

**Entwicklung von Klasse I/IIb  
Histondeacetylase (HDAC) -inhibitoren und  
HDAC-PROTACs**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

**Fabian Fischer**

aus Hagen

Düsseldorf, Mai 2024



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

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

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. Thomas Kurz  
Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
2. Prof. Dr. Matthias U. Kassack  
Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Tag der mündlichen Prüfung: 27.08.2024

---



## Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Diese Dissertation wurde weder in vorgelegter noch in ähnlicher Form bei keiner anderen Fakultät eingereicht.

Ich habe bisher keine Promotionsversuche unternommen, weder erfolgreich noch erfolglos.

Düsseldorf, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Fabian Fischer

Die vorliegende Dissertation wurde im Zeitraum von April 2020 bis Dezember 2023 am Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf unter Aufsicht von Herrn Prof. Dr. Thomas Kurz angefertigt.

---



## Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei Prof. Dr. Thomas Kurz, der mir diese Promotion in seinem Arbeitskreis ermöglicht hat. Ich habe in dieser Zeit viel gelernt und schaue dankbar auf alle Unterstützung, Anleitung und Herausforderung zurück.

Ebenso bedanke ich mich bei Prof. Dr. Matthias U. Kassack für die Übernahme des Zweitgutachtens und die Bereitstellung der HDAC-Enzymdaten. In diesem Zuge danke ich auch Nadine Horstick und Lukas Biermann.

Bei Dr. Sanil Bhatia, Julian Schliehe-Diecks und Jia-Wey Tu bedanke ich mich für das andauernde Interesse an meinen Verbindungen, sowie die exzellente Zusammenarbeit die große Teile dieser Dissertation erst möglich gemacht hat.

Prof. Dr. Björn Burkhardt und Dr. Tanja Gangnus danke ich für die Bereitstellung der pharmakokinetischen Daten.

Ein besonderer Dank geht an Prof. Dr. George Burslem und Dr. Adam Green für die Möglichkeit einer Laborrotation und die besondere Zeit in Philadelphia. Ich danke dem HeRa-Reisekostenzuschussprogramm der HHU und den großzügigen Stifterinnen und Stiftern für die Ermöglichung dieser Reise.

Dr. Martina Holz und dem Graduiertenkolleg 2158 danke ich für die Finanzierung und der Möglichkeit des fächer- und nationenübergreifenden Austausches.

Ich danke dem CeMSA@HHU (Center for Molecular and Structural Analytics an der Heinrich Heine Universität) für die Aufnahme der massenspektrometrischen und NMR-spektroskopischen Daten.

Ich danke Laoise, Oksana, Christina, Thomas und Andre für Ihre praktische Unterstützung bei der Synthesearbeit.

Marc und Yodi danke ich für die Einführung in die Welt der pharmazeutischen und medizinischen Chemie, von euch habe ich gelernt, wieviel Leidenschaft und Motivation für die Laborarbeit nötig ist. Ohne Leandro hätte ich keinen Zugang zu der Welt der HDACs gefunden, vielen Dank für deine ständige Hilfsbereitschaft und den stundenlangen fachlichen Austausch.

Bei Beate und Petra möchte ich mich für die synthetische, technische und fachliche Unterstützung bedanken.

---





Eine Promotion ist eine lehrreiche, herausfordernde und charakterbildende Zeit. Ich bin den Menschen dankbar, die mich auf dieser Reise lange begleitet haben, immer ein offenes Ohr hatten und über die Zeit zu einer zweiten Familie geworden sind: ich danke meinen Kolleginnen und Kollegen, meinen Freundinnen und Freunden Hendrik, Saskia, Stefan, Talea, Franzi, Christian, Mona, Olli und Yu Lin.

Zum Schluss danke ich meiner Familie und meinen Freunden für ständige Unterstützung und Ansporn.

---



„Die tapferen Taten in den alten Geschichten und Liedern Herr Frodo: Abenteuer, wie ich sie immer nannte. Ich glaubte, das wären Taten, zu denen die wundervollen Leute in den Geschichten sich aufmachten und nach denen sie Ausschau hielten, weil sie es wollten, weil das aufregend war und das Leben ein bisschen langweilig, eine Art Zeitvertreib, könnte man sagen. Aber so ist es nicht bei den Geschichten, die wirklich wichtig waren oder bei denen, die einem im Gedächtnis bleiben. Gewöhnlich schienen die Leute einfach hineingeraten zu sein – ihre Wege waren nun einmal so festgelegt wie du es ausdrückst. Aber ich nehme an, sie hatten eine Menge Gelegenheiten umzukehren, wie wir. Nur taten sie es nicht. Und wenn sie es getan hätten, dann wüssten wir's nicht, denn dann wären sie vergessen worden. Wir hören von denen, die einfach weitergingen [...]“

- J.R.R. Tolkien: „Der Herr der Ringe“



## Inhalt

---

Abkürzungsverzeichnis.....	I
1. Einleitung .....	1
1.1 Epigenetik .....	1
1.2 Histondeacetylasen (HDAC) .....	4
1.2.1 HDAC Katalysezyklus.....	6
1.2.2 Histondeacetylasen in malignen Erkrankungen .....	7
1.3 Histondeacetylase-Inhibitoren .....	8
1.3.1 Pharmakophor der Histondeacetylase-Inhibitoren .....	10
1.3.2 Selektive Inhibitoren der Klasse I und IIb Histondeacetylasen .....	13
1.3.3 Alkoxyamid-basierte Histondeacetylase-Inhibitoren.....	15
1.4 Proteolysis targeting chimera (PROTAC).....	17
1.4.1 Ubiquitin-Proteasom-System .....	19
1.4.2 HDAC-PROTACs .....	21
1.4.3 HDAC-PROTACs mit nicht-kanonischen E3-Ligase Liganden.....	23
1.4.4 Publikation: HDAC-PROTACs: lessons learned so far.....	24
2. Zielsetzung.....	49
3. Ergebnisse und Diskussion .....	52
3.1 Manuskript: Deciphering the therapeutic potential of novel alkoxyamide-based class I, IIb HDAC inhibitors against therapy-resistant leukemia.....	52
3.1.1 Weiterführende Analyse der Struktur-Aktivitätsbeziehung .....	106
3.2 Darstellung des HDAC-PROTACs <b>7</b> .....	111
3.2.1 Zielstruktur und Retrosynthese des HDAC-PROTACs <b>7</b> .....	111
3.2.2 Synthese des HDAC Liganden von <b>7</b> .....	114
3.2.3 Synthese des E3-Ligase Ligand-Linker Konstruktes <b>8</b> .....	115
3.2.4 Synthese des PROTACs <b>7</b> .....	117
3.2.5 HDAC Degradation durch den HDAC-PROTAC <b>7</b> .....	119

---

3.3 HDAC-PROTACs mit nicht-kanonischen E3-Ligase Liganden .....	122
3.3.1 Zielstrukturen und Retrosynthese der potentiellen PROTACs <b>19</b> , <b>20</b> und <b>24</b> .....	124
3.3.2 Darstellung der HDACi Liganden .....	128
3.3.3 Synthese der E3-Ligase Module .....	133
3.3.4 Synthese der potentiellen PROTACs <b>19</b> , <b>20</b> und <b>24</b> .....	135
3.3.4.1 Synthese der potentiellen PROTACs <b>19</b> und <b>20</b> .....	135
3.3.4.2 Synthese des potentiellen PROTACs <b>24</b> .....	139
4. Zusammenfassung .....	147
5. Experimenteller Teil .....	148
5.1 Material und Methoden .....	148
5.2 Allgemeine Arbeitsvorschrift I (AAV I): Darstellung der Ethylphenylthiazol-carboxylate <b>1b-1z</b> .....	150
5.3 Allgemeine Arbeitsvorschrift II (AAV II): Darstellung der O-Trityl-geschützten Hydroxamate <b>3b-3aa</b> .....	178
5.4 Allgemeine Arbeitsvorschrift III (AAV III): Darstellung der Hydroxamate <b>4b-4aa</b> .....	205
5.5 Allgemeine Arbeitsvorschrift IV (AAV IV): N-Boc-Entschützung .....	261
6. Literaturverzeichnis .....	265
Anhang .....	283
Definition des Eigenanteils .....	283

---

## Abkürzungsverzeichnis

---

### A

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Abb.	Abbildung
Ac	Acetyl
ACN	Acetonitril
AcOH	Essigsäure
AMP	Adenosinmonophosphat
Äq.	Äquivalent
ARID1A	<i>AT-rich interactive domain-containing protein 1A</i> (AT-reiches, interaktive Domäne enthaltenes Protein 1A)
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	<i>area under the curve</i> (Fläche unter der Kurve)

### B

Bcl2	<i>B-cell lymphoma 2</i> (B-Zell Lymphom 2)
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BRD	<i>Bromodomain containing protein</i> (Bromodomäne enthaltendes Protein)
bzw.	beziehungsweise

### C

Cbz	Benzyloxycarbonyl
Cbz-Cl	Chlorameisensäurebenzylester
CDI	Carbonyldiimidazol
CDCl <sub>3</sub>	Deuterchloroform
COMU	1-[(1-(Cyano-2-ethoxy-2-oxo-ethylidene-aminoxy)-dimethyl-amino-morpholino)]uronium hexafluorosphat
COX IV	Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit IV
CRBN	Cereblon

## Abkürzungsverzeichnis

CuAAC	Kupfer-katalysierte Azid-Alkin Cycloaddition
CUL4	Cullin 4
<b>D</b>	
$\delta$	chemische Verschiebung [ppm]
d	Dublett
<i>d</i>	deutero
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DCAF15	<i>DDB1 and CUL4 associated factor 15</i> (DDB1 und CUL4 assoziierter Faktor 15)
DCM	Dichlormethan
dd	Dublett vom Dublett
DDB1	<i>DNA damage binding protein 1</i> (DNA-Schaden bindendes Protein 1)
ddd	Dublett vom Dublett vom Dublett
dddd	Dublett vom Dublett vom Dublett vom Dublett
ddq	Dublett vom Dublett vom Quartett
dest.	destilliert
DIPEA	<i>N, N</i> -Diisopropylethylamin
DMF	<i>N, N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonucleinsäure
dq	Dublett vom Quartett
dt	Dublett vom Triplet
<b>E</b>	
EDC·HCl	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid
<i>et al.</i>	et alii (und andere)
Et <sub>2</sub> O	Diethylether
EtOH	Ethanol
Et <sub>3</sub> SiH	Triethylsilan



## Abkürzungsverzeichnis

### F

FKBP12 *FK506 binding protein 12* (FK506 bindendes Protein 12)

FT Fußtasche

### G

GAPDH Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase

### H

HATU O-(7-Aza-benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorphosphat

HBTU 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorphosphat

HCl/Dioxan Chlorwasserstoff in 1,4-Dioxan gelöst

HDAC Histondeacetylase

HDACi Histondeacetylase-Inhibitor

HHU Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

HPLC Hochleistungsflüssigchromatographie

HSP90 Hitzeschockprotein 90

### I

IAP *Inhibitor of apoptosis* (Inhibitor der Apoptose)

### J

$J$  Kopplungskonstante [Hz]

### K

$K_i$  Inhibitionskonstante [mol/L]

KG Kopfgruppe

KI Kaliumiodid

### L

LC MS Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung

### M

m Multipllett

M Molar [mol/L]

Me Methyl

## Abkürzungsverzeichnis

MeOH      Methanol

### N

n.a.      nicht auswertbar

n.d.      nicht detektiert

Na-ascorbat      Natriumascorbat

NAD<sup>+</sup>      Nicotinamidadenindinukleotid

NaOAc      Natriumacetat

NMI      *N*-Methylimidazol

NMR      Kernspinresonanz

### P

p      Pentett

P      Phosphat

Pd/C      Palladium auf Aktivkohle

pH      negativer dekadischer Logarithmus der Protonen-Konzentration in wässriger Lösung

POI      *protein of interest* (Protein von Interesse)

PPh<sub>3</sub>      Triphenylphosphan

PPi      Pyrophosphat

PROTAC      *Proteolysis targeting chimera* (auf Proteolyse abzielendes chimäres Molekül)

PTM      posttranslationale Modifikation

### Q

q      Quartett

### R

RT      Raumtemperatur

### S

s      Singulett

SG      Schutzgruppe

SIN3      *SWI independent Protein 3* (SWI unabhängiges Protein 3)

## Abkürzungsverzeichnis

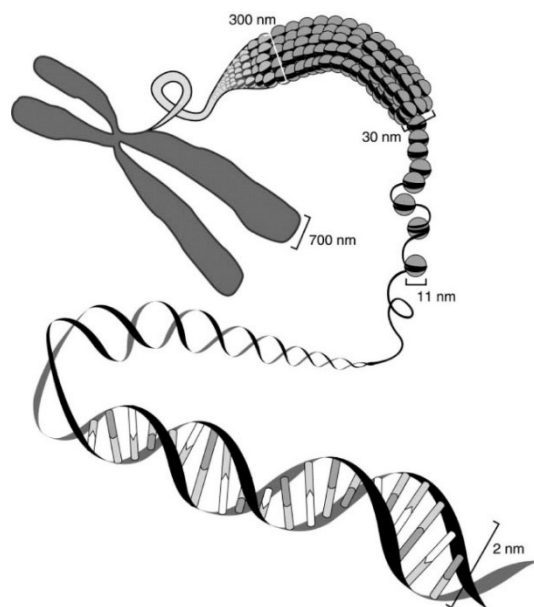
Sirt	Sirtuin
SMC3	<i>Structural maintenance of chromosomes Protein 3</i> (Chromosomenstruktur-erhaltendes Protein 3)
Smp.	Schmelzpunkt [°C]
S <sub>N</sub> Ar	nukleophile aromatische Substitution
ST	Seitentasche
SWI	<i>switch chromatin remodeling complex</i> (Switch-Chromatin-Umstrukturierungskomplex)
<b>T</b>	
t	Triplett
t <sub>r</sub>	Retentionszeit
TBACl	Tetrabutylammoniumchlorid
TCFH	Chlor- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethylformamidiniumhexafluorphosphat
td	Triplett vom Dublett
tdd	Triplett vom Dublett vom Dublett
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
Ts	<i>para</i> -Toluensulfonat
<b>U</b>	
Ub	Ubiquitin
UKD	Universitätsklinikum Düsseldorf
UT	Untere Tasche
<b>V</b>	
VE	Verbindungseinheit
VHL	Von-Hippel-Lindau
<b>Z</b>	
ZBG	Zink-bindende Gruppe

# 1. Einleitung

## 1.1 Epigenetik

Der Begriff „Epigenetik“ ist mehrmals definiert worden. Zuerst definierte *Waddington* 1968 „Epigenetik“ als Zweig der Biologie, der die kausalen Wechselwirkungen zwischen den Genen und ihren Produkten untersucht, die den Phänotyp hervorbringen.<sup>1</sup> Zuletzt definierte *Bird* 2007 „Epigenetik“ als die strukturelle Anpassung von Chromosombereichen, um veränderte Aktivitätszustände zu registrieren, zu signalisieren oder aufrechtzuerhalten.<sup>2</sup> Beide Definitionen betonen, dass die Komplexität des Phänotyps nicht alleine durch die Erbinformation zu erklären ist, sondern durch die Regulation desselben.

Die menschliche Erbinformation ist in der Desoxyribonukleinsäure (DNS) kodiert. Diese befindet sich als Chromosom kondensiert im Zellkern. Die kleinste Organisationseinheit eines Chromosoms ist das Nukleosom. Ein Nukleosom besteht aus acht Histonproteinen und circa 150 Basenpaaren DNS (Abbildung 1). Durch die Interaktion zwischen positiv geladenen  $\epsilon$ -Aminogruppen von Lysin-Seitenketten der Histone und dem negativ geladenen Phosphat-Rückgrat der DNS ergibt sich der dichte Verpackungsgrad der DNS.<sup>3</sup>



**Abbildung 1: Schematische strukturelle Organisation des DNS-Doppelstranges zu Chromosomen in menschlichen Zellen mit jeweiliger Größenordnung. Abbildung übernommen aus Weier *et al.*<sup>4</sup>**

## 1. Einleitung

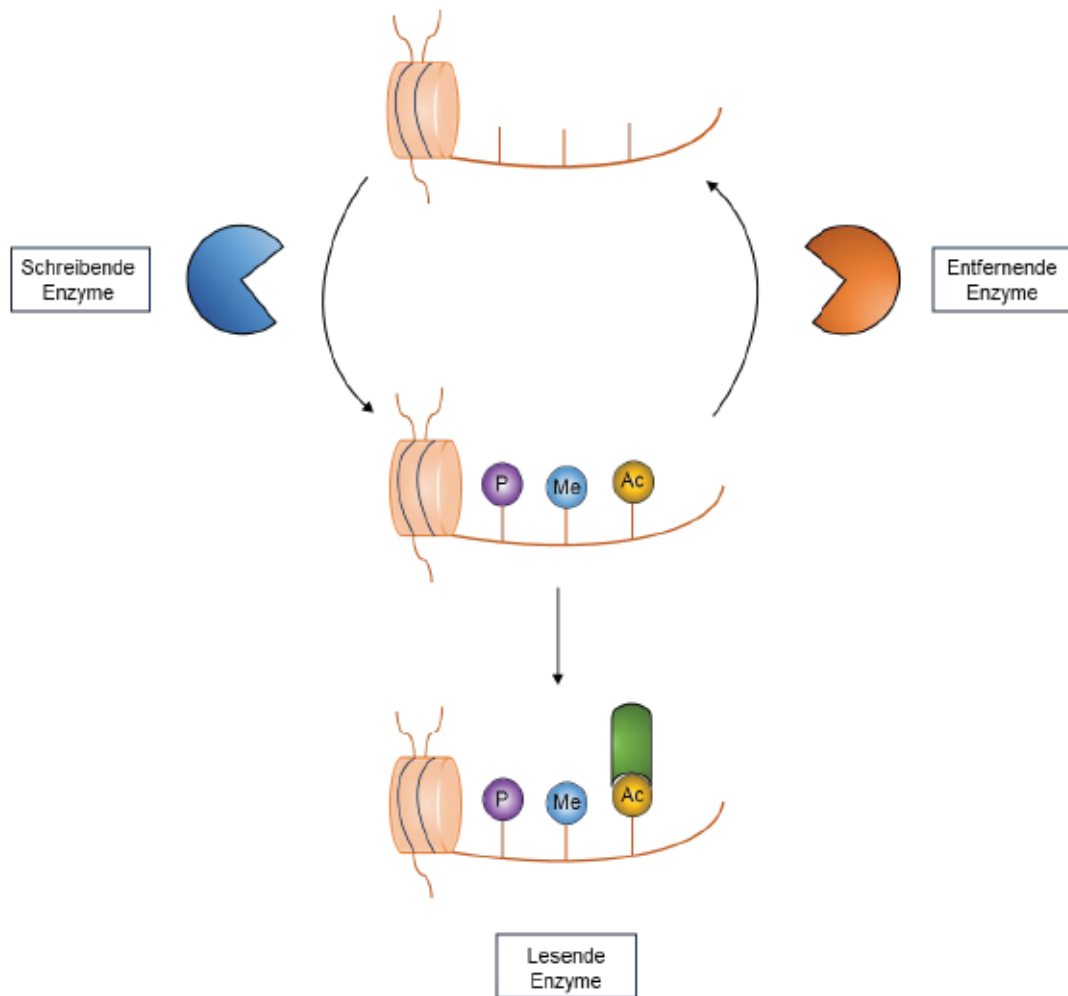
Modifikationen von Histonproteinen haben somit einen direkten Einfluss auf den Zustand des Chromatins und beeinflussen damit die Transkription. Posttranslationale Modifikationen (PTM) sind kovalente Modifikationen an einem Protein, die nach der ribosomalen Translation eingeführt wurden. Die meisten PTM sind reversibel und werden durch verschiedene Klassen von Enzymen hinzugefügt, entfernt oder erkannt.<sup>5</sup>

PTM wie *N*-Methylierung von Lysin und Argininen, Acetylierung der  $\epsilon$ -Aminogruppe von Lysin oder *O*-Phosphorylierung von Serin, Threonin oder Tyrosinen verändern direkt die Transkription von Genen und sind deshalb wichtige epigenetische Modifikationen.<sup>6</sup>

Zwei große Klassen von Enzymen regulieren die Einführung und die Entfernung dieser Histon-PTM. Zum einen die sogenannten „schreibenden“ Enzyme, die posttranslationale Modifikationen an Histone hinzufügen. Dazu gehören beispielsweise Histonacetylasen, Histonmethyltransferasen oder Histonkinasen. Zum anderen die „entfernenden“ Enzyme, diese katalysieren die Entfernung dieser postrationalen Modifikationen. Hierzu gehören unter anderem die Histondeacetylasen (HDAC) (Kap. 1.2), die Histondemethylasen und die Histonphosphatasen.<sup>7</sup>

Zusätzlich zu den zwei Klassen von Enzymen, die die Einführung und Entfernung von Histon-PTM regulieren, erkennt eine dritte Enzymklasse PTMs, ohne diese zu verändern. Die Klasse der „lesenden“ Enzyme erkennt PTM und löst dann weitere Signalkaskaden aus. Zu der Klasse der lesenden Enzyme gehören unter anderem die Bromodomäne-enthaltenden Proteine, die den Acetylierungsstatus von Histonen erkennen (Abbildung 2).<sup>8</sup>

## 1. Einleitung



**Abbildung 2:** Die Regulation posttranslationaler Modifikationen von Histonen durch „schreibende“ (blau) und „entfernende“ (orange) Enzyme. „Lesende“ Enzyme interagieren mit posttranslationalen Veränderungen von Histonen, ohne diese zu verändern. P = Phosphat, Me = Methyl, Ac = Acetyl

## 1. Einleitung

### 1.2 Histondeacetylasen (HDAC)

HDAC sind „entfernende“ Enzyme die PTM von Proteinen entfernen. Diese Klasse von Enzymen katalysiert die Abspaltung von Acetylgruppen oder Acylgruppen von  $\epsilon$ -ständigen Aminogruppen von Lysinen oder anderen biogenen (Poly-)Aminen. Die humanen HDAC-Enzyme werden nach ihrer Sequenzhomologie zu Hefeproteinen in vier Klassen eingeteilt. Die Enzyme der Klassen I, II und IV sind zinkabhängige Enzyme, während die Enzyme der Klasse III, auch Sirtuine genannt,  $\text{NAD}^+$  als Kofaktor rekrutieren.<sup>9</sup>

HDAC 1, 2, 3 und 8 bilden die Klasse I der HDAC-Enzyme. Während HDAC 1, 2 und 3 sich vorwiegend im Nukleus befinden<sup>10</sup>, ist HDAC 8 dagegen vor allem im Zytoplasma lokalisiert.<sup>11</sup> HDAC 1, 2 und 3 sind Bestandteile von Multiproteinkomplexen und interagieren in den Komplexen mit Transkriptionsfaktoren und Chomatin.<sup>12,13</sup> Insbesondere HDAC 1 und HDAC 2 sind mit einer Sequenzhomologie von 82 % strukturell eng miteinander verwandt und übernehmen teilweise dieselben physiologischen Funktionen.<sup>14,15</sup> HDAC 8 dagegen deacetyliert Nicht-Histonproteine wie SMC3<sup>16</sup> oder den Tumorsuppressor ARID1A<sup>17</sup> und entfernt langkettige Acylgruppen effektiver als Acetylgruppen von  $\epsilon$ -Aminogruppen von Lysinen.<sup>18</sup>

HDACs der Klasse II sind innerhalb der Klasse in zwei Untergruppen unterteilt. Die HDAC-Enzyme 4, 5, 7 und 9 bilden die Klasse IIa. Diese Subklasse ist gekennzeichnet durch eine deutlich reduzierte Deacetylase Aktivität im Vergleich zu den Klasse I HDAC-Enzymen. Diese Reduktion der katalytischen Aktivität ist zurückzuführen auf eine Mutation im aktiven Zentrum. Weiterhin ist die zelluläre Lokalisation der Klasse IIa HDAC-Enzyme flexibel, durch deren Möglichkeit zwischen Zytoplasma und Nukleus zu wechseln.<sup>9</sup>

HDAC 6 und die HDAC 10 bilden die Enzyme der Klasse IIb. Beide Enzyme sind vor allem im Zytoplasma lokalisiert<sup>19,20</sup>. HDAC 6 besitzt als einziges HDAC-Enzym zwei katalytisch aktive Zentren und deacetyliert zytoplasmatische Proteine wie z.B. Tubulin oder HSP90.<sup>21</sup> Bisher sind keine Substrate von HDAC 10 beschrieben worden, allerdings deacetyliert HDAC 10 Polyamine.<sup>22</sup>

Die Klasse III HDAC-Enzyme sind eine heterogene Gruppe von Enzymen, die sich in ihrer zellulären Lokalisation stark unterscheiden. Gemeinsam haben die Enzyme dieser Klasse, dass sie einen zinkunabhängigen Deacetylierungsmechanismus besitzen und stattdessen  $\text{NAD}^+$  als Cofaktor verwenden.<sup>23</sup>

Klasse IV wird von HDAC 11 gebildet, welche vor allem im Zellkern lokalisiert ist.<sup>24</sup> Zu den Substraten von HDAC 11 gehören vor allem  $\epsilon$ -ständige Aminogruppen von Substrat-Lysinen, die mit langkettigen Fettsäuren acyliert sind (Abbildung 3).<sup>25</sup>

## 1. Einleitung

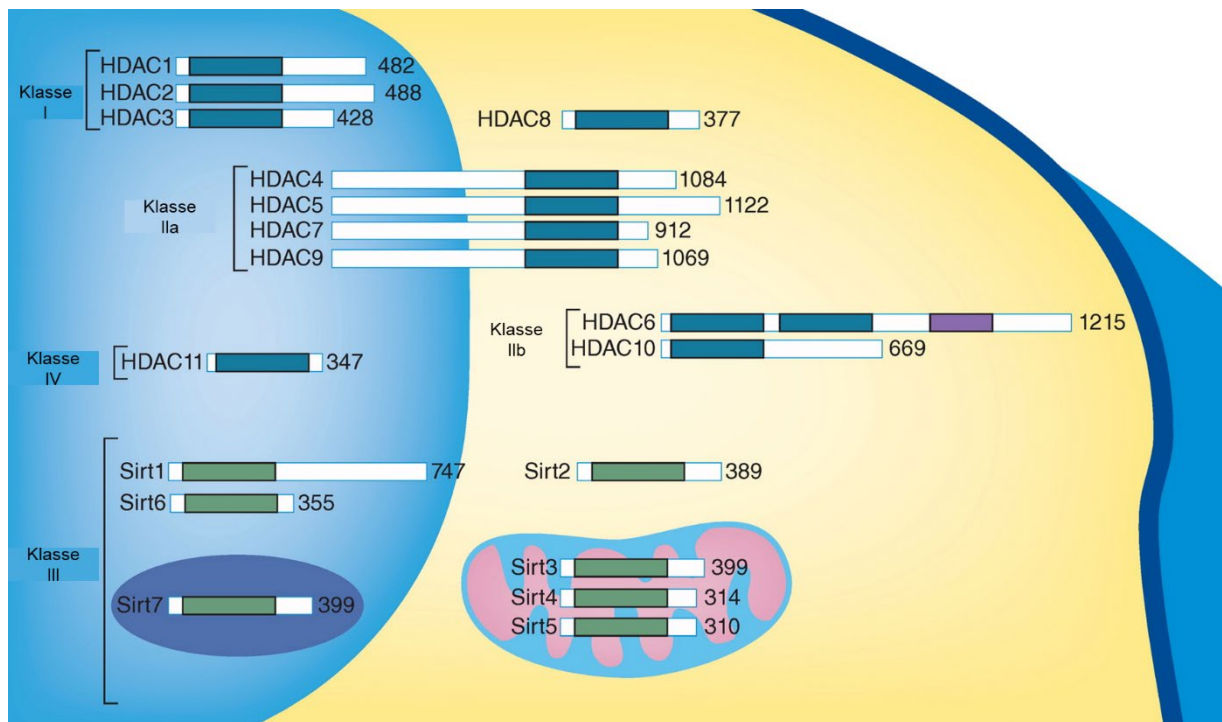


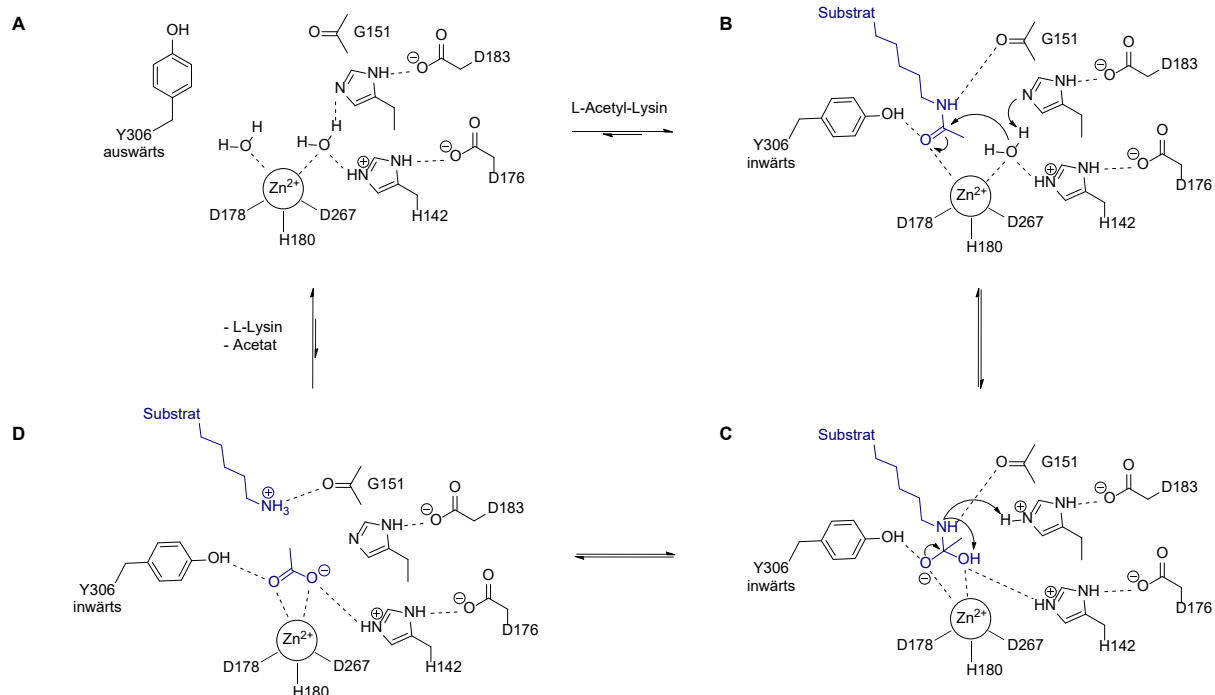
Abbildung 3: Zelluläre Lokalisation der Histondeacetylasen (HDAC)-Enzyme und deren Einteilung in vier Klassen. Die Nummern hinter den jeweiligen Balken geben die Länge der Aminosäuresequenz an. Die dunkelblauen Balken markieren das zinkabhängige aktive Zentrum, der grüne Balken markiert das NAD<sup>+</sup>-abhängige aktive Zentrum. Der violette Balken in HDAC 6 gibt die Ubiquitin-bindende Domäne an. Abbildung entnommen aus Fischer *et al.*<sup>26</sup>

Drei der vier HDAC-Klassen sind auf ein Zinkion als Kofaktor angewiesen. Der katalytische Mechanismus und die biologische Bedeutung dieser Metalloenzyme ist bisher eingehender untersucht als die der NAD<sup>+</sup> abhängigen HDAC-Enzyme der Klasse III.<sup>27,28</sup>



# 1. Einleitung

## 1.2.1 HDAC Katalysezyklus



**Abbildung 4: Mechanismus der Deacetylierung eines  $\epsilon$ -acetylierten L-Lysins durch HDAC 8. Abbildung modifiziert nach Lombardi *et al.*<sup>29</sup>**

Stellvertretend für die Klasse I, II und IV HDAC-Enzyme wird im Folgenden der Deacetylierungsmechanismus der zinkabhängigen HDAC-Enzyme exemplarisch an dem Deacetylierungsmechanismus von HDAC 8 erläutert. Aufgrund des hohen Konservierungsgrades der an dem Mechanismus beteiligten Aminosäuren ist bei allen zinkabhängigen HDAC-Enzymen, mit Ausnahme der Klasse IIa HDAC-Enzyme, von einem ähnlichen Mechanismus auszugehen.<sup>30,31</sup>

Im aktiven Zentrum von HDAC 8 wird das katalytische Zinkion durch die Asparaginsäuren D178 und D267 und Histidin H180 koordiniert. Zwei weitere Valenzen des Zinkions werden durch zwei Wassermoleküle besetzt. (Abbildung 4 A) Die Bindung des  $\epsilon$ -acetylierten-L-Lysins verdrängt eines dieser Wassermoleküle aus dem aktiven Zentrum. Im substratgebundenen Zustand polarisiert das Zinkion sowohl die Carbonylgruppe des Amids als auch das verbliebene Wassermolekül und ermöglicht damit den nukleophilen Angriff des Wassermoleküls an das Carbonyl-Kohlenstoffatom des Acetyl-Restes. Das Histidin H142 trägt zu der Polarisierung des Wassermoleküls bei und fängt das freiwerdende Proton ab (Abbildung 4 B). Das gebildete tetraedrische Intermediat wird durch eine Wasserstoffbrücke zu dem Tyrosin Y306 stabilisiert (Abbildung 4 C) und zerfällt schließlich zu dem deacetylierten L-Lysin und Acetat (Abbildung 4 D).<sup>32</sup>

### 1.2.2 Histondeacetylasen in malignen Erkrankungen

Epigenetische Dysregulationen sind ein gemeinsames Merkmal aller Krebszellen. Einige Autoren gehen davon aus, dass die epigenetische Dysregulation die Ursache von malignen Erkrankungen ist und alle Eigenschaften von Krebszellen beeinflusst.<sup>33,34</sup> Insofern überrascht es nicht, dass in vielen malignen Erkrankungen speziell HDAC-Enzyme, als Schlüsselenzyme der epigenetischen Regulation, dysreguliert sind.

Die Überexpression von HDAC-Enzymen ist verbunden mit einer reduzierten Expression von Tumorsuppressorgenen.<sup>35</sup> Für den Patienten ist dies verbunden mit einer verschlechterten klinischen Prognose. Beispielsweise wurden in Fällen akuter lymphoblastischer Leukämie bei Kindern erhöhte Level von HDAC 3, HDAC 7 und HDAC 9 assoziiert mit einem verringerten fünfjährigen, ereignisfreien Überleben der Patienten.<sup>36</sup>

Dem entgegenstehend konnte für einige Krebs-Entitäten eine tumorsupprimierende Eigenschaft von HDAC-Enzymen gezeigt werden. Zum Beispiel sind niedrige HDAC 1-Spiegel bei Patienten mit Osteosarkom assoziiert mit einer aggressiveren Form des Tumors und früher Metastasierung.<sup>37</sup>

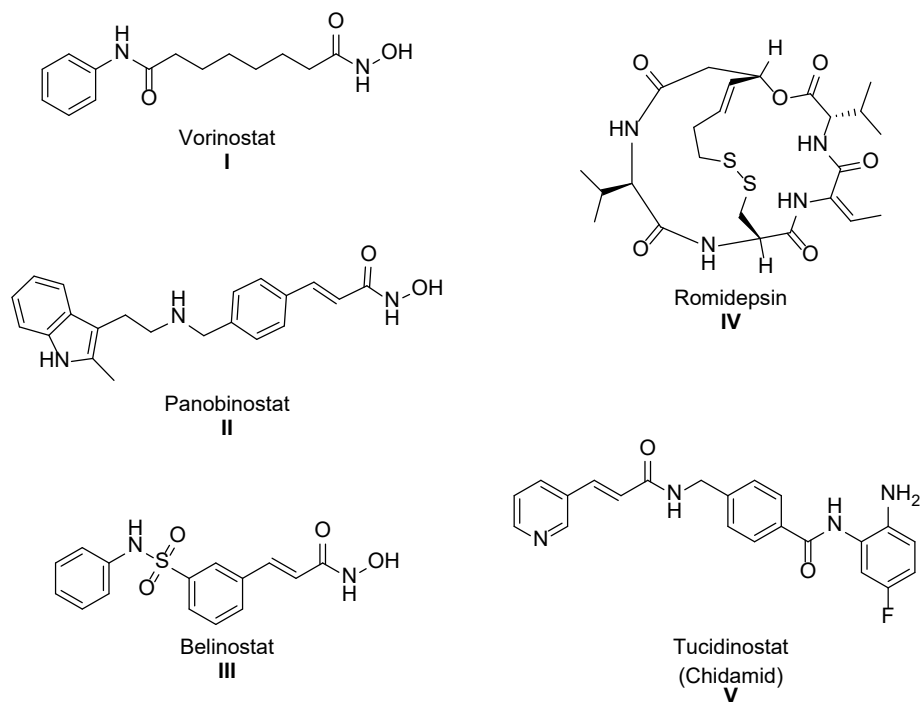
Diese ambivalente Rolle von HDAC-Enzymen in malignen Erkrankungen wird weiter unterstrichen durch das paradoxe Ergebnis, dass der klinische Erfolg von Klasse I-selektiven Inhibitoren<sup>38</sup> nicht bedeutet, dass die Klasse I HDAC-Enzyme eine generelle tumorigene Eigenschaft besitzen. Im Gegenteil deuten *in vivo* Untersuchungen eher auf tumorsupprimierende Eigenschaften dieser Klasse von HDAC-Enzymen.<sup>39,40</sup> Die Autoren dieser Studien legen nahe, dass eine Minimalaktivität von HDAC-Enzymen für eine normale Zellentwicklung notwendig bleibt. Santoro *et al.* zeigte daraufhin, dass HDAC 1 in verschiedenen Stadien der Tumorigenese entweder tumorsupprimierende oder onkogene Eigenschaften besitzt.<sup>41</sup>

Das Beispiel von HDAC1 illustriert die Komplexität der Biologie von HDAC-Enzymen in malignen Erkrankungen und unterstreicht die Notwendigkeit der individuellen Betrachtung einzelner HDAC-Enzyme in einer spezifischen Erkrankung bzw. in einem Tumorzelltyp.

## 1.3 Histondeacetylase-Inhibitoren

Die Überexpression oder Überaktivität von HDAC-Enzymen in einigen malignen Erkrankungen und die Rekrutierung von HDAC-Enzymen durch onkogene Fusionsproteine bildet die Rationale zu der klinischen Entwicklung von HDAC-Inhibitoren (HDACi).<sup>42,43</sup> Die beobachtete spezielle Vulnerabilität von hämatologischen Tumoren gegenüber HDAC-Inhibition führte zu der Zulassung von fünf HDACi zur Behandlung von malignen Erkrankungen des blutbildenden Systems.<sup>44</sup>

Vorinostat war 2006 der erste zugelassene HDACi zur Behandlung des kutanen T-Zell-Lymphoms.<sup>45</sup> Romidepsin und Panobinostat folgten mit derselben Indikation. Tucidinostat (auch bekannt unter der Bezeichnung Chidamid), Belinostat und ebenfalls Romidepsin sind zugelassen zur Behandlung des peripheren T-Zell-Lymphoms (Abbildung 5).<sup>46-48</sup>



**Abbildung 5: Strukturen der fünf zugelassenen Histondeacetylaseinhibitoren.**

Alle zugelassenen HDACi inhibieren die zinkabhängigen HDAC-Enzyme der Klassen I, II und IV. Ein Inhibitor der Klasse III HDACs hat noch keine klinische Signifikanz erreichen können. Unter den zugelassenen HDAC-Inhibitoren inhibiert nur Panobinostat alle HDAC-Klassen in einer ähnlichen Ausprägung und wird deswegen als „Paninhibitor“ bezeichnet. Vorinostat und Belinostat besitzen beide ein vergleichbares Selektivitätsprofil und inhibieren vor allem die Klasse I HDAC-Enzyme und HDAC 6. Ältere Literatur beschreibt Belinostat und Vorinostat noch als Paninhibitoren mit einem ähnlichen Selektivitätsprofil wie Panobinostat.<sup>49</sup> Diese

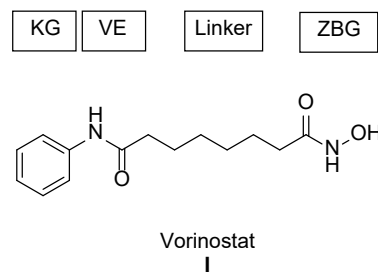
## 1. Einleitung

Daten basieren allerdings auf einem HDAC-Enzym Assay, der durch das verwendete Substrat oder durch Kopurifikation von Klasse I mit Klasse IIa Enzymen die Inhibition von Klasse IIa Enzymen überrepräsentierte. Lahm *et al.* und Bradner *et al.* konnten geeignetere *in vitro* Substrate für die Detektion der Klasse IIa Enzymaktivität vorschlagen.<sup>50,51</sup> Diese verbesserten Assaybedingungen und komplementäre Proteom Daten validieren Vorinostat und Belinostat als HDAC Klasse I und IIb Inhibitoren ohne relevante Affinität zu den Klasse IIa Enzymen.<sup>52</sup>

Die nicht-hydroxamsäurebasierten HDACi Romidepsin und Tucidinostat inhibieren präferentiell die Klasse I HDAC neben HDAC 10 und HDAC 11.<sup>10</sup>

## 1. Einleitung

### 1.3.1 Pharmakophor der Histondeacetylase-Inhibitoren



**Abbildung 6: Das HDAC Pharmakophormodell eines Histondeacetylaseinhibitors am Beispiel von Vorinostat. Die Zink-bindende Gruppe (ZBG) ist über einen Linker und eine Verbindungseinheit (VE) mit der Kopfgruppe (KG) verbunden.**

Als erster zugelassener HDACi ist Vorinostat prototypisch für das HDACi-Pharmakophor der zinkabhängigen HDAC-Enzyme. Dieses grundlegende Pharmakophormodell ist in vier Abschnitte unterteilt: die Zink-bindende Gruppe, der hydrophobe Linker, die Verbindungseinheit und die Kopfgruppe (Abbildung 6).

Die Zink-bindende Gruppe (ZBG) interagiert mit dem Zinkion im aktiven Zentrum der HDACs. Die meist untersuchten ZBG sind Hydroxamsäuren, *ortho*-Aminoanilide und Trifluormethyl-1,2,4-oxadiazole.<sup>53</sup> Die verwendete ZBG beeinflusst neben der enzyminhibitorischen Potenz auch die Enzymselektivität der HDACi. Hydroxamsäure-basierte Inhibitoren liefern tendenziell die potentesten HDACi-Enzyminhibitoren mit HDAC-Enzymhemmung im nanomolaren Bereich.<sup>54,55</sup> Die Hydroxamsäure-ZBG erlaubt in Kombination mit der Modifikation der anderen Pharmakophorbestandteile die Darstellung von HDAC 6, HDAC 8, HDAC 10, HDAC 11 und Klasse IIa selektiven HDACi.<sup>10</sup> *Ortho*-Aminoanilide sind in der Regel weniger potente Enzyminhibitoren als Hydroxamsäure-basierte HDACi, dafür weisen HDACi-Inhibitoren mit dieser ZBG eine Präferenz für die Klasse I HDACs auf. Mit *ortho*-Aminoanilid basierten HDACi sind HDAC 1/2 und HDAC 3 selektiv adressierbar.<sup>56,57</sup> Die Trifluormethyl-1,2,4-oxadiazol ZBG ist eine nicht-chelatisierende ZBG und ermöglicht durch ihre Präferenz zu den HDAC Klasse IIa Enzymen die Darstellung selektiver Klasse IIa HDACi.<sup>58</sup>

Die Interaktion zwischen der ZBG und dem katalytisch aktiven Zinkion trägt bedeutend zu der Affinität und der Bindungskinetik eines HDACi zu dem HDAC-Enzym bei. So sind Hydroxamsäure-basierte HDACi als schnell bindende aber auch schnell abdiffundierende Inhibitoren beschrieben, während *ortho*-Aminoanilide langsam binden und langsam abdiffundieren.<sup>59,60</sup> Neuere Untersuchungen arbeiten den Einfluss der HDAC-Komplexbestandteile und der anderen Bestandteile des HDACi Pharmakophors auf die Bindungskinetik heraus.<sup>61–63</sup> Die restlichen HDACi Pharmakophorbestandteile interagieren mit

## 1. Einleitung

den Aminosäuren des HDAC-Enzyms, die das weitere aktive Zentrum bilden, und beeinflussen so Bindungskinetik, Selektivität und inhibitorische Potenz des HDACi.<sup>62,64</sup>

Das aktive Zentrum befindet sich am Ende eines hydrophoben Tunnels, gebildet aus den Seitenketten aromatischer Aminosäuren. Der hydrophobe Linker interagiert mit diesen Seitenketten. Übliche Chemotypen sind hier neben Alkylketten,  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Carbonsäurederivate und arylische Linker.<sup>10</sup>

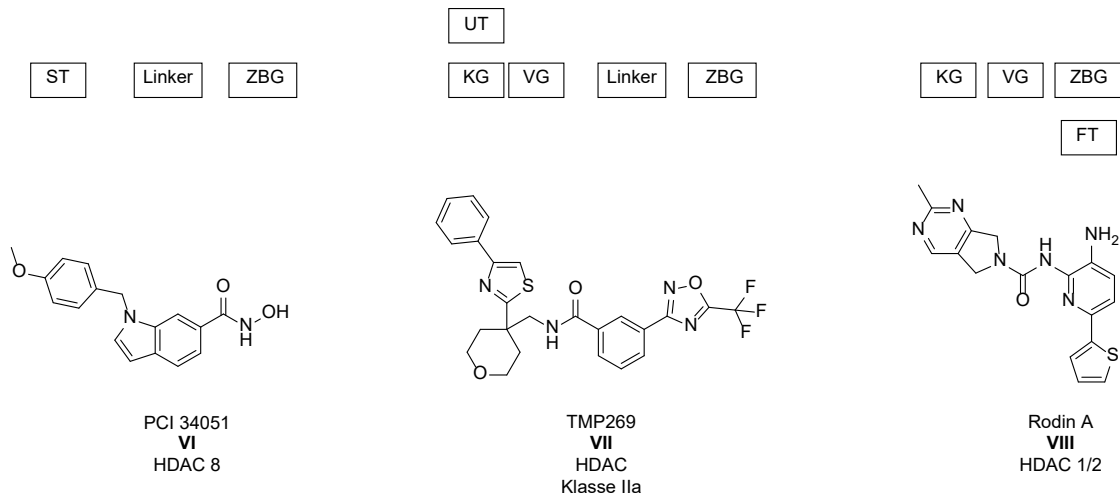
Die Verbindungseinheit verbindet den Linker mit der Kopfgruppe und interagiert mit den Aminosäuren, die am Übergang zwischen dem hydrophoben Tunnel und der Oberfläche des HDAC-Enzyms nahe des aktiven Zentrums liegen. Amide, Sulfonamide, Amine, Alkoxyamide und Alkoxyharnstoffe sind etablierte Verbindungseinheiten (Abbildung 5).<sup>65,66</sup>

Die Kopfgruppe interagiert mit den Aminosäuren, die sich an der lösungsmittlexponierten Oberfläche nahe dem aktiven Zentrum des jeweiligen HDAC-Enzyms befinden. Der Beitrag der Kopfgruppe eines HDACi zur HDAC-Enzyminhibition wird besonders deutlich an den HDACi, die ohne ZBG HDAC-Enzyminhibition im Bereich von Vorinostat aufweisen.<sup>64,67</sup> Dieser Teil des klassischen Pharmakophormodells toleriert die größten Strukturvariationen und beeinflusst nicht nur Potenz, sondern auch die Selektivität der HDACi.<sup>68</sup> Dabei tendieren HDACi mit besonders raumfüllenden Kopfgruppen zu einer Präferenz für HDAC 6, da dieses HDAC-Enzym eine besonders flache Region um die Substratbindetasche besitzt, die große Substituenten toleriert.<sup>69</sup>

Die Charakterisierung von weiteren Bindetaschen in einigen HDAC-Enzymen bzw. HDAC-Enzym Klassen und die Entwicklung von selektiven Inhibitoren, die diese Taschen adressieren, machte es notwendig, das klassische Pharmakophormodell zu erweitern. *Sippl* schlug 2018 eine Erweiterung vor und führte sie 2021 weiter aus.<sup>68,70</sup> Dieses erweiterte Pharmakophormodell berücksichtigt Subtaschen einzelner HDAC-Enzyme bzw. HDAC-Enzymklassen und erklärt die Selektivitäten einiger HDACi (Abbildung 7).<sup>57,58,71</sup> So besitzt HDAC 8 eine spezielle Seitentasche (ST) die von PCI 34051 durch einen Methoxybenzyl-Substituenten adressiert wird. TMP269 ist ein Klasse IIa selektiver HDACi durch einen Phenylring, der mit der „unteren Tasche“ (UT) dieser HDAC Enzymklasse interagiert. Ein weiteres Beispiel ist der HDAC 1 und 2 selektive HDACi Rodin A, dessen 2-Thienyl-Substituent hierbei eine Fußtasche (FT) in HDAC 1 und 2 adressiert.

Trotzdem hat das klassische Pharmakophormodell nichts an seiner Relevanz verloren, da alle zugelassenen HDACi und alle HDACi, die zurzeit in klinischen Studien untersucht werden, dem klassischen Pharmakophormodell folgen.(Abbildung 5)<sup>10,52</sup>

## 1. Einleitung



**Abbildung 7: Beispiele von Histondeacetylaseinhibitoren (HDACi), die sich durch das erweiterte HDACi Pharmakophormodell beschreiben lassen, und die HDAC-Enzyme, die von ihnen inhibiert werden. ST = Seitentasche, UT = untere Tasche, FT = Fußtasche**

### 1.3.2 Selektive Inhibitoren der Klasse I und IIb Histondeacetylasen

Ein Hauptfokus der klinischen Forschung an HDACi liegt in der Entwicklung und Evaluation von HDAC Klasse I und IIb Inhibitoren. Die Enzyme dieser beiden Klassen weisen distinkte strukturelle Unterschiede auf, die für das Design selektiver HDACi genutzt wurden. Neben selektiven Inhibitoren der Klassen I und IIb haben mit Vorinostat und Belinostat unselektive Inhibitoren beider Klassen klinische Signifikanz erreicht.

Die Klasse I HDACs, HDAC 1, 2 und 3, zeichnen sich durch eine sogenannte Fußtasche (FT), eine lipophile Tasche in unmittelbarer Nähe zu dem Zinkion aus. Das Adressieren dieser Fußtasche durch *ortho*-Aminoanilid-basierte HDACi ermöglicht die Darstellung HDAC 1, 2 und 3 selektiver Inhibitoren. Diese Fußtasche ist bei HDAC 1 und 2 flexibler und größer als bei HDAC 3. Folglich können durch Substitution des Phenylrings der *ortho*-Aminoanilid-ZBG mit raumfüllenden Substituenten HDAC1/2 selektive Inhibitoren erhalten werden.<sup>56</sup>

Dem Design selektiver HDAC Klasse IIb-Inhibitoren liegen unterschiedliche Prinzipien zugrunde. HDAC 6 besitzt im Vergleich zu den anderen HDAC-Enzymen einen breiteren hydrophoben Tunnel und eine flachere Substratbindetasche, sodass Inhibitoren mit breiten Phenyl-Linkern und/oder verzweigten, raumfüllenden Substituenten eine HDAC 6 Selektivität besitzen.<sup>69</sup> HDAC 10 ist involviert in der Deacetylierung von biogenen Polyaminen, demzufolge weisen HDACi mit einem basischen Zentrum im Linker oder in der Kopfgruppe eine Präferenz für HDAC 10 auf.<sup>72,73</sup>

In der klinischen Entwicklung von HDACi spielen duale Inhibitoren von HDAC Klasse I und IIb eine prominente Rolle. Mit Vorinostat und Belinostat weisen zwei von fünf zugelassenen HDACi dieses Selektivitätsprofil auf. Ein Grund für diese überproportionale gute klinische Effektivität kann in der dualen Hemmung von Klasse I und HDAC 6 liegen. Duale Klasse I/IIb-Inhibitoren vereinen die zytotoxische Effektivität in der Monotherapie mit dem Potential, bereits klinisch etablierte Kombinationstherapien patientenrelevant zu ergänzen. Zurzeit befinden sich mehrere Kombinationen aus Klasse I/IIb HDACi mit diversen anderen zytostatischen Arzneistoffen in klinischen Studien.<sup>74</sup>

Ein Hauptgrund für die Entwicklung selektiver HDACi sind die dosislimitierenden unerwünschten Arzneimittelwirkungen der zugelassenen, unselektiven Pan- und Klasse I/IIb Inhibitoren.<sup>75,76</sup> Die Inhibition einzelner HDAC-Enzyme sollte eine bessere Verträglichkeit bei gleichzeitigem Beibehalten der tumorsuppressiven Wirkung erzielen. Bisher allerdings blieben selektive Inhibitoren gegenüber dualen Klasse I/IIb-Inhibitoren in der klinischen Effektivität zurück.



## 1. Einleitung

Die zytotoxische Wirkung von HDACi in der Monotherapie ist zurückzuführen auf die Inhibition der Klasse I Enzyme.<sup>77</sup> Nichtsdestotrotz ist in verschiedenen *in vitro* Modellen die selektive Klasse I-Inhibition nicht ausreichend, um konsistent eine verbesserte zytotoxische Wirkung gegen die untersuchten Leukämie- oder Brustkrebszellen im direkten Vergleich zu Pan- oder Klasse I/IIb Inhibitoren zu zeigen.<sup>78,79</sup> Bestätigt werden konnte dieser Trend auch in kultivierten Zellen von an kutanem T-Zell-Lymphom erkrankten Patienten. Dort zeigte sich die Überlegenheit einer Kombination eines Klasse I/IIb-Inhibitors mit dem Bcl2-Inhibitor Venetoclax gegenüber der Kombination eines Klasse I selektiven Inhibitors mit Venetoclax.<sup>80</sup>

Die reine HDAC 6-Inhibition bleibt ebenso in Bezug auf die *in vitro* Zytotoxizität gegenüber Klasse I/IIb-Inhibitoren zurück.<sup>81,82</sup> Diese limitierte *in vitro* Effektivität von HDAC 6-Inhibitoren in Monotherapie überträgt sich auch auf die klinische Effektivität. So zeigte der HDAC 6-präferentielle Inhibitor Ricolinostat in der Monotherapie bei refraktärem und/oder rezidivierendem multiplem Myelom kein signifikantes klinisches Ansprechen. Dies stellt den klinischen Nutzen von HDAC 6-Inhibitoren in Frage, aber dieselbe Studie unterstreicht den Wert von Ricolinostat als gut verträglichen Kombinationspartner mit bereits etablierten Chemotherapeutika.<sup>83</sup> Dieses Ergebnis wurde zuletzt von Zeleke *et al.* mit einer Studie an Brustkrebspatientinnen bestätigt.<sup>84</sup> Somit konnte ein klinisch relevanter Nutzen der HDAC 6-Inhibition nur als Kombinationspartner mit verschiedenen Chemotherapeutika in verschiedenen malignen Erkrankungen gezeigt werden.

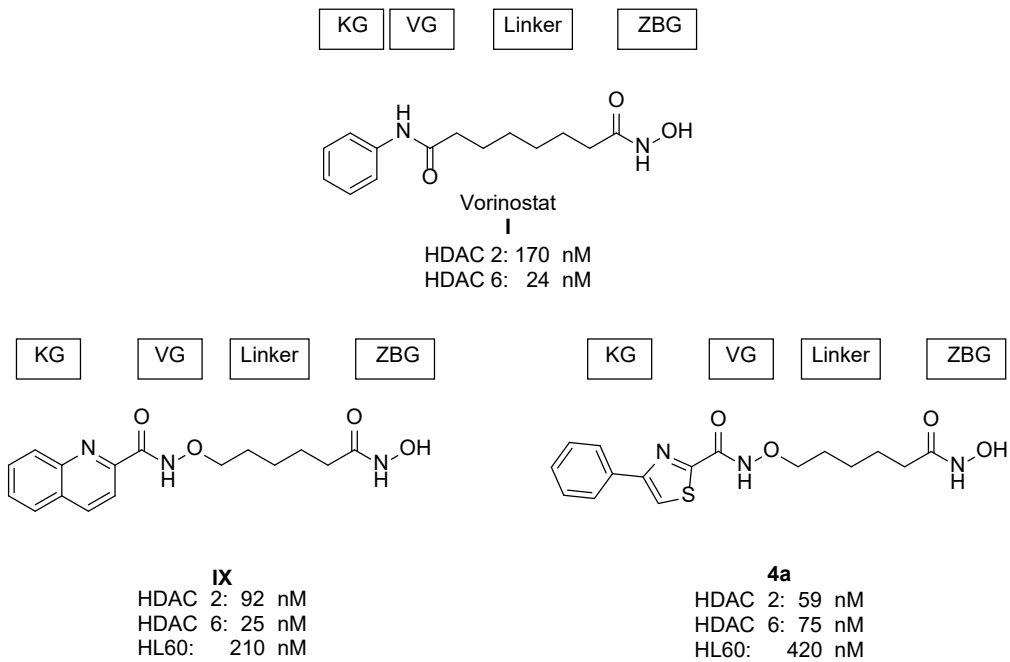
Moderne Klasse I/IIb-Inhibitoren sollten deswegen ein ausbalanciertes HDAC Klasse I und IIb-Inhibitionsprofil aufweisen, um die Effektivität der HDAC Klasse I-Inhibition mit der guten klinischen Verträglichkeit selektiver HDAC 6-Inhibitoren zu verbinden.

### 1.3.3 Alkoxyamid-basierte Histondeacetylase-Inhibitoren

Die Arbeitsgruppe *Kurz* konnte durch einen bioisosteren Amid-Alkoxyamid Austausch in Kombination mit gezielten Modifikationen der Kopfgruppe HDACi mit nanomolarer Inhibition von HDAC 2 und HDAC 6 darstellen. Vertreter dieser Klasse von Alkoxyamid-basierten HDACi zeigten potente Aktivität gegen Leukämiezellen sowie gegen solide Tumore. Die *in vitro* Kombination Alkoxyamid-basierter HDACi mit den zugelassenen Chemotherapeutika Cisplatin oder Bortezomib zeigte synergistische zytotoxische Effekte und erweiterte damit deren Anwendungsmöglichkeiten.<sup>65,85</sup> Die Effektivität in der Monotherapie zusammen mit der Möglichkeit der Kombinationstherapie mit verschiedenen zytostatischen Arzneistoffen liefert die Basis für die weitere präklinische Entwicklung Alkoxyamid-basierter HDACi.

Alle Alkoxyamid-basierten HDACi besitzen als strukturelle Gemeinsamkeit die Hydroxamsäure als ZBG, einen Alkyllinker und die Alkoxyamid-Verbindungseinheit. *Dr. Leandro A. Alves-Avelar* aus der Arbeitsgruppe *Kurz* erarbeitete durch die Modifikation der Kopfgruppe HDACi, die in ihrer HDAC-Enzyminhibition an den strukturell vergleichbaren, zugelassenen HDACi Vorinostat herankamen oder übertrafen (Abbildung 8).<sup>65</sup> Insbesondere der Phenylthiazol-basierte HDACi **4a** wies neben nanomolaren Inhibition von HDAC-Enzymen auch eine potente Aktivität gegen Leukämiezellen auf. Der terminale Phenylring von **4a** bietet einen Ansatzpunkt für eine medizinalchemische Optimierung zur Steigerung der HDAC-Enzyminhibition sowie der antileukämischen Aktivität. Bisher wurden in den Vorarbeiten von *Dr. Leandro A. Alves-Avelar* vor allem strukturell diverse Kopfgruppen untersucht, eine gezielte Optimierung der vielversprechendsten Kopfgruppe und die *in vivo* Validierung der Alkoxyamid-basierten HDACi stehen noch aus.<sup>65,86</sup>

## 1. Einleitung



**Abbildung 8: Die Alkoxyamid-basierten Histondeacetylaseinhibitoren (HDACi) 4a und IX im Vergleich zu dem zugelassenen HDACi Vorinostat. Die drei HDACi folgen einem ähnlichen Pharmakophor und sind nanomolare HDAC 2 und HDAC 6 Inhibitoren. 4a und IX zeigten zudem submikromolare Aktivität gegenüber den Leukämiezellen HL60. Die Daten stammen aus Avelar *et al.* und aus den Arbeitsgruppen von Dr. Sanil Bhatia (UKD) sowie Prof. Dr. Matthias U. Kassack (HHU).<sup>65</sup> KG = Kopfgruppe, VG = Verbindungsgruppe, ZBG = Zink-bindende Gruppe.**

### 1.4 Proteolysis targeting chimera (PROTAC)

Die bisher beschriebenen HDACi interferieren ausschließlich mit dem aktiven Zentrum der HDAC-Enzyme und können somit andere Domänen der HDAC-Enzyme nicht beeinflussen. Viele HDAC-Enzyme besitzen zusätzlich zu ihrer katalytischen Aktivität Domänen, die mit Kofaktoren, Komplexpartnern oder anderen Proteinen interagieren.<sup>9</sup> Beispielsweise moduliert die Bindung von SIN3-Proteinen an HDAC 1 und 2 deren Deacetylase-Aktivität.<sup>13</sup> Diese Interaktionen sind auch die Grundlage für nicht-enzymatische Funktionen von HDACs. So bindet HDAC 6 über eine Ubiquitin-bindende Domäne an polyubiquitinylierte Proteine und beeinflusst so deren proteasomalen Abbau.<sup>87</sup> Die biologische Relevanz dieser vielfältigen Funktionen oder Modulationen von HDAC-Enzymen können entweder durch Entwicklung selektiver Inhibitoren von Protein-Protein-Interaktionsflächen oder durch Regulation des HDAC-Protein-Levels in der Zelle aufgeklärt werden.<sup>88,89</sup> Eine Methode, um das Proteinlevel in einer Zelle mit Hilfe niedermolekularer Verbindungen zu kontrollieren, ist die *Proteolysis-targeting-chimera* (PROTAC)-Technik. PROTACs sind heterobifunktionelle Moleküle, die das zelleigene Ubiquitin-Proteasom-System rekrutieren, um ein Zielprotein zu degradieren.<sup>90</sup>

Mit dem ersten vollständig niedermolekularen Molekül, welches durch Rekrutieren des Ubiquitin-Proteasom-Systems den Androgenrezeptor abbaute, begann die präklinische Entwicklung dieser neuen Klasse an heterobifunktionalen Molekülen.<sup>90</sup> Zurzeit befinden sich 18 PROTACs gegen verschiedene onkologisch relevante Zielproteine, wie den Androgenrezeptor oder Brutons Tyrosinkinase, in klinischen Studien.<sup>91</sup> PROTACs üben ihre Wirkung über einen Event-abhängigen und nicht über einen Okkupations-abhängigen Wirkungsmechanismus wie konventionelle Inhibitoren aus. Auf diesem grundlegenden Unterschied basieren die Eigenschaften von PROTAC-Molekülen. Die Degradationseffizienz eines PROTACs ist allein abhängig von der Bildung eines produktiven ternären Komplexes aus PROTAC, Substratprotein und der E3-Ligase.<sup>92,93</sup> Die reinen Bindungsaffinitäten des PROTACs zu den beiden anderen Komplexbestandteilen spielen dabei eine untergeordnete Rolle, anders als bei traditionellen Inhibitoren, die ihren Effekt allein durch die Bindungsaffinität zu dem jeweiligen Zielprotein ausüben. Diese Entkopplung des Degradationsereignisses von den reinen Bindungsaffinitäten ermöglicht der PROTAC-Technologie die Aufweitung des medizinalchemisch adressierbaren Proteoms auf bisher nicht effizient adressierbare Proteine.<sup>92,94,95</sup> Desweiteren sind PROTACs durch diesen besonderen Wirkmechanismus substöchiometrisch aktiv, im Gegensatz zu beispielsweise klassischen Enzyminhibitoren, die stöchiometrisch aktiv werden müssen, um eine Wirkung zu vermitteln.<sup>96</sup> Folglich ist die Wirkung von PROTACs unabhängig von dem Expressionslevel des Zielproteins.

## 1. Einleitung

Alle PROTACs vermitteln ihre Wirkung über das zelleigene Ubiquitin-Proteasom-System. Andere Wege zur zielgerichteten Degradation von Zielproteinen über heterobifunktionelle Verbindungen werden untersucht, konnten bisher aber keine klinische Relevanz erreichen.<sup>97</sup>

## 1. Einleitung

### 1.4.1 Ubiquitin-Proteasom-System

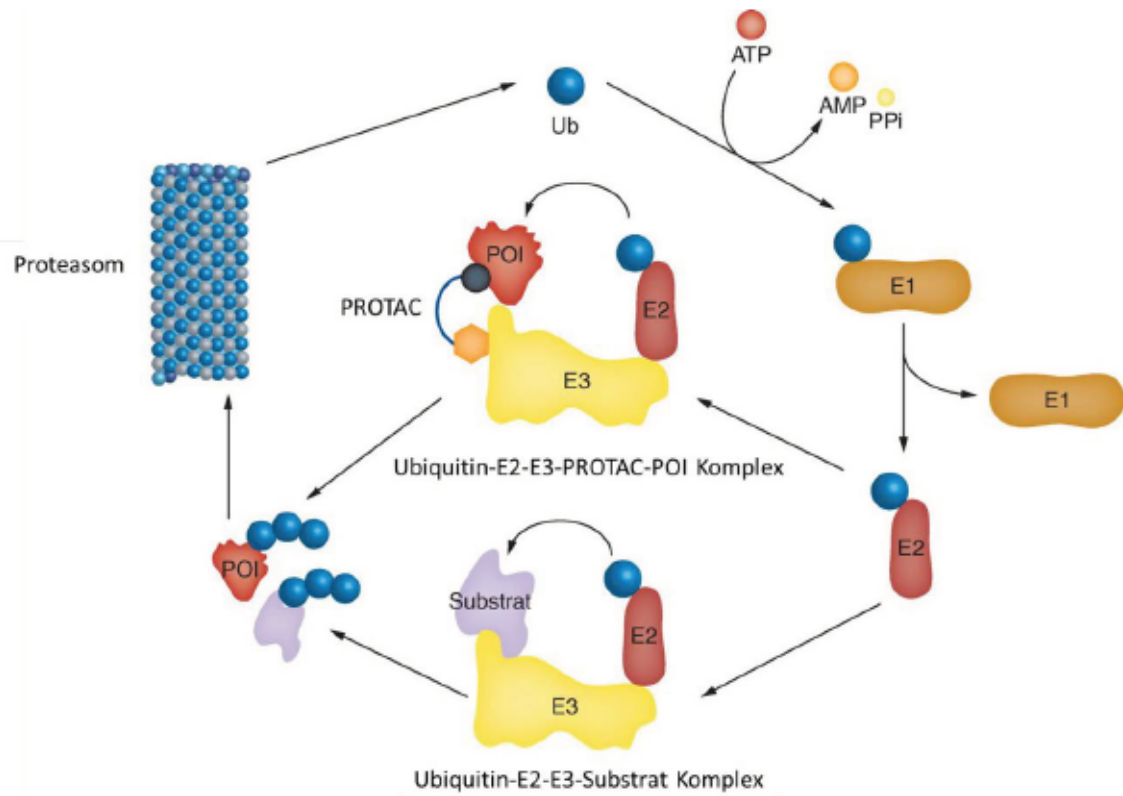
Das Ubiquitin-Proteasom-System ist ein intrazellulärer Weg für den gezielten Abbau von hauptsächlich zelleigenen Proteinen.

Ubiquitin, ein globuläres, aus 76 Aminosäuren bestehendes Protein, ist nach Konjugation mit Substratproteinen der Hauptmarker für den Abbau des Substratproteins durch das Proteasom.<sup>98,99</sup>

Ubiquitin wird in einem ATP-abhängigen Prozess an seinem carboxyterminalen Ende aktiviert und auf eine E1-Ligase übertragen. Die E1-Ligase überträgt Ubiquitin daraufhin auf eine E2-Ligase, die mit einer E3-Ligase und dem Substrat Protein zu einem ternären Komplex assoziiert. In diesem Komplex befinden sich dann das aktivierte Ubiquitin und das Substrat Protein in räumlicher Nähe, sodass Ubiquitin auf ein zugängliches Substratlysine unter Ausbildung einer Isopeptidbindung übertragen werden kann.<sup>100,101</sup>

Die Mono- bzw. Polyubiquitylierung ist ein Signal für die Erkennung durch das Proteasom und nachfolgende Degradierung durch dessen proteolytische Aktivität. Dabei werden nicht alle Ubiquitin-Proteine mit abgebaut, sondern zurückgewonnen und stehen für den nächsten Degradationszyklus zur Verfügung (Abbildung 9).<sup>102-104</sup>

## 1. Einleitung



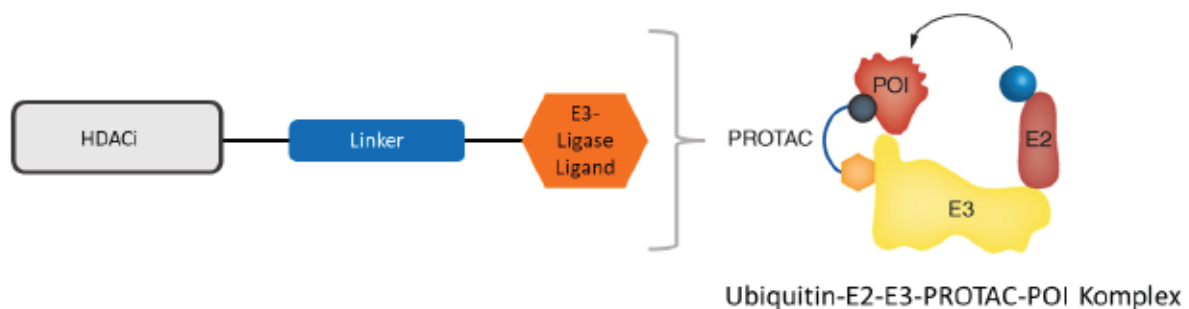
**Abbildung 9:** Das Ubiquitin-Proteasom-System und der Wirkmechanismus der *Proteolysis-targeting chimera* (PROTAC). POI = *protein of interest*, Protein von Interesse  
Abbildung modifiziert nach Fischer *et al.*<sup>26</sup>

## 1. Einleitung

### 1.4.2 HDAC-PROTACs

Bisher sind für jede Klasse von HDAC-Enzymen, mit Ausnahme von HDAC 11 bzw. Klasse IV HDACs, selektive HDAC-PROTACs beschrieben worden.<sup>105</sup>

HDAC-PROTACs sind heterobifunktionelle Moleküle, die sich mit einem dreigeteilten Pharmakophor-Modell beschreiben lassen. Zusätzlich zu einem HDAC-Inhibitor Motiv besteht ein HDAC-PROTAC noch aus einer E3-Ligase rekrutierenden Einheit und einem Linker, der die beiden Motive miteinander verbindet (Abbildung 10).



**Abbildung 10:** Das allgemeine Pharmakophor eines HDAC-PROTACs. HDAC-PROTACs bestehen aus einem HDACi, einem Linker und einem Liganden für die jeweilige E3-Ligase. POI = *protein of interest*, Protein von Interesse.

Alle drei Teile des HDAC-PROTACs beeinflussen sowohl die Degradationseffizienz als auch die Degradationsselektivität der HDAC-PROTACs.

Der HDAC-Inhibitor Teil ist grundlegend für die Degradationsselektivität des HDAC-PROTAC. In allen Fällen, in denen ein selektiver HDACi verwendet wurde, reflektierte die Degradationsselektivität des resultierenden HDAC-PROTACs die Inhibitionsselektivität des HDAC-Inhibitors. Das Verwenden von Klasse I/IIb-HDACi oder Pan-HDACi als Modul führte dagegen nicht zu einer unselektiven Degradation verschiedener HDAC-Enzyme, sondern die resultierenden HDAC-PROTACs tendierten zu einer HDAC 6 Degradation.<sup>89</sup>

Schon kleine chemische Modifikationen des Linkers hinsichtlich der Länge oder Zusammensetzung haben starken Einfluss auf die Degradationseffizienz des HDAC-PROTACs. Mit PROTACs die Bromodomäne enthaltende Proteine (BRD) degradieren, konnte gezeigt werden, dass der Linker direkten Einfluss auf die Bildung des produktiven ternären Komplexes hat, der die Grundvoraussetzung für die Degradation des Zielproteins ist.<sup>106</sup>

Bisher wurden drei E3-Ligasen erfolgreich für das Degradieren von HDACs durch HDAC-PROTACs rekrutiert: die Von-Hippel-Lindau (VHL)-, die Cereblon (CRBN)- und die



## 1. Einleitung

Inhibitor of Apoptosis-Ligase (IAP)-Ligase. Die Wahl der E3-Ligasen beeinflusst nicht nur die Degradationseffizienz von HDAC-PROTACs, sondern auch die Degradationsselektivität.<sup>89</sup>

HDAC-PROTACs haben im Vergleich zu HDACi drei Hauptvorteile, welches sie zu wertvollen Instrumenten zur Aufklärung der (Patho-)Physiologie der HDAC-Enzyme macht:

Wie oben bereits erwähnt, hemmen alle HDACi das aktive Zentrum der jeweiligen HDAC-Enzyme. Andere funktionale Domänen wie beispielsweise die Ubiquitin-bindende Domäne in HDAC 6 oder Protein-Protein-Interaktionsflächen werden durch die Hemmung des aktiven Zentrums nicht oder nicht direkt beeinflusst.<sup>107,108</sup> Insofern bieten HDAC-PROTACs durch die Degradation der HDACs die Möglichkeit, den biologischen Einfluss dieser Domänen weiter zu charakterisieren.

Zweitens übertrifft die Degradationsselektivität der HDAC-PROTACs in der Regel die Enzyminhibitionsselektivität der HDACi. Während Vorinostat beispielsweise fünf von neun untersuchten HDACs hemmt, degradieren von 21 Vorinostat-basierten HDAC-PROTACs sieben PROTACs nur zwei von zehn untersuchten HDAC-Enzymen, elf PROTACs drei von zehn Enzymen und nur drei PROTACs vier von zehn HDAC-Enzymen.<sup>52,89</sup> Der Grund für diese Beobachtung kann in der unterschiedlichen Kooperativität der verschiedenen entstehenden ternären Komplexe liegen. Dasselbe Phänomen konnte für PROTACs mit einem Multikinaseinhibitor-Baustein gezeigt werden.<sup>92</sup> HDAC-PROTACs sind damit ein geeignetes Werkzeug, um die physiologischen Funktionen einzelner HDAC-Enzyme zu erforschen.

Drittens können durch Verwendung von HDAC-PROTACs die Resultate von HDAC-Enzym knock-out oder knock-down Studien auf Proteinebene validiert werden. Diese niedermolekularen Verbindungen erlauben eine reversible und reproduzierbare Einstellung von HDAC-Proteinleveln im zellulären Kontext. Zum Beispiel sind HDAC 1/2 selektive PROTACs prinzipiell dazu geeignet, die These von Heideman *et al.* zu überprüfen, nach der eine minimale Aktivität von HDAC 1/2 nötig ist, um die Entstehung von Lymphomen zu unterdrücken.<sup>40</sup>

### 1.4.3 HDAC-PROTACs mit nicht-kanonischen E3-Ligase Liganden

Funktionale HDAC-PROTACs rekrutieren bisher drei kanonische E3-Ligasen CRBN, VHL oder IAP.<sup>89</sup> Kürzlich wurden Liganden für nicht-kanonische E3-Ligasen beschrieben, die bisher nicht in dem Design für HDAC-PROTACs berücksichtigt wurden.<sup>26,109,110</sup> Der Einsatz dieser E3-Ligase Liganden in HDAC-PROTACs hat das Potential, das HDAC-PROTAC Konzept um folgende Punkte zu erweitern.

Ein häufiger Grund für die Resistenz einer Zelllinie gegen PROTACs sind Mutationen der E3-Ligase.<sup>111,112</sup> Neben der Möglichkeit, mit gewebespezifisch exprimierten E3-Ligasen eine zielgerichtete Therapie durchzuführen, können mit der Rekrutierung von anderen E3-Ligasen auch Resistenzen gegen PROTACs umgangen werden. Damit bietet die Variation von E3-Ligase Modulen die Möglichkeit, diese erworbenen Resistenzen zu umgehen.

Daneben bietet der gewebe- oder tumorspezifische Expressionsstatus von verschiedenen E3-Ligasen eine Option der zielgerichteten Therapie mit HDAC-PROTACs. Die am häufigsten rekrutierten E3-Ligasen CRBN und VHL sind ubiquitär in allen Geweben exprimiert.<sup>113,114</sup> Dies führt zu einer weitgehend gewebsunabhängigen Aktivität von PROTACs, die diese E3-Ligasen rekrutieren. Gewebe- oder zelltypspezifisch exprimierte E3-Ligasen können eine gezielte Aktivität von PROTACs in einzelnen Gewebetypen ermöglichen. Das Ausnutzen von E3-Ligasen die in Tumoren überexprimiert sind, könnte eine gezielte Therapie mit PROTACs ermöglichen.

Des Weiteren wurde mit HDAC-PROTACs gezeigt, dass die Degradationsselektivität von HDAC-PROTACs durch die Wahl des jeweiligen E3-Ligase-Liganden beeinflusst wurde. Als Grundlage für diese Beobachtung wird die Ausbildung unterschiedlich produktiver ternärer Komplexe aus der rekrutierten E3-Ligase und dem jeweiligen HDAC-Enzym vermutet.<sup>89</sup> Andere E3-Ligasen zu rekrutieren, bietet damit die Möglichkeit, die Degradationsselektivität der HDAC-PROTACs zu steuern, und so vielleicht Isoform selektive HDAC-PROTACs zu entwerfen.

Diese Gründe sprechen für eine Variation der E3-Ligase Module und Validierung dieser in dem HDAC-PROTAC Feld. Infolgedessen wurden im Zuge dieser Arbeit neue potentielle HDAC-PROTACs entwickelt, die nicht-kanonische E3-Ligase Liganden verwenden, die bisher nicht für die Entwicklung von HDAC-PROTACs benutzt wurden.

## 1. Einleitung

### 1.4.4 Publikation: HDAC-PROTACs: lessons learned so far

Fabian Fischer<sup>1</sup> , Leandro A Alves Avelar<sup>1</sup> , Laoise Murray<sup>1</sup> & Thomas Kurz<sup>\*1</sup>



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

\*Author for correspondence: [thomas.kurz@hhu.de](mailto:thomas.kurz@hhu.de)

Reproduced from Future Medicinal Chemistry (2022) 14(3), 143-166 with permission of Future  
Science Group.

For reprint orders, please contact: [reprints@future-science.com](mailto:reprints@future-science.com)

# Designing HDAC-PROTACs: lessons learned so far

Fabian Fischer<sup>1</sup>, Leandro A Alves Avelar<sup>1</sup>, Laoise Murray<sup>1</sup> & Thomas Kurz<sup>\*,1</sup>

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

\*Author for correspondence: [thomas.kurz@hhu.de](mailto:thomas.kurz@hhu.de)

Proteolysis-targeting chimeras (PROTACs) are a powerful tool to hijack the endogenous ubiquitin-proteasome system (UPS) and to degrade the intracellular proteins of therapeutic importance. Recently, two heterobifunctional degraders targeting hormone receptors headed into Phase II clinical trials. Compared to traditional drug design and common modes of action, the PROTAC approach offers new opportunities for the drug research field. Histone deacetylase inhibitors (HDACi) are well-established drugs for the treatment of hematological malignancies. The integration of HDAC binding motifs in PROTACs explores the possibility of targeted, chemical HDAC degradation. This review provides an overview and a perspective about the key steps in the structure development of HDAC-PROTACs. In particular, the influence of the three canonical PROTAC elements on HDAC-PROTAC efficacy and selectivity are discussed, the HDACi, the linker and the E3 ligase ligand.

First draft submitted: 16 July 2021; Accepted for publication: 1 November 2021; Published online: 24 December 2021

**Keywords:** epigenetics • histone deacetylases • PROTAC • protein degradation • ubiquitin proteasome system

Cancer is a major cause of death in the modern society [1,2]. The first histone deacetylase (HDAC) inhibitor (HDACi) vorinostat was approved as a new treatment option in the fight against hematological malignancies 15 years ago [3–5]. Despite the advances in the field of targeted cancer drugs, there is constant struggle to establish new tolerable and effective drugs. Moreover, resistance to targeted cancer therapies is common and impedes the successful treatment of patients [6–8]. Therefore, new therapy options with innovative modes of action are urgently needed. In the last few years, the proteolysis-targeting chimera (PROTAC) approach has attracted attention as its unique mode of action raises hope for innovation in the field of targeted cancer therapy [9]. This hope is encouraged by the introduction of several PROTACs into clinical trials. The headliners of the first generation of this class of degraders, ARV-110 and ARV-741 (Figure 1), have even entered into Phase II of clinical trials [10–12]. The field of protein degraders targeting proteins involved in epigenetic regulation is headed by two PROTACs targeting the BRD 9-protein: CFT8634 and FHD-609 (structures not disclosed). For CFT8634, an investigational new drug (IND) application was submitted [12] and the Phase I study for FHD-609 is currently recruiting (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04965753).

Overall, the extensive clinical experience with various HDACi, their intensively studied epigenetic modes of action, the innovative approach of the PROTAC-technology and the first encouraging results from clinically tested PROTACs explore the field for the preclinical and clinical development of HDAC-PROTACs.

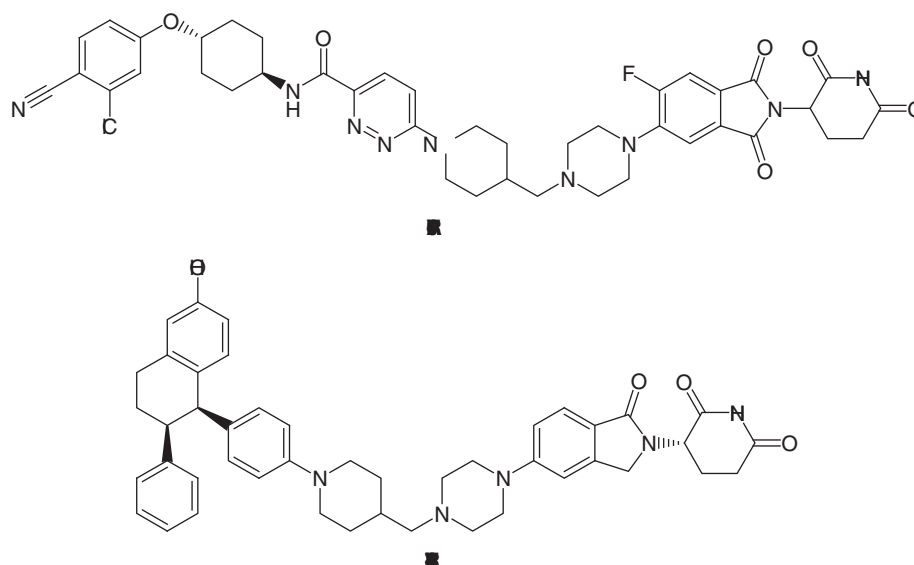
## Histone deacetylases and their inhibitors

### Classification of histone deacetylases

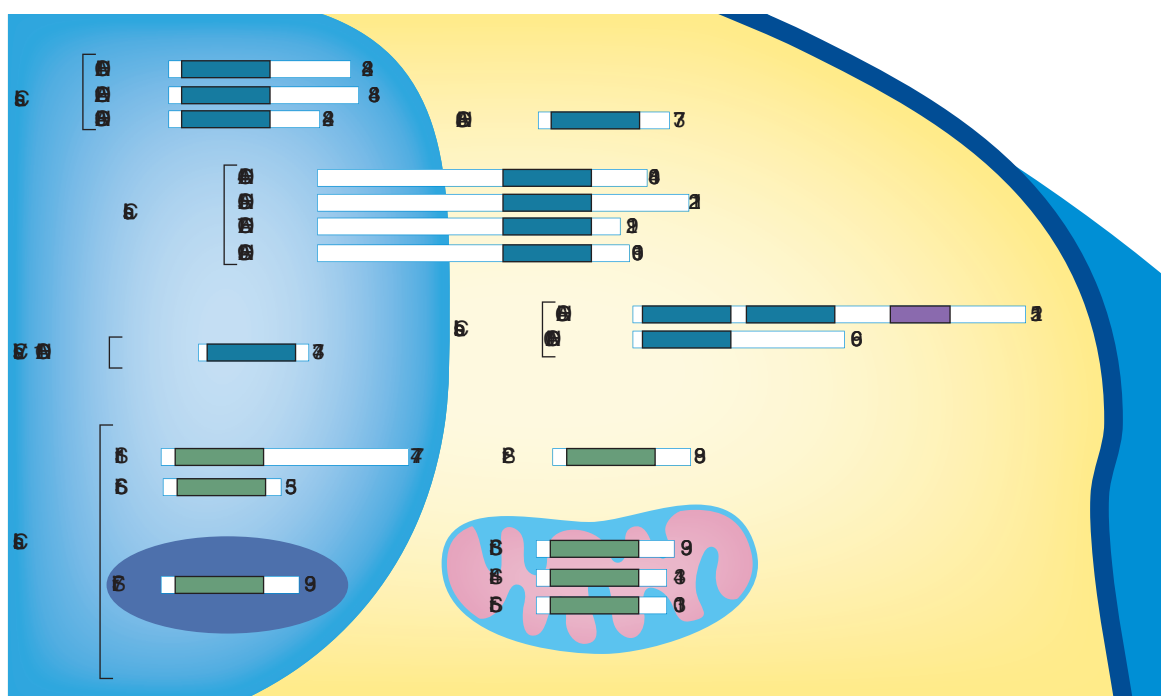
The HDAC family is divided into four classes of enzymes based on their homology toward yeast proteins (Figure 2). Three of the four classes are zinc-dependent proteins while the members of class III, called sirtuins, utilize NAD<sup>+</sup> as a cofactor.

Among the zinc-dependent HDAC enzymes, the members of class I are HDAC 1, 2, 3 and 8. Class IIa enzymes are HDAC 4, 5, 7 and 9. Class IIb consists of HDAC 6 and 10, while class IV includes HDAC 11 [13].

newlands  
press



**Figure 1.** Structures of ARV-110 and ARV-471, the most advanced proteolysis-targeting chimeras in clinical trials. ARV-110 targets the androgen receptor whereas ARV-471 targets the estrogen receptor.



**Figure 2.** The family of HDAC enzymes with cellular localization. While HDAC 1, 2, 3; HDAC 11, Sirt1 and Sirt6 are located in the nucleus, Sirt7 is located in the nucleolus. Class IIa HDACs can shuttle between the nucleus and cytoplasm. Class IIb and class IV HDAC enzymes together with HDAC 8 and Sirt2 are located in the cytoplasm. Sirt3, Sirt4 and Sirt5 are mitochondrial enzymes. The zinc-dependent catalytic domain of class I, II and IV HDACs is depicted as a blue bar, whereas the NAD<sup>+</sup> dependent catalytic domain of class III HDACs is depicted as a green bar. The violet bar of HDAC 6 depicts the zinc finger ubiquitin binding region. Numbers indicate the length of the amino acid sequence.

Adapted from Asfaha *et al.* [35].

Class III HDAC consists of seven proteins, sirtuins, which can be grouped into four classes based on molecular phylogenetic analysis. Sirt1, 2 and 3 belong to class I, Sirt4 to class II, Sirt5 to class III and Sirt6 and 7 to class IV [14].

### Function & cellular localization of histone deacetylases

Class I HDACs 1, 2 and 3 are mainly located in the nucleus and part of transcriptional repressor complexes [4,15]. These enzymes are mainly responsible for the regulation of the transcriptional activity of the cell. HDAC 8 is structurally different from the other class I members and presumably also responsible for the removal of long-chain alkanoyl modifications from lysines [16,17]. Its main cellular localization is the cytoplasm [18].

Class IIa HDACs can shuttle between the nucleus and the cytoplasm. Because of their weak deacetylase activity, their exact biological role has yet to be elucidated [19]. Several implications of HDAC class IIa enzymes in biological functions such as memory, learning processes or in the immune system are reported [20,21].

Class IIb members, HDAC 6 and 10, are mainly located in the cytoplasm [22,23]. HDAC 6, therefore, deacetylates cytoplasmatic proteins such as  $\alpha$ -tubulin or HSP90 whereas HDAC 10 is a polyamine deacetylase [24–26].

Because of its zinc-finger-ubiquitin-binding (Znf-UBP) domain, HDAC 6 recognizes the ubiquitinylation status of proteins and is therefore able to regulate their degradation. It has been shown that HDAC 6 tightly binds polyubiquitinated proteins, without possessing any of its own deubiquitinase activity. The interplay between HDAC 6 and the chaperone p97/VCF regulates the accumulation of polyubiquitinated proteins in the cell [27], making HDAC 6 a regulator of proteasome dependent protein degradation. As a regulator of several protein degradation pathways HDAC 6 is also involved in aggresome formation and transport of polyubiquitinated proteins to the aggresome as well as to the autophagosomes [28,29].

The NAD<sup>+</sup> dependent class of sirtuins, class III HDACs, is involved in multiple processes besides the epigenetic regulation of the chromatin structure. Sirtuins regulate processes like senescence, caloric restriction and cell metabolism. The most studied enzymes belong to sirtuin class I, with a particular focus on their implications in neurodegenerative diseases [30]. To date, little is known about the biological functions of the remaining Sirt enzymes or their role in diseases [31].

In class I sirtuins, Sirt1 is located in the nucleus, while Sirt2 is a cytoplasmatic and Sirt3 a mitochondrial enzyme. Class II sirtuin, Sirt4, and class III sirtuin, Sirt5, are also mitochondrial enzymes. Class IV sirtuins, Sirt6 and Sirt7, are both located in the nucleus and Sirt7 is located in the nucleolus [32].

The sole class IV member HDAC 11 is a fatty acid deacylase and is located in the nucleus [33,34].

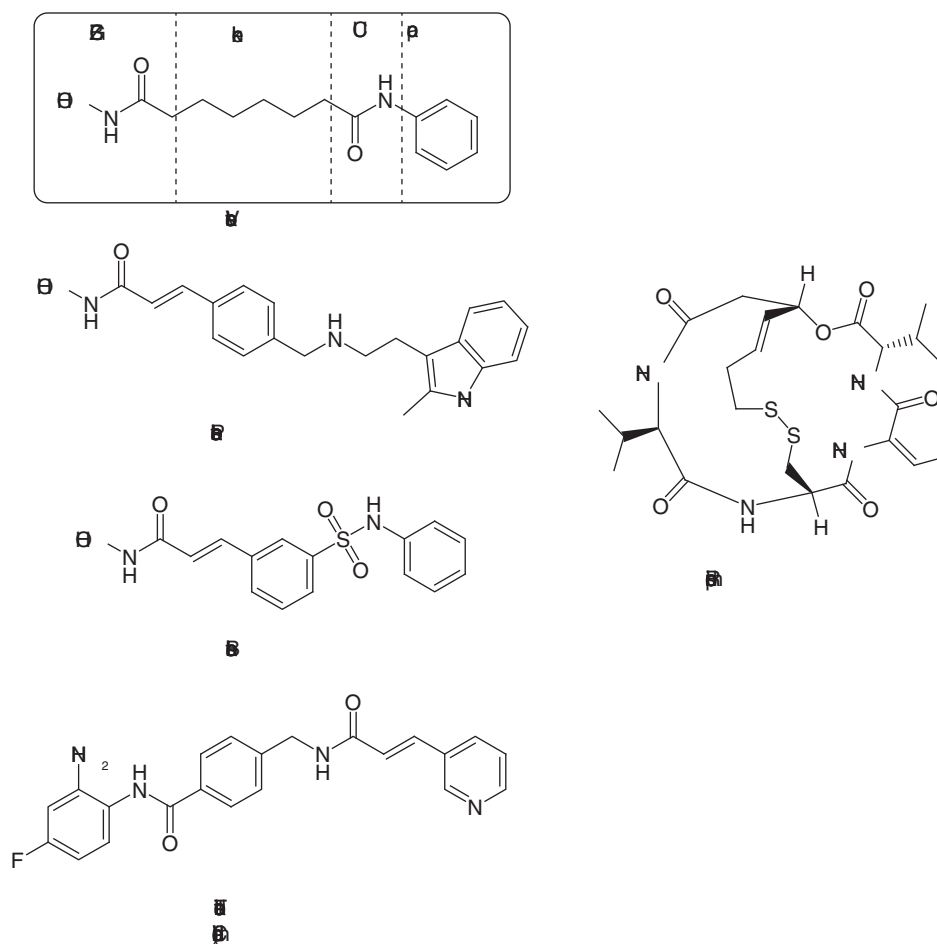
### Clinical use & pharmacophore model of histone deacetylase inhibitors

Several implications of HDAC enzymes in cancer are known. The dysregulation of HDAC enzymes in many different cancer types has been shown as reviewed by [5] and [36]. This dysregulation is not only limited to hematological diseases but also occurs in different types of solid tumors. In particular, HDACi of classes I, II and IV are being investigated in the field of anticancer drug targets [36–38] whereas the investigation of class III HDACi has not resulted in a drug approval yet. The interest in class I, II and IV HDACi led to the approval of five HDACi (Figure 3).

