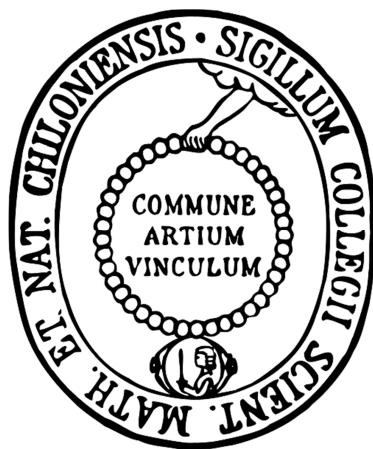


# **Design, Synthese, Optimierung und Vergleich von Pyrazin-2-on DFG<sub>in</sub>- und DFG<sub>out</sub>-Inhibitoren**



**Dissertation**  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität  
zu Kiel

vorgelegt von

**Eugen Johannes**

Kiel 2015

Erster Berichterstatter: Prof. Dr. Christian Peifer

Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. Rainer Herges

Tag der mündlichen Prüfung: 08.10.15

Zum Druck genehmigt: 16.11.15

Prof. Dr. Wolfgang J. Duschl  
(Dekan)





# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>V</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Proteinkinasen .....	1
1.2 Rezeptortyrosinkinasen .....	1
1.3 Platelet-derived Growth Factor Receptor (PDGFR) .....	3
1.4 Kinaseinhibitoren .....	5
<b>2. Aktueller Stand der Forschung und Zielsetzung.....</b>	<b>9</b>
2.1 Stand der Forschung: Pyrazin-2-on-Serie (DFG <sub>in</sub> -Inhibitoren).....	9
2.2 Stand der Forschung: Pyrazin-2-on-Serie (DFG <sub>out</sub> -Inhibitoren) .....	13
2.3 Zielsetzung für beide Pyrazin-2-on-Serien (DFG <sub>in/out</sub> ).....	16
2.4 Neue Darstellungsmethode von Indol-2-ylmethylamin- und Benzofuran-2-ylmethylamin-Derivaten.....	18
2.4.1 Zielsetzung zur Darstellung von Indol-Derivaten .....	19
<b>3. Computergestützte Leitstrukturoptimierung .....</b>	<b>20</b>
3.1 Software.....	20
3.2 Ergebnisse der computergestützten Docking-Studien (DFG <sub>in</sub> -Serie).....	22
3.2.1 Elektronischer Einfluss des <i>meta</i> -Substituenten.....	22
3.2.2 Sterischer Einfluss der <i>meta</i> -Substituenten .....	24
3.2.3 Syntheseauswahl der Zielmoleküle für die DFG <sub>in</sub> -Serie .....	27
3.3 Ergebnisse der computergestützten Docking-Studien (DFG <sub>out</sub> -Serie) .....	28
3.3.1 Einführung der unterschiedlich substituierten Benzamide .....	28
3.3.2 Einführung der unterschiedlich substituierten Harnstoffderivate .....	32
3.3.3 Syntheseauswahl der Zielmoleküle für die DFG <sub>out</sub> -Serie .....	32
<b>4. Synthese .....</b>	<b>34</b>
4.1 Synthese von 2-(3,4,5-Trimethoxyphenyl)glyoxylsäure (7) .....	35
4.2 Synthese der $\alpha$ -Ketoaminderivate ausgehend von Carbonsäuren .....	36
4.2.1 Synthese der $\alpha$ -Ketoaminderivate 80-85 .....	38
4.2.2 Synthese des $\alpha$ -Ketoamins 14.....	40
4.3 Synthese der Glyoxylsäureamide 15, 98-103 .....	40
4.3.1 Synthese der Glyoxylsäureamide 98-103 .....	40
4.3.2 Synthese des Gyloxylsäureamids 15 .....	42
4.4 Synthesen der (1 <i>H</i> )-Pyrazin-2-one 16, 27, 33, 37, 44, 48, 49 .....	42
4.4.1 Ringschlussreaktion zu den (1 <i>H</i> )-Pyrazin-2-onen 27, 33, 37, 44, 48, 49.....	43
4.4.2 Ringschlussreaktion zu dem (1 <i>H</i> )-Pyrazin-2-on 16 .....	44
4.5 Reduktion der Nitrogruppe in der Mikrowelle .....	44

4.6	Synthese unterschiedlich substituierter Benzamide und Harnstoffderivate .....	45
4.6.1	Amidkupplung des <i>Building Blocks</i> 11 mit den Benzoësäuren 104 und 105 zu den Benzamiden 2 und 50 .....	45
4.6.2	Darstellung der Harnstoffderivate .....	49
4.7	Darstellung der Indolderivate .....	52
4.7.1	Darstellung der Nitrophenylessigsäuren.....	52
4.7.2	Synthese des 4-Methoxynitrobenzols.....	54
4.7.3	Synthese der Oxazolderivate .....	54
4.7.4	Reduktion der Nitrogruppe zu einem Amin .....	55
4.7.5	Darstellung der Indol-2-yl-methylamin Hydrochloride 139-144 .....	56
<b>5.</b>	<b>Methoden der biochemischen Charakterisierung .....</b>	<b>58</b>
5.1	Proliferationsassay.....	58
5.1.1	Auswertung der Daten .....	59
5.2	Kinaseassay .....	60
5.2.1	Durchführung und Auswertung des Kinaseassays .....	61
5.2.2	Kinaseassay mit Präinkubationszeiten.....	61
5.3	Western Blot .....	62
5.3.1	Durchführung der Western Blot-Analyse .....	62
5.4	Selektivitätsprofil der Verbindungen 1 und 2 .....	62
5.4.1	Aktivitätsbasierter Selektivitätsassay .....	62
5.4.2	Bindungsbasierter Selektivitätsassay.....	63
<b>6.</b>	<b>Ergebnisse der biologischen Untersuchungen .....</b>	<b>65</b>
6.1	Ergebnisse der DFG <sub>in</sub> -Inhibitoren .....	66
6.2	Ergebnisse der DFG <sub>out</sub> -Inhibitoren .....	66
6.3	Ergebnisse des PDGFRβ-Kinaseassays .....	68
6.3.1	Bestimmung der IC <sub>50</sub> -Werte des DFG <sub>out</sub> -Inhibitor 2 im PDGFRβ-Kinaseassay .....	68
6.3.2	Bestimmung des Bindemodus des Inhibitors 2 im PDGFRβ-Kinaseassay .....	70
6.4	Validierung der Western Blot-Analyse .....	71
6.4.1	Western Blot-Versuche der Inhibitoren 1, 2 und Imatinib auf NIH3T3 Zellen .....	72
6.5	Selektivitätsprofile der Verbindungen 1 und 2.....	74
<b>7.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>77</b>
7.1	Diskussion der biologischen und computergestützten Ergebnisse der DFG <sub>in</sub> -Serie .....	77
7.2	Diskussion der biologischen und computergestützten Ergebnisse der DFG <sub>out</sub> -Serie .....	80

7.3 Gegenüberstellung der DFG <sub>in</sub> - (Typ-I) und DFG <sub>out</sub> -Inhibitoren (Typ-II) bezüglich ihrer Affinität und Selektivität gegenüber PDGFRβ .....	81
7.3.1 Kinetische Untersuchung des DFG <sub>out</sub> -Inhibitors 2 im PDGFRβ Kinaseassay .....	84
7.4 Untersuchung der UV-Stabilität der Verbindungen 1 und 2 .....	87
<b>8. Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>90</b>
8.1 Ergebnisse der Optimierung der DFG <sub>in</sub> -Serie .....	90
8.2 Ergebnisse der Optimierung der DFG <sub>out</sub> -Serie .....	92
8.3 Vergleich der DFG <sub>in</sub> - bzw. DFG <sub>out</sub> -Inhibitoren 1 und 2.....	94
<b>9. Experimenteller Teil.....</b>	<b>97</b>
9.1 Allgemeine Methoden .....	97
9.2 Einzelvorschriften.....	100
9.2.1 Synthese von 2-(3,4,5-Trimethoxyphenyl)glyoxylsäure (7) .....	100
9.2.2 Synthese von 3-Ethoxy-4-hydroxybenzoësäure (89).....	101
9.2.3 Benzylschützung der 4-Hydroxybenzoësäurederivate 67-71 .....	102
9.2.4 Synthesen der 1,3-Oxazol-4-carbonsäuremethylester 74-79 .....	106
9.2.5 Synthesen der $\alpha$ -Ketoamine 80-85 .....	112
9.2.6 Synthesen der Glyoxylsäureamide .....	116
9.2.7 Synthesen der (1 <i>H</i> )-pyrazin-2-one .....	120
9.2.8 Synthese des Methyl-5-(2-nitrobenzyl)-1,3-oxazol-4-carboxylats (73) .....	126
9.2.9 Synthese des 1-Amino-3-(3-nitrophenyl)propan-2-on-Hydrochlorids (14).....	127
9.2.10 Synthese des <i>N</i> -[3-(3-Nitrophenyl)-2-oxopropyl]-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-2-oxoacetamids (15).....	128
9.2.11 Synthese von 5-(3-Nitrobenzyl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)pyrazin-2( <i>H</i> )-on (16) .....	129
9.2.12 Synthese von 5-(3-Aminobenzyl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)pyrazin-2( <i>H</i> )-on (11) .....	130
9.2.13 Amidkupplung .....	131
9.2.14 Darstellung der Harnstoffderivate .....	133
9.2.15 Synthese von 1-Methoxy-4-nitrobenzol (147) .....	136
9.2.16 Synthese von 2-Nitrophenylacetonitrils .....	137
9.2.17 Synthese der 2-Nitrophenylessigsäuren.....	140
9.2.18 Synthese der Oxazole .....	142
9.2.19 Reduktion der Nitrogruppe der Oxazolderivate (133).....	146
9.2.20 Darstellung der 1 <i>H</i> -Indol-2-ylmethylamin-Hydrochloride (139 – 144).....	152
<b>10. Literatur .....</b>	<b>157</b>
<b>11. Anhang.....</b>	<b>162</b>

11.1 Selektivitätsprofil der Fa. ProQinase.....	162
11.2 Selektivitätsprofil der Fa. DiscoveRx .....	169
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>173</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>174</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>175</b>
<b>Erklärung zu §8 Abs. 1 der Promotionsordnung .....</b>	<b>177</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
abs.	absolut
Ac	Acetyl-
AKT	Proteinkinase B
APS	Ammoniumpersulfat
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bn	Benzyl-
bs (NMR)	breites Singulett
c	Konzentration
CDI	Carbodiimidazol
CML	chronische myeloische Leukämie
COSY	<i>Correlated Spectroscopy</i>
Cy	Cyclohexan
Cys	Cystein
d (NMR)	Duplett
dd (NMR)	Duplett vom Duplett
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]-undec-7-en
DCM	Dichlormethan
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer</i>
DFG	Glutaminsäure, Phenylalanin, Glycin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DIPEA	N-Ethylidiisopropylamin
DMEM	Dulbeccos's modifiziertes Eagle Medium (engl. <i>Dulbeccos's modified eagle medium</i> )
DMSO	Dimethylsulfoxid
EA	Ethylacetat
EDCI	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
eq.	Äquivalent
ERK	Extrazellulär-Signal regulierte Kinase
ESI	<i>Electrospray-Ionisation</i>
Et <sub>3</sub> N	Triethylamin
Fa.	Firma
FBS	Fätales Kälberserum
FT-IR	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie
ges.	gesättigt
GI <sub>50</sub>	Wachstumsreduktion um 50 % ( <i>growth inhibition</i> )
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
i. Vak.	im Vakuum
J	Kopplungskonstante
konz.	konzentriert
KID	<i>kinase insert domain</i>
LC <sub>50</sub>	Letalität der Zellen um 50 %
LC-MS	<i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>
Lsg.	Lösung
Lys	Lysin

m (NMR)	Multiplett
max.	maximal
MEM	Modifiziertes Eagle Medium (engl. <i>modified eagle medium</i> )
min	Minuten
$\mu$ M	Mikromolar
mM	Millimolar
NaHMDS	Natriumhexamethyldisilizan
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
org.	organisch
PDB	<i>protein data base</i>
PDGF(R)	<i>Platelet Derived Growth Factor (Receptor)</i>
PK	Proteinkinase
PPG	<i>photolabile protecting group</i>
PTK	Protein Tyrosinkinase
RTK	Rezeptortyrosinkinase
S.	Seite
s.	siehe
SAR	Struktur-Wirkungsbeziehungen
SG	Schutzgruppe
sog.	so genannte
T <sub>3</sub> P	<i>Propylphosphonic anhydride</i>
Tab.	Tabelle
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Tetramethylsilan
U87-MG	Menschliche Glioblastom-Astrozyten eines malignen Glioms
Vers.	Version
VEGF(R)	<i>Vascular Endothelial Growth Factor (Receptor)</i>
vgl.	vergleiche
wässr.	wässrig
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

## 1. Einleitung

### 1.1 Proteinkinasen

Es gibt 518 bekannte Proteinkinasen im menschlichen Genom.<sup>[1][2]</sup> Proteinkinasen (PKs) sind Enzyme, die die Übertragung eines  $\gamma$ -Phosphats des Co-Faktors Adenosin-5'-triphosphats (ATP) auf die Hydroxygruppe einer Aminosäure (Serin, Threonin oder Tyrosin) des spezifischen Substrats katalysieren.<sup>[1]</sup> Aufgrund der Substratspezifität wird zwischen Serin-Threoninkinasen (SPK's) und Tyrosinkinasen (TPK's) unterschieden.<sup>[3]</sup> Die Ausnahme bilden einige wenige Kinasen, die sowohl Serin als auch Tyrosin phosphorylieren. Die Phosphorylierung verläuft reversibel, wobei die Rückreaktion (Dephosphorylierung) von Proteinkinasen durchgeführt wird.<sup>[4]</sup>

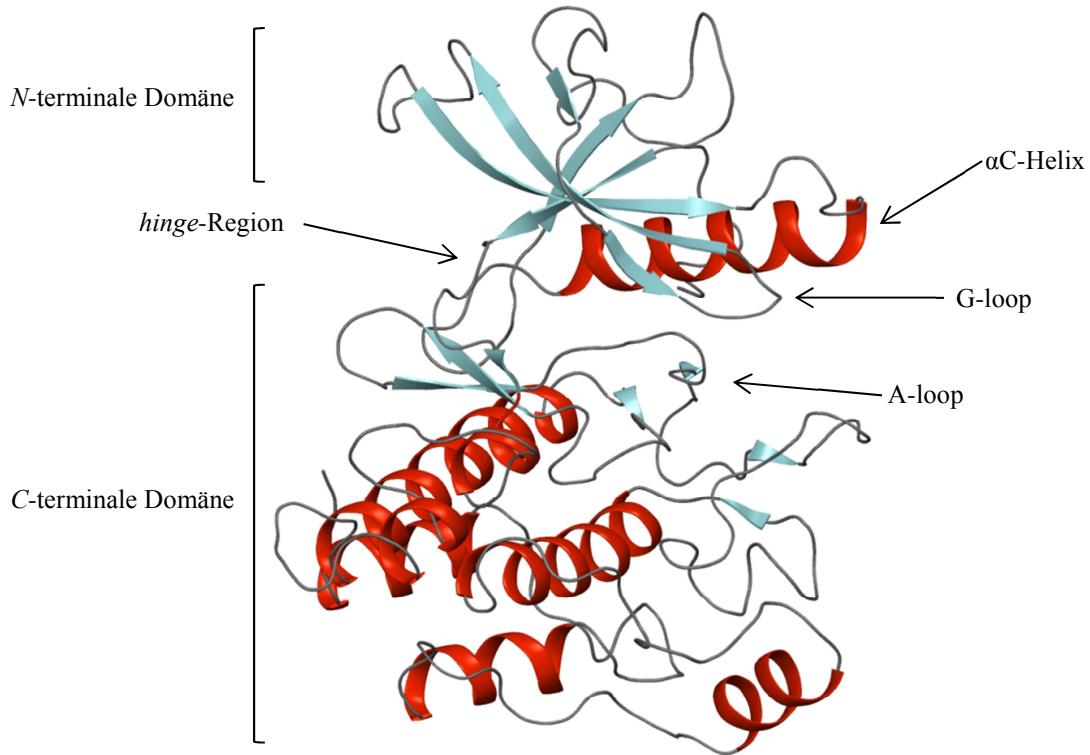
Proteinkinasen spielen eine zentrale Rolle bei Signaltransduktionskaskaden, die die Regulierung wichtiger Prozesse im Organismus wie Metabolismus, Transkription, Zelldifferenzierung und Apoptose (programmierter Zelltod) übernehmen.<sup>[5]</sup>

Durch Mutationen kann es zu einer dauerhaften Aktivierung von Proteinkinasen kommen. Das daraus resultierende unkontrollierte Zellwachstum führt häufig zu einer Entstehung von malignen Erkrankungen wie Krebs oder Entzündungen (Autoimmunerkrankungen).<sup>[6]</sup> Die Inhibierung von relevanten Proteinkinasen stellt somit einen vielversprechenden Therapieansatz gegen diese Krankheiten dar. Deshalb wurde Ende der 1980er mit der Erforschung und Entwicklung von Proteinkinaseinhibitoren begonnen. Im Jahr 2001 kam der erste zur Behandlung der chronischen myeloischen Leukämie (CML) zugelassene Rezeptortyrosinkinase-Inhibitor Imatinib (Gleevec<sup>®</sup>) der Firma Novartis auf den Markt.<sup>[7]</sup>

### 1.2 Rezeptortyrosinkinasen

Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) stehen am Anfang der Signaltransduktionkaskade und bestehen aus einem extrazellulären Teil, der Rezeptordomäne, einem Transmembranteil und einem intrazellulären Teil, der Kinasedomäne. Die Rezeptordomäne besteht aus fünf immunoglobulinähnlichen Einheiten, die spezifisch ein Signalmolekül, z.B. im Falle des *platelet derived growth factor receptor* (PDGF-R) den Wachstumsfaktor PDGF (*platelet derived growth factor*) binden können<sup>[8]</sup> (s. Kap. 1.3). Die intrazelluläre Kinasedomäne besteht aus einer C- und

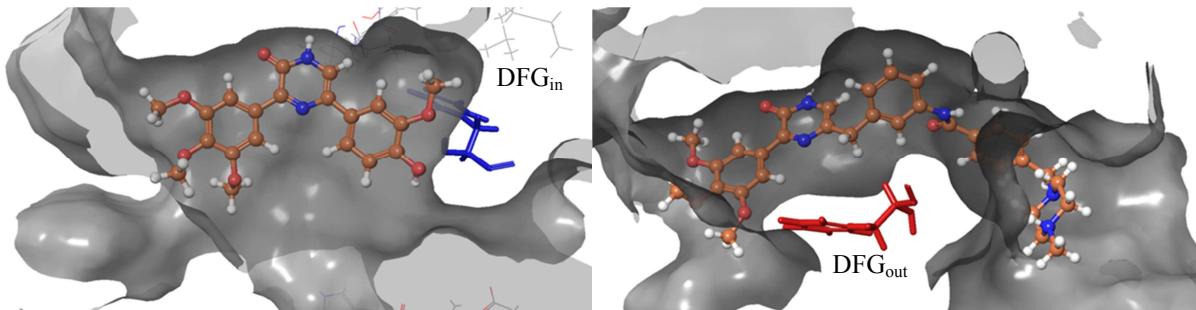
*N*-terminalen Domäne, die über die *hinge*-Region (Gelenk-Region) flexibel miteinander verbunden sind. Die *C*-terminale Domäne besteht aus acht  $\alpha$ -helikalnen Bereichen und drei kurzen antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern. Die *N*-terminale Domäne ist aus einer  $\alpha$ -Helix und fünf  $\beta$ -Faltblättern aufgebaut.<sup>[8]</sup> Zwischen beiden Domänen befindet sich die ATP-Bindetasche der Kinase, die ein Erkennungsmotiv für den Cofaktor (ATP) besitzt (s. Abb. 1).



**Abb. 1:** Allgemeiner Aufbau einer Kinase. Hier beispielhaft die Kristallstruktur von PDGFR $\beta$  (Homologiemodell). Dargestellt mit PyMol.

Die Regulation der Kinaseaktivität wird durch eine Konformationsänderung der flexiblen Aktivierungsschleife (A-loop) ermöglicht.<sup>[8]</sup> Am Anfang der Aktivierungsschleife befindet sich ein hochkonserviertes DFG-Motiv, das für die Aminosäuren Asparaginsäure (D), Phenylalanin (F) und Glycin (G) steht. In der inaktiven Konformation der Kinase, DFG<sub>out</sub>, ragt der Phenylrest des DFG-Motivs aus der tiefen hydrophoben Tasche in die ATP-Bindetasche (Adeninerkennungsregion) und blockiert somit den Zugang für ATP und für das zu phosphorylierende Substrat (s. Abb. 2).<sup>[9]</sup> Findet extrazellulär die Bindung eines Signalmoleküls an den Rezeptor statt, kommt es zu einer Dimerisierung der RTK, wobei eine Autophosphorylierung an mehreren Positionen der intrazellulären Kinasedomäne induziert wird. Eine entscheidende Rolle spielt dabei die Phosphorylierung der Aminosäure Threonin des A-loops der *C*-terminalen Domäne. Das dabei übertragene Phosphat wechselwirkt mit der benachbarten  $\alpha$ C-Helix der *N*-terminalen Domäne und initiiert schließlich eine Konformationsänderung der Aktivierungs-

schleife mit dem DFG-Motiv.<sup>[8]</sup> In dem aktiven Zustand der Kinase, DFG<sub>in</sub>, ragt der Phenylrest des Phenylalanins in die tiefe hydrophobe Tasche der Kinase und gibt damit den Zugang für ATP zur ATP-Bindetasche frei (s. Abb. 2). Dadurch wird eine *Downstream* Phosphorylierung und die Signaltransduktion in die Zelle induziert.



**Abb. 2:** Darstellung der DFG<sub>in/out</sub>-Konformation. **Links:** DFG<sub>in</sub>-Konformation. In der Bindetasche (dargestellt durch die graue Oberfläche) der aktiven Kinase ist ein DFG<sub>in</sub>-Inhibitor 1 (braun) gebunden. Der Phenylrest (blau) des DFG-Motivs ragt in den Eingang zu der hydrophoben Tasche und blockiert somit deren Zugang. **Rechts:** DFG<sub>out</sub>-Konformation. Der Phenylrest (rot) des DFG-Motivs klappt aus der tiefen Tasche in die ATP-Binderegion und gibt somit den Zugang zu der tiefen Tasche frei. In der Bindetasche einer inaktiven Kinase ist ein DFG<sub>out</sub>-Inhibitor 2 (braun) gebunden, der die tiefen Tasche adressiert. Die Abbildung wurde mit der Schrödinger Software (*Maestro* Vers. 10.0) visualisiert.

