 163.9, 140.5, 137.8, 136.15, 133.5, 131.65, 129.2, 127.6, 127.0, 126.75, 124.0, 52.9, 51.0, 48.7, 47.55, 47.15, 32.15, 25.1, 24.3, 19.1 ppm.

EA (%): ber.: C 68.63, H 7.14, N 9.60.
 gef.: C 68.62, H 7.43, N 9.64.

HPLC (10 \rightarrow 100% B in 20 min): t_R : 13.67 min, 98.8% Reinheit.

HRMS (ESI) m/z: ber. 438.2387, gef. 438.2392 [M+H] $^+$.

***N*-(2-(Cyclohexylamino)-2-oxoethyl)-*N*-(4-(hydroxycarbonyl)benzyl)-4-methylbenzamide (1h)**

1h
C₂₄H₂₉N₃O₄
[423.51]

Synthetisiert aus Paraformaldehyd (18.0 mg, 0.6 mmol, 1.2 Äq.), 4-Methyl-benzoesäure (82.6 mg, 0.5 mmol, 1.0 Äq.) und Cyclohexylisocyanid (62.0 µl, 0.5 mmol, 1.0 Äq.) nach AAV1.

Analytische Daten:

Ausbeute: 82% eines farblosen Feststoffs

Schmelzpunkt: 187°C

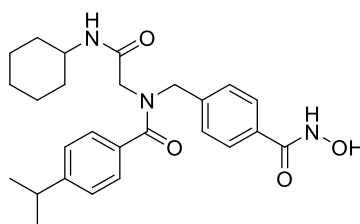
¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ: 11.21 (s, 1H), 9.03 (s, 1H), 7.86-7.67 (m, 3H), 7.46-7.26 (m, 4H), 7.27-7.18 (m, 2H), 4.64/4.54* (s, 2H), 3.89*/3.70 (s, 2H), 3.61-3.48 (m, 1H), 2.33/2.31* (s, 3H), 1.77-1.49 (m, 5H), 1.33-1.00 (m, 5H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ: 171.35, 166.5, 163.9, 140.4, 139.1, 133.1, 131.6, 128.7, 127.6, 127.0, 126.6, 52.9, 51.05, 48.7, 47.5, 47.1, 32.1, 25.05, 24.3, 20.8 ppm.

HPLC (10→100% B in 20 min): *t*_R: 13.00 min, 99.1% Reinheit.

HRMS (ESI) m/z: ber. 424.2231, gef. 424.2229 [M+H]⁺.

***N*-(2-(Cyclohexylamino)-2-oxoethyl)-*N*-(4-(hydroxycarbonyl)benzyl)-4-isopropylbenzamide (1i)**



1i
 $C_{26}H_{33}N_3O_4$
 [451.57]

Synthetisiert aus Paraformaldehyd (18.0 mg, 0.6 mmol, 1.2 Äq.), 4-Isopropylbenzoesäure (82.1 mg, 0.5 mmol, 1.0 Äq.) und Cyclohexylisocyanid (62.0 μ l, 0.5 mmol, 1.0 Äq.) nach AAV1.

Analytische Daten:

Ausbeute: 60% eines farblosen Feststoffs

Schmelzpunkt: 167°C

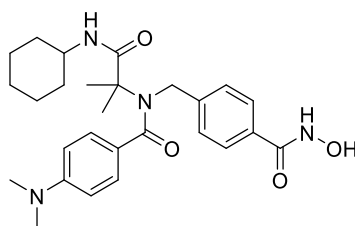
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6): δ : 11.20 (s, 1H), 9.02 (s, 1H), 7.89-7.64 (m, 3H), 7.49-7.16 (m, 6H), 4.63/4.54* (s, 2H), 3.88*/3.70 (s, 2H), 3.61-3.46 (m, 1H), 3.06-2.80 (m, 1H), 1.88-1.45 (m, 5H), 1.37-0.91 (m, 5H), 1.20 (d, 6H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, DMSO- d_6): δ : 171.5, 166.6, 166.4, 164.0, 163.9, 150.0, 140.6, 133.6, 131.7, 127.7, 127.3, 127.1, 126.9, 126.8, 126.7, 126.4, 126.2, 51.2, 48.8, 47.6, 33.3, 32.5, 32.25, 25.2, 24.5, 24.4, 23.7 ppm.

HPLC (10 \rightarrow 100% B in 20 min): t_R : 14.76 min, 96.9% Reinheit.

HRMS (ESI) m/z: ber. 452.2544, gef. 452.2544 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

***N*-(1-(Cyclohexylamino)-2-methyl-1-oxopropan-2-yl)-4-(dimethylamino)-*N*-(4-(hydroxycarbamoyl)benzyl)benzamide (1j)**



1j
C₂₇H₃₆N₄O₄
[480.61]

Synthetisiert aus Aceton (44.1 μ l, 0.6 mmol, 1.2 Äq.), Cyclohexylisocyanid (62.0 μ l, 0.5 mmol, 1.0 Äq.) und 4-Dimethylaminobenzoesäure (82.6 mg, 0.5 mmol, 1.0 Äq.) nach AAV1.

Analytische Daten:

Ausbeute: 70% eines farblosen Feststoffs

Schmelzpunkt: 200°C

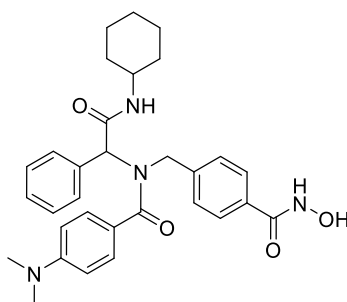
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ : 11.18 (s, 1H), 9.01 (s, 1H), 7.79-7.63 (m, 2H), 7.53-7.30 (m, 4H), 7.17-7.01 (m, 1H), 6.76-6.55 (m, 2H), 4.76 (s, 2H), 3.56-3.43 (m, 1H), 2.90 (s, 6H), 1.80-1.46 (m, 5H), 1.28-1.19 (m, 5H), 1.22 (s, 6H) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ : 172.9, 172.1, 163.9, 150.9, 143.3, 131.5, 128.2, 127.0, 126.7, 124.2, 111.0, 62.0, 50.1, 47.8, 32.4, 25.4, 24.9, 24.2 ppm.

HPLC (10 \rightarrow 100% B in 20 min): t_R : 10.32 min., 98.3% Reinheit.

HRMS (ESI) m/z: ber. 481.2809, gef. 481.2807 [M+H]⁺.

***N*-(2-(Cyclohexylamino)-2-oxo-1-phenylethyl)-4-(dimethylamino)-*N*-(4-(hydroxycarbonyl)benzyl)benzamide (1k)**



1k
 $C_{31}H_{36}N_4O_4$
 [528.65]

Synthetisiert aus Benzaldehyd (60.7 μ l, 0.6 mmol, 1.2 Äq.), Cyclohexylisocyanid (62.0 μ l, 0.5 mmol, 1.0 Äq.) und 4-Dimethylaminobenzoesäure (82.6 mg, 0.5 mmol, 1.0 Äq.) nach AAV1.

Analytische Daten:

Ausbeute: 56% eines farblosen Feststoffs

Schmelzpunkt: 154°C

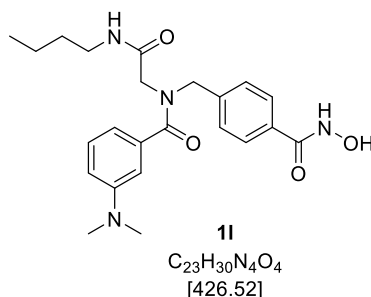
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): δ : 11.05 (s, 1H), 8.91 (s, 1H), 8.07-7.91 (m, 1H), 7.60-7.44 (m, 2H), 7.42-6.93 (m, 9H), 6.83-6.61 (m, 2H), 5.77 (s, 1H), 4.86-4.62 (m, 1H), 4.52-4.23 (m, 1H), 3.75-3.51 (m, 1H), 2.94 (s, 6H), 1.87-1.45 (m, 5H), 1.37-0.97 (m, 5H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6): δ : 172.4, 168.1, 164.0, 151.2, 142.6, 136.5, 130.3, 128.6, 128.4, 128.2, 127.7, 126.4, 126.0, 122.7, 111.1, 64.0, 49.0, 47.6, 40.0, 39.6, 31.95, 25.1, 24.4, 24.3 ppm.

HPLC (10 \rightarrow 100% B in 20 min): t_R : 12.25 min, 96.5% Reinheit.

HRMS (ESI) m/z: ber. 529.2809, gef. 529.2811 [M+H].

***N*-(2-(Butylamino)-2-oxoethyl)-3-(dimethylamino)-*N*-(4-(hydroxycarbonyl)-benzyl)benzamide (11)**



Synthetisiert aus Paraformaldehyd (18.0 mg, 0.6 mmol, 1.2 Äq.), 3-Dimethylamino-benzoesäure (82.6 mg, 0.5 mmol, 1.0 Äq.) und *n*-Butylisocyanid (52.0 µl, 0.5 mmol, 1.0 Äq.) nach AAV1.

Analytische Daten:

Ausbeute: 59% eines farblosen Feststoffs

Schmelzpunkt: 116°C

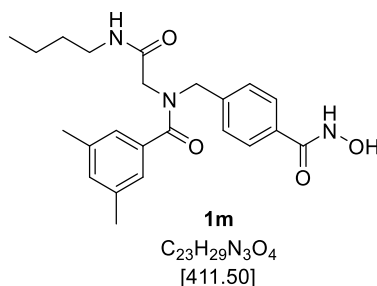
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ: 11.00 (s, 1H), 9.07 (s, 1H), 7.94-7.82 (m, 1H), 7.82-7.64 (m, 2H), 7.45-7.11 (m, 3H), 6.90-6.54 (m, 3H), 4.64/4.55* (s, 2H), 3.91*/3.71 (s, 2H), 3.18-2.98 (m, 2H), 2.89/2.79* (s, 6H), 1.47-1.16 (m, 4H), 1.00-0.77 (m, 3H) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ: 171.9, 167.6, 167.3, 163.9, 163.8, 150.0, 140.5, 136.6, 136.45, 131.7, 129.0, 127.7, 127.2, 127.1, 126.65, 114.0, 113.8, 113.2, 110.0, 109.8, 53.1, 50.9, 48.5, 47.35, 39.9, 39.5, 38.25, 31.2, 31.1, 19.5, 13.6 ppm.

HPLC (10→100% B in 20 min): *t*_R: 8.84 min, 96.3% Reinheit.

HRMS (ESI) m/z: ber. 427.2340, gef. 427.2337 [M+H]⁺.

***N*-(2-(Butylamino)-2-oxoethyl)-*N*-(4-(hydroxycarbonyl)benzyl)-3,5-dimethylbenzamide (1m)**



Synthetisiert aus Paraformaldehyd (18.0 mg, 0.6 mmol, 1.2 Äq.), 3,5-Dimethylbenzoesäure (75.1 mg, 0.5 mmol, 1.0 Äq.) und *n*-Butylisocyanid (52.0 µl, 0.5 mmol, 1.0 Äq.) nach AAV1.

Analytische Daten:

Ausbeute: 68% eines farblosen Feststoffs

Schmelzpunkt: 181°C

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ: 11.20 (s, 1H), 9.03 (s, 1H), 7.94-7.80 (m, 1H), 7.80-7.66 (m, 2H), 7.51-7.19 (m, 2H), 7.16-6.91 (m, 3H), 4.65/4.51* (s, 2H), 3.89*/3.69 (s, 2H), 3.16-2.95 (m, 2H), 2.27/2.24* (s, 6H), 1.50-1.10 (m, 4H), 0.9-0.75 (m, 3H) ppm.

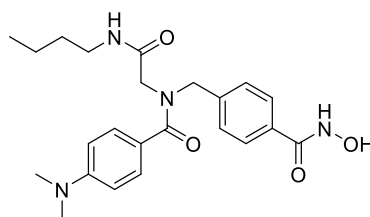
¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ: 171.6, 167.6, 167.3, 164.0, 140.5, 140.3, 137.64, 137.6, 136.05, 135.9, 131.85, 131.7, 130.9, 127.7, 127.3, 127.15, 126.9, 124.1, 53.1, 51.0, 48.7, 47.3, 38.25, 31.25, 20.8, 19.6, 19.5, 13.7 ppm.

EA (%): ber.: C 67.13, H 7.10, N 10.21.

gef.: C 66.84, H 7.18, N 10.15.

HPLC (10→100% B in 20 min): *t*_R: 12.97 min, 98.9% Reinheit.

HRMS (ESI) m/z: ber. 412.2231, gef. 412.2230 [M+H]⁺.

***N*-(2-(Butylamino)-2-oxoethyl)-4-(dimethylamino)-*N*-(4-(hydroxycarbonyl)-benzyl)benzamide (1n)**

1n
C₂₃H₃₀N₄O₄
[426.52]

Synthetisiert aus Paraformaldehyd (18.0 mg, 0.6 mmol, 1.2 Äq.), 4-Dimethylamino-benzoesäure (82.6 mg, 0.5 mmol, 1.0 Äq.) und *n*-Butylisocyanid (52.0 µl, 0.5 mmol, 1.0 Äq.) nach AAV1.

Analytische Daten:

Ausbeute: 73% eines farblosen Feststoffs

Schmelzpunkt: 169°C

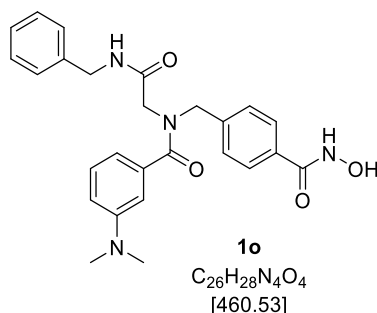
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ: 11.20 (s, 1H), 9.02 (s, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.82-7.64 (m, 2H), 7.49-7.19 (m, 4H), 6.81-6.57 (m, 2H), 4.63 (s, 2H), 3.81 (s, 2H), 3.07 (q, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.93 (s, 6H), 1.51-1.14 (m, 4H), 0.87 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ: 171.6, 167.7, 163.9, 151.2, 140.7, 131.6, 128.5, 127.0, 122.05, 110.9, 39.6, 38.1, 31.0, 19.4, 13.5 ppm.

HPLC (10→100% B in 20 min): *t*_R: 9.08 min, 98.7% Reinheit.

HRMS (ESI) m/z: ber. 427.2340, gef. 427.2337 [M+H]⁺.

***N*-(2-(Benzylamino)-2-oxoethyl)-3-(dimethylamino)-*N*-(4-(hydroxycarbamoyl)-benzyl)benzamide (1o)**



Synthetisiert aus Paraformaldehyd (18.0 mg, 0.6 mmol, 1.2 Äq.), 3-Dimethylamino-benzoesäure (82.6 mg, 0.5 mmol, 1.0 Äq.) und Benzylisocyanid (62.0 µl, 0.5 mmol, 1.0 Äq.) nach AAV1.

Analytische Daten:

Ausbeute: 63% als farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 149°C

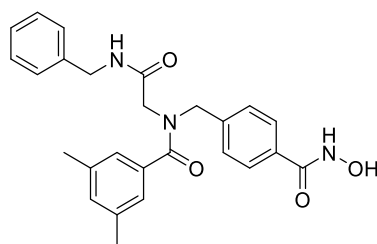
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ: 11.21 (s, 1H), 9.03 (s, 1H), 8.53-8.31 (m, 1H), 7.85-7.64 (m, 2H), 7.48-7.12 (m, 8H), 6.88-6.58 (m, 3H), 4.68/4.59* (s, 2H), 4.30 (dd, *J* = 13.5, 5.8 Hz, 2H), 4.00*/3.81 (s, 2H), 2.86/2.78* (s, 6H) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ: 172.05, 172.0, 167.95, 167.7, 164.0, 150.0, 149.9, 140.5, 139.3, 139.0, 136.6, 136.4, 131.7, 129.0, 128.3, 127.7, 127.2, 127.15, 126.9, 126.8, 126.7, 113.9, 113.3, 113.2, 109.9, 109.8, 53.2, 51.0, 48.6, 47.7, 42.2, 39.9 ppm.

EA (%): ber.: C 67.81, H 6.13, N 12.17.
gef.: C 67.58, H 6.21, N 11.96.

HPLC (10→100% B in 20 min): *t*_R: 9.43 min, 96.9% Reinheit.

HRMS (ESI) m/z: ber. 461.2183, gef. 461.2180 [M+H]⁺.

***N*-(2-(Benzylamino)-2-oxoethyl)-*N*-(4-(hydroxycarbonyl)benzyl)-3,5-dimethylbenzamide (1p)****1p**

C₂₆H₂₇N₃O₄
[445.52]

Synthetisiert aus Paraformaldehyd (18.0 mg, 0.6 mmol, 1.2 Äq.), 3,5-Dimethylbenzoesäure (75.1 mg, 0.5 mmol, 1.0 Äq.) und Benzylisocyanid (62.0 µl, 0.5 mmol, 1.0 Äq.) nach AAV1.

Analytische Daten:

Ausbeute: 77% eines farblosen Feststoffs

Schmelzpunkt: 194°C

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ: 11.21 (s, 1H), 9.03 (s, 1H), 8.52-8.33 (m, 1H), 7.87-7.69 (m, 2H), 7.48-7.12 (m, 7H), 7.13-6.96 (m, 3H), 4.68/4.55* (s, 2H), 4.41-4.21 (m, 2H), 3.99*/3.79 (s, 2H), 2.24 (s, 6H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ: 171.5, 167.7, 163.95, 140.4, 139.0, 137.5, 135.9, 131.7, 130.7, 128.2, 127.6, 127.1, 126.8, 124.0, 53.1, 51.0, 48.6, 47.4, 42.1, 20.65 ppm.

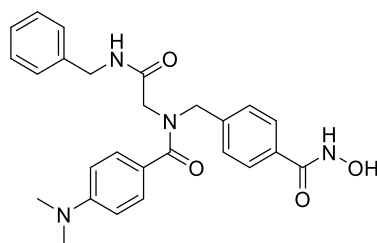
EA (%): ber.: C 70.09, H 6.11, N 9.43.

gef.: C 69.89, H 6.21, N 9.23.

HPLC (10→100% B in 20 min): *t*_R: 13.37 min, 99.3% Reinheit.

HRMS (ESI) m/z: ber. 446.2074, gef. 446.2077 [M+H]⁺.

***N*-(2-(Benzylamino)-2-oxoethyl)-4-(dimethylamino)-*N*-(4-(hydroxycarbonyl)-benzyl)benzamide (1q)**



1q
C₂₆H₂₈N₄O₄
[460.53]

Synthetisiert aus Paraformaldehyd (18.0 mg, 0.6 mmol, 1.2 Äq.), 4-Dimethylamino-benzoesäure (82.6 mg, 0.5 mmol, 1.0 Äq.) und Benzylisocyanid (62.0 µl, 0.5 mmol, 1.0 Äq.) nach AAV1.

Analytische Daten:

Ausbeute: 83% eines farblosen Feststoffs

Schmelzpunkt: 193°C

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ: 11.20 (s, 1H), 9.03 (s, 1H), 8.60-8.32 (m, 1H), 7.83-7.66 (m, 2H), 7.46-7.14 (m, 9H), 6.75-6.55 (m, 2H), 4.67 (s, 2H), 4.30 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.90 (s, 2H), 2.93 (s, 6H) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ: 171.7, 168.15, 164.0, 151.2, 140.8, 139.2, 131.7, 128.6, 128.3, 127.3, 127.15, 127.0, 126.92, 126.86, 121.9, 110.95, 42.1, 39.7 ppm.

EA (%): ber.: C 67.81, H 6.13, N 12.17.
gef.: C 68.10, H 6.38, N 12.43.

HPLC (10→100% B in 20 min): *t*_R: 9.75 min, 98.2% Reinheit.

HRMS (ESI) m/z: ber. 461.2183, gef. 461.2182 [M+H]⁺.

10 Publikationen

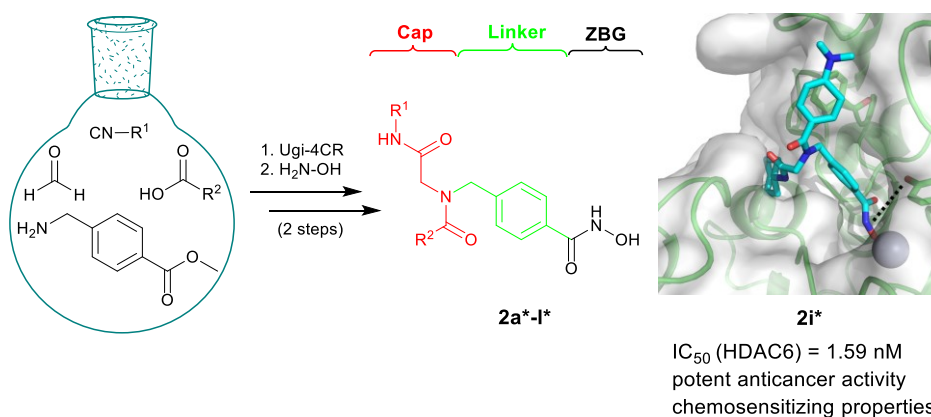
10.1 Publikation I

Die vorliegende Publikation I wurde bereits veröffentlicht in:

„Chemical Communications“

Impact factor: 6.319 (2016)

D. Diedrich, A. Hamacher, C. G. W. Gertzen, L. A. Alves Avelar, G. J. Reiss, T. Kurz, H. Gohlke, M. U. Kassack and F. K. Hansen, Rational design and diversity-oriented synthesis of peptoid-based selective HDAC6 inhibitors, *Chem. Commun.* **2016**, 52, 3219-3222.



„Reproduced from Chemical Communications, **2016**, 52 (15), 3219-3222, ‘Rational design and diversity-oriented synthesis of peptoid-based selective HDAC6 inhibitors’, with permission from The Royal Society of Chemistry.”

Eigener Anteil der Arbeit: 70%, Erstautorin, Optimierung der Synthesevorschrift, Durchführung der organischen Synthesen aller Verbindungen, sowie die analytische Charakterisierung dieser Verbindungen; Planung und Analyse der NMR-Studien; Auswertung von Strukturaktivitätsbeziehungen; Mitarbeit an der Erstellung des Manuskriptes für die Veröffentlichung.

Cite this: *Chem. Commun.*, 2016, 52, 3219Received 15th December 2015,
Accepted 14th January 2016

DOI: 10.1039/c5cc10301k

www.rsc.org/chemcomm

Rational design and diversity-oriented synthesis of peptoid-based selective HDAC6 inhibitors†

D. Diedrich,^a A. Hamacher,^a C. G. W. Gertzen,^a L. A. Alves Avelar,^a G. J. Reiss,^b T. Kurz,^a H. Gohlke,^a M. U. Kassack^a and F. K. Hansen*^a

A mini library of HDAC inhibitors with peptoid-based cap groups was synthesized using an efficient multicomponent approach. Four compounds were identified as potent HDAC6 inhibitors with a selectivity over other HDAC isoforms. The most potent HDAC6 inhibitor revealed remarkable chemosensitizing properties and completely reverted the cisplatin resistance in Cal27 CisR cells.

Histone deacetylases (HDACs) catalyze the cleavage of acetyl groups from *N*-acetyl-lysine residues of histones and non-histone proteins. These posttranslational modifications (PTMs) are important for the regulation of gene transcription and protein function.¹ HDAC classes I (HDACs 1–3,8), IIa (HDACs 4,5,7,9), IIb (HDACs 6,10), and IV (HDAC 11) contain zinc-dependent deacetylase domains and are considered “classical” HDACs.^{2,3} The class III HDACs (sirtuins) are structurally different and NAD⁺-dependent.³ Most inhibitors of “classical” HDACs are characterized by a widely accepted pharmacophore model comprising a zinc binding group (ZBG) chelating the zinc atom in the active site, a linker accommodating the tubular access of the active site, and a cap group interacting with the external surface (Fig. 1A).⁴ Currently, four HDAC inhibitors (HDACi) have been approved by the FDA for the treatment of cancer (vorinostat, romidepsin, belinostat and panobinostat). Furthermore, HDACi have attracted attention as potential therapeutic drugs for treating a variety of diseases beyond cancer including inflammation, diabetes, HIV, neurodegenerative diseases (e.g. Alzheimer, Huntington), and parasitic diseases (e.g. malaria).⁵

All approved HDACi target multiple HDAC isoforms. Their clinical use may therefore cause serious unwanted side effects.³

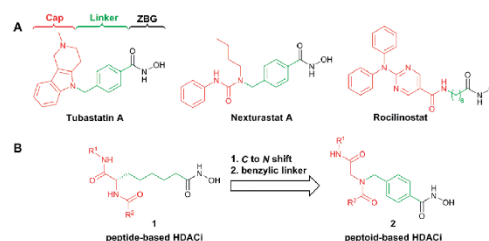


Fig. 1 (A) Selected HDAC6-selective HDACi; (B) design of peptoid-based HDACi.

Thus, the development of isoform-selective HDACi has been hypothesized to afford inhibitors with an improved safety profile.^{3,4} HDAC6, a class IIb enzyme, is structurally and functionally unique among the eleven human zinc-dependent HDACs.⁶ It is the only HDAC with two independent functional catalytic domains and a C-terminal zinc finger motif responsible for binding ubiquitinated proteins.^{5b} Interestingly, it has been demonstrated that the second catalytic site is the major functional domain of HDAC6.⁷ The enzyme was initially described as tubulin deacetylase; however, it also modulates the function of other non-histone proteins implicated in regulatory processes, including cortactin, peroxiredoxins, and Hsp90.^{5b} Due to the large number of substrates, HDAC6 is involved in numerous diseases such as autoimmune disorders, inflammation, neurodegenerative diseases, and cancer.^{5b} Notably, the first selective HDAC6 inhibitor, rocilinostat (ACY-1215, Fig. 1A), has recently entered phase II clinical trials for the treatment of multiple myeloma and lymphoid malignancies.^{5a} Consequently, HDAC6 has emerged as an attractive therapeutic target, and the search for novel potent and selective HDAC6 inhibitors is of high importance.

We report here on the rational design and diversity-oriented synthesis of a series of selective HDAC6 inhibitors utilizing peptoid-based cap groups. The biological evaluation of the target compounds includes whole cell HDAC and MTT assays on sensitive and chemoresistant cancer cell lines. The most active peptoid-based

^a Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Universitätsstr. 1, 40225 Düsseldorf, Germany.
E-mail: finn.hansen@hhu.de

^b Institut für Anorganische Chemie und Strukturchemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Universitätsstr. 1, 40225 Düsseldorf, Germany

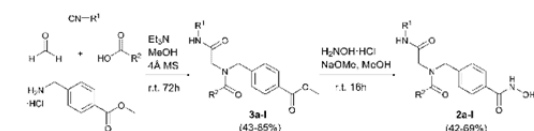
† Electronic supplementary information (ESI) available: Experimental details (synthetic protocols, bioassays, X-ray crystallography, computational methods), characterization data of new compounds, and copies of NMR spectra. CCDC 1434499. For ESI and crystallographic data in CIF or other electronic format see DOI: 10.1039/c5cc10301k

HDACi were investigated for their activity against selected HDAC isoforms and their enhancement of cisplatin-induced cytotoxicity. NMR spectroscopy and X-ray crystallography were employed to study the peptoid amide bond geometry. Molecular modelling, MD simulations, and docking studies allowed rationalization of the observed selectivity profile.

Recently, it has been identified *via* homology modelling that the catalytic domain II (CDII) of HDAC6 possesses a significantly wider channel rim in comparison with HDAC1.^{8a} This feature has been used to develop selective HDAC6 inhibitors utilizing bulky or branched cap groups.⁸ Tubastatin A and nexturastat A (Fig. 1A) are important examples that occupy this unique rim region of HDAC6.⁸ Fairlie and co-workers previously described peptide-based HDACi utilizing 2-aminosuberic acid as key building block.⁹ These HDACi of type 1 (Fig. 1B) revealed remarkable anticancer activity. Notably, some compounds of this type showed a preference for HDAC6.¹⁰ However, peptides are intrinsically labile to enzymatic degradation, and the large scale synthesis of enantiomerically pure unnatural amino acids is often a challenging task. Peptoids, *N*-alkyl glycine derivatives, feature several advantages over peptides including proteolytic stability and increased cell permeability.¹¹ We hypothesized that peptoid analogues 2 of the α -amino suberic acid-containing HDACi (1) having the linker attached to the nitrogen rather than to the α -carbon are promising scaffolds for the development of selective HDAC6 inhibitors. The peptoid-based cap group is intended to accommodate the significantly wider catalytic channel rim identified in human HDAC6. Furthermore, we decided to incorporate a benzyl linker, which is known to increase the selectivity for HDAC6 (Fig. 1B).⁸

We aimed at the development of a multicomponent approach in order to allow a rapid and diversity-oriented synthesis of the target compounds. Our retrosynthetic analysis led to an Ugi four-component reaction (U-4CR) as the key step followed by hydroxylaminolysis as a suitable synthetic pathway. Although the U-4CR has been used previously for the preparation of HDACi,¹² no synthesis of peptoid-based HDACi *via* the U-4CR has been reported so far. Preparative conditions for the U-4CR were first optimized using intermediate 3a (R¹: *t*-Bu; R²: 3,4-Me-Ph) as model compound (Table S1, ESI†). Different solvents, stoichiometries, concentrations, and reaction times were studied. Best results were achieved at room temperature using dry methanol as solvent in the presence of 4 Å molecular sieves. This optimized protocol was then used for the synthesis of the intermediates 3a–l. In all cases, the crude products were purified by flash column chromatography and isolated in 43–85% yield. The subsequent hydroxylaminolysis afforded the desired HDACi 2a–l in 42–69% yield (Scheme 1).

All synthesized peptoid-based HDACi 2a–l were first assessed in a whole cell HDAC inhibition assay and a MTT assay for cytotoxicity using the human ovarian cancer cell line A2780 and its cisplatin resistant subclone A2780 CisR. The results of both assays are summarized in Table 1. The whole cell HDAC assay provided valuable structure–activity relationships. Notably, all HDACi with a 4-dimethylamino-substituted cap group (2e, i, l) displayed remarkable activity in the whole cell HDAC assay and showed similar or better potency than the FDA-approved reference compound vorinostat. The most active compound from this series, 2i, showed IC₅₀ values of 0.90 μ M (A2780) and 0.79 μ M (A2780 CisR). Interestingly, the nature of the isocyanide component (R¹) used in U-4CR is important for the activity. The potency of the compounds decreased according to their R¹ substituent in the order cyclohexyl > 4-tolyl > *tert*-butyl. All compounds (2a–l) showed cytotoxic activities against the ovarian cancer cell lines A2780/A2780 CisR. In good agreement with the data from the whole cell HDAC assay, 2e, i, l exhibited remarkable anticancer activity and displayed higher cytotoxicity than the reference compound cisplatin. Notably, 2i was the most potent



Scheme 1 Synthesis of peptoid-based HDACi 2a–l.

Table 1 HDAC inhibition and cytotoxic activity (MTT) of 2a–l against the human ovarian cancer cell lines A2780 and the human tongue squamous cell carcinoma cell line Cal27 and their cisplatin resistant sublines A2780 CisR and Cal27 CisR

Entry	R ¹	R ²	HDAC IC ₅₀ [μ M]		MTT IC ₅₀ [μ M]		HDAC IC ₅₀ [μ M]		MTT IC ₅₀ [μ M]	
			A2780	A2780 CisR	A2780	A2780 CisR	Cal27	Cal27 CisR	Cal27	Cal27 CisR
2a	<i>t</i> -Bu	3,4-Me-Ph	5.14	4.97	3.59	9.39	2.05	3.22	14.7	10.7
2b	<i>t</i> -Bu	3,5-Me-Ph	5.99	6.16	4.86	10.7	2.89	3.83	25.3	11.7
2c	<i>t</i> -Bu	Ph	7.82	4.82	32.1	53.6	7.83	10.6	37.1	36.7
2d	<i>t</i> -Bu	1-Naphthyl	15.0	15.5	8.33	31.0	13.9	18.1	27.7	34.7
2e	<i>t</i> -Bu	4-Me ₂ N-Ph	1.23	1.03	0.94	1.62	1.08	0.76	2.92	3.83
2f	<i>c</i> -Hex	3,5-Me-Ph	2.72	2.00	6.05	19.3	3.31	2.50	7.50	12.8
2g	<i>c</i> -Hex	Ph	3.88	3.56	20.0	32.8	5.45	3.18	16.9	14.2
2h	<i>c</i> -Hex	1-Naphthyl	6.03	4.47	31.2	36.5	5.23	7.51	34.1	18.0
2i	<i>c</i> -Hex	4-Me ₂ N-Ph	0.90	0.79	0.34	1.45	0.62	0.48	2.04	2.70
2j	4-Tolyl	Ph	5.51	5.03	5.87	24.3	5.00	2.99	15.8	11.8
2k	4-Tolyl	1-Naphthyl	8.51	8.94	6.31	25.4	3.93	3.76	19.8	12.3
2l	4-Tolyl	4-Me ₂ N-Ph	0.90	1.05	0.65	3.88	0.77	0.57	2.77	3.44
Vorinostat			0.96	0.97	2.42 ^a	3.12 ^a	0.86	0.73	2.64 ^a	2.08 ^a
Cisplatin			—	—	2.25	17.2	—	—	2.50	16.1

^a Data from ref. 5d.

compound with IC_{50} values of 0.34 μ M (A2780) and 1.45 μ M (A2780 CisR).

To extend the investigation of this novel class of HDACi to another pair of solid cancer cell lines, compounds **2a–l** were tested for HDAC inhibitory and cytotoxic activity in the human tongue squamous cell carcinoma cell line Cal27 and its cisplatin resistant subline Cal27 CisR. We observed similar structure–activity relationships as seen against A2780/A2780 CisR. Again, **2i** was the most potent HDACi (Table 1). Interestingly, the compounds showed almost equipotent cellular HDAC inhibition in the respective cancer cell pairs. However, cytotoxic activity (MTT assay) was higher in A2780 than in A2780 CisR whereas the compounds displayed about similar cytotoxicity in Cal27 and Cal27 CisR cells. Thus, resistance mechanisms induced by cisplatin may (A2780 CisR) or may not (Cal27 CisR) modulate cytotoxic effects of these novel HDACi.

Based on their noteworthy activity in the whole cell HDAC assay, compounds **2e, f, i, l** were selected for a detailed biological evaluation. First, they were assessed for their inhibitory activity against recombinant HDAC6. Strikingly, all four compounds were found to be potent HDAC6 inhibitors with IC_{50} values ranging from 1.59 nM to 11.2 nM (Table 2). In order to investigate the selectivity against other HDAC isozymes, we screened compounds **2e, f, i, l** against representative examples of all other zinc dependent HDAC classes (class I: HDAC2; class IIa: HDAC4; and class IV: HDAC11). The results are presented in Table 2. Compound **2f** and **2i** demonstrated the highest overall selectivity for HDAC6. **2f** revealed selectivity indices of 390 against HDAC2, > 893 against HDAC4 and 38 against HDAC11. The most potent HDAC6 inhibitor **2i** (HDAC6 IC_{50} : 1.59 nM) exhibited selectivity indices of 126 against HDAC2, > 6289 against HDAC4, and 40 against HDAC11. The HDAC6 inhibitory activity of these compounds was further validated by investigation of the acetylation status of α -tubulin in Cal27 and Cal27 CisR cells. As expected, the peptoid-based HDACi **2e, f, i, l** and HDAC6-selective tubastatin A are causing α -tubulin hyperacetylation whereas class I HDAC-selective entinostat had no effect. These data confirm the inhibition of HDAC6 in a more complex cellular environment (Fig. S1, ESI[†]).

The 1D NMR spectra of compounds **2a–d, f–h, j–k** at room temperature and of **2e, i, l** at -30 °C (Fig. S2–S4, ESI[†]) revealed the presence of two sets of NMR signals. The occurrence of *cis/trans* amide bond rotamers in peptoids is a well-known phenomenon.¹¹ Accordingly, we assumed that the two sets of NMR signals arise from the restricted rotation around the tertiary amide bond.

Table 2 Inhibitory activities of compounds **2e, f, i, l** against HDAC isoforms 2, 4, 6 and 11^a

Compound	HDAC2 IC_{50} [nM]	HDAC4 IC_{50} [nM]	HDAC6 IC_{50} [nM]	HDAC11 IC_{50} [nM]
2e	799	> 10 000	6.52	227
2f	4366	> 10 000	11.2	421
2i	200	> 10 000	1.59	63.2
2l	637	4377	2.84	25.0
TSA	18.9	nd	3.18	17.8
TMP269	nd	169	nd	nd

^a The inhibition of HDAC isoforms was determined by Reaction Biology Corporation (Malvern, PA, USA).

Indeed, variable temperature NMR studies (VT-NMR, Fig. S5 and S6, ESI[†]) using **2f** and **2i** as representative examples confirmed the presence of two rotamers. A careful inspection of the ¹H NMR spectra revealed a strongly upfield-shifted position of the glycine methylene resonance signals in the case of the major conformers. This upfield shift of the major species might be attributed to shielding by the aryl ring (R^2), which is only possible for the *cis* rotamer indicating a *cis* amide bond preference.¹³ This was further supported by single crystal X-ray crystallography. Diffraction quality crystals of **2f** were obtained by vapor diffusion (see ESI[†]). The X-ray crystal structure of **2f** confirmed the *cis* amide bond geometry in the solid state (Fig. S7 and S8, ESI[†]).

A docking study with HDAC2, HDAC4, and HDAC6 was performed to rationalize the selectivity profiles of **2f** and **2i**. **2f** and **2i** show the highest selectivity for binding to HDAC6 over HDAC2 and HDAC4 (Table 2) but are less selective with respect to HDAC11. Hence, docking to HDAC11 was omitted as the differences to HDAC6 are expected to be less pronounced. Due to the presence of *cis/trans* rotamers, it is important to consider both amide bond geometries when investigating the binding modes of **2f** and **2i**. Thus, both the *cis*- and *trans*-rotamers were docked into crystal structures of HDAC2 and HDAC4 and, due to the lack of a crystal structure, homology models of HDAC6 CDII using AutoDock3 in combination with DrugScore¹⁴ as successfully applied previously.^{5d} Class IIa HDACs possess a highly conserved histidine residue in the catalytic domain that is rotated away from the binding site.¹⁵ In class I isoforms, this histidine is replaced by a tyrosine accommodating an “inward” orientation. Since the conformation of the corresponding tyrosine in HDAC6 is unknown, we generated homology models of HDAC6 CDII with Y301 (numbering based on the homology model) flipped-in and -out and subjected them to all-atom molecular dynamics (MD) simulations of 1 μ s length (see ESI[†]). After clustering the generated protein conformations, the cluster-representative of the largest cluster was chosen for molecular docking. Comparing the docking results between the respective HDAC structures, a clear trend is apparent. Regardless of which compound and rotamer was docked, the docking energy of the ligands in HDAC6, considering the Y301 flipped-in structure, was on average 1.67 kcal mol⁻¹ more favorable than in other HDAC isoforms (Table S2, ESI[†]), in qualitative agreement with the exhibited isoform selectivity (Table 2). As a reason, in the wider channel rim of HDAC6 lined with hydrophobic amino acids, the hydrophobic R^1 groups of **2f** and **2i** become more buried than in the other isoforms (see Fig. 2B–D versus Fig. 2A). In the Y301 flipped-in structure of HDAC6, hydrogen bonding between Y301 and the hydroxamic acid moiety of **2f** and **2i** occurs (Fig. 2B–D), leading to more favorable docking energies than in the flipped-out structure (Fig. S9 and Table S2, ESI[†]). **2f** and **2i** are not able to bind to the HDAC4 isoform, which is also reflected in the docking where only <5% of the docking poses chelated the zinc ion irrespective of the rotamer. Thus, no converged docking solution could be identified in HDAC4. Comparing the two HDACi docked to HDAC6 with Y301 flipped-in, **2i** shows on average a by 1 kcal mol⁻¹ more favorable docking energy than **2f**, in semi-quantitative agreement with observed inhibition activities (Table S2, ESI[†]). First, the channel rim can better accommodate the two methyl groups when attached to the aniline nitrogen of **2i** (Fig. 2B) than when attached in meta positions to the phenyl ring of **2f** (Fig. 2D). Second, as a result, the

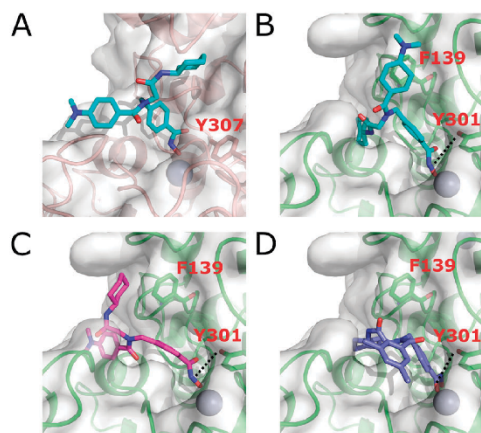


Fig. 2 Docking poses of **2i** as a *trans*-rotamer (A and B) and *cis*-rotamer (C), and **2f** (D), to HDAC2 (A) and HDAC6 with Y301 flipped-in (B–D). Zinc is shown as a sphere.

hydrophobic groups of **2f** are less buried than those of **2i**, resulting in a lower energetic contribution. The *trans*-rotamer of **2i** (Fig. 2A and B) has on average 1 kcal mol^{-1} more favorable docking energies than its *cis*-rotamer (Fig. 2C), as it can form π -stacking interactions with F139 (Fig. 2B). **2f** however does not show an energy difference regarding its two rotamers, in agreement with a less buried binding pose. In summary, the predicted binding modes are in line with and provide structural explanations for the observed selectivity profiles and inhibition activities.

To further study their anticancer properties, compounds **2e**, **f**, **i**, **l** were selected for subsequent drug combination experiments. HDACi might find broad utility as epigenetic primers resensitizing tumours to a primary agent after the tumour has developed resistance.¹⁶ Thus, we tested compounds **2e**, **f**, **i**, **l** in combination with cisplatin using the cell lines Cal27 and the platinum-resistant subline Cal27 CisR. The cells were pretreated with the respective HDACi at a fixed concentration of $1 \mu\text{M}$ for 48 h followed by a treatment with cisplatin for 72 h. All four compounds markedly enhanced the cisplatin-induced cytotoxicity towards Cal27 and Cal27 CisR (Table 3). The strongest chemosensitizing effect was observed for **2i** showing better shift factors compared with the reference compound tubastatin A. Strikingly, the combination of **2i** and cisplatin led to a complete resensitization of the platinum-resistant Cal27 CisR cell line towards cisplatin (shift factor (SF): 5.57) with an IC_{50} of cisplatin similar to the IC_{50} in the native cell line Cal27. Thus, **2i** possesses remarkable chemosensitizing properties leading to full reversal of cisplatin resistance in Cal27 CisR.

In conclusion, we have developed a highly efficient multi-component approach for the diversity-oriented synthesis of peptoid-based HDACi. Our data demonstrate that the peptoid-based HDACi of type 2 are a new class of potent and selective HDAC6 inhibitors with remarkable activity against a panel of cancer cells of different chemosensitivity and tissue origin. Most notably, compound **2i** enhanced cisplatin-induced cytotoxicity and completely resensitized the platinum-resistant Cal27 CisR cell

Table 3 IC_{50} values (μM) after treatment of Cal27 and Cal27 CisR with cisplatin alone or in combination with $1 \mu\text{M}$ **2e**, **2f**, **2i**, and **2l**, respectively. The HDAC6 selective inhibitor tubastatin A (tub A) was included as control. The shift factor (SF) was calculated by dividing the IC_{50} of cisplatin alone and the IC_{50} of the corresponding drug combinations^a

Compound	Cell line		Cell line	
	Cal27	Cal27 CisR	Cal27	Cal27 CisR
	IC_{50}	SF	IC_{50}	SF
Cisplatin	3.69	—	15.7	—
Cisplatin + 2e	1.28	2.88	4.09	3.84
Cisplatin + 2f	2.17	1.70	7.72	2.03
Cisplatin + 2i	0.80	4.61	2.82	5.57
Cisplatin + 2l	1.15	3.21	4.40	3.57
Cisplatin + tub A	2.96	1.24	6.16	2.54

^a Values are the mean of three experiments each performed in triplicate. The standard deviations are <10% of the mean.

line towards cisplatin. Taken together, compound **2i** represents a valuable lead structure for future efforts towards developing novel HDACi with optimized anticancer properties.

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. FKX acknowledges financial support from the Fonds der Chemischen Industrie (FCI).

Notes and references

- M. Biel, V. Wascholowski and A. Giannis, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2005, **44**, 3186.
- J. E. Bradner, N. West, M. L. Grachan, E. F. Greenberg, S. J. Haggarty, T. Warnow and R. Mazitschek, *Nat. Chem. Biol.*, 2010, **6**, 238.
- O. Witt, H. E. Deubzer, T. Milde and I. Oehme, *Cancer Lett.*, 2009, **277**, 8.
- P. Bertrand, *Eur. J. Med. Chem.*, 2010, **45**, 2095.
- (a) K. Falkenberg and R. Johnstone, *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2014, **13**, 673; (b) J. H. Kalin and J. A. Bergman, *J. Med. Chem.*, 2013, **56**, 6297; (c) F. K. Hansen, T. S. Skinner-Adams, S. Duffy, L. Marek, S. D. M. Sumanadasa, K. Kuna, J. Held, V. M. Avery, K. T. Andrews and T. Kurz, *ChemMedChem*, 2014, **9**, 665; (d) L. Marek, A. Hamacher, F. K. Hansen, K. Kuna, H. Gohlke, M. U. Kassack and T. Kurz, *J. Med. Chem.*, 2013, **56**, 427; (e) R. De Vreese, T. Verhaeghe, T. Desmet and M. D'hooghe, *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 3775.
- J.-H. Lee, A. Mahendran, Y. Yao, L. Ngo, G. Vente-Perez, M. L. Choy, N. Kim, W.-S. Ham, R. Breslow and P. A. Marks, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2013, **110**, 15704.
- H. Zou, Y. Wu, M. Navre and B. C. Sang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2006, **341**, 45.
- (a) K. V. Butler, J. Kalin, C. Brochier, G. Vistoli, B. L. Alan and P. Kozikowski, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 10842; (b) J. A. Bergman, K. Woan, P. Perez-Villarroel, A. Villagra, E. M. Sotomayor and A. P. Kozikowski, *J. Med. Chem.*, 2012, **55**, 9891.
- P. Kahnberg, A. J. Lucke, M. P. Glenn, G. M. Boyle, J. D. A. Tyndall, P. G. Parsons and D. P. Fairlie, *J. Med. Chem.*, 2006, **49**, 7611.
- P. K. Gupta, R. C. Reid, L. Liu, A. J. Lucke, S. A. Broomfield, M. R. Andrews, M. J. Sweet and D. P. Fairlie, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2010, **20**, 7067.
- B. Yoo and K. Kirshenbaum, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2008, **12**, 714.
- A. A. Grolla, V. Podestà, M. G. Chini, S. Di Micco, A. Vallario, A. A. Genazzani, P. L. Canonico, G. Bifulco, G. C. Tron, G. Sorba and T. Pirali, *J. Med. Chem.*, 2009, **52**, 2776.
- D. Marcovici-Mizrahi, H. E. Gottlieb, V. Marks and A. Nudelman, *J. Org. Chem.*, 1996, **61**, 8402.
- C. A. Sotriffer, H. Gohlke and H. Klebe, *J. Med. Chem.*, 2002, **45**, 1967.
- J. Melesina, D. Robaa, R. J. Pierce, C. Romier and W. Sippl, *J. Mol. Graphics Modell.*, 2015, **62**, 342.
- M. Guha, *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2015, **14**, 225.

Electronic Supplementary Material (ESI) for Chemical Communications.
This journal is © The Royal Society of Chemistry 2016

Electronic Supplementary Information

Rational design and diversity-oriented synthesis of peptoid-based selective HDAC6 inhibitors

D. Diedrich,^a A. Hamacher,^a C. G. W. Gertzen,^a L. A. Alves Avelar,^a G. J. Reiss,^b T. Kurz,^a
H. Gohlke,^a M. U. Kassack^a and F. K. Hansen^{*a}

^aInstitut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf, Universitätsstr. 1, 40225 Düsseldorf, Germany.

*Email: finn.hansen@hhu.de

^bInstitut für Anorganische Chemie und Strukturchemie, Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf, Universitätsstr. 1, 40225 Düsseldorf, Germany.

Contents

1. Supplemental Figures.....	S1
2. Chemistry	S5
General information.....	S5
Optimization of the Ugi four-component reaction (U-4CR) conditions.....	S5
General procedure for the synthesis of 3a-I	S6
General procedure for the synthesis of 2a-I	S8
3. X-ray crystallography.....	S11
4. Biological evaluation	S11
Reagents.....	S11
Cell lines and cell culture.....	S11
MTT cell viability assay	S11
Combination experiments.....	S11
Whole-cell HDAC inhibition assay	S12
Immunoblotting	S12
Data Analysis	S12
HDAC IC ₅₀ Profiling	S12
5. Computational details.....	S12
Homology modeling.....	S12
Molecular dynamics simulations and clustering.....	S13
Molecular docking.....	S13
Supplemental Table.....	S13
6. References.....	S14

1. Supplemental Figures

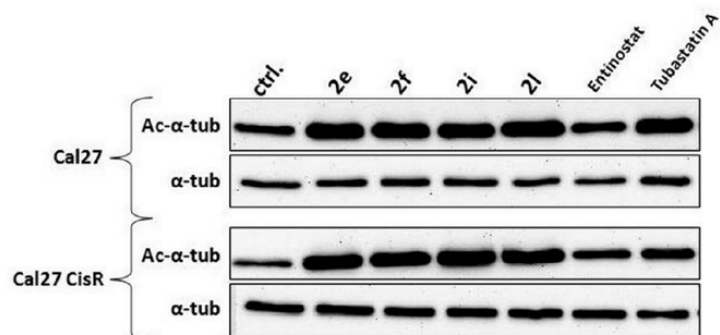


Fig. S1. Hyperacetylation of α -tubulin after 24 h incubation with 2e, f, i, l, entinostat and tubastatin A (1 μ M) in Cal27 and Cal27 CisR.

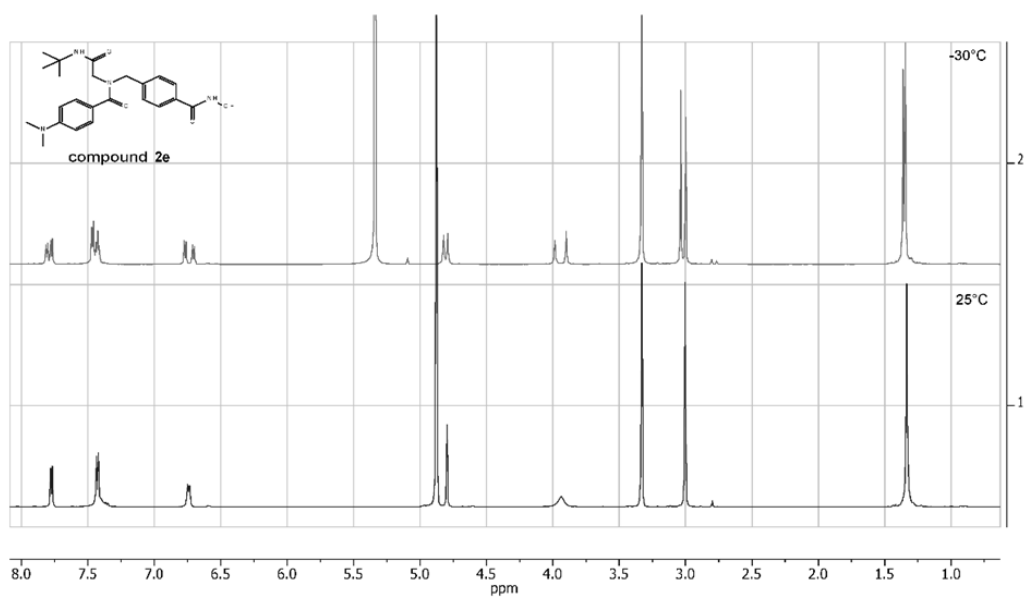


Fig. S2. ¹H-NMR spectra of compound 2e in methanol-*d*₄ at -30°C and 25°C.

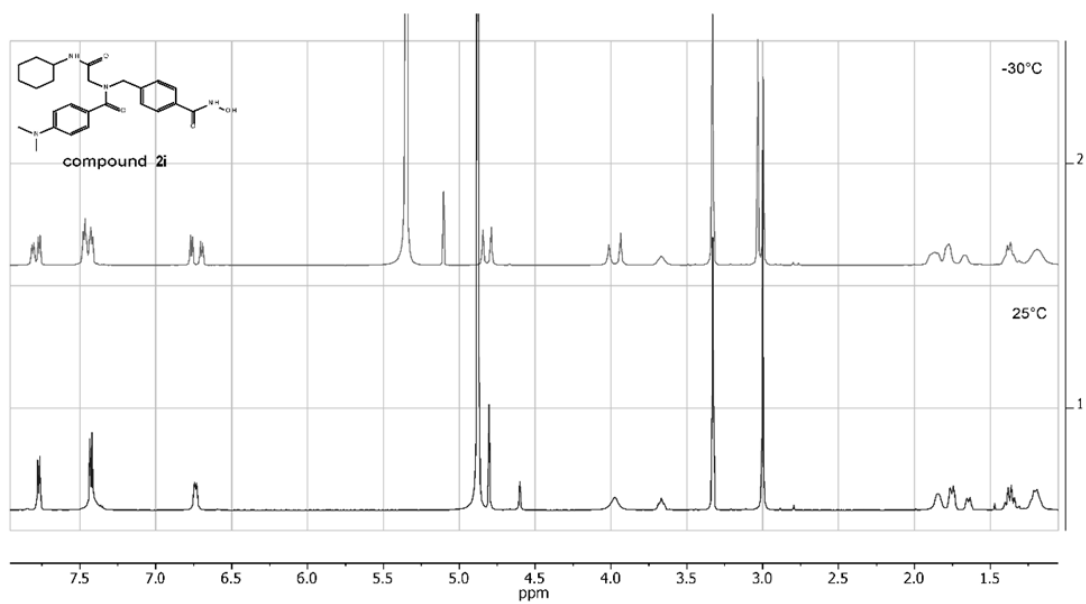


Fig. S3. ¹H-NMR spectra of compound **2i** in methanol-*d*₄ at -30°C and 25°C.