The first HDACi vorinostat (SAHA) was approved in 2006 for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma [3]. Between 2009 and 2015, the approval of romidepsin, belinostat, tucidinostat (chidamide) and panobinostat followed [39–41]. HDACi are therefore a useful therapeutic option in the treatment of hematological diseases and are being investigated for several other forms of cancer. In the last few years, it has been shown that HDACi act synergistically with different classes of anticancer drugs such as platinum-based chemotherapeutics and kinase inhibitors [42]. Currently, various clinical trials with several drug combinations are ongoing [43].

The approved HDACi share a common pharmacophore model (Figure 3). As the approved HDACi target the active site of the zinc-dependent HDAC classes I, II and IV, these inhibitors contain a zinc-binding group (ZBG) as a key structural feature. The ZBG is connected via a linker and a connecting unit (CU) with the cap group which interacts with the surface of the respective HDAC. While vorinostat, panobinostat, belinostat and chidamide follow this pharmacophore strictly, romidepsin is a prodrug in which the ZBG is formed by the reduction of the disulfide bond [44].

Although HDACi are currently being evaluated for the treatment of several other diseases [45–47], research in these areas is not as advanced as their development for cancer therapy.



**Figure 3. Approved histone deacetylase inhibitors.** Vorinostat, panobinostat, belinostat and tucidinostat (chidamide) share the same pharmacophore consisting of a zinc binding group, linker, connecting unit and cap-group. CU: Connecting unit; ZBG: Zinc binding group.

## Targeting protein degradation with the PROTAC technology

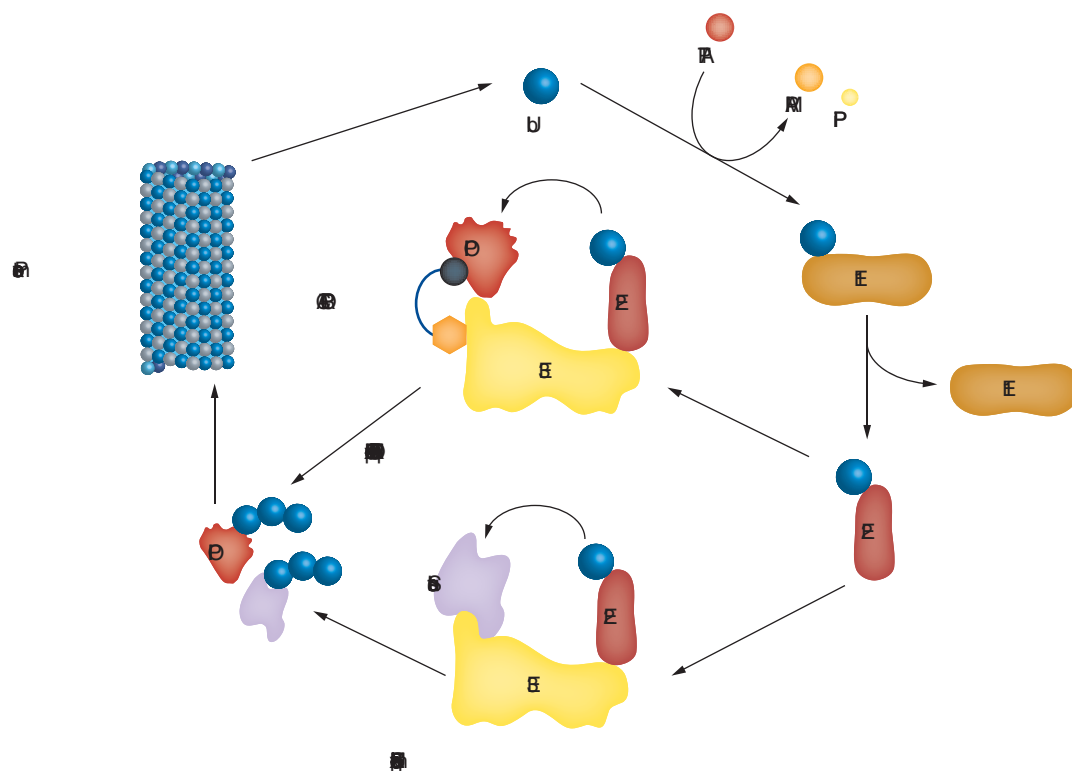
### The ubiquitin-proteasome system

The human ubiquitin-proteasome system (UPS) relies on the interplay between three ligases (Figure 4). The E1 ligase activates ubiquitin (Ub) under ATP consumption through the formation of a reactive thioester moiety and transfers ubiquitin to the E2 ligase. This E2 ligase binds to the E3 ligase complex and forms together with the substrate protein an E2-E3 substrate complex. The E3 ligase brings the substrate and ubiquitin into proximity and enables the transfer of ubiquitin to the substrate protein. Finally, the ubiquitylated substrate protein is recognized by the proteasome and subsequently degraded (Figure 4) [48].

Since 2001, the PROTAC concept has led to the development of a new type of heterobifunctional molecules with the ability to hijack the endogenous Ub-E2-E3 complex. Crews and Deshaies developed the first PROTACs and established the PROTAC concept by using a peptidic E3 ligase ligand which led to the degradation of the methionine aminopeptidase 2 [49]. The development of all-small-molecule PROTACs is based on the pioneering work of the Crews group and is experiencing significant progress since their first description in 2008 [50–52].

A PROTAC consists of three structural units, the E3 ligase binding motif for recruiting the ubiquitin-proteasome-system (UPS), a linker and a second pharmacophore for the binding of the target protein, the protein of interest (POI) [53].

Because of these unique structural features, PROTAC interacts simultaneously with the endogenous Ub-E2-E3 complex and the POI to ultimately form an Ub-E2-E3-neosubstrate complex. Subsequently, the POI is ubiquitylated and degraded (Figure 4).



**Figure 4. Schematic representation of the ubiquitin-proteasome-system and the PROTAC mechanism in general.** First, ubiquitin (Ub) is transferred to an E1 ligase in an ATP-dependent manner. Second, Ub is further transferred to an E2 ligase which assembles to a complex with the substrate protein and an E3 ligase to form an ubiquitin–E2–E3–substrate complex. In this complex, Ub is transferred to the substrate protein and the (poly)ubiquitinated substrate is subsequently subjected to protein degradation by the proteasome recovering Ub. A PROTAC can hijack the ubiquitin–E2–E3 complex causing the degradation of proteins of interest. The PROTAC itself is not degraded and maintains its ability to form ubiquitin–E2–E3-PROTAC-POI complexes again. POI: Protein of interest; PROTAC: Proteolysis-targeting chimera; Ub: Ubiquitin.

### Structural units of a PROTAC

The three-unit-pharmacophore of a PROTAC is crucial for the understanding of the PROTAC mode of action.

The E3 ligase binding motif recruits the Ub–E2–E3 complex, whereas the POI ligand targets the protein-to-be-degraded. The linker moiety between the E3 ligase binding motif and the protein of interest ligand adjusts the distance between these two elements and assists the formation of the ternary complex [50].

To date, four small molecule-based E3 ligase binding motifs are commonly used for the development of PROTACs (Figure 5) [54].

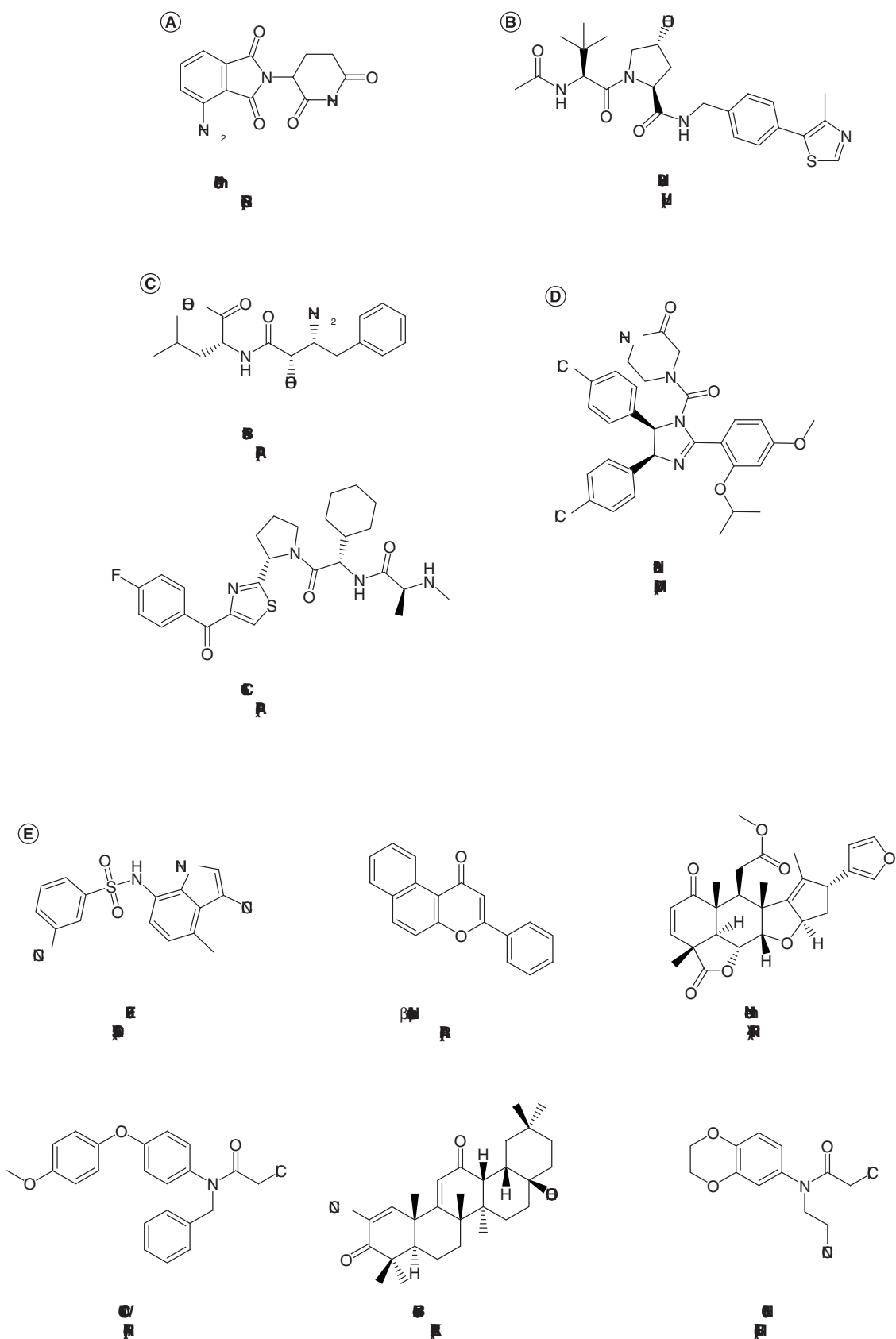
First, the cereblon (CRBN) ligands rely on the structure of the anticancer drug thalidomide and its derivatives (Figure 5A). It was established in 2015 that after binding of  $\alpha$ -phthalimidoglutarimide derivatives to CRBN they induce the degradation of neosubstrates and can be utilized in PROTAC design [51,55,56].

Second, Crews, Ciulli and coworkers designed and synthesized a ligand in 2012 for the recruitment of VHL-E3 ligase [57–60]. Due to its effective and robust degradation of a wide range of POI and its ability to bypass the possible off-target effects of the CRBN recruitment, the VHL ligand is the most commonly used E3 ligase binding motif, besides the CRBN ligands (Figure 5B) [61–63].

Third, ligands for the IAP-proteins are also used as E3 ligase binding motifs for PROTACs. Often, derivatives of the IAP ligand bestatin or more complex specific and non-genetic inhibitor of apoptosis protein (SNIPER) structures are used to recruit the IAP E3 ligase [64–66] (Figure 5C). However, the success of these PROTAC is often hampered by less pronounced degradation compared to other E3 ligase units [61] as well as autoubiquitination after IAP inhibition [65].

The last E3 ligase utilized is the MDM2 ligase (Figure 5D). The first all-small-molecule-based PROTAC was synthesized by recruiting this E3 ligase, utilizing a nutlin derivative as an E3 ligase unit [50]. After several years





**Figure 5. Ligands for the recruitment of E3 ligases and the ligases they are engaging. (A)** Cereblon. **(B)** von-Hippel-Lindau. **(C)** Inhibitor of apoptosis protein. **(D)** Mouse double minute 2 homolog. **(E)** Examples of newly discovered and infrequently used E3 ligase recruiters.

AhR: Arylhydrocarbon receptor; CRBN: Cereblon; DCAF: DDB1 and CUL4-associated factor; FEM1B: Protein fem 1 homolog B; IAP: Inhibitor of apoptosis protein; MDM2: Mouse double minute 2 homolog; RNF: Ring finger protein; VHL: von-Hippel-Lindau.

of concentration on the CRBN and VHL ligases, in 2019, Hines *et al.* presented a potent degrader based on a modified MDM2 ligand. Nevertheless, PROTACs recruiting MDM2 often suffer from diminished degradation potency in comparison to VHL or CRBN recruiting ligands [61,67].

Recently, new E3 ligase ligands were identified and utilized for the design of PROTACs [68–74]. Although these E3 ligase ligands were not yet used in the development of HDAC–PROTACs, they exemplify the under explored chemical space for the development of PROTACs utilizing new and effective E3 ligases. Among these E3 ligase ligands are traditional non-covalent binding E3 ligase ligands as well as covalently binding E3 ligase ligands. For example, the E3 ligases DCAF 15 and the AhR-E3 ligase were successfully recruited by PROTACs using non covalently binding ligands. Li *et al.* used the indisulam-derivative E7820 for the ligase DCAF 15 [70], whereas Ohoka *et al.* showed that PROTACs incorporating ligands of AhR-E3 ligase can induce degradation of POI [71]. In the field of covalently binding E3 ligase ligands, Ward *et al.* screened a library of covalently binding fragments to identify fragment CCW-16 as a suitable ligand for the E3 ligase RNF4 [70]. Tong *et al.* observed that the triterpenoid-based compound bardoxolone is a reversible covalently binding ligand of the E3 ligase KEAP1 and was successfully incorporated into a PROTAC [72]. Even the natural compound nimbolide targets an E3 ligase, namely RNF114 and Spradlin *et al.* were able to translate this observation into a PROTAC [73]. In an actual preprint, Henning *et al.* showed that their identified ligand EN-106 is a suitable covalent recruiter of the E3 ligase FEM1B [74] (Figure 5E).

The linker region is the most comprehensively optimized part in the development of PROTACs. It has been shown that the optimization of the linker through the modification of the linker length and its chemical structure has a significant influence on the degradation ability of the HDAC–PROTAC and PROTACs in general [75–77] (Figure 9).

Flexible alkyl chain or ethylene glycol derived linkers are the most common, often containing a triazole moiety [78], but there are also more rigid heterocycle based linkers reported [79–81].

In general, the optimal linker depends on both the used E3 ligase and the POI ligand. The optimization process relies in most cases on an empirical process [75,82]. The Ciulli lab demonstrated that a structure-guided design of the PROTAC linker is possible [83].

The third structural element of a PROTAC is the ligand for the protein of interest. The event-driven mechanism of PROTACs allows the design of potent protein degraders even with low-affinity ligands [84].

Owing to their mechanism of action, an orthosteric ligand is not mandatory for the design of a PROTAC. As expected, the design of potent degraders with allosteric ligands for the POI was also successful. This was exemplified by the development of PROTACs targeting allosteric binding sites of the oncogenic drivers BCR-ABL or EGFR [85,86]. Also, proteins that have no enzymatic activities are targeted by PROTACs such as the protein Tau which plays a crucial role in the development of Alzheimer's disease [87–89]. Even multi-pass transmembrane proteins like members of the solute carrier (SLC) family are amenable for degradation through the PROTAC technology [90].

### Advantages & disadvantages of the PROTAC technology

One of the main advantages of the PROTAC technology is its unique catalytic mode of action. As one PROTAC molecule can perform many degradation cycles, PROTACs are unlike classical occupancy-driven inhibitors independent of a stoichiometric engagement of the POI [91]. Furthermore, since PROTACs follow an event-driven mode of action, unlike the occupancy-driven mode of action of traditional small molecule inhibitors, they are not dependent on high-affinity binding [84]. Whereas the effect of small molecule agonists or antagonists is dependent on binding at a certain and defined site in the target molecule, the PROTACs are independent of these certain sites as they are mainly dependent on the efficient building of a ternary complex between the PROTAC molecule, the POI and the E3 ligase [84–86,91]. With this in mind, the PROTAC technology is opening up the so-called 'undruggable' proteome [53,63,92,93]. Furthermore, since many resistance mechanisms depend on diminishing the affinity by mutation of the target, some PROTACs may overcome this particular challenge [94,95].

In addition to their catalytic mode of action, several PROTACs have shown exquisite selectivity, even in demanding selectivity conditions [82,96,97]. This demonstrates that the PROTAC technology can be utilized in the elucidation of biochemical pathways where currently the available inhibitors display an undesirable selectivity profile.

One of the main disadvantages of the PROTAC technology are the challenging physicochemical and pharmacokinetic properties, as the PROTAC molecules are usually beyond Lipinski's rule of five [98,99].

Another major concern in the development of PROTACs is, aggravated by their substoichiometric mode of action, the to some extent unpredictable degradation of off-target proteins. Whereas classical inhibitors are only able to inhibit one off-target protein per time, one PROTAC is theoretically able to significantly lower the level of an off-target protein. The unpredictable degradation of off-target proteins is exemplified by the degradation of the family of IKFZ proteins by CRBN-based HDAC-PROTACs. The IKFZ proteins are degraded by the use of thalidomide and its derivatives but in CRBN-HDAC-PROTACs development, the depletion of IKFZ is in most cases considered an off-target effect. Surprisingly, only a minority of CRBN-HDAC-PROTACs can induce IKFZ degradation and this population of PROTACs is hard to predict [75]. This illustrates the underlying problem of the use of PROTACs as they require careful screening for possible off-target proteins. In a single study, Xiong *et al.* conducted a chemo-proteome screening and identified several proteins besides the targeted HDAC which were up- or down-regulated after treatment with their HDAC-PROTACs. This allows insights into the function of HDACs but these indirect targets need to be taken into concern in the clinical development of HDAC-PROTACs [100].

Another major drawback of PROTACs is the mostly empirical-driven drug development process accompanied by complex chemical synthesis. Fortunately, the development of *in silico* models for the development of new PROTACs has improved and could facilitate the development by shortening the discovery process [101–103].

### Elements of HDAC-PROTAC design

In comparison to classical active site inhibitors of HDAC enzymes, HDAC-PROTACs offer several relevant opportunities. These opportunities cover enhanced selectivity for HDAC isozymes, a chemical option for inactivating HDAC activities, prolonged biological effects as well as the option to elucidate signal cascades and diseases with HDAC involvement.

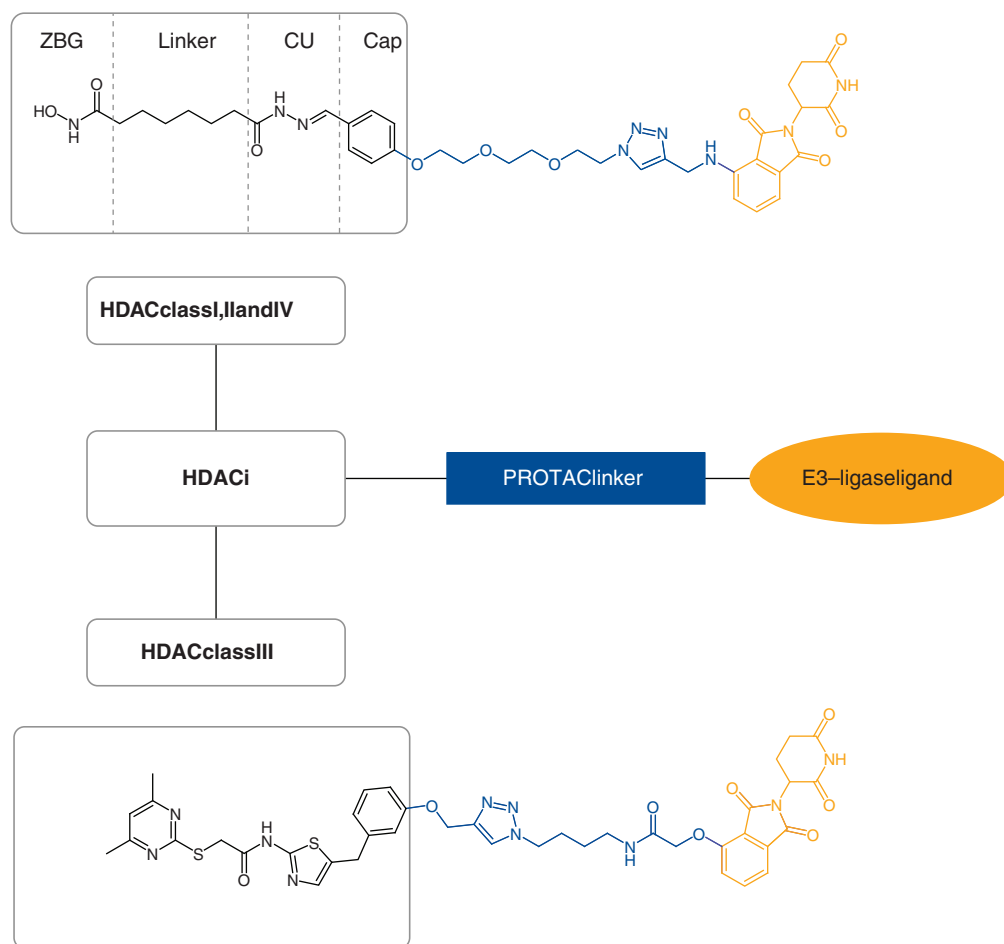
All approved HDACi inhibit several HDAC isoforms and are at best class selective [39,40]. The clinically observed limited tolerance of the approved HDACi may be due to their promiscuous isoform profile [104,105]. To investigate this hypothesis isoform-specific inhibitors are needed. Some HDAC-PROTACs have been shown to selectively degrade single HDAC isoforms [100]. The HDAC-PROTAC itself often inherits the HDAC isoform inhibition profile of its parent HDACi [100,106]. It would be conceivable that the toxicity through promiscuous binding is also inherited, but this does not take into account that; a) PROTACs act catalytically [91] and therefore a much lower drug load is necessary; and b) through target degradation, HDAC-PROTACs exhibit a more sustained effect than classical inhibitors [75,106].

On the other hand, resistance to anticancer drugs is a major challenge in cancer therapy [6–8]. To date, no clinically relevant cases of HDAC resistance have been reported [107]. But due to the occurrence of many *in vitro* resistances [108], the development of *in vivo* HDACi resistance is not unexpected. Due to the likelihood of resistance to the approved HDACi, new concepts of targeting HDAC enzymes are needed.

The pronounced selectivity and the possibility of compensating resistance mechanisms underline the potential of HDAC-PROTACs in comparison to classical HDAC inhibition. Additionally, class IIa HDAC enzymes are known to have low deacetylase activity and the mode of action of these HDAC enzymes in biological pathways is poorly understood [19,35]. Inhibitors which are targeting the deacetylase domain of these HDACs are not able to inhibit signal transduction pathways that are independent of the deacetylase activity of the HDAC, such as protein-protein-interactions. However, an HDAC-PROTAC targeting these HDACs induces the degradation of the HDAC enzyme and interrupts several signal pathways which are independent of the deacetylase activity of the HDAC itself. In this way, the HDAC-PROTAC technology enables the investigation of yet underexplored signal transductions pathways. The first work in this direction was reported by Xiong *et al.* who observed collateral degradation of members of HDAC protein complexes [100].

### Pharmacophore model of an HDAC-PROTAC

A typical HDAC-PROTAC combines the pharmacophore features of an HDAC inhibitor as well as a PROTAC (Figure 6). The general pharmacophore of an HDAC-PROTAC consists of the HDACi, a linker and the E3 ligase ligand. In the case of HDAC-PROTACs targeting the zinc-dependent HDAC classes I, II and IV, this pharmacophore can be expanded. The general HDACi pharmacophore of HDAC inhibitors targeting the active site of class I, II and IV HDAC enzymes consists of a zinc-binding group, a linker, a connecting unit and a cap region (Figure 6).

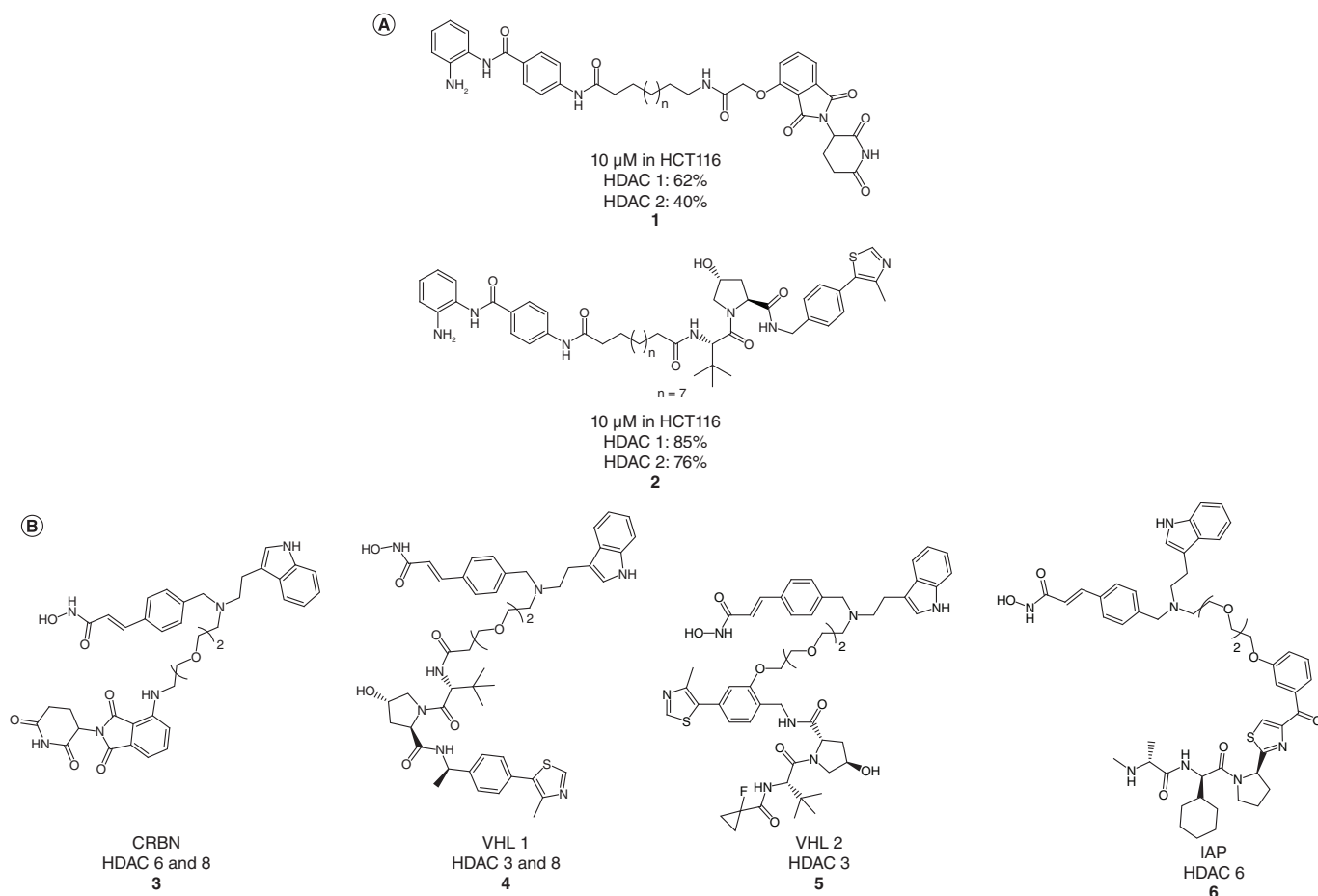


**Figure 6. General pharmacophore of an HDAC-PROTAC.** Exemplified by the HDAC-PROTACs by Yang and Schiedel [109,110]. Whereas the upper HDAC-PROTAC includes a typical pharmacophore for an HDAC inhibitor targeting the Zn-dependent HDAC classes I, II and IV, the lower HDAC-PROTAC contains an HDAC class III targeting motif.

CU: Connecting unit; ZBG: Zinc-binding group.

### E3 ligase ligands for HDAC-PROTACs

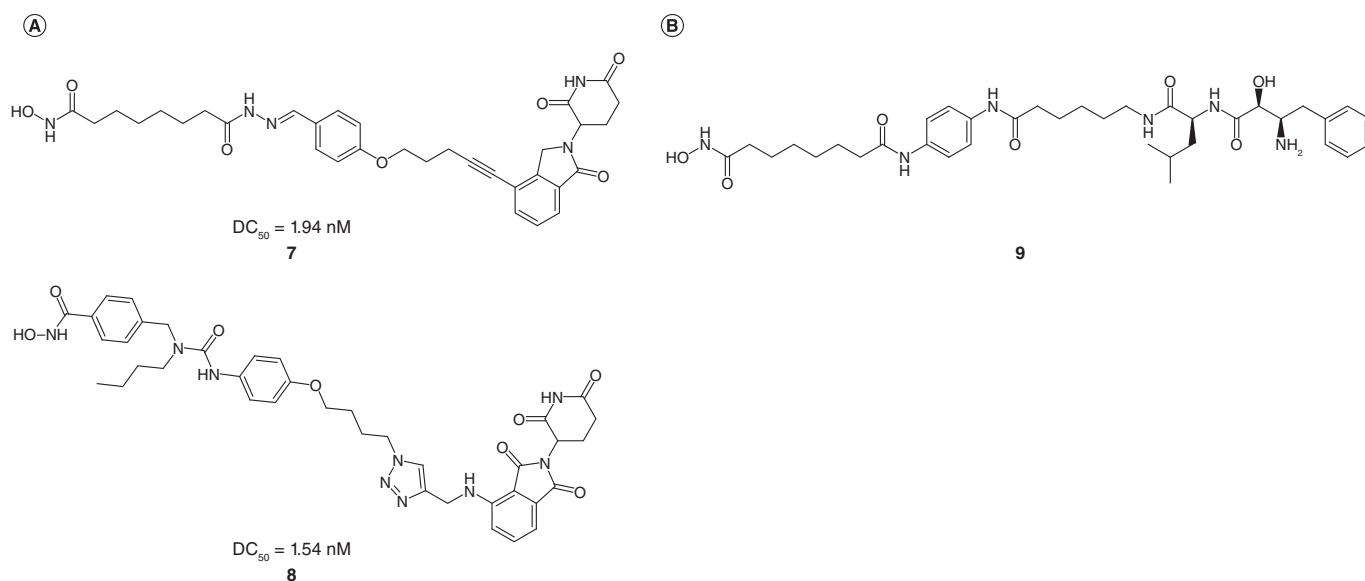
To date, approximately 100 HDACi-PROTACs utilizing the CRBN, VHL or the cIAP E3 ligases have been reported [100,111]. Xiong *et al.* recently investigated CRBN-, VHL-, and IAP-based PROTACs and more specifically within their VHL-based PROTACs they also studied two different attachment points of the VHL ligand [100] (Figure 7B). It was formerly published that the attachment point of the VHL ligand has a significant impact on the degradation profile of the resulting PROTACs [97]. By focusing only on the effect of the recruited ligand through using the same HDACi and the same linker, they elucidated the different degradation efficacy and substrate selectivity of the resulting PROTACs. Their set of Dacinostat based PROTACs showed that the CRBN recruiting PROTAC had a preference for HDAC 6 and 8 (Figure 7B; PROTAC 3) while the VHL-based PROTACs showed a strong preference for HDAC 3 (Figure 7B; PROTACs 4,5). Between the two VHL-based degraders which only differ in the attachment point of the VHL ligand, a difference in degradation efficacy was observed. The degradation selectivity showed only a slight difference as one of the degraders initiated not only the degradation of HDAC 3 but also a weak degradation of HDAC 8. Interestingly, the IAP-based degrader exhibited weak but selective HDAC 6 degradation [100] (Figure 7B; PROTAC 6). The observed E3 ligase dependent degradation selectivity of different HDAC enzymes was also true with a different HDACi part. The replacement of Dacinostat with vorinostat as an HDACi ligand led to a change in the profile of degraded HDAC enzymes. Intriguingly, whereas the selectivity of Dacinostat-based PROTACs is strongly dependent on the recruited E3 ligase, the selectivity of SAHA-based PROTACs is less dependent on the E3 ligase. HDAC 6 and 10 were degraded independently from the used E3



**Figure 7. Comparison of HDAC-PROTACs recruiting different E3 ligase ligands. (A)** The choice of the E3 ligase ligand influences degradation efficacy. Direct comparison of a cereblon-based histone deacetylase (HDAC)-proteolysis-targeting chimera (PROTAC) versus a VHL-based HDAC-PROTAC [112]. **(B)** The choice of the E3 ligase ligand influences degradation selectivity. Comparison of a set of HDAC-PROTACs only differing in the utilized E3 ligase ligand and the HDAC enzymes which were degraded [100]. The percentages represent the proportion of degraded protein compared to vehicle control in the stated cell types using the declared concentrations. CRBN: Cereblon.

ligase ligand, however, the CRBN-based degraders showed a more pronounced HDAC 6 degradation compared to the VHL-based analogues [100].

A very limited number of studies allow the direct comparison of the effects of different E3 ligases on the degradation of HDAC proteins since in most cases only one E3 binding motif is used. Smalley *et al.* synthesized sets of CRBN-based and VHL-based PROTACs with the same linker length, type and the same HDACi motif and tested their *in vitro* HDAC inhibitory activity on an isolated LSD1-CoREST-HDAC 1 complex [112]. It was observed that their CRBN-based and VHL-based PROTAC, were potent HDAC 1 and 2 degraders. Interestingly, the VHL-based PROTAC induced a more pronounced degradation of HDAC 1 and 2 than the CRBN-based PROTAC. In HCT 116 cells, at a concentration of 10  $\mu$ M, the VHL-based degrader achieved a degradation of 85% for HDAC 1, 76% for HDAC 2 and 63% for HDAC 3 whereas the CRBN-based degrader achieved 62% degradation of HDAC 1 and 40% degradation of HDAC 2, HDAC 3 levels were not measured (all values are relative to DMSO control) (Figure 7A; PROTACs 1 and 2). In addition to the influence of the E3 ligase ligand, a difference between the investigated cell lines was seen [112]. A stronger degradation was observed in HCT116 cells in comparison to E14 mouse embryonic stem (ES) cells. Interestingly, the PROTACs with shorter linkers displayed the most potent affinity toward the LSD1-CoREST-HDAC 1 complex but were unable to induce histone acetylation in the ES cell model. In this cell model, only the formerly less active PROTACs with longer linker lengths were able to induce histone acetylation.



**Figure 8.** Lenalidomide based HDAC-PROTACs and bestatin-based HDAC-cIAP hybrid molecule. (A) A lenalidomide-based PROTAC can induce as potent HDAC 6 degradation as a pomalidomide based in MM1S cells [77]. (B) HDAC-cIAP hybrid molecule [113].

The higher degradation activity of VHL-based PROTACs toward class I HDACs was also reported by Xiao *et al.* In their PROTAC set, only the VHL-based PROTAC was consistently capable of degrading the HDAC 3 enzyme. Only one CRBN PROTAC was reported to degrade HDAC 3 in the triple-negative breast cancer cell line MDA-MB-468 and the ER+ cell line T47D (Figure 11B; PROTAC 14). The degradation of the most homologous HDAC isoforms, HDAC 1 and 2 was not observed [96]. Intriguingly, despite the promising degradation ability, their most potent PROTAC showed diminished cytotoxic effects on the investigated cancer cells in comparison to the parent HDACi [96]. This may be attributed to the specific degradation of HDAC 3 over HDAC 1 and 2. It has been shown that these three HDACs are driving the anticancer activity of HDACi. Thus the degradation of just one of these isoforms may be the reason for the diminished cytotoxic activity [4].

In contrast to the superiority of the VHL ligand and in accordance with the work of the Fischer lab, the studies of Yang *et al.* indicated that their subset of CRBN-based PROTACs are more potent degraders of HDAC 6 than their VHL-based [82,100]. Their degrader was able to induce protein degradation in a wide panel of cell lines. These findings regarding the potency of CRBN-based degraders were later confirmed by authors, who only after optimizing the linker length of the HDAC 6-PROTACs, found a VHL-based PROTAC degrader with equal efficiency in MM1S cells to a CRBN-based one [79]. In comparison to their synthesized CRBN-based degrader, the VHL-based one retaining the same linker length showed a feeble degradation. After linker extension, the VHL-based degrader showed a comparable degradation efficacy to their CRBN-based degrader. This emphasizes the need to optimize the linker length and stresses the differences in the ternary complex formation depending on the utilized E3 ligase ligand. The degradation effect of their most potent VHL-based degrader (Figure 12; PROTAC 20) was consistent along different human cancer cell lines (HEK293T, U87MG, A549 and MCF-7), but the potency varied across the cell lines. Only in the MCF-7 and HEK293T cancer cells nearly complete HDAC 6 degradation was observed, whereas the maximum degradation in U87MG and A549 was not that pronounced. Also, an animal species variation regarding the potency was reported. In mouse 4935 cells, the optimized VHL-based degrader induced more HDAC 6 degradation and  $\alpha$ -tubulin acetylation than their CRBN-based degrader [79].

Due to the synthetic accessibility and validated degrading potency, Yang *et al.* focused on the optimization of the CRBN ligands for the development of new HDAC-PROTACs. The initial modification of the E3 ligase ligand indeed led to positive effects, however, to achieve the desired effects, the linker length also needed to be adapted [77]. They developed improved CRBN ligands and were able to translate their results into a new small set of lenalidomide, instead of pomalidomide, based HDAC-PROTAC [77] (Figure 8A; PROTAC 7). This finding illustrates that it is possible to design lenalidomide-based HDAC-PROTACs even with the same degradation efficacy as their previously published pomalidomide-based PROTAC in MM1S cells (Figure 8; PROTAC 7 and 8).



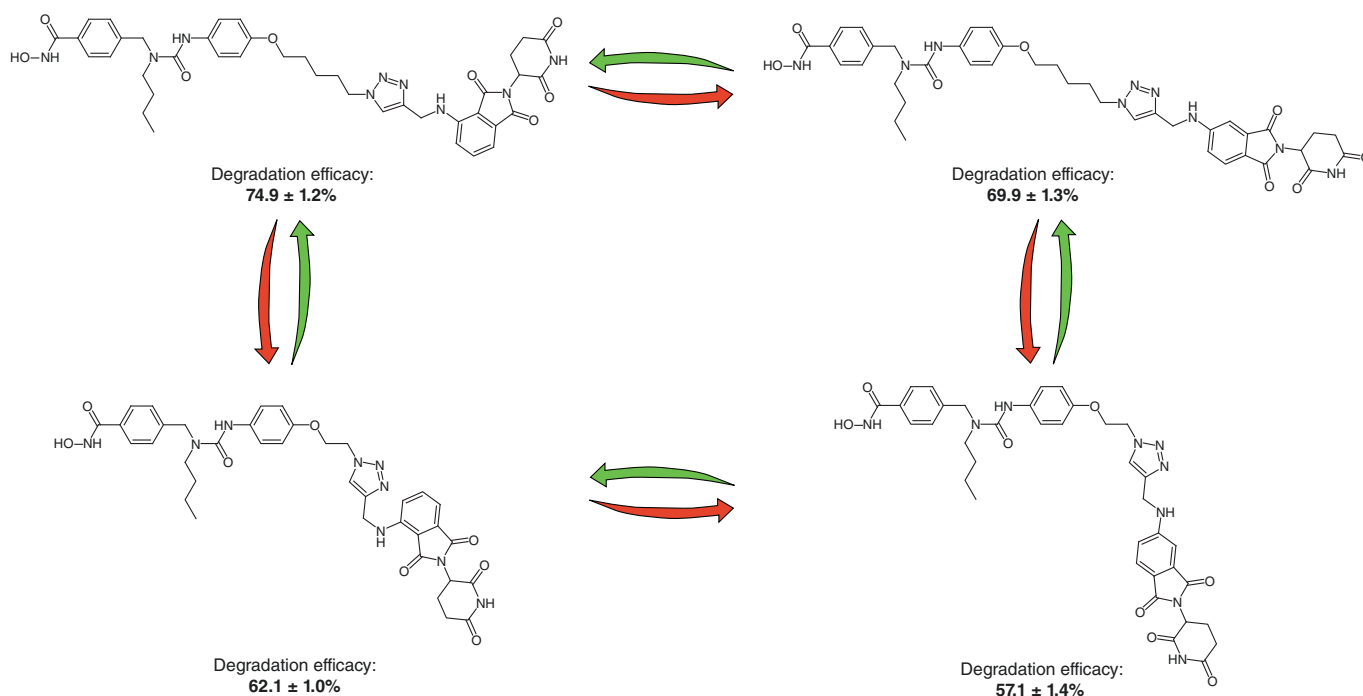
Their results highlighted that there is chemical space for the development of new E3 ligase binding motifs [75,77]. Apart from their work on designing an HDAC degrader, the same group has also established an assay for determining the affinity of new CRBN ligands through the displacement of an HDAC–PROTAC and measuring the protein levels of the rescued HDAC enzyme [77].

In addition to CRBN- and VHL-based HDAC–PROTACs, Cao *et al.* used the known cIAP1 ligand bestatin to develop cIAP–HDAC–PROTACs [113], due to previous success of this ligand when used in the design of PROTACs targeting different POIs [64]. Unfortunately, these derived HDAC–cIAP–hybrid molecules were not able to induce degradation of the analyzed HDACs in RPMI-8226 cells (Figure 8B; PROTAC 9) [113]. As described before, Xiong *et al.* later successfully recruited the IAP–E3 ligase with their HDAC–PROTACs [100] (Figure 7B; PROTAC 6).

### Influence of the linker region

Currently, the linker region is the most targeted region for chemical modifications of the HDAC–PROTACs. The vast majority of these modifications involve the utilization of flexible (poly-)ethyleneglycol or alkyl-chain-based linkers, often including a triazole-moiety serving as a connecting element [75,79,82,96,100,106,110,112,114].

Wu *et al.* performed the most comprehensive linker optimization. In their work, not only the linker length but also the position of the triazole, as well as the influence of the attachment position of the linker at the CRBN ligand, was investigated [75] (Figure 9).



**Figure 9. Influence of linker length and attachment position on the degradation efficacy of cereblon-based histone deacetylase–proteolysis-targeting chimeras.** Green arrows indicate an increase in degradation efficacy, red arrows represent a decrease in degradation efficacy. Values indicate the reduction of HDAC 6 levels relative to DMSO control in MM1S cells at 10 nM [75].

In summary, current findings demonstrate that the linker length, composition and the attachment point of the linker to the E3 ligase ligand modulate HDAC–PROTAC degradation efficacy. In line with the importance of the formation of a ternary complex, the linker length showed the most prominent impact on the degradation ability of their HDAC–PROTAC set, followed by the orientation of the E3 ligase ligand. The position of the triazole moiety in the linker displayed a minor role in tuning the degradation efficacy [75] (Figure 9). The study by Wu *et al.* illustrated different parameters and opportunities to optimize the linker of an HDAC–PROTAC. The results of the Tang group broadened these parameters by highlighting the importance of the linker type as their developed VHL-based HDAC 6 degraders were only active with an alkyl linker and not with a polyethylene glycol linker [79].

The Fischer group showed that a longer linker seems to broaden the HDAC–PROTAC target profile. Their analogues with longer linkers induced the degradation of more HDAC isozymes than the direct analogues with a

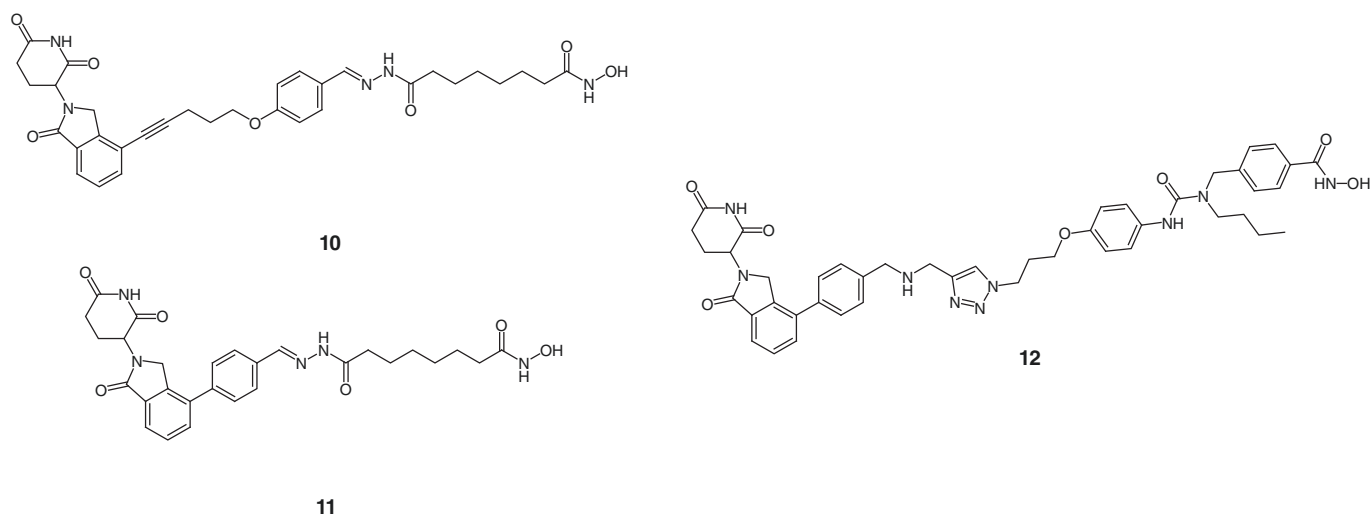
shorter linker. Specific differences were observed with two different HDACi units and seen regardless of the utilized E3 ligase [100].

With two sets of either CRBN-utilizing Dacinostat-based PROTACs or VHL-utilizing Dacinostat-based PROTACs only differing in their linker length, they detected differences in HDAC-PROTAC efficacy and selectivity. Interestingly, in both sets, each consisting of five PROTACs, one PROTAC was unable to induce any degradation of an HDAC enzyme. In the case of the VHL-recruiting PROTAC, the shorter as well as the longer analogues were potent degraders of HDAC 3. In the case of CRBN-utilizing PROTACs, the analogue with the longest linker was unable to show degradation of any HDAC, whereas the shorter analogues were potent degraders of HDACs 6 and 8 [100]. This emphasizes the crucial importance of the linker length itself and the necessity to optimize the linker in the design of HDAC-PROTACs.

Due to the similarity of the underlying principles of the PROTAC technology these parameters are not unique to HDAC-PROTACs and comparable studies have been conducted with PROTACs targeting a variety of targets [61,76,78,97].

As expected in regard to the necessity of a productive ternary complex and because these ternary complexes should present substantial differences depending on the recruited E3 ligase, the targeted HDAC and the properties of the HDAC-PROTAC itself, it is neither possible nor useful to generalize the observed findings of the optimal HDAC-PROTAC linker. However, it may be pointed out that in the case of HDAC-PROTACs, a sharp decrease in degradation is often observed if the linker is too short [77,112,114], while PROTACs with longer linkers show an increase or at least a maintenance of degradation efficacy [75,112]. Additionally, as mentioned above, a longer linker may broaden the selectivity profile of an HDAC-PROTAC [100].

As mentioned earlier in this section, most of the published HDAC-PROTACs rely on flexible linkers, however, different linker compositions were developed further by Yang and coworkers. They have made valuable progress with their development of more rigid alkyne and phenyl linkers [77] (Figure 10; PROTAC 10 and 11). Although only the alkyne-based PROTACs showed degradation activity, this work provided a proof of concept for the introduction of alternative HDAC-PROTAC linkers. Interestingly, they were also able to synthesize a linker with an integrated secondary amine (Figure 10; PROTAC 12). This structural element was also used by Xiong *et al.* as it shows fewer hydrogen-bond-acceptors- and donors in comparison to the amide-analogues. In this way, they aimed to enhance the cell permeability of their degraders [77,100] (Figure 7B; PROTACs 3–6 & Figure 12; PROTAC 18, 19).

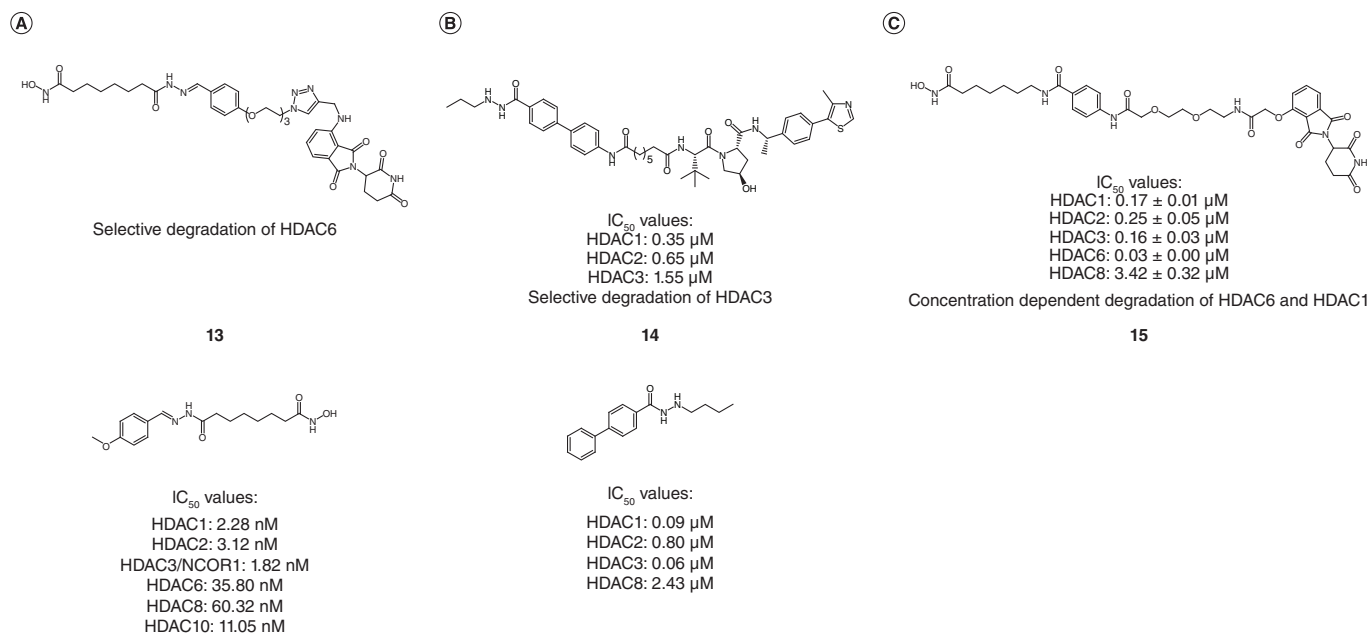


**Figure 10.** PROTACs synthesized by Yang *et al.* illustrating different types of linker design.

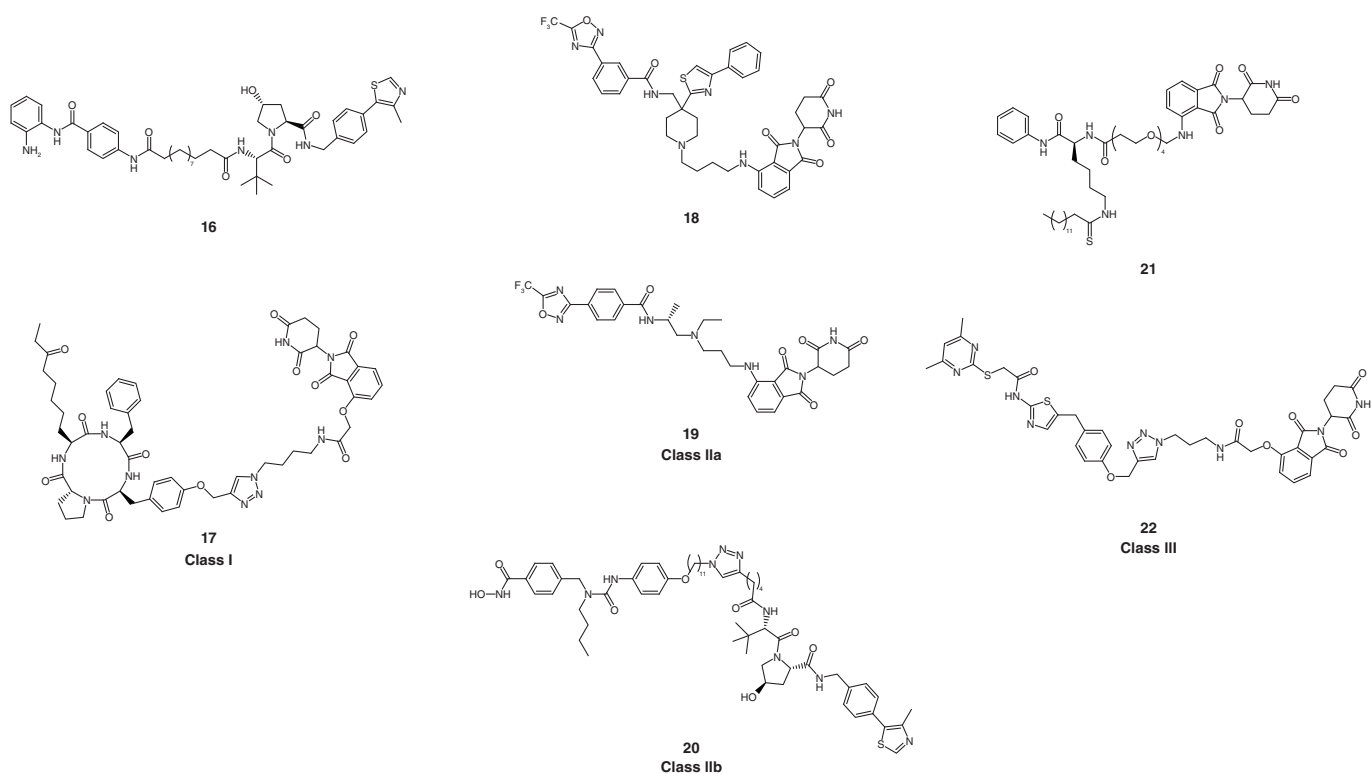
### The role of the HDACi

The HDACi motif of an HDAC-PROTAC is of crucial importance for the degradation selectivity, as it dictates the affinity of the HDAC-PROTAC toward certain HDAC enzymes. However, in several cases HDAC-PROTACs utilizing non-selective HDACi ligands selectively degraded one of the HDAC enzymes which the parent HDACi





**Figure 11. Histone deacetylase–proteolysis-targeting chimeras derived from unselective HDAC inhibitors are showing an unexpected HDAC-degradation selectivity. (A) PROTAC 13 is derived from a pan-HDAC inhibitor and shows selective degradation of HDAC 6 [109,115]. (B) PROTAC 14 shows selective HDAC 3 degradation although derived from an unselective HDAC class I inhibitor [96]. (C) PROTAC 15 itself is a potent inhibitor of HDAC classes I and IIb HDAC enzymes and shows concentration-dependent degradation of either HDAC 6 or HDAC 1 and HDAC 6 [116].**



**Figure 12. Examples of histone deacetylase–proteolysis-targeting chimeras with primed selectivity through utilizing a HDAC inhibitor with a preference for a certain HDAC class and the classes of HDAC enzymes they degrade.**

showed affinity to. In contrast, there are only singular cases reported where a degradation of a certain HDAC by an HDAC-PROTAC was observed which was not inhibited by the parent HDACi [100].

For example, Yang *et al.* used an unselective hydroxamate-based HDACi as an HDAC binding module and mainly observed the degradation of HDAC 6, despite the nanomolar IC<sub>50</sub> values of the HDACi against other isoforms (HDAC 1–3, 8 and 10) (Figure 11A; PROTAC 13) [77,109,115]. Xiao *et al.* observed similar results, which showed that their parent HDACi was a potent inhibitor of all class 1 enzymes, especially HDAC 1–3, but the PROTACs containing that inhibitor only led to HDAC 3 degradation (Figure 11B; PROTAC 14) [96]. These interesting outcomes indicate that the HDAC isoform profile of the parent HDAC inhibitor may not be the best surrogate parameter for the degradation profile of a derived HDAC-PROTAC.

Xiong *et al.* observations raise the question if even the HDAC isoform profile of the HDAC-PROTAC itself is a suitable parameter for the degradation profile. Their investigated SAHA-based degraders showed an isozyme profile comparable to their parent pan-HDAC inhibitor as well as a retained inhibition potency on the respective HDAC enzyme *in vitro*. Nevertheless, the derived HDAC-PROTACs were only able to degrade HDAC 6. To exclude possible time-dependent effects, they performed a time-course analysis and found a selective and time-dependent degradation of only HDAC 6.

Additionally, their VHL-recruiting and Dacinostat-based degraders showed the same preference for HDAC isozymes as Dacinostat but preferentially HDAC 3 was degraded [100] (Figure 7B; PROTAC 4 and 5). Sinatra *et al.*s degrader also revealed the robust selectivity of HDAC-PROTACs for degradation of an HDAC class in contrast to the inhibitory activities of the HDAC-PROTAC itself. Their PROTAC showed an inhibition of HDAC enzyme activity in the higher nanomolar range with a roughly tenfold stronger inhibition of HDAC 6 over HDAC 1, 2 and 3. However, they observed up to a concentration of 10 micromolar selective HDAC 6 degradation [116] (Figure 11C; PROTAC 15).

With these outcomes, another result of the Ciulli group was successfully translated into the field of HDAC degraders. They found the same trend of pronounced selectivity of PROTACs targeting the family of bromodomain proteins [52]. This trend is also true for proteins which are not directly involved in the process of epigenetic regulation as was elucidated by the Crews group [84].

These findings were rationalized by the fact that the ternary complex formation of PROTACs with the E3 ligase and the protein of interest is the key driver in dictating PROTAC selectivity and efficacy. The Ciulli lab showed that besides high target affinity, the cooperativity of the ternary complex drives the selectivity of the degradation of bromodomain PROTACs [117,118]. Although neither the cooperativity nor the half-lives of the ternary HDAC-PROTAC E3 ligase complexes were investigated in the HDAC-PROTAC literature, the observations made in the present publications can be explained by this concept.

Although a degradation selectivity for a certain HDAC-PROTAC containing a non-selective HDACi is observed, the degradation profile is difficult to predict. This is because it is not in full accordance with the IC<sub>50</sub> profile of the parent HDACi or the HDAC-PROTAC itself.

Aiming for targeted degradation of a certain HDAC, HDAC-PROTACs utilizing class selective HDACi were designed.

TMP 269 and NVS-HD1 are HDAC class IIa selective inhibitors [119,120]. The TMP 269-based degraders showed E3 ligase ligand dependent selectivity. TMP 269-based and CRBN-utilizing PROTACs induced selective degradation of HDAC class IIa enzymes 5 and 7, whereas the VHL-utilizing analogues degraded HDAC 4 and/or 7 (Figure 12; PROTAC 18). A TMP 269-based PROTAC recruiting the IAP ligase was not able to induce degradation of any HDAC isoform. Interestingly, despite the comparable isoform profile of the parent HDACi, the NVS-HD1-based HDAC-PROTACs displayed a different degradation profile than the TMP 269-based ones. The degradation profile of NVS-HD1-based PROTACs were not as class IIa selective as the TMP 269-based degraders. Whereas the investigated set of TMP-based degraders selectively degraded class IIa enzymes, only one out of nine designed NVS HD1-based degraders was a selective class IIa HDAC enzyme degrader (Figure 12; PROTAC 19). The other NVS-HD1-based degraders were either not class-selective or not able to induce degradation at all [100]. In contrast to the non-functional TMP 269-based IAP-utilizing degrader, the NVS-HD1-based IAP-utilizing degrader was able to induce HDAC 6 degradation.

Nexturastat A is an HDAC 6 selective inhibitor [121]. All of the nexturastat A derived PROTACs are degrading HDAC 6 and are proclaimed to be HDAC 6 selective, although not all HDAC isoform levels were investigated [75,77,79,82,122] (Figure 12; PROTAC 20).

Another important class of HDAC–PROTACs are PROTACs which are primed to degrade HDACs of class I. Known HDAC class I selective inhibitors are inhibitors that are based on an ortho-aminoanilide-zinc-binding-group or different macrocyclic HDAC inhibitors [123,124].

Smalley *et al.* used the HDAC 1–3 selective inhibitor CI-994 as HDACi motif. CI-994 shows a strong inhibition of HDAC 1, 2 and 3 along with a tenfold preference over the next targeted isoform, HDAC 10 [112,125]. Their best PROTAC was able to degrade HDAC 1–3, as shown above, reflecting the same preferences as the parent compound. Since no other HDAC-isoform was investigated, no statement can be made regarding the PROTAC selectivity [112] (Figure 7A; PROTAC 12,16 & Figure 12; PROTAC 16). Cao *et al.* partially confirmed these results by designing another set of CI-994-based HDAC–PROTACs. Different from previous results, their PROTACs were mainly able to induce degradation of HDAC 3 whereas the degradation of HDAC 1 and HDAC 2 was not significant or at least not as pronounced as the degradation of HDAC 3 in RAW 264.7 macrophages [106].

Roatsch *et al.* reported in an actual preprint macrocyclic HDAC–PROTACs with selective class 1 inhibition properties. Their inhibition profile is in accordance with the degradation profile as their most potent degrader degrades only class 1 HDAC enzymes 1–3 [114] (Figure 12; PROTAC 17).

Among the NAD<sup>+</sup>-dependent sirtuins, Schiedel *et al.* developed a PROTAC using a selective Sirt2 inhibitor. Their PROTAC degradation profile falls in line with the former results, as their PROTAC selectively degrades Sirt2 over Sirt1 enzymes [110] (Figure 12; PROTAC 22). Recently, another selective Sirt2 degrader was designed. Interestingly, this degrader utilized a covalent inhibitor of Sirt2 and is, therefore, the only reported HDAC–PROTAC with a covalently binding HDACi motif (Figure 12; PROTAC 21). The most potent designed degrader was able to reduce cell viability in MCF7 and MDA-MB-231 cells. In this aspect, the degrader outruns the Sirt2 inhibitor which it was derived from, as it shows a more pronounced effect in the low micromolar concentration range [126].

These results led to the conclusion that through the use of a highly selective HDAC ligand, or if the PROTAC itself shows a high grade of selectivity, the resulting degradation of HDAC enzymes can be steered.

It is noticeable that the majority of reported HDAC–PROTACs at least preferentially degrade the HDAC enzymes 3, 6, 8 and Sirt2. This might correlate with their cytosolic localization, as HDAC 6, 8 and Sirt2 are located in the cytosol [4,32] and HDAC 3 is the only member of class 1 HDAC enzymes that is not strictly located in the nucleus [127]. Other authors mentioned the role of the protein turn-over rates as HDAC 3, 6 and 8 are among the HDAC enzymes with the longest half-lives [100,128]. Degradation of these enzymes therefore exhibits a more pronounced long-lasting effect than the degradation of the other HDAC enzymes with shorter half-lives. Lastly, it cannot be ruled out that HDAC enzymes 3, 6, 8 and Sirt2 form the ternary complexes with the PROTAC and the E3 ligase more efficiently than the other HDAC enzymes. The underlying selectivity-driving parameters have yet to be elucidated.

HDAC inhibitory data alone is not a suitable parameter for the prediction of effective degradation abilities and profiles. One driving principle behind effective degradation is the efficient formation of the ternary complex consisting of the E3 ligase, the PROTAC and the HDAC as seen in literature before [84,97].

This complex feature of HDAC–PROTACs was observed by Roatsch *et al.* as their measured HDAC inhibitory data does not fully correspond to a forecast of efficient degradation [114]. PROTAC 17 showed efficient degradation of HDAC class I enzymes despite having feebler binding affinities toward these enzymes compared to the parent HDAC inhibitor and compared to a degrader with more pronounced HDAC inhibitory properties (Figure 12; PROTAC 17) [114]. These results were confirmed by Xiao *et al.* as their most potent degrader was not the most potent inhibitor of HDAC class 1 activity. In general, their VHL-based PROTACs showed a roughly tenfold weaker HDAC inhibitor ability than their CRBN-based PROTACs. Albeit, this observation does not translate into the degradation efficacy [96]. However, HDAC–PROTACs can still be potent HDACi themselves as several degraders roughly maintain the HDAC inhibitory activity of their parent HDACi [106,110,112,126].

Smalley *et al.* observed that the enzymatic HDAC inhibitory activity of HDAC–PROTACs does not necessarily translate into cellular HDAC degradation activity. Two of their PROTACs were only active against the HDAC 1 in an LSD1-CoREST-HDAC complex but showed no hyperacetylation in E14 mouse embryonic stem cells. The degradation assays were only performed with the PROTACs which were able to induce hyperacetylation. Thus, it remains unclear if the degradation of HDAC enzymes is independent of the inhibition of HDAC enzymes in a cellular context [112]. They could not discard the hypothesis that these observed effects are only because of limited permeation into the cell.

### Cell type dependency

A general challenge in assessing the degradation potency of HDAC-PROTACs is illustrated by the work of Xiong *et al.* and Xiao *et al.* Xiong *et al.* screened their HDAC-PROTACs against KELLY as well as MM.1S cells and found significant differences in the degradation potency as well as the isoform profile of the investigated degraders. In general, they observed a more pronounced and promiscuous HDAC degradation in MM.1S cells. The finding of more pronounced degradation in MM.1S cells was in line with prior observations by Yang *et al.* [79]. The authors noted that the comparison of isoform-selectivity between different lineages should only be done carefully as the HDAC expression levels differ between these cells. For example, HDAC 9 and 10 are not reliably expressed in KELLY cells but in MM.1S cells. Still, they were unable to find any evidence that the cell line-specific degradation is influenced by the expression levels of the other HDAC enzymes [100]. The same issue was observed by Cao *et al.* their set of CRBN-based PROTACs only differed in linker length and chemical structure and were only active in RAW 264.7 macrophages, but not in A549 cells [106]. Xiao *et al.* gave further valuable insights into the topic of cell-type dependencies of HDAC-PROTACs with their screening against MDA-MB-468 and T47D cancer cells. In both cell lines, the same PROTAC attained the best degradation of the HDAC 3 enzyme. Interestingly, the cell lines showed different vulnerabilities against other VHL-based PROTACs in this set. For example, the analogue with the longest linker showed in the MDA-MB-469 cell line a feebler degradation potency than in the T47D cell line. The result was inverted by a PROTAC with an intermediate linker length, showing a more stressed degradation in T47D than in MDA-MB-469 cells [96]. This demonstrated that the cell type influences the degradation efficacy of HDAC-PROTACs even when they are targeting the same E3 ligase and HDAC enzyme.

### Conclusion

In the last 3 years, significant progress in the field of HDAC-PROTACs has been made. Potent HDAC-PROTACs have been developed, validating the PROTAC approach in the HDACi field.

The three-part pharmacophore of a PROTAC consisting of an E3 ligase ligand, the linker and a POI ligand was successfully established into the new class of HDAC-PROTACs.

First, the E3 ligases CRBN, VHL and IAP were successfully recruited in HDAC degraders. The choice of the E3 ligase ligand determines not only degradation efficacy but also degradation selectivity. Consequently, tuning of the degradation profile of HDAC-PROTACs by choosing the appropriate E3 ligase ligand is possible. The CRBN- and the VHL ligase-recruiting HDAC-PROTACs exceed their IAP-recruiting analogs with regard to the degradation efficacy [100]. Both E3 ligase units are suitable for the design of potent HDAC degraders and all HDAC classes, except those of class IV, have been addressed with degraders based on CRBN- or VHL-recruiting elements [77,96,100].

Second, the linker is of crucial importance for the degradation efficacy of the HDAC-PROTACs. Moreover, there are first hints that the linker has an impact on degradation selectivity [100]. Most of the used linkers are flexible alkyl chains or (poly)ethyleneglycol linkers, more rigid alkyne or phenyl linkers are, at least for CRBN-based PROTACs, tolerated, but are relatively rare [77,112]. As the optimal linker depends on the HDAC of interest, the recruited E3 ligase, the resulting HDAC-PROTAC-E3 ligase complex as well as the chemical structure of the PROTAC itself, the development of universally applicable linker-guidelines is not possible. Small changes in linker length or its composition showed significant effects on the degradation efficacy of HDAC-PROTACs. This emphasizes that the optimal PROTAC linker for a specific drug target has to fulfill all linker requirements such as length, chemical structure and attachment points toward the HDACi and the E3 ligase [75,78,79,100].

Lastly, it was shown that the choice of the HDAC binding motif heavily influences the selectivity of the HDAC-PROTAC leading to degraders with an exquisite selectivity over other isoforms. However, the surprising HDAC selectivity of an HDAC-PROTAC derived from unselective HDACi led to the conclusion that the HDAC inhibitory properties are not in all cases the appropriate prediction parameter for the envisioned HDAC degradation profile. The discrepancy between the degradation profile and the HDAC-inhibitory properties is not limited to the comparison of the HDAC-PROTAC degradation profile with the inhibition profile of the parent HDACi but extends to the HDAC inhibitory activities of the HDAC-PROTAC itself. This raises the question of how to steer the selectivity of HDAC degraders by chemical PROTAC design. In accordance to formerly published results referring to other research fields, the degradation selectivity of an HDAC-PROTAC often supersedes the selectivity of its HDACi inhibitory properties as well as the HDACi inhibitory properties of its parent HDACi [52,84,96,116].

So far, most of the research activities were focused on the design of HDAC class I, IIb or III selective degraders by utilizing an HDAC inhibitor with the class preference of interest. Unselective inhibitors incorporated in HDAC-PROTACs tend to show degradation preference for the class I HDACs 3 and 8 and the class IIb HDAC

6 [96,100,109,116]. This underlines that the cytoplasmic localization of the HDACs 3, 6 and 8 enzymes seems to be the main reason for their frequent degradation. In contrast, there is no reported HDAC–PROTAC for the at least partly cytosolic localized HDAC enzyme HDAC 11. Additionally, the class IIa HDACs are, despite their tractability through selective inhibitors and their at least partially cytosolic location, difficult to degrade with HDAC–PROTACs. The existing class IIa HDAC degraders show a weak degradation potency compared to the degradation levels of HDAC degraders of class IIb HDACs [100]. This queries the importance of the cellular HDAC localization. The questions arise of how other factors like the cooperativity and the half-life of the ternary E3 ligase–PROTAC–HDAC complex, the cellular turnover of the HDAC enzyme or the occurrence of the respective HDAC enzyme in larger protein complexes influence the degradation selectivity of the HDAC–PROTACs. Intriguingly, it was recently shown that complex components of HDAC protein complexes are prone to collateral degradation induced by HDAC–PROTACs. These HDAC complex components could even be degraded if the HDAC component itself was not [100]. These results may offer the possibility to selectively destabilize HDAC–protein complexes instead of just inhibiting their HDAC function.

If the optimal HDAC–PROTAC possesses efficient degradation potency as well as degradation selectivity, the HDAC–PROTACs investigated to date are on track to realize this idea. Potent degraders with diverse structural motifs have been developed, and promising effects on different cancer cell types have been observed. A major challenge for further HDAC–PROTAC development remains the elucidation of the currently hardly predictable selectivity of HDAC enzyme degradation.

### Future perspective

With the emergence of BRD degraders in clinical trials, the field of epigenetic protein degraders has proven its suitability to enrich the field of epigenetic drug research. Before HDAC–PROTACs can catch up to the BRD degraders, more detailed biological and pharmacological studies are needed. Three major areas need to be addressed in the future. First, the biological screening and evaluation of the HDAC–PROTACs to be extended. The majority of HDAC–PROTACs have not been tested for their degradation ability on all HDAC isoforms. Furthermore, to elucidate off-target degradation and to investigate the effects of indirect degradation, further proteomic screening of HDAC–PROTACs is needed. In particular, the development of further class IIa or class IV degrading HDAC–PROTACs in combination with an analysis of their collateral or indirectly degraded proteins would contribute to the understanding of their biological function. The fact that HDAC-targeting PROTACs can degrade other members of protein complexes without degrading the target HDAC itself will help to elucidate their implications and role in these complexes [100].

Second, a systematic evaluation of the cell type differences is crucial for understanding whether certain cancer or tissue types are more sensitive to HDAC–PROTACs than others. Furthermore, it is of great interest to elucidate the correlation between the cellular HDAC expression levels and the sensitivity toward HDAC–PROTACs. The results obtained out of these preclinical studies could pave the way for the introduction of HDAC–PROTAC in the clinic.

Third, the promising *in vitro* data are lacking confirmation through *in vivo* experiments. To date, the biological evaluation of HDAC–PROTACs fully depends on *in vitro* assays. No case of *in vivo* evaluation has been reported. In this regard, the further development of HDAC–PROTACs has to focus on the translation of the already observed biological effects as well as on the development of bioavailable PROTACs. Thus, physicochemical and pharmacokinetic properties of HDAC–PROTACs have to be taken in account.

But even without *in vivo* results, the HDAC–PROTAC field has opened up space for further investigation through the synthesis of potent degraders recruiting different E3 ligases and including HDAC inhibitors with various isoenzyme profiles. With these encouraging results, the use of different and new E3 ligase ligands has become an urgent topic, which is already on the current research agenda. The scope of ligandable E3 ligases is continuously expanding through the development of new approaches to discover new ligands [62,68,70,72]. These new E3 ligase ligands could facilitate the search for tissue- and disease-specific HDAC–PROTACs.

In addition to the discovery and development of new E3 ligase ligands, the HDAC–PROTAC approach leaves also chemical space for the inclusion of novel HDACi motifs. To date, no HDAC–PROTAC targeting the class IV HDAC enzyme, HDAC 11, has been described, but suitable ligands for this target have been recently developed [129,130]. Moreover, the recent development of a ligand binding to the Zn<sup>2+</sup>-UBD of HDAC 6 spearheaded the way for the non-active site dependent targeting of HDAC enzymes [131]. The inclusion of this new type



of HDAC inhibitor, that is targeting a functional HDAC domain, into the design of HDAC-PROTACs would significantly broaden the scope of HDAC degraders.

### Executive summary

#### Choosing the E3 ligase ligand

- The VHL, CRBN and IAP ligands are currently the only E3 ligase recruiting elements successfully implemented in histone deacetylase (HDAC)-proteolysis-targeting chimeras (PROTACs).
- Usually, the VHL ligand and CRBN-based HDAC-PROTACs are more potent degraders, compared to IAP-based analogs.

#### Linker composition

- Commonly, flexible alkyl-chains or polyethyleneglycol based linkers are used, and more rigid linkers are tolerated.
- Linker length, composition and attachment position have to be considered in the PROTAC-linker development.

#### Influence of the HDACi motif

- Even PROTACs utilizing an unselective HDACi can provide the selective degradation of certain HDAC isozymes.
- Neither the HDAC inhibition selectivity profile of the parent HDAC inhibitor nor the HDAC inhibitory properties of the HDAC-PROTAC itself are appropriate predictive parameters for the degradation profile of the HDAC-PROTAC.
- HDAC 3, HDAC 6, HDAC 8 and Sirt2 are especially prone to HDAC-PROTAC degradation influenced by their cytosolic localization.

### Financial & competing interests disclosure

The authors would like to thank the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation), the Research Training Group GRK 2158 and the Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD, German Academic Exchange Service) for funding. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

### Open access

This work is licensed under the Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

### References

Papers of special note have been highlighted as: • of interest; •• of considerable interest

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA. Cancer J. Clin.* 70(1), 7–30 (2020).
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* 71(3), 209–249 (2021).
3. Mann BS, Johnson JR, Cohen MH, Justice R, Pazdur R. FDA approval summary: vorinostat for treatment of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma. *Oncologist* 12(10), 1247–1252 (2007).
4. Ho TCS, Chan AHY, Ganesan A. Thirty years of HDAC inhibitors: 2020 insight and hindsight. *J. Med. Chem.* 63(21), 12460–12484 (2020).
- **Comprehensive review about histone deacetylase (HDAC) enzymes and progress in the field of HDAC inhibitors.**
5. Li Y, Seto E. HDACs and HDAC inhibitors in cancer development and therapy. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 6(10), 1–34 (2016).
6. Dagogo-Jack I, Shaw AT. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 15(2), 81–94 (2018).
7. Camidge DR, Pao W, Sequist LV. Acquired resistance to TKIs in solid tumours: learning from lung cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 11(8), 473–481 (2014).
8. Schram AM, Chang MT, Jonsson P, Drilon A. Fusions in solid tumours: diagnostic strategies, targeted therapy, and acquired resistance. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 14(12), 735–748 (2017).
9. Li X, Song Y. Proteolysis-targeting chimera (PROTAC) for targeted protein degradation and cancer therapy. *J. Hematol. Oncol.* 13(1), 1–14 (2020).
10. Flanagan JJ, Qian Y, Gough SM *et al.* Abstract P5-04-18: ARV-471, an oral estrogen receptor PROTAC degrader for breast cancer. *Cancer Res.* 79(Suppl. 4), P5-04-18-LP-P5-04-18 (2019).
11. Neklesa T, Snyder LB, Willard RR *et al.* Abstract 5236: ARV-110: an androgen receptor PROTAC degrader for prostate cancer. *Clin. Res.* 11(8), 5236–5236 (2018).

12. Mullard A. Targeted protein degraders crowd into the clinic. *Nat. Rev. Drug Discov.* 20(4), 247–250 (2021).
13. Park SY, Kim JS. A short guide to histone deacetylases including recent progress on class II enzymes. *Exp. Mol. Med.* 52(2), 204–212 (2020).
14. Frye RA. Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273(2), 793–798 (2000).
15. Kelly RDW, Cowley SM. The physiological roles of histone deacetylase (HDAC) 1 and 2: complex co-stars with multiple leading parts. *Biochem. Soc. Trans.* 41(3), 741–749 (2013).
16. Aramsangtienchai P, Spiegelman NA, He B *et al.* HDAC8 catalyzes the hydrolysis of long chain fatty acyl lysine. *ACS Chem. Biol.* 11(10), 2685–2692 (2016).
17. Chakrabarti A, Melesina J, Kolbinger FR *et al.* Targeting histone deacetylase 8 as a therapeutic approach to cancer and neurodegenerative diseases. *Future Med. Chem.* 8(13), 1609–1634 (2016).
18. Vanaja GR, Ramulu HG, Kalle AM. Overexpressed HDAC8 in cervical cancer cells shows functional redundancy of tubulin deacetylation with HDAC6. *Cell Commun. Signal* 16(1), 1–16 (2018).
19. Lahm A, Paolini C, Pallaoro M *et al.* Unraveling the hidden catalytic activity of vertebrate class IIa histone deacetylases. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104(44), 17335–17340 (2007).
20. Zhu Y, Huang M, Bushong E *et al.* Class IIa HDACs regulate learning and memory through dynamic experience-dependent repression of transcription. *Nat. Commun.* 10(1), 1–14 (2019).
21. Das Gupta K, Shakespear MR, Curson JEB *et al.* Class IIa histone deacetylases drive toll-like receptor-inducible glycolysis and macrophage inflammatory responses via pyruvate kinase M2. *Cell Rep.* 30(8), 2712–2728.e8 (2020).
22. Bertos NR, Gilquin B, Chan GKT, Yen TJ, Khochbin S, Yang XJ. Role of the tetradecapeptide repeat domain of human histone deacetylase 6 in cytoplasmic retention. *J. Biol. Chem.* 279(46), 48246–48254 (2004).
23. Tong JJ, Liu J, Bertos NR, Yang XJ. Identification of HDAC10, a novel class II human histone deacetylase containing a leucine-rich domain. *Nucleic Acids Res.* 30(5), 1114–1123 (2002).
24. Zhang Y, Li N, Caron C *et al.* HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules *in vivo*. *EMBO J.* 22(5), 1168–1179 (2003).
25. Kovacs JJ, Murphy PJM, Gaillard S *et al.* HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor. *Mol. Cell.* 18(5), 601–607 (2005).
26. Hai Y, Shinsky SA, Porter NJ, Christianson DW. Histone deacetylase 10 structure and molecular function as a polyamine deacetylase. *Nat. Commun.* 8(May), 1–9 (2017).
27. Boyault C, Gilquin B, Zhang Y *et al.* HDAC6-p97/VCP controlled polyubiquitin chain turnover. *EMBO J.* 25(14), 3357–3366 (2006).
28. Kawaguchi Y, Kovacs JJ, McLaurin A, Vance JM, Ito A, Yao TP. The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell* 115(6), 727–738 (2003).
29. Iwata A, Riley BE, Johnston JA, Kopito RR. HDAC6 and microtubules are required for autophagic degradation of aggregated Huntingtin. *J. Biol. Chem.* 280(48), 40282–40292 (2005).
30. Donmez G, Outeiro TF. SIRT1 and SIRT2: emerging targets in neurodegeneration. *EMBO Mol. Med.* 5(3), 344–352 (2013).
31. Carafa V, Rotili D, Forgione M *et al.* Sirtuin functions and modulation: from chemistry to the clinic. *Clin. Epigenetics* 8(1), 1–21 (2016).
32. Michishita E, Park JY, Burneskis JM, Barrett JC, Horikawa I. Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *Mol. Biol. Cell* 16(10), 4623–4635 (2005).
33. Kutil Z, Novakova Z, Melesin M, Mikesova J, Schutkowski M, Barinka C. Histone deacetylase 11 is a fatty-acid deacylase. *ACS Chem. Biol.* 13(3), 685–693 (2018).
34. Gao L, Cueto MA, Asselbergs F, Atadja P. Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *J. Biol. Chem.* 277(28), 25748–25755 (2002).
35. Asfaha Y, Schrenk C, Alves Avelar LA *et al.* Recent advances in class IIa histone deacetylases research. *Bioorganic Med. Chem.* 27(22), 115087 (2019).
36. Li G, Tian Y, Zhu WG. The roles of histone deacetylases and their inhibitors in cancer therapy. *Front. Cell Dev. Biol.* 8(September), 1–34 (2020).
37. Mottamal M, Zheng S, Huang TL, Wang G. Histone deacetylase inhibitors in clinical studies as templates for new anticancer agents. *Molecules* 20(3), 3898–3941 (2015).
38. Slingerland M, Guchelaar HJ, Gelderblom H. Histone deacetylase inhibitors: an overview of the clinical studies in solid tumors. *Anticancer Drugs* 25(2), 140–149 (2014).
39. Feng S, De Carvalho DD. Clinical advances in targeting epigenetics for cancer therapy. *FEBS J.* 1–26 (2021).
40. Lu X, Ning Z, Li Z, Cao H, Wang X. Development of chidamide for peripheral T-cell lymphoma, the first orphan drug approved in China. *Intractable Rare Dis. Res.* 5(3), 185–191 (2016).

41. Yoon S, Eom GH. HDAC and HDAC inhibitor: from cancer to cardiovascular diseases. *Chonnam Med. J.* 52(1), 1 (2016).
42. Suraweera A, O'Byrne KJ, Richard DJ. Combination therapy with histone deacetylase inhibitors (HDACi) for the treatment of cancer: achieving the full therapeutic potential of HDACi. *Front. Oncol.* 8, 92 (2018).
43. Hontecillas-Prieto L, Flores-Campos R, Silver A, de Álava E, Hajji N, García-Domínguez DJ. Synergistic enhancement of cancer therapy using HDAC inhibitors: opportunity for clinical trials. *Front. Genet.* 11, 578011 (2020).
44. Furumai R, Matsuyama A, Kobashi N *et al.* FK228 (depsipeptide) as a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylases. *Cancer Res.* 62(17), 4916–4921 (2002).
45. Wallner M, Eaton DM, Berretta RM *et al.* HDAC inhibition improves cardiopulmonary function in a feline model of diastolic dysfunction. *Sci. Transl. Med.* 12(525), 1–14 (2020).
46. Albert BJ, Niu A, Ramani R *et al.* Combinations of isoform-targeted histone deacetylase inhibitors and bryostatins display remarkable potency to activate latent HIV without global T-cell activation. *Sci. Rep.* 7(1), 1–12 (2017).
47. Ziemka-Nalecz M, Jaworska J, Sypecka J, Zalewska T. Histone deacetylase inhibitors: a therapeutic key in neurological disorders? *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 77(10), 855–870 (2018).
48. Hershko A, Heller H, Elias S, Ciechanover A. Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J. Biol. Chem.* 258(13), 8206–8214 (1983).
49. Sakamoto KM, Kim KB, Kumagai A, Mercurio F, Crews CM, Deshaies RJ. Protacs: chimeric molecules that target proteins to the Skp1-cullin-F box complex for ubiquitination and degradation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98(15), 8554–8559 (2001).
- **The first reported chimeric molecules targeting protein degradation.**
50. Schneekloth AR, Pucheault M, Tae HS, Crews CM. Targeted intracellular protein degradation induced by a small molecule: en route to chemical proteomics. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 18(22), 5904–5908 (2008).
- **The first reported all small molecule proteolysis-targeting chimera (PROTAC).**
51. Winter GE, Buckley DL, Paulk J *et al.* Phthalimide conjugation as a strategy for *in vivo* target protein degradation. *Science* 348(6241), 1376–1381 (2015).
52. Zengerle M, Chan KH, Ciulli A. Selective small molecule induced degradation of the BET bromodomain protein BRD4. *ACS Chem. Biol.* 10(8), 1770–1777 (2015).
53. Toure M, Crews CM. Small-molecule PROTACS: new approaches to protein degradation. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 55(6), 1966–1973 (2016).
54. Ottis P, Crews CM. Proteolysis-targeting chimeras: induced protein degradation as a therapeutic strategy. *ACS Chem. Biol.* 12(4), 892–898 (2017).
55. Lu G, Middleton RE, Sun H *et al.* The myeloma drug lenalidomide promotes the cereblon-dependent destruction of ikaros proteins. *Science* 343(6168), 305–309 (2014).
56. Ito T, Ando H, Suzuki T *et al.* Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. *Science* 327(5971), 1345–1350 (2010).
57. Van Molle I, Thomann A, Buckley DL *et al.* Dissecting fragment-based lead discovery at the von Hippel-Lindau protein: hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  protein-protein interface. *Chem. Biol.* 19(10), 1300–1312 (2012).
58. Buckley DL, Van Molle I, Gareiss PC *et al.* Targeting the von Hippel-Lindau E3 ubiquitin ligase using small molecules to disrupt the VHL/HIF-1 $\alpha$  interaction. *J. Am. Chem. Soc.* 134(10), 4465–4468 (2012).
59. Buckley DL, Gustafson JL, Van-Molle I *et al.* Small-molecule inhibitors of the interaction between the E3-ligase VHL and HIF1 $\alpha$ . *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 51(46), 11463–11467 (2012).
60. Galdeano C, Gadd MS, Soares P *et al.* Structure-guided design and optimization of small molecules targeting the protein-protein interaction between the von Hippel-Lindau (VHL) E3 ubiquitin ligase and the hypoxia inducible factor (HIF) alpha subunit with *in vitro* nanomolar affinities. *J. Med. Chem.* 57(20), 8657–8663 (2014).
61. Krönke J, Steinebach C, Ng YLD *et al.* Systematic exploration of different E3 ubiquitin ligases: an approach towards potent and selective CDK6 degraders. *Chem. Sci.* 11(13), 3474–3486 (2020).
62. Ishida T, Ciulli A. E3-ligase ligands for PROTACs: how they were found and how to discover new ones. *SLAS Discov.* 26(4), 484–502 (2021).
63. Sun X, Gao H, Yang Y *et al.* PROTACs: great opportunities for academia and industry. *Signal Transduct. Target. Ther.* 4(1), 2019).
64. Ma Z, Ji Y, Yu Y, Liang D. Specific Non-genetic IAP-based Protein ERasers (SNIPERs) as a potential therapeutic strategy. *Eur. J. Med. Chem.* 216, 113247 (2021).
65. Sekine K, Takubo K, Kikuchi R *et al.* Small molecules destabilize cIAP1 by activating auto-ubiquitylation. *J. Biol. Chem.* 283(14), 8961–8968 (2008).
66. Itoh Y, Ishikawa M, Naito M, Hashimoto Y. Protein knockdown using methyl bestatin-ligand hybrid molecules: Design and synthesis of inducers of ubiquitination-mediated degradation of cellular retinoic acid-binding proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 132(16), 5820–5826 (2010).



67. Hines J, Lartigue S, Dong H, Qian Y, Crews CM. MDM2-recruiting PROTAC offers superior, synergistic antiproliferative activity via simultaneous degradation of BRD4 and stabilization of p53. *Cancer Res.* 79(1), 251–262 (2019).
68. Zhang X, Crowley VM, Wucherpfennig TG, Dix MM, Cravatt BF. Electrophilic PROTACs that degrade nuclear proteins by engaging DCAF16. *Nat. Chem. Biol.* 15(7), 737–746 (2019).
69. Li L, Mi D, Pei H *et al.* *In vivo* target protein degradation induced by PROTACs based on E3-ligase DCAF15. *Signal Transduct. Target. Ther.* 5(1), 4–6 (2020).
70. Ward CC, Kleinman JI, Brittain SM *et al.* Covalent ligand screening uncovers a RNF4 E3-ligase recruiter for targeted protein degradation applications. *ACS Chem. Biol.* 14(11), 2430–2440 (2019).
71. Ohoka N, Tsuji G, Shoda T *et al.* Development of small molecule chimeras that recruit AhR E3-ligase to target proteins. *ACS Chem. Biol.* 14(12), 2822–2832 (2019).
72. Tong B, Luo M, Xie Y *et al.* Bardoxolone conjugation enables targeted protein degradation of BRD4. *Sci. Rep.* 10(1), 1–8 (2020).
73. Spradlin JN, Hu X, Ward CC *et al.* Harnessing the anti-cancer natural product nimbolide for targeted protein degradation. *Nat. Chem. Biol.* 15(7), 747–755 (2019).
74. Henning NJ, Manford AG, Spradlin JN *et al.* Discovery of a covalent FEM1B recruiter for targeted protein degradation applications. *bioRxiv* DOI:10.1101/2021.04.15.439993 (2021).
75. Wu H, Yang K, Zhang Z *et al.* Development of multifunctional histone deacetylase 6 degraders with potent antimyeloma activity. *J. Med. Chem.* 62(15), 7042–7057 (2019).
- **Investigation of CRBN-based HDAC 6 PROTACs including a broad linker optimization study.**
76. Cyrus K, Wehenkel M, Choi EY *et al.* Impact of linker length on the activity of PROTACs. *Mol. Biosyst.* 7(2), 359–364 (2011).
77. Yang K, Zhao Y, Nie X *et al.* A cell-based target engagement assay for the identification of cereblon E3 ubiquitin ligase ligands and their application in HDAC6 degraders. *Cell Chem. Biol.* 27(7), 866–876.e8 (2020).
78. Troup RI, Fallan C, Baud MGJ. Current strategies for the design of PROTAC linkers: a critical review. *Explor. Target. Anti-tumor Ther.* 1(5), 273–312 (2020).
79. Yang K, Wu H, Zhang Z *et al.* Development of selective histone deacetylase 6 (HDAC6) degraders recruiting von Hippel-Lindau (VHL) E3 ubiquitin ligase. *ACS Med. Chem. Lett.* 11(4), 575–581 (2020).
80. Han X, Zhao L, Xiang W *et al.* Discovery of highly potent and efficient PROTAC degraders of androgen receptor (AR) by employing weak binding affinity VHL E3-ligase ligands. *J. Med. Chem.* 62(24), 11218–11231 (2019).
81. Han X, Wang C, Qin C *et al.* Discovery of ARD-69 as a highly potent proteolysis targeting chimera (PROTAC) degrader of androgen receptor (AR) for the treatment of prostate cancer. *J. Med. Chem.* 62(2), 941–964 (2019).
82. Yang H, Lv W, He M *et al.* Plasticity in designing PROTACs for selective and potent degradation of HDAC6. *Chem. Commun.* 55(98), 2019).
83. Farnaby W, Koegl M, Roy MJ *et al.* BAF complex vulnerabilities in cancer demonstrated via structure-based PROTAC design. *Nat. Chem. Biol.* 15(7), 672–680 (2019).
84. Bondeson DP, Smith BE, Burslem GM *et al.* Lessons in PROTAC design from selective degradation with a promiscuous warhead. *Cell Chem. Biol.* 25(1), 78–87.e5 (2018).
85. Shimokawa K, Shibata N, Sameshima T *et al.* Targeting the allosteric site of oncoprotein BCR-ABL as an alternative strategy for effective target protein degradation. *ACS Med. Chem. Lett.* 8(10), 1042–1047 (2017).
86. Jang J, To C, De Clercq DJH *et al.* Mutant-selective allosteric EGFR degraders are effective against a broad range of drug-resistant mutations. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 59(34), 14481–14489 (2020).
87. Silva MC, Ferguson FM, Cai Q *et al.* Targeted degradation of aberrant tau in frontotemporal dementia patient-derived neuronal cell models. *Elife* 8, 1–31 (2019).
88. Wang W, Zhou Q, Jiang T *et al.* A novel small-molecule PROTAC selectively promotes tau clearance to improve cognitive functions in Alzheimer-like models. *Theranostics* 11(11), 5279–5295 (2021).
89. Kargbo RB. Treatment of Alzheimer's by PROTAC-Tau protein degradation. *ACS Med. Chem. Lett.* 10, 699–700 (2019).
90. Bensimon A, Pizzagalli MD, Kartnig F *et al.* Targeted degradation of SLC transporters reveals amenability of multi-pass transmembrane proteins to ligand-induced proteolysis. *Cell Chem. Biol.* 27(6), 728–739.e9 (2020).
91. Bondeson DP, Mares A, Smith IED *et al.* Catalytic *in vivo* protein knockdown by small-molecule PROTACs. *Nat. Chem. Biol.* 11(8), 611–617 (2015).
92. Giardina SF, Valdambri E, Warren JD, Barany F. PROTACs: promising approaches for epigenetic strategies to overcome drug resistance. *Curr. Cancer Drug Targets* 21, 306–325 (2021).
93. Lai AC, Crews CM. Induced protein degradation: an emerging drug discovery paradigm. *Nat. Rev. Drug Discov.* 16(2), 101–114 (2017).
94. Kregel S, Wang C, Han X *et al.* Androgen receptor degraders overcome common resistance mechanisms developed during prostate cancer treatment. *Neoplasia (United States)* 22(2), 111–119 (2020).