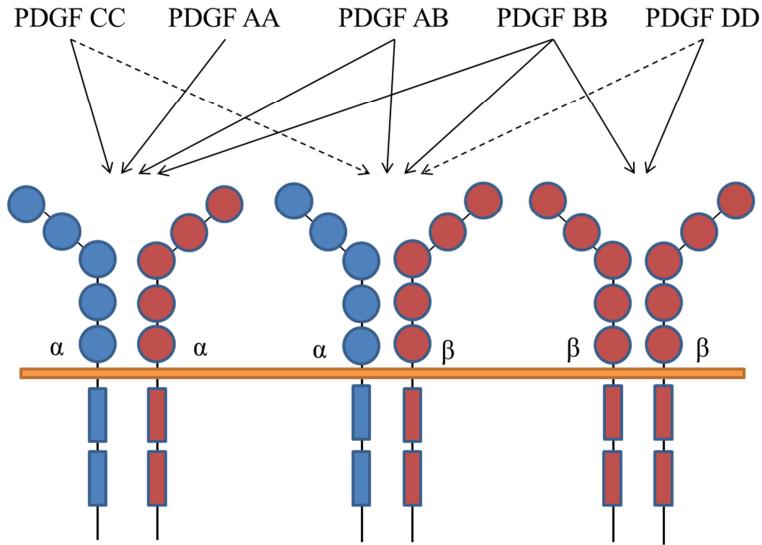
### 1.3 Platelet-derived Growth Factor Receptor (PDGFR)

PDGFR gehören zu den RTK. Sie spielen eine zentrale Rolle bei der Signaltransduktion der PDGF und werden von unterschiedlichen Zellen wie mesenchymalen Zellen oder mesenchymalen Progenitor Zellen (Lunge, Haut) exprimiert.<sup>[10]</sup> Analog zu dem allgemeinen Aufbau der RTK besteht PDGFR aus einer extrazellulären Rezeptordomäne, einem Transmembranteil und einem intrazellulären Teil, der Tyrosinkinasedomäne. Die Kinasedomäne ist durch eine *Kinase Insert Domain* (KID) erweitert<sup>[11]</sup> (s. Kap. 2.1).

Es sind zwei Isoformen, PDGFR $\alpha$  und PDGFR $\beta$ , bekannt, die sich strukturell voneinander unterscheiden<sup>[12]</sup> (s. Abb. 3). Der *platelet-derived growth factor* (PDGF) gehört zu der Familie der Wachstumsfaktoren und wird z.B. von Thrombozyten, von denen die Bezeichnung stammt, gebildet<sup>[13]</sup>. Es handelt sich dabei um ein Polypeptid, das sowohl Homo- als auch Heterodimere PDGF-AA, -BB, -AB, -CC und -DD bildet. Bindet einer dieser Wachstumsfaktoren am Rezeptor, dimerisieren die PDGF-Rezeptoren, wodurch sich entweder ein Homo- $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Komplex oder ein Hetero- $\alpha/\beta$ -Komplex bildet.<sup>[12]</sup> Die unterschiedlichen PDGF-Dimere weisen eine unterschiedlich starke Affinität zu den PDGFR-Isomeren auf<sup>[12][14]</sup> (s. Abb. 3).

Der PDGF-Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei der Embryogenese, der Zellproliferation und der Angiogenese.<sup>[10][12]</sup> PDGF wird auch mit pathologischen Prozessen wie Arteriosklerose und Fibrosen in Verbindung gebracht.<sup>[10]</sup>

Die vielseitige Beteiligung des PDGF Signalweges an malignen Erkrankungen macht den PDGFR zu einem wichtigen *Drug-Target*. Aus diesem Grund wurden in der Arbeitsgruppe Peifer et al. PDGFR $\beta$ -Inhibitoren ( $DFG_{in}/DFG_{out}$ ) entwickelt (s. Kapitel 2.1).



**Abb. 3:** Schematische Darstellung der PDGF und PDGFR-Rezeptor Interaktion. Die PDGF-Dimere weisen eine unterschiedlich starke Affinität zu den PDGFR-Isoformen auf. Der durchgezogene Pfeil verdeutlicht eine starke Affinität; der gestrichelte Pfeil eine niedrige. Grafik adaptiert nach S. Vázquez.<sup>[15]</sup>

## 1.4 Kinaseinhibitoren

Kinaseinhibitoren lassen sich aufgrund ihrer Struktur und Art der Bindung in fünf Gruppen klassifizieren: Typ-I ( $\text{DFG}_{\text{in}}$ -Binder), Typ-I<sup>I</sup>/<sub>II</sub> ( $\text{DFG}_{\text{in/out}}$ -Binder), Typ-II ( $\text{DFG}_{\text{out}}$ -Binder), Typ-III (allosterische Binder) und Typ-IV (irreversible Binder)<sup>[9]</sup> (s. Tab. 1).

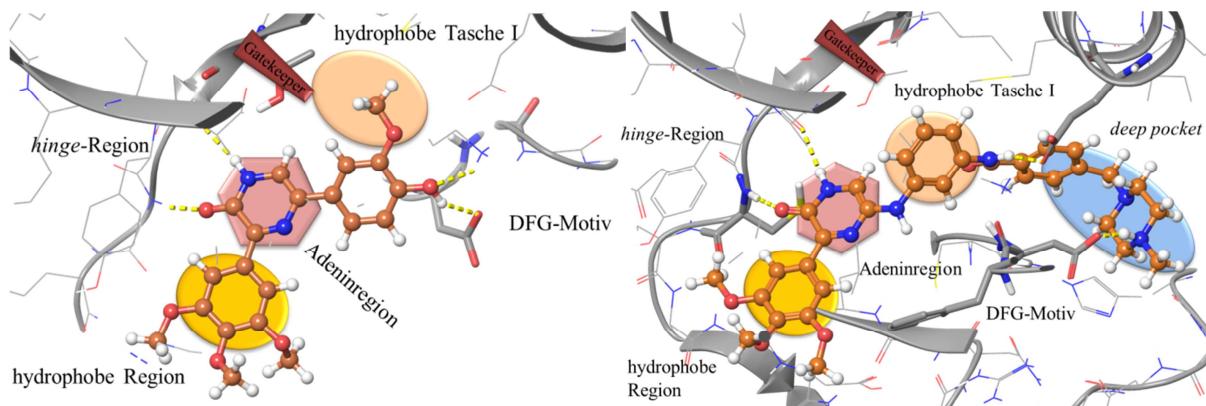
**Tabelle 1:** Klassifizierung der Kinaseinhibitoren nach Typ-I-IV.<sup>[9]</sup>

Klasse	Bindemodus	Konformation der Kinase	Selektivität	Beispiel
<b>Typ-I</b>	Kompetitiv zu ATP, bindet an der <i>hinge</i> -Region, mögliche Adressierung der hydrophoben Tasche-I und der hydrophoben Region.	$\text{DFG}_{\text{in}}$ (aktiv)	eher unselektiv	Gefitinib <sup>[16]</sup>
<b>Typ-I<sup>I</sup>/<sub>II</sub></b>	Bindet zwischen der hydrophoben Region und der allosterischen Binderegion ( <i>deep pocket</i> ).	$\text{DFG}_{\text{out}}$ und $\text{DFG}_{\text{in}}$	eher selektiv	16e von S. Fischer et al. <sup>[17]</sup>
<b>Typ-II</b>	Kompetitiv zu ATP, bindet in der allosterischen Binderegion ( <i>deep pocket</i> ).	$\text{DFG}_{\text{out}}$ (inaktiv)	eher selektiv	Imatinib <sup>[7]</sup>
<b>Typ-III</b>	Nicht kompetitiv zu ATP, bindet in der allosterischen Region.	$\text{DFG}_{\text{out}}$ und $\text{DFG}_{\text{in}}$	selektiv	(Akt-I-1) <sup>[18]</sup>
<b>Typ-IV</b>	Bindet irreversibel außerhalb der ATP Bindetasche.	$\text{DFG}_{\text{out}}$ und $\text{DFG}_{\text{in}}$	sehr selektiv	(HKI-272) <sup>[19]</sup>

Die in dieser Arbeit behandelten  $\text{DFG}_{\text{in}}$ -Inhibitoren (s. Kap. 3.1) gehören zu den Typ-I-Inhibitoren, die in der aktiven Konformation der Kinase binden. Die Bindung erfolgt dabei kompetitiv zu ATP durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zu der *hinge*-Region. Die Bindeaffinität des Typ-I-Inhibitors zum aktiven Zentrum sollte höher sein als die des ATPs, da die natürliche ATP-Konzentration *in vivo* mit 2-10 mM, verglichen mit der verabreichten Inhibitorkonzentration, relativ hoch ist.

Die ATP-Bindetaschen der unterschiedlichen Kinasen weisen eine hohe strukturelle Ähnlichkeit auf, die auf das Binden des gemeinsamen Cofaktors ATP zurückzuführen ist. Diese strukturelle Ähnlichkeit führt zu einer schlechten Selektivität und damit zu schwereren Nebenwirkungen.<sup>[20]</sup> Typ-I Inhibitoren haben meist eine niedrigere Selektivität als die anderen Inhibitoren (s. Tab. 1), was auf die spezifische Struktur der Kinasen zurückzuführen ist (s. Abb. 4).<sup>[9]</sup>

Die Bindetasche der aktiven Kinase ( $\text{DFG}_{\text{in}}$ ) besitzt jedoch Bereiche, die an die hochkonserve ATP-Binderegion angrenzen und sich strukturell voneinander unterscheiden: hydrophobe Tasche-I und hydrophobe Region (s. Abb. 4). Neben der *hinge*-Region können diese beiden Binderegionen von dem Typ-I-Inhibitor adressiert werden (Abb. 4, links), wodurch die Selektivität des Inhibitors erhöht werden kann.<sup>[9]</sup> Der Zugang zu der hydrophoben Tasche-I wird durch einen sog. *gatekeeper* (Türsteher-Aminosäure) reguliert. Dieser variiert bei den unterschiedlichen Kinasen in der Größe der Seitenkette und beeinflusst die Selektivität der Inhibitoren gegenüber der Kinasen. Eine Mutation des *gatekeepers* kann dazu führen, dass es zwischen dem für diese Kinase entwickelten Inhibitor und dem größeren, mutierten Türsteher-Aminosäurerest zu einem *clash* kommt. Dadurch wird der Zugang des Inhibitors zu der hydrophoben Tasche-I eingeschränkt. Krebszellen, die eine Resistenz gegenüber den Kinaseinhibitoren (z.B. Imatinib) zeigen, weisen zum Teil eine Mutation des *gatekeepers* auf.<sup>[9]</sup>



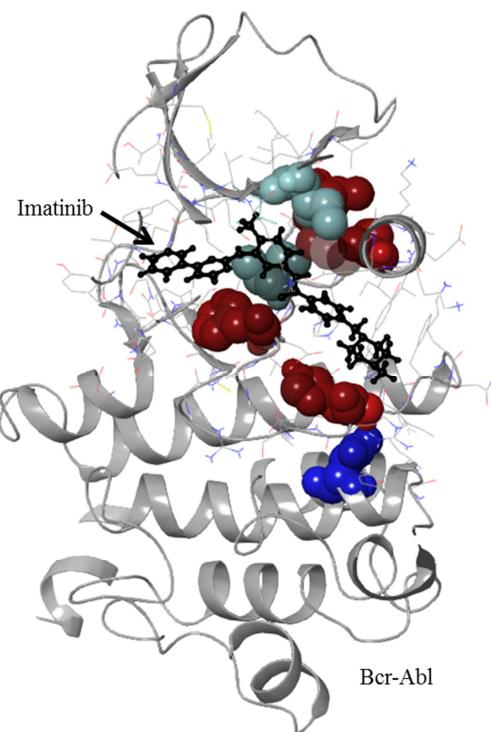
**Abb. 4:** Schematische Darstellung der Bindemodi von Kinase-Inhibitoren nach Traxler.<sup>[21]</sup> **Links:** Komplex aus der aktiven Konformation von PDGFR $\beta$  und einem ATP-kompetitiven Typ-I-Inhibitor **1**.<sup>[22]</sup> Der Inhibitor bildet Wasserstoffbrückenbindungen zu der *hinge*-Region aus (gelb). Der Methoxyrest adressiert die hydrophobe Tasche I (rosa). Der 3,4,5-Trimethoxyphenylrest ragt in die hydrophobe Region. **Rechts:** DFG<sub>out</sub>-Konformation (inaktiv) von PDGFR $\beta$  mit einem Typ-II-Inhibitor **2**, *vide infra*. Der Inhibitor bildet Wasserstoffbrückenbindungen zu der *hinge*-Region und dem DFG-Loop. Der Inhibitor adressiert sowohl die hydrophobe Tasche I, die hydrophobe Region, als auch die in der inaktiven Konformation zugängliche tiefe Tasche, der sog. *allosteric site* (blau).

Die in dieser Arbeit behandelten DFG<sub>out</sub>-Inhibitoren (s. Kap. 3.2) gehören zu den Typ-II Inhibitoren und inhibieren somit die inaktive Konformation der Kinase. Durch das Umklappen des DFG-Motivs wird zwar der Zugang für den Cofaktor ATP zu der ATP-Binderegion blockiert, gleichzeitig wird aber der Zugang zu der tiefen hydrophoben Tasche (*allosteric site*, Abb. 4 rechts) zugänglich gemacht. Ein Typ-II-Inhibitor stabilisiert somit beim Binden die DFG<sub>out</sub>-Konformation der Aktivierungsschleife.<sup>[9]</sup> Die inaktive Konformation (DFG<sub>out</sub>) der Kinase weist zusätzlich eine weitere tiefere Tasche (*allosteric site*, Abb. 4 rechts) auf, die sich strukturell teilweise stark von denen der anderen Kinasen unterscheidet. Die DFG<sub>out</sub>-Seite | 6

Inhibitoren weisen sowohl eine zu ATP kompetitive als auch eine allosterische Bindekompone nte auf.<sup>[3][23][24]</sup> Durch die zusätzliche Adressierung dieser sog. *deep pocket* können die Typ-II-Inhibitoren im Vergleich zu den Typ-I-Inhibitoren eine höhere Selektivität erreichen (s. Tab. 1).<sup>[3][20]</sup>

Neben der Selektivität spielt bei der Hemmaktivität auch die On-/Off-Kinetik der Inhibitoren eine wichtige Rolle. Die Typ-II-Inhibitoren weisen im Vergleich zu den Typ-I-Inhibitoren, die eine schnelle On-/Off-Kinetik zeigen, eine langsame on-Bindungskinetik auf, dissoziieren jedoch viel langsamer.<sup>[20]</sup> Dadurch wird die Effektivität der Hemmung bei den Typ-II-Inhibitoren gesteigert.

Neuere Erkenntnisse zeigen, dass die Bindemodi einiger als Typ-II entwickelter Inhibitoren sich eher zwischen Typ-I und Typ-II einordnen lassen. Diese Inhibitoren lassen sich daher als Typ-I<sub>II</sub> Binder beschreiben.<sup>[20]</sup> Sie binden in dem Bereich zwischen der hydrophoben Region I und der *deep pocket*. Durch die Bindung des Inhibitors wird das sog. hydrophobe *spine* (Rückgrat) unterbrochen. Bei dem hydrophoben *spine* handelt es sich um einen hochkonser vierten Bereich in einer Kinase, der aus vier nicht zusammenhängenden Aminosäuren unter schiedlicher Bereiche besteht (s. Abb. 5).



**Abb. 5:** Darstellung eines unterbrochenen Rückgrats (*spine*) am Beispiel des Bindemodus von Imatinib in Bcr-Abl (PDB: 3K5V). In blau und rot sind die Aminosäurereste des hydrophoben *spine* dargestellt. Durch die Bindung von Imatinib wird das Rückgrat (*spine*) unterbrochen. Adaptiert nach Meharena.<sup>[25]</sup>

## Einleitung

---

Ein Bestandteil dieses Rückgrats ist z.B. der Phenylalaninrest des DFG-Motivs. Dieses Rückgrat wirkt regulatorisch, wobei die Typ-I I<sub>II</sub> Inhibitoren sowohl in der inaktiven als auch in der aktiven Konformation der Kinase binden und mit dem *spine* wechselwirken.<sup>[20]</sup>

Darüber hinaus sind noch zwei weitere Klassen von Kinase-Inhibitoren bekannt. Die rein allosterisch bindenden Inhibitoren (z.B. Akt-I-1)<sup>[18]</sup> werden als Typ-III Inhibitoren bezeichnet. Im Vergleich zu dem Typ-II Inhibitor binden sie nur in der allosterischen Binderegion der Kinase und stabilisieren zum Teil die DFG<sub>out</sub>-Konformation. Die vierte Klasse der Kinaseinhibitoren (z.B. HKI-272)<sup>[19]</sup> bindet kovalent innerhalb der ATP-Binderegion und führt zu einer irreversiblen Inhibierung der Kinaseaktivität.<sup>[9]</sup>

## 2. Aktueller Stand der Forschung und Zielsetzung

### 2.1 Stand der Forschung: Pyrazin-2-on-Serie (DFG<sub>in</sub>-Inhibitoren)

Die im Rahmen dieser Arbeit bearbeiteten 3,5-Diarylpyrazin-2-on PDGFR $\beta$ -Inhibitoren gehen auf den in der Arbeitsgruppe Peifer entwickelten hoch potenteren VEGFR2-Inhibitor **3** zurück. Dieser basiert auf einem Pyrrol-2-on-Derivat. Ausgehend von dieser Stoffklasse und der in der Literatur beschriebenen marinen Hamacathine **4**<sup>[26]</sup> wurde ein Hybrid, ein Pyrazin-2-on-Derivat **5**, aus beiden Strukturen entworfen (s. Abb. 6).<sup>[27]</sup> Mit Hilfe von *Molecular Modeling*-Studien konnte ein plausibler Bindemodus des Pyrazin-2-ons **5** zu der *hinge*-Region von VEGFR2 gezeigt werden.<sup>[27]</sup>

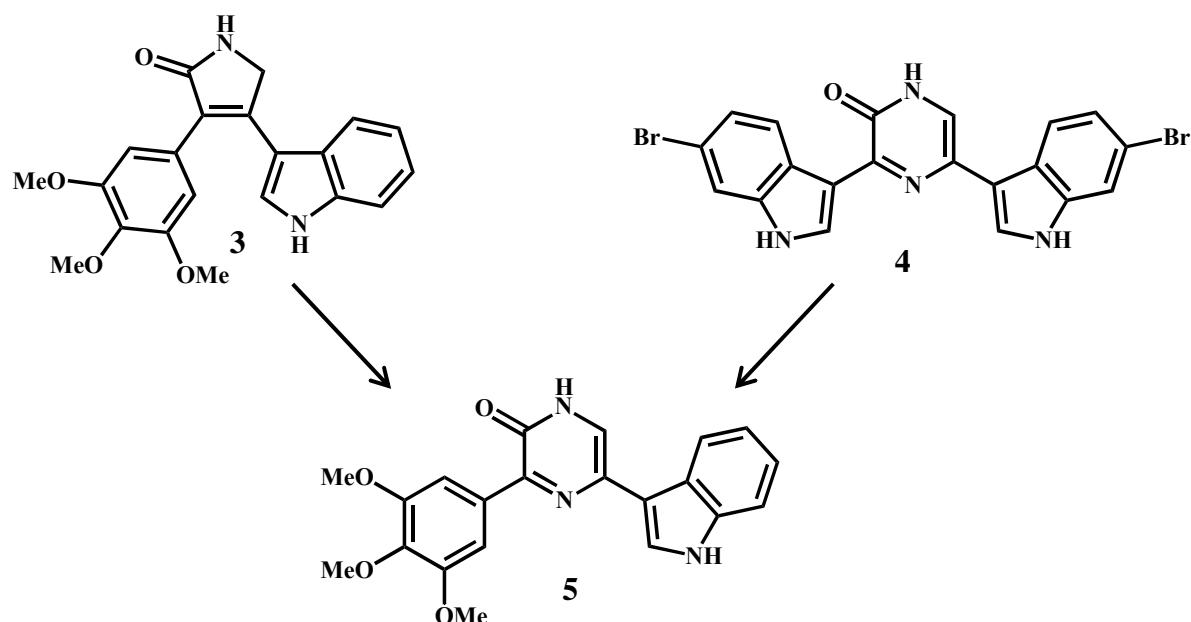


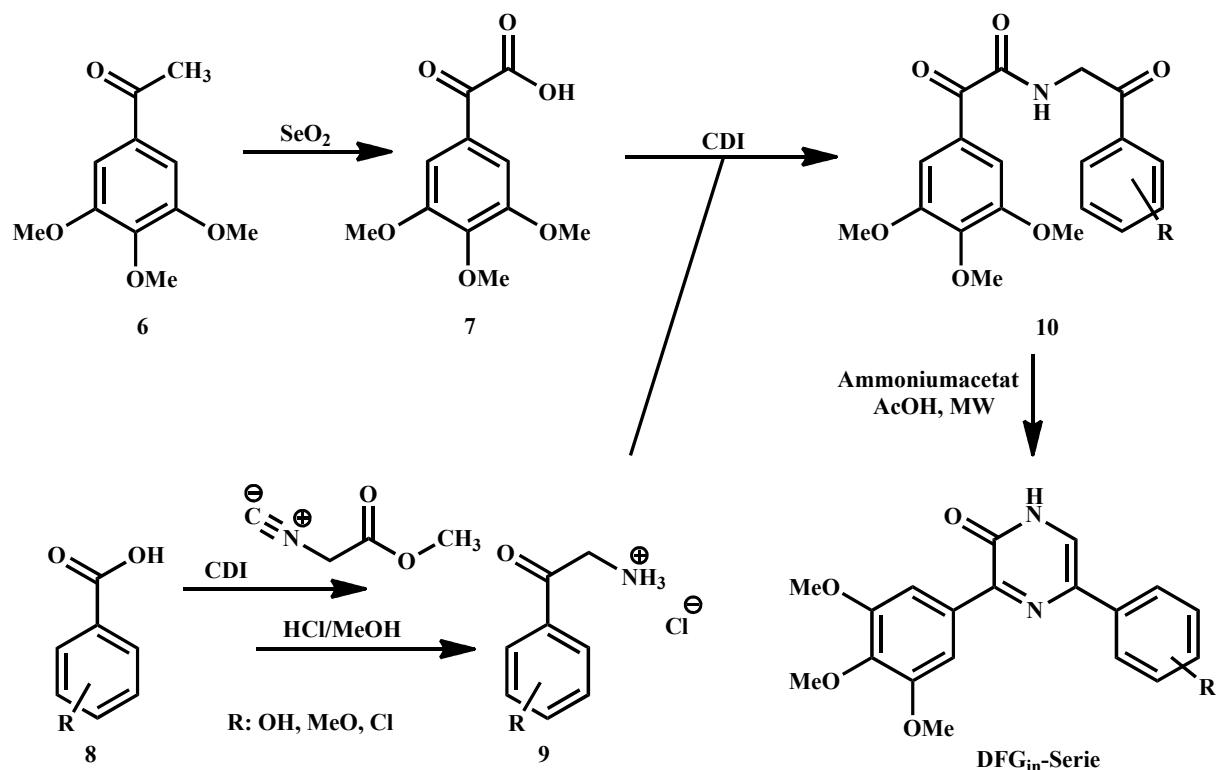
Abb. 6: Pyrrol-2-on **3**, modelliertes Hamacathin-Derivat **4** und 3,5-Diarylpyrazin-2(1H)-on **5**.