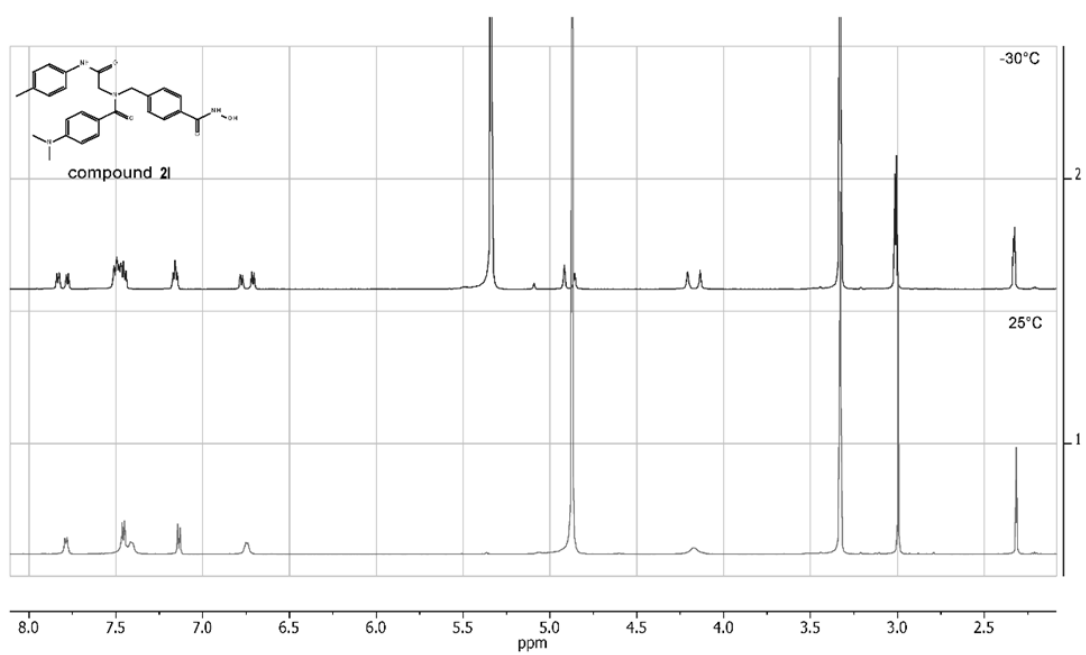


Fig. S4. ¹H-NMR spectra of compound **2l** in methanol-*d*₄ at -30°C and 25°C.

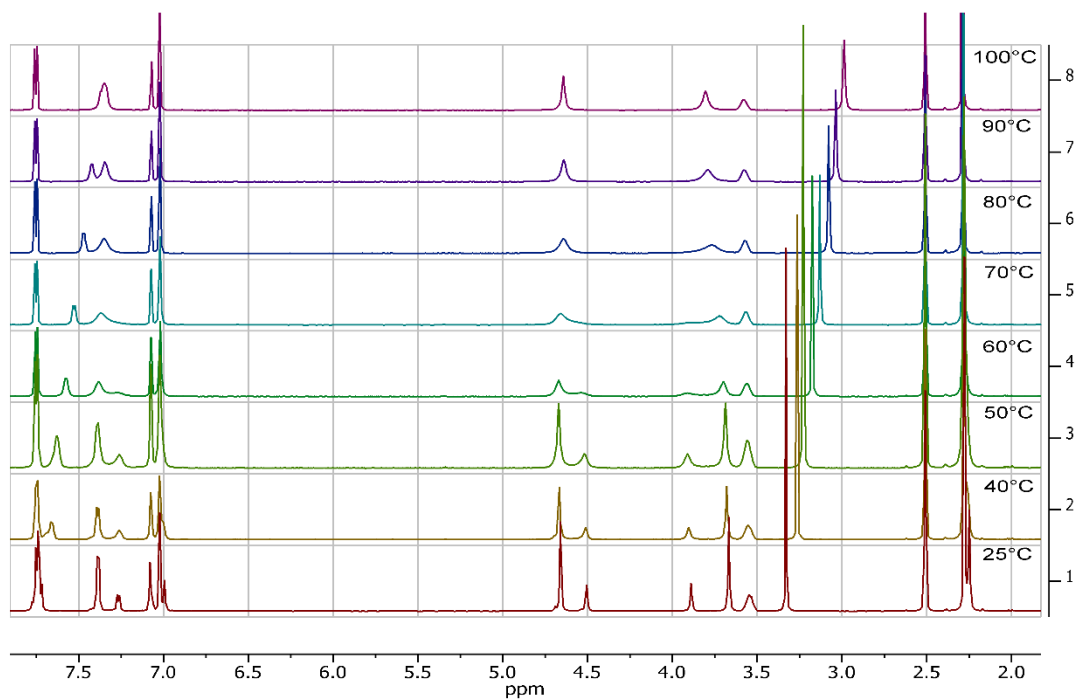


Fig. S5. VT-NMR spectra of compound **2f** in DMSO-*d*₆.

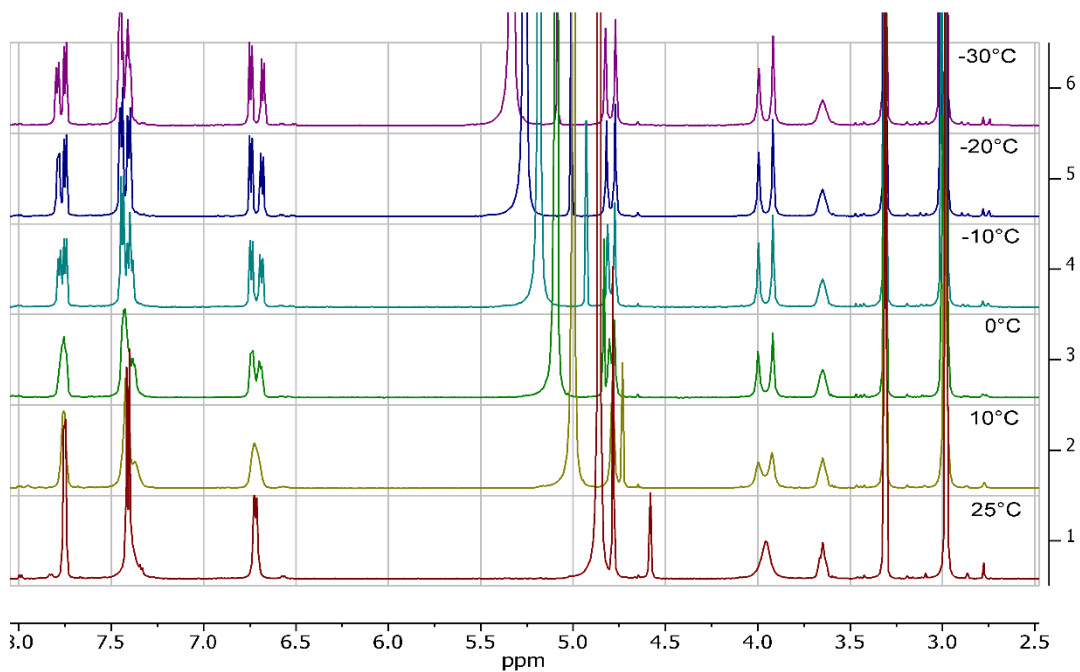


Fig. S6. VT-NMR spectra of compound **2i** in methanol-*d*₄.

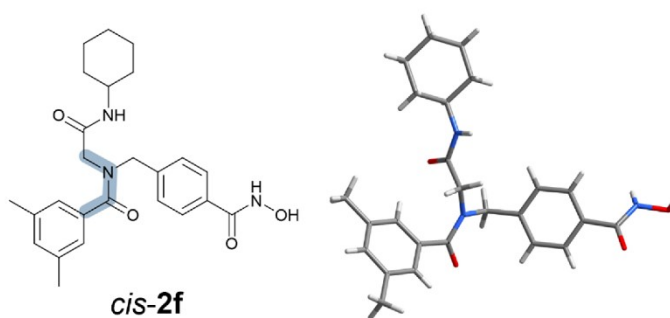


Fig. S7. X-ray structure of compound 2f.

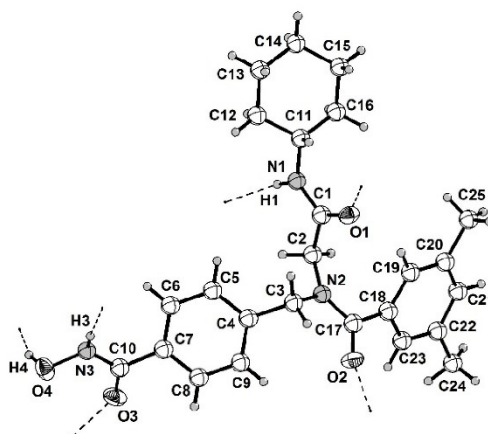


Fig. S8. The asymmetric unit of the title structure 2f contains one complete molecule. The ellipsoids are drawn at the 45% probability level. Hydrogen bonds are indicated by dashed lines.¹

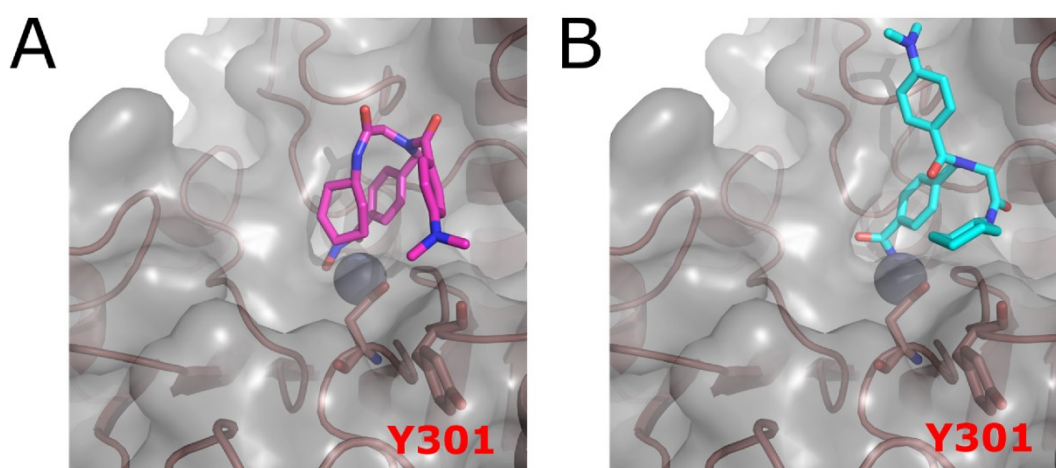


Fig. S9. Docking poses of 2i as a *cis*-rotamer (A) and *trans*-rotamer (B) to HDAC6 with Y301 flipped-out. Zinc is shown as a sphere.

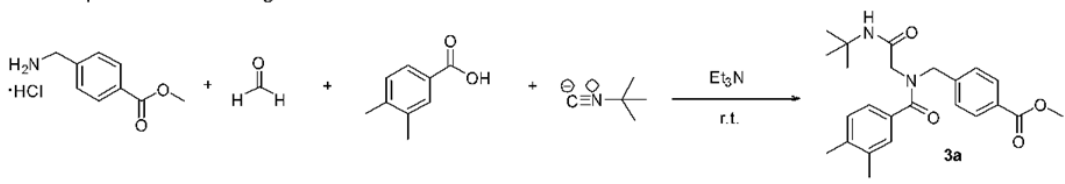
2. Chemistry

General information

All 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 UV₂₅₄). Components were visualized by irradiation with ultraviolet light (254 nm) or staining in potassium permanganate solution following heating. 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 (¹H) and carbon (¹³C) NMR spectra were recorded on a Bruker Avance 300, 500 or 600 using DMSO-*d*₆ or CDCl₃ as solvents. Chemical shifts are given in parts per million (ppm), relative to residual solvent peak for ¹H and ¹³C. ¹H NMR signals marked with an asterisk (*) correspond to peaks assigned to the minor rotamer conformation. Elemental analysis was performed on a Perkin Elmer 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 analysis were carried out on a Varian Prostar system equipped with a Prostar 410 (autosampler), 210 (pumps) and 330 (UV-detector) using a Phenomenex Luna 5u C18(2) 1.8 μm particle (250 mm × 4.6 mm) column, supported by Phenomenex Security Guard Cartridge Kit C18 (4.0 mm × 3.0 mm). UV absorption was detected at 254 nm with a linear gradient of 10% B to 100% B in 20 min using HPLC-grade water +0.1% TFA (solvent A) and HPLC-grade acetonitrile +0.1% TFA (solvent B) for elution at a flow rate of 1 mL/min. The purity of all final compounds was 95% or higher.

Optimization of the Ugi four-component reaction (U-4CR) conditions

Table S1: Optimization of the Ugi-4CR.



entry	solvent	additive	time	stoichiometries	Concentration ^b	yield (%) ^c
1	Ether	-	72 h	1.2:1.2:1:1	0.5	29
2	THF	-	72 h	1.2:1.2:1:1	0.5	38
3	DCM	-	72 h	1.2:1.2:1:1	0.5	61
4	THF/MeOH 2:1	-	72 h	1.2:1.2:1:1	0.5	68
5	MeOH	-	72 h	1.2:1.2:1:1	0.5	78
6	MeOH ^a	MS (4 Å)	72 h	1.2:1.2:1:1	0.5	86
7	MeOH ^a	MS (4 Å)	24 h	1.2:1.2:1:1	0.5	57
8	MeOH ^a	MS (4 Å)	72 h	1:1:1:1	0.5	82
9	MeOH ^a	MS (4 Å)	72 h	2:2:1:1	0.5	41
10	MeOH ^a	MS (4 Å)	72 h	1.2:1.2:1:1	0.25	74

^ause of dry methanol

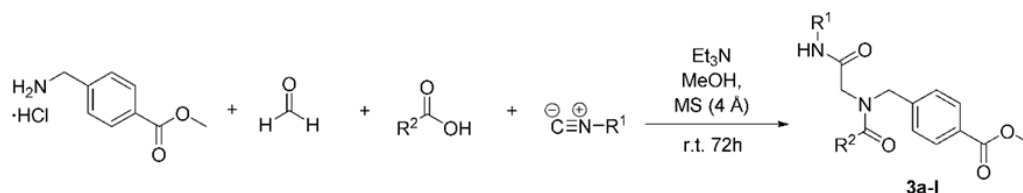
^bconcentration is calculated based on the amount of carboxylic acid

^cisolated yield after flash column chromatography

A series of experiments were carried out to determine the optimal conditions for the U-4CR using intermediate **3a** as model compound. For all reactions a pre-formation of the imine intermediate was performed, using 4-aminomethyl benzoic acid methyl ester hydrochloride and paraformaldehyde in presence of triethylamine as base. After 30 min 3,4-dimethyl benzoic acid and *tert*-butyl isocyanide were added sequentially and the reaction mixture was stirred at room temperature for the time stated. The results are summarized in Table S1. First, a range of solvents (analytical grade) were screened for the synthesis of **3a** (entry 1-5). Among these solvents, MeOH gave favorable results (entry 5). Addition of crushed molecular

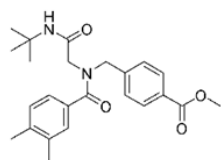
sieves (MS 4 Å) and the use of dry methanol increased the yield from 78% (entry 5) to 86% (entry 6). Hence, further optimization was performed by carrying out the reaction in dry MeOH using molecular sieves as additive. Shortening of the reaction time from 72 h (entry 6) to 24 h (entry 7) led to a lower yield. Finally, investigation of different stoichiometries and concentrations revealed that the best yield was obtained by using 1.2 eq. of 4-aminomethyl benzoic acid methyl ester hydrochloride and paraformaldehyde and a concentration of 0.5 M (entry 6).

General procedure for the synthesis of 3a-l



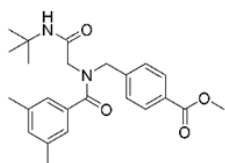
A mixture of 4-aminomethyl benzoic acid methyl ester hydrochloride (484 mg, 2.4 mmol, 1.2 eq), paraformaldehyde (72 mg, 2.4 mmol, 1.2 eq), triethylamine (333 μ l, 2.4 mmol, 1.2 eq), and 200 mg of crushed molecular sieves (MS) 4 Å was stirred in dry methanol (4 mL, 0.5 M) at room temperature for 30 min. Next, the appropriate carboxylic acid (2.0 mmol, 1.0 eq) and isocyanide (2.0 mmol, 1.0 eq) were added sequentially. The reaction mixture was stirred at room temperature for 72 h. After completion of the reaction, the reaction mixture was filtered and the solvent was removed under reduced pressure. Water (15 mL) was added and the pH was adjusted to a pH 4 using 4 M HCl. The mixture was extracted with dichloromethane (3 x 20 mL), the combined organic layers were dried over anhydrous sodium sulfate, filtered, and concentrated in vacuum. The crude products were purified by flash column chromatography (prepacked silica cartridge, hexane-ethylacetate, gradient: 90:10 \rightarrow 50:50 in 30 min) to yield the desired products **3a-l**.

Methyl 4-((N-(2-(tert-butylamino)-2-oxoethyl)-3,4-dimethylbenzamido)methyl)benzoate (**3a**)



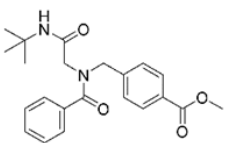
Colorless solid; yield: 700 mg (1.70 mmol, 85%); mp: 195°C; t_R : 17.86 min, purity: 99.1%; $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 8.11-7.96 (m, 2H), 7.51-7.22 (m, 3H), 7.21-7.07 (m, 2H), 6.22/5.32* (2 x s, 1H), 4.84*/4.72 (2 x s, 2H), 3.94/3.73* (2 x s, 2H), 3.91 (s, 3H), 2.26 (s, 3H), 2.23 (s, 3H), 1.32 (s, 9H); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 173.2, 167.9, 166.8, 141.8, 139.35, 137.3, 132.5, 130.3, 129.8, 128.2, 127.2, 124.3, 54.1, 52.3, 51.6, 50.5, 49.8, 28.8, 19.85; Anal. calcd. for $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_4$: C 70.22, H 7.37, N 6.82, found: C 69.99, H 7.46, N 6.66.

Methyl 4-((N-(2-(tert-butylamino)-2-oxoethyl)-3,5-dimethylbenzamido)methyl)benzoate (**3b**)

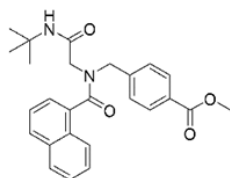


Colorless solid; yield: 665 mg (1.62 mmol, 81%); mp: 157°C; t_R : 18.09 min, purity: 97.0%; $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 8.05-8.00 (m, 2H), 7.45-7.41*/7.28-7.23 (2 x m, 2H), 7.07-7.03 (m, 3H), 6.15/ 5.27* (2 x s, 1H), 4.86*/4.69 (2 x s, 2H), 3.95/3.71* (2 x s, 2H), 3.92 (s, 3H), 2.28 (s, 6H), 1.35/1.30* (2 x s, 9H); $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) δ 173.4, 167.8, 166.8, 141.7, 138.5, 135.1, 131.9, 130.3, 129.8, 128.6, 127.3, 124.4, 54.1, 52.9, 52.3, 51.5, 50.3, 49.8, 28.8, 21.3; Anal. calcd. for $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_4$: C 70.22, H 7.37, N 6.82, found: C 70.20, H 7.56, N 6.64.

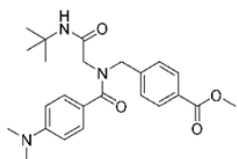
Methyl 4-((N-(2-(tert-butylamino)-2-oxoethyl)benzamido)methyl)benzoate (**3c**)



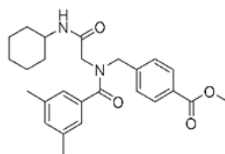
Colorless solid; yield: 650 mg (1.70 mmol, 85%); mp: 144°C; t_R : 16.18 min, purity: 98.6%; $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 8.08-7.96 (m, 2H), 7.46-7.34 (m, 6H), 7.29-7.20 (m, 1H), 6.17/5.26* (2 x s, 1H), 4.86*/4.70 (2 x s, 2H), 3.96/3.68* (2 x s, 2H), 3.91 (s, 3H), 1.34/1.28* (2 x s, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) δ 173.0, 167.64 166.8, 142.1, 141.5, 135.5, 135.1, 130.4, 130.3, 129.9, 128.8, 128.5, 127.1, 126.9, 54.0, 52.8, 52.3, 51.5, 50.4, 49.8, 28.8; Anal. calcd. for $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_4$: C 69.09, H 6.85, N 7.32, found: C 69.27, H 6.80, N 7.29.

Methyl 4-((N-(2-*tert*-butylamino)-2-oxoethyl)-1-naphthamido)methyl)benzoate (3d)

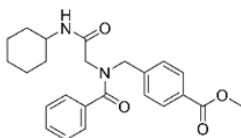
Colorless solid; yield: 700 mg (1.62 mmol, 81%); mp: 143°C; t_R : 18.07 min, purity: 96.9%; 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 8.11-7.82 (m, 5H), 7.63-7.13 (m, 6H), 6.23/4.97* (2 x s, 1H), 5.29*/4.79*/4.51 (3 x s, 2H), 4.44*/3.70*/3.54 (3 x s, 2H), 3.94*/3.89 (2 x s, 3H), 1.42/1.17* (2 x s, 9H); ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ 172.3, 171.8, 167.6, 166.9, 166.7, 166.7, 142.25, 141.1, 133.7, 133.6, 133.3, 133.2, 130.4, 130.2, 129.9, 129.8, 129.8, 129.6, 128.8, 128.7, 127.6, 127.55, 126.8, 126.8, 125.2, 125.1, 124.8, 124.7, 124.2, 123.9, 77.2, 53.7, 52.35, 52.3, 52.2, 51.7, 51.7, 49.9, 49.4, 28.9, 28.6; Anal. calcd. for $C_{26}H_{28}N_2O_4$: C 72.20, H 6.53, N 6.48, found: C 72.19, H 6.64, N 6.31.

Methyl 4-((N-(2-*tert*-butylamino)-2-oxoethyl)-4-(dimethylamino)benzamido)methyl)benzoate (3e)

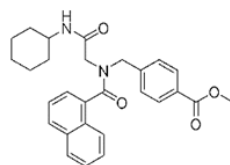
Colorless solid; yield: 683 mg (1.60 mmol, 80%); mp: 187°C; t_R : 13.04 min, purity: 96.2%; 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 8.09-7.96 (m, 2H), 7.47-7.37 (m, 2H), 7.38-7.29 (m, 2H), 6.68-6.55 (m, 2H), 4.81 (s, 2H), 3.91 (s, 5H), 2.97 (s, 6H), 1.32 (s, 9H); ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ 173.4, 168.2, 166.9, 152.0, 142.3, 130.3, 129.7, 129.2, 127.4, 121.3, 111.3, 77.2, 52.3, 51.4, 40.3, 31.7, 28.8, 22.8, 14.2; Anal. calcd. for $C_{24}H_{31}N_3O_4$: C 67.74, H 7.34, N 9.88, found: C 67.75, H 7.52, N 9.60.

Methyl 4-((N-(2-(cyclohexylamino)-2-oxoethyl)-3,5-dimethylbenzamido)methyl)benzoate (3f)

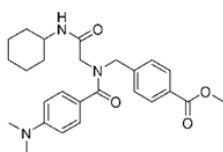
Colorless solid; yield: 698 mg (1.60 mmol, 80%); mp: 196°C; t_R : 18.76 min, purity: 98.8%; 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 8.09-7.96 (m, 2H), 7.46-7.35*/7.31-7.19 (2 x m, 2H), 7.10-6.97 (m, 3H), 6.33/5.62* (2 x s, 1H), 4.83*/4.68 (2 x s, 2H), 4.01/3.76* (2 x s, 2H), 3.91 (s, 3H), 3.84-3.69 (m, 1H), 2.29*/2.27 (2 x s, 6H), 1.95-1.80 (m, 2H), 1.75-1.68 (m, 2H), 1.66-1.55 (m, 1H), 1.43-1.29 (m, 2H), 1.25-1.12 (m, 2H), 1.13-0.98 (m, 1H); ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ 173.6, 167.7, 166.8, 141.6, 138.6, 134.9, 132.0, 130.3, 129.85, 128.5, 127.2, 124.45, 54.1, 52.3, 49.7, 49.5, 48.55, 48.4, 33.1, 33.0, 25.6, 25.5, 24.9, 24.8, 21.35; Anal. calcd. for $C_{26}H_{32}N_2O_4$: C 71.53, H 7.39, N 6.42, found: C 71.26, H 7.46, N 6.22.

Methyl 4-((N-(2-(cyclohexylamino)-2-oxoethyl)benzamido)methyl)benzoate (3g)

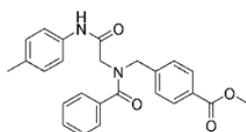
Colorless solid; yield: 637 mg (1.56 mmol, 78%); mp: 137°C; t_R : 16.87 min, purity: 97.3%; 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 8.09-7.98 (m, 2H), 7.59-7.35 (m, 6H), 7.32-7.20 (m, 1H), 6.37/5.54* (2 x s, 2H), 4.87*/4.72 (2 x s, 2H), 4.06/3.77* (2 x s, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.87-3.70 (m, 1H), 1.89 (s, 2H), 1.77-1.67 (m, 2H), 1.67-1.57 (m, 1H), 1.45-1.32 (m, 2H), 1.27-1.00 (m, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ 173.1, 167.5, 166.8, 141.4, 135.0, 130.5, 130.3, 129.9, 128.8, 128.45, 127.1, 126.9, 54.0, 52.3, 49.8, 49.5, 48.6, 48.3, 33.0, 25.6, 24.8; Anal. calcd. for $C_{24}H_{28}N_2O_4$: C 70.57, H 6.91, N 6.86, found: C 70.47, H 7.12, N 6.60.

Methyl 4-((N-(2-(cyclohexylamino)-2-oxoethyl)-1-naphthamido)methyl)benzoate (3h)

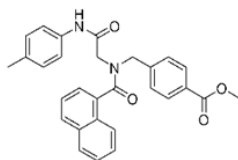
Colorless solid; yield: 580 mg (1.26 mmol, 63%); mp: 153°C; t_R : 18.75 min, purity: 98.7%; 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 8.21-7.77 (m, 5H), 7.70-7.36 (m, 6H), 6.43-6.08/5.26-5.08* (2 x m, 1H), 5.31*/4.75*/4.50 (3 x s, 2H), 4.53*/3.75*/3.59 (3 x s, 2H), 3.94*/3.90 (2 x s, 3H), 3.88-3.80/3.69-3.61* (2 x m, 1H), 1.87-0.75 (m, 10H); ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ 172.4, 171.9, 167.4, 166.9, 166.7, 166.5, 142.1, 141.2, 133.7, 133.6, 133.3, 133.2, 130.4, 130.2, 129.9, 129.8, 129.8, 129.6, 128.75, 128.7, 128.6, 127.6, 127.5, 127.5, 126.85, 126.8, 125.2, 124.9, 124.6, 124.2, 123.9, 77.2, 53.65, 52.34, 52.31, 51.6, 49.2, 48.9, 48.55, 48.5, 33.2, 33.0, 25.6, 25.4, 24.9, 24.85; Anal. calcd. for $C_{28}H_{30}N_2O_4$: C 73.34, H 6.59, N 6.11, found: C 73.17, H 6.55, N 5.91.

Methyl 4-((N-(2-(cyclohexylamino)-2-oxoethyl)-4-(dimethylamino)benzamido)methyl)benzoate (3i)

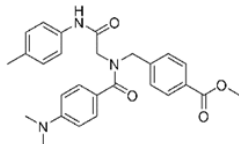
Colorless solid; yield: 409 mg (0.90 mmol, 45%); mp: 189°C; t_R : 13.96 min, purity: 96.5%; 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 8.10-7.96 (m, 2H), 7.47-7.37 (m, 2H), 7.38-7.29 (m, 2H), 6.67-6.54 (m, 2H), 4.80 (s, 2H), 3.98 (s, 2H), 3.91 (s, 3H), 3.82-3.71 (m, 1H), 1.94-1.82 (m, 2H), 1.77-1.64 (m, 2H), 1.63-1.54 (m, 1H), 1.45-1.30 (m, 2H), 1.25-1.06 (m, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ 173.5, 168.1, 166.9, 152.0, 142.2, 130.3, 129.7, 129.2, 127.3, 121.1, 111.3, 52.3, 48.2, 40.2, 33.0, 25.6, 24.8; Anal. calcd. for $C_{26}H_{33}N_3O_4$: C 69.16, H 7.37, N 9.31, found: C 69.16, H 7.59, N 9.05.

Methyl 4-((N-(2-oxo-2-(p-tolylamino)ethyl)benzamido)methyl)benzoate (3j)

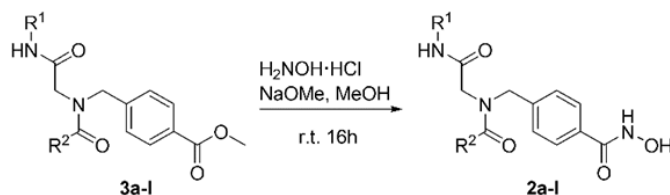
Colorless solid; yield: 593 mg (1.42 mmol, 71%); mp: 153°C; t_R : 17.53 min, purity: 98.8%; 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 8.61 (s, 1H), 8.13-7.92 (m, 2H), 7.59-7.22 (m, 9H), 7.18-7.02 (m, 2H), 4.91*/4.76 (2 x s, 2H), 4.22/3.92* (2 x s, 2H), 3.92 (s, 3H), 2.31 (s, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ 173.6, 166.7, 166.6, 141.15, 135.2, 134.6, 134.1, 130.8, 130.4, 130.0, 129.6, 128.9, 128.45, 127.1, 126.9, 120.1, 54.2, 52.35, 50.9, 21.0; HRMS (ESI) Anal. Calcd. for $C_{25}H_{25}N_2O_4$ 417.1804 $[M+H]^+$, Found 417.1809.

Methyl 4-((N-(2-oxo-2-(p-tolylamino)ethyl)-1-naphthamido)methyl)benzoate (3k)

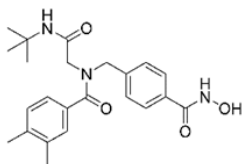
Colorless solid; yield: 710 mg (1.52 mmol, 76%); mp: 147°C; t_R : 19.31 min, purity: 99.4%; 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 8.51/7.20* (2 x s, 1H), 8.10-7.83 (m, 5H), 7.59-7.36 (m, 6H), 7.21-6.99 (m, 4H), 5.41/4.70/4.56/3.96/3.72 (5 x s, 2 x 2H), 3.94*/3.90 (2 x s, 3H), 2.33/2.28* (2 x s, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ 172.9, 172.0, 166.7, 166.5, 165.7, 142.0, 140.9, 135.2, 134.65, 134.35, 134.2, 133.7, 133.6, 133.1, 132.9, 130.4, 130.3, 130.0, 130.0, 129.85, 129.8, 129.6, 129.6, 128.8, 128.7, 128.6, 127.8, 127.5, 126.9, 126.8, 125.3, 125.1, 124.9, 124.6, 124.3, 124.0, 120.2, 120.1, 77.2, 53.9, 52.3, 51.95, 49.7, 49.1, 21.03, 20.98; Anal. calcd. for $C_{29}H_{26}N_2O_4$: C 74.66, H 5.62, N 6.00, found: C 74.48, H 5.64, N 5.87.

Methyl 4-((4-(dimethylamino)-N-(2-oxo-2-(p-tolylamino)ethyl)benzamido)methyl)benzoate (3l)

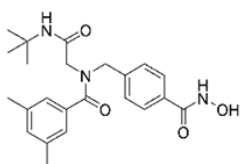
Colorless solid; yield: 395 mg (0.86 mmol, 43%); mp: 174°C; t_R : 14.84 min, purity: 98.6%; 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.91 (s, 1H), 8.16-7.97 (m, 2H), 7.54-7.42 (m, 2H), 7.40-7.30 (m, 4H), 7.19-7.03 (m, 2H), 6.81-6.50 (m, 2H), 4.86 (s, 2H), 4.16 (s, 2H), 3.93 (s, 3H), 2.98 (s, 6H), 2.31 (s, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 173.9, 167.15, 166.8, 151.8, 141.8, 135.4, 134.0, 130.4, 129.8, 129.6, 129.5, 127.1, 121.1, 120.0, 111.7, 54.0, 52.3, 52.2, 40.5, 21.0; Anal. calcd. for $C_{27}H_{29}N_3O_4$: C 70.57, H 6.36, N 9.14, found: C 70.82, H 6.58, N 9.00.

General procedure for the synthesis of 2a-l

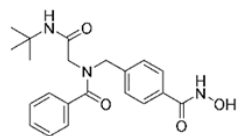
Hydroxylamine hydrochloride (348 mg, 5.0 mmol, 10 eq) was added to a sodium methanolate solution freshly prepared from dry methanol (8 mL) and sodium (175 mg, 7.5 mmol, 7.5 eq). The mixture was stirred for 10 min before the respective ester **3a-l** (0.5 mmol, 1.0 eq) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 16 h. The solvent was removed under reduced pressure, water (15 mL) was added, and the pH was adjusted to pH 7-8 was using 4 M HCl. The mixture was extracted with ethyl acetate (3 x 20 mL), the combined organic layers were dried over anhydrous sodium sulfate, filtered, and concentrated in vacuum. The crude products were purified by flash column chromatography (prepacked silica cartridge, dichloromethane-dichloromethane/methanol (70:30), gradient: 90:10 \rightarrow 70:30 in 20 min) to yield the desired hydroxamic acids **2a-l**.

***N*-(2-(*tert*-Butylamino)-2-oxoethyl)-*N*-(4-(hydroxycarbamoyl)benzyl)-3,4-dimethylbenzamide (2a)**

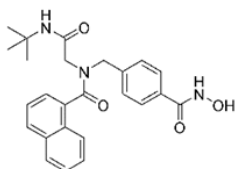
Colorless solid; yield: 116 mg (0.28 mmol, 56%); mp: 127°C; t_R : 12.92 min, purity: 98.2%; 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 11.20 (s, 1H), 9.03 (s, 1H), 7.85-7.66 (m, 2H), 7.52-7.08 (m, 6H), 4.64/4.51* (2 x s, 2H), 3.86*/3.65 (2 x s, 2H), 2.24*/2.22 (2 x s, 6H), 1.25*/1.21 (2 x s, 9H); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 171.5, 171.4, 167.1, 166.6, 164.0, 163.8, 140.7, 138.0, 137.9, 136.2, 133.65, 133.4, 131.8, 131.6, 129.3, 127.7, 127.6, 127.25, 127.1, 126.8, 124.15, 123.8, 52.9, 51.3, 50.3, 50.2, 48.85, 47.2, 39.5, 28.6, 28.4, 19.3, 19.25; HRMS (ESI) Anal. Calcd. for $C_{23}H_{30}N_3O_4$ 412.2231 [M+H] $^+$, found 412.2232.

***N*-(2-(*tert*-Butylamino)-2-oxoethyl)-*N*-(4-(hydroxycarbamoyl)benzyl)-3,5-dimethylbenzamide (2b)**

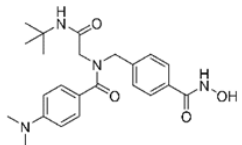
Colorless solid; yield: 142 mg (0.35 mmol, 69%); mp: 164°C; t_R : 13.08 min, purity: 98.0%; 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 11.20 (s, 1H), 9.02 (s, 1H), 7.80-7.70 (m, 2H), 7.48*/7.39 (2 x s, 1H), 7.40-7.32/7.30-7.21 (2 x m, 2H), 7.11-7.04 (m, 1H), 7.05-6.94 (m, 2H), 4.64/4.48* (2 x s, 2H), 3.86*/3.62 (2 x s, 2H), 2.27/2.25* (2 x s, 6H), 1.25*/1.21 (2 x s, 9H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 171.5, 167.1, 166.55, 164.0, 140.6, 140.3, 137.65, 137.5, 136.15, 136.0, 131.8, 131.7, 130.8, 127.7, 127.1, 126.9, 124.1, 52.9, 51.2, 50.2, 48.8, 47.1, 28.6, 28.4, 20.8; HRMS (ESI) Anal. calcd. for $C_{23}H_{30}N_3O_4$ 412.2231 [M+H] $^+$, found 412.2229.

***N*-(2-(*tert*-Butylamino)-2-oxoethyl)-*N*-(4-(hydroxycarbamoyl)benzyl)benzamide (2c)**

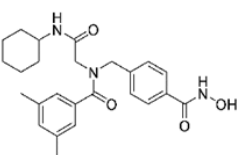
Colorless solid; yield: 117 mg (0.31 mmol, 61%); mp: 116°C; t_R : 11.35 min, purity: 96.1%; 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 11.19 (s, 1H), 9.02 (s, 1H), 7.89-7.67 (m, 2H), 7.62-7.15 (m, 8H), 4.64/4.49* (2 x s, 2H), 3.88*/3.65 (2 x s, 2H), 1.25*/1.19 (2 x s, 9H); ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 171.4, 166.85, 163.8, 140.5, 136.2, 131.6, 129.4, 128.2, 127.55, 127.0, 126.8, 126.5, 52.8, 51.3, 50.2, 48.8, 47.25, 28.5, 28.3; HRMS (ESI) Anal. Calcd. for $C_{21}H_{26}N_3O_4$ 384.1918 [M+H] $^+$, found 384.1916.

***N*-(2-(*tert*-Butylamino)-2-oxoethyl)-*N*-(4-(hydroxycarbamoyl)benzyl)-1-naphthamide (2d)**

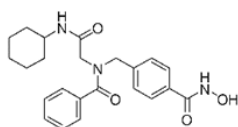
Colorless solid; yield: 92 mg (0.21 mmol, 42%); mp: 149°C; t_R : 13.03 min, purity: 98.2%; 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 11.20 (s, 1H), 9.04/9.02* (2 x s, 1H), 8.43-7.75 (m, 4H), 7.72-7.43 (m, 6H), 7.28-7.16 (m, 2H), 5.12/4.68-4.37/4.29/3.73-3.42 (2 x m, 2 x s, 2 x 2H), 1.31/1.10* (2 x s, 9H); ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 170.5, 170.4, 166.6, 166.5, 163.85, 163., 140.5, 139.55, 134.2, 133.8, 133.0, 132.8, 131.9, 131.8, 129.2, 129.0, 128.8, 128.8, 128.2, 128.1, 127.8, 127.1, 127.1, 127.0, 126.9, 126.8, 126.5, 126.3, 125.2, 125.2, 125.0, 124.6, 123.7, 123.5, 52.3, 50.8, 50.2, 50.1, 48.7, 46.8, 39.5, 28.5, 28.2; HRMS (ESI) Anal. Calcd. for $C_{25}H_{28}N_3O_4$ 434.2074 [M+H] $^+$, found 434.2070.

***N*-(2-(*tert*-Butylamino)-2-oxoethyl)-4-(dimethylamino)-*N*-(4-(hydroxycarbamoyl)benzyl)benzamide (2e)**

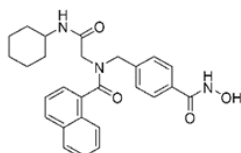
Colorless solid; yield: 120 mg (0.28 mmol, 56%); mp: 162°C; t_R : 8.84 min, purity: 96.6%; 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 11.19 (s, 1H), 9.02 (s, 1H), 7.92-7.62 (m, 2H), 7.47 (s, 1H), 7.42-7.14 (m, 4H), 6.85-6.53 (m, 2H), 4.61 (s, 2H), 3.77 (s, 2H), 2.93 (s, 6H), 1.24 (s, 9H); ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 171.6, 167.2, 163.9, 151.2, 140.8, 131.6, 128.5, 127.0, 122.2, 110.9, 50.2, 28.4; HRMS (ESI) Anal. Calcd. for $C_{23}H_{31}N_4O_4$ 427.2340 [M+H] $^+$, found 427.2341.

***N*-(2-(Cyclohexylamino)-2-oxoethyl)-*N*-(4-(hydroxycarbamoyl)benzyl)-3,5-dimethylbenzamide (2f)**

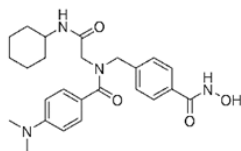
Colorless solid; yield: 127 mg (0.29 mmol, 58%); mp: 179°C; t_R : 13.77 min, purity: 96.0%; 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 11.20 (s, 1H), 9.02 (s, 1H), 7.82-7.65 (m, 3H), 7.46-7.34/7.30-7.21* (2 x m, 2H), 7.10-7.04 (m, 1H), 7.04-6.96 (m, 2H), 4.65/4.50* (2 x s, 2H), 3.88*/3.66 (2 x s, 2H), 3.61-3.43 (m, 1H), 2.27/2.24* (2 x s, 6H), 1.79-1.47 (m, 5H), 1.34-0.99 (m, 5H); ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 171.4, 166.6, 163.9, 140.45, 137.4, 136.0, 131.6, 130.6, 127.6, 127.0, 124.0, 50.9, 47.0, 48.65, 52.9, 47.55, 32.2, 25.05, 24.3, 20.65; HRMS (ESI) Anal. Calcd. for $C_{25}H_{32}N_3O_4$ 438.2387 [M+H] $^+$, found 438.2392.

***N*-(2-(Cyclohexylamino)-2-oxoethyl)-*N*-(4-(hydroxycarbamoyl)benzyl)benzamide (2g)**

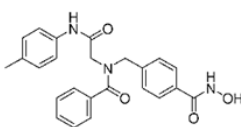
Colorless solid; yield: 87 mg (0.21 mmol, 42%); mp: 148°C; t_R : 12.15 min, purity: 97.8%; ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11.18 (s, 1H), 8.99 (s, 1H), 7.85-7.62 (m, 3H), 7.56-7.13 (m, 7H), 4.66/4.52* (2 x s, 2H), 3.91*/3.69 (2 x s, 2H), 3.62-3.45 (m, 1H), 1.90-1.47 (m, 5H), 1.36-1.00 (m, 5H); ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 171.3, 166.4, 163.9, 140.4, 136.1, 131.65, 129.4, 128.2, 127.6, 127.0, 126.7, 126.5, 52.9, 51.0, 48.7, 47.55, 47.1, 32.1, 25.05, 24.3. HRMS (ESI) Anal. Calcd. for $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_4$ 410.2074 $[\text{M}+\text{H}]^+$, found 410.2071.

***N*-(2-(Cyclohexylamino)-2-oxoethyl)-*N*-(4-(hydroxycarbamoyl)benzyl)-1-naphthamide (2h)**

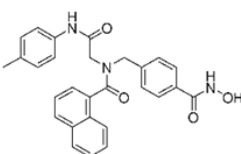
Colorless solid; yield: 98 mg (0.22 mmol, 43%); mp: 165°C; t_R : 13.75 min, purity: 96.5%; ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11.22 (s, 1H), 9.06*/9.03 (2 x s, 1H), 8.54-7.85 (m, 3H), 7.86-7.36 (m, 8H), 7.39-7.06 (m, 1H), 5.24-4.99*/3.80-3.39 (2 x m, 2H + 1H), 4.55*/4.30 (2 x s, 2H), 1.89-1.43 (m, 5H), 1.41-0.84 (m, 5H); ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 170.5, 170.4, 166.25, 163.9, 163.7, 140.5, 139.6, 134.2, 133.7, 133.0, 132.8, 131.9, 131.8, 129.2, 129.0, 128.9, 128.8, 128.2, 128.1, 127.9, 127.2, 127.1, 127.0, 126.9, 126.8, 126.5, 126.3, 125.3, 125.2, 125.0, 124.6, 123.8, 123.4, 52.35, 50.5, 48.6, 47.7, 47.4, 46.5, 32.4, 32.0, 25.1, 25.0, 24.4, 24.2; HRMS (ESI) Anal. Calcd. for $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_4$ 460.2231 $[\text{M}+\text{H}]^+$, found 460.2230.

***N*-(2-(Cyclohexylamino)-2-oxoethyl)-4-(dimethylamino)-*N*-(4-(hydroxycarbamoyl)benzyl)benzamide (2i)**

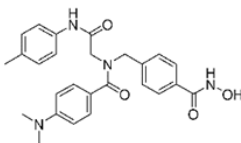
Colorless solid; yield: 153 mg (0.34 mmol, 68%); mp: 151°C; t_R : 9.77 min, purity: 96.9%; ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11.19 (s, 1H), 9.02 (s, 1H), 7.88-7.65 (m, 3H), 7.50-7.19 (m, 4H), 6.77-6.59 (m, 2H), 4.62 (s, 2H), 3.79 (s, 2H), 3.64-3.48 (m, 1H), 2.93 (s, 6H), 1.82-1.49 (m, 5H), 1.35-1.04 (m, 5H); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 171.6, 166.9, 164.0, 151.2, 140.8, 131.6, 128.6, 127.6, 127.2, 122.1, 111.0, 47.6, 39.8, 39.7, 32.3, 25.2, 24.5; HRMS (ESI) Anal. Calcd. for $\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{O}_4$ 453.2496 $[\text{M}+\text{H}]^+$, found 453.2499.

***N*-(4-(Hydroxycarbamoyl)benzyl)-*N*-(2-oxo-2-(*p*-tolylamino)ethyl)benzamide (2j)**

Colorless solid; yield: 134 mg (0.32 mmol, 64%); mp: 158°C; t_R : 13.03 min, purity: 97.3%; ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11.21 (s, 1H), 9.94*/9.80 (2 x s, 1H), 9.03 (s, 1H), 7.86-7.67 (m, 2H), 7.61-7.27 (m, 9H), 7.20-7.01 (m, 2H), 4.72/4.60* (2 x s, 2H), 4.12*/3.95 (2 x s, 2H), 2.24 (s, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 171.7, 171.5, 166.3, 166.1, 163.9, 136.4, 136.0, 135.95, 135.7, 132.55, 132.2, 131.9, 131.7, 129.8, 129.6, 129.2, 128.6, 128.5, 127.7, 127.3, 127.1, 126.8, 126.6, 126.5, 119.3, 119.05, 53.2, 51.7, 48.7, 48.2, 20.45; HRMS (ESI) Anal. Calcd. for $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_4$ 418.1761 $[\text{M}+\text{H}]^+$, found 418.1760.

***N*-(4-(Hydroxycarbamoyl)benzyl)-*N*-(2-oxo-2-(*p*-tolylamino)ethyl)-1-naphthamide (2k)**

Colorless solid; yield: 129 mg (0.28 mmol, 55%); mp: 196°C; t_R : 14.57 min, purity: 99.2%; ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11.21 (s, 1H), 10.05/9.58* (2 x s, 1H), 9.06*/9.02 (2 x s, 1H), 8.47-7.77 (m, 4H), 7.79-7.44 (m, 7H), 7.39-6.96 (m, 4H), 5.17*/4.40 (2 x s, 2H), 4.84-4.51/4.06-3.63 (2 x m, 2H), 2.28/2.23* (s, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 170.6, 166.1, 163.7, 140.5, 139.7, 136.3, 135.7, 133.95, 133.6, 133.0, 132.8, 132.4, 132.15, 131.9, 129.2, 129.1, 129.0, 128.9, 128.3, 128.2, 127.9, 127.2, 127.1, 127.0, 126.9, 126.5, 126.4, 125.1, 125.1, 124.5, 123.7, 123.5, 119.2, 119.1, 52.6, 51.1, 48.6, 47.5, 20.35; HRMS (ESI) Anal. Calcd. for $\text{C}_{28}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_4$ 468.1918 $[\text{M}+\text{H}]^+$, found 468.1917.

4-(Dimethylamino)-*N*-(4-(hydroxycarbamoyl)benzyl)-*N*-(2-oxo-2-(*p*-tolylamino)ethyl)benzamide (2l)

Pale yellow solid; yield: 125 mg (0.27 mmol, 54%); mp: 167°C; t_R : 10.60 min, purity: 96.6%; ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11.21 (s, 1H), 9.88 (s, 1H), 9.03 (s, 1H), 7.89-7.67 (m, 2H), 7.56-7.25 (m, 6H), 7.22-7.02 (m, 2H), 6.80-6.59 (m, 2H), 4.70 (s, 2H), 4.05 (s, 2H), 2.92 (s, 6H), 2.25 (s, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 171.8, 166.7, 164.0, 151.3, 140.9, 131.7, 129.1, 128.6, 127.2, 119.1, 111.0, 53.6, 48.9, 39.7, 20.4; HRMS (ESI) Anal. Calcd. for $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{N}_4\text{O}_4$ 461.2183 $[\text{M}+\text{H}]^+$, found 461.2188.

3. X-ray crystallography

Diffraction quality crystals were obtained by vapor diffusion. 1.0 mg of purified **2f** was added to 0.5 mL of DMSO in a small vial. This vial was then placed within a 20 mL vial containing 3 mL of water. The sample was capped and then left undisturbed for eight weeks to obtain crystals of X-ray quality.

General: All bond lengths are in the expected ranges. Packing: N-H...O and O-H...O hydrogen bonds connect adjacent molecules to form a layered network in the *ab* plane.

Data collection and reduction generally followed the routine procedure^{2,3} with an increase of the exposure time. Crystal data of C₂₅H₃₁N₃O₄: space group *Pbca*, *Z* = 8, *a* = 9.3020 (4) Å, *b* = 15.8206 (5) Å, *c* = 32.7189 (11) Å, *V* = 4815.0 (3) Å³, μ = 0.08 mm⁻¹, crystal size: 0.22 × 0.20 × <0.01 mm, 55144 measured reflections, 4237 unique reflections, 297 parameters, *wR2*(all reflections) = 0.167, *R1* (*I* > 2σ) = 0.115, $\Delta\rho_{max/min}$: 0.22/-0.21 eÅ⁻³.

CCDC 1434499 contains the supplementary crystallographic data for this paper. The data can be obtained free of charge from The Cambridge Crystallographic Data Centre via www.ccdc.cam.ac.uk/getstructures.

4. Biological evaluation

Reagents

Cisplatin was purchased from Sigma-Aldrich (Germany), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) was purchased from Serva (Germany). All other reagents were supplied by PAN Biotech (Germany) unless otherwise stated.

Cell lines and cell culture

The human epithelial ovarian cancer cell line A2780 was obtained from the European Collection of Cell Cultures (ECACC, UK). The human tongue cell line Cal27 was obtained from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Germany). The cisplatin resistant CisR sublines were generated by exposing the parental cell lines to weekly cycles of cisplatin in an IC₅₀ concentration over a period of 24-30 weeks as described in Gosepath *et al.*⁴ and Eckstein *et al.*⁵

All cell lines were grown at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ in RPMI 1640 (A2780) or DMEM (Cal27) containing 10% fetal calf serum, 120 IU/mL penicillin, and 120 µg/mL streptomycin. The cells were grown to 80% confluency before using them for the appropriate assays.

MTT cell viability assay

Cell viability was evaluated by an improved MTT assay as previously described.⁶ In brief, A2780 or Cal27 and their cisplatin resistant sublines were seeded at a density of 5,000 and 2,000 cells/well in 96well plates (Corning, Germany). After 24 h, cells were exposed to test compounds. Incubation was ended after 72 h 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 nm and 690 nm in a FLUOstar microplate-reader (BMG LabTech, Germany).

Combination experiments

To investigate the effect of **2e**, **2f**, **2i**, and **2l** on cisplatin-induced cytotoxicity, compounds were added 48 h prior to the addition of cisplatin. After 72 h, cell viability was determined by MTT assay.

Whole-cell HDAC inhibition assay

The cellular HDAC assay was based on an assay published by Ciossek *et al.*⁷ and Bonfils *et al.*⁸ with minor modifications. Briefly, A2780, A2780 CisR, Cal27, and Cal27 CisR were seeded in 96-well tissue culture plates (Corning, Germany) at a density of 1.5×10^4 cells/well in a total volume of 90 μ L medium. After 24 h, cells were incubated for 18 h with increasing concentrations of test compounds. HDAC assay was started by adding 10 μ L of 3 mM Boc-Lys(ϵ -Ac)-AMC (Bachem, Germany) and incubated for 3 h under cell culture conditions. Then, 100 μ L/well stop solution (25 mM Tris-HCl (pH 8), 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1% NP40, 2.0 mg/mL trypsin, 10 μ M vorinostat) were added, and incubated for 3 h under cell culture conditions. Fluorescence intensity was then measured at an excitation wavelength of 320 nm and emission wavelength of 520 nm in a NOVOstar microplate-reader (BMG LabTech, Offenburg, Germany).

Immunoblotting

Cells were treated with 1 μ M of test compounds (**2e**, **2f**, **2i**, **2l**, tubastatin A, entinostat) or vehicle for 24 h. Cell pellets were dissolved with lysis buffer 6 (bio-technie, Germany) and centrifuged at 14.000 g. Protein amount was estimated by bicinchoninic acid assay according to the manufacturer's instructions (Pierce, Thermo Fisher). Equal amounts of total protein (10 μ g) were resolved by SDS-PAGE and transferred to polyvinylidene fluoride membranes. Blots were incubated with primary antibodies against acetylated α -tubulin and α -tubulin (Santa Cruz Biotechnology, Germany). Immunoreactive proteins were visualized using luminol reagent (Santa Cruz, Heidelberg, Germany) with an Intas Imager (Intas, Germany).

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.

HDAC IC₅₀ Profiling

The in vitro inhibitory activity of compounds **2e**, **2f**, **2i**, and **2l** against four human HDAC isoforms (2, 4, 6 and 11) were performed at Reaction Biology Corp. (Malvern, PA) with a fluorescent based assay according to the company's standard operating procedure. The IC₅₀ values were determined using 10 different concentrations with 3-fold serial dilution starting at 10 μ M. TSA and TMP269 were used as reference compounds.