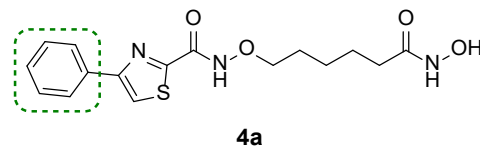
95. Yang Y, Gao H, Sun X *et al.* Global PROTAC toolbox for degrading BCR-ABL overcomes drug-resistant mutants and adverse effects. *J. Med. Chem.* 63(15), 8567–8583 (2020).
96. Xiao Y, Wang J, Zhao LY *et al.* Discovery of histone deacetylase 3 (HDAC3)-specific PROTACs. *Chem. Commun.* 56(68), 9866–9869 (2020).
97. Smith BE, Wang SL, Jaime-Figueroa S *et al.* Differential PROTAC substrate specificity dictated by orientation of recruited E3-ligase. *Nat. Commun.* 10(1), 1–13 (2019).
98. Edmondson SD, Yang B, Fallan C. Proteolysis targeting chimeras (PROTACs) in 'beyond rule-of-five' chemical space: recent progress and future challenges. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 29(13), 1555–1564 (2019).
99. Pike A, Williamson B, Harlfinger S, Martin S, McGinnity DF. Optimising proteolysis-targeting chimeras (PROTACs) for oral drug delivery: a drug metabolism and pharmacokinetics perspective. *Drug Discov. Today* 25(10), 1793–1800 (2020).
100. Xiong Y, Donovan KA, Eleuteri NA *et al.* Chemo-proteomics exploration of HDAC degradability by small molecule degraders. *Cell Chem. Biol.* 28(10), 1514–1527.e4 (2021).
- **Most detailed investigation of HDAC-PROTACs so far, including a broad variety of PROTACs and comprehensive chemo-proteomic exploration.**
101. Zaidman D, Prilusky J, London N. Prosetac: rosetta based modeling of PROTAC mediated ternary complexes. *J. Chem. Inf. Model.* 60(10), 4894–4903 (2020).
102. Drummond ML, Williams CI. *In silico* modeling of PROTAC-mediated ternary complexes: validation and application. *J. Chem. Inf. Model.* 59(4), 1634–1644 (2019).
103. Drummond ML, Henry A, Li H, Williams CI. Improved accuracy for modeling ProTAC-mediated ternary complex formation and targeted protein degradation via new *in silico* methodologies. *J. Chem. Inf. Model.* 60(10), 5234–5254 (2020).
104. Subramanian S, Bates SE, Wright JJ, Espinoza-Delgado I, Piekars RL. Clinical toxicities of histone deacetylase inhibitors. *Pharmaceuticals* 3(9), 2751–2767 (2010).
105. Balasubramanian S, Verner E, Buggy JJ. Isoform-specific histone deacetylase inhibitors: the next step? *Cancer Lett.* 280(2), 211–221 (2009).
106. Cao F, De Weerd S, Chen D, Zwinderman MRH, Van Der Wouden PE, Dekker FJ. European journal of medicinal chemistry induced protein degradation of histone deacetylases 3 (HDAC3) by proteolysis targeting chimera (PROTAC). *Eur. J. Med. Chem.* 208, 112800 (2020).
107. Fischer F, Alves Avelar LA. A short overview of resistance to approved histone deacetylase inhibitors. *Future Med. Chem.* 13(14), 1153–1155 (2021).
108. Lee JH, Choy ML, Marks PA. Mechanisms of resistance to histone deacetylase inhibitors. *Adv. Cancer Res.* 116, 39–86 (2012).
109. Yang K, Song Y, Xie H *et al.* Development of the first small molecule histone deacetylase 6 (HDAC6) degraders. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 28(14), 2493–2497 (2018).
110. Schiedel M, Herp D, Hammelmann S *et al.* Chemically induced degradation of sirtuin 2 (Sirt2) by a proteolysis targeting chimera (PROTAC) based on sirtuin rearranging ligands (SirReals). *J. Med. Chem.* 61(2), 482–491 (2018).
111. Weng G, Shen C, Cao D *et al.* PROTAC-DB: an online database of PROTACs. *Nucleic Acids Res.* 49(D1), D1381–D1387 (2021).
112. Smalley JP, Adams GE, Millard CJ *et al.* PROTAC-mediated degradation of class I histone deacetylase enzymes in corepressor complexes. *Chem. Commun.* 56(32), 4476–4479 (2020).
- **HDAC-PROTACs were able to induce the degradation of all class I HDAC enzymes.**
113. Cao J, Zhao W, Zhao C *et al.* Development of a bestatin-SAHA hybrid with dual inhibitory activity against APN and HDAC. *Molecules* 25(21), 4991 (2020).
114. Roatsch M, Vogelmann A, Herp D, Jung M, Olsen CA. Proteolysis-targeting chimeras (PROTACs) based on macrocyclic tetrapeptides selectively degrade class I histone deacetylases 1-3. *ChemRxiv* doi: 10.26434/chemrxiv.12416303.v1 (2020) (Epub ahead of print).
115. Jaskula-Sztul R, Eide J, Tesfazghi S *et al.* Tumor-suppressor role of notch3 in medullary thyroid carcinoma revealed by genetic and pharmacological induction. *Mol. Cancer Ther.* 4(2), 499–512 (2015).
116. Sinatra L, Bandolik JJ, Roatsch M *et al.* Hydroxamic acids immobilized on resins (HAIRs): synthesis of dual-targeting HDAC inhibitors and HDAC degraders (PROTACs). *Angew. Chemie Int. Ed.* 59(50), 22494–22499 (2020).
117. Roy MJ, Winkler S, Hughes SJ *et al.* SPR-measured dissociation kinetics of PROTAC ternary complexes influence target degradation rate. *ACS Chem. Biol.* 14(3), 361–368 (2019).
118. Gadd MS, Testa A, Lucas X *et al.* Structural basis of PROTAC cooperative recognition for selective protein degradation. *Nat. Chem. Biol.* 13(5), 514–521 (2017).
119. Lobera M, Madauss KP, Pohlhaus DT *et al.* Selective class IIa histone deacetylase inhibition via a nonchelating zinc-binding group. *Nat. Chem. Biol.* 9(5), 319–325 (2013).
120. Stott AJ, Maillard MC, Beaumont V *et al.* Evaluation of 5-(trifluoromethyl)-1,2,4-oxadiazole-based class IIa HDAC inhibitors for huntington's disease. *ACS Med. Chem. Lett.* 12(3), 380–388 (2021).

121. Bergman JA, Woan K, Perez-Villarroel P, Villagra A, Sotomayor EM, Kozikowski AP. Selective histone deacetylase 6 inhibitors bearing substituted urea linkers inhibit melanoma cell growth. *J. Med. Chem.* 55(22), 9891–9899 (2012).
122. An Z, Lv W, Su S, Wu W, Rao Y. Developing potent PROTACs tools for selective degradation of HDAC6 protein. *Protein Cell* 10(8), 606–609 (2019).
123. Zhang L, Zhang J, Jiang Q, Zhang L, Song W. Zinc binding groups for histone deacetylase inhibitors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 33(1), 714–721 (2018).
124. Mwakwari SC, Patil V, Guerrant W, Oyelere AK. Macrocyclic histone deacetylase inhibitors. *Curr. Top. Med. Chem.* 10(14), 1423–1440 (2010).
125. Fuller NO, Pirone A, Lynch BA *et al.* CoREST complex-selective histone deacetylase inhibitors show prosynaptic effects and an improved safety profile to enable treatment of synaptopathies. *ACS Chem. Neurosci.* 10(3), 1729–1743 (2019).
126. Hong JY, Jing H, Price IR, Cao J, Bai JJ, Lin H. Simultaneous inhibition of SIRT2 deacetylase and defatty-acylase activities via a PROTAC strategy. *ACS Med. Chem. Lett.* 11(11), 2305–2311 (2020).
127. Yang WM, Tsai SC, Der Wen Y, Fejé G, Seto E. Functional domains of histone deacetylase-3. *J. Biol. Chem.* 277(11), 9447–9454 (2002).
128. Zecha J, Meng C, Zolg DP, Samaras P, Wilhelm M, Kuster B. Peptide level turnover measurements enable the study of proteoform dynamics. *Mol. Cell. Proteomics* 17(5), 974–992 (2018).
129. Martin MW, Lee JY, Lancia DR *et al.* Discovery of novel N-hydroxy-2-arylisindoline-4-carboxamides as potent and selective inhibitors of HDAC11. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 28(12), 2143–2147 (2018).
130. Son SI, Cao J, Zhu CL, Miller SP, Lin H. Activity-guided design of HDAC11-specific inhibitors. *ACS Chem. Biol.* 14(7), 1393–1397 (2019).
131. Ferreira De Freitas R, Harding RJ, Franzoni I *et al.* Identification and structure–activity relationship of HDAC6 zinc-finger ubiquitin binding domain inhibitors. *J. Med. Chem.* 61(10), 4517–4527 (2018).

## 2. Zielsetzung

In der frühen Phase der Arzneistoffentwicklung steht die präklinische Optimierung einer Leitstruktur im Vordergrund. Ein wichtiger Meilenstein hierbei ist der Nachweis der Effektivität dieser Leitstruktur in *in vivo* Studien.

Die präklinische Optimierung einer Leitstruktur beschränkt sich nicht nur auf die Optimierung der Bindung an ein biologisches Zielprotein, wie beispielsweise die Inhibition von HDAC-Enzymen, sondern berücksichtigt auch komplexere Parameter wie zytotoxische Aktivität gegen Krebszellen, physikochemische Eigenschaften oder pharmakokinetische Parameter. Diese Optimierung ist erforderlich, um die initiale Leitstruktur zu einem klinischen Kandidaten weiterzuentwickeln.<sup>115</sup>



**Leukämiezelllinien**  
 HAL-01 IC<sub>50</sub>: 0.21 μM  
 K562 IC<sub>50</sub>: 0.11 μM

**HDAC-Inhibitionsprofil**  
 K<sub>i</sub>(HDAC2): 0.014 μM  
 K<sub>i</sub>(HDAC4): 62.12 μM  
 K<sub>i</sub>(HDAC6): 0.007 μM  
 K<sub>i</sub>(HDAC8): 1.78 μM

**Abbildung 11: Der phenylthiazol-basierte HDACi 4a. 4a ist ein HDACi mit nanomolarer Inhibition zu HDAC 2 und HDAC 6 Enzymen und submikromolarer Aktivität gegen Leukämiezellen. Der terminale Phenylring ist grün markiert. Unveröffentlichte Daten aus den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Matthias U. Kassack und Dr. Sanil Bhatia.**

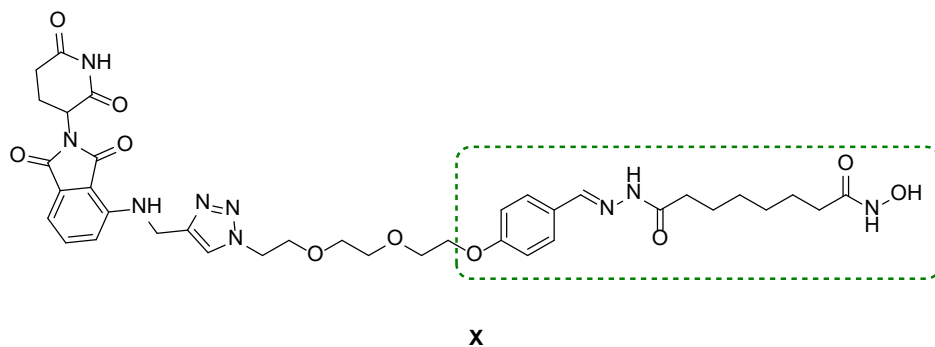
Die Leitstruktur dieser Arbeit, der HDAC Klasse I/IIb Inhibitor **4a**, stammt aus Vorarbeiten von *Dr. Leandro Alves-Avelar* im Arbeitskreis *Kurz*. Dieser HDACi zeigt im HDAC-Enzym Assay nanomolare Inhibition zu einem repräsentativen HDAC-Enzym der Klasse I und HDAC 6 sowie potente zytotoxische Aktivität gegen Leukämiezellen im submikromolaren Bereich (Abbildung 11). Diese Daten bilden eine gute Ausgangslage für eine präklinische Optimierung. Insbesondere der terminale, unsubstituierte Phenylring von **4a** eignet sich für Modifikationen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der terminale Phenylring von **4a** systematisch substituiert, um die Struktur-Aktivitätsbeziehung dieses Strukturmotives abzuleiten. Die Derivate von **4a** wurden sowohl auf ihre HDAC-enzyminhibitorischen Eigenschaften als auch auf ihre Aktivität gegen Leukämiezellen untersucht.

## 2. Zielsetzung

Ausgehend von den *in vitro* Ergebnissen sollten die beiden HDACi mit dem besten antileukämischen Profil zur Vorbereitung auf *in vivo* Tierstudien einer *in vitro* Pharmakokinetik Analyse unterzogen werden.

Aus diesen pharmakokinetischen Analysen wurde der vielversprechendste HDACi in einem Leukämie-Mausmodell auf antiproliferierende Eigenschaften *in vivo* hin untersucht.

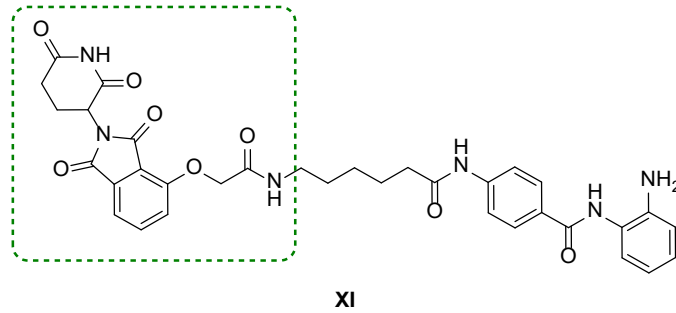
Die umfassende Charakterisierung von **4a** belegt die Eignung dieses HDACi-Motives zur Anwendung in einem HDAC-PROTAC. Ein HDAC-PROTAC mit diesem HDACi-Modul hat zusätzlich zu den biochemischen Effekten resultierend aus der Hemmung der Deacetylase-Aktivität das Potential, darüber hinausgehende Effekte durch die Degradation von HDAC-Enzymen zu zeigen. Insofern können mit diesen PROTACs die nicht-enzymatischen Funktionen von HDAC-Enzymen unterbrochen werden. Dabei bietet das generelle Pharmakophor von HDAC-PROTACs die Möglichkeit, durch Anpassungen des HDACi Moduls und des E3-Ligase Liganden die Potenz und die Degradationsselektivität zu steuern.



**Abbildung 12: HDAC 6 selektiver HDAC-PROTAC von Yang *et al.*<sup>116</sup> Das HDACi-Pharmakophor ist grün markiert.**

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die HDACi Leitstruktur **4a** als HDACi-Motiv in einen HDAC-PROTAC inkorporiert werden. Die Struktur des neuen HDAC-PROTACs orientiert sich hierbei an einem HDAC 6-selektiven HDAC-PROTAC von Yang *et al.*, mit einem E3-Ligase Liganden der CRBN-Ligase, der bereits erfolgreich für das Design von HDAC-PROTACs verwendet wurde (Abbildung 12).<sup>117</sup> Der resultierende HDAC-PROTAC sollte dann neben seiner HDAC-Enzyminhibition auch bezüglich seiner HDAC-Enzym Degradationseigenschaften untersucht werden.

## 2. Zielsetzung



**Abbildung 13: Klasse I HDAC-PROTAC von Smalley *et al.*<sup>118</sup> Der E3-Ligase Ligand ist grün markiert.**

Die Rekrutierung verschiedener E3-Ligasen ist eine Möglichkeit, die Degradationsselektivität von HDAC-PROTACs zu beeinflussen. Neben der Degradationsselektivität ist durch die gewebsspezifische Expression einiger E3-Ligasen theoretisch eine Zelltyp- oder gewebsspezifische Aktivität von HDAC-PROTACs möglich.<sup>119</sup> Deswegen wurde anhand der Leitstruktur von Smalley *et al.* der E3-Ligase Ligand gegen andere, noch nicht im Design von HDAC-PROTACs beschriebene E3-Ligase Liganden ausgetauscht. Diese heterobifunktionellen Moleküle sollten dann auf ihre Degradationseffizienz und -selektivität hin untersucht werden (Abbildung 13). Zur besseren Vergleichbarkeit wurde bei diesen neuen potentiellen HDAC-PROTACs dasselbe HDACi-Modul gewählt.

## 3. Ergebnisse und Diskussion

---

### 3.1 Manuskript: Deciphering the therapeutic potential of novel alkoxyamide-based class I, IIb HDAC inhibitors against therapy-resistant leukemia

Fabian Fischer<sup>1#</sup>, Julian Schliehe-Diecks<sup>2#</sup>, Jia-Wey Tu<sup>2</sup>, Tanja Gangnus<sup>3</sup>, Leandro A. Alves Avelar<sup>1</sup>, Katerina Scharov<sup>2</sup>, Titus Watrin<sup>2</sup>, Marie Kemkes<sup>1</sup>, Lukas Biermann<sup>1</sup>, Josefa Kremeyer<sup>1</sup>, Nadine Horstick<sup>1</sup>, Arndt Borkhardt,<sup>2</sup> Matthias U. Kassack<sup>1</sup>, Björn B. Burckhardt<sup>3</sup>, Sanil Bhatia<sup>2\*</sup> and Thomas Kurz<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Pharmaceutical und Medicinal Chemistry, Heinrich-Heine University Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany

<sup>2</sup>Department of Pediatric Oncology, Hematology and Clinical Immunology, Medical Faculty, Heinrich-Heine-University Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany

<sup>3</sup>Institute of Pharmaceutical and Medicinal Chemistry, Individualized Pharmacotherapy, University of Münster, 48149 Münster, Germany

# These authors contributed equally to this work.

#### **Keywords:**

Leukemia, Histone deacetylases, Synergy, HDAC-inhibitors, cancer resistance

#### **Abstract**

Histone deacetylases inhibitors (HDACi) have proven to be valuable anticancer drugs, particularly in treating hematological malignancies. However, the dose-limiting toxicities of approved HDACi pose a significant challenge. This study aimed to design, synthesize, and evaluate a set of HDACi with an alkoxyamide connecting unit and substituted phenylthiazole cap groups, particularly interested in their efficacy against therapy resistant leukemia cells while ensuring minimal toxicity. A structural optimization program yielded HDACi with nanomolar inhibitory activity against HDAC class I/IIb enzymes. The novel inhibitors (**4d** and **4m**) showed superior anti-leukemic activity compared to several approved HDACi against leukemia cell lines and patient-derived leukemia samples. Notably, **4d** and **4m** exhibited selectivity against leukemia cell lines and patient derived leukemia cells with minimal impact on healthy human cells compared to the clinically used HDACi vorinostat and romidepsin. Furthermore, **4d** and **4m** displayed high synergistic activity when combined with routinely used

### 3. Ergebnisse und Diskussion

chemotherapeutics, decitabine and clofarabine. *In vitro* pharmacokinetic studies showed the most promising profile for **4d** with intermediate microsomal stability, excellent plasma stability and concentration-independent plasma protein binding, superior to **4m**. Finally, when administered *in vivo*, **4d** at 10mg/kg dosage suppressed *in vivo* growth of MV4-11 leukemia cells, without causing any observable signs of toxicity.

#### 1. Introduction

Leukemia is characterized by genetic and epigenetic heterogeneity due to the presence of diverse molecular alterations, contributing to the formation of distinct subgroups and influencing the prognosis and therapeutic outcome of patients<sup>1-3</sup>. Leukemia is the most common cancer in children, with a 5-year-overall survival rate exceeding 85%<sup>4</sup>. However, approximately 20 - 25% of childhood leukemia patients experience relapsed or refractory leukemia; among those cases around 15 - 50% of patients are only able to achieve remission<sup>5</sup>. Another ongoing challenge in leukemia treatment is the therapy-related toxicity of routinely used drugs<sup>6,7</sup>, along with certain leukemia subtypes that continue to be linked to unfavourable outcomes<sup>8</sup>. In order to prevent long-term therapy-related health damage and to successfully treat therapy-refractory subtypes, new anti-leukemic drugs are urgently needed.

A possible target for new therapies are the characteristic perturbations of cancer cells in their epigenetic regulation<sup>9</sup>. Epigenetic dysregulation is common for all kinds of human cancer irrespective of solid tumors or hematological malignancies<sup>10</sup>. It has been argued that the epigenetic disruption is the causative mechanism behind all hallmarks of cancer steering proliferation, growth suppressor evasion or apoptosis of cancer cells.<sup>11</sup> Previous studies revealed that hematological malignant cells are especially sensitive to treatment with HDAC inhibitors<sup>12</sup>, although the exact mechanism behind this observation remains elusive as it is not allocated to a single cause<sup>13</sup>. Today, all approved HDACi are approved for the therapy of hematological malignancies<sup>14</sup>. The epigenetic regulation of transcription is significantly governed by the acetylation status of histones<sup>15</sup>. This status is tightly regulated by the interplay of two families of enzymes that control the acetylation or deacetylation of  $\epsilon$ -amino-group of lysine residues: Histone acetyltransferases (HAT) acetylate the  $\epsilon$ -amino group of lysine residues while Histone deacetylases (HDAC) remove acetyl groups from lysines<sup>16</sup>. HDAC enzymes are classified into four classes related to their homology towards yeast deacetylases<sup>17</sup>. Three of the four classes, namely class I, II and IV HDAC enzymes, are zinc-dependent metalloenzymes. Class I consists of HDAC enzymes 1, 2, 3 and 8. Especially the nuclear HDAC enzymes 1, 2, and 3 are directly involved in the regulation of the acetylation status of histones<sup>18</sup>. Class IIb is formed by the cytosolic enzymes HDAC6 and -10. Substrates of HDAC6 are, among others, proteins which are found to be dysregulated in cancer like HSP90<sup>19</sup> or Ku70<sup>20</sup>.



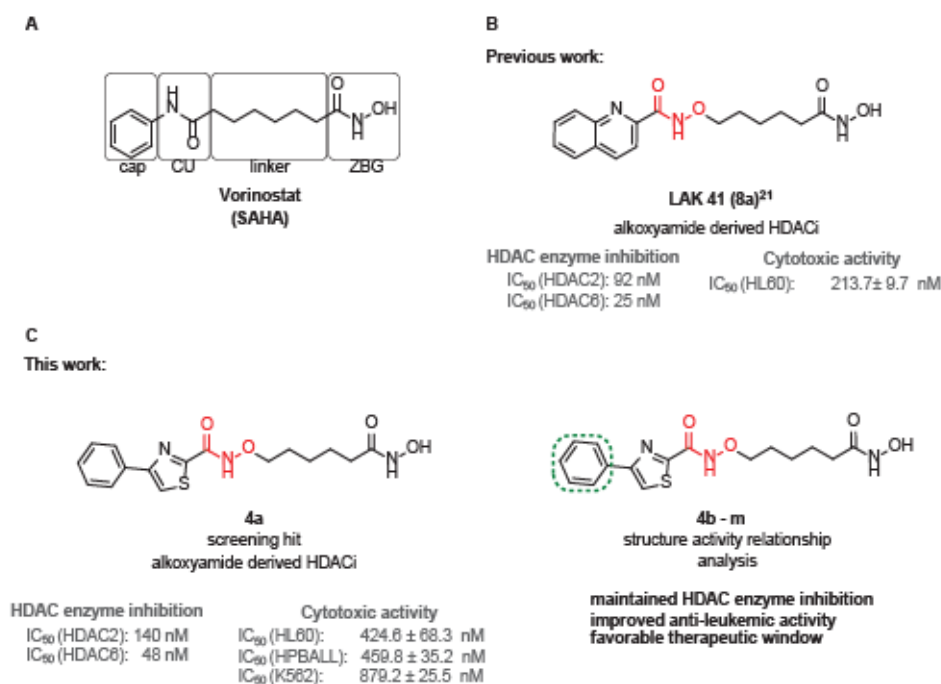
### 3. Ergebnisse und Diskussion

In addition to their potent anti-leukemic effects used as mono treatment, HDACi are displaying strong synergistic effects in combination with a broad variety of anticancer drugs<sup>21</sup>. For instance, HDACi act synergistically with alkylating<sup>22,23</sup> and hypomethylating agents<sup>24</sup>, proteasome inhibitors<sup>25–27</sup> and immunomodulating drugs<sup>28,29</sup>. In light of the promising results seen in preclinical studies, clinical trials are currently underway to investigate the potential of HDACi (vorinostat) in combination with the hypomethylating agent (azacytidine) for the treatment of pediatric or adult acute myeloid leukemia (AML) patients (NCT03843528 and NCT00392353). This provides the rationale for a systematic investigation of HDACi as synergistic combination partners for the therapy of resistant leukemic cells.

Our newly developed HDAC inhibitors, targeting class I and IIb, have demonstrated remarkable efficacy against different types of leukemic cells, including those resistant to standard therapies. Notably, these inhibitors exhibit a higher selectivity towards leukemic cells while minimizing damage to healthy cells, distinguishing them from several approved HDACi. Moreover, our most promising candidates (**4d**, **4m**) have displayed significant synergistic effects when combined with the approved chemotherapeutic agents, decitabine and clofarabine. Promising *in vitro* pharmacokinetic characteristics and *in vivo* activity encourage their further investigation.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 2. Results and discussion:



**Figure 1. Development of novel alkoxyamide-based HDACi** A) Pharmacophore model of HDAC-inhibitors exemplified on vorinostat. CU= connecting unit, ZBG= zinc-binding-group. B) Previously published alkoxyamide-derived HDAC-inhibitor<sup>26</sup>. C) The initial screening hit **4a** showed nanomolar HDAC-isoenzyme inhibition and high nanomolar cytotoxic activity on three different leukemic cell lines. Derivatisation of the terminal phenyl moiety improved the anti-leukemic activity whilst retaining the HDAC-isoenzyme inhibition.

In search of anti-leukemic agents we screened our internal library for novel and easily accessible lead structures against three leukemic cell lines K562 – (chronic myeloid leukemia or CML); HL60 – (acute myeloid leukemia or AML); HPBALL – (T-cell acute lymphoblastic leukemia or T-ALL) and identified HDACi **4a** as a hit compound. Strikingly, **4a** outperformed the approved HDACi, vorinostat, both in terms of HDAC-enzyme inhibitory activity and on cytotoxic activity on various leukemic cell lines. **4a** combines a phenylthiazole cap group that has been successfully deployed in the development of HDACi before<sup>30–33</sup> and an alkoxyamide as a bioisosteric replacement for the common amide moiety<sup>26,34</sup>. Currently, the two clinical approved Mitogen-activated protein kinase kinase (MEK) 1/2 inhibitors, binimetinib and selumetinib, are establishing the alkoxyamide group as a valuable structural motif in the field of anticancer drugs.<sup>35,36</sup> We have shown previously, that alkoxyamide-based HDACi with an alkoxyamide connecting unit are equally potent as or even more potent as some approved HDACi with an amide connecting unit.<sup>28,34</sup> The alkoxyamide extends the chemical space of amide bioisosters and may contribute to the recently emerging topic of hydroxylamine analogs to established amine moieties.<sup>37,38</sup>

### 3. Ergebnisse und Diskussion

As starting materials for a diverse set of phenylthiazole analogues were readily available, we aimed in this study to further develop **4a** into a new anti-leukemic lead structure by elucidating the structure activity relationship of its terminal phenyl moiety.

#### Synthesis

The synthesis of the novel HDACi (**4a-m**) started with the saponification of the phenylthiazole carboxylic esters (**1a-m**) followed by a HBTU-mediated coupling of the generated corresponding sodium salts with the hydroxylamine linker **2** containing the *O*-trityl-protected hydroxamic acid zinc binding group using a modified protocol of Goodreid et al<sup>39</sup> (Figure 2). The coupling reactions for the construction of the alkoxyamide moiety was performed utilizing the *in situ* generated sodium salts of the respective carboxylic acids as the corresponding acids of **1a-m** were prone to decarboxylation. The synthesis of the hydroxylamine linker **2** was previously published by our group<sup>26</sup>. Subsequent TFA and triethylsilane mediated deprotection of the *O*-trityl-protected hydroxamates yielded the hydroxamic acids **4a-m**.

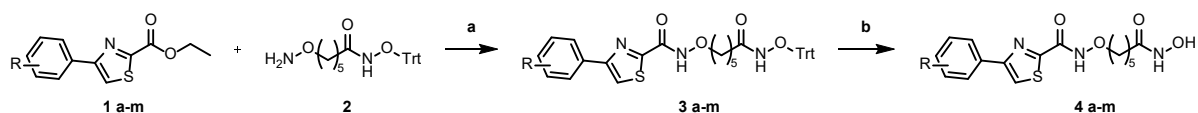


Figure 2. Reagents and conditions: a) 1. 1 M. NaOH, THF, RT o.n. 2. HBTU, DIPEA, DMF, RT, o.n. b) TFA, Et<sub>3</sub>SiH, DCM, RT, 30 min

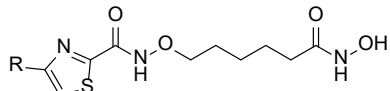













### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### HDAC-enzyme inhibition

All synthesized HDACi are nanomolar inhibitors of HDAC2, a representative of HDAC class I, and of HDAC6, a representative of HDAC class IIb. The HDAC enzyme inhibition profile did not differ remarkably among the improved analogues (Table 1). Derivate **4m** was the most potent HDAC2 inhibitor improving the  $IC_{50}$  of the parent compound **4a** ( $IC_{50}$  0.140  $\mu$ M) significantly by a factor of 13 ( $IC_{50}$  0.0045  $\mu$ M). Also compounds **4d** ( $IC_{50}$  0.015  $\mu$ M) and **4l** ( $IC_{50}$  0.010  $\mu$ M) improved the HDAC2 inhibition in comparison to **4a** by a factor of 4 or 6, respectively. Interestingly, HDAC6 inhibition was not improved to the same extent as the HDAC2 inhibition. **4c** is the most active HDAC6 inhibitor in this series and exceeded the activity of the parent compound by a factor of about three ( $IC_{50}$  0.026  $\mu$ M). However, each newly synthesized HDAC inhibitor surpassed vorinostat in regards of the HDAC2 inhibition and were similar potent as tubastatin A in HDAC6 enzyme inhibition.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

**Table 1. Inhibition of human HDAC2, 4, 6, and 8 by compounds 4a – m and reference compounds vorinostat, panobinostat and tubastatin A.**

					
compound	R	IC <sub>50</sub> (HDAC2) [μM]	IC <sub>50</sub> (HDAC4) [μM]	IC <sub>50</sub> (HDAC6) [μM]	IC <sub>50</sub> (HDAC8) [μM]
<b>4a</b>		0.059 ± 0.012	> 100	0.075 ± 0.03	4.01 ± 0.9
<b>4b</b>		0.046 ± 0.009	> 100	0.026 ± 0.006	2.16 ± 0.3
<b>4c</b>		0.056 ± 0.013	> 100	0.026 ± 0.008	5.20 ± 1
<b>4d</b>		0.015 ± 0.004	> 100	0.038 ± 0.01	5.75 ± 0.9
<b>4e</b>		0.065 ± 0.008	> 100	0.051 ± 0.05	1.29 ± 0.3
<b>4f</b>		0.045 ± 0.011	> 100	0.047 ± 0.015	2.32 ± 0.3
<b>4g</b>		0.048 ± 0.012	> 100	0.045 ± 0.012	6.38 ± 1.6
<b>4h</b>		0.047 ± 0.008	> 100	0.081 ± 0.03	2.51 ± 0.3
<b>4i</b>		0.105 ± 0.016	> 100	0.049 ± 0.017	5.41 ± 0.3
<b>4j</b>		0.060 ± 0.03	> 100	0.064 ± 0.03	7.01 ± 1.9
<b>4k</b>		0.065 ± 0.03	> 100	0.108 ± 0.004	4.86 ± 0.5
<b>4l</b>		0.010 ± 0.003	> 100	0.030 ± 0.01	3.68 ± 0.5
<b>4m</b>		0.0045 ± 0.0007	> 100	0.064 ± 0.03	4.80 ± 1.6
<b>Vorinostat</b>	-	0.165 ± 0.006	47.8 ± .006	0.047 ± 0.003	5.85 ± 0.7
<b>Panobinostat</b>	-	N.D.	0.725 ± 0.06	N.D.	0.299 ± 0.07
<b>Tubastatin</b>	-	N.D.	N.D.	0.033 ± 0.017	N.D.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

<sup>a</sup>: All compounds were evaluated in duplicate in two independent experiments. Values represent the mean +/- SEM. N.D. = not determined.

#### High throughput drug screening on cytotoxicity of novel HDACi

A high throughput drug screening (HTDS)<sup>40</sup> was conducted to evaluate the activity of 13 new synthesized HDACi across three leukemia cell lines: K562, HPBALL, and HL60. By representing the IC<sub>50</sub> values of each HDACi through heatmaps and performing unsupervised clustering, three distinct clusters were identified (Figure 3 and Table 2). Compared to the lead inhibitor **4a**, the first cluster had a similar activity against the three entities, while the second cluster consisted of HDACi with slightly lower IC<sub>50</sub> and the third one showed significantly lower IC<sub>50</sub> (~ 0.7 log<sub>10</sub> fold change). In the HL60 cell line, which is the most sensitive, HDACi **4d**, **4m**, and **4l** showed IC<sub>50</sub> values between 0.049 μM and 0.086 μM, whereas in the K562 cell line, the range was 0.141 nM to 0.242 nM. Throughout all three cell lines the inhibitor with the most potent anti-cancer activity is **4m**, followed by **4d** and **4l**.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

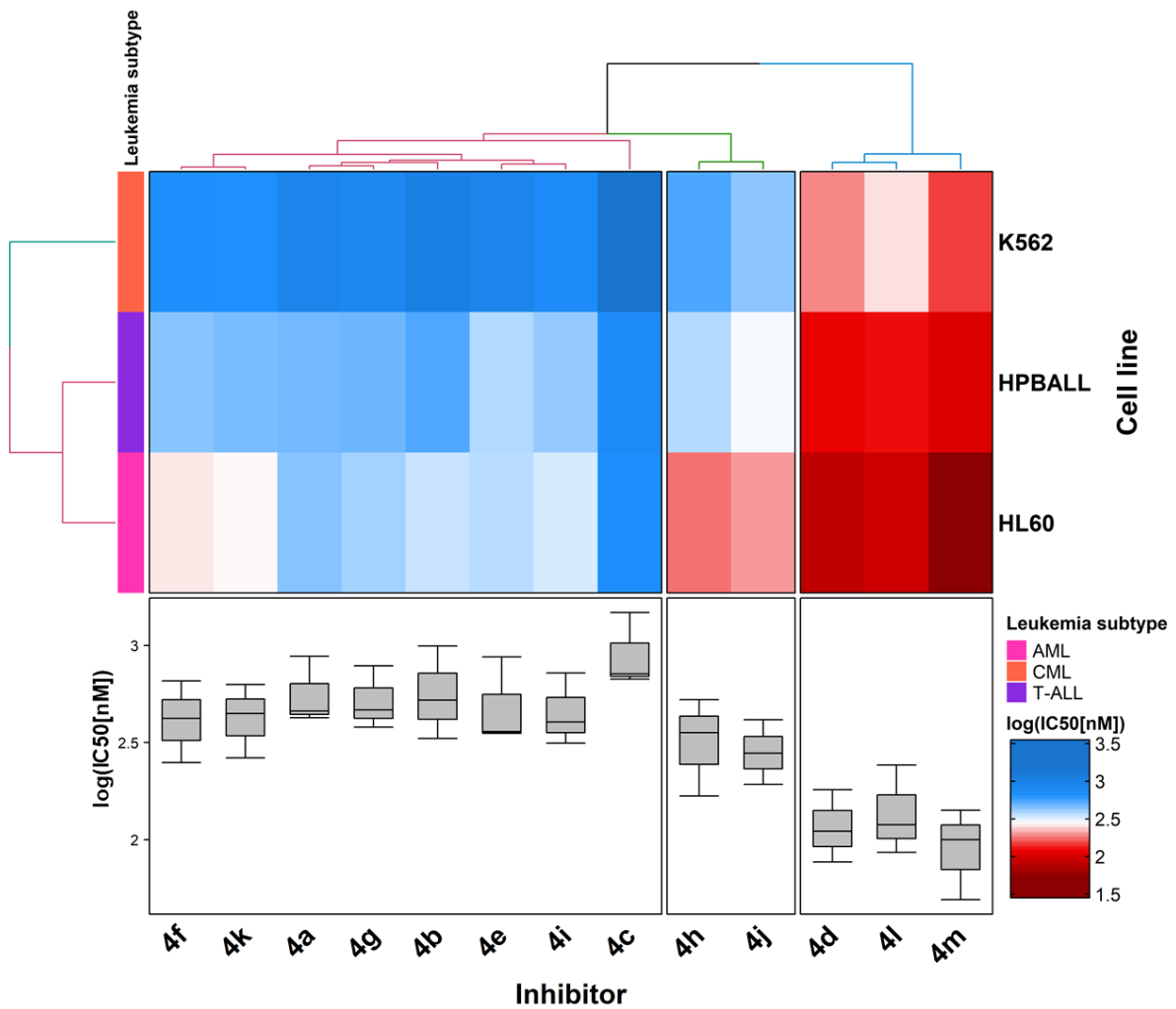


Figure 3. Comparison of the cytotoxic effect of compounds 4a-4m on three leukemia cell lines (K562, HPBALL, and HL60) originating from different lineages (n=3). The data is visualized using an unsupervised clustered heat map using log<sub>10</sub> nanomolar IC<sub>50</sub> values. Additionally, a box plot analysis was performed, enabling the identification of three distinct clusters. The color-coded dendrogram placed above the heat map highlights that compounds 4d, 4l, and 4m demonstrate high cytotoxicity when compared to the other tested compounds.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

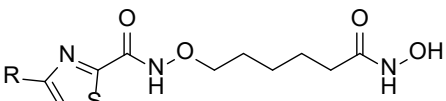



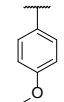


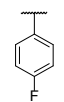


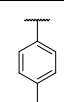
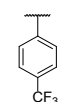
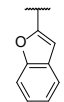
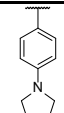
				
compound	R	IC <sub>50</sub> (HL60) [nM]	IC <sub>50</sub> (HPBALL) [nM]	IC <sub>50</sub> (K562) [nM]
4a		424.6 ± 68.3	459.8 ± 35.2	879.2 ± 25.5
4b		332.1 ± 56.2	523.1 ± 58.2	993 ± 128.2
4c		670.7 ± 74.8	714.6 ± 55.2	1478.7 ± 53
4d		76.8 ± 8.2	110.6 ± 15.2	180.8 ± 55.7
4e		352.4 ± 25.5	359.9 ± 20	873.9 ± 238.4
4f		249.8 ± 84.5	421.2 ± 44.7	656.1 ± 264.7
4g		380.3 ± 36.8	465.3 ± 73.1	786.4 ± 230.9
4h		168.1 ± 104	355.9 ± 19.6	526.5 ± 28
4i		313.7 ± 96.5	403.8 ± 46.2	722 ± 164
4j		192.4 ± 22.4	279 ± 20.7	414.6 ± 38.8
4k		263.7 ± 70.7	446.4 ± 65.7	629.6 ± 69.6
4l		86 ± 10.4	119.4 ± 6.2	242.5 ± 52
4m		49.1 ± 5.4	100.1 ± 6	141.9 ± 13.2

Table 2. Comparison of the IC<sub>50</sub> of the experimental compounds in three different leukemia entities



### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### Structure-activity-relationship analysis

First, we modulated the electronic properties of the terminal phenyl ring by introducing a methoxy or fluorine substituent at the 1', 2' or 3' position, respectively. Whereas the introduction of fluorine did not influence the anti-leukemic effect of the HDAC inhibitors regardless of the ring position (**4e – g**), the introduction of a methoxy substituent at the 4'-position (**4d**) enhanced the cytotoxic activity against leukemia cells in comparison to the 2' or the 3' derivatives (**4b, 4c**).

Secondly, the replacement of the phenyl ring with thiophene was tolerated (**4h, 4i**). Interestingly, the sulfur in the 2'-position (**4h**) proved to be beneficial for the anti-leukemic activity. However, the overall influence on the cytotoxic activity remained rather small.

Thirdly, we focused on the optimization of the substituent in 4'-position. The comparison of the 4'-methyl substituted analog (**4j**) with the 4'-trifluoromethylated analogue (**4k**) clearly showed that a strong electron withdrawing substituent at this position reduces the cytotoxic efficacy. However, introduction of larger substituents combined with electron donating properties led to the pyrrolidine analog **4m**, a compound with strong cytotoxic activity. Extending the size of the cap group with a 2'-benzofuran moiety (**4l**) also enhanced the cytotoxic activity remarkably in comparison to **4a**.

Overall, the introduction of larger substituents in 4'-position in combination with electron donating heteroatoms (**4d, 4m**) and the 2'-substituted benzofuran (**4l**) improved the antileukemic activity in comparison to the unsubstituted compound **4a** remarkably (Table 2). In addition, there is also a good correlation between the antileukemic activity and the inhibition of HDAC2 and 6.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

The HDAC inhibitory effects of the three most promising derivatives (**4d**, **4l**, and **4m**) were next evaluated through cell-based assays using the HL60 cell line. Treatment of HL60 cells with compounds **4d**, **4l**, and **4m** resulted in notable  $\alpha$ -tubulin acetylation (indicating effective inhibition of HDAC6), as determined by Western blot analysis. Vorinostat was utilized as a control for comparison (Figure 4.). When evaluating HDAC class I inhibition, the optimized inhibitors displayed higher histone H3 acetylation levels compared to vorinostat. Furthermore, correlating with the H3 acetylation, we observed higher PARP cleavage (indicator of apoptosis induction) with **4d**, **4l** and **4m**, suggesting their enhanced effectiveness in comparison to vorinostat.

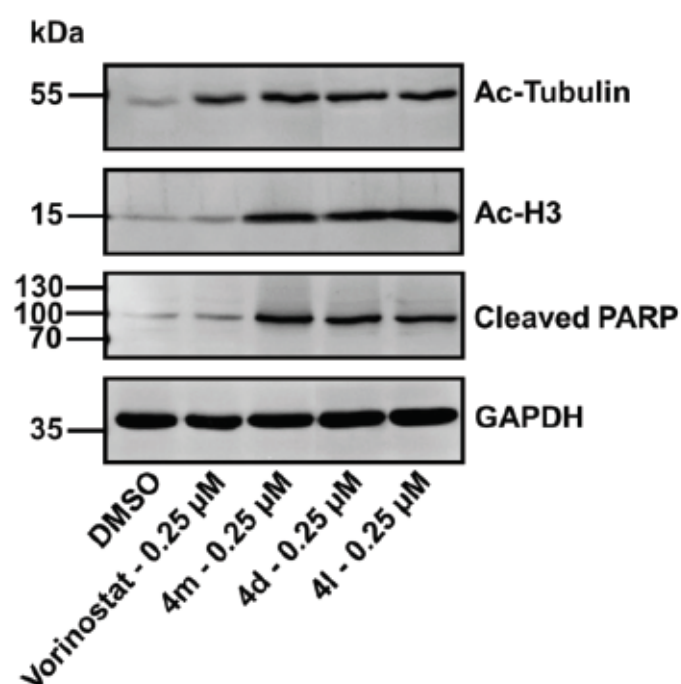


Figure 4. Western Blot analysis was conducted to assess the effects on HDAC inhibition markers (ac-H3 and ac-Tubulin) and the induction of apoptosis marker (cleaved PARP) following a 24-hour treatment with 4d, 4m and vorinostat (control) in HL60 leukemia cells (n=3). A representative blot is shown here with GAPDH serving as the loading control.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### **Selective cytotoxicity of 4d and 4m against leukemia cells surpasses various commercial HDAC inhibitors**

Following the confirmation of cellular HDAC inhibition by the promising new HDACi series, we selected two most potent HDACi (**4d** and **4m**) for an extended drug screening analysis. This analysis involved evaluating their effectiveness against twelve commercially available HDAC inhibitors using 7 leukemia cell lines (Figure 5A) and 18 leukemia patient-derived xenograft (PDX) cells (Figure 5B) across distinct therapy response subgroups. We incorporated healthy controls into our screens to determine whether **4d** and **4m** operate within a safe therapeutic window. These controls comprised CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) derived from cord blood and T-cells from healthy donors. By determining drug sensitivity scores (DSS) and generating selective DSS (sDSS),<sup>41</sup> we obtained comparative data to evaluate their selectivity on the leukemia cells compared to the healthy controls. In comparative studies, both **4d** and **4m** demonstrated superior efficacy compared to clinically advanced HDAC inhibitors including tubastatin A, ricolinostat, CI994, romidepsin, and vorinostat. This was evidenced by their significantly elevated sDSS values when assayed against a panel of leukemia cell lines and PDX cells. Moreover, **4d** and **4m** consistently displayed selective anti-leukemic effects in the majority of tested leukemia cell types, suggesting their superiority over other examined HDACi.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

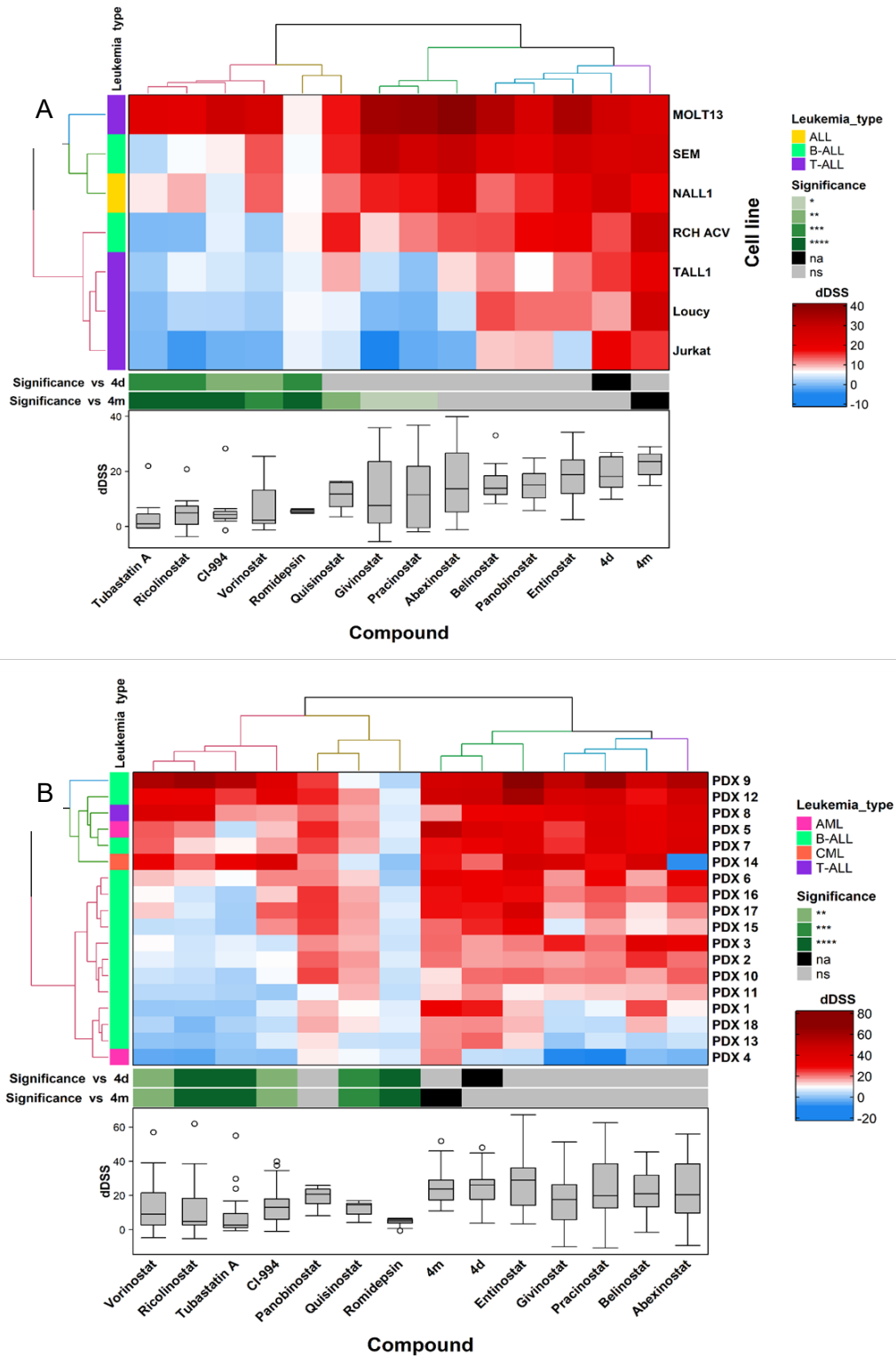


Figure 5. Unsupervised clustered heatmap displaying selective drug sensitivity score (dDSS) of A) leukemia cell lines and B) patient derived xenografts (PDX) grown leukemia cells. The statistical analysis was conducted using one way ANOVA,  $n=1$ . ALL = acute lymphoblastic leukemia, AML = acute myeloid leukemia, B-ALL = B-cell acute lymphoblastic leukemia, CML = chronic myeloid leukemia, MLLr = MLL rearranged leukemia, T-ALL = T-cell acute lymphoblastic leukemia, na = not applicable, ns= not significant, \* =  $p(\text{adj}) > 0.05$ , \*\* =  $p(\text{adj}) > 0.01$ , \*\*\* =  $p(\text{adj}) > 0.001$ , \*\*\*\* =  $p(\text{adj}) > 0.0001$

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 4d and 4m induce cell cycle arrest and apoptosis in leukemia cells

HDAC inhibition commonly leads to cell cycle arrest as an initial response, followed by the induction of apoptosis<sup>42,43</sup>. Analysis of the cell cycle demonstrated that treatment with **4d** in a concentration of 0.15  $\mu\text{M}$  and **4m** at both concentration significantly increased the proportion of HL60 cells in the G1 phase. **4d** and **4m** reduced the number of cells in the S and G2/M phases significantly (Figure 6). Furthermore, an increased population of cells exhibited sub G1 labelling, indicating DNA fragmentation and confirming the induction of apoptosis. In comparison, **4m** exhibited greater potency than **4d** in inducing cell cycle arrest at the same concentration, which can be attributed to the lower  $\text{IC}_{50}$  value reported for **4m** as compared to **4d** (Table 2).

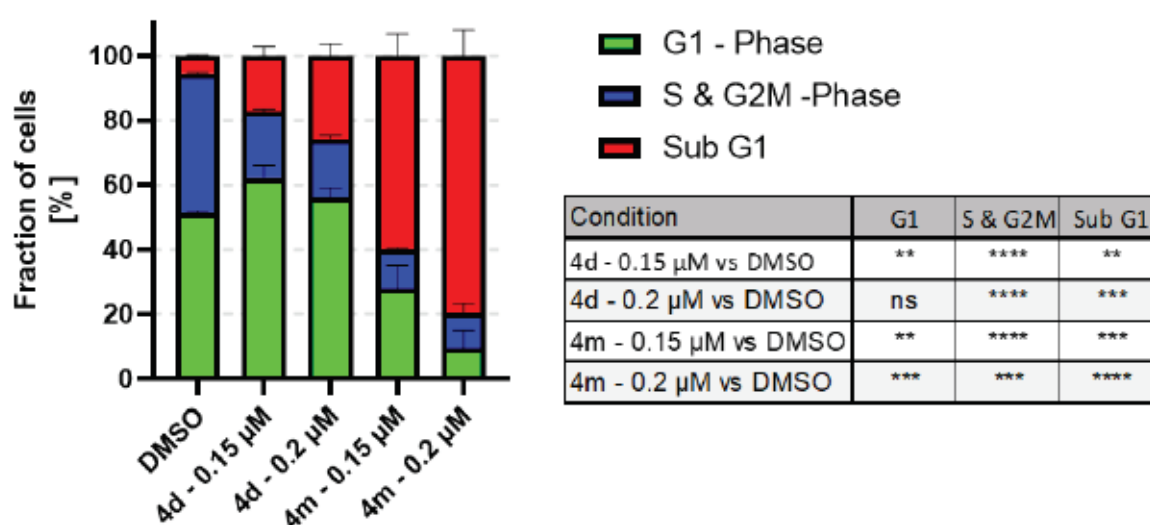


Figure 6. Bar graph depicting a cell cycle analysis via propidium iodide staining of HL60 leukemia cells treated with **4m** or **4d**, while the bar graphs displays statistical significance (unpaired student t test,  $n=3$ ). ns= not significant, \*\*=  $p(\text{adj}) > 0.01$ , \*\*\*=  $p(\text{adj}) > 0.001$ , \*\*\*\*=  $p(\text{adj}) > 0.0001$

To assess apoptosis induction by **4d** and **4m** further, we employed a trypan blue staining in conjunction with a caspase 3/7 assay on HL60 leukemia cells. As a control, we used the pan-caspase inhibitor Q-VD<sup>44</sup>. Treatment with **4d** or **4m** resulted in a significant reduction of viability  $\sim 20\%$  after 24 h and 70% after 48 h (Figure 7A). Q-VD reduced the loss of viability by 50%, suggesting that the cytotoxic effects triggered by both compounds are associated with apoptosis and are largely caspase-dependent. The caspase 3/7 assay further validated these findings, showing a marked increase in caspase activity after 48 h treatments with **4d** or **4m** (Figure 7B). Notably, Q-VD effectively negated this caspase 3/7 activity. In sum, the findings robustly indicate that both **4d** and **4m** induce apoptosis, leading to cytotoxic impacts on leukemia cells.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

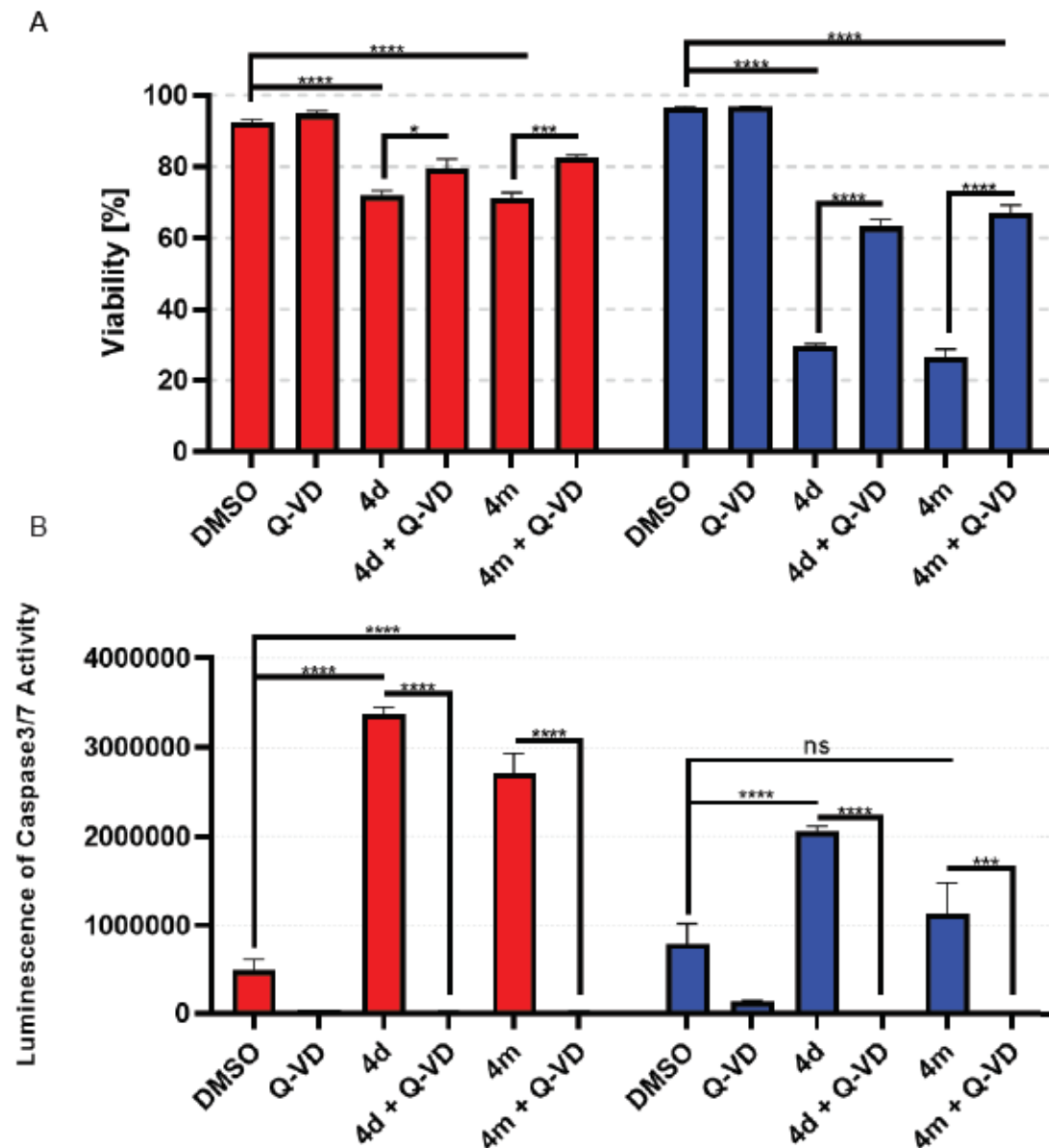


Figure 7. Bar diagram comparing the changes in A) viability and B) apoptosis induction via caspase 3/7 activity of HL60 leukemia cells treated with 4m or 4d & Q-VD (pan-Caspase inhibitor) via trypan blue or caspase3/7 assay, respectively. The statistical analysis was conducted using unpaired student t-test, n=3. ns= not significant, \* = p(adj) > 0.05, \*\* = p(adj) > 0.01, \*\*\* = p(adj) > 0.001, \*\*\*\* = p(adj) > 0.0001

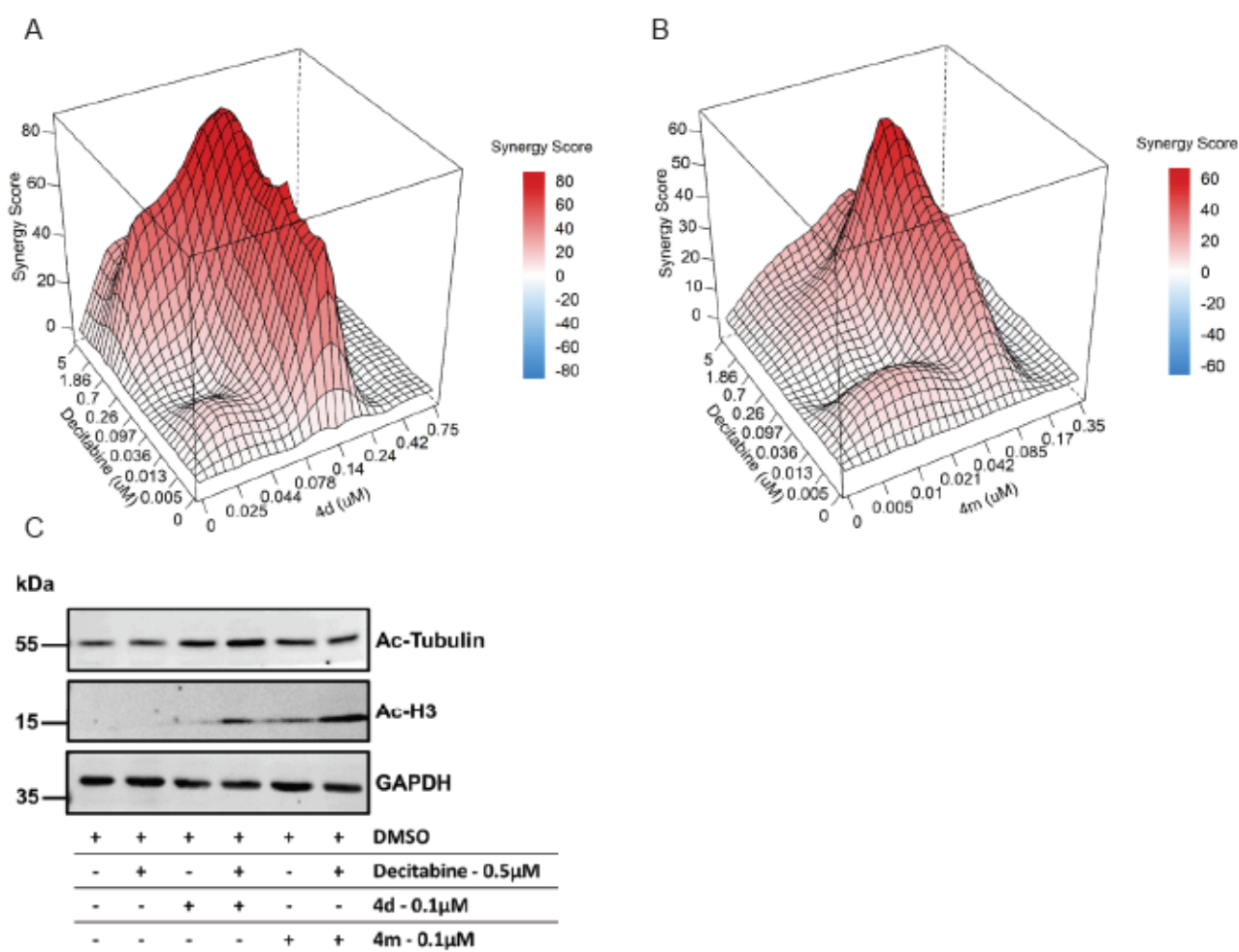
#### 4d and 4m synergize effectively with the standard chemotherapy drugs decitabine and clofarabine

Current clinical therapeutic strategies acknowledge the shortcomings of singular drug treatments, advocating for the utilization of synergistic drug combinations. These combinations aim to reduce cytotoxicity, exploit the unique susceptibilities of cancer cells, and avert drug resistance development. Therefore, we investigated potential synergistic drug combinations with the novel HDACi **4d** and **4m**. Decitabine, a first line chemotherapeutic, functions as a DNA



### 3. Ergebnisse und Diskussion

methyltransferase inhibitor resulting in DNA hypomethylation. Synergistic drug effects between decitabine and HDACi have been well characterized, particularly in the context of AML<sup>45,46</sup>. Utilizing a matrix synergy screening method with the zero-interaction potency (ZIP) algorithm, we identified high ZIP synergy scores ranging from 60 to 80 across various concentration for both **4d** and **4m** when combined with decitabine (Figure 8A and 8B). Subsequently, we looked into the underlying mechanism of this drug synergy by evaluating the acetylation levels of histone H3 (Figure 8C). Although decitabine alone did not augment H3 acetylation, its combination with **4d** or **4m** showcased more pronounced bands compared to the individual HDACi treatment.

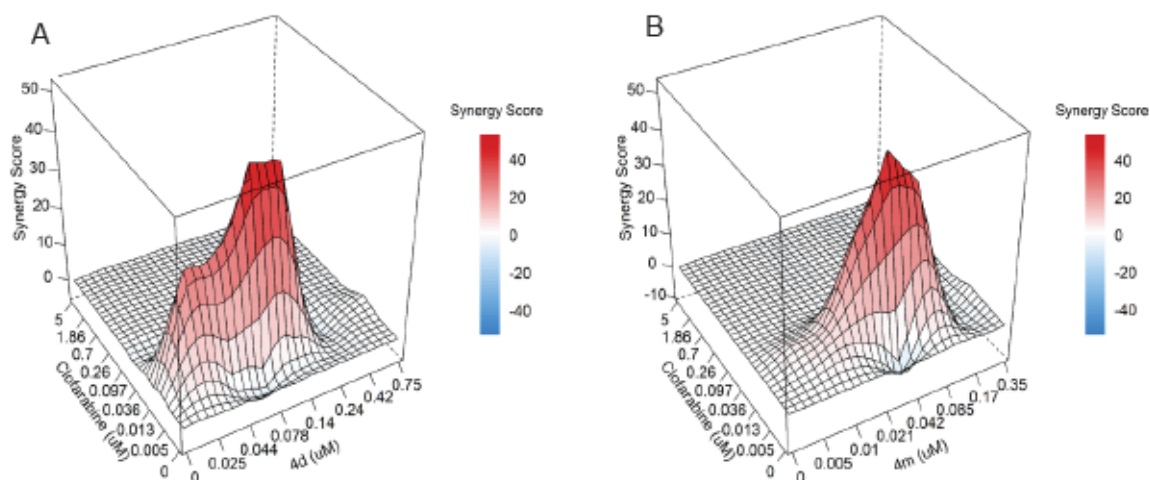


**Figure 8.** 3D synergy plots of HL60 cells treated with drug combinations for 72 hours. The plots represent synergy scores from a combination matrix analyzed by the Zero Interaction Potency (ZIP) algorithm: A) 4d + decitabine and B) 4m + decitabine (n= 2). C) Western Blot analysis illustrating the differences in HDAC inhibition markers, ac-H3 and ac-Tubulin, in HL60 cells. The comparison is between solo treatment and combination treatments of either 4d or 4m with decitabine (n=3) for 24 h. Displayed is a representative blot with GAPDH as the loading control.

HDAC inhibition contributes to increased DNA damage<sup>47</sup>. We examined the synergistic impact of combining **4d** and **4m** with clofarabine, a purine nucleoside analogue and DNA synthesis inhibitor. In line with our previous observations, we found in a similar matrix synergy approach,

### 3. Ergebnisse und Diskussion

ZIP synergy scores of around 50 when **4d** and **4m** were administered in combination with clofarabine (Figure 9A and 9B).



**Figure 9.** 3D synergy plots of HL60 cells treated with drug combinations for 72 hours. The plots represent synergy scores from a combination matrix analyzed by the Zero Interaction Potency (ZIP) algorithm: A) 4d + clofarabine and B) 4m + clofarabine (n= 2).

These findings indicate that HDAC inhibitors **4d** and **4m** enhance the effectiveness of first line chemotherapeutics decitabine and clofarabine potentially allowing for dose reduction and decreasing the likelihood of drug resistance.

#### **4d shows promising *in vitro* pharmacokinetics superior to 4m**

Determination of *in vitro* pharmacokinetic properties of new chemical entities is a key step in drug discovery and aids in non-clinical evaluation. To assess initial ADME characteristics (absorption, distribution, metabolism and elimination) of **4d** and **4m**, coefficient of distribution, plasma stability, blood-to-plasma ratio, microsomal stability and plasma protein binding were investigated.

Good oral absorption can be assumed for coefficient of distribution (logD) between 0 and 3.<sup>48</sup> The logD value was determined as  $1.47 \pm 0.05$  for **4d** and  $4.15 \pm 0.18$  for **4m** (Figure 10A), favoring **4d**. Carvedilol acted as a control and confirmed the assay validity (obtained: 3.21 vs. in literature: 3.2).<sup>49</sup>

Further, *in vitro* plasma stability was determined as instability is an indicator for rapid clearance or short half-life ( $t_{1/2}$ ), resulting in a poor *in vivo* performance. **4d** and **4m** demonstrated excellent stability over the 24 hours period monitored in human plasma at 37°C (Figure 10B).



### 3. Ergebnisse und Diskussion

**4m** showed equal affinity to plasma and red blood cells, while **4d** tended towards higher distribution into red blood cells (Figure 10C) as determined by the blood-to-plasma ratio ( $K_{B/P}$ ). One-way ANOVA confirmed no concentration dependency over the range of 2.5 nM to 1  $\mu$ M for **4d** ( $K_{B/P}$ : 1.27 at 2.5 nM, 1.26 at 50 nM and 1.37 at 1  $\mu$ M), while for **4m** the  $K_{B/P}$  at the highest concentration level investigated (1  $\mu$ M) was significantly lower if compared to the lower concentration levels ( $K_{B/P}$ : 1.00 at 2.5 nM, 1.02 at 50 nM and 0.88 at 1  $\mu$ M). The control compound carvedilol validated the assay performance ( $K_{B/P}$  obtained: 0.76 vs.  $K_{B/P}$  in literature: 0.76).<sup>50</sup>

Plasma protein binding was high for **4d** with a mean of 99.0% over the observed concentration range with no concentration-dependency. **4m** exhibited an atypical concentration-dependent plasma protein binding with lower binding for lower concentrations (Figure 10D). If proceeding in drug development, this phenomenon needs to be further investigated.<sup>51</sup> Itraconazol as control showed high plasma protein binding throughout all cavities confirming no leakage and being in line with values reported in literature.<sup>52</sup>

While **4m** was extensively metabolized by hepatic enzymes, such as Cytochrome P450 and Uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferases, in human liver microsomes, **4d** showed only moderate metabolism (Figure 10E). The half-life of **4d** was 35.9 min, with an intrinsic clearance of 38.6  $\mu$ L/min/mg. When corrected for non-specific protein binding in the incubation mixture, the unbound intrinsic clearance was determined as 54.7  $\mu$ L/min/mg. The half-life of **4m** was substantially shorter with 11.2 min. While the corresponding intrinsic clearance resulted in 123.6  $\mu$ L/min/mg, its unbound intrinsic clearance was 466.4  $\mu$ L/min/mg.

Using the collected data, the *in vivo* hepatic clearance was estimated to be 0.39 L/min for **4d** and 8.18 L/min for **4m**. Assuming a hepatic blood flow of 1500 mL/min, **4d** can therefore be classified as a low hepatic extraction drug (calculated hepatic extraction ratio ( $E_h$ ) < 0.3) and **4m** as high hepatic extraction drug ( $E_h$ >0.7).

Moreover, the collected *in vitro* pharmacokinetic data of **4d** and **4m** were compared to that of the approved drug vorinostat (Table 3). The HDACi vorinostat has a short *in vivo* half-life of less than one hour following i.v. administration in humans,<sup>53</sup> high serum clearance and low oral bioavailability, which results in the requirement of administration of higher doses with increased risk of side effects. **4d** may provide improved pharmacokinetic properties in this regard due to e.g. highly improved plasma stability, its intermediate intrinsic clearance and low hepatic extraction (Table 3). While vorinostat is classified as a high clearance drug (apparent clearance 5.2-6.4 L/min)<sup>54</sup> with strong extra-renal elimination, the outcome of our *in vitro-in vivo* extrapolation of **4d** characterizes the compound as superior in regard to hepatic clearance and its plasma stability (0.390 L/min, low extraction drug).

### 3. Ergebnisse und Diskussion

Table 3. Comparison of in vitro pharmacokinetic data of 4d and 4m to vorinostat.

	Vorinostat	4d	4m
<b>logD</b>	1.46 <sup>55</sup>	1.47 ± 0.05	4.15 ± 0.18
<b>Plasma stability / t<sub>1/2</sub></b>	75 min <sup>55</sup>	>24 hours	>24 hours
<b>K<sub>B/P</sub></b>	2.0 <sup>56</sup>	1.26 ± 0.16 (50 nM)	1.02 ± 0.06 (50 nM)
<b>Plasma protein binding</b>	71% <sup>57</sup> (1.89 µM)	99.0% (1 µM)	99.6% (1 µM)
<b>Microsomal stability / t<sub>1/2</sub></b>	60 min <sup>58</sup>	35.9 min <sup>58</sup>	11.2 min
<b>(Clearance Category)</b>	(intermediate)	(intermediate)	(high)

K<sub>B/P</sub>: blood-to-plasma ratio, logD: coefficient of distribution, t<sub>1/2</sub>: half-life

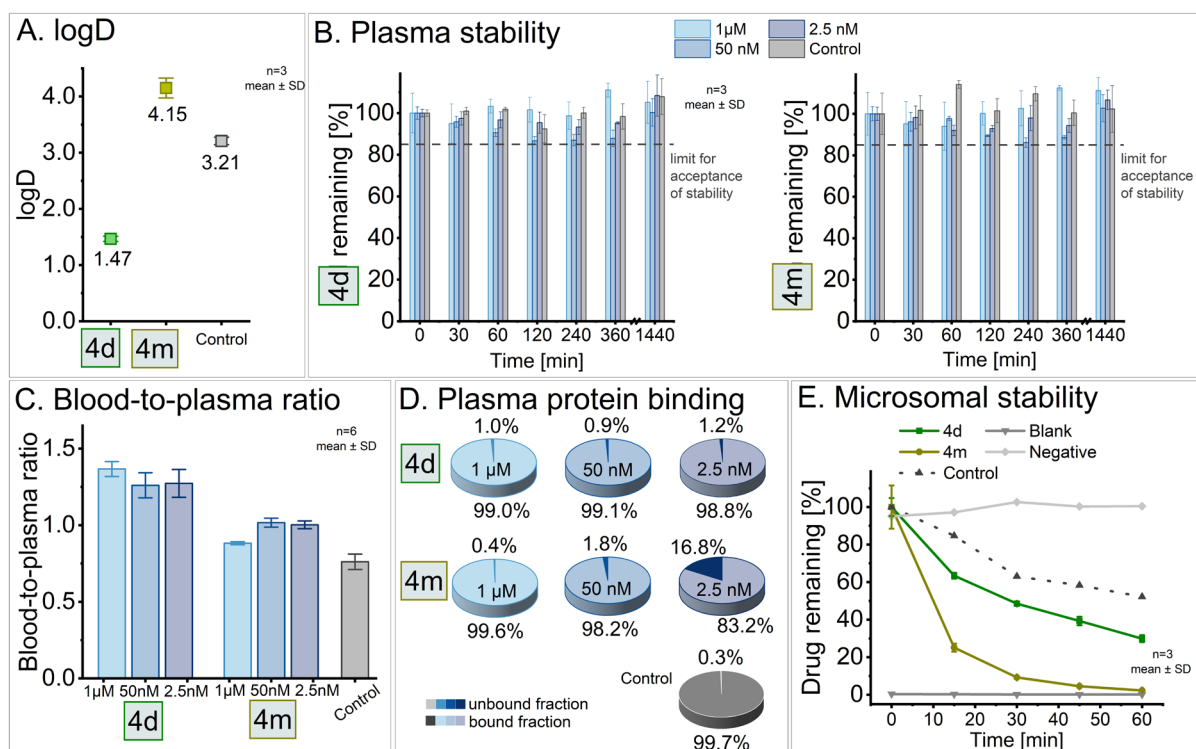


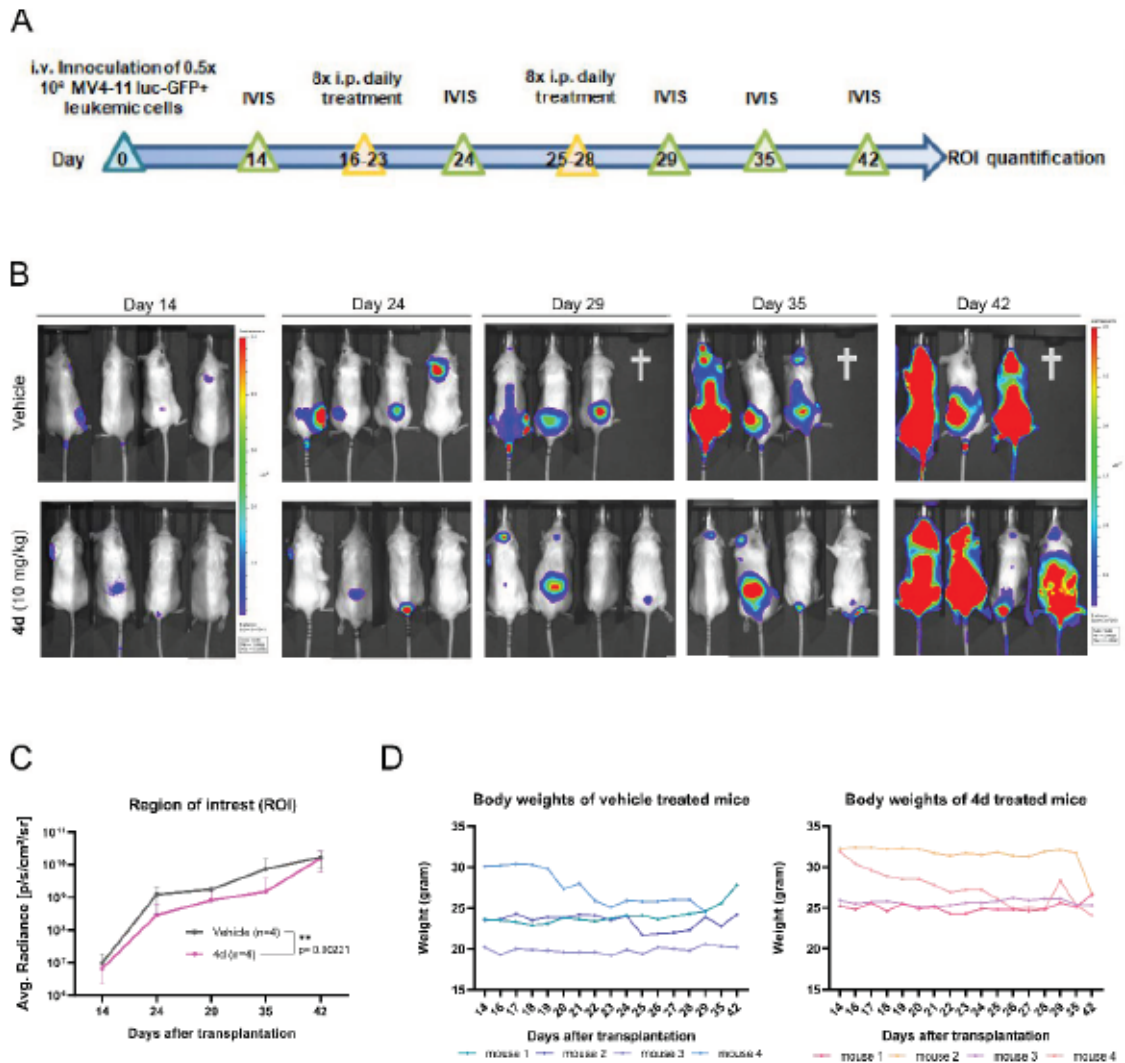
Figure 10. Overview of in vitro pharmacokinetics of 4d and 4m. A. Interval plot of the determination of the coefficient of distribution (logD). Carvedilol was used as a control. B. Stability of 4d and 4m in human plasma over 24 hours at three different concentrations. A limit of -15% was set as acceptance criterium for stability according to bioanalytical guidelines. 4% BSA (absence of plasma enzymes) was used as a control spiked with a concentration of 50nM of the drug. C. Blood-to-plasma ratio of 4d and 4m for the three assessed concentration levels applying carvedilol as a control. D. Plasma protein binding for 4d and 4m at three different concentration levels. The mean value of n=3 is displayed. Itraconazol was used as a control. E. Microsomal stability of 4d and 4m in human liver microsomes. Propranolol was used as a control. The blank contains no drug, while the negative is free of HLMs. BSA: bovine serum albumin, HLM: human liver microsomes, SD: standard deviation

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### **4d suppresses *in vivo* growth of (MV4-11) leukemia cells**

The pronounced cytotoxic effect of **4d** on leukemia cells, combined with the comparatively promising *in vitro* pharmacokinetic characteristics of **4d**, prompted us to evaluate its effectiveness in a preclinical leukemic xenograft mouse (NSG) model. The experimental design is illustrated in Figure 11A. Briefly, mice were first intravenously (i.v.) injected with ( $0.5 \times 10^6$ ) MV4-11 luciferase-GFP+ leukemia cells. The *in vivo* growth of the leukemia cells was examined after 14 days of injection via bioluminescence measurement using *in vivo* imaging system (IVIS). Next, the leukemia bearing mice were distributed randomly to two groups. From day 16 onwards, the mice were treated for 8 consecutive days with intraperitoneal injections of either with a vehicle control or **4d** (at a dose of 10 mg/kg). The IVIS images (Figure 11B) and the quantified region of interest (ROI) measurements during the treatment period indicated that the treatment with **4d** significantly ( $p = 0.002$ ) suppresses the *in vivo* growth of MV4-11 leukemia cells as compared to vehicle control group (Figure 11C). At day 42, which is three weeks after discontinuing the **4d** treatment, no differences in the growth of leukemia cells was observed between **4d** treated and vehicle group. Importantly, for measuring the potential signs of toxicity, such as body weight alterations, the **4d** treatment group exhibited a minor (not significant) reduction during and after the treatment course when compared to the vehicle control group (Figure 11D).

### 3. Ergebnisse und Diskussion



**Figure 11.** A) Schematic timeline of the experimental design. Each mouse received  $0.5 \times 10^6$  MV4-11 luc-GFP+ leukemic cells. After confirmation of tumor engraftment via monitoring bioluminescence-based in vivo imaging system (IVIS), mice were grouped into two treatment groups, Vehicle (n=4) and 4d (n=4). All mice received daily treatments accordingly via intraperitoneal injection. Tumor progression was examined by measuring bioluminescent signals with IVIS and region of interest (ROI, p/s/cm<sup>2</sup>/sr) quantification. B) IVIS images of treated mice were taken on day 14, 24, 29, 35 and 42. C) ROI values at various time points, representing the measurement of leukemia cell growth. Statistical analysis was performed using a Two-way mixed ANOVA with Greenhouse-Geisser correction. D) Changes in body weight of each mouse from the two groups during and after the treatment course.

## 3. Ergebnisse und Diskussion

### 3. Conclusion

A set of novel alkoxyamide-containing histone deacetylase inhibitors with substituted phenylthiazole cap groups was developed and evaluated for their potential as novel anti-leukemic lead structures. The leading candidates from this series, **4d** and **4m**, exhibited nanomolar inhibition towards HDAC2 and HDAC6, and demonstrated cytotoxic effects against a wide range of therapy-sensitive and therapy-resistant leukemia cell lines and patient-derived leukemia cells.

Importantly, **4d** and **4m** exhibited comparable or even higher drug sensitivity scores than well-established and clinically used HDAC inhibitors, along with greater selectivity towards malignant cells relative to healthy controls. Considering the current reliance on combination therapies in modern cancer treatment, drugs that demonstrate synergistic interactions can significantly influence the therapeutic outcome, delay or prevent the developing of resistance and increase the treatable population of patients. In this regard, the combination of **4d** and **4m** with the routinely used chemotherapeutic agents clofarabine and decitabine exhibited a notable synergistic cytotoxic effect. The promising *in vitro* pharmacokinetic characteristics of **4d** made it the candidate of choice for initial *in vivo* studies. Notably, *in vivo* administration of **4d** effectively suppressed the growth of leukemia cells, without inducing any observable signs of toxicity in mice. Overall, these findings position **4d** and **4m** as novel lead structures with potential for further preclinical development, as they not only demonstrate a therapeutic window but also promising anti-leukemic effects when used in combination with established anti-leukemic drugs.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 4. Experimental section

##### 4.1 Chemistry

Chemicals and solvents were purchased from commercial suppliers (Acros Organics, TCI, abcr, Alfa Aesar, Ambeed, BLDpharm and Merck) and used without further purification. Dry solvents were purchased from Acros Organics. The reactions were monitored by thin-layer chromatography (TLC) using Macherey-Nagel pre-coated ALUGRAM® Xtra SIL G/UV<sub>254</sub> plates. Spots were visualized either by irradiation with ultraviolet light (254 nm) or staining in potassium permanganate solution. Hydroxamic acids were further stained using a 1% solution of iron(III) chloride in ethanol. Flash chromatography was performed on a CombiFlash® RF 200 or a Büchi Pure C-810 Flash using RediSep™ Rf-columns using the solvent mixtures of *n*-hexane/ethyl acetate or dichloromethane/methanol according to the separation. Melting points (mp) analyses were performed using a Büchi M-565 melting point apparatus and are uncorrected. Proton (<sup>1</sup>H) and carbon (<sup>13</sup>C) NMR spectra were recorded on a Bruker Avance III 300 or 600 MHz using DMSO-d<sub>6</sub> as the solvent. Chemical shifts are given in parts per million (ppm), relative to residual solvent peak for <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR. Coupling constants, J, were reported in Hertz (Hz). High-resolution mass spectra (HRMS) analysis was performed on a UHR-QTOF maXis 4G, Bruker Daltonics, by electrospray ionization (ESI). Analytical HPLC analyses were carried out on an Knauer AZURA system equipped with AZURA 6.1L (pumps), AZURA column thermostat CT 2.1 and AZURA UVD 2.1L (UV-detector) and a Spark Holland B.V. OPTIMAS™ model 820 autosampler or on a Agilent LC 1260 Infinity II system equipped with an G7116A Infinity II Multicolumn Thermostat, a G7104C Infinity II Flexible Pump a G7129C Infinity II Vialsampler and a G7114A Infinity II Variable Wavelength Detector. The separation took place on a Eurospher II 100 5 C18 (150 x 4 mm) column. UV absorption was detected at 254 nm. HPLC-grade water +0.1% TFA (solvent A) and HPLC grade acetonitrile +0.1% TFA (solvent B) were used for elution at a flow rate of 1 mL/min. A linear gradient of 10% B to 100% B within 30 min was used. In the case of the *O*-trityl protected compounds **3 a-m** HPLC-grade water (solvent A) and HPLC grade acetonitrile (solvent B) were used for elution at a flow rate of 1 mL/min. A linear gradient of 10% B to 100% B within 30 min was used. All compounds are >95.0% pure by HPLC.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### A. General procedure for the preparation of the phenylthiazoles 1a-1m

The respective 2-bromoketones (1.0 eq) and ethyl thiooxamate (1.0 eq.) were dissolved in ethanol (7 mL/mmol) and heated at 70 °C. If the TLC (eluent: ethyl acetate/*n*-hexane) showed incomplete conversion after 7 hours of heating, the reaction was stirred at room temperature overnight. After evaporation of the solvent, the resulting residue was diluted with ethyl acetate and washed three times with 50 mL saturated sodium bicarbonate solution and once with 50 mL brine. The organic phase was dried over anhydrous sodium sulfate, filtrated and the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was purified using flash chromatography using ethyl acetate and *n*-hexane as eluent (0 - 30% ethyl acetate) to yield the phenylthiazoles **1 a-m**.

#### 1a Ethyl 4-phenylthiazole-2-carboxylate

Synthesis according to general procedure A using phenacyl bromide (4.1 g, 20.0 mmol) afforded as **1a** a light yellow solid (3.3 g, 14.1 mmol, 71%). mp 36.9 °C, *t<sub>r</sub>* 14.47 min, purity: 99.3%

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.36 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 4.42 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 7.36 – 7.44 (m, 1H), 7.45 – 7.53 (m, 2H), 7.98 – 8.00 (m, 1H), 8.02 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 8.53 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 14.1, 62.2, 121.0, 126.2, 128.7, 129.0, 133.2, 156.3, 157.5, 159.4.

HRMS (*m/z*) MH<sup>+</sup> calcd for C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>S 234.0583, found 234.0584

#### 1b Ethyl 4-(2-methoxyphenyl)thiazole-2-carboxylate

Synthesis according to general procedure A using 2-bromo-1-(2-methoxyphenyl)ethanone (2.3 g, 10,0 mmol) afforded **1b** as a white solid (2.0 g, 7.6 mmol, 76%). mp 70.3 °C, *t<sub>r</sub>* 15.21 min purity: 99.1%

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.36 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 3.94 (s, 3H), 4.41 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 7.09 (ddd, *J* = 7.8, 7.3, 1.1 Hz, 1H), 7.18 (dd, *J* = 8.4, 1.1 Hz, 1H), 7.40 (ddd, *J* = 8.3, 7.3, 1.8 Hz, 1H), 8.13 (dd, *J* = 7.7, 1.8 Hz, 1H), 8.45 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 14.1, 55.6, 62.1, 111.9, 120.7, 121.6, 124.2, 129.4, 129.9, 152.3, 155.8, 156.6, 159.5.

HRMS (*m/z*) MH<sup>+</sup> calcd for C<sub>13</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>3</sub>S 264.0689, found 264.0696



### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 1c Ethyl 4-(3-methoxyphenyl)thiazole-2-carboxylate

Synthesis according to general procedure A using 3-methoxyphenacyl bromide (2.3 g, 10.0 mmol) afforded **1c** as a white solid (1.9 g, 7.4 mmol, 74%). mp 76.6 °C,  $t_r$  14.36 min purity: 98.9%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1.36 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H), 3.83 (s, 3H), 4.42 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 2H), 6.98 (ddd,  $J$  = 8.2, 2.6, 1.0 Hz, 1H), 7.40 (ddd,  $J$  = 8.2, 7.7, 0.4 Hz, 1H), 7.51 – 7.62 (m, 2H), 8.56 (s, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  14.1, 55.2, 62.2, 111.6, 114.4, 118.6, 121.3, 130.1, 134.6, 156.1, 157.3, 159.3, 159.7.

HRMS ( $m/z$ )  $\text{MH}^+$  calcd for  $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{NO}_3\text{S}$  264.0689, found 264.0693

#### 1d Ethyl 4-(4-methoxyphenyl)thiazole-2-carboxylate

Synthesis according to general procedure A using 4-methoxyphenacyl bromide (2.3 g, 10.0 mmol) afforded **1d** as a white solid (1.9 g, 7.3 mmol, 73%). mp 150.5 °C,  $t_r$  14.40 min purity: 97.7%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1.36 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H), 3.81 (s, 3H), 4.41 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 2H), 6.99 – 7.09 (m, 2H), 7.90 – 7.98 (m, 2H), 8.37 (s, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  14.1, 55.2, 62.1, 114.3, 119.0, 126.0, 127.7, 156.3, 157.2, 159.4, 159.7.

HRMS ( $m/z$ )  $\text{MH}^+$  calcd for  $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{NO}_3\text{S}$  264.0689, found 264.0693

#### 1e Ethyl 4-(2-fluorophenyl)thiazole-2-carboxylate

Synthesis according to general procedure A using 2-bromo-2-fluoro-acetophenone (2.2 g, 10.0 mmol) afforded **1e** as a white solid (1.3 g, 5.2 mmol, 52%). Mp 65.7 °C,  $t_r$  15.25 min purity: 99.8%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1.36 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H), 4.42 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 2H), 7.31 – 7.43 (m, 2H), 7.48 (tdd,  $J$  = 7.2, 5.3, 2.7 Hz, 1H), 8.11 (td,  $J$  = 7.8, 1.7 Hz, 1H), 8.37 (d,  $J$  = 2.4 Hz, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  14.0, 62.3, 116.3 (d,  $J$  = 22.0 Hz), 121.0 (d,  $J$  = 11.5 Hz), 124.8 – 125.2 (m), 129.8 (d,  $J$  = 2.8 Hz), 130.6 (d,  $J$  = 8.7 Hz), 149.8 (d,  $J$  = 2.3 Hz), 157.1, 157.8, 159.3, 161.1.

HRMS ( $m/z$ )  $\text{MH}^+$  calcd for  $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{FNO}_2\text{S}$  252.0489, found 252.0490

#### 1f Ethyl 4-(3-fluorophenyl)thiazole-2-carboxylate

Synthesis according to general procedure A using 2-bromo-1-(3-fluorophenyl)ethan-1-one (2.2 g, 10.0 mmol) afforded **1f** as a white solid (1.6 g, 6.5 mmol, 65%). Mp 66.0 °C,  $t_r$  14.81 min purity: 99.7%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1.36 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H), 4.42 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 2H), 7.24 (dddd,  $J$  = 9.1, 8.3, 2.6, 1.0 Hz, 1H), 7.41 – 7.66 (m, 1H), 7.73 – 7.92 (m, 2H), 8.64 (s, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  14.1, 62.3, 112.8 (d,  $J$  = 23.2 Hz), 115.5 (d,  $J$  = 21.2 Hz), 121.1 – 123.0 (m), 131.1 (d,  $J$  = 8.4 Hz), 135.5 (d,  $J$  = 8.3 Hz), 154.8 (d,  $J$  = 2.9 Hz), 157.7, 159.3, 161.0, 164.2.

HRMS ( $m/z$ )  $\text{MH}^+$  calcd for  $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{FNO}_2\text{S}$  252.0489, found 252.0489



### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 1g Ethyl 4-(4-fluorophenyl)thiazole-2-carboxylate

Synthesis according to general procedure A using 2-bromo-1-(4-fluorophenyl)ethan-1-one (1.1 g, 5.0 mmol) afforded **1g** as a white solid (0.8 g, 3.3 mmol, 66%). Mp 74.0 °C  $t_r$  14.79 min purity: 99.9%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1.36 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H), 4.41 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 2H), 7.25 – 7.39 (m, 2H), 7.96 – 8.13 (m, 2H), 8.51 (s, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  13.9, 62.1, 115.7 (d,  $J$  = 21.7 Hz), 120.6, 128.3 (d,  $J$  = 8.3 Hz), 129.8 (d,  $J$  = 3.1 Hz), 155.2, 157.5, 159.2, 161.3, 163.2.

HRMS ( $m/z$ )  $\text{MH}^+$  calcd for  $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{FNO}_2\text{S}$  252.0489, found 252.0494

#### 1h Ethyl 4-(thiophen-2-yl)thiazole-2-carboxylate

Synthesis according to general procedure A using 2-bromo-1-(thiophen-2-yl)ethanone (2.1 g, 10.0 mmol) afforded **1h** as a black solid (1.3 g, 10.0 mmol, 54%). mp 53.4 °C  $t_r$  13.81 min purity: 96.5%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1.35 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H), 4.41 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 2H), 7.16 (dd,  $J$  = 5.1, 3.6 Hz, 1H), 7.61 (dd,  $J$  = 5.1, 1.2 Hz, 1H), 7.68 (dd,  $J$  = 3.6, 1.2 Hz, 1H), 8.37 (s, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  14.1, 62.3, 119.3, 125.5, 126.9, 128.2, 136.8, 151.1, 157.4, 159.2.