Das Pyrazin-2-on Derivat **5** konnte erfolgreich in fünf Schritten synthetisiert werden. Die Ergebnisse der biologischen Untersuchungen dieser Verbindung zeigten, dass der neu entwickelte Inhibitor **5** ( $IC_{50} = 2.3 \mu M$ ) im Vergleich zur Verbindung **3** ( $IC_{50} = 0.03 \mu M$ ) zwar eine Absenkung der Hemmaktivität gegenüber VEGFR2 aufwies, gleichzeitig aber eine Steigerung der Hemmaktivität ( $IC_{50} = 0.5 \mu M$ ) gegenüber PDGFR $\beta$  zeigte (s. Tab. 2).<sup>[27]</sup>

**Tabelle 2:** Hemmaktivität der Verbindungen **3** und **5** gegenüber VEGFR2 bzw. PDGFR $\beta$ .<sup>[22]</sup>

#	Verbindung	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M] (VEGFR2)	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M] (PDGFR $\beta$ )
<b>3</b>		0.03	11
<b>5</b>		2.3	0.5

Im Rahmen seiner Doktorarbeit konnte Schlosser die Syntheseroute zur Darstellung der 3,5-Diarylpyrazin-2-on-Derivate bezüglich der Reaktionsbedingungen optimieren (s. Abb. 7) und die Verbindung **5** zielgerichtet darstellen.<sup>[22][27]</sup>



**Abb. 7:** Syntheseroute zur Darstellung der 3,5-Diarylpyrazin-2-on-Derivate der DFG<sub>in</sub>-Serie. Die Darstellung der Glyoxylsäure **7** findet durch Oxidation des Ketons **6** mit SeO<sub>2</sub> statt. Die Synthese des  $\alpha$ -Ketoamins **9** als Hydrochlorid, ausgehend von der Benzoesäure **8**, konnte in zwei Schritten realisiert werden. Die Kupplung der Glyoxylsäure **7** mit dem  $\alpha$ -Ketoamin **9** wurde mit Hilfe von Carbonyldiimidazol (CDI) durchgeführt. Letzter Schritt: Der Ringschluss zum Pyrazinon konnte in Anwesenheit von Ammoniumacetat und AcOH in einer Mikrowelle durchgeführt werden.<sup>[28]</sup>

Die zielgerichtete Weiterentwicklung der Verbindung **5**, basierend auf den ermittelten Struktur-Wirkungsbeziehungen (SAR), wurde im Rahmen seiner Doktorarbeit von Schlosser durchgeführt. Dabei wurde zunächst eine virtuelle Optimierung mittels *Molecular Modeling*-Studien unter der Verwendung der *Schrödinger*-Software durchgeführt. Danach wurden die entworfenen Inhibitoren synthetisiert und anschließend durch biologische Testungen charakterisiert.<sup>[22][29]</sup>

Für die computergestützte Optimierung wurde zunächst eine Modellstruktur der Zielkinase (*target*) benötigt. Aufgrund von fehlenden Kristallstrukturdaten der Kinasedomäne von PDGFR $\beta$  in der *protein data bank* (PDB) wurden als erstes Homologiemodelle, abgeleitet von homologen Kinasekristallstrukturen, mit Hilfe der *Schrödinger*-Software erstellt. Zur Erstellung der Homologiemodelle wurde die auf der Homepage von kinase.com<sup>[30]</sup> veröffentlichte Aminosäuresequenz der Kinasedomäne von PDGFR $\beta$  verwendet. Diese Sequenz besteht aus 354 Aminosäuren und ist durch eine *kinase insert domain* (KID) erweitert. Das Fehlen von KID in den für das Homologiemodell ausgewählten Kinasekristallstrukturen sowie die Tatsache, dass die biologische Funktion der KID bisher noch nicht geklärt ist und sie außerhalb der ATP-Binderegion lokalisiert ist, führt zu der Annahme, dass die KID keinen relevanten Einfluss auf die Interaktion zwischen der Kinase und dem Liganden aufweist. Diese Hypothese wurde durch die Arbeiten von Gajiwala et al.<sup>[31]</sup> mit Sunitinib an der zu PDGFR $\beta$  verwandten Kinase c-kit (ebenfalls ohne KID) untermauert. Aus diesem Grund wurde der Teil der Aminosäuresequenz, der die KID kodiert, bei der Entwicklung des Homologiemodells herausgelöscht<sup>[22]</sup>. Für ein besseres Verständnis bezüglich des Bindemodus der entwickelten Inhibitoren und deren Zuordnung, ob sie in die aktive DFG<sub>in</sub>- bzw. in die inaktive DFG<sub>out</sub>-Konformation binden, wurden zwei unterschiedliche Homologiemodelle erstellt. Das DFG<sub>in</sub>-Modell basiert auf den Kristallstrukturen von FMS (PDB-Code: 3LCD) und VEGFR2 (PDB-Code: 2P2H) aufgrund ihrer hohen Verwandtschaft zu PDGFR $\beta$ . Das DFG<sub>out</sub>-Modell basiert auf der Kristallstruktur von c-kit (PDB-Code: 1T46). Bei der Auswahl der Templates wurde besonders darauf geachtet, dass zum einen die ausgewählte Kristallstruktur einen zu den im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Inhibitoren strukturell ähnlichen cokristallisierten Liganden aufweist und zum anderen eine hohe Übereinstimmung mit der Aminosäuresequenz von PDGFR aufzeigt: die Übereinstimmung der Sequenz ohne KID zu PDGFR $\beta$  liegt für FMS bei 66 %, für c-kit bei 62 % und für VEGFR2 bei 57 %. Die zwei erstellten Homologiemodelle wurden für die computergestützte Optimierung der DFG<sub>in</sub>- bzw. DFG<sub>out</sub>-Inhibitoren verwendet.<sup>[22]</sup>

Die von Schlosser durchgeführte virtuelle Optimierung erfolgte folgendermaßen: mit Hilfe der *Schrödinger*-Software wurde zunächst eine virtuelle Bibliothek mit unterschiedlich substituierten Pyrazin-2-on-Derivaten erstellt und anschließend unter Verwendung des DFG<sub>in</sub>-Homologiemodells in die ATP-Tasche gedockt. Die Dockingergebnisse wurden mittels einer *Scoring*-Funktion des Programms *GlideXP* quantifiziert. Ausgehend von dem Ranking wurden Kandidaten für Synthese und biochemische Charakterisierung ausgewählt. Die aus den *Docking*-Studien und den biochemischen Assays gewonnenen Erkenntnisse führten zu einer Aufstellung von Struktur-Wirkungsbeziehungen zwischen den Pyrazin-2-on-Derivaten und PDGFRβ. Im Verlauf der Optimierung wurden unterschiedliche Arylreste an den 3- bzw. 5-Positionen des Pyrazin-2-ons variiert. In 3-Position wurden Arylreste mit variabler Anzahl der Methoxysubstituenten in unterschiedlicher Position eingeführt, wobei der 3,4,5-Trimethoxyphenylsubstituent die beste biochemische Aktivität gegenüber PDGFRβ zeigte.<sup>[29]</sup> In 5-Position wurden verschiedene mono- bzw. disubstituierte Methoxy-, Chlor- und Hydroxyphe-nylreste eingeführt. Die SAR zeigten dabei, dass die Hydroxygruppe in *para*- und die Methoxygruppe in *meta*-Stellung die beste Hemmung erzielten.

Die Analyse der biologischen Daten der Verbindung **1** ( $IC_{50} = 0.02 \mu M$ ) zeigten, dass die Kombination dieser Substitutionsmuster zu einer Erhöhung der Hemmaktivität gegenüber PDGFRβ im Vergleich zu der Verbindung **5** ( $IC_{50} = 0.5 \mu M$ ) um den Faktor 25 führt (s. Abb. 8).<sup>[22][29]</sup>

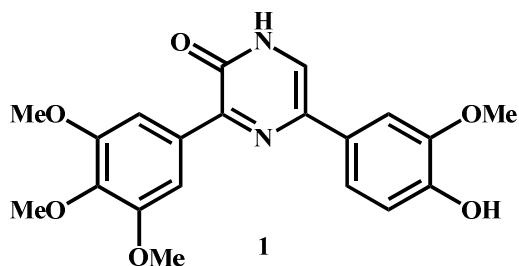
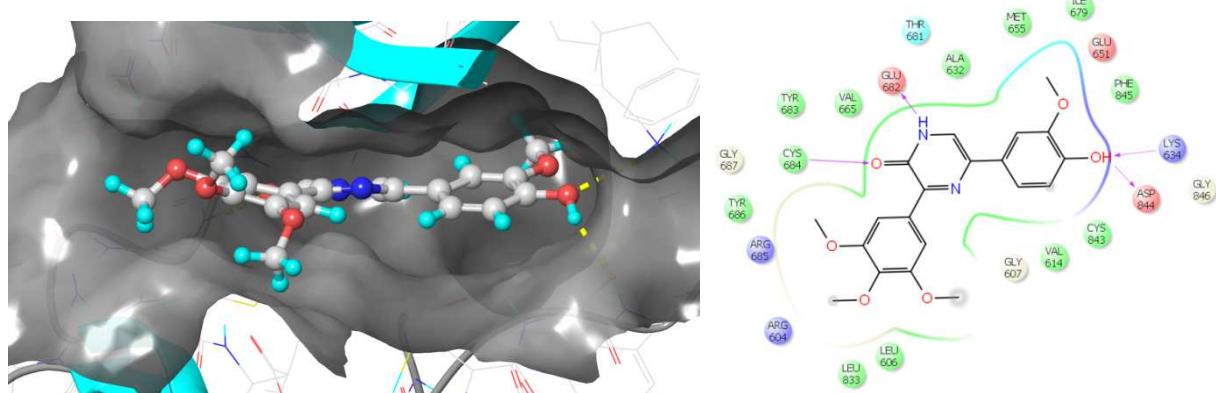


Abb. 8: 5-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-(1*H*)-pyrazin-2-on (**1**), PDGFRβ  $IC_{50} = 0.02 \mu M$ .<sup>[22][29]</sup>

Der modellierte Bindemodus und die berechneten Interaktionen der Verbindung **1** mit PDGFRβ wurden mittels einer dreidimensionalen Darstellung der Bindetasche (s. Abb. 9, links) und einer zweidimensionalen Darstellung durch ein sog. Ligand-Interaktion-Diagramm (s. Abb. 9, rechts) visualisiert. Aus Abbildung 9 (links) geht hervor, dass der genannte Inhibitor **1** sehr gut in die Bindetasche der aktiven Konformation (DFG<sub>in</sub>) von PDGFRβ passt, wobei der Pyrazinonring zwei Wasserstoffbrückenbindungen (kurz H-Brückenbindungen) zu den Aminosäuren Glu682 und Cys684 der *hinge*-Region ausbildet (s. Abb. 9, rechts). Zusätz-

lich dient die *para*-ständige Hydroxygruppe am Phenylrest sowohl als H-Brückendoron als auch als H-Brückenakzeptor und bildet H-Brückenbindungen zu den Aminosäuren Lys634 und Asp844 des Aktivierungsloops aus. Diese zusätzliche Bindung zu dem Protein im Vergleich zu der Verbindung **5** sorgt für eine Erhöhung der Affinität des Inhibitors zu der PDGFR $\beta$ -Bindetasche.<sup>[22][29]</sup>

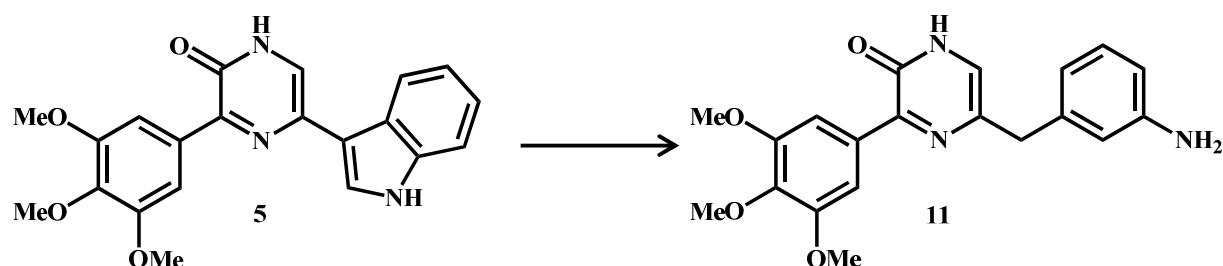


**Abb. 9:** Darstellung des modellierten Bindemodus der Verbindung **1** im DFG<sub>in</sub>-Homologiemodell von PDGFR $\beta$ . **Links:** In der Bindetasche (dargestellt durch die graue Oberfläche) der aktiven Kinase ist der DFG<sub>in</sub>-Inhibitor **1** (grau) gebunden. Gelbe, gestrichelte Linien deuten Wasserstoffbrückenbindungen an. **Rechts:** Das Liganden-Interaktions-Diagramm zeigt den Bindemodus des DFG<sub>in</sub>-Inhibitoren **1** an. Die unterschiedlich gefärbten Kugeln stellen die Aminosäuren des Proteins dar. Die roten Pfeile deuten die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Ligand und Protein an. Visualisierung durch Schrödinger-Software (Release 2015-1).

Die von Schlosser entwickelte Verbindung **1** diente im Rahmen dieser Arbeit als Leitstruktur zur Optimierung der DFG<sub>in</sub>-Serie.

## 2.2 Stand der Forschung: Pyrazin-2-on-Serie (DFG<sub>out</sub>-Inhibitoren)

Bei der Entwicklung der DFG<sub>out</sub>-Serie diente analog zu der DFG<sub>in</sub>-Serie das an 3-Position durch Indol substituierte Pyrazin-2-on **5** als Vorlage. Im Rahmen seiner Doktorarbeit wurden von Schlosser zu Beginn unterschiedlich substituierte Indol-Derivate design, synthetisiert und biochemisch untersucht. Doch sowohl die berechneten *Molecular Docking*-Ergebnisse als auch die biologischen Untersuchungen der synthetisierten Verbindungen sorgten nicht für die anvisierte Steigerung der Affinität der entwickelten Inhibitoren gegenüber PDGFR $\beta$ .<sup>[22]</sup> Erst der Austausch des Indols durch einen flexiblen Benzylrest brachte den Durchbruch und sorgte für eine Adressierung der inaktiven Konformation (DFG<sub>out</sub>) der Kinase (s. Abb. 10). In der DFG<sub>out</sub>-Konformation ragt der Phenylrest des DFG-Motivs in die ATP-Binderegion und blockiert so die Bindung des Co-Faktors ATP in der Bindetasche. Gleichzeitig wird aber der Zugang zu der tiefen Tasche (*deep pocket*) frei gelegt. Dadurch ist der Inhibitor in der Lage, die tiefe Tasche zu adressieren, *vide supra*.



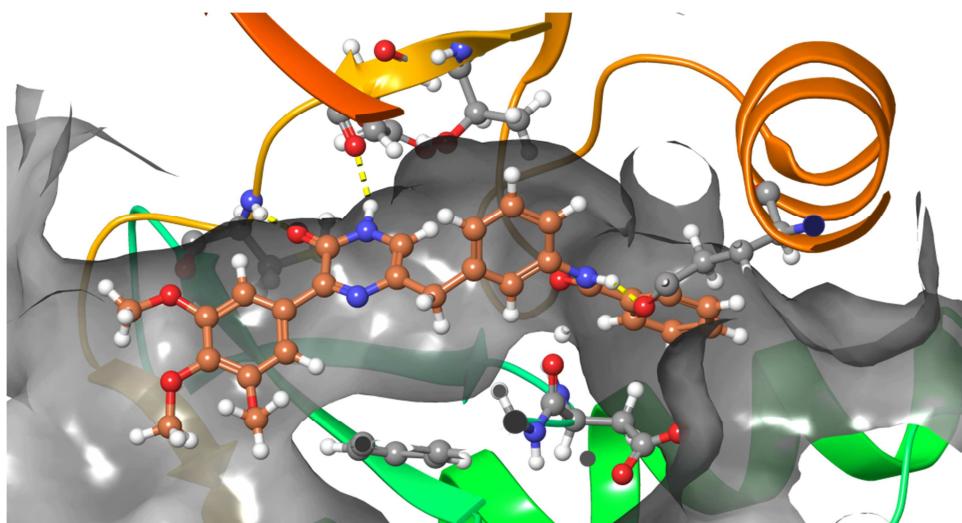
**Abb. 10:** Konzeptidee: strukturelle Reduktion des Indols in **5** unter Ausbildung einer flexiblen Aminobenzylfunktion in **11**.<sup>[22]</sup>

Während der strukturbasierten Optimierung des Benzylrestes wurden Monosubstituenten ( $\text{OH}$ ,  $\text{NH}_2$ ,  $\text{CH}_3$  bzw.  $\text{OMe}$ ) in unterschiedlichen Positionen eingesetzt.<sup>[22]</sup> Die Einführung der Aminogruppe in der *meta*-Position am Benzylrest zeigte in den *Molecular Docking*-Studien die besten Ergebnisse gegenüber der  $\text{DFG}_{\text{out}}$ -Konformation von  $\text{PDGFR}\beta$  (Verbindung **11**).<sup>[22]</sup> Eine weitere Verbesserung brachte ein zusätzlicher Benzoylerst am Aminogruppe des Aromaten (s. Tab. 3, Verbindung **12**). Der während der *Docking*-Studien berechnete Bindemodus der Verbindung **12** zeigt, dass der Pyrazin-2-on-Ring analog zu den entwickelten Inhibitoren der  $\text{DFG}_{\text{in}}$ -Serie zwei Wasserstoffbrückenbindungen zu der *hinge*-Region ausbildet. Zusätzlich bildet die eingeführte Amidgruppe eine Wasserstoffbrückenbindung zu der Aminosäure Glu651 aus, wobei die endständige Benzylgruppe die tiefe Tasche adressiert (s. Abb. 11). Sowohl die berechnete Affinität der Verbindung **12** gegenüber  $\text{PDGFR}\beta$  als auch die biochemische Aktivität ( $\text{IC}_{50} = 0.1 \mu\text{M}$ ) im Vergleich zu der Verbindung **11** ( $\text{IC}_{50} = 7.6 \mu\text{M}$ ) konnten durch diese strukturelle Variation gesteigert werden (s. Tab. 3).<sup>[22]</sup>

**Tabelle 3:**  $\text{PDGFR}\beta$   $\text{DFG}_{\text{out}}$ -Inhibitoren. *Schrödinger GlideXP* beinhaltet die *Scoring*-Funktion. Die  $\text{IC}_{50}$ -Werte beziehen sich auf  $\text{PDGFR}\beta$ .<sup>[22]</sup>

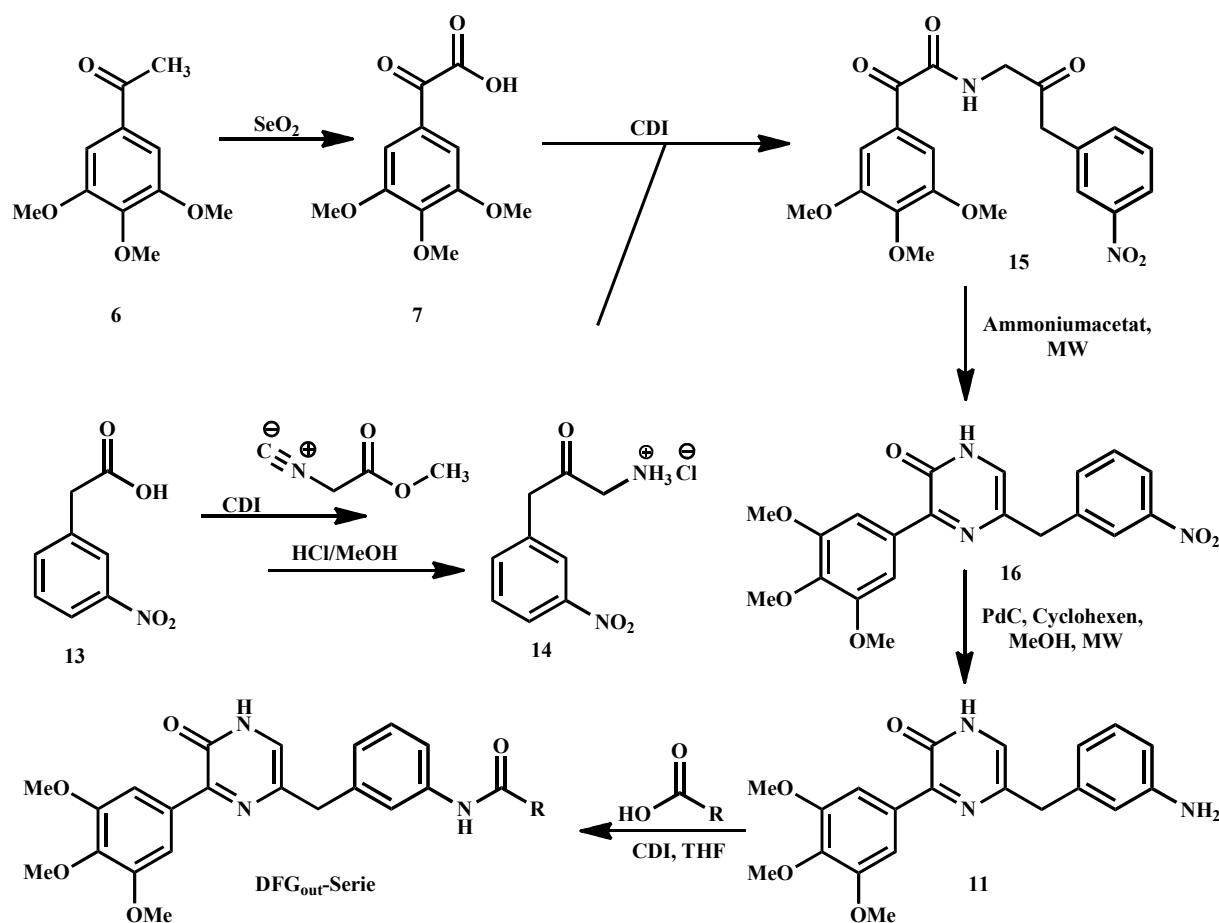
#	R	Score (GlideXP)	$\text{IC}_{50} [\mu\text{M}]$
<b>11</b>		-13.1	7.6
<b>12</b>		-15.6	0.1

Eine strukturelle Analyse der *deep pocket* zeigt, dass in diesem Bereich noch Raum für größere lipophile Substituenten vorhanden ist (s. Abb. 11).



**Abb. 11:** Modellierter Bindungsmodus der Verbindung **12** in der inaktiven  $\text{DFG}_{\text{out}}$ -Konformation des  $\text{PDGFR}\beta$  Homologiemodells. Berechnet und dargestellt mit *GlideXP*, *Schrödinger*.

Die Darstellung der auf Pyrazin-2-on basierenden  $\text{DFG}_{\text{out}}$ -Serie wurde durch eine Anpassung der Syntheseroute der  $\text{DFG}_{\text{in}}$ -Serie realisiert (s. Abb. 12). Im Vergleich zu der  $\text{DFG}_{\text{in}}$ -Serie wurden anstelle einer Benzoësäure eine 3-Nitrophenylessigsäure (**13**) eingesetzt. Nach der Ringschlussreaktion zu einem Pyrazinon **16** in der Mikrowelle wurde die Nitrogruppe zum Amin reduziert. Das durch die Reduktion gebildete Amin **11** diente im Rahmen dieser Arbeit als *Building Block* für die Darstellung von weiteren auf Pyrazin-2-on basierenden  $\text{DFG}_{\text{out}}$ -Inhibitoren durch eine Kupplung von unterschiedlichen Substituenten an die Aminogruppe (s. Abb. 12). Der von Schlosser entwickelte  $\text{DFG}_{\text{out}}$ -Inhibitor **12** diente im Rahmen dieser Arbeit als Grundlage für die Entwicklung und Optimierung der  $\text{DFG}_{\text{out}}$ -Serie.



**Abb. 12:** Syntheseroute zur Darstellung der Pyrazin-2-on-Derivate der  $\text{DFG}_{\text{out}}$ -Serie. Die Darstellung der Glyoxylsäure **7** findet durch Oxidation des Ketons **6** mit  $\text{SeO}_2$  statt. Die Synthese des Hydrochlorids **14**, ausgehend von einer 3-Nitrophenylessigsäure (**13**), verläuft in zwei Schritten. Die Kupplung der Glyoxylsäure **7** mit dem  $\alpha$ -Ketoamin **14** wird mit Hilfe von Carbonyldiimidazol (CDI) durchgeführt. Der Ringschluss zu einem Pyrazinon **16** findet in Anwesenheit von Ammoniumacetat als N-Quelle in der Mikrowelle statt. Die anschließende Reduktion der Nitrogruppe wird mit Hilfe von  $\text{Pd/C}$ , Cyclohexen und  $\text{MeOH}$  in der Mikrowelle realisiert. Der letzte Syntheseschritt ist eine Amidkupplung.<sup>[28]</sup> Die unterschiedlichen Reste (R) der Amidsubstituenten werden im Kapitel 3.2 thematisiert.