5. Computational details**Homology modeling**

The CD II amino acid sequence of HDAC6 (Gly482-Gly800)⁹ was used to search crystal structures of homologues in the Protein Data Bank (PDB) using BLAST.¹⁰ The results showed that HDAC4 is the closest homologue with 48% sequence identity. For the model with Y301 (numbering based on the homology model) in a flipped-out conformation, the protein structure of PDB ID 4CBY¹¹ was used as a template as it has the best resolution (2.7 \AA) among HDAC4 flipped-out crystal structures. For the flipped-in model, the protein structure of PDB ID 2VQW, a H976Y gain of function mutated HDAC4cd crystal structure with Y976 in a flipped-in conformation and a resolution of 3.0 \AA ,¹² was used as a template for similar reasons described above. The alignment of the sequences of HDAC6 and HDAC4 was calculated using the Align2D routine from the software Modeller9.14.¹³ With the alignment, comparative modeling was performed using the standard automodel class from the same software package. In detail, 20 models with a high level of refinement were created and subsequently evaluated depending on their DOPE scores. The respective models with the lowest score were further refined by MD simulations as described next.

Molecular dynamics simulations and clustering

For molecular dynamics simulations of HDAC6 in the Y301 flipped-in and -out conformations, the termini were capped with ACE and NME groups for the N- and C-terminus, respectively. The system was hydrated with TIP3P¹⁴ water in an octahedral box such that the distance between the protein and the box edges is at least 12 Å. Ions were added to neutralize the charge of the system. MD simulations were performed with Amber14¹⁵ using the ff14SB force field and 12-6-4 Lennard-Jones type potentials for divalent ions.¹⁶ The Particle Mesh Ewald¹⁷ method was used to treat long-range electrostatic interactions. Bond lengths involving bonds to hydrogen atoms were constrained using SHAKE.¹⁸ The time step for all MD simulations was 2 fs with a direct-space, non-bonded cutoff of 8 Å. Initially, 12500 steps of steepest descent and conjugate gradient minimization were performed. Harmonic restraints with a force constant of 5 kcal mol⁻¹ Å⁻² were applied to all solute atoms; the force constant was reduced to 1 kcal mol⁻¹ Å⁻² after 2500 steps. Then, NVT-MD (MD simulations with a constant number of particles, volume, and temperature) was carried out for 50 ps during which the system was heated from 100 K to 300 K. Subsequent NPT-MD (MD simulations with a constant number of particles, pressure, and temperature) was used for 100 ps to adjust the solvent density. In both steps, harmonic restraints with a force constant of 1 kcal mol⁻¹ Å⁻² were applied to all solute atoms. A final unrestrained NVT-MD was performed for 200 ps. In the following 1000 ns of unrestrained NVT-MD, conformations were extracted every 40 ps for analysis. Afterwards, the trajectories of the respective HDAC6 in flipped-in and -out conformation were clustered with the protein as a reference. A hierarchical agglomerative clustering algorithm was applied as implemented in cpptraj,¹⁹ with a minimum distance of 1 Å between the clusters in combination with a symmetry-corrected root mean-square deviation (RMSD) between the structures as a distance measure. The cluster means of the biggest cluster for the respective HDAC6 flipped-in and -out structures were used in subsequent docking studies.

Molecular docking

For the molecular docking, the *cis*- and *trans*-rotamers of **2f** and **2i** were drawn with ChemDraw Ultra,²⁰ converted into a 3D structure, and energy minimized with Moloc using the MAB force field.²¹ The HDACi were then docked into HDAC2 (PDB ID: 4LY1²²) and HDAC4 (PDB ID: 4CBT¹¹), and into HDAC6 models with Y301 flipped-in and -out conformations using AutoDock3^{23,24} as a docking engine and the DrugScore^{25,26} distance-dependent pair-potentials as an objective function as described in ref.²⁷ 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 < 3 Å to the hydroxamic acid oxygen, was used for further evaluation.

Supplemental Table

Table S2. Docking results of HDACi's into HDAC isoforms.

Compound	HDAC2 ^a	HDAC4 ^a	HDAC6 flipped-out ^a	HDAC6 flipped-in ^a
2f <i>cis</i>	-13.61	n/a ^b	-13.91	-15.42
2f <i>trans</i>	-13.97	n/a ^b	-13.86	-15.26
2i <i>cis</i>	-13.77	n/a ^b	-14.46	-15.58
2i <i>trans</i>	-15.5	n/a ^b	-15.53	-16.27

^a Docking energy of the energetically most favorable configuration in the largest cluster; in kcal mol⁻¹.

^b No docking configuration fulfilling the criteria given in the section above could be identified.

6. References

1. K. Brandenburg: *DIAMOND*. Visual Crystal Structure Information System. Version 3.2i. Crystal Impact, Bonn, Germany 2012.
2. Stoe & Cie, X-Area data collection and reduction software, Darmstadt, 2009.
3. G. M. Sheldrick: A short history of *SHELX*. *Acta Crystallogr.* **A64** (2008). 112.
4. E. M. Gosepath, N. Eckstein, A. Hamacher, K. Servan, G. von Jonquieres, H. Lage, B. Györfy, H. D. Royer and M. U. Kassack, *Int. J. Cancer* 2008, **123**, 2013.
5. N. Eckstein, K. Servan, L. Girard, D. Cai, G. von Jonquieres, U. Jaehde, M. U. Kassack, A. F. Gazdar, J. D. Minna and H. D. Royer, *J. Biol. Chem.* 2008, **283**, 739.
6. L. Marek, A. Hamacher, F. K. Hansen, K. Kuna, H. Gohlke, M. U. Kassack and T. Kurz, *J. Med. Chem.* 2013, **56**, 427.
7. T. Ciossek, H. Julius, H. Wieland, T. Maier and T. A. Beckers, *Anal. Biochem.* 2008, **372**, 72.
8. C. Bonfils, A. Kalita, M. Dubay, L. L. Siu, M. A. Carducci, G. Reid, R. E. Martell, J. M. Besterman and Z. Li, *Clin. Cancer Res.*, 2008, **14**, 3441.
9. K. V. Butler, J. Kalin, C. Brochier, G. Vistoli, B. Langley and A. P. Kozikowski, *J. Am. Chem. Soc.* 2010, **132**, 10842.
10. S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers and D. J. Lipman, *J. Mol. Biol.* 1990, **215**, 403.
11. R. W. Bürlü, C. A. Luckhurst, O. Aziz, K. L. Matthews, D. Yates, K. A. Lyons, M. Beconi, G. McAllister, P. Breccia, A. J. Stott, S. D. Penrose, M. Wall, M. Lamers, P. Leonard, I. Müller, C. M. Richardson, R. Jarvis, L. Stones, S. Hughes, G. Wishart, A. F. Haughan, C. O'Connell, T. Mead, H. McNeil, J. Vann, J. Mangette, M. Maillard, V. Beaumont, I. Munoz-Sanjuan and C. Dominguez, *J. Med. Chem.* 2013, **56**, 9934.
12. M. J. Bottomley, P. L. Surdo, P. Di Giovine, A. Cirillo, R. Scarpelli, F. Ferrigno, P. Jones, P. Neddermann, R. De Francesco and C. Steinkühler, *J. Biol. Chem.* 2008, **283**, 26694.
13. A. Šali and T. L. Blundell, *J. Mol. Biol.* 1993, **234**, 779.
14. W. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. Madura, R. Impey and M. Klein, *J. Chem. Phys.* 1983, 926.
15. D. Case, V. Babin, J. Berryman, R. Betz, Q. Cai, D. Cerutti, T. Cheatham III, T. Darden, R. Duke and H. Gohlke, *Amber* 14. 2014.
16. P. Li and K. M. Merz Jr., *J. Chem. Theory. Comput.* 2013, **10**, 289.
17. T. Darden, D. York and L. Pedersen, *J. Chem. Phys.* 1993, **98**, 10089.
18. J.-P. Ryckaert, G. Ciccotti and H. J. Berendsen, *J. Comput. Phys.* 1977, **23**, 327.
19. D. R. Roe and T. E. Cheatham III, *J. Chem. Theory. Comput.* 2013, **9**, 3084.
20. N. Mills, *J. Am. Chem. Soc.* 2006, **128**, 13649.
21. P. R. Gerber and K. Müller, *J. Comput.-Aided Mol. Des.* 1995, **9**, 251.
22. B. E. L. Lauffer, R. Mintzer, R. Fong, S. Mukund, C. Tam, I. Zilberleyb, B. Flicke, A. Ritscher, G. Fedorowicz, R. Vallero, D. F. Ortwine, J. Gunzner, Z. Modrusan, L. Neumann, C. M. Koth, P. J. Lupardus, J. S. Kaminker, C. E. Heise and P. Steiner, *J. Biol. Chem.* 2013, **288**, 26926.
23. F. Osterberg, G. M. Morris, M. F. Sanner, A. J. Olson and D. S. Goodsell, *Proteins* 2002, **46**, 34.
24. G. M. Morris, D. S. Goodsell, R. S. Halliday, R. Huey, W. E. Hart, R. K. Belew and A. J. Olson, *J. Comput. Chem.* 1998, **19**, 1639.
25. S. Radestock, M. Bohm and H. Gohlke, *J. Med. Chem.* 2005, **48**, 5466.
26. H. Gohlke, M. Hendlich and G. Klebe, *J. Mol. Biol.* 2000, **295**, 337.
27. C. A. Sotriffer, H. Gohlke and G. Klebe, *J. Med. Chem.* 2002, **45**, 1967.

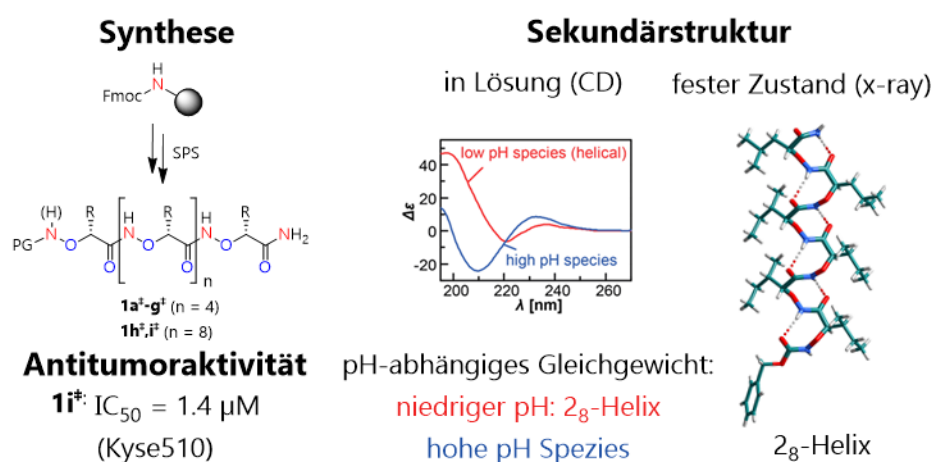
10.2 Publikation II

Die Publikation II wurde bereits veröffentlicht in:

„Chemistry – A European Journal“

Impact factor: 5.317 (2016)

D. Diedrich, A. J. Moita, A. Rütter, B. Frieg, G. J. Reiss, A. Hoepfner, T. Kurz, H. Gohlke, S. Lüdeke, M. U. Kassack, and F. K. Hansen, Aminoxy Oligopeptides: Synthesis, Secondary Structure, and Cytotoxicity of a New Class of Anticancer Foldamers, *Chem. Eur. J.* **2016**, 22, 17600-17611.



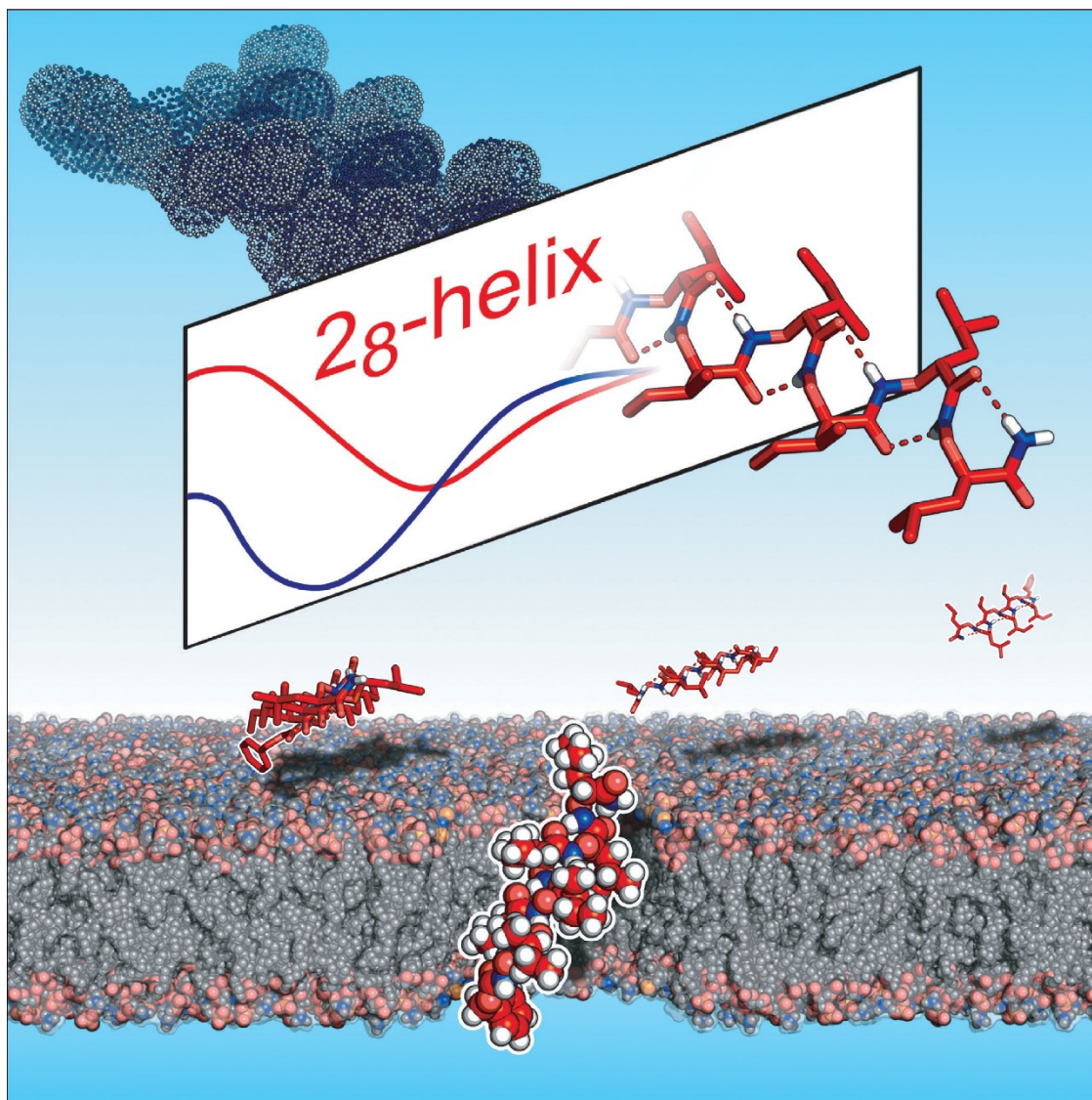
„Reprinted from Chemistry – A European Journal, **2016**, 22 (49), 17600-17611, ‘α-Aminoxy oligopeptides: synthesis, secondary structure and cytotoxicity of a novel class of anticancer foldamers’ Copyright © 2016, with permission by John Wiley Son, Inc.”

Eigener Anteil der Arbeit: 65%, Erstautorin, Durchführung aller organischen Synthesen und analytische Charakterisierung aller Synthesebausteine; Entwicklung und Optimierung der Festphasensynthesemethode; Planung und Durchführung der Synthese, Reinigung und analytische Charakterisierung aller Oligomere; Planung und Analyse der 2D-NMR-Studien; Auswertung von Strukturaktivitätsbeziehungen; Mitarbeit an der Erstellung des Manuskripts für die Veröffentlichung.

■ Peptidomimetics | *Hot Paper* |

α -Aminoxy Oligopeptides: Synthesis, Secondary Structure, and Cytotoxicity of a New Class of Anticancer Foldamers

Daniela Diedrich,^[a] Ana J. Rodrigues Moita,^[a] Anja R  ther,^[b] Benedikt Frieg,^[a] Guido J. Reiss,^[c] Astrid Hoepfner,^[d] Thomas Kurz,^[a] Holger Gohlke,^[a] Steffen Lüdeke,^[b] Matthias U. Kassack,^[a] and Finn K. Hansen^{*[a]}



Abstract: α -Aminoxy peptides are peptidomimetic foldamers with high proteolytic and conformational stability. To gain an improved synthetic access to α -aminoxy oligopeptides we used a straightforward combination of solution- and solid-phase-supported methods and obtained oligomers that showed a remarkable anticancer activity against a panel of cancer cell lines. We solved the first X-ray crystal structure of an α -aminoxy peptide with multiple turns around the helical axis. The crystal structure revealed a right-handed 2_8 -helical conformation with precisely two residues per turn and a helical pitch of 5.8 Å. By 2D ROESY experiments, molecular dynamics simulations, and CD spectroscopy we were

able to identify the 2_8 -helix as the predominant conformation in organic solvents. In aqueous solution, the α -aminoxy peptides exist in the 2_8 -helical conformation at acidic pH, but exhibit remarkable changes in the secondary structure with increasing pH. The most cytotoxic α -aminoxy peptides have an increased propensity to take up a 2_8 -helical conformation in the presence of a model membrane. This indicates a correlation between the 2_8 -helical conformation and the membranolytic activity observed in mode of action studies, thereby providing novel insights in the folding properties and the biological activity of α -aminoxy peptides.

Introduction

The use of unnatural amino acids to control secondary structures is a promising strategy to overcome drawbacks of peptide drugs, such as conformational flexibility and poor bioavailability.^[1] In recent years, significant efforts have been devoted to the investigation of peptidomimetic foldamers. β -Peptides are the most thoroughly studied class of foldamers, and pioneering research by the groups of Seebach and Gellman revealed that oligopeptides constructed from β -amino acids can adopt helical conformations that are structurally similar to the α -helix.^[2,3]

α -Aminoxy peptides, the oxa-analogs of β -peptides, were also found to be promising candidates for foldamers.^[4] The aminoxy amide bond is resistant to enzymatic degradation, and peptide analogs constructed from α -aminoxy acids show remarkable conformational stability, which has been demonstrated by Yang and coworkers through quantum chemical calculations, NMR, FT-IR, and CD spectroscopy.^[4,5] The preferred secondary structure of homochiral α -aminoxy peptides is stabilized by strong intramolecular hydrogen bonds between the C=O_{*i*} oxygen and the N-H_{*i-2*} proton leading to so-called α N-O turns.^[4] It has been hypothesized that oligomers can adopt a conformation consisting of consecutive α N-O turns resulting in a 1.8_8 -helix.^[4] Presumably, in such a 1.8_8 -helix, the spatial arrangement of the side chains is similar as in an

α -helix in canonical peptides, thereby highlighting the potential of α -aminoxy peptides as mimics for bioactive peptides. However, until now, this helical conformation has only been studied for short oligomers (mainly α -aminoxy dipeptide amides).^[4] This is partly due to the limited access to long-chained oligomers. The synthesis of longer α -aminoxy peptide sequences under solution-phase conditions is generally challenging, which also hampers the applicability of α -aminoxy peptides as foldamers for biomedical applications. Even though the field of anticancer peptides (ACPs) is rapidly emerging,^[6] no anticancer properties have been reported for α -aminoxy peptides thus far.

Here we present an improved synthesis of α -aminoxy oligopeptides based on a straightforward combination of solution-phase and solid-phase supported methods. We report a remarkable cytotoxic activity, particularly of long-chained oligomers, against a panel of cancer cell lines of different chemosensitivities and tissue origins. X-ray crystallography and circular dichroism (CD) spectroscopy were applied to identify a 2_8 -helix as the prevalent fold of the α -aminoxy oligopeptides. We compared the results from membrane integrity assays as well as apoptotic assays with the CD data in the presence of liposomes as a membrane model. The CD experiments suggest that the membranolytic properties of the most cytotoxic α -aminoxy peptides are associated with an increased propensity for a 2_8 -helix formation in the membrane environment.

[a] D. Diedrich, A. J. R. Moita, B. Frieg, Prof. Dr. T. Kurz, Prof. Dr. H. Gohike, Prof. Dr. M. U. Kassack, Dr. F. K. Hansen
 Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie
 Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 40225 Düsseldorf (Germany)
 E-mail: finn.hansen@hhu.de

[b] A. Rütger, Dr. S. Lüdeke
 Institut für Pharmazeutische Wissenschaften
 Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, 79104 Freiburg (Germany)

[c] Dr. G. J. Reiss
 Institut für Anorganische Chemie und Strukturchemie
 Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 40225 Düsseldorf (Germany)

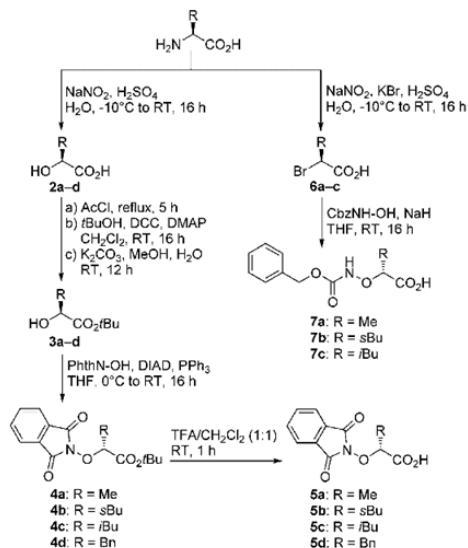
[d] Dr. A. Hoepfner
 X-Ray Facility and Crystal Farm
 Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 40225 Düsseldorf (Germany)

Supporting information for this article can be found under
<http://dx.doi.org/10.1002/chem.201602521>.

Results and Discussion

Chemistry

Synthesis of the building blocks: In order to synthesize a mini library of α -aminoxy oligopeptides (**1**), we first prepared a series of D- α -aminoxy acids (D-¹⁵N₁Xaa-OH) using literature procedures (Scheme 1).^[7] Briefly, phthaloyl-protected monomers **5a–d** were synthesized from their respective L- α -amino acids by conversion into the L- α -hydroxy acids **2a–d** followed by acetylation, esterification, and deprotection of the acetyl group to yield the *tert*-butyl protected L- α -hydroxy acids **3a–d**. The desired phthaloyl-protected D- α -aminoxy acids **5a–d** were obtained through a Mitsunobu reaction with *N*-hydroxyphthal-

Scheme 1. Synthesis of α -aminoxy acids.

imide, followed by deprotection of the *tert*-butyl ester. The carboxybenzyl-protected α -aminoxy acids **7a–c** were prepared from the respective *L*- α -amino acids by their corresponding *L*- α -bromo acids **6a–c**. The subsequent reaction with benzyl *N*-hydroxycarbamate (CbzNH-OH) in the presence of sodium hydride as a base afforded the desired Cbz-protected monomers **7a–c**.

To the best of our knowledge only one solid-phase-supported protocol for the synthesis of α -aminoxy oligopeptides has been published thus far.^[5] The method reported by Shin and coworkers allowed the preparation of a series of pentamers.^[5] In the initial phase of this project, we attempted to prepare the hexamer **1a** (Phth-^{NO}Ile-^{NO}Ile-^{NO}Ile-^{NO}Ile-^{NO}Leu-^{NO}Leu-NH₂) utilizing this published protocol. However, the desired product was only obtained in low crude yield (20%) and purity (33%), which is in line with previous reports about difficulties in the synthesis of peptide sequences containing repetitive aliphatic side chains, such as *sec*-butyl.^[8] We therefore aimed at the development of a more efficient approach that allows the preparation of longer α -aminoxy oligopeptides. For this purpose, we decided to use a combination of solution- and solid-phase peptide synthesis. We synthesized a panel of dimeric building blocks in solution by deprotection of the phthaloyl groups of **4b–d** using hydrazine hydrate to provide the free aminoxy groups followed by an EDC/HOBt mediated amide coupling reaction with the phthaloyl- or Cbz-protected α -aminoxy acids **5** or **7** to afford the α -aminoxy dipeptides **8a–k** (Table 1).

Solid-phase synthesis of α -aminoxy oligopeptides: The required *N*-protected α -aminoxy dipeptide acids (PG-^{NO}Xaa-^{NO}Xaa-OH) were obtained from the corresponding *tert*-butyl protected derivatives **8a–k** directly before use.^[9] Preparative conditions for the synthesis of the model hexamer **1a** were

Table 1. Solution-phase synthesis of α -aminoxy dipeptides.

Entry	PG-N(H) ⁿ	R ¹	R ²	Product	Yield [%]
1	Phth-N	iBu	iBu	8a	86
2	Phth-N	sBu	sBu	8b	71
3	Phth-N	Bn	Bn	8c	75
4	Phth-N	iBu	Me	8d	54
5	Phth-N	sBu	Me	8e	59
6	Phth-N	Bn	iBu	8f	63
7	Phth-N	sBu	Bn	8g	78
8	Cbz-NH	Bn	Me	8h	86
9	Cbz-NH	sBu	Me	8i	76
10	Cbz-NH	iBu	iBu	8j	64
11	Cbz-NH	sBu	sBu	8k	43

[a] Protecting group on the N-terminus of the α -aminoxy dipeptides.

optimized by investigating several well-established coupling reagents (see Table S1 in the Supporting Information for details). The results from this screening showed significant differences between the investigated coupling reagents. The BOP/HOBt/NEM coupling system gave the highest crude yield (67%) and purity (57%) compared with EDCI/HOBt, DIC, DIC/HOBt, HBTU/HOBt/NEM, and PyBOP/HOBt/NEM. Thus, BOP/HOBt/NEM was chosen as the coupling system for all subsequent solid-phase supported reactions.

We next prepared a series of hexamers and decamers (Scheme 2). In all cases, the resin was loaded by the reaction

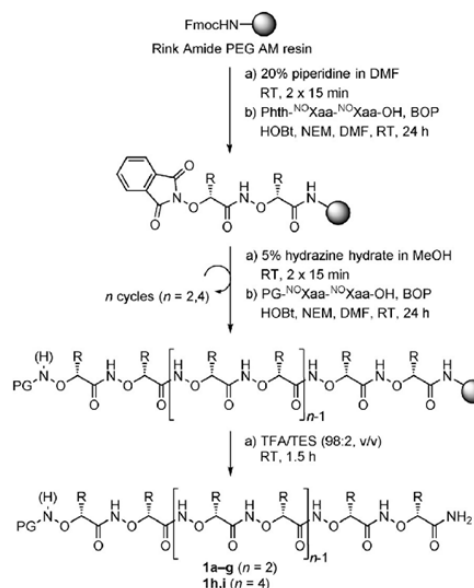
Scheme 2. Solid-phase synthesis of α -aminoxy oligopeptides.

Table 2. Yields, purities, and HRMS data of the α -aminoxy peptides **1a–i** prepared by solid-phase synthesis.

Entry	Peptide ^[a]	Crude purity [%]	Purity ^[b] [%]	Isolated yield ^[c] [%]	m/z ^[d] [calcd]	m/z ^[d] [obs]
1	Phth- ^{NO} Ile- ^{NO} Ile- ^{NO} Ile- ^{NO} Ile- ^{NO} Leu- ^{NO} Leu-NH ₂ 1a	57	96	30	922.5132	922.5135
2	Cbz- ^{NO} Ile- ^{NO} Ile- ^{NO} Ile- ^{NO} Ile- ^{NO} Leu- ^{NO} Leu-NH ₂ 1b	62	96	32	926.5445	926.5447
3	Cbz- ^{NO} Ala- ^{NO} Ile- ^{NO} Ala- ^{NO} Ile- ^{NO} Ala- ^{NO} Leu-NH ₂ 1c	61	96	24	800.4036	800.4028
4	Phth- ^{NO} Leu- ^{NO} Leu- ^{NO} Ile- ^{NO} Ile- ^{NO} Phe- ^{NO} Phe-NH ₂ 1d	64	96	24	990.4819	990.4819
5	Cbz- ^{NO} Leu- ^{NO} Leu- ^{NO} Ile- ^{NO} Ile- ^{NO} Phe- ^{NO} Phe-NH ₂ 1e	36	97	18	994.5132	994.5131
6	Cbz- ^{NO} Ala- ^{NO} Phe- ^{NO} Ala- ^{NO} Leu- ^{NO} Ile- ^{NO} Ile-NH ₂ 1f	66	98	28	876.4349	876.4354
7	Cbz- ^{NO} Ala- ^{NO} Phe- ^{NO} Phe- ^{NO} Ile- ^{NO} Ala- ^{NO} Leu-NH ₂ 1g	75	97	42	910.4193	910.4200
8	Cbz- ^{NO} Ala- ^{NO} Ile- ^{NO} Leu- ^{NO} Phe- ^{NO} Ala- ^{NO} Leu- ^{NO} Phe- ^{NO} Ile- ^{NO} Leu- ^{NO} Phe-NH ₂ 1h	54	96	21	1460.7195	1460.7202
9	Cbz- ^{NO} Ala- ^{NO} Phe- ^{NO} Leu- ^{NO} Phe- ^{NO} Ala- ^{NO} Leu- ^{NO} Phe- ^{NO} Ile- ^{NO} Leu- ^{NO} Phe-NH ₂ 1i	49	97	22	1494.7039	1494.7029

[a] All abbreviations refer to *D*-configured α -aminoxy acids. [b] Purity after purification by RP-HPLC. [c] Yields are calculated based on the loading capacity of the resin. [d] Based on HRMS.

of the deprotected Fmoc Rink Amide PEG AM resin with three equivalents of the respective phthaloyl-protected α -aminoxy dipeptide acid (Phth-^{NO}Xaa-^{NO}Xaa-OH) in the presence of the BOP/HOBt/NEM coupling system for 24 h. Iterative cycles of the phthaloyl deprotection (5% hydrazine hydrate in methanol, 2 × 15 min) and the amide coupling (3 equiv of the respective dimer and coupling agents, 24 h) were performed to synthesize the resin-bound oligopeptides. In the case of the final coupling step, we used both phthaloyl- and Cbz-protected dimers to afford oligomers with two different cap groups. After the desired chain length was reached, all products were cleaved from the resin and precipitated with cold diethyl ether to give the crude products (Scheme 2, Table 2). The crude α -aminoxy peptides **1a–i** were subsequently purified by semipreparative RP-HPLC to a purity greater than 95%, lyophilized, and characterized by HRMS (Table 2). To the best of our knowledge, the decamers **1h** and **1i** are the longest α -aminoxy peptides reported so far.

Biological evaluation

Anticancer activity: While no anticancer activities have been reported for α -aminoxy peptides, recent reports regarding the cytotoxic activities of various ACPs^[6a] and ACP mimetics (anticancer foldamers)^[6b] prompted us to investigate the anticancer activity of the α -aminoxy peptides **1a–i**. All compounds were first tested for their cytotoxic properties against the human esophageal squamous cancer cell line Kyse510 and its cisplatin resistant subclone Kyse510 CisR. Several compounds exhibited remarkable anticancer activities (Table 3). It is worth noting that the most potent α -aminoxy peptide **1h** (IC_{50} = 1.4 μ M) exceeded the potency of the reference compound cisplatin (IC_{50} = 2.0 μ M) against Kyse510 cells and also showed the highest activity against Kyse510 CisR cells (IC_{50} = 2.6 μ M). All compounds were subsequently tested for their anticancer activity against the human ovarian cancer cell lines A2780 and A2780 CisR (Table 3). Remarkably, the most potent α -aminoxy peptides **1h** and **1i** showed an up to twofold higher activity against the cisplatin resistant subclone A2780 CisR than against the native cell line A2780. Again, the decamer **1h** showed the highest activity with IC_{50} values of 3.3 μ M (A2780) and 1.7 μ M

Table 3. Cytotoxic activity (MTT) of **1a–i** against cancer cell lines and HEK293 cells.^[a,b]

Compound	IC_{50} [μ M]				
	Kyse510	Kyse510 CisR	A2780	A2780 CisR	HEK293
cisplatin	2.0 ± 0.02	5.7 ± 0.2	1.7 ± 0.1	11.1 ± 0.1	3.8 ± 0.1
hexamers					
1a	> 100	66.0 ± 4.0	> 100	> 100	> 100
1b	55.8 ± 1.4	65.8 ± 6.5	91.6 ± 6.5	> 100	17.5 ± 1.1
1c	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
1d	58.0 ± 1.3	54.6 ± 1.2	57.5 ± 3.0	70.0 ± 2.4	> 100
1e	5.7 ± 0.1	7.8 ± 0.1	7.5 ± 0.2	8.9 ± 0.6	20.2 ± 0.8
1f	63.8 ± 1.6	77.3 ± 1.7	81.1 ± 1.4	> 100	> 100
1g	40.2 ± 0.8	52.4 ± 1.2	55.0 ± 2.5	60.9 ± 1.5	84.0 ± 2.8
decamers					
1h	1.4 ± 0.1	2.6 ± 0.1	3.3 ± 0.1	1.7 ± 0.1	9.0 ± 0.6
1i	2.7 ± 0.1	6.6 ± 0.5	8.0 ± 0.4	3.9 ± 0.1	26.3 ± 1.3

[a] CisR = cisplatin resistant. [b] Data shown are the mean ± SE of at least 3 experiments.

(A2780 CisR). From the data summarized in Table 3 some preliminary structure–activity relationships can be drawn: 1) Replacement of the phthaloyl by a Cbz protecting group leads to a up to tenfold increase in the anticancer potency (see **1d** vs. **1e**), 2) decamers are more potent than hexamers (see **1a–g** vs. **1h, i**), and 3) aromatic side chains increase the anticancer activity (see **1b** vs. **1e**; and **1a** vs. **1d**). To probe the selectivity of our α -aminoxy peptides against cancer cells, we investigated the cytotoxicity of **1a–i** against human embryonic kidney 293 (HEK293) cells (Table 3). The results showed that the most potent α -aminoxy peptides **1e, h, i** are less toxic to normal cells than to cancer cells. In summary, even though the preference for cancer cells still needs to be improved for an increased therapeutic index, α -aminoxy peptides can be considered a new class of anticancer foldamers.

Conformational analysis

The activity of ACPs and anticancer foldamers is generally associated with a specifically folded bioactive conformation.^[6,10] As the folding behavior of long-chained α -aminoxy peptides is still elusive, we analyzed the conformations of representative

members of this novel class of anticancer foldamers by X-ray crystallography, molecular modeling, NMR spectroscopy, molecular dynamics (MD) simulations, and CD spectroscopy.

X-ray crystallography: We obtained diffraction-quality crystals of the α -aminoxy hexapeptide **1b** by crystallization from acetonitrile/water. The packing of the molecules in the crystal structure (Figure 1A) is dominated by two types of interactions: 1) Each molecule is head-to-tail connected to neighboring ones by hydrogen bonds resulting in a zig-zag chain; the characteristic angle of this zig-zag chain seems to depend on the steric demand of the terminal side chains (Figure 1A). 2) The side chains of adjacent zig-zag chains interlock with each other (Figure 1A).

The conformation observed in the crystal structure of **1b** (Figure 1B) is in several aspects in good agreement with the folding pattern previously predicted for α -aminoxy peptides:^[4d]

1) The secondary structure is stabilized by the formation of eight-membered hydrogen-bonded rings leading to multiple highly conserved α N–O turns. 2) The side chains alternate on opposite sides of the helix. This results in the interlocking of

neighboring side chains, which possibly contributes to the stability of the molecule (Figure 1A). As a consequence of all these interactions, the backbone of the all-D-configured α -aminoxy hexapeptide forms a right-handed helix. 3) The α -aminoxy peptide helix is rather flat (Figure 1B, bottom) compared to other helices of conventional spiral shape, such as α -helices or 3_{10} -helices.^[4e]

In comparison to previous conformational studies on α -aminoxy peptides, we observed some subtle but important differences. By quantum mechanical calculations, the amide carbonyl at the $i+2$ position had been predicted to be twisted by -30 – 50° relative to the corresponding carbonyl at the i position, thereby leading to a 1.8_8 -helical conformation.^[4] However, the crystal structure of **1b** reveals that precisely two residues are necessary to complete a full turn around the helical axis, which demonstrates that α -aminoxy peptides adopt a 2_8 -helix. The observed helical pitch of 5.8 \AA ($\pm 0.1 \text{ \AA}$) (Figure 1B) lies in between the helical pitches observed in typical protein secondary structures, such as α -helices (5.4 \AA) or 3_{10} -helices (6.0 \AA), in contrast to the computationally predicted helical pitch of 6.5 \AA .^[4d]

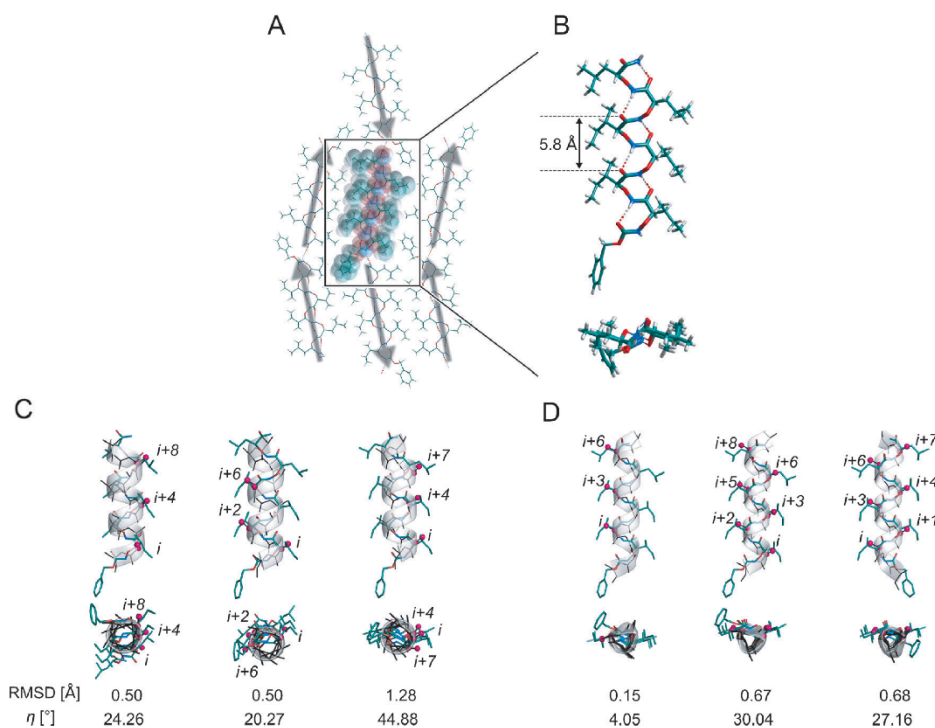


Figure 1. X-ray crystal structure of the α -aminoxy hexapeptide **1b**. A) Crystal packing of **1b**. Arrows denote the orientation of the α -aminoxy hexapeptides (C-terminus \rightarrow N-terminus). B) Close-up view of **1b** in side view (top, C-terminus at the top) and rotated by 90° (bottom, C-terminus oriented towards the viewer). Intramolecular hydrogen bonds are depicted as dashed lines. Overlay of C_α and C_β atoms of the crystal structure of **1b** onto (C) C_α and C_β atoms of a canonical α -helix and (D) C_α and C_β atoms of a 3_{10} -helix, resulting in a $i, i+j$ pattern (in which j ranges from one to eight). The Cbz protecting group is oriented towards the helical C-terminus. In the lower panel, the overlays are rotated by 90° , such that the helical C-terminus is oriented towards the viewer. The carbon atoms of the crystal structure of **1b** are depicted in green (A–D). The helical structures are depicted as black sticks with transparent cartoon representations (C+D). The magenta spheres highlight the helical reference atoms addressed by the side chains of **1b**. The root mean square deviation (RMSD) and average angle deviation η (see text for definition) were used to evaluate the quality of the superimposition.

Molecular modeling: To probe if α -aminoxy peptides can mimic specific features of protein secondary structures, we overlaid the C_{α} and C_{β} atoms of the crystal structure of **1b** (Figure 1B) onto respective atoms of a canonical α -helix (backbone dihedrals $\varphi = -48.0^\circ$ and $\psi = -57.0^\circ$; Figure 1C), and a 3_{10} -helix ($\varphi = -74.0^\circ$ and $\psi = -4.0^\circ$; Figure 1D). The root mean square deviation (RMSD) of the C_{α} and C_{β} atoms of **1b** with respect to equivalent atoms of the secondary structures and the average deviation (η) of the respective C_{α} – C_{β} bond vectors were used to evaluate the quality of the superimposition (Figure 1C,D).

For the α -helix, amino acid side chains in the $i, i+j, i+k$ positions (with j and k in the range of two to eight) of two helix turns are well addressed by α -aminoxy oligopeptides when their N-terminus is oriented towards the C-terminus of the α -helix. For the substitution pattern $i, i+4, i+8$ (side chains on one helical face, Figure 1C), we determined a RMSD of roughly 0.5 Å and a η smaller than 25° , indicating similar positions of the C_{α} and C_{β} atoms and similar side chain orientations. Similar RMSD and η values were found for the substitution patterns $i, i+2, i+6$ (Figure 1C), $i, i+2, i+4$, and $i, i+2, i+4, i+8$ (side chains on both helical faces, Figure S1A in the Supporting Information). In contrast, other helical substitution patterns, which have been described for protein–protein interfaces^[11] ($i, i+4, i+7$, Figure 1C; $i, i+3, i+7$ and $i, i+4, i+6$, Figure S1A), reveal larger positional and/or angle deviations (up to 1.41 Å or 48.32°).

The substitution pattern $i, i+3, i+6$ of a 3_{10} -helix is perfectly addressed by the side chains of the α -aminoxy oligopeptides (RMSD = 0.15 Å, $\eta = 4.05^\circ$) when the Cbz protecting group is oriented towards the helical C-terminus (Figure 1D). In addition, the side chains of the α -aminoxy peptides can also mimic a great variety of other 3_{10} -helical side chains patterns ($i, i+j$ with $1 \leq j \leq 8$), resulting in a RMSD smaller than 0.7 Å and a η of roughly 30° (Figure 1D). For both secondary structures, larger positional and/or angle deviations are found if the Cbz protecting group of **1b** is oriented towards the helical N-terminus (Figure S1B,C).

Taken together, α -aminoxy oligopeptides represent a new class of helix mimetics that can mimic several substitution patterns of α -helices and 3_{10} -helices. Although there is an increasing number of synthetic scaffolds for the mimicry of side chains on a single face of an α -helix, there are very few examples that can reproduce the side chain projection of two helical faces.^[12] Therefore, these findings may enable the structure-based design of α -aminoxy peptide-based one-sided and double-sided helix mimetics with potential applications as inhibitors of protein–protein interactions or as analogs of α -helical ACPs.

Conformational properties in solution: As shown above, the similarity in the fold and helical pitch of the 2_8 -helix and the secondary structures of canonical peptides, namely α - and 3_{10} -helices, is intriguing and highlights the particular importance of this structural element. Yet to understand its role for biological activity it is indispensable to know the conditions that support the existence of the 2_8 -helix in solution.

To study the conformational properties of **1b** and **1c** in solution, we performed 2D rotating frame nuclear Overhauser effect spectroscopy (ROESY) experiments in $CDCl_3$ at room temperature. The 1H NMR spectra of **1b** and **1c** revealed no evidence for the presence of multiple conformations. In agreement with previously published data,^[4d] all internal aminoxy protons of **1b** and **1c** were clustered in the range of 11.5–12.5 ppm, whereas the N-terminal aminoxy and the C-terminal NH_2 protons were shifted upfield (see the Supporting Information). Key ROE cross-peaks observed in the 2D ROESY spectra of **1b** and **1c** are illustrated in Figure S2 and S3 (see the Supporting Information). Previously, Yang and coworkers found a characteristic ROE pattern for the typical α N–O turn of a homochiral α -aminoxy peptide with each internal aminoxy proton (NH), showing a strong ROE to its own α -methine proton ($C_{\alpha}H$) and a weaker ROE cross-peak to the neighboring backbone methine proton ($C_{\alpha}H_{\beta}$).^[4d] The same ROE pattern was observed in our 2D ROESY analysis of **1c** (Figure S2), which indicates the presence of repetitive α N–O turns. While the overlap of some signals in the 1H NMR spectrum of **1b** hampered the assignment of some of the weaker ROE cross-peaks, the key ROE pattern (Figure S3) was also observed for **1b**. Furthermore, the interatomic distances reflected by these ROE signals are in good agreement with the distances observed in the crystal structure of **1b** (Figure S4).

To corroborate this observation and to gain insights regarding the preferred conformation of **1b** in solution, we performed molecular dynamics (MD) simulations of 1.5 μs length of **1b** in $CHCl_3$. The conformational ensemble was clustered according to the structural similarity of the backbone. In general, for all clusters I–X, the distances measured between the respective hydrogen atoms are in agreement with the occurrence of an ROE pattern that is indicative for repetitive α N–O turns, in particular for ROEs observed in the N-terminal part of the molecule (Figure S4). Representative structures of **1b** extracted from the clusters I and II, which contain more than 73% of all conformations (Figure S5), show pronounced movements of the N-terminal Cbz group and the C-terminal α -aminoxy acid only. For the core region, however, a conformation very similar to the crystal structure is found, with characteristic repetitive α N–O turns forming a rather flat helix with the side chains alternating on the opposite sides of the helix (Figure 2). Based on these observations, we conclude that the 2_8 -helix consisting of repetitive α N–O turns is retained in a hydrophobic environment such as $CDCl_3$.

CD spectroscopy: In proteins and peptides, a conformation can be identified from their CD spectra by the assignment of characteristic motifs that correspond to a particular secondary structure. For molecules in which such characteristic CD motifs are not known, CD spectra can be correlated with molecular geometries through the comparison of experimental spectra to spectra obtained from quantum chemical calculations. The recent development of simplified theoretical models allows the simulation of accurate CD spectra of large molecules at comparably low computational cost.^[13,14] We calculated a CD spectrum for the crystal structure geometry of **1b** at the simplified

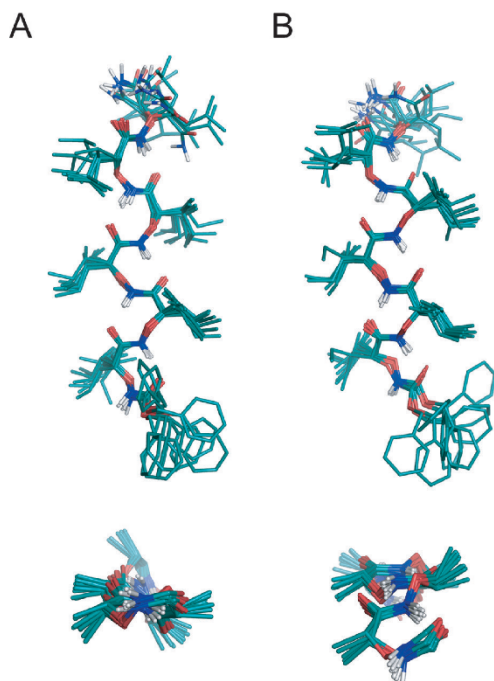


Figure 2. Representative conformations of **1b** in CHCl_3 . Overlays of 10 representative structures extracted from the two largest clusters I (A) and II (B) (Figure S5 in the Supporting Information); the clustering was performed on a conformational ensemble of **1b** in CHCl_3 generated by MD (molecular dynamics) simulations of 1.5 μs length. The N-terminus is oriented towards the bottom (top panels) or to the viewer (lower panels). For clarity, hydrogens at carbon atoms are omitted and only the backbone and C_β atoms are shown in the lower panels.

time-dependent density functional theory (sTD-DFT) level ($\omega\text{B97X/TZVPP}$)^[44] and compared it to experimental CD spectra of solutions of **1b** and **1f–i** in 2,2,2-trifluoroethanol (TFE) (Figure 3). The good agreement between the calculated and experimental spectrum of **1b** suggests that the 2_8 -helix is retained in TFE. The spectral patterns of **1f–i** look very similar and are in good agreement with previously reported data on short-chained α -aminoxy peptides.^[4] Furthermore, this CD pattern is also reminiscent of a β -turn secondary structure in canonical peptides, which agrees with the fact that the 2_8 -helix can be interpreted as a motif of consecutive turns. In proteins and peptides, prototypic CD patterns indicate a particular secondary structure, more or less irrespective of the individual amino acid sequence. This is due to the fact that the spectral patterns arise from the dipolar coupling of electronic transitions in the peptidic carbonyls of the backbone, while the contributions from the side chains are often negligible.^[15] Obviously, the same also holds true for α -aminoxy peptides. Except for a slight additional positive intensity around 210 nm in **1i** that is possibly due to the unique arrangement of the aromatic side chains in this compound (Figure 3, inset), the same overall band pattern is observed in all spectra. This suggests that not only compound **1b**, but also α -aminoxy peptides **1f–i**, take up

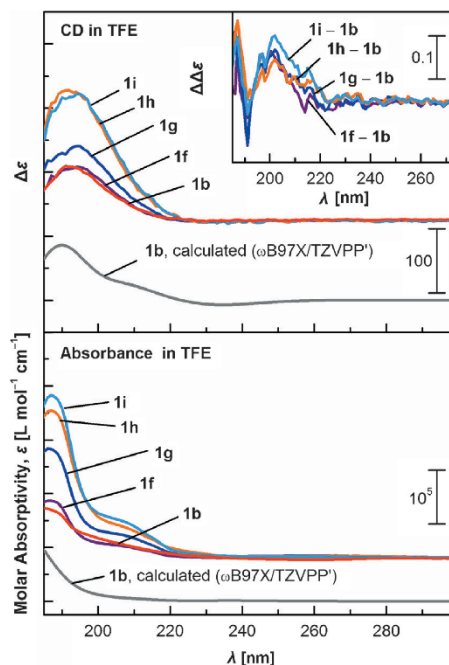


Figure 3. CD and UV/Vis absorbance spectra of **1b** and **1f–i** in comparison with theoretical spectra calculated for **1b** at the sTD-DFT level. Inset: Difference of the normalized CD spectra (**1b** subtracted from **1f–i**). Deviations are most obvious around 210 nm, in particular for the phenyl-rich oligomer **1i**.

a 2_8 -helical structure in TFE. The corresponding CD spectra recorded in acetonitrile look very similar, which indicates that the secondary structure is also retained in this solvent (Figure S6). Furthermore, we did not observe significant temperature-dependent changes in the CD spectra of **1f–i** recorded in TFE (1–20 °C) and acetonitrile (–2–35 °C), which highlights the conformational stability of these α -aminoxy peptides (Figure S7).

To study the conformational properties in an aqueous environment, we recorded CD spectra of the hexamer **1g**, an α -aminoxy peptide with satisfactory solubility in water in the range from pH 2.5–11.2 (Figure 4). Below pH 6.5, the water solubility of **1g** decreases significantly. The CD spectrum at acidic pH values remains basically unchanged and exhibits the spectral features of a 2_8 -helix (Figure 4A, inset). However, similar to previous studies on α -aminoxy dipeptides,^[4a] significant changes occur at higher pH values. This suggests the existence of at least one additional conformation that is in a pH-dependent equilibrium with the 2_8 -helix in aqueous solutions. Every pH-dependent spectrum can be viewed as the linear combination of the spectral contributions that correspond to individual pH-dependent species. To determine the number of pH-dependent species, their individual CD spectra, and the pK_a value(s) associated with the pH-dependent conformational transition(s) in the pH range from 6.5–11.2, we performed a matrix least-squares (MLS) global fitting,^[16] a method that we have previ-

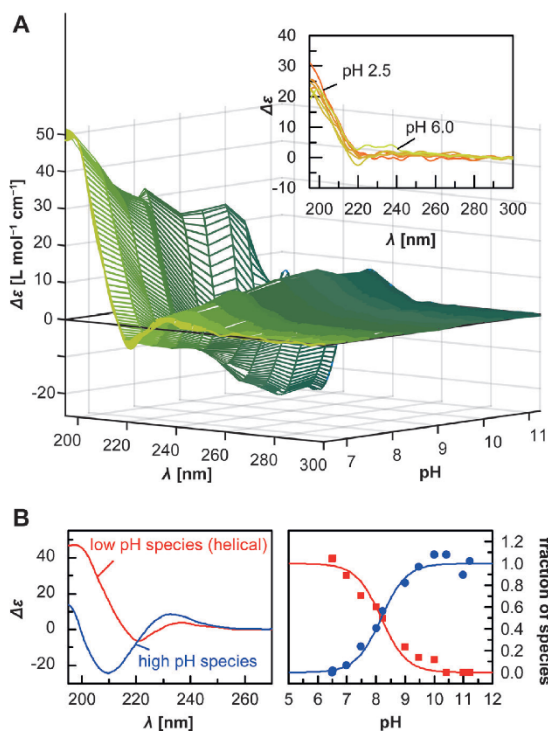


Figure 4. A) pH-dependent CD spectra of **1g** in the range from pH 6.5–11.2 (3D representation). Inset: pH 2.5–6.0 2D representation. The low pH values have been omitted from the MLS (matrix least-squares) analysis due to the low solubility below pH 6.5. The colors are chosen according to litmus paper color coding from blue (basic) to red (acidic). B) Pure spectra from MLS global fitting that correspond to spectral contributions from the 2_8 -helical structure and another conformer (left) and the corresponding titration curves (right). The dots represent the coefficient with which the pure spectra contribute to each pH-dependent spectrum. The curves are the theoretical Henderson-Hasselbalch curves assuming a transition at a pK_a of 8.2.

ously used for the analysis of pH-dependent spectral data.^[17] The MLS fitting procedure delivered a transition pK_a of 8.2 between two conformational species, the pure CD spectra of two involved conformational species, and the corresponding titration curves (Figure 4B). The pure spectrum of the low pH species closely resembles the CD spectra of α -aminoxy peptides in a 2_8 -helical conformation (Figure 3). Different from the CD spectra recorded below pH 6.5, there is a small negative feature around 220 nm, which suggests the existence of two distinct species with predominant 2_8 -helical conformations, a species with low solubility in water that exists at acidic pH, and a species with higher solubility around neutral pH. The high pH species that is represented by the second pure spectrum presumably has a disordered conformation. Therefore, taken together, **1g** undergoes two pH-dependent transitions; one with a transition pK_a of 8.2 that is associated with a conformational transition from a disordered structure to a predominantly 2_8 -helical conformation, and a second transition at a pK_a smaller than 6.5 related to a dramatic decrease in solubility. Such

a behavior could be explained by a lower pK_a of the terminal aminoxy groups in comparison to the pK_a of the internal aminoxy groups in which the protons are involved in strong intramolecular hydrogen bonding (Figure 1). Deprotonation of a terminal aminoxy group at around neutral pH would have only little impact on the conformational stability, but would increase the solubility in water. Deprotonation at higher pH, on the other hand, disrupts the intramolecular hydrogen bonds and invokes a conformational change, thereby eventually leading to the loss of the helical secondary structure.