HRMS ( $m/z$ )  $\text{MH}^+$  calcd for  $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{NO}_2\text{S}_2$  240.0147, found 240.0149

#### 1i Ethyl 4-(thiophen-3-yl)thiazole-2-carboxylate

Synthesis according to general procedure A using 3-(bromoacetyl)thiophene (1.0 g, 4.7 mmol) afforded **1i** as a brown oil (0.7 g, 3.0 mmol, 63%).  $T_r$  13.43 min purity: 99.0%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1.35 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H), 4.41 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 2H), 7.63 – 7.69 (m, 2H), 8.03 (dd,  $J$  = 2.6, 1.6 Hz, 1H), 8.36 (s, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  14.1, 62.2, 120.3, 123.3, 126.2, 127.4, 135.4, 152.6, 157.3, 159.4.

HRMS ( $m/z$ )  $\text{MH}^+$  calcd for  $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{NO}_2\text{S}_2$  240.0147, found 240.0151

#### 1j Ethyl 4-(p-tolyl)thiazole-2-carboxylate

Synthesis according to general procedure A using 2-bromo-1-(p-tolyl) (2.2 g, 10.0 mmol) afforded **1j** as a white solid (1.7 g, 6.9 mmol, 69%). Mp 60.0 °C,  $t_r$  15.59 min purity: 99.3%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1.36 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H), 2.35 (s, 3H), 4.41 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 2H), 7.29 (dd,  $J$  = 7.9, 0.7 Hz, 2H), 7.84 – 7.94 (m, 2H), 8.45 (s, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  14.1, 20.8, 62.2, 120.1, 126.2, 129.5, 130.6, 138.2, 156.4, 157.3, 159.4.

HRMS ( $m/z$ )  $\text{MH}^+$  calcd for  $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{NO}_2\text{S}$  248.0740, found 248.0744

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 1k Ethyl 4-(4-(trifluoromethyl)phenyl)thiazole-2-carboxylate

Synthesis according to general procedure A using 2-bromo-4'-(trifluoromethyl)acetophenone (2.8 g, 10.0 mmol) afforded **1k** as a white solid (2.3 g, 7.7 mmol, 77%). Mp 134.3 °C,  $t_r$  16.36 min purity: 96.4%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1.36 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H), 4.43 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 7.85 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H), 8.23 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 8.74 (s, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  14.1, 62.3, 123.3, 125.9 (d,  $J = 4.1$  Hz), 126.9, 128.5, 128.9, 136.9, 154.5, 158.0, 159.3.

HRMS ( $m/z$ )  $\text{MH}^+$  calcd for  $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{F}_3\text{NO}_2\text{S}$  302.0457, found 302.0465

#### 1l Ethyl 4-(benzofuran-2-yl)thiazole-2-carboxylate

Synthesis according to general procedure A using 2-(bromoacetyl)benzofuran (1.0 g, 4.1 mmol) afforded **1l** as a brown solid (0.5 g, 1.7 mmol, 42%). Mp 128.6 °C,  $t_r$  16.02 min purity: 99.4%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1.37 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H), 4.43 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 7.25 – 7.41 (m, 2H), 7.42 (d,  $J = 0.9$  Hz, 1H), 7.69 (ddq,  $J = 17.4, 8.1, 0.8$  Hz, 2H), 8.49 (s, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  14.1, 62.4, 104.2, 111.3, 121.8, 122.5, 123.5, 125.3, 128.2, 147.3, 150.3, 154.3, 158.7, 159.1.

HRMS ( $m/z$ )  $\text{MH}^+$  calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{NO}_3\text{S}$  274.0532, found 274.0534

#### 1m Ethyl 4-(4-(pyrrolidine-1-yl)phenyl)thiazole-2-carboxylate

Synthesis according to general procedure A using 2-bromo-4'-(1-pyrrolidinyl)acetophenone (2.8 g, 10.0 mmol) afforded **1m** as a dark yellow solid (0.9 g, 2.9 mmol, 29%). Mp 180.5 °C,  $t_r$  15.15 min purity: 99.3%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1.35 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H), 1.88 – 2.04 (m, 4H), 3.21 – 3.32 (m, 4H), 4.40 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 6.54 – 6.67 (m, 2H), 7.75 – 7.87 (m, 2H), 8.16 (s, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  14.1, 25.0, 47.2, 62.0, 111.6, 116.5, 120.5, 127.3, 147.8, 156.7, 157.5, 159.5.

HRMS ( $m/z$ )  $\text{MH}^+$  calcd for  $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$  303.1162, found 303.1167

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 2 6-(Aminoxy)-N-(trityloxy)hexanamide

The synthesis of the linker **2** was performed after an adapted protocol of Avelar et al.<sup>59</sup>

#### 6-Bromo-N-(trityloxy)hexanamide (I)

To a stirred solution of 6-bromohexanoic acid (7.4 g, 38 mmol, 1.0 eq.) in 100 ml THF, isobutyl chloroformate (IBCF) (5.8 ml, 45 mmol, 1.2 eq.) and *N*-Methylmorpholine (NMM) (5.0 ml, 45 mmol, 1.2 eq.) were added at 10 °C. After stirring for 15 min *O*-tritylhydroxylamine (13 g, 38 mmol, 1.0 eq.) dissolved in 50 ml THF was carefully added and the reaction was left stirring at room temperature overnight. The precipitate was filtered off and the filtrate was evaporated, the crude residue dissolved in ethylacetate and washed three times with 100 mL saturated sodiumbicarbonate solution and once with 100 mL brine. The organic phase was dried over anhydrous sodium sulfate, filtrated and evaporated. The crude product was recrystallized from ethylacetate/n hexanes to yield **I** (14 g, 30 mmol, 80%) as a white solid. Mp 128.0 °C, *t<sub>r</sub>* 17.58 min purity: 99.6%

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.07 (dd, *J* = 15.6, 6.6 Hz, 1H), 1.14 – 1.28 (m, 1H), 1.64 (p, *J* = 6.9 Hz, 1H), 1.79 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 3.41 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 7.33 (s, 8H), 10.18 (s, 1H)  
<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 23.8, 26.9, 31.7, 31.9, 34.9, 91.7, 127.4, 127.5, 128.9, 142.4, 170.1.

HRMS (*m/z*) MNa<sup>+</sup> calcd for C<sub>25</sub>H<sub>26</sub>BrNO<sub>2</sub> 474.1039, found 474.1041

#### 6-((1,3-Dioxoisindolin-2-yl)oxy)-N-(trityloxy)hexanamide (II)

**I** (7.1 g, 16 mmol, 1.0 eq.), *N*-Hydroxyphthalimide (NHPI) (2.6 g, 16 mmol, 1.0 eq.) and triethylamine (4.5 ml, 31 mmol, 2.0 eq.) were suspended in 100 ml acetonitrile and refluxed for 12 h. The solvent was removed, the residue dissolved in ethyl acetate and extracted with saturated sodiumbicarbonate solution until the aqueous phase did not show any left NHPI. The organic phase was dried over anhydrous sodium sulfate, filtrated and evaporated. The crude product was recrystallized using ethylacetate/n hexanes to yield **II** (6.2 g, 12 mmol, 74%) as a white solid. Mp 142.0 °C, HPLC *t<sub>r</sub>* 16.72 min purity: 96.9%

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.11 (d, *J* = 16.0 Hz, 2H), 1.18 – 1.30 (m, 2H), 1.52 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.72 – 1.85 (m, 2H), 4.03 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 7.32 (s, 15H), 7.86 (s, 4H), 10.19 (s, 1H)  
<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 24.4, 27.3, 77.5, 91.7, 123.2, 127.4, 127.5, 128.6, 129.0, 134.7, 142.5, 163.3, 170.2.

HRMS (*m/z*) MH<sup>+</sup> calcd for C<sub>33</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 535.2227, found 535.2237

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### Synthesis of 6-(Aminoxy)-*N*-(trityloxy)hexanamide (**2**)

**II** (2.1 g, 4.0 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in 40 ml dichloromethane, subsequently, hydrazine monohydrate (0.4 ml, 8 mmol, 2.0 eq.) was added and the reaction was left stirring overnight. The precipitate was filtered off and the filtrate was washed three times with 50 mL saturated sodium bicarbonate solution and once with 50 mL brine. The organic phase was dried over anhydrous sodium sulfate, filtrated and evaporated to yield the linker **2** (1.5 g, 3.7 mmol, 94%) as a white wax which was suitable to use without any further purification. HPLC: tr 13.17 min purity: 96.0%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  0.98 (q,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 1.18 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 2H), 1.32 (q,  $J$  = 7.0 Hz, 2H), 1.77 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 2H), 3.40 (t,  $J$  = 6.7 Hz, 2H), 5.84 (s, 2H), 7.32 (s, 15H), 10.16 (s, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  24.7, 25.0, 27.7, 31.9, 74.7, 91.7, 127.4, 127.5, 128.9, 142.5, 170.2.

HRMS ( $m/z$ )  $\text{MH}^+$  calcd for  $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_3$  405.2173, found 405.2172

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### B. General procedure for the preparation of the O-trityl-protected hydroxamates **3 a-m**

The synthesis of the O-trityl-protected hydroxamates was performed after an adapted protocol of Goodreid *et al.*<sup>39</sup>

After solving the corresponding phenylthiazole (**1a-m**) (1.0 eq.) in tetrahydrofuran (15 mL/mmol), an equimolar amount of 1 M sodium hydroxide solution in water was added. The reaction was monitored via TLC (eluent ethyl acetate/*n*-hexane). After complete consumption of the starting material, the solvent was evaporated under reduced pressure and the resulting solid dried in vacuum. The dried product was suspended in *N,N*-dimethylformamide (2.2 mL/mmol). HBTU (1.1 eq.) and DIPEA (1.1 eq.) were added and the resulting suspension was left stirring until a clear solution was formed (usually after one hour). To that solution linker **2** (1.1 eq.) solved in *N,N*-dimethylformamide (2.2 mL/mmol), was added and the reaction was left stirring overnight. The solvent was removed under reduced pressure, the resulting product diluted with 50 mL dichloromethane and washed three times with 50 mL saturated sodium bicarbonate solution, and three times with 50 mL brine. The organic layer was dried over anhydrous sodium sulfate, filtrated and the solvent was removed under reduced pressure. The obtained crude product was purified via flash chromatography, unless otherwise stated, using *n*-hexane/ethyl acetate (0-100%) as eluent to yield the O-trityl-protected hydroxamates **3 a-m**.

#### **3a N-((6-Oxo-6-((trityloxy)amino)hexyl)oxy)-4-phenylthiazole-2-carboxamide**

Synthesis according to general procedure B using **2a** (114 mg, 0.5 mmol) afforded **3a** as a white solid (150 mg, 0.25 mmol, 51%). mp 130.0 °C, *t<sub>r</sub>* 17.46 min purity: 99.6%

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.11 (dd, *J* = 14.8, 7.9 Hz, 2H), 1.25 (dq, *J* = 11.3, 5.4 Hz, 2H), 1.45 – 1.53 (m, 2H), 1.82 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 3.86 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 7.26 – 7.38 (m, 15H), 7.40 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.49 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 8.07 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 8.44 (s, 1H), 10.21 (s, 1H), 12.15 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 25.0, 25.2, 27.8, 32.4, 76.0, 92.2, 119.8, 126.8, 127.9, 128.0, 129.1, 129.3, 129.4, 133.8, 142.9, 155.9, 157.1, 162.0, 170.7.

HRMS (*m/z*) MNa<sup>+</sup> calcd for C<sub>35</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S 614.2084, found 614.2092

#### **3b 4-(2-Methoxyphenyl)-N-((6-oxo-6-((trityloxy)amino)hexyl)oxy)thiazole-2-carboxamide**

Synthesis according to general procedure B using **2b** (0.8 g, 3.0 mmol) afforded **3b** as a white solid (1.7 g, 2.2 mmol, 74%). mp 190.6 °C, *t<sub>r</sub>* 17.66 min purity: 98.8%

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.04 – 1.17 (m, 2H), 1.18 – 1.31 (m, 2H), 1.48 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 1.80 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.84 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 3.94 (s, 3H), 7.03 – 7.13 (m, 1H), 7.17 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.33 (s, 16H), 8.29 – 8.37 (m, 2H), 10.19 (s, 1H), 12.12 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 24.5, 24.7, 27.3, 31.9, 55.6, 75.5, 91.7, 111.7, 120.4, 121.7, 122.6, 127.4, 127.5, 129.0, 129.7, 129.8, 142.4, 151.4, 156.6, 159.8, 170.2.

HRMS (*m/z*) MH<sup>+</sup> calcd for C<sub>36</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S 622.2370, found 622.2373

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### **3c 4-(3-Methoxyphenyl)-N-((6-oxo-6-((trityloxy)amino)hexyl)oxy)thiazole-2-carboxamide**

Synthesis according to general procedure B using **2c** (0.8 g, 3.0 mmol) afforded **3c** as a white solid (1.2 g, 1.9 mmol, 62%). mp 142.8 °C,  $t_r$  17.36 min purity: 99.3%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12.15 (s, 1H), 10.20 (s, 1H), 8.46 (s, 1H), 7.73 – 7.58 (m, 2H), 7.33 (d,  $J$  = 4.6 Hz, 16H), 6.96 (dd,  $J$  = 8.2, 2.6 Hz, 1H), 3.84 (d,  $J$  = 5.5 Hz, 5H), 1.81 (t,  $J$  = 6.9 Hz, 2H), 1.59 – 1.40 (m, 2H), 1.24 (s, 2H), 1.19 – 1.01 (m, 2H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  24.5, 24.7, 27.3, 31.9, 55.2, 75.5, 91.7, 111.9, 114.2, 118.6, 119.6, 127.4, 127.5, 129.0, 129.9, 134.7, 142.4, 155.3, 156.5, 159.7, 161.4, 170.2

HRMS ( $m/z$ )  $\text{MH}^+$  calcd for  $\text{C}_{36}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$  622.2370, found 622.2373

#### **3d 4-(4-Methoxyphenyl)-N-((6-oxo-6-((trityloxy)amino)hexyl)oxy)thiazole-2-carboxamide**

Synthesis according to general procedure B using **2d** (263 mg, 1.0 mmol) afforded **3d** as a white solid (150 mg, 0.24 mmol, 24%). mp 195.4 °C,  $t_r$  17.34 min purity: 98.2%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1.11 (q,  $J$  = 7.7 Hz, 2H), 1.16 – 1.33 (m, 2H), 1.48 (p,  $J$  = 7.0 Hz, 2H), 1.81 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 2H), 3.83 (d,  $J$  = 10.2 Hz, 5H), 6.99 – 7.08 (m, 2H), 7.33 (d,  $J$  = 4.7 Hz, 15H), 7.95 – 8.04 (m, 2H), 8.27 (s, 1H), 10.20 (s, 1H), 12.11 (s, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  24.5, 24.7, 27.3, 31.9, 55.2, 75.5, 91.7, 114.2, 117.3, 126.2, 127.4, 127.5, 127.7, 129.0, 142.5, 155.4, 156.6, 159.6, 161.3, 170.2.

HRMS ( $m/z$ )  $\text{MNa}^+$  calcd for  $\text{C}_{36}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$  644.2189, found 644.2196

#### **3e 4-(2-Fluorophenyl)-N-((6-oxo-6-((trityloxy)amino)hexyl)oxy)thiazole-2-carboxamide**

Synthesis according to general procedure B using **2e** (0.8 g, 3.0 mmol) afforded **3e** as a white solid (1.3 g, 2.1 mmol, 70%). mp 159.2 °C,  $t_r$  17.87 min purity: 98.6%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1.00 – 1.18 (m, 2H), 1.24 (s, 2H), 1.47 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 2H), 1.80 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 2H), 3.85 (t,  $J$  = 6.6 Hz, 2H), 7.33 (s, 16H), 7.46 (dt,  $J$  = 7.9, 5.4 Hz, 1H), 8.21 – 8.34 (m, 2H), 10.19 (s, 1H), 12.18 (s, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  24.5, 24.7, 27.3, 31.9, 75.5, 91.7, 116.2 (d,  $J$  = 22.0 Hz), 121.0 (d,  $J$  = 11.5 Hz), 123.5 (d,  $J$  = 13.5 Hz), 124.8 (d,  $J$  = 3.4 Hz), 127.4, 127.5, 129.0, 130.1, 130.5 (d,  $J$  = 8.8 Hz), 142.5, 148.9, 156.4, 157.9, 161.2, 170.2.

HRMS ( $m/z$ )  $\text{MH}^+$  calcd for  $\text{C}_{35}\text{H}_{32}\text{FN}_3\text{O}_4\text{S}$  610.2170, found 610.2163

#### **3f 4-(3-Fluorophenyl)-N-((6-oxo-6-((trityloxy)amino)hexyl)oxy)thiazole-2-carboxamide**

Synthesis according to general procedure B using **2f** (0.8 g, 3.0 mmol) afforded **3f** as a white solid (0.6 g, 1.0 mmol, 34%). mp 142.8 °C,  $t_r$  17.85 min purity: 99.1%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1.11 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 2H), 1.23 (d,  $J$  = 7.0 Hz, 2H), 1.48 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 2H), 1.80 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 2H), 3.85 (t,  $J$  = 6.6 Hz, 2H), 7.17 – 7.41 (m, 16H), 7.53 (td,  $J$  = 8.2, 6.2 Hz, 1H), 7.88 – 7.97 (m, 2H), 8.55 (s, 1H), 10.19 (s, 1H), 12.16 (s, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  24.7, 27.3, 75.6, 91.8, 113.3, 115.3 (d,  $J$  = 21.5 Hz), 120.6, 122.3, 127.4, 127.5, 129.0, 130.9 (d,  $J$  = 9.1 Hz), 135.7 (d,  $J$  = 8.4 Hz), 142.5, 154.0, 156.4, 161.7.

HRMS ( $m/z$ )  $\text{MH}^+$  calcd for  $\text{C}_{35}\text{H}_{32}\text{FN}_3\text{O}_4\text{S}$  610.2170, found 610.2173

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### **3g 4-(4-Fluorophenyl)-N-((6-oxo-6-((trityloxy)amino)hexyl)oxy)thiazole-2-carboxamide**

Synthesis according to general procedure B using **2g** (253 mg, 1.0 mmol) afforded **3g** as a white solid (313 mg, 0.5 mmol, 51%). mp 163.0 °C,  $t_r$  17.57 min purity: 99.6%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1.11 (d,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 1.24 (s, 2H), 1.40 – 1.55 (m, 2H), 1.79 (d,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 3.84 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2H), 7.24 – 7.41 (m, 17H), 8.06 – 8.15 (m, 2H), 8.41 (s, 1H), 10.18 (s, 1H), 12.13 (s, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  24.5, 24.7, 27.3, 31.9, 75.5, 91.7, 115.7 (d,  $J = 21.7$  Hz), 119.1, 127.4, 127.5, 128.4 (d,  $J = 8.3$  Hz), 128.9, 130.0 (d,  $J = 2.9$  Hz), 142.4, 154.4, 156.5, 160.6, 161.6, 163.9, 170.2.

HRMS ( $m/z$ )  $\text{MH}^+$  calcd for  $\text{C}_{35}\text{H}_{32}\text{FN}_3\text{O}_4\text{S}$  610.2170, found 610.2180

#### **3h N-((6-Oxo-6-((trityloxy)amino)hexyl)oxy)-4-(thiophen-2-yl)thiazole-2-carboxamide**

Synthesis according to general procedure B using **2h** (0.7 g, 3.0 mmol) afforded **3h** as a white solid (1.6 g, 2.6 mmol, 88%). mp 174.6 °C,  $t_r$  17.23 min purity: 98.1%

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1.09 (p,  $J = 7.9$  Hz, 2H), 1.24 (p,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 1.47 (p,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 1.80 (q,  $J = 7.9$  Hz, 2H), 3.84 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2H), 7.15 (dd,  $J = 5.0, 3.6$  Hz, 1H), 7.25 – 7.38 (m, 15H), 7.58 – 7.62 (m, 1H), 7.64 – 7.68 (m, 1H), 8.25 (s, 1H), 10.19 (s, 1H), 12.09 (s, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  24.5, 24.7, 27.3, 31.9, 75.4, 91.7, 118.0, 125.4, 126.8, 127.4, 127.5, 128.1, 129.0, 136.8, 142.5, 150.3, 156.4, 161.8, 170.2

HRMS ( $m/z$ )  $\text{MH}^+$  calcd for  $\text{C}_{33}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}_2$  598.1829, found 598.1832

#### **3i N-((6-Oxo-6-((trityloxy)amino)hexyl)oxy)-4-(thiophen-3-yl)thiazole-2-carboxamide**

Synthesis according to general procedure B using **2i** (665 mg, 2.8 mmol) afforded **3i** after recrystallization in n-hexane/ ethyl acetate as a white solid (1.5 g, 2.6 mmol, 92%). mp 214.7 °C,  $t_r$  16.91 min purity: 96.9%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1.10 (d,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 1.23 (d,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 1.46 (d,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 1.79 (d,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 3.84 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2H), 7.33 (d,  $J = 4.3$  Hz, 15H), 7.62 – 7.73 (m, 2H), 8.01 (dd,  $J = 2.8, 1.5$  Hz, 1H), 8.25 (s, 1H), 10.19 (s, 1H), 12.09 (s, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  24.9, 25.1, 27.7, 32.3, 75.9, 92.2, 119.0, 123.3, 126.7, 127.6, 127.8, 127.9, 129.3, 136.1, 142.9, 152.1, 157.0, 161.8, 170.6

HRMS ( $m/z$ )  $\text{MH}^+$  calcd for  $\text{C}_{33}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}_2$  598.1829, found 598.1836

#### **3j N-((6-Oxo-6-((trityloxy)amino)hexyl)oxy)-4-(p-tolyl)thiazole-2-carboxamide**

Synthesis according to general procedure B using **2j** (742 mg, 3.0 mmol) afforded **3j** as a white solid (313 mg, 0.5 mmol, 17%). mp 163.2 °C,  $t_r$  17.93 min purity: 95.1%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1.10 (d,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 1.23 (s, 2H), 1.46 (d,  $J = 7.7$  Hz, 3H), 1.79 (d,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 2.35 (s, 3H), 3.84 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2H), 7.24 – 7.41 (m, 17H), 7.95 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H), 8.36 (s, 1H), 10.19 (s, 1H), 12.11 (s, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  20.9, 24.5, 24.7, 27.3, 31.9, 75.5, 91.7, 118.5, 126.2, 127.4, 127.5, 129.0, 129.4, 130.7, 138.0, 142.5, 156.6, 161.4, 170.2.

HRMS ( $m/z$ )  $\text{MNa}^+$  calcd for  $\text{C}_{36}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$  628.2240, found 628.2244



### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### **3k N-((6-Oxo-6-((trityloxy)amino)hexyl)oxy)-4-(4-(trifluoromethyl)phenyl)thiazole-2-carboxamide**

Synthesis according to general procedure B using **2k** (904 mg, 3.0 mmol) afforded **3k** as a white solid (499 mg, 0.8 mmol, 25%). mp 182.5 °C,  $t_r$  19.44 min purity: 99.8%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1.11 (q,  $J = 7.7$  Hz, 2H), 1.25 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 1.48 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 1.81 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 3.85 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2H), 7.33 (s, 15H), 7.86 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 8.29 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H), 8.66 (s, 1H), 10.19 (s, 1H), 12.22 (s, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  24.4, 24.6, 27.2, 31.7, 75.4, 91.6, 121.6, 125.7, 126.8, 127.3, 127.4, 128.8, 137.0, 142.3, 153.6, 156.3, 162.0, 170.1.

HRMS ( $m/z$ )  $\text{MNa}^+$  calcd for  $\text{C}_{36}\text{H}_{32}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$  682.1958, found 682.1966

#### **3l 4-(Benzofuran-2-yl)-N-((6-oxo-6-((trityloxy)amino)hexyl)oxy)thiazole-2-carboxamide**

Synthesis according to general procedure B using **2l** (547 mg, 2.0 mmol) afforded **3l** after recrystallization in dichloromethane/ ethyl acetate as a light brown solid (408 mg, 0.7 mmol, 32%). mp 200.7 °C,  $t_r$  18.46 min purity: 97.9%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1.03 – 1.19 (m, 2H), 1.14 – 1.34 (m, 3H), 1.42 – 1.56 (m, 2H), 1.74 – 1.87 (m, 2H), 3.85 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2H), 7.20 – 7.43 (m, 18H), 7.63 – 7.69 (m, 1H), 7.74 (dd,  $J = 7.3, 1.4$  Hz, 1H), 8.42 (s, 1H), 10.19 (s, 1H), 12.24 (s, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  24.5, 24.7, 27.3, 31.9, 75.5, 91.7, 104.0, 111.2, 121.2, 121.8, 123.5, 125.3, 127.4, 127.5, 128.1, 129.0, 142.5, 146.5, 150.5, 154.3, 156.3, 163.1, 170.2.

HRMS ( $m/z$ )  $\text{MH}^+$  calcd for  $\text{C}_{37}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$  532.2214, found 632.2211

#### **3m N-((6-Oxo-6-((trityloxy)amino)hexyl)oxy)-4-(4-(pyrrolidin-1-yl)phenyl)thiazole-2-carboxamide**

Synthesis according to general procedure B using **2m** (907 mg, 3.0 mmol) afforded **3m**, after flashchromatography with dichloromethane/30%methanol in dichloromethane as a eluent, as a yellow solid (487 mg, 0.7 mmol, 25%). mp 192.1 °C,  $t_r$  20.03 min purity: 95.3%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1.05 – 1.17 (m, 2H), 1.18 – 1.30 (m, 2H), 1.43 – 1.53 (m, 2H), 1.79 (d,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 1.92 – 2.02 (m, 4H), 3.27 (q,  $J = 5.1$  Hz, 4H), 3.84 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2H), 6.56 – 6.64 (m, 2H), 7.31 (q,  $J = 5.1$  Hz, 15H), 7.81 – 7.91 (m, 2H), 8.05 (s, 1H), 10.20 (s, 1H), 12.05 (s, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  24.5, 24.7, 25.0, 26.3, 27.3, 31.9, 47.3, 75.5, 91.7, 111.5, 114.7, 120.7, 127.4, 127.5, 129.0, 142.5, 147.8, 156.6, 156.8, 170.2.

HRMS ( $m/z$ )  $\text{MH}^+$  calcd for  $\text{C}_{39}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$  661.2843, found 661.2838



### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### C. General procedure for the preparation of the hydroxamates **4a - 4m**:

The *O*-trityl-protected hydroxamate (**4a-m**) was dissolved in DCM (30 mL/mmol). Et<sub>3</sub>SiH (10 eq.) and TFA (10 eq.) were added successively and the reaction was left stirring for 30 min at room temperature. After that time the reaction mixture was purified via flash chromatography using dichloromethane and 30% methanol in dichloromethane as eluent to yield the hydroxamic acids **4 a-m**.

#### **4a N-((6-(Hydroxyamino)-6-oxohexyl)oxy)-4-phenylthiazole-2-carboxamide**

Synthesis according to general procedure C using **3a** (296 mg, 0.5 mmol) afforded **4a** as a colourless wax (240 mg, 0.41 mmol, 81%). t<sub>r</sub> 9.32 min purity: 95.1%

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.38 (qd, *J* = 9.0, 6.2 Hz, 2H), 1.55 (p, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.62 (p, *J* = 6.8 Hz, 2H), 1.98 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 3.94 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 7.40 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.49 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 8.07 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 8.43 (s, 1H), 8.68 (s, 1H), 10.37 (s, 1H), 12.18 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 25.3, 25.5, 27.8, 32.7, 76.1, 119.8, 126.8, 129.1, 129.3, 133.8, 155.9, 157.1, 162.0, 169.5.

HRMS (*m/z*) MH<sup>+</sup> calcd for C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S 349.1096, found 350.1170

#### **4b N-((6-(Hydroxyamino)-6-oxohexyl)oxy)-4-(2-methoxyphenyl)thiazole-2-carboxamide**

Synthesis according to general procedure C using **3b** (622 mg, 1.0 mmol) afforded **4b** as a white solid (284 mg, 0.75 mmol, 75%). mp 137.4 °C, t<sub>r</sub> 9.84 min, purity: 99.6 %

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.26 – 1.47 (m, 2H), 1.58 (dp, *J* = 22.2, 7.0 Hz, 4H), 1.97 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 3.93 (d, *J* = 4.0 Hz, 5H), 7.08 (td, *J* = 7.5, 1.1 Hz, 1H), 7.17 (dd, *J* = 8.4, 1.1 Hz, 1H), 7.39 (ddd, *J* = 8.4, 7.3, 1.8 Hz, 1H), 8.31 (dd, *J* = 7.8, 1.8 Hz, 1H), 8.35 (s, 1H), 8.67 (s, 1H), 10.35 (s, 1H), 12.14 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 24.9, 25.0, 27.4, 32.2, 55.6, 75.6, 111.8, 120.5, 121.7, 122.6, 129.8, 129.8, 151.4, 156.6, 156.7, 159.8, 169.0.

HRMS (*m/z*) MH<sup>+</sup> calcd for C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S 380.1275, found 380.1272

#### **4c N-((6-(Hydroxyamino)-6-oxohexyl)oxy)-4-(3-methoxyphenyl)thiazole-2-carboxamide**

Synthesis according to general procedure C using **3c** (622 mg, 1.0 mmol) afforded **4c** as a yellow wax (253 mg, 0.67 mmol, 67%). t<sub>r</sub> 9.53 min purity 99.9%

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.38 (ddd, *J* = 12.4, 6.0, 3.2 Hz, 2H), 1.58 (dp, *J* = 22.5, 7.0 Hz, 4H), 1.97 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.93 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 6.96 (ddd, *J* = 8.3, 2.6, 1.0 Hz, 1H), 7.39 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.57 – 7.72 (m, 2H), 8.46 (s, 1H), 8.67 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 10.35 (s, 1H), 12.17 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 24.9, 25.0, 27.4, 32.2, 55.3, 75.6, 111.9, 114.2, 118.6, 119.6, 129.9, 134.7, 155.3, 156.5, 159.7, 161.3, 169.0.

HRMS (*m/z*) MH<sup>+</sup> calcd for C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S 380.1275, found 380.1276

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### **4d N-((6-(Hydroxyamino)-6-oxohexyl)oxy)-4-(4-methoxyphenyl)thiazole-2-carboxamide**

Synthesis according to general procedure C using **3d** (1.8 g, 3.0 mmol) afforded **4d** as a white solid (603 mg, 1.59 mmol, 53%). mp 151.1 °C,  $t_r$  9.46 min purity 98.1%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1.38 (q,  $J = 8.1$  Hz, 2H), 1.58 (dp,  $J = 22.1, 7.0$  Hz, 4H), 1.97 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.92 (t,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 6.92 – 7.18 (m, 2H), 7.85 – 8.13 (m, 2H), 8.27 (s, 1H), 8.67 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H), 10.35 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H), 12.13 (s, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  24.9, 25.0, 27.4, 32.2, 55.2, 75.6, 114.2, 117.3, 126.2, 127.7, 155.4, 156.6, 159.6, 161.3, 169.0.

HRMS ( $m/z$ )  $\text{MH}^+$  calcd for  $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$  380.1275, found 380.1277

#### **4e 4-(2-Fluorophenyl)-N-((6-(hydroxyamino)-6-oxohexyl)oxy)thiazole-2-carboxamide**

Synthesis according to general procedure C using **3e** (610 mg, 1.0 mmol) afforded **4e** as a orange wax (221 mg, 0.6 mmol, 60%).  $t_r$  9.93 min purity 99.2%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1.28 – 1.46 (m, 2H), 1.58 (dp,  $J = 22.5, 7.0$  Hz, 4H), 1.97 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 3.93 (t,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 7.28 – 7.41 (m, 2H), 7.41 – 7.52 (m, 1H), 8.21 – 8.36 (m, 2H), 8.67 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H), 10.35 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H), 12.21 (s, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  24.7, 24.9, 27.3, 32.1, 75.5, 116.1 (d,  $J = 22.0$  Hz), 121.0 (d,  $J = 11.5$  Hz), 123.2 (d,  $J = 13.4$  Hz), 124.7 (d,  $J = 3.4$  Hz), 130.0 (d,  $J = 2.8$  Hz), 130.3 (d,  $J = 8.7$  Hz), 148.9, 156.4, 158.4, 160.4, 161.0, 168.9.

HRMS ( $m/z$ )  $\text{MH}^+$  calcd for  $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{FN}_3\text{O}_4\text{S}$  368.1075, found 368.1067

#### **4f 4-(3-Fluorophenyl)-N-((6-(hydroxyamino)-6-oxohexyl)oxy)thiazole-2-carboxamide**

Synthesis according to general procedure C using **3f** (505 mg, 0.8 mmol) afforded **4f** as a colourless wax (258 mg, 0.7 mmol, 85%).  $t_r$  9.89 min purity 95.9%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1.30 – 1.48 (m, 2H), 1.46 – 1.70 (m, 4H), 1.97 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 3.93 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2H), 7.23 (td,  $J = 8.6, 2.5$  Hz, 1H), 7.53 (td,  $J = 8.1, 6.1$  Hz, 1H), 7.87 – 7.99 (m, 2H), 8.54 (s, 1H), 8.67 (s, 1H), 10.36 (s, 1H), 12.18 (s, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  24.9, 25.0, 27.4, 32.2, 75.6, 113.1 (d,  $J = 23.6$  Hz), 115.3 (d,  $J = 20.7$  Hz), 120.5, 122.3, 130.9 (d,  $J = 8.5$  Hz), 135.8, 154.0, 156.4, 161.0, 161.7, 164.3, 169.0.

HRMS ( $m/z$ )  $\text{MH}^+$  calcd for  $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{FN}_3\text{O}_4\text{S}$  368.1075, found 368.1081

#### **4g 4-(4-Fluorophenyl)-N-((6-(hydroxyamino)-6-oxohexyl)oxy)thiazole-2-carboxamide**

Synthesis according to general procedure C using **3g** (260 mg, 0.4 mmol) afforded **4g** as a white solid (99 mg, 0.3 mmol, 63%). mp 170.7 °C,  $t_r$  9.65 min purity 98.5%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1.38 (q,  $J = 7.8$  Hz, 2H), 1.45 – 1.67 (m, 4H), 1.97 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 3.92 (t,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 7.26 – 7.39 (m, 2H), 8.03 – 8.16 (m, 2H), 8.41 (s, 1H), 8.68 (s, 1H), 10.36 (s, 1H), 12.17 (s, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  24.9, 25.0, 27.4, 32.2, 75.6, 115.7 (d,  $J = 21.6$  Hz), 119.1, 128.5 (d,  $J = 8.3$  Hz), 130.0 (d,  $J = 3.0$  Hz), 154.4, 156.5, 160.6, 161.6, 163.9, 169.0.

HRMS ( $m/z$ )  $\text{MH}^+$  calcd for  $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{FN}_3\text{O}_4\text{S}$  368.1075, found 368.1074

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 4h *N*-((6-(Hydroxyamino)-6-oxohexyl)oxy)-4-(thiophen-2-yl)thiazole-2-carboxamide

Synthesis according to general procedure C using **3h** (598 mg, 1.0 mmol) afforded **4h** as a white solid (226 mg, 0.6 mmol, 63%). mp 123.4 °C, *t<sub>r</sub>* 8.87 min purity 98.8%

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.28 – 1.47 (m, 2H), 1.44 – 1.75 (m, 4H), 1.97 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 3.92 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 7.15 (dd, *J* = 5.1, 3.6 Hz, 1H), 7.54 – 7.71 (m, 2H), 8.25 (s, 1H), 8.67 (s, 1H), 10.35 (s, 1H), 12.12 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 24.9, 25.0, 27.4, 32.2, 75.5, 118.0, 125.4, 126.8, 128.1, 136.8, 150.3, 156.4, 161.8, 169.0.

HRMS (*m/z*) MH<sup>+</sup> calcd for C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub> 356.0733, found 356.0735

#### 4i *N*-((6-(Hydroxyamino)-6-oxohexyl)oxy)-4-(thiophen-3-yl)thiazole-2-carboxamide

Synthesis according to general procedure C using **3i** (598 mg, 1.0 mmol) afforded **4i** as a white solid (198 mg, 0.6 mmol, 56%). mp 140.4 °C, *t<sub>r</sub>* 8.79 min purity 98.6%

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.38 (tt, *J* = 11.3, 6.3 Hz, 2H), 1.58 (dp, *J* = 22.1, 7.0 Hz, 4H), 1.97 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 3.92 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 7.42 – 7.81 (m, 2H), 8.01 (dd, *J* = 2.7, 1.6 Hz, 1H), 8.25 (s, 1H), 8.67 (s, 1H), 10.35 (s, 1H), 12.12 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 24.8, 25.0, 27.3, 32.1, 75.5, 118.7, 122.9, 126.3, 127.3, 135.7, 151.7, 156.5, 161.4, 169.0.

HRMS (*m/z*) MH<sup>+</sup> calcd for C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub> 356.0733, found 356.0734

#### 4j *N*-((6-(Hydroxyamino)-6-oxohexyl)oxy)-4-(*p*-tolyl)thiazole-2-carboxamide

Synthesis according to general procedure C using **3j** (606 mg, 1.0 mmol) afforded **4j** as a white solid (212 mg, 0.6 mmol, 58%). mp 134.3 °C, *t<sub>r</sub>* 10.20 min purity 97.8%

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.37 (tt, *J* = 9.5, 6.2 Hz, 2H), 1.54 (p, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.61 (p, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.97 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.35 (s, 3H), 3.92 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 7.22 – 7.34 (m, 2H), 7.90 – 8.00 (m, 2H), 8.35 (s, 1H), 8.67 (s, 1H), 10.35 (s, 1H), 12.14 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 20.9, 25.0, 25.0 (d, *J* = 9.3 Hz), 27.4, 32.2, 75.6, 118.5, 126.2, 129.4, 130.7, 138.0, 155.6, 156.6, 161.4, 169.0.

HRMS (*m/z*) MH<sup>+</sup> calcd for C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S 364.1326, found 364.1330

#### 4k *N*-((6-(Hydroxyamino)-6-oxohexyl)oxy)-4-(4-(trifluoromethyl)phenyl)thiazole-2-carboxamide

Synthesis according to general procedure C using **3k** (382 mg, 0.6 mmol) afforded **4k** as a light brown solid (134 mg, 0.3 mmol, 56%). mp 127.2 °C, *t<sub>r</sub>* 11.278 min purity 98.5%

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.37 (qd, *J* = 8.7, 5.5 Hz, 2H), 1.48 – 1.68 (m, 4H), 1.97 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 3.93 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 7.86 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 8.23 – 8.33 (m, 2H), 8.66 (s, 2H), 10.36 (s, 1H), 12.25 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 24.9, 25.0, 27.4, 32.2, 75.6, 121.7, 122.4, 125.8 (d, *J* = 3.2 Hz), 126.0, 126.9, 127.9 – 129.4 (m), 137.1, 153.7, 156.4, 162.1, 169.0.

HRMS (*m/z*) MH<sup>+</sup> calcd for C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S 418.1043, found 418.1041

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### **4l 4-(Benzofuran-2-yl)-N-((6-(hydroxyamino)-6-oxohexyl)oxy)thiazole-2-carboxamide**

Synthesis according to general procedure C using **3l** (316 mg, 0.5 mmol) afforded as a off-white solid (112 mg, 0.3 mmol, 58%). yield 58%, mp 150.4 °C,  $t_r$  10.70 min purity 99.3%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1.18 – 1.45 (m, 2H), 1.58 (dp,  $J$  = 22.2, 7.0 Hz, 4H), 1.97 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 2H), 3.93 (t,  $J$  = 6.4 Hz, 2H), 7.25 – 7.43 (m, 3H), 7.66 (dq,  $J$  = 8.2, 0.9 Hz, 1H), 7.70 – 7.78 (m, 1H), 8.42 (s, 1H), 8.67 (d,  $J$  = 1.8 Hz, 1H), 10.35 (d,  $J$  = 1.8 Hz, 1H), 12.27 (s, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  24.9, 25.0, 27.4, 32.2, 75.6, 104.1, 111.2, 121.3, 121.8, 123.5, 125.3, 128.1, 146.5, 150.5, 154.3, 156.3, 163.1, 169.0.

HRMS ( $m/z$ )  $\text{MH}^+$  calcd for  $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$  390.1118, found 390.1117

#### **4m N-((6-(Hydroxyamino)-6-oxohexyl)oxy)-4-(4-(pyrrolidin-1-yl)phenyl)thiazole-2-carboxamide**

Synthesis according to general procedure C using **3m** (500 mg, 0.8 mmol) afforded as **4m** a yellow solid (93 mg, 0.2 mmol, 29%). mp 136.2 °C,  $t_r$  9.29 min purity 98.9%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1.28 – 1.47 (m, 2H), 1.58 (dp,  $J$  = 21.9, 6.9 Hz, 4H), 1.86 – 2.07 (m, 6H), 3.23 – 3.34 (m, 4H), 3.92 (t,  $J$  = 6.4 Hz, 2H), 6.48 – 6.81 (m, 2H), 7.75 – 8.01 (m, 2H), 8.05 (s, 1H), 8.67 (s, 1H), 10.35 (s, 1H), 12.07 (s, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  24.9, 25.0, 25.0, 27.4, 32.2, 47.3, 48.6, 75.5, 111.5, 114.7, 120.7, 127.4, 147.8, 156.6, 156.8, 160.8, 169.0.

HRMS ( $m/z$ )  $\text{MH}^+$  calcd for  $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$  419.1748, found 419.1746

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 4.2 Biological evaluation

**Enzyme assay:** All human recombinant enzymes were purchased from Reaction Biology Corp. (Malvern, PA, USA). The HDAC activity assay of HDAC2 (catalog nr. KDA-21-277), 4 (catalog nr. KDA-21-279), 6 (catalog nr. KDA-21-213) and 8 (catalog nr. KDA-21-481) was performed in 96-well plates (Corning, Germany). Briefly, 20 ng of HDAC2 and HDAC8, 17.5 ng of HDAC6 and 2 ng of HDAC4 per reaction were used. Recombinant enzymes were diluted in assay buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, and 1 mg/mL BSA). 80 µl of this dilution was incubated with 10 µl of different concentrations of inhibitors in assay buffer. After a 5 min incubation step, the reaction was started with 10 µl of 300 µM (HDAC2), 150 µM (HDAC6) Boc-Lys(Ac)-AMC (Bachem, Germany) or 100 µM (HDAC4), 60 µM (HDAC8) Boc-Lys(TFA)-AMC (Bachem, Germany). The reaction was stopped after 90 min by adding 100 µl stop solution (16 mg/mL trypsin, 2 µM panobinostat for HDAC2, HDAC6 and HDAC8, 2 µM CHDI0039 (kindly provided by the CHDI Foundation Inc., New York, USA) for HDAC4 in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, and 100 mM NaCl. 15 min after the addition of the stop solution the fluorescence intensity was measured at an excitation of 355 nm and emission of 460 nm in a NOVOstar microplate reader (BMG Lab-Tech, Offenburg, Germany).

**Cell culture:** All leukemic cell lines were cultured at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> in RPMI 1640 GlutaMax medium supplemented with 10-20% fetal bovine serum (FBS), depending on the recommendation of the German collection of microorganisms and cell culture (DSMZ). Patient derived xenograft (PDX) samples were generated by (intravenously) injecting leukemia cells, isolated from patients into immune deficient *NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ* or NSG mice aged 8-12 weeks. The transplanted leukemia cells were isolated from the spleen or the bone marrow of the mice. If the proportion of human cells was below 90%, a mouse cell depletion kit (Miltenyi Biotec) was used to enrich the human cells. Subsequently, leukemia cells (≥ 90% human) derived from the bone marrow and spleen of the mice were utilized to conduct a short-term ex vivo drug sensitivity assay. PDX cells were short-term cultured in RPMI 1640 GlutaMax with 15% FBS, 0.1mM 2- Mercaptoethanol, 1mM Sodium Pyruvate, and Gentamicin 0.5 µg/mL. All animal experiments were conducted in accordance with the regulatory guidelines of the official committee at LANUV (Akt. 81-02.04.2017.A441), under the authorization of the animal research institute (ZETT) at the Heinrich Heine University Düsseldorf. Patient samples were received after obtaining informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki. The experiments were approved by the ethics committee of the medical faculty of the Heinrich Heine University (Study Nr.: 2019-566).

### 3. Ergebnisse und Diskussion

**High throughput drug screening:** All compounds were used in 10 mM stock solutions and dissolved in DMSO.<sup>40</sup> Drug screening plates were pre-printed with the Tecan D300e in 384 or 1536 well plates. To avoid plate effects, all plates were randomized and all wells were further on normalized to the highest DMSO volume on the plate. Plates were stored at -80°C and thawed 1 hour prior to the experiment. Cells concentration and viability was determined via the Vi-CELL BLU cell counter. Only if cells exceeded 90% viability they were deemed acceptable for seeding. Cell lines were seeded at a concentration of  $0.04 \times 10^6$  cells/mL in 384 well plates or at  $0.5 \times 10^6$  cells/mL in 1536 well plates, while PDX samples were seeded in 1536 well plates at  $1.5 \times 10^6$  cells/mL via the Multidrop reagent dispenser. The seeded plates were incubated for 72 h and subsequently evaluated via CellTiter-Glo. A Tecan Spark microplate reader was used to measure the emerging luminescence.

Initial  $IC_{50}$  determinations of all experimental compounds was done in 11 concentrations (from 0.005 to 25  $\mu$ M) three times with the three cell lines K562 (CML), HL60 (AML), HPBALL (T-ALL). The viability was determined in relation to the DMSO controls and the  $IC_{50}$  was calculated via Prism (log(inhibitor) vs. normalized response – Variable slope). The screening with commercially available inhibitors was done in 6 concentration from 0.005 - 25  $\mu$ M. Viability and inhibition curves were determined in the same way. The DSS was calculated via the R package *DSS*. The dDSS was calculated by subtracting the DSS value of five healthy controls from the leukemia value. Significance was calculated by comparing all dDSS values of two drugs in a one-way Anova test. Heatmaps were generated via *the complex heatmap* package.

**Synergy drug screening:** Drug synergy was investigated by a matrix screening approach. Plates were designed by combining each concentration of drug A with each concentration of drug B. All drugs were printed in 8 concentrations on 384 well plates. (**4d**: 0.025 -0.75  $\mu$ M, **4m**: 0.005 – 0.35  $\mu$ M, decitabine & clofarabine 0.005 – 5  $\mu$ M). HL60 were seeded with a concentration of  $0.1 \times 10^6$  cells/ml and afterwards processed by the previously described protocol.<sup>26</sup> After the viability calculation, ZIP scores were generated through the 'Synergyfinder' package.

**Immunoblotting:** Leukemia cells were treated with the indicated concentrations for 24 h. Afterwards the cells were collected and washed three times with cold PBS and in the end snap frozen with liquid nitrogen. Cells were lysed in Pierce RIPA buffer (with cComplete Protease Inhibitor cocktail, PhosSTOP & Dithiothreitol) and DNA was removed via high speed centrifugation. The protein concentration was determined via BCA assay. Protein lysates were diluted via 5x laemmli buffer and denatured at 95 °C for 5 minutes. Into every pocket of a 10% acryl amid gel, a volume with 20  $\mu$ g of protein was added. SDS-Page were run for 90 minutes at 100 mV in 1x running buffer. The proteins were transferred with 1x transfer buffer with 10% methanol onto nitrocellulose membranes at 100 mV for 90 minutes.



### 3. Ergebnisse und Diskussion

The membranes were blocked with 3% bovine serum albumin (BSA) in Tris buffered saline with Tween (TBST) for 1 hour. The membranes were incubated overnight at 4 °C with primary antibodies, including anti-acetyl- $\alpha$ -tubulin (catalog no. 5335), anti-acetyl-histone H3 (catalog no. 9677S), anti-cleaved PARP (catalog no. 9541) and anti-GAPDH (catalog no. 97166), following manufacturer's guidelines (Cell Signaling Technology).

**Caspase 3/7 & trypan blue assay:** At a concentration of 0.25  $\mu$ M, either **4d** or **4m** was introduced to wells containing HL60 leukemia cells. Additionally, compounds were co-administered with a caspase inhibitor Q-VD at a concentration of 10  $\mu$ M in separate wells. Control conditions encompassed wells treated solely with DMSO or exclusively with Q-VD. Each experimental condition was executed in quadruplicate. Following a 24 or 48 h incubation period, the cells underwent treatment with a Caspase 3/7 Kit (Promega), and luminescence was quantified using the Tecan Spark microplate reader. In parallel, the identical cell solutions was dispensed into 24-well plates, and cell enumeration was conducted employing the Vi-CELL BLU (Beckman Coulter) cell counter after 24 or 48 hours.

**Cell cycle analysis:** HL60 cells were plated in a concentration of  $0.1 \times 10^6$  cells/ml in 12 well plates with a volume of 1.5 ml. Both **4d** and **4m** were added to the cultures at 0.15 or 0.20  $\mu$ M. After 24 h of incubation, the cells were centrifuged and incubated with 0.2 ml Nicoletti assay buffer (0.1% tri-sodium citrate dehydrate, 0.1% Triton X-100, 50  $\mu$ g/ml propidium iodide, 0.5 mg/ml RNase A). The solution was incubated 15 minutes at 4°C and afterwards measured via CytoFLEX (Beckman Coulter).

#### 4.3. In vitro pharmacokinetics

**LC-MS/MS method:** For the determination of in vitro pharmacokinetics of **4d** and **4m**, a tailored liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) assay was developed. Chromatographic separation was performed using a Luna Pentafluorophenyl (PFP (2)) column (100.0 x 2.0 mm; 3  $\mu$ m; Phenomenex Ltd, Aschaffenburg, Germany). For the mobile phase, 0.1% FA in water (v/v) and 0.1% FA in methanol (v/v, B) were applied. Gradient separation at a flow rate of 0.4 mL/min was used, involving the following steps: 0.0–1.5 min: 5% B, 1.5–2.5 min: 5%–20% B, 2.5–4.5 min: 20%–95% B, 4.5.–7.5 min: 95% B, 7.5–8.0 min: 95%–5% B. The injection volume was set to 20  $\mu$ L, and the column oven was maintained at 60°C. A TSQ Quantum Ultra triple quadrupole mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts) with an electrospray ionisation (ESI) interface was used for the mass spectrometric detection. A spray voltage of 4000 V and a capillary temperature of 300 °C were applied. The vaporizer temperature was maintained at 380 °C, the sheath gas at 50 a.u., aux gas pressure at 5 a.u. and ion sweep gas at 1.0 a.u.. Argon was utilised as the collision gas with a pressure of 1.6 mTorr. **4j** was used as internal standard for **4d** and **4m**, while deuterated standards were used for the control compounds in the respective in vitro

### 3. Ergebnisse und Diskussion

pharmacokinetic assays. The following multiple reaction monitoring (MRM) transitions with their collision energy (CE) and tube lens voltage (TL) were monitored in the positive ion mode: 4d: 380.23 → 175.0 mass-to-charge ratio (m/z) (CE: 40 V, TL: 96 V), 4m: 419.19 → 229.1 m/z (CE: 26 V, TL: 100 V), 4j: 364.15 → 217.1 m/z (CE: 17 V, TL: 158 V), Carvedilol: 407.04 → 224.07 m/z (CE: 22 V, TL: 150 V), Carvedilol d5 CE: 412.28 → 229.1 m/z (CE: 23 V, TL: 116 V), Propranolol 260.0 → 155.0 m/z (CE: 24 V, TL: 86V), Propranolol d7 267.18 → 116.12 m/z (CE: 20 V, TL: 88 V), Itraconazol 705.4 → 392.18 m/z (CE: 34 V, TL: 154 V), Itraconazol d4 709.6 → 396.23 m/z (CE: 36 V, TL: 165 V).

**Distribution coefficient (log D):** The logD determination was based on the shake flask method optimized for mass spectrometric analysis.<sup>60</sup> The distribution of test compounds was investigated between buffer pre-saturated octanol and octanol pre-saturated 0.1 M potassium phosphate buffer pH 7.4. A 10 mM solution of the test compounds in DMSO and the control carvedilol were diluted 1:100 in buffer. A 200 µL aliquot was directly taken and 1:1 diluted in acetonitrile (v/v, standard). To the residual buffer volume octanol was added in different v/v ratios: 1:0.1, 1:0.01, 3:0.01 and 5:0.01. Samples were shaken for one hour to reach equilibrium before the two phases were separated by centrifugation at 13.200 x g for 10 min. Determinations were performed in triplicate for each compound from the aqueous phase. For the calculation of logD, the buffer/octanol v/v ratio was used in which the amount of drug was most similar in order to obtain the most precise measurement. The logD was then calculated by the following Equation 1:

$$\log D = \log \left( \left( \frac{A_{St}}{A_w} - 1 \right) \frac{V_w}{V_o} \right)$$

**Equation 1. Calculation of logD.** A<sub>St</sub>: area ratio standard, A<sub>w</sub>: area ratio after partition, V<sub>w</sub>: volume aqueous phase, V<sub>o</sub>: volume octanol

**Plasma stability:** *Ex vivo* plasma stability was studied in fresh human plasma at 37 °C. Plasma was prewarmed to 37 °C and reactions were started by spiking 4d and 4m to the plasma to a final concentration of 1 µM, 50 nM and 2.5 nM. Sample aliquots of 100 µL were taken at 0, 30, 60, 120, 240, 360 minutes and after 24 hours. Each aliquot was mixed with 300 µL ice-cold acetonitrile containing the internal standards, and directly vortexed followed by 15 min shaking at 800 rpm at room temperature. Then, samples were centrifuged for 5 min at 13.200 xg. 300 µL of the supernatant was evaporated to dryness under heated nitrogen stream at 50 °C. Samples were stored at 4 °C, until completion of the assay and reconstituted in 100 µL 50/50 acetonitrile/water (v/v). This customized sample preparation protocol was characterized by good recoveries of 104.7 ± 6.7% for 4d and 104.5 ± 6.6% for 4m and low matrix effects of less than 11% for both compounds. The assay was conducted in triplicate. As a control, the compounds were incubated in 4% bovine serum albumin to identify potential enzyme-related degradation in plasma. In vitro plasma half-life (t<sub>1/2</sub>) was calculated by t<sub>1/2</sub>=ln2/k<sub>e</sub>, where k<sub>e</sub> is



### 3. Ergebnisse und Diskussion

the slope in the linear fit of the natural logarithm of the fraction remaining of the parent compound vs. incubation time.

**Blood-to-plasma ratio:** The blood-to-plasma ratio ( $K_{B/P}$ ) was determined to investigate the drug binding to erythrocytes. Therefore, freshly drawn whole blood was spiked to a final concentration of 1  $\mu$ M, 50 nM and 2.5 nM, cautiously shaken to avoid lysis and incubated at 37 °C for 30 min. Spiked whole blood was centrifuged at room temperature for 10 min at 2,000 x g and the obtained plasma was used for analysis. Additionally, plasma was directly spiked to a final concentration of 1  $\mu$ M, 50 nM and 2.5 nM and also incubated for 30 min at 37 °C (reference plasma; not considering distribution into the red blood fraction). 100  $\mu$ L of reference plasma and of plasma separated from spiked whole blood were precipitated with 300  $\mu$ L of ice-cold acetonitrile containing 3.33 ng/mL of the internal standards. Following immediate vortexing, samples were shaken for 15 minutes at 800 rpm at room temperature. Subsequently, samples were centrifuged for 5 min at 13,200 x g and 300  $\mu$ L of the supernatant was evaporated to dryness under a heated nitrogen stream at 50 °C. The residue was reconstituted in 100  $\mu$ L 50/50 acetonitrile/water (v/v). Whole blood and plasma of two donors (male and female) in three independent replicates were used for the analysis. Carvedilol was used as a control compound with known  $K_{B/P}$ . The hematocrit was determined volumetrically. The blood-to-plasma-ratios were calculated according to Equation 2 and Equation 3:<sup>61,62</sup>

$$K_{e/p} = \frac{1}{H} \times \left( \frac{Area\ ratio_{pRef}}{Area\ ratio_p} - 1 \right) + 1$$

**Equation 2. Calculation of Red blood cell partitioning coefficient.** H: hematocrit;  $K_{e/p}$ : red blood cell partition coefficient, pref: reference plasma; p: plasma separated from spiked whole blood

$$K_{b/p} = (K_{e/p} \times H) + (1 - H)$$

**Equation 3: Calculation of Blood-to-plasma ratio ( $K_{b/p}$ ).** H: hematocrit;  $K_{e/p}$ : red blood cell partition coefficient

**Plasma protein binding:** Plasma protein binding was determined using equilibrium dialysis. A 20% ethanol regenerated dialysis membrane with a molecular weight cutoff of 6 kDa (Reichelt Chemietechnik GmbH + Co, Heidelberg, Germany) was placed into a 96-well dialysis apparatus to obtain two chambers. 150  $\mu$ L of plasma spiked to a final concentration of 1  $\mu$ M, 50 nM and 2.5 nM of the test compounds and 150  $\mu$ L of 0.9% saline were added to the respective sides of the 96-well dialysis plate, wells were sealed and the plate was placed into an incubator at 37 °C to dialyze for 24 h. Following 24 h of incubation, 100  $\mu$ L of plasma were removed, directly precipitated with ice-cold acetonitrile containing the internal standards and prepared as described above. 100  $\mu$ L methanol with internal standards was added to the saline at the acceptor chamber to keep the compounds dissolved before taking the respective aliquot. Plasma protein binding was analyzed in three independent replicates and itraconazole was

### 3. Ergebnisse und Diskussion

used as a control in each chamber to account for potential leaking of the dialysis membrane. Plasma protein binding was calculated according to Equation 4, where  $f_b$  is the fraction bound,  $c_{te}$  is the total plasma drug concentration at equilibrium,  $c_f$  is the free drug concentration of the acceptor side,  $V_{pi}$  is the initial plasma volume and  $V_{pe}$  is the equilibrium plasma volume.<sup>63</sup>

$$f_b [\%] = \frac{(c_{te} - c_f) \times \frac{V_{pe}}{V_{pi}}}{\left[ (c_{te} - c_f) \times \frac{V_{pe}}{V_{pi}} \right] + c_f} \times 100$$

**Equation 4. Calculation of drug fraction bound.**

To determine plasma protein binding > 99% more accurately, the dilution method was applied.<sup>64</sup> For this purpose, a 1:10 and a 1:20 dilution of plasma in 0.9 % saline was additionally used as donor. The diluted plasma was spiked to a final concentration of 1  $\mu$ M, 50 nM and 2.5 nM of 4d and 4m and incubated with 0.9% saline in the acceptor chamber for 24 h at 37°C. Sample purification was performed as for the classical approach. Calibration curves from 1:10 and 1:20 diluted plasma were used to determine the corresponding donor concentrations. Plasma protein binding was analyzed in triplicates. As a control, the plasma protein binding of itraconazole was determined. Plasma protein binding was calculated according to Equation 5, 6 and 7 where  $f_u$  is the fraction unbound and D is the dilution level of the plasma.

$$f_{u,d} [\%] = \left( 1 - \frac{(c_{te} - c_f) \times \frac{V_{pe}}{V_{pi}}}{\left[ (c_{te} - c_f) \times \frac{V_{pe}}{V_{pi}} \right] + c_f} \right) \times 100$$

**Equation 5. Calculation of diluted fraction unbound.  $f_{u,d}$ : free fraction from diluted plasma,**

$$\text{undiluted } f_u = \frac{\frac{1}{D}}{\left[ \left( \frac{1}{f_{u,d}} \right) - 1 \right] + \frac{1}{D}}$$

**Equation 6. Calculation of undiluted fraction unbound. D: plasma dilution factor,  $f_u$ : fraction unbound,  $f_{u,d}$ : fraction unbound from diluted plasma**

$$\text{undiluted } f_b [\%] = (1 - f_u) \times 100$$

**Equation 7. Calculation of undiluted fraction bound.**

**Microsomal stability:** Human liver microsomes (HLMs) were used to determine the microsomal stability using the co-solvent method. For this purpose, 905  $\mu$ L of 0.1 M potassium phosphate buffer pH 7.4 and 25  $\mu$ L of 20 mg/mL pooled (from 150 donors) human liver microsomes (Corning, New York, USA) were added and gently inverted for mixing. 10  $\mu$ L of a 100  $\mu$ M working solution for **4d**, **4m** and the control compound propranolol in acetonitrile/DMSO 80/20 (v/v) was added and gently inverted for three times. 47  $\mu$ L of this mix was aliquoted into three reaction tubes per time point. To start the reaction, 3  $\mu$ L of a freshly prepared mix of 125  $\mu$ L NADPH Regenerating System Solution A and 25  $\mu$ L NADPH

### 3. Ergebnisse und Diskussion

Regenerating System Solution B (Corning, New York, USA) was added. The tubes were incubated at 37° C and 300 rpm and reactions were stopped at the time points 0, 15, 30, 45, and 60 min by adding 150 µL of ice-cold acetonitrile (containing 100 ng/mL of the internal standards). Each sample was directly vortexed and placed on ice. Following, samples were centrifuged at 13,200 x g for 10 min and the supernatant was diluted 1:10 with acetonitrile/water 50/50 (v/v). A negative control (no HLMs) and a blank (no analytes) were used as controls besides propranolol. First-order kinetics was used to calculate half-life ( $t_{1/2}$ ) and intrinsic clearance ( $Cl_{int}$ ) (Equation 8,9)

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_e}$$

**Equation 8. Calculation of half-life ( $t_{1/2}$ ).  $k_e$ : elimination rate constant**

$$Cl_{int} [\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}] = \frac{\ln(2)}{t_{1/2}} \times \frac{\text{volume of incubation } [\mu\text{L}]}{\text{protein amount in incubation } [\text{mg}]}$$

**Equation 9. Calculation of intrinsic clearance.  $t_{1/2}$ : half-life**

The elimination rate constant ( $k_e$ ) was determined as the negative slope of the plotted natural logarithm of the test compound peak area ratio versus time.

To correct for non-specific binding in the HLM incubation, plasma protein binding of 4d and 4m to HLMs was determined by equilibrium dialysis. The procedure was conducted as described above, replacing plasma by a 0.5 mg/mL HLM mixture (no NADPH). The unbound intrinsic clearance, which is solely influenced by the activity of metabolizing enzymes, was calculated (Equation 10).

$$\text{Unbound } Cl_{int} = \frac{Cl_{int}}{f_{u_{mic}}}$$

**Equation 10. Calculation of unbound intrinsic clearance.  $Cl_{int}$ : intrinsic clearance,  $f_{u_{mic}}$ : unbound fraction microsomal incubation**

***In vitro* – *in vivo* extrapolation of hepatic clearance:** The *in vivo* hepatic clearance of **4d** and **4m** was estimated using the *in vitro* determined  $K_{B/P}$ , unbound intrinsic clearance and plasma protein binding at 50 nM according to Equation 11. A hepatic blood flow of 1500 mL/min was used for calculation, displaying the normal value in the healthy male.<sup>65</sup> In addition, the hepatic extraction ratio was calculated according to Equation 12. Drugs with an extraction ratio <0.3 were classified as low hepatic extraction drugs, 0.3-0.7 as intermediate hepatic extraction drugs, and >0.7 as high hepatic extraction drugs.

$$Cl_H = Q_H \times \frac{\frac{f_u}{K_{B/P}} \times Cl_{int,u}}{Q_H + \frac{f_u}{K_{B/P}} \times Cl_{int,u}}$$

**Equation 11. Calculation of hepatic clearance.  $Cl_H$ : hepatic clearance,  $Cl_{int,u}$ : unbound intrinsic clearance,  $f_u$ : fraction unbound in plasma,  $K_{B/P}$ , blood-to-plasma ratio,  $Q_H$ : hepatic blood flow**

### 3. Ergebnisse und Diskussion

$$E_H = \frac{Cl_H}{Q_H}$$

**Equation 12. Calculation of the hepatic extraction ratio ( $E_H$ ).  $Cl_H$ : hepatic clearance,  $Q_H$ : hepatic blood flow**

#### **Animal experiment**

MV4-11, a human acute monocytic leukemia (AML) cell line was purchased from DSMZ (#ACC 102). Luc-GFP expressed MV4-11 cells were generated by lentiviral transduction with luciferase reporter gene.<sup>66</sup> MV4-11 cells were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 20% FBS. MV4-11 GFP-Luc ( $0.5 \times 10^6$ ) cells were intravenously injected into 6 to 8 weeks old immunodeficient NSG mice (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ, Jackson laboratory). Engraftments of the leukemia cells was verified by *in vivo* imaging system (IVIS® Spectrum *In Vivo* Imaging System, PerkinElmer) 14 days after injection. The leukemia bearing mice were randomly divided to three treatment groups, vehicle control (10% DMSO+ 18% PEG300+ 5% TWEEN 20+ 68% dH<sub>2</sub>O) and compound **4d** (10mg/kg). Starting from day 16, a total of 8 daily doses were administered through intraperitoneal (i.p.) injections. Body weight from each mouse was recorded every day. Treatment efficacy and tumor progression were monitored by means of IVIS and quantification of ROI values (radiance, p/s/cm<sup>2</sup>/sr).

#### **Author contributions**

F.F. and J.S.-D. share first authorship. S.B. and T.K. contributed equally to this work as senior authors. F.F. and L.A.A.A. synthesized all intermediates and target compounds. J.K. contributed to the characterisation of all intermediates and target compounds. J.S.-D., J.-W.T., K.S., M.K. and T.W. performed the biological evaluation. L.B. and N.H. provided the HDAC enzyme data. T.G. and B.B.B. performed the bioanalytical determination and evaluation of *in vitro* pharmacokinetics. A.B., M.U.K., B.B.B., S.B., and T.K. acquired funding and provided resources. F.F., J.S.-D., S.B., and T.K. designed the study. The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### Corresponding Authors

**Thomas Kurz** – Institute of Pharmaceutial and Medicinial Chemistry, Heinrich-Heine University Düsseldorf, Universitätsstr.1, 40225 Düsseldorf, Germany; orcid.org/0000-0002-9474-4224; Phone: (+49) 211 81 14894; E-Mail: thomas.kurz@hhu.de

**Sanil Bhatia** – Department of Pediatric Oncology, Hematology and Clinical Immunology, Medical Faculty, Heinrich Heine University Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany; orcid.org/0000-0001-6494-7744; Phone: (+49) 211 81 04896; E-Mail: sanil.bhatia@med.uni-duesseldorf.de; Fax: (+49) 211 81 16436

#### Funding

This work was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) 270650915 (Research Training Group GRK 2158). S.B. additionally acknowledges the financial support from Elterninitiative Kinderkrebsklinik e.V. A.B. acknowledges the financial support from Katharina-Hardt Foundation, Christiane und Claudia Hempel foundation and Löwenstern e.V. M.U.K. acknowledges financial support from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) KA 1942/2-1.

#### Declaration of competing interest

The authors declare no competing financial interest.

#### Acknowledgments

F.F., L.A.A.A. and T.K. thank the CeMSA@HHU (Center for Molecular and Structural Analytics @ Heinrich Heine University) for recording the mass-spectrometric and the NMR-spectroscopic data.

#### Appendix A. Supplementary data

Synthesis of linker **2**, NMR spectra and HPLC traces of synthesized compounds

#### Abbreviations

AML - acute myeloid leukemia

BCP-ALL - B cell precursor acute lymphoblastic leukemia

BSA - bovine serum albumin

CE: collision energy

CML - chronic myeloid leukemia

dDSS - differential DSS

### 3. Ergebnisse und Diskussion

DSMZ - german collection of microorganisms and cell culture

DSS - drug sensitivity scores

ESI - electrospray ionization

FBS - fetal bovine serum

HAT - histone acetyltransferases

HBTU – *O*-(benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumhexafluorophosphat

HDAC - histone deacetylases

HDACi - HDAC inhibitors

HLM: human liver microsomes

HRMS - high-resolution mass spectra

HSCs - hematopoietic stem cells

HTDS - high throughput drug screening

Hz - Hertz

$K_{B/P}$ : blood-to-plasma ratio

mp - melting points

MRM: multiple reaction monitoring

PDX - patient-derived xenograft

ppm - parts per million

T-ALL - T cell acute lymphoblastic leukemia

TBST - tris buffered saline with Tween

TFA – trifluoroacetic acid

TL: Tube lens

TLC - thin-layer chromatography

ZIP - zero interaction potency

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### References

- (1) Cordo', V.; van der Zwet, J. C. G.; Canté-Barrett, K.; Pieters, R.; Meijerink, J. P. P. T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: A Roadmap to Targeted Therapies. *Blood cancer Discov.* **2021**, *2* (1), 19–31. <https://doi.org/10.1158/2643-3230.BCD-20-0093>.
- (2) Ratti, S.; Lonetti, A.; Follo, M. Y.; Paganelli, F.; Martelli, A. M.; Chiarini, F.; Evangelisti, C. B-All Complexity: Is Targeted Therapy Still a Valuable Approach for Pediatric Patients? *Cancers (Basel)*. **2020**, *12* (12), 1–27. <https://doi.org/10.3390/cancers12123498>.
- (3) de Rooij, J. D. E.; Michel Zwaan, C.; van den Heuvel-Eibrink, M. Pediatric AML: From Biology to Clinical Management. *J. Clin. Med.* **2015**, *4* (1), 127–149. <https://doi.org/10.3390/jcm4010127>.
- (4) Pui, C. H.; Yang, J. J.; Hunger, S. P.; Pieters, R.; Schrappe, M.; Biondi, A.; Vora, A.; Baruchel, A.; Silverman, L. B.; Schmiegelow, K.; Escherich, G.; Horibe, K.; Benoit, Y. C. M.; Izraeli, S.; Yeoh, A. E. J.; Liang, D. C.; Downing, J. R.; Evans, W. E.; Relling, M. V.; Mullighan, C. G. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Progress through Collaboration. *J. Clin. Oncol.* **2015**, *33* (27), 2938–2948. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.59.1636>.
- (5) Nguyen, K.; Devidas, M.; Cheng, S. C.; La, M.; Raetz, E. A.; Carroll, W. L.; Winick, N. J.; Hunger, S. P.; Gaynon, P. S.; Loh, M. L. Factors Influencing Survival after Relapse from Acute Lymphoblastic Leukemia: A Children's Oncology Group Study. *Leukemia* **2008**, *22* (12), 2142–2150. <https://doi.org/10.1038/leu.2008.251>.
- (6) Schmiegelow, K.; Müller, K.; Mogensen, S. S.; Mogensen, P. R.; Wolthers, B. O.; Stoltze, U. K.; Tuckuviene, R.; Frandsen, T. Non-Infectious Chemotherapy-Associated Acute Toxicities during Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Therapy. *F1000Research* **2017**, *6*, 1–14. <https://doi.org/10.12688/f1000research.10768.1>.
- (7) O'Connor, D.; Bate, J.; Wade, R.; Clack, R.; Dhir, S.; Hough, R.; Vora, A.; Goulden, N.; Samarasinghe, S. Infection-Related Mortality in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia: An Analysis of Infectious Deaths on UKALL2003. *Blood* **2014**, *124* (7), 1056–1061. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-03-560847>.
- (8) Gu, Z.; Churchman, M. L.; Roberts, K. G.; Moore, I.; Zhou, X.; Nakitandwe, J.; Hagiwara, K.; Pelletier, S.; Gingras, S.; Berns, H.; Payne-Turner, D.; Hill, A.; Iacobucci, I.; Shi, L.; Pounds, S.; Cheng, C.; Pei, D.; Qu, C.; Newman, S.; Devidas, M.; Dai, Y.; Reshmi, S. C.; Gastier-Foster, J.; Raetz, E. A.; Borowitz, M. J.; Wood, B. L.; Carroll, W. L.; Zweidler-McKay, P. A.; Rabin, K. R.; Mattano, L. A.; Maloney, K. W.; Rambaldi, A.; Spinelli, O.; Radich, J. P.; Minden, M. D.; Rowe, J. M.; Luger, S.; Litzow, M. R.; Tallman, M. S.; Racevskis, J.; Zhang, Y.; Bhatia, R.; Kohlschmidt, J.; Mrózek, K.; Bloomfield, C. D.; Stock, W.; Kornblau, S.; Kantarjian, H. M.; Konopleva, M.; Evans, W. E.; Jeha, S.; Pui, C. H.; Yang, J.; Paietta, E.; Downing, J. R.; Relling, M. V.; Zhang, J.; Loh, M. L.; Hunger, S. P.; Mullighan, C. G. PAX5-Driven Subtypes of B-Progenitor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Nat. Genet.* **2019**, *51* (2), 296–307. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0315-5>.
- (9) Cheng, Y.; He, C.; Wang, M.; Ma, X.; Mo, F.; Yang, S.; Han, J.; Wei, X. Targeting Epigenetic Regulators for Cancer Therapy: Mechanisms and Advances in Clinical Trials. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2019**, *4* (1). <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0095-0>.
- (10) Gopi, L. K.; Kidder, B. L. Integrative Pan Cancer Analysis Reveals Epigenomic Variation in Cancer Type and Cell Specific Chromatin Domains. *Nat. Commun.* **2021**, *12* (1), 1–20. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21707-1>.
- (11) Timp, W.; Feinberg, A. P. Cancer as a Dysregulated Epigenome Allowing Cellular



### 3. Ergebnisse und Diskussion

- Growth Advantage at the Expense of the Host. *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13* (7), 497–510. <https://doi.org/10.1038/nrc3486>.
- (12) Zeng, H.; Qu, J.; Jin, N.; Xu, J.; Lin, C.; Chen, Y.; Yang, X.; He, X.; Tang, S.; Lan, X.; Yang, X.; Chen, Z.; Huang, M.; Ding, J.; Geng, M. Feedback Activation of Leukemia Inhibitory Factor Receptor Limits Response to Histone Deacetylase Inhibitors in Breast Cancer. *Cancer Cell* **2016**, *30* (3), 459–473. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.08.001>.
- (13) Ceccacci, E.; Minucci, S. Inhibition of Histone Deacetylases in Cancer Therapy: Lessons from Leukaemia. *Br. J. Cancer* **2016**, *114* (6), 605–611. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.36>.
- (14) Bondarev, A. D.; Attwood, M. M.; Jonsson, J.; Chubarev, V. N.; Tarasov, V. V.; Schiöth, H. B. Recent Developments of HDAC Inhibitors: Emerging Indications and Novel Molecules. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2021**, *87* (12), 4577–4597. <https://doi.org/10.1111/bcp.14889>.
- (15) Shvedunova, M.; Akhtar, A. Modulation of Cellular Processes by Histone and Non-Histone Protein Acetylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2022**, *23* (5), 329–349. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00441-y>.
- (16) Yang, X. J.; Seto, E. HATs and HDACs: From Structure, Function and Regulation to Novel Strategies for Therapy and Prevention. *Oncogene* **2007**, *26* (37), 5310–5318. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210599>.
- (17) Park, S. Y.; Kim, J. S. A Short Guide to Histone Deacetylases Including Recent Progress on Class II Enzymes. *Exp. Mol. Med.* **2020**, *52* (2), 204–212. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0382-4>.
- (18) Ho, T. C. S.; Chan, A. H. Y.; Ganesan, A. Thirty Years of HDAC Inhibitors: 2020 Insight and Hindsight. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2020. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00830>.
- (19) Liu, P.; Xiao, J.; Wang, Y.; Song, X.; Huang, L.; Ren, Z.; Kitazato, K.; Wang, Y. Posttranslational Modification and beyond: Interplay between Histone Deacetylase 6 and Heat-Shock Protein 90. *Mol. Med.* **2021**, *27* (1). <https://doi.org/10.1186/s10020-021-00375-3>.
- (20) Kerr, E.; Holohan, C.; McLaughlin, K. M.; Majkut, J.; Dolan, S.; Redmond, K.; Riley, J.; McLaughlin, K.; Stasik, I.; Crudden, M.; Van Schaeybroeck, S.; Fenning, C.; O'Connor, R.; Kiely, P.; Sgobba, M.; Haigh, D.; Johnston, P. G.; Longley, D. B. Identification of an Acetylation-Dependant Ku70/FLIP Complex That Regulates FLIP Expression and HDAC Inhibitor-Induced Apoptosis. *Cell Death Differ.* **2012**, *19* (8), 1317–1327. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.8>.
- (21) Zhou, M.; Yuan, M.; Zhang, M.; Lei, C.; Aras, O.; Zhang, X.; An, F. Combining Histone Deacetylase Inhibitors (HDACis) with Other Therapies for Cancer Therapy. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *226*, 113825. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113825>.
- (22) Diyabalanage, H. V. K.; Granda, M. L.; Hooker, J. M. Combination Therapy: Histone Deacetylase Inhibitors and Platinum-Based Chemotherapeutics for Cancer. *Cancer Lett.* **2013**, *329* (1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.09.018>.
- (23) Stenzel, K.; Hamacher, A.; Hansen, F. K.; Gertzen, C. G. W.; Senger, J.; Marquardt, V.; Marek, L.; Marek, M.; Romier, C.; Remke, M.; Jung, M.; Gohlke, H.; Kassack, M. U.; Kurz, T. Alkoxyurea-Based Histone Deacetylase Inhibitors Increase Cisplatin Potency in Chemoresistant Cancer Cell Lines. *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (13), 5334–5348. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01538>.
- (24) Reßing, N.; Schliehe-Diecks, J.; Watson, P. R.; Sönnichsen, M.; Cragin, A. D.; Schöler, A.; Yang, J.; Schäker-Hübner, L.; Borkhardt, A.; Christianson, D. W.; Bhatia, S.; Hansen,



### 3. Ergebnisse und Diskussion

- F. K. Development of Fluorinated Peptoid-Based Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitors for Therapy-Resistant Acute Leukemia. *J. Med. Chem.* **2022**, *65* (22), 15457–15472. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c01418>.
- (25) Laporte, A. N.; Barrott, J. J.; Yao, R. J.; Poulin, N. M.; Brodin, B. A.; Jones, K. B.; Underhill, T. M.; Nielsen, T. O. HDAC and Proteasome Inhibitors Synergize to Activate Pro-Apoptotic Factors in Synovial Sarcoma. *PLoS One* **2017**, *12* (1), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169407>.
- (26) Alves Avelar, L. A.; Schrenk, C.; Sönnichsen, M.; Hamacher, A.; Hansen, F. K.; Schliehe-Diecks, J.; Borkhardt, A.; Bhatia, S.; Kassack, M. U.; Kurz, T. Synergistic Induction of Apoptosis in Resistant Head and Neck Carcinoma and Leukemia by Alkoxyamide-Based Histone Deacetylase Inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *211*. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.113095>.
- (27) Bhatia, S.; Krieger, V.; Groll, M.; Osko, J. D.; Reßing, N.; Ahlert, H.; Borkhardt, A.; Kurz, T.; Christianson, D. W.; Hauer, J.; Hansen, F. K. Discovery of the First-in-Class Dual Histone Deacetylase-Proteasome Inhibitor. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (22), 10299–10309. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01487>.
- (28) Hideshima, T.; Cottini, F.; Ohguchi, H.; Jakubikova, J.; Gorgun, G.; Mimura, N.; Tai, Y. T.; Munshi, N. C.; Richardson, P. G.; Anderson, K. C. Rational Combination Treatment with Histone Deacetylase Inhibitors and Immunomodulatory Drugs in Multiple Myeloma. *Blood Cancer J.* **2015**, *5* (5), 1–9. <https://doi.org/10.1038/bcj.2015.38>.
- (29) Knox, T.; Sahakian, E.; Banik, D.; Hadley, M.; Palmer, E.; Noonepalle, S.; Kim, J.; Powers, J.; Gracia-Hernandez, M.; Oliveira, V.; Cheng, F.; Chen, J.; Barinka, C.; Pinilla-Ibarz, J.; Lee, N. H.; Kozikowski, A.; Villagra, A. Author Correction: Selective HDAC6 Inhibitors Improve Anti-PD-1 Immune Checkpoint Blockade Therapy by Decreasing the Anti-Inflammatory Phenotype of Macrophages and down-Regulation of Immunosuppressive Proteins in Tumor Cells (Scientific Reports, (2019), 9. *Sci. Rep.* **2019**, *9* (1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51403-6>.
- (30) Kozikowski, A. P.; Chen, Y.; Gaysin, A. M.; Savoy, D. N.; Billadeau, D. D.; Kim, K. H. Chemistry, Biology, and QSAR Studies of Substituted Biaryl Hydroxamates and Mercaptoacetamides as HDAC Inhibitors - Nanomolar-Potency Inhibitors of Pancreatic Cancer Cell Growth. *ChemMedChem* **2008**, *3* (3), 487–501. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200700314>.
- (31) Curtin, M.; Glaser, K. Histone Deacetylase Inhibitors: The Abbott Experience. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *10* (22), 2373–2392. <https://doi.org/10.2174/0929867033456576>.
- (32) Mo, H.; Zhang, R.; Chen, Y.; Li, S. T.; Wang, Y.; Zou, W.; Lin, Q.; Zhao, D. G.; Du, Y.; Zhang, K.; Ma, Y. Y. Synthesis and Anticancer Activity of Novel Histone Deacetylase Inhibitors That Inhibit Autophagy and Induce Apoptosis. *Eur. J. Med. Chem.* **2022**, *243* (August), 114705. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114705>.
- (33) Peng, X.; Li, L.; Chen, J.; Ren, Y.; Liu, J.; Yu, Z.; Cao, H.; Chen, J. Discovery of Novel Histone Deacetylase 6 (HDAC6) Inhibitors with Enhanced Antitumor Immunity of Anti-PD-L1 Immunotherapy in Melanoma. *J. Med. Chem.* **2022**, *65* (3), 2434–2457. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c01863>.
- (34) Asfaha, Y.; Schrenk, C.; Alves Avelar, L. A.; Lange, F.; Wang, C.; Bandolik, J. J.; Hamacher, A.; Kassack, M. U.; Kurz, T. Novel Alkoxyamide-Based Histone Deacetylase Inhibitors Reverse Cisplatin Resistance in Chemoresistant Cancer Cells. *Bioorganic Med. Chem.* **2020**, *28* (1), 115108. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.115108>.
- (35) Tran, B.; Cohen, M. S. The Discovery and Development of Binimetinib for the Treatment of Melanoma. *Expert Opin. Drug Discov.* **2020**, *15* (7), 745–754. <https://doi.org/10.1080/17460441.2020.1746265>.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

- (36) Markham, A.; Keam, S. J. Selumetinib: First Approval. *Drugs* **2020**, *80* (9), 931–937. <https://doi.org/10.1007/s40265-020-01331-x>.
- (37) Lassalas, P.; Gay, B.; Lasfargeas, C.; James, M. J.; Tran, V.; Vijayendran, K. G.; Brunden, K. R.; Kozlowski, M. C.; Thomas, C. J.; Smith, A. B.; Hury, D. M.; Ballatore, C. Structure Property Relationships of Carboxylic Acid Isosteres. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (7), 3183–3203. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01963>.
- (38) Hill, J.; Crich, D. The N,N,O-Trisubstituted Hydroxylamine Isostere and Its Influence on Lipophilicity and Related Parameters. *ACS Med. Chem. Lett.* **2022**, *13* (5), 799–806. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.1c00713>.
- (39) Goodreid, J. D.; Duspara, P. A.; Bosch, C.; Batey, R. A. Amidation Reactions from the Direct Coupling of Metal Carboxylate Salts with Amines. *J. Org. Chem.* **2014**, *79* (3), 943–954. <https://doi.org/10.1021/jo402374c>.
- (40) Oikonomou, A.; Valsecchi, L.; Quadri, M.; Watrin, T.; Scharov, K.; Procopio, S.; Tu, J. W.; Vogt, M.; Savino, A. M.; Silvestri, D.; Valsecchi, M. G.; Biondi, A.; Borkhardt, A.; Bhatia, S.; Cazzaniga, G.; Fazio, G.; Bardini, M.; Palmi, C. High-Throughput Screening as a Drug Repurposing Strategy for Poor Outcome Subgroups of Pediatric B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Biochem. Pharmacol.* **2023**, *217* (May), 115809. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2023.115809>.
- (41) Yadav, B.; Pemovska, T.; Szwajda, A.; Kuleskiy, E.; Kontro, M.; Karjalainen, R.; Majumder, M. M.; Malani, D.; Murumägi, A.; Knowles, J.; Porkka, K.; Heckman, C.; Kallioniemi, O.; Wennerberg, K.; Aittokallio, T. Quantitative Scoring of Differential Drug Sensitivity for Individually Optimized Anticancer Therapies. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep05193>.
- (42) Nalawansa, D. A.; Gomes, I. D.; Wambua, M. K.; Pflum, M. K. H. HDAC Inhibitor-Induced Mitotic Arrest Is Mediated by Eg5/KIF11 Acetylation. *Cell Chem. Biol.* **2017**, *24* (4), 481–492.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.03.008>.
- (43) Stockhammer, P.; Okumus, Ö.; Hegedus, L.; Rittler, D.; Ploenes, T.; Herold, T.; Kalbournz, S.; Bankfalvi, A.; Sucker, A.; Kimmig, R.; Aigner, C.; Hegedus, B. HDAC Inhibition Induces Cell Cycle Arrest and Mesenchymal-Epithelial Transition in a Novel Pleural-Effusion Derived Uterine Carcinosarcoma Cell Line. *Pathol. Oncol. Res.* **2021**, *27* (March), 1–10. <https://doi.org/10.3389/pore.2021.636088>.
- (44) Caserta, T. M.; Smith, A. N.; Gultice, A. D.; Reedy, M. A.; Brown, T. L. Q-VD-OPh, a Broad Spectrum Caspase Inhibitor with Potent Antiapoptotic Properties. *Apoptosis* **2003**, *8* (4), 345–352. <https://doi.org/10.1023/A:1024116916932>.
- (45) Kalac, M.; Scotto, L.; Marchi, E.; Amengual, J.; Seshan, V. E.; Bhagat, G.; Ulahannan, N.; Leshchenko, V. V.; Temkin, A. M.; Parekh, S.; Tycko, B.; O'Connor, O. A. HDAC Inhibitors and Decitabine Are Highly Synergistic and Associated with Unique Gene-Expression and Epigenetic Profiles in Models of DLBCL. *Blood* **2011**, *118* (20), 5506–5516. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-02-336891>.
- (46) Blagitko-Dorfs, N.; Schlosser, P.; Greve, G.; Pfeifer, D.; Meier, R.; Baude, A.; Brocks, D.; Plass, C.; Lübbert, M. Combination Treatment of Acute Myeloid Leukemia Cells with DNMT and HDAC Inhibitors: Predominant Synergistic Gene Downregulation Associated with Gene Body Demethylation. *Leukemia* **2019**, *33* (4), 945–956. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0293-8>.
- (47) Gkatzamanidou, M.; Terpou, E.; Kentepozidis, N.; Terpos, E. Targeting the Interplay between Hdacs and Dna Damage Repair for Myeloma Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (19). <https://doi.org/10.3390/ijms221910406>.
- (48) Di, L.; Kerns, E. H. Profiling Drug-like Properties in Discovery Research. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7* (3), 402–408. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(03\)00055-3](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(03)00055-3).

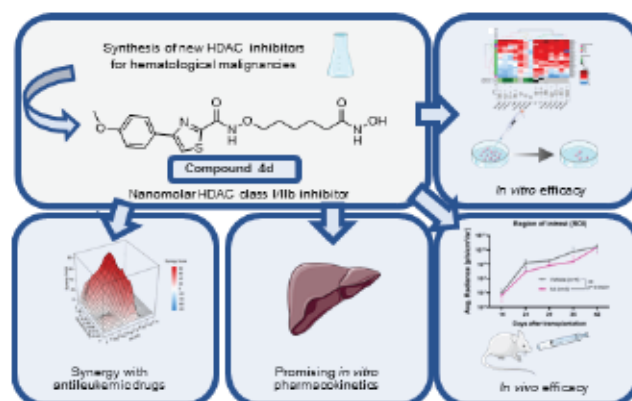
### 3. Ergebnisse und Diskussion

- (49) Markovic, M.; Zur, M.; Fine-Shamir, N.; Haimov, E.; González-álvarez, I.; Dahan, A. Segmental-Dependent Solubility and Permeability as Key Factors Guiding Controlled Release Drug Product Development. *Pharmaceutics* **2020**, *12* (3), 1–15. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12030295>.
- (50) Gangnus, T.; Burckhardt, B. B. Low-Volume LC–MS/MS Method for the Pharmacokinetic Investigation of Carvedilol, Enalapril and Their Metabolites in Whole Blood and Plasma: Application to a Paediatric Clinical Trial. *Drug Test. Anal.* **2021**, *13* (3), 694–708. <https://doi.org/10.1002/dta.2949>.
- (51) Nation, R. L.; Theuretzbacher, U.; Tsuji, B. T. Concentration-Dependent Plasma Protein Binding: Expect the Unexpected. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2018**, *122* (May), 341–346. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.07.004>.
- (52) Schafer-Korting, M.; Korting, H. C.; Amann, F.; Peuser, R.; Lukacs, A. Influence of Albumin on Itraconazole and Ketoconazole Antifungal Activity: Results of a Dynamic in Vitro Study. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1991**, *35* (10), 2053–2056. <https://doi.org/10.1128/AAC.35.10.2053>.
- (53) Iwamoto, M.; Friedman, E. J.; Sandhu, P.; Agrawal, N. G. B.; Rubin, E. H.; Wagner, J. A. Clinical Pharmacology Profile of Vorinostat, a Histone Deacetylase Inhibitor. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2013**, *72* (3), 493–508. <https://doi.org/10.1007/s00280-013-2220-z>.
- (54) Ramalingam, S. S.; Parise, R. A.; Ramanathan, R. K.; Lagattuta, T. F.; Musquire, L. A.; Stoller, R. G.; Potter, D. M.; Argiris, A. E.; Zwiebel, J. A.; Egorin, M. J.; Belani, C. P. Phase I and Pharmacokinetic Study of Vorinostat, a Histone Deacetylase Inhibitor, in Combination with Carboplatin and Paclitaxel for Advanced Solid Malignancies. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13* (12), 3605–3610. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0162>.
- (55) Konsoula, R.; Jung, M. In Vitro Plasma Stability, Permeability and Solubility of Mercaptoacetamide Histone Deacetylase Inhibitors. *Int. J. Pharm.* **2008**, *361* (1–2), 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.05.001>.
- (56) EMEA, H. C. Withdrawal Assessment Report Vorinostat MSD 100 Mg Hard Capsules (Vorinostat ). **2009**, No. October 2008.
- (57) Abraham, S., Booth, B., Rahman, A. Merck Research Laboratories Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics Review(s). Zolinza. **2006** [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2006/021991s000\\_Zolinza\\_ClinPharmR.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2006/021991s000_Zolinza_ClinPharmR.pdf) (12.05.2024 20:27)
- (58) Venkatesh, P. R.; Goh, E.; Zeng, P.; New, L. S.; Xin, L.; Pasha, M. K.; Sangthongpitag, K.; Yeo, P.; Kantharaj, E. In Vitro Phase I Cytochrome P450 Metabolism, Permeability and Pharmacokinetics of SB639, a Novel Histone Deacetylase Inhibitor in Preclinical Species. *Biol. Pharm. Bull.* **2007**, *30* (5), 1021–1024. <https://doi.org/10.1248/bpb.30.1021>.
- (59) Alves Avelar, L. A.; Held, J.; Engel, J. A.; Sureechatchaiyan, P.; Hansen, F. K.; Hamacher, A.; Kassack, M. U.; Mordmüller, B.; Andrews, K. T.; Kurz, T. Design and Synthesis of Novel Anti-Plasmodial Histone Deacetylase Inhibitors Containing an Alkoxyamide Connecting Unit. *Arch. Pharm. (Weinheim)*. **2017**, *350* (3–4), 1–11. <https://doi.org/10.1002/ardp.201600347>.
- (60) Andrés, A.; Rosés, M.; Ràfols, C.; Bosch, E.; Espinosa, S.; Segarra, V.; Huerta, J. M. Setup and Validation of Shake-Flask Procedures for the Determination of Partition Coefficients (Log D) from Low Drug Amounts. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2015**, *76*, 181–191. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.05.008>.
- (61) Yu, S.; Li, S.; Yang, H.; Lee, F.; Wu, J. T.; Qian, M. G. A Novel Liquid

### 3. Ergebnisse und Diskussion

- Chromatography/Tandem Mass Spectrometry Based Depletion Method for Measuring Red Blood Cell Partitioning of Pharmaceutical Compounds in Drug Discovery. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, *19* (2), 250–254. <https://doi.org/10.1002/rcm.1777>.
- (62) Hinderling, P. H. Red Blood Cells: A Neglected Compartment in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Pharmacol. Rev.* **1997**, *49* (3), 279–295.
- (63) Banker, M. J.; Clark, T. H.; Williams, J. A. Development and Validation of a 96-Well Equilibrium Dialysis Apparatus for Measuring Plasma Protein Binding. *J. Pharm. Sci.* **2003**, *92* (5), 967–974. <https://doi.org/10.1002/jps.10332>.
- (64) Riccardi, K.; Cawley, S.; Yates, P. D.; Chang, C.; Funk, C.; Niosi, M.; Lin, J.; Di, L. Plasma Protein Binding of Challenging Compounds. *J. Pharm. Sci.* **2015**, *104* (8), 2627–2636. <https://doi.org/10.1002/jps.24506>.
- (65) Rocha, F. G. *Liver Blood Flow: Physiology, Measurement, and Clinical Relevance*, Fifth Edit.; Elsevier Inc., 2012. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-1454-8.00004-7>.
- (66) Bhatia, S.; Diedrich, D.; Frieg, B.; Ahlert, H.; Stein, S.; Bopp, B.; Lang, F.; Zang, T.; Kröger, T.; Ernst, T.; Kögler, G.; Krieg, A.; Lüdeke, S.; Kunkel, H.; Rodrigues Moita, A. J.; Kassack, M. U.; Marquardt, V.; Opitz, F. V.; Oldenburg, M.; Remke, M.; Babor, F.; Grez, M.; Hochhaus, A.; Borkhardt, A.; Groth, G.; Nagel-Steger, L.; Jose, J.; Kurz, T.; Gohlke, H.; Hansen, F. K.; Hauer, J. Targeting HSP90 Dimerization via the C Terminus Is Effective in Imatinib-Resistant CML and Lacks the Heat Shock Response. *Blood* **2018**, *132* (3), 307–320. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-10-810986>.