### 2.3 Zielsetzung für beide Pyrazin-2-on-Serien ( $\text{DFG}_{\text{in/out}}$ )

Für die Entwicklung von Kinaseinhibitoren gilt, dass die *small molecules* eine höhere Affinität zu der Bindetasche aufweisen sollten als ATP. Idealerweise sollten sie außerdem hochselektiv gegenüber der Zielkinase sein. Des Weiteren sollten diese die Lipinski Regeln (*Rule of Five*)<sup>[32]</sup> erfüllen und eine gute Bioverfügbarkeit aufweisen.

Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit folgende Hauptziele für die Bearbeitung der Pyrazin-2-on-Derivate der  $\text{DFG}_{\text{in}}$ -Serie formuliert:

1. Strukturbasierte Optimierung des Pyrazin-2-ons **1** hinsichtlich Affinität und Selektivität gegenüber PDGFR $\beta$  mit Hilfe von *Molecular Modeling*-Studien.
2. Aufstellung von Struktur-Wirkungsbeziehungen (SAR) zwischen den elektronenziehenden bzw. elektronenschiebenden Substituenten in der *meta*-Position und der Bindaffinität der *para*-OH-Gruppe zu dem Protein.
3. Optimierung der etablierten Syntheseroute (s. Abb. 7).
4. Synthese und biochemische Validierung der entwickelten Inhibitoren.
5. Prüfung auf UV-Stabilität des Pyrazinons und gegebenenfalls Schützung des Inhibitors mit einer UV-labilen Schutzgruppe zur Darstellung eines photoaktivierbaren *Prodrugs*.

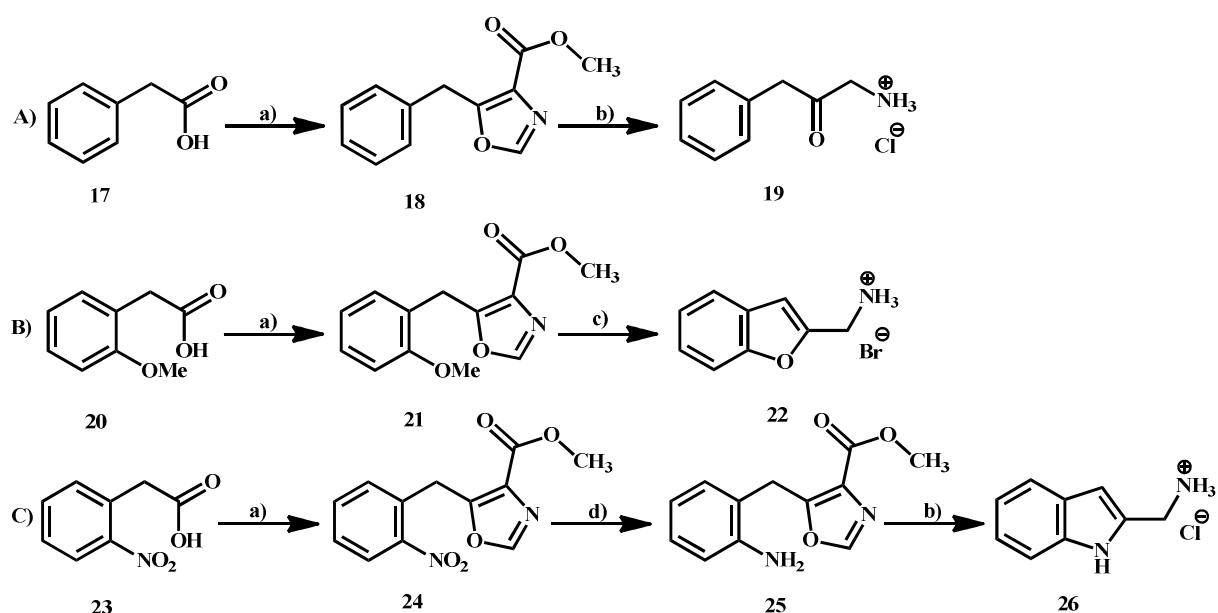
Analog zu dem DFG<sub>in</sub>-Projekt wurden folgende Hauptziele im Rahmen dieser Arbeit für die Bearbeitung der Pyrazin-2-on-Derivate der DFG<sub>out</sub>-Serie formuliert:

1. Strukturbasierte Optimierung der Leitstruktur **12** und Berechnung von Bindemodi zu PDGFR $\beta$  mit Hilfe von *Molecular Modeling*-Studien.
2. Optimierung der etablierten Syntheseroute (s. Abb. 12).
3. Synthese und Verifizierung der biologischen Aktivität Kinaseaktivitätsassays und Zellproliferationsassays.
4. Gegenüberstellung von DFG<sub>in</sub>- (Typ-I) und DFG<sub>out</sub>- (Typ-II) -Inhibitoren bezüglich ihrer Selektivität und Affinität gegenüber PDGFR $\beta$  am Beispiel der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Pyrazin-2-on-Inhibitoren.

## 2.4 Neue Darstellungsmethode von Indol-2-ylmethylamin- und Benzofuran-2-ylmethylamin-Derivaten

Benzofuran- und Indol-Derivate findet man in vielen natürlichen, biologisch und pharmakologisch aktiven Verbindungen als Teil der Strukturen wieder.<sup>[33][34][35]</sup> Daher spielt das Finden von neuen Darstellungsmethoden dieser als *Building Block* genutzten Strukturen eine wichtige Rolle in der pharmazeutischen Chemie bei der Entwicklung von neuen pharmakologisch wirksamen Verbindungen. In der Literatur sind bereits zahlreiche Methoden zur Darstellung von Indol- bzw. Benzofuran-Derivaten beschrieben.<sup>[36][37]</sup> Jedoch sind nur wenige Synthesemethoden zur Darstellung von Heteroaryl-2-ylmethylaminen bekannt.<sup>[34][38][39]</sup> Die beschriebenen Synthesemethoden benötigen kostenintensive bzw. schwer zugängige Edukte, häufig handelt es sich auch um Patente. Im Rahmen seiner Doktorarbeit entdeckte Schlosser eine alternative Darstellungsmethode von Indol-2-yl-methylamin und Benzofuran-2-yl-methylamin-Derivaten.

Diese neue Methode wurde im Rahmen der Synthese der auf Pyrazin-2-on basierenden DFG<sub>out</sub>-Inhibitoren während der Darstellung des  $\alpha$ -Ketoamins **19** entdeckt (s. Abb. 13).<sup>[22][40]</sup> Wie man in der Abbildung 13 (A) erkennen kann, verläuft die Darstellung des  $\alpha$ -Ketoamins **19** in zwei Syntheseschritten. Zuerst wird ein Oxazol mit Hilfe von 2-Isocyano-methylessigester und CDI synthetisiert. Anschließend wird dieses unter der Verwendung von konz. HCl unter Rückfluss gespalten. Dabei entsteht das Hydrochlorid des  $\alpha$ -Ketoamins, das es vor Dimerisierung schützt.<sup>[28]</sup> Im Verlauf der Darstellung von unterschiedlich substituierten  $\alpha$ -Ketoaminen sollte ein an der *meta*-Position durch eine Hydroxygruppe substituiertes  $\alpha$ -Ketoamin synthetisiert werden. Ausgehend von der 2-Methoxyphenylessigsäure **20** wurde das Oxazol **21** erfolgreich dargestellt. Die anschließende saure Spaltung des Methyl-5-(2-methoxybenzyl)-1,3-oxazol-4-carboxylats (**21**) mit HBr führte entgegen unserer Erwartung nicht zum gewünschten  $\alpha$ -Ketoamin, sondern in hoher Ausbeute zum Benzofuran-2-yl-methylamin (**22**) (s. Abb. 13 B). Basierend auf dieser Darstellungsmethode entstand die Idee, ausgehend von einer 2-Nitrophenylessigsäure (**23**) eine analoge Synthesemethode zu der Darstellung von Indol-2-yl-methylamin-Derivaten **26** durchzuführen (s. Abb. 13 C).



**Abb. 13:** **A)** Darstellung des  $\alpha$ -Ketoamins **19** ausgehend von Phenylessigsäure (**17**). **B)** Darstellung des Benzofurans **22** ausgehend von 2-Methoxyphenylessigsäure (**20**). **C)** Darstellung von Indol-2-yl-methylamin **26**, ausgehend von der 2-Nitrophenylessigsäure (**23**), in drei Syntheseschritten. Die Reaktionen wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt:  
**a** 1. CDI; 2. 2-Isocyanomethyl ester; **b** HCl, MeOH (1:1), Rückfluss; **c** HBr, Rückfluss; **d** Pd/C, Cyclohexen, MeOH, MW.

Die Darstellung der Indol-Derivate gelang in drei Schritten. Nach der Synthese des Oxazols **24** wurde die Nitrogruppe mit Hilfe eines Pd/C Katalysators und Cyclohexen in der Mikrowelle zum Amin reduziert. Die anschließende Oxazolspaltung und der dadurch induzierte Ringschluss zum Indol **26** wurde durch eine Reaktion in HCl unter Rückfluss realisiert (s. Abb. 13 C).

#### 2.4.1 Zielsetzung zur Darstellung von Indol-Derivaten

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden folgende Ziele festgelegt:

1. Optimierung der Syntheseroute (s. Abb. 13 C). Die optimierten Reaktionsbedingungen sollten anschließend bei der Synthese der  $\alpha$ -Ketoamin-Derivate (DFG<sub>in/out</sub>-Serien) angewendet werden (vgl. Kap. 4).
2. Untersuchung der elektronischen Einflüsse (-/+I und -/+M) von verschiedenen Substituenten an der 2-Nitrophenylessigsäure auf die Robustheit der neuartigen Syntheseroute.

### 3. Computergestützte Leitstrukturoptimierung

Bei der Leitstrukturoptimierung existieren unterschiedliche Herangehensweisen. Im Jahr 1972 stellte J. Topliss<sup>[3]</sup> eine neue Strategie zur Optimierung von Substitutionsmustern von aromatischen Verbindungen vor. Bei dieser Methode wird ein aromatisches Wasserstoffatom formal durch z.B. ein Chloratom oder eine Hydroxygruppe ausgetauscht und die Verbindung anschließend experimentell auf ihre Bioaktivität analysiert. Das Substitutionsmuster mit der stärkeren bioaktiven Wirkung wird für die nachfolgende Variation als Orientierungspunkt verwendet. Dabei werden Substituenten mit ähnlichen, aber stärker ausgeprägten physiko-chemischen Eigenschaften ausgewählt und auf eine verbesserte Aktivität untersucht. Kommt es durch die Einführung eines Substituenten zu einer Erniedrigung der Bioaktivität, so werden Substituenten mit entgegengesetzten physikochemischen Eigenschaften ausgewählt.<sup>[3]</sup> Diese Strategie kann auch bei einer computergestützten Optimierung angewendet werden, wobei die berechnete Voraussage der Bioaktivität an die Stelle der experimentellen Bestimmung tritt.

Für eine effiziente computergestützte Optimierung der Leitstrukturen **1** und **12** wurde die *Schödinger*-Software verwendet. Dabei wurden die bereits von J. Schlosser im Rahmen seiner Doktorarbeit<sup>[22]</sup> aufgestellten Struktur-Wirkungsbeziehungen berücksichtigt (s. Kap. 2).

#### 3.1 Software

Bei der verwendeten Software „Maestro“ der Fa. *Schrödinger* handelt es sich um eine graphische Bedienungsoberfläche, die Zugriff auf verschiedene *Molecular Modelling*-Programme wie „MacroModel“<sup>[41]</sup>, „LigPrep“<sup>[42]</sup>, „ConfGen“<sup>[43]</sup> und „Glide“<sup>[44][45]</sup> bietet. Zunächst wurde eine virtuelle Bibliothek zweidimensional gezeichneter Moleküle erstellt. Anschließend wurden die Moleküle mit Hilfe der Software in eine dreidimensionale Form umgewandelt. Bevor die virtuelle Bibliothek in eine 3D-Struktur des Zielproteins gedockt werden konnte, mussten die Moleküle in mehreren Schritten vorbereitet werden. Im ersten Schritt wurde mit Hilfe des Programms „MacroModel“ unter der Verwendung des Kraftfelds *optimized Potential for Liquid Simulations* (OPLS\_2005) ein lokales Minimum der dreidimensionalen Struktur berechnet. Als nächstes wurden mit Hilfe des Programms „LigPrep“ mögliche Enantiomere, Tautomere und Ionisierungszustände in einem pH-Bereich zwischen 5 und 9 berechnet. Der letzte vorbereitende Schritt wurde mittels „ConfGen“<sup>[43]</sup> durchgeführt, wobei eine Vielzahl von Konformeren erzeugt wurde. Dadurch wird eine mögliche Anpassung des Liganden an das

Zielprotein simuliert. Beim anschließenden *Ligand-Receptor-Docking* mittels „Glide“<sup>[44][45]</sup> (*grid-based ligand docking with energetics*) werden die zuvor prozessierten Liganden in das starre kristallstruktur-basierte Homologiemodell von PDGFR $\beta$  gedockt. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Homologiemodelle (DFG<sub>in/out</sub>) des PDGF-Rezeptors verwendet (vgl. Kap. 2.1). Während des *Docking*-Vorganges wurden von dem Programm neben den unterschiedlichen Konformationen auch mögliche Wasserstoffbrücken- und Salzbindungen zwischen dem Liganden und dem Protein sowie energetisch günstige bzw. ungünstige Wechselwirkungen zu der Binderegion berechnet. Die berechneten Dockingergebnisse wurden abschließend tabellarisch in Form eines Rankings unter der Angabe eines sog *Glidescores* dargestellt. Der *Glidescore* korreliert im Idealfall mit der freien Bindungsenthalpie  $\Delta G$  und setzt sich wie folgt zusammen:

$$\text{Glidescore} = 0.065 \cdot \text{vdW} + 0.130 \cdot \text{Coul} + \text{Lipo} + \text{Hbond} + \text{Metal} + \text{BuryP} + \text{RotB} + \text{Site} \quad (1)$$

mit	vdW	Van-der-Waals-Energie
	Coul	Coulomb-Energie
	Lipo	Lipophile Wechselwirkungen
	Hbond	Wasserstoffbrückenbindungen
	Metal	Metallbindungen
	BuryP	Abzug für vergrabene Ladungen
	RotB	Abzug für blockierte rotierbare Bindungen
	Site	Polare Wechselwirkungen im aktiven Zentrum

Je negativer der Wert des Glidescores, desto höher ist die berechnete Bindungsaffinität des Liganden zum Protein. Die berechneten pK<sub>a</sub>-Werte wurden mit dem Programm „Epic“<sup>[46]</sup> annäherungsweise bestimmt.

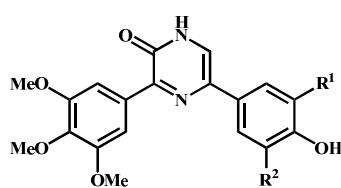
### 3.2 Ergebnisse der computergestützten Docking-Studien (DFG<sub>in</sub>-Serie)

In den nachfolgenden Abschnitten werden die Ergebnisse der *Molecular Docking*-Studien unter Angabe des *Glidescores* dargestellt. Diese Ergebnisse dienten im Rahmen der Bachelor-Arbeit von D. Schmidt<sup>[47]</sup> als Auswahlkriterium der Verbindungen, die synthetisiert und biochemisch verifiziert werden sollten.

#### 3.2.1 Elektronischer Einfluss des *meta*-Substituenten

Im Rahmen der Bachelor-Arbeit wurde von D. Schmidt<sup>[47]</sup> der elektronische Einfluss von *meta*-Substituenten des 4-Hydroxyphenylrestes des Pyrazinons **1** auf die Bindeaffinität der *para*-Hydroxygruppe gegenüber PDGFR $\beta$  durch die Auswahl von unterschiedlichen Resten mit verschiedenen induktiven und mesomeren Einflüssen untersucht. In Tabelle 4 sind neben den Ergebnissen der Dockingstudien zusätzlich die mit „Epik“ berechneten pKa-Werte zur Abschätzung der Acidität der *para*-Hydroxygruppe, abhängig von dem *meta*-Substituenten, zusammengefasst.

**Tabelle 4:** Dockingergebnisse der Verbindungen **1**, **27-38** an PDGFR $\beta$  (Homologiemodell DFG<sub>in</sub>).



#	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	pKa <sup>a</sup>	Glidescore
<b>1</b>	-OMe	-H	9.8	-11.5
<b>27</b>	-OMe	-OMe	9.8	-11.5
<b>28</b>	-CH <sub>3</sub>	-H	10.3	-10.7
<b>29</b>	-H	-H	9.8	-10.9
<b>30</b>	-N(Me) <sub>2</sub>	-H	12.0	-11.0
<b>31</b>	-NH <sub>2</sub>	-H	9.7	-10.8
<b>32</b>	-OH	-H	9.8	-11.5
<b>33</b>	-Cl	-H	8.5	-10.6
<b>34</b>	-F	-H	8.7	-10.8
<b>35</b>	-NO <sub>2</sub>	-H	7.0	-10.6
<b>36</b>	- <sup>+</sup> N(Me) <sub>3</sub>	-H	7.7	-11.6
<b>37</b>	-Cl	-Cl	7.1	-10.1
<b>38</b>	-NO <sub>2</sub>	-NO <sub>2</sub>	3.7	-9.8

<sup>a</sup> Berechnete pK<sub>a</sub>-Werte der phenolischen Hydroxygruppe in H<sub>2</sub>O (Epik).

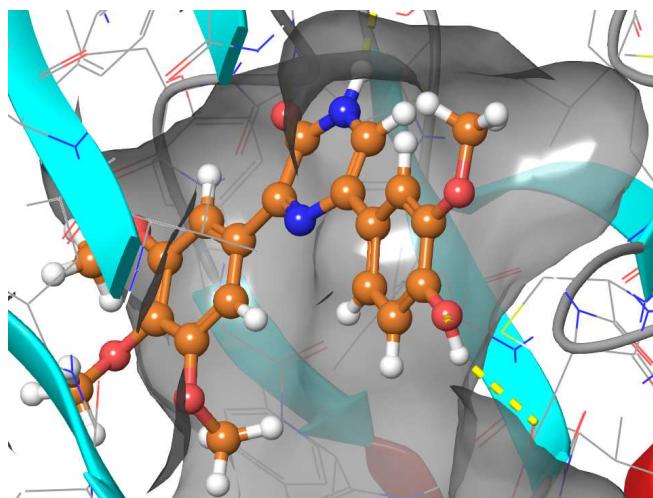
Die in der Tabelle 4 aufgelisteten Verbindungen weisen elektronenschiebende (Verbindungen **1**, **27-32**) bzw. elektronenziehende (Verbindungen **34-38**) Substituenten in *meta*-Stellung auf. Durch einen elektronenziehenden Substituenten mit einem -I- bzw. einem -M-Effekt an der *meta*-Position sollte die phenolische Hydroxygruppe stärker polarisiert werden. Dadurch

könnten die Wasserstoffbrückenbindungen zu den Aminosäuren Asp844 und Lys634 des Proteins verstärkt und somit die Bindeaffinität des Liganden zu dem Protein erhöht werden. Die stärkere Polarisierung der *para*-Hydroxygruppe führt zu einer erhöhten Acidität. In Abhängigkeit von dem pH-Wert kann daher die Ausbildung eines Phenolat-Ions begünstigt werden. Zwischen diesem und der Aminogruppe des Lys634 können ionische Bindungen ausgebildet werden, wodurch die Bindeaffinität gegenüber PDGFR $\beta$  weiter erhöht werden kann.

Anhand der Tabelle 4 lässt sich erkennen, dass die berechnete Acidität der 4-Hydroxygruppe in Abhängigkeit der elektronenschiebenden Substituenten entweder ähnlich zu der Acidität der Leitstruktur **1** bleibt (Verbindungen **27-30** und **32**) oder durch den Aminosubstituenten (Verbindung **31**, pKa = 12) gesenkt wird. Im Gegensatz dazu tragen die elektronenziehenden *meta*-Substituenten der Verbindungen **33-38** zur Erhöhung der Acidität der phenolischen Hydroxygruppe bei. Besonders der Einsatz von zwei Nitro-Gruppen in den *meta*-Positionen zeigte die stärkste Abnahme des berechneten pKa-Wertes (Verbindung **38**, pKa = 3.7) im Vergleich zu der Verbindung **1** (pKa = 9.8). Aufgrund von minimalen Schwankungen des berechneten *Glidescores* der entsprechenden Verbindungen im Bereich zwischen -9.8 und -11.5 konnte keine Korrelation zwischen der höheren Acidität und der berechneten Bindeaffinität (*Glidescore*) festgestellt werden. Auf der Grundlage der *Molecular Modeling*-Ergebnisse können an dieser Stelle keinen eindeutigen Aussagen bezüglich des elektronischen Einflusses der *meta*-Substituenten auf die Erhöhung der Bindeaffinität der Pyrazin-2-on DFG<sub>in</sub>-Inhibitoren gegenüber PDGFR $\beta$  getroffen werden und müssen mittels biochemischer Assays untersucht werden.

### 3.2.2 Sterischer Einfluss der *meta*-Substituenten

Ein anderer Ansatz für die Optimierung war die Untersuchung der sterischen Einflüsse von verschiedenen großen *meta*-Substituenten. Betrachtet man die Binderegion des 4-Hydroxy-3-methoxyphenyls, erkennt man, dass dort Raum für größere Reste im Vergleich zu der Methoxygruppe vorhanden ist (s. Abb. 14).



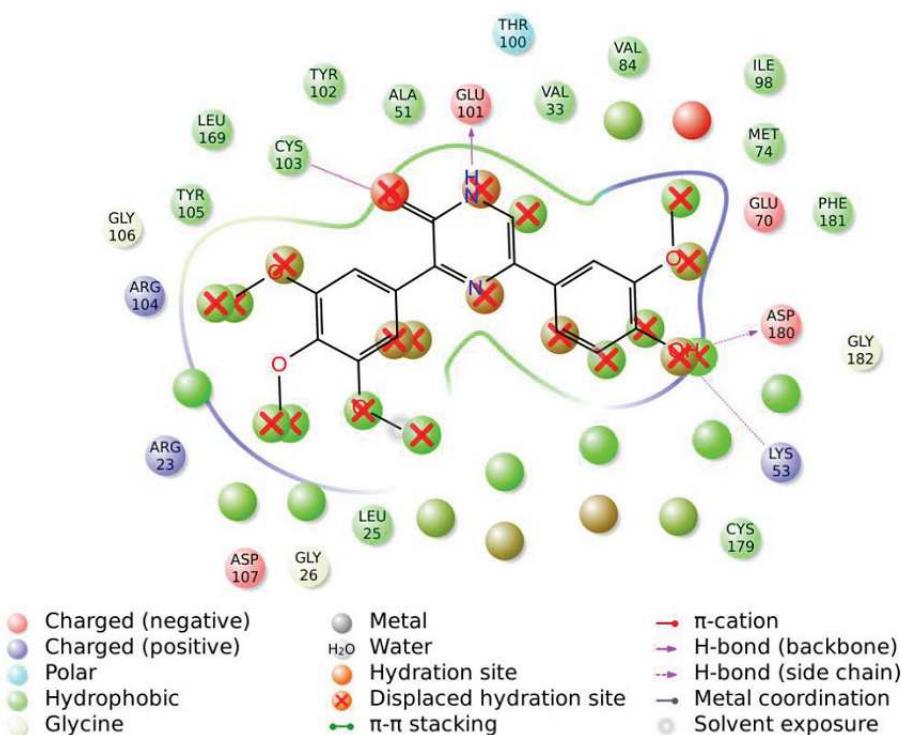
**Abb. 14:** Ausschnitt aus dem Bindemodus der Verbindung 1 (braun) in PDGFR $\beta$ . Die Oberfläche der Bindetasche ist grau dargestellt. Bei der abgebildeten dreidimensionalen Struktur handelt es sich ein Homologiemodell der DFG<sub>in</sub>-Konformation.