Mode of action studies and CD spectroscopy in a membrane environment

Most known ACPs act through membranolytic and/or apoptotic modes of action.^[6] As a first step to elucidate the role of the conformational folding in the cytotoxic activity of α -aminoxy peptides (Table 3), we studied the membrane damage and apoptosis induction of the two decamers **1h** and **1i**, and the hexamers **1b**, **1f**, and **1g** that are at least 20-fold less cytotoxic than **1h** and **1i**. Both membranolytic and late apoptosis eventually result in membrane damage that allows nuclear DNA staining with propidium iodide (PI). However, membranolytic compounds lead to a much earlier cellular uptake of PI than late apoptosis. Early apoptosis does not lead to membrane damage, but instead DNA fragmentation can be detected after cell lysis and PI staining. Flow cytometry was, thus, used to easily distinguish between membranolytic (direct PI uptake) and apoptosis induction (PI uptake only after cell lysis and DNA fragmentation). Figure 5 shows significant differences in the membrane damage and apoptosis induction for the decamers **1h** and **1i** compared to the hexamers **1b**, **1f**, and **1g**. Whereas $2 \mu\text{M}$ **1h** (approx. $2 \times IC_{50}$ by MTT) do not show significant differences compared to the untreated control, $5 \mu\text{M}$ **1h** (roughly $3.5 \times IC_{50}$) significantly increased the membrane damage but did not change the number of apoptotic cells (Figure 5A). The second most potent peptide **1i** behaved similarly; the membrane damage was significantly increased at 5 and $10 \mu\text{M}$ without affecting the apoptosis. In contrast, $50 \mu\text{M}$ of the hexamers **1b**, **1f**, or **1g** (roughly IC_{50}) increased the apoptosis significantly, whereas the membrane damage was not significantly affected. Concerning the membrane damage and apoptosis induction, **1b** resembles the DNA damaging agent cisplatin (cDDP, Figure 5A) more than the structurally related peptides **1h** and **1i**. Figure 5B summarizes the ratios of the membrane damage and apoptosis induction. The decamers **1h** and **1i** have significantly increased ratios over the untreated control, cisplatin was in the range of the untreated control, and the hexamers **1b**, **1f**, and **1g** displayed reduced ratios (**1f** and **1g** significantly). The membrane damage induced by the decamers **1h** and **1i** only leads to an increase in apoptosis at incubation times longer than 24 h, while the hexamers **1b**, **1f**, and **1g**, similar to cisplatin, directly increase apoptosis. Hence, the decamers **1h** and **1i** act through a different mechanism of action compared to the hexamers. This indicates that the chain length contributes to the preferred mode of action of the α -aminoxy peptides.

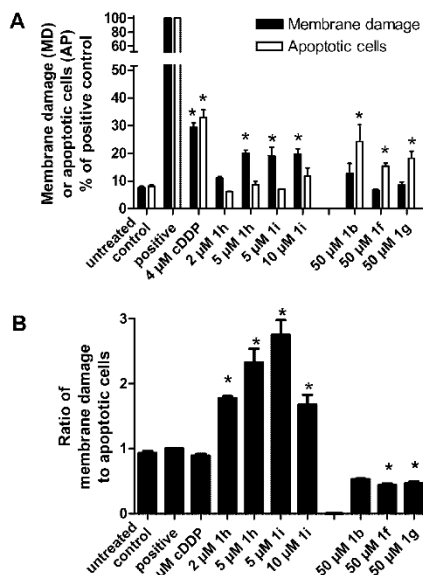


Figure 5. Analysis of the membrane damage (MD) and apoptosis induction (AP) in Kyse510 cells after 24 h incubation with peptides **1b**, **1f–i**, and cisplatin (cDDP). **A**) MD and AP as percentage of the positive control (0.2% Triton X-100 for MD, 5% DMSO for AP). **B**) Ratio of MD to AP. Data shown are the mean \pm SEM of at least 3 experiments. * Shows a significant difference ($p < 0.05$) compared to the untreated control.

Many ACPs are unordered in aqueous solution but adopt a bioactive folded conformation upon interaction with hydrophobic surfaces such as cellular membranes.^[10] Conversely, ACPs that have a higher propensity for ordered secondary structures also have a higher membrane binding affinity and might therefore act by a membranolytic mechanism of action. To study the putative correlation between the conformational folding and membrane binding, we performed CD measurements of the hexamers **1f** and **1g** and the decamers **1h** and **1i** in the presence of liposomes (POPC/POPS 50:50, 80 nm diameter) as a model for membranes (Figure 6). The experiments were performed at pH 9, a pH value in which most of the α -aminoxy peptides exhibit a good solubility in water and are predominantly present in a disordered conformation. To estimate the relative proportions of the secondary structure in the absence and presence of liposomes from these CD spectra, we performed a spectral fitting using spectra obtained from the CD analysis of **1g** as spectral standards. As a standard for the disordered conformation we used the high-pH-species pure spectrum from the MLS global fitting (Figure 4B); for the 2_8 -helical conformation we used the low-pH-species pure spectrum (Figure 4B) and an average spectrum of **1g** recorded at low pH values (Figure 4A, inset). Addition of liposomes induces only marginal changes for the hexamers **1f** and **1g** compared to the corresponding CD spectra in the absence of lipids. The coefficients from the linear combination of the spectral standards suggest a ratio of around 30% 2_8 -helix and 70% disordered structure both in the absence and presence of liposomes.

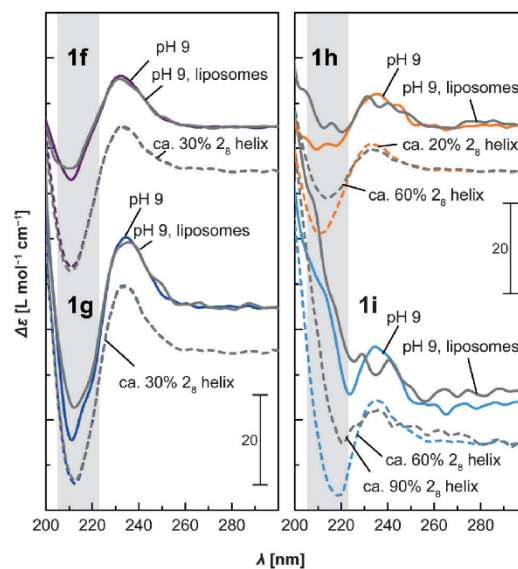


Figure 6. CD spectra recorded at pH 9 for compounds **1f–i** in the absence and presence of liposomes (POPC/POPS 50:50). The dashed curves are constructed by a linear combination of the pure spectra from Figure 4B and the low pH spectra from Figure 4A (inset), which allows for a rough quantification of the amount of 2_8 -helices being present at the given conditions. As it contains spectral features that are different for **1f–i** (Figure 3, inset), the region between 205–223 nm (grey) was omitted from the spectral fitting.

In contrast, the decamers **1h** and **1i** exhibit significant spectral changes upon addition of liposomes. In **1h**, the amount of 2_8 -helix increases from around 20 to 60%. For **1i** the liposome-induced disappearance of the positive intensity around 235 nm, which indicates a disordered conformation, suggests a virtually full transition (ca. 90%) to a 2_8 -helical structure when **1i** binds to lipid membranes. The cytotoxicity of the decamers **1h** and **1i** is, in contrast to **1b**, **1f**, and **1g**, at least in parts related to membranolysis (Figure 5). Together with the findings from the CD experiments in the presence of liposomes, this suggests that the membranolytic properties of **1h** and **1i** are associated with an increased propensity for a 2_8 -helical conformation in a membrane environment.

Conclusion

In this study, we have developed an improved synthesis for long-chained α -aminoxy oligopeptides through a combined solution- and solid-phase approach. Several of the novel hexamers and decamers showed promising anticancer activities against the cancer cell lines Kyse510 and A2780, as well as their cisplatin resistant subclones. Decamer **1h**, the most potent oligomer (Kyse510 IC_{50} = 1.4 μ M), was less toxic to normal HEK293 cells than to the cancer cell lines, indicating a moderate preference for cancer cells.

We obtained the first X-ray structure of an α -aminoxy peptide consisting of multiple turns around the helical axis and

identified a right-handed 2_8 -helical conformation with precisely two residues per turn and a helical pitch of 5.8 Å. This 2_8 -helix can mimic the spatial arrangement of the peptide side chains in α -helices and 3_{10} -helices. By 2D ROESY experiments, MD simulations, and CD spectroscopy we identified a 2_8 -helix as the predominant conformation in organic solvents. However, in aqueous solutions, we observed a pH-dependent equilibrium between the 2_8 -helix and another conformation. As CD spectroscopy in the presence of liposomes revealed that long-chained α -aminoxy peptides have an increased propensity to take up a 2_8 -helical conformation in a membrane environment, we conclude that this conformation is responsible for the membranolytic activity of the decameric α -aminoxy peptides observed in our mode of action studies.

In summary, the improved access to α -aminoxy peptide hexamers and decamers allowed for a thorough analysis of their anticancer activity, conformational fold, and modes of action of this novel class of bioactive compounds. These findings should improve the understanding of α -aminoxy peptides as foldamers and enable the structure-based design of peptide analogs that mimic helical structures such as α -helices and 3_{10} -helices in the future.

Experimental Section

Chemistry

Materials and general methods, synthetic protocols for the preparation of the dimeric building blocks, and the compound characterization data for all novel compounds are given in the Supporting Information.

Solid-phase synthesis of α -aminoxy oligopeptides 1a–i: The manual peptide synthesis was conducted in fritted PE syringes on a 0.2 mmol scale. After the resin swelling for 60 min in DMF, the Fmoc deprotection of the Rink Amide PEG resin (loading 0.56 mmol g⁻¹) was accomplished with 20% piperidine in DMF (2 × 15 min, 2 mL/100 mg of resin) before the resin was sequentially washed with DMF, CH₂Cl₂, and DMF (3 × 2 mL/100 mg resin, agitation for 15 s and then drained). A solution of the free acid^[9] of the respective phthaloyl-protected α -aminoxy dipeptide (0.6 mmol, 3.0 equiv), BOP (265.4 mg, 0.6 mmol, 3.0 equiv), and HOBt (81.1 mg, 0.6 mmol, 3.0 equiv) in DMF (5 mL) was agitated for 1 min, NEM (101 μ L, 0.8 mmol, 4.0 equiv) was added, and this solution was then added to the resin. The amide coupling was performed for 24 h at room temperature. Afterwards, the resin was sequentially washed with DMF, CH₂Cl₂, and DMF. Then, the phthaloyl group was removed by treatment with 5% hydrazine monohydrate in methanol for 15 min (2 ×) and the resin was sequentially washed with DMF, MeOH, CH₂Cl₂, and DMF. After the assembly of the α -aminoxy hexamer or decamer by iterative cycles of the phthaloyl deprotection, the amide coupling reaction, and several washing cycles (final washing with CH₂Cl₂), the crude product was cleaved from the support with TFA/TES (98:2, v/v, 5 mL) for 1.5 h. The filtrate was concentrated in a stream of nitrogen to a volume of smaller than 1 mL. The crude product was precipitated with cold diethyl ether, centrifuged, and the diethyl ether was discarded. This procedure was repeated twice to obtain the crude α -aminoxy peptide. For the semipreparative purification, the crude α -aminoxy peptides were redissolved in acetonitrile and purified on a Macherey-Nagel Nucleosil C8 RP-HPLC column (VP 250/10 Nucleosil 100–5

C8ec) at a flow rate of 4 mL min⁻¹. Fractions containing only the desired α -aminoxy peptide were collected and lyophilized from the HPLC solvents, yielding the purified α -aminoxy peptides (>95% purity in all cases, for details see Table 2 and the Supporting Information).

Biological evaluation

Cell lines and cell culture: The human esophagus cell line Kyse510 and human embryonic kidney cells HEK293 were obtained from the German Collection of Microorganism and Cell Cultures (DSMZ, Braunschweig, Germany). The human ovarian carcinoma cell line A2780 was obtained from the European Collection of Cell Cultures (ECACC, Salisbury, United Kingdom). The cisplatin resistant CisR cell lines were generated by exposing the parental cell lines to weekly cycles of cisplatin at an inhibitory concentration of 50% according to Gosepath et al. and Eckstein et al.^[18,19] The cell lines were grown at 37 °C under humidified air supplemented with 5% CO₂ in RPMI 1640 (A2780, Kyse510) or DMEM (HEK293) media containing 10% fetal calf serum, penicillin (120 IU mL⁻¹), and streptomycin (120 μ g mL⁻¹).

MTT cell viability assay: MTT assays were performed as previously described.^[20] MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) was purchased from Applichem (Darmstadt, Germany). In brief, A2780, Kyse510, and HEK293 cell lines were seeded in 96-well plates. After 24 h, the cells were exposed to increased concentrations of the test compounds. Incubation was ended after additional 72 h, and the cell survival was determined by adding the MTT solution (5 mg mL⁻¹ in PBS buffer). The formazan precipitate was dissolved in DMSO and the absorbance was measured at 544 and 690 nm in a FLUOstar microplate reader (BMG LabTech, Offenburg, Germany).

Analysis of the cell membrane integrity and apoptosis: To measure the membrane integrity, Kyse510 cells were grown in 6-well plates and treated with the indicated concentrations of the compounds for 24 h. Treatment with 0.2% Triton X-100 for 20 min served as a positive control. After harvesting and washing with PBS, the cells were stained with 20 μ g mL⁻¹ propidium iodide (PI, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) dissolved in 0.9% NaCl for 15 min in the dark at 37 °C. Then, the cells were analyzed by flow cytometry (Partec, Münster, Germany). To determine apoptosis, Kyse510 cells were treated in 24-well plates with the indicated concentrations of the compounds for 24 h. 5% DMSO was used as a positive control. After incubation, the cells were lysed overnight in hypotonic staining buffer (0.1% Triton X-100, 0.1% sodium citrate in sterile filtrated water) containing 100 μ g mL⁻¹ PI and analyzed by flow cytometry.

Data analysis: Concentration–effect curves were obtained using Prism 4.0 from GraphPad (San Diego, CA, USA) by fitting the pooled data to the four-parameter logistic equation. Flow cytometry data were analyzed using FloMax 2.82 (Partec, Münster, Germany).

Crystal structure analysis

Long rod shaped crystals of the hexamer **1b** with an average size of 15 × 15 × 600 μ m³ were obtained after one day from acetonitrile/water (60:40). After overlaying the crystal containing the mother liquid with mineral oil for cryoprotection, the crystals were harvested with litho loops and flash frozen in liquid nitrogen. A dataset of the hexamer **1b** was collected at 100 K at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Grenoble, France) on beamline ID30A-3. According to the instrumentation at the beamline, the

resolution was limited to 1.02 Å in the corners of the detector. On the other hand, each hydrogen atom of the structure could be located from the ΔF map. The A alerts in the checkcif procedure are solely caused by the low resolution of the experiment at the synchrotron. Crystallographic data: space group $P2_12_12_1$, $a = 5.1627(1)$ Å, $b = 23.5630(5)$ Å, $c = 41.5043(10)$ Å, 24874 measured reflections, synchrotron radiation ($\lambda = 0.9677$ Å), 3489 unique reflections used for the refinement, $wR_2(\text{all}) = 0.0836$, $R_1(\text{all}) = 0.0359$, CCDC 1420774 contains the supplementary crystallographic data for this paper. These data are provided free of charge by The Cambridge Crystallographic Data Centre.

Computational methods

The polyalanine reference α -helix and 3_{10} -helix were generated using the Maestro suite of programs.^[21] Therefore, the backbone dihedrals ϕ (φ) and ψ (ψ) were set to $\varphi = -48.0^\circ$ and $\psi = -57.0^\circ$ for the α -helix and to $\varphi = -74.0^\circ$ and $\psi = -4.0^\circ$ for the 3_{10} -helix.^[22] Superimposition of the crystal structure of **1b** on C_α and C_β atoms of the reference structure was performed manually using the pair-fitting option in PyMOL.^[23] The average angle deviation (η) of the respective C_α – C_β bond vectors was calculated using `vector_angle.py` by Robert L. Campbell with PyMOL. Details regarding the MD simulations of **1b** in chloroform are given in the Supporting Information.

CD analysis

CD experiments: Circular dichroism (CD) spectra of the α -aminoxy oligopeptides were recorded on a J-180 spectropolarimeter (Jasco, Tokyo, Japan) equipped with a PFD-4255 Peltier temperature cell (Jasco) at 20 °C. Solutions of **1b** (100 μM), **1f** (123 μM), **1g** (57 μM), **1h** (41 μM), and **1i** (38 μM) in TFE (2,2,2-trifluoroethanol) were placed in a 1 mm quartz cell (Hellma, Müllheim, Germany). The initial concentration for the pH titration of **1g** was 50 μM in sodium hydroxide solution (pH 11.24). Lower pH values were established by addition of 100 mM hydrochloric acid solution, except for the pH range from 8–3.5, in which 10 mM hydrochloric acid was used, and determined with a pH meter (Metrohm, Herisau, Switzerland). CD spectra were recorded subsequently at pH 11.24, 11.00, 10.42, 10.00, 9.48, 9.01, 8.23, 8.02, 7.48, 6.99, 6.51, 6.49, 5.95, 5.48, 4.96, 4.49, 4.00, 3.52, 3.02, and 2.51 in a 2 mm cell (Hellma). For the liposome-binding analysis we prepared liposomes with an average diameter of 80 nm according to a method described previously.^[24] Slow evaporation of the solvent from a chloroform solution of equimolar amounts of 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) and 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoserine (POPS) under nitrogen led to a thin lipid film that was redispersed in water. The aqueous lipid dispersion was extruded 21 times through an 80 nm Nucleopore polycarbonate membrane (Whatman, Dassel, GE, USA) with a LiposoFast extruder (Avestin, Ottawa, Canada). CD spectra of the solutions of **1f** (142 μM), **1g** (56 μM), **1h** (46 μM), and **1i** (33 μM) in ammonium chloride buffer (pH 9) and of 6:1 (v/v) mixtures of the α -aminoxy peptide solutions and a suspension of POPC/POPS liposomes in ammonium chloride buffer (1.64 μM in respect to POPC) were recorded in a 1 mm cell. All spectra were corrected for the solvent background (TFE, water, ammonium chloride buffer, liposome suspension in ammonium chloride buffer). Spectra recorded in aqueous solvents are shown after smoothing by Fourier filtering (resolution: 4 nm).

Fitting analyses: Prior to the matrix-least-squares (MLS) Henderson–Hasselbalch global fitting of the pH-dependent CD spectra of **1g**, all spectra were normalized with respect to their corresponding UV/Vis absorbance spectra to correct for concentration errors

arising from the addition of the acid solution and from the pH-dependent solubility. The MLS procedure was performed in MATLAB (MathWorks, Natick, MA, USA) in analogy to what has been described elsewhere.^[16] In brief, the pH-dependent data set was reduced by singular-value decomposition to obtain a matrix in which common spectral features throughout all pH values were clustered together, and another matrix containing the coefficients with which the features in the first matrix contribute to each observed spectrum. The pK value for the transition from the disordered to the 2_8 -helical conformation was determined by least-squares fitting of the coefficient matrix with an algebraic equivalent of the Henderson–Hasselbalch equation. The pure spectra of the conformational species were obtained after matrix inversion and mathematical transformation as described elsewhere.^[15] The semi-quantitative analysis of the CD spectra of the α -aminoxy oligopeptides **1f–i** in the absence and in the presence of liposomes was done by least-squares fitting of the pure spectra from the MLS global fitting and an average of the (normalized) spectra recorded between pH 6.0–2.5 in the spectral range from 200–204 nm and from 223–300 nm in MATLAB. The relative proportions given in Figure 6 represent the linear coefficients from the spectral fitting normalized to 100%. Coefficients associated with the low pH species from the MLS global fitting and with the spectra recorded at pH values smaller than 6 were combined and attributed to the 2_8 -helical structure.

Quantum chemical calculation: A single-point energy calculation of the crystal structure of **1b** was performed at the density functional theory (DFT) level in Gaussian 09^[25] using the ω B97X functional and TZVPP^[26] (TZVPP basis with discarded f-functions and TZVP basis on hydrogen atoms) as a basis set. CD and absorbance intensities (velocity representation) were calculated at the simplified time-dependent DFT (sTD-DFT) level with the sTDA program by Grimme and co-workers.^[14] The spectra shown in Figure 3 were constructed with a Gaussian line shape with a half width at the half maximum of 0.3 eV and an energy shift of -0.6 eV.

Acknowledgements

We thank S. Braun and M. Weinheimer for help with the preparation of the liposomes. We acknowledge the European Synchrotron Radiation Facility for beamtime and would like to thank P. Carpentier for assistance in using the beamline ID30A-3. Computational support and infrastructure was provided by the “Centre for Information and Media Technology” (ZIM) at the University of Düsseldorf. This work was supported by funds from the Strategischer Forschungsfonds of the Heinrich Heine University Düsseldorf (SFF-F 2012/79-17 to F.K.H.) and 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 and the hybrid compute cluster (INST 208/704-1 FUGG to H.G.) used in this study. This research was supported in part by the bwHPC initiative and the bwHPC-C5 project provided through associated compute services of the JUSTUS HPC facility at the University of Ulm.

Keywords: antitumor agents • foldamers • helical structures • peptides • peptidomimetics

- [1] a) R. Cheng, S. Gellman, W. DeGrado, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3219–3232; b) D. Diedrich, A. Hamacher, C. G. W. Gerten, L. A. Alves Avelar, G. J.

- Reiss, T. Kurz, H. Gohlke, M. U. Kassack, F. K. Hansen, *Chem. Commun.* **2016**, 52, 3219–3222; c) D. J. Craik, D. P. Fairlie, S. Liras, D. Price, *Chem. Biol. Drug Des.* **2013**, 81, 136–147; d) J. S. Laursen, J. Engel-Andreasen, C. A. Olsen, *Acc. Chem. Res.* **2015**, 48, 2696–2704.
- [2] a) D. Seebach, J. L. Matthews, *Chem. Commun.* **1997**, 2015–2022; b) T. A. Martinek, F. Fülöp, *Eur. J. Biochem.* **2003**, 270, 3657–3666; c) W. F. DeGrado, J. P. Schneider, Y. Hamuro, *J. Pept. Res.* **2008**, 54, 206–217; d) J. Venkatraman, S. C. Shankaramma, P. Balaram, *Chem. Rev.* **2001**, 101, 3131–3152; e) D. H. Appella, L. A. Christianson, I. L. Karle, D. R. Powell, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 13071–13072.
- [3] a) J. Frackenhohl, P. I. Arvidsson, J. V. Schreiber, D. Seebach, *ChemBioChem* **2001**, 2, 445–455; b) H. Wiegand, B. Wirz, A. Schweitzer, G. P. Camenisch, M. I. R. Perez, G. Gross, R. Woessner, R. Voges, P. I. Arvidsson, J. Frackenhohl, D. Seebach, *Biopharm. Drug Dispos.* **2002**, 23, 251–262.
- [4] a) 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; b) D. Yang, F.-F. Ng, Z.-J. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 9794–9795; c) Y.-D. Wu, D.-P. Wang, K. W. K. Chan, D. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 11189–11196; d) D. Yang, J. Qu, B. Li, F.-F. Ng, X.-C. Wang, K.-K. Cheung, D.-P. Wang, Y.-D. Wu, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 589–590; e) X. Li, Y.-D. Wu, D. Yang, *Acc. Chem. Res.* **2008**, 41, 1428–1438; f) X. Li, D. Yang, *Chem. Commun.* **2006**, 3367–3379.
- [5] M. Lee, J. Lee, B. Baek, I. Shin, *Synlett* **2003**, 3, 325–328.
- [6] a) D. Gaspar, A. S. Veiga, M. A. R. B. Castanho, *Front. Microbiol.* **2013**, 4, 294; b) S. Fahs, Y. Patil-Sen, T. J. Snape, *ChemBioChem* **2015**, 16, 1840–1853.
- [7] a) D. Yang, B. Li, F.-F. Ng, Y.-L. Yan, J. Qu, Y.-D. Wu, *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 7303–7312; 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) A. Katritzky, A. Ilker, S. R. Tala, *J. Org. Chem.* **2009**, 74, 8690–8694.
- [8] S. Abdel Rahman, A. El-Kafrawy, A. Hattaba, M. F. Anwer, *Amino Acids* **2007**, 33, 531–536.
- [9] The free carboxylic acids were prepared immediately before use from their respective *tert*-butyl-protected aminoxy acids or dipeptides by treatment with TFA/CH₂Cl₂ (1:1, v/v, 10 mL mmol⁻¹) for 1 h at room temperature. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was codistilled with toluene twice to give the corresponding free carboxylic acid in quantitative yields.
- [10] C. Sinthuvanich, A. S. Veiga, K. Gupta, D. Gaspar, R. Blumenthal, J. P. Schneider, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 6210–6217.
- [11] B. N. Bullock, A. L. Jochim, P. S. Arora, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 14220–14223.
- [12] a) S. Thompson, R. Vallinayagam, M. J. Adler, R. T. W. Scott, A. D. Hamilton, *Tetrahedron* **2012**, 68, 4501–4505; b) L. Spanier, E. Ciglia, F. K. Hansen, K. Kuna, W. Frank, H. Gohlke, T. Kurz, *J. Org. Chem.* **2014**, 79, 1582–1593.
- [13] S. Grimme, J. Harren, A. Sobanski, F. Vögtle, *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 1491–1509.
- [14] a) S. Grimme, *J. Chem. Phys.* **2013**, 138, 244104; b) C. Bannwarth, S. Grimme, *Comput. Theor. Chem.* **2014**, 1040, 45–53.
- [15] R. W. Woody in *Comprehensive Chiroptical Spectroscopy*, Vol. 2 (Eds.: N. Berova, P. L. Polavarapu, K. Nakanishi, R. W. Woody), Wiley-VCH, New York, **2012**, pp. 475–497.
- [16] R. W. Hendler, R. I. Shrager, *J. Biochem. Biophys. Meth.* **1994**, 28, 1–33.
- [17] A. Rütger, M. Pfeifer, V. A. Lórenz-Fonfría, S. Lüdeke, *J. Phys. Chem. B* **2014**, 118, 3941–3949.
- [18] E. M. Gosepath, N. Eckstein, A. Hamacher, K. Servan, G. von Jonquieres, H. Lage, B. Györfy, H. D. Royer, M. U. Kassack, *Int. J. Cancer* **2008**, 123, 2013–2019.
- [19] N. Eckstein, K. Servan, B. Hildebrandt, A. Politz, G. v. Jonquieres, S. Wolfkummeth, I. Napierski, A. Hamacher, M. U. Kassack, J. Budczies, M. Beier, M. Dietel, B. Royer-Pokora, C. Denkert, H.-D. Royer, *Cancer Res.* **2009**, 69, 2996–3003.
- [20] H. Mueller, M. U. Kassack, M. Wiese, *J. Biomol. Screening* **2004**, 9, 506–515.
- [21] Schrödinger Release 2015-2: Maestro (Version 10.2), Schrödinger, LLC, New York, NY, **2015**.
- [22] L. Pauling, R. B. Corey, H. R. Branson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1951**, 37, 205–211.
- [23] W. L. DeLano, The PyMOL Molecular Graphics System (Version 1.7.3.0) Schrödinger, LLC, New York, NY, **2009–2014**.
- [24] M. Holzer, J. Momm, R. Schubert, *Langmuir* **2010**, 26, 4142–4151.
- [25] Gaussian 09, Rev. D.01, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, N. J. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, D. J. Fox, Gaussian Inc., Wallingford, CT, **2009**.
- [26] L. Goerigk, S. Grimme, *J. Phys. Chem. A* **2009**, 113, 767–776.

Received: May 27, 2016

Published online on August 30, 2016

CHEMISTRY

A European Journal

Supporting Information

α -Aminoxy Oligopeptides: Synthesis, Secondary Structure, and Cytotoxicity of a New Class of Anticancer Foldamers

Daniela Diedrich,^[a] Ana J. Rodrigues Moita,^[a] Anja Rüther,^[b] Benedikt Frieg,^[a] Guido J. Reiss,^[c] Astrid Hoepfner,^[d] Thomas Kurz,^[a] Holger Gohlke,^[a] Steffen Lüdeke,^[b] Matthias U. Kassack,^[a] and Finn K. Hansen^{*[a]}

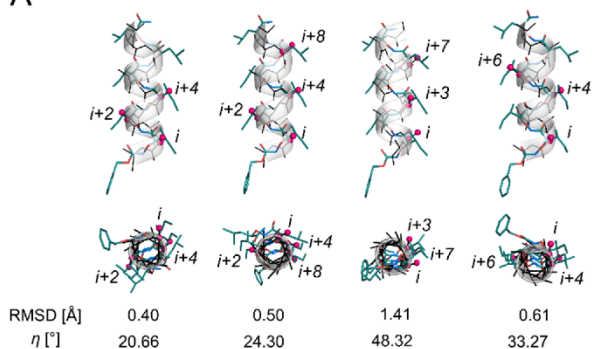
chem_201602521_sm_miscellaneous_information.pdf

Table of Contents

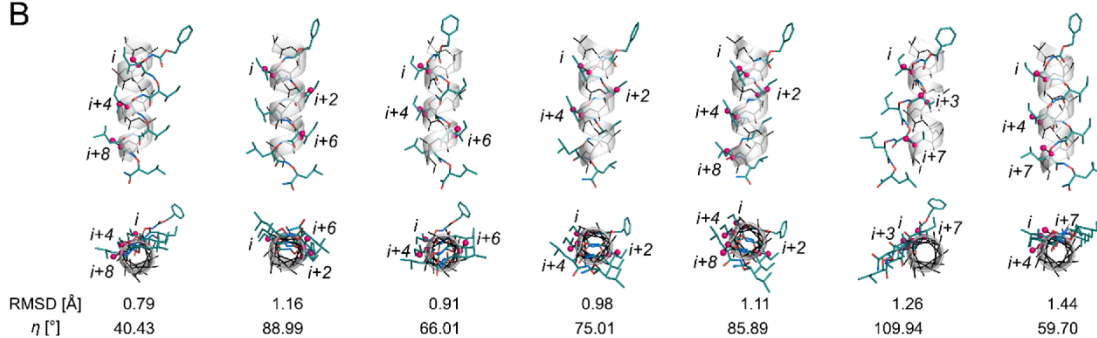
1. Supplemental figures	S2
2. Chemistry	S7
Materials and Methods	S7
Solution phase synthesis of α -aminoxy dipeptides 8a-k	S7
Characterization data of compounds 8a-k	S8
Optimization of coupling conditions	S11
Characterization data for compounds 1a-i	S12
3. Supplementary computational methods	S14
5. References	S15

1. Supplemental figures

A



B



C

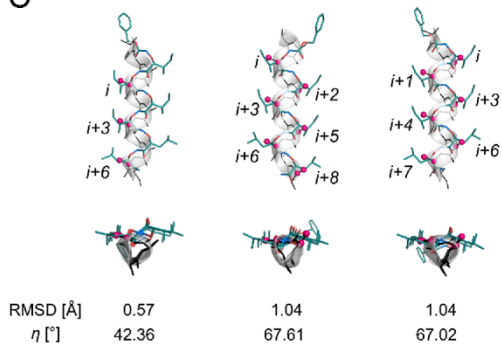
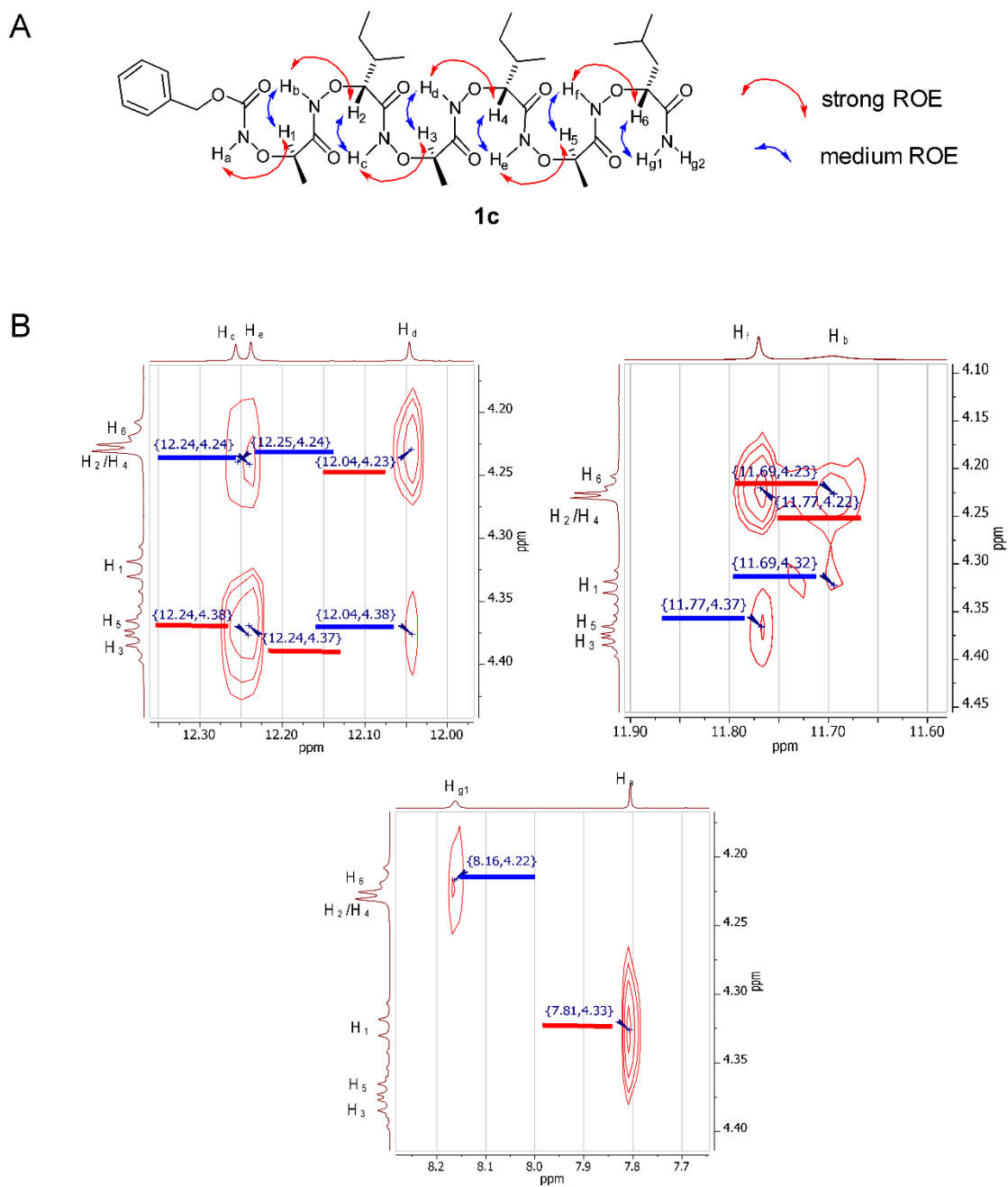


Figure S1. Overlay of C_{α} and C_{β} atoms of the crystal structure of **1b** onto C_{α} and C_{β} atoms of a canonical α -helix (**A**, **B**) and of a 3_{10} -helix (**C**), resulting in $i, i+j$ (where j ranges from one to eight) patterns. In (**A**) The Cbz-protection group is oriented towards the helix C-terminus, in (**B**, **C**) towards the helix N-terminus. In the lower panel, the overlays are rotated by 90° such that the helix C-terminus is oriented towards the viewer. In (**A–C**) carbon atoms of the crystal structure of **1b** are depicted in green. The helix structure is depicted as black sticks with transparent cartoon representation. The magenta spheres highlight the helix reference atoms addressed by the side chains of **1b**. The root mean square deviation (RMSD) and average angle deviation η (see main text for definition) were used to evaluate the quality of the superimposition.



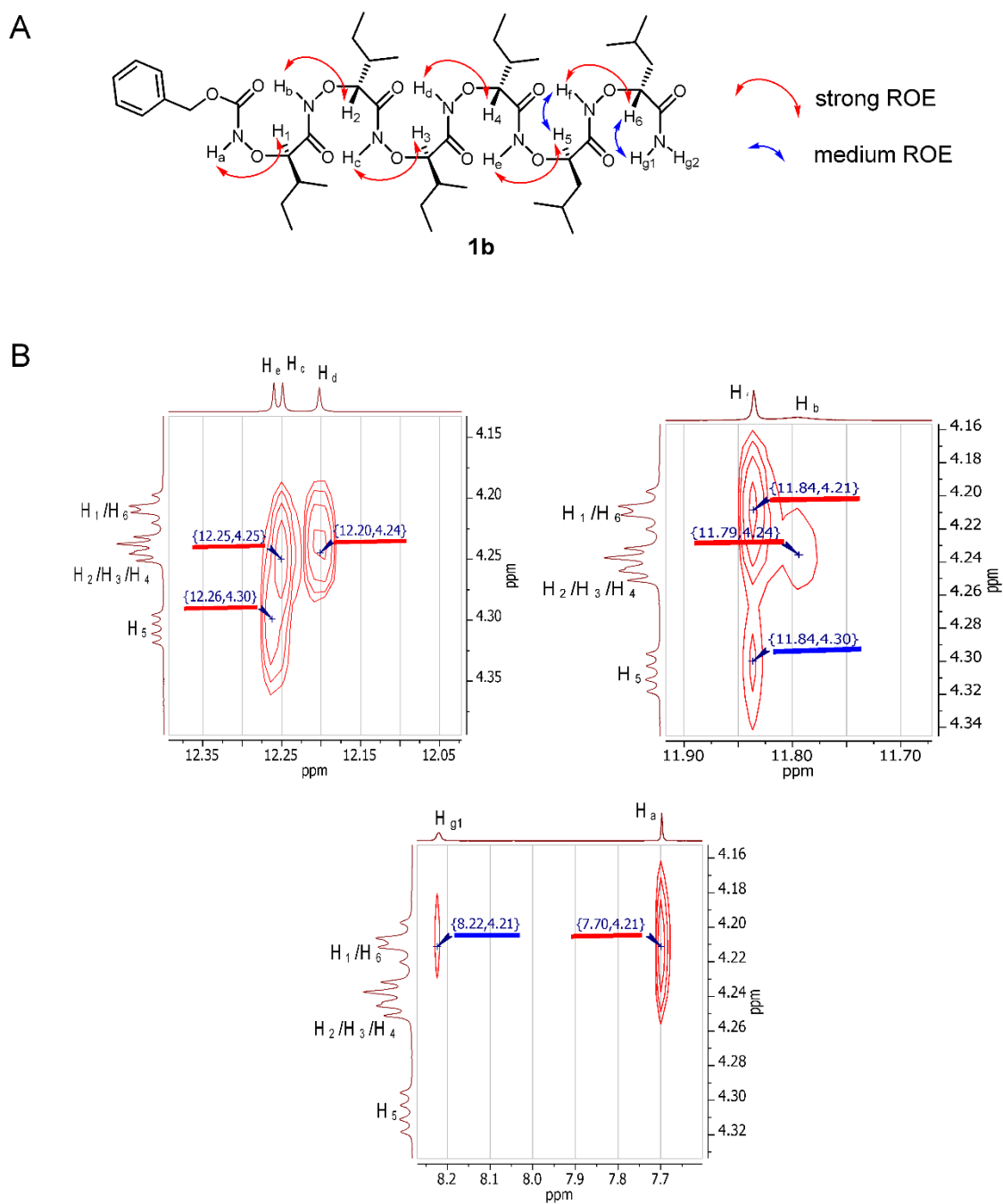


Figure S3. (A) Key ROEs observed in the 2D-ROESY spectrum of **1b**. (B) Expansions of important ROE cross peaks (see page S19 for full 2D ROESY spectrum of **1b**).

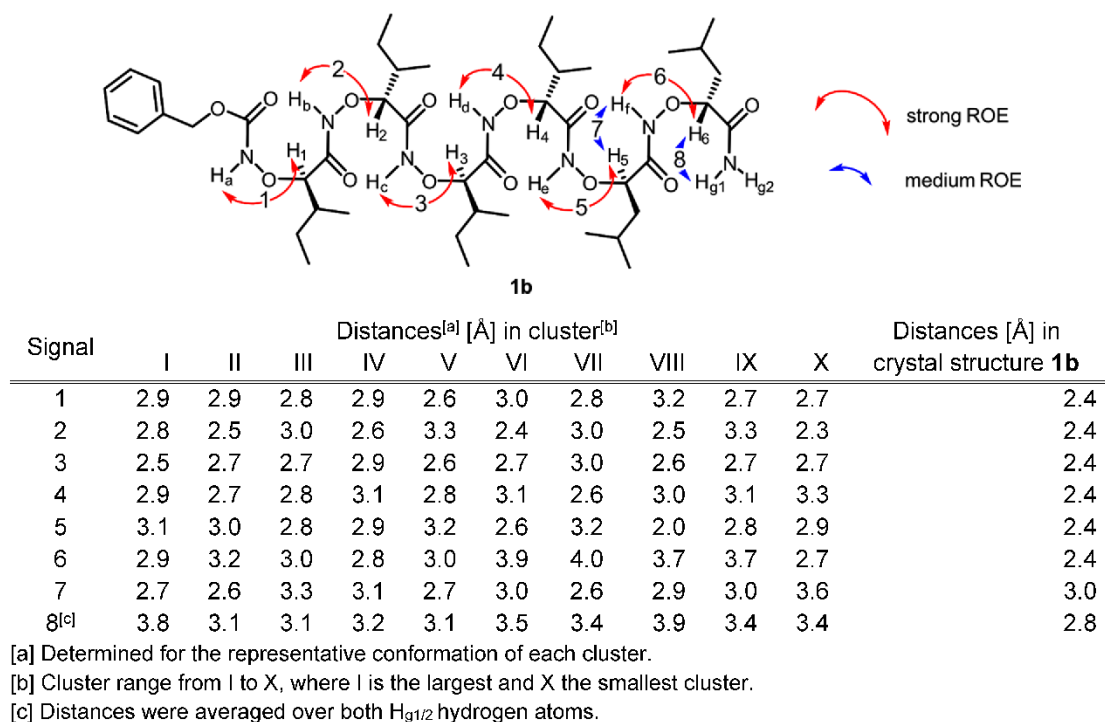


Figure S4. Distances between hydrogens of **1b** for which experimental ROEs are available. The structure of α -aminoxy peptide **1b**; strong ROEs are indicated with red arrows and medium ROEs with blue arrows, respectively. Signals are numbers from 1 to 8. The table below shows distances between the hydrogens for which ROEs are available, found during 1.5 μ s of MD simulations and in the crystal structure of **1b**.

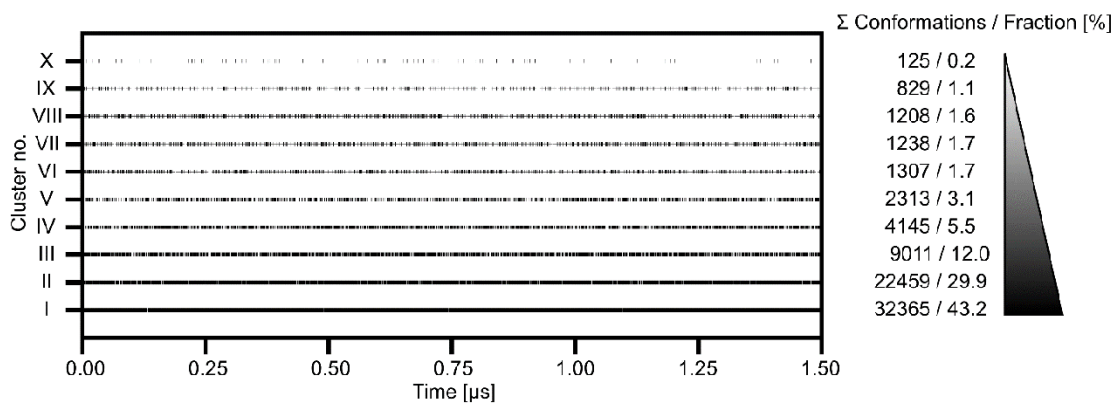


Figure S5. Cluster analysis of the conformational ensemble from MD simulations. Left plot: Association of conformations generated during 1.5 μ s of unbiased MD simulations to clusters I to X. Right plot: Number of conformations per cluster and relative cluster size with respect to the total number of conformations. In total, 75000 conformations were considered for clustering based on structural similarity of the backbone (see Supplementary computational methods for details).

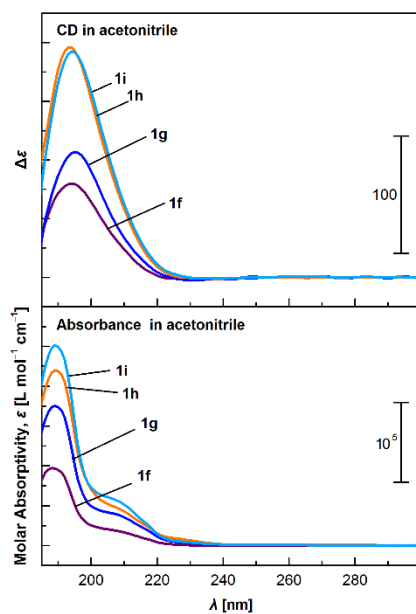


Figure S6. CD and UV-visible absorbance spectra of **1f**, **1g**, **1h**, and **1i** recorded in acetonitrile (50 mM, path: 1mm). As the spectra closely resemble the corresponding spectra recorded in TFE (Figure 3), these α -aminoxy oligopeptides most probably acquire the same conformational fold in both solvents.

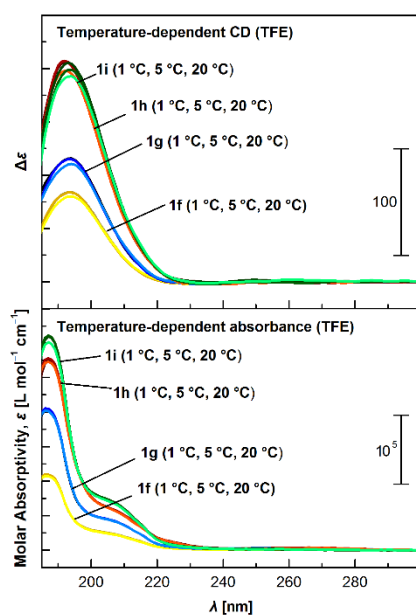


Figure S7. CD and UV-visible absorbance spectra of **1f**, **1g**, **1h**, and **1i** recorded at different temperatures (1, 5, and 20 °C) in TFE, coded with brighter colors for lower, and darker colors for higher temperatures. Neither of the compounds exhibits any significant spectral changes in the observed temperature range. Temperature control was established by the use of a PFD-425S Peltier temperature cell (Jasco).

2. Chemistry

Materials and Methods

All chemicals and solvents were obtained from commercial suppliers (Sigma-Aldrich, Acros Organics, Carbolution Chemicals) and used as purchased without further purification. Fmoc-Rink-Amide PEG AM Resin (200-400 mesh, 0.56 mmol g⁻¹) was purchased from Iris Biotech, Germany. Solution phase reactions were monitored by thin layer chromatography (TLC) on Merck silica gel plates, precoated with fluorescence indicator UV₂₅₄, using ethyl acetate/*n*-hexane as the mobile phase. Components were visualized by irradiation with ultraviolet light (254 nm) or staining with potassium permanganate solution followed by heating. Flash column chromatography was performed with prepacked silica cartridges or Fluka silica gel 60 (230-400 mesh ASTM) with the solvent mixtures specified in the corresponding experiment. Melting points (m.p.) were taken in open capillaries on a Stuart SMP11 melting-point apparatus and are uncorrected. Proton (¹H) and carbon (¹³C) NMR spectra were recorded on a Bruker Avance 300, 500 or 600 using CDCl₃ as solvent. Chemical shifts are given in parts per million (ppm), relative to the residual solvent peak for ¹H and ¹³C. 2D NMR data were collected on a Bruker Avance 600 instrument operating at 600 MHz. ROESY acquisitions were performed at 298 K with the following parameters: spectral window = 8474.58 Hz in both dimensions; mixing time = 0.05 ms; number of transients = 16; number of increments = 256; number of points = 1024. Square cosine window functions were applied in both dimensions. Elemental analysis was performed on a Perkin Elmer PE 2400 CHN elemental analyzer. HRMS analysis was performed on a UHR-TOF maXis 4G, Bruker Daltonics, Bremen. All HPLC analyses and purifications were carried out on a Varian Prostar system equipped with a Prostar 410 (autosampler), 210 (pumps) and 330 (UV-detector). HPLC-grade water +0.1% TFA (solvent A) and HPLC-grade acetonitril +0.1% TFA (solvent B) were used as solvents. Analytical analyses were performed on a *Macherey-Nagel Nucleosil* C8 RP-HPLC column (EC 250/4 Nucleosil 100-5 C8) using a linear gradient from 50% B to 100% B in 40 min at a flow rate of 1 mL min⁻¹. For semipreparative purification a *MN Nucleosil* C8 RP-HPLC column (VP 250/10 Nucleosil 100-5 C8ec) was used at a flow rate of 4 mL min⁻¹. Phthaloyl-protected monomers **4a–d** and carboxybenzyl-protected monomers **7a–c** were synthesized as described elsewhere.^[1]

Solution phase synthesis of α -aminoxy dipeptides **8a–k**

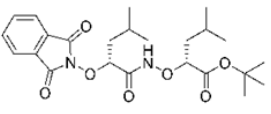
Hydrazine monohydrate (0.44 mL, 9.0 mmol, 3.0 eq.) was added to a solution of the respective phthaloyl-protected monomer **4** (3.0 mmol, 1.0 eq.) in methanol (15 mL). The reaction was stirred for 1.5 h and the solvent was subsequently removed under reduced pressure. The residue was dissolved in 5% aqueous sodium carbonate solution (15 mL) and extracted with diethyl ether (3 x 20 mL). The organic layer was dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated under reduced pressure to afford the phthaloyl-deprotected monomer as colorless oil which was immediately used in the next step without further purification. The phthaloyl-deprotected monomer was dissolved in CH₂Cl₂ (5 mL) and added to a stirred solution of the corresponding free carboxylic acid **5[±]** or **7** (3.0 mmol, 1.0 eq.), HOBt (486.4 mg, 3.6 mmol, 1.2 eq.) and EDC·HCl (690.1 mg, 3.6 mmol, 1.2 eq.) in dry CH₂Cl₂ (20 mL) and the reaction

* The free carboxylic acids **5a–d** were prepared immediately before use from their respective *tert*-butyl protected α -aminoxy acids **4a–d** by treatment with TFA/CH₂Cl₂ (1:1, v/v, 10 mL/mmol) for 1 h at room temperature. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was azeotroped with toluene twice to give the corresponding free carboxylic acid in quantitative yields

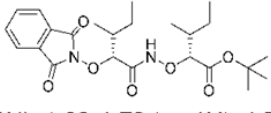
was stirred at room temperature overnight. The solvent was removed under reduced pressure and the crude product was purified by flash column chromatography using hexane-ethyl acetate as eluent (gradient: from 90:10 to 60:40 over 20 min) to afford α -aminoxy dipeptides **8a–k**.

Characterization data of compounds **8a–k**

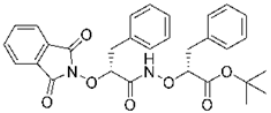
Phth-^{NO}Leu-^{NO}Leu-OtBu (**8a**)

 Colorless solid; yield: 1.20 g (2.59 mmol, 86%); m.p. 88°C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 10.33 (s, 1H), 8.16–7.65 (m, 4H), 4.72 (dd, J = 9.2, 4.1 Hz, 1H), 4.36 (dd, J = 9.3, 4.2 Hz, 1H), 2.21–2.08 (m, 1H), 2.07–1.95 (m, 1H), 1.94–1.85 (m, 1H), 1.85–1.71 (m, 2H), 1.60–1.54 (m, 1H), 1.50 (s, 9H), 1.06 (d, J = 6.5 Hz, 3H), 0.99 (2 x d, J = 6.6 Hz, 6H), 0.95 (d, J = 6.7 Hz, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 171.1, 167.7, 163.95, 135.1, 128.8, 124.1, 87.2, 82.7, 82.2, 42.0, 40.0, 28.2, 24.7, 23.26, 23.23, 21.92, 21.90; elemental analysis calcd (%) for C₂₄H₃₄N₂O₇: C 62.32, H 7.41, N 6.06; found: C 62.07, H 7.16, N 5.93.

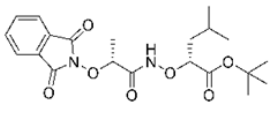
Phth-^{NO}Ile-^{NO}Ile-OtBu (**8b**)

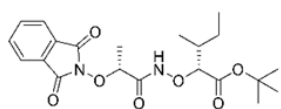
 Colorless solid; yield: 0.98 g (2.12 mmol, 71%); m.p. 98°C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 10.16 (s, 1H), 7.77–7.69 (m, 4H), 4.54 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 4.21 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 2.11–2.00 (m, 1H), 1.93–1.84 (m, 1H), 1.82–1.72 (m, 1H), 1.72–1.62 (m, 1H), 1.43 (s, 9H), 1.42–1.28 (m, 2H), 1.08–0.86 (m, 12H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 170.4, 166.4, 163.9, 135.0, 128.8, 124.0, 91.2, 86.9, 82.1, 38.5, 37.6, 28.2, 25.9, 25.8, 14.2, 13.9, 12.0, 11.9; elemental analysis calcd (%) for C₂₄H₃₄N₂O₇: C 62.32, H 7.41, N 6.06; found: C 62.33, H 7.35, N 5.95.