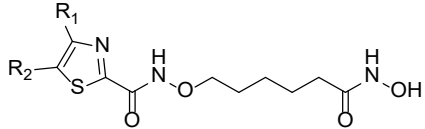


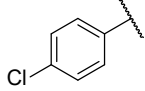
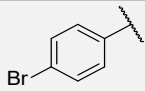
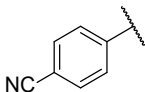
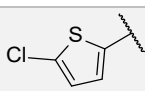
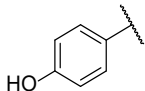

#### Table of Contents graphic



### 3. Ergebnisse und Diskussion





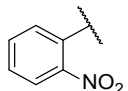
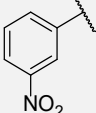
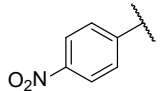
#### 3.1.1 Weiterführende Analyse der Struktur-Aktivitätsbeziehung

**Tabelle 1: Strukturen und Aktivität der HDACi 4n – 4t gegen drei verschiedene leukämische Zelllinien. n=3, Mittelwert±Standardabweichung. Die Daten wurden von Julian Schliehe-Diecks aus dem Arbeitskreis von Dr. Sanil Bhatia erhoben. HDACi 4a ist als Referenz angegeben.**

Nr.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	IC <sub>50</sub>		
			(HL60) [nM]	(HPBALL) [nM]	(K562) [nM]
					
<b>4a</b>		H	430.0 ± 68.0	460.0 ± 35.0	880.0 ± 26.0
<b>4n</b>		Me	450.0 ± 95.0	700.0 ± 38.0	1800.0 ± 360.0
<b>4o</b>		H	220.0 ± 27.0	320.0 ± 16.0	460.0 ± 110.0
<b>4p</b>		H	220.0 ± 89.0	310.0 ± 40.0	420.0 ± 140.0
<b>4q</b>		H	1800.0 ± 130.0	1100.0 ± 140.0	>5000
<b>4r</b>		H	570.0 ± 170.0	940.0 ± 240.0	1100.0 ± 170.0
<b>4s</b>		H	710.0 ± 360.0	317.0 ± 40.0	1900.0 ± 540.0
<b>4t</b>			160.0 ± 29.0	263.0 ± 32.0	450.0 ± 190.0

### 3. Ergebnisse und Diskussion

**Tabelle 2: Strukturen und Aktivität der HDACi 4u – 4z gegen drei verschiedene leukämische Zelllinien. n=3, Mittelwert±Standardabweichung. Die Daten wurden von Julian Schliehe-Diecks aus dem Arbeitskreis von Dr. Sanil Bhatia erhoben. HDACi 4a ist als Referenz angegeben.**

Nr.	R <sub>1</sub>	IC <sub>50</sub> (HL60)	IC <sub>50</sub> (HPBALL)	IC <sub>50</sub> (K562)
		[nM]	[nM]	[nM]
<b>4a</b>		430.0 ± 68.0	460.0 ± 35.0	880.0 ± 26.0
<b>4u</b>		2100.0 ± 580.0	1500.0 ± 160.0	4700.0 ± 1300.0
<b>4v</b>		>5000	3400 ± 310.0	>5000
<b>4w</b>		>5000	2700.0 ± 350.0	>5000
<b>4x</b>		>5000	4400.0 ± 240.0	>5000
<b>4y</b>		1700.0 ± 980.0	1900.0 ± 190.0	>5000
<b>4z</b>		1600 ± 430.0	1200.0 ± 120.0	4900.0 ± 1100.0

Die **4a** Analoga **4n–4z** sind auf analoge Weise zu den Derivaten **4b–4m** unter 3.1 synthetisch zugänglich. Diese Derivate ergänzen die Derivate **4b–4m** aus 3.1, indem sie weitere Modifikationen der terminalen Phenylgruppe (**4o–4q**, **4s**, **4x–4z**) oder einen bioisosteren Austausch (**4r**, **4u–4w**) derselben repräsentieren. Insbesondere die Derivate **4n** und **4t** erweitern die Struktur-Aktivitätsbeziehung der **4a** Analoga, indem sie verschiedene Substitutionsmuster des zentralen Thiazolringes darstellen (Tabelle 1).

Aus diesen 13 Derivaten zeigten nur drei, das chlorierte Derivat **4o**, das bromierte Derivat **4p** und das Derivat **4t** mit dem Phenylring an der 2- statt der 4-Position, eine robuste Verbesserung der zytotoxischen Aktivität gegen drei leukämische Zelllinien im Vergleich zu der Leitstruktur **4a** (Tabelle 1). Alle anderen Derivate zeigten eine teilweise deutliche Erniedrigung der antileukämischen Aktivität. Besonders das Phenol **4s** und das Chlorthiophen



### 3. Ergebnisse und Diskussion

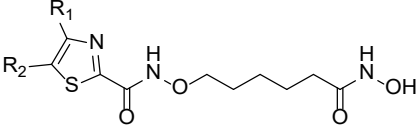

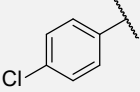
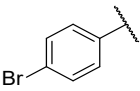
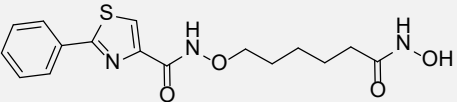
**4r** verschlechterten die antileukämische Aktivität im Vergleich zu der Leitstruktur **4a**. Dies ist nicht klar auf die erhöhte Elektronendichte des aromatischen Systems zurückzuführen, da unter den in 3.1 vorgestellten Derivaten **4b-4m** vor allem Derivate mit elektronenschiebenden Substituenten eine verbesserte Aktivität zeigten. Ein möglicher Grund für die Trendumkehr bei den Derivaten **4s** und **4r** könnte in einer verschlechterten Zellpermeation dieser Derivate liegen. Auch die Dreifachsubstitution des Thiazols (**4n**) führte zu einer leichten Reduktion der zytotoxischen Aktivität.

Die Substitution mit der stark elektronenziehenden Nitrogruppe (**4x-4z**) und die Substitution des Phenylrings durch ein elektronenarmes Pyridin (**4u-4w**) führte zu einer drastischen Verschlechterung der antileukämischen Aktivität (Tabelle 2).

Die drei HDACi (**4o**, **4p** und **4t**) mit verbesserter Aktivität gegen die untersuchten leukämischen Zellen wurden auf ihre HDAC-Enzyminhibition hin untersucht. Alle Verbindungen wiesen eine leicht stärkere Inhibition von HDAC 2 und HDAC 6 und dasselbe HDAC Klasse I/IIb-Inhibitionsprofil wie die Leitstruktur **4a** auf (Tabelle 3).

### 3. Ergebnisse und Diskussion

**Tabelle 3: HDAC-Enzyminhibition der HDACi 4a, 4o, 4p und 4t von HDAC 2, HDAC 4, HDAC 6 und HDAC 8. Es wurden zwei unabhängige Experimente mit jeweils zwei Replikaten durchgeführt. Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. Die Daten wurden von Nadine Horstick und Lukas Biermann aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Matthias U. Kassack erhoben.**

Nr.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>				
			IC <sub>50</sub> (HDAC2) [nM]	IC <sub>50</sub> (HDAC4) [nM]	IC <sub>50</sub> (HDAC6) [nM]	IC <sub>50</sub> (HDAC8) [nM]
<b>4a</b>		H	59 $\pm$ 12	>100000	75 $\pm$ 31	4000 $\pm$ 860
<b>4o</b>		H	27 $\pm$ 8	>100000	50 $\pm$ 16	4100 $\pm$ 530
<b>4p</b>		H	21 $\pm$ 5	>100000	32 $\pm$ 9	5500 $\pm$ 390
<b>4t</b>			46 $\pm$ 9	>100000	26 $\pm$ 6	2200 $\pm$ 270

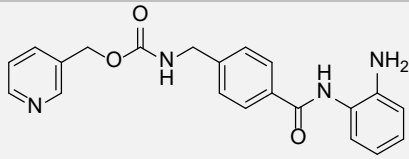
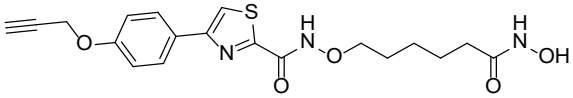
Der generelle Trend, dass ein elektronenreicher Aromat mit Substitution in para-Position zu dem Thiazol-Substituenten zu einer guten antileukämischen Wirkung führt, bestätigt das Derivat **4aa**. **4aa** übertrifft in drei leukämischen Zelllinien die Referenzverbindung Entinostat, einen HDACi in klinischen Studien (Tabelle 4).<sup>120</sup> Darüber hinaus eignet sich die terminale Alkinfunktionalität in dem Kontext der Arzneistoffentwicklung, um beispielsweise über eine Kupfer katalysierte Azid-Alkin Cycloaddition (CuAAC) potentielle Kopfgruppenmodifikationen zu untersuchen.<sup>121</sup>

Allerdings ist nicht auszuschließen, dass die potente zytotoxische Aktivität von einer unspezifischen Toxizität der terminalen Alkinfunktionalität beeinflusst wird. Ekkebus *et al.* zeigten, dass unaktivierte Propargylamine mit Cysteinen im zellulären Kontext reagieren können.<sup>122</sup> Aufgrund dieser nicht auszuschließenden Reaktivität wurde das Derivat **4aa** nicht weiter untersucht.



### 3. Ergebnisse und Diskussion

**Tabelle 4: Strukturen und Aktivität des HDACi 4aa und dem Referenzinhibitor Entinostat gegen drei verschiedene leukämische Zelllinien. n=3, Mittelwert±Standardabweichung. Die Daten wurden von Julian Schliehe-Diecks aus dem Arbeitskreis von Dr. Sanil Bhatia erhoben.**

Nr.	HDACi-Struktur	IC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub>
		(RS4;11) [nM]	(SEM) [nM]	(NALM6) [nM]
Entinostat		300.0 ± 68.0	43.0 ± 15.0	190.0 ± 73.0
4aa		28.0 ± 16.0	13.0 ± 9.0	19.0 ± 7.0

Von allen dargestellten Derivaten der Leitstruktur **4a** wiesen die drei Derivate **4d**, **4l** und **4m** die potenteste zytotoxische Wirkung gegen Leukämiezellen auf (s. Kap. 3.1). Insbesondere die Derivate **4d** und **4m** zeigten ein besonders günstiges zytotoxisches Profil, da sie neben der antileukämischen Wirkung eine reduzierte zytotoxische Aktivität gegen gesunde Zellen besitzen. Gemeinsam haben diese drei Strukturen eine erweiterte Kopfgruppe mit einem elektronenreichen System. Generell führt ein eher elektronenschiebender Substituent in *para*-Position zum Thiazolring zu einer erhöhten zytotoxischen Aktivität gegen Leukämiezellen. Im Gegensatz dazu schwächen elektronenziehende, eher polare Substituenten, wie beispielsweise die Substitution des Phenylrings durch ein Pyridin, die antileukämische Wirkung ab. Die HDAC-Enzyminhibition ist weitgehend unabhängig von der Art oder der Position des Substituenten, alle dargestellten Derivate sind nanomolare Klasse I/IIb-HDACi.

Das besondere Potenzial von **4d** als neue HDACi-Leitstruktur in der präklinischen Entwicklung wurde durch die Translation von **4d** von den *in vitro* Effektivitätsdaten über *in vitro* Pharmakokinetik Studien bis hin zu ersten *in vivo* Studien im Mausmodell herausgestellt.

In diesen ersten *in vivo* Studien verringerte **4d** signifikant das Tumorstadium und unterstrich damit das Potential dieser HDACi-Klasse für weitere präklinische Entwicklung.

Die potente HDAC-Klasse I/IIb Enzyminhibition, die antileukämische Wirkung und die Toleranz gegenüber großen Resten in *para*-Position zum Thiazolring machen **4d** zu einem geeigneten HDAC-Modul für die Entwicklung von heterobifunktionellen Molekülen.

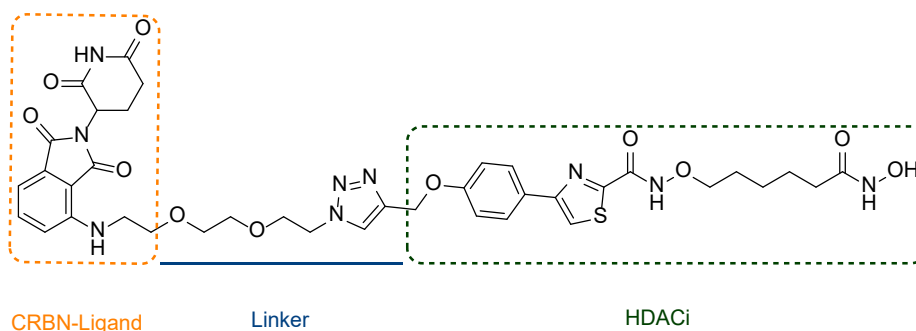
### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.2 Darstellung des HDAC-PROTACs 7

Potente HDACi können als Motiv in HDAC-PROTACs verwendet werden, um HDAC-Enzyme zu degradieren. Aufbauend auf den *in vitro* und *in vivo* Ergebnissen der HDACi wurde der HDACi **4d** auf seine Eignung als HDACi-Motiv für einen HDAC-PROTAC untersucht. Der HDACi interagiert in dem dreiteiligen HDAC-PROTAC Pharmakophor mit dem HDAC-Enzym und wird über einen Linker mit dem E3-Ligase-Liganden verbunden. In diesem Fall ist der E3-Ligase-Ligand ein Ligand der CRBN-Ligase.

Dieser HDAC-PROTAC wurde hinsichtlich seiner Degradationseffizienz und -selektivität untersucht.

##### 3.2.1 Zielstruktur und Retrosynthese des HDAC-PROTACs 7



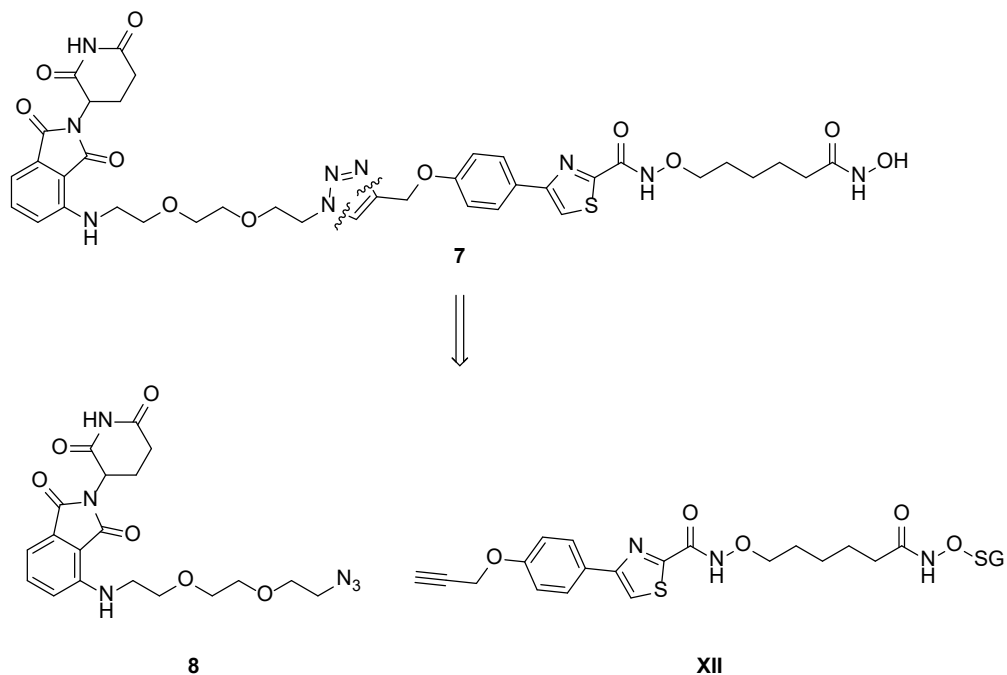
7

**Abbildung 14:** Die HDAC-PROTAC Zielstruktur 7. Der Cereblon (CRBN)-Ligand ist orange, der Linker blau und der HDACi grün markiert.

In der Zielstruktur **7** findet sich das typische dreigeteilte Pharmakophor eines HDAC-PROTACs wieder. Zum einen der HDACi, in diesem Fall ein Analogon der Verbindung **4d**, einem Triethylglykol-basierten Linker und einem E3-Ligase Liganden der E3-Ligase CRBN (Abbildung 14).

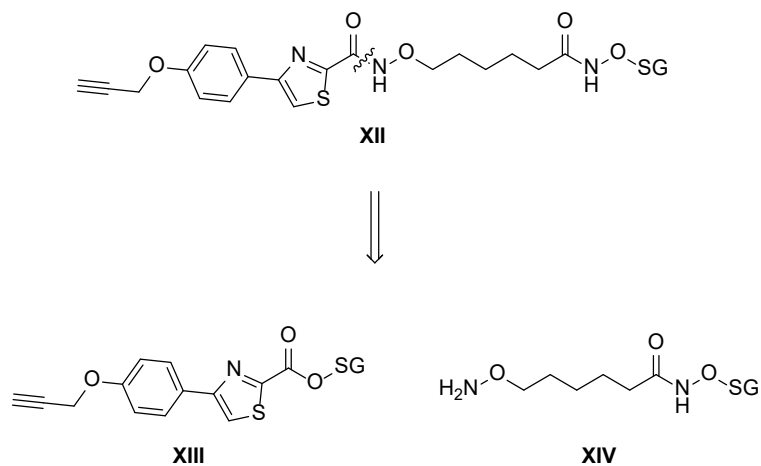
Die retrosynthetische Analyse liefert zunächst zwei Vorstufen: das Azid **8** und die O-geschützte Hydroxamsäure **XII** (Schema 1).

### 3. Ergebnisse und Diskussion



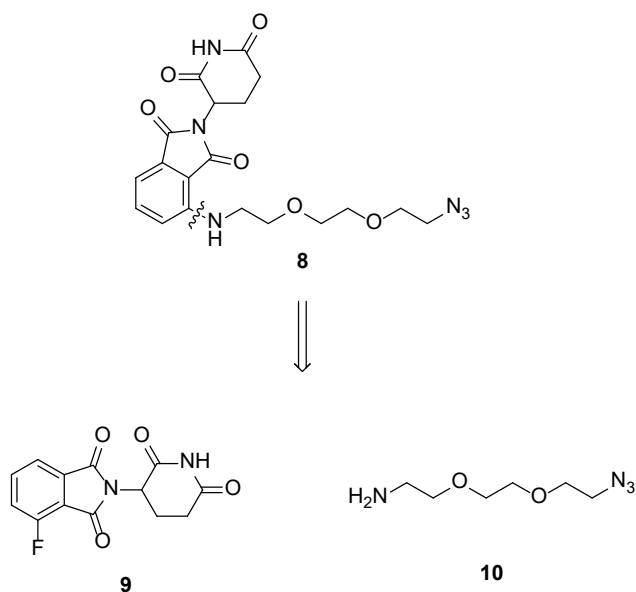
**Schema 1: Retrosynthetische Analyse des zentralen Triazols der Zielstruktur 7.**

Die O-geschützte Hydroxamsäure **XII** ist analog zu den HDACi-Inhibitoren **4a-4aa** retrosynthetisch in den propargylierten Phenylthiazolester **XIII** und den O-geschützten HDACi-Linker **XIV** (Schema 2) unterteilbar.



**Schema 2: Retrosynthetische Analyse des HDACi Liganden XII**

### 3. Ergebnisse und Diskussion

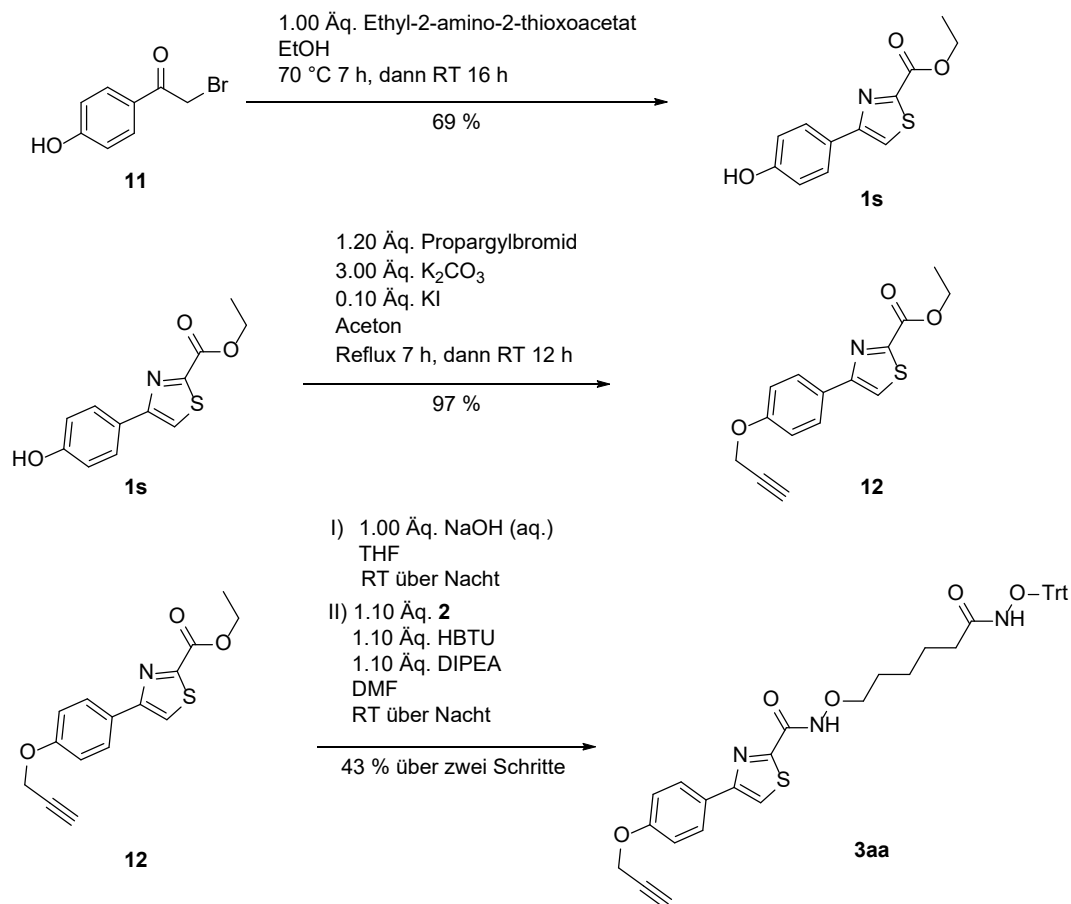


**Schema 3: Retrosynthetische Analyse des Cereblon-Linker Moleküls 8.**

Das Azid **8** ist durch die Phthalimid Struktur aus einer nukleophilen aromatischen Substitution ( $S_NAr$ ) synthetisch zugänglich. Der retrosynthetische Schnitt liefert den fluorierten CRBN-Liganden **9** und den Linker **10** (Schema 3).

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.2.2 Synthese des HDAC Liganden von 7

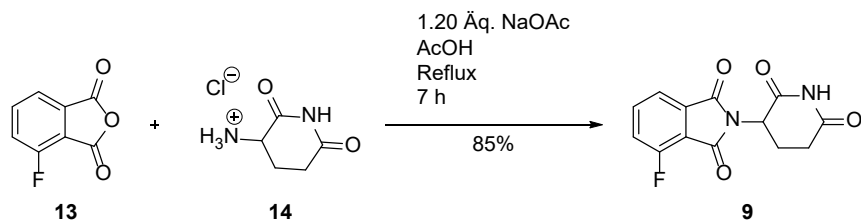


**Schema 4: Synthese des alkinylierten, O-trityl geschütztem HDACi 3aa.**

Die Synthese des HDACi-Motives startete mit der Darstellung des Phenylthiazols **1s** nach dem unter 3.1 beschriebenen Protokoll mit anschließender Propargylierung der phenolischen Hydroxygruppe unter Finkelstein-Bedingungen. Die propargylierte Verbindung **12** wurde dann nach dem Protokoll von Goodreid *et al.* mit dem Hydroxylamin-Linker **2** zu dem O-Trityl-geschütztem HDACi **3aa** umgesetzt.<sup>123</sup> Der geschützte HDACi **3aa** ist mit seiner Propargylether-Struktur der HDAC-Ligand des HDAC-PROTACs **7** inklusive eines kurzen Teil des Linkers (Schema 4).

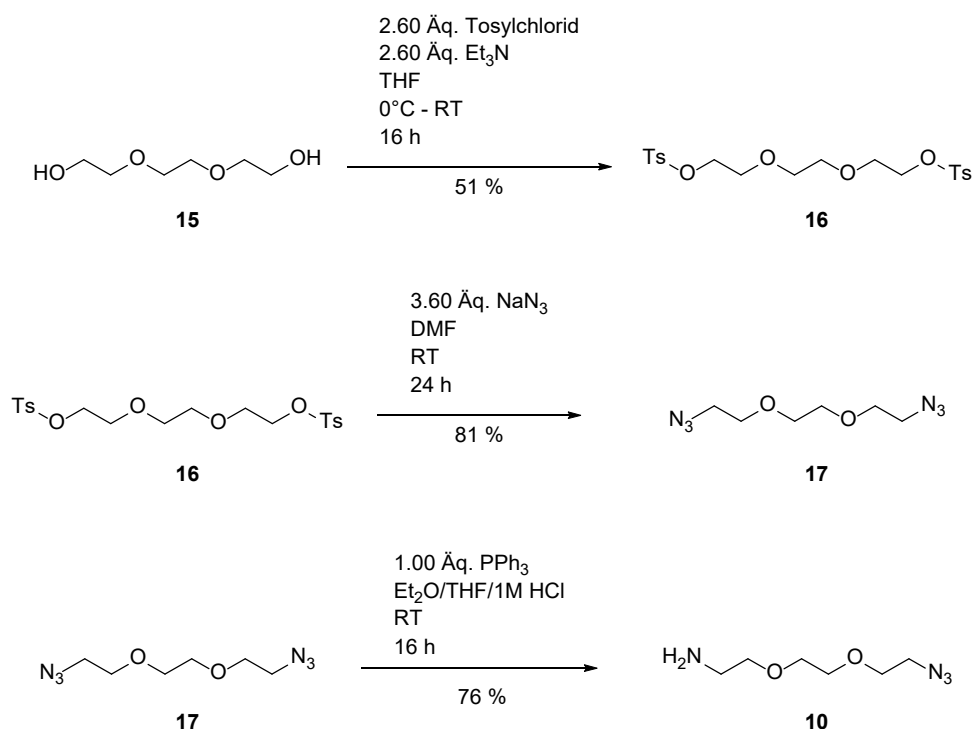
### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.2.3 Synthese des E3-Ligase Ligand-Linker Konstruktes **8**



**Schema 5: Synthese des Cereblon-Liganden **9**.**

Die Darstellung des fluorierten CRBN-Liganden nach der Vorschrift von Cheng *et al.* erfolgte durch die Reaktion zwischen den kommerziell erhältlichen Edukten 4-Fluorphthalsäureanhydrid **13** und 3-Aminopiperidin-2,6-dion Hydrochlorid **14** in refluxierendem Eisessig.<sup>124</sup> Anschließende Umkristallisation aus Ethanol/Dioxan lieferte den E3-Ligase Liganden **9** (Schema 5).

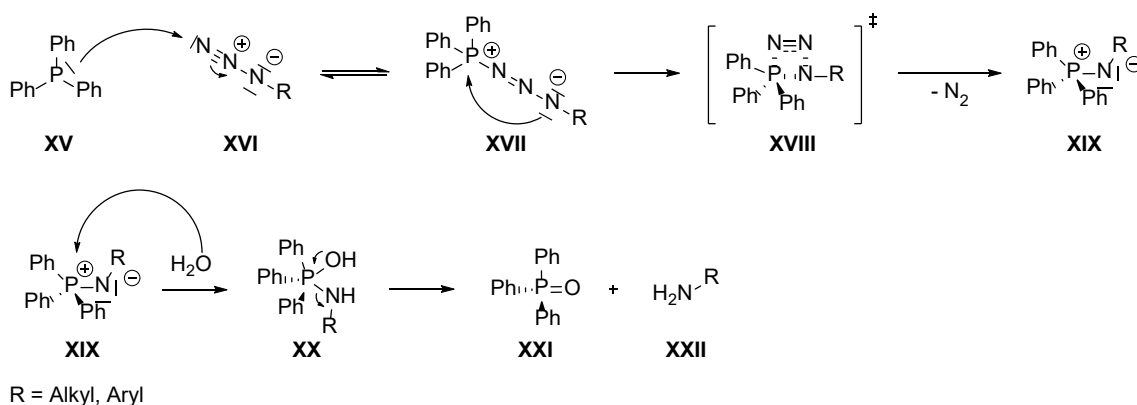


**Schema 6 Synthese des Linkers **10**.**

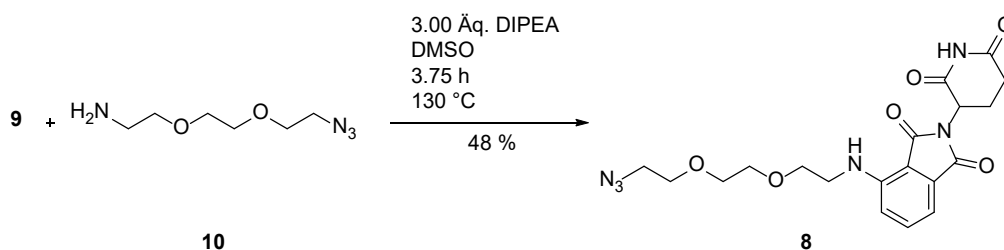
Die Synthese des Linkers **10** startete mit der Aktivierung der terminalen Alkoholgruppen des Triethylenglykols durch Veresterung mit Tosylchlorid. Das beidseitig tosylierte Intermediat **16** wurde flashchromatographisch isoliert, bevor die Tosylate durch Azide substituiert wurden (Schema 6). Die Staudinger-Reaktion erlaubt es, Azide als Vorstufe für Amine einzusetzen. Das erhaltene Bis-Azid **17** wurde dementsprechend in einer Staudinger-Reaktion zu dem

### 3. Ergebnisse und Diskussion

Mono-Amin-Linker **10** umgesetzt. Im ersten Schritt der Reaktion greift Triphenylphosphan (**XV**) nukleophil an das terminale Stickstoffatom des Azides (**XVI**) an. Das so gebildete Phosphazid **XVII** spaltet über einen viergliedrigen Übergangszustand (**XVIII**) molekularen Stickstoff ab. Das Produkt dieser intramolekularen Umlagerung ist das Azaylid **XIX**, welches nach Hydrolyse durch wässrige Säure Amin **XXII** freisetzt (Schema 7).<sup>125</sup>



**Schema 7: Mechanismus der Staudinger Reaktion.**

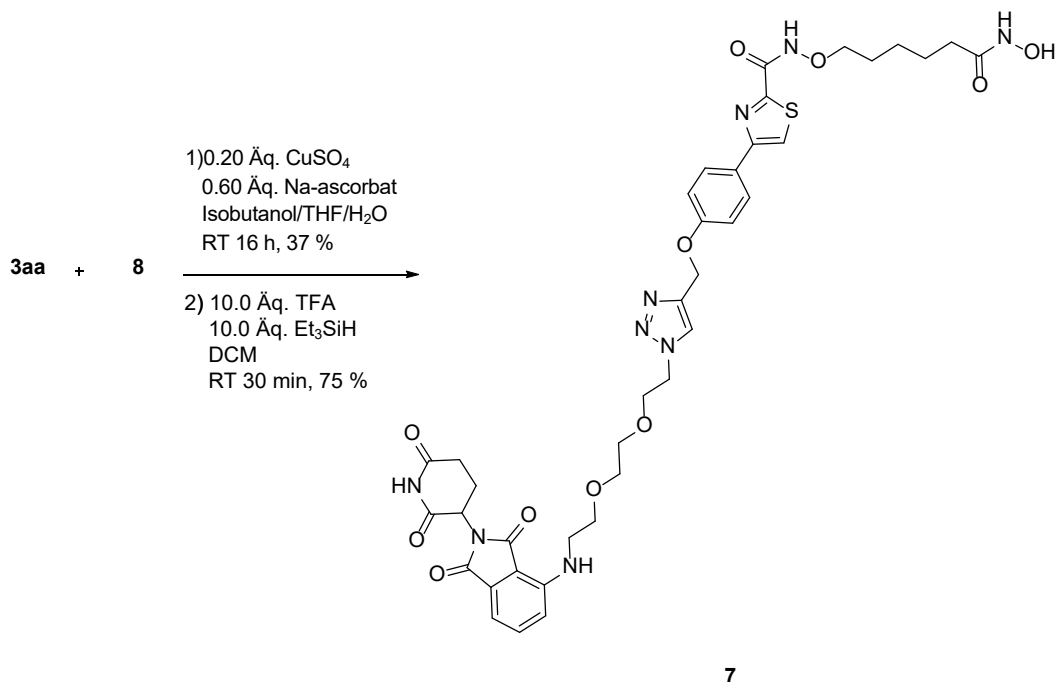


**Schema 8: Synthese des Cereblon-Ligand-Linker Konstruktes 8.**

Der fluorierte E3-Ligase Ligand **9** und der Amin-Linker **10** wurden nach dem Protokoll von Brownsey *et al.*<sup>126</sup> in einer  $S_NAr$  Reaktion zu dem Konstrukt **8** umgesetzt (Schema 8). Das Konstrukt **8** enthält mit dem Phthalimid-Teil den E3-Ligase-Liganden und mit dem Azid-Linker einen großen Teil des Linkers des späteren HDAC-PROTACs **7**.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.2.4 Synthese des PROTACs 7



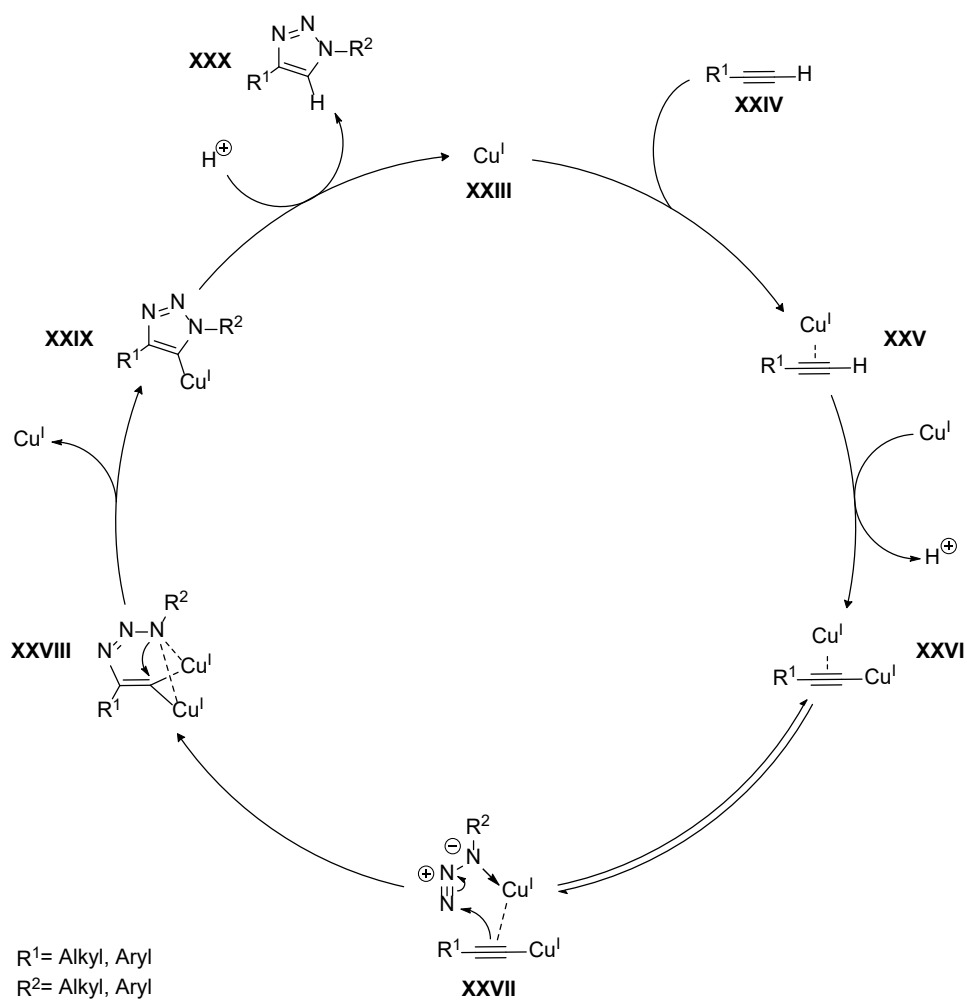
Schema 9: Synthese des HDAC-PROTAC 7.

Das Azid **8** und das Alkin **3aa** wurden in einer Kupfer-katalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) zu der *O*-Trityl geschützten Vorstufe **18** des PROTACs **7** umgesetzt (Schema 9). Die CuAAC toleriert viele verschiedene funktionelle Gruppen und ermöglicht unter milden und atomökonomischen Bedingungen die Synthese von 1,2,3-Triazolen. Bei dieser Reaktion aktivieren zwei Kupfer-[I]-Spezies die Dreifachbindung des terminalen Alkins (XXVI) für eine 1,3-dipolare Cycloaddition mit dem Azid. Der ursprünglich formulierte Mechanismus ging von einem Mechanismus unter Vermittlung eines Kupfer-Ions aus, mittlerweile konnte jedoch gezeigt werden, dass die Reaktion unter Katalyse von zwei Kupfer-Ionen erheblich schneller abläuft als die Reaktion mit Beteiligung nur eines Kupfer-Ions.<sup>127</sup> Jin et al. gelang es schließlich, Intermediate der Reaktion mit zwei beteiligten Kupfer-Ionen zu isolieren (Schema 10).<sup>128</sup>

Die TFA vermittelte Entschützung der *O*-Trityl-geschützten Hydroxamsäure lieferte den PROTAC **7** (Schema 9).



### 3. Ergebnisse und Diskussion



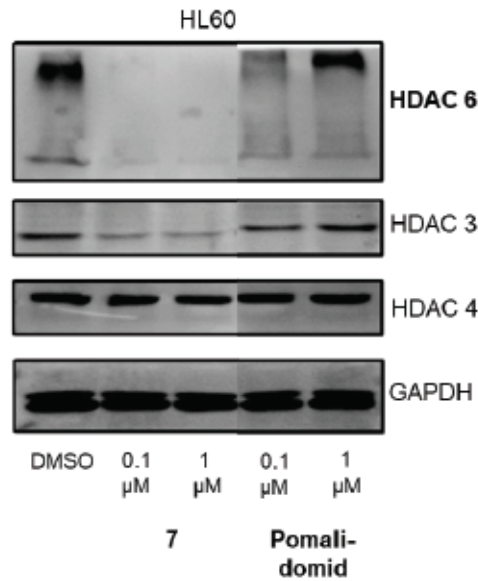
Schema 10: Mechanismus der Kupfer-katalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition.

#### 3.2.5 HDAC Degradation durch den HDAC-PROTAC **7**

Im HDAC-Enzym Assay wies der PROTAC **7** ein vergleichbares HDAC-Inhibitionsprofil wie die Leitstruktur **4a** auf. **7** inhibiert HDAC 2, einen Vertreter der HDAC-Klasse I, mit einem  $IC_{50}$  von 90 nM und HDAC 6, einen Vertreter der HDAC-Klasse IIb, mit einem  $IC_{50}$  von 30 nM. **7** zeigte keine Affinität zu HDAC 4, einem repräsentativen Enzym der Klasse IIa (Tabelle 5). Die vergrößerte Kopfgruppe von **7** im Vergleich zu **4a** verändert demnach weder die Affinität noch die Präferenz zu den inhibierten HDAC-Enzymen. Die Degradationseffizienz und -selektivität wurde durch Analyse der intrazellulären Proteinkonzentration von HDACs 3, 4 und 6 auf einem Western Blot gezeigt. In den HL60 Leukämiezellen induzierte **7** in submikromolaren Konzentrationen beinahe vollständigen HDAC 6-Abbau. In denselben Konzentrationen führte **7** zu keiner Degradation von HDAC 4 und nur zu einer schwachen Degradation von HDAC 3. **7** zeigt damit trotz vergleichbarer Affinität zu den HDAC-Enzymen eine Präferenz für den HDAC 6-Abbau. Die Pomalidomid-Kontrolle schloss aus, dass der CRBN-Ligand selbst zu einer Degradation von HDAC-Enzymen führt (Abbildung 15).

Die Western Blot Analyse bestätigt die Degradation von HDAC 6, kann aber keine Aussage zu der Kinetik der Degradation treffen. Die Degradationskinetik von **7** wurde im HiBiT-Assay untersucht. In diesem Assay wird in K562-Zellen das HDAC 6-Enzym zusammen mit einem elf Aminosäuren großem HiBiT-Protein und einem 18 kDa großem Protein LgBiT exprimiert. HiBiT bindet mit einer hohen Affinität zu LgBiT und der resultierende HiBiT-LgBiT-Komplex besitzt Luciferase-Aktivität. Die Luciferase-Aktivität liefert mit dem Substrat Fumarizin ein kontinuierliches Lumineszenz-Signal. Dabei ist das Lumineszenz-Signal proportional zu dem Level an HDAC 6-Protein in der Zelle und nimmt bei Degradation von HDAC 6 ab. In diesem Assay erreichte **7** das Degradationsmaximum nach circa neun Stunden und senkte den HDAC 6-Level auf circa 30 % des Ausgangswertes (Abbildung 16).

### 3. Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 15: HDAC 6 Degradation durch 7 in HL60 Zellen. n=3, Konzentration von 7= 0.25 μM. Der Western Blot der HL60 Zellen wurde durchgeführt von Julian Schliehe-Diecks aus der Arbeitsgruppe von Dr. Sanil Bhatia.**

**Tabelle 5: HDAC-Enzyminhibitionsprofil des HDAC-PROTACs 7 im Vergleich zu dem HDACi 4a. Es wurden zwei unabhängige Experimente mit jeweils zwei Replikaten durchgeführt. Mittelwert ± Standardabweichung. Die Daten wurden von Nadine Horstick und Lukas Biermann aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Matthias U. Kassack erhoben.**

Nr.	IC <sub>50</sub> (HDAC 2) [nM]	IC <sub>50</sub> (HDAC 4) [nM]	IC <sub>50</sub> (HDAC 6) [nM]	IC <sub>50</sub> (HDAC 8) [nM]
<b>4a</b>	140	>100.000	42	3700
<b>7</b>	90	>100.000	30	5700

### 3. Ergebnisse und Diskussion

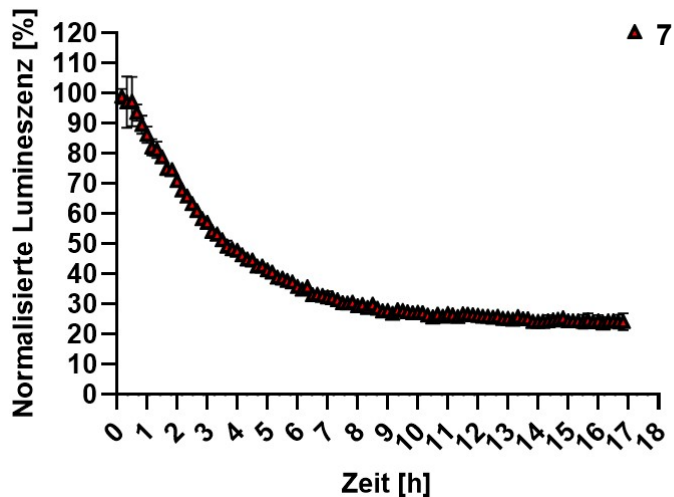


Abbildung 16: HDAC 6 Degradation durch den HDAC-PROTAC 7 in K562 Zellen. Die roten Dreiecke repräsentieren den HDAC 6 Spiegel relativ zu der Anfangsmenge an HDAC 6 und normalisiert zu der DMSO-Kontrolle. n=3. Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. Die Daten wurden von Julian Schliehe-Diecks aus der Arbeitsgruppe von Dr. Sanil Bhatia erhoben.

7 ist ein auf **4d** basierender HDAC-PROTAC mit einer submikromolaren Degradationsaktivität gegen HDAC 6. Dies macht 7 zu einem geeigneten PROTAC, um den Effekt einer HDAC 6-Degradation bei gleichzeitiger Hemmung der Klasse I/IIb Inhibitoren zu untersuchen. Durch den Vergleich von HDAC-PROTAC 7 und einem konventionellen Klasse I/IIb Inhibitor könnten die biochemischen Effekte einer HDAC 6-Inhibition mit denen einer HDAC 6-Degradation verglichen werden. Allein die Degradation von HDAC 6 ist in der Lage, die nicht-enzymatischen Funktionen dieses HDAC-Enzyms zu unterbrechen und würde einen indirekten Hinweis auf die biologische Relevanz der anderen Domänen, wie der Ubiquitin bindenden Domäne, liefern. Dieses Ergebnis würde Anhaltspunkte liefern, um den klinischen Erfolg der Klasse I/IIb Inhibitoren weiter zu verbessern.

### 3.3 HDAC-PROTACs mit nicht-kanonischen E3-Ligase Liganden

Der PROTAC **7** beinhaltet einen kanonischen E3-Ligase Liganden um die E3-Ligase CRBN zu rekrutieren. Nicht-kanonische E3-Ligase Liganden wurden bisher nicht in das HDAC-PROTAC Feld eingeführt, obwohl die Darstellung von HDAC-PROTACs mit nicht-kanonischen E3-Ligase Liganden, wie unter 1.4.3 beschrieben, das HDAC-PROTAC Feld signifikant erweitern würden. Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit die heterobifunktionellen Moleküle **19**, **20** und **24** als Prototypen für HDAC-PROTACs dargestellt, basierend auf vorher beschriebenen nicht-kanonischen E3-Ligase Modulen.

Li *et al.* beschrieben funktionale BRD4-PROTACs mit einem Indisulam-Analog als Motiv für die E3-Ligase DCAF15.<sup>109</sup> Aktuelle Ergebnisse stellen die Abhängigkeit dieser PROTACs von DCAF15 in Frage und schlagen einen neuen Mechanismus ähnlich aufgebauter PROTACs über die Bildung einer neuen BRD4-DCAF16/11 Interaktionsfläche vor.<sup>129</sup> Ob diese neue Bindungsmodalität auch für andere Zielmoleküle benutzt werden kann, bleibt abzuwarten und bildet die Rationale für die Entwicklung der heterobifunktionellen Moleküle **19** und **20**.

2019 beschrieben Zhang *et al.* einen kovalenten Liganden für die E3-Ligase DCAF16 und degradierten mit PROTACs basierend auf diesem Liganden FKBP12.<sup>110</sup> Auf kovalenten E3-Ligase-Liganden aufgebaute PROTACs profitieren von der stärkeren Bindung an die E3-Ligase. Diese verlängerte Interaktionszeit erhöht die Wahrscheinlichkeit der Bildung eines ternären Komplexes mit dem Substratprotein. Dieser Rationale steht hinter der Darstellung des potentiellen PROTACs **24** in dieser Arbeit.

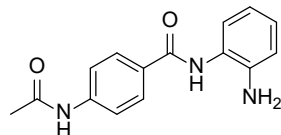
Für alle neuen HDAC-PROTAC-Zielstrukturen wurde als HDACi interagierender Part der HDACi CI-994 (auch: Tacedinalin) gewählt (**XXXI**, Abbildung 17).

CI-994 besitzt eine gute Selektivität zu HDAC 1, 2 und 3 im Vergleich zu den anderen HDAC-Enzymen.<sup>57</sup> Diese drei HDAC-Enzyme sind, wie oben beschrieben, von besonderem therapeutischen Interesse, außerdem sind HDAC 1 oder 2 durch die hohe Sequenzhomologie zueinander bisher mit konventionellen Inhibitoren nicht selektiv adressierbar.<sup>56,57,130</sup> CI-994 ist, wie viele *ortho*-Aminoanilid-basierte HDACi (s. Kap. 1.3.1), charakterisiert durch eine vergleichsweise langsame Bindung an das HDAC-Enzym in Kombination mit einer langsamen Abdiffusion.<sup>131</sup> Diese Eigenschaft kann theoretisch die Bildung eines ternären HDAC-PROTAC-E3-Ligase Komplexes fördern, indem der binäre HDAC-PROTAC-Komplex in einem längeren, ununterbrochenen Zeitraum vorliegt.

Im Vorfeld zeigten Smalley *et al.*, dass CI-994 erfolgreich als HDACi Motiv in HDAC-PROTACs verwendet werden kann.<sup>118</sup>

### 3. Ergebnisse und Diskussion

Die potentiellen HDAC-PROTACs **19**, **20** und **24** bestehen also aus einem von CI-994 abgeleiteten HDACi, einem Alkyl linker und einem rekrutierenden Element für die jeweilige DCAF-Ligase. Im Nachfolgenden werden die Zielstrukturen, die retrosynthetische Betrachtung und die Darstellung der heterobifunktionellen Moleküle **19**, **20** und **24** detailliert besprochen.

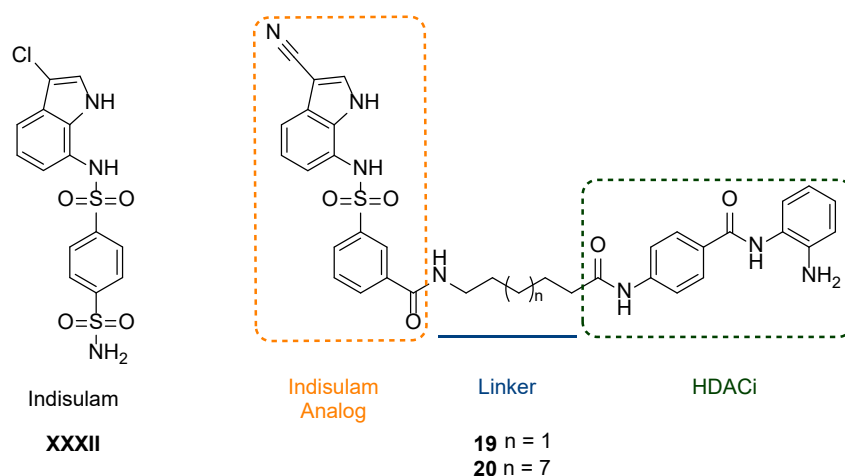


CI-994  
(Tacidenalin)  
**XXXI**

**Abbildung 17: Struktur des Klasse I selektiven HDAC-Inhibitors CI-994 (Tacidenalin, XXXI).**

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.3.1 Zielstrukturen und Retrosynthese der potentiellen PROTACs **19**, **20** und **24**

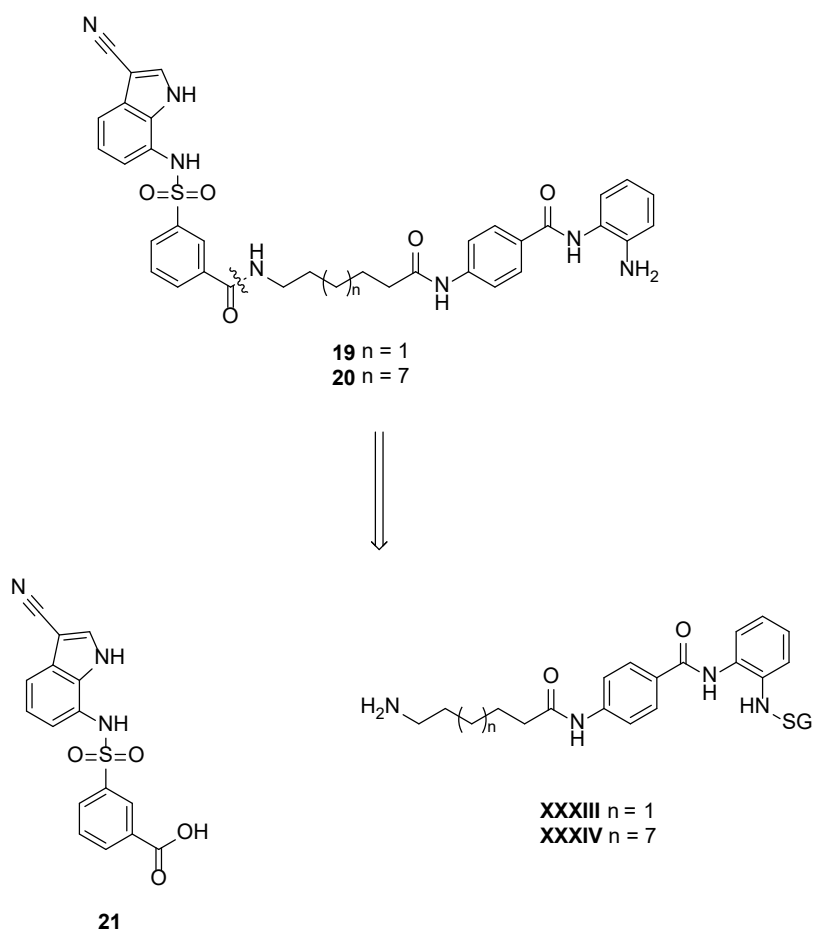


**Abbildung 18:** Indisulam **XXXII** und die HDAC-PROTAC Zielstrukturen **19** und **20**. In den Zielstrukturen **19** und **20** ist das Indisulam Analog orange, der Linker blau und der HDACi grün markiert.

Die heterobifunktionellen Moleküle **19** und **20** bestehen aus einem Indisulam Analog, einem Alkyllinker und dem HDACi CI-994. Dabei soll das Indisulam Analog mit einer oder mehreren DCAF-Ligasen interagieren und der CI-994 Part die HDAC-Enzyme 1, 2 und 3 rekrutieren. Beide Teile werden verbunden mit einem Alkyllinker in zwei verschiedenen Längen (Abbildung 18).

Die retrosynthetische Analyse liefert zunächst zwei Intermediate, das Indisulam-Analog **21** und das partiell geschützte HDACi-Motiv mit dem Linker in der jeweiligen Länge (**XXXIII**, **XXXIV**, Schema 11).

### 3. Ergebnisse und Diskussion

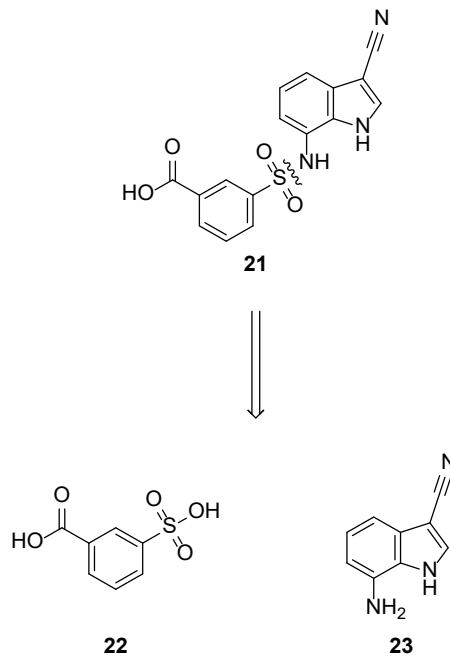


Schema 11: Retrosynthetische Analyse der Zielstrukturen 19 und 20.



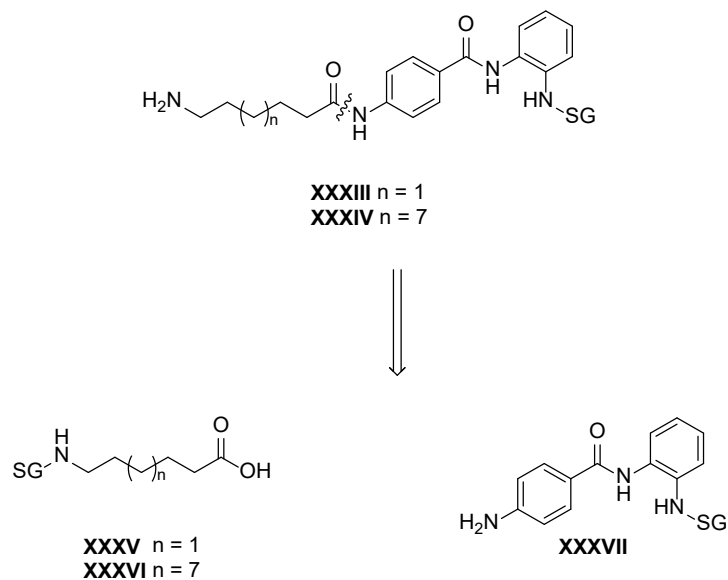
### 3. Ergebnisse und Diskussion

Das Indisulam Analog **21** ist darstellbar aus der Sulfonsäure **22** und dem Amino-Indol **23** (Schema 12).



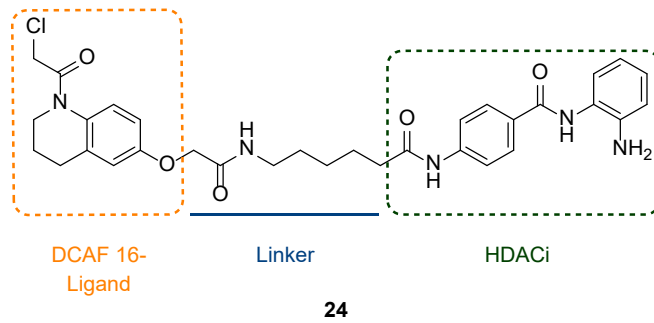
Schema 12: Retrosynthetische Analyse des Indisulam-Analoges **21**.

Die Synthese des geschützten HDACi kann aus den geschützten Aminosäuren **XXXV** und **XXXVI** und dem geschützten *ortho*-Aminoanilid **XXXVII** erfolgen (Schema 13).



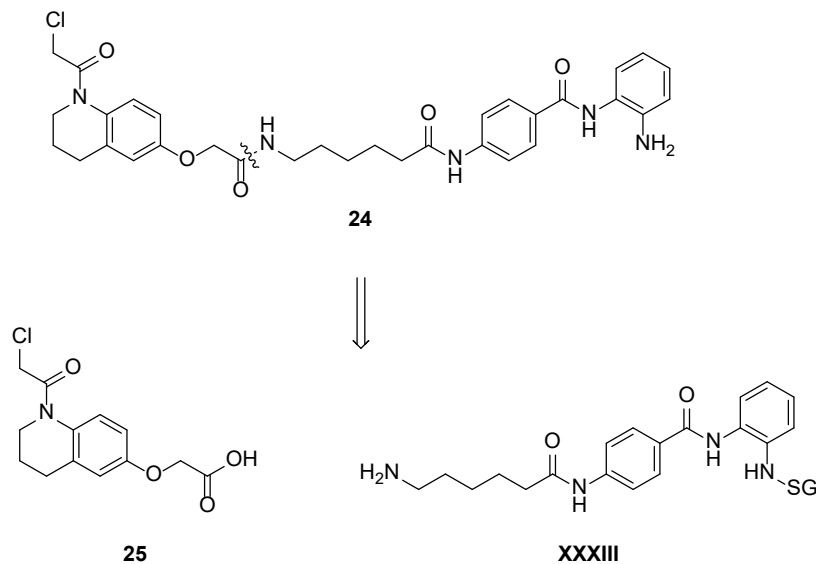
Schema 13: Retrosynthetische Analyse der HDACi-Linker Konstrukte **XXXIII** und **XXXIV**

### 3. Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 19:** Die Zielstruktur **24**. In der Zielstruktur **24** ist der DCAF 16 Ligand orange, der Linker blau und der HDACi grün markiert.

Der potentielle HDAC-PROTAC **24** soll über das chloracetylierte 1,2,3,4-Tetrahydrochinolin kovalent an die E3-Ligase DCAF16 binden. Der Alkyllinker und das HDACi-rekrutierende Motiv sind analog zu den potentiellen HDAC-PROTACs **19** und **20** (Abbildung 19).

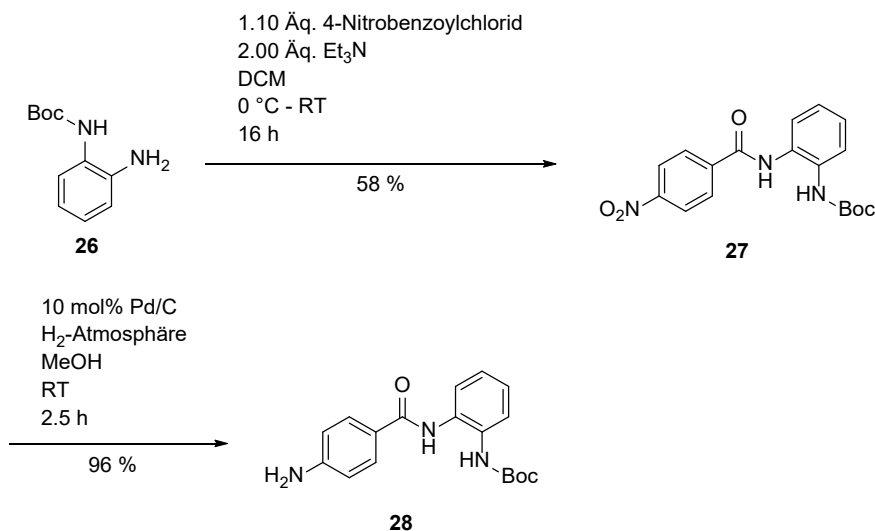


**Schema 14: Retrosynthetische Analyse der Zielstruktur 24.**

Die retrosynthetische Analyse liefert den E3-Ligase Liganden **25** und dasselbe HDACi-Linker Konstrukt **XXXIII** wie für die potentiellen HDAC-PROTACs **19** und **20** (Schema 14).

### 3. Ergebnisse und Diskussion

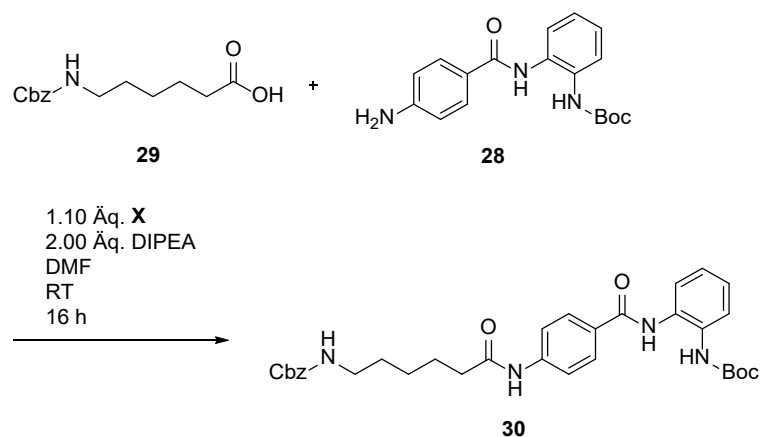
#### 3.3.2 Darstellung der HDACi Liganden



**Schema 15: Synthese des *N*-Boc-geschütztem HDACi-Fragmentes 28.**

Die Synthese des HDACi-Fragmentes **28** startete von einfach *N*-Boc-geschütztem Benzen-1,2-diamin **26**. Die Umsetzung mit 4-Nitrobenzoylchlorid nach der Vorschrift von Cao *et al.* lieferte das Produkt **27**.<sup>132</sup> Die Nitro-Gruppe von **27** wurde mit Palladium auf Aktivkohle unter Wasserstoff-Atmosphäre katalytisch reduziert, um das HDACi-Fragment **28** zu erhalten (Schema 15).

### 3. Ergebnisse und Diskussion



**Schema 16: Synthese des HDACi-Linker Konstruktes 30. X kennzeichnet das jeweilige Kupplungsreagenz in Tabelle 6.**

Die Verknüpfung des Linkers **29** mit dem HDACi-Fragment **28** stellt durch die geringe Nucleophilie des Anillins **28** eine Herausforderung dar (Schema 16). Mithilfe eines Kupplungsreagenzscreenings wurden fünf verschiedene Kupplungsreagenzien miteinander verglichen. Messgröße hierbei war der HPLC-Umsatz nach 16 h Reaktionszeit. Die erhaltenen Chromatogramme wurden zum einen nach dem Umsatz des Anillins **28** und zum anderen nach dem Anteil der AUC des Produktpeaks an der Gesamt-AUC im Chromatogramm ausgewertet. Im Vergleich der Kupplungsreagenzien liefert nur O-(7-Aza-benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HATU) befriedigende Umsätze. 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HBTU), 1-[(1-(Cyano-2-ethoxy-2-oxo-ethyliden-aminoxy)-dimethyl-amino-morpholino)]uronium-hexafluorophosphat (COMU), Carbonyldiimidazol (CDI) und 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimidhydrochlorid (EDC•HCl) zeigten keine relevanten Umsätze. (Tabelle 6)

Die Wiederholung des HATU-Ansatzes in einem größeren Maßstab bestätigte das Ergebnis des Kupplungsreagenzscreenings und lieferte das Produkt **30** in einer guten<sup>133</sup> Ausbeute (Tabelle 6).

### 3. Ergebnisse und Diskussion

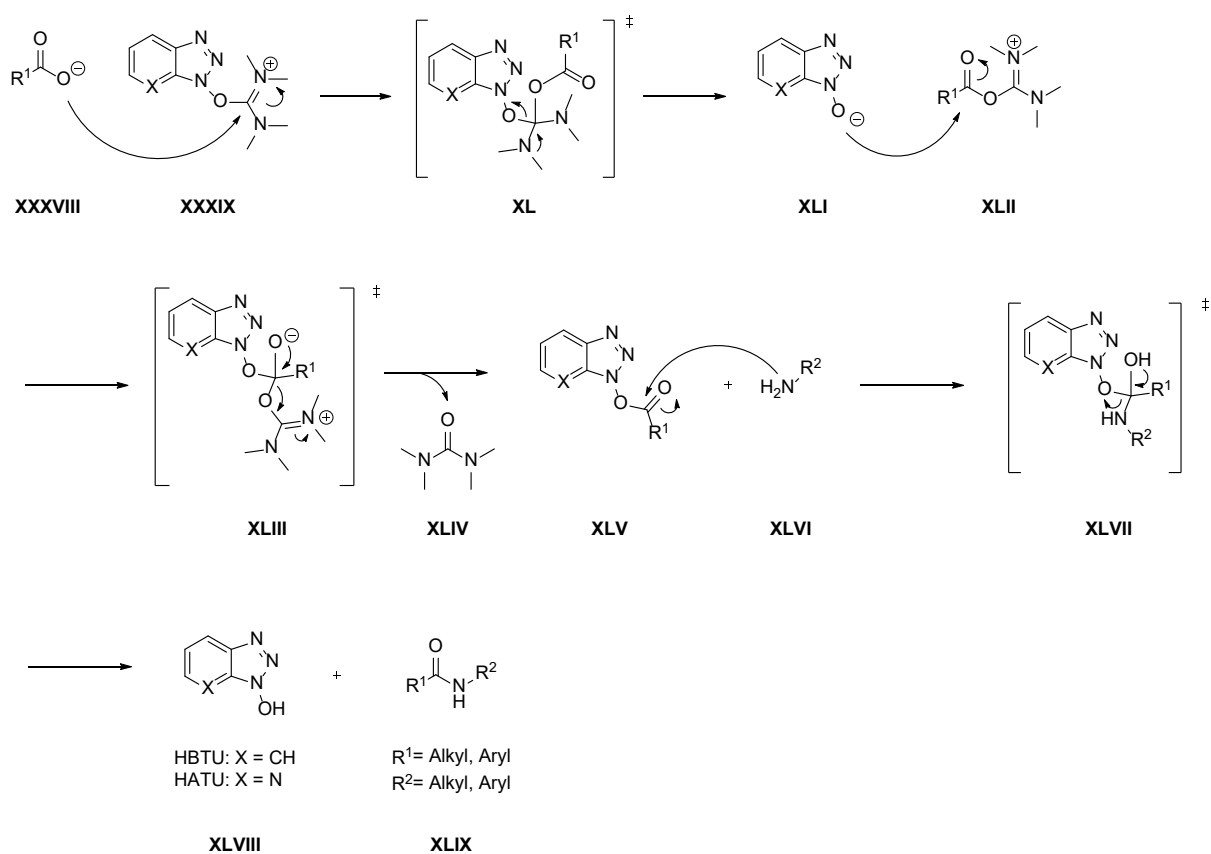
**Tabelle 6: Reaktionsoptimierung der Amidkupplung zwischen Anilin 28 und Säure 29. Die Aktivierungszeit nach der Zugabe des jeweiligen Kupplungsreagenzes zu der Säure 29 und DIPEA betrug 10 min.**

<div style="display: flex; align-items: center; justify-content: space-between;"> <div style="text-align: center;"> <p>28 + 29</p> <p>1.00 Äq.   1.00 Äq.</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>1.10 Äq. X 2.00 Äq. DIPEA 10.0 mL/mmol DMF RT 16 h</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>30</p> </div> </div>					
Ansatz- nummer	Ansatz- größe [mmol]	X	Verhältnis der AUC des Eduktpeaks zu der AUC des Produktpeaks 28:30	Anteil der AUC des Produktpeaks an der Gesamt AUC [%]	Isolierte Ausbeute [%]
a	0.1	HBTU	4.0 : 1.0	13	----
b	0.1	HATU	0.6 : 1.0	43	---
c	0.1	COMU	10.1 : 1.0	7	---
d*	0.1	CDI	32.3 : 1.0	3	---
e	0.1	EDC·HCl	13.3 : 1.0	6	---
f	3.0	HATU	0.2 : 1.0	57	57

\* In diesem Ansatz wurde kein DIPEA verwendet

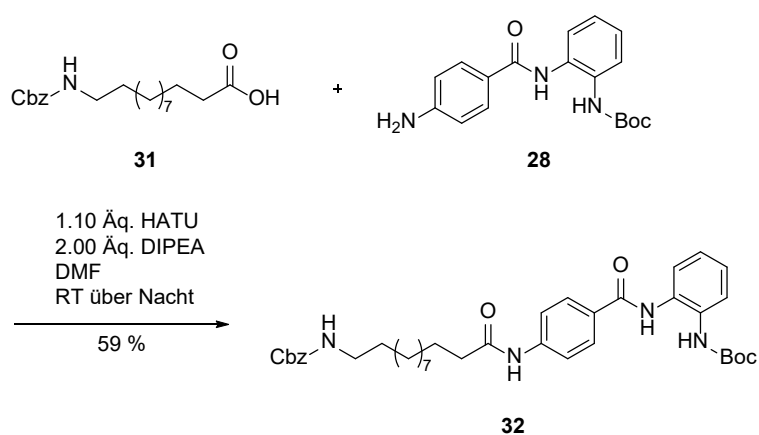
HATU und HBTU sind Derivate des 1-Hydroxybenzotriazols bzw. des 1-Hydroxy-7-aza-benzotriazols. Bei der Verwendung dieser Kupplungsreagenzien entstehen äquimolare Mengen an 1-Hydroxybenzotriazol oder 1-Hydroxy-7-aza-benzotriazol. (Schema 17) Durch deren UV-Absorptionseigenschaften bei der Messwellenlänge von 254 nm geben diese Nebenprodukte einen Peak im HPLC Chromatogramm und führen deswegen zu einer systematischen niedrigeren Einschätzung des relativen Anteils des Produktpeaks bei Verwendung dieser Kupplungsreagenzien (Spalte 5 der Tabelle 6).

### 3. Ergebnisse und Diskussion



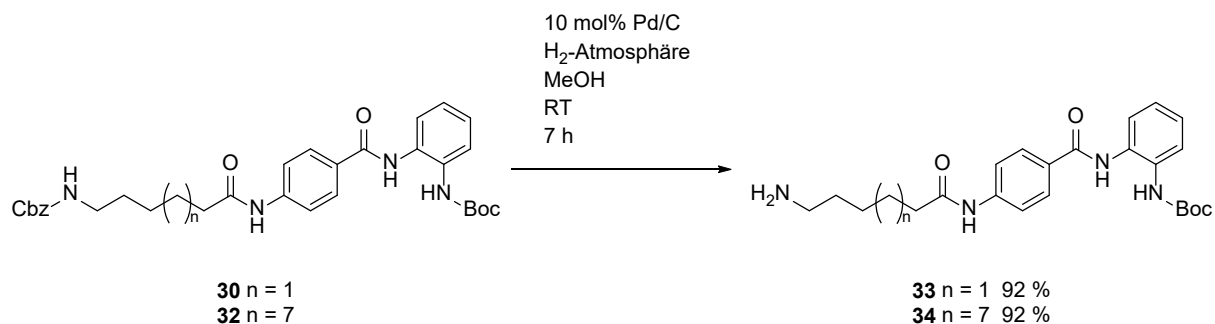
**Schema 17: Reaktionsmechanismus einer HATU-medierten Amidkupplung.**

Die HATU-medierte Amidkupplung erwies sich als robust für die Darstellung des im Vergleich zu **30** verlängerten Derivates **32** (Schema 18).



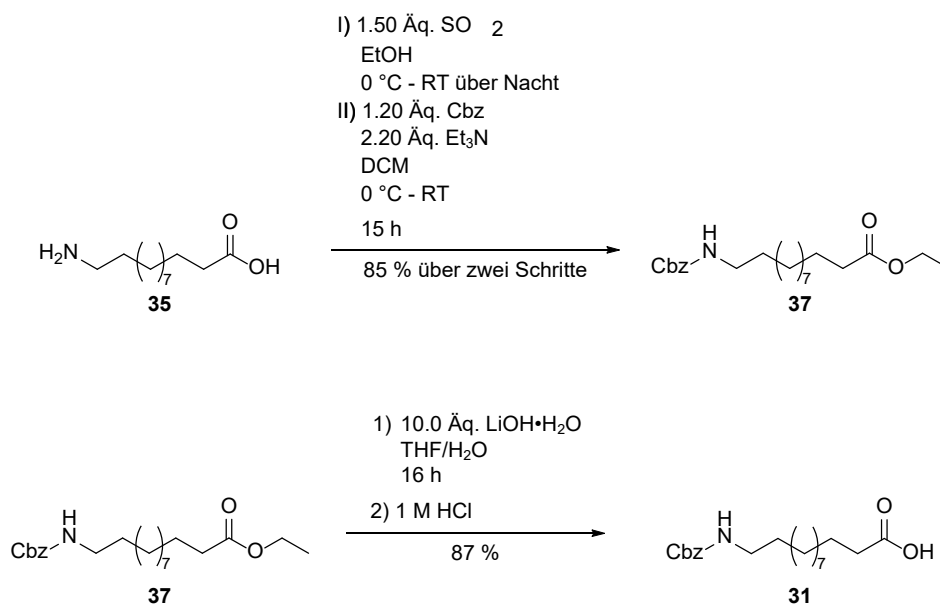
**Schema 18: Synthese des HDACi-Linker Konstruktes **32** mit optimierten Reaktionsbedingungen.**

### 3. Ergebnisse und Diskussion



**Schema 19: Entfernung der Cbz-Schutzgruppe zu den HDACi-Linker-Konstrukten 33 und 34.**

Die hydrogenolytische Entfernung der Cbz-Schutzgruppe lieferte bei beiden Intermediaten exzellente<sup>133</sup> Ausbeuten (Schema 19).

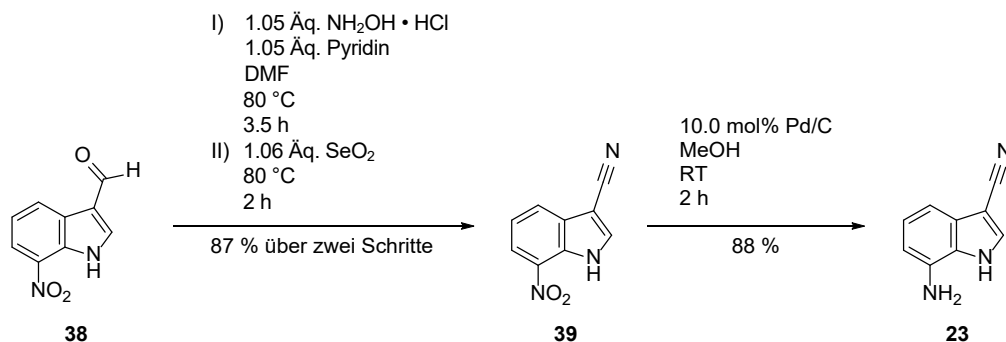


**Schema 20: Synthese des Linkers 31.**

Die 12-(Cbz-amino)-dodecansäure **31** ist im Gegensatz zu der 6-(Cbz-amino)-hexansäure **29** nicht kommerziell erhältlich. Die Darstellung erfolgte nach Thionylchlorid medierter Veresterung der Carbonsäure und anschließender Cbz-Schützung der Aminogruppe (**37**). Hydrolyse des Ethylesters lieferte die *N*-Cbz-geschützte Aminosäure **31** (Schema 20).

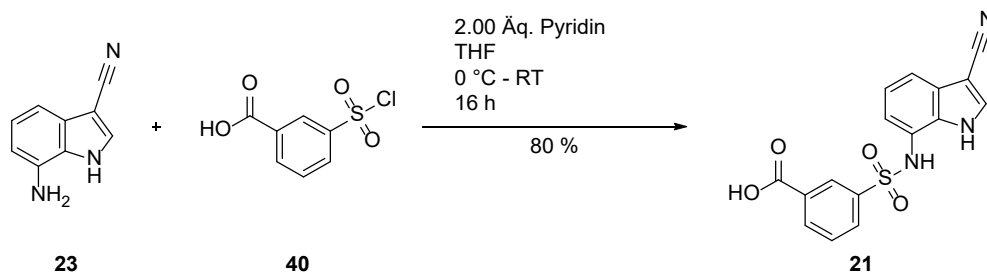
### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.3.3 Synthese der E3-Ligase Module



**Schema 21** Synthese des Amino-Indols **23**.

Die Synthese des kommerziell nicht erhältlichen Aminoindols **23** startete ausgehend von der Nitroverbindung **39** nach der Vorschrift von Owa *et al.*<sup>134</sup> Im ersten Syntheseschritt wurde die Aldehyd Funktionalität über die nicht isolierte Zwischenstufe eines Aldoxims zu einem Nitril dehydratisiert. Das entstehende 7-Nitroindol **39** wurde anschließend katalytisch hydriert, um die Zwischenstufe **23** zu erhalten. (Schema 21).

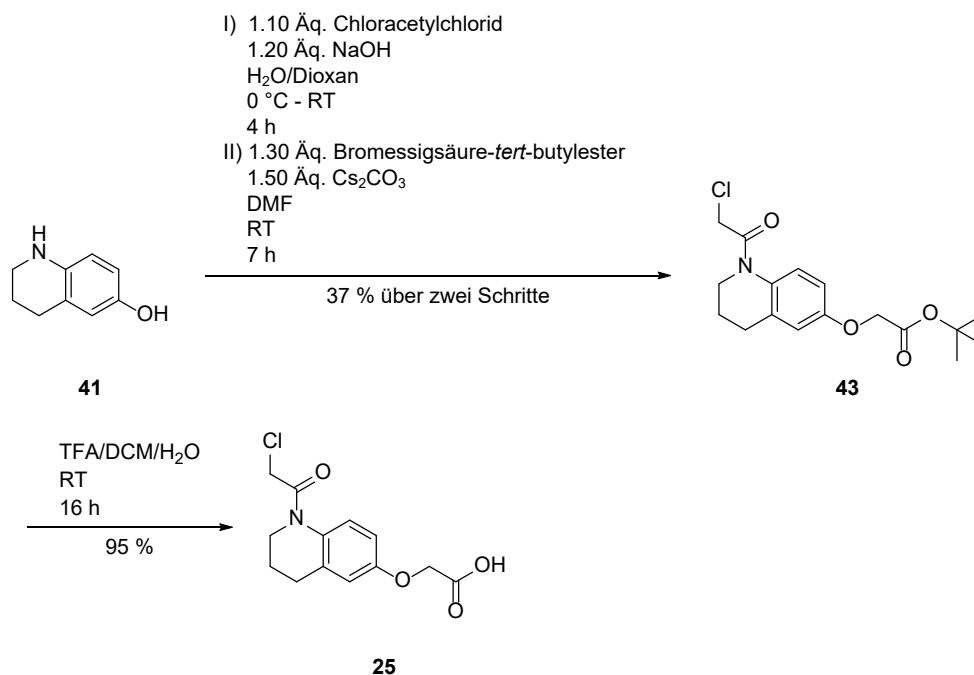


**Schema 22: Synthese des Indisulam-Analoges 21.**

Die Zwischenstufe **23** wurde anschließend mit kommerziell erhältlicher 3-(Chlorsulfonyl)benzoesäure **40** zu dem E3-Ligase Liganden **21** umgesetzt (Schema 22).



### 3. Ergebnisse und Diskussion



**Schema 23: Synthese des DCAF 16-Liganden 25.**

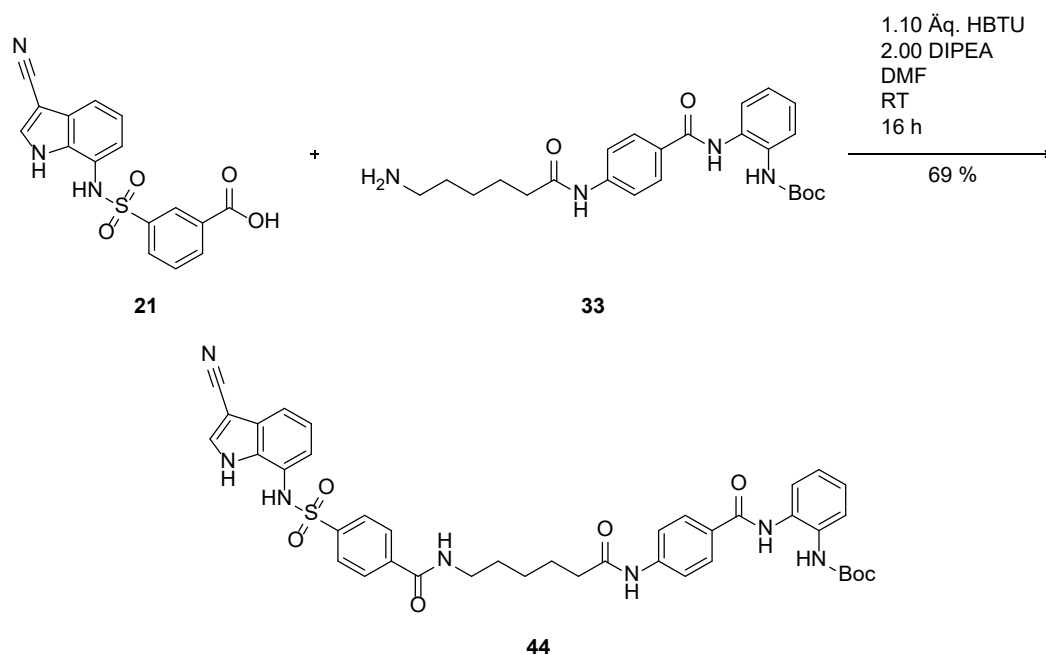
Die Synthese des E3-Ligase Liganden **25** erfolgte nach der Vorschrift von Zhang *et al.*<sup>110</sup> Ausgehend von dem kommerziell erhältlichen Hydroxy-tetrahydrochinolin **41** wurde zunächst der Chloracetylrest eingeführt. Anschließend erfolgte die Veretherung der phenolischen Hydroxygruppe mit Bromessigsäure-*tert*-butylester. Spaltung des *tert*-Butylesters **43** unter sauren Bedingungen lieferte den E3-Ligase-Liganden **25** (Schema 23).

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.3.4 Synthese der potentiellen PROTACs **19**, **20** und **24**

Die letzten Schritte in der Synthese der potentiellen HDAC-PROTACs **19**, **20** und **24** bestehen in einer zentralen Amidkupplung um die HDACi-Linker Konstrukte **33** und **34** mit den jeweiligen E3-ligase Liganden **21** oder **25** zu verbinden (Schema 24, Schema 25, Schema 28), und in einer anschließenden Entschützung des *N*-Boc-geschützten *ortho*-Aminoanilids (Schema 27, Schema 31).

##### 3.3.4.1 Synthese der potentiellen PROTACs **19** und **20**



**Schema 24: Synthese der *N*-Boc geschützten Zielstruktur **44** aus dem Indisulam-Analog **21** und dem HDACi-Linker Konstrukt **33**.**

Für die Amidkupplung zu der PROTAC Vorstufe **44** wurde analog zu Tabelle 6 ein Screening von fünf verschiedenen Kupplungsreagenzien durchgeführt. In diesem Screening war HBTU bezogen auf den Eduktumsatz und dem Anteil des Produktpeaks an der Gesamt-AUC das beste Kupplungsreagenz. Dieses Ergebnis ließ sich auf einen größeren Ansatz übertragen und lieferte eine gute<sup>133</sup> Ausbeute. Tabelle 7 zeigt die Übersicht über das Kupplungsreagenzscreening. Spalte 5 zeigt dabei den reinen Eduktumsatz, während Spalte 6 den Anteil der Produktpeaks an der Gesamt-AUC darstellt. Wie oben zu Tabelle 6 beschrieben, ist der Anteil der AUC des Produktpeaks an der Gesamt-AUC beeinflusst von der Art des verwendeten Kupplungsreagenzes (Tabelle 7).

### 3. Ergebnisse und Diskussion

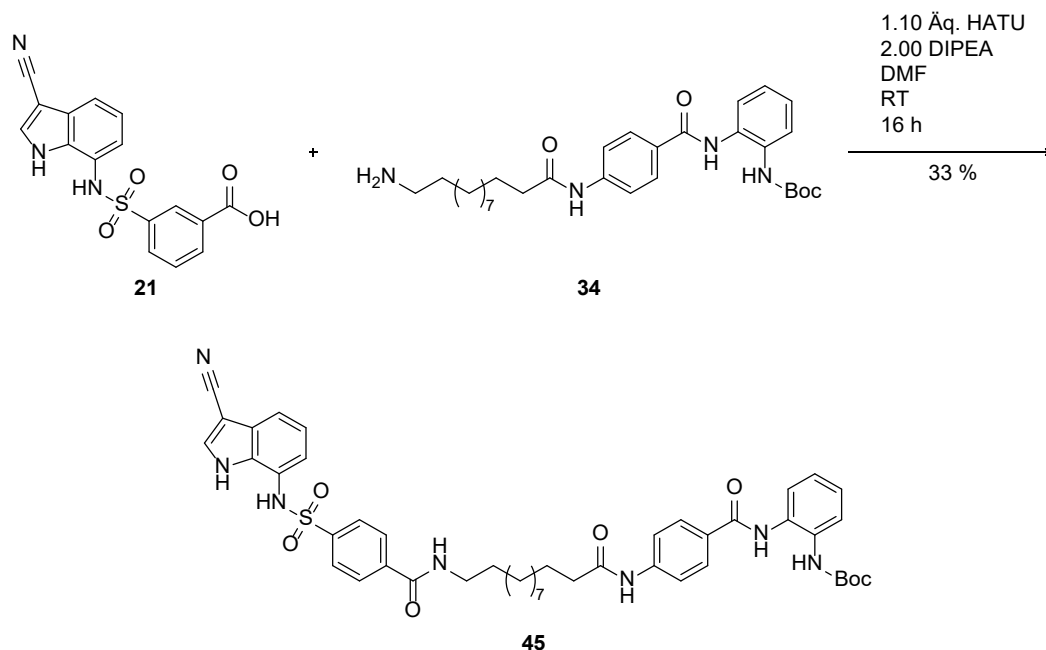
**Tabelle 7: Reaktionsoptimierung der Amidkupplung zwischen dem Indisulam-Analog 21 und dem HDACi-Linker Konstrukt 33. Die Aktivierungszeit nach der Zugabe des Kupplungsreagenzes zu 21 und DIPEA betrug 10 min.**

<p> </p>					
Ansatz- nummer	Ansatz- größe [mmol]	X	Verhältnis der AUC der Eduktpeaks zu der AUC des Produktpeaks 33:21:44	Anteil der AUC des Produktpeaks an der Gesamt AUC [%]	Isolierte Ausbeute [%]
a	0.05	HBTU	0.1 : 0.0 : 1.0	72	----
b	0.05	HATU	0.2 : 0.2 : 1.0	55	---
c	0.05	COMU	0.3 : 0.3 : 1.0	41	---
d	0.05	CDI	2.6 : 2.0 : 1.0	12	---
e	0.05	EDC•HCl	2.7 : 7.4 : 1.0	8	---
f	0.50	HBTU	0.0 : 0.0 : 1.0	75	69

\* In diesem Ansatz wurde kein DIPEA verwendet.

Die PROTAC-Vorstufe mit längerem Alkyllinker **45** wurde in analoger Weise zu **44** durch eine HATU-medierte Amidkupplung erhalten (Schema 25).

### 3. Ergebnisse und Diskussion

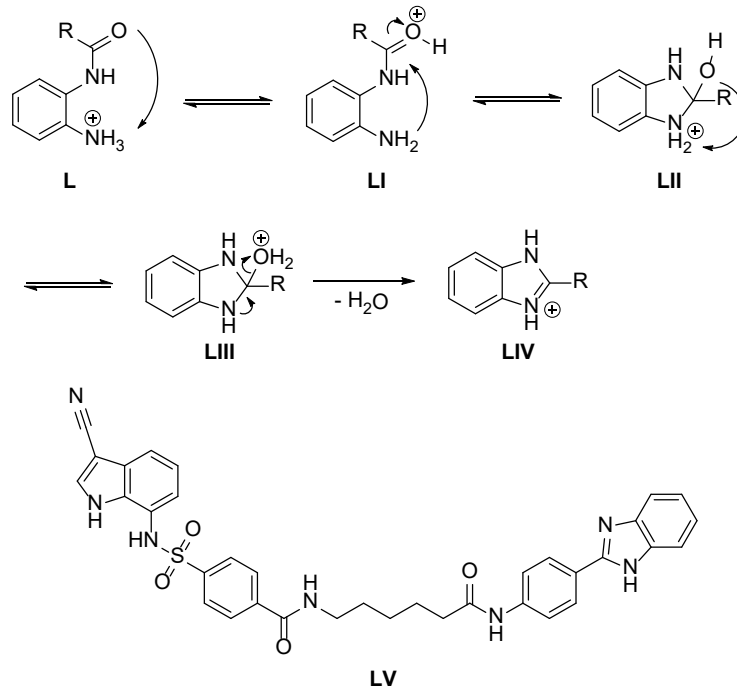


**Schema 25: Synthese der *N*-Boc geschützten Zielstruktur 45 aus dem Indisulam-Analog 21 und dem HDACi-Linker Konstrukt 34.**

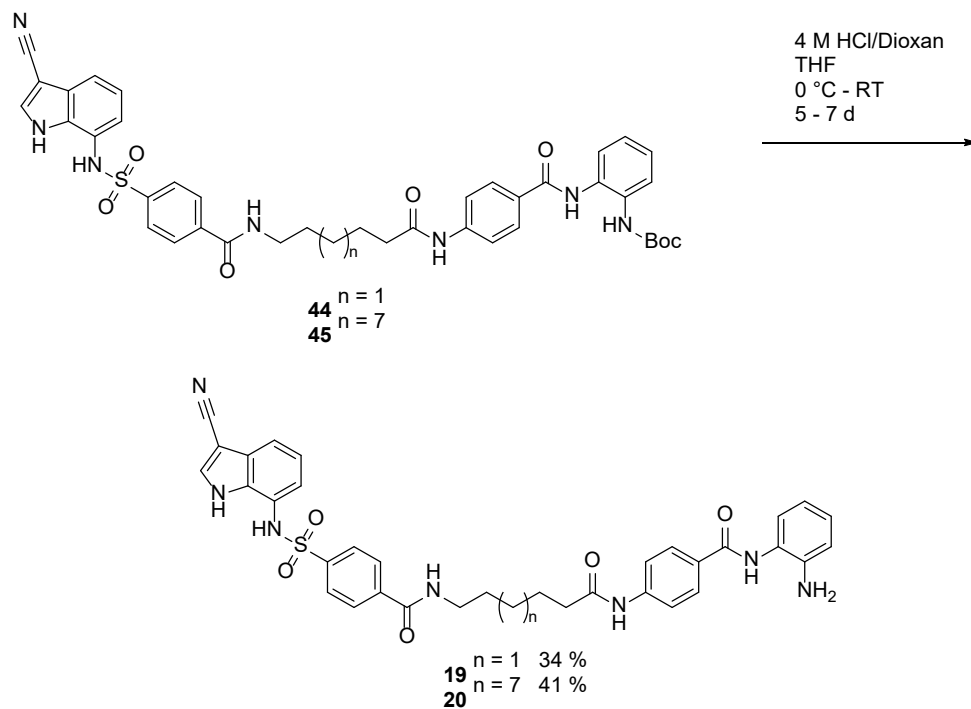
Die *N*-Boc-Entschützung zu den potentiellen PROTACs **19** und **20** wurde mit 4 M Hydrogenchlorid in 1,4-Dioxan und fünf bis sieben Tagen Reaktionszeit durchgeführt (Schema 27). Die geringen Ausbeuten der *N*-Boc-Entschützungen erklären sich teilweise durch die Bildung von Benzimidazolen unter sauren Bedingungen aus mono-*N*-acylierten *ortho*-Dianilinen. Dabei schließt sich an die *N*-Boc-Entschützung eine säurekatalysierte Dehydratisierung des *ortho*-Aminoanilides **L** an. Ein möglicher Mechanismus ist in Schema 26 dargestellt. Das gebildete Nebenprodukt **LV** wurde durch LC-MS-Untersuchung bestätigt und ist durch seine strukturelle Ähnlichkeit zu dem entschützten *ortho*-Aminoanilid nur schwierig abzutrennen. Diese Reaktion wurde unter ähnlichen Bedingungen von anderen Autoren forciert, um *N*-Acyl-*N'*-Boc-dianilide als Precursor für 2-substituierte Benzimidazole zu verwenden.<sup>135,136</sup>

Die flashchromatographische Aufreinigung mit Acetonitril/Wasser als Eluenten lieferte die potentiellen PROTACs **19** und **20**. Diese potentiellen PROTACs bestehen aus einem Liganden für DCAF-Ligasen, einem Alkyllinker und einem CI-994-Analog als HDACi-Motiv.