Um die Bindetasche in dieser Region besser auszufüllen, sind verschiedene Substituenten wie Alkylether (Ethoxy, Propoxy), Alkylreste (Ethyl, Propyl, *i*-Propyl), primäre Amine, sekundäre Amine und weitere Substituenten denkbar (s. Tab. 5).

Biochemische Prozesse im menschlichen Körper finden im wässrigen Milieu statt, weshalb sich Wassermoleküle in der unbesetzten Bindetasche befinden.<sup>[3]</sup> Durch die Bindung eines Liganden in der Bindetasche kommt es in der Binderegion zu einer Verdrängung dieser Wassermoleküle. Energetisch labile Wassermoleküle, die sich in hydrophoben Bereichen der Bindetasche befinden, können keine H-Brückenbindungen zu dem Protein ausbilden und tragen deshalb beim Verdrängen durch den Liganden zu einer Erhöhung der Entropie (entropisches Wasser) bei. Die daraus resultierende Erhöhung der Entropie wirkt sich positiv auf den Betrag der freien Bindungsenthalpie ( $\Delta G$ ) aus.<sup>[3]</sup> Das Verdrängen von Wassermolekülen, die sich dagegen in hydrophilen Bereichen der Bindetasche befinden und H-Brückenbindungen zu dem Protein ausbilden, wirkt sich thermodynamisch ungünstig auf die freie Bindungsenthalpie aus. Wird aber eines dieser Wassermoleküle durch einen hydrophilen Rest eines Liganden, der Wasserstoffbrückenbindungen zu dem Protein ausbildet, ersetzt, kommt es zu keinem ne-

gativen Einfluss auf die Bindungsenthalpie.<sup>[29]</sup> Die Bindung des Liganden führt allerdings ebenfalls zu einer Limitierung der Freiheitsgrade des Liganden und sorgt deshalb für eine Erniedrigung der Entropie. Ob die Bindungsenthalpie erhöht bzw. erniedrigt wird, hängt von der Summe aller Beiträge ab.

Um den Beitrag des verdrängten Wassers zu der Bindeaffinität berechnen zu können, wurden in Kooperation mit Dr. Daniel Cappel von der Fa. Schrödinger WaterMap<sup>[48]</sup> Berechnungen durchgeführt. Mittels der WaterMap-Methode können die Enthalpie, Entropie und die freie Energie der Hydrathülle in einer Bindetasche berechnet werden. Während der Berechnung werden folgende Parameter berücksichtigt: statistische Thermodynamik, molekulardynamische Berechnungen und die Solvatation der Bindetasche.<sup>[29]</sup> Diese Methode wurde schon mehrfach erfolgreich bei der Entwicklung von selektiven Inhibitoren verwendet.<sup>[49]</sup> Die Ergebnisse dieser Berechnung für das Molekül **1** kann man aus der Abbildung 15 entnehmen.

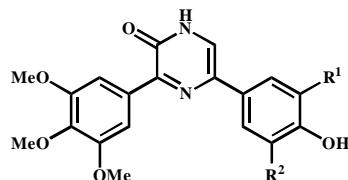


**Abb. 15:** WaterMap Berechnung. Darstellung der Ergebnisse durch das Ligand-Interaktions-Diagramm von der Verbindung **1** in der Bindetasche von PDGFR $\beta$  (Homologiemodell). Die verschiedenen gefärbten Kugeln, die ein drei Buchstabencode beinhalten, stellen die Aminosäuren des Proteins dar. Die unterschiedlich gefärbten Kugeln ohne Beschriftung stellen die sog. *Hydration sites* dar. Die gefärbten Kugeln mit einem roten (X) stellen die verdrängten *Hydration sites* dar. Die rot gefärbten Kugeln stellen die instabilen *Hydration sites* und die grün gefärbten die stabilen *sites* dar.<sup>[29]</sup>

In der Abbildung 15 ist ein Ligand-Interaktions-Diagramm der Verbindung **1** in der Bindetasche von PDGFR $\beta$  (Homologiemodell) dargestellt. Die nicht beschrifteten, verschieden ge-

färben Kugeln stellen die Wassermoleküle dar, die sich in der Bindetasche befinden. Über diese Wassermoleküle ist die gedockte Struktur der Verbindung **1** gelegt. Daraus kann man entnehmen, welche Wassermoleküle von dem Liganden bereits verdrängt bzw. ersetzt wurden. Zusätzlich werden Wassermoleküle dargestellt, deren Verdrängung sich positiv bzw. negativ auf die freie Bindungsenthalpie  $\Delta G$  auswirken. Diese Informationen werden mittels einer Farbcodierung dargestellt: die grün gefärbten Kugeln stellen die stabilen, die rot gefärbten Kugeln die instabilen Wassermoleküle dar. Im Gegensatz zu den stabilen tragen die instabilen Wassermoleküle positiv zu der Bindeaffinität des Liganden bei. Der Pyrazinonkern, der Wasserstoffbrückenbindungen zu der *hinge*-Region ausbildet, verdrängt die instabilen rötlich gefärbten Wassermoleküle. Die *para*-ständige Hydroxygruppe des 3-Methoxyphenylrestes verdrängt sowohl ein instabiles (rötlich) als auch ein stabiles (grün) Wassermolekül, welches in ein H-Brücken Netzwerk mit Lys53 und Asp180 assoziiert ist. Diese Tatsache allein würde nicht die hohe Affinitätssteigerung dieser Gruppe erklären (vgl. Kap. 2.1). Das Besondere an dieser Gruppe ist, dass das stabile Wassermolekül nicht einfach nur verdrängt, sondern auch gleichzeitig ersetzt wird, wodurch die zwei Wasserstoffbrückenbindungen zu dem Protein weiterhin ausgebildet werden.<sup>[29]</sup> Obwohl das Ersetzen des stabilen Wassermoleküls sich negativ auf die Entropie des Systems auswirkt, kommt es insgesamt durch die gleichzeitige Erhöhung der Enthalpie zu einer Erniedrigung der freien Bindungsenthalpie und somit zu einer Steigerung der Affinität des Liganden **1** gegenüber PDGFR $\beta$ .<sup>[29]</sup> Die Betrachtung der noch verbliebenen instabilen Wassermoleküle in der Bindetasche hilft bei der weiteren Optimierung der Verbindung **1**. Das eine instabile Wassermolekül, das sich zwischen den drei Aminosäuren MET-73, ILE-98 und VAL-84 befindet, könnte durch einen größeren *meta*-Substituenten wie z.B. eine Ethoxygruppe verdrängt werden.

Mit Hilfe der obengenannten Ergebnissen (*Docking*-Studien, *WaterMap*) wurden folgende Verbindungen designt und in das DFG<sub>in</sub>-Homologiemodell gedockt (s. Tab. 5).

**Tabelle 5:** Docking-Ergebnisse der Verbindungen an PDGFR $\beta$  (Homologiemodell).

#	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Glidescore
1	-OMe	-H	-11.54
27	-OMe	-OMe	-11.51
30	-N(Me) <sub>2</sub>	-H	-10.97
31	-NH <sub>2</sub>	-H	-10.80
39	-N(Me)	-H	-11.33
40	-Et	-H	-11.12
41	-Pr	-H	-11.28
42	-iPr	-H	-11.40
43	-Bu	-H	-11.50
44	-OEt	-H	-11.88
45	-OPr	-H	-12.13
46	-O <i>i</i> Pr	-H	-12.07
47	-OBu	-H	-11.75
48	-OMe	-Cl	-11.43
49	-OEt	-Cl	-11.65

Allgemein lässt sich die Tendenz erkennen, dass die Einführung von größeren *meta*-Substituenten den Betrag der Bindeaffinität erhöht. Besonders hohe Werte weisen die Verbindungen **44-47** auf, wobei man einen Zusammenhang bezüglich der Länge (Methoxy, Ethoxy, Propoxy) und der Bindeaffinität erkennen kann. Die Verbindungen **45** und **46**, die längere bzw. sterisch anspruchsvollere Reste (Propoxy, *i*Propoxy) tragen, weisen den höchsten *Glidescore* auf (s. Tab. 5). Außerdem tragen die Alkylether (Propoxy, *i*Propoxy) im Vergleich zu den Alkylresten stärker zu einer Bindeaffinitätssteigerung bei. Die Substitution über ein Stickstoffatom (Amine) führte zu einer Erniedrigung des *Glidescores* bei den Verbindungen **30**, **31** und **39**. Aufgrund von nur minimalen Veränderungen des *Glidescores* können an dieser Stelle keine zuverlässigen Voraussagen über die Bioaktivität der entworfenen Verbindungen getroffen werden. Um diese Tendenzen zu überprüfen, müssen ausgewählte Moleküle zunächst synthetisiert und anschließend biologisch getestet werden.

### 3.2.3 Syntheseauswahl der Zielmoleküle für die DFG<sub>in</sub>-Serie

Die in dieser Arbeit beschriebenen DFG<sub>in</sub>-Inhibitoren wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von D. Schmidt<sup>[47]</sup> ausgewählt und synthetisiert. Der Einfluss der elektronenziehenden *meta*-Substituenten sollte durch die Synthese der Verbindungen **33**, **37** und **48** überprüft werden. Zur Überprüfung des Einflusses eines größeren, sterisch anspruchsvolleren Substituenten wurde die Verbindung **44** ausgewählt. Dabei wurde an 3-Position des 4-Hydroxyphenylrestes

die Methoxy- durch eine Ethoxygruppe ausgetauscht. Die Verbindung **49** stellt die Kombination dieser beider Einflüsse dar. Die nach den oben genannten Kriterien ausgewählten Testverbindungen sind in der Tabelle 6 zusammengefasst.

**Tabelle 6:** Übersicht der Zielmoleküle.

#	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Glidescore
<b>27</b>	-OMe	-OMe	-11.5
<b>33</b>	-Cl	-H	-10.6
<b>37</b>	-Cl	-Cl	-10.1
<b>44</b>	-OEt	-H	-11.9
<b>48</b>	-OMe	-Cl	-11.4
<b>49</b>	-OEt	-Cl	-11.7

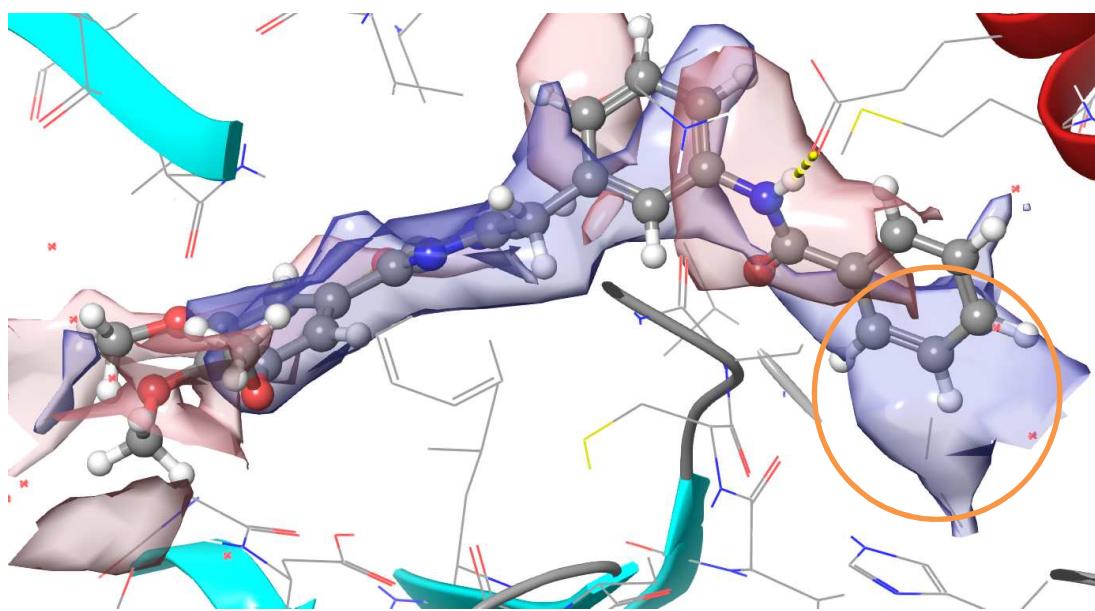


### 3.3 Ergebnisse der computergestützten Docking-Studien (DFG<sub>out</sub>-Serie)

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine computergestützte Optimierung der von J. Schlosser<sup>[22]</sup> entwickelten Leitstruktur **12** und damit verbundene Verbesserung der Affinität gegenüber PDGFRβ durchgeführt werden. Dies wurde mit Hilfe der *Schrödinger*-Software durchgeführt. Die Ergebnisse der *Molecular Docking*-Studien werden in den nachfolgenden Abschnitten in Form von Tabellen 7 und 8 unter der Angabe des *Glidescores* dargestellt. Das dabei resultierende Ranking und der berechnete Bindemodus dienten im Rahmen dieser Arbeit als Auswahlkriterien derjenigen Verbindungen, die synthetisiert und biochemisch getestet werden sollten.

#### 3.3.1 Einführung der unterschiedlich substituierten Benzamide

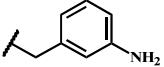
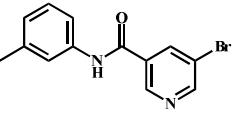
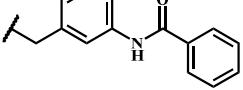
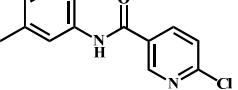
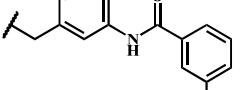
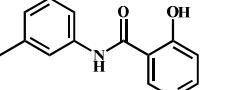
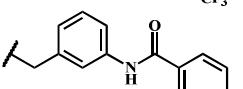
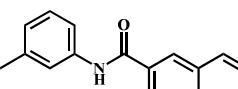
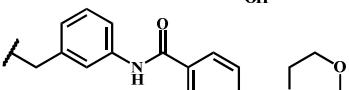
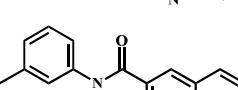
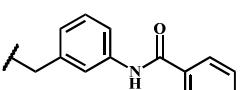
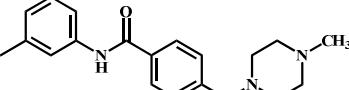
Aufgrund der hydrophoben Beschaffenheit der *deep pocket* wurden im Rahmen der virtuellen Optimierung der von Schlosser<sup>[22]</sup> entwickelten Verbindung **12** aromatische Reste wie Benzoic- oder Nicotinsäuren mit unterschiedlichen Substituenten variiert. Der *XP-Visualizer*, ein Bestandteil der *Schrödinger*-Software, ermöglicht es, graphisch die hydrophoben (rötlich) bzw. die hydrophilen Bereiche (blau) der Bindetasche des Proteins darzustellen (s. Abb. 16). Der vordere Bereich der ATP-Binderegion zugewandten Seite weist vorwiegend hydrophobe Eigenschaften auf (s. Abb. 16, umkreist).



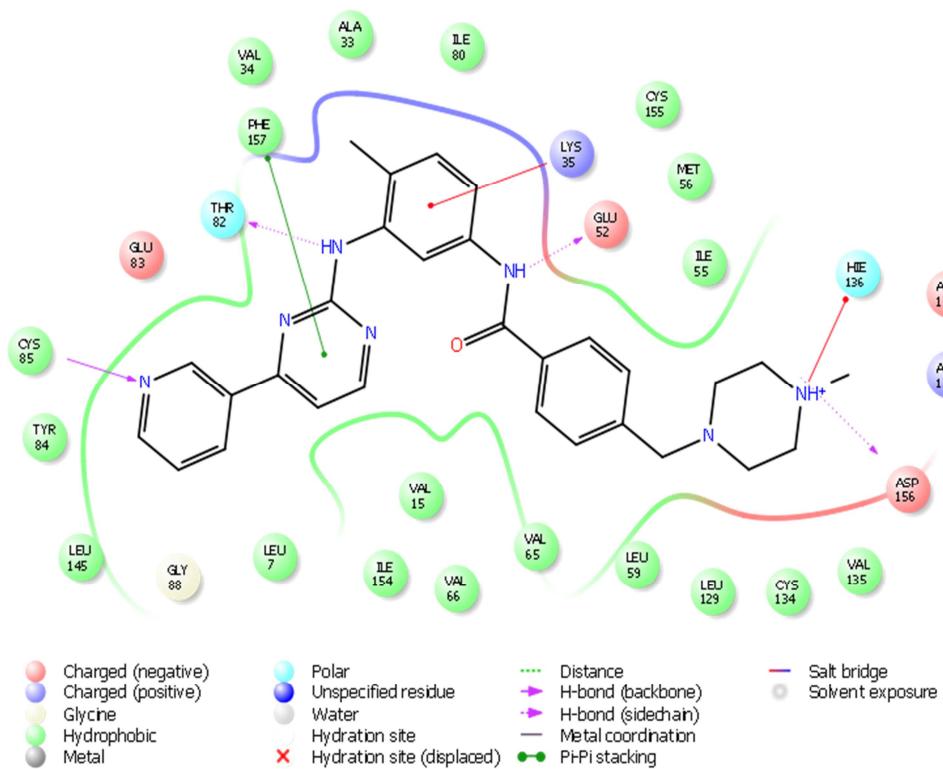
**Abb. 16:** PDGFR $\beta$  DFGout-Inhibitor 12. Darstellung der *hydrophobic/philic map* durch „Maestro“ Schrödinger. Die rote Farbe codiert den hydrophilen und die blaue Farbe den hydrophoben Bereich.

Für eine bessere Adressierung des vorderen Bereiches der tiefen Tasche wurden Substituenten mit einem -I-Effekt (Cl, F, Br) zur Erhöhung der Lipophilie des Inhibitors ausgewählt (vgl. Tab. 7). Des Weiteren wurde auch ein polarer Substituent mit einem +M-Effekt (OH) eingeführt, um dessen Einfluss auf die Affinität gegenüber dem *target* PDGFR $\beta$  zu untersuchen. Die Ergebnisse des *Dockings* sind mittels Angabe des *Glidescores* in der Tabelle 7 abgebildet.

**Tabelle 7:** Docking Ergebnisse der Verbindungen **2**, **11**, **50-58** an PDGFR $\beta$  (DFG<sub>out</sub>-Homologiemodell).

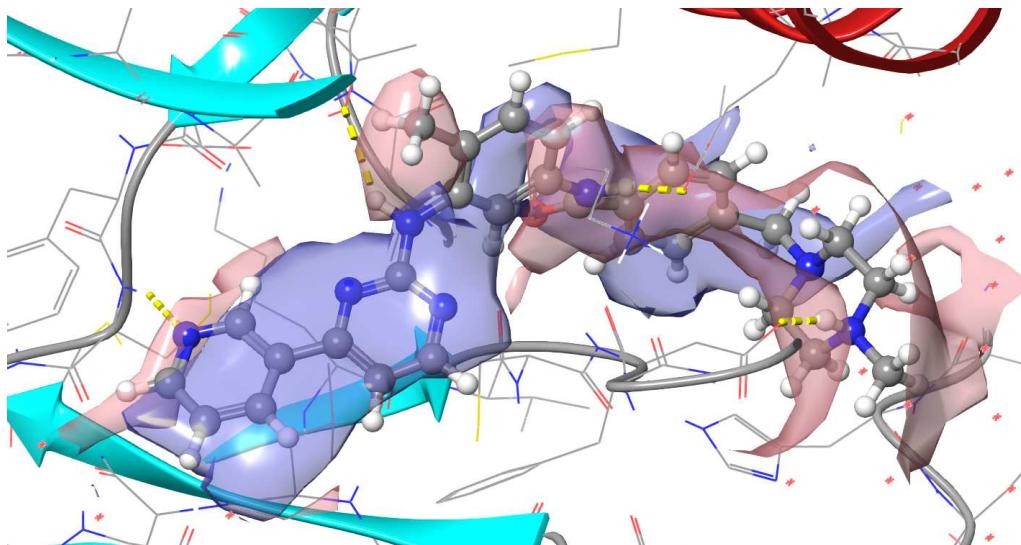
#	R	Glidescore	#	R	Glidescore
<b>11</b>		-12.0	<b>54</b>		-13.2
<b>12</b>		-13.4	<b>55</b>		-13.3
<b>50</b>		-14.7	<b>56</b>		-13.4
<b>51</b>		-13.5	<b>57</b>		-14.1
<b>52</b>		-13.8	<b>58</b>		-14.3
<b>53</b>		-13.3	<b>2</b>		-15.1

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Einführung eines *meta*-Trifluorophenylrestes zum Adressieren des hydrophoben Bereichs der *deep pocket* zu einer Steigerung der berechneten Bindeaffinität der Verbindung **50** (Glidescore = -14.7) gegenüber der DFG<sub>out</sub>-Konformation des PDGFR $\beta$ -Homologiemodells im Vergleich zu der Ausgangsverbindung **12** (Glidescore = -13.4) führt. Die Verbindungen **51** bis **56** weisen einen ähnlichen Betrag der Bindungsaffinität wie die Ausgangsverbindung **12** auf. Auch der Austausch der Benzoësäurederivate durch Nicotinsäurederivate führte zu keiner signifikanten Veränderung der berechneten Bindeaffinität der Verbindungen **53-56**. Erst durch die Erweiterung der Nicotinsäure durch einen anellierten Phenylring in Form eines Carbonsäurequinolins bei den Verbindungen **57** und **58** konnte eine Verbesserung des *Glidescores* im Vergleich zu der Verbindung **12** erzielt werden. Die höchste berechnete Bindeaffinität gegenüber PDGFR $\beta$  (DFG<sub>out</sub>) zeigt die Verbindung **2** (Glidescore = -15.1). Der dabei eingesetzte Benzyl-4-methylpiperazin-Rest wurde in Anlehnung an den als Referenz verwendeten DFG<sub>out</sub>-Inhibitor Imatinib adaptiert. Dafür wurde ein Bindemodus von Imatinib berechnet und als Ligand-Interaktions-Diagramm dargestellt (s. Abb. 17).



**Abb. 17:** Ligand-Interaktions-Diagramm von Imatinib, gedockt in das PDGFR $\beta$  DFG<sub>out</sub>-Homologiemodell.

Imatinib bildet H-Brückenbindungen zu den Aminosäuren Cys85 und Thr82 der *hinge*-Region aus. Die Amidgruppe bildet eine H-Brückenbindung zu der Glu52 aus. Der hydrophobe Bereich der *deep pocket* wird durch den Piperazinusteil adressiert, wobei zusätzlich eine Salzbrücke zu der Asp156 ausgebildet wird (s. Abb. 17).



**Abb. 18:** PDGFR $\beta$  DFG<sub>out</sub>-Inhibitor Imatinib. Darstellung der *hydrophobic/philic map* durch „Maestro“ Schrödinger. Die rote Farbe kodiert den hydrophilen und die blaue Farbe den hydrophoben Bereich.