Phth-^{NO}Phe-^{NO}Phe-OtBu (**8c**)

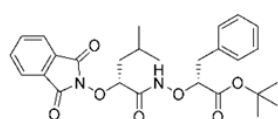
 Colorless solid; yield: 1.19 g (2.25 mmol, 75%); m.p. 158°C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 10.29 (s, 1H), 7.83–7.70 (m, 4H), 7.39–7.16 (m, 10H), 4.94–4.88 (m, 1H), 4.57–4.50 (m, 1H), 3.52 (dd, J = 14.7, 4.4 Hz, 1H), 3.29 (dd, J = 14.7, 6.5 Hz, 1H), 3.12 (dd, J = 14.5, 6.3 Hz, 1H), 3.03 (dd, J = 14.5, 6.4 Hz, 1H), 1.33 (s, 9H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 169.35, 166.1, 163.7, 134.0, 135.2, 135.1, 130.0, 129.7, 128.7, 128.5, 128.4, 127.2, 126.9, 124.05, 88.3, 84.4, 82.5, 38.2, 37.1, 28.0; elemental analysis calcd (%) for C₃₀H₃₀N₂O₇: C 67.91, H 5.70, N 5.28; found: C 67.63, H 5.71, N 5.12.

Phth-^{NO}Ala-^{NO}Leu-OtBu (**8d**)

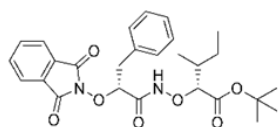
 Colorless oil; yield: 0.68 g (1.63 mmol, 54% yield); ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 10.40 (s, 1H), 7.89–7.74 (m, 4H), 4.73 (q, J = 7.0 Hz, 1H), 4.40 (dd, J = 9.3, 4.1 Hz, 1H), 2.08–1.95 (m, 1H), 1.81–1.72 (m, 1H), 1.70 (d, J = 7.0 Hz, 3H), 1.61–1.53 (m, 1H), 1.51 (s, 9H), 1.02 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.96 (d, J = 6.7 Hz, 3H); ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 171.1, 167.1, 163.9, 135.1, 128.8, 124.1, 84.9, 82.8, 82.3, 40.1, 28.2, 24.7, 23.25, 21.9, 17.6; elemental analysis calcd (%) for C₂₁H₂₈N₂O₇: C 59.99, H 6.71, N 6.66; found: C 60.06, H 6.66, N 6.59.

Phth-^{NO}Ala-^{NO}Ile-OtBu (8e)

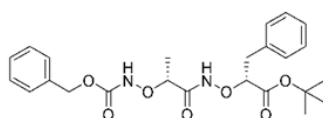
Colorless solid; yield: 0.75 g (1.78 mmol, 59%); m.p. 76°C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 10.30 (s, 1H), 8.01-7.66 (m, 4H), 4.71 (q, *J* = 7.0 Hz, 1H), 4.30 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 2.01-1.90 (m, 1H), 1.80-1.70 (m, 1H), 1.69 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.52 (s, 9H), 1.47-1.35 (m, 1H), 1.07-0.93 (m, 6H); ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 170.4, 166.7, 163.8, 135.1, 128.8, 124.1, 86.8, 84.8, 82.3, 37.55, 28.2, 25.9, 17.6, 14.2, 11.9; elemental analysis calcd (%) for C₂₁H₂₈N₂O₇: C 59.99, H 6.71, N 6.66; found: C 59.77, H 6.75, N 6.55.

Phth-^{NO}Leu-^{NO}Phe-OtBu (8f)

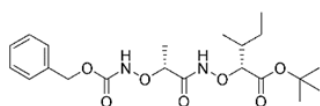
Colorless solid; yield: 0.94 g (1.90 mmol, 63%); m.p. 136°C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 10.38 (s, 1H), 7.95-7.71 (m, 4H), 7.36-7.28 (m, 4H), 7.26-7.22 (m, 1H), 4.75 (dd, *J* = 9.4, 3.9 Hz, 1H), 4.63 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H), 3.32-3.13 (m, 2H), 2.27-2.09 (m, 1H), 2.00-1.87 (m, 1H), 1.86-1.76 (m, 1H), 1.40 (s, 9H), 1.09 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 1.02 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H); ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 169.5, 167.8, 164.0, 136.1, 135.1, 129.7, 128.8, 128.4, 126.9, 124.1, 87.2, 84.4, 82.5, 41.9, 37.3, 28.05, 24.7, 23.3, 21.9; elemental analysis calcd (%) for C₂₇H₃₂N₂O₇: C 65.31, H 6.50, N 5.64; found: C 65.23, H 6.59, N 5.57.

Phth-^{NO}Phe-^{NO}Ile-OtBu (8g)

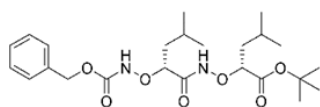
Colorless solid; yield: 1.17 g (2.35 mmol, 78%); m.p. 65°C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 10.10 (s, 1H), 7.85-7.67 (m, 4H), 7.39-7.19 (m, 5H), 4.89 (dd, *J* = 6.7, 4.6 Hz, 1H), 4.19 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 3.51 (dd, *J* = 14.7, 4.6 Hz, 1H), 3.28 (dd, *J* = 14.7, 6.7 Hz, 1H), 2.00-1.80 (m, 1H), 1.81-1.58 (m, 1H), 1.49 (s, 9H), 1.45-1.22 (m, 1H), 1.09-0.88 (m, 6H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 170.2, 165.5, 163.5, 135.35, 135.0, 129.9, 128.7, 128.4, 127.1, 124.0, 88.2, 87.0, 82.2, 38.2, 37.4, 28.2, 25.8, 14.2, 11.9; elemental analysis calcd (%) for C₂₇H₃₂N₂O₇: C 65.31, H 6.50, N 5.64; found: C 65.04, H 6.38, N 5.51.

Cbz-^{NO}Ala-^{NO}Phe-OtBu (8h)

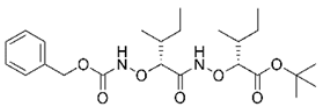
Colorless oil; yield: 1.18 g (2.57 mmol, 86%); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 10.20 (s, 1H), 7.74 (s, 1H), 7.33-7.10 (m, 10H), 5.09 (d, *J* = 1.3 Hz, 2H), 4.61 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H), 4.30 (q, *J* = 6.3 Hz, 1H), 3.09 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 1.37 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 1.27 (s, 9H); ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 170.0, 168.6, 158.1, 135.75, 135.2, 129.7, 128.7, 128.6, 128.5, 128.4, 126.9, 83.95, 82.6, 82.0, 68.2, 37.2, 28.0, 16.8; elemental analysis calcd (%) for C₂₄H₃₀N₂O₇: C 62.87, H 6.60, N 6.11; found: C 62.59, H 6.55, N 6.04.

Cbz-^{NO}Ala-^{NO}Ile-OtBu (8i)

Colorless solid; yield: 0.97 g (2.29 mmol, 76%); m.p. 72°C. ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 10.01 (s, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.44-7.30 (m, 5H), 5.28-5.08 (m, 2H), 4.47-4.26 (m, 2H), 2.03-1.82 (m, 1H), 1.76-1.66 (m, 1H), 1.49 (s, 9H), 1.45 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 1.43-1.30 (m, 1H), 1.08-0.80 (m, 6H); ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 170.9, 168.0, 158.0, 135.2, 128.8, 128.6, 86.3, 82.4, 82.0, 68.3, 37.4, 28.2, 25.9, 16.75, 14.2, 11.9; elemental analysis calcd (%) for C₂₁H₃₂N₂O₇: C 59.42, H 7.60, N 6.60; found: C 59.16, H 7.55, N 6.52.

Cbz-^{NO}Leu-^{NO}Leu-OtBu (8j)

Colorless oil; yield: 0.90 g (1.93 mmol, 64%); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 10.20 (s, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.40-7.27 (m, 5H), 5.16 (d, *J* = 1.2 Hz, 2H), 4.46 (dd, *J* = 9.3, 4.2 Hz, 1H), 4.31 (dd, *J* = 8.8, 4.8 Hz, 1H), 2.06-1.87 (m, 1H), 1.93-1.75 (m, 1H), 1.78-1.46 (m, 4H), 1.46 (s, 9H), 1.07-0.86 (m, 12H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 171.85, 168.6, 158.0, 135.2, 128.7, 128.6, 84.6, 82.5, 82.25, 68.2, 40.5, 40.0, 28.1, 24.7, 24.6, 23.2, 23.2, 21.9, 21.7; elemental analysis calcd (%) for C₂₄H₃₈N₂O₇: C 61.78, H 8.21, N 6.00; found: C 61.60, H 7.96, N 6.01.

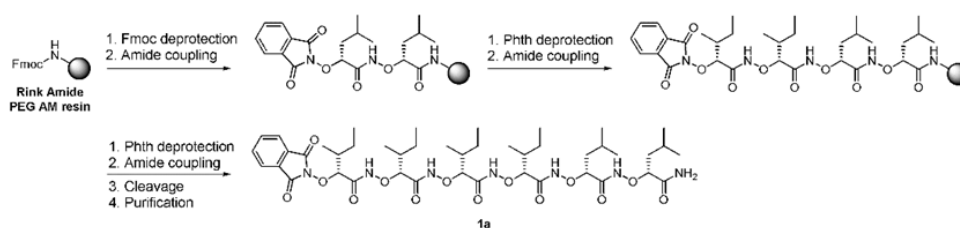
Cbz-^{NO}Ile-^{NO}Ile-OtBu (8k)

Colorless oil; yield: 0.61 g (1.30 mmol, 43%); ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 10.04 (s, 1H), 7.94-7.65 (m, 1H), 7.38-7.29 (m, 5H), 5.19-5.10 (m, 2H), 4.40-4.33 (m, 1H), 4.22-4.13 (m, 1H), 1.96-1.88 (m, 2H), 1.76-1.66 (m, 1H), 1.54-1.47 (m, 1H), 1.47 (s, 9H), 1.41-1.25 (m, 2H), 1.01-0.88 (m, 12H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 171.0, 167.4, 157.9, 135.2, 128.7, 128.5, 89.2, 86.25, 82.35, 77.6, 77.2, 76.7, 68.1, 37.4, 37.3, 28.2, 25.9, 25.8, 14.2, 13.95, 11.9, 11.8; elemental analysis calcd (%) for C₂₄H₃₈N₂O₇: C 61.78, H 8.21, N 6.00; found: C 61.55, H 8.39, N 6.16.

Optimization of coupling conditions

Preparative conditions for the synthesis of the model hexamer **1a** were optimized by investigating several well-established coupling reagents (Table S1). The required *N*-protected α -aminoxy dipeptide acids (PG-^{NO}Xaa-^{NO}Xaa-OH) were obtained from their corresponding *tert*-butyl protected derivatives **8a-k** directly before use.[‡] In all cases the loading of the resin was performed by the reaction of the deprotected Fmoc-Rink-Amide PEG AM resin with three equivalents of the phthaloyl-protected α -aminoxy dipeptide Phth-^{NO}Leu-^{NO}Leu-OH in the presence of three equivalents of the respective coupling reagent and 4 equivalents of *N*-ethyl-morpholine in the case of HBTU, PyPOP and BOP, for 24 h. Iterative cycles of phthaloyl deprotection (5% hydrazine hydrate in methanol, 2 x 15 min) and amide coupling reaction (3 equiv. of the respective dimer and coupling agents, 4 equiv. of base (for HBTU, PyPOP, BOP), 24 h) were performed to synthesize the resin-bound hexamer **1a**. The progress of the loading and coupling steps were monitored using the 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) test.^[2] The results from this screening showed significant differences between the investigated coupling reagents. The coupling agents EDCI/HOBt (entry 1) were unable to achieve a complete loading of the resin as judged by the TNBS test. Even an attempted double coupling resulted in an incomplete loading step. The coupling reagents DIC, DIC/HOAt, HBTU/HOBt/NEM, PyBOP/HOBt/NEM and BOP/HOBt/NEM (entries 2-6) allowed the complete loading of the resin and the preparation of the desired hexamer **1a**. The products were cleaved from the resin by treatment with TFA/TES (98:2) for 1.5 h, precipitated with cold diethyl ether and analyzed by RP-HPLC on a Phenomenex Luna C18 column (250/4.6 Luna 100-1.8 C18). The crude purities and yields are summarized in Table S1. The BOP/HOBt/NEM coupling system (entry 6) gave the highest crude yield (67%) and purity (56%) compared with DIC, DIC/HOBt, HBTU/HOBt/NEM and PyBOP/HOBt/NEM (entries 2-5). Thus, BOP/HOBt/NEM was chosen as coupling reagent for all subsequent solid-phase supported reactions.

Table S1. Optimization of Coupling Conditions^a



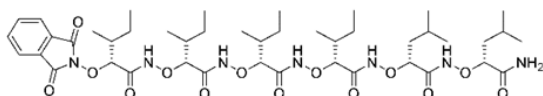
entry	coupling reagents (equivalent)	crude yield ^a	crude purity
1	EDCI/HOBt (3/3)	n.d.	n.d.
2	DIC (3)	50%	26%
3	DIC/HOAt (3/3)	49%	38%
4	HBTU/HOBt/NEM (3/3/4)	66%	50%
5	PyBOP/HOBt/NEM (3/3/4)	56%	52%
6	BOP/HOBt/NEM (3/3/4)	67%	57%

^aYields are calculated based on loading capacity of the resin. n.d., not determined due to incomplete loading step.

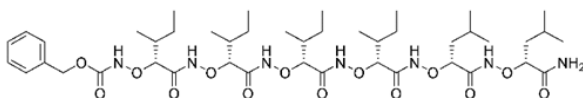
[‡] Free carboxylic acids (PG-^{NO}Xaa-^{NO}Xaa-OH) were prepared immediately before use from their respective *tert*-butyl protected dipeptides **8a-k** by treatment with TFA/CH₂Cl₂ (1:1, v/v, 10 mL/mmol) for 1 h at room temperature. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was azeotroped with toluene twice to give the corresponding free carboxylic acid in quantitative yields.

Characterization data for compounds 1a-i

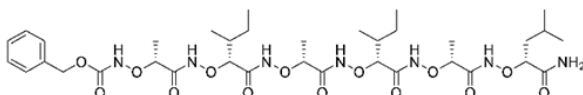
HRMS analysis was performed on a UHR-TOF maXis 4G, Bruker Daltonics, Bremen. All HPLC analysis were carried out on a Varian Prostar system equipped with a Prostar 410 (autosampler), 210 (pumps) and 330 (UV-detector). The solvents used were HPLC-grade water +0.1% TFA (solvent A) and HPLC-grade acetonitril +0.1% TFA (solvent B). HPLC analysis were performed on a *Macherey-Nagel Nucleosil C8 RP-HPLC* column (EC 250/4 Nucleosil 100-5 C8) using a linear gradient of 50% B to 100% B in 40 min at a flow rate of 1 ml min⁻¹.

Phth-^{NO}Ile-^{NO}Ile-^{NO}Ile-^{NO}Ile-^{NO}Leu-^{NO}Leu-NH₂ (1a)

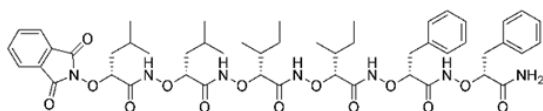
Colorless solid; 30% yield; 96.3% purity as determined by HPLC (50% B → 100% B in 40 min, 1 mL min⁻¹), *t_R* = 19.35 min; HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₄₄H₇₂N₇O₁₄ [M+H]⁺ 922.5132; found 922.5135.

Cbz-^{NO}Ile-^{NO}Ile-^{NO}Ile-^{NO}Ile-^{NO}Leu-^{NO}Leu-NH₂ (1b)

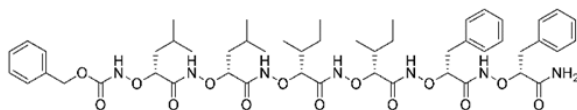
Colorless solid; 32% yield; 96.1% purity as determined by HPLC (50% B → 100% B in 40 min, 1 mL min⁻¹), *t_R* = 18.06 min; HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₄₄H₇₆N₇O₁₄ [M+H]⁺ 926.5445; found 926.5447.

Cbz-^{NO}Ala-^{NO}Ile-^{NO}Ala-^{NO}Ile-^{NO}Ala-^{NO}Leu-NH₂ (1c)

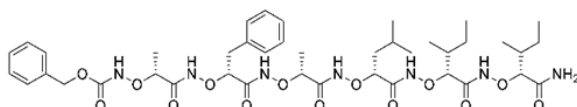
Colorless solid; 24% yield; 96.3% purity as determined by HPLC (50% B → 100% B in 40 min, 1 mL min⁻¹), *t_R* = 20.40 min; HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₃₅H₅₈N₇O₁₄ [M+H]⁺ 800.4036; found 800.4028.

Phth-^{NO}Leu-^{NO}Leu-^{NO}Ile-^{NO}Ile-^{NO}Phe-^{NO}Phe-NH₂ (1d)

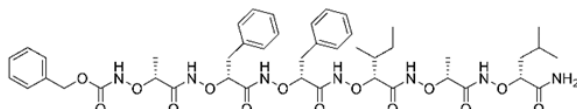
Colorless solid; 24% yield; 96.1% purity as determined by HPLC (50% B → 100% B in 40 min, 1 mL min⁻¹), *t_R* = 20.73 min; HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₅₀H₆₈N₇O₁₄ [M+H]⁺ 990.4819; found 990.4819.

Cbz-^{NO}Leu-^{NO}Leu-^{NO}Ile-^{NO}Ile-^{NO}Phe-^{NO}Phe-NH₂ (1e)

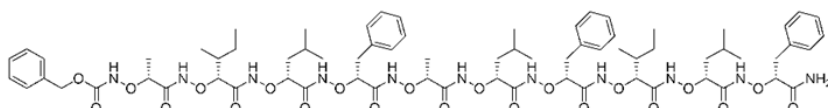
Colorless solid; 18% yield; 97.3% purity as determined by HPLC (50% B → 100% B in 40 min, 1 mL min⁻¹), *t_R* = 20.01 min; HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₅₀H₇₂N₇O₁₄ [M+H]⁺ 994.5132; found 994.5131.

Cbz-^{NO}Ala-^{NO}Phe-^{NO}Ala-^{NO}Leu-^{NO}Ile-^{NO}Ile-NH₂ (1f)

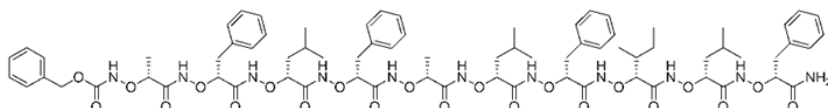
Colorless solid; 28% yield; 97.5% purity as determined by HPLC (50% B → 100% B in 40 min, 1 mL min⁻¹), *t_R* = 25.43 min; HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₄₁H₆₂N₇O₁₄ [M+H]⁺ 876.4349; found 876.4354.

Cbz-^{NO}Ala-^{NO}Phe-^{NO}Phe-^{NO}Ile-^{NO}Ala-^{NO}Leu-NH₂ (1g)

Colorless solid; 42% yield; 96.8% purity as determined by HPLC (50% B → 100% B in 40 min, 1 mL min⁻¹), *t_R* = 24.84 min; HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₄₄H₆₀N₇O₁₄ [M+H]⁺ 910.4193; found 910.4200.

Cbz-^{NO}Ala-^{NO}Ile-^{NO}Leu-^{NO}Phe-^{NO}Ala-^{NO}Leu-^{NO}Phe-^{NO}Ile-^{NO}Leu-^{NO}Phe-NH₂ (1h)

Colorless solid; 21% yield; 96.3% purity as determined by HPLC (50% B → 100% B in 40 min, 1 mL min⁻¹), *t_R* = 31.78 min; HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₇₁H₁₀₂N₁₁O₂₂ [M+H]⁺ 1460.7195; found 1460.7202.

Cbz-^{NO}Ala-^{NO}Phe-^{NO}Leu-^{NO}Phe-^{NO}Ala-^{NO}Leu-^{NO}Phe-^{NO}Ile-^{NO}Leu-^{NO}Phe-NH₂ (1i)

Colorless solid; 22% yield; 96.6% purity as determined by HPLC (50% B → 100% B in 40 min, 1 mL min⁻¹), *t_R* = 32.85 min; HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₇₄H₁₀₀N₁₁O₂₂ [M+H]⁺ 1494.7039; found 1494.7029.

3. Supplementary computational methods

In order to investigate the conformational preference of α -aminoxy peptide **1b** in solution, we performed molecular dynamics (MD) simulations of 1.5 μ s length of **1b** in CHCl_3 . As a starting structure, we used the crystal structure of **1b**, energy-minimized at the HF/6-31G* level of theory with Gaussian 09.^[3] The structure was placed in a truncated octahedral box of CHCl_3 , leaving at least 11 Å between the solute and the edge of the box, using the *LEaP* program in Amber 14.^[4] The obtained system comprised ~3000 atoms. Atomic partial charges for **1b** were derived according to the restraint electrostatic potential fit (RESP) procedure.^[5] Force field parameters for **1b** were taken from the general amber force field (gaff)^[6] and for CHCl_3 from Cieplak *et al.*^[7]

We applied the established MD simulation protocol described in Ref.[8]. Thus, to relax the system, we performed three steps of energy minimization. First, we performed 500 cycles steepest descent (SD) and 2000 cycles conjugate gradient (CG) minimization applying positional harmonic restraints with a force constant of 5 kcal·mol⁻¹·Å⁻² to all atoms of **1b**, while all CHCl_3 atoms were free to move. Second, we performed 2000 cycles SD and 8000 cycles CG minimization with reduced positional restraints (force constant of 1 kcal·mol⁻¹·Å⁻²). Third, we performed 1000 cycles SD and 4000 cycles CG minimization and removed the positional restraints completely.

The subsequent MD simulation procedure started by heating from 0 to 100 K in a canonical (NVT) MD simulation of 50 ps length with positional restraints of 1 kcal·mol⁻¹·Å⁻² applied to all atoms of **1b**. Then, the temperature was increased to 300 K in an isobaric-isothermal (NPT) MD simulation of 50 ps length. Afterwards, the density was adjusted to 1.4 g·cm⁻³ during 200 ps of NPT-MD. Finally, the positional restraints were gradually lowered from 1 to 0 kcal·mol⁻¹·Å⁻² during 6 × 50 ps NVT-MD simulations. Production NVT-MD simulations were conducted at 300 K for 1.5 μ s. Coordinates were saved in a trajectory file every 20 ps.

For MD simulations, the particle mesh Ewald (PME) method^[9,10] was applied to treat long-range electrostatic interactions. We used the SHAKE algorithm^[11] for all bonds involving hydrogen atoms. This allows using a 2 fs time step for integrating Newton's equations of motion. All minimization, thermalization, and production calculations were performed with the *pmemd.cuda* module^[12] in Amber 14.^[4]

Subsequent cluster analyses of the MD trajectory were performed using *cpptraj*^[13] of AmberTools 15.^[14] The MD ensemble comprised 75000 conformations of **1b**, which were clustered according to the structural similarity (root mean square deviation (RMSD) of the coordinates) of the backbone, stopping when 10 clusters are reached. The representative conformation of each of the ten clusters, which showed the highest structural similarity to the cluster centroid, was extracted and used for distance measurements between the hydrogens for which ROEs (1–8; Figure S4, Supporting Information) are available. Finally, the ten most representative conformations of clusters I and II were extracted, overlaid, and analyzed with respect to structural features found in the crystal structure described in this work.

5. References

- 1 (a) D. Yang, B. Li, F.-F. Ng, Y.-L. Yan, J. Qu, Y.-D. Wu, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 7303-7312. (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) A. Katritzky, A. Ilker, S. R. Tala, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 8690-9694.
- 2 A. J. Souers, S. Schürer, H. Kwack, A. A. Virgilio, J. Ellman, *Synthesis*, **1999**, *4*, 583-585.
- 3 M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, N. J. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, D. J. Fox *GAUSSIAN 09*, Rev. D.01; Gaussian Inc., Wallingford, CT, **2009**.
- 4 D. A. Case, V. Babin, J.T. Berryman, R.M. Betz, Q. Cai, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham, III, T.A. Darden, R.E. Duke, H. Gohlke, A.W. Goetz, S. Gusarov, N. Homeyer, P. Janowski, J. Kaus, I. Kolossváry, A. Kovalenko, T.S. Lee, S. LeGrand, T. Luchko, R. Luo, B. Madej, K.M. Merz, F. Paesani, D.R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, R. Salomon-Ferrer, G. Seabra, C.L. Simmerling, W. Smith, J. Swails, R.C. Walker, J. Wang, R.M. Wolf, X. Wu, P.A. Kollman, *AMBER 14*, University of California, San Francisco, **2014**.
- 5 C. I. Bayly, P. Cieplak, W. D. Cornell, P. A. Kollman, *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 10269-10280.
- 6 J. M. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell, P. A. Kollman, D. A. Case, *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1157-1174.
- 7 P. Cieplak, J. Caldwell, P. Kollman, *J. Comput. Chem.* **2001**, *22*, 1048-1057.
- 8 B. Frieg, B. Görg, N. Homeyer, V. Keitel, D. Häussinger, H. Gohlke, *PLoS Comput. Biol.* **2016**, *12*, e1004693.
- 9 T. Darden, D. M. York, L. G. Pedersen, *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 10089-10092.
- 10 D. M. York, T. A. Darden, L. G. Pedersen, *J. Chem. Phys.* **1993**, *99*, 8345-8348.
- 11 J. P. Ryckaert, G. Ciccotti, H. J. C. Berendsen, *J. Comput. Phys.* **1977**, *23*, 327-341.
- 12 R. Salomon-Ferrer, A. W. Gotz, D. Poole, S. Le Grand, R. C. Walker, *J. Chem. Theory Comput.* **2013**, *9*, 3878-3888.
- 13 D. R. Roe, T. E. Cheatham, *J. Chem. Theory Comput.* **2013**, *9*, 3084-3095.
- 14 D. A. Case, J. T. Berryman, R. M. Betz, D. S. Cerutti, T. E. Cheatham, III, T. A. Darden, R. E. Duke, T. J. Giese, H. Gohlke, A. W. Goetz, N. Homeyer, S. Izadi, P. Janowski, J. Kaus, A. Kovalenko, T. S. Lee, S. LeGrand, P. Li, T. Luchko, R. Luo, B. Madej, K. M. Merz, G. Monard, P. Needham, H. Nguyen, H.T. Nguyen, I. Omelyan, A. Onufriev, D. R. Roe, A. Roitberg, R. Salomon-Ferrer, C. L. Simmerling, W. Smith, J. Swails, R. C. Walker, J. Wang, R. M. Wolf, X. Wu, D. M. York, P. A. Kollman, *AMBER 2015*, University of California, San Francisco, **2015**.

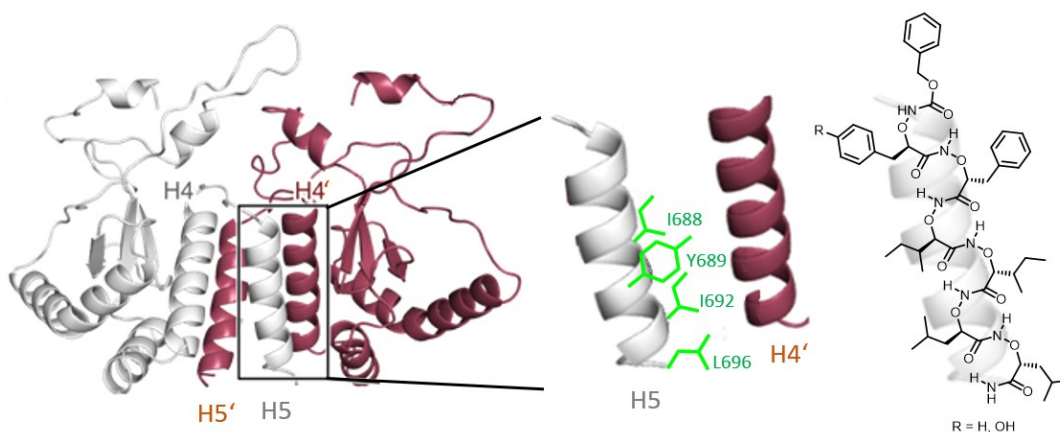
10.3 Publikation III

Die vorliegende Arbeit (Publikation III) wurde zur Veröffentlichung angenommen:

„Blood“

Impact factor: 13.164 (2016)

S. Bhatia, D. Diedrich, B. Frieg, H. Ahlert, S. Stein, B. Bopp, F. Lang, T. Zang, T. Kröger, T. Ernst, G. Kögler, A. Krieg, S. Lüdeke, H. Kunkel, A. J. Rodrigues Moita, M. U. Kassack, V. Marquardt, F. V. Opitz, M. Oldenburg, M. Remke, M. Grez, A. Hochhaus, A. Borkhardt, G. Groth, L. Nagel-Steger, J. Jose, T. Kurz, H. Gohlke, F. K. Hansen, J. Hauer, Targeting HSP90 dimerization via the C-terminus is effective in imatinib resistant CML and lacks heat shock response, *Blood*. April 2017, zur Veröffentlichung angenommen.



„This research was originally published in *Blood* Online. S. Bhatia, D. Diedrich, B. Frieg, H. Ahlert, S. Stein, B. Bopp, F. Lang, T. Zang, T. Kröger, T. Ernst, G. Kögler, A. Krieg, S. Lüdeke, H. Kunkel, A. J. Rodrigues Moita, M. U. Kassack, V. Marquardt, F. V. Opitz, M. Oldenburg, M. Remke, M. Grez, A. Hochhaus, A. Borkhardt, G. Groth, L. Nagel-Steger, J. Jose, T. Kurz, H. Gohlke, F. K. Hansen, J. Hauer, Targeting HSP90 dimerization via the C-terminus is effective in imatinib resistant CML and lacks heat shock response. *Blood*. Prepublished May 3, 2018; doi: 10.1182/blood-2017-10-812086. © the American Society of Hematology.”

Eigener Anteil der Arbeit: 20%, Coautorin, Durchführung aller organischen Synthesen und analytische Charakterisierung aller Synthesebausteine; Planung und Durchführung der Festphasensynthese, Reinigung und analytische Charakterisierung der α -Aminoxyhexapeptide; Planung und Analyse der 2D-NMR-Studien; Mitarbeit an der Erstellung des Manuskripts für die Veröffentlichung.

1 **Targeting HSP90 dimerization via the C-terminus is effective in imatinib-**
2 **resistant CML and lacks heat shock response induction**

3

4 **Authors:** Sanil Bhatia,¹ Daniela Diedrich,² Benedikt Frieg,² Stefan Stein,³ Bertan Bopp,⁴
5 Franziska Lang,¹ Tao Zang,^{5,6} Tobias Kröger,² Thomas Ernst,⁷ Gesine Kögler,⁸ Andreas
6 Krieg,⁹ Steffen Lüdeke,¹⁰ Hana Kunkel,³ Ana J. Rodrigues Moita,² Matthias U. Kassack,²
7 Viktoria Marquardt,^{1,2,11,12} Marc Remke,^{1,11,12} Manuel Grez,³ Andreas Hochhaus,⁷ Arndt
8 Borkhardt,¹ Georg Groth,¹³ Luitgard Nagel-Steger,^{5,6} Joachim Jose,⁴ Thomas Kurz,² Holger
9 Gohlke,^{2,14} Finn K. Hansen,^{2,15#} and Julia Hauer^{1#}

10 *# contributed equally to this work*

11

12 **Affiliations:**

13 ¹Department of Pediatric Oncology, Hematology and Clinical Immunology, Medical
14 Faculty, Heinrich Heine University Düsseldorf, Düsseldorf, Germany; ²Institute for
15 Pharmaceutical and Medicinal Chemistry, Heinrich Heine University Düsseldorf,
16 Düsseldorf, Germany; ³Institute for Tumor Biology and Experimental Therapy, Georg-
17 Speyer-Haus, Frankfurt, Germany; ⁴Institute for Pharmaceutical and Medicinal
18 Chemistry, PharmaCampus, Westphalian Wilhelms University, Münster, Germany;
19 ⁵Institute for Physical Biology, Heinrich Heine University Düsseldorf, Düsseldorf,
20 Germany; ⁶Institute of Complex Systems, Structural Biochemistry (ICS-6),
21 Forschungszentrum Jülich GmbH, Jülich, Germany; ⁷Hematology/Oncology, Internal
22 Medicine II, Jena University Hospital, Jena, Germany; ⁸Institute for Transplantation
23 Diagnostics and Cell Therapeutics, Heinrich Heine University Duesseldorf,
24 Duesseldorf, Germany; ⁹Department of Surgery (A), Heinrich Heine University
25 Düsseldorf, Düsseldorf, Germany; ¹⁰Institute of Pharmaceutical Sciences, University
26 of Freiburg, Freiburg, Germany; ¹¹Institute of Neuropathology, Medical Faculty,
27 Heinrich Heine University Düsseldorf, Düsseldorf, Germany; ¹²Division of Pediatric
28 Neuro-Oncogenomics, German Cancer Consortium (DKTK), partner site University
29 Hospital Düsseldorf, Germany; ¹³Institute for Biochemical Plant Physiology, Heinrich
30 Heine University Düsseldorf, Düsseldorf, Germany; ¹⁴John von Neumann Institute for
31 Computing (NIC), Jülich Supercomputing Centre (JSC) & Institute for Complex
32 Systems - Structural Biochemistry (ICS 6), Forschungszentrum Jülich GmbH, Jülich,

33 Germany; ¹⁵Pharmaceutical/Medicinal Chemistry, Institute of Pharmacy, Leipzig
34 University, Leipzig, Germany

35 **Corresponding authors:** Julia Hauer, Department of Pediatric Oncology,
36 Hematology and Clinical Immunology, Heinrich-Heine-University Duesseldorf,
37 Medical Faculty, Moorenstrasse 5, 40225 Duesseldorf, Germany, Tel: +49 211 81
38 17680; Fax: +49 211 81 16206; e-mail: Julia.Hauer@med.uni-duesseldorf.de

39 Finn K. Hansen, Pharmaceutical/Medicinal Chemistry, Institute of Pharmacy, Leipzig
40 University, Brüderstr. 34, 04103 Leipzig, Germany, Tel: +49 341 97 36801, Fax: +49
41 341 97 36889, E-mail: finn.hansen@uni-leipzig.de

42

43 **Short running title:** Novel HSP90 inhibitor in imatinib-resistant CML.

44

45 **Keywords:** CML, BCR-ABL1, imatinib, HSP90 & NVP-AUY922 (or luminespib).

46

47 **Word count:** 3947

48

49 **Abstract**

50 The BCR-ABL1 oncogenic fusion protein is the molecular hallmark of chronic myeloid
51 leukemia (CML). Tyrosine kinase inhibitors (TKIs) have revolutionized the treatment
52 of CML; however, resistance by various mechanisms is common. Furthermore, TKIs
53 cannot eradicate persisting leukemia stem cells (LSCs) which may repopulate the
54 bone marrow during or after TKI therapy. Therefore, novel treatment approaches are
55 needed, and an attractive strategy is the destabilization of the BCR-ABL1 kinase,
56 resulting in increased sensitivity to TKI treatment. Heat shock protein 90 (HSP90)
57 stabilizes BCR-ABL1 protein, and several inhibitors targeting the N-terminal domain
58 (NTD) of HSP90 are under investigation. However, there are still concerns regarding
59 side effects such as induction of heat shock response (HSR) and toxicity.

60 We have developed a novel inhibitor (referred to as **1**) of HSP90 function by targeting
61 HSP90 dimerization via the C-terminal domain (CTD) through structure-based
62 molecular design, chemical synthesis, and functional pre-clinical validation *in vitro*
63 and *in vivo* using CML cell lines as well as patient-derived CML cells. **1** is a promising
64 potential candidate for TKI resistant CML, which (i) leads to the destabilization of the

2

65 BCR-ABL1 oncoprotein and weakens the related pro-oncogenic cellular response, (ii)
66 does not induce HSR *in vitro* and *in vivo*, (iii) acts in a reasonable therapeutic window
67 and (iv) is efficient in imatinib-resistant CML, especially in BCR-ABL1^{T315I}.

68

69 **Key Points**

70 1) Majority of the HSP90 inhibitors induce a resistance mechanism called HSR.

71 2) We have developed a first in class HSP90 inhibitor which does not inflict any HSR
72 and is efficient in imatinib-resistant CML.

73

74 **Introduction**

75 The presence of Philadelphia (Ph) chromosome (translocation t(9;22)(q34;q11)) and
76 its molecular oncogenic equivalent, the *BCR-ABL1* fusion, is the molecular hallmark
77 of CML and one of the most recurrent cytogenetic aberrations identified in human
78 leukemias with an incidence of more than 95% in the case of CML, 20-40% in adult
79 BCP-ALL, and 2-5% in childhood BCP-ALL.¹⁻⁷ BCR-ABL1 is an oncogenic fusion
80 protein (p210-kD) with constitutive tyrosine kinase activity, and sufficient to propagate
81 and sustain disease.⁷ Most patients with CML are diagnosed in the chronic phase
82 (>70%), and the disease can be stabilized in a major proportion with frontline TKI
83 treatment strategies. Though CML can, in most cases be controlled, it cannot be
84 eradicated because (i) of the rapid development of resistant clones and (ii) TKIs only
85 target proliferating leukemic clones but are unable to eradicate persisting leukemia
86 stem cells (LSCs).^{8,9} This implicates long-term dependence on TKIs with an
87 increased risk of resistance and subsequent disease progression to blast crisis,
88 which is a disease state that is extremely difficult to treat with current therapies. The
89 introduction of TKI imatinib (IB) and the second-generation TKI, e.g., dasatinib and
90 nilotinib have prompted initial clinical response, but in the case of the BCR-ABL1
91 mutant phenotype, resistance is also common.¹⁰⁻¹² Two mechanisms of TKI
92 resistance are known, primary resistance, which is insufficient protein binding or
93 aberrant expression of drug transporters, and secondary resistance, which refers to
94 ABL1 kinase mutations.^{13,14} In a meta-analysis, which analyzed twelve studies with
95 1,698 newly diagnosed CML patients, 9.7% developed imatinib resistance, 1.7%
96 dasatinib and 3.35% nilotinib resistance.⁹ Especially the BCR-ABL1^{T315I} mutation is
97 common, associated with disease progression, shortened survival rates,¹⁵ and only
98 sensitive against third-generation TKI ponatinib. However, the indication for ponatinib

99 is limited because of its high risk of inducing cardiovascular side effects.¹⁶ Hence, the
100 introduction of novel therapeutic agents, which specifically target or destabilize the
101 BCR-ABL1 in combination with specific TKIs, can be a major advantage in the
102 treatment of CML.

103 Heat shock proteins (HSPs) act as molecular chaperones, thereby ensuring correct
104 protein folding and translocation of several client proteins. The HSP of 90 kDa
105 (HSP90) facilitates the correct folding of several oncogenic, newly synthesized and
106 denatured proteins, among them BCR-ABL1.¹⁷ HSP90 expression is highly enriched
107 in BCR-ABL1 positive leukemia.¹⁷⁻¹⁹ Hence, targeting HSP90 would increase the
108 proportion of misfolded BCR-ABL1, which could serve as a potential therapeutic
109 strategy against CML in the future, alone or in combination with TKIs.²⁰ Several
110 inhibitors targeting HSP90 have been established but none has been clinically
111 approved by the FDA. Majority of the HSP90 inhibitors target the ATP binding pocket
112 in HSP90's N-terminus and thereby induce a resistance mechanism called heat
113 shock response (HSR).^{21,22} HSR is a pro-survival mechanism essentially
114 characterized by the overexpression of other pro-survival HSPs such as HSP70,
115 HSP40, and HSP27 (mediated by HSF1) in response to HSP90 inhibition, which
116 potentially weakens the cytotoxic effect of HSP90 inhibitors.²¹⁻²⁶

117 In the present study, we have developed a novel HSP90 inhibitor targeting HSP90
118 dimerization via the C-terminal domain (CTD) (referred to as **1**) through structure-
119 based molecular design and chemical synthesis, which (i) leads to the destabilization
120 of the BCR-ABL1 oncoprotein and weakens the related pro-oncogenic cellular
121 response, (ii) acts in a reasonable therapeutic window, (iii) does not induce HSR *in*
122 *vitro* and *in vivo*, and is (iv) efficient in IB resistant CML, especially in BCR-ABL1^{T315I}.

123

124 **Methods**

125 **Chemical synthesis, 2D NMR spectroscopy**

126 See **supplemental Note 1** for general methods, synthetic protocols, compound
127 characterization and spectral data.

128

129 **Circular dichroism (CD) spectroscopy**

130 CD spectra in trifluoroethanol (TFE) (50 μ M, 1 mm path length) and sodium
131 phosphate buffer (10 μ M, 5 mm path length) were recorded on a J-810
132 Spectropolarimeter (Jasco) at 20°C and background corrected by solvent subtraction.

133 Autodisplay dimerization assay

134 Surface display of HSP90 on *E. coli* BL21 (DE3) cells was performed as described
135 before²⁷. (See supplemental note 2 for further details)

136

137 Microscale Thermophoresis (MST)

138 The HSP90 CTD was purified as described before²⁸ and labeled with the Monolith
139 NT™ Protein Labeling Kit RED-NHS (Amine-reactive) of NanoTemper (NanoTemper
140 Technologies GmbH, München, Germany) according to the manufacturer's protocol.
141 (See supplemental note 2 for further details)

142

143 Analytical ultracentrifugation

144 Sedimentation velocity experiments were carried out using a Beckman ProteomeLab
145 XL-A ultracentrifuge (Beckman Coulter, Inc., Indianapolis, INUS) equipped with an
146 absorbance detection system and an eight-hole rotor. (See supplemental note 2 for
147 further details)

148

149 Luciferase refolding assay

150 Luciferase assay was performed with K562 cells, stably expressing luciferase-
151 transgene, as described in²⁹ with some modifications. (See supplemental note 2 for
152 further details)

153

154 DARTS

155 Drug Affinity Responsive Target Stability (DARTS) assay was carried to evaluate the
156 protease protection of **1** from thermolysin, described in²⁹. (See supplemental note 2
157 for further details)

158

159 WB & Blue-native gels

160 Cell lysates were generated after 48h treatment of leukemic cells with **1**, IB, NB or
161 AU922. (See supplemental note 2 for further details)

162

163 Blue-native gels

164 Blue-native gels were performed following manufacturer's instructions (Invitrogen)
165 and as described in²⁹. (See supplemental note 2 for further details)

166

167 Molecular dynamics simulations and computation of effective binding energies

168 To provide a structural model of the binding mode of **1** at the HSP90 CTD, we
169 performed 60 molecular dynamics (MD) simulations of at least 400 ns length of free
170 diffusion³⁰ of **1** in the presence of the CTD. During the MD simulations, **1** was not
171 biased by any guiding force. Resulting MD trajectories were analyzed with respect to
172 potential binding sites of **1** and its binding mode. Furthermore, effective binding
173 energy calculations of **1** binding to the CTD were performed³¹ (See supplemental
174 note 2 for further details)

175

176 Cell culture

177 K562, KCL22 (BCR-ABL1+), HL60 and Mutz-2 (BCR-ABL1-) leukemic cell lines
178 (DSMZ, Braunschweig, Germany) were cultured in RPMI1640 supplemented with 10
179 % FCS and maintained at 37°C with 5 % CO₂, except Mutz-2,³² which was cultured in
180 α-MEM supplemented with 20% FCS and 20% conditioned medium from 5637 cells
181 (DSMZ). Normal Ba/F3 (murine pro-B cell line) or expressing BCR-ABL1^{T315I, M351T &}
182 ^{E255K} mutants were cultured in RPMI1640 (10% FCS) supplemented with or without
183 IL-3 (10ng/ml), respectively. Ba/F3 cells expressing BCR-ABL1 mutants were
184 resistant against IB until ~10 μM. In addition, IB resistant (~1 μM) K562 and KCL22
185 (referred to as K562r and KCL22r) were generated by the gradual increase in the
186 concentration of IB (Sigma-Aldrich) over a period of 3-6 months³³.

187

188 Primary Cell culture

189 Fresh cord blood (CB) samples were obtained from the Institute for Transplantation
190 Diagnostics and Cell Therapeutics (Heinrich-Heine-University, Duesseldorf) after
191 informed consent approval of the local ethical committee. Mononuclear cells (MNC)
192 were isolated by Ficoll density gradient centrifugation using standard procedures and
193 later cultured in Mononuclear Cell Medium (PromoCell, Heidelberg, Germany).
194 CD34+ cells were later sorted from these MNC using MACS (Miltenyi, Gladbach,
195 Germany).³² Five primary CML-patient derived CD34+ cells were obtained from
196 newly diagnosed patients after informed consent approval of the local ethics
197 committee and were cultured in Stemline[®] II Hematopoietic Stem Cell Expansion
198 Medium (Sigma-Aldrich).³²

199

200

201 Viability, proliferation and cell cycle assay

202 (See supplemental note 2 for further details)

203

204 Annexin V staining and Caspase 3/7 Glo assay

205 (See supplemental note 2 for further details)

206

207 FACS and CFU assay

208 (See supplemental note 2 for further details)

209

210 In vivo Xenograft tumor model

211 5×10^5 K-562-luciferase expressing (stably transduced) cells mixed with matrigel
212 matrix (Corning, NY, USA) were injected subcutaneously in the dorsal flank of NSG
213 (B6 NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl} /SzJ; JAX-Nr.: 005557; Jacksons Laboratory, Bar
214 Harbor, ME, USA) mice. Engraftment was monitored by measuring luminescence 3-
215 4 days after i.p. injection of 150 μ g per 100 μ l D-Luciferin Firefly, sodium salt
216 monohydrate (Biosynth, Staad, Switzerland) using the Caliper IVIS Lumina II
217 Multispectral Imaging System (Perkin Elmer, Rodgau, Germany) and the Living
218 Image Software. Compound **1** (0.5 mg/kg dose) or vehicle (DMSO) was administered
219 starting from the day after the transplantation by peritumoral injection for 17 days
220 (n=5 per group). Mice were sacrificed on Day 17 and excised tumors were weighed
221 and subjected to WB analysis. No blinding experiment was performed. Animal
222 husbandry and experiments were conducted in accordance with the German Animal
223 Welfare Act at the Institute for Tumor Biology and Experimental Therapy, Georg-
224 Speyer-Haus, Frankfurt, Germany.

225

226 Results**227 Design and synthesis of α -aminoxy hexapeptides 1 and 2 as potential HSP90
228 CTD dimerization inhibitors**

229 HSP90 is a homodimer, with each monomer consisting of three major functional
230 domains: the N-terminal domain (NTD), the middle (M) domain, and the C-terminal
231 domain (CTD) which mediates HSP90 dimerization (**Figure 1a**). Inhibitors targeting
232 the NTD trigger a survival mechanism in cancer cells referred to as HSR, whereas
233 inhibiting the HSP90 CTD dimerization could circumvent this stress response.^{21-26,34}
234 Thus, the development of inhibitors against HSP90 CTD dimerization might be the

235 most promising route towards new clinical HSP90 inhibitors.²² The CTD dimerization
236 interface is formed by a characteristic four-helix bundle (**Figure 1b**)³⁵. We recently
237 introduced a strategy to identify small-molecule mimetics of protein-protein
238 interactions starting from hot spot residues in the interface that account for most of
239 the binding affinity.^{28,30} Accordingly, we have resolved hot spots in the HSP90 CTD
240 dimerization interface (I688, Y689, I692, and L696, **Figure 1c**) and identified the first
241 peptidic inhibitors shown to bind to the CTD.^{27,28} However, peptides feature serious
242 drawbacks as drugs, such as low metabolic stability and poor bioavailability. In this
243 work we aimed at the development of the first peptidomimetic HSP90 CTD
244 dimerization inhibitors. We recently demonstrated that α -aminoxy peptides, a novel
245 class of peptidomimetic foldamers, can fold into a unique 2_8 -helical conformation.³⁶
246 Molecular modeling studies revealed that this 2_8 -helix can mimic the spatial
247 arrangement of peptide side chains in α -helices.³⁶ Herein, we found that side chains
248 of a α -aminoxy hexapeptide can accurately mimic the HSP90 dimerization hot spots
249 (**Figure 1c**). Based on this knowledge, we designed two tailor-made potential HSP90
250 CTD dimerization inhibitors (α -aminoxy hexapeptides **1** and **2**, **Figure 1d**). A
251 combination of the solution- and solid-phase supported methods was used to
252 synthesize **1** and **2**. Initially, a series of monomeric and dimeric building blocks were
253 prepared in solution (see **supplemental Note 1**). The target compounds **1** and **2**
254 were then prepared via solid-phase synthesis (**Figure 1d**) and purified by RP-HPLC
255 to > 95% purity. Investigating the conformational properties by 2D NMR spectroscopy
256 (**supplemental Figure 1 and 2**) and circular dichroism (CD) spectroscopy
257 (**supplemental Figure 3**) confirmed that **1** and **2** are able to fold into the desired 2_8 -
258 helical conformation indicating that they can adopt the required secondary structure
259 to mimic the HSP90 CTD dimerization hot spots.

260

261 **1 inhibits HSP90 dimer formation, specifically binds to the CTD of HSP90, and**
262 **either dissociates oligomeric species of or suppresses HSP90 CTD**
263 **oligomerization**

264 To elucidate the biological properties of **1** and **2**, we first showed by means of a
265 dimerization assay based on the autodisplay technology²⁷ that **1** and **2** inhibit HSP90
266 dimer formation (**Figure 2a, 2b**). Furthermore, binding of **1** and **2** to the CTD of
267 HSP90 was revealed by microscale thermophoresis (MST) measurements with the

268 purified, recombinant, NT-647 labeled CTD of HSP90 (**1**: $K_D = 27.4 \mu\text{M}$; **2**: $K_D =$
269 $44.2 \mu\text{M}$; **Figure 2c, 2d**).

270 The efficacy of **1** and **2** to HSP90 was also analyzed *in vitro* by using K562 cells,
271 stably expressing a luciferase transgene. A cell-based luciferase refolding assay²⁹
272 revealed a dose-dependent reduction in the luciferase activity within 180 min after
273 application of **1** or **2**, comparable to (C-terminus HSP90 inhibitor) novobiocin (NB)
274 and (intravenous N-terminus HSP90 inhibitor) NVP-AUY922 / AUY922 / luminespib
275 (**Figure 2e, supplemental figure 4a**). Hence, **1** (IC_{50} : $5.72 \pm 0.31 \mu\text{M}$ - K562;
276 $7.1 \pm 1.7 \mu\text{M}$ - HL60) was selected for further experiments due to the higher efficacy
277 in autodisplay, MST and luciferase refolding assay as well as in the viability assay
278 compared to **2** (IC_{50} : $16.8 \pm 0.11 \mu\text{M}$ - K562; $17.4 \pm 0.4 \mu\text{M}$ - HL60) (**supplemental**
279 **Figure 4b**). We proved specific binding of **1** to HSP90 complexes by native gel
280 analysis, resulting in a more potent disruption of HSP90 α and HSP90 β (also HSP40
281 and HSP27) complexes (including their monomers/dimers) at cytotoxic
282 concentrations (**supplemental Figure 5a**) than NB and AUY922. In contrast,
283 treatment with AUY922 resulted in an elevated expression of HSR-associated protein
284 complexes (including their monomers/dimers) of HSP40 and HSP27 (**supplemental**
285 **Figure 5a**). **1** protected recombinant HSP90 α protein from degradation against
286 thermolysin digestion, an assay commonly used to quantify drug affinity responsive
287 target stability (DARTS)²⁹ (**supplemental Figure 5b**). Additionally, immunoblotting
288 was performed under reducing (+DTT) and non-reducing (-DTT) conditions and it
289 revealed that **1** acts on HSP90 oligomers, in contrast to NB but in concordance with
290 AUY922 (**supplemental Figure 5c**). Finally, sedimentation velocity analysis revealed
291 that **1** influences the size distribution of HSP90 CTD, in that **1** is able to either
292 dissociate oligomeric species or suppress HSP90 CTD oligomerization (**Figure 2f**
293 and see **supplemental Note 2**).

294 In summary, these results reveal the specific binding of **1** to the CTD of HSP90.

295

296 **1 is predicted to bind to the HSP90 CTD dimerization interface and mimic hot**
297 **spot residues on helix H5'**

298 To provide a structural model of the binding mode of **1** at the HSP90 CTD, we
299 performed 60 molecular dynamics simulations of at least 400 ns length of free
300 diffusion of **1** at mM concentrations in the presence of the CTD (**supplemental**
301 **Figure 6** and see **supplemental Note 3**). In 22 of the MD simulations, **1** binds to a

302 site between helices H4 and H5 in the dimerization interface (site ① in **Figure 3a, b**
303 and **supplemental Figure 7**). In the remaining cases, **1** either binds to a hydrophobic
304 site occupied by the middle domain in full-length HSP90 (site ② in **Figure 3a, b**;
305 **supplemental Figure 7 and 8**) or gets interim trapped in locations scattered across
306 the CTD surface (sites ③ in **Figure 3b, c** and **supplemental Figure 7**). Extending
307 the simulation times to 1 μ s did not lead to the release of **1** from the site ①, but did so
308 for **1** at the site ③ (**supplemental Figure 9**). These results are corroborated by
309 effective binding energy calculations that show that the most favorable effective
310 binding energies are found for **1** at the site ① (**Figure 3a**; **supplemental Figure 10**
311 **and 11**). Investigation of conformations of **1** at the site ① furthermore revealed that
312 side chains of **1** partially align with side chains of hot spot residues of helix H5'
313 (**Figure 3d**). Taken together, the computational results suggest that **1** binds to the
314 HSP90 CTD dimerization interface and mimics hot spot residues on helix H5'.²⁸

315

316 **1 destabilizes BCR-ABL1 oncogenic properties via HSP90 without inducing** 317 **HSR**

318 BCR-ABL1 maintains and propagates CML.⁷ First, we evaluated HSP90 expression
319 in BCR-ABL1+/- cell lines (**supplemental Figure 12a**). Later the average IC₅₀ values
320 for **1** in selected cell lines were determined (**Table 1**). Upon 48 h exposure to **1**, K562
321 cells downregulated BCR-ABL1 levels as well as downstream signaling pathways
322 such as STAT5a and CRKL, evaluated by western blot (WB) analysis (**supplemental**
323 **Figure 12b**). **1** additionally reduced pAKT-S473, pS6 expression and expression of
324 client proteins associated with HSP90 chaperone activity, involving t-AKT, t-STAT5a,
325 t-CRKL, cMYC, and BCL2 (**supplemental Figure 12b**).