### 3. Ergebnisse und Diskussion



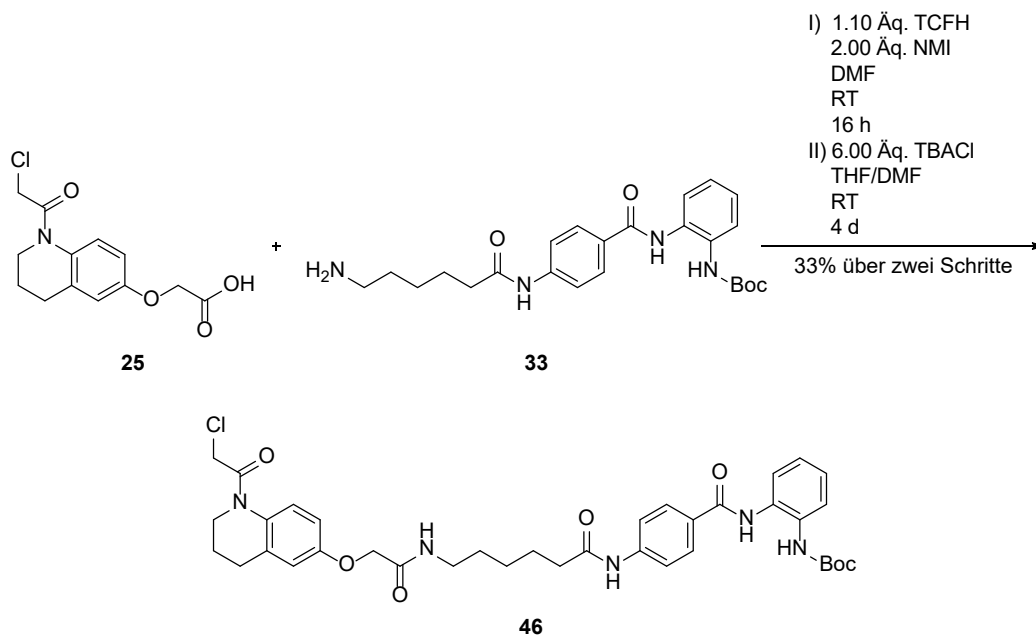
Schema 26: Möglicher Mechanismus der Bildung des Nebenproduktes LV durch die Dehydratisierung von *ortho*-Aminoaniliden unter sauren Bedingungen.



Schema 27: Synthese der Zielstrukturen **19** und **20** durch Entschützung der *N*-Boc-Gruppe von **44** und **45**.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.3.4.2 Synthese des potentiellen PROTACs **24**

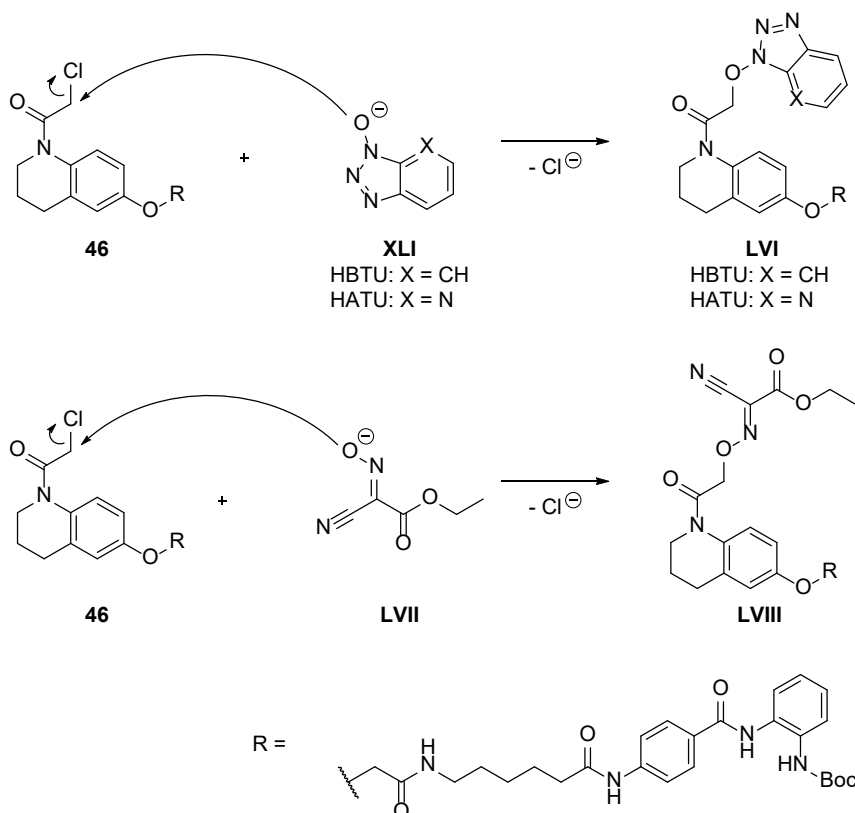


**Schema 28: Synthese der *N*-Boc geschützten Zielstruktur **46** aus dem DCAF 16-Liganden **25** und dem HDACi-Linker Konstrukt **33**.**

Für die Verknüpfung des E3-Ligase Liganden **25** mit dem Linker-HDACi-Konstrukt **33** (Schema 28) wurde ähnlich zu den potentiellen PROTACs **44** und **45** ein Kupplungsreagenzscreening durchgeführt. Der initiale Vergleich von fünf Kupplungsreagenzien mit je zwei Äquivalenten *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) lieferte für die Kupplungsreagenzien CDI und EDC•HCl nur schlechte Edukturnsätze und kein eindeutig identifizierbares Hauptprodukt. Die Kupplungsreagenzien COMU, HATU und HBTU zeigten dagegen beinahe kompletten Edukturnsatz und einen definierten Hauptpeak (Tabelle 8 **a,c,d**). In keinem der drei Fälle entsprach die Masse des Hauptproduktes dem gewünschten Produkt **46**, sondern der Masse eines Adduktes aus der nukleophilen Abgangsgruppe des jeweiligen Kupplungsreagenzes mit dem Chloracetylrestes des Produktes. Schema 29 veranschaulicht die Substitution des Chlors durch das nukleophile Oxim des COMU bzw. durch die Hydroxytriazole des HATU oder HBTU. Die Bildung des Kupplungsreagenz-Adduktes hängt dabei direkt von der Nukleophilie der Abgangsgruppe des Kupplungsreagenzes ab. In einem Experiment mit dem Kupplungsreagenz HBTU und nur einem Äquivalent DIPEA wurde der Anteil an HBTU-Addukt gegenüber dem gewünschten Produkt stark verringert (Tabelle 8 **b**). Zurückzuführen ist dies darauf, dass ein geringerer Zusatz an DIPEA zu weniger deprotoniertem 1-Hydroxybenzotriazol führt und damit die Nukleophilie des 1-Hydroxybenzotriazols abgeschwächt wird. Eine möglichst hohe

### 3. Ergebnisse und Diskussion

Produktausbeute kann damit nur durch ein Kupplungsreagenz mit einer möglichst schwach nukleophilen Abgangsgruppe erreicht werden. EDC•HCl ist ein Kupplungsreagenz ohne eine nukleophile Abgangsgruppe, allerdings lieferte die Reaktion unter Beteiligung von EDC•HCl selbst mit einer erhöhten Aktivierungszeit der Säure nur schlechte Edukturnsätze und kein identifizierbares Hauptprodukt (Tabelle 8 f,g).

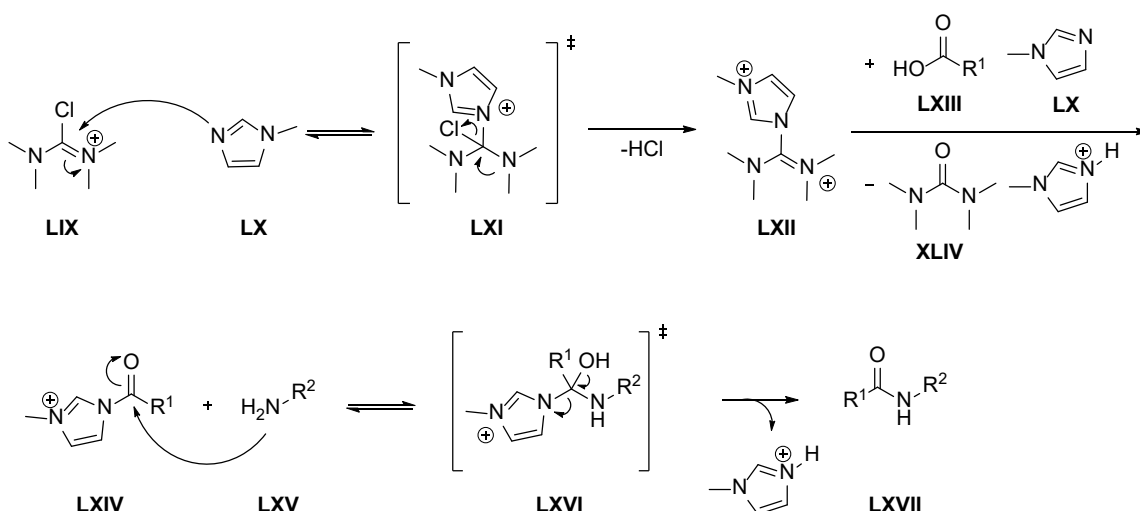


**Schema 29: Substitution des Chlors durch Kupplungsreagenz-Nukleophile. Oben: Substitution des Chlors durch das 1-Hydroxybenzotriazol des HBTUs oder das 1-Hydroxy-7-aza-benzotriazol des HATUs. Unten: Substitution des Chlors durch das Oxim des COMUs.**

### 3. Ergebnisse und Diskussion

Chlor-*N,N,N',N'*-tetramethylformamidinium-hexafluorosphat (TCFH) ist ein Kupplungsreagenz mit Chlorid als wenig nukleophiler Abgangsgruppe. TCFH selbst aktiviert im ersten Schritt *N*-Methylimidazol (NMI), bevor dieses über das Dikation **LXII** mit der eingesetzten Säure **LXIII** das Imidazolid **LXIV** bildet. Das Imidazolid **LXIV** reagiert dann mit dem Amin **LXV** zu dem Amid **LXVII**. Die Aktivierung der Säure mit TCFH und NMI hat den Vorteil, dass das NMI, eine gute Base, selbst aber nur ein schwaches Nukleophil ist (Schema 30).<sup>137</sup>

Das Reaktionsscreening mit TCFH und NMI lieferte mit drei Äquivalenten NMI vollständigen Eduktumsatz bei gutem Produkt zu Addukt-Verhältnis. Zudem ist das Verhältnis von Produkt zu Addukt deutlich unabhängiger von den eingesetzten NMI-Äquivalenten als in dem System HBTU-DIPEA (Tabelle 9 i,j,k). Das Wiederholen der besten Reaktionsbedingungen im größeren Maßstab bestätigte den sehr guten Eduktumsatz bei leichter Verschlechterung des Produkt/Addukt Verhältnisses (Tabelle 9 I).



**Schema 30: Reaktionsmechanismus einer TCFH-medierten Amidkupplung nach Beutner *et al.***<sup>137</sup>

Da trotz der optimierten Bedingungen ein erheblicher Teil des NMI-Adduktes gebildet wurde, wurde die Möglichkeit der direkten Substitution des NMI-Adduktes mit Chlorid-Ionen untersucht. Für *N*-Hydroxybenzotriazol-Addukte wurde diese Substitution erfolgreich durchgeführt, allerdings unter sauren Bedingungen oder unter der Verwendung von Acetylchlorid als Chlorid-Quelle.<sup>138,139</sup> In einem kleinen Ansatz verbesserte sich durch die Zugabe von drei Äquivalenten Tetrabutylammoniumchlorid (TBACl) und Rühren bei Raumtemperatur über 24 h das Verhältnis von Produkt zu Addukt leicht gegenüber den Ausgangsbedingungen. Dieses Verhältnis blieb über die weitere Reaktionszeit stabil. Diese Bedingungen ließen sich nicht in einem größeren Maßstab reproduzieren. Auch die weitere Erhöhung der Chlorid-Ionen Konzentration und eine Modifikation des Lösungsmittels zur



### 3. Ergebnisse und Diskussion

Verbesserung der Löslichkeit des TBACIs änderte das Verhältnis von Produkt zu Addukt nicht (Tabelle 10). Es bleibt weiter zu untersuchen, ob die direkte Substitution unter anderen Reaktionsbedingungen möglich ist, oder ob eine direkte an die Amidkupplung anschließende *N*-Boc-Entschützung mit Hydrogenchlorid im organischen Lösungsmittel das Produkt zu Addukt Verhältnis verbessert.

Schließlich konnte die PROTAC-Vorstufe **46** nach einer flashchromatographischen Aufreinigung mit Wasser und Acetonitril als Eluenten mit einer Ausbeute von 33 % isoliert werden.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

**Tabelle 8: Reaktionsoptimierung der Amidkupplung zwischen dem DCAF 16-Liganden 25 und dem HDACi-Linker Konstrukt 33. Die Aktivierungszeit nach Zugabe des Kupplungsreagenzes zu der Säure 25 und DIPEA betrug 10 min.**

<p> </p>						
Ansatz- nummer	Ansatz- größe [mmol]	X	Y Äq. DIPEA	Verhältnis der AUC der Eduktpeaks zu der AUC des Produktpeaks 33:25:46	Anteil der AUC des Produkt- peaks an der Gesamt AUC [%]	Verhältnis Produkt zu Kupplungs- reagenz- Addukt
<b>a</b>	0.10	HBTU	2.00	0.0 : 0.6 : 1.0	4	1.0 : 19
<b>b</b>	0.10	HBTU	1.00	0.1 : 0.1 : 1.0	49	1.0 : 0.4
<b>c</b>	0.10	HATU	2.00	4.8 : 14 : 1.0	1	1.0 : 32
<b>d</b>	0.10	COMU	2.00	0.4 : 0.3 : 1.0	8	1.0 : 7.3
<b>e</b>	0.10	CDI	2.00	n.a.	n.a.	n.a.
<b>f</b>	0.10	EDC•HCl	2.00	n.a.	n.a.	n.a.
<b>g*</b>	0.10	EDC•HCl	2.00	n.a.	n.a.	n.a.

\* Die Aktivierungszeit betrug in diesem Ansatz 30 min.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

**Tabelle 9: Reaktionsoptimierung der TCFH-medierten Amidkupplung zwischen dem DCAF 16-Liganden 25 und dem HDACi-Linker Konstrukt 33.**

Ansatz- nummer	Ansatz- größe [mmol]	X	Y Äq. Base	Verhältnis der AUC der Eduktpeaks zu der AUC des Produktpeaks <b>33:25:46</b>	Anteil der AUC des Produktpeaks an der Gesamt AUC [%]	Verhältnis Produkt zu Kupplungs- reagenz- Addukt
<b>b</b>	0.10	HBTU	1.00 DIPEA	0.1 : 0.1 : 1.0	49	1.0 : 0.4
<b>h*</b>	0.10	TCFH	1.0 NMI	0.3 : 0.2 : 1.0	58	1.0 : 0.0
<b>i</b>	0.05	TCFH	1.0 NMI	0.2 : 0.2 : 1.0	62	1.0 : 0.1
<b>j</b>	0.05	TCFH	2.0 NMI	0.0 : 0.1 : 1.0	64	1.0 : 0.3
<b>k</b>	0.05	TCFH	3.0 NMI	0.0 : 0.0 : 1.0	71	1.0 : 0.3
<b>l</b>	0.59	TCFH	3.0 NMI	0.0 : 0.1 : 1.0	59	1.0 : 0.4

\* In diesem Ansatz setzte sich das Lösungsmittel aus 1.5 ml ACN und 0.5 ml DMF zusammen.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

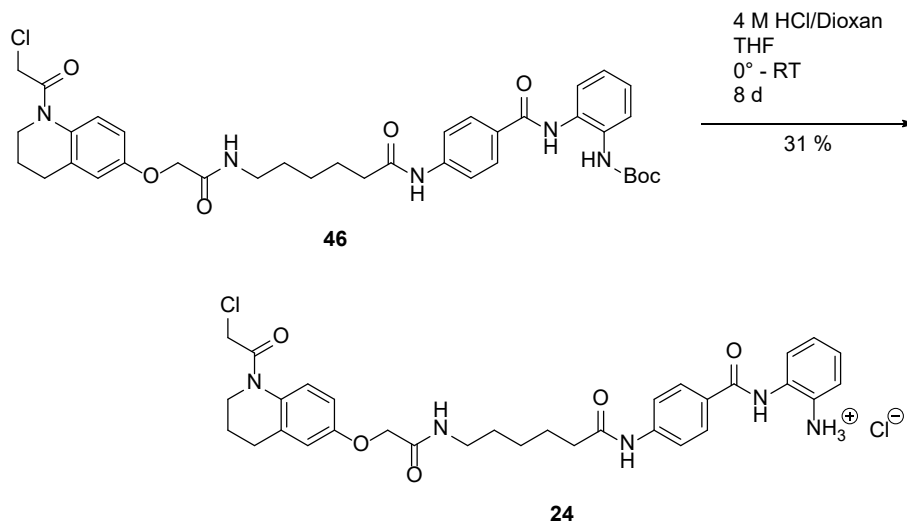
Tabelle 10: Einfluss der Chlorid-Ionen Konzentration auf das Verhältnis von 46 zu dem NMI-Addukt. Die Amidkupplung (Zeitpunkt 0 h) wurde mit einem Äquivalent 25, einem Äquivalent 33, 1.1 Äquivalenten TCFH und drei Äquivalenten NMI bei Raumtemperatur in einer Konzentration von 10 ml/mmol in DMF durchgeführt. Nach der wässrigen Extraktion gegen Ethylacetat wurde der Rückstand der organischen Phase in THF zu einer Konzentration von 10 ml/mmol verdünnt und die angegebene Zeit bei Raumtemperatur gerührt.

Ansatz- nummer	Ansatz- größe [mmol]	Zeit [h]	Äq. TBACl	Anteil der AUC des Produktpeaks an der Gesamt AUC [%]	Verhältnis Produkt zu Kupplungs- reagenz- Addukt	Isolierte Ausbeute [%]
<b>a</b>	0.05	0	3.00	71	1.0 : 0.3	---
		24	3.00	76	1.0 : 0.1	---
		48	6.00	78	1.0 : 0.1	---
		72	6.00	79	1.0 : 0.1	---
<b>b</b>	0.59	0	3.00	59	1.0 : 0.4	---
		24*	3.00	66	1.0 : 0.4	---
		72**	6.00	68	1.0 : 0.3	---
		96	6.00	65	1.0 : 0.4	33

\*+0.25 ml DMF

\*\*+0.50 ml DMF

### 3. Ergebnisse und Diskussion



**Schema 31: Synthese der Zielstruktur 24 durch Entschützung der *N*-Boc-Gruppe von 46.**

Die Entschützung der PROTAC-Vorstufe **46** wurde analog zu den *N*-Boc-Entschützung zu den potentiellen PROTACs **19** und **20** durchgeführt und lieferte nach flashchromatographischer Aufreinigung mit Acetonitril/Wasser und Behandlung mit Hydrogenchlorid in Ether das Hydrochlorid-Salz des potentiellen PROTACs **24**. Dieser potentielle PROTAC besteht aus einem kovalent bindenden E3-Ligase Liganden für die DCAF 16 Ligase, einem Alkyllinker und einem CI-994-Analog als HDACi-Fragment (Schema 31).

### 4. Zusammenfassung

---

Der klinische Erfolg von fünf HDACi bei der Therapie von hämatologischen Erkrankungen belegt das patientenrelevante Potential von Arzneistoffen, die diese Klasse von epigenetischen „Löschern“ inhibieren.

Die Leitstruktur **4a** dieser Arbeit ist ein nanomolarer Inhibitor von HDAC-Enzymen der Klasse I und IIb und gleichzeitig potent aktiv gegen verschiedene Arten von Leukämiezellen. Ausgehend von dieser Leitstruktur wurden im Rahmen dieser Arbeit durch Modifikation der terminalen Phenylgruppe von **4a** 26 Analoga dargestellt.

Von diesen Derivaten zeigten insbesondere **4d**, **4l** und **4m** eine verbesserte antileukämische Potenz unter Beibehaltung der nanomolaren Klasse I/IIb-HDAC-Inhibition. Die HDACi **4d** und **4m** zeigten submikromolare Aktivität gegen Isolate von Leukämiepatienten zusätzlich zu einem therapeutischen Fenster, welches vergleichbar oder größer ist als das von zugelassenen HDACi. Eine folgende Analyse der *in vitro* Pharmakokinetik favorisierte **4d** für die Untersuchung in einem *in vivo* Leukämie Mausmodell. In diesem Mausmodell reduzierte **4d** signifikant das Tumorwachstum und erbrachte damit den Nachweis, dass diese Klasse an HDACi auch für weitere präklinische Forschung geeignet ist.

Das HDACi-Motiv von **4a** konnte mit einem Liganden für die CRBN E3-Ligase erfolgreich in dem Design für HDAC-PROTACs mit HDAC 6-degradierenden Eigenschaften verwendet werden. Der HDAC-PROTAC **7** zeigte nanomolare Enzyminhibition von HDAC 2 und HDAC 6 und führte in mikromolaren Konzentrationen innerhalb von 9 h zu einer Degradation von HDAC 6 auf 30 % des Ausgangswertes.

Das Identifizieren neuer E3-Ligase Liganden für die HDAC-PROTAC Entwicklung führt zu einer neuen Ebene an molekularer Diversität von HDAC-PROTACs. Diese haben das Potential, neben anderen Degradationsselektivitäten auch tumor- oder gewebsspezifisch aktiv zu werden. **19**, **20** und **24** rekrutieren bisher noch nicht in dem Gebiet der HDAC-PROTACs verwendete DCAF-E3-Ligase Liganden und eignen sich damit, den Einfluss dieser E3-Ligase-Module auf die Degradationsselektivität dieser heterobifunktionellen Moleküle zu untersuchen.

In dieser Arbeit wurden mit **4d** und **4m** zwei neue HDACi mit dem Potential für ihre weitere präklinische Entwicklung dargestellt und mit dem HDAC-PROTAC **7** ein neuer HDAC-PROTAC mit potenter und schneller HDAC 6 Degradation. Die drei heterobifunktionellen Moleküle **19**, **20**, und **24** erweitern das Spektrum potentieller HDAC-PROTACs mit neuen E3-Ligase Modulen. Die biologische Evaluierung dieser heterobifunktionellen Moleküle wird Gegenstand künftiger Arbeiten sein.

# 5. Experimenteller Teil

---

## 5.1 Material und Methoden

Alle verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel wurden käuflich erworben (*Acros*, *TCl*, *abcr*, *Alfa Aesar*, *Ambeed*, *BLDpharm* und *Merck*) und ohne weitere Aufreinigung direkt verwendet. Trockene Lösungsmittel wurden von *Acros Organics* erworben.

Der Reaktionsumsatz wurde mit dünnschichtchromatographischer Kontrolle verfolgt. Die verwendeten Platten waren ALUGRAM® Xtra SIL G/UV<sub>254</sub>-Platten der Firma *Macherey-Nagel*. Die Auswertung erfolgte entweder unter ultraviolettem Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm oder durch Anfärben der Platte mit einer Kaliumpermanganat-Lösung (3.0 g Kaliumpermanganat, 20.0 g Kaliumcarbonat und 5.00 g Natriumhydroxid-Lösung (5%) in 300 ml dest. Wasser) oder einer Eisen(III)chlorid-Lösung (1.00 g Eisen(III)chlorid in 96 % Ethanol).

Flashchromatographie wurde durchgeführt entweder mit einer CombiFlash® RF 200 oder einer Büchi Pure C-810 Flash mit vorgepackten RediSep™ Rf-Säulen. Die Eluenten wurden abhängig von dem Trennproblem gewählt und waren entweder *n*-Hexan und Ethylacetat oder Dichlormethan und 30% Methanol in Dichlormethan.

Umkristallisationen wurden durchgeführt, indem das Rohprodukt in möglichst wenig refluxierendem Solvens gelöst und anschließend das Antisolvens vorsichtig zugetropft wurde. Anschließend wurde der Ansatz langsam auf Raumtemperatur abkühlen gelassen.

Die Schmelzpunkte wurde mit einem Büchi M-565 Schmelzpunktmessgerät gemessen und sind unkorrigiert.

Protonen (<sup>1</sup>H) und Kohlenstoff (<sup>13</sup>C) NMR wurden mit einem Bruker Avance III 300 or 600 MHz oder einem Bruker Avance DRX 500 MHz Gerät aufgenommen. Alle NMR-Spektren wurden im „*Center for Molecular and Structural Analytics an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf (CeMSA@HHU)*“ aufgenommen. Die verwendeten deuterierten Lösungsmittel (DMSO-*d*<sub>6</sub>, CDCl<sub>3</sub>) wurden von *Sigma-Aldrich* bezogen. Die chemische Verschiebung ist in parts per million (ppm), relativ zu dem verwendeten deuterierten Lösungsmittel, ausgedrückt. Die chemischen Verschiebungen der <sup>1</sup>H-NMR Spektren sind bezogen auf das Signal des restlichen nicht deuterierten Lösungsmittels (<sup>1</sup>H-NMR: DMSO-*d*<sub>6</sub> 2.50 ppm, CDCl<sub>3</sub>: 7.26 ppm) oder im Falle der <sup>13</sup>C-Spektren auf das Signal des Lösungsmittels (<sup>13</sup>C-NMR: DMSO-*d*<sub>6</sub> 39.52 ppm, CDCl<sub>3</sub>: 77.16 ppm). Alle Kopplungskonstanten sind in Hertz angegeben. Die Signalaufspaltungen werden wie folgt angegeben: Singulett (s), Dublett (d), Triplett (t), Quartett (q), Pentett (p), Multiplett (m).

## 5. Experimenteller Teil

Die hochauflösenden Massenspektren wurden im „Center for Molecular and Structural Analytics an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf (CeMSA@HHU)“ mit einem UHR-QTOF maXis 4G der Firma *Bruker* aufgenommen. Die Chromatogramme der Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung wurden ebenfalls im CeMSA@HHU mit einem UHR-QTOF maXis 4G der Firma *Bruker* in Kombination mit einer UHPLC-Anlage UltiMate 3000 RS der Firma *Dionex* aufgenommen. Die Ionisierung erfolgte in beiden Fällen per Elektronensprayionisation (ESI).

HPLC-Messungen wurden entweder mit einem *Knauer* AZURA System bestehend aus einer AZURA 6.1L Pumpe, einem AZURA CT 2.1 Säulenofen, einem AZURA UVD 2.1L UV-Detektor und einem *Spark Holland* B.V. OPTIMAS™ Model 820 Autosampler oder mit einem Agilent LC 1260 Infinity II System bestehend aus einem G7116A Infinity II Säulenofen, einer G7104C Infinity II Pumpe, einem G7129C Infinity II Vialsampler und einem G7114A Infinity II Detektor durchgeführt. Die Trennung erfolgte auf einer EuroSpher II 100 5 C18 (150 x 4 mm)-Säule. Die UV-Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 254 nm detektiert. Die mobile Phase bestand aus Wasser (Eluent A) und Acetonitril (Eluent B) jeweils mit einem Zusatz von 0.1 % Trifluoressigsäure (TFA). Der exakte Gradient ist in Tabelle 11 angegeben. Die Flussrate betrug 1 ml/min.

Im Falle der *O*-Trityl geschützten Verbindungen wurde auf den Trifluoressigsäure-Zusatz in der mobilen Phase verzichtet.

**Tabelle 11: Fließmittelzusammensetzung bei den HPLC-Reinheitsuntersuchungen**

<b>Zeit [min]</b>	<b>Wasser (+0.1 % TFA) [%]</b>	<b>Acetonitril (+0.1 % TFA) [%]</b>
<b>0</b>	90	10
<b>0.5</b>	90	10
<b>20</b>	0	100
<b>30</b>	0	100
<b>31</b>	90	10
<b>40</b>	90	10



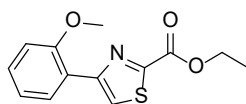
## 5. Experimenteller Teil

### 5.2 Allgemeine Arbeitsvorschrift I (AAV I): Darstellung der Ethylphenylthiazol-carboxylate **1b-1z**.

Zur Darstellung der Ethylphenylthiazol-carboxylate **1b-1z** wurde das benötigte Thioamid (1.00 Äq.) mit dem entsprechenden  $\alpha$ -Bromketon (1.00 Äq.) in Ethanol (7 mL/mmol) gelöst und für 7 h bei 70 °C gerührt. Falls die DC-Reaktionskontrolle nach dieser Zeit keinen kompletten Umsatz zeigte (Fließmittel *n*-Hexan/Ethylacetat 9:1 (V/V)), wurde der Ansatz 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde dem Ansatz unter reduziertem Druck das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand in 100 mL Ethylacetat aufgenommen und dreimal mit 50 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und einmal mit 50 mL gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde, falls nicht anders angegeben, flashchromatographisch mit *n*-Hexan/Ethylacetat (0-30 % Ethylacetat) gereinigt, um die Ethylphenylthiazolcarboxylate **1b-1z** zu erhalten.

## 5. Experimenteller Teil

### Ethyl-4-(2-methoxyphenyl)thiazol-2-carboxylat (**1b**)



**1b**

C<sub>13</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>3</sub>S  
[263.31 g/mol]

Die Synthese von **1b** erfolgte nach **AAV I** aus den Edukten Ethyl-2-amino-2-thioacetat (1.33 g, 10.0 mmol) und 2-Brom-1-(2-methoxyphenyl)ethan-1-on (2.29 g, 10.0 mmol).

**1b** wurde als gelblicher Feststoff (2.00 g, 7.60 mmol, 76 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.36 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 3.94 (s, 3H), 4.41 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 7.09 (ddd, *J* = 7.8, 7.3, 1.1 Hz, 1H), 7.18 (dd, *J* = 8.4, 1.1 Hz, 1H), 7.40 (ddd, *J* = 8.3, 7.3, 1.8 Hz, 1H), 8.13 (dd, *J* = 7.7, 1.8 Hz, 1H), 8.45 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 14.1, 55.6, 62.1, 111.9, 120.7, 121.6, 124.2, 129.4, 129.9, 152.3, 155.8, 156.6, 159.5.

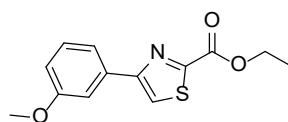
**HRMS** (*m/z*) MH<sup>+</sup> berechnet für C<sub>13</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>3</sub>S 264.0689, gefunden: 264.0696

**HPLC**: *t*<sub>r</sub> 15.21 min; 99.1 %

**Smp.**: 70.3 °C

## 5. Experimenteller Teil

### Ethyl-4-(3-methoxyphenyl)thiazol-2-carboxylat (**1c**)



**1c**

$C_{13}H_{13}NO_3S$   
[263.31 g/mol]

Die Synthese von **1c** erfolgte nach **AAV I** aus den Edukten Ethyl-2-amino-2-thioacetat (1.33 g, 10.0 mmol) und 2-Brom-1-(3-methoxyphenyl)ethan-1-on (2.29 g, 10.0 mmol).

**1c** wurde als farbloser Feststoff (1.94 g, 7.35 mmol, 74 %) erhalten.

**$^1H$ -NMR** (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.36 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H), 3.83 (s, 3H), 4.42 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 6.98 (ddd,  $J = 8.2, 2.6, 1.0$  Hz, 1H), 7.40 (ddd,  $J = 8.2, 7.7, 0.4$  Hz, 1H), 7.51 – 7.62 (m, 2H), 8.56 (s, 1H).

**$^{13}C$ -NMR** (75 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  14.1, 55.2, 62.2, 111.6, 114.4, 118.6, 121.3, 130.1, 134.6, 156.1, 157.3, 159.3, 159.7.

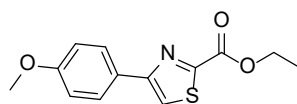
**HRMS** ( $m/z$ )  $MH^+$  berechnet für  $C_{13}H_{13}NO_3S$  264.0689, gefunden: 264.0693

**HPLC**:  $t_r$  14.36 min; 98.9 %

**Smp.**: 76.6 °C

## 5. Experimenteller Teil

### Ethyl-4-(4-methoxyphenyl)thiazol-2-carboxylat (**1d**)



**1d**

C<sub>13</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>3</sub>S

[263.31 g/mol]

Die Synthese von **1d** erfolgte nach **AAV I** aus den Edukten Ethyl-2-amino-2-thioacetat (1.33 g, 10.0 mmol) und 2-Brom-1-(4-methoxyphenyl)ethan-1-on (2.30 g, 10.0 mmol).

**1d** wurde als farbloser Feststoff (1.93 g, 7.33 mmol, 73 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.36 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 3.81 (s, 3H), 4.41 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 6.99 – 7.09 (m, 2H), 7.90 – 7.98 (m, 2H), 8.37 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 14.1, 55.2, 62.1, 114.3, 119.0, 126.0, 127.7, 156.3, 157.2, 159.4, 159.7.

**HRMS** (*m/z*) MH<sup>+</sup> berechnet für C<sub>13</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>3</sub>S 264.0689, gefunden: 264.0693

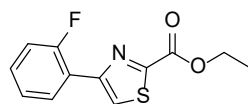
**HPLC**: t<sub>r</sub> 14.40 min; 97.7 %

**Smp.**: 150.5 °C

Die <sup>1</sup>H-NMR-Daten stimmen mit der Literatur überein. Li *et al.* (2019)<sup>140</sup>

## 5. Experimenteller Teil

### Ethyl-4-(2-fluorphenyl)thiazol-2-carboxylat (**1e**)



**1e**

C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>FNO<sub>2</sub>S

[251.28 g/mol]

Die Synthese von **1e** erfolgte nach **AAV I** aus den Edukten Ethyl-2-amino-2-thioacetat (1.33 g, 10.0 mmol) und 2-Brom-1-(2-fluorphenyl)ethan-1-on (2.24 g, 10.0 mmol).

**1e** wurde als farbloser Feststoff (1.30 g, 5.17 mmol, 52 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.36 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 4.42 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 7.31 – 7.43 (m, 2H), 7.48 (tdd, *J* = 7.2, 5.3, 2.7 Hz, 1H), 8.11 (td, *J* = 7.8, 1.7 Hz, 1H), 8.37 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 14.0, 62.3, 116.3 (d, *J* = 22.0 Hz), 121.0 (d, *J* = 11.5 Hz), 124.8 – 125.2 (m), 129.8 (d, *J* = 2.8 Hz), 130.6 (d, *J* = 8.7 Hz), 149.8 (d, *J* = 2.3 Hz), 157.1, 157.8, 159.3, 161.1.

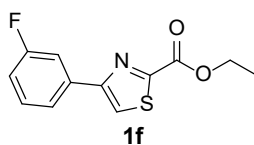
**HRMS** (*m/z*) MH<sup>+</sup> berechnet für C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>FNO<sub>2</sub>S 252.0489, gefunden: 252.0490

**HPLC**: *t*<sub>r</sub> 15.25 min; 99.8 %

**Smp.**: 65.7 °C

## 5. Experimenteller Teil

### Ethyl-4-(3-fluorphenyl)thiazol-2-carboxylat (**1f**)



**1f**  
C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>FNO<sub>2</sub>S  
[251.28 g/mol]

Die Synthese von **1f** erfolgte nach **AAV I** aus den Edukten Ethyl-2-amino-2-thioacetat (1.33 g, 10.0 mmol) und 2-Brom-1-(3-fluorphenyl)ethan-1-on (2.24 g, 10.0 mmol).

**1f** wurde als farbloser Feststoff (1.64 g, 6.52 mmol, 65 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.36 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 4.42 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 7.24 (dddd, *J* = 9.1, 8.3, 2.6, 1.0 Hz, 1H), 7.41 – 7.66 (m, 1H), 7.73 – 7.92 (m, 2H), 8.64 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 14.1, 62.3, 112.8 (d, *J* = 23.2 Hz), 115.5 (d, *J* = 21.2 Hz), 121.1 – 123.0 (m), 131.1 (d, *J* = 8.4 Hz), 135.5 (d, *J* = 8.3 Hz), 154.8 (d, *J* = 2.9 Hz), 157.7, 159.3, 161.0, 164.2.

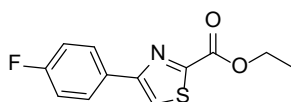
**HRMS** (*m/z*) MH<sup>+</sup> berechnet für C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>FNO<sub>2</sub>S 252.0489, gefunden: 252.0489

**HPLC**: *t<sub>r</sub>* 14.81 min; 99.7 %

**Smp.**: 66.0 °C

## 5. Experimenteller Teil

### Ethyl-4-(4-fluorphenyl)thiazol-2-carboxylat (**1g**)



**1g**  
 $C_{12}H_{10}FNO_2S$   
[251.28 g/mol]

Die Synthese von **1g** erfolgte nach **AAV I** aus den Edukten Ethyl-2-amino-2-thioacetat (666 mg, 5.00 mmol) und 2-Brom-1-(4-fluorphenyl)ethan-1-on (1.09 g, 5.00 mmol). Die Aufreinigung erfolgte durch Umkristallisation aus *n*-Hexan/Ethylacetat.

**1g** wurde als farbloser Feststoff (831 g, 3.31 mmol, 66 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  1.36 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H), 4.41 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 7.25 – 7.39 (m, 2H), 7.96 – 8.13 (m, 2H), 8.51 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  13.9, 62.1, 115.7 (d,  $J = 21.7$  Hz), 120.6, 128.3 (d,  $J = 8.3$  Hz), 129.8 (d,  $J = 3.1$  Hz), 155.2, 157.5, 159.2, 161.3, 163.2.

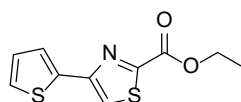
**HRMS** ( $m/z$ )  $MH^+$  berechnet für  $C_{12}H_{10}FNO_2S$  252.0489, gefunden: 252.0494

**HPLC**:  $t_r$  14.79 min; 99.9 %

**Smp.**: 74.0 °C

## 5. Experimenteller Teil

### Ethyl-4-(thiophen-2-yl)thiazol-2-carboxylat (**1h**)



**1h**

C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub>S<sub>2</sub>  
[239.31 g/mol]

Die Synthese von **1h** erfolgte nach **AAV I** aus den Edukten Ethyl-2-amino-2-thioacetat (1.33 g, 10.0 mmol) und 2-Brom-1-(thiophen-2-yl)ethan-1-on (2.09 g, 10.0 mmol).

**1h** wurde als schwarzer Feststoff (1.30 g, 5.43 mmol, 54 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.35 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 4.41 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 7.16 (dd, *J* = 5.1, 3.6 Hz, 1H), 7.61 (dd, *J* = 5.1, 1.2 Hz, 1H), 7.68 (dd, *J* = 3.6, 1.2 Hz, 1H), 8.37 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 14.1, 62.3, 119.3, 125.5, 126.9, 128.2, 136.8, 151.1, 157.4, 159.2.

**HRMS** (*m/z*) MH<sup>+</sup> berechnet für C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub>S<sub>2</sub> 240.0147, gefunden: 240.0149

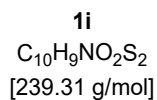
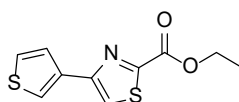
**HPLC**: *t*<sub>r</sub> 13.81 min; 96.5 %

**Smp.**: 53.4 °C



## 5. Experimenteller Teil

### Ethyl-4-(thiophen-3-yl)thiazol-2-carboxylat (**1i**)



Die Synthese von **1i** erfolgte nach **AAV I** aus den Edukten Ethyl-2-amino-2-thioacetat (630 g, 4.73 mmol) und 2-Brom-1-(thiophen-3-yl)ethan-1-on (1.00 g, 4.73 mmol).

**1i** wurde als braunes Öl (715 g, 2.99 mmol, 63 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.35 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 4.41 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 7.63 – 7.69 (m, 2H), 8.03 (dd, *J* = 2.6, 1.6 Hz, 1H), 8.36 (s, 1H).

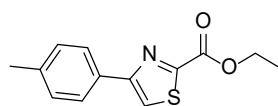
**<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 14.1, 62.2, 120.3, 123.3, 126.2, 127.4, 135.4, 152.6, 157.3, 159.4.

**HRMS** (*m/z*)  $MH^+$  berechnet für  $C_{10}H_9NO_2S_2$  240.0147, gefunden: 240.0151

**HPLC**: *t<sub>r</sub>* 13.43 min; 99.0 %

## 5. Experimenteller Teil

### Ethyl-4-(p-tolyl)thiazole-2-carboxylat (**1j**)



**1j**

$C_{13}H_{13}NO_2S$   
[247.31 g/mol]

Die Synthese von **1j** erfolgte nach **AAV I** aus den Edukten Ethyl-2-amino-2-thioacetat (1.33 g, 10.0 mmol) und 2-Brom-1-(p-tolyl)ethan-1-on (2.17 g, 10.0 mmol).

**1j** wurde als farbloser Feststoff (1.71 g, 6.93 mmol, 69 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  1.36 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H), 2.35 (s, 3H), 4.41 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 7.29 (dd,  $J = 7.9, 0.7$  Hz, 2H), 7.84 – 7.94 (m, 2H), 8.45 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  14.1, 20.8, 62.2, 120.1, 126.2, 129.5, 130.6, 138.2, 156.4, 157.3, 159.4.

**HRMS** ( $m/z$ )  $MH^+$  berechnet für  $C_{13}H_{13}NO_2S$  248.0740, gefunden: 248.0744

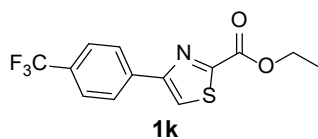
**HPLC**:  $t_r$  15.59 min; 99.3 %

**Smp.:** 60.0 °C

Die <sup>1</sup>H-NMR-Daten stimmen mit der Literatur überein. Li *et al.* (2019)<sup>140</sup>

## 5. Experimenteller Teil

### Ethyl-4-(4-(trifluormethyl)phenyl)thiazol-2-carboxylat (**1k**)



**1k**  
C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>2</sub>S  
[301.28 g/mol]

Die Synthese von **1k** erfolgte nach **AAV I** aus den Edukten Ethyl-2-amino-2-thioacetat (1.33 g, 10.0 mmol) und 2-Brom-1-(4-(trifluormethyl)phenyl)ethan-1-on (2.75 g, 10.0 mmol).

**1k** wurde als farbloser Feststoff (2.32 g, 7.69 mmol, 77 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.36 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 4.43 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 7.85 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 8.23 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 8.74 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 14.1, 62.3, 123.3, 125.9 (d, *J* = 4.1 Hz), 126.9, 128.5, 128.9, 136.9, 154.5, 158.0, 159.3.

**HRMS** (*m/z*) MH<sup>+</sup> berechnet für C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>2</sub>S 302.0457, gefunden: 302.0465

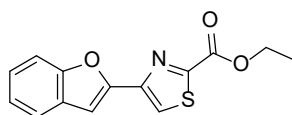
**HPLC**: *t<sub>r</sub>* 16.36 min; 96.4 %

**Smp.**: 134.3 °C

Die <sup>1</sup>H-NMR-Daten stimmen mit der Literatur überein. Li *et al.* (2019)<sup>140</sup>

## 5. Experimenteller Teil

### Ethyl-4-(benzofuran-2-yl)thiazol-2-carboxylat (**1I**)



**1I**  
C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>S  
[273.31 g/mol]

Die Synthese von **1I** erfolgte nach **AAV I** aus den Edukten Ethyl-2-amino-2-thioacetat (541 mg, 4.06 mmol) und 1-(Benzofuran-2-yl)-2-bromethan-1-on (1.00 g, 4.06 mmol).

Das Präzipitat aus der Reaktionslösung wurde abfiltriert und der Rückstand mit Ethanol gewaschen.

**1I** wurde als bräunlicher Feststoff (464 g, 1.70 mmol, 42 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.37 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 4.43 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 7.25 – 7.41 (m, 2H), 7.42 (d, *J* = 0.9 Hz, 1H), 7.69 (ddq, *J* = 17.4, 8.1, 0.8 Hz, 2H), 8.49 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 14.1, 62.4, 104.2, 111.3, 121.8, 122.5, 123.5, 125.3, 128.2, 147.3, 150.3, 154.3, 158.7, 159.1.

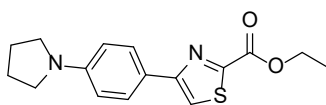
**HRMS** (*m/z*) MH<sup>+</sup> berechnet für C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>S 274.0532, gefunden: 274.0534

**HPLC**: *t<sub>r</sub>* 16.02 min; 99.4 %

**Smp.**: 128.6 °C

## 5. Experimenteller Teil

### Ethyl-4-(4-(pyrrolidin-1-yl)phenyl)thiazol-2-carboxylat (**1m**)



**1m**

$C_{16}H_{18}N_2O_2S$   
[302.39 g/mol]

Die Synthese von **1m** erfolgte nach **AAV I** aus den Edukten Ethyl-2-amino-2-thioacetat (1.33 g, 10.0 mmol) und 2-Brom-1-(4-(pyrrolidin-1-yl)phenyl)ethan-1-on (2.76 g, 10.0 mmol).

**1m** wurde als dunkelgelber Feststoff (888 mg, 2.94 mmol, 29 %) erhalten.

**$^1H$ -NMR** (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.35 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H), 1.88 – 2.04 (m, 4H), 3.21 – 3.32 (m, 4H), 4.40 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 6.54 – 6.67 (m, 2H), 7.75 – 7.87 (m, 2H), 8.16 (s, 1H).

**$^{13}C$ -NMR** (151 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  14.1, 25.0, 47.2, 62.0, 111.6, 116.5, 120.5, 127.3, 147.8, 156.7, 157.5, 159.5.

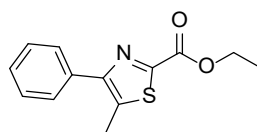
**HRMS** ( $m/z$ )  $MH^+$  berechnet für  $C_{16}H_{18}N_2O_2S$  303.1162, gefunden: 303.1167

**HPLC**:  $t_r$  15.15 min; 99.3 %

**Smp.**: 180.5 °C

## 5. Experimenteller Teil

### Ethyl-5-methyl-4-phenylthiazol-2-carboxylat (**1n**)



**1n**  
C<sub>13</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>S  
[247.31 g/mol]

Die Synthese von **1n** erfolgte nach **AAV I** aus den Edukten Ethyl-2-amino-2-thioacetat (1.33 g, 10.0 mmol) und 2-Brom-1-phenylpropan-1-on (2.22 g, 10.0 mmol).

**1n** wurde als farbloser Feststoff (1.51 g, 6.12 mmol, 61 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.34 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 2.64 (s, 3H), 4.38 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 7.38 – 7.55 (m, 3H), 7.64 – 7.73 (m, 2H).

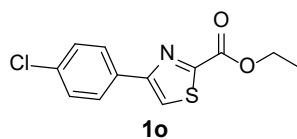
**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.8, 14.1, 62.0, 128.2, 128.4, 128.5, 133.7, 136.1, 152.7, 152.9, 159.4.

**HPLC**: *t*<sub>r</sub> 14.67 min; 97.8 %

**Smp.**: 74.2 °C

## 5. Experimenteller Teil

### Ethyl-4-(4-chlorphenyl)thiazol-2-carboxylat (**1o**)



C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>ClNO<sub>2</sub>S  
[267.73 g/mol]

Die Synthese von **1o** erfolgte nach **AAV I** aus den Edukten Ethyl-2-amino-2-thioacetat (1.33 g, 10.0 mmol) und 2-Brom-1-(4-chlorphenyl)ethan-1-on (2.38 g, 10.0 mmol).

**1o** wurde als farbloser Feststoff (765 g, 2.86 mmol, 29 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.36 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 4.42 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 7.50 – 7.62 (m, 2H), 7.92 – 8.11 (m, 2H), 8.59 (s, 1H).

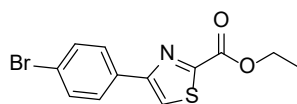
**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 14.1, 62.3, 121.6, 128.0, 129.0, 132.1, 133.3, 154.9, 157.7, 159.3.

**HPLC**: t<sub>r</sub> 16.10 min; 96.2 %

**Smp.**: 107.9 °C

## 5. Experimenteller Teil

### Ethyl-4-(4-bromphenyl)thiazol-2-carboxylat (**1p**)



**1p**

C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>BrNO<sub>2</sub>S

[312.18 g/mol]

Die Synthese von **1p** erfolgte nach **AAV I** aus den Edukten Ethyl-2-amino-2-thioacetat (2.72 g, 20.0 mmol) und 2-Brom-1-(4-bromphenyl)ethan-1-on (5.59 g, 20.0 mmol).

**1p** wurde als gelber Feststoff (3.12 g, 10.0 mmol, 50 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.36 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 4.42 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 7.64 – 7.73 (m, 2H), 7.92 – 8.02 (m, 2H), 8.60 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 14.1, 62.3, 121.7, 122.0, 128.3, 131.9, 132.4, 155.0, 157.7, 159.3.

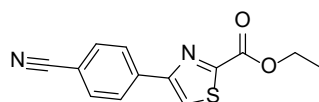
**HPLC**: *t*<sub>r</sub> 16.55 min; 97.8 %

**Smp.**: 111.6 °C



## 5. Experimenteller Teil

### Ethyl-4-(4-cyanophenyl)thiazol-2-carboxylat (**1q**)



**1q**

C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S  
[258.30 g/mol]

Die Synthese von **1q** erfolgte nach **AAV I** aus den Edukten Ethyl-2-amino-2-thioacetat (1.33 g, 10.0 mmol) und 4-(2-Bromacetyl)benzonitril (2.36 g, 10.0 mmol). Das Präzipitat aus der Reaktionslösung wurde abfiltriert und der Rückstand mit Ethanol gewaschen.

**1q** wurde als farbloser Feststoff (2.03 g, 7.85 mmol, 79 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.36 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 4.42 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 7.86 – 8.05 (m, 2H), 8.09 – 8.27 (m, 2H), 8.77 (s, 1H).

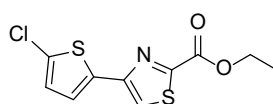
**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 14.0, 62.4, 111.0, 118.7, 124.0, 126.9, 133.0, 137.3, 154.2, 158.1, 159.2.

**HPLC**: *t*<sub>r</sub> 13.67 min; 99.9 %

**Smp.**: 179.6 °C

## 5. Experimenteller Teil

### Ethyl-4-(5-chlorthiophen-2-yl)thiazol-2-carboxylat (**1r**)



**1r**

$C_{10}H_8ClNO_2S_2$   
[273.75 g/mol]

Die Synthese von **1r** erfolgte nach **AAV I** aus den Edukten Ethyl-2-amino-2-thioacetat (1.33 g, 10.0 mmol) und 2-Brom-1-(5-chlorthiophen-2-yl)ethan-1-on (2.50 g, 10.0 mmol).

**1r** wurde als brauner Feststoff (991 mg, 3.6 mmol, 36 %) erhalten.

**$^1H$ -NMR** (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.35 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H), 4.40 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 7.19 (d,  $J = 4.0$  Hz, 1H), 7.57 (d,  $J = 3.9$  Hz, 1H), 8.43 (s, 1H).

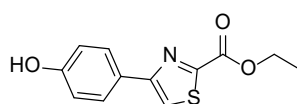
**$^{13}C$ -NMR** (75 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  14.0, 62.4, 119.9, 125.0, 128.1, 128.8, 135.7, 149.8, 157.7, 159.0.

**HPLC**:  $t_r$  16.05 min; 98.7 %

**Smp.**: 105.4 °C

## 5. Experimenteller Teil

### Ethyl 4-(4-hydroxyphenyl)thiazol-2-carboxylat (**1s**)



**1s**

C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>S

[249.28 g/mol]

Die Synthese von **1s** erfolgte nach **AAV I** aus den Edukten Ethyl-2-amino-2-thioacetat (1.33 g, 10.0 mmol) und 2-Brom-1-(4-hydroxyphenyl)ethan-1-on (2.15 g, 10.0 mmol).

**1s** wurde als farbloser Feststoff (1.73 g, 6.94 mmol, 69 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.35 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 4.40 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 6.79 – 6.91 (m, 2H), 7.75 – 7.88 (m, 2H), 8.27 (s, 1H), 9.72 (s, 1H).

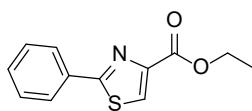
**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 14.1, 62.1, 115.6, 118.2, 124.5, 127.7, 156.8, 157.0, 158.0, 159.5.

**HPLC:** *t*<sub>r</sub> 11.25 min; 96.1 %

**Smp.:** 144.7 °C

## 5. Experimenteller Teil

### Ethyl-2-phenylthiazol-4-carboxylat (**1t**)



**1t**

C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>S  
[233.29 g/mol]

Die Synthese von **1t** erfolgte nach **AAVI** aus den Edukten Thiobenzamid (707 mg, 5.00 mmol) und Ethylbrompyruvat (0.84 mL, 6.00 mmol).

**1t** wurde als gelblicher Feststoff (545 mg, 2.33 mmol, 47 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.33 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 4.34 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 7.47 – 7.60 (m, 3H), 7.93 – 8.04 (m, 2H), 8.58 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 14.2, 60.9, 126.4, 129.3, 129.4, 130.9, 132.3, 147.0, 160.7, 167.7.

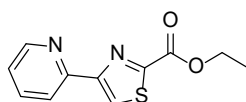
**HPLC**: *t<sub>r</sub>* 13.96 min; 99.9 %

**Smp.**: 48.4 °C

Alle spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein. Senger *et al.* (2016)<sup>141</sup>

## 5. Experimenteller Teil

### Ethyl-4-(pyridin-2-yl)thiazol-2-carboxylat (**1u**)



**1u**

C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S  
[234.27 g/mol]

Die Synthese von **1u** erfolgte nach **AAV I** aus den Edukten Ethyl-2-amino-2-thioacetat (1.33 g, 10.0 mmol) und 2-(2-Bromacetyl)pyridiniumbromid (2.96 g, 10.0 mmol) mit Zugabe von Triethylamin (1.4 mL, 10.0 mmol, 1.00 Äq.).

**1u** wurde als rosa Feststoff (2.08 g, 8.86 mmol, 89 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.37 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 4.43 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 7.42 (ddd, *J* = 7.5, 4.8, 1.2 Hz, 1H), 7.94 (td, *J* = 7.7, 1.8 Hz, 1H), 8.11 (dt, *J* = 7.9, 1.1 Hz, 1H), 8.58 – 8.71 (m, 2H).

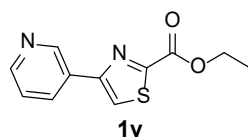
**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 14.1, 62.3, 120.7, 123.8, 124.3, 137.6, 149.7, 151.1, 156.3, 157.9, 159.3.

**HPLC**: *t*<sub>r</sub> 6.30 min; 95.0 %

**Smp.**: 96.2 °C

## 5. Experimenteller Teil

### Ethyl-4-(pyridin-3-yl)thiazol-2-carboxylat (**1v**)



**1v**  
C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S  
[234.27 g/mol]

Die Synthese von **1v** erfolgte nach **AAV I** aus den Edukten Ethyl-2-amino-2-thioacetat (1.33 g, 10.0 mmol) und 3-(2-Bromacetyl)pyridiniumbromid (2.87 g, 10.0 mmol) mit Zugabe von Triethylamin (1.39 mL, 10.0 mmol, 1.00 Äq.). Die Reaktionslösung wurde filtriert, der Rückstand in 50 mL Ethylacetat aufgenommen und dreimal mit je 50 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt.

**1v** wurde als brauner Feststoff (1.00 g, 4.30 mmol, 43 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.36 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 4.43 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 7.53 (ddd, *J* = 8.0, 4.8, 0.9 Hz, 1H), 8.36 (ddd, *J* = 8.0, 2.4, 1.7 Hz, 1H), 8.61 (dd, *J* = 4.8, 1.6 Hz, 1H), 8.70 (s, 1H), 9.20 (dd, *J* = 2.3, 0.9 Hz, 1H).

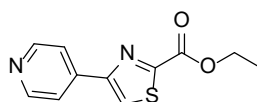
**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 14.1, 62.3, 122.4, 124.0, 129.0, 133.6, 147.3, 149.6, 153.4, 158.1, 159.2.

**HPLC:** t<sub>r</sub> 5.94 min; 99.9 %

**Smp.:** 72.4 °C

## 5. Experimenteller Teil

### Ethyl-4-(pyridin-4-yl)thiazol-2-carboxylat (**1w**)



**1w**

C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S  
[234.27 g/mol]

Die Synthese von **1w** erfolgte nach **AAV I** aus den Edukten Ethyl-2-amino-2-thioacetat (1.40 g, 10.0 mmol) und 4-(2-Bromacetyl)pyridiniumbromid (2.81 g, 10.0 mmol) nach Freisetzen der korrespondierenden Base mit Triethylamin (1.39 mL, 10.0 mmol, 1.00 Äq.). Die Reaktionslösung wurde filtriert und der Rückstand anschließend in Ethylacetat/Ethanol umkristallisiert.

**1w** wurde als brauner Feststoff (1.60 g, 6.84 mmol, 68 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.37 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 4.45 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 8.45 – 8.53 (m, 2H), 8.91 – 9.00 (m, 2H), 9.23 (s, 1H).

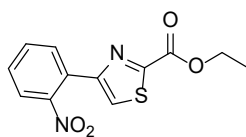
**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 13.9, 62.5, 122.7, 129.6, 143.8, 146.8, 150.9, 158.8, 159.1.

**HPLC**: *t*<sub>r</sub> 5.99 min; 99.9 %

**Smp.**: 203.9 °C

## 5. Experimenteller Teil

### Ethyl-4-(2-nitrophenyl)thiazol-2-carboxylat (**1x**)



**1x**

C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S

[278.28 g/mol]

Die Synthese von **1x** erfolgte nach **AAV I** aus den Edukten Ethyl-2-amino-2-thioacetat (2.66 g, 20.0 mmol) und 2-Brom-1-(2-nitrophenyl)ethan-1-on (4.98 g, 20.0 mmol). Der Rückstand aus der organischen Phase nach Extraktion wurde mit *n*-Hexan/Ethylacetat umkristallisiert.

**1x** wurde als oranger Feststoff (1.77 g, 6.36 mmol, 32 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.33 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 4.39 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 7.70 (ddd, *J* = 8.0, 6.2, 2.8 Hz, 1H), 7.76 – 7.92 (m, 2H), 7.94 – 8.07 (m, 1H), 8.42 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 14.0, 62.4, 124.3, 124.8, 127.4, 130.2, 131.4, 133.0, 148.5, 152.0, 157.5, 159.0.

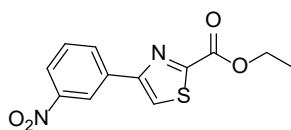
**HPLC**: *t*<sub>r</sub> 15.34 min; 98.8 %

**Smp.**: 97.6 °C



## 5. Experimenteller Teil

### Ethyl-4-(3-nitrophenyl)thiazol-2-carboxylat (**1y**)



**1y**

C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S

[278.28 g/mol]

Die Synthese von **1y** erfolgte nach **AAV I** aus den Edukten Ethyl-2-amino-2-thioxoacetat (2.72 g, 20.0 mmol, 1.00 Äq.) und 2-Brom-1-(3-nitrophenyl)ethan-1-on (5.03 g, 20.0 mmol). Das Präzipitat aus der Reaktionslösung wurde abfiltriert und der Rückstand mit Ethanol gewaschen.

**1y** wurde als farbloser Feststoff (4.49 g, 16.1 mmol, 81 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1.48 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 4.52 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 7.63 (ddd, *J* = 8.2, 7.8, 0.5 Hz, 1H), 7.92 (s, 1H), 8.22 (ddd, *J* = 8.2, 2.3, 1.1 Hz, 1H), 8.33 (ddd, *J* = 7.8, 1.8, 1.1 Hz, 1H), 8.76 (ddd, *J* = 2.3, 1.7, 0.5 Hz, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 14.4, 63.1, 120.7, 121.5, 123.5, 130.0, 132.7, 135.2, 148.8, 155.2, 159.1, 159.9.

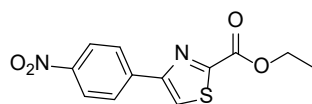
**HPLC**: *t<sub>r</sub>* 14.62 min; 99.9 %

**Smp.**: 151.6 °C

Die <sup>1</sup>H-NMR-Daten stimmen mit der Literatur überein. Wright *et al.* (2002)<sup>142</sup>

## 5. Experimenteller Teil

### Ethyl-4-(4-nitrophenyl)thiazol-2-carboxylat (**1z**)



**1z**

C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S

[278.28 g/mol]

Die Synthese von **1z** erfolgte nach **AAV I** aus den Edukten Ethyl-2-amino-2-thioacetat (1.12 g, 8.41 mmol) und 2-Brom-1-(4-nitrophenyl)ethan-1-on (2.20 g, 8.41 mmol). Das Präzipitat aus der Reaktionslösung wurde abfiltriert und der Rückstand mit Ethanol gewaschen.

**1z** wurde als gelblicher Feststoff (1.82 g, 6.54 mmol, 78 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1.47 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 4.53 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 7.95 (s, 1H), 8.08 – 8.18 (m, 2H), 8.26 – 8.34 (m, 2H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 14.4, 63.1, 121.7, 124.4, 127.5, 139.3, 147.9, 155.2, 159.2, 159.8.

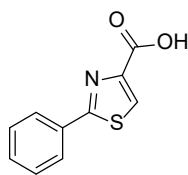
**HPLC**: t<sub>r</sub> 14.38 min; 99.1 %

**Smp.**: 187.7 °C

Die <sup>1</sup>H-NMR-Daten stimmen mit der Literatur überein. Kandre *et al.* (2014)<sup>143</sup>

## 5. Experimenteller Teil

### 2-Phenylthiazol-4-carbonsäure (5)



**5**

C<sub>10</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>S  
[205.23 g/mol]

**1t** (233 mg, 1.00 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 10 mL Isopropanol gelöst, Kaliumhydroxid (112 mg, 2.00 mmol, 2.00 Äq.) wurde dazugegeben und der Ansatz bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem DC-Umsatz (Fließmittel *n*-Hexan/Ethylacetat/Essigsäure 80/20/2 (V/V/V)) wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt, der Ansatz in 50 mL Ethylacetat aufgenommen und dreimal mit 50 mL 1 M Salzsäure-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt.

**5** wurde als farbloser Feststoff (161 mg, 0.78 mmol, 78 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO)  $\delta$  7.40 – 7.63 (m, 3H), 7.87 – 8.09 (m, 2H), 8.51 (s, 1H), 13.09 (s, 1H).

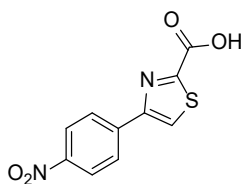
**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO)  $\delta$  126.4, 128.8, 128.8, 129.3, 130.8, 132.5, 148.1, 162.1, 167.4.

**HPLC:**  $t_r$  9.53 min; 99.9 %

**Smp.:** 177.1 °C

## 5. Experimenteller Teil

### 4-(4-Nitrophenyl)thiazol-2-carbonsäure (**6**)



**6**

C<sub>10</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S  
[250.23 g/mol]

**1z** (557 mg, 2.00 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 20 mL Isopropanol gelöst, Kaliumhydroxid (224 mg, 4.00 mmol, 2.00 Äq.) dazugegeben und der Ansatz bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem DC-Umsatz (Fließmittel *n*-Hexan/Ethylacetat/Essigsäure 70/30/2 (V/V/V)) wurde der Ansatz unter reduziertem Druck eingengt, der Rückstand in 50 mL Dichlormethan aufgenommen und dreimal mit 50 mL 1 M Salzsäure-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt.

**6** wurde als gelber Feststoff (440 mg, 1.76 mmol, 88 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO)  $\delta$  8.22 – 8.30 (m, 2H), 8.30 – 8.37 (m, 2H), 8.79 (s, 1H), 14.27 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO)  $\delta$  124.3, 124.3, 127.2, 139.3, 147.1, 153.6, 159.9, 160.6.

**HPLC:**  $t_r$  10.24 min; 98.2 %

**Smp.:** 183.3 °C

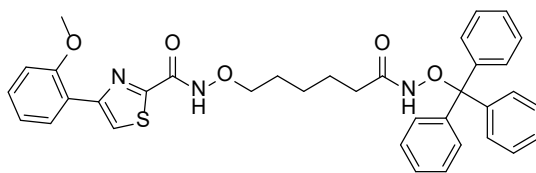
## 5. Experimenteller Teil

### 5.3 Allgemeine Arbeitsvorschrift II (AAV II): Darstellung der O-Trityl-geschützten Hydroxamate **3b-3aa**

Insofern nicht anders angegeben, wurde zur Darstellung der O-Trityl-geschützten Hydroxamate **3b-3aa** zunächst das entsprechende Phenylthiazol (**1b-1z**) (1.00 Äq.) in Tetrahydrofuran (15 mL/mmol) gelöst, bevor eine äquimolare Menge 1 M Natronlauge-Lösung zugegeben wurde. Nach vollständigem DC-Umsatz (Fließmittel *n*-Hexan/Ethylacetat (30:70 V/V)) wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt und der resultierende Feststoff im Hochvakuum getrocknet. Das getrocknete Produkt wurde in *N,N'*-Dimethylformamid (2.2 mL/mmol) suspendiert, ehe HBTU (1.1 Äq.) und DIPEA (1.1 Äq.) hinzugegeben wurden. Der Ansatz wurde solange bei Raumtemperatur gerührt, bis sich aus der Suspension eine Lösung bildete (üblicherweise nach 1 h). Zu dieser Lösung wurde der Linker **2** (1.1 Äq.) in *N,N'*-Dimethylformamid (2.2 mL/mmol) zugegeben und der Ansatz bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Anschließend wurde der Ansatz unter reduziertem Druck eingengt, das resultierende Rohprodukt in 50 mL Dichlormethan aufgenommen und dreimal mit 50 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und dreimal mit 50 mL gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde, falls nicht anders angegeben, flashchromatographisch mit *n*-Hexan/Ethylacetat (0-100 % Ethylacetat) gereinigt, um die O-Trityl-geschützten Hydroxamate **3b-3aa** zu erhalten.

## 5. Experimenteller Teil

### 4-(2-Methoxyphenyl)-N-((6-oxo-6-((trityloxy)amino)hexyl)oxy)thiazol-2-carboxamid (**3b**)



**3b**

$C_{36}H_{35}N_3O_5S$   
[621.75 g/mol]

Die Synthese von **3b** erfolgte nach **AAV II** aus dem Edukt **1b** (790 mg, 3.00 mmol, 1.00 Äq.) und dem Linker **2** (1.34 g, 3.30 mmol, 1.10 Äq.).

**3b** wurde als farbloser Feststoff (1.37 g, 2.21 mmol, 74 %) erhalten.

**$^1H$ -NMR** (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.04 – 1.17 (m, 2H), 1.18 – 1.31 (m, 2H), 1.48 (t,  $J$  = 7.8 Hz, 2H), 1.80 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 2H), 3.84 (t,  $J$  = 6.7 Hz, 2H), 3.94 (s, 3H), 7.03 – 7.13 (m, 1H), 7.17 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.33 (s, 16H), 8.29 – 8.37 (m, 2H), 10.19 (s, 1H), 12.12 (s, 1H).

**$^{13}C$ -NMR** (75 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  24.5, 24.7, 27.3, 31.9, 55.6, 75.5, 91.7, 111.7, 120.4, 121.7, 122.6, 127.4, 127.5, 129.0, 129.7, 129.8, 142.4, 151.4, 156.6, 159.8, 170.2.

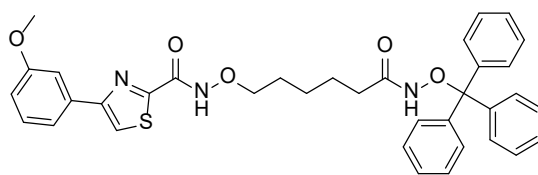
**HRMS** ( $m/z$ )  $MH^+$  berechnet für  $C_{36}H_{35}N_3O_5S$  622.2370, gefunden: 622.2373

**HPLC**:  $t_r$  17.66 min; 98.8 %

**Smp.**: 190.6 °C

## 5. Experimenteller Teil

### 4-(3-Methoxyphenyl)-N-((6-oxo-6-((trityloxy)amino)hexyl)oxy)thiazol-2-carboxamid (3c)



**3c**

C<sub>36</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S  
[621.75 g/mol]

Die Synthese von **3c** erfolgte nach **AAV II** aus dem Edukt **1c** (790 mg, 3.00 mmol, 1.00 Äq.) und dem Linker **2** (1.34 g, 3.30 mmol, 1.10 Äq.).

**3c** wurde als farbloser Feststoff (1.16 g, 1.87 mmol, 62 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.15 (s, 1H), 10.20 (s, 1H), 8.46 (s, 1H), 7.73 – 7.58 (m, 2H), 7.33 (d, *J* = 4.6 Hz, 16H), 6.96 (dd, *J* = 8.2, 2.6 Hz, 1H), 3.84 (d, *J* = 5.5 Hz, 5H), 1.81 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.59 – 1.40 (m, 2H), 1.24 (s, 2H), 1.19 – 1.01 (m, 2H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 24.5, 24.7, 27.3, 31.9, 55.2, 75.5, 91.7, 111.9, 114.2, 118.6, 119.6, 127.4, 127.5, 129.0, 129.9, 134.7, 142.4, 155.3, 156.5, 159.7, 161.4, 170.2.

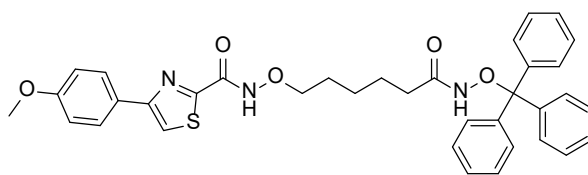
**HRMS** (*m/z*) MH<sup>+</sup> berechnet für C<sub>36</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S 622.2370, gefunden: 622.2373

**HPLC**: *t*<sub>r</sub> 17.36 min; 99.3 %

**Smp.**: 142.8 °C

## 5. Experimenteller Teil

### 4-(4-Methoxyphenyl)-N-((6-oxo-6-((trityloxy)amino)hexyl)oxy)thiazol-2-carboxamid (3d)



**3d**

C<sub>36</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S  
[621.75 g/mol]

Die Synthese von **3d** erfolgte nach **AAV II** aus dem Edukt **1d** (257 mg, 1.00 mmol, 1.00 Äq.) und dem Linker **2** (405 mg, 1.00 mmol, 1.00 Äq.).

**3d** wurde als farbloser Feststoff (150 mg, 0.24 mmol, 24 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.11 (q, *J* = 7.7 Hz, 2H), 1.16 – 1.33 (m, 2H), 1.48 (p, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.81 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 3.83 (d, *J* = 10.2 Hz, 5H), 6.99 – 7.08 (m, 2H), 7.33 (d, *J* = 4.7 Hz, 15H), 7.95 – 8.04 (m, 2H), 8.27 (s, 1H), 10.20 (s, 1H), 12.11 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 24.5, 24.7, 27.3, 31.9, 55.2, 75.5, 91.7, 114.2, 117.3, 126.2, 127.4, 127.5, 127.7, 129.0, 142.5, 155.4, 156.6, 159.6, 161.3, 170.2.

**HRMS** (*m/z*) MNa<sup>+</sup> berechnet für C<sub>36</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S 644.2189, gefunden: 644.2196

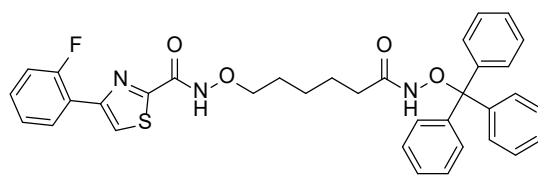
**HPLC**: *t*<sub>r</sub> 17.34 min; 98.2 %

**Smp.**: 195.4 °C



## 5. Experimenteller Teil

### 4-(2-Fluorphenyl)-N-((6-oxo-6-((trityloxy)amino)hexyl)oxy)thiazol-2-carboxamid (3e)



**3e**

$C_{35}H_{32}FN_3O_4S$   
[609.72 g/mol]

Die Synthese von **3e** erfolgte nach **AAV II** aus dem Edukt **1e** (754 mg, 3.00 mmol, 1.00 Äq.) und dem Linker **2** (1.34 g, 3.30 mmol, 1.10 Äq.).

**3e** wurde als farbloser Feststoff (1.27 g, 2.10 mmol, 70 %) erhalten.

**$^1H$ -NMR** (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.00 – 1.18 (m, 2H), 1.24 (s, 2H), 1.47 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 1.80 (t,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 3.85 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2H), 7.33 (s, 16H), 7.46 (dt,  $J = 7.9, 5.4$  Hz, 1H), 8.21 – 8.34 (m, 2H), 10.19 (s, 1H), 12.18 (s, 1H).

**$^{13}C$ -NMR** (75 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  24.5, 24.7, 27.3, 31.9, 75.5, 91.7, 116.2 (d,  $J = 22.0$  Hz), 121.0 (d,  $J = 11.5$  Hz), 123.5 (d,  $J = 13.5$  Hz), 124.8 (d,  $J = 3.4$  Hz), 127.4, 127.5, 129.0, 130.1, 130.5 (d,  $J = 8.8$  Hz), 142.5, 148.9, 156.4, 157.9, 161.2, 170.2.

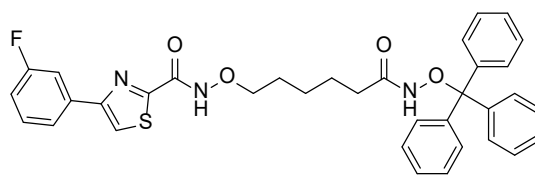
**HRMS** ( $m/z$ )  $MH^+$  berechnet für  $C_{35}H_{32}FN_3O_4S$  610.2170, gefunden: 610.2163

**HPLC**:  $t_r$  17.87 min; 98.6 %

**Smp.**: 159.2 °C

## 5. Experimenteller Teil

### 4-(3-Fluorphenyl)-N-((6-oxo-6-((trityloxy)amino)hexyl)oxy)thiazol-2-carboxamid (3f)



**3f**

$C_{35}H_{32}FN_3O_4S$   
[609.72 g/mol]

Die Synthese von **3f** erfolgte nach **AAV II** aus dem Edukt **1f** (754 mg, 3.00 mmol, 1.00 Äq.) und dem Linker **2** (1.34 g, 3.30 mmol, 1.10 Äq.).

**3f** wurde als farbloser Feststoff (613 mg, 1.01 mmol, 34 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.11 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.23 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.48 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.80 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.85 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 7.17 – 7.41 (m, 16H), 7.53 (td, *J* = 8.2, 6.2 Hz, 1H), 7.88 – 7.97 (m, 2H), 8.55 (s, 1H), 10.19 (s, 1H), 12.16 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 24.7, 27.3, 75.6, 91.8, 113.3, 115.3 (d, *J* = 21.5 Hz), 120.6, 122.3, 127.4, 127.5, 129.0, 130.9 (d, *J* = 9.1 Hz), 135.7 (d, *J* = 8.4 Hz), 142.5, 154.0, 156.4, 161.7.

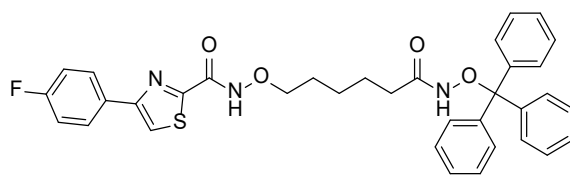
**HRMS** (*m/z*) MH<sup>+</sup> berechnet für C<sub>35</sub>H<sub>32</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S 610.2170, gefunden: 610.2173

**HPLC**: t<sub>r</sub> 17.85 min; 99.1 %

**Smp.**: 142.8 °C

## 5. Experimenteller Teil

### 4-(4-Fluorphenyl)-*N*-((6-oxo-6-((trityloxy)amino)hexyl)oxy)thiazol-2-carboxamid (**3g**)



**3g**

$C_{35}H_{32}FN_3O_4S$   
[609.72 g/mol]

Die Synthese von **3g** erfolgte nach **AAV II** aus dem Edukt **1g** (245 mg, 1.00 mmol, 1.00 Äq.) und dem Linker **2** (445 mg, 1.10 mmol, 1.10 Äq.).

**3g** wurde als farbloser Feststoff (313 mg, 0.51 mmol, 51 %) erhalten.

**$^1H$ -NMR** (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.11 (d,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 1.24 (s, 2H), 1.40 – 1.55 (m, 2H), 1.79 (d,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 3.84 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2H), 7.24 – 7.41 (m, 17H), 8.06 – 8.15 (m, 2H), 8.41 (s, 1H), 10.18 (s, 1H), 12.13 (s, 1H).

**$^{13}C$ -NMR** (75 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  24.5, 24.7, 27.3, 31.9, 75.5, 91.7, 115.7 (d,  $J = 21.7$  Hz), 119.1, 127.4, 127.5, 128.4 (d,  $J = 8.3$  Hz), 128.9, 130.0 (d,  $J = 2.9$  Hz), 142.4, 154.4, 156.5, 160.6, 161.6, 163.9, 170.2.

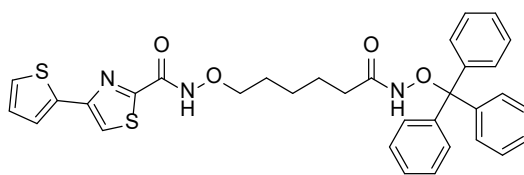
**HRMS** ( $m/z$ )  $MH^+$  berechnet für  $C_{35}H_{32}FN_3O_4S$  610.2170, gefunden: 610.2180

**HPLC**:  $t_r$  17.57 min; 99.6 %

**Smp.** 163.0 °C

## 5. Experimenteller Teil

### ***N*-((6-Oxo-6-((trityloxy)amino)hexyl)oxy)-4-(thiophen-2-yl)thiazol-2-carboxamid (3h)**



**3h**

$C_{33}H_{31}N_3O_4S_2$   
[597.75 g/mol]

Die Synthese von **3h** erfolgte nach **AAV II** aus dem Edukt **1h** (718 mg, 3.00 mmol, 1.00 Äq.) und dem Linker **2** (1.34 g, 3.30 mmol, 1.10 Äq.).

**3h** wurde als farbloser Feststoff (1.58 g, 2.64 mmol, 88 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.09 (p, *J* = 7.9 Hz, 2H), 1.24 (p, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.47 (p, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.80 (q, *J* = 7.9 Hz, 2H), 3.84 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 7.15 (dd, *J* = 5.0, 3.6 Hz, 1H), 7.25 – 7.38 (m, 15H), 7.58 – 7.62 (m, 1H), 7.64 – 7.68 (m, 1H), 8.25 (s, 1H), 10.19 (s, 1H), 12.09 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 24.5, 24.7, 27.3, 31.9, 75.4, 91.7, 118.0, 125.4, 126.8, 127.4, 127.5, 128.1, 129.0, 136.8, 142.5, 150.3, 156.4, 161.8, 170.2.

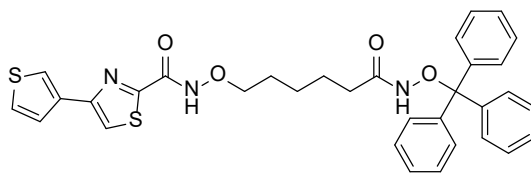
**HRMS** (*m/z*) MH<sup>+</sup> berechnet für C<sub>33</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub> 598.1829, gefunden: 598.1832

**HPLC**: t<sub>r</sub> 17.23 min; 98.1 %

**Smp.** 174.6 °C

## 5. Experimenteller Teil

### ***N*-((6-Oxo-6-((trityloxy)amino)hexyl)oxy)-4-(thiophen-3-yl)thiazol-2-carboxamid (**3i**)**



**3i**

$C_{33}H_{31}N_3O_4S_2$   
[597.75 g/mol]

Die Synthese von **3i** erfolgte nach **AAV II** aus dem Edukt **1i** (665 mg, 2.78 mmol, 1.00 Äq.) und dem Linker **2** (1.24 g, 3.06 mmol, 1.10 Äq.).

**3i** wurde als farbloser Feststoff (1.53 g, 2.55 mmol, 92 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.10 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.23 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H), 1.46 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.79 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 3.84 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 7.33 (d, *J* = 4.3 Hz, 15H), 7.62 – 7.73 (m, 2H), 8.01 (dd, *J* = 2.8, 1.5 Hz, 1H), 8.25 (s, 1H), 10.19 (s, 1H), 12.09 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 24.9, 25.1, 27.7, 32.3, 75.9, 92.2, 119.0, 123.3, 126.7, 127.6, 127.8, 127.9, 129.3, 136.1, 142.9, 152.1, 157.0, 161.8, 170.6.

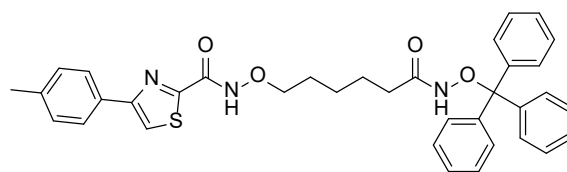
**HRMS** (*m/z*)  $MH^+$  berechnet für  $C_{33}H_{31}N_3O_4S_2$  598.1829, gefunden: 598.1836

**HPLC**: *t*<sub>r</sub> 16.91 min; 96.9 %

**Smp.** 214.7 °C

## 5. Experimenteller Teil

### **N-((6-Oxo-6-((trityloxy)amino)hexyl)oxy)-4-(p-tolyl)thiazol-2-carboxamid (3j)**



**3j**

$C_{36}H_{35}N_3O_4S$   
[605.75 g/mol]

Die Synthese von **3j** erfolgte nach **AAV II** aus dem Edukt **1j** (742 mg, 3.00 mmol, 1.00 Äq.) und dem Linker **2** (1.34 g, 3.30 mmol, 1.10 Äq.).

**3j** wurde als farbloser Feststoff (313 mg, 0.52 mmol, 17 %) erhalten.

**$^1H$ -NMR** (300 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  1.10 (d,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 1.23 (s, 2H), 1.46 (d,  $J = 7.7$  Hz, 3H), 1.79 (d,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 2.35 (s, 3H), 3.84 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2H), 7.24 – 7.41 (m, 17H), 7.95 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H), 8.36 (s, 1H), 10.19 (s, 1H), 12.11 (s, 1H).

**$^{13}C$ -NMR** (75 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  20.9, 24.5, 24.7, 27.3, 31.9, 75.5, 91.7, 118.5, 126.2, 127.4, 127.5, 129.0, 129.4, 130.7, 138.0, 142.5, 156.6, 161.4, 170.2.

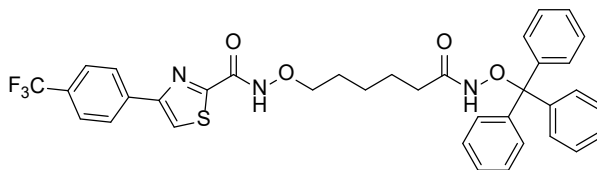
**HRMS** ( $m/z$ )  $MH^+$  berechnet für  $C_{36}H_{35}N_3O_4S$  628.2240, gefunden: 628.2244

**HPLC**:  $t_r$  17.93 min; 95.1 %

**Smp.** 163.2 °C

## 5. Experimenteller Teil

### *N*-((6-Oxo-6-((trityloxy)amino)hexyl)oxy)-4-(4-(trifluormethyl)phenyl)thiazol-2-carboxamid (**3k**)



**3k**

$C_{36}H_{32}F_3N_3O_4S$   
[659.72 g/mol]

Die Synthese von **3k** erfolgte nach **AAV II** aus dem Edukt **1k** (904 mg, 3.0 mmol, 1.00 Äq.) und dem Linker **2** (1.34 g, 3.30 mmol, 1.10 Äq.).

**3k** wurde als farbloser Feststoff (499 mg, 0.76 mmol, 25 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  1.11 (q,  $J = 7.7$  Hz, 2H), 1.25 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 1.48 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 1.81 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 3.85 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2H), 7.33 (s, 15H), 7.86 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 8.29 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H), 8.66 (s, 1H), 10.19 (s, 1H), 12.22 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  24.4, 24.6, 27.2, 31.7, 75.4, 91.6, 121.6, 125.7, 126.8, 127.3, 127.4, 128.8, 137.0, 142.3, 153.6, 156.3, 162.0, 170.1.

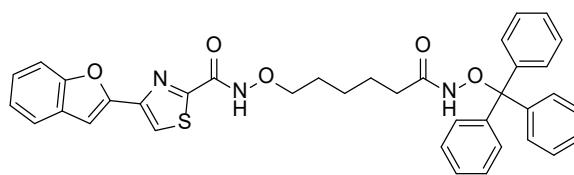
**HRMS** ( $m/z$ )  $MNa^+$  berechnet für  $C_{36}H_{32}F_3N_3O_4S$  682.1958, gefunden: 682.1966

**HPLC**:  $t_r$  19.44 min; 99.8 %

**Smp.** 182.5 °C

## 5. Experimenteller Teil

### 4-(Benzofuran-2-yl)-N-((6-oxo-6-((trityloxy)amino)hexyl)oxy)thiazol-2-carboxamid (3I)



**3I**

C<sub>37</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S  
[631.75 g/mol]

Die Synthese von **3I** erfolgte nach **AAV II** aus dem Edukt **1I** (547 mg, 2.00 mmol, 1.00 Äq.) und dem Linker **2** (890 mg, 2.20 mmol, 1.10 Äq.). Die Aufarbeitung erfolgte durch Umkristallisation des Rohproduktes aus *n*-Hexan/Dichlormethan.

**3I** wurde als bräunlicher Feststoff (408 mg, 0.65 mmol, 32 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.03 – 1.19 (m, 2H), 1.14 – 1.34 (m, 3H), 1.42 – 1.56 (m, 2H), 1.74 – 1.87 (m, 2H), 3.85 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 7.20 – 7.43 (m, 18H), 7.63 – 7.69 (m, 1H), 7.74 (dd, *J* = 7.3, 1.4 Hz, 1H), 8.42 (s, 1H), 10.19 (s, 1H), 12.24 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 24.5, 24.7, 27.3, 31.9, 75.5, 91.7, 104.0, 111.2, 121.2, 121.8, 123.5, 125.3, 127.4, 127.5, 128.1, 129.0, 142.5, 146.5, 150.5, 154.3, 156.3, 163.1, 170.2.

**HRMS** (*m/z*) MH<sup>+</sup> berechnet für C<sub>37</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S 632.2214, gefunden: 632.2211

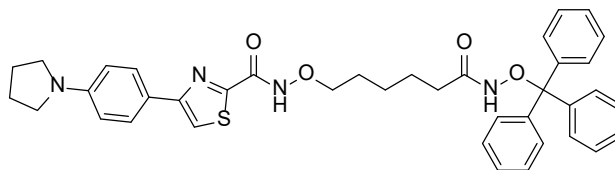
**HPLC**: *t*<sub>r</sub> 18.46 min; 97.9 %

**Smp.** 200.7 °C



## 5. Experimenteller Teil

### **N-((6-Oxo-6-((trityloxy)amino)hexyl)oxy)-4-(4-(pyrrolidin-1-yl)phenyl)thiazol-2-carboxamid (3m)**



**3m**

$C_{39}H_{40}N_4O_4S$   
[660.83 g/mol]

Die Synthese von **3m** erfolgte nach **AAV II** aus dem Edukt **1m** (907 mg, 3.00 mmol, 1.00 Äq.) und dem Linker **2** (1.34 g, 3.30 mmol, 1.10 Äq.). Die Aufarbeitung erfolgte durch Umkristallisation des Rohproduktes aus Cyclohexan/Tetrahydrofuran.

**3m** wurde als gelber Feststoff (487 mg, 0.74 mmol, 25 %) erhalten.

**$^1H$ -NMR** (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.05 – 1.17 (m, 2H), 1.18 – 1.30 (m, 2H), 1.43 – 1.53 (m, 2H), 1.79 (d,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 1.92 – 2.02 (m, 4H), 3.27 (q,  $J = 5.1$  Hz, 4H), 3.84 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2H), 6.56 – 6.64 (m, 2H), 7.31 (q,  $J = 5.1$  Hz, 15H), 7.81 – 7.91 (m, 2H), 8.05 (s, 1H), 10.20 (s, 1H), 12.05 (s, 1H).

**$^{13}C$ -NMR** (75 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  24.5, 24.7, 25.0, 26.3, 27.3, 31.9, 47.3, 75.5, 91.7, 111.5, 114.7, 120.7, 127.4, 127.5, 129.0, 142.5, 147.8, 156.6, 156.8, 170.2.

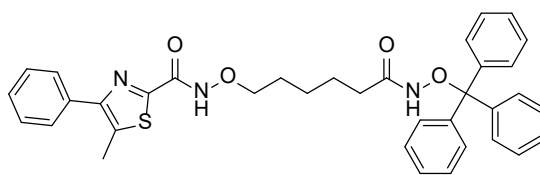
**HRMS** ( $m/z$ )  $MH^+$  berechnet für  $C_{39}H_{40}N_4O_4S$  661.2843, gefunden: 661.2838

**HPLC**:  $t_r$  20.03 min; 95.3 %

**Smp.** 192.1 °C

## 5. Experimenteller Teil

### 5-Methyl-*N*-((6-oxo-6-((trityloxy)amino)hexyl)oxy)-4-phenylthiazol-2-carboxamid (**3n**)



**3n**

C<sub>36</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S  
[605.75 g/mol]

Die Synthese von **3n** erfolgte nach **AAV II** aus dem Edukt **1n** (742 mg, 3.00 mmol, 1.00 Äq.) und dem Linker **2** (1.34 g, 3.30 mmol, 1.10 Äq.).

**3n** wurde als farbloser Feststoff (622 mg, 1.03 mmol, 34 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.01 – 1.14 (m, 2H), 1.15 – 1.31 (m, 2H), 1.36 – 1.54 (m, 2H), 1.71 – 1.88 (m, 2H), 2.61 (s, 3H), 3.80 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 7.33 (s, 15H), 7.43 – 7.56 (m, 2H), 7.65 – 7.81 (m, 2H), 10.19 (s, 1H), 12.00 (s, 1H).

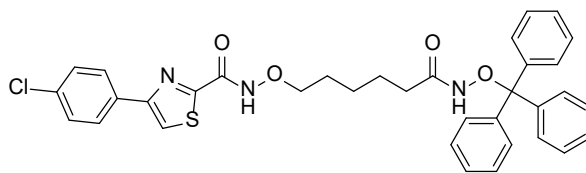
**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.7, 24.5, 24.7, 27.3, 31.9, 75.3, 91.7, 127.4, 127.5, 128.0, 128.4, 128.9, 133.9, 134.1, 142.5, 151.5, 156.7, 157.4, 170.2.

**HPLC**: *t*<sub>r</sub> 18.94 min; 99.9 %

**Smp.**: 176.7 °C

## 5. Experimenteller Teil

### 4-(4-Chlorphenyl)-N-((6-oxo-6-((trityloxy)amino)hexyl)oxy)thiazol-2-carboxamid (**3o**)



**3o**

$C_{35}H_{32}ClN_3O_4S$   
[626.17 g/mol]

Die Synthese von **3o** erfolgte nach **AAV II** aus dem Edukt **1o** (700 mg, 2.61 mmol, 1.00 Äq.) und dem Linker **2** (1.16 g, 2.87 mmol, 1.10 Äq.).

**3o** wurde als farbloser Feststoff (200 mg, 0.32 mmol, 12 %) erhalten.

**$^1H$ -NMR** (600 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  1.10 (q,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 1.16 – 1.32 (m, 2H), 1.48 (q,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 1.80 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 3.84 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2H), 7.24 – 7.38 (m, 15H), 7.45 – 7.67 (m, 2H), 7.95 – 8.19 (m, 2H), 8.49 (s, 1H), 10.19 (s, 1H), 12.16 (s, 1H).