Zusätzlich wurde der Bindemodus von Imatinib mit dem *XP Visualizer* von *Schrödinger* mittels der *hydrophobic/philic map* dargestellt. Der eingesetzte Benzyl-4-methylpiperazin-Rest adressiert dabei mit der Benzylgruppe den hydrophoben und mit dem Methylpiperazingruppe den hydrophilen Bereich der tiefen Tasche von PDGFR $\beta$  (s. Abb. 18). Für die von Imatinib abgeleitete Struktur **2** konnte ein ähnlicher Bindemodus berechnet werden.

### 3.3.2 Einführung der unterschiedlich substituierten Harnstoffderivate

Neben den Benzamidderivaten wurden auch Harnstoffderivate bezüglich ihrer Substituenten variiert. Bei der Auswahl der Substituenten wurde analog zu den Benzamiden vorgegangen (vgl. Kap. 3.3.1). Die *Docking*-Ergebnisse der designten Harnstoffderivate **59-66** sind in der Tabelle 8 zusammen gestellt.

**Tabelle 8:** Docking Ergebnisse der Verbindungen **59-66** an PDGFR $\beta$  (DFG<sub>out</sub> Homologiomodell).

#	R	Glidescore	#	R	Glidescore
<b>59</b>		-14.5	<b>63</b>		-13.6
<b>60</b>		-14.1	<b>64</b>		-13.9
<b>61</b>		-13.7	<b>65</b>		-14.0
<b>62</b>		-14.0	<b>66</b>		-14.8

Sowohl für die Benzamide als auch die Harnstoffderivate wurden ähnliche Bindungsaffinitäten im Bereich zwischen -13 und -15 (*Glidescore*) berechnet. Die Verbindungen **60** bis **65**, bei denen die unterschiedlichen Substituenten sowohl mit einem -I-Effekt (Cl), einem +I-Effekt (Me) als auch mit einem +M-Effekt (OMe) variiert wurden, zeigen berechnete Bindungsaffinitäten im Bereich zwischen -13.7 (**61**) und -14.1 (**60**).

### 3.3.3 Syntheseauswahl der Zielmoleküle für die DFG<sub>out</sub>-Serie

Basierend auf den *Docking*-Ergebnissen wurden die Verbindungen **2**, **50**, **60**, **62** und **66** für die Synthese und anschließende biochemische Untersuchung ausgewählt. Von den Benzamidderi-

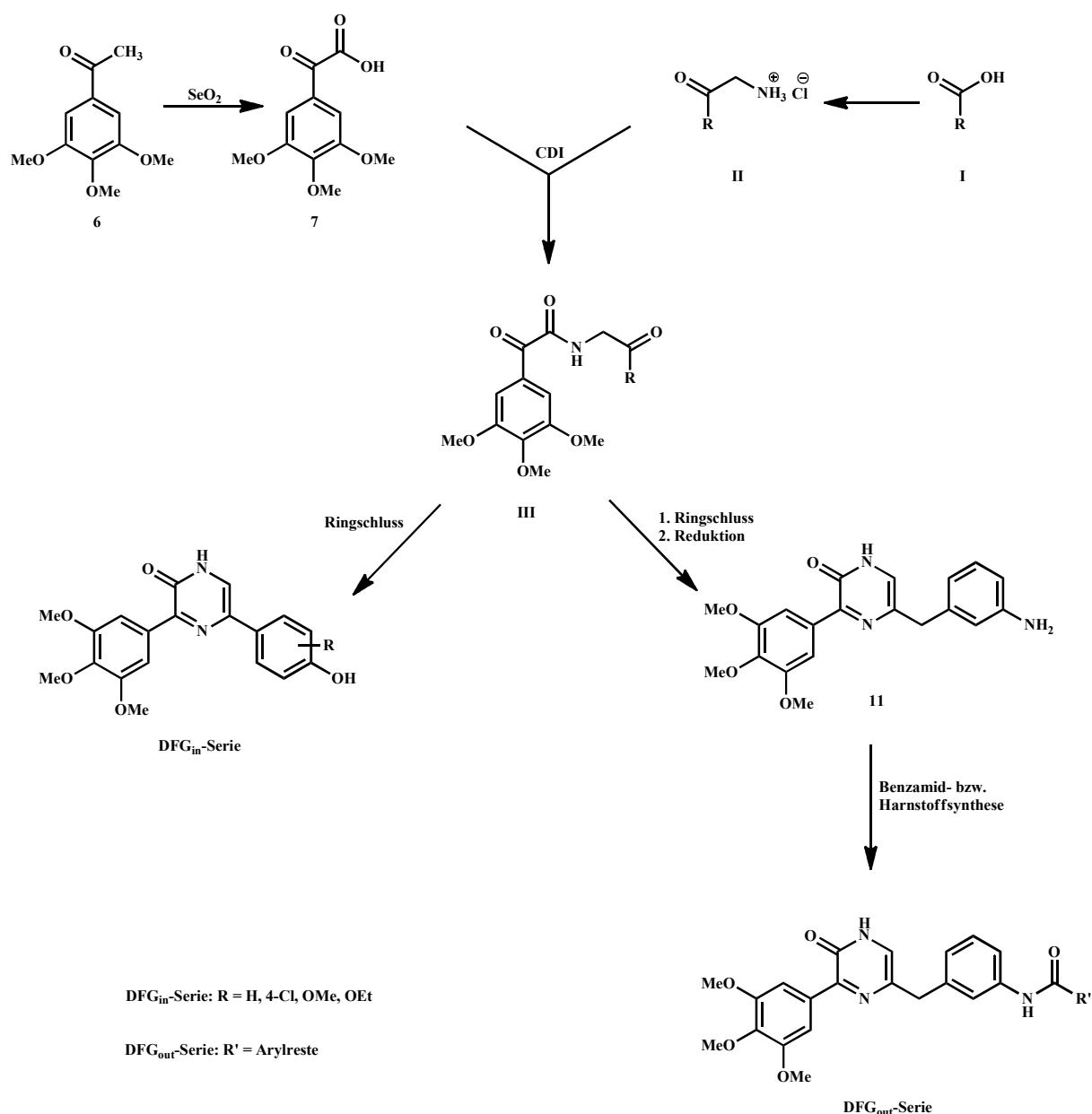
vaten (s. Tab. 7) zeigten die von Imatinib abgeleitete Verbindung **2** und die Verbindung **50** in den *Docking*-Studien die höchste berechnete biologische Aktivität gegenüber PDGFR $\beta$ . Aus der Serie der unterschiedlich substituierten Harnstoffderivate (s. Tab. 8) wurden die drei Verbindungen **60**, **62** und **66** mit den höchsten berechneten Bindungsaffinitäten zu PDGFR $\beta$  ausgewählt.

## 4. Synthese

Die Darstellung der 3,5-disubstituierten Pyrazin-2-one der DFG<sub>in</sub>-Serie wurde von Schlosser<sup>[22]</sup> entwickelt und kann in zwei Syntheseschritten, ausgehend von der Phenylglyoxylsäure **7** und dem  $\alpha$ -Ketoamin **II**, realisiert werden. Beide Ausgangsverbindungen sind synthetisch gut zugänglich (s. Kap. 4.1 und 4.2). Für die DFG<sub>in</sub>-Serie werden unterschiedlich substituierte Benzoesäuren **I** verwendet (s. Kap. 4.2). Der nachfolgende Syntheseschritt ist eine Amidkupplung zwischen der Glyoxylsäure **7** und dem  $\alpha$ -Ketoamin **II** (s. Kap. 4.3). Das dabei entstandene Glyoxylsäureamid **III** wird anschließend mittels der von Schlosser beschriebenen Ringschlussreaktion in der Mikrowelle zum Pyrazin-2-on umgesetzt (s. Abb. 19).<sup>[22][28]</sup>

Die Darstellung der 3,5-disubstituierten Pyrazin-2-one der DFG<sub>out</sub>-Serie erfolgt analog zu der Syntheseroute der DFG<sub>in</sub>-Serie. Als Carbonsäure für die DFG<sub>out</sub>-Serie dient die 3-Nitrophenylessigsäure (**13**), die in zwei Syntheseschritten zum  $\alpha$ -Ketoamin **II** umgesetzt wird. Im ersten Schritt wird die Carbonsäure zu einem Oxazol umgesetzt und anschließend durch Oxazolspaltung in das  $\alpha$ -Ketoamin **II** überführt. Das durch die Amidkupplung dargestellte Glyoxylsäureamid **III** wird mittels einer Ringschlussreaktion in ein Pyrazin-2-on überführt. Dieses wird anschließend durch Reduktion der Nitrogruppe zu der Aminoverbindung **11** umgesetzt (s. Kap. 4.5). Die Verbindung **11** dient bei der Darstellung der DFG<sub>out</sub>-Serie als *Building Block*. Im letzten Syntheseschritt wird der *Building Block* **11** durch eine Kupplung mit einer Benzoesäure zum Benzamid oder mit einem Isocyanat zu einem Harnstoffderivat umgesetzt (s. Kap. 4.6).

Während der Darstellung der  $\alpha$ -Ketoamine hat Schlosser im Rahmen seiner Doktorarbeit eine neuartige Syntheseroute zur Darstellung von Indol-2-ylmethylaminderivaten entdeckt (s. Kap. 2.4). Die Darstellung der unterschiedlich substituierten Indolderivate wird im Kapitel 4.7 beschrieben. Die im Rahmen der Synthese der Indolderivate optimierten Reaktionsbedingungen der Oxazoldarstellung konnten auf die Syntheseroute der DFG<sub>in/out</sub>-Serien angewendet werden.

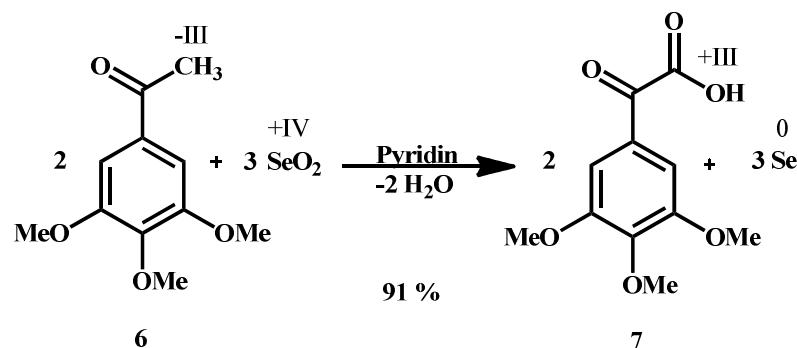


**Abb. 19:** Syntheseroute zur Darstellung der 3,5-Diarylpyrazin-2-on-Derivate der DFG<sub>in/out</sub>-Serie. Die Darstellung der Glyoxylsäure **7** konnte durch Oxidation des Ketons **6** mit  $\text{SeO}_2$  durchgeführt werden. Die Carbonsäuren **I** konnten in zwei Schritten zu den  $\alpha$ -Ketoaminen **II** als Hydrochlorid umgesetzt werden. Die Kupplung der Glyoxylsäure **7** mit dem  $\alpha$ -Ketoamin **II** wurde mit Hilfe von CDI durchgeführt. Der Ringschluss zum Pyrazinon konnte in Anwesenheit von Ammoniumacetat in der Mikrowelle realisiert werden.<sup>[28]</sup> Im Rahmen der Darstellung der DFG<sub>out</sub>-Serie wurde der *Building Block* **11**, ausgehend von einem Glyoxylsäureamid **III**, in zwei Schritten dargestellt. Anschließend wurde die Verbindung **11** zu Benzamiden bzw. Harnstoffderivaten umgesetzt.

#### 4.1 Synthese von 2-(3,4,5-Trimethoxyphenyl)glyoxylsäure (**7**)

Die Phenylglyoxylsäure **7** konnte durch eine von Riley et al.<sup>[50]</sup> beschriebene Oxidationsreaktion des Acetophenons **6**, unter Verwendung von Selendioxid, in Pyridin in sehr guter Ausbeu-

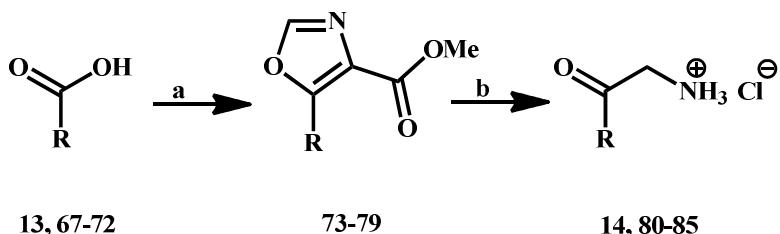
te (91%) erhalten werden. Dabei wurde selektiv die  $\alpha$ -Position der Carbonylgruppe bis zu der  $\alpha$ -Ketosäure oxidiert (s. Abb. 20).<sup>[50]</sup>



**Abb. 20:** Oxidation von 3,4,5-Trimethoxyacetophenon (**6**) zur Glyoxylsäure **7** mit Selendioxid.

## 4.2 Synthese der $\alpha$ -Ketoaminderivate ausgehend von Carbonsäuren

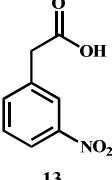
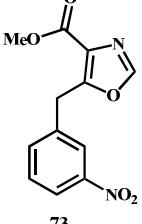
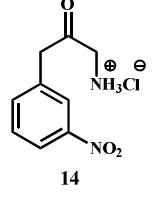
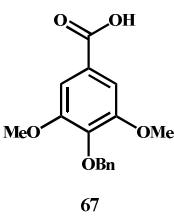
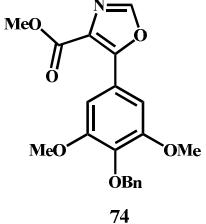
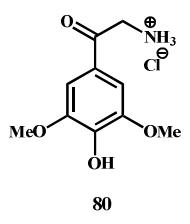
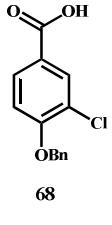
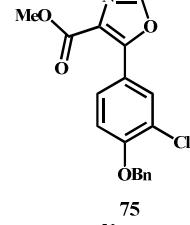
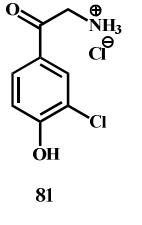
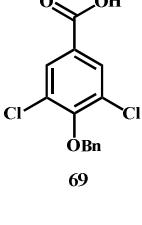
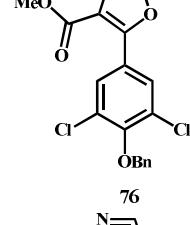
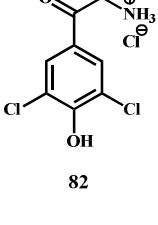
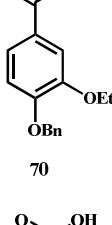
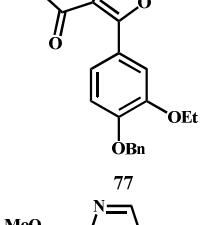
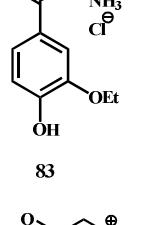
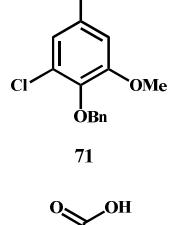
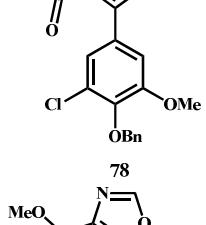
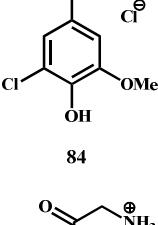
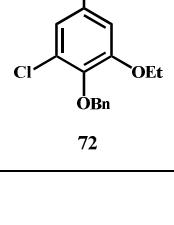
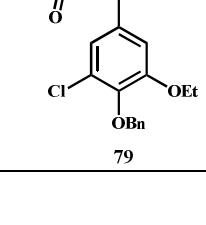
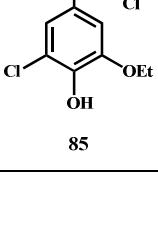
Die Synthese der  $\alpha$ -Ketoamine **14** und **80-85** (s. Tab. 9) wurde ausgehend von benzylgeschützten Benzoesäuren **67-72** für die DFG<sub>in</sub>-Serie bzw. 3-Nitrophenylessigsäure (**13**) für die DFG<sub>out</sub>-Serie in zwei Schritten realisiert. Die Carbonsäuren werden zunächst mit Hilfe von Carboonyldiimidazol (CDI) aktiviert und anschließend durch Umsetzung mit einer Base und Methylisocyanoacetat nach Suzuki<sup>[51]</sup> zu den Oxazolen **73-79** umgesetzt (s. Abb. 21). Die Oxazole werden anschließend unter sauren Bedingungen zu den stabileren Hydrochloriden der  $\alpha$ -Ketoamine **14**, **80-85** gespalten (s. Abb. 21).<sup>[28][51]</sup> Die einzelnen Verbindungen und die zugehörigen Ausbeuten sind in der Tabelle 9 zusammengefasst.



**Abb. 21:** Umsetzung von Carbonsäurederivaten zu den  $\alpha$ -Ketoamiderivaten in zwei Syntheseschritten nach Suzuki<sup>[51]</sup>.

a) CDI, NaHMDS, Methylisocyanoacetat, THF, 20 °C, b) konz.  $\text{HCl}/\text{MeOH}$  (1:1), Rückfluss.

Tabelle 9: Dargestellte  $\alpha$ -Ketoamine ausgehend von Carbonsäuren durch Oxazolspaltung.

Carbonsäure	Oxazol	Ausbeute (%)	$\alpha$ -Ketoamin	Ausbeute (%)
		52		85
		84		82
		59		91
		41		99
		49		94
		30		94
		68		91

#### 4.2.1 Synthese der $\alpha$ -Ketoaminderivate 80-85

Für die Synthese von DFG<sub>in</sub>-Inhibitoren wurden unterschiedlich substituierte *para*-Hydroxybenzoësäuren verwendet (vgl. Kap. 3). Der direkte Umsatz von *para*-substituierten Hydroxybenzoësäuren mit CDI und Methylisocyanoacetat führte zunächst nicht zum gewünschten Oxazol. Die Reaktionskontrolle mittels HPLC zeigte eine Vielzahl von Nebenprodukten, die weder isoliert noch identifiziert werden konnten. Dieser Befund kann wahrscheinlich auf die phenolische Hydroxygruppe in *para*-Stellung zurückgeführt werden. Während im ersten Schritt die Aktivierung der Carbonsäure mit CDI vermutlich noch stattfand, kam es im zweiten Schritt unter basischen Bedingungen zu einer Deprotonierung der Hydroxygruppe. Das negativ geladene Sauerstoffatom des entstandenen Phenolats **I** übt einen +M-Effekt auf das konjugierte System aus, was zu einer Reduzierung der Carbonylaktivität der phenylogen Carbonsäure führt (s. Abb. 22).

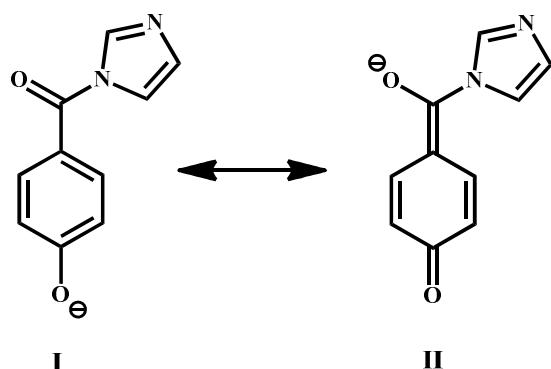
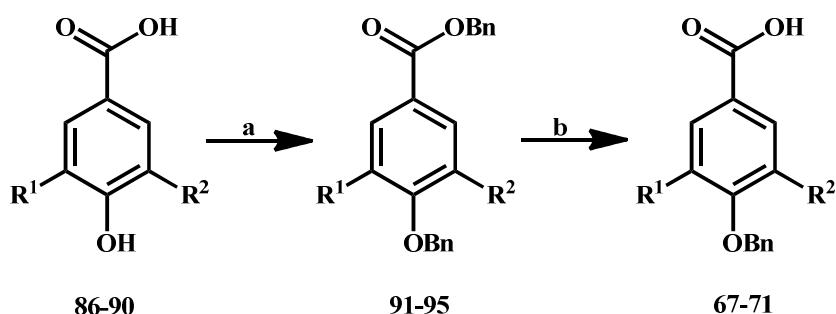


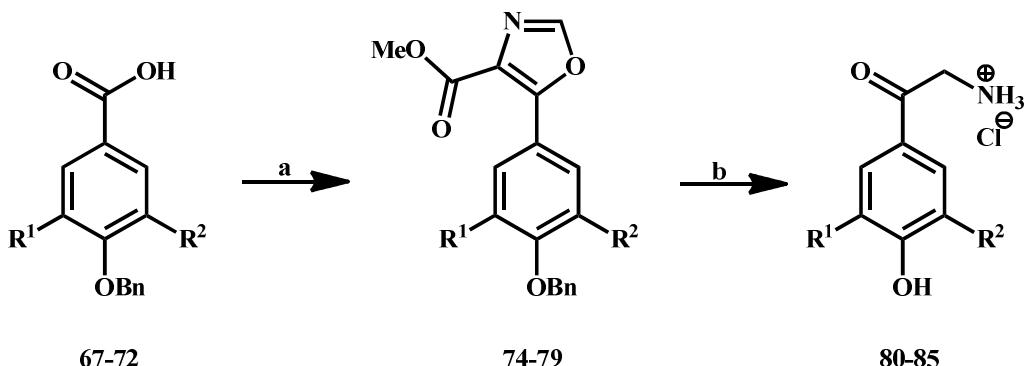
Abb. 22: Mesomere Grenzformeln einer mit CDI aktivierte *p*-Hydroxybenzoësäure.

So kam es trotz Aktivierung der Carbonylgruppe mit CDI zu einer Verminderung der Elektrophilie des Carbonylkohlenstoffes und zum Ausbleiben einer nucleophilen Substitution. Um diesen Effekt der *para*-ständigen Hydroxygruppe zu unterbinden, musste eine Schutzgruppe eingeführt werden, die sich unter den basischen Bedingungen der Oxazolsynthese nicht abspaltet. Die Wahl fiel dabei auf eine Benzylschutzgruppe. Die selektive Schützung der Hydroxygruppe verlief in zwei Syntheseschritten nach Tranchimand.<sup>[52]</sup> Zunächst wurde die *p*-Hydroxybenzoësäure mit Benzylbromid und Natriumcarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) umgesetzt. Dabei kam es gleichzeitig zu der Bildung des Benzylethers und des Benzylesters. Anschließend wurde die Estergruppe durch Umsetzung mit Kaliumhydroxid in wässrig ethanolischer Lösung verseift (s. Abb. 23). Die Benzyl-geschützte *para*-Hydroxybenzoësäure **72** wurde kommerziell erworben.



**Abb. 23:** Benzylschützung der *p*-Hydroxybenzoësäurederivate **86-90**, **67/86/91**: R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = OMe; **68/87/92**: R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = Cl; **69/88/93**: R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = Cl; **70/89/94**: R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = OEt; **71/90/95**: R<sup>1</sup> = Cl, R<sup>2</sup> = OMe. **a)** Benzylchlorid, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF; **b)** KOH, H<sub>2</sub>O, MeOH. R<sup>1</sup> = H, OMe, Cl. R<sup>2</sup> = Cl, OEt, OMe.