326 The major challenge associated with the HSP90 inhibitors in the pre-clinical and
327 clinical testing phase is non-selectivity and the induction of HSR, which may provide
328 resistance to the tumor cells and can cause severe side effects due to higher doses.
329 **1** triggered the degradation of HSP90 client proteins without elevating the expression
330 of HSPs (HSP70, HSP40 & HSP27) involved in HSR in contrast to AUY922
331 (**Figure 4a** and **supplemental Figure 5a**).

332 **1** inhibited cell proliferation (**supplemental Figure 12c**) and induced apoptosis in
333 HL60 and K562 as illustrated by Annexin V and PI staining with ~ 2-6 fold increase in
334 the apoptotic cells upon 48 h treatment (**supplemental Figure 12d**). Comparable
335 results were observed in a caspase 3/7 enzyme-dependent apoptosis assays with an

10

336 induction of ~3-5 fold of apoptotic cells in K562, HL60, Mutz-2 (data not shown) and
337 KCL22, in accordance to NB (**Figure 4b**). K562 cells were dose-dependent arrested
338 in G1 phase as well as a reduction in G2/M phase was observed after exposure to **1**
339 (**supplemental Figure 12e**). Furthermore, **1** facilitated early differentiation in a liquid
340 medium, measured by expression of differentiation markers involving CD13 and
341 CD38 in K562 cells, and CD11b in HL60 cells (**supplemental Figure 12f**). Moreover,
342 48 h exposure of **1** to K562, HL60, Mutz-2 (data not shown) and KCL22 significantly
343 reduced their colony forming capacity (**Figure 4c**). However, **1** was effective at
344 micromolar (μM) concentration, approximately 100 fold below NB in the millimolar
345 range (mM). In summary, these data confirm a potent anti-BCR-ABL1 effect in the
346 absence of HSR induction and at low cytotoxic concentrations.

347 The clinical value of **1** depends on its therapeutic window. In this regard, we first
348 evaluated cell viability (trypan exclusion) (**Figure 5a**) and caspase 3/7 activity
349 (**supplemental Figure 13a**) in healthy human cord blood (CB) derived mononuclear
350 cells (hMNC-CB). **1** showed less cytotoxicity on healthy hMNC-CB at IC_{50}
351 concentrations of leukemic cell lines (**Table 1**). We also determined the IC_{50}
352 ($13.3 \pm 2.3 \mu\text{M}$) (**supplemental Figure 13b**) and caspase 3/7 activity (**supplemental**
353 **Figure 13c**) of **1** on CB-derived CD34⁺ cells from healthy individuals (n=3). Similarly,
354 the cytotoxic effect of **1** was ~ 2 fold less pronounced on healthy CB-CD34⁺ than on
355 leukemia cell line models. In addition, unlike in leukemic cell lines, **1** did not induce
356 early differentiation of CB-CD34⁺ cells in liquid medium at 6 and 12 μM , measured
357 by expression of differentiation markers CD14 and CD19 (**supplemental**
358 **Figure 13d**). These data suggest that **1** acts in a reasonable therapeutic window.
359 Furthermore, **1** inhibited cell proliferation (**Figure 5b**) and induced apoptosis
360 (**Figure 5c**) at 6 and 12 μM without inducing any HSR (**supplemental Figure 14a, b**)
361 in primary CML^{CD34⁺} patient-derived cells. Like in leukemic cell lines, in liquid medium
362 **1** induced early differentiation in CML^{CD34⁺}, which was measured by FACS for the
363 expression of CD14 and CD19 (**supplemental Figure 14c**). Moreover, 48 h
364 exposure of **1** significantly reduced the colony forming capacity of primary CML^{CD34⁺}
365 cells (**Figure 5d**). We additionally transplanted the BCR-ABL1⁺ cell line K562-Luc
366 (stably expressing the luciferase reporter gene) in an *in vivo* xenograft model and
367 treated the tumor locally with **1** (0.5 mg/kg - dose) for 17 days. We obtained a
368 significant reduction in tumor weight (**Figure 5e and 5f**) at a lower dose, indicating
369 that **1** has an anti-oncogenic potential *in vivo*. BCR-ABL1 protein and its downstream

370 signaling pathways (STAT5a and CRKL) (**Figure 5g**) were downregulated, and HSR
371 was not initiated in the excised tumors (**Figure 5h**). The lack of HSR response *in vivo*
372 makes compound **1** a promising candidate for BCR-ABL1+ CML.

373

374 **1 is effective in imatinib-resistant CML models**

375 BCR-ABL1^{T315I, E255K & M351T} are the clinically relevant mutations with severe TKI
376 resistance profile, and especially in BCR-ABL1^{T315I} CML only the TKI ponatinib is
377 effective, however with severe cardiovascular side effects.¹⁶ **1** has a superior effect
378 over IB in TKI resistant Ba/F3 cell line models encompassing BCR-ABL1^{T315I, E255K &}
379 ^{M351T} mutants (**Figure 6a**). **1** reduced viability (IC₅₀ ~ 3 μM) (**Table 1 & Figure 6a**)
380 and proliferation (**supplemental Figure 15**), and induced apoptosis (**Figure 6b**)
381 comparable to NB (0.3 mM) in IB resistant (~10 μM) BCR-ABL1^{T315I, E255K & M351T}
382 mutants expressing Ba/F3 cells. Additionally, after application of **1**, BCR-ABL1
383 oncoprotein was destabilized, and downstream signaling pathways (AKT, STAT5a
384 and BCL-2) were blocked with increasing concentrations of **1**, comparable to the
385 leukemic cell line models and *in vivo* experiment (**Figure 6c**). To further evaluate the
386 synergistic effect of **1** along with IB, proliferation and differentiation assays were
387 performed, where **1** alone or co-administered (at lower doses) with IB significantly
388 reduced the proliferation (**Figure 6d**) and colony forming capacity (**Figure 6e**) of
389 BCR-ABL1^{T315I} cells, comparable to NB, AUY922, and ponatinib. Furthermore, we
390 have generated the human BCR-ABL1+ IB resistant cell lines referred as K562 IBr
391 and KCL22 IBr (**Table 1**). **1** did not differentiate between IB resistant vs. sensitive
392 cells, suggesting a superior effect of **1** in human IB resistant BCR-ABL1+ cell lines
393 (**Table 1**). In addition, the cytotoxic effect (IC₅₀) of **1** on solid tumor cell lines,
394 including cisplatin sensitive/resistant ovarian (A2780) and esophageal carcinoma
395 (Kyse) cell line, and on a medulloblastoma (D425) cell line is comparable to the
396 leukemic cell line model (**Table 1**).

397

398 **Discussion**

399 One of the major challenges in treating CML is the development of resistant clones,
400 which can occur due to the activation of kinase mutations in ABL1 kinase.^{11,12} Long-
401 term TKI treatment induces high toxicity such as myelotoxicity and hepatotoxicity,
402 which is a relevant problem in CML patients with a peak frequency of 75 years and a
403 significant amount of co-morbidities.³⁷⁻³⁹ New treatment strategies of CML that

12

404 destabilize the BCR-ABL1 oncoprotein and bear the potential to increase the
405 sensitivity of LSCs to TKIs, thereby reducing TKI concentration and treatment
406 duration, are needed. Here, we developed the α -aminoxy hexapeptide **1**, which
407 blocks HSP90 function by specifically binding to the CTD of HSP90, that way either
408 dissociating oligomeric species of or suppressing HSP90 CTD oligomerization, which
409 ultimately leads to an inhibition of HSP90 dimer formation. **1** destabilizes the BCR-
410 ABL1 oncoprotein and weakens the related pro-oncogenic cellular response, (2) acts
411 in a reasonable therapeutic window, (3) does not induce HSR *in vitro* and *in vivo*, and
412 is (4) efficient in IB resistant CML, especially in BCR-ABL1^{T315I}.

413 The involvement in a plethora of oncogenic pathways has positioned HSP90 as a
414 prominent therapeutic target. Malignant cells are particularly sensitive to HSP90
415 inhibition (reviewed in ²¹). Over the last decade, around 15 different inhibitors
416 targeting the ATP binding pocket in HSP90's N-terminus have been assessed in
417 more than 40 different clinical trials; however, the entire class of these inhibitors
418 instigates HSR.^{20-26,34,40-42} In clinical trial phase I, the maximum tolerated dose of
419 AUY922 induced night blindness in 20% of the patients, and around 7% of the
420 patients developed grade 3 or more eye disorder.^{43,44} These reports suggested that
421 1) non-selectivity and 2) triggering of HSR might be important reasons for the failure
422 of N-terminal HSP90 inhibitors in advanced clinical trials. Besides that, functional
423 assays have shown that the silencing of HSF-1, HSP70, and HSP27 in addition to
424 HSP90 considerably enhances the cytotoxic effect of HSP90 inhibitors against
425 malignant cells.^{23,25,26} Accordingly, HSP90 C-terminal inhibitors have been developed
426 that appear to induce significantly less HSR; however, they have not yet entered
427 clinical trials.^{22,29,45-47} For none of these inhibitors, it has been reported that they act
428 as protein-protein interaction inhibitors that interfere with the CTD
429 dimerization.^{45,46,48,49}

430 The CTD is essential for the dimerization of HSP90 and therefore crucial for HSP90
431 function³⁵. Previous results have shown that the C-terminal dimer opens and closes
432 with fast kinetics⁵⁰. Together with recently identified hot spot residues in the CTD-
433 dimerization interface and subsequently designed peptidic inhibitors^{27,28} these
434 findings provided the incentive for us to develop the α -aminoxy hexapeptides **1** and **2**
435 (**Figure 1d**), of which **1** was selected for further analysis due to a higher efficacy. **1** is
436 the first-in-class peptidomimetic that exerts a novel mode of action for interfering with
437 HSP90 function (**Figure 2**). The absence of HSR upon administration of **1** is in

438 agreement with previous reports that the modulation of HSP90 function via the C-
439 terminus does not trigger HSR response.^{22,29,45-47} Compared to the previous C-
440 terminal HSP90 inhibitors, **1** shows a superior effect against TKI resistant cells
441 (**Figure 6; Table 1**). Furthermore, **1** is efficacious at a concentration 100-fold lower
442 than NB and has a reasonable therapeutic window. Therefore, we consider **1** a
443 promising preclinical candidate in the treatment of CML alone or in combination with
444 TKIs to overcome TKI resistance. We thus decided to term this compound
445 **aminoxyrone**. In the future, **aminoxyrone** or analogues might also be applied to
446 other leukemia entities that still have an intolerably poor prognosis, such as BCR-
447 ABL1+ B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL), and in other
448 malignant diseases as HSP90 stabilizes other oncogenic proteins (e.g. AKT, HER2,
449 BRAF, EGFR etc.) with key functions in multiple myelomas and solid carcinomas
450 (**Table 1**).

451

452 **Acknowledgements**

453 We are indebted to all members of our groups for useful discussions and for their
454 critical reading of the manuscript. J.H. has been supported by the German Children's
455 Cancer Foundation (110997), the German Jose Carreras Leukemia Foundation
456 (DJCLS 02R/2016), the "Forschungskommission" of the medical faculty of the
457 Heinrich Heine University Düsseldorf (HHU), and the Elterninitiative
458 Kinderkrebsklinik. F.K.H. acknowledges financial support from the Fonds der
459 Chemischen Industrie (FCI) and the Strategischer Forschungsfonds of HHU (SFF - F
460 2012/79-17). T.K., H.G., G.G., and M.U.K. have been supported by funds from the
461 Strategischer Forschungsfonds of HHU. Computational support and infrastructure
462 were provided by the "Centre for Information and Media Technology" (ZIM) at the
463 Heinrich Heine University Düsseldorf (Germany). We are grateful to the Jülich
464 Supercomputing Center for granting computing time on the supercomputer JURECA
465 (NIC project ID HDD13) to H.G. Financial support by Deutsche
466 Forschungsgemeinschaft (DFG) through funds (INST 208/704-1 FUGG to H.G.) to
467 purchase the hybrid computer cluster used in this study is gratefully acknowledged.
468 The Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) is acknowledged for funds used to
469 purchase the UHR-TOF maXis 4G, Bruker Daltonics, Bremen HRMS instrument
470 used in this research. V.M. has been supported by the Düsseldorf School of
471 Oncology (funded by the Comprehensive Cancer Centre Düsseldorf / Deutsche

472 Krebshilfe and the Medical Faculty of the Heinrich Heine University Düsseldorf. The
473 Georg-Speyer-Haus is funded jointly by the German Federal Ministry of Health
474 (BMG) and the Ministry of Higher Education, Research and the Arts of the State of
475 Hessen (HMWK). Kathleen Mohs is acknowledged for her technical assistance
476 during the animal experiment. A.B. has been supported by the German Children's
477 Cancer Foundation and the Federal Ministry of Education and Research, Bonn,
478 Germany.

479

480 **Authorship**

481 Conception and design of the project and supervision of the study: H.G., T.K., F.K.H.,
482 J.H. Data were acquired by D.D., B.B., S.B., B.F., T.Z., T.Kr., S.L., A.J.R.M., B.P., S.S.,
483 F.L., V.M. Development of methodology was performed by S.B., D.D., B.F., T.K., H.G.,
484 F.K.H., J.H. Responsible for analysis and interpretation of data: S.B., D.D., B.F., B.B.,
485 S.L., A.J.R.M., M.U.K., G.G., L.N.-S., J.J., T.K., H.G., F.K.H., J.H. Writing, review, and/or
486 revision of the manuscript: S.B., D.D., B.F., S.L., M.U.K., G.G., L.N.-S., J.J., T.K., H.G.,
487 F.K.H., J.H.

488

489 Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

490

491 Correspondence: Julia Hauer, Department of Pediatric Oncology, Hematology and
492 Clinical Immunology, Medical Faculty, Heinrich Heine University Düsseldorf, Düsseldorf,
493 Germany (Julia.hauer@med.uni-duesseldorf.de) and Finn K. Hansen,
494 Pharmaceutical/Medicinal Chemistry, Institute of Pharmacy, Leipzig University, Leipzig,
495 Germany (finn.hansen@uni-leipzig.de).

496

497 **References**

- 498 1. Kurzrock R, Estrov Z, Kantarjian H, Talpaz M. Conversion of interferon-induced, long-
499 term cytogenetic remissions in chronic myelogenous leukemia to polymerase chain reaction
500 negativity. *J Clin Oncol*. 1998;16(4):1526-1531.
- 501 2. Maurer J, Janssen JW, Thiel E, et al. Detection of chimeric BCR-ABL genes in acute
502 lymphoblastic leukaemia by the polymerase chain reaction. *Lancet*. 1991;337(8749):1055-1058.
- 503 3. Bloomfield CD, Goldman AI, Alimena G, et al. Chromosomal abnormalities identify high-
504 risk and low-risk patients with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1986;67(2):415-420.
- 505 4. Schrappe M, Arico M, Harbott J, et al. Philadelphia chromosome-positive (Ph+) childhood
506 acute lymphoblastic leukemia: good initial steroid response allows early prediction of a
507 favorable treatment outcome. *Blood*. 1998;92(8):2730-2741.
- 508 5. Westbrook CA, Hooberman AL, Spino C, et al. Clinical significance of the BCR-ABL fusion
509 gene in adult acute lymphoblastic leukemia: a Cancer and Leukemia Group B Study (8762).
510 *Blood*. 1992;80(12):2983-2990.
- 511 6. Preti HA, O'Brien S, Giralt S, Beran M, Pierce S, Kantarjian HM. Philadelphia-
512 chromosome-positive adult acute lymphocytic leukemia: characteristics, treatment results, and
513 prognosis in 41 patients. *Am J Med*. 1994;97(1):60-65.
- 514 7. Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice
515 by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science*. 1990;247(4944):824-830.
- 516 8. Wieczorek A, Uharek L. Management of Chronic Myeloid Leukemia Patients Resistant to
517 Tyrosine Kinase Inhibitors Treatment. *Biomark Insights*. 2015;10(Suppl 3):49-54.
- 518 9. Ursan ID, Jiang R, Pickard EM, Lee TA, Ng D, Pickard AS. Emergence of BCR-ABL kinase
519 domain mutations associated with newly diagnosed chronic myeloid leukemia: a meta-analysis
520 of clinical trials of tyrosine kinase inhibitors. *J Manag Care Spec Pharm*. 2015;21(2):114-122.
- 521 10. Talpaz M, Shah NP, Kantarjian H, et al. Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia
522 chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med*. 2006;354(24):2531-2541.
- 523 11. Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, et al. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy
524 caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science*. 2001;293(5531):876-880.
- 525 12. Shah NP, Nicoll JM, Nagar B, et al. Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer
526 polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and
527 blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 2002;2(2):117-125.
- 528 13. Milojkovic D, Apperley J. Mechanisms of Resistance to Imatinib and Second-Generation
529 Tyrosine Inhibitors in Chronic Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res*. 2009;15(24):7519-7527.
- 530 14. Hochhaus A, Kreil S, Corbin AS, et al. Molecular and chromosomal mechanisms of
531 resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia*. 2002;16(11):2190-2196.

- 532 15. Nicolini FE, Hayette S, Corm S, et al. Clinical outcome of 27 imatinib mesylate-resistant
533 chronic myelogenous leukemia patients harboring a T315I BCR-ABL mutation. *Haematologica*.
534 2007;92(9):1238-1241.
- 535 16. Ariad suspends ponatinib sales. *Cancer Discov*. 2014;4(1):6-7.
- 536 17. Mahalingam D, Swords R, Carew JS, Nawrocki ST, Bhalla K, Giles FJ. Targeting HSP90 for
537 cancer therapy. *Br J Cancer*. 2009;100(10):1523-1529.
- 538 18. Wu LX, Xu JH, Zhang KZ, et al. Disruption of the Bcr-Abl/Hsp90 protein complex: a
539 possible mechanism to inhibit Bcr-Abl-positive human leukemic blasts by novobiocin. *Leukemia*.
540 2008;22(7):1402-1409.
- 541 19. Blagosklonny MV, Toretsky J, Neckers L. Geldanamycin selectively destabilizes and
542 conformationally alters mutated p53. *Oncogene*. 1995;11(5):933-939.
- 543 20. Wang M, Shen A, Zhang C, et al. Development of Heat Shock Protein (Hsp90) Inhibitors
544 To Combat Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitors through Hsp90-Kinase Interactions. *J Med*
545 *Chem*. 2016.
- 546 21. Butler LM, Ferraldeschi R, Armstrong HK, Centenera MM, Workman P. Maximizing the
547 Therapeutic Potential of HSP90 Inhibitors. *Mol Cancer Res*. 2015;13(11):1445-1451.
- 548 22. Wang Y, McAlpine SR. Heat-shock protein 90 inhibitors: will they ever succeed as
549 chemotherapeutics? *Future Med Chem*. 2015;7(2):87-90.
- 550 23. Maloney A, Clarke PA, Naaby-Hansen S, et al. Gene and protein expression profiling of
551 human ovarian cancer cells treated with the heat shock protein 90 inhibitor 17-allylamino-17-
552 demethoxygeldanamycin. *Cancer Res*. 2007;67(7):3239-3253.
- 553 24. Bagatell R, Paine-Murrieta GD, Taylor CW, et al. Induction of a heat shock factor 1-
554 dependent stress response alters the cytotoxic activity of hsp90-binding agents. *Clin Cancer Res*.
555 2000;6(8):3312-3318.
- 556 25. McCollum AK, Teneyck CJ, Sauer BM, Toft DO, Erlichman C. Up-regulation of heat shock
557 protein 27 induces resistance to 17-allylamino-demethoxygeldanamycin through a glutathione-
558 mediated mechanism. *Cancer Res*. 2006;66(22):10967-10975.
- 559 26. Guo F, Rocha K, Bali P, et al. Abrogation of heat shock protein 70 induction as a strategy
560 to increase antileukemia activity of heat shock protein 90 inhibitor 17-allylamino-demethoxy
561 geldanamycin. *Cancer Res*. 2005;65(22):10536-10544.
- 562 27. Bopp B, Ciglia E, Ouald-Chaib A, Groth G, Gohlke H, Jose J. Design and biological testing of
563 peptidic dimerization inhibitors of human Hsp90 that target the C-terminal domain. *Biochim*
564 *Biophys Acta*. 2016;1860(6):1043-1055.
- 565 28. Ciglia E, Vergin J, Reimann S, et al. Resolving hot spots in the C-terminal dimerization
566 domain that determine the stability of the molecular chaperone Hsp90. *PLoS One*.
567 2014;9(4):e96031.

- 568 29. Eskew JD, Sadikot T, Morales P, et al. Development and characterization of a novel C-
569 terminal inhibitor of Hsp90 in androgen dependent and independent prostate cancer cells. *BMC*
570 *Cancer*. 2011;11:468.
- 571 30. Gohlke H, Hergert U, Meyer T, et al. Binding region of alanopine dehydrogenase
572 predicted by unbiased molecular dynamics simulations of ligand diffusion. *J Chem Inf Model*.
573 2013;53(10):2493-2498.
- 574 31. Miller BR, 3rd, McGee TD, Jr., Swails JM, Homeyer N, Gohlke H, Roitberg AE. MMPBSA.py:
575 An Efficient Program for End-State Free Energy Calculations. *J Chem Theory Comput*.
576 2012;8(9):3314-3321.
- 577 32. Bhatia S, Reister S, Mahotka C, Meisel R, Borkhardt A, Grinstein E. Control of
578 AC133/CD133 and impact on human hematopoietic progenitor cells through nucleolin.
579 *Leukemia*. 2015;29(11):2208-2220.
- 580 33. Mahon FX, Deininger MW, Schultheis B, et al. Selection and characterization of BCR-ABL
581 positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse
582 mechanisms of resistance. *Blood*. 2000;96(3):1070-1079.
- 583 34. Hall JA, Forsberg LK, Blagg BS. Alternative approaches to Hsp90 modulation for the
584 treatment of cancer. *Future Med Chem*. 2014;6(14):1587-1605.
- 585 35. Pearl LH, Prodromou C. Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone
586 machinery. *Annu Rev Biochem*. 2006;75:271-294.
- 587 36. Diedrich D, Moita AJ, Ruther A, et al. alpha-Aminoxy Oligopeptides: Synthesis, Secondary
588 Structure, and Cytotoxicity of a New Class of Anticancer Foldamers. *Chemistry*. 2016.
- 589 37. Moslehi JJ, Deininger M. Tyrosine Kinase Inhibitor-Associated Cardiovascular Toxicity in
590 Chronic Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 2015;33(35):4210-4218.
- 591 38. Shah RR, Morganroth J, Shah DR. Hepatotoxicity of tyrosine kinase inhibitors: clinical and
592 regulatory perspectives. *Drug Saf*. 2013;36(7):491-503.
- 593 39. Steegmann JL, Baccarani M, Breccia M, et al. European LeukemiaNet recommendations
594 for the management and avoidance of adverse events of treatment in chronic myeloid
595 leukaemia. *Leukemia*. 2016;30(8):1648-1671.
- 596 40. Hsu HS, Lin JH, Huang WC, et al. Chemoresistance of lung cancer stemlike cells depends
597 on activation of Hsp27. *Cancer*. 2011;117(7):1516-1528.
- 598 41. Gandhi N, Wild AT, Chettiar ST, et al. Novel Hsp90 inhibitor NVP-AUY922 radiosensitizes
599 prostate cancer cells. *Cancer Biol Ther*. 2013;14(4):347-356.
- 600 42. Modi S, Saura C, Henderson C, et al. A multicenter trial evaluating retaspimycin HCL (IPI-
601 504) plus trastuzumab in patients with advanced or metastatic HER2-positive breast cancer.
602 *Breast Cancer Res Treat*. 2013;139(1):107-113.

- 603 43. Jhaveri K, Ochiana SO, Dunphy MP, et al. Heat shock protein 90 inhibitors in the
604 treatment of cancer: current status and future directions. *Expert Opin Investig Drugs*.
605 2014;23(5):611-628.
- 606 44. Zhou D, Liu Y, Ye J, et al. A rat retinal damage model predicts for potential clinical visual
607 disturbances induced by Hsp90 inhibitors. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013;273(2):401-409.
- 608 45. Wang Y, McAlpine SR. N-terminal and C-terminal modulation of Hsp90 produce
609 dissimilar phenotypes. *Chem Commun (Camb)*. 2015;51(8):1410-1413.
- 610 46. Koay YC, McConnell JR, Wang Y, et al. Chemically accessible hsp90 inhibitor that does not
611 induce a heat shock response. *ACS Med Chem Lett*. 2014;5(7):771-776.
- 612 47. Sellers RP, Alexander LD, Johnson VA, et al. Design and synthesis of Hsp90 inhibitors:
613 exploring the SAR of Sansalvamide A derivatives. *Bioorg Med Chem*. 2010;18(18):6822-6856.
- 614 48. Marcu MG, Chadli A, Bouhouche I, Catelli M, Neckers LM. The heat shock protein 90
615 antagonist novobiocin interacts with a previously unrecognized ATP-binding domain in the
616 carboxyl terminus of the chaperone. *J Biol Chem*. 2000;275(47):37181-37186.
- 617 49. Yun BG, Huang W, Leach N, Hartson SD, Matts RL. Novobiocin induces a distinct
618 conformation of Hsp90 and alters Hsp90-cochaperone-client interactions. *Biochemistry*.
619 2004;43(25):8217-8229.
- 620 50. Ratzke C, Mickler M, Hellenkamp B, Buchner J, Hugel T. Dynamics of heat shock protein
621 90 C-terminal dimerization is an important part of its conformational cycle. *Proc Natl Acad Sci U*
622 *SA*. 2010;107(37):16101-16106.
- 623 51. Ali MMU, Roe SM, Vaughan CK, et al. Crystal structure of an Hsp90-nucleotide-p23/Sba1
624 closed chaperone complex. *Nature*. 2006;440(7087):1013-1017.
- 625 52. Lee CC, Lin TW, Ko TP, Wang AH. The hexameric structures of human heat shock protein
626 90. *PLoS One*. 2011;6(5):e19961.
- 627
628

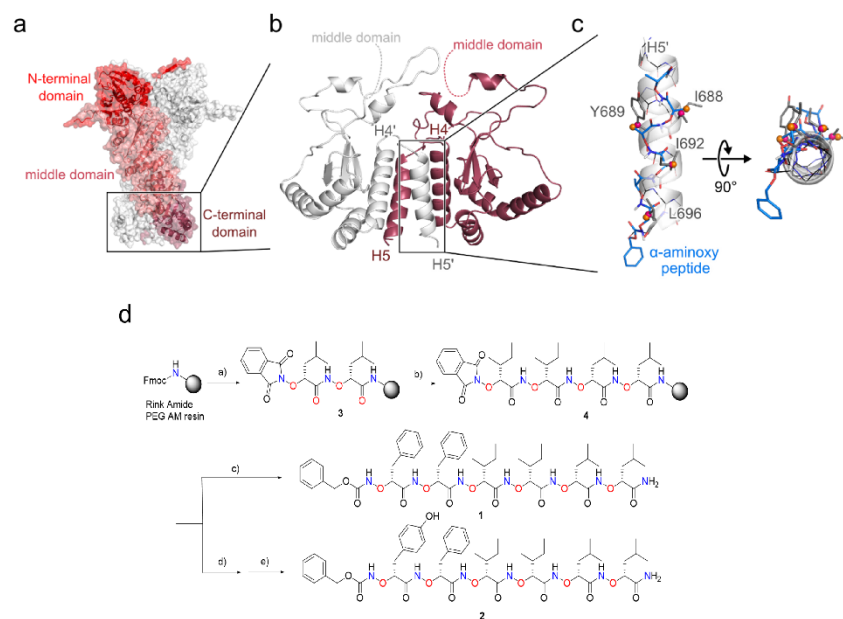
629 **Table and Figure legends:**

630

631 **Table 1:** Imatinib sensitive/resistant (r) human and murine derived pro B cell lines expressing clinically
 632 relevant BCR-ABL1 mutant isoforms (T315I, M351T and E255K) were treated with **1** at different
 633 concentration for 48 h and later the average IC₅₀ was determined by Celltitre-Glo assay. In addition to
 634 leukemic cell line models' the cytotoxicity (IC₅₀) of **1** against solid carcinoma cell line models such as
 635 cisplatin sensitive/resistant ovarian and esophageal carcinoma, and a brain tumor cell line was also
 636 evaluated (n=3). IBr (Imatinib-resistant), CisR (Cisplatin resistant), CML (Chronic Myeloid Leukemia),
 637 AML (Acute Myeloid Leukemia).

Cell lines	Origin	Growth inhibition (IC ₅₀) μ M
K562 & K562 IBr	CML (BCR-ABL1 +)	5.72 \pm 0.31 & 6.24 \pm 0.52
HL60	AML (BCR-ABL ⁻)	7.17 \pm 1.7
KCL22 & KCL22 IBr	CML (BCR-ABL +)	2.74 \pm 0.52 & 2.86 \pm 0.63
Mutz-2	AML (BCR-ABL ⁻)	10.10 \pm 0.46
BA/F3 (T315I)	Murine pro B cell line (BCR-ABL +)	3.02 \pm 0.22
BA/F3 (M351T)	Murine pro B cell line (BCR-ABL +)	3.11 \pm 0.12
BA/F3 (E255K)	Murine pro B cell line (BCR-ABL +)	3.02 \pm 0.41
A2780 sens	Ovarian carcinoma (cisplatin sensitive)	7.1 \pm 1.1
A2780 CisR	Ovarian carcinoma (cisplatin resistant)	5.8 \pm 0.8
Kyse sens	Esophageal carcinoma (cisplatin sensitive)	2.9 \pm 0.6
Kyse CisR	Esophageal carcinoma (cisplatin resistant)	6.9 \pm 1.1
D425	Medulloblastoma	6.3 \pm 0.2
HEK293	Human Embryonic Kidney 293 cells	10.7 \pm 2.0

638



639

640 **Figure 1. Design and synthesis towards HSP90 CTD dimerization inhibitors.**

641 (a) Crystal structure of the HSP90 dimer from *S. cerevisiae* (PDB code: 2CG9⁵¹), shown as a
 642 transparent surface with cartoon representation. One monomer is colored in white and one in red, with
 643 three domains (N-terminal, middle, and C-terminal) colored in different shades of red. (b) Dimeric C-
 644 terminal domain (CTD) from human HSP90 (PDB code: 3Q6M⁵²). Both subunits are colored
 645 differently. Helices H4, H4' and H5, H5' form the CTD dimerization interface. Dashed lines show
 646 where the middle domains would be located. (c) Overlay of a hexameric α -aminoxy peptide with all-
 647 methyl side chains (blue sticks) onto C $_{\beta}$ atoms of hot spot amino acids I688, Y689, I692, and L696²⁸
 648 (gray sticks) on helix H5' (sequence P681 – D699), shown in transparent cartoon representation with
 649 backbone atoms shown as black lines. The right panel shows the structures rotated by 90° such that
 650 the helix C-terminus is oriented towards the viewer. C $_{\beta}$ reference atoms of hot spot amino acids are
 651 depicted as magenta spheres, C $_{\beta}$ atoms of the α -aminoxy peptide as orange spheres, respectively. (d)
 652 Solid-phase synthesis of α -aminoxy hexapeptides **1** and **2**. Reagents and conditions: a) (i) 20%
 653 piperidine in DMF, r.t., 2 x 15 min; (ii) Phth-^{NO}Leu-^{NO}Leu-OH, BOP, HOBt, NEM in DMF, r.t., 24 h; b)
 654 5% hydrazine hydrate in MeOH, 2 x 15 min; (ii) Phth-^{NO}Ile-^{NO}Ile-OH, BOP, HOBt, NEM in DMF, r.t.,
 655 24 h; c) (i) 5% hydrazine hydrate in MeOH, 2 x 15 min; (ii) Cbz-^{NO}Phe-^{NO}Phe-OH, BOP, HOBt, NEM in
 656 DMF, r.t., 24 h; (iii) TFA/TES (98:2, v:v), r.t., 1.5 h; d) (i) 5% hydrazine hydrate in MeOH, 2 x 15 min;
 657 (ii) Phth-^{NO}Phe-OH, BOP, HOBt, NEM in DMF, r.t., 24 h; e) 5% hydrazine hydrate in MeOH, 2 x
 658 15 min; (ii) Cbz-^{NO}Tyr(t-Bu)-OH, BOP, HOBt, NEM in DMF, 24 h; (iii) TFA/TES (98:2, v:v), r.t., 1.5 h.
 659

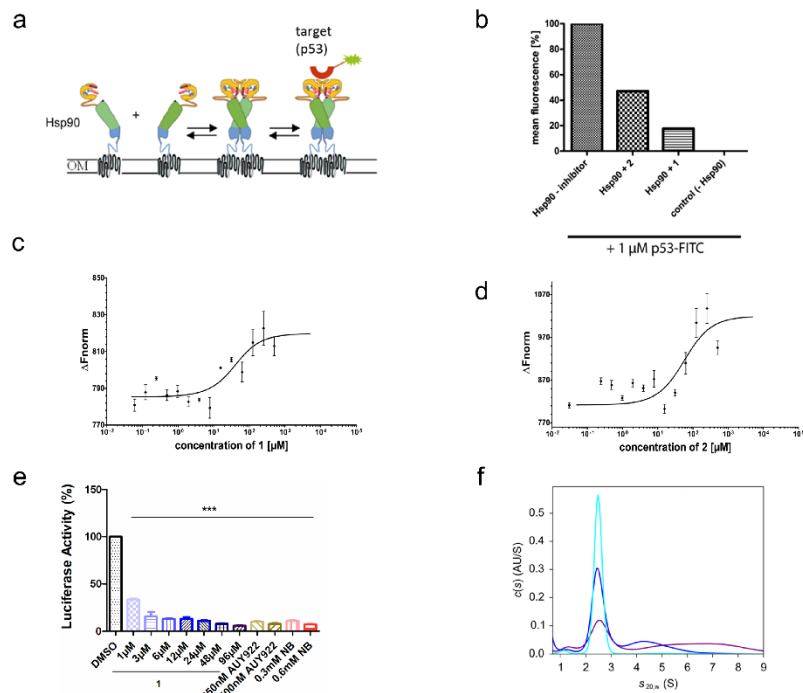
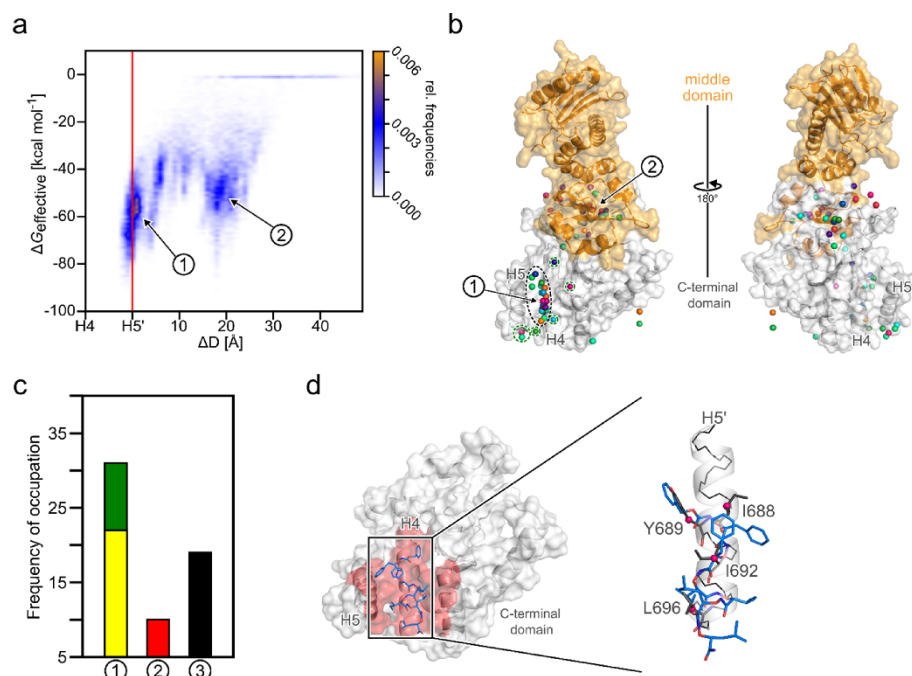
660
661

Figure 2. Selective binding of compound 1 and 2 to HSP90 C-terminus.

662 (a) Scheme of the Hsp90 dimerization assay using Autodisplay. Hsp90 is displayed on the surface of
 663 *E. coli* cells via the Autodisplay technique. The motility of the anchoring domain within the outer
 664 membrane of *E. coli* facilitates the dimerization of Hsp90. Dimerized Hsp90 on the surface of *E. coli* is
 665 capable of binding to FITC labeled p53. This leads to an increase of cellular fluorescence which can
 666 then be detected via flow cytometry. Blocking the dimerization of surface displayed Hsp90 inhibits the
 667 binding of FITC labeled p53 to Hsp90 and thus leads to a decrease of cellular fluorescence²⁷. (b)
 668 Inhibition of dimerization of on *E. coli* cells displayed Hsp90 measured via flow cytometry. Incubation
 669 of *E. coli* BL21 (DE3) cells displaying Hsp90 with 1 μM FITC labeled p53 leads to a high cellular
 670 fluorescence indicating dimerization of Hsp90, whereas no cellular fluorescence was detectable in
 671 *E. coli* cells without displaying Hsp90 (control cells). Preincubation of cells with surface displayed
 672 Hsp90 with 50 μM of **1** and **2**, respectively, leads to a loss in cellular fluorescence indicating a lowered
 673 binding affinity of FITC labeled p53 to surface displayed Hsp90. Determination of the apparent K_D
 674 value of NT-647 labeled C-terminal domain of Hsp90 and **1** (c) and **2** (d) via Microscale
 675 Thermophoresis (MST). A constant amount of 50 nM labeled C-terminal domain of Hsp90 was used
 676 and three independent measurements were performed. The resulting mean values were determined
 677 and used in the K_D Fit formula. This yielded an apparent K_D of 27.39 μM for **1** and 44.2 μM for **2**,
 678 respectively. (e) Cell-based HSP90 dependent luciferase assay was performed on K562-Luciferase
 679 (stable) expressing cells. The extent of thermally denatured luciferase refolding (3 min at 50 $^{\circ}\text{C}$) in the
 680 presence of **1**, NB and AUY922 were monitored after 180 min. (f) Influence of **1** on the size distribution
 681 of HSP90 CTD revealed by sedimentation velocity analysis. 20 μM HSP90 CTD alone (purple), 20 μM
 682 HSP90 CTD plus 27.4 μM **1** (blue), and 20 μM HSP90 CTD plus 54.8 μM **1** (cyan) were analyzed at
 683 50,000 rpm at 20 $^{\circ}\text{C}$ and the continuous $c(s)$ model was applied to evaluate the data. The s -values

22

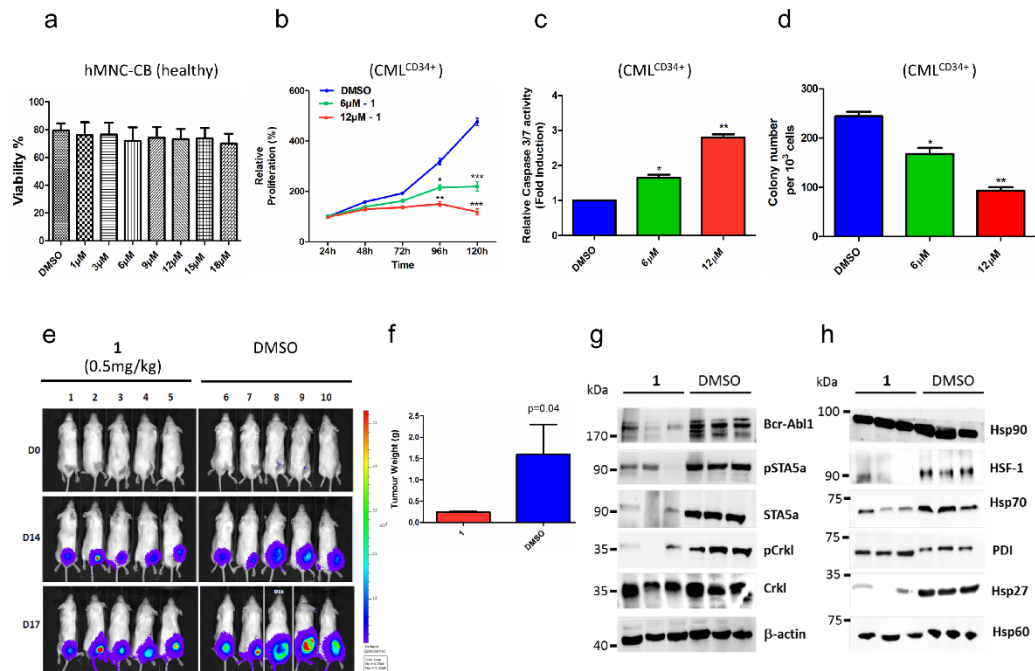
684 were standardized to $s_{20,w}$ -values. Columns depict the mean of 3 independent experiments (n=3).
 685 Significance analyses of normally distributed data with variance similar between groups used paired,
 686 two-tailed Student's t-test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$.
 687



688

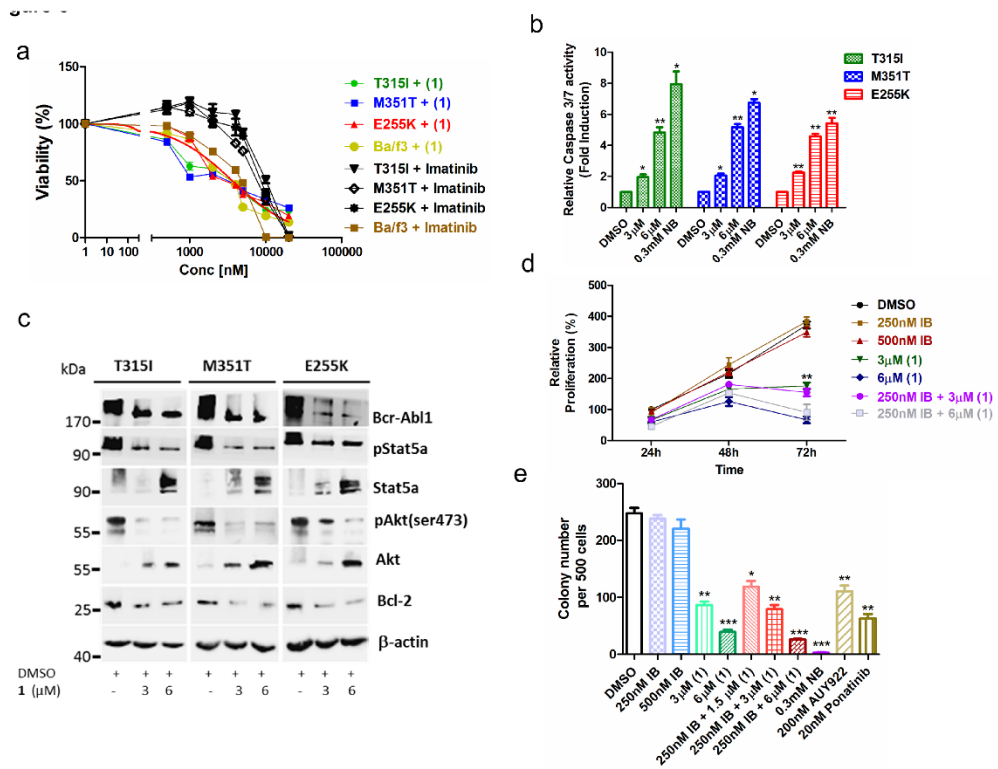
689 **Figure 3. Results of MD simulations of free diffusion of 1.**

690 (a) Relative frequencies of ligand pose (see color scale) as a function of the relative distance between
 691 the center of mass of 1 and helix H4 (ΔD) and computed effective energies of binding ($\Delta G_{\text{effective}}$). (b)
 692 Locations of the center of mass of 1 (spheres) after 60 MD simulations of 400 ns length each, with
 693 each simulation result colored differently. The black dashed line highlights all conformations that are
 694 bound to dimerization interface ① with $\Delta D_{\text{min}} \leq 0$ Å, the green dashed line those with $\Delta D_{\text{min}} < 4$ Å. The
 695 protein structure is shown as surface representation with the middle domain (not present during MD
 696 simulations) in orange and the CTD in white. In the left panel, the structure is rotated by 180° around
 697 the y-axis. (c) Frequency of occupation of binding sites ① (yellow), close to ① (green; see definition in
 698 the main text), ② (red), or ③ (black) by 1 across 60 MD simulations. (d) Binding mode model of 1. A
 699 representative conformation of 1 bound to the CTD, extracted from the MD trajectory. (e) An overlay of
 700 1 onto helix H5' (Figure 1b, c) extracted from the crystal structure (PDB code: 3Q6M⁵²). In (d, e) 1 is
 701 depicted as blue sticks, hot spot amino acids I688, Y689, I692, and L696²⁸ as gray sticks with C_β
 702 atoms as magenta spheres, helix H5' as white cartoon with black backbone atoms, and the CTD in the
 703 left panel as surface representation, with all residues within 3 Å of 1 colored in red. In (a, b, c) ①, ②,
 704 and ③ denote the binding sites of 1, where ③ represents all binding sites besides ① and ②.
 705



721
722 **Figure 5. Selective inhibition and *in vivo* efficacy of 1 by destabilization of BCR-ABL1 without**
723 **the induction of HSR.**

724 (a) Healthy human CB-derived MNC were treated for 48 h with increasing concentrations of 1 and
725 later viability was monitored by trypan exclusion method. 1 did not show any reduction in the viability
726 even at approx. 3 times (18 μ M) more concentration than the IC₅₀ (3-6 μ M) for leukemic cells (n=3). (b)
727 Primary CML^{CD34+} cells from the patient were treated with the indicated concentration of 1 and viable
728 cells were counted after every 24 h interval for 5 days (n=3). (c) Primary CML^{CD34+} cells were treated
729 with the indicated concentration of 1 (48 h) and later enzymatic activity of caspase 3/7 was examined
730 by caspase 3/7 dependent Glo assay (absorbance at 405 nm) (n=3). (d) Primary CML-patient derived
731 CD34+ were seeded in methylcellulose medium after treatment with 1 for 48 h. Colonies were counted
732 after 14 days (n=3). (e) 5 x 10⁵ luciferase expressing K562 cells were subcutaneously transplanted
733 into NSG mice. Starting the day after transplantation, animals were treated by peri tumoral injection
734 (15 μ g) of compound 1 (0.5 mg/kg dose) or solvent only (DMSO). One control DMSO-treated mouse
735 was sacrificed earlier on day 16 due to large tumor size. Luminescence was monitored every 3-4 days
736 after i.p. injection of 100 μ l luciferin and the final analysis was performed on day 17 (n=5 mice per
737 group). (f) 1 reduced tumor burden with respect to tumor weight 0.24 \pm 0.01 g vs. vehicle 1.6 \pm 0.6 g
738 (p = 0.04 - One-tailed t-test). (g) Immunoblot analysis of tumor samples derived from mice treated with
739 1 revealed downregulation of BCR-ABL1 kinase activity and its associated downstream signaling
740 pathways involving, Stat5a and Crkl. (h) Immunoblot analysis of tumor samples derived from mice
741 after treatment with 1, displayed no HSR, which was evaluated by the expression of HSF-1, HSP70
742 and HSP27, whereas PDI (endoplasmic reticulum) and HSP60 (primarily present in mitochondria)
743 were employed as a control. Significance analysis of normally distributed data with variance similar
744 between groups used paired, two-tailed Student's t-test. * p < 0.05, ** p < 0.005, *** p < 0.001.



745

746

Figure 6. Efficacy of 1 in imatinib-resistant clinically relevant BCR-ABL1 mutants.

747

748

749

750

751

752

753

754

755

756

757

758

759

760

761

(a) Ba/F3 cells expressing BCR-ABL1^{T315I}, M351T & E255K mutants were subjected to different concentrations (4nM-25μM) of either 1 or IB (48 h), found to be resistant to IB (till ~ 10 μM), whereas sensitive against 1 (at ~ 3 μM). (b) Ba/F3 cells expressing BCR-ABL1^{T315I}, M351T & E255K mutants were treated with the indicated concentration of 1 (48 h) and later enzymatic activity of caspase 3/7 were examined by caspase 3/7 dependent Glo assay (absorbance at 405 nm). (c) Like in human leukemia cell lines, 1 causes downregulation of BCR-ABL1 and subsequently its associated downstream signaling pathways including Stat5a, Akt & Bcl-2 in Ba/f3 cells expressing BCR-ABL1 mutants (T315I, M351T & E255K). (d) Ba/F3 cells expressing BCR-ABL1^{T315I} mutant were treated alone or in combination with IB and later viable cells were counted at 24, 48 and 72 h. (e) Ba/F3 cells expressing BCR-ABL1^{T315I} mutant were seeded in methylcellulose medium after treatment with 1 (or NB, AU922, Ponatinib) for 48 h. Colonies were counted after 14 days. Columns depict the mean of 3 independent experiments (n=3). Significance analysis of normally distributed data with variance similar between groups used paired, two-tailed Student's t-test. * p < 0.05, ** p < 0.005, *** p < 0.001.

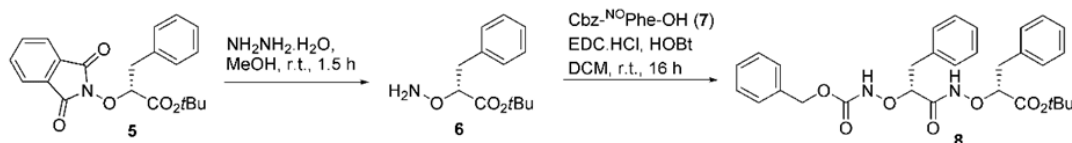
Supplemental Note 1

1. Chemistry	1
Materials and Methods.....	1
Synthesis of Cbz- ^{NO} Leu- ^{NO} Leu-O <i>t</i> Bu (8).....	2
Experimental data for compound 8	2
Synthesis of Cbz- ^{NO} Tyr(<i>t</i> Bu)-OH (11).....	3
Experimental data for compound 11	3
Solid-phase synthesis of α -aminoxy hexapeptides 1 and 2	4
Characterization data for compound 1 and 2	5
2. References.....	5

1. Chemistry

Materials and Methods

All chemicals and solvents were obtained from commercial suppliers (Sigma-Aldrich, Acros Organics, Carbolution Chemicals) and used as purchased without further purification. Fmoc-Rink-Amide PEG AM Resin (200-400 mesh, 0.56 mmol/g) was purchased from Iris Biotech, Germany. Solution-phase reactions were monitored by thin layer chromatography (TLC) using MN silica gel plates, precoated with fluorescence indicator UV₂₅₄, using ethyl acetate/*n*-hexane as the mobile phase. Components were visualized by irradiation with ultraviolet light (254 nm) or staining in potassium permanganate solution followed by heating. Flash column chromatography was performed with prepacked silica cartridge or Fluka silica gel 60 (230-400 mesh ASTM) with the solvent mixtures specified in the corresponding experiment. Proton (¹H) and carbon (¹³C) NMR spectra were recorded on a Bruker Avance 600 using CDCl₃ as solvent. Chemical shifts are given in parts per million (ppm), relative to residual solvent peak for ¹H and ¹³C. 2D NMR data were collected on a Bruker Avance 600 instrument operating at 600 MHz. ROESY acquisitions were performed at 298 K with the following parameters: spectral-window = 8474.58 Hz in both dimensions; mixing time = 0.05 ms; number of transients = 16; number of increments = 256; number of points = 1024. Square cosine window functions were applied in both dimensions. HRMS analysis was performed on a UHR-TOF maXis 4G, Bruker Daltonics, Bremen. All HPLC analyses and purifications were carried out on a Varian Prostar system equipped with a Prostar 410 (autosampler), 210 (pumps) and 330 (UV-detector). HPLC-grade water +0.1% TFA (solvent A) and HPLC-grade acetonitril +0.1% TFA (solvent B) were used as solvents. Analytical HPLC analyses were performed on a *Macherey-Nagel Nucleosil* C8 RP-HPLC column (EC 250/4 Nucleosil 100-5 C8) using a linear gradient from 50% B to 100% B in 40 min at a flow rate of 1 ml/min. For semipreparative purification a *MN Nucleosil* C8 RP-HPLC column (VP 250/10 Nucleosil 100-5 C8ec) was used at a flow rate of 4 mL/min. The Phthaloyl-protected monomers¹ and dimers² and the carboxybenzyl-protected monomers^{3,4} were synthesized according to literature procedures.

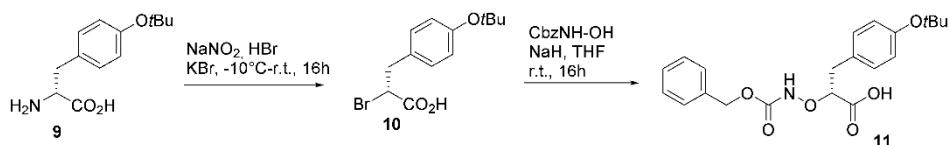
Synthesis of Cbz-^{NO}Leu-^{NO}Leu-O^tBu (8)

Hydrazine monohydrate (0.44 mL, 9.0 mmol, 3.0 eq.) was added to a solution of **5** (3.0 mmol, 1.0 eq.) in methanol (15 mL). The reaction was stirred for 1.5 h and the solvent was subsequently removed under reduced pressure. The residue was dissolved in 5% aqueous sodium carbonate solution (15 mL) and extracted with diethyl ether (3 x 20 mL). The organic layer was dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated under reduced pressure to provide the phthaloyl-deprotected monomer **6** as colorless oil which was immediately used in the next step without further purification. The phthaloyl-deprotected monomer **6** was dissolved in DCM (5 mL) and added to a stirred solution of Cbz-^{NO}Phe-OH **7** (3.0 mmol, 1.0 eq.), HOBt (486.4 mg, 3.6 mmol, 1.2 eq.) and EDC·HCl (690.1 mg, 3.6 mmol, 1.2 eq.) in dry DCM (20 mL) and the reaction was stirred overnight at room temperature. The solvent was removed under reduced pressure and the crude product was purified by flash column chromatography using hexane-ethyl acetate as eluent (gradient: 90:10 → 60:40 in 20 min) to afford the α -aminoxy dipeptide **8**.