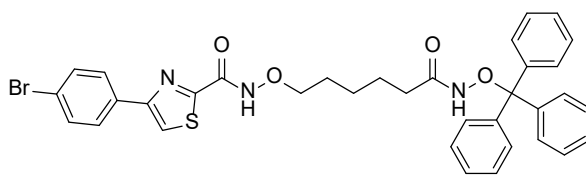
**$^{13}C$ -NMR** (75 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  24.5, 24.7, 27.3, 31.9, 75.5, 91.7, 120.0, 127.4, 127.5, 128.0, 128.9, 129.0, 132.2, 133.2, 142.4, 154.1, 156.4, 161.8, 170.2.

**HPLC**:  $t_r$  19.75 min; 98.0 %

**Smp.**: 183.0 °C

## 5. Experimenteller Teil

### 4-(4-Bromphenyl)-N-((6-oxo-6-((trityloxy)amino)hexyl)oxy)thiazol-2-carboxamid (3p)



**3p**

$C_{35}H_{32}BrN_3O_4S$   
[670.62 g/mol]

Die Synthese von **3p** erfolgte nach **AAV II** aus dem Edukt **1p** (625 mg, 2.00 mmol, 1.00 Äq.) und dem Linker **2** (890 mg, 2.20 mmol, 1.10 Äq.).

**3p** wurde als farbloser Feststoff (200 mg, 0.30 mmol, 30 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  1.02 – 1.17 (m, 2H), 1.17 – 1.30 (m, 2H), 1.40 – 1.56 (m, 2H), 1.73 – 1.88 (m, 2H), 3.84 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 7.33 (s, 15H), 7.63 – 7.74 (m, 2H), 7.98 – 8.07 (m, 2H), 8.50 (s, 1H), 10.18 (s, 1H), 12.15 (s, 1H).

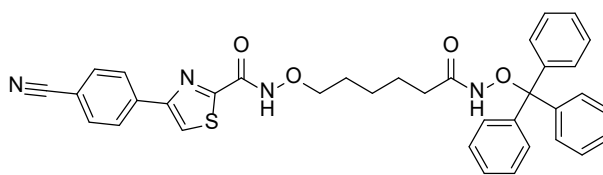
**<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  24.5, 24.7, 27.3, 31.9, 75.5, 91.7, 120.0, 121.8, 127.4, 127.5, 128.3, 129.0, 131.8, 132.6, 142.5, 154.2, 156.4, 161.8, 170.2.

**HPLC**:  $t_r$  18.73 min; 99.8 %

**Smp.**: 228.8 °C

## 5. Experimenteller Teil

### 4-(4-Cyanophenyl)-N-((6-oxo-6-((trityloxy)amino)hexyl)oxy)thiazol-2-carboxamid (3q)



**3q**

C<sub>36</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S  
[616.74 g/mol]

Die Synthese von **3q** erfolgte nach **AAV II** aus dem Edukt **1q** (775 mg, 3.00 mmol, 1.00 Äq.) und dem Linker **2** (1.34 g, 3.30 mmol, 1.10 Äq.).

**3q** wurde als farbloser Feststoff (1.33 g, 2.20 mmol, 72 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.08 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 1.18 – 1.32 (m, 2H), 1.48 (s, 2H), 1.80 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 3.85 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 7.33 (s, 15H), 7.98 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 8.27 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 8.70 (s, 1H), 10.19 (s, 1H), 12.22 (s, 1H).

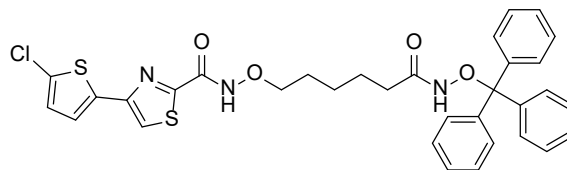
**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 24.4, 24.6, 27.2, 31.8, 75.5, 91.7, 110.7, 118.6, 122.2, 126.9, 127.3, 127.4, 128.8, 132.7, 137.4, 142.4, 153.3, 156.3, 162.0.

**HPLC:** *t*<sub>r</sub> 16.61 min; 97.6 %

**Smp.:** 185.3 °C

## 5. Experimenteller Teil

### 4-(5-Chlorthiophen-2-yl)-N-((6-oxo-6-((trityloxy)amino)hexyl)oxy)thiazol-2-carboxamid (3r)



**3r**

C<sub>33</sub>H<sub>30</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub>  
[632.19 g/mol]

Die Synthese von **3r** erfolgte nach **AAV II** aus dem Edukt **1r** (803 mg, 3.00 mmol, 1.00 Äq.) und dem Linker **2** (1.34 g, 3.30 mmol, 1.10 Äq.). Die Aufreinigung erfolgte durch Umkristallisation aus Ethylacetat/Ethanol.

**3r** wurde als farbloser Feststoff (742 g, 1.17 mmol, 39 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.10 (q, *J* = 8.0 Hz, 2H), 1.22 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 1.31 – 1.60 (m, 2H), 1.80 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.83 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 7.18 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 7.21 – 7.46 (m, 15H), 7.54 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H), 8.32 (s, 1H), 10.19 (s, 1H), 12.09 (s, 1H).

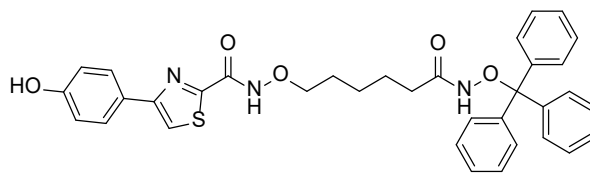
**<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 24.5, 24.7, 27.3, 31.9, 75.5, 91.7, 118.5, 124.9, 127.4, 127.5, 128.0, 128.6, 129.0, 135.8, 142.5, 149.0, 156.2, 162.1, 170.2.

**HPLC:** t<sub>r</sub> 18.45 min; 98.7 %

**Smp.:** 174.5 °C

## 5. Experimenteller Teil

### 4-(4-Hydroxyphenyl)-*N*-((6-oxo-6-((trityloxy)amino)hexyl)oxy)thiazol-2-carboxamid (**3s**)



**3s**

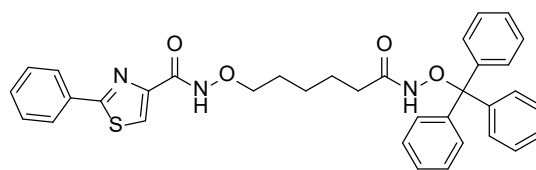
C<sub>35</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S  
[607.73 g/mol]

Die Synthese von **3s** erfolgte nach **AAV II** aus dem Edukt **1s** (249 mg, 1.00 mmol, 1.00 Äq.) und dem Linker **2** (445 mg, 1.10 mmol, 1.10 Äq.).

Der erhaltene Feststoff wurde ohne weitere Aufarbeitung umgesetzt.

## 5. Experimenteller Teil

### ***N*-((6-Oxo-6-((trityloxy)amino)hexyl)oxy)-2-phenylthiazol-4-carboxamid (3t)**



**3t**

C<sub>35</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S

[591.73 g/mol]

**5** (101 mg, 0.49 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 20 mL *N,N*-Dimethylformamid gelöst, ehe HATU (190 mg, 0.50 mmol, 1.00 Äq.) und DIPEA (0.17 mL, 1.00 mmol, 1.00 Äq.) hinzugegeben wurden und der Ansatz für 15 min bei Raumtemperatur gerührt wurde. Nach dieser Zeit wurde **2** (202 mg, 0.50 mmol, 1.00 Äq.) zugegeben und der Ansatz 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der Ansatz unter reduziertem Druck eingengt, der Rückstand in 50 mL Ethylacetat aufgenommen und dreimal mit je 50 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung, dreimal mit 50 mL gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde in *n*-Hexan/Ethylacetat umkristallisiert.

**3t** wurde als farbloser Feststoff (164 mg, 0.27 mmol, 55 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.12 (q, *J* = 7.8 Hz, 2H), 1.25 (s, 2H), 1.48 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.81 (s, 2H), 3.83 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 7.23 – 7.39 (m, 15H), 7.47 – 7.59 (m, 3H), 8.05 (dd, *J* = 6.7, 3.0 Hz, 2H), 8.32 (s, 1H), 10.13 (s, 1H), 11.63 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 24.7, 27.2, 75.2, 91.7, 124.2, 126.4, 127.2, 127.3, 128.8, 129.0, 130.6, 132.3, 142.3, 148.6, 158.0, 167.3.

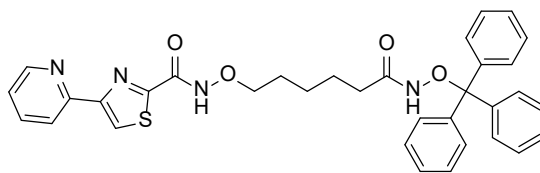
**HPLC**: *t*<sub>r</sub> 17.26 min; 98.6 %

**Smp.**: 163.7 °C



## 5. Experimenteller Teil

### ***N*-((6-Oxo-6-((trityloxy)amino)hexyl)oxy)-4-(pyridin-2-yl)thiazol-2-carboxamid (3u)**



**3u**

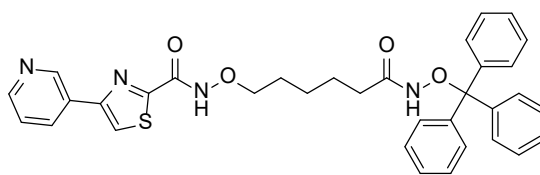
C<sub>34</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S  
[592.71 g/mol]

Die Synthese von **3u** erfolgte nach **AAV II** aus dem Edukt **1u** (703 mg, 3.00 mmol, 1.00 Äq.) und dem Linker **2** (1.34 g, 3.30 mmol, 1.10 Äq.).

Der erhaltene Feststoff wurde ohne weitere Aufarbeitung umgesetzt.

## 5. Experimenteller Teil

### ***N*-((6-Oxo-6-((trityloxy)amino)hexyl)oxy)-4-(pyridin-3-yl)thiazol-2-carboxamid (3v)**



**3v**

C<sub>34</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S  
[592.71 g/mol]

Die Synthese von **3v** erfolgte nach **AAV II** aus dem Edukt **1v** (703 mg, 3.00 mmol, 1.00 Äq.) und dem Linker **2** (1.34 g, 3.30 mmol, 1.10 Äq.). Die Aufarbeitung erfolgte durch flashchromatographische Aufreinigung mit Dichlormethan/30 % Methanol in Dichlormethan als Eluenten und anschließender Umkristallisation des Rückstandes aus *n*-Hexan/Ethylacetat. **3v** wurde als farbloser Feststoff (190 mg, 0.32 mmol, 11 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.08 (dq, *J* = 16.1, 8.1 Hz, 2H), 1.16 – 1.31 (m, 2H), 1.48 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.80 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 3.85 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 7.27 – 7.37 (m, 15H), 7.52 (dd, *J* = 8.0, 4.8 Hz, 1H), 8.40 (dt, *J* = 8.0, 2.0 Hz, 1H), 8.59 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H), 9.29 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 10.19 (s, 1H), 12.18 (s, 1H).

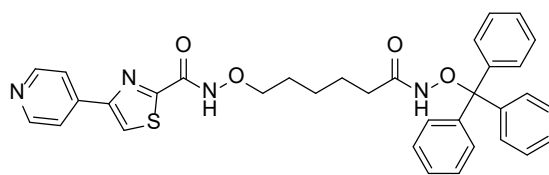
**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 24.5, 24.7, 27.3, 31.9, 75.6, 91.7, 120.8, 123.8, 127.4, 127.5, 129.0, 129.1, 133.5, 142.5, 147.6, 149.4, 152.5, 156.4, 162.1, 170.2.

**HPLC:** *t*<sub>r</sub> 15.01 min; 99.9 %

**Smp.:** 134.3 °C

## 5. Experimenteller Teil

### ***N*-((6-Oxo-6-((trityloxy)amino)hexyl)oxy)-4-(pyridin-4-yl)thiazol-2-carboxamid (**3w**)**



**3w**

C<sub>34</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S  
[592.71 g/mol]

Die Synthese von **3w** erfolgte nach **AAV II** aus dem Edukt **1w** (493 mg, 2.10 mmol, 1.00 Äq.) und dem Linker **2** (0.93 g, 2.30 mmol, 1.10 Äq.).

**3w** wurde als farbloser Feststoff (165 mg, 0.28 mmol, 13 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.06 – 1.14 (m, 2H), 1.21 – 1.29 (m, 3H), 1.45 – 1.52 (m, 2H), 1.80 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 3.85 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 7.25 – 7.39 (m, 15H), 7.98 – 8.07 (m, 2H), 8.65 – 8.73 (m, 2H), 8.76 (s, 1H), 10.19 (s, 1H), 12.21 (s, 1H).

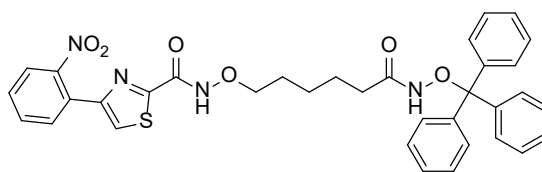
**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 24.5, 24.7, 27.3, 31.9, 75.6, 91.7, 120.4, 123.2, 127.4, 127.5, 129.0, 140.1, 142.5, 150.4, 152.8, 156.3, 162.3, 170.2.

**HPLC**: *t*<sub>r</sub> 15.65 min; 97.8 %

**Smp.**: 153.9 °C

## 5. Experimenteller Teil

### 4-(2-Nitrophenyl)-N-((6-oxo-6-((trityloxy)amino)hexyl)oxy)thiazol-2-carboxamid (**3x**)



**3x**  
C<sub>35</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S  
[636.72 g/mol]

Die Synthese von **3x** erfolgte nach **AAV II** aus dem Edukt **1x** (835 mg, 3.00 mmol, 1.00 Äq) und dem Linker **2** (1.34 g, 3.30 mmol, 1.10 Äq.).

**3x** wurde als farbloser Feststoff (1.03 g, 1.61 mmol, 54 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.07 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.14 – 1.34 (m, 2H), 1.43 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.79 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.79 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 7.33 (d, *J* = 4.5 Hz, 15H), 7.71 (dq, *J* = 8.6, 4.2 Hz, 1H), 7.82 (d, *J* = 4.3 Hz, 2H), 8.03 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.24 (s, 1H), 10.18 (s, 1H), 12.05 (s, 1H).

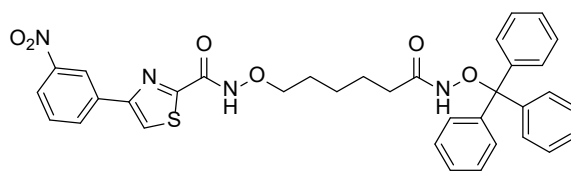
**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 24.4, 24.6, 27.1, 31.8, 75.3, 91.7, 123.1, 124.1, 127.3, 127.4, 127.8, 128.8, 130.0, 131.6, 132.9, 142.4, 148.4, 151.0, 156.3, 161.9.

**HPLC**: *t<sub>r</sub>* 16.37 min; 98.1 %

**Smp.**: 123.7 °C

## 5. Experimenteller Teil

### 4-(3-Nitrophenyl)-N-((6-oxo-6-((trityloxy)amino)hexyl)oxy)thiazol-2-carboxamid (**3y**)



**3y**

C<sub>35</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S

[636.72 g/mol]

Die Synthese von **3y** erfolgte nach **AAV II** aus dem Edukt **1y** (272 mg, 1.00 mmol, 1.00 Äq.) und dem Linker **2** (445 mg, 1.10 mmol, 1.10 Äq.).

**3y** wurde als farbloser Feststoff (85.1 mg, 0.13 mmol, 13 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.09 (td, *J* = 7.1, 3.7 Hz, 2H), 1.24 (s, 2H), 1.48 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.79 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.86 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 7.32 (s, 15H), 7.79 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.25 (ddd, *J* = 8.2, 2.4, 1.0 Hz, 1H), 8.50 (dt, *J* = 7.8, 1.3 Hz, 1H), 8.75 (s, 1H), 8.92 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H), 10.19 (s, 1H), 12.31 (s, 1H).

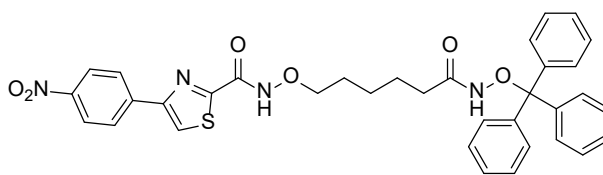
**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 13.9, 24.7, 27.3, 31.8, 75.5, 91.7, 120.8, 121.7, 123.1, 127.4, 127.5, 128.9, 130.4, 132.4, 134.9, 142.4, 148.5, 152.9, 156.3, 162.1, 170.2.

**HPLC**: *t*<sub>r</sub> 17.45 min; 99.9 %

**Smp.**: 127.3 °C

## 5. Experimenteller Teil

### 4-(4-Nitrophenyl)-*N*-((6-oxo-6-((trityloxy)amino)hexyl)oxy)thiazol-2-carboxamid (**3z**)



**3z**

C<sub>35</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S

[636.72 g/mol]

**6** (340 mg, 1.36 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 20 mL *N,N*-Dimethylformamid gelöst, ehe HATU (517 mg, 1.36 mmol, 1.00 Äq.) und DIPEA (0.47 mL, 2.72 mmol, 2.00 Äq.) hinzugegeben wurden und der Ansatz für 15 min bei Raumtemperatur gerührt wurde. Anschließend wurde **2** (550 mg, 1.36 mmol, 1.00 Äq.) zugegeben und der Ansatz 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der Ansatz unter reduziertem Druck eingeeengt, der Rückstand in 50 mL Ethylacetat aufgenommen und dreimal mit je 50 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung, dreimal mit 50 mL gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde erst flashchromatographisch mit Dichlormethan/30 %Methanol in Dichlormethan aufgereinigt und anschließend aus *n*-Hexan/Ethylacetat umkristallisiert.

**3z** wurde als farbloser Feststoff (286 mg, 0.45 mmol, 33 %) erhalten.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.11 (q, *J* = 7.8 Hz, 2H), 1.25 (p, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.48 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.81 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.86 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 7.32 (s, 15H), 8.27 – 8.41 (m, 4H), 8.76 (s, 1H), 10.20 (s, 1H), 12.27 (s, 1H).

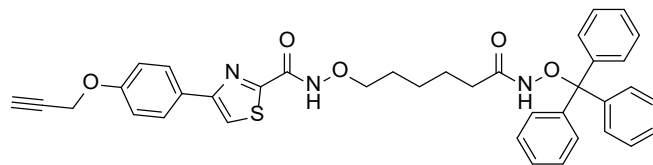
<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 24.5, 24.7, 27.3, 31.9, 75.6, 91.7, 123.2, 124.2, 127.2, 127.4, 127.5, 129.0, 139.3, 142.4, 147.1, 153.0, 156.3, 162.3, 170.2.

HPLC: *t*<sub>r</sub> 17.33 min; 95.1 %

Smp.: 216.3 °C

## 5. Experimenteller Teil

### ***N*-((6-Oxo-6-((trityloxy)amino)hexyl)oxy)-4-(4-(prop-2-yn-1-yloxy)phenyl)thiazol-2-carboxamid (3aa)**



**3aa**

C<sub>38</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S  
[645.77 g/mol]

Die Synthese von **3aa** erfolgte nach **AAV II** aus dem Edukt **12** (1.30 g, 4.52 mmol, 1.00 Äq.) und dem Linker **2** (2.01 g, 5.00 mmol, 1.10 Äq.). Die Aufarbeitung erfolgte durch Umkristallisation des Rohproduktes aus *n*-Hexan/Dichlormethan.

**3aa** (1.25 g, 1.94 mmol, 43 %) wurde als bräunlicher Feststoff erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.11 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.24 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H), 1.47 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.81 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 3.60 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H), 3.85 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 4.87 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H), 7.05 – 7.16 (m, 2H), 7.22 – 7.42 (m, 15H), 7.97 – 8.05 (m, 2H), 8.29 (s, 1H), 10.20 (s, 1H), 12.11 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 24.5, 24.7, 27.3, 31.9, 55.5, 78.4, 79.1, 91.7, 115.1, 117.7, 126.9, 127.4, 127.5, 127.7, 129.0, 142.5, 155.3, 156.6, 157.5, 161.3, 170.2, 191.8.

**HPLC**: *t*<sub>r</sub> 17.16 min; 98.9 %

**Smp.** 180.1°C

## 5. Experimenteller Teil

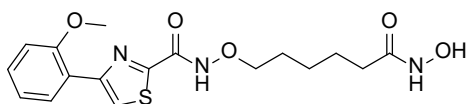
### 5.4 Allgemeine Arbeitsvorschrift III (AAV III): Darstellung der Hydroxamate **4b-4aa**.

Zur Darstellung der Hydroxamate **4b-4aa** wurde zunächst die entsprechende O-Trityl-geschützte Vorstufe (**3b-3aa**) (1.00 Äq.) in Dichlormethan (30 mL/mmol) gelöst, bevor zu der entstandenen Lösung nacheinander Triethylsilan (10.0 Äq.) und Trifluoressigsäure (10.0 Äq.) hinzugegeben wurden. Die Reaktion wurde für 30 min bei Raumtemperatur gerührt, bevor der Ansatz, falls nicht anders angegeben, flashchromatographisch mit einem Eluenten aus Dichlormethan/30 % Methanol in Dichlormethan (0-50 %) gereinigt wurde.



## 5. Experimenteller Teil

### ***N*-((6-(Hydroxyamino)-6-oxohexyl)oxy)-4-(2-methoxyphenyl)thiazol-2-carboxamid (**4b**)**



**4b**

C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S

[379.43 g/mol]

Die Synthese von **4b** erfolgte nach **AAV III** aus dem Edukt **3b** (622 mg, 1.00 mmol, 1.00 Äq.).

**4b** wurde als farbloser Feststoff (284 mg, 0.75 mmol, 75 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.26 – 1.47 (m, 2H), 1.58 (dp, *J* = 22.2, 7.0 Hz, 4H), 1.97 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 3.93 (d, *J* = 4.0 Hz, 5H), 7.08 (td, *J* = 7.5, 1.1 Hz, 1H), 7.17 (dd, *J* = 8.4, 1.1 Hz, 1H), 7.39 (ddd, *J* = 8.4, 7.3, 1.8 Hz, 1H), 8.31 (dd, *J* = 7.8, 1.8 Hz, 1H), 8.35 (s, 1H), 8.67 (s, 1H), 10.35 (s, 1H), 12.14 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 24.9, 25.0, 27.4, 32.2, 55.6, 75.6, 111.8, 120.5, 121.7, 122.6, 129.8, 129.8, 151.4, 156.6, 156.7, 159.8, 169.0.

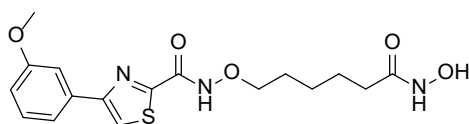
**HRMS** (*m/z*) MH<sup>+</sup> berechnet für C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S 380.1275, gefunden: 380.1272

**HPLC**: *t*<sub>r</sub> 9.84 min; 99.6 %

**Smp.**: 137.4 °C

## 5. Experimenteller Teil

### ***N*-((6-(Hydroxyamino)-6-oxohexyl)oxy)-4-(3-methoxyphenyl)thiazol-2-carboxamid (**4c**)**



**4c**

C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S

[379.43 g/mol]

Die Synthese von **4c** erfolgte nach **AAV III** aus dem Edukt **3c** (622 mg, 1.0 mmol, 1.00 Äq.). **4c** wurde als gelbes Wachs (253 mg, 0.67 mmol, 67 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.38 (ddd, *J* = 12.4, 6.0, 3.2 Hz, 2H), 1.58 (dp, *J* = 22.5, 7.0 Hz, 4H), 1.97 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.93 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 6.96 (ddd, *J* = 8.3, 2.6, 1.0 Hz, 1H), 7.39 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.57 – 7.72 (m, 2H), 8.46 (s, 1H), 8.67 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 10.35 (s, 1H), 12.17 (s, 1H).

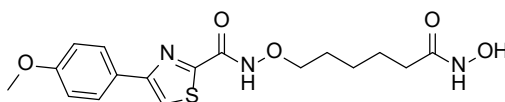
**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 24.9, 25.0, 27.4, 32.2, 55.3, 75.6, 111.9, 114.2, 118.6, 119.6, 129.9, 134.7, 155.3, 156.5, 159.7, 161.3, 169.0.

**HRMS** (*m/z*) MH<sup>+</sup> berechnet für C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S 380.1275, gefunden: 380.1276

**HPLC**: 9.531 min; 99.9 %

## 5. Experimenteller Teil

### ***N*-((6-(Hydroxyamino)-6-oxohexyl)oxy)-4-(4-methoxyphenyl)thiazol-2-carboxamid (**4d**)**



**4d**

C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S  
[379.43 g/mol]

Die Synthese von **4d** erfolgte nach **AAV III** aus dem Edukt **3d** (1.87 g, 3.00 mmol, 1.00 Äq.). **4d** wurde als farbloser Feststoff (603 mg, 1.59mmol, 53 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.38 (q, *J* = 8.1 Hz, 2H), 1.58 (dp, *J* = 22.1, 7.0 Hz, 4H), 1.97 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.92 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 6.92 – 7.18 (m, 2H), 7.85 – 8.13 (m, 2H), 8.27 (s, 1H), 8.67 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 10.35 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 12.13 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 24.9, 25.0, 27.4, 32.2, 55.2, 75.6, 114.2, 117.3, 126.2, 127.7, 155.4, 156.6, 159.6, 161.3, 169.0.

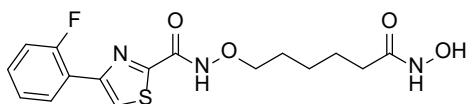
**HRMS** (*m/z*) MH<sup>+</sup> berechnet für C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S 380.1275, gefunden: 380.1277

**HPLC**: *t<sub>r</sub>* 9.46 min; 98.1 %

**Smp.**: 151.1 °C

## 5. Experimenteller Teil

### 4-(2-Fluorphenyl)-*N*-((6-(hydroxyamino)-6-oxohexyl)oxy)thiazol-2-carboxamid (**4e**)



**4e**

C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S

[367.40 g/mol]

Die Synthese von **4e** erfolgte nach **AAV III** aus dem Edukt **3e** (610 mg, 1.00 mmol, 1.00 Äq.). **4e** wurde als oranges Wachs (221 mg, 0.60 mmol, 60 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.28 – 1.46 (m, 2H), 1.58 (dp, *J* = 22.5, 7.0 Hz, 4H), 1.97 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 3.93 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 7.28 – 7.41 (m, 2H), 7.41 – 7.52 (m, 1H), 8.21 – 8.36 (m, 2H), 8.67 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 10.35 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 12.21 (s, 1H).

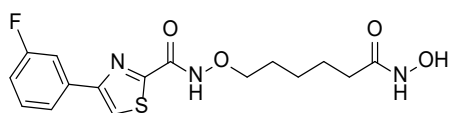
**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 24.7, 24.9, 27.3, 32.1, 75.5, 116.1 (d, *J* = 22.0 Hz), 121.0 (d, *J* = 11.5 Hz), 123.2 (d, *J* = 13.4 Hz), 124.7 (d, *J* = 3.4 Hz), 130.0 (d, *J* = 2.8 Hz), 130.3 (d, *J* = 8.7 Hz), 148.9, 156.4, 158.4, 160.4, 161.0, 168.9.

**HRMS** (*m/z*) MH<sup>+</sup> berechnet für C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S 368.1075, gefunden: 368.1067

**HPLC**: *t*<sub>r</sub> 9.93 min; 99.2 %

## 5. Experimenteller Teil

### 4-(3-Fluorphenyl)-N-((6-(hydroxyamino)-6-oxohexyl)oxy)thiazol-2-carboxamid (4f)



**4f**

C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S

[367.40 g/mol]

Die Synthese von **4f** erfolgte nach **AAV III** aus dem Edukt **3f** (505 mg, 0.83 mmol, 1.00 Äq.). **4f** wurde als farbloses Wachs (258 mg, 0.70 mmol, 85 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.30 – 1.48 (m, 2H), 1.46 – 1.70 (m, 4H), 1.97 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 3.93 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 7.23 (td, *J* = 8.6, 2.5 Hz, 1H), 7.53 (td, *J* = 8.1, 6.1 Hz, 1H), 7.87 – 7.99 (m, 2H), 8.54 (s, 1H), 8.67 (s, 1H), 10.36 (s, 1H), 12.18 (s, 1H).

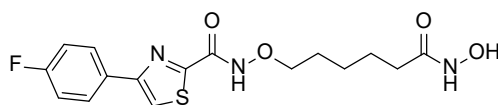
**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 24.9, 25.0, 27.4, 32.2, 75.6, 113.1 (d, *J* = 23.6 Hz), 115.3 (d, *J* = 20.7 Hz), 120.5, 122.3, 130.9 (d, *J* = 8.5 Hz), 135.8, 154.0, 156.4, 161.0, 161.7, 164.3, 169.0.

**HRMS** (*m/z*) MH<sup>+</sup> berechnet für C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S 368.1075, gefunden: 368.1081

**HPLC**: t<sub>r</sub> 9.89 min; 95.9 %

## 5. Experimenteller Teil

### 4-(4-Fluorphenyl)-N-((6-(hydroxyamino)-6-oxohexyl)oxy)thiazol-2-carboxamid (4g)



**4g**

C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S  
[367.40 g/mol]

Die Synthese von **4g** erfolgte nach **AAV III** aus dem Edukt **3g** (3.05 g, 5.00 mmol, 1.00 Äq.). **4g** wurde als farbloser Feststoff (522 mg, 1.42 mmol, 28 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.38 (q, *J* = 7.8 Hz, 2H), 1.45 – 1.67 (m, 4H), 1.97 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.92 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 7.26 – 7.39 (m, 2H), 8.03 – 8.16 (m, 2H), 8.41 (s, 1H), 8.68 (s, 1H), 10.36 (s, 1H), 12.17 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 24.9, 25.0, 27.4, 32.2, 75.6, 115.7 (d, *J* = 21.6 Hz), 119.1, 128.5 (d, *J* = 8.3 Hz), 130.0 (d, *J* = 3.0 Hz), 154.4, 156.5, 160.6, 161.6, 163.9, 169.0.

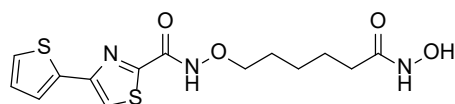
**HRMS** (*m/z*) MH<sup>+</sup> berechnet für C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S 368.1075, gefunden: 368.1074

**HPLC**: *t<sub>r</sub>* 9.65 min; 98.5 %

**Smp.**: 170.7 °C

## 5. Experimenteller Teil

### ***N*-((6-(Hydroxyamino)-6-oxohexyl)oxy)-4-(thiophen-2-yl)thiazol-2-carboxamid (4h)**



**4h**

C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub>  
[355.43 g/mol]

Die Synthese von **4h** erfolgte nach **AAV III** aus dem Edukt **3h** (598 mg, 1.00 mmol, 1.00 Äq.). **4h** wurde als farbloser Feststoff (226 mg, 0.63 mmol, 63 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.28 – 1.47 (m, 2H), 1.44 – 1.75 (m, 4H), 1.97 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 3.92 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 7.15 (dd, *J* = 5.1, 3.6 Hz, 1H), 7.54 – 7.71 (m, 2H), 8.25 (s, 1H), 8.67 (s, 1H), 10.35 (s, 1H), 12.12 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 24.9, 25.0, 27.4, 32.2, 75.5, 118.0, 125.4, 126.8, 128.1, 136.8, 150.3, 156.4, 161.8, 169.0.

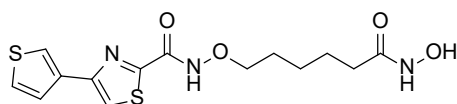
**HRMS** (*m/z*) MH<sup>+</sup> berechnet für C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub> 356.0733, gefunden: 356.0735

**HPLC**: *t<sub>r</sub>* 8.87 min; 98.8 %

**Smp.** 123.4 °C

## 5. Experimenteller Teil

### ***N*-((6-(Hydroxyamino)-6-oxohexyl)oxy)-4-(thiophen-3-yl)thiazol-2-carboxamid (**4i**)**



**4i**

C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub>  
[355,43 g/mol]

Die Synthese von **4i** erfolgte nach **AAV III** aus dem Edukt **3i** (598 mg, 1.00 mmol, 1.00 Äq.). **4i** wurde als farbloser Feststoff (198 mg, 0.56 mmol, 56 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.38 (tt, *J* = 11.3, 6.3 Hz, 2H), 1.58 (dp, *J* = 22.1, 7.0 Hz, 4H), 1.97 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 3.92 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 7.42 – 7.81 (m, 2H), 8.01 (dd, *J* = 2.7, 1.6 Hz, 1H), 8.25 (s, 1H), 8.67 (s, 1H), 10.35 (s, 1H), 12.12 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 24.8, 25.0, 27.3, 32.1, 75.5, 118.7, 122.9, 126.3, 127.3, 135.7, 151.7, 156.5, 161.4, 169.0.

**HRMS** (*m/z*) MH<sup>+</sup> berechnet für C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub> 356.0733, gefunden: 356.0734

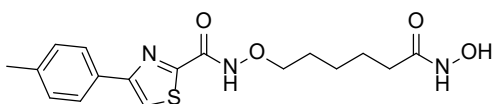
**HPLC**: *t<sub>r</sub>* 8.79 min; 98.6 %

**Smp.**: 140.4 °C



## 5. Experimenteller Teil

### ***N*-((6-(Hydroxyamino)-6-oxohexyl)oxy)-4-(*p*-tolyl)thiazol-2-carboxamid (**4j**)**



**4j**

C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S

[363.43 g/mol]

Die Synthese von **4j** erfolgte nach **AAV III** aus dem Edukt **3j** (606 mg, 1.00 mmol, 1.00 Äq.).

**4j** wurde als farbloser Feststoff (212 mg, 0.58 mmol, 58 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.37 (tt, *J* = 9.5, 6.2 Hz, 2H), 1.54 (p, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.61 (p, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.97 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.35 (s, 3H), 3.92 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 7.22 – 7.34 (m, 2H), 7.90 – 8.00 (m, 2H), 8.35 (s, 1H), 8.67 (s, 1H), 10.35 (s, 1H), 12.14 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 20.9, 25.0, 25.0 (d, *J* = 9.3 Hz), 27.4, 32.2, 75.6, 118.5, 126.2, 129.4, 130.7, 138.0, 155.6, 156.6, 161.4, 169.0.

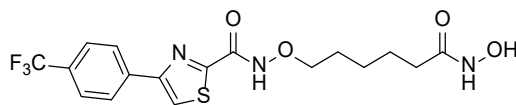
**HRMS** (*m/z*) MH<sup>+</sup> berechnet für C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S 364.1326, gefunden: 364.1330

**HPLC**: t<sub>r</sub> 10.20 min; 97.8 %

**Smp.**: 134.3 °C

## 5. Experimenteller Teil

### ***N*-((6-(Hydroxyamino)-6-oxohexyl)oxy)-4-(4-(trifluormethyl)phenyl)thiazol-2-carboxamid (**4k**)**



**4k**

$C_{17}H_{18}F_3N_3O_4S$

[417.40 g/mol]

Die Synthese von **4k** erfolgte nach **AAV III** aus dem Edukt **3k** (382 mg, 0.58 mmol, 1.00 Äq.). **4k** wurde als bräunlicher Feststoff (134 mg, 0.32 mmol, 56 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  1.37 (qd,  $J = 8.7, 5.5$  Hz, 2H), 1.48 – 1.68 (m, 4H), 1.97 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 3.93 (t,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 7.86 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 8.23 – 8.33 (m, 2H), 8.66 (s, 2H), 10.36 (s, 1H), 12.25 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  24.9, 25.0, 27.4, 32.2, 75.6, 121.7, 122.4, 125.8 (d,  $J = 3.2$  Hz), 126.0, 126.9, 127.9 – 129.4 (m), 137.1, 153.7, 156.4, 162.1, 169.0.

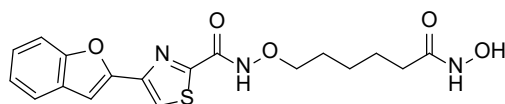
**HRMS** ( $m/z$ )  $MH^+$  berechnet für  $C_{17}H_{18}F_3N_3O_4S$  418.1043, gefunden: 418.1041

**HPLC**:  $t_r$  11.28 min; 98.5 %

**Smp.:** 127.2 °C

## 5. Experimenteller Teil

### 4-(Benzofuran-2-yl)-N-((6-(hydroxyamino)-6-oxohexyl)oxy)thiazol-2-carboxamid (4I)



**4I**

C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S

[389.43 g/mol]

Die Synthese von **4I** erfolgte nach **AAV III** aus dem Edukt **3I** (316 mg, 0.50 mmol, 1.00 Äq.).

**4I** wurde als bräunlicher Feststoff (112 mg, 0.29 mmol, 58 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.18 – 1.45 (m, 2H), 1.58 (dp, *J* = 22.2, 7.0 Hz, 4H), 1.97 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 3.93 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 7.25 – 7.43 (m, 3H), 7.66 (dq, *J* = 8.2, 0.9 Hz, 1H), 7.70 – 7.78 (m, 1H), 8.42 (s, 1H), 8.67 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 10.35 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 12.27 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 24.9, 25.0, 27.4, 32.2, 75.6, 104.1, 111.2, 121.3, 121.8, 123.5, 125.3, 128.1, 146.5, 150.5, 154.3, 156.3, 163.1, 169.0.

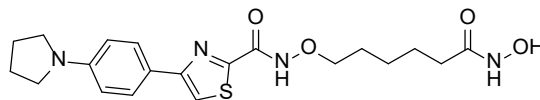
**HRMS** (*m/z*) MH<sup>+</sup> berechnet für C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S 390.1118, gefunden: 390.1117

**HPLC**: *t*<sub>r</sub> 10.70 min; 99.3 %

**Smp.**: 150.4 °C

## 5. Experimenteller Teil

### ***N*-((6-(Hydroxyamino)-6-oxohexyl)oxy)-4-(4-(pyrrolidin-1-yl)phenyl)thiazol-2-carboxamid (**4m**)**



**4m**

$C_{20}H_{26}N_4O_4S$

[418.51 g/mol]

Die Synthese von **4m** erfolgte nach **AAV III** aus dem Edukt **3m** (500 mg, 0.76 mmol, 1.00 Äq.). **4m** wurde als gelber Feststoff (93.3 mg, 0.22 mmol, 29 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.28 – 1.47 (m, 2H), 1.58 (dp, *J* = 21.9, 6.9 Hz, 4H), 1.86 – 2.07 (m, 6H), 3.23 – 3.34 (m, 4H), 3.92 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 6.48 – 6.81 (m, 2H), 7.75 – 8.01 (m, 2H), 8.05 (s, 1H), 8.67 (s, 1H), 10.35 (s, 1H), 12.07 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 24.9, 25.0, 25.0, 27.4, 32.2, 47.3, 48.6, 75.5, 111.5, 114.7, 120.7, 127.4, 147.8, 156.6, 156.8, 160.8, 169.0.

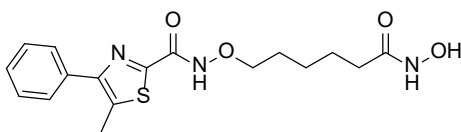
**HRMS** (*m/z*)  $MH^+$  berechnet für  $C_{20}H_{26}N_4O_4S$  419.1748, gefunden: 419.1746

**HPLC**: *t<sub>r</sub>* 9.29 min; 98.9 %

**Smp.**: 136.2 °C

## 5. Experimenteller Teil

### ***N*-((6-(Hydroxyamino)-6-oxohexyl)oxy)-5-methyl-4-phenylthiazol-2-carboxamid (**4n**)**



**4n**

C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S  
[363.43 g/mol]

Die Synthese von **4n** erfolgte nach **AAV III** aus dem Edukt **3n** (500 mg, 0.83 mmol, 1.00 Äq.). **4n** wurde als bräunlicher Feststoff (191 mg, 0.53 mmol, 64 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.27 – 1.45 (m, 2H), 1.45 – 1.67 (m, 4H), 1.96 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.61 (s, 3H), 3.89 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 7.33 – 7.59 (m, 3H), 7.67 – 7.81 (m, 2H), 8.67 (s, 1H), 10.35 (s, 1H), 12.04 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.7, 24.9, 25.0, 27.4, 32.2, 75.5, 128.0, 128.4, 133.9, 134.3, 151.5, 156.7, 157.2, 169.0.

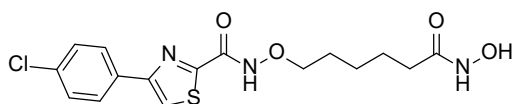
**HRMS** (*m/z*) MH<sup>+</sup> berechnet für C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S 364.1326, gefunden: 364.1327

**HPLC**: *t<sub>r</sub>* 9.78 min, 99.1 %

**Smp.**: 152.0 °C

## 5. Experimenteller Teil

### 4-(4-Chlorphenyl)-N-((6-(hydroxyamino)-6-oxohexyl)oxy)thiazol-2-carboxamid (4o)



**4o**

$C_{16}H_{18}ClN_3O_4S$

[383.85 g/mol]

Die Synthese von **4o** erfolgte nach **AAV III** aus dem Edukt **3o** (1.88 g, 3.00 mmol, 1.00 Äq.).

**4o** wurde als farbloser Feststoff (238 mg, 0.62 mmol, 21 %) erhalten.

**$^1H$ -NMR** (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.38 (p,  $J$  = 7.8 Hz, 2H), 1.55 (p,  $J$  = 7.4 Hz, 2H), 1.62 (p,  $J$  = 6.9 Hz, 2H), 1.97 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 2H), 3.93 (t,  $J$  = 6.5 Hz, 2H), 7.55 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 2H), 8.08 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H), 8.46 (d,  $J$  = 3.1 Hz, 1H), 8.61 (s, 1H), 10.31 (s, 1H), 12.12 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H).

**$^{13}C$ -NMR** (126 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  24.7, 24.9, 27.3, 32.1, 75.5, 119.8, 127.9, 128.7, 132.2, 133.1, 154.0, 156.4, 161.6, 168.9.

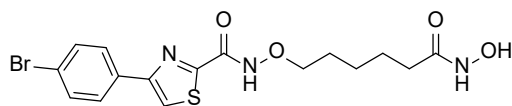
**HRMS** ( $m/z$ )  $MH^+$  berechnet für  $C_{16}H_{18}ClN_3O_4S$  384.0779, gefunden: 384.0772

**HPLC**:  $t_r$  10.70 min; 98.5 %

**Smp.:** 140.0 °C

## 5. Experimenteller Teil

### 4-(4-Bromphenyl)-N-((6-(hydroxyamino)-6-oxohexyl)oxy)thiazol-2-carboxamid (4p)



**4p**

C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>BrN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S

[428.30 g/mol]

Die Synthese von **4p** erfolgte nach **AAV III** aus dem Edukt **3p** (670 mg, 1.00 mmol, 1.00 Äq.). **4p** wurde als bräunlicher Feststoff (109 mg, 0.26 mmol, 26 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.19 – 1.81 (m, 6H), 1.97 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 3.92 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 7.63 – 7.78 (m, 2H), 7.97 – 8.10 (m, 2H), 8.51 (s, 1H), 8.66 (s, 1H), 10.35 (s, 1H), 12.19 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 24.9, 25.0, 27.4, 32.2, 75.6, 120.1, 121.9, 128.3, 131.8, 132.6, 154.2, 156.5, 161.8, 169.0.

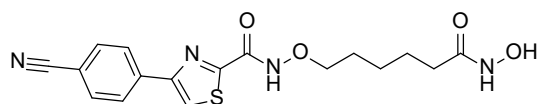
**HRMS** (*m/z*) MH<sup>+</sup> berechnet für C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>BrN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S 428.0274; gefunden: 428.0274

**HPLC**: t<sub>r</sub> 10.94 min; 99.9 %

**Smp.:** 148.9 °C

## 5. Experimenteller Teil

### 4-(4-Cyanophenyl)-N-((6-(hydroxyamino)-6-oxohexyl)oxy)thiazol-2-carboxamid (4q)



**4q**

C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S

[374,42 g/mol]

Die Synthese von **4q** erfolgte nach **AAV III** aus dem Edukt **3q** (617 mg, 1.00 mmol, 1.00 Äq.).

**4q** wurde als farbloser Feststoff (270 mg, 0.72 mmol, 72 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.38 (h, *J* = 6.4 Hz, 2H), 1.55 (p, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.62 (p, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.97 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 3.93 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 7.97 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 8.26 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 8.63 (s, 1H), 8.68 (s, 1H), 10.32 (s, 1H), 12.20 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 24.7, 24.9, 27.3, 32.1, 75.6, 110.8, 118.6, 122.2, 126.9, 132.7, 137.4, 153.3, 156.3, 162.0, 168.9.

**HRMS** (*m/z*) MH<sup>+</sup> berechnet für C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S 375.1122, gefunden: 375.1119

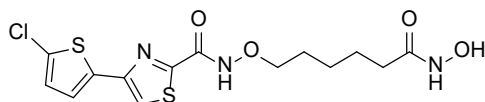
**HPLC**: *t<sub>r</sub>* 8.88 min; 98.7 %

**Smp.:** 184.4 °C



## 5. Experimenteller Teil

### 4-(5-Chlorthiophen-2-yl)-N-((6-(hydroxyamino)-6-oxohexyl)oxy)thiazol-2-carboxamid (4r)



**4r**

C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub>

[389.87 g/mol]

Die Synthese von **4r** erfolgte nach **AAV III** aus dem Edukt **3r** (379 mg, 0.60 mmol, 1.00 Äq.). **4r** wurde als oranger Feststoff (223 mg, 0.57 mmol, 95 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.12 – 1.45 (m, 2H), 1.56 (dq, *J* = 22.0, 7.5 Hz, 4H), 1.96 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.91 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 7.18 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H), 7.54 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H), 8.32 (s, 1H), 8.67 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 10.24 – 10.49 (m, 1H), 12.12 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 24.9, 25.0, 27.4, 32.2, 75.5, 118.5, 124.9, 128.0, 128.6, 135.8, 149.0, 156.2, 162.0, 169.0.

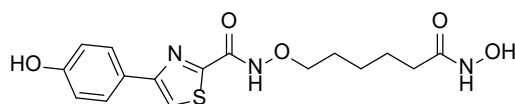
**HRMS** (*m/z*) MH<sup>+</sup> berechnet für C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S 390.0344, gefunden: 390.0431

**HPLC**: t<sub>r</sub> 10.56 min; 98.0 %

**Smp.**: 145.5 °C

## 5. Experimenteller Teil

### ***N*-((6-(Hydroxyamino)-6-oxohexyl)oxy)-4-(4-hydroxyphenyl)thiazol-2-carboxamid (**4s**)**



**4s**

C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S

[365.40 g/mol]

Die Synthese von **4s** erfolgte nach **AAV III** aus dem Edukt **3s** (1.82 g, 3.00 mmol, 1.00 Äq.).

**4s** wurde als farbloser Feststoff (306 mg, 0.84 mmol, 28 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.29 – 1.47 (m, 2H), 1.57 (dp, *J* = 21.8, 7.0 Hz, 4H), 1.97 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 3.92 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 6.70 – 6.98 (m, 2H), 7.77 – 7.96 (m, 2H), 8.16 (s, 1H), 8.67 (s, 1H), 9.69 (s, 1H), 10.35 (s, 1H), 12.09 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 24.9, 25.0, 27.4, 32.2, 75.6, 115.5, 116.5, 124.7, 127.8, 155.9, 156.7, 157.9, 161.1, 169.0.

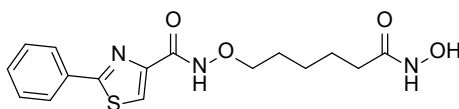
**HRMS** (*m/z*) MH<sup>+</sup> berechnet für C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S 366.1118, gefunden: 366.1118

**HPLC**: *t*<sub>r</sub> 9.45 min; 99.7 %

**Smp.**: 176.8 °C

## 5. Experimenteller Teil

### ***N*-((6-(Hydroxyamino)-6-oxohexyl)oxy)-2-phenylthiazol-4-carboxamid (**4t**)**



**4t**

C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S

[349.41 g/mol]

Die Synthese von **4t** erfolgte nach **AAV III** aus dem Edukt **3t** (115 mg, 0.19 mmol, 1.00 Äq.). **4t** wurde als farbloses Wachs (46.4 mg, 0.13 mmol, 69 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.38 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.48 – 1.68 (m, 4H), 1.97 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 3.90 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 7.49 – 7.59 (m, 3H), 8.01 – 8.10 (m, 2H), 8.34 (s, 1H), 8.67 (s, 1H), 10.35 (s, 1H), 11.73 (s, 1H).

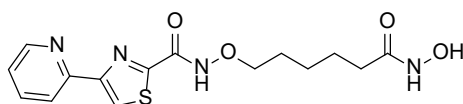
**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 24.9, 25.1, 27.4, 32.2, 75.4, 124.6, 126.5, 129.2, 130.8, 132.4, 148.6, 158.1, 167.5, 169.0.

**HRMS** (*m/z*) MH<sup>+</sup> berechnet für C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S 350.1096; gefunden: 350.1168

**HPLC**: *t*<sub>r</sub> 8.87 min; 97.3 %

## 5. Experimenteller Teil

### ***N*-((6-(Hydroxyamino)-6-oxohexyl)oxy)-4-(pyridin-2-yl)thiazol-2-carboxamid (**4u**)**



**4u**

C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S

[350.39 g/mol]

Die Synthese von **4u** erfolgte nach **AAV III** aus dem Edukt **3u** (120 mg, 0.20 mmol, 1.00 Äq.).

**4u** wurde als gelbes Harz (39.7 mg, 0.11 mmol, 56 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.19 – 1.45 (m, 3H), 1.58 (dp, *J* = 22.7, 7.0 Hz, 3H), 1.97 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 3.94 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 7.41 (ddd, *J* = 7.6, 4.8, 1.2 Hz, 1H), 7.96 (td, *J* = 7.7, 1.8 Hz, 1H), 8.21 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.55 (s, 1H), 8.65 (dd, *J* = 4.9, 1.5 Hz, 1H), 10.36 (s, 1H), 12.22 (s, 1H).

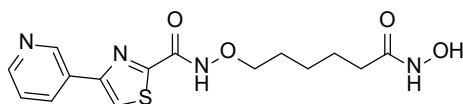
**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 24.9, 25.0, 27.4, 32.2, 75.6, 121.0, 122.7, 123.7, 137.5, 149.6, 151.3, 155.4, 156.5, 161.9, 169.0.

**HRMS** (*m/z*) MH<sup>+</sup> berechnet für C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S 351.1122, gefunden: 351.1125

**HPLC**: *t*<sub>r</sub> 4.47 min.;, 98.0 %

## 5. Experimenteller Teil

### ***N*-((6-(Hydroxyamino)-6-oxohexyl)oxy)-4-(pyridin-3-yl)thiazol-2-carboxamid (4v)**



**4v**

C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S

[350.39 g/mol]

Die Synthese von **4v** erfolgte nach **AAV III** aus dem Edukt **3v** (120 mg, 0.20 mmol, 1.00 Äq.). **4v** wurde als gelbes Wachs (64.0 mg, 0.18 mmol, 90 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.37 (tt, *J* = 10.1, 6.2 Hz, 2H), 1.51 – 1.66 (m, 4H), 1.96 (q, *J* = 7.8 Hz, 2H), 3.94 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 7.62 (ddd, *J* = 8.0, 4.9, 0.9 Hz, 1H), 8.50 (dt, *J* = 8.0, 1.9 Hz, 1H), 8.64 (q, *J* = 2.2 Hz, 2H), 9.31 (dd, *J* = 2.3, 0.8 Hz, 1H), 10.36 (s, 1H), 12.23 (s, 1H).

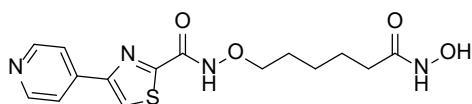
**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 24.9, 25.0, 27.4, 32.2, 75.6, 121.3, 124.4, 129.6, 134.7, 146.5, 148.3, 152.0, 156.3, 162.2, 169.0.

**HRMS** (*m/z*) MH<sup>+</sup> berechnet für C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S 351.1122, gefunden: 351.1121

**HPLC**: *t*<sub>r</sub> 4.26 min.;, 97.5 %

## 5. Experimenteller Teil

### ***N*-((6-(Hydroxyamino)-6-oxohexyl)oxy)-4-(pyridin-4-yl)thiazol-2-carboxamid (**4w**)**



**4w**

C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S

[350.39 g/mol]

Die Synthese von **4w** erfolgte nach **AAV III** aus dem Edukt **3w** (593 mg, 1.00 mmol, 1.00 Äq.). **4w** wurde als gelblicher Feststoff (158 mg, 0.45 mmol, 45 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.38 (qd, *J* = 8.9, 6.1 Hz, 2H), 1.54 (h, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.62 (p, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.97 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 3.94 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 8.13 – 8.31 (m, 2H), 8.77 – 8.85 (m, 3H), 8.92 (s, 1H), 10.35 (s, 1H), 12.29 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 24.7, 24.9, 27.3, 32.1, 75.6, 115.1, 117.5, 121.2, 124.9, 142.5, 147.9, 151.8, 156.1, 157.9, 158.1, 162.5, 168.9.

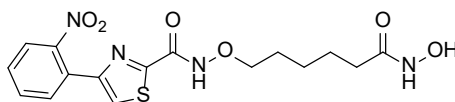
**HRMS** (*m/z*) MH<sup>+</sup> berechnet für C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S 351.1122, gefunden: 351.1120

**HPLC**: *t<sub>r</sub>* 4.28 min, 95.3 %

**Smp.**: 148.4 °C

## 5. Experimenteller Teil

### ***N*-((6-(Hydroxyamino)-6-oxohexyl)oxy)-4-(2-nitrophenyl)thiazol-2-carboxamid (**4x**)**



**4x**

C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S  
[394.40 g/mol]

Die Synthese von **4x** erfolgte nach **AAV III** aus dem Edukt **3x** (637 mg, 1.00 mmol, 1.00 Äq.). **4x** wurde als gelbes Harz (248 mg, 0.63 mmol, 63 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.34 (h, *J* = 6.2 Hz, 2H), 1.52 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.57 (p, *J* = 6.8 Hz, 2H), 1.95 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 3.88 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 7.71 (dq, *J* = 8.6, 4.2 Hz, 1H), 7.82 (d, *J* = 4.3 Hz, 2H), 8.03 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.25 (s, 1H), 8.67 (s, 1H), 10.34 (s, 1H), 12.08 (s, 1H).

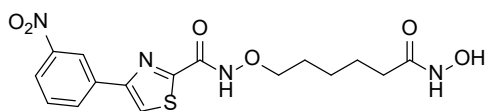
**<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 25.3, 25.5, 27.8, 32.6, 75.9, 124.8, 128.4, 130.6, 132.2, 133.6, 148.9, 151.7, 156.8, 162.4, 169.5.

**HRMS** (*m/z*) MH<sup>+</sup> berechnet für C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S 395.1020, gefunden: 395.1021

**HPLC**: *t<sub>r</sub>* 8.67 min; 98.7 %

## 5. Experimenteller Teil

### ***N*-((6-(Hydroxyamino)-6-oxohexyl)oxy)-4-(3-nitrophenyl)thiazol-2-carboxamid (**4y**)**



**4y**

C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S  
[394.40 g/mol]

Die Synthese von **4y** erfolgte nach **AAV III** aus dem Edukt **3y** (817 mg, 3.00 mmol, 1.00 Äq.). **4y** wurde als bräunlicher Feststoff (84.2 mg, 0.21 mmol, 7 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.38 (tt, *J* = 9.8, 6.3 Hz, 2H), 1.55 (p, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.62 (p, *J* = 6.8 Hz, 2H), 1.97 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 3.94 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 7.79 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.24 (ddd, *J* = 8.2, 2.4, 1.0 Hz, 1H), 8.49 (dt, *J* = 7.9, 1.3 Hz, 1H), 8.67 (s, 1H), 8.74 (s, 1H), 8.91 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H), 10.35 (s, 1H), 12.33 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 24.9, 25.0, 27.4, 32.2, 75.6, 120.8, 121.8, 123.2, 130.5, 132.4, 135.0, 148.5, 152.9, 156.3, 162.2, 169.0.

**HRMS** (*m/z*) MH<sup>+</sup> berechnet für C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S 395.1020, gefunden: 395.1018

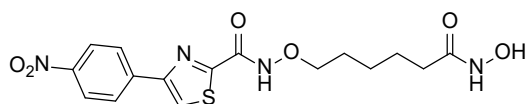
**HPLC**: t<sub>r</sub> 9.64 min; 96.8 %

**Smp.**: 178.3 °C



## 5. Experimenteller Teil

### ***N*-((6-(Hydroxyamino)-6-oxohexyl)oxy)-4-(4-nitrophenyl)thiazol-2-carboxamid (**4z**)**



**4z**

C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S

[394.40 g/mol]

Die Synthese von **4z** erfolgte nach **AAV III** aus dem Edukt **3z** (200 mg, 0.31 mmol, 1.00 Äq.). **4z** wurde als bräunlicher Feststoff (107 mg, 0.27 mmol, 87 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.11 – 1.46 (m, 2H), 1.58 (dp, *J* = 22.6, 7.0 Hz, 4H), 1.97 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 3.94 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 8.34 (d, *J* = 1.5 Hz, 4H), 8.67 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H), 8.76 (s, 1H), 10.36 (s, 1H), 12.29 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 24.9, 25.0, 27.4, 32.2, 75.6, 123.2, 124.2, 127.3, 139.3, 147.1, 153.0, 156.3, 162.3, 169.0.

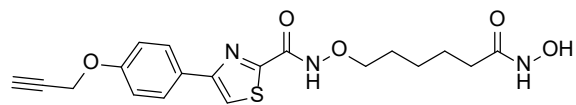
**HRMS** (*m/z*) MH<sup>+</sup> berechnet für C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S 395.1020; gefunden: 395.1019

**HPLC**: *t*<sub>r</sub> 9.55 min; 98.9 %

**Smp.**: 179.8 °C

## 5. Experimenteller Teil

### ***N*-((6-(Hydroxyamino)-6-oxohexyl)oxy)-4-(4-(prop-2-yn-1-yloxy)phenyl)thiazol-2-carboxamid (4aa)**



**4aa**

C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S

[403.45 g/mol]

Die Synthese von **4aa** erfolgte nach **AAV III** aus dem Edukt **3aa** (0.97 g, 1.50 mmol, 1.00 Äq.). **4aa** wurde als farbloser Feststoff (382 mg, 0.95 mmol, 63 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.38 (td, *J* = 8.4, 4.0 Hz, 2H), 1.58 (dp, *J* = 22.1, 7.0 Hz, 4H), 1.97 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 3.60 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H), 3.92 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 4.86 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H), 7.03 – 7.15 (m, 2H), 7.93 – 8.08 (m, 2H), 8.29 (s, 1H), 8.67 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 10.35 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 12.13 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 24.9, 25.0, 27.4, 32.2, 55.5, 75.6, 78.4, 79.1, 115.1, 117.7, 126.8, 127.7, 155.3, 156.6, 157.5, 161.3, 169.0.

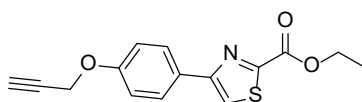
**HRMS** (*m/z*) MH<sup>+</sup> berechnet für C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S 404.1275, gefunden: 404.1276

**HPLC**: *t*<sub>r</sub> 9.96 min; 99.9 %

**Smp.**: 144.2 °C

## 5. Experimenteller Teil

### Ethyl-4-(4-(prop-2-yn-1-yloxy)phenyl)thiazol-2-carboxylat (**12**)



**12**

C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>3</sub>S

[287.33 g/mol]

**1s** (1.99 g, 8.00 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 16 mL Aceton gelöst, bevor Kaliumcarbonat (3.32 g, 24.0 mmol, 3.00 Äq.), Kaliumiodid (133 mg, 0.80 mmol, 0.10 Äq.) und Propargylbromid (0.90 mL, 9.60 mmol, 1.20 Äq.) dazugegeben wurden. Der Ansatz wurde 7 h lang zum Reflux erhitzt und 12 h bei Raumtemperatur gerührt, ehe das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entzogen, der Ansatz in 50 mL Ethylacetat aufgenommen und dreimal mit 50 mL dest. Wasser und einmal mit 50 mL gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen wurde. Anschließend wurde der Ansatz mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde flashchromatographisch mit *n*-Hexan/Ethylacetat (0-70 %) als Fließmittel aufgereinigt.

**12** wurde als farbloser Feststoff (2.24 g, 7.78 mmol, 97 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.36 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 3.60 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H), 4.41 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.86 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H), 7.06 – 7.14 (m, 2H), 7.91 – 7.99 (m, 2H), 8.39 (s, 1H).

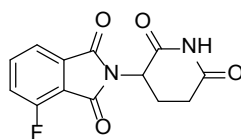
**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 14.1, 55.5, 62.2, 78.4, 78.4, 79.1, 115.2, 119.4, 126.7, 127.6, 156.1, 157.3, 157.6, 159.4.

**HPLC**: *t*<sub>r</sub> 14.52 min; 97.5 %

**Smp.**: 104.2 °C

## 5. Experimenteller Teil

### 2-(2,6-Dioxopiperidin-3-yl)-4-fluorisoindolin-1,3-dion (9)



9

$C_{13}H_9FN_2O_4$

[276.22 g/mol]

Die Synthese wurde nach der Vorschrift von Cheng *et al.* durchgeführt.<sup>124</sup> 3-Fluorphthalsäureanhydrid **13** (3.39 g, 20.0 mmol, 1.00 Äq.), 3-Aminopiperidin-2,6-dion-Hydrochlorid **14** (3.29 g, 20.0 mmol, 1.00 Äq.) und Natriumacetat (1.97 g, 24.0 mmol, 1.20 Äq.) wurden in 80 mL Essigsäure suspendiert und für 7 h zum Reflux erhitzt. Die DC-Kontrollen erfolgten mit Dichlormethan und Essigsäure als Laufmittel. Nach vollständigem DC-Umsatz (Fließmittel Dichlormethan/Essigsäure 99:1 V/V) wurde die Reaktion mit 320 mL dest. Wasser versetzt und für 45 min auf 4 °C abgekühlt. Der entstehende farblose Niederschlag wurde abfiltriert und in einer Mischung aus Ethanol und 1,4-Dioxan umkristallisiert.

**9** wurde als farbloser Feststoff (4.70 g, 17.0 mmol, 85 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.96 – 2.16 (m, 1H), 2.52 – 2.70 (m, 2H), 2.90 (ddd, *J* = 17.0, 13.8, 5.2 Hz, 1H), 5.16 (dd, *J* = 12.9, 5.4 Hz, 1H), 7.66 – 7.83 (m, 2H), 7.95 (ddd, *J* = 8.4, 7.3, 4.6 Hz, 1H), 11.15 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 21.8, 30.9, 49.1, 117.0 (d, *J* = 12.6 Hz), 120.0 (d, *J* = 3.5 Hz), 123.0 (d, *J* = 19.7 Hz), 133.4 (d, *J* = 1.5 Hz), 138.0 (d, *J* = 8.0 Hz), 155.1, 158.5, 163.9, 166.1 (d, *J* = 3.0 Hz), 169.7, 172.7.

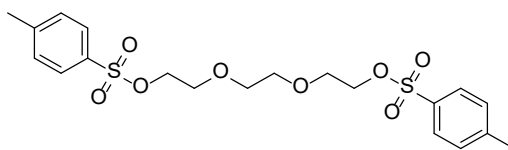
**HPLC:** *t*<sub>r</sub> 7.73 min; 96.6 %

**Smp.:** 256.2 °C

Alle spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein. Keuler *et al.* (2022)<sup>144</sup>

## 5. Experimenteller Teil

### (Ethan-1,2-diylbis(oxy))bis(ethan-2,1-diyl)-bis(4-methylbenzensulfonat) (**16**)



**16**

$C_{20}H_{26}O_8S_2$

[458.54 g/mol]

Tosylchlorid (9.91 g, 52.0 mmol, 2.60 Äq.) wurde in 40 mL trockenem Tetrahydrofuran gelöst und der Ansatz im Eisbad auf 0 °C abgekühlt. Nach Zugabe von Triethylamin (7.30 mL, 52.0 mmol, 2.60 Äq.) wurde Triethylenglykol **15** (3.00 mL, 20.0 mmol, 1.00 Äq.) zugetropft und der Ansatz über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem dünnschichtchromatographischem (DC) Umsatz (DC-Kontrollen mit Cyclohexan und Ethylacetat (1:1 V/V) und Anfärbung mit Kaliumpermanganat-Lösung) wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen und dreimal mit 50 mL dest. Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Die Aufreinigung erfolgte flashchromatographisch mit einem Fließmittelgemisch aus Cyclohexan und Ethylacetat (0-100 %).

**16** wurde als farbloser Feststoff (4.70 g, 10.3 mmol, 51 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 2.41 (s, 6H), 3.38 (s, 4H), 3.50 – 3.58 (m, 4H), 4.06 – 4.13 (m, 4H), 7.47 (d, *J* = 7.8 Hz, 4H), 7.77 (d, *J* = 8.4 Hz, 4H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 21.1, 67.9, 69.6, 69.9, 127.6, 130.1, 132.4, 144.9.

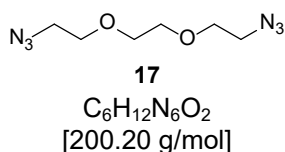
**HPLC**: *t*<sub>r</sub> 14.83 min; 98.1 %

**Smp.**: 75.8 °C

Alle spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein. More *et al.* (2018)<sup>145</sup>

## 5. Experimenteller Teil

### 1,2-Bis(2-azidoethoxy)ethan (17)



**16** wurde in 10 mL trockenem *N,N*-Dimethylformamid gelöst. Natriumazid (2.39 g, 36.9 mmol, 3.60 Äq.) wurde hinzugegeben und der Ansatz 24 h bis zum kompletten DC-Umsatz (Cyclohexan:Ethylacetat (1:1 V/V)) bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der Ansatz mit 100 mL Ethylacetat verdünnt und dreimal mit je 50 mL dest. Wasser und einmal mit 50 mL ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt.

**17** wurde als gelbes Öl erhalten (1.66 g, 8.29 mmol, 81 %).

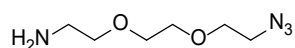
**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 3.39 (t, *J* = 5.0 Hz, 4H), 3.64 – 3.73 (m, 8H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 50.8, 70.3, 70.9.

Alle spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein. Wang *et al.* (2023)<sup>146</sup>

## 5. Experimenteller Teil

### 2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethan-1-amin (**10**)



**10**

$C_6H_{14}N_4O_2$

[174.20 g/mol]

**17** wurde in einem Gemisch aus 10.0 mL Diethylether, 2.00 mL Tetrahydrofuran und 8.00 mL einer 1 M Salzsäure gelöst. Triphenylphosphin (2.20 g, 8.29 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 10.0 mL Diethylether gelöst und zugetropft. Die Reaktion wurde für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der Ansatz mit 15 mL 4 M HCl versetzt und neun Mal mit 20 mL Diethylether extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit Natriumhydroxid-Pellets auf pH 14 eingestellt und das Produkt drei Mal mit je 25 mL Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wurde mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt.

**10** wurde als rötliches Öl erhalten (1.09 g, 6.27 mmol, 76 %).

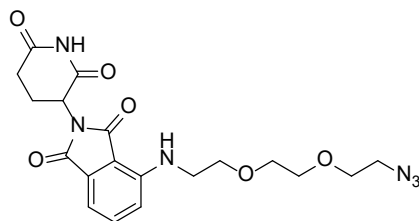
**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.80 (s, 2H), 2.88 (t,  $J = 5.2$  Hz, 2H), 3.39 (t,  $J = 5.1$  Hz, 2H), 3.53 (t,  $J = 5.2$  Hz, 2H), 3.62 – 3.71 (m, 6H).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  41.9, 50.8, 70.2, 70.5, 70.8, 73.4.

Alle spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein. Perrot *et al.* (2023)<sup>147</sup>

## 5. Experimenteller Teil

### 4-((2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethyl)amino)-2-(2,6-dioxopiperidin-3-yl)isoindolin-1,3-dion (**8**)



**8**

C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>

[430.42 g/mol]

Die Synthese wurde durchgeführt nach der Vorschrift von Brownsey *et al.*<sup>126</sup>

**9** (829 mg, 3.00 mmol, 1.00 Äq.) und **10** (575 mg, 3.30 mmol, 1.10 Äq.) wurden in 6.70 mL trockenem Dimethylsulfoxid unter Stickstoffatmosphäre gelöst. DIPEA (1.58 ml, 9.00 mmol, 3.00 Äq.) wurde zu dem Ansatz gegeben und der Ansatz wurde für 3.75 h auf 130 °C erhitzt. Anschließend wurde der Ansatz auf Raumtemperatur abgekühlt, mit 50 mL Wasser verdünnt und dreimal mit 50 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden einmal mit 50 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, bevor sie mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt wurde. Der erhaltene Rückstand wurde flashchromatographisch mit einem Fließmittel aus Cyclohexan und Ethylacetat (30-100 %) aufgereinigt.

**8** wurde als gelber Feststoff erhalten (616 mg, 1.43 mmol, 48 %).

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 2.02 (ddd, *J* = 10.5, 5.5, 3.3 Hz, 1H), 2.52 – 2.66 (m, 2H), 2.88 (ddd, *J* = 17.2, 13.9, 5.4 Hz, 1H), 3.36 (dd, *J* = 5.5, 4.2 Hz, 2H), 3.47 (q, *J* = 5.6 Hz, 2H), 3.54 – 3.69 (m, 8H), 5.05 (dd, *J* = 12.8, 5.4 Hz, 1H), 6.61 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 7.04 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.15 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.58 (dd, *J* = 8.6, 7.1 Hz, 1H), 11.09 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 22.1, 31.0, 41.7, 48.5, 50.0, 68.9, 69.3, 69.7, 69.8, 109.3, 110.7, 117.4, 132.1, 136.2, 146.4, 167.3, 168.9, 170.1, 172.8.

**HPLC**: *t*<sub>r</sub> 10.78 min; 99.9 %

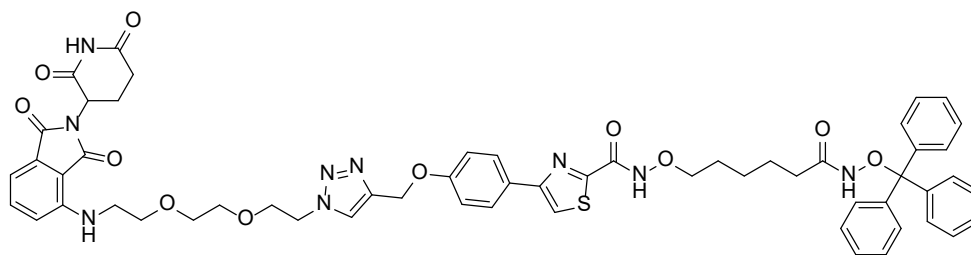
**Smp.**: 107.1 °C

Alle spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein. Liu *et al.* (2021)<sup>148</sup>



## 5. Experimenteller Teil

### 4-(4-((1-(2-(2-(2-(2-(2,6-Dioxopiperidin-3-yl)-1,3-dioxoisindolin-4-yl)amino)ethoxy)ethoxy)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)phenyl)-N-((6-oxo-6-((trityloxy)amino)hexyl)oxy)thiazol-2-carboxamid (**18**)



**18**

C<sub>57</sub>H<sub>57</sub>N<sub>9</sub>O<sub>11</sub>S

[1076.20 g/mol]

**8** (124 mg, 0.29 mmol, 1.00 Äq.) und **3aa** (185 mg, 0.29 mmol, 1.00 Äq.) wurden in 14.0 mL aus einem Gemisch von *tert*-Butanol und Tetrahydrofuran (1:1) gelöst, ehe Natriumascorbat (35.7 mg, 0.18 mmol, 0.60 Äq.) und Kupfersulfat (9.58 mg, 0.06 mmol, 0.20 Äq.) sowie 5.0 mL dest. Wasser zugegeben wurden. Die Reaktion wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend filtriert. Der erhaltene Rückstand wurde mit Wasser gewaschen und das Filtrat sechs Mal mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wurde mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und gemeinsam mit dem Rückstand flashchromatographisch mit Dichlormethan / 30 % Methanol in Dichlormethan als Eluenten aufgereinigt.

**18** wurde als gelber Feststoff erhalten (113 mg, 0.11 mmol, 37 %)

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.11 (s, 3H), 1.23 (s, 2H), 1.47 (s, 3H), 1.80 (s, 2H), 2.02 (s, 1H), 2.84 (d, *J* = 15.0 Hz, 1H), 3.43 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H), 3.55 (d, *J* = 9.2 Hz, 6H), 3.82 (d, *J* = 6.6 Hz, 4H), 4.53 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 5.05 (dd, *J* = 13.0, 5.2 Hz, 1H), 5.17 (s, 2H), 6.58 (s, 1H), 7.02 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.10 (t, *J* = 8.1 Hz, 3H), 7.32 (s, 15H), 7.55 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.98 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 8.15 – 8.31 (m, 2H), 10.19 (s, 1H), 11.09 (s, 1H), 12.09 (s, 1H).

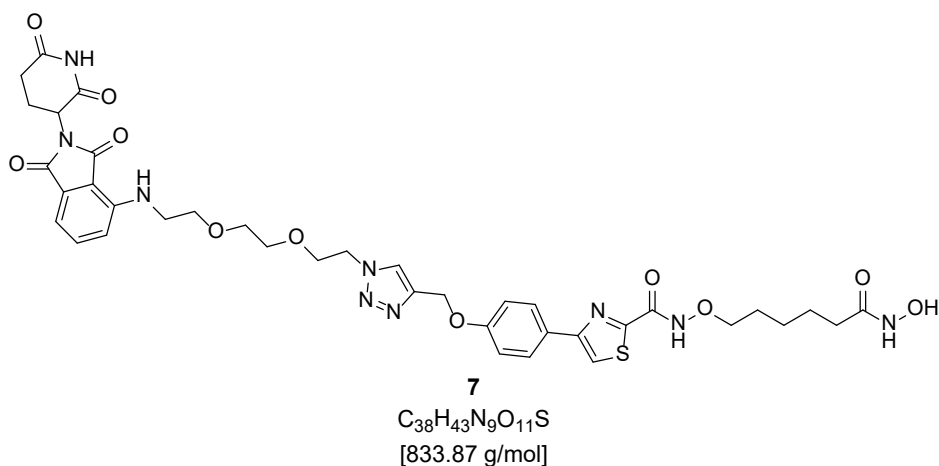
**<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, DMSO) δ 22.17, 24.91, 25.07, 27.42, 31.01, 32.22, 41.68, 48.59, 49.51, 61.18, 68.76, 68.83, 69.60, 69.62, 79.20, 80.59, 109.26, 110.72, 114.93, 117.40, 117.47, 124.98, 126.48, 126.66, 127.55, 127.76, 127.80, 128.99, 132.09, 136.24, 142.42, 142.49, 146.38, 147.79, 155.39, 156.67, 158.38, 161.31, 167.31, 169.00, 169.09, 170.13, 172.83.

**HPLC:** *t*<sub>r</sub> 15.68 min; 98.8 %

**Smp.:** 108.3 °C

## 5. Experimenteller Teil

### 4-(4-((1-(2-(2-(2-((2-(2,6-Dioxopiperidin-3-yl)-1,3-dioxoisindolin-4-yl)amino)ethoxy)ethoxy)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)phenyl)-N-((6-(hydroxyamino)-6-oxohexyl)oxy)thiazol-2-carboxamid (7)



Die Synthese von **7** erfolgte nach **AAV III** aus dem Edukt **18** (100 mg, 0.09 mmol, 1.00 Äq.).  
**7** wurde als rotes Harz (58.2 mg, 0.07 mmol, 75 %) erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$**  (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  1.30 – 1.45 (m, 2H), 1.54 (p,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 1.61 (p,  $J = 6.7$  Hz, 2H), 1.99 (dt,  $J = 27.1, 6.8$  Hz, 3H), 2.57 (q,  $J = 14.2$  Hz, 2H), 2.87 (ddd,  $J = 18.3, 14.2, 5.3$  Hz, 1H), 3.42 (q,  $J = 5.5$  Hz, 2H), 3.53 (q,  $J = 4.4$  Hz, 5H), 3.56 (t,  $J = 5.3$  Hz, 2H), 3.83 (t,  $J = 5.1$  Hz, 2H), 3.88 – 3.98 (m, 2H), 4.53 (t,  $J = 5.1$  Hz, 2H), 5.04 (dd,  $J = 12.8, 5.4$  Hz, 1H), 5.17 (s, 2H), 6.58 (t,  $J = 5.7$  Hz, 1H), 7.02 (d,  $J = 6.9$  Hz, 1H), 7.10 (dd,  $J = 13.2, 8.5$  Hz, 3H), 7.55 (t,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.98 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 8.19 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 8.67 (s, 1H), 10.35 (s, 1H), 11.09 (s, 1H), 12.12 (s, 1H).

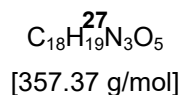
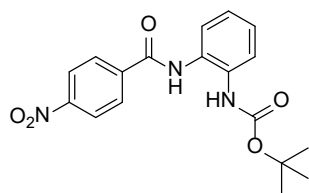
**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  22.0, 24.7, 24.9, 25.4, 27.3, 30.9, 32.1, 41.6, 48.5 (d,  $J = 4.5$  Hz), 49.4, 61.2, 68.6, 68.7, 69.5, 75.5, 109.2, 110.6, 114.8, 117.2, 124.7, 126.4, 127.6, 132.0, 136.0, 142.3, 146.3, 155.3, 156.6, 158.3, 161.1, 167.1, 168.8, 169.8, 172.5.

**HRMS** ( $m/z$ )  $\text{MH}^+$  berechnet für  $C_{38}H_{43}N_9O_{11}S$  834.2876, gefunden: 834.2874

**HPLC**:  $t_r$  9.77 min; 95.6 %

## 5. Experimenteller Teil

### **tert-Butyl-(2-(4-nitrobenzamido)phenyl)carbamat (27)**



Die Synthese wurde nach einem Protokoll von Cao *et al.* (2020) durchgeführt.<sup>132</sup>

*tert*-Butyl-(2-aminophenyl)carbamat **26** (2.08 g, 10.0 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 10.0 mL trockenem Dichlormethan gelöst. Triethylamin (2.79 mL, 20.0 mmol, 2.00 Äq.) wurde hinzugegeben und der Ansatz auf 0 °C abgekühlt. 4-Nitrobenzoylchlorid (2.04 g, 11.0 mmol, 1.10 Äq.) wurde in 3 mL trockenem Dichlormethan suspendiert und hinzuge tropft. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Anschließend wurde der Ansatz mit Dichlormethan verdünnt und je einmal mit 50 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung, 1 M HCl und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und das Rohprodukt aus *n*-Hexan/Ethylacetat umkristallisiert.

Das Produkt **27** wurde als gelblicher Feststoff erhalten (2.07 g, 5.79 mmol, 57.9 %).

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.44 (s, 9H), 7.19 (dtd, *J* = 24.6, 7.5, 1.6 Hz, 2H), 7.51 (dd, *J* = 7.9, 1.7 Hz, 1H), 7.61 (dd, *J* = 8.0, 1.6 Hz, 1H), 8.14 – 8.26 (m, 2H), 8.32 – 8.45 (m, 2H), 8.72 (s, 1H), 10.08 (s, 1H).

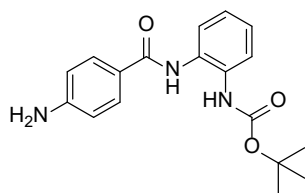
**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 28.1, 79.6, 123.6, 123.9, 126.1, 126.5, 129.0, 129.2, 132.4, 140.2, 149.3, 153.3, 163.9.

**HPLC:** *t*<sub>r</sub> 13.82 min; 97.4 %

**Smp.:** 184.1 °C

## 5. Experimenteller Teil

### **tert-Butyl-(2-(4-aminobenzamido)phenyl)carbamate (28)**



**28**

$C_{18}H_{21}N_3O_2$

[327.38 g/mol]

**27** (1.79 g, 5.00 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 30 mL Methanol gelöst, 10% Palladium auf Aktivkohle (0.50 g, 10.0 mol%.) wurde hinzugegeben und der Ansatz für 2.75 h unter Wasserstoffatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der Ansatz über Kieselgur filtriert und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entzogen.

**28** wurde als farbloser Feststoff (1.57 g, 4.78 mmol, 95.6 %) erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  1.45 (s, 9H), 5.82 (s, 2H), 6.55 – 6.66 (m, 2H), 7.07 – 7.21 (m, 2H), 7.40 – 7.56 (m, 2H), 7.61 – 7.75 (m, 2H), 8.65 (s, 1H), 9.48 (s, 1H).

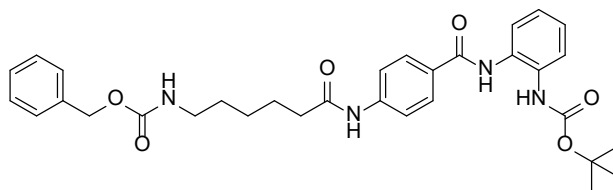
**$^{13}\text{C-NMR}$**  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  28.0, 79.7, 112.6, 120.2, 124.0, 124.2, 125.0, 125.6, 129.3, 130.6, 131.2, 152.5, 153.5, 165.2.

**HPLC**:  $t_r$  10.09 min; 95.2 %

**Smp.**: 186.0 °C

## 5. Experimenteller Teil

### **tert-Butyl-(2-(4-(6-(((benzyloxy)carbonyl)amino)hexanamido)benzamido)-phenyl)carbamate (30)**



**30**

$C_{32}H_{38}N_4O_6$

[574.68 g/mol]

**29** (796 g, 3.00 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 30.0 mL *N,N*-Dimethylformamid gelöst, ehe HATU (1.26 g, 3.30 mmol, 1.10 Äq.) und DIPEA (1.05 mL, 6.00 mmol, 2.00 Äq.) hinzugegeben wurden. Nach 15 min Rühren bei Raumtemperatur wurde **28** (982 mg, 3.00 mmol, 1.00 Äq.) dazugegeben und der Ansatz über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der Ansatz eingeeengt, der Rückstand in 50 mL Dichlormethan aufgenommen und dreimal mit 20 mL 10 %iger Zitronensäure, dreimal mit 20 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit 20 mL gesättigter Natriumchlorid-Lösung extrahiert. Die organische Phase wurde mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde aus Cyclohexan und Ethylacetat umkristallisiert. **30** (985 mg, 1.71 mmol, 57 %) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  1.31 (q,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 1.45 (s, 11H), 1.60 (p,  $J = 7.7$  Hz, 2H), 2.34 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 3.00 (q,  $J = 6.5$  Hz, 2H), 5.00 (s, 2H), 7.16 (qd,  $J = 7.2, 1.9$  Hz, 2H), 7.21 – 7.29 (m, 1H), 7.28 – 7.38 (m, 5H), 7.53 (td,  $J = 7.8, 2.0$  Hz, 2H), 7.74 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H), 7.91 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H), 8.67 (s, 1H), 9.74 (s, 1H), 10.17 (s, 1H).

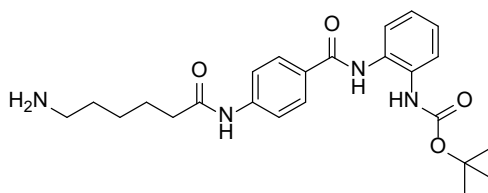
**<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  24.68, 25.94, 28.03, 29.23, 36.40, 40.18, 65.08, 79.67, 118.23, 123.91, 124.17, 125.46, 125.96, 127.70, 127.73, 128.22, 128.34, 128.50, 129.97, 131.60, 137.30, 142.55, 153.50, 156.09, 164.72, 171.70.

**HPLC:**  $t_r$  14.17 min; 98.5 %

**Smp.:** 127.2 °C

## 5. Experimenteller Teil

### **tert-Butyl-(2-(4-(6-aminohexanamido)benzamido)phenyl)carbamat (33)**



**33**

$C_{24}H_{32}N_4O_4$

[440.54 g/mol]

**30** (442 mg, 0.77 mmol, 1.00 Äq.) wurde unter Stickstoffatmosphäre in 6.6 mL Methanol suspendiert, ehe 10 % Palladium auf Aktivkohle hinzugegeben (81.9 mg, 10.0 mol%) wurde. Die Atmosphäre wurde zu einer Wasserstoffatmosphäre ausgetauscht und der Ansatz für 7 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem DC-Umsatz (Fließmittel: 5 % Methanol in Dichlormethan) wurde der Ansatz über Kieselgur filtriert und das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt.

**33** (312 mg, 0.71 mmol, 92 %) wurde als klarer, glasartiger Feststoff erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  1.14 – 1.53 (m, 13H), 1.62 (q,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 2.36 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 2.60 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 7.16 (tt,  $J = 7.7, 3.8$  Hz, 2H), 7.52 (t, 2H), 7.75 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.91 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 8.69 (s, 1H), 9.75 (s, 1H), 10.22 (s, 1H).

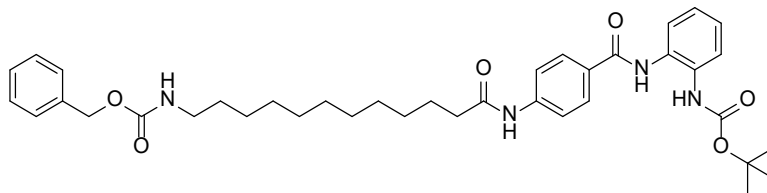
**$^{13}\text{C-NMR}$**  (151 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  24.8, 25.9, 28.0, 31.1, 36.4, 40.6, 79.7, 118.3, 123.9, 124.2, 125.5, 126.0, 128.2, 128.5, 130.0, 131.6, 142.6, 153.5, 164.7, 171.8.

**HPLC:**  $t_r$  9.24 min; 95.5 %

**Smp.:** 73.3 °C

## 5. Experimenteller Teil

### Benzyl-(12-((4-((2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)phenyl)carbamoyl)phenyl)amino)-12-oxododecyl)carbammat (**32**)



**32**

$C_{38}H_{50}N_4O_6$

[658.84 g/mol]

**31** (699 mg, 2.00 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 20 mL *N,N*-Dimethylformamid gelöst, ehe HATU (837 mg, 2.20 mmol, 1.10 Äq.) und DIPEA (0.70 mL, 4.00 mmol, 2.00 Äq.) hinzugegeben wurden. Nach zehn Minuten Rühren bei Raumtemperatur wurde **28** (655 mg, 2.00 mmol, 1.00 Äq.) dazugegeben und der Ansatz 13 h bei Raumtemperatur gerührt. Zu diesem Ansatz wurde HATU (760 mg, 2.0 mmol, 1.00 Äq.) und DIPEA (0.35 mL, 2.00 mmol, 1.00 Äq.) gegeben und der Ansatz für 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der Ansatz unter reduziertem Druck eingedunstet, der Rückstand in 50 mL Dichlormethan aufgenommen und zweimal mit je 20 mL 10%iger Zitronensäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und gesättigter Natriumchlorid-Lösung extrahiert. Die organische Phase wurde mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde aus Cyclohexan und Ethylacetat umkristallisiert.

**32** (783 mg, 1.19 mmol, 59 %) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  1.17 – 1.34 (m, 14H), 1.38 (t,  $J = 5.1$  Hz, 2H), 1.45 (s, 9H), 1.61 (q,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 2.34 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 2.97 (q,  $J = 6.6$  Hz, 2H), 5.00 (s, 2H), 7.17 (ddd,  $J = 14.6, 7.4, 5.4$  Hz, 3H), 7.26 – 7.40 (m, 5H), 7.53 (td,  $J = 7.8, 2.0$  Hz, 2H), 7.67 – 7.80 (m, 2H), 7.87 – 7.95 (m, 2H), 8.68 (s, 1H), 9.74 (s, 1H), 10.16 (s, 1H).

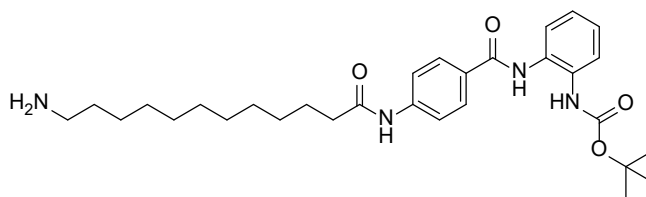
**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  25.0, 26.2, 28.0, 28.7, 28.8, 29.0, 29.4, 36.5, 65.0, 79.7, 118.2, 123.9, 124.1, 125.4, 125.9, 127.7, 128.2, 128.3, 128.5, 130.0, 131.6, 137.3, 142.5, 153.5, 156.1, 164.7, 171.8.

**HPLC:**  $t_r$  17.70 min; 99.2 %

**Smp.:** 149.8 °C

## 5. Experimenteller Teil

### **tert-Butyl-(2-(4-(12-aminododecanamido)benzamido)phenyl)carbammat (34)**



**34**

$C_{30}H_{44}N_4O_4$

[524.71 g/mol]

**32** (725 mg, 1.10 mmol, 1.00 Äq.) wurde unter Stickstoffatmosphäre in 6.6 mL Methanol suspendiert, ehe 10 % Palladium auf Aktivkohle hinzugegeben (117 mg, 10.0 mol%) wurde. Der Ansatz wurde für 7 h bei Raumtemperatur in einer Wasserstoffatmosphäre gerührt. Nach vollständigem DC-Umsatz (Fließmittel 5% Methanol in Dichlormethan) wurde der Ansatz über Kieselgur filtriert und das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt.

**34** (528 mg, 1.01 mmol, 92 %) wurde als klarer, glasartiger Feststoff erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  1.28 (d,  $J = 13.4$  Hz, 18H), 1.46 (s, 9H), 1.62 (q,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 2.35 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 4.08 (s, 1H), 7.06 – 7.29 (m, 2H), 7.54 (td,  $J = 7.7, 1.7$  Hz, 2H), 7.71 – 7.82 (m, 2H), 7.85 – 8.02 (m, 2H), 10.19 (s, 1H).

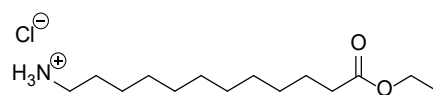
**$^{13}\text{C-NMR}$**  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  25.0, 26.5, 28.0, 28.6, 28.8, 28.9, 29.0, 29.0, 29.1, 33.4, 36.5, 41.7, 48.6, 79.6, 118.2, 123.9, 124.1, 125.4, 126.0, 128.2, 128.5, 130.0, 131.6, 142.6, 153.5, 164.7, 171.8.

**HPLC:**  $t_r$  12.13 min; 95.9 %



## 5. Experimenteller Teil

### 12-Ethoxy-12-oxododecan-1-ammonium-chlorid (**36**)



**36**

C<sub>30</sub>H<sub>44</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>

[524.71 g/mol]

Thionylchlorid (2.17 mL, 30.0 mmol, 1.50 Äq.) wurde bei 0 °C in 80 mL trockenen Ethanol getropft, ehe 12-Aminododecansäure **35** (4.40 g, 20.0 mmol, 1.00 Äq.) portionsweise hinzugegeben wurde. Der Ansatz wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde unter reduziertem Druck das Lösungsmittel entzogen, um **36** als farblosen Feststoff zu erhalten.

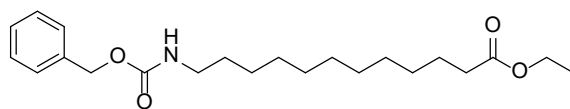
**36** wurde ohne weitere Aufarbeitung eingesetzt.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1.17 – 1.47 (m, 17H), 1.60 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.75 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.28 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.97 (s, 2H), 4.12 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 8.30 (s, 3H).

Alle spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein. Maraswami *et al.* (2020)<sup>149</sup>

## 5. Experimenteller Teil

### Ethyl-12-(((benzyloxy)carbonyl)amino)dodecanoat (37)



37

$C_{22}H_{35}NO_4$

[377.53 g/mol]

**36** (5.60 g, 20.0 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 100 mL Dichlormethan gelöst. Der Ansatz wurde auf 0 °C abgekühlt, ehe Triethylamin (6.13 mL, 24.0 mmol, 2.20 Äq.) hinzugegeben und Chlorkohlensäurebenzylester (3.43 mL, 24.0 mmol, 1.20 Äq.) dazugetropft wurde. Der Ansatz wurde 15 h bei Raumtemperatur gerührt, bevor der Ansatz dreimal mit 50 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonat- und dreimal mit 50 mL 10%iger-Zitronensäure-Lösung gewaschen wurde. Die organische Phase wurde mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Der erhaltene Feststoff wurde säulenchromatographisch mit einem Fließmittelgemisch aus Ethylacetat/Cyclohexan (1:9) aufgereinigt.

**37** wurde als farbloser Feststoff (6.39 g, 16.9 mmol, 84.7 % Ausbeute über zwei Schritte) erhalten.

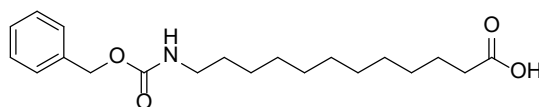
**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.17 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.23 (d, *J* = 2.7 Hz, 15H), 1.38 (t, *J* = 6.5 Hz, 3H), 1.50 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.26 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.97 (q, *J* = 6.6 Hz, 2H), 4.04 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 5.00 (s, 2H), 7.21 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 7.26 – 7.41 (m, 5H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 14.1, 24.4, 26.2, 28.4, 28.6, 28.7, 28.8, 28.9, 28.9, 29.4, 33.5, 40.2, 59.6, 65.0, 127.7, 128.3, 137.3, 156.1, 172.9.