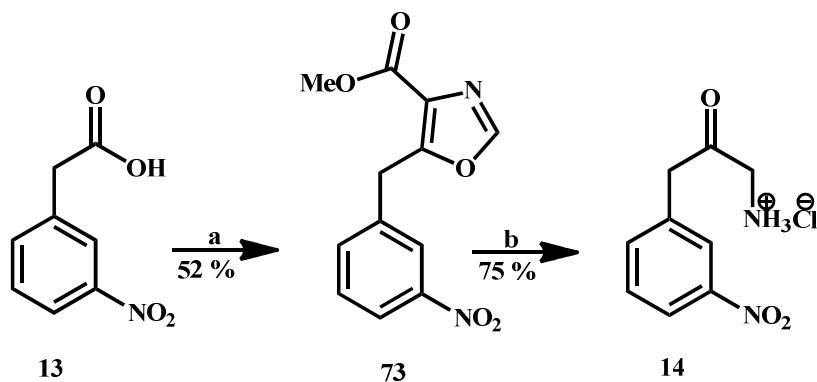
Die *p*-O-Benzyl-geschützte Benzoësäure wurde anschließend mittels CDI aktiviert. Die Lösung der aktivierte Säure wurde dann langsam zu einer Lösung aus der jeweiligen Base und Methylisocyanoacetat in THF zugetropft und 18 h bei 20 °C gerührt. Im Laufe der Optimierung der Oxazolsynthese im Rahmen der Darstellung von Indol-2-yl-methylaminderivaten lieferte der Einsatz von NaHMDS als Base die besten Ergebnisse (vgl. Kap. 4.7.2). Die im Kapitel 4.7.2 beschriebenen Reaktionsbedingungen wurden für die hier beschriebene Synthese angewendet. Die gewünschten Produkte konnten mit Ausbeuten zwischen 30 % und 59 % dargestellt werden. Das erhaltene Oxazol wurde unter sauren Bedingungen zum α-Ketoamin umgesetzt, wobei es zu einer Decarboxylierung des Methylesters unter Abspaltung von Methanol und Freisetzung von Kohlenstoffdioxid kam. Gleichzeitig wurde der Oxazolring gespalten und das α-Ketoamin als Hydrochlorid gebildet (s. Abb. 24). Unter den stark sauren Reaktionsbedingungen wurde zusätzlich die Benzylschutzgruppe quantitativ abgespalten. Die nach dieser Methode dargestellten Produkte konnten in sehr guten Ausbeuten (> 90 %) erhalten werden.



**Abb. 24:** Synthese der α-Ketoamine **80-85** via Oxazolspaltung, mit **67/74/80**: R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = OMe; **68/75/81**: R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = Cl; **69/76/82**: R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = Cl; **70/77/83**: R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = OEt; **71/78/84**: R<sup>1</sup> = Cl, R<sup>2</sup> = OMe; **72/79/85**: R<sup>1</sup> = Cl, R<sup>2</sup> = OEt. **a)** 1. CDI, abs. THF, 2. NaHMDS, Methylisocyanoacetat, 20 °C, THF; **b)** HCl/MeOH (1:1), Rückfluss, 4 h.

## 4.2.2 Synthese des $\alpha$ -Ketoamins 14

Bei der Darstellung der 3,5-Diarylpyrazin-2-one der DFG<sub>out</sub>-Serie wurde anstelle der Benzoesäure 3-Nitrophenylessigsäure (**13**) verwendet (vgl. Kap. 2). Das benötigte  $\alpha$ -Ketoamin **14** wurde analog zu der im vorangegangenen Kapitel 4.2.1 beschriebenen Methode dargestellt (s. Abb. 25).



**Abb. 25:** Synthese des  $\alpha$ -Ketoamins **14** via Oxazolspaltung: **a** 1. CDI, abs. THF, 2. NaHMDS, Methylisocyanoacetat, 20 °C, THF; **b** HCl/MeOH (1:1), Rückfluss, 4 h.

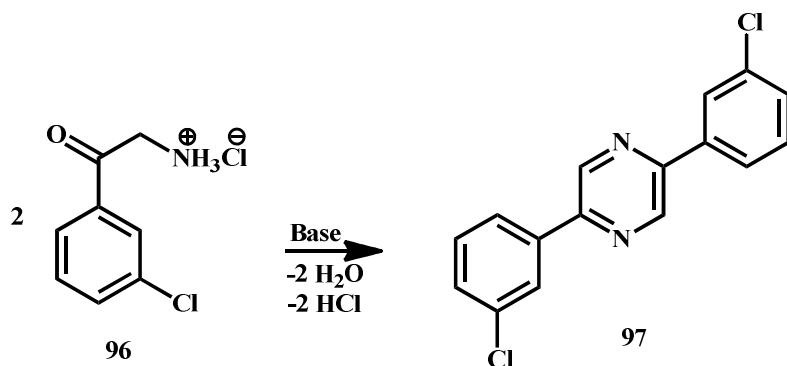
## 4.3 Synthese der Glyoxylsäureamide 15, 98-103

Die Kupplung zwischen der Glyoxylsäure **7** und einem  $\alpha$ -Ketoamin wird nach der von Schlosser etablierten Methode mit CDI als Aktivierungsreagenz durchgeführt.<sup>[22]</sup> Die Aktivierungsreaktion sorgt für eine Steigerung der Reaktivität der Carbonylgruppe, wobei neben dem Glyoxylsäureimidazolid und Imidazol auch Kohlenstoffdioxid freigesetzt wird. Das CO<sub>2</sub>-Gas entweicht aus der Reaktionsmischung und sorgt für eine Verschiebung des Gleichgewichtes in Richtung des Produktes.<sup>[53]</sup> Der Fortschritt der Reaktion wird mittels eines Blasenzählers über die CO<sub>2</sub>-Gasentwicklung überprüft. Das bei der Reaktion freigesetzte Imidazol ist eine schwache Base (pK<sub>s</sub> = 7)<sup>[54]</sup> und sorgt für Deprotonierung des Ammoniumchlorids. Um eine Selbstaddition, d.h. eine Dimerisierung (s. Abb. 26) seitens des  $\alpha$ -Ketoamins zu vermeiden, sollte keine zusätzliche Base verwendet werden. Weiterhin hat es sich als sinnvoll erwiesen, das Amin portionsweise zu der aktivierten Glyoxylsäure **7** zuzugeben.

### 4.3.1 Synthese der Glyoxylsäureamide 98-103

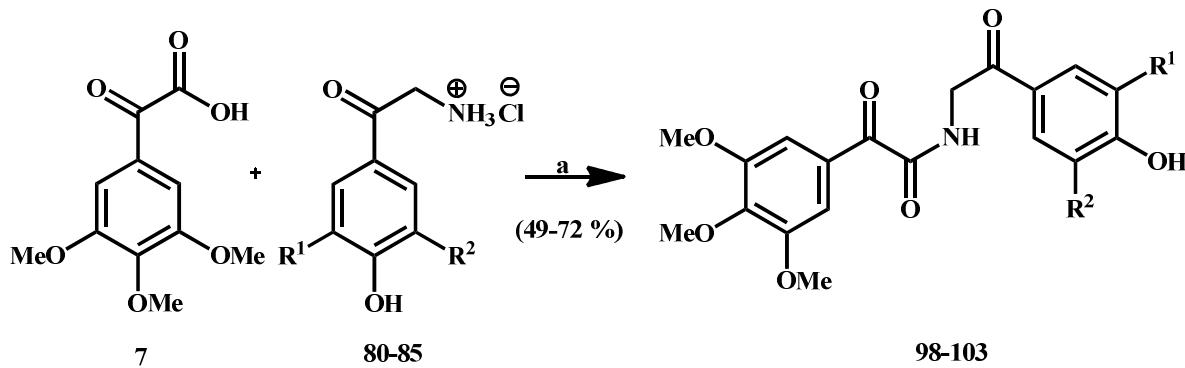
Nach der Aktivierung der Glyoxylsäure **7** wurde zu der Reaktionslösung das  $\alpha$ -Ketoamin **81** als Hydrochlorid zugegeben und 18 h bei 20 °C in NMP gerührt. Anschließend wurde lang-

sam Wasser zugegeben. Da sich kein Niederschlag bildete, wurde säulenchromatographisch aufgereinigt. Das gewünschte Produkt (Säureamid) konnte nicht isoliert werden. Um einen möglichen Einfluss der *para*-ständigen Hydroxygruppe der  $\alpha$ -Ketoamine **80-85** auszuschließen, wurde bei dem nachfolgenden Versuch anstelle der  $\alpha$ -Ketoamine **80-85** das 3-Chlorphenyl-2-oxoethanammoniumchlorid **96** eingesetzt (s. Abb. 26).



**Abb. 26:** Beispielhafte Darstellung der Dimerisierung zweier  $\alpha$ -Ketoamine **96** in Anwesenheit einer Base.

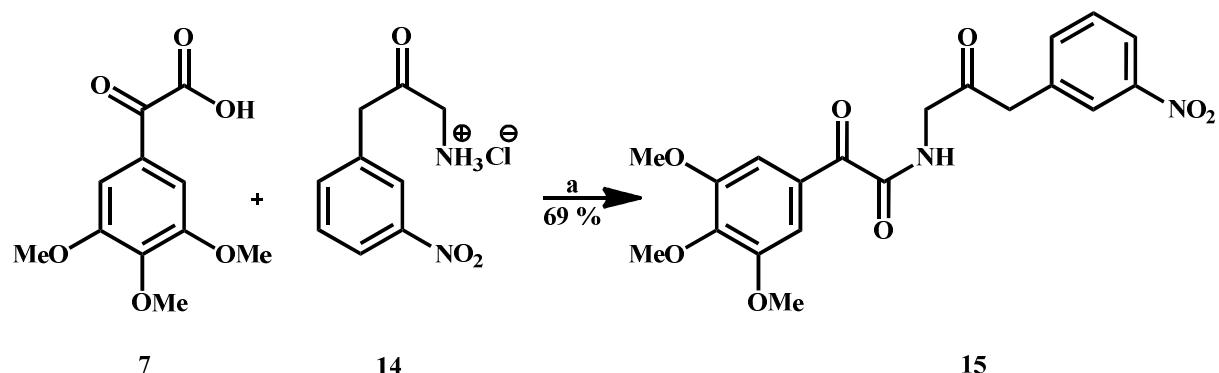
Nach der durchgeführten Kupplungsreaktion konnte nicht das gewünschte Produkt isoliert werden, sondern nur das Dimer **97** des  $\alpha$ -Ketoamins **96** (s. Abb. 26). Bei der Optimierung der Reaktionsbedingungen der Amidkupplungsreaktion im Rahmen der Bachelorarbeit durch D. Schmidt<sup>[47]</sup> führte der Austausch des Lösungsmittels NMP durch DMF schließlich zum gewünschten Produkt **99** mit einer Ausbeute von 32 %. Des Weiteren sorgte das langsame Zutropfen und die Erhöhung der Äquivalente sowohl der Glyoxylsäure als auch des Kupplungsreagenz CDI für eine Steigerung der Ausbeute auf 49 %.<sup>[47]</sup>



**Abb. 27:** Synthese der Glyoxylsäureamide mittels Aktivierung durch CDI: **a**) 1. CDI, DMF, 3 h bei 20 °C, 2.  $\alpha$ -Ketomin, 18 h, 20°C. **80/98:** R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = OMe; **81/99:** R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = Cl; **82/100:** R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = Cl; **83/101:** R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = OEt; **84/102:** R<sup>1</sup> = Cl, R<sup>2</sup> = OMe; **85/103:** R<sup>1</sup> = Cl, R<sup>2</sup> = OEt.

### 4.3.2 Synthese des Gyloxylsäureamids 15

Die Kupplung der Glyoxylsäure **7** mit 1-Amino-3-(3-nitrophenyl)propan-2-on Hydrochlorid (**14**) wurde analog zu der optimierten Amidsynthese durchgeführt. Bei der Aufarbeitung des Rohproduktes hat sich jedoch gezeigt, dass sich durch die langsame Zugabe von Eis ein gelblicher Niederschlag bildet, der sich anschließend abfiltrieren ließ. Das saubere Produkt **15** wurde ohne weitere Aufreinigung in einer guten Ausbeute von 69 % erhalten (s. Abb. 28).

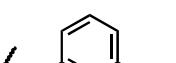
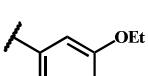
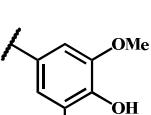
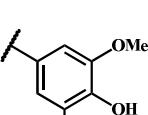
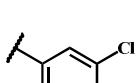
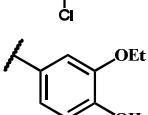
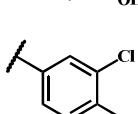


**Abb. 28:** Synthese des Gyloxylsäureamids **15** durch Aktivierung der Glyoxylsäure **7** mit CDI: **a)** CDI, DMF, 20 °C.

### 4.4 Synthesen der (1*H*)-Pyrazin-2-one **16, 27, 33, 37, 44, 48, 49**

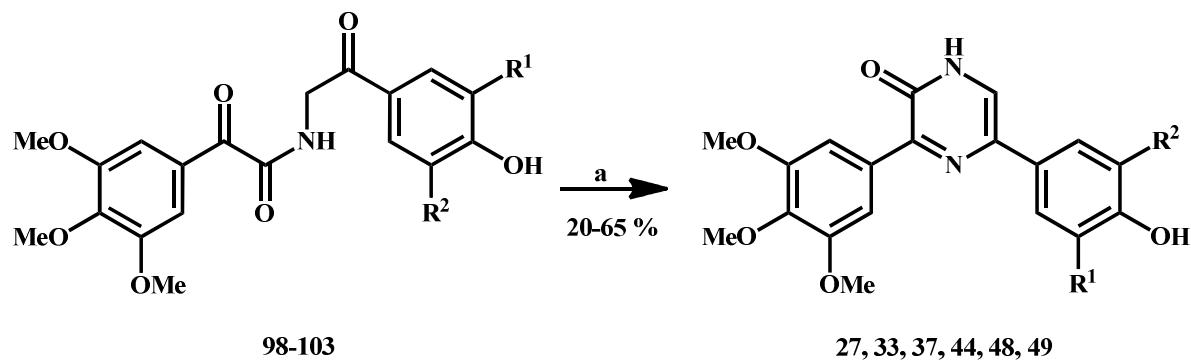
Für die Ringschlussreaktion von Glyoxylsäureamiden zu Pyrazin-2-onen wurde von J. Schlosser im Rahmen seiner Doktorarbeit eine Mikrowellensynthese entwickelt.<sup>[28]</sup> Diese Methode basiert auf einer von Miyake<sup>[55]</sup> beschriebenen Ringschlussreaktion von Diketoamiden. Bei der von Miyake beschriebenen Methode werden die Diketoamide in einer wässrigen Ammoniaklösung 48 h unter Rückfluss umgesetzt. Zur Optimierung der Reaktionsbedingungen wurde diese Methode auf die Mikrowelle übertragen und die Ammoniaklösung durch Ammoniumacetat und Eisessig ersetzt. Die dabei synthetisierten Produkte sind in der Tabelle 10 dargestellt.

**Tabelle 10:** Synthetisierten (1H)-Pyrazin-2-one **16, 27, 33, 37, 44, 48, 49**

#	R	#	R
16		44	
27		48	
33		49	
37			

#### 4.4.1 Ringschlussreaktion zu den (*1H*)-Pyrazin-2-onen 27, 33, 37, 44, 48, 49

Die Glyoxylsäureamide **98-103** wurden gemäß der von J. Schlosser beschriebenen Bedingungen mit Ammoniumacetat in Eisessig in einem 5 mL Reaktionsröhrrchen für wenige Minuten bei 130 °C erhitzt (s. Abb. 29).

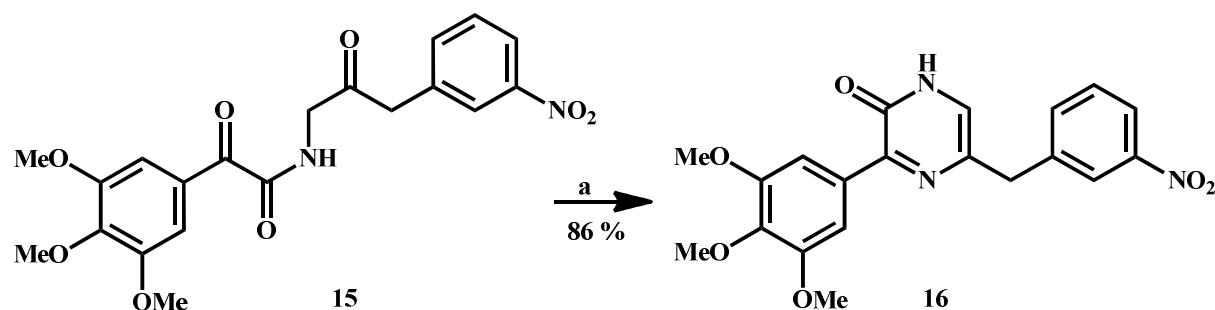


**Abb. 29:** Ringschlussreaktion zur Darstellung der Pyrazinone (**27,33, 37, 44, 48, 49**). **27/98:**  $R^1 = R^2 = \text{OMe}$ ; **33/99:**  $R^1 = \text{H}$ ,  $R^2 = \text{Cl}$ ; **37/100:**  $R^1 = R^2 = \text{Cl}$ ; **44/101:**  $R^1 = \text{H}$ ,  $R^2 = \text{OEt}$ ; **48/102:**  $R^1 = \text{Cl}$ ,  $R^2 = \text{OMe}$ ; **49/103:**  $R^1 = \text{Cl}$ ,  $R^2 = \text{OEt}$ . **a**) Ammoniumacetat, Eisessig, 130 °C MW, 8 min.

Nach Beendigung der Reaktion wurden bei der Aufreinigung unterschiedliche Lösungsmittel (MeOH, EtOH/H<sub>2</sub>O, EA) für die Umkristallisation getestet. Ethylacetat stellte sich dabei als das am besten geeignete Lösungsmittel heraus. Die Produkte **27, 33, 37, 44, 48, 49** konnten in guten Ausbeuten (20-65 %) dargestellt werden.

#### 4.4.2 Ringschlussreaktion zu dem (*1H*)-Pyrazin-2-on **16**

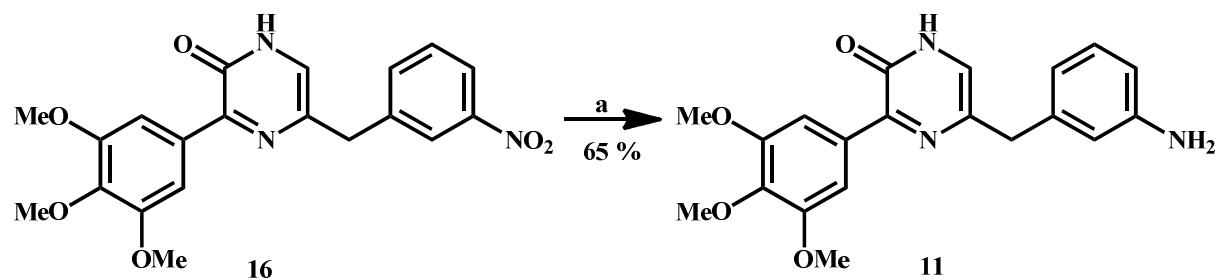
Die Ringschlussreaktion zur Darstellung des 5-(3-Nitrobenzyl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-pyrazin-2-ons (**16**) wurde analog zu der oben beschriebenen Synthese der Pyrazin-2-one durchgeführt. Dazu wurde das Glyoxylsäureamid **15** mit Ammoniumacetat und Eisessig in der Mikrowelle umgesetzt (s. Abb. 30). Das an der 5-Position mit 3-Nitrobenzyl substituierte Pyrazinon **16** konnte in guter Ausbeute von 86 % erhalten werden.



**Abb. 30:** Ringschlussreaktion zur Darstellung des Pyrazinons **16**: a) Ammoniumacetat, Eisessig, 90 °C MW, 20 min .

#### 4.5 Reduktion der Nitrogruppe in der Mikrowelle

Der *Building Block* **11**, der zur Darstellung unterschiedlich substituierter DFG<sub>out</sub>-Inhibitoren benötigt wird, wurde ausgehend der Nitroverbindung **16** durch Reduktion synthetisiert. Bei dieser Synthese wurde erneut eine Mikrowellenreaktion durchgeführt. Dabei wurde auf die Erfahrungen bei der Entwicklung der Syntheseroute der Indolderivate (vgl. Kap. 4.7.3) zurückgegriffen<sup>[40]</sup>. Die Nitroverbindung **16** wurde mit Pd/C als Katalysator und Cyclohexen als Reduktionsäquivalent bei 85 °C in einem Mikrowellenreaktor in Methanol umgesetzt (s. Abb. 31).



**Abb. 31:** Reduktion der Nitrogruppe in der Mikrowelle: a) Cyclohexen, Pd/C, MeOH, 10 min, 85 °C.

Das Produkt wurde in Form von gelben Nadeln in einer Ausbeute von 65 % erhalten.

## 4.6 Synthese unterschiedlich substituierter Benzamide und Harnstoffderivate

Die retrosynthetische Zerlegung der designten DFG<sub>out</sub>-Inhibitoren zeigt zwei Möglichkeiten, den *Building Block* **11** zu erweitern. Zum einen kann der *Building Block* **11** mit einer Carbonsäure (z.B.: Benzoësäure, Nikotinsäure) zu einem Benzamid zum anderen mit einem Isocyanat zu einem Harnstoffderivat umgesetzt werden (s. Abb. 32).

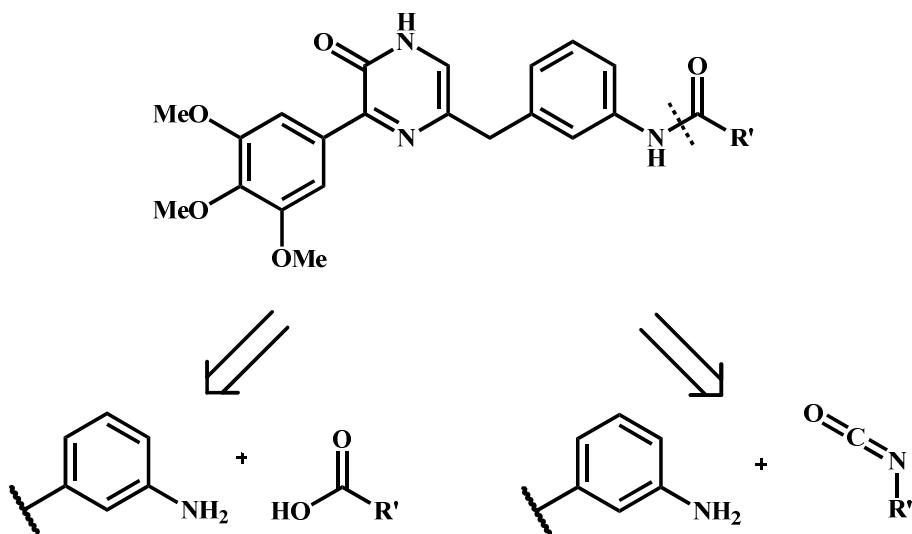
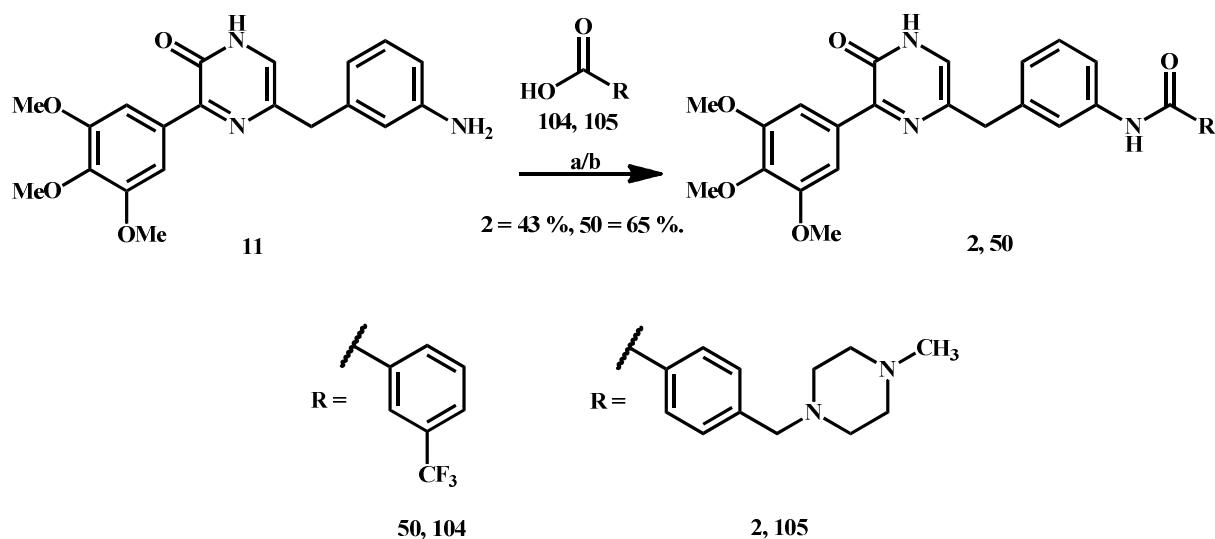


Abb. 32: Retrosynthetische Zerlegung der DFG<sub>out</sub>-Inhibitor Serien.