Experimental data for compound 8

Colorless oil; yield: 1.43 g (2.68 mmol, 89%). ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 10.51 (s, 1H), 7.43 (s, 1H), 7.39-7.19 (m, 15H), 5.20-5.06 (m, 2H), 4.66-4.57 (m, 1H), 4.50-4.42 (m, 1H), 3.36-3.26 (m, 1H), 3.21-3.09 (m, 2H), 3.02-2.91 (m, 1H), 1.35 (s, 9H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 169.7, 167.3, 158.2, 136.6, 135.9, 135.0, 129.7, 129.5, 128.8, 128.8, 128.7, 128.6, 128.4, 127.1, 126.9, 87.5, 84.1, 82.5, 68.4, 37.6, 37.2, 28.0. Anal. Calcd. for C₃₀H₃₅N₂O₇ 535.2439 [M+H]⁺; found 535.2438.

Synthesis of Cbz-^{NO}Tyr(*t*Bu)-OH (**11**)



Compound **10** and **11** were synthesized according to literature protocols^{3,4} as followed: KBr (9.28 g, 78.0 mmol, 3.7 equiv.) was diluted in 0.75 M aq. HBr[†] (125 mL, 92.7 mmol, 4.4 equiv.) and cooled to -7 °C. NaNO₂ (2.76 g, 40.0 mmol, 1.9 equiv.) was then added in one portion, followed by the portionwise addition of L-tyrosin *tert*-butyl ether (5.0 g, 21.1 mmol, 1.0 equiv.) while maintaining the temperature of the reaction mixture between -7 and -4 °C. The reaction was stirred for 1.5 h and then extracted with EtOAc that had been precooled to 0 °C (3 x 200 mL). The organic layers were dried over NaSO₄ and the solvent was removed under reduced pressure to afford **10** in 78% yield as a solid compound which was used without further purification.

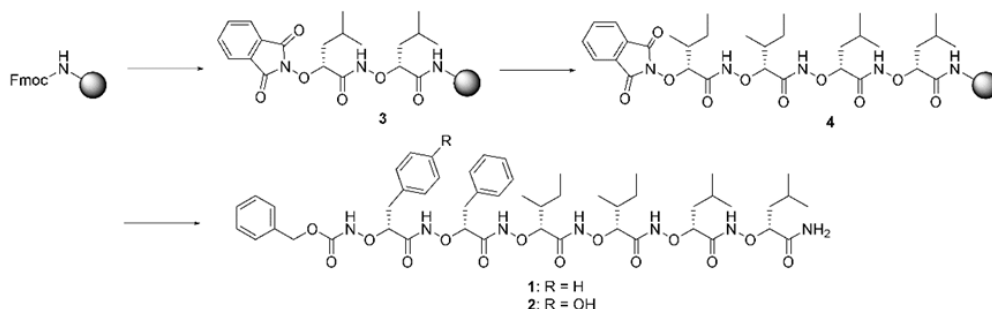
NaH (60% in mineral oil, 320.0 mg, 8.0 mmol, 2.0 equiv.) was added in small portions to a stirred solution of benzyl hydroxycarbamate (668.6 mg, 4.0 mmol, 1.0 equiv.) in THF (20 mL) at -5 °C. The resulting reaction mixture was stirred for 10 min. A solution of **10** (1.20 g, 4.0 mmol, 1.0 equiv.) in THF (3 mL) was added dropwise and the resulting reaction mixture was stirred for 15 h at room temperature. The solvent was removed under reduced pressure. The resulting precipitate was dissolved in water and acidified with 4 M HCl to pH = 2 and extracted with diethyl ether (3 x 30 mL). The organic layer was dried over NaSO₄ and the solvent was removed under reduced pressure. Next, 30 mL of diethyl ether and *N,N*-dicyclohexylamine (725.3 mg, 4.0 mmol, 1.0 equiv.) were added and the resulting precipitate was collected and washed with diethyl ether (3 x 20 mL). The precipitate was suspended in water (60 mL), the mixture was acidified with 4 M HCl to pH = 2 and extracted with ether (3 x 30 mL). The organic layer was dried over NaSO₄ and the solvent was removed under reduced pressure to give **11**.

Experimental data for compound **11**

Colorless oil; yield: 0.91 g (2.36 mmol, 59%). ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 9.24 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.47-7.29 (m, 5H), 7.21-7.00 (m, 2H), 7.01-6.79 (m, 2H), 5.16 (s, 2H), 4.56 (dd, *J* = 9.3, 3.7 Hz, 1H), 3.22 (dd, *J* = 15.0, 3.7 Hz, 1H), 3.00 (dd, *J* = 15.0, 9.3 Hz, 1H), 1.33 (s, 9H). ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 173.0, 159.1, 154.4, 134.8, 131.0, 129.9, 128.9, 128.8, 128.6, 124.3, 86.5, 78.7, 77.2, 68.75, 36.7, 29.0. Anal. Calcd. for C₂₁H₂₆NO₆ 388.1755 [M+H]⁺; found 388.1755.

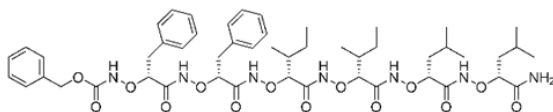
[†] Prior to the preparation of the acidic media, the concentrated HBr (48% aq.) was washed with 5% tributyl phosphate in chloroform (3 x 20 mL) to remove Br₂. Disappearance of the brown color indicates the complete removal of Br₂.

Solid-phase synthesis of α -aminoxy hexapeptides **1** and **2**

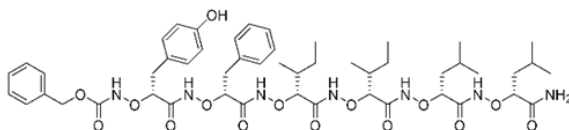


Peptide synthesis was conducted in fritted PE-syringes on a 0.2 mmol scale. After resin swelling for 60 min in DMF, the Fmoc group of the Fmoc-Rink-Amide PEG resin (loading 0.56 mmol/g) was removed by treatment with 20% piperidine in DMF (2 x 15 min, 2 ml/100 mg of resin) before the resin was sequentially washed with DMF, CH₂Cl₂, DMF (3 x 2 ml/100 mg resin, agitating for 15 sec and then drained). Then a solution of Phth-^{NO}Leu-^{NO}Leu-OH[‡] (243.7 mg, 0.6 mmol, 3.0 equiv.), BOP (265.4 mg, 0.6 mmol, 3.0 equiv.) and HOBt (81.1 mg, 0.6 mmol, 3.0 equiv.) in DMF (5 mL) was agitated for 1 min, NEM (101 μ L, 0.8 mmol, 4.0 equiv.) was added and this solution was added to the resin. The amide coupling was performed for 24 h at room temperature. Afterwards, the resin was sequentially washed with DMF, CH₂Cl₂ and DMF. Then, the phthaloyl group was removed by treatment with 5% hydrazine monohydrate in methanol for 15 min (2x) and the resin was sequentially washed with DMF, MeOH, CH₂Cl₂ and DMF. A subsequent amide coupling reaction with Phth-^{NO}Ile-^{NO}Ile-OH[‡] (243.7 mg, 0.6 mmol, 3.0 equiv.) in the presence of the BOP/HOBt/NEM coupling system provided the resin-bound α -aminoxy tetrapeptide **4**. The resin-bound target compound **1** was prepared starting from compound **4** by an additional cycle of phthaloyl-deprotection and amide coupling reaction with the α -aminoxy dipeptide acid Cbz-^{NO}Phe-^{NO}Phe-OH[‡] (284.7 mg, 0.6 mmol, 3 equiv.). In the case of compound **2** the final two α -aminoxy acids Phth-^{NO}Phe-OH (186.8 mg, 0.6 mmol, 3 equiv.) and Cbz-^{NO}Tyr(*t*Bu)-OH (232.4 mg, 0.6 mmol, 3 equiv.) were coupled as monomeric building blocks to the resin-bound tetrapeptide **4** by two iterative cycles of phthaloyl deprotection, amide coupling reaction and washing cycles. In both cases the final washing was achieved with CH₂Cl₂ before the crude products were cleaved from the resin by treatment with TFA/TES (98:2, v/v, 2 ml/100 mg of resin) for 1.5 h. The filtrates were concentrated in a stream of nitrogen to a volume <1 ml, and the crude products were precipitated with cold diethyl ether, centrifugated and the diethyl ether was discarded. This procedure was repeated twice to obtain the crude peptides **1** and **2**. For semipreparative purification the crude peptides were re-dissolved in acetonitrile and purified on a *MN Nucleosil* C8 RP-HPLC column (VP 250/10 Nucleosil 100-5 C8ec) at a flow rate of 4 mL/min. Fractions containing only the desired peptide were collected and lyophilized from HPLC solvents yielding the purified peptides in >95% purity in both cases.

[‡] Free carboxylic acids were prepared immediately before use from their respective *t*Bu protected aminoxy acids or dipeptides by treatment with TFA/DCM (1:1, v/v, 10 mL / 0.5 mmol) for 1 h at room temperature. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was azeotroped with toluene twice to give the free acid in quantitative yields.

Characterization data for compound 1 and 2**Cbz-^{NO}Phe-^{NO}Phe-^{NO}Ile-^{NO}Ile-^{NO}Leu-^{NO}Leu-NH₂ (1)**

Colorless solid; 39% yield; 96.2% purity as determined by HPLC (50% B → 100% B in 40 min, 1mL/min)
 $t_R = 18.44$ min; HRMS (ESI): m/z calcd. for C₅₀H₇₁N₇O₁₄ [M+H]⁺ 994.5132, found 994.5140.

Cbz-^{NO}Tyr-^{NO}Phe-^{NO}Ile-^{NO}Ile-^{NO}Leu-^{NO}Leu-NH₂ (2)

Colorless solid; 30% yield; 97.8% purity as determined by HPLC (50% B → 100% B in 40 min, 1mL/min)
 $t_R = 15.75$ min; HRMS (ESI): m/z calcd. for C₅₀H₇₂N₇O₁₅ [M+H]⁺ 1010.5081, found 1010.5090.

2. References

- [1] D. Yang, B. Li, F.-F. Ng, Y.-L. Yan, J. Qu and Y.-D. Wu, *J. Org. Chem.*, 2001, **66**, 7303.
- [2] D. Diedrich, A. J. R Moita, A. Rütger, B. Frieg, G. J. Reiss, A. Hoepfner, T. Kurz, H. Gohlke, S. Lüdeke, M. U. Kassack and F. K. Hansen, *Chem. Eur. J.*, 2016, doi:10.1002/chem.201602521
- [3] (a) B. Draghici, F. K. Hansen, A.-M. Buciumas, B. E.-D. M. El-Gendy, E. Todadze and A. R. Katritzky, *RSC Adv.*, 2011, **1**, 602. (b) A. Katritzky, A. Ilker and S. R. Tala, *J. Org. Chem.*, 2009, **74**, 8690.
- [4] A. J. Souers, S. Schürer, H. Kwack, A. A. Virgilio, J. A. Ellman, *Synthesis*, 1999, **4**, 583-585.

Supplemental Note 2

Methods

Autodisplay dimerization assay

Surface display of HSP90 on *E. coli* BL21 (DE3) cells was performed as described before¹. Cells were washed three times and suspended in PBS to a final OD₆₀₀ = 0.35 in a final volume of 50 µl. Cells were incubated for 15 min either with or without addition of the respective compounds. Cells were then again washed three times with PBS containing 0.1 % Tween-20 to avoid unspecific binding. Subsequently, FITC labeled p53 was added to the cells in a final concentration of 1 µM. Cells were incubated for 1 h in the dark at RT, and again were washed three times with filter sterilized PBS containing 0.1 % Tween-20. *E. coli* cells without displaying a passenger were used as control and were treated the same. Cellular mean fluorescence was measured with a FACS Aria III (BD, Heidelberg), using 488 nm as excitation wavelength, 530 nm for detection, and filter-sterilized PBS as sheath fluid as described before.¹ For each sample, at least 50,000 events were counted using a flow rate of 1000 events per second.

Microscale Thermophoresis (MST)

The HSP90 CTD was purified as described before² and labeled with the Monolith NT™ Protein Labeling Kit RED-NHS (Amine reactive) of NanoTemper (NanoTemper Technologies GmbH, München, Germany) according to the manufacturer's protocol. The determination of the apparent K_D values of HSP90 CTD and **1** and **2** were performed by using a constant amount of 50 nM of labeled HSP90 CTD in PBS including 0.5 % BSA and 0.1 % Tween-20 and addition of 10 µl **1** or **2** in different concentrations ranging from 30 nM to 500 µM. These mixtures were incubated for 15 min at RT in the dark. Subsequently, thermophoresis of each concentration was measured using the Monolith NT.115 (NanoTemper Technologies GmbH, München, Germany)³. Each measurement was performed at 25 °C for 25 s at 90 % LED power and 40 % infrared laser power. The measurement was repeated three times independently for each sample. Fluorescence of each measurement was normalized and plotted against the different concentrations of the titrant. K_D Fit formula $Y = E + (A - E) / 2 * (T + x + K_D - \sqrt{(T + x + K_D)^2 - 4 * T * x})$ was used to calculate the apparent K_D value using the GraphPad Prism software (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA, USA). The concentration value for the labelled CTD protein was set to 50 nM for determining the apparent K_D of HSP90 CTD with respect to **1** and **2**.

Analytical ultracentrifugation

Sedimentation velocity experiments were carried out using a Beckman ProteomeLab XL-A ultracentrifuge (Beckman Coulter, Inc., Indianapolis, INUS) equipped with an absorbance detection system and an eight-hole rotor. HSP90 CTD and ligand were dissolved in 20 mM NaPi, 50 mM KCl

with 8 % DMSO (pH 8.0) as vehicle. Solutions of 20 μM HSP90 CTD treated with (27.4 μM or 54.8 μM) **1** and the control sample (20 μM HSP90 CTD alone) were loaded into 12-mm double-sector aluminum cells with quartz glass windows, respectively. All samples were analyzed at 50,000 rpm at 20°C. Protein samples were monitored by UV absorbance at 280 nm in continuous mode with a time interval of 360 s and a step size of 0.002 cm. Recorded data were evaluated with Sedfit (version 15.01b) using the continuous $c(s)$ distribution model⁴. A minimization of the rmsd value was achieved by alternated and repeated fitting based on either a Simplex algorithm or Marquardt Levenberg. The resolution in s value was set to 0.05 S. The chosen F-ratio was 0.95. As a final step meniscus as well as bottom positions had been floated. The partial specific volume of HSP90 CTD was calculated using Sednterp (version 20130813BETA)⁵. The influence of DMSO on the density and viscosity of the buffer had been experimentally determined in a densitometer and a viscometer, respectively. The following parameters were used for the fitting procedures: density $\rho = 1.03945$ g/cm³; viscosity $\eta = 1.278$ cP; partial specific volume $v = 0.7302$ cm³/g⁶. Graphical outputs were generated by GUSSI (version 1.2.1)⁷. The final sedimentation coefficient values (s -values) were corrected to the s -values in water at 20 °C ($s_{20,w}$ -values).

The major peak of HSP90 CTD samples in the absence of **1** as well as in the presence of 27.4 μM and 54.8 μM **1** has an s -value of 3.27 S. This s -value species most probably represents the HSP90 CTD dimer. A monomer cannot sediment with 3.27 S even if it has a near spherical shape, and can therefore be excluded. Applying the molecular scaling law

$$\left(\frac{M}{N_A}\right)^{2/3} = \frac{s \cdot f/f_0}{1 - v\rho} 6\pi\eta \left(\frac{3v}{4\pi}\right)^{1/3}$$

(M molecular mass, N_A Avogadro's number, s sedimentation coefficient, v partial specific volume, ρ density, η viscosity) in order to calculate the mass of the sedimenting species based on an $s_{20,w}$ value of 3.27 S and a weight-average frictional ratio f/f_0 of 1.30 leads to a mass of 42.196 g/mol, which is in perfect agreement with the expected mass of a dimer (42.660 g/mol). Aside from this dimer with 3.27 S, about 60 % of oligomers with s -values between 4 and 9 S were detected in samples without **1**. Analytical techniques such as PAGE, size exclusion chromatography, and analytical ultracentrifugation previously indicated that both HSP90^{8,9} and isolated CTD^{9,10} can exist as higher oligomers than dimers. Furthermore, recombinant CTD carrying a C-terminal His-tag, as in our case, was shown to form tetramers¹¹. However, while the dimerization interface of human HSP90 was mapped to amino acids 660-696^{2,8}, no study has yet resolved the interaction site for higher oligomer formation in the CTD. Upon addition of **1**, these larger oligomers disappear in a concentration-dependent manner, while the amount of the 3.27 S species increases. This demonstrates that the ligand is able to either dissociate oligomeric species or suppress HSP90 CTD oligomerization.

Luciferase refolding assay

Luciferase assay was performed with K562 cells, stably expressing (transduced) luciferase-transgene, as described in¹² with some modifications. Briefly, cells were resuspended in pre-warmed (50°C) media. After optimization, 3 min of heat shock was sufficient to denature the endogenous luciferase activity, however insufficient to affect the viability of the cells. Later 50000 cells / well were seeded in white plates at 37°C in the presence of **1**, **2**, NB (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) or AUY922 (Selleckchem.com, Houston, TX, USA) to allow refolding of denatured luciferase. After 180 min, luciferase activity was measured by addition of luciferin (Promega) and read out was performed using a luminometer (integration 0.1 sec/well). Inhibition with the compounds was calculated using GraphPad Prism software (GraphPad Software).

DARTS

Ligand binding to a target protein can result in conformational changes that lead to a stabilization against proteolytic lysis by dropping the sensitivity to proteases. Drug Affinity Responsive Target Stability (DARTS) assay was carried to evaluate the protease protection of **1** from thermolysin, described in¹². Briefly, 1 µg of recombinant HSP90α was incubated on ice for 15 min with 25 µM of **1**, NB, AUY922 and DMSO. After incubation, the samples were treated with thermolysin (1:50 of protein) for 5 min. The reaction was stopped by addition of 50 mM EDTA and later examined by immunoblot analysis using anti-HSP90α antibody.

Western blotting (WB)

Cell lysates were generated after 48 h treatment of leukemic cells with **1**, IB, NB or AUY922. Immunoblot analysis was performed by following standard protocol using antibodies: anti-Hsp90, anti-Hsp70, anti-Hsp40, anti-Hsp27, anti-HSF-1, anti-Hsp60, anti-PDI, anti-Hsp90α, anti-Hsp90β, anti-c-Abl, anti-phospho-c-Abl (T245), antiStat5a, anti-pStat5a (T694), anti-pCrkl (T207), anti-Crkl, anti-Akt, anti-pAkt (S473), anti-pS6, anti-S6, anti-cMyc (Cell Signaling Technology, Danvers, MA), anti-pAkt (T308), anti-Bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology, TX, USA) & β-actin (Sigma-Aldrich).

Blue-native gels

Blue-native gels were performed following manufacturer's instructions (Invitrogen) and as described in¹². Briefly, lysates were generated after 48 h treatment with **1** using NativePAGE Sample Prep kit (Invitrogen) by 2-3 freezing thawing cycles followed by centrifugation at 20,000 x g for 25-30 min 4 °C. Protein concentration was determined by Dye reagent (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) and subsequently equal amount of protein (25 - 30 µg) was loaded on Native PAGE 3 12% Bis - tris gel (Invitrogen) and electrophoresed using NativePAGE running buffer (Invitrogen) following supplier's guidelines.

Molecular dynamics simulations and computation of effective binding energies

We used molecular dynamics (MD) simulations of free diffusion of **1** in the presence of the C-terminal domain (CTD) of HSP90 to provide structural insights how **1** binds to this domain. **1** was designed to mimic hotspot residues² within the dimerization interface of the CTD. We used a monomeric CTD model (sequence E527 – G697; extracted from the crystal structure¹³) rather than a full-length HSP90 structure in our MD simulations in order to focus the computational time available on sampling of **1** configurations around the CTD. We evaluated the structural stability of this model by, first, calculating the protein backbone root mean square-deviation (RMSD) with respect to the crystal structure¹³. Second, we calculated the angle η as a measure of helix H5 orientation; H5 is part of the dimerization interface¹³. η is the average angle between the vector along H5 during 0.4 μ s of MD simulations and the vector along H5 in the crystal structure¹³. See next chapter for details. All results are summarized in **Supplementary Fig. 1**.

Initially, we performed 8×400 ns of unbiased MD simulations of **1** diffusion in the presence of the HSP90 CTD. The backbone RMSD increases up to ~ 11 Å with mean RMSD values > 4 Å, indicating distinct structural deviations relative to the crystal structure, in particular in regions where the adjacent middle domain is missing. Additionally, η increases up to 33° , indicating a reorientation of H5 towards helix H4 in the dimerization interface, that way narrowing the space between the two helices. A plausible explanation is that the CTD in the crystal structure¹³ is stabilized by the middle domain and/or the CTD of the adjacent subunit. This explanation is supported by backbone RMSD values of the CTD dimer being generally smaller² than the backbone RMSD values found here for the CTD monomer.

Next, we performed 8×400 ns of unbiased MD simulations of **1** diffusion in the presence of the HSP90 MD/CTD structure (sequence K294 – G697; extracted from the crystal structure¹³). Here, the backbone RMSD of the CTD is < 6 Å, indicating a partial stabilization of the CTD. This is in line with our suggestion that the middle domain likely stabilizes the CTD. However, similar to the CTD alone, η increases up to 30° .

Finally, we performed 8×400 ns MD simulations of **1** diffusion in the presence of the HSP90 CTD restraining all backbone atoms by harmonic potentials, that way mimicking the stabilizing influence of the presence of the MD and another CTD. During 400 ns of MD simulations, the backbone RMSD of the CTD is < 2 Å, revealing only small structural changes. Furthermore, η remains $< 7^\circ$, indicating that H5 barely moves to H4. This setup was thus used to investigate binding of **1** to the CTD by free ligand diffusion.

Molecular dynamics simulations

This method was successfully applied to investigate ligand binding by us^{14,15} and others¹⁶⁻¹⁸. As to HSP90, coordinates are available from the Protein Data Bank¹⁹ (PDB entry 3Q6M¹³). We extracted a structure that contains the middle domain and CTD (sequence K294 – D699; using the numbering

of HSP90 in the crystal structure¹³), which we further refer to as the middle domain – CTD structure (MD/CTD structure). Additionally, we extracted only a CTD from the crystal structure¹³ (sequence Glu527 – Gly697), which we further refer to as the CTD structure. Both protein structures were subsequently prepared using the *protein preparation wizard*²⁰ available in the *Maestro* suite of programs²¹. First, we added amino acids that were not resolved in the crystal structure (sequence A615 – A628). Second, we assigned H633, H684 to the HID state and H640 to the HIE state. Third, we attached acetyl and *N*-methyl cap groups to the N- and C-terminal ends of the protein structures. Finally, hydrogen atoms were added to the protein structure. As to **1**, the molecule was generated according to the structural formula in **Fig. 1d**. The 3D structure was subjected to a quantum mechanical geometry optimization at the HF/631G* level. Calculations were conducted with Gaussian 09²². HF/6-31G* optimized structure was later used as initial structure for MD simulations.

To provide a structural model of the binding mode of **1** at the HSP90 CTD, we performed 60 MD simulations of at least 0.4 μ s length of free diffusion of **1** in the presence of the CTD. We randomly placed **1** and the CTD structure, leaving at least 10 Å between any atoms in **1** and the protein structure, by using *PACKMOL*²³. These structures were solvated by TIP3P water²⁴, leaving at least 11 Å between the solute and the edge of the box, using the *LEaP* program in Amber 14²⁵, resulting in concentrations of **1** in the mM range. We added sodium counter ions (Na⁺) to enforce neutrality of the systems. Following this procedure, we generated 60 different starting structures in total (**Supplementary Fig. 9a**). Analogously, we prepared eight different starting structures that contain one **1** molecule and one HSP90 MD/CTD structure.

Atomic partial charges for **1** were derived according to the restraint electrostatic potential fit (RESP) procedure²⁶ using Gaussian 09²². Force field parameters for **1** were taken from the general amber force field (gaff)²⁷, as used previously²⁸. As to Na⁺, we used ion parameters described by Joung and Cheatham²⁹. All other partial charges and force field parameters were taken from the ff14SB force field³⁰. Both gaff²⁷ and ff14SB³⁰ force fields are available in Amber 14²⁵. For subsequent MD simulations, we used a slightly modified simulation protocol as described in ref.^{28,31}. The overall minimization, thermalization, and density adaptation scheme is adapted from ref.^{28,31}. Here, we kept the protein backbone fixed during the whole equilibration procedure (force constant of 5 kcal·mol⁻¹·Å⁻²). As control, we also performed a free equilibration by gradually removing all positional restraints. These simulations are explicitly mentioned in the text (see details in Suppl. Notes “Model validation”). Note that during all MD simulations **1** was not biased by any guiding force.

All production NVT-MD simulations were conducted at 300 K for at least 0.4 μ s with positional restraints (force constant of 5 kcal·mol⁻¹·Å⁻²) applied to all protein backbone atoms, if not reported differently. Coordinates were saved in a trajectory file every 20 ps. The particle mesh Ewald (PME) method^{32,33} was applied to treat long-range electrostatic interactions. We used the SHAKE algorithm³⁴ for all bonds involving hydrogen atoms. This allows one using a 2 fs time step for integrating Newton's equations of motion. All minimization, thermalization, and production

calculations were performed with the *pmemd.cuda* module³⁵ in Amber 14²⁵. We analyzed the MD trajectories using *cpptraj*³⁶ of AmberTools 14. During the model validation procedure, the trajectories were analyzed with respect to the protein root mean square-deviation (RMSD) relative to the crystal structure, as a measure of the structural similarity. Further, we calculated the angle η as a measure of helix H5 orientation; H5 is part of the dimerization interface¹³. η is the average angle between the vector along H5 during 0.4 μ s of MD simulations and the vector along H5 in the crystal structure¹³ after superimposing conformations of the CTD extracted from the MD simulations onto the crystal structure. The vector along H5 is defined by the backbone centers of mass (COM) of the amino acids (Pro681 – His684) and (Ile692 – Gly695) located at the termini of H5.

To investigate **1** binding to the CTD, we calculated the distance between the COM of **1** and COM of the helix H4 backbone, which is part of the CTD dimerization interface¹³. As **1** was designed to mimic hotspots¹³ on helix H5' of the adjacent subunit, distances are expressed as relative distances (ΔD) with respect to the distance between the backbone COMs of helices H4 and H5' in the crystal structure¹³. We considered **1** bound to the CTD interface if it is at least as close as or closer to helix H4 than helix H5' ($\Delta D < 0$). To elucidate how **1** binds to the CTD, we extracted a representative conformation from the MD trajectories after superimposing the CTD onto the crystal structure.

Computation of effective binding energies

Effective binding energies ($\Delta G_{\text{effective}}$), i.e., the sum of gas-phase energies plus solvation free energies, for **1** binding to the CTD structure were calculated by the molecular mechanics generalized Born surface area (MM-GBSA) approach³⁷. MM-GBSA calculations were performed employing the “single trajectory approach”, in which snapshots of complex (CTD/**1**), receptor (CTD), and ligand (**1**) are obtained from 60 MD trajectories of free ligand diffusion. 400 snapshots were extracted in 1 ns intervals from each trajectory. Additionally, we extracted the conformations that showed the smallest relative distance (ΔD_{min}) between **1** and helix H4 during MD simulations. Prior to the MM-GBSA computations, counter ions and water molecules were stripped from the snapshots. The computations were performed with the *mm_pbsa.pl* module available in Amber 14²⁵. Gas phase energies were computed based on the gaff²⁷ (**1**) and ff14SB³⁰ (CTD) force fields. Polar contributions to solvation free energy were computed at 100 mM ionic strength using Onufriev's GB model³⁸ for a dielectric constant of 1 (solute) and 80 (solvent), together with Parse radii³⁹. To avoid introducing additional uncertainty in the calculations, changes in the configurational entropy upon **1** binding to the CTD were not considered^{37,40}.

Proliferation assay

Cell proliferation was examined after treatment using automated cell counter using trypan exclusion method (Vi-CELL™ XR -Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA), after 24 h interval.

Viability assay

Cells were seeded in white 96-well plate with increasing concentration (100 nm – 20 µM) of inhibitors and respective controls for 48 h. Cell viability was monitored using Celltitre Glo luminescent assay (based on the ATP quantification), following manufacturer's guidelines (Promega). IC₅₀ for compounds were determined by plotting raw data (normalized to controls) using sigmoid dose curve and non-linear regression (GraphPad).

Cell cycle assay

1 or NB treated cells (48 h) were fixed with chilled (70%) ethanol for 24 h to allow the access of propidium iodide (PI) to the DNA. Fixed cells were treated with ribonuclease to digest RNA and later incubated with 200 µl PI (50 µg/ml stock) for 10 min at 37 °C and immediately subjected to FACS analysis.

Annexin V staining

For evaluating apoptosis, 48 h (with **1** or NB) treated cells were stained with Annexin V and PI and later subjected to FACS, following supplier guidelines (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Caspase 3/7 Glo assay

Cells were treated with **1** or NB for 48 h in white 96 well plates. Later enzymatic activity of caspase 3/7 was examined by using caspase 3/7 dependent Glo assay (absorbance at 405 nm), following manufacturer's instructions (Promega)

FACS

Fluorescence activated cell sorting (FACS) was performed on FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) by using fluorochrome coupled monoclonal antibodies (mAbs) along with matched isotype controls: anti-CD34 (8G12; BD Biosciences), anti-CD11b (Bear1; Beckman Coulter), anti-CD14 (RMO52; Beckman Coulter), anti-CD33 (Miltenyi Biotec) & anti-CD13 (Beckman Coulter).

CFU assay

CFU activity was examined by plating **1**, NB (Sigma-Aldrich), AUY922 or ponatinib (Selleckchem) treated cells for 48 h in methylcellulose medium (Methocult H4100 StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada) supplemented with (Peprotech, Hamburg, Germany) 50 ng/ml SCF, 10 ng/ml IL-3, 10 ng/ml G-CSF, 10 ng/ml GM-CSF and 3 U/ml erythropoietin (ebiosciences, San Diego, CA, USA).⁴¹ Colonies were counted after 14 days (n=3).

Supplemental Figures

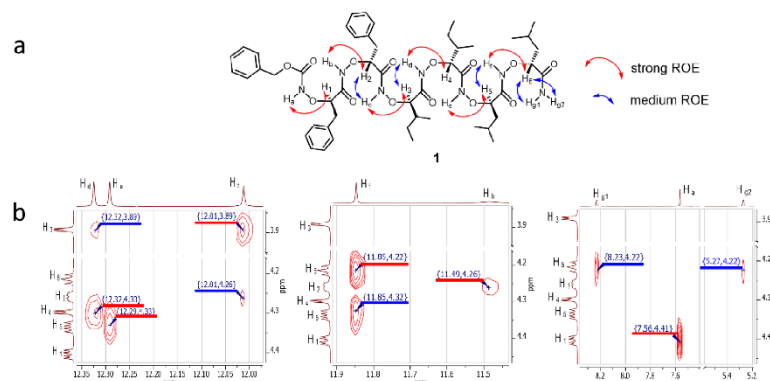


Figure S1: (a) α -Aminoxy peptide **1** folds into a 2_8 -helical conformation consisting of repetitive α N-O turns. A typical α N-O turn is characterized by a ROE pattern in which the aminoxy proton shows a strong ROE to its own α -methine proton and a weaker ROE cross-peak to the neighboring backbone methine proton. (a) Key ROEs observed in the 2D-ROESY spectrum of **1**. (b) Expansions of important ROE cross peaks (see Supplementary Note 1 for full 2D ROESY spectrum of **1** in CDCl_3).

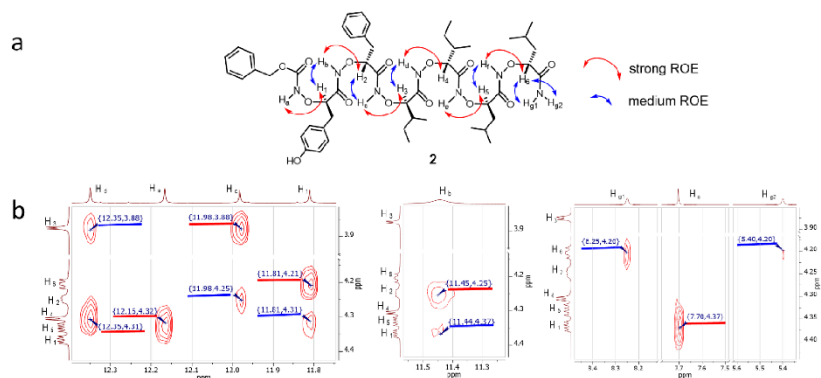


Figure S2: (a) α -Aminoxy peptide **2** folds into a 2_8 -helical conformation consisting of repetitive α N-O turns. A typical α N-O turn is characterized by a ROE pattern in which the aminoxy proton shows a strong ROE to its own α -methine proton and a weaker ROE cross-peak to the neighboring backbone methine proton. (a) Key ROEs observed in the 2D-ROESY spectrum of **2**. (b) Expansions of important ROE cross peaks (see Supplementary Note 1 for full 2D ROESY spectrum of **2** in CDCl_3).

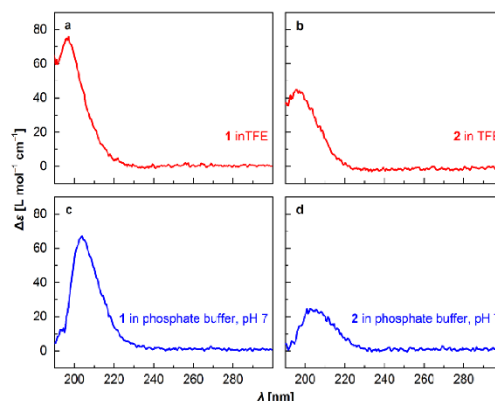


Figure S3: Circular dichroism (CD) spectra of **1** (left panel) and **2** (right panel). In the organic solvent trifluoroethanol (TFE) a characteristic CD band at 196 nm is present both for **1** (a) and **2** (b) indicating 2_8 -helix conformation. In sodium phosphate buffer (1 mM, pH 7) the maximum is slightly red shifted (c and d) being in accordance with previous observations for CD spectra of α -aminoxy peptides with similar conformation⁴².

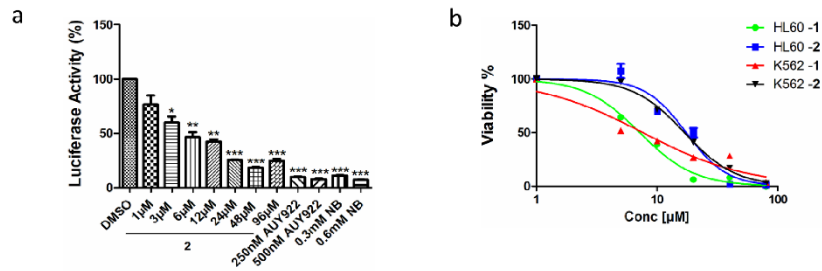


Figure S4: Selective binding of 1 and 2 to HSP90. (a) Cell based HSP90 dependent luciferase assay was performed K562-Luciferase (stably) expressing cells. The extent of thermally denatured luciferase refolding (3 min at 50 °C) in the presence of 2, NB and AUY922 was monitored after 180 min. Columns depicts the mean of 3 independent experiments (n=3). (b) Viability assay of the leukemic cell lines K562 and HL60 were carried out using Celltitre Glo assay (promega) and later 1 (IC₅₀ - 5.72 ± 0.31 µM - K562; 7.1 ± 1.7 µM - HL60) was selected on the basis of its enhanced potency as compared to 2 (IC₅₀ - 16.8 ± 0.11 µM - K562; 17.4 ± 0.4 µM - HL60). Significance analyses of normally distributed data with variance similar between groups used paired, two-tailed Student's t-test. * < P 0.05, ** < P 0.005, *** < P 0.001.

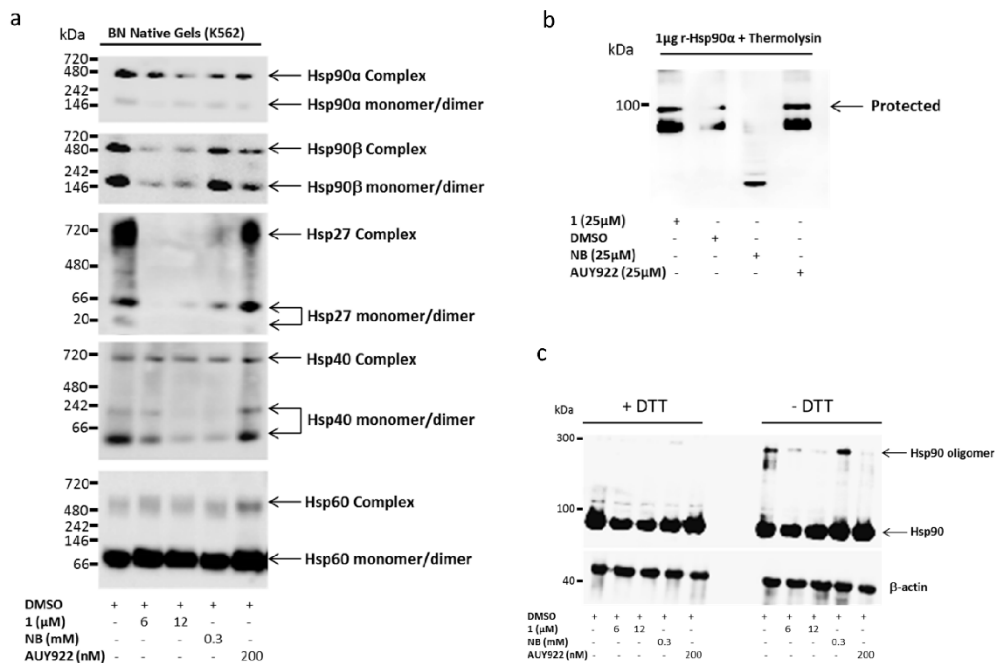


Figure S5: Functional specificity of 1 to HSP90. (a) Native HSP90 complexes in K562 were identified by running Blue-Native gels followed by immunoblotting. Application of cytotoxic concentration of 1 to K562 cells resulted in the potent disruption of HSP90α, HSP90β, HSP40 and HSP27 complexes and monomers/dimers. Addition of AUY922 resulted in the elevated expression of HSR associated protein complexes as well as monomers/dimers (HSP40 & HSP27), whereas HSP60 served as loading controls showing relative equal loading. (b) After treating K562 cells with 1, NB or AUY922 for 48 h, lysates were generated with or without DTT and subjected to immunoblotting using anti-HSP90 antibody. An additional HSP90 oligomer band appeared in lysates without DTT. (c) DARTS was used to evaluate the specificity of 1 to HSP90. Recombinant HSP90α (1 µg) was incubated with 25 µM 1, NB and AUY922, respectively, followed by digestion with thermolysin. Treated samples were electrophoresed (SDS-PAGE) and immunoblotted with anti-HSP90α for detecting protection of HSP90 protein by 1 (upper band is protected from proteolysis). Digestion of recombinant HSP90α was not protected by NB. This could have been due to low affinity of NB to HSP90 at this concentration (25 µM).

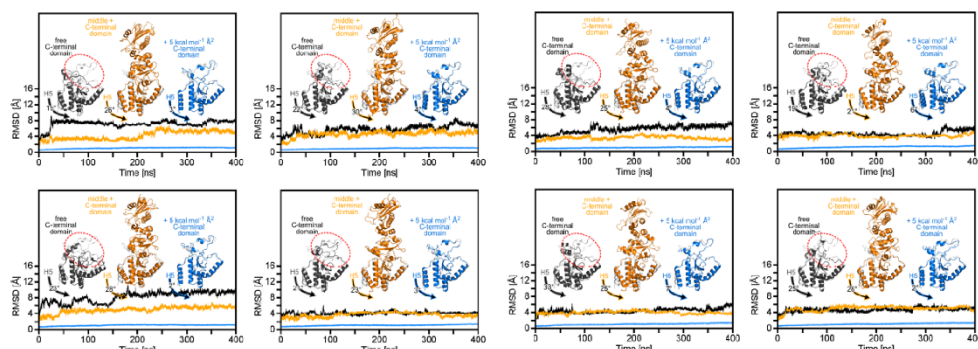


Figure S6: Validation of the model of the monomeric C-terminal domain. Backbone RMSD of the C-terminal domain (CTD) relative to the crystal structure (extracted from PDB code 3Q6M¹³) during eight MD simulations of 400 ns length. The black lines show results for unbiased MD simulations, the blue lines for MD simulations with positional restraints of 5 kcal mol⁻¹ Å² applied to all backbone atoms, and the orange lines for a MD/CTD structure (here only CTD residues were considered for RMSD calculations). The structures in the respective panels, shown in cartoon representation, were extracted from the trajectories after 400 ns and superimposed onto the CTD of the crystal structure¹³. The arrows depict the helix H5 movement, the labels on these arrows the average angle η (see Methods section for definition), and the red circles those areas, where distinct structural deviations, relative to the crystal structure¹³, were observed during the MD simulations.

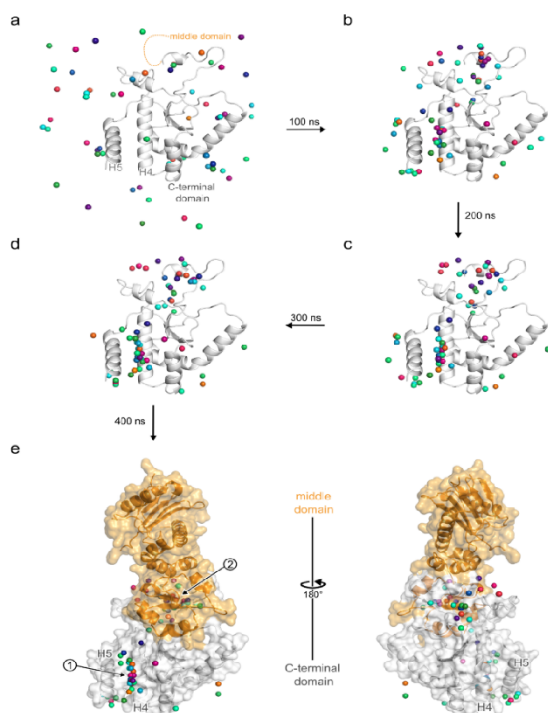


Figure S7: Results of MD simulations of free ligand diffusion. (a) The 60 starting configurations of **1** used for 60 individual MD simulations of free ligand diffusion after superimposition of the C-terminal domain (CTD). The dashed line indicates where the middle domain would be located. (b – e): Locations of **1** after 100 ns (b), 200 ns (c), 300 ns (d), and 400 ns (e) each of 60 MD simulations of free **1** diffusion. ① and ② depict the most frequently populated binding sites of **1**. In (a – e), for clarity reasons, only the center of mass of **1** is shown as spheres, colored differently for each MD simulation. The protein structure is shown in white cartoon representation. In (e), a middle domain-CTD part of HSP90 is additionally shown in orange (middle domain) and white (CTD) surface representation (in the right panel the structure is rotated by 180° around the y-axis; extracted from PDB code 3Q6M¹³).

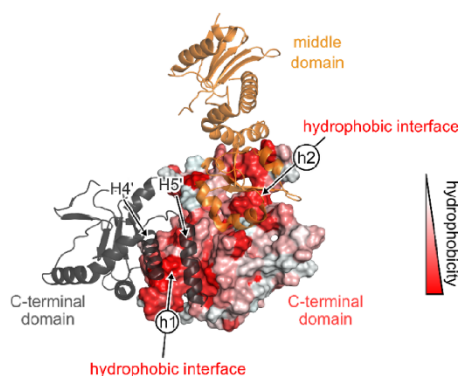


Figure S8: Hydrophobic interfaces in HSP90. CTD and one middle domain of HSP90 (extracted from PDB code 3Q6M¹³). The CTD used for MD simulations is shown in surface representation colored according to the hydrophobicity spectrum. The adjacent CTD in the crystal structure is shown in black cartoon, with helices H4' and H5' as part of the dimerization interface, and the middle domain in orange cartoon representation. (h1) and (h2) show the identified hydrophobic interfaces on the protein surface.

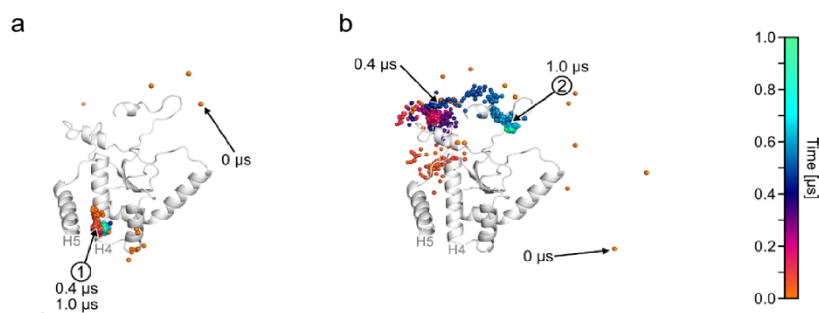


Figure S9: Traces of compound 1 movement during MD simulations. Traces of **1** in two MD simulations of 1 μ s length in which **1** binds to the dimerization interface of the C-terminal domain (CTD) (binding site ①, (a)) or to the interface between the middle domain and the CTD (binding site ②, (b)). The centers of mass of **1** are depicted as spheres colored according to the elapsed time (see scale on the right). For clarity reasons only the initial structures of the CTD and conformations of **1** extracted in 1 ns intervals from the MD trajectories are shown. Arrows depict positions of **1** after 0 μ s, 0.4 μ s, and 1.0 μ s.

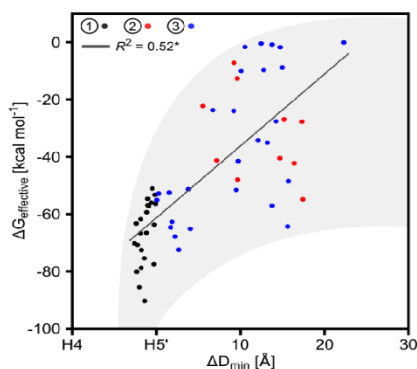


Figure S10: Correlation between effective binding energy and minimal distance. Effective energies ($\Delta G_{\text{effective}}$) were calculated for **1** binding to the HSP90 C-terminal domain, for configurations at the minimal relative distance (ΔD_{min}) between **1** and helix H4 during 60 MD simulations of 400 ns length. Black points show results for **1** binding to interface ①, red for interface ②, and blue for ③ (see main text and Fig. 2a-c for definition). The gray background represents the binding funnel that gets narrow close to binding site ①. In the legend, R^2 depicts the coefficient of determination including all data points (dark gray line), with $p < 0.01$ (*).

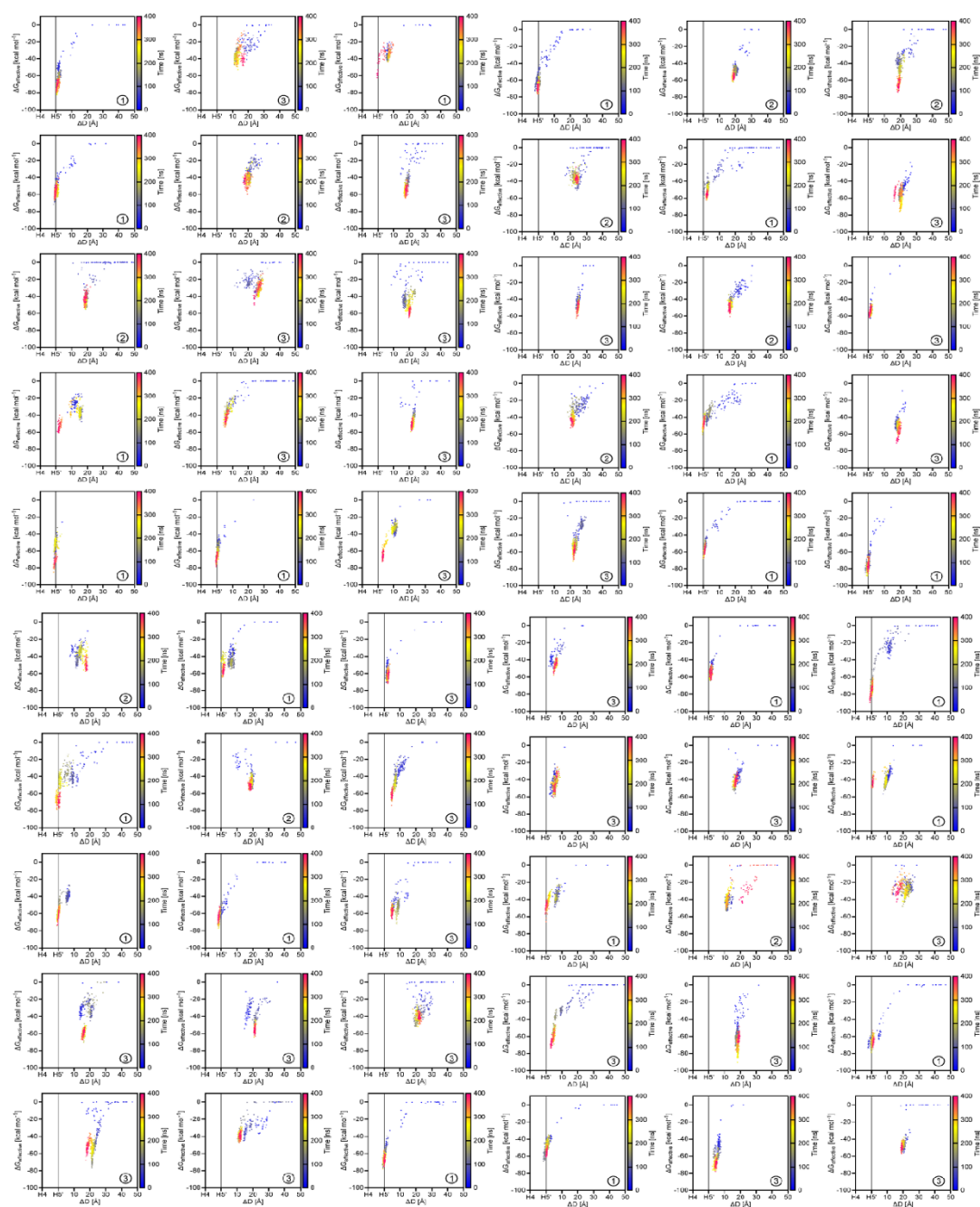


Figure S11: Relative distances and effective energies of 1 binding to HSP90. Calculated effective binding energies ($\Delta G_{\text{effective}}$) for 60 MD trajectories, plotted against the relative distance (ΔD ; see Methods section for definition) between 1 and helix H4. The plots are colored according to the elapsed time (see scale on the right of each panel). The gray line at $\Delta D = H5' (= 0 \text{ \AA})$ shows the location of helix H5' relative to helix H4 in the crystal structure¹³. The labels ①, ②, and ③ in the lower right corner depict the interfaces to which 1 is bound after 400 ns of MD simulations.

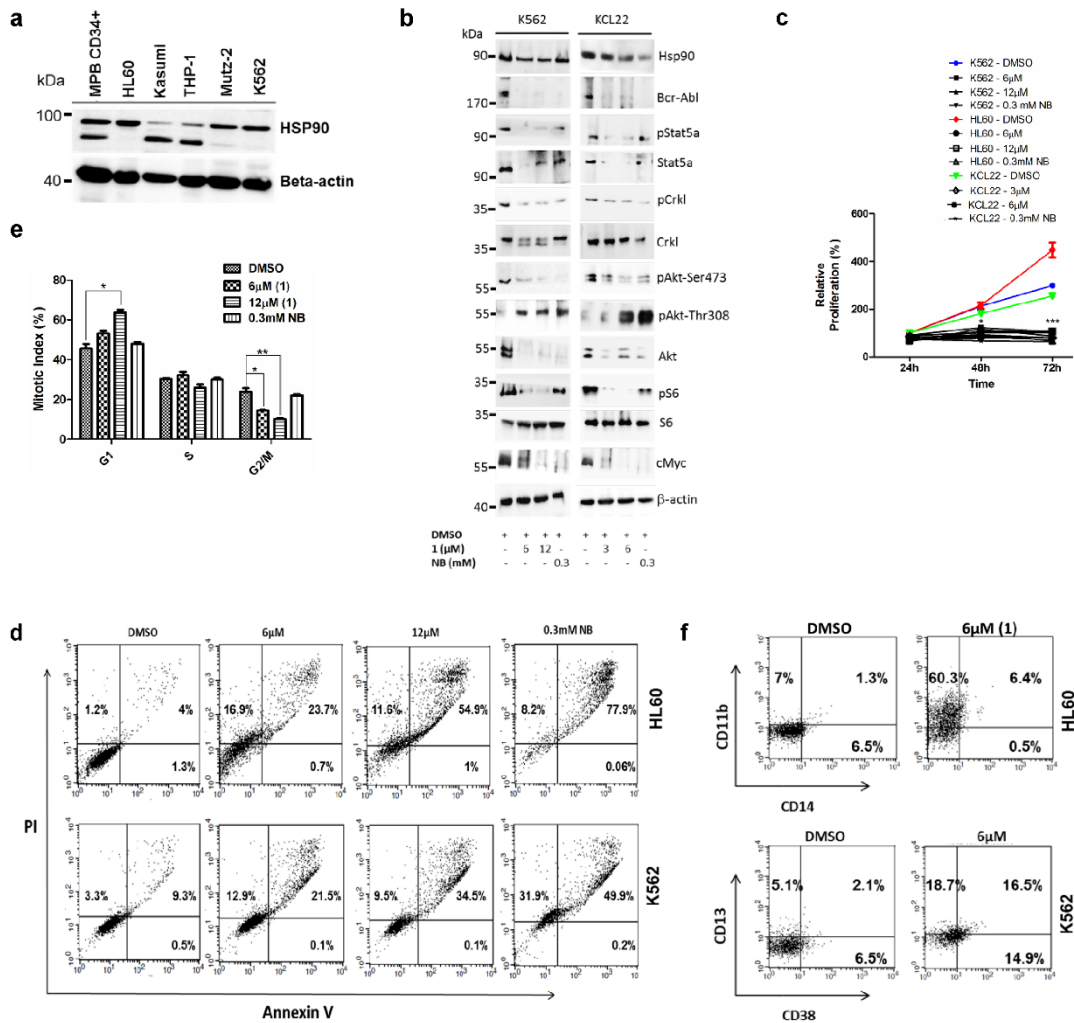


Figure S12: 1 as a potent inhibitor in leukemic cell line models without inducing any HSR. (a) Expression of HSP90 in leukemic cell line models (HL60, Kasumi, THP-1, Mutz-2 and K562) and in mobilized peripheral blood (MPB) derived CD34+ cells. **(b)** Treatment of K562 & KCL22 with **1**, NB & respective controls (DMSO) for 48h, resulted in the downregulation of BCR-ABL1 and subsequently downstream signaling pathways including pStat5a, pCrkl, pAkt (Ser473), pS6 (mTOR) and cMyc. **(c)** K562, KCL22 and HL60 (Mutz-2 - data not shown) were treated with the indicated concentration of **1** and viable cells were counted at 24h, 48h and 72h (n=3). **(d)** K562 and HL60 cells (Mutz-2 - data not shown) were treated with the indicated concentration of **1** for 48h and later dually stained with annexin V/PI and consequently measured by FACS where viable cells (-ve for annexin V/PI) were compared to necrotic (+ve for PI) and early (+ve for annexin V) or late (+ve for both annexin/PI) apoptotic stage. **(e)** K562 cells were treated with **1** for 48h and were subjected to cell cycle analysis using FACS (PI staining). **(f)** HL60 & K562 cells were treated with **1** for 72h and were subjected to FACS after staining with CD11b, CD14 & CD38 CD13 antibodies respectively. Diagrams show bivariate FACS analysis of CD11b vs. CD14 for HL60 cells & CD38 vs. CD13 for K562. Columns depicts the mean of 3 independent experiments (n=3). Significance analyses of normally distributed data with variance similar between groups used paired, two-tailed Student's t-test. * p < 0.05, ** p < 0.005, *** p < 0.001.