**Smp.:** 50.3 °C

## 5. Experimenteller Teil

### 12-(((Benzyloxy)carbonyl)amino)dodecansäure (31)



**31**  
 $C_{20}H_{31}NO_4$   
[349.47 g/mol]

**37** (1.89 g, 5.00 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 75 mL Tetrahydrofuran gelöst, ehe eine Lösung von Lithiumhydroxid-monohydrat (2.10 g, 50.0 mmol, 10.0 Äq) in 75 mL dest. Wasser hinzugegeben wurde. Der Ansatz wurde 16 h bei Raumtemperatur gerührt, ehe mit 1 M Salzsäure-Lösung ein pH von 1 eingestellt wurde und der Ansatz dreimal mit 100 mL Ethylacetat-Lösung extrahiert wurde. Die organische Phase wurde mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt.

**31** wurde als farbloser Feststoff (1.53 g, 4.37 mmol, 87 %) erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  1.23 (d,  $J = 2.5$  Hz, 14H), 1.38 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 1.42 – 1.53 (m, 2H), 2.18 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 2.97 (q,  $J = 6.6$  Hz, 2H), 5.00 (s, 2H), 7.21 (t,  $J = 5.7$  Hz, 1H), 7.25 – 7.40 (m, 5H), 11.95 (s, 1H).

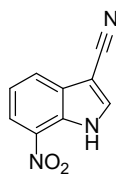
**$^{13}\text{C-NMR}$**  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  24.51, 26.23, 28.57, 28.76, 28.92, 28.95, 28.99, 29.40, 33.67, 65.05, 127.70, 128.32, 137.35, 156.08, 174.50.

**HPLC:**  $t_r$  14.46 min; 95.3 %

**Smp.:** 87.0 °C

## 5. Experimenteller Teil

### 7-Nitro-1*H*-indol-3-carbonitril (**39**)



**39**  
C<sub>9</sub>H<sub>5</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>  
[187.16 g/mol]

Die Synthese wurde nach einer Vorschrift von Owa et al. durchgeführt.<sup>134</sup>

7-Nitroindol-3-carboxaldehyd **38** (1.00 g, 5.00 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 15 mL *N,N*-Dimethylformamid gelöst, ehe Hydroxylamin-hydrochlorid (365 mg, 5.25 mmol, 1.05 Äq.) und Pyridin (0.43 mL, 5.25 mmol, 1.05 Äq.) hinzugegeben wurden und der Ansatz für 3.5 h bei 80 °C erhitzt wurde. Nach dieser Reaktionszeit wurde Selendioxid (588 mg, 5.30 mmol, 1.06 Äq.) und wasserfreies Natriumsulfat (2 g) dazugegeben und der Ansatz weitere 2.0 h bei 80 °C gerührt. Anschließend wurde der Ansatz filtriert, mit dest. Wasser verdünnt und erneut filtriert. Das gewonnene Rohprodukt aus dem zweiten Filtrationsschritt wurde mit Wasser gewaschen und flashchromatographisch mit *n*-Hexan/Ethylacetat als Eluent aufgereinigt. **39** (817 mg, 4.37 mmol, 87.3 %) wurde als gelber Feststoff erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 7.47 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.16 (dd, *J* = 7.9, 1.0 Hz, 1H), 8.26 (dd, *J* = 8.1, 1.0 Hz, 1H), 8.46 (s, 1H), 12.83 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 86.7, 114.9, 120.6, 121.6, 126.9, 127.4, 130.3, 133.8, 137.6.

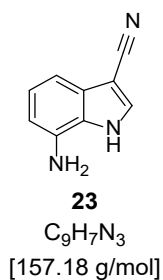
**HPLC**: *t*<sub>r</sub> 11.04 min; 98.4 %

**Smp.**: 278.9 °C

Alle spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein. Owa *et al.* (1999)<sup>134</sup>

## 5. Experimenteller Teil

### 7-Amino-1H-indol-3-carbonitril (**23**)



**39** (374 mg, 2.00 mmol, 1.00 Äq.) wurde unter Stickstoffatmosphäre in 12 mL Methanol suspendiert, ehe 10 % Palladium auf Aktivkohle (213 mg, 10.0 mol%) hinzugegeben wurde. Der Ansatz wurde für 2 h bei Raumtemperatur in einer Wasserstoffatmosphäre bis zum kompletten DC-Umsatz (Fließmittel *n*-Hexan/Ethylacetat (1:1)) gerührt. Anschließend wurde der Ansatz über Kieselgur filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt.

**23** (275 mg, 1.75 mmol, 87.5 %) wurde als grauer Feststoff erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 5.32 (s, 2H), 6.47 (dd, *J* = 7.5, 1.0 Hz, 1H), 6.81 (dd, *J* = 7.9, 1.0 Hz, 1H), 6.94 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 8.12 (s, 1H), 11.56 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 84.4, 106.0, 106.5, 116.9, 123.0, 124.6, 127.8, 132.8, 135.0.

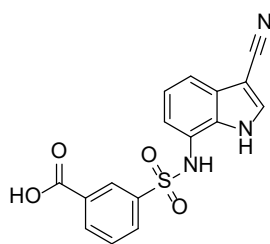
**HPLC:** *t*<sub>r</sub> 5.47 min; 96.9 %

**Smp.:** 189.5 °C

Alle spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein Wakabayashi *et al.* (2004)<sup>150</sup>

## 5. Experimenteller Teil

### 3-(*N*-(3-Cyano-1*H*-indol-7-yl)sulfamoyl)benzoesäure (**21**)



**21**

C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S  
[341.34 g/mol]

Die Synthese wurde nach einer Vorschrift von Li *et al.* durchgeführt.<sup>109</sup>

**23** (276 mg, 1.76 mmol, 1.00 Äq.) wurde mit Pyridin (0.28 mL, 3.52 mmol, 2.00 Äq.) in 12 mL Tetrahydrofuran gelöst. Der Ansatz wurde auf 0 °C abgekühlt, ehe 3-(Chlorsulfonyl)benzoesäure **40** (582 mg, 2.64 mmol, 1.50 Äq.) in 6 mL Tetrahydrofuran gelöst und dazugetropft wurde. Der Ansatz wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, ehe er mit 50 mL 1 M HCl verdünnt und dreimal mit je 50 mL Ethylacetat extrahiert wurde. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt.

**21** wurde als leicht violetter Feststoff (482 mg, 1.41 mmol, 80 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 6.69 (dd, *J* = 7.7, 0.9 Hz, 1H), 7.06 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.45 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.65 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.87 (dt, *J* = 8.0, 1.4 Hz, 1H), 8.14 (dt, *J* = 7.7, 1.4 Hz, 1H), 8.20 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H), 8.26 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H), 10.20 (s, 1H), 11.98 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H), 13.45 (s, 1H).

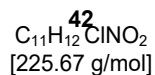
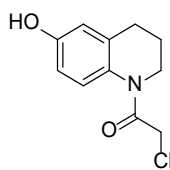
**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 84.9, 115.9, 116.7, 118.4, 122.0, 122.4, 127.6, 128.5, 129.8, 130.6, 130.9, 131.7, 133.5, 135.0, 139.6, 165.9.

**HPLC:** *t*<sub>r</sub> 9.82 min; 98.3 %

**Smp.:** 267.4 °C

## 5. Experimenteller Teil

### 2-Chlor-1-(6-hydroxy-3,4-dihydrochinolin-1(2H)-yl)ethan-1-on (42)



**42** wurde nach der Vorschrift von Zhang *et al.* dargestellt.<sup>110</sup>

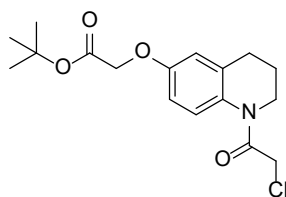
6-Hydroxy-1,2,3,4-tetrahydrochinolin **41** (3.18 g, 20.0 mmol, 1.00 Äq.) wurde in einer Mischung aus 30 mL dest. Wasser und 30 mL 1,4-Dioxan suspendiert, ehe Natriumhydroxid (960 mg, 24.0 mmol, 1.20 Äq.) zugegeben wurde. Die resultierende Lösung wurde auf 0 °C abgekühlt. Anschließend wurde Chloracetylchlorid (1.75 mL, 22.0 mmol, 1.10 Äq.) hinzugegeben und der Ansatz auf Raumtemperatur gebracht. Nach 4 h Rühren bei Raumtemperatur wurde mit 1 M HCl ein pH kleiner 4 eingestellt und der Ansatz dreimal mit 50 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden einmal mit 50 mL gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt.

Der erhaltene Feststoff wurde ohne weitere Aufarbeitung weiterverwendet.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.77 – 1.92 (m, 2H), 2.61 (s, 2H), 3.64 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 4.41 (s, 2H), 6.58 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.96 – 7.64 (m, 1H), 9.38 (s, 1H).

## 5. Experimenteller Teil

### **tert-Butyl-2-((1-(2-chloracetyl)-1,2,3,4-tetrahydrochinolin-6-yl)oxy)acetat (43)**



**43**

C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>ClNO<sub>4</sub>  
[339.82 g/mol]

**43** wurde nach der Vorschrift von Zhang *et al.* dargestellt.<sup>110</sup>

**42** wurde in 48 mL *N,N*-Dimethylformamid gelöst, Bromessigsäure-*tert*-butylester (3.80 mL, 25.0 mmol, 1.30 Äq.) und Cäsiumcarbonat (9.81 g, 30.0 mmol, 1.50 Äq.) wurden dazugegeben und der Ansatz wurde 7 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der Ansatz mit 200 mL Ethylacetat verdünnt, mit 50 mL 1 M HCl versetzt und extrahiert. Die wässrige Phase wurde noch zweimal mit 100 mL Ethylacetat extrahiert, ehe die vereinigten organischen Phasen mit Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt wurde. Der erhaltene Rückstand wurde flashchromatographisch mit *n*-Hexan und Ethylacetat als Eluenten aufgereinigt.

**43** wurde als gelber Feststoff (2.79 g, 7.39 mmol, 37 % über zwei Schritte) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.43 (s, 9H), 1.88 (q, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.67 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 3.66 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 4.47 (s, 2H), 4.62 (s, 2H), 6.73 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.44 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO) δ 23.2, 26.3, 27.7, 65.1, 81.4, 112.0, 114.1, 125.0, 131.5, 165.2, 167.8.f

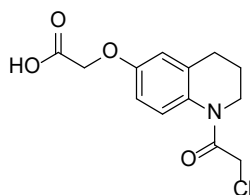
**HPLC:** *t<sub>r</sub>* 13.97 min; 91.9 %

**Smp.:** 93.3 °C



## 5. Experimenteller Teil

### 2-((1-(2-Chloracetyl)-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-6-yl)oxy)essigsäure (**25**)



**25**

C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>ClNO<sub>4</sub>

[283.71 g/mol]

**25** wurde nach der Vorschrift von Zhang *et al.* synthetisiert.<sup>110</sup>

**43** (755 mg, 2.00 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 1.4 mL trockenem Dichlormethan gelöst, ehe 1.4 mL Trifluoressigsäure und 36 µl dest. Wasser zu dem Ansatz gegeben wurden. Die Reaktion wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entzogen, der Rückstand dreimal mit Toluol und dreimal mit Dichlormethan koevaporiert und mit 50 mL 1 M HCl versetzt. Die resultierende Suspension wurde dreimal mit 50 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt.

**25** wurde als gelber Feststoff (596 mg, 1.89 mmol, 95 %) erhalten.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.87 (p, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.67 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 3.66 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 4.47 (s, 2H), 4.64 (d, *J* = 3.6 Hz, 2H), 6.54 – 7.03 (m, 2H), 7.44 (s, 1H).

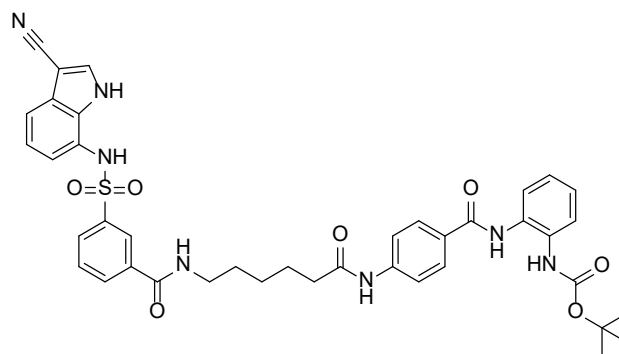
<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, DMSO) δ 23.3, 26.3, 64.6, 111.9, 112.0, 114.0, 124.9, 131.4, 165.2, 170.2, 170.2, 170.9.

HPLC: *t*<sub>r</sub> 8.23 min; 90.5 %

Smp.: 138.0 °C

## 5. Experimenteller Teil

### **tert-Butyl-(2-(4-(6-(3-(*N*-(3-cyano-1*H*-indol-7-yl)sulfamoyl)benzamido)hexanamido)-benzamido)phenyl)carbamate (**44**)**



**44**

C<sub>40</sub>H<sub>41</sub>N<sub>7</sub>O<sub>7</sub>S  
[763.87 g/mol]

**21** (171 mg, 0.50 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 5.0 mL *N,N*-Dimethylformamid gelöst, bevor HBTU (209 mg, 0.55 mmol, 1.10 Äq.) und DIPEA (180 µl, 1.00 mmol, 2.00 Äq.) hinzugegeben wurden. Der Ansatz wurde für 10 min bei Raumtemperatur gerührt, bevor **33** dazugegeben und der Ansatz weiterhin über Nacht gerührt wurde. Anschließend wurde der Ansatz eingengt, mit 50 mL Ethylacetat verdünnt und zweimal mit 50 mL 10 %iger Zitronensäure-Lösung, zweimal mit 50 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit 50 mL gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Anschließend wurde der Ansatz mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde flashchromatographisch mit Dichlormethan/ 30 % Methanol in Dichlormethan als Eluenten aufgereinigt.

**44** wurde als brauner Feststoff erhalten (263 mg, 0.35 mmol, 69 %).

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.36 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.45 (s, 9H), 1.54 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.65 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.36 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 3.26 (q, *J* = 6.7 Hz, 2H), 6.72 (dd, *J* = 7.7, 1.0 Hz, 1H), 7.05 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.17 (pd, *J* = 7.4, 1.9 Hz, 2H), 7.43 (dd, *J* = 8.0, 0.9 Hz, 1H), 7.53 (td, *J* = 7.7, 2.0 Hz, 2H), 7.61 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.70 – 7.77 (m, 2H), 7.78 – 7.84 (m, 1H), 7.91 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 8.06 (dt, *J* = 8.0, 1.3 Hz, 1H), 8.20 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 8.23 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H), 8.65 – 8.73 (m, 2H), 9.74 (s, 1H), 10.17 (s, 2H), 11.97 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 24.7, 25.5, 26.2, 28.0, 28.8, 36.4, 79.7, 84.9, 115.9, 116.4, 117.9, 118.2, 121.9, 122.5, 123.9, 124.2, 125.5, 125.9, 128.2, 128.4, 128.5, 129.2, 129.3, 130.0, 130.4, 131.3, 131.6, 134.9, 135.4, 139.5, 142.5, 153.5, 164.5, 164.7, 171.7.

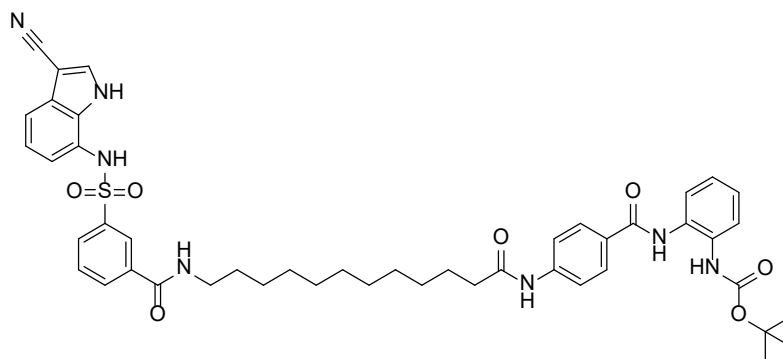
**HPLC:** t<sub>r</sub> 13.34 min; 98.4 %

## 5. Experimenteller Teil

**Smp.:** 199.0 °C

## 5. Experimenteller Teil

### **tert-Butyl-(2-(4-(12-(3-(*N*-(3-cyano-1*H*-indol-7-yl)sulfamoyl)benzamido)dodecanamido)benzamido)phenyl)carbamate (45)**



**45**

C<sub>46</sub>H<sub>53</sub>N<sub>7</sub>O<sub>7</sub>S

[848.03 g/mol]

**21** (279 mg, 0.82 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 8.0 mL *N,N*-Dimethylformamid gelöst, ehe HATU (342 mg, 0.90 mmol, 1.10 Äq.) und DIPEA (0.29 mL, 1.63 mmol, 2.00 Äq.) hinzugegeben wurden. Der Ansatz wurde für 15 min bei Raumtemperatur gerührt, ehe **34** (429 mg, 0.82 mmol, 1.00 Äq.) dazugegeben und der Ansatz weiterhin über Nacht gerührt wurde. Anschließend wurde der Ansatz eingeeengt, mit 50 mL Ethylacetat verdünnt und dreimal mit je 50 mL 10 %iger Zitronensäure-Lösung, dreimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und dreimal mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Anschließend wurde der Ansatz mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde flashchromatographisch zuerst mit Dichlormethan/ 30 % Methanol in Dichlormethan und anschließend mit Acetonitril/Wasser als Eluent aufgereinigt.

**45** wurde als gelbes Wachs erhalten (226 mg, 0.27 mmol, 33 %).

**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, DMSO)  $\delta$  1.27 (dd,  $J = 17.0, 7.4$  Hz, 14H), 1.44 (s, 9H), 1.46 – 1.53 (m, 2H), 1.59 (p,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 2.34 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 3.23 (q,  $J = 5.5$  Hz, 2H), 6.72 (dd,  $J = 7.7, 1.0$  Hz, 1H), 7.04 (t,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.14 (td,  $J = 7.6, 1.6$  Hz, 1H), 7.19 (td,  $J = 7.7, 1.7$  Hz, 1H), 7.42 (dd,  $J = 8.0, 1.0$  Hz, 1H), 7.51 (dd,  $J = 8.0, 1.6$  Hz, 1H), 7.54 (dd,  $J = 7.9, 1.7$  Hz, 1H), 7.61 (t,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.72 – 7.77 (m, 2H), 7.80 (ddd,  $J = 7.9, 1.9, 1.1$  Hz, 1H), 7.89 – 7.94 (m, 2H), 8.05 (ddd,  $J = 7.8, 1.7, 1.1$  Hz, 1H), 8.20 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1H), 8.22 (t, 1H), 8.65 (t,  $J = 5.6$  Hz, 1H), 8.68 (s, 1H), 9.74 (s, 1H), 10.16 (s, 1H), 10.18 (s, 1H), 11.98 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, DMSO)  $\delta$  24.98, 26.48, 28.03, 28.68, 28.79, 28.83, 28.94, 29.01, 29.02, 36.49, 48.60, 60.21, 69.78, 79.67, 84.88, 115.90, 116.39, 117.91, 118.22, 121.92, 122.56,

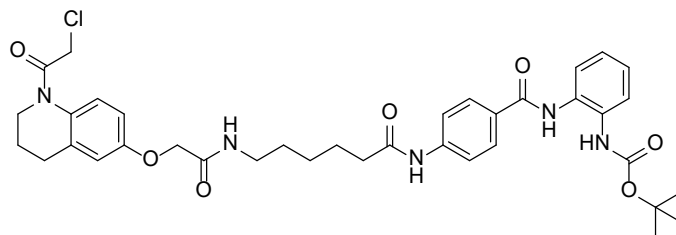
## 5. Experimenteller Teil

123.92, 124.17, 125.46, 125.94, 125.97, 128.22, 128.43, 128.50, 129.16, 129.29, 129.97, 130.34, 131.29, 131.60, 134.86, 135.43, 139.46, 142.57, 153.51, 164.46, 164.73, 171.81.

**HPLC:**  $t_r$  18.02 min; 99.0 %

## 5. Experimenteller Teil

### **tert-Butyl-(2-(4-(6-(2-((1-(2-chloroacetyl)-1,2,3,4-tetrahydrochinolin-6-yl)oxy)acetamido)hexanamido)benzamido)phenyl)carbamate (46)**



**46**

$C_{37}H_{44}ClN_5O_7$   
[706.24 g/mol]

**25** (168 mg, 0.59 mmol, 1.00 Äq.) und **33** (261 mg, 0.59 mmol, 1.00 Äq.) wurden in 5.9 mL *N,N*-Dimethylformamid gelöst, ehe 1-Methylimidazol (143  $\mu$ l, 1.78 mmol, 3.00 Äq) zugegeben wurde. Zu diesem Ansatz wurde TCFH (187 mg, 0.65 mmol, 1.1 Äq.) gegeben und der Ansatz bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Anschließend wurde der Ansatz mit 50 mL Ethylacetat verdünnt, zweimal mit je 50 mL wässriger 10 %iger Zitronensäure-Lösung, 50 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und 50 mL gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde in 5.9 mL Tetrahydrofuran und 0.5 mL *N,N*-Dimethylformamid aufgenommen, mit Tetrabutylammoniumchlorid (1.02 g, 3.55 mmol, 6.00 Äq.) versetzt und für 96 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der Ansatz mit 50 mL Ethylacetat verdünnt und einmal mit 50 mL wässriger 10 %er Zitronensäure-Lösung und einmal mit 50 mL dest. Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde flashchromatographisch mit dest. Wasser und Acetonitril als Eluent aufgereinigt.

**46** (136 mg, 0.19 mmol, 33 %) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  1.25 – 1.35 (m, 2H), 1.45 (s, 11H), 1.60 (p,  $J$  = 7.7 Hz, 2H), 1.88 (dd,  $J$  = 11.8, 5.2 Hz, 2H), 2.34 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 2H), 2.67 (d,  $J$  = 7.0 Hz, 2H), 3.14 (q,  $J$  = 6.6 Hz, 2H), 3.66 (t,  $J$  = 6.3 Hz, 2H), 4.44 (s, 4H), 6.79 (d,  $J$  = 8.9 Hz, 2H), 7.10 – 7.23 (m, 2H), 7.52 (td,  $J$  = 7.7, 2.0 Hz, 2H), 7.74 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 2H), 7.86 – 7.94 (m, 2H), 8.07 (t,  $J$  = 5.8 Hz, 1H), 8.68 (s, 1H), 9.74 (s, 1H), 10.17 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  14.1, 20.8, 23.2, 24.7, 26.0, 26.3, 28.0, 28.9, 36.4, 38.2, 59.8, 67.2, 79.7, 112.3, 114.3, 118.2, 123.9, 124.2, 125.5, 126.0, 128.2, 128.5, 130.0, 131.6, 142.5, 153.5, 164.7, 165.2, 167.4, 170.3, 171.7.

## 5. Experimenteller Teil

**HPLC:**  $t_r$  15.77 min; 98.0 %

**Smp.:** 104.6 °C

## 5. Experimenteller Teil

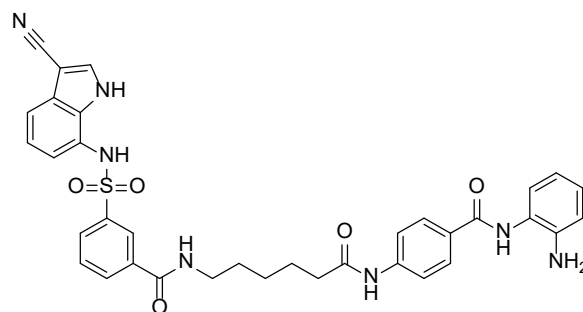
### 5.5 Allgemeine Arbeitsvorschrift IV (AAV IV): *N*-Boc-Entschützung.

Die entsprechende *N*-Boc-geschützte Verbindung wurde in Tetrahydrofuran (45 mL/mmol) gelöst und der Ansatz wurde auf 0 °C abgekühlt, ehe 4 M HCl in 1,4-Dioxan (5 mL/mmol) dazugetropft wurde. Anschließend wurde der Ansatz bis zum kompletten HPLC-Umsatz bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem Umsatz wurde der Ansatz mit 50 mL Ethylacetat verdünnt und dreimal mit je 25 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entzogen. Das erhaltene Rohprodukt wurde flashchromatographisch mit dest. Wasser/Acetonitril (0-70 %) als Eluenten aufgereinigt.



## 5. Experimenteller Teil

### ***N*-(6-((4-((2-Aminophenyl)carbamoyl)phenyl)amino)-6-oxohexyl)-3-(*N*-(3-cyano-1*H*-indol-7-yl)sulfamoyl)benzamid (**19**)**



**19**

C<sub>35</sub>H<sub>33</sub>N<sub>7</sub>O<sub>5</sub>S

[663.75 g/mol]

Die Synthese von **19** erfolgte nach **AAV IV** aus dem Edukt **44** (115 mg, 0.15 mmol, 1.00 Äq.). **19** wurde als farbloser Feststoff (34.0 mg, 0.05 mmol, 34 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.36 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.54 (q, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.65 (q, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.36 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 3.26 (q, *J* = 6.6 Hz, 2H), 4.89 (s, 2H), 6.60 (td, *J* = 7.5, 1.4 Hz, 1H), 6.72 (dd, *J* = 7.6, 1.0 Hz, 1H), 6.78 (dd, *J* = 8.0, 1.5 Hz, 1H), 6.96 (ddd, *J* = 8.7, 7.2, 1.6 Hz, 1H), 7.05 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.16 (dd, *J* = 7.8, 1.5 Hz, 1H), 7.43 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.61 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.70 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.80 (ddd, *J* = 7.8, 2.0, 1.0 Hz, 1H), 7.93 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 8.06 (dt, *J* = 8.0, 1.3 Hz, 1H), 8.20 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H), 8.23 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H), 8.69 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 9.55 (s, 1H), 10.12 (s, 1H), 10.18 (s, 1H), 11.97 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 14.1, 24.7, 26.2, 28.8, 36.4, 84.9, 115.9, 116.1, 116.3, 116.5, 118.0, 118.1, 121.9, 122.5, 123.5, 125.9, 126.3, 126.6, 128.4, 128.6, 128.7, 129.2, 129.3, 130.4, 131.3, 134.9, 135.4, 139.4, 142.1, 143.1, 164.5, 171.6.

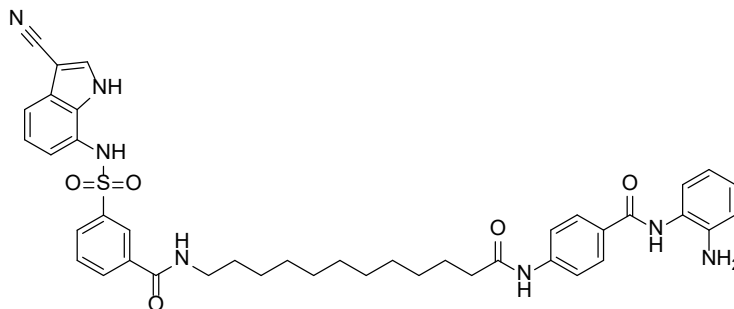
**HRMS** (*m/z*) MH<sup>+</sup> berechnet für C<sub>35</sub>H<sub>34</sub>N<sub>7</sub>O<sub>5</sub>S 664.2337, gefunden: 664.2333

**HPLC**: t<sub>r</sub> 9.55 min; 97.1 %

**Smp.**: 172.9 °C

## 5. Experimenteller Teil

### ***N*-(12-((4-((2-Aminophenyl)carbamoyl)phenyl)amino)-12-oxododecyl)-3-(*N*-(3-cyano-1*H*-indol-7-yl)sulfamoyl)benzamid (**20**)**



**20**

$C_{41}H_{45}N_7O_5S$   
[747.92 g/mol]

Die Synthese von **20** erfolgte nach **AAV IV** aus dem Edukt **45** (102 mg, 0.12 mmol, 1.00 Äq.). **20** wurde als farbloser Feststoff (36.5 mg, 0.05 mmol, 41 %) erhalten.

**$^1H$ -NMR** (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.26 (q,  $J = 7.8$  Hz, 14H), 1.47 (d,  $J = 13.4$  Hz, 2H), 1.59 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 2.33 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 3.23 (q,  $J = 6.7$  Hz, 2H), 4.88 (s, 2H), 6.59 (td,  $J = 7.5$ , 1.4 Hz, 1H), 6.72 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 6.78 (dd,  $J = 8.0$ , 1.5 Hz, 1H), 6.96 (td,  $J = 7.6$ , 1.5 Hz, 1H), 7.04 (t,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.15 (dd,  $J = 7.9$ , 1.5 Hz, 1H), 7.42 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 7.61 (t,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.70 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 7.80 (dt,  $J = 8.1$ , 1.3 Hz, 1H), 7.90 – 7.97 (m, 1H), 8.05 (dt,  $J = 7.9$ , 1.4 Hz, 1H), 8.20 (d,  $J = 3.0$  Hz, 1H), 8.21 (t,  $J = 1.8$  Hz, 1H), 8.65 (t,  $J = 5.6$  Hz, 1H), 9.55 (s, 1H), 10.11 (s, 1H), 10.18 (s, 1H), 11.98 (d,  $J = 3.2$  Hz, 1H).

**$^{13}C$ -NMR** (151 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  25.03, 26.50, 28.71, 28.81, 28.85, 28.97, 29.02, 36.51, 60.25, 69.81, 72.37, 84.90, 115.94, 116.20, 116.35, 116.42, 117.95, 118.13, 121.97, 122.59, 123.54, 125.96, 126.41, 126.69, 128.46, 128.68, 128.72, 129.19, 129.34, 130.38, 131.32, 134.89, 135.45, 139.49, 142.16, 143.15, 164.52, 164.78, 171.79.

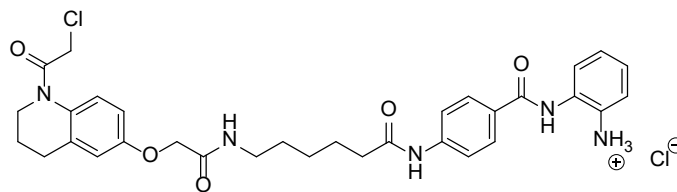
**HRMS** ( $m/z$ )  $MH^+$  berechnet für  $C_{41}H_{45}N_7O_5S$  748.3276, gefunden: 748.3276

**HPLC**:  $t_r$  15.36 min; 96.9 %

**Smp.**: 120.1 °C

## 5. Experimenteller Teil

### 2-(4-(6-(2-((1-(2-Chloracetyl)-1,2,3,4-tetrahydrochinolin-6-yl)oxy)acetamido)-hexanamido)benzamido)benzenammoniumchlorid (**24**)



**24**

C<sub>32</sub>H<sub>37</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>5</sub>  
[642.58 g/mol]

**46** (100 mg, 0.14 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 6.3 mL Tetrahydrofuran gelöst und der Ansatz wurde auf 0°C abgekühlt, ehe 0.7 mL 4 M HCl in 1,4-Dioxan dazugetropft wurde. Anschließend wurde der Ansatz bis zum vollständigen HPLC-Umsatz bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem Umsatz wurde dem Ansatz im Stickstoffstrom das Lösungsmittel entzogen und der erhaltene Feststoff flashchromatographisch mit dest. Wasser/Acetonitril als Eluenten aufgereinigt. Die produkthaltigen Fraktionen wurden vereinigt und dreimal mit je 50 mL Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wurde mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Stickstoffstrom eingeeengt. Zu dieser Lösung wurden 2 mL Salzsäure in Diethylether getropft. Der resultierende Feststoff wurde abfiltriert und getrocknet.

**24** wurde als schwarzer Feststoff (28.2 mg, 0.04 mmol, 31 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.30 (p, *J* = 5.6 Hz, 2H), 1.47 (p, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.60 (p, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.88 (q, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.36 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.68 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 3.04 – 3.18 (m, 2H), 3.55 – 4.06 (m, 5H), 4.44 (s, 4H), 6.79 (d, *J* = 9.8 Hz, 2H), 7.26 – 7.38 (m, 2H), 7.41 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.53 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.72 – 7.81 (m, 2H), 8.09 (dd, *J* = 15.1, 7.2 Hz, 3H), 10.30 (s, 1H), 10.37 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 23.2, 24.7, 26.0, 26.3, 28.9, 36.4, 38.2, 40.1, 60.2, 67.2, 69.8, 112.4, 114.3, 118.1, 119.1, 123.2, 125.8, 126.5, 127.1, 127.6, 129.0, 130.9, 131.6, 142.7, 165.2, 167.4, 171.8.

**HRMS** (*m/z*) MH<sup>+</sup> berechnet für C<sub>32</sub>H<sub>36</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>5</sub> 606.2478, gefunden: 606.2475

**HPLC**: t<sub>r</sub> 9.40 min; 98.4 %

**Smp.**: 83.9 °C

### 6. Literaturverzeichnis

---

- (1) Waddington, C. H. Towards a Theoretical Biology. *Nature* **1968**, *218* (5141), 525–527. <https://doi.org/10.1038/218525a0>.
- (2) Bird, A. Perceptions of Epigenetics. *Nature* **2007**, *447* (7143), 396–398. <https://doi.org/10.1038/nature05913>.
- (3) Fyodorov, D. V.; Zhou, B. R.; Skoultchi, A. I.; Bai, Y. Emerging Roles of Linker Histones in Regulating Chromatin Structure and Function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2018**, *19* (3), 192–206. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.94>.
- (4) Weier, H. U. G. DNA Fiber Mapping Techniques for the Assembly of High-Resolution Physical Maps. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **2001**, *49* (8), 939–948. <https://doi.org/10.1177/002215540104900802>.
- (5) Liu, P.; Xiao, J.; Wang, Y.; Song, X.; Huang, L.; Ren, Z.; Kitazato, K.; Wang, Y. Posttranslational Modification and beyond: Interplay between Histone Deacetylase 6 and Heat-Shock Protein 90. *Molecular Medicine* **2021**, *27* (1). <https://doi.org/10.1186/s10020-021-00375-3>.
- (6) Bannister, A. J.; Kouzarides, T. Regulation of Chromatin by Histone Modifications. *Cell Res* **2011**, *21* (3), 381–395. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.22>.
- (7) Falkenberg, K. J.; Johnstone, R. W. Histone Deacetylases and Their Inhibitors in Cancer, Neurological Diseases and Immune Disorders. *Nat Rev Drug Discov* **2014**, *13* (9), 673–691. <https://doi.org/10.1038/nrd4360>.
- (8) Andrews, F. H.; Strahl, B. D.; Kutateladze, T. G. Insights into Newly Discovered Marks and Readers of Epigenetic Information. *Nat Chem Biol* **2016**, *12* (9), 662–668. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2149>.
- (9) Park, S. Y.; Kim, J. S. A Short Guide to Histone Deacetylases Including Recent Progress on Class II Enzymes. *Exp Mol Med* **2020**, *52* (2), 204–212. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0382-4>.
- (10) Ho, T. C. S.; Chan, A. H. Y.; Ganesan, A. Thirty Years of HDAC Inhibitors: 2020 Insight and Hindsight. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2020. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00830>.
- (11) Vanaja, G. R.; Ramulu, H. G.; Kalle, A. M. Overexpressed HDAC8 in Cervical Cancer Cells Shows Functional Redundancy of Tubulin Deacetylation with HDAC6. *Cell*

## 6. Literaturverzeichnis

- Communication and Signaling* **2018**, *16* (1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12964-018-0231-4>.
- (12) Yang, X. J.; Seto, E. The Rpd3/Hda1 Family of Lysine Deacetylases: From Bacteria and Yeast to Mice and Men. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2008**, *9* (3), 206–218. <https://doi.org/10.1038/nrm2346>.
- (13) Wan, M. S. M.; Muhammad, R.; Koliopoulos, M. G.; Roumeliotis, T. I.; Choudhary, J. S.; Alfieri, C. Mechanism of Assembly, Activation and Lysine Selection by the SIN3B Histone Deacetylase Complex. *Nat Commun* **2023**, *14* (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38276-0>.
- (14) Luo, Y.; Jian, W.; Stavreva, D.; Fu, X.; Hager, G.; Bungert, J.; Huang, S.; Qiu, Y. Trans-Regulation of Histone Deacetylase Activities through Acetylation. *Journal of Biological Chemistry* **2009**, *284* (50), 34901–34910. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.038356>.
- (15) Moser, M. A.; Hagelkruys, A.; Seiser, C. Transcription and beyond: The Role of Mammalian Class I Lysine Deacetylases. *Chromosoma* **2014**, *123* (1–2), 67–78. <https://doi.org/10.1007/s00412-013-0441-x>.
- (16) Lopez, J. E.; Haynes, S. E.; Majmudar, J. D.; Martin, B. R.; Fierke, C. A. HDAC8 Substrates Identified by Genetically Encoded Active Site Photocrosslinking. *J Am Chem Soc* **2017**, *139* (45), 16222–16227. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b07603>.
- (17) Olson, D. E.; Udeshi, N. D.; Wolfson, N. A.; Pitcairn, C. A.; Sullivan, E. D.; Jaffe, J. D.; Svinkina, T.; Natoli, T.; Lu, X.; Paulk, J.; McCarren, P.; Wagner, F. F.; Barker, D.; Howe, E.; Lazzaro, F.; Gale, J. P.; Zhang, Y. L.; Subramanian, A.; Fierke, C. A.; Carr, S. A.; Holson, E. B. An Unbiased Approach to Identify Endogenous Substrates of “Histone” Deacetylase 8. *ACS Chem Biol* **2014**, *9* (10), 2210–2216. <https://doi.org/10.1021/cb500492r>.
- (18) Aramsangtienchai, P.; Spiegelman, N. A.; He, B.; Miller, S. P.; Dai, L.; Zhao, Y.; Lin, H. HDAC8 Catalyzes the Hydrolysis of Long Chain Fatty Acyl Lysine. *ACS Chem Biol* **2016**, *11* (10), 2685–2692. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b00396>.
- (19) Bertos, N. R.; Gilquin, B.; Chan, G. K. T.; Yen, T. J.; Khochbin, S.; Yang, X. J. Role of the Tetradecapeptide Repeat Domain of Human Histone Deacetylase 6 in Cytoplasmic Retention. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279* (46), 48246–48254. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408583200>.
- (20) Tong, J. J.; Liu, J.; Bertos, N. R.; Yang, X. J. Identification of HDAC10, a Novel Class II Human Histone Deacetylase Containing a Leucine-Rich Domain. *Nucleic Acids Res* **2002**, *30* (5), 1114–1123. <https://doi.org/10.1093/nar/30.5.1114>.

## 6. Literaturverzeichnis

- (21) Li, T.; Zhang, C.; Hassan, S.; Liu, X.; Song, F.; Chen, K.; Zhang, W.; Yang, J. Histone Deacetylase 6 in Cancer. *J Hematol Oncol* **2018**, *11* (1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0654-9>.
- (22) Hai, Y.; Shinsky, S. A.; Porter, N. J.; Christianson, D. W. Histone Deacetylase 10 Structure and Molecular Function as a Polyamine Deacetylase. *Nat Commun* **2017**, *8* (May), 1–9. <https://doi.org/10.1038/ncomms15368>.
- (23) Chang, H. C.; Guarente, L. SIRT1 and Other Sirtuins in Metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **2014**, *25* (3), 138–145. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2013.12.001>.
- (24) Gao, L.; Cueto, M. A.; Asselbergs, F.; Atadja, P. Cloning and Functional Characterization of HDAC11, a Novel Member of the Human Histone Deacetylase Family. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277* (28), 25748–25755. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111871200>.
- (25) Kutil, Z.; Novakova, Z.; Meleshin, M.; Mikesova, J.; Schutkowski, M.; Barinka, C. Histone Deacetylase 11 Is a Fatty-Acid Deacylase. *ACS Chem Biol* **2018**, *13* (3), 685–693. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00942>.
- (26) Fischer, F.; Alves Avelar, L. A.; Murray, L.; Kurz, T. Designing HDAC-PROTACs: Lessons Learned so Far. *Future Med Chem* **2022**, *14* (3), 143–166. <https://doi.org/10.4155/fmc-2021-0206>.
- (27) Li, G.; Tian, Y.; Zhu, W. G. The Roles of Histone Deacetylases and Their Inhibitors in Cancer Therapy. *Front Cell Dev Biol* **2020**, *8* (September), 1–34. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.576946>.
- (28) Feldman, J. L.; Dittenhafer-Reed, K. E.; Denu, J. M. Sirtuin Catalysis and Regulation. *Journal of Biological Chemistry* **2012**, *287* (51), 42419–42427. <https://doi.org/10.1074/jbc.R112.378877>.
- (29) Lombardi, P. M.; Cole, K. E.; Dowling, D. P.; Christianson, D. W. Structure, Mechanism, and Inhibition of Histone Deacetylases and Related Metalloenzymes. *Curr Opin Struct Biol* **2011**, *21* (6), 735–743. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2011.08.004>.
- (30) Milazzo, G.; Mercatelli, D.; Di Muzio, G.; Triboli, L.; De Rosa, P.; Perini, G.; Giorgi, F. M. Histone Deacetylases (HDACs): Evolution, Specificity, Role in Transcriptional Complexes, and Pharmacological Actionability. *Genes (Basel)* **2020**, *11* (5). <https://doi.org/10.3390/genes11050556>.

## 6. Literaturverzeichnis

- (31) Somoza, J. R.; Skene, R. J.; Katz, B. A.; Mol, C.; Ho, J. D.; Jennings, A. J.; Luong, C.; Arvai, A.; Buggy, J. J.; Chi, E.; Tang, J.; Sang, B. C.; Verner, E.; Wynands, R.; Leahy, E. M.; Dougan, D. R.; Snell, G.; Navre, M.; Knuth, M. W.; Swanson, R. V.; McRee, D. E.; Tari, L. W. Structural Snapshots of Human HDAC8 Provide Insights into the Class I Histone Deacetylases. *Structure* **2004**, *12* (7), 1325–1334. <https://doi.org/10.1016/j.str.2004.04.012>.
- (32) Gantt, S. M. L.; Decroos, C.; Lee, M. S.; Gullett, L. E.; Bowman, C. M.; Christianson, D. W.; Fierke, C. A. General Base-General Acid Catalysis in Human Histone Deacetylase 8. *Biochemistry* **2016**, *55* (5), 820–832. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b01327>.
- (33) Timp, W.; Feinberg, A. P. Cancer as a Dysregulated Epigenome Allowing Cellular Growth Advantage at the Expense of the Host. *Nat Rev Cancer* **2013**, *13* (7), 497–510. <https://doi.org/10.1038/nrc3486>.
- (34) Gopi, L. K.; Kidder, B. L. Integrative Pan Cancer Analysis Reveals Epigenomic Variation in Cancer Type and Cell Specific Chromatin Domains. *Nat Commun* **2021**, *12* (1), 1–20. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21707-1>.
- (35) Li, Y.; Seto, E. HDACs and HDAC Inhibitors in Cancer Development and Therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2016**, *6* (10), 1–34. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026831>.
- (36) Moreno, D. A.; Scrideli, C. A.; Cortez, M. A. A.; De Paula Queiroz, R.; Valera, E. T.; Da Silva Silveira, V.; Yunes, J. A.; Brandalise, S. R.; Tone, L. G. Differential Expression of HDAC3, HDAC7 and HDAC9 Is Associated with Prognosis and Survival in Childhood Acute Lymphoblastic Leukaemia: Research Paper. *Br J Haematol* **2010**, *150* (6), 665–673. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2010.08301.x>.
- (37) Chaiyawat, P.; Pruksakorn, D.; Phanphaisarn, A.; Teeyakasem, P.; Klangjorhor, J.; Settakorn, J. Expression Patterns of Class i Histone Deacetylases in Osteosarcoma: A Novel Prognostic Marker with Potential Therapeutic Implications. *Modern Pathology* **2018**, *31* (2), 264–274. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2017.125>.
- (38) Piekarz, R. L.; Frye, R.; Prince, H. M.; Kirschbaum, M. H.; Zain, J.; Allen, S. L.; Jaffe, E. S.; Ling, A.; Turner, M.; Peer, C. J.; Figg, W. D.; Steinberg, S. M.; Smith, S.; Joske, D.; Lewis, I.; Hutchins, L.; Craig, M.; Fojo, A. T.; Wright, J. J.; Bates, S. E. Phase 2 Trial of Romidepsin in Patients with Peripheral T-Cell Lymphoma. *Blood* **2011**, *117* (22), 5827–5834. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-10-312603>.
- (39) Dovey, O. M.; Foster, C. T.; Conte, N.; Edwards, S. A.; Edwards, J. M.; Singh, R.; Vassiliou, G.; Bradley, A.; Cowley, S. M. Histone Deacetylase 1 and 2 Are Essential for

## 6. Literaturverzeichnis

- Normal T-Cell Development and Genomic Stability in Mice. *Blood* **2013**, *121* (8), 1335–1344. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-07-441949>.
- (40) Heideman, M. R.; Wilting, R. H.; Yanover, E.; Velds, A.; De Jong, J.; Kerkhoven, R. M.; Jacobs, H.; Wessels, L. F.; Dannenberg, J. H. Dosage-Dependent Tumor Suppression by Histone Deacetylases 1 and 2 through Regulation of c-Myc Collaborating Genes and P53 Function. *Blood* **2013**, *121* (11), 2038–2050. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-08-450916>.
- (41) Santoro, F.; Botrugno, O. A.; Dal Zuffo, R.; Pallavicini, I.; Matthews, G. M.; Cluse, L.; Barozzi, I.; Senese, S.; Fornasari, L.; Moretti, S.; Altucci, L.; Pelicci, P. G.; Chiocca, S.; Johnstone, R. W.; Minucci, S. A Dual Role for Hdac1: Oncosuppressor in Tumorigenesis, Oncogene in Tumor Maintenance. *Blood* **2013**, *121* (17), 3459–3468. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-10-461988>.
- (42) Licht, J. D. AML1 and the AML1-ETO Fusion Protein in the Pathogenesis of t(8;21) AML. *Oncogene* **2001**, *20* (40 REV. ISS. 4), 5660–5679. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204593>.
- (43) West, A. C.; Johnstone, R. W. New and Emerging HDAC Inhibitors for Cancer Treatment. *Journal of Clinical Investigation* **2014**, *124* (1), 30–39. <https://doi.org/10.1172/JCI69738>.
- (44) Zeng, H.; Qu, J.; Jin, N.; Xu, J.; Lin, C.; Chen, Y.; Yang, X.; He, X.; Tang, S.; Lan, X.; Yang, X.; Chen, Z.; Huang, M.; Ding, J.; Geng, M. Feedback Activation of Leukemia Inhibitory Factor Receptor Limits Response to Histone Deacetylase Inhibitors in Breast Cancer. *Cancer Cell* **2016**, *30* (3), 459–473. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.08.001>.
- (45) Mann, B. S.; Johnson, J. R.; Cohen, M. H.; Justice, R.; Pazdur, R. FDA Approval Summary: Vorinostat for Treatment of Advanced Primary Cutaneous T-Cell Lymphoma. *Oncologist* **2007**, *12* (10), 1247–1252. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.12-10-1247>.
- (46) Lee, H. Z.; Kwitkowski, V. E.; Del Valle, P. L.; Ricci, M. S.; Saber, H.; Habtemariam, B. A.; Bullock, J.; Bloomquist, E.; Shen, Y. L.; Chen, X. H.; Brown, J.; Mehrotra, N.; Dorff, S.; Charlab, R.; Kane, R. C.; Kaminskis, E.; Justice, R.; Farrell, A. T.; Pazdur, R. FDA Approval: Belinostat for the Treatment of Patients with Relapsed or Refractory Peripheral T-Cell Lymphoma. *Clinical Cancer Research* **2015**, *21* (12), 2666–2670. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-3119>.



## 6. Literaturverzeichnis

- (47) Lu, X.; Ning, Z.; Li, Z.; Cao, H.; Wang, X. Development of Chidamide for Peripheral T-Cell Lymphoma, the First Orphan Drug Approved in China. *Intractable Rare Dis Res* **2016**, *5* (3), 185–191. <https://doi.org/10.5582/irdr.2016.01024>.
- (48) Yoon, S.; Eom, G. H. HDAC and HDAC Inhibitor: From Cancer to Cardiovascular Diseases. *Chonnam Med J* **2016**, *52* (1), 1. <https://doi.org/10.4068/cmj.2016.52.1.1>.
- (49) Khan, N.; Jeffers, M.; Kumar, S.; Hackett, C.; Boldog, F.; Khramtsov, N.; Qian, X.; Mills, E.; Berghs, S. C.; Carey, N.; Finn, P. W.; Collins, L. S.; Tumber, A.; Ritchie, J. W.; Jensen, P. B.; Lichenstein, H. S.; Sehested, M. Determination of the Class and Isoform Selectivity of Small-Molecule Histone Deacetylase Inhibitors. *Biochemical Journal* **2008**, *409* (2), 581–589. <https://doi.org/10.1042/BJ20070779>.
- (50) Lahm, A.; Paolini, C.; Pallaoro, M.; Nardi, M. C.; Jones, P.; Neddermann, P.; Sambucini, S.; Bottomley, M. J.; Lo Surdo, P.; Carfí, A.; Koch, U.; De Francesco, R.; Steinkühler, C.; Gallinari, P. Unraveling the Hidden Catalytic Activity of Vertebrate Class IIa Histone Deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, *104* (44), 17335–17340. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706487104>.
- (51) Bradner, J. E.; West, N.; Grachan, M. L.; Greenberg, E. F.; Haggarty, S. J.; Warnow, T.; Mazitschek, R. Chemical Phylogenetics of Histone Deacetylases. *Nat Chem Biol* **2010**, *6* (3), 238–243. <https://doi.org/10.1038/nchembio.313>.
- (52) Lechner, S.; Malgapo, M. I. P.; Grätz, C.; Steimbach, R. R.; Baron, A.; Rütther, P.; Nadal, S.; Stumpf, C.; Loos, C.; Ku, X.; Prokofeva, P.; Lautenbacher, L.; Heimbürg, T.; Würf, V.; Meng, C.; Wilhelm, M.; Sippl, W.; Kleigrew, K.; Pauling, J. K.; Kramer, K.; Miller, A. K.; Pfaffl, M. W.; Linder, M. E.; Kuster, B.; Médard, G. Target Deconvolution of HDAC Pharmacopoeia Reveals MBLAC2 as Common Off-Target. *Nat Chem Biol* **2022**, *18* (8), 812–820. <https://doi.org/10.1038/s41589-022-01015-5>.
- (53) Zhang, L.; Zhang, J.; Jiang, Q.; Zhang, L.; Song, W. Zinc Binding Groups for Histone Deacetylase Inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem* **2018**, *33* (1), 714–721. <https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1417274>.
- (54) Wang, Y.; Stowe, R. L.; Pinello, C. E.; Tian, G.; Madoux, F.; Li, D.; Zhao, L. Y.; Li, J. L.; Wang, Y.; Wang, Y.; Ma, H.; Hodder, P.; Roush, W. R.; Liao, D. Identification of Histone Deacetylase Inhibitors with Benzoylhydrazide Scaffold That Selectively Inhibit Class I Histone Deacetylases. *Chem Biol* **2015**, *22* (2), 273–284. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2014.12.015>.
- (55) Yue, K.; Qin, M.; Huang, C.; James Chou, C.; Jiang, Y.; Li, X. Comparison of Three Zinc Binding Groups for HDAC Inhibitors – A Potency, Selectivity and Enzymatic Kinetics

## 6. Literaturverzeichnis

- Study. *Bioorg Med Chem Lett* **2022**, *70* (March), 128797. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2022.128797>.
- (56) Wagner, F. F.; Lundh, M.; Kaya, T.; McCarren, P.; Zhang, Y. L.; Chattopadhyay, S.; Gale, J. P.; Galbo, T.; Fisher, S. L.; Meier, B. C.; Vetere, A.; Richardson, S.; Morgan, N. G.; Christensen, D. P.; Gilbert, T. J.; Hooker, J. M.; Leroy, M.; Walpita, D.; Mandrup-Poulsen, T.; Wagner, B. K.; Holson, E. B. An Isochemogenic Set of Inhibitors to Define the Therapeutic Potential of Histone Deacetylases in  $\beta$ -Cell Protection. *ACS Chem Biol* **2016**, *11* (2), 363–374. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.5b00640>.
- (57) Fuller, N. O.; Pirone, A.; Lynch, B. A.; Hewitt, M. C.; Quinton, M. S.; Mckee, T. D.; Ivarsson, M. CoREST Complex-Selective Histone Deacetylase Inhibitors Show Prosynaptic Effects and an Improved Safety Profile To Enable Treatment of Synaptopathies. **2019**. <https://doi.org/10.1021/acscemneuro.8b00620>.
- (58) Lobera, M.; Madauss, K. P.; Pohlhaus, D. T.; Wright, Q. G.; Trocha, M.; Schmidt, D. R.; Baloglu, E.; Trump, R. P.; Head, M. S.; Hofmann, G. A.; Murray-Thompson, M.; Schwartz, B.; Chakravorty, S.; Wu, Z.; Mander, P. K.; Kruidenier, L.; Reid, R. A.; Burkhart, W.; Turunen, B. J.; Rong, J. X.; Wagner, C.; Moyer, M. B.; Wells, C.; Hong, X.; Moore, J. T.; Williams, J. D.; Soler, D.; Ghosh, S.; Nolan, M. A. Selective Class IIa Histone Deacetylase Inhibition via a Nonchelating Zinc-Binding Group. *Nat Chem Biol* **2013**, *9* (5), 319–325. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1223>.
- (59) Becher, I.; Dittmann, A.; Savitski, M. M.; Hopf, C.; Drewes, G.; Bantscheff, M. Chemoproteomics Reveals Time-Dependent Binding of Histone Deacetylase Inhibitors to Endogenous Repressor Complexes. *ACS Chem Biol* **2014**, *9* (8), 1736–1746. <https://doi.org/10.1021/cb500235n>.
- (60) Lauffer, B. E. L.; Mintzer, R.; Fong, R.; Mukund, S.; Tam, C.; Zilberleyb, I.; Flicke, B.; Ritscher, A.; Fedorowicz, G.; Vallerio, R.; Ortwine, D. F.; Gunzner, J.; Modrusan, Z.; Neumann, L.; Koth, C. M.; Kaminker, J. S.; Heise, C. E.; Steiner, P. Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitor Kinetic Rate Constants Correlate with Cellular Histone Acetylation but Not Transcription and Cell Viability. *Journal of Biological Chemistry* **2013**, *288* (37), 26926–26943. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.490706>.
- (61) Moreno-Yruela, C.; Fass, D. M.; Cheng, C.; Herz, J.; Olsen, C. A.; Haggarty, S. J. Kinetic Tuning of HDAC Inhibitors Affords Potent Inducers of Progranulin Expression. *ACS Chem Neurosci* **2019**, *10* (8), 3769–3777. <https://doi.org/10.1021/acscemneuro.9b00281>.

## 6. Literaturverzeichnis

- (62) Yue, K.; Qin, M.; Huang, C.; James Chou, C.; Jiang, Y.; Li, X. Comparison of Three Zinc Binding Groups for HDAC Inhibitors – A Potency, Selectivity and Enzymatic Kinetics Study. *Bioorg Med Chem Lett* **2022**, *70*. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2022.128797>.
- (63) Payne, N. C.; Mazitschek, R. Resolving the Deceptive Isoform and Complex Selectivity of HDAC1/2 Inhibitors. *Cell Chem Biol* **2022**, *29* (7), 1140-1152.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2022.03.002>.
- (64) Beshore, D. C.; Adam, G. C.; Barnard, R. J. O.; Burlein, C.; Gallicchio, S. N.; Holloway, M. K.; Krosky, D.; Lemaire, W.; Myers, R. W.; Patel, S.; Plotkin, M. A.; Powell, D. A.; Rada, V.; Cox, C. D.; Coleman, P. J.; Klein, D. J.; Wolkenberg, S. E. Redefining the Histone Deacetylase Inhibitor Pharmacophore: High Potency with No Zinc Cofactor Interaction. *ACS Med Chem Lett* **2021**, *12* (4), 540–547. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.1c00074>.
- (65) Alves Avelar, L. A.; Schrenk, C.; Sönnichsen, M.; Hamacher, A.; Hansen, F. K.; Schliehe-Diecks, J.; Borkhardt, A.; Bhatia, S.; Kassack, M. U.; Kurz, T. Synergistic Induction of Apoptosis in Resistant Head and Neck Carcinoma and Leukemia by Alkoxyamide-Based Histone Deacetylase Inhibitors. *Eur J Med Chem* **2021**, *211*. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.113095>.
- (66) Stenzel, K.; Hamacher, A.; Hansen, F. K.; Gertzen, C. G. W.; Senger, J.; Marquardt, V.; Marek, L.; Marek, M.; Romier, C.; Remke, M.; Jung, M.; Gohlke, H.; Kassack, M. U.; Kurz, T. Alkoxyurea-Based Histone Deacetylase Inhibitors Increase Cisplatin Potency in Chemoresistant Cancer Cell Lines. *J Med Chem* **2017**, *60* (13), 5334–5348. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01538>.
- (67) Vickers, C. J.; Olsen, C. A.; Leman, L. J.; Ghadiri, M. R. Discovery of HDAC Inhibitors That Lack an Active Site Zn<sup>2+</sup>-Binding Functional Group. *ACS Med Chem Lett* **2012**, *3* (6), 505–508. <https://doi.org/10.1021/ml300081u>.
- (68) Melesina, J.; Simoben, C. V.; Praetorius, L.; Bülbül, E. F.; Robaa, D.; Sippl, W. Strategies To Design Selective Histone Deacetylase Inhibitors. *ChemMedChem* **2021**, *16* (9), 1336–1359. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202000934>.
- (69) Zhang, X. H.; Qin-Ma; Wu, H. P.; Khamis, M. Y.; Li, Y. H.; Ma, L. Y.; Liu, H. M. A Review of Progress in Histone Deacetylase 6 Inhibitors Research: Structural Specificity and Functional Diversity. *J Med Chem* **2021**, *64* (3), 1362–1391. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01782>.

## 6. Literaturverzeichnis

- (70) Melesina, J.; Praetorius, L.; Simoben, C. V.; Robaa, D.; Sippl, W. Design of Selective Histone Deacetylase Inhibitors: Rethinking Classical Pharmacophore. *Future Med Chem* **2018**, *10* (13), 1537–1540. <https://doi.org/10.4155/fmc-2018-0125>.
- (71) Balasubramanian, S.; Ramos, J.; Luo, W.; Sirisawad, M.; Verner, E.; Buggy, J. J. A Novel Histone Deacetylase 8 (HDAC8)-Specific Inhibitor PCI-34051 Induces Apoptosis in T-Cell Lymphomas. *Leukemia* **2008**, *22* (5), 1026–1034. <https://doi.org/10.1038/leu.2008.9>.
- (72) Géraldy, M.; Morgen, M.; Sehr, P.; Steimbach, R. R.; Moi, D.; Ridinger, J.; Oehme, I.; Witt, O.; Malz, M.; Nogueira, M. S.; Koch, O.; Gunkel, N.; Miller, A. K. Selective Inhibition of Histone Deacetylase 10: Hydrogen Bonding to the Gatekeeper Residue Is Implicated. *J Med Chem* **2019**, *62* (9), 4426–4443. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01936>.
- (73) Herbst-Gervasoni, C. J.; Christianson, D. W. Binding of N8-Acetylspermidine Analogues to Histone Deacetylase 10 Reveals Molecular Strategies for Blocking Polyamine Deacetylation. *Biochemistry* **2019**, *58* (49), 4957–4969. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00906>.
- (74) Hontecillas-Prieto, L.; Flores-Campos, R.; Silver, A.; de Álava, E.; Hajji, N.; García-Domínguez, D. J. Synergistic Enhancement of Cancer Therapy Using HDAC Inhibitors: Opportunity for Clinical Trials. *Front Genet* **2020**, *11* (September). <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.578011>.
- (75) Bug, G.; Burchert, A.; Wagner, E. M.; Kröger, N.; Berg, T.; Güller, S.; Metzelder, S. K.; Wolf, A.; Hünecke, S.; Bader, P.; Schetelig, J.; Serve, H.; Ottmann, O. G. Phase I/II Study of the Deacetylase Inhibitor Panobinostat after Allogeneic Stem Cell Transplantation in Patients with High-Risk MDS or AML (PANOBEST Trial). *Leukemia* **2017**, *31* (11), 2523–2525. <https://doi.org/10.1038/leu.2017.242>.
- (76) Park, H.; Garrido-Laguna, I.; Naing, A.; Fu, S.; Falchook, G. S.; Piha-Paul, S. A.; Wheler, J. J.; Hong, D. S.; Tsimberidou, A. M.; Subbiah, V.; Zinner, R. G.; Kaseb, A. O.; Patel, S.; Fanale, M. A.; Velez-Bravo, V. M.; Meric-Bernstam, F.; Kurzrock, R.; Janku, F. Phase I Dose-Escalation Study of the MTOR Inhibitor Sirolimus and the HDAC Inhibitor Vorinostat in Patients with Advanced Malignancy. *Oncotarget* **2016**, *7* (41), 67521–67531. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11750>.
- (77) Mithraprabhu, S.; Khong, T.; Jones, S. S.; Spencer, A. Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitors as Single Agents Induce Multiple Myeloma Cell Death Principally through the Inhibition of Class I HDAC. *Br J Haematol* **2013**, *162* (4), 559–562. <https://doi.org/10.1111/bjh.12388>.

## 6. Literaturverzeichnis

- (78) Stubbs, M. C.; Kim, W.; Bariteau, M.; Davis, T.; Vempati, S.; Minehart, J.; Witkin, M.; Qi, J.; Krivtsov, A. V.; Bradner, J. E.; Kung, A. L.; Armstrong, S. A. Selective Inhibition of HDAC1 and HDAC2 as a Potential Therapeutic Option for B-ALL. *Clinical Cancer Research* **2015**, *21* (10), 2348–2358. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1290>.
- (79) Schäker-Hübner, L.; Haschemi, R.; Büch, T.; Kraft, F. B.; Brumme, B.; Schöler, A.; Jenke, R.; Meiler, J.; Aigner, A.; Bendas, G.; Hansen, F. K. Balancing Histone Deacetylase (HDAC) Inhibition and Drug-Likeness: Biological and Physicochemical Evaluation of Class I Selective HDAC Inhibitors. *ChemMedChem* **2022**, *17* (9). <https://doi.org/10.1002/cmdc.202100755>.
- (80) Cyrenne, B. M.; Lewis, J. M.; Weed, J. G.; Carlson, K. R.; Mirza, F. N.; Foss, F. M.; Girardi, M. Synergy of BCL2 and Histone Deacetylase Inhibition against Leukemic Cells from Cutaneous T-Cell Lymphoma Patients. *Blood* **2017**, *130* (19), 2073–2083. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-06-792150>.
- (81) Bergman, J. A.; Woan, K.; Perez-Villarroel, P.; Villagra, A.; Sotomayor, E. M.; Kozikowski, A. P. Selective Histone Deacetylase 6 Inhibitors Bearing Substituted Urea Linkers Inhibit Melanoma Cell Growth. *J Med Chem* **2012**, *55* (22), 9891–9899. <https://doi.org/10.1021/jm301098e>.
- (82) Nawar, N.; Bukhari, S.; Adile, A. A.; Suk, Y.; Manaswiyoungkul, P.; Toutah, K.; Olaoye, O. O.; Raouf, Y. S.; Sedighi, A.; Garcha, H. K.; Hassan, M. M.; Gwynne, W.; Israelian, J.; Radu, T. B.; Geletu, M.; Abdeldayem, A.; Gawel, J. M.; Cabral, A. D.; Venugopal, C.; De Araujo, E. D.; Singh, S. K.; Gunning, P. T. Discovery of HDAC6-Selective Inhibitor NN-390 with in Vitro Efficacy in Group 3 Medulloblastoma. *J Med Chem* **2022**, *65* (4), 3193–3217. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c01585>.
- (83) Vogl, D. T.; Raje, N.; Jagannath, S.; Richardson, P.; Hari, P.; Orlowski, R.; Supko, J. G.; Tamang, D.; Yang, M.; Jones, S. S.; Wheeler, C.; Markelewicz, R. J.; Lonial, S. Ricolinostat, the First Selective Histone Deacetylase 6 Inhibitor, in Combination with Bortezomib and Dexamethasone for Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *Clinical Cancer Research* **2017**, *23* (13), 3307–3315. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-2526>.
- (84) Zeleke, T. Z.; Pan, Q.; Chiuzan, C.; Onishi, M.; Li, Y.; Tan, H.; Alvarez, M. J.; Honan, E.; Yang, M.; Chia, P. L.; Mukhopadhyay, P.; Kelly, S.; Wu, R.; Fenn, K.; Trivedi, M. S.; Accordino, M.; Crew, K. D.; Hershman, D. L.; Maurer, M.; Jones, S.; High, A.; Peng, J.; Califano, A.; Kalinsky, K.; Yu, J.; Silva, J. Network-Based Assessment of HDAC6 Activity Predicts Preclinical and Clinical Responses to the HDAC6 Inhibitor Ricolinostat

## 6. Literaturverzeichnis

- in Breast Cancer. *Nat Cancer* **2023**, *4* (2), 257–275. <https://doi.org/10.1038/s43018-022-00489-5>.
- (85) Asfaha, Y.; Schrenk, C.; Alves Avelar, L. A.; Lange, F.; Wang, C.; Bandolik, J. J.; Hamacher, A.; Kassack, M. U.; Kurz, T. Novel Alkoxyamide-Based Histone Deacetylase Inhibitors Reverse Cisplatin Resistance in Chemoresistant Cancer Cells. *Bioorg Med Chem* **2020**, *28* (1), 115108. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.115108>.
- (86) Alves Avelar, L. A.; Held, J.; Engel, J. A.; Sureechatchaiyan, P.; Hansen, F. K.; Hamacher, A.; Kassack, M. U.; Mordmüller, B.; Andrews, K. T.; Kurz, T. Design and Synthesis of Novel Anti-Plasmodial Histone Deacetylase Inhibitors Containing an Alkoxyamide Connecting Unit. *Arch Pharm (Weinheim)* **2017**, *350* (3–4), 1–11. <https://doi.org/10.1002/ardp.201600347>.
- (87) Hook, S. S.; Orian, A.; Cowley, S. M.; Eisenman, R. N. Histone Deacetylase 6 Binds Polyubiquitin through Its Zinc Finger (PAZ Domain) and Copurifies with Deubiquitinating Enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, *99* (21), 13425–13430. <https://doi.org/10.1073/pnas.172511699>.
- (88) Harding, R. J.; Franzoni, I.; Mann, M. K.; Szewczyk, M. M.; Mirabi, B.; Ferreira de Freitas, R.; Owens, D. D. G.; Ackloo, S.; Scheremetjew, A.; Juarez-Ornelas, K. A.; Sanichar, R.; Baker, R. J.; Dank, C.; Brown, P. J.; Barsyte-Lovejoy, D.; Santhakumar, V.; Schapira, M.; Lautens, M.; Arrowsmith, C. H. Discovery and Characterization of a Chemical Probe Targeting the Zinc-Finger Ubiquitin-Binding Domain of HDAC6. *J Med Chem* **2023**, *66* (15), 10273–10288. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.3c00314>.
- (89) Xiong, Y.; Donovan, K. A.; Eleuteri, N. A.; Kirmani, N.; Yue, H.; Razov, A.; Krupnick, N. M.; Nowak, R. P.; Fischer, E. S. Chemo-Proteomics Exploration of HDAC Degradability by Small Molecule Degradors. *Cell Chem Biol* **2021**, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2021.07.002>.
- (90) Schneekloth, A. R.; Pucheault, M.; Tae, H. S.; Crews, C. M. Targeted Intracellular Protein Degradation Induced by a Small Molecule: En Route to Chemical Proteomics. *Bioorg Med Chem Lett* **2008**, *18* (22), 5904–5908. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.07.114>.
- (91) Chirnomas, D.; Hornberger, K. R.; Crews, C. M. Protein Degraders Enter the Clinic — a New Approach to Cancer Therapy. *Nat Rev Clin Oncol* **2023**, *20* (4), 265–278. <https://doi.org/10.1038/s41571-023-00736-3>.
- (92) Bondeson, D. P.; Smith, B. E.; Burslem, G. M.; Buhimschi, A. D.; Hines, J.; Jaime-Figueroa, S.; Wang, J.; Hamman, B. D.; Ishchenko, A.; Crews, C. M. Lessons in



## 6. Literaturverzeichnis

- PROTAC Design from Selective Degradation with a Promiscuous Warhead. *Cell Chem Biol* **2018**, *25* (1), 78-87.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.09.010>.
- (93) Huang, H. T.; Dobrovolsky, D.; Paulk, J.; Yang, G.; Weisberg, E. L.; Doctor, Z. M.; Buckley, D. L.; Cho, J. H.; Ko, E.; Jang, J.; Shi, K.; Choi, H. G.; Griffin, J. D.; Li, Y.; Treon, S. P.; Fischer, E. S.; Bradner, J. E.; Tan, L.; Gray, N. S. A Chemoproteomic Approach to Query the Degradable Kinome Using a Multi-Kinase Degradator. *Cell Chem Biol* **2018**, *25* (1), 88-99.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.10.005>.
- (94) Xiong, Y.; Zhong, Y.; Yim, H.; Yang, X.; Park, K. S.; Xie, L.; Poulikakos, P. I.; Han, X.; Xiong, Y.; Chen, X.; Liu, J.; Jin, J. Bridged Proteolysis Targeting Chimera (PROTAC) Enables Degradation of Undruggable Targets. *J Am Chem Soc* **2022**, *144* (49), 22622–22632. <https://doi.org/10.1021/jacs.2c09255>.
- (95) Li, X.; Zhang, Z.; Gao, F.; Ma, Y.; Wei, D.; Lu, Z.; Chen, S.; Wang, M.; Wang, Y.; Xu, K.; Wang, R.; Xu, F.; Chen, J. Y.; Zhu, C.; Li, Z.; Yu, H.; Guan, X. C-Myc-Targeting PROTAC Based on a TNA-DNA Bivalent Binder for Combination Therapy of Triple-Negative Breast Cancer. *J Am Chem Soc* **2023**, *145* (16), 9334–9342. <https://doi.org/10.1021/jacs.3c02619>.
- (96) Bondeson, D. P.; Mares, A.; Smith, I. E. D.; Ko, E.; Campos, S.; Miah, A. H.; Mulholland, K. E.; Routly, N.; Buckley, D. L.; Gustafson, J. L.; Zinn, N.; Grandi, P.; Shimamura, S.; Bergamini, G.; Faelth-Savitski, M.; Bantscheff, M.; Cox, C.; Gordon, D. A.; Willard, R. R.; Flanagan, J. J.; Casillas, L. N.; Votta, B. J.; Den Besten, W.; Famm, K.; Kruidenier, L.; Carter, P. S.; Harling, J. D.; Churcher, I.; Crews, C. M. Catalytic in Vivo Protein Knockdown by Small-Molecule PROTACs. *Nat Chem Biol* **2015**, *11* (8), 611–617. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1858>.
- (97) Liu, X.; Ciulli, A. Proximity-Based Modalities for Biology and Medicine. *ACS Cent Sci* **2023**, *9* (7), 1269–1284. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.3c00395>.
- (98) Ciechanover, A. Reprint of “A Heat-Stable Polypeptide Component of an ATP-Dependent Proteolytic System from Reticulocytes.” *Biochem Biophys Res Commun* **2012**, *425* (3), 565–570. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.08.025>.
- (99) Dikic, I.; Wakatsuki, S.; Walters, K. J. Ubiquitin-Binding Domains from Structures to Functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2009**, *10* (10), 659–671. <https://doi.org/10.1038/nrm2767>.
- (100) Hershko, A.; Ciechanover, A.; Heller, H.; Haas, A. L.; Rose, I. A. Proposed Role of ATP in Protein Breakdown: Conjugation of Protein with Multiple Chains of the Polypeptide of

## 6. Literaturverzeichnis

- ATP-Dependent Proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1980**, *77* (4), 1783–1786. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.4.1783>.
- (101) Hershko, A.; Heller, H.; Elias, S.; Ciechanover, A. Components of Ubiquitin-Protein Ligase System. Resolution, Affinity Purification, and Role in Protein Breakdown. *Journal of Biological Chemistry* **1983**, *258* (13), 8206–8214. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(20\)82050-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(20)82050-x).
- (102) Braten, O.; Livneh, I.; Ziv, T.; Admon, A.; Kehat, I.; Caspi, L. H.; Gonen, H.; Bercovich, B.; Godzik, A.; Jahandideh, S.; Jaroszewski, L.; Sommer, T.; Kwon, Y. T.; Guharoy, M.; Tompa, P.; Ciechanover, A. Numerous Proteins with Unique Characteristics Are Degraded by the 26S Proteasome Following Monoubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2016**, *113* (32), E4639–E4647. <https://doi.org/10.1073/pnas.1608644113>.
- (103) Pohl, C.; Dikic, I. Cellular Quality Control by the Ubiquitin-Proteasome System and Autophagy. *Science* (1979) **2019**, *366* (6467), 818–822. <https://doi.org/10.1126/science.aax3769>.
- (104) Hershko, A.; Rose, I. A. Ubiquitin-Aldehyde: A General Inhibitor of Ubiquitin-Recycling Processes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1987**, *84* (7), 1829–1833. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.7.1829>.
- (105) Patel, U.; Smalley, J. P.; Hodgkinson, J. T. PROTAC Chemical Probes for Histone Deacetylase Enzymes. *RSC Chem Biol* **2023**, 623–634. <https://doi.org/10.1039/d3cb00105a>.
- (106) Nowak, R. P.; Deangelo, S. L.; Buckley, D.; He, Z.; Donovan, K. A.; An, J.; Safaee, N.; Jedrychowski, M. P.; Ponthier, C. M.; Ishoey, M.; Zhang, T.; Mancias, J. D.; Gray, N. S.; Bradner, J. E.; Fischer, E. S. Plasticity in Binding Confers Selectivity in Ligand-Induced Protein Degradation Article. *Nat Chem Biol* **2018**, *14* (7), 706–714. <https://doi.org/10.1038/s41589-018-0055-y>.
- (107) Hook, S. S.; Orian, A.; Cowley, S. M.; Eisenman, R. N. Histone Deacetylase 6 Binds Polyubiquitin through Its Zinc Finger (PAZ Domain) and Copurifies with Deubiquitinating Enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, *99* (21), 13425–13430. <https://doi.org/10.1073/pnas.172511699>.
- (108) Millard, C. J.; Watson, P. J.; Fairall, L.; Schwabe, J. W. R. Targeting Class I Histone Deacetylases in a “Complex” Environment. *Trends Pharmacol Sci* **2017**, *38* (4), 363–377. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.12.006>.
- (109) Li, L.; Mi, D.; Pei, H.; Duan, Q.; Wang, X.; Zhou, W.; Jin, J.; Li, D.; Liu, M.; Chen, Y. In Vivo Target Protein Degradation Induced by PROTACs Based on E3 Ligase DCAF15.



## 6. Literaturverzeichnis

- Signal Transduct Target Ther* **2020**, *5* (1), 4–6. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00245-0>.
- (110) Zhang, X.; Crowley, V. M.; Wucherpennig, T. G.; Dix, M. M.; Cravatt, B. F. Electrophilic PROTACs That Degrade Nuclear Proteins by Engaging DCAF16. *Nat Chem Biol* **2019**, *15* (7), 737–746. <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0279-5>.
- (111) Shirasaki, R.; Matthews, G. M.; Gandolfi, S.; de Matos Simoes, R.; Buckley, D. L.; Raja Vora, J.; Sievers, Q. L.; Brüggenthies, J. B.; Dashevsky, O.; Poarch, H.; Tang, H.; Bariteau, M. A.; Sheffer, M.; Hu, Y.; Downey-Kopyscinski, S. L.; Hengeveld, P. J.; Glassner, B. J.; Dhimolea, E.; Ott, C. J.; Zhang, T.; Kwiatkowski, N. P.; Laubach, J. P.; Schlossman, R. L.; Richardson, P. G.; Culhane, A. C.; Groen, R. W. J.; Fischer, E. S.; Vazquez, F.; Tsherniak, A.; Hahn, W. C.; Levy, J.; Auclair, D.; Licht, J. D.; Keats, J. J.; Boise, L. H.; Ebert, B. L.; Bradner, J. E.; Gray, N. S.; Mitsiades, C. S. Functional Genomics Identify Distinct and Overlapping Genes Mediating Resistance to Different Classes of Heterobifunctional Degraders of Oncoproteins. *Cell Rep* **2021**, *34* (1). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108532>.
- (112) Zhang, L.; Riley-Gillis, B.; Vijay, P.; Shen, Y. Acquired Resistance to BET-ProTACS (Proteolysis-Targeting Chimeras) Caused by Genomic Alterations in Core Components of E3 Ligase Complexes. *Mol Cancer Ther* **2019**, *18* (7), 1302–1311. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-18-1129>.
- (113) Los, M.; Jansen, G. H.; Kaelin, W. G.; Lips, C. J.; Blijham, G. H.; Voest, E. E. Expression Pattern of the von Hippel-Lindau Protein in Human Tissues. *Lab Invest* **1996**, *75* (2), 231–238.
- (114) Lopez-Girona, A.; Mendy, D.; Ito, T.; Miller, K.; Gandhi, A. K.; Kang, J.; Karasawa, S.; Carmel, G.; Jackson, P.; Abbasian, M.; Mahmoudi, A.; Cathers, B.; Rychak, E.; Gaidarova, S.; Chen, R.; Schafer, P. H.; Handa, H.; Daniel, T. O.; Evans, J. F.; Chopra, R. Cereblon Is a Direct Protein Target for Immunomodulatory and Antiproliferative Activities of Lenalidomide and Pomalidomide. *Leukemia* **2012**, *26* (11), 2326–2335. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.119>.
- (115) Hughes, J. P.; Rees, S. S.; Kalindjian, S. B.; Philpott, K. L. Principles of Early Drug Discovery. *Br J Pharmacol* **2011**, *162* (6), 1239–1249. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01127.x>.
- (116) Yang, K.; Song, Y.; Xie, H.; Wu, H.; Wu, Y. T.; Leisten, E. D.; Tang, W. Development of the First Small Molecule Histone Deacetylase 6 (HDAC6) Degraders. *Bioorg Med Chem Lett* **2018**. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.05.057>.

## 6. Literaturverzeichnis

- (117) Wu, H.; Yang, K.; Zhang, Z.; Leisten, E. D.; Li, Z.; Xie, H.; Liu, J.; Smith, K. A.; Novakova, Z.; Barinka, C.; Tang, W. Development of Multifunctional Histone Deacetylase 6 Degraders with Potent Antimyeloma Activity. *J Med Chem* **2019**. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00516>.
- (118) Smalley, J. P.; Adams, G. E.; Millard, C. J.; Song, Y.; Norris, J. K. S.; Schwabe, J. W. R.; Cowley, S. M.; Hodgkinson, J. T. PROTAC-Mediated Degradation of Class i Histone Deacetylase Enzymes in Corepressor Complexes. *Chemical Communications* **2020**. <https://doi.org/10.1039/d0cc01485k>.
- (119) Békés, M.; Langlely, D. R.; Crews, C. M. PROTAC Targeted Protein Degraders: The Past Is Prologue. *Nat Rev Drug Discov* **2022**, *21* (3), 181–200. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00371-6>.
- (120) Yardley, D. A.; Ismail-Khan, R. R.; Melichar, B.; Lichinitser, M.; Munster, P. N.; Klein, P. M.; Cruickshank, S.; Miller, K. D.; Lee, M. J.; Trepel, J. B. Randomized Phase II, Double-Blind, Placebo-Controlled Study of Exemestane with or without Entinostat in Postmenopausal Women with Locally Recurrent or Metastatic Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer Progressing on Treatment with a Nonsteroidal Aromata. *Journal of Clinical Oncology* **2013**, *31* (17), 2128–2135. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.43.7251>.
- (121) Kaur, J.; Saxena, M.; Rishi, N. An Overview of Recent Advances in Biomedical Applications of Click Chemistry. *Bioconj Chem* **2021**, *32* (8), 1455–1471. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.1c00247>.
- (122) Ekkebus, R.; Van Kasteren, S. I.; Kulathu, Y.; Scholten, A.; Berlin, I.; Geurink, P. P.; De Jong, A.; Goerdayal, S.; Neefjes, J.; Heck, A. J. R.; Komander, D.; Ovaas, H. On Terminal Alkynes That Can React with Active-Site Cysteine Nucleophiles in Proteases. *J Am Chem Soc* **2013**, *135* (8), 2867–2870. <https://doi.org/10.1021/ja309802n>.
- (123) Goodreid, J. D.; Duspara, P. A.; Bosch, C.; Batey, R. A. Amidation Reactions from the Direct Coupling of Metal Carboxylate Salts with Amines. *Journal of Organic Chemistry* **2014**, *79* (3), 943–954. <https://doi.org/10.1021/jo402374c>.
- (124) Cheng, J.; Li, Y.; Wang, X.; Dong, G.; Sheng, C. Discovery of Novel PDE $\delta$ Degraders for the Treatment of KRAS Mutant Colorectal Cancer. *J Med Chem* **2020**, *63* (14), 7892–7905. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00929>.
- (125) Gololobov, Y. G.; Zhmurova, I. N.; Kasukhin, L. F. Sixty Years of Staudinger. *Tetrahedron* **1981**, *37* (102), 437–472. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)92417-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)92417-2).

## 6. Literaturverzeichnis

- (126) Brownsey, D. K.; Rowley, B. C.; Gorobets, E.; Gelfand, B. S.; Derksen, D. J. Rapid Synthesis of Pomalidomide-Conjugates for the Development of Protein Degradation Libraries. *Chem Sci* **2021**, *12* (12), 4519–4525. <https://doi.org/10.1039/d0sc05442a>.
- (127) Worrell, B. T.; Malik, J. A.; Fokin, V. V. Direct Evidence of a Dinuclear Copper Intermediate in Cu(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloadditions. *Science (1979)* **2013**, *340* (1), 457–461. <https://doi.org/10.1126/science.1229506>.
- (128) Jin, L.; Tolentino, D. R.; Melaimi, M.; Bertrand, G. Isolation of Bis(Copper) Key Intermediates in Cu-Catalyzed Azide-Alkyne “Click Reaction.” *Sci Adv* **2015**, *1* (5). <https://doi.org/10.1126/sciadv.1500304>.
- (129) Hsia, O.; Hinterndorfer, M.; Cowan, A. D.; Iso, K.; Ishida, T.; Sundaramoorthy, R.; Nakasone, M. A.; Imrichova, H.; Schätz, C.; Rukavina, A.; Husnjak, K.; Wegner, M.; Correa-Sáez, A.; Craigon, C.; Casement, R.; Maniaci, C.; Testa, A.; Kaulich, M.; Dikic, I.; Winter, G. E.; Ciulli, A. Targeted Protein Degradation via Intramolecular Bivalent Glues. *Nature* **2024**, *627* (8002), 204–211. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07089-6>.
- (130) Gregoretti, I. V.; Lee, Y.; Goodson, H. V.; Dame, N.; Dame, N. Molecular Evolution of the Histone Deacetylase Family: Functional Implications of Phylogenetic Analysis. **2004**, 17–31. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.02.006>.
- (131) Wang, Y.; Zhang, Y. L.; Hennig, K.; Gale, J. P.; Hong, Y.; Cha, A.; Riley, M.; Wagner, F.; Haggarty, S. J.; Holson, E.; Hooker, J. Class I HDAC Imaging Using [3H]CI-994 Autoradiography. *Epigenetics* **2013**, *8* (7), 756–764. <https://doi.org/10.4161/epi.25202>.
- (132) Cao, F.; Weerd, S. De; Chen, D.; Zwinderman, M. R. H.; Wouden, P. E. Van Der; Dekker, F. J. European Journal of Medicinal Chemistry Induced Protein Degradation of Histone Deacetylases 3 ( HDAC3 ) by Proteolysis Targeting Chimera ( PROTAC ). *Eur J Med Chem* **2020**, *208*, 112800. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112800>.
- (133) Furniss, B. S.; Hannaford, A. J.; Smith, P. W. G.; Tatchell, A. R. *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*, 5.; 1989.
- (134) Owa, T.; Yoshino, H.; Okauchi, T.; Yoshimatsu, K.; Ozawa, Y.; Sugi, N. H.; Nagasu, T.; Koyanagi, N.; Kitoh, K. Discovery of Novel Antitumor Sulfonamides Targeting G1 Phase of the Cell Cycle. *J Med Chem* **1999**, *42*, 3789–3799.
- (135) Holownia, A.; Tien, C. H.; Diaz, D. B.; Larson, R. T.; Yudin, A. K. Carboxyboronate: A Versatile C1 Building Block. *Angewandte Chemie - International Edition* **2019**, *58* (42), 15148–15153. <https://doi.org/10.1002/anie.201907486>.

## 6. Literaturverzeichnis

- (136) Dines, J. A.; Marson, C. M. A Direct Alkylation Route to Branched Derivatives of Suberoylanilide Hydroxamic Acid (SAHA), a Potent Non-Selective Inhibitor of Histone Deacetylases. *Tetrahedron* **2016**, *72* (52), 8584–8592. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2016.11.039>.
- (137) Beutner, G. L.; Young, I. S.; Davies, M. L.; Hickey, M. R.; Park, H.; Stevens, J. M.; Ye, Q. TCFH-NMI: Direct Access to N-Acyl Imidazoliums for Challenging Amide Bond Formations. *Org Lett* **2018**, *20* (14), 4218–4222. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.8b01591>.
- (138) Andia, A. A.; Miner, M. R.; Woerpel, K. A. Copper(I)-Catalyzed Oxidation of Alkenes Using Molecular Oxygen and Hydroxylamines: Synthesis and Reactivity of  $\alpha$ -Oxygenated Ketones. *Org Lett* **2015**, *17* (11), 2704–2707. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.5b01120>.
- (139) Zhang, J. Z.; Tang, Y. Iron-Catalyzed Regioselective Oxo- and Hydroxy-Phthalimidation of Styrenes: Access to  $\alpha$ -Hydroxyphthalimide Ketones. *Adv Synth Catal* **2016**, *358* (5), 752–764. <https://doi.org/10.1002/adsc.201500732>.
- (140) Li, Z.; Hu, L.; Wang, X.; Zhou, Z.; Deng, L.; Xu, Y.; Zhang, L. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel Dual FFA1 (GPR40)/PPAR $\delta$  Agonists as Potential Anti-Diabetic Agents. *Bioorg Chem* **2019**, *92* (September), 103254. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103254>.
- (141) Senger, J.; Melesina, J.; Marek, M.; Romier, C.; Oehme, I.; Witt, O.; Sippl, W.; Jung, M. Synthesis and Biological Investigation of Oxazole Hydroxamates as Highly Selective Histone Deacetylase 6 (HDAC6) Inhibitors. *J Med Chem* **2016**, *59* (4), 1545–1555. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01493>.
- (142) Wright, S. W.; Carlo, A. A.; Carty, M. D.; Danley, D. E.; Hageman, D. L.; Karam, G. A.; Levy, C. B.; Mansour, M. N.; Mathiowetz, A. M.; McClure, L. D.; Nestor, N. B.; McPherson, R. K.; Pandit, J.; Pustilnik, L. R.; Schulte, G. K.; Soeller, W. C.; Treadway, J. L.; Wan, I. K.; Bauer, P. H. Anilinoquinazoline Inhibitors of Fructose 1,6-Bisphosphatase Bind at a Novel Allosteric Site: Synthesis, in Vitro Characterization, and x-Ray Crystallography. *J Med Chem* **2002**, *45* (18), 3865–3877. <https://doi.org/10.1021/jm010496a>.
- (143) Kandre, S.; Bhagat, P. R.; Kumar Reddy, M. M.; Dalal, R.; Dixit, A.; Deshmukh, N. J.; Anthony, J.; Bose, J.; Anupindi, R.; Sharma, R.; Gupte, A. Synthesis and Evaluation of Cyclohexane Carboxylic Acid Head Group Containing Isoxazole and Thiazole Analogs

## 6. Literaturverzeichnis

- as DGAT1 Inhibitors. *Eur J Med Chem* **2014**, *79*, 203–215. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.03.077>.
- (144) Keuler, T.; König, B.; Bückreiß, N.; Kraft, F. B.; König, P.; Schäker-Hübner, L.; Steinebach, C.; Bendas, G.; Gütschow, M.; Hansen, F. K. Development of the First Non-Hydroxamate Selective HDAC6 Degraders. *Chemical Communications* **2022**, *58* (79), 11087–11090. <https://doi.org/10.1039/d2cc03712b>.
- (145) More, K. N.; Lee, J. Y.; Kim, D. Y.; Cho, N. C.; Pyo, A.; Yun, M.; Kim, H. S.; Kim, H.; Ko, K.; Park, J. H.; Chang, D. J. Acetazolamide-Based [<sup>18</sup>F]-PET Tracer: In Vivo Validation of Carbonic Anhydrase IX as a Sole Target for Imaging of CA-IX Expressing Hypoxic Solid Tumors. *Bioorg Med Chem Lett* **2018**, *28* (5), 915–921. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.01.060>.
- (146) Wang, C.; Wang, H.; Zheng, C.; Li, B.; Liu, Z.; Zhang, L.; Yuan, L.; Xu, P. Discovery of Coumarin-Based MEK1/2 PROTAC Effective in Human Cancer Cells. *ACS Med Chem Lett* **2023**, *14* (1), 92–102. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.2c00446>.
- (147) Perrot, A.; Wang, W. zhi; Buhler, E.; Moulin, E.; Giuseppone, N. Bending Actuation of Hydrogels through Rotation of Light-Driven Molecular Motors. *Angewandte Chemie - International Edition* **2023**, *62* (13). <https://doi.org/10.1002/anie.202300263>.
- (148) Liu, H.; Sun, R.; Ren, C.; Qiu, X.; Yang, X.; Jiang, B. Construction of an IMiD-Based Azide Library as a Kit for PROTAC Research. *Org Biomol Chem* **2021**, *19* (1), 166–170. <https://doi.org/10.1039/d0ob02120b>.
- (149) Maraswami, M.; Goh, J.; Loh, T. P. Macrolactam Synthesis via Ring-Closing Alkene-Alkene Cross-Coupling Reactions. *Org Lett* **2020**, *22* (24), 9724–9728. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.0c03801>.
- (150) Wakabayashi, T.; Funahashi, Y.; Hata, N.; Semba, T.; Yamamoto, Y.; Haneda, T.; Owa, T.; Tsuruoka, A.; Kamata, J.; Okabe, T.; Takahashi, K.; Nara, K.; Hamaoka, S.; Ueda, N. Integrin Expression Inhibitors US 2004/0018192 A1, 2004.

## Anhang

---

### Definition des Eigenanteils

1) Publikation: „Designing HDAC-PROTACs: Lessons Learned so Far“

Fabian Fischer<sup>1</sup>, Leandro A Alves Avelar<sup>1</sup>, Laoise Murray<sup>1</sup> & Thomas Kurz<sup>\*1</sup>

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

\*Author for correspondence: [thomas.kurz@hhu.de](mailto:thomas.kurz@hhu.de)

Referenz:

Fischer, F.; Alves Avelar, L. A.; Murray, L.; Kurz, T. Designing HDAC-PROTACs: Lessons Learned so Far. *Future Med. Chem.* **2022**, *14* (3), 143–166.

<https://doi.org/10.4155/fmc-2021-0206>.

Fabian Fischer war hauptverantwortlich für die Literaturrecherche, das Schreiben und die Revision der gesamten Publikation.

2) Manuskript: „Deciphering the therapeutic potential of novel alkoxyamide based class I, IIb HDAC inhibitors against therapy-resistant leukemia“

Fabian Fischer<sup>1#</sup>, Julian Schliehe-Diecks<sup>2#</sup>, Jia-Wey Tu<sup>2</sup>, Tanja Gangnus<sup>3</sup>, Leandro A. Alves Avelar<sup>1</sup>, Katerina Scharov<sup>2</sup>, Titus Watrin<sup>2</sup>, Marie Kemkes<sup>1</sup>, Lukas Biermann<sup>1</sup>, Josefa Kremeyer<sup>1</sup>, Nadine Horstick<sup>1</sup>, Arndt Borkhardt<sup>2</sup>, Matthias U. Kassack<sup>1</sup>, Björn B. Burckhardt<sup>3</sup>, Sanil Bhatia<sup>2\*</sup> and Thomas Kurz<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Pharmaceutical und Medicinal Chemistry, Heinrich-Heine University Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany

<sup>2</sup>Department of Pediatric Oncology, Hematology and Clinical Immunology, Medical Faculty, Heinrich-Heine-University Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany

<sup>3</sup>Institute of Pharmaceutical and Medicinal Chemistry, Individualized Pharmacotherapy, University of Münster, 48149 Münster, Germany

Fabian Fischer synthetisierte alle Zwischenstufen und Zielverbindungen, entwarf zusammen mit Julian Schliehe-Diecks, Sanil Bhatia und Thomas Kurz die Experimente und schrieb vor allem die Teile „Introduction“, „Synthesis“ und „Conclusion“ des Manuskriptes.

Das Manuskript ist unveröffentlicht.

Hiermit versichere ich, dass die oben gemachten Angaben zum Eigenanteil von Fabian Fischer an der oben aufgeführten Publikation und dem Manuskript glaubhaft sind.

Düsseldorf, den

---

Prof. Dr. Thomas Kurz