### 4.6.1 Amidkupplung des *Building Blocks* **11** mit den Benzoësäuren **104** und **105** zu den Benzamiden **2** und **50**

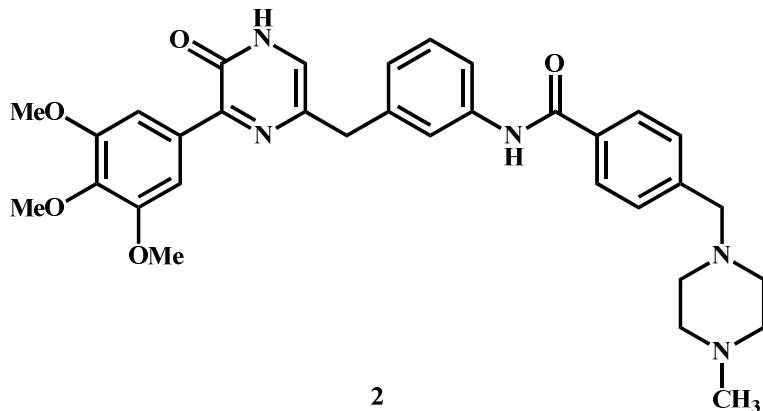
Der in Kapitel 4.5 beschriebene *Building Block* **11** wurde durch eine Amidkupplung mit den Benzoësäurederivaten **104** und **105** umgesetzt. Für die Amidkupplung wurde die bereits beschriebene Methode mittels CDI-Aktivierung angewandt (s. Abb. 33). Die Produkte wurden anschließend säulenchromatographisch aufgereinigt.



**Abb. 33:** Synthese der Benzamide **2** und **50**: **a**): CDI, DMF, 20 °C, 16 h. Ausbeute: **50** = 65 %; **b**): HATU, DIPEA, DMF, 90 °C MW, 30 min. Ausbeute: **2** = 43 %.

#### 4.6.1.1 Darstellung des Benzamids **2**

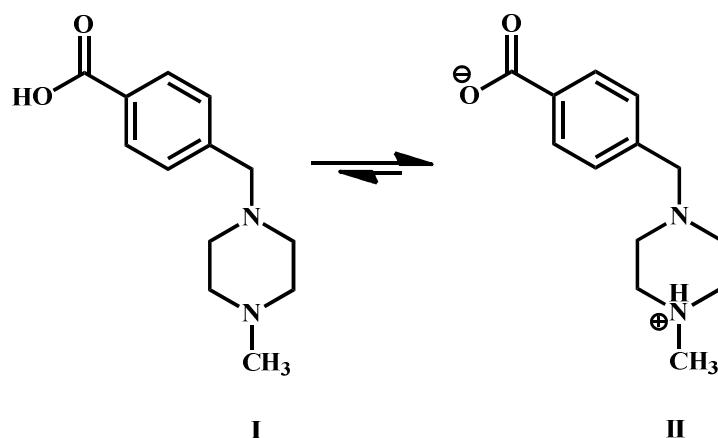
Das Benzamid **2** konnte zunächst nicht mittels einer Amidkupplung durch Umsetzung mit CDI in DMF dargestellt werden.



**Abb. 34:** 4-(4-Methylpiperazin-1-ylmethyl)-N-{3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)pyrazin-2(1H)-on-5-yl)methylphenyl}-benzamid (**2**)

Die Benzoësäure **105** wurde zunächst zur Aktivierung der Carboxylgruppe mit CDI in DMF umgesetzt. Die Reaktionskontrolle mittels HPLC zeigte jedoch kaum Umsatz unter diesen Bedingungen. Auch die Aktivierung der Benzoësäure zum Säurechlorid mit Hilfe von Thionylchlorid und anschließender Umsetzung mit dem *Building Block* **11** führte nicht zum gewünschten Produkt **2**. Bei der 4-(4-methylpiperazin-1-yl)-methylbenzoësäure (**105**) handelt es sich um einen Ampholyten, da sie sowohl eine saure Gruppe (Carboxylfunktion) als auch

eine basische Gruppe (4-Methylpiperazinyl) aufweist. Bei einem neutralen pH-Wert findet eine intramolekulare Säure-Base-Reaktion statt, sodass die Säure **I** als Carboxylat **II** in der Lösung vorliegt, was zu einer niedrigen Carbonylreakтивität führt (s. Abb. 35).



**Abb. 35:** Autoprotolyse von 4-(4-Methylpiperazin-1-yl)-methylbenzoësäure (**105**).

Da in der Literatur bereits erfolgreiche Kupplungen<sup>[7]</sup> mit der vorliegenden Säure **105** beschrieben sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Reihe von unterschiedlichen Kupplungsreagenzien getestet (s. Tab. 11).

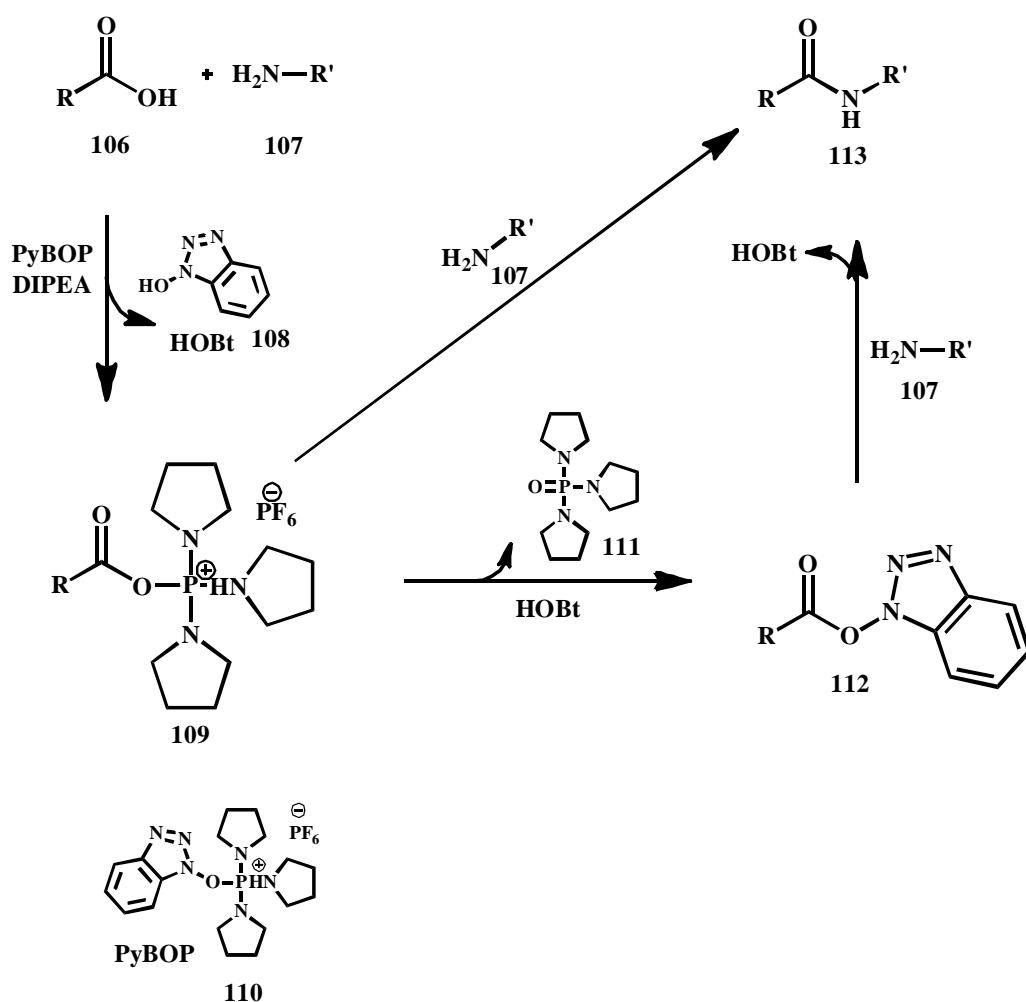
**Tabelle 11:** Reaktionsbedingungen für die Amidkupplung der Benzoësäure **105**.

#	Kupplungsreagenz	Reaktionsbedingungen	Ausbeute (%)
<b>1</b>	CDI	20 °C	0
<b>2</b>	EDCI	20 °C	0
<b>3</b>	$\text{T}_3\text{P}$ , HOBT	20 °C	0
<b>4</b>	PyBOP	20 °C	0 <sup>a</sup>
<b>5</b>	PyBOP	60 °C, MW	35 <sup>b</sup>
<b>6</b>	HATU	20 °C	1
<b>7</b>	HATU	90°C, MW	43

<sup>a</sup> Das Produkt konnte mittels LC-MS identifiziert aber nicht isoliert werden. <sup>b</sup> Das Produkt konnte nicht vollständig von dem Nebenprodukt Phosphorsäuretriamid **111** getrennt werden.

Im Reaktionsverlauf der Amidkupplung mit CDI<sup>[22][28]</sup>, EDCI<sup>[56]</sup> und  $\text{T}_3\text{P}$ <sup>[57]</sup> (Versuche 1-3) konnte kein Umsatz zum gewünschten Produkt unter den in der Literatur beschriebenen Bedingungen beobachtet werden. Bei der Reaktion mit PyBOP<sup>[58]</sup> (Versuch 4) als Kupplungsreagenz bei 20 °C konnten Spuren von dem gebildeten Endprodukt **2** mittels LC-MS identifiziert werden. Nach dem Erhitzen der Reaktionslösung auf 60 °C für 3 h (Versuch 5) konnte während der Reaktionskontrolle mittels HPLC ein höherer Umsatz im Vergleich zum Versuch 4 detektiert werden (s. Tab. 11). Das Erhitzen der Lösung für weitere 2 h führte zu keiner Steigerung der Umsetzung. Weiterhin gelang es nicht, das reine Produkt zu isolieren. Der Me-

chanismus der Kupplungsreaktion mittels PyBOP **110** als Kupplungsreagenz und die Entstehung des Nebenproduktes Phosphorsäuretriamid **111** kann der Abbildung 36 entnommen werden.



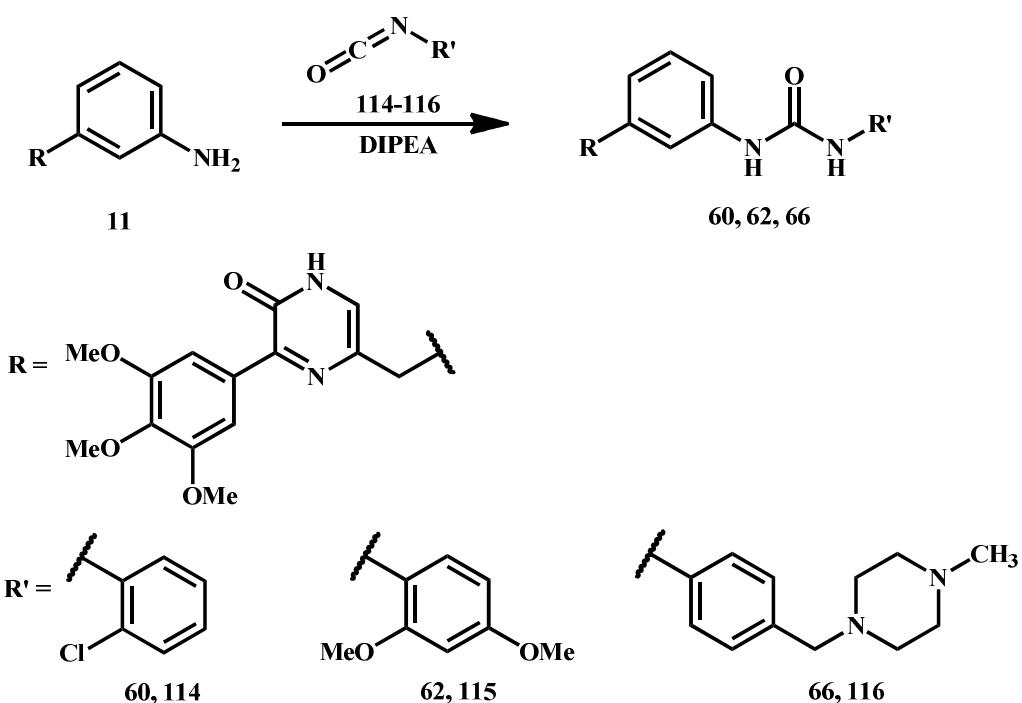
**Abb. 36:** Mechanismus der Amidkupplung mit PyBOP und DIPEA.

Im ersten Schritt wird die Carbonsäure **106** durch den Einsatz einer Base (DIPEA) deprotoniert. Das negativ geladene Carboxylation greift anschließend nucleophil am Phosphor des PyBOPs (**110**) an, wobei formal das 1-Hydroxybenzotriazol (HOBr, **108**) freigesetzt wird. Das dabei entstandene Phosphoniumsalz **109** reagiert weiter mit HOBr **108** zum Oxybenzotriazol-Aktivester **112**. Sowohl das Phosphoniumsalz **109** als auch der Aktivester **112** setzen sich mit der Aminkomponente **107** zum Amid **113** um. Die Entstehung des thermodynamisch stabilen Nebenprodukts Phosphorsäuretriamid **111** (s. Abb. 36) stellt die Triebkraft der Reaktion dar.<sup>[58]</sup> Das dabei entstandene Nebenprodukt **111** konnte weder durch säulenchromatographische Aufreinigung noch durch Umkristallisation von dem gewünschten Produkt **2** getrennt werden. Deshalb wurde ein weiteres in der Literatur beschriebenes Kupplungreagenz

(HATU)<sup>[59]</sup> für die Amidkupplung eingesetzt (Versuche 6 und 7, Tab. 9). Der erste Reaktionsversuch wurde zunächst bei Raumtemperatur (20 °C) durchgeführt (Versuch 6). Das gewünschte Produkt konnte anschließend jedoch nur in einer niedrigen Ausbeute von 1 % isoliert werden. Die Adaptierung der Reaktionsbedingungen auf die Mikrowelle und die Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 90 °C für 30 min (Versuch 7) führten anschließend zu einer Steigerung der Ausbeute auf 43 %.

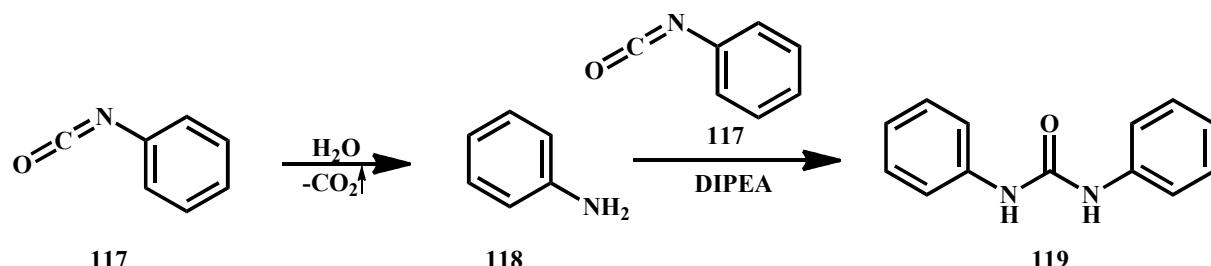
#### 4.6.2 Darstellung der Harnstoffderivate

Alternativ zu der Amidkupplung wurde die Synthese von Harnstoffderivaten zur Darstellung von DFG<sub>out</sub>-Inhibitoren durchgeführt. Dabei wurde der *Building Block* **11** mit den Isocyanaten **114-116** umgesetzt (s. Abb. 37).<sup>[60]</sup>



**Abb. 37:** Darstellung der Harnstoffderivate **60**, **62** und **66**, ausgehend von dem *Building Block* **11** und den Isocyanaten **114-116**.<sup>[60]</sup>

Die Isocyanate **114** und **115** wurden durch eine Reaktion mit dem *Building Block* **11** und DIPEA in abs. DMF bei 20 °C unter Stickstoffatmosphäre zu den Harnstoffderivaten **60** und **62** umgesetzt. Dabei ist es sehr wichtig unter Ausschluss von Wasser zu arbeiten, da Isocyanate durch eine Reaktion mit Wasser unter CO<sub>2</sub>-Abspaltung zu Aminen abreagieren (vgl. Abb. 38). Das so entstandene Amin **118** kann wiederum mit dem Isocyanat **117** zu dem Dimer **119** reagieren. Die beschriebene Dimerisierung ist am Beispiel des Isocyanats **117** in der Abbildung 38 dargestellt.

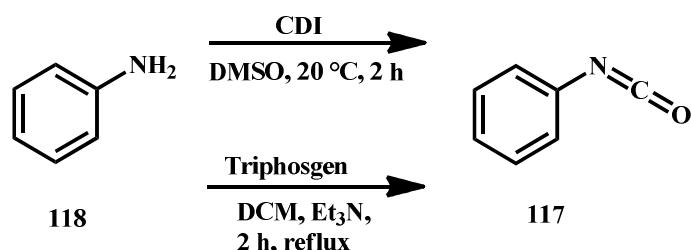


**Abb. 38:** Dimerisierung am Beispiel eines Isocyanats **117** unter Einfluss von Wasser.

Der mit HPLC detektierte Umsatz zum gewünschten Harnstoffderivat konnte durch die Zugabe des Molekularsiebs und dem Arbeiten unter Schutzgasatmosphäre ( $\text{N}_2$ ) verbessert werden. Das jeweilige Produkt wurde durch die Zugabe von Wasser gefällt, abfiltriert und säulenchromatographisch aufgereinigt.

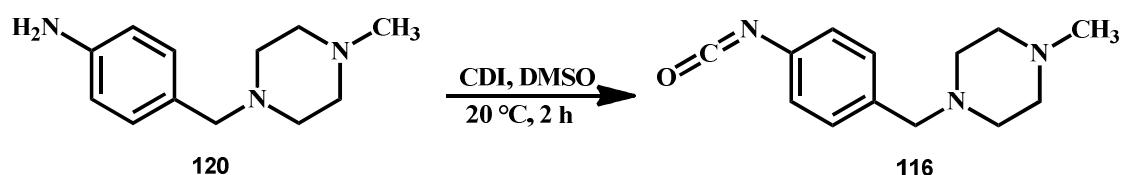
#### 4.6.2.1 Darstellung des Isocyanats **116** und anschließende Umsetzung zum Harnstoffderivat **66**

Zur Darstellung kommerziell nicht erhältlicher Isocyanate findet man in der Literatur mehrere Methoden. Wie in der Abbildung 39 dargestellt, kann das Isocyanat **117** z.B. durch Umsetzung des Amins **118** entweder mit Hilfe von CDI<sup>[61]</sup> oder mittels Triphosgen<sup>[62]</sup> *in situ* dargestellt werden.



**Abb. 39:** Darstellungsmethoden eines Isocyanats **119** unter der Verwendung von CDI<sup>[61]</sup> oder Triphosgen<sup>[62]</sup>.

Für die Darstellung des Harnstoffderivates **66** wurde das dafür benötigte Isocyanat **116** ausgehend von 4-(4-Methylpiperazin-1-ylmethyl)-phenylamin (**120**) synthetisiert. Das kommerziell erworbene Amin **120** wurde mit Hilfe von CDI in DMSO zum Isocyanat umgesetzt und für die nachfolgende Kupplung ohne Aufarbeitung eingesetzt (s. Abb. 40).

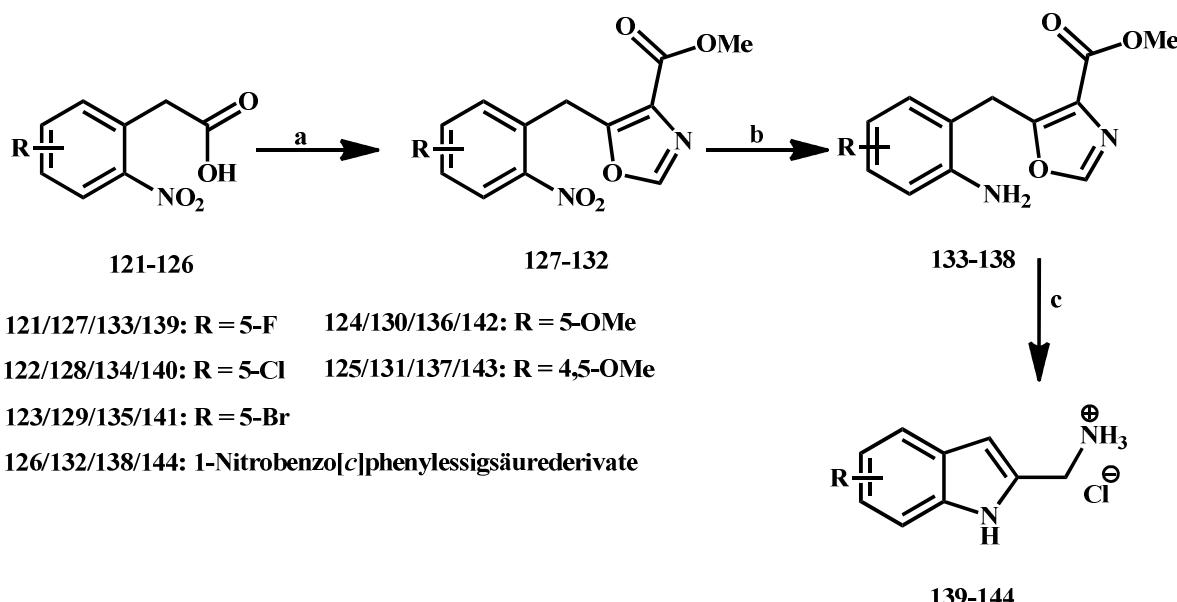


**Abb. 40:** Darstellung des Isocyanats **116** unter der Verwendung von CDI.

Das Isocyanat wurde anschließend mit dem *Building Block* **11** zum Harnstoffderivat **66** umgesetzt. Nach der säulenchromatographischen Aufreinigung lag die Ausbeute allerdings bei nur 1%. Eine mögliche Ursache für die geringe Ausbeute könnte der schlechte Umsatz des Amins **120** zum Isocyanat **116** mit CDI sein. Außerdem konnte mittels LC-MS die Bildung des Dimers des Isocyanats **116** detektiert werden.

## 4.7 Darstellung der Indolderivate