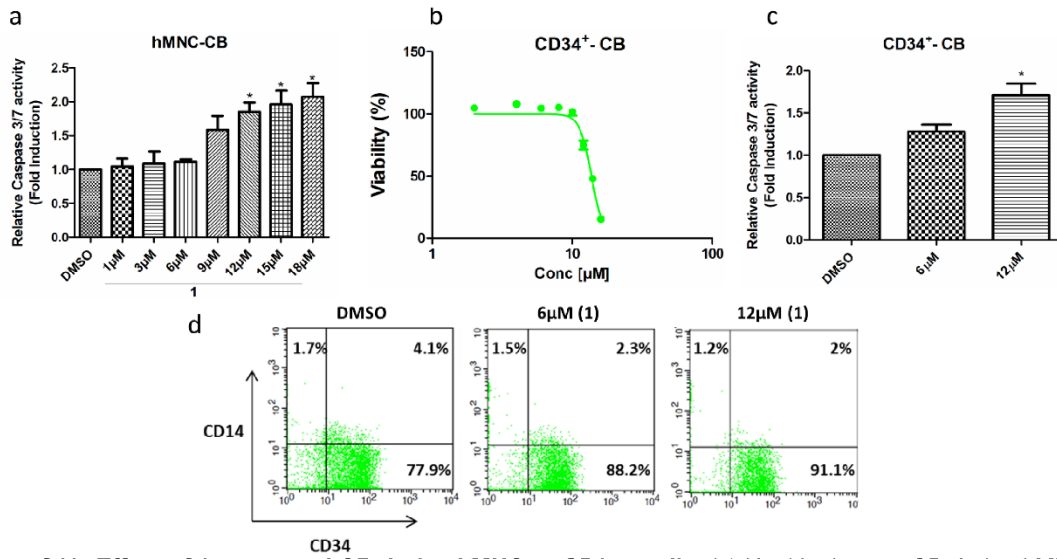


Figure S13: Effect of 1 on normal CB derived MNC or CD34+ cells. (a) Healthy human CB derived MNC were treated for 48 h with increasing concentrations of 1 and later enzymatic activity of caspase 3/7 was examined by caspase 3/7 dependent glo assay (absorbance at 405 nm). (b) Primary CB derived CD34+ cells were treated with 1 to determine the sensitivity using Celltiter glo assay resulting in a higher IC₅₀ value than in leukemic cells (13 ± 0.46 μM). (c) Human CB derived CD34+HSCs were treated with 1 for 48h and later apoptosis was examined by using caspase 3/7 glo assay (absorbance at 405 nm). 1 has not induced apoptosis at 6μM; however, apoptosis was significantly induced at this concentration in leukemic cells (Fig 1B). (d) Effect of 1 on differentiation of CD34+ cells were determined by FACS after staining with CD34 & CD11b antibodies. Diagrams show bivariate FACS analysis of CD34 versus CD14 for CD34+ cells.

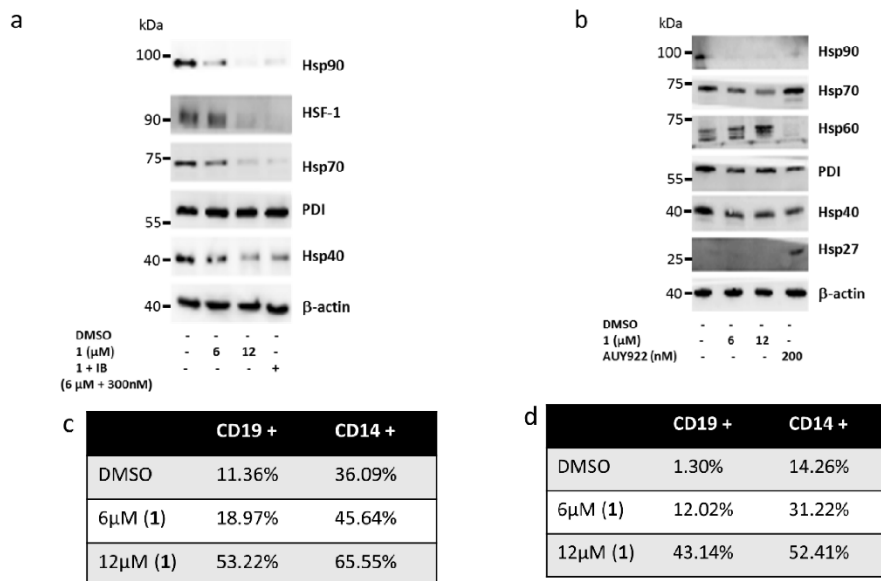


Figure S14: 1 as a potent inhibitor in primary CML patient derived CD34+ blast cells without inducing HSR. (a, b) Primary CML^{CD34+} cells from two patients were either treated with the indicated (cytotoxic) concentration of 1 alone or in combination with IB (b) or with 1 and AUY922 for 48h. Later the protein lysates were subjected to immunoblot analysis. As opposed to AUY922 treatment, administration of 1 alone or in combination with IB does not induce HSR which was evaluated by the expression of HSF-1, HSP70, HSP40 and HSP27, whereas PDI (endoplasmic reticulum) and HSP60 (primarily present in mitochondria) served as a control for HSR in the cytoplasm. (c, d) Primary CML^{CD34+} cells were treated with 1 for 5 days in liquid medium and later subjected to FACS after staining with CD14 and CD19 antibodies (n=2 patients).

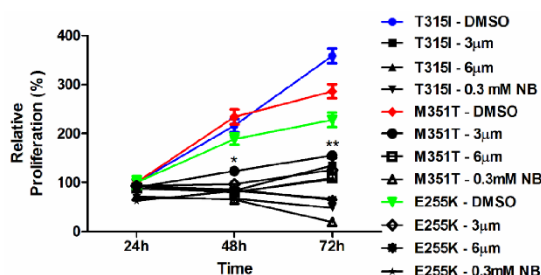


Figure S15: Efficacy of 1 in imatinib resistant clinically relevant BCR-ABL1 mutants. Ba/F3 cells expressing BCR-ABL1^{T315I}, M351T & E255K mutants were treated with the indicated concentration of 1 and later viable cells were counted at 24, 48 and 72 h.

References

- Bopp B, Ciglia E, Ouald-Chaib A, Groth G, Gohlke H, Jose J. Design and biological testing of peptidic dimerization inhibitors of human Hsp90 that target the C-terminal domain. *Biochimica et biophysica acta*. Jun 2016;1860(6):1043-1055.
- Ciglia E, Vergin J, Reimann S, et al. Resolving hot spots in the C-terminal dimerization domain that determine the stability of the molecular chaperone Hsp90. *PLoS one*. 2014;9(4):e96031.
- Seidel SA, Dijkman PM, Lea WA, et al. Microscale thermophoresis quantifies biomolecular interactions under previously challenging conditions. *Methods*. Mar 2013;59(3):301-315.
- Schuck P. Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophysical journal*. Mar 2000;78(3):1606-1619.
- Hurton T WA, Deubler G, Bashir B, Hayes DB, Laue TM, et al. SEDNTERP http://bitcwiki.sr.unh.edu/index.php/Main_Page 2016.
- R. G. LeBel DAIG. Density, Viscosity, Refractive Index, and Hygroscopicity of Mixtures of Water and Dimethyl Sulfoxide. *J. Chem. Eng. Data*. 1962;7(1):100-101.
- Brautigam CA. Calculations and Publication-Quality Illustrations for Analytical Ultracentrifugation Data. *Methods in enzymology*. 2015;562:109-133.
- Lee CC, Lin TW, Ko TP, Wang AH. The hexameric structures of human heat shock protein 90. *PLoS one*. 2011;6(5):e19961.
- Nemoto T, Sato N. Oligomeric forms of the 90-kDa heat shock protein. *The Biochemical journal*. Mar 01 1998;330 (Pt 2):989-995.
- Minami Y, Kawasaki H, Miyata Y, Suzuki K, Yahara I. Analysis of native forms and isoform compositions of the mouse 90-kDa heat shock protein, HSP90. *The Journal of biological chemistry*. Jun 05 1991;266(16):10099-10103.
- Krishna P, Reddy RK, Sacco M, Frappier JR, Felsheim RF. Analysis of the native forms of the 90 kDa heat shock protein (hsp90) in plant cytosolic extracts. *Plant molecular biology*. Feb 1997;33(3):457-466.
- Eskew JD, Sadikot T, Morales P, et al. Development and characterization of a novel Cterminal inhibitor of Hsp90 in androgen dependent and independent prostate cancer cells. *BMC cancer*. 2011;11:468.
- Lee CC, Lin TW, Ko TP, Wang AHJ. The hexameric structures of human heat shock protein 90. *PLoS One*. May 25 2011;6(5).
- Gohlke H, Hergert U, Meyer T, et al. Binding region of alanopine dehydrogenase predicted by unbiased molecular dynamics simulations of ligand diffusion. *J. Chem. Inf. Model*. Oct 2013;53(10):2493-2498.

11 Literaturverzeichnis

- [1] J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D. M. Parkin, D. Forman und F. Bray, *Int. J. Cancer*, **2015**, *136*, E359–E386.
- [2] American Cancer Society: *Global cancer facts and figures 3rd Edition*, Atlanta, American Cancer Society, **2015**.
- [3] A. P. Feinberg und B. Tycko, *Nat. Rev. Cancer*, **2004**, *4*, 143–153.
- [4] J. You und P. Jones, *Cancer Cell*, **2012**, *22*, 9–20.
- [5] S. Sharma, T. K. Kelly und P. A. Jones, *Carcinogenesis*, **2009**, *31*, 27–36.
- [6] S. Ropero und M. Esteller, *Mol. Oncol.*, **2007**, *1*, 19–25.
- [7] M. Federico und L. Bagella, *J. Biomed. Biotechnol.*, **2011**, *2011*, 1–12.
- [8] Y. Wang und S. R. Mcalpine, *Futur. Med. Chem*, **2015**, *7*, 87–90.
- [9] L. M. Butler, R. Ferraldeschi, H. K. Armstrong, M. M. Centenera und P. Workman, *Mol. Cancer Res.*, **2015**, *13*, 1445–1451.
- [10] K. Sidera und E. Patsavoudi, *Recent Pat. Anticancer. Drug Discov.*, **2014**, *9*, 1–20.
- [11] M. Taipale, D. F. Jarosz und S. Lindquist, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2010**, *11*, 515–28.
- [12] Y. F. Xiao, M. M. Jie, B. S. Li, C. J. Hu, R. Xie, B. Tang und S. M. Yang, *J. Immunol. Res.*, **2011**, *2011*, 1–13.
- [13] D. Wu, Y. Gao, Y. Qi, L. Chen, Y. Ma und Y. Li, *Cancer Lett.*, **2014**, *351*, 13–22.
- [14] J. Thundimadathil, *J. Amino Acids*, **2012**, *2012*, 967347.
- [15] L. Sun, *Mod. Chem. Appl.*, **2013**, *1*, 1–2.
- [16] M. Pelay-Gimeno, A. Glas, O. Koch und T. N. Grossmann, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2015**, *54*, 8896–927.
- [17] A. Grauer und B. König, *European J. Org. Chem.*, **2009**, 5099–5111.
- [18] S. Fahs, Y. Patil-Sen und T. J. Snape, *ChemBioChem*, **2015**, *16*, 1840–1853.
- [19] P. Wójcik und Ł. Berlicki, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2015**, *26*, 707–713.
- [20] D. J. Hill, M. J. Mio, R. B. Prince, T. S. Hughes und J. S. Moore, *Chem. Rev.*, **2001**, *101*, 3893–4011.
- [21] E. Goldhammer, C. Rössig und L. Wicher, in *Thiemes Pflege*, Hrsg. S. Schewior-Popp, F. Sitzmann und L. Ullrich, Thieme Verlagsgruppe, Stuttgart, 13. Auflag., **2017**, S. 1353–1385.
- [22] M. Esteller, *N. Engl. J. Med.*, **2008**, *358*, 1148–1159.
- [23] R. A. Gatenby und R. J. Gillies, *Nat. Rev. Cancer*, **2008**, *8*, 56–61.
- [24] B. Vogelstein und K. W. Kinzler, *Nat. Med.*, **2004**, *10*, 789–799.
- [25] D. Hanahan und R. A. Weinberg, *Cell*, **2011**, *144*, 646–674.
- [26] G. M. Cooper und R. E. Hausman, *Cell A Mol. Approach*, **2007**, 743.
- [27] Deutsches Krebsforschungszentrum: *Krebsentstehung*
<https://www.krebsinformationsdienst.de/grundlagen/krebsentstehung.php>,
(zugegriffen 5. Mai 2017).
- [28] M. F. Fromm und M. Gramatzki, in *Pharmakotherapie - Klinische Pharmakologie*, Hrsg. B. Lemmer und K. Brune, Springer-Verlag, Heidelberg, 11. Auflag., **2011**, S. 155–166.
- [29] Deutsches Krebsforschungszentrum: *Chemotherapie*,
<https://www.krebsinformationsdienst.de/behandlung/chemotherapie-substanzen.php#inhalt5>, (zugegriffen 5. Mai 2017).
- [30] K. Masui, B. Gini, J. Wykosky, C. Zanca, P. S. Mischel, F. B. Furnari und W. K. Cavenee, *Carcinogenesis*, **2013**, *34*, 725–738.
- [31] D. E. Gerber, *Am. Fam. Physician*, **2008**, *77*, 311–319.
- [32] M. Huang, A. Shen, J. Ding und M. Geng, *Trends Pharmacol. Sci.*, **2014**, *35*, 41–50.

- [33] T. A. Baudino, *Curr. Drug Discov. Technol.*, **2015**, *12*, 3–20.
- [34] National Cancer Institute: *Targeted Therapy*, <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/targeted-therapies>, (zugegriffen 20. Mai 2017).
- [35] Deutsches Krebsforschungszentrum: *Zielgerichtete Krebstherapien*, <https://www.krebsinformationsdienst.de/behandlung/moderne-krebstherapien.php>, (zugegriffen 20. Mai 2017).
- [36] National Comprehensive Cancer Network: *Targeted Therapy*, https://www.nccn.org/patients/resources/life_with_cancer/treatment/targeted_therapy.aspx, (zugegriffen 23. November 2017).
- [37] T. R. Wilson, D. B. Longley und P. G. Johnston, *Ann. Oncol.*, **2006**, Suppl. 10, X315-324.
- [38] I. Martínez-Lacaci, P. García Morales, J. Soto und M. Saceda, *Clin. Transl. Oncol.*, **2007**, *9*, 13–20.
- [39] M. M. Gottesman, T. Fojo und S. E. Bates, *Nat. Rev. Cancer*, **2002**, *2*, 48–58.
- [40] C. F. Higgins, *Nature*, **2007**, *446*, 749–757.
- [41] M. A. Dawson und T. Kouzarides, *Cell*, **2012**, *150*, 12–27.
- [42] C. H. Arrowsmith, C. Bountra, P. V. Fish, K. Lee und M. Schapira, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2012**, *11*, 384–400.
- [43] P. B. Becker und J. L. Workman, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **2013**, *5*: a017905.
- [44] A. Bird, *Genes Dev.*, **2002**, 6–21.
- [45] M. Biel, V. Wascholowski und A. Giannis, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, **2005**, *44*, 3186–3216.
- [46] K. J. Falkenberg und R. W. Johnstone, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2014**, *13*, 673–691.
- [47] T. Kouzarides, *Cell*, **2007**, *128*, 693–705.
- [48] S. L. Berger, *Curr Opin Genet Dev*, **2002**, *12*, 142–148.
- [49] C. L. Peterson und M.-A. Laniel, *Curr. Biol.*, **2004**, *14*, R546–R551.
- [50] D. M. Chuang, Y. Leng, Z. Marinova, H. J. Kim und C. T. Chiu, *Trends Neurosci.*, **2009**, *32*, 591–601.
- [51] R. Heinke und W. Sippl, *Pharm. Unserer Zeit*, **2010**, *39*, 183–189.
- [52] J. E. Bolden, M. J. Peart und R. W. Johnstone, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2006**, *5*, 769–784.
- [53] K. Halkidou, L. Gaughan, S. Cook, H. Y. Leung, D. E. Neal und C. N. Robson, *Prostate*, **2004**, *59*, 177–189.
- [54] A. J. Wilson, D. S. Byun, N. Popova, L. B. Murray, K. L'Italien, Y. Sowa, D. Arango, A. Velcich, L. H. Augenlicht und J. M. Mariadason, *J. Biol. Chem.*, **2006**, *281*, 13548–13558.
- [55] P. Zhu, E. Martin, J. Mengwasser, P. Schlag, K. P. Janssen und M. Göttlicher, *Cancer Cell*, **2004**, *5*, 455–463.
- [56] Z. Zhang, H. Yamashita, T. Toyama, H. Sugiura, Y. Omoto, Y. Ando, K. Mita, M. Hamaguchi, S. I. Hayashi und H. Iwase, *Clin. Cancer Res.*, **2004**, *10*, 6962–6968.
- [57] O. Witt, H. E. Deubzer, T. Milde und I. Oehme, *Cancer Lett.*, **2009**, *277*, 8–21.
- [58] J. M. Villalba und F. J. Alcáin, *BioFactors*, **2012**, *38*, 349–359.
- [59] L. Gao, M. A. Cueto, F. Asselbergs und P. Atadja, *J. Biol. Chem.*, **2002**, *277*, 25748–55.
- [60] M. S. Finnin, J. R. Donigian, A. Cohen, V. M. Richon, R. A. Rifkind, P. A. Marks, R. Breslow und N. P. Pavletich, *Nature*, **1999**, *401*, 188–193.
- [61] Y. Hai und D. W. Christianson, *Nat.Chem.Biol.*, **2016**, *12*, 741-747.
- [62] P. A. Marks, *Expert Opin. Investig. Drugs*, **2010**, *19*, 1049–1066.
- [63] M. Haberland, R. L. Montgomery und E. N. Olson, *Nat. Rev. Genet.*, **2009**, *10*, 32–42.

- [64] M. Mottamal, S. Zheng, T. L. Huang und G. Wang, *Molecules*, **2015**, *20*, 3898–3941.
- [65] J. M. Wagner, B. Hackanson, M. Lübbert und M. Jung, *Clin. Epigenetics*, **2010**, *1*, 117–136.
- [66] S. Roy, K. Packman, R. Jeffrey und M. Tenniswood, *Cell Death Differ.*, **2005**, *12*, 482–491.
- [67] C. Subramanian, A. W. Opirari Jr., X. Bian, V. P. Castle und R. P. Kwok, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2005**, *102*, 4842–4847.
- [68] H. Y. Lin, C. S. Chen, S. P. Lin, J. R. Weng und C. S. Chen, *Med. Res. Rev.*, **2006**, *26*, 397–413.
- [69] W. M. Yang und Y. L. Yao, *J. Biomed. Biotechnol.*, **2011**, ID: 146493, 1–15.
- [70] J. E. Bolden, W. Shi, K. Jankowski, C.-Y. Kan, L. Cluse, B. P. Martin, K. L. MacKenzie, G. K. Smyth und R. W. Johnstone, *Cell Death Dis.*, **2013**, *4*, e519.
- [71] P. Bertrand, *Eur. J. Med. Chem.*, **2010**, *45*, 2095–2116.
- [72] J. Roche und P. Bertrand, *Eur. J. Med. Chem.*, **2016**, *121*, 451–483.
- [73] B. S. Mann, J. R. Johnson, M. H. Cohen, R. Justice und R. Pazdur, *Oncologist*, **2007**, *12*, 1247–52.
- [74] S. P. Iyer und F. F. Foss, *Oncologist*, **2015**, *20*, 1084–91.
- [75] H.-Z. Lee, V. E. Kwitkowski, P. L. Del Valle, M. S. Ricci, H. Saber, B. A. Habtemariam, J. Bullock, E. Bloomquist, Y. Li Shen, X.-H. Chen, J. Brown, N. Mehrotra, S. Dorff, R. Charlab, R. C. Kane, E. Kaminskas, R. Justice, A. T. Farrell und R. Pazdur, *Clin. Cancer Res.*, **2015**, *21*, 2666–70.
- [76] B. L. A. Raedler und M. Writer, *Am. Heal. Drug Benefits*, **2016**, *9*, 84–89.
- [77] P. G. Richardson, V. T. M. Hungria, S. S. Yoon, M. Beksac, M. A. Dimopoulos, A. Elghandour, W. W. Jedrzejczak, A. Guenther, T. Na Nakorn, N. Siritanaratkul, R. L. Schlossman, J. Hou, P. Moreau, S. Lonial, J. H. Lee, H. Einsele, M. Sopala, B. R. Bengoudifa, C. Corrado, F. Binlich und J. F. San-Miguel, *Blood*, **2016**, *127*, 713–721.
- [78] M. Manal, M. J. N. Chandrasekar, J. Gomathi Priya und M. J. Nanjan, *Bioorg. Chem.*, **2016**, *67*, 18–42.
- [79] Z. Qiao, S. Ren, W. Li, X. Wang, M. He, Y. Guo, L. Sun, Y. He, Y. Ge und Q. Yu, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2013**, *434*, 95–101.
- [80] J. H. Kalin und J. A. Bergman, *J. Med. Chem.*, **2013**, *56*, 6297–6313.
- [81] F. K. Hansen, T. S. Skinner-Adams, S. Duffy, L. Marek, S. D. M. Sumanadasa, K. Kuna, J. Held, V. M. Avery, K. T. Andrews und T. Kurz, *ChemMedChem*, **2014**, *9*, 665–670.
- [82] K. Stenzel, A. Chakrabarti, J. Melesina, F. K. Hansen, J. Lancelot, S. Herkenhöfner, B. Lungerich, M. Marek, C. Romier, R. J. Pierce, W. Sippl, M. Jung und T. Kurz, *Arch. Pharm. (Weinheim)*, **2017**, *350*, 1700096.
- [83] A. Fischer, *Pharm. Unserer Zeit*, **2010**, *39*, 204–209.
- [84] N. M. Archin, A. L. Liberty, A. D. Kashuba, S. K. Choudhary, J. D. Kuruc, A. M. Crooks, D. C. Parker, E. M. Anderson, M. F. Kearney, M. C. Strain, D. D. Richman, M. G. Hudgens, R. J. Bosch, J. M. Coffin, J. J. Eron, D. J. Hazuda und D. M. Margolis, *Nature*, **2012**, *487*, 482–485.
- [85] A. V Bieliauskas und M. K. H. Pflum, *Chem. Soc. Rev.*, **2008**, *37*, 1402–1413.
- [86] D. Wu, Q. Huang, Y. Zhang, Q. Zhang, Q. Liu, J. Gao, Z. Cao und R. Zhu, *BMC Bioinformatics*, **2012**, *13*, 212.
- [87] S. Subramanian, S. E. Bates, J. J. Wright, I. Espinoza-Delgado und R. L. Piekarz, *Pharmaceuticals*, **2010**, *3*, 2751–2767.
- [88] S. Dallavalle, C. Pisano und F. Zunino, *Biochem. Pharmacol.*, **2012**, *84*, 756–765.
- [89] E. E. Hull, M. R. Montgomery und K. J. Leyva, *Biomed Res. Int.*, **2016**,

- ID:8797206, 1–15.
- [90] O. A. O'Connor, M. L. Heaney, L. Schwartz, S. Richardson, R. Willim, B. MacGregor-Cortelli, T. Curly, C. Moskowitz, C. Portlock, S. Horwitz, A. D. Zelenetz, S. Frankel, V. Richon, P. Marks und W. K. Kelly, *J. Clin. Oncol.*, **2006**, *24*, 166–173.
- [91] P. Gupta, R. C. Reid, A. Iyer, M. J. Sweet, D. P. Fairlie, R. C. Reid, A. Iyer, M. J. Sweet und D. P. Fairlie, *Curr. Top. Med. Chem.*, **2012**, *12*, 1479–99.
- [92] F. Thaler und C. Mercurio, *ChemMedChem*, **2014**, *9*, 523–536.
- [93] K. M. Sakamoto und G. I. Aldana-Masangkay, *J. Biomed. Biotechnol.*, **2011**, ID:875824, 1–10.
- [94] C. Boyault, K. Sadoul, M. Pabion und S. Khochbin, *Oncogene*, **2007**, *26*, 5468–5476.
- [95] S. S. Hook, A. Orian, S. M. Cowley und R. N. Eisenman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2002**, *99*, 13425–13430.
- [96] N. R. Bertos, B. Gilquin, G. K. T. Chan, T. J. Yen, S. Khochbin und X. J. Yang, *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*, 48246–48254.
- [97] Y. Li, D. Shin und S. H. Kwon, *FEBS J.*, **2013**, *280*, 775–793.
- [98] Y. Zhang, S. Kwon, T. Yamaguchi, F. Cubizolles, S. Rousseaux, M. Kneissel, C. Cao, N. Li, H.-L. Cheng, K. Chua, D. Lombard, A. Mizeracki, G. Matthias, F. W. Alt, S. Khochbin und P. Matthias, *Mol. Cell. Biol.*, **2008**, *28*, 1688–1701.
- [99] C. Hubbert, A. Guardiola, R. Shao, Y. Kawaguchi, A. Ito, A. Nixon, M. Yoshida, X.-F. Wang und T.-P. Yao, *Nature*, **2002**, *417*, 455–458.
- [100] A. D.-A. Tran, T. P. Marmo, A. a Salam, S. Che, E. Finkelstein, R. Kabarriti, H. S. Xenias, R. Mazitschek, C. Hubbert, Y. Kawaguchi, M. P. Sheetz, T.-P. Yao und J. C. Bulinski, *J. Cell Sci.*, **2007**, *120*, 1469–1479.
- [101] D. Kaluza, J. Kroll, S. Gesierich, T. P. Yao, R. A. Boon, E. Hergenreider, M. Tjwa, L. Rössig, E. Seto, H. G. Augustin, A. M. Zeiher, S. Dimmeler und C. Urbich, *EMBO J.*, **2011**, *30*, 4142–4156.
- [102] X. Zhang, Z. Yuan, Y. Zhang, S. Yong, A. Salas-Burgos, J. Koomen, N. Olashaw, J. T. Parsons, X. J. Yang, S. R. Dent, T. P. Yao, W. S. Lane und E. Seto, *Mol. Cell*, **2007**, *27*, 197–213.
- [103] P. Bali, M. Pranpat, J. Bradner, M. Balasis, W. Fiskus, F. Guo, K. Rocha, S. Kumaraswamy, S. Boyapalle, P. Atadja, E. Seto und K. Bhalla, *J. Biol. Chem.*, **2005**, *280*, 26729–26734.
- [104] J. J. Kovacs, P. J. M. Murphy, S. Gaillard, X. Zhao, J. T. Wu, C. V. Nicchitta, M. Yoshida, D. O. Toft, W. B. Pratt und T. P. Yao, *Mol. Cell*, **2005**, *18*, 601–607.
- [105] A. Valenzuela-Fernández, J. R. Cabrero, J. M. Serrador und F. Sánchez-Madrid, *Trends Cell Biol.*, **2008**, *18*, 291–297.
- [106] Y. Zhang, N. Li, C. Caron, G. Matthias, D. Hess, S. Khochbin und P. Matthias, *EMBO J.*, **2003**, *22*, 1168–1179.
- [107] S. Y. Khaitlina, *Biochem. Biokhimiia*, **2014**, *79*, 917–27.
- [108] Y. Kawaguchi, J. J. Kovacs, A. McLaurin, J. M. Vance, A. Ito und T. P. Yao, *Cell*, **2003**, *115*, 727–738.
- [109] A. Fribley, K. Zhang und R. J. Kaufman, *Methods Mol. Biol.*, **2009**, *559*, 191–204.
- [110] A. Mani und E. P. Gelmann, *J. Clin. Oncol.*, **2005**, *23*, 4776–89.
- [111] L. Catley, E. Weisberg, T. Kiziltepe, Y. T. Tai, T. Hideshima, P. Neri, P. Tassone, P. Atadja, D. Chauhan, N. C. Munshi und K. C. Anderson, *Blood*, **2006**, *108*, 3441–3449.
- [112] T. Hideshima, J. E. Bradner, D. Chauhan und K. C. Anderson, *Clin. Cancer Res.*, **2005**, *11*, 8530–8533.
- [113] A. Rodriguez-Gonzalez, T. Lin, A. K. Ikeda, T. Simms-Waldrup, C. Fu und K. M.

- Sakamoto, *Cancer Res.*, **2008**, *68*, 2557–2560.
- [114] J. A. Bergman, K. Woan, P. Perez-Villarrol, A. Villagra, E. M. Sotomayor und A. P. Kozikowski, *J. Med. Chem.*, **2012**, *55*, 9891–9899.
- [115] S. J. Haggarty, K. M. Koeller, J. C. Wong, C. M. Grozinger und S. L. Schreiber, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2003**, *100*, 4389–4394.
- [116] T. Hideshima, J. E. Bradner, J. Wong, D. Chauhan, P. Richardson, S. L. Schreiber und K. C. Anderson, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2005**, *102*, 8567–8572.
- [117] K. V. Butler, J. Kalin, C. Brochier, G. Vistoli, B. Langley und A. P. Kozikowski, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 10842–10846.
- [118] J. Lee, A. Mahendran, Y. Yao, L. Ngo, G. Venta-Perez, M. L. Choy, N. Kim, W.-S. Ham, R. Breslow und P. a Marks, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2013**, *110*, 15704–15709.
- [119] Y. Miyake, J. J. Keusch, L. Wang, M. Saito, D. Hess, X. Wang, B. J. Melancon, P. Helquist, H. Gut und P. Matthias, *Nat. Chem. Biol.*, **2016**, *12*, 748–754..
- [120] L. Santo, T. Hideshima, A. L. Kung, J. C. Tseng, D. Tamang, M. Yang, M. Jarpe, J. H. Van Duzer, R. Mazitschek, W. C. Ogier, D. Cirstea, S. Rodig, H. Eda, T. Scullen, M. Canavese, J. Bradner, K. C. Anderson, S. S. Jones und N. Raje, *Blood*, **2012**, *119*, 2579–2589.
- [121] D. T. Vogl, N. Raje, S. Jagannath, P. Richardson, P. Hari, R. Orłowski, J. G. Supko, D. Tamang, M. Yang, S. S. Jones, C. Wheeler, R. J. Markelewicz und S. Lonial, *Clin. Cancer Res.*, **2017**, *23*, 3307–3315.
- [122] A. J. Yee, W. I. Bensinger, J. G. Supko, P. M. Voorhees, J. G. Berdeja, P. G. Richardson, E. N. Libby, E. E. Wallace, N. E. Birrer, J. N. Burke, D. L. Tamang, M. Yang, S. S. Jones, C. A. Wheeler, R. J. Markelewicz und N. S. Raje, *Lancet Oncol.*, **2016**, *17*, 1569–1578.
- [123] G. Dasmahapatra, H. Patel, J. Friedberg, S. N. Quayle, S. S. Jones und S. Grant, *Mol. Cancer Ther.*, **2014**, *13*, 2886–2897.
- [124] B. Kost, in *Strasburger - Lehrbuch der Pflanzenwissenschaften*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 37. Auflag., **2014**, S. 182.
- [125] S. Lien und H. B. Lowman, *Trends Biotechnol.*, **2003**, *21*, 556–562.
- [126] S. K. Bhutia und T. K. Maiti, *Trends Biotechnol.*, **2008**, *26*, 210–217.
- [127] D. J. Craik, D. P. Fairlie, S. Liras und D. Price, *Chem. Biol. Drug Des.*, **2013**, *81*, 136–147.
- [128] J. T. Pelton und L. R. McLean, *Anal. Biochem.*, **2000**, *277*, 167–176.
- [129] G. A. Petsko und D. Ringe, *Protein structure and function*, New Science Press Ltd., London, **2004**.
- [130] *Introduction to chemistry: general, organic, and biological*, <https://2012books.lardbucket.org/pdfs/introduction-to-chemistry-general-organic-and-biological.pdf>, (zugegriffen 22. September 2017).
- [131] Z. A. Wang, X. Ding, C.-L. Tian und J.-S. Zheng, *RSC Adv.*, **2016**, *6*, 61599–61609.
- [132] S. Fletcher und A. D. Hamilton, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2005**, *9*, 632–638.
- [133] A. D. Cunningham, N. Qvit und D. Mochly-Rosen, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2017**, *44*, 59–66.
- [134] I. S. Moreira, P. A. Fernandes und M. J. Ramos, *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.*, **2007**, *68*, 803–812.
- [135] A. Metz, E. Ciglia und H. Gohlke, *Curr. Pharm. Des.*, **2012**, *18*, 4630–4647.
- [136] B. N. Bullock, A. L. Jochim und P. S. Arora, *JACS*, **2011**, *133*, 14220–14223.
- [137] L. Nevola und E. Giralt, *Chem. Commun.*, **2015**, *51*, 3302–3315.
- [138] T. A. Hill, N. E. Shepherd, F. Diness und D. P. Fairlie, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, **2014**, *53*, 13020–13041.

- [139] A. Giannis und T. Kolter, *Angew. Chemie*, **1993**, *105*, 1303–1326.
- [140] J. Vagner, H. Qu und V. J. Hruby, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2008**, *12*, 292–296.
- [141] P. I. Arvidsson, N. S. Ryder, H. M. Weiss, D. F. Hook, J. Escalante und D. Seebach, *Chem. Biodivers.*, **2005**, *2*, 401–420.
- [142] W. Huang, J. Seo, S. B. Willingham, A. M. Czyzewski, M. L. Gonzalgo, I. L. Weissman und A. E. Barron, *PLoS One*, **2014**, *9*, 1–10.
- [143] D. W. Hoskin und A. Ramamoorthy, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, **2008**, *1778*, 357–375.
- [144] D. Gaspar, A. Salomé Veiga und M. A. R. B. Castanho, *Front. Microbiol.*, **2013**, *4*, 1–16.
- [145] B. Mojsoska und H. Jenssen, *Pharmaceuticals*, **2015**, *8*, 366–415.
- [146] H. Jenssen, P. Hamill und R. E. W. Hancock, *Clin. Microbiol. Rev.*, **2006**, *19*, 491–511.
- [147] M. Hemshekhar, V. Anaparti und N. Mookherjee, *Pharmaceuticals*, **2016**, *9*, 40, 1–10.
- [148] M. R. Yeaman und N. Y. Yount, *Pharmacol. Rev.*, **2003**, *55*, 27–55.
- [149] R. E. W. Hancock und G. Diamond, *Trends Microbiol.*, **2000**, *8*, 402–410.
- [150] F. Schweizer, *Eur. J. Pharmacol.*, **2009**, *625*, 190–194.
- [151] N. Mookherjee und R. E. W. Hancock, *Cell. Mol. Life Sci.*, **2007**, *64*, 922–933.
- [152] M. N. Melo, R. Ferre und M. A. R. B. Castanho, *Nat. Rev. Microbiol.*, **2009**, *7*, 245–250.
- [153] K. A. Brogden, *Nat. Rev. Microbiol.*, **2005**, *3*, 238–250.
- [154] Y. Li, Q. Xiang, Q. Zhang, Y. Huang und Z. Su, *Peptides*, **2012**, *37*, 207–215.
- [155] I. Dobrzyńska, B. Szachowicz-Petelska, S. Sulkowski und Z. Figaszewski, *Mol. Cell. Biochem.*, **2005**, *276*, 113–119.
- [156] D. W. Kufe, *Nat. Rev. Cancer*, **2009**, *9*, 874–885.
- [157] S. C. Chan, L. Hui und H. M. Chen, *Anticancer Res.*, **1998**, *18*, 4467–4474.
- [158] C. Leuschner und W. Hansel, *Curr. Pharm. Des.*, **2004**, *10*, 2299–2310.
- [159] M. Sok, M. Šentjurc, M. Schara, M. Sentjurc und M. Schara, *Cancer Lett.*, **1999**, *139*, 215–20.
- [160] K. Simons und E. Ikonen, *Science*, **2000**, *290*, 1721–1726.
- [161] D. Yang, F. Ng, Z. Li, P. Road, H. Kong, Y. Wu, K. W. K. Chan, D. Wang, C. W. Bay, C. H. R und R. Et, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 9794–9795.
- [162] F. Chen, B. Ma, Z. C. Yang, G. Lin und D. Yang, *Amino Acids*, **2012**, *43*, 499–503.
- [163] J. Lee, B. Baek und I. Shin, *Synlett*, **2003**, *3*, 325–328.
- [164] Y. D. Wu, D. P. Wang, K. W. K. Chan und D. Yang, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 11189–11196.
- [165] D. Yang, J. Qu, B. Li, F. F. Ng, X. C. Wang, K. K. Cheung, D. P. Wang und Y. D. Wu, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 589–590.
- [166] D. Yang, B. Li, F. F. Ng, Y. L. Yan, J. Qu und Y. D. Wu, *J. Org. Chem.*, **2001**, *66*, 7303–7312.
- [167] D. Yang, G.-J. J. G. Liu, Y. Hao, W. Li, Z.-M. M. Dong, D.-W. W. Zhang und N.-Y. Y. Zhu, *Chem. Asian J.*, **2010**, *5*, 1356–1363.
- [168] X. Li und D. Yang, *Chem. Comm.*, **2006**, *2006*, 3367–3379.
- [169] X. Li, Y.-D. Wu und D. Yang, *Acc. Chem. Res.*, **2008**, *41*, 1428–38.
- [170] Y. Ma, D. Yang, Y. Ma und Y. H. Zhang, *ChemBioChem*, **2012**, *13*, 73–79.
- [171] D. Yang, J. Qu, W. Li, Y. H. Zhang, Y. Ren, D. P. Wang und Y. D. Wu, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 12410–12411.
- [172] D. Yang, X. Li, Y. Sha und Y. D. Wu, *Chem. - A Eur. J.*, **2005**, *11*, 3005–3009.
- [173] X. Li, B. Shen, X. Q. Yao und D. Yang, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 7264–7265.

- [174] D. Yang, X. Li, Y.-F. Fan und D.-W. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 7996–7997.
- [175] T. Jentsch, V. Stein, F. Weinreich und A. Zdebik, *Physiol Rev*, **2002**, *82*, 503–568.
- [176] T. J. Jentsch, C. A. Hübner und J. C. Fuhrmann, *Nat. Cell Biol.*, **2004**, *6*, 1039–1047.
- [177] R. Dutzler, E. B. Campbell, M. Cadene, B. T. Chait und R. MacKinnon, *Nature*, **2002**, *415*, 287–294.
- [178] R. N. Zuckermann, J. M. Kerr, S. B. H. Kent und W. H. Moos, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, 10646–10647.
- [179] A. S. Culf und R. J. Ouellette, *Molecules*, **2010**, *15*, 5282–5335.
- [180] S. M. Miller, R. J. Simon, S. Ng, R. N. Zuckermann, J. M. Kerr und W. H. Moos, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1994**, *4*, 2657–2662.
- [181] Y. U. Kwon und T. Kodadek, *Chem. Biol.*, **2007**, *14*, 671–677.
- [182] K. Kirshenbaum, A. E. Barron, R. A. Goldsmith, P. Armand, E. K. Bradley, K. T. V Truong, K. A. Dill, F. E. Cohen und R. N. Zuckermann, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1998**, *95*, 4303–4308.
- [183] J. R. Stringer, J. A. Crapster, I. A. Guzei und H. E. Blackwell, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 15559–15567.
- [184] O. Roy, C. Caumes, Y. Esvan, C. Didierjean, S. Faure und C. Taillefumier, *Org. Lett.*, **2013**, *15*, 2246–2249.
- [185] C. Caumes, O. Roy, S. Faure und C. Taillefumier, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 9553–9556.
- [186] N. H. Shah, G. L. Butterfoss, K. Nguyen, B. Yoo, R. Bonneau, D. L. Rabenstein und K. Kirshenbaum, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 16622–16632.
- [187] P. a. Jordan, B. Paul, G. L. Butterfoss, P. D. Renfrew, R. Bonneau und K. Kirshenbaum, *Biopolymers*, **2011**, *96*, 617–626.
- [188] I. M. Mándity und F. Fülöp, *Exp. Op. Drug. Discov.*, **2015**, *10*, 1163–1177.
- [189] D. G. Udugamasooriya, S. P. Dineen, R. A. Brekken und T. Kodadek, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 5744–5752.
- [190] T. Hara, S. R. Durell, M. C. Myers und D. H. Appella, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 1995–2004.
- [191] J. A. Patch und A. E. Barron, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 12092–12093.
- [192] P. Chène, *Nat. Rev. Cancer*, **2003**, *3*, 102–109.
- [193] M. Shibuya, *Genes Cancer*, **2011**, *2*, 1097–1105.
- [194] P. Kahnberg, A. J. Lucke, M. P. Glenn, G. M. Boyle, J. D. a Tyndall, P. G. Parsons und D. P. Fairlie, *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 7611–7622.
- [195] P. K. Gupta, R. C. Reid, L. Liu, A. J. Lucke, S. A. Broomfield, M. R. Andrews, M. J. Sweet und D. P. Fairlie, *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, **2010**, *20*, 7067–7070.
- [196] G. V. M. Sharma, V. Manohar, S. K. Dutta, V. Subash und A. C. Kunwar, *J. Org. Chem.*, **2008**, *73*, 3689–3698.
- [197] V. Duléry, O. Renaudet und P. Dumy, *Tetrahedron*, **2007**, *63*, 11952–11958.
- [198] I. P. Decostaire, D. Lelièvre, H. Zhang und A. F. Delmas, *Tetrahedron Lett.*, **2006**, *47*, 7057–7060.
- [199] S. Abdel Rahman, A. El-Kafrawy, A. Hattaba und M. F. Anwer, *Amino Acids*, **2007**, *33*, 531–536.
- [200] M. Paradís-Bas, J. Tulla-Puche und F. Albericio, *Chem. Soc. Rev.*, **2016**, *45*, 631–654.
- [201] S. B. H. Kent, *Ann. Rev. Biochem.*, **1988**, *957*–989.
- [202] R. J. Ellis, *Trends Biochem. Sci.*, **2006**, *31*, 395–401.
- [203] P. Csermely, T. Schnaider und I. Szántó, *BBA - Rev. Biomembr.*, **1995**, *1241*, 425–451.

- [204] J. Buchner, *Cell. Mol. Life Sci.*, 2002, **59**, 1587–1588.
- [205] D. Picard, *HSP90 Interactors*, <https://www.picard.ch/downloads/Hsp90interactors.pdf>, (zugegr. 14. Nov. 2017).
- [206] G. Garg, H. Zhao und B. S. J. Blagg, *Bioorganic Med. Chem.*, **2017**, *25*, S1–S58.
- [207] R. Pennisi, P. Ascenzi und A. di Masi, *Biomolecules*, **2015**, *5*, 2589–2618.
- [208] C. Prodromou, *Biochem. J.*, **2016**, *473*, 2439–2452.
- [209] L. Whitesell und S. L. Lindquist, *Nat. Rev. Cancer*, **2005**, *5*, 761–72.
- [210] G. Garg, A. Khandelwal und B. S. J. Blagg, in *Advances in Cancer Research*, **2016**, *129*, 51–88.
- [211] S. Chaudhury, T. R. Welch und B. S. J. Blagg, *ChemMedChem*, **2006**, *1*, 1331–1340.
- [212] E. Ciglia, *Inhibiting protein-protein interactions in Hsp90 dimerization as a novel approach for targeting cancer*, Universität Düsseldorf, **2015**.
- [213] L. H. Pearl und C. Prodromou, *Annu. Rev. Biochem.*, **2006**, *75*, 271–294.
- [214] S. F. Harris, A. K. Shiau und D. A. Agard, *Structure*, **2004**, *12*, 1087–1097.
- [215] B. Panaretou, C. Prodromou, S. M. Roe, R. O’Brien, J. E. Ladbury, P. W. Piper und L. H. Pearl, *EMBO J.*, **1998**, *17*, 4829–4836.
- [216] C. Ratzke, M. Mickler, B. Hellenkamp, J. Buchner und T. Hugel, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2010**, *107*, 16101–16106.
- [217] A. Kamal, L. Thao, J. Sensintaffar, L. Zhang, M. F. Boehm, L. C. Fritz und F. J. Burrows, *Nature*, **2003**, *425*, 407–410.
- [218] M. Tatokoro, F. Koga, S. Yoshida und K. Kihara, *EXCLI J.*, **2015**, *14*, 48–58.
- [219] X. Lu, L. Xiao, L. Wang und D. M. Ruden, *Biochem. Pharmacol.*, **2012**, *83*, 995–1004.
- [220] S. M. Roe, C. Prodromou, R. O’Brien, J. E. Ladbury, P. W. Piper und L. H. Pearl, *J. Med. Chem.*, **1999**, *42*, 260–266.
- [221] R. Garcia-Carbonero, A. Carnero und L. Paz-Ares, *Lancet Oncol.*, **2013**, *14*.
- [222] K. Jhaveri, S. O. Ochiana, M. P. Dunphy, J. F. Gerecitano, A. D. Corben, R. I. Peter, Y. Y. Janjigian, E. M. Gomes-DaGama, J. Koren, S. Modi und G. Chiosis, *Expert Opin. Investig. Drugs*, **2014**, *23*, 611–628.
- [223] K. Jhaveri, T. Taldone, S. Modi und G. Chiosis, *Biochim. Biophys. Acta*, **2012**, *1823*, 742–755.
- [224] T. Taldone und G. Chiosis, *Curr. Top. Med. Chem.*, **2009**, *9*, 1436–1446.
- [225] G. Chiosis, M. N. Timaul, B. Lucas, P. N. Munster, F. F. Zheng, L. Sepp-Lorenzino und N. Rosen, *Chem. Biol.*, **2001**, *8*, 289–299.
- [226] L. Neckers und P. Workman, *Clin. Cancer Res.*, **2012**, *18*, 64–76.
- [227] P. W. Piper und S. H. Millson, *Pharmaceuticals*, **2011**, *4*, 1400–1422.
- [228] X. Wang, M. Chen, J. Zhou und X. Zhang, *Int. J. Oncol.*, **2014**, *45*, 18–30.
- [229] J. A. Hall, L. K. Forsberg und B. S. J. Blagg, *Future Med. Chem.*, **2014**, *6*, 1587–605.
- [230] A. Donnelly und B. S. J. Blagg, *Curr. Med. Chem.*, **2008**, *15*, 2702–17.
- [231] Y. Wang und S. R. McAlpine, *Chem. Commun. (Camb.)*, **2015**, *51*, 1410–3.
- [232] Y. Wang und S. R. McAlpine, *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, *13*, 4627–31.
- [233] M. G. Marcu, T. W. Schulte und L. Neckers, *J. Natl. Cancer Inst.*, **2000**, *92*, 242–248.
- [234] M. G. Marcu, A. Chadli, I. Bouhouche, M. Catelli und L. M. Neckers, *J. Biol. Chem.*, **2000**, *275*, 37181–37186.
- [235] J. A. Burlison, L. Neckers, A. B. Smith, A. Maxwell und B. S. J. Blagg, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 15529–15536.
- [236] H. Zhao, B. Reddy Kusuma und B. S. J. Blagg, *ACS Med. Chem. Lett.*, **2010**, *1*, 311–315.

- [237] H. Zhao, A. C. Donnelly, B. R. Kusuma, G. E. L. Brandt, D. Brown, R. A. Rajewski, G. Vielhauer, J. Holzbeierlein, M. S. Cohen und B. S. J. Blagg, *J. Med. Chem.*, **2011**, *54*, 3839–3853.
- [238] H. Zhao, G. Garg, J. Zhao, E. Moroni, A. Girgis, L. S. Franco, S. Singh, G. Colombo und B. S. J. Blagg, *Eur. J. Med. Chem.*, **2015**, *89*, 442–466.
- [239] K. M. Byrd, C. Subramanian, J. Sanchez, H. F. Motiwala, W. Liu, M. S. Cohen, J. Holzbeierlein und B. S. J. Blagg, *Chem. - A Eur. J.*, **2016**, *22*, 6921–6931.
- [240] G. Garg, L. Forsberg, H. Zhao und B. Blagg, *Chem. - A Eur. J.*, **2017**, 1–13.
- [241] J. A. Burlison, C. Avila, G. Vielhauer, D. J. Lubbers, J. Holzbeierlein und B. S. J. Blagg, *J. Org. Chem.*, **2008**, *73*, 2130–2137.
- [242] C. M. Palermo, C. A. Westlake und T. A. Gasiewicz, *Biochemistry*, **2005**, *44*, 5041–5052.
- [243] H. Zhao, G. E. Brandt, L. Galam, R. L. Matts und B. S. J. Blagg, *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, **2011**, *21*, 2659–2664.
- [244] C. A. Byrd, W. Bornmann, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, N. Pavletich, N. Rosen, C. F. Nathan und A. Ding, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1999**, *96*, 5645–50.
- [245] H. Itoh, M. Ogura, A. Komatsuda, H. Wakui, A. B. Miura und Y. Tashima, *Biochem. J.*, **1999**, *343 Pt. 3*, 697–703.
- [246] C. Söti, A. Rácz und P. Csermely, *J. Biol. Chem.*, **2002**, *277*, 7066–7075.
- [247] H. Zhao, B. Yan, L. B. Peterson und B. S. J. Blagg, *ACS Med. Chem. Lett.*, **2012**, *3*, 327–331.
- [248] A. Khandelwal, J. A. Hall und B. S. J. Blagg, *J. Org. Chem.*, **2013**, *78*, 7859–7884.
- [249] E. Ciglia, J. Vergin, S. Reimann, S. H. J. J. Smits, L. Schmitt, G. Groth und H. Gohlke, *PLoS One*, **2014**, *9*, 4, e96031.
- [250] B. Bopp, E. Ciglia, A. Ouald-Chaib, G. Groth, H. Gohlke und J. Jose, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, **2016**, *1860*, 1043–1055.
- [251] D. Marcovici-Mizrahi, H. E. Gottlieb, V. Marks und A. Nudelman, *J. Org. Chem.*, **1996**, *61*, 8402–8406.
- [252] Viktoria Krieger, *Synthese, Konformationsanalyse und biologische Evaluierung von neuartigen antitumoraktiven Peptoid-Derivaten*, Universität Düsseldorf, **2017**.
- [253] D. Yang, G. Liu, Y. Hao, W. Li, Z. M. Dong, D. W. Zhang, N. Y. Zhu, *Chem. Asian J.*, 2010, *5*, 1356–1363.
- [254] X. Li, Y.-D. Wu und D. Yang, *Acc. Chem. Res.*, **2008**, *41*, 1428–1438.
- [255] B. Draghici, F. K. Hansen, A. M. Buciumas, B. E. D. M. El-Gendy, E. Todadze und A. R. Katritzky, *Rsc Adv.*, **2011**, *1*, 602–606.
- [256] A. R. Katritzky, I. Avan und S. R. Tala, *J. Org. Chem.*, **2009**, *74*, 8690–8694.
- [257] D. Diedrich, J. R. Moita, A. Rüter, B. Frieg, G. J. Reiss, A. Hoepfner, T. Kurz, H. Gohlke, S. Lüdeke, M. U. Kassack, F. K. Hansen, A. J. R. Moita, A. Rüter, B. Frieg, *Chem. - A Eur. J.*, **2016**, *22*, 1–13.
- [258] A. A. J. Souers, S. Schuerer, H. Kwack, A. A. A. Virgilio, S. Schiirer und J. A. Ellman, *Synthesis (Stuttg.)*, **1999**, 583.
- [259] Y. Hai, S. A. Shinsky, N. J. Porter und D. W. Christianson, *Nat. Commun.*, **2017**, *8*, 1–9.
- [260] Z. Kutil, Z. Novakova, M. Meleshin, J. Mikesova, M. Schutkowski und C. Barinka, *bioRxiv*, **2017**, DOI: <https://doi.org/10.1101/212043>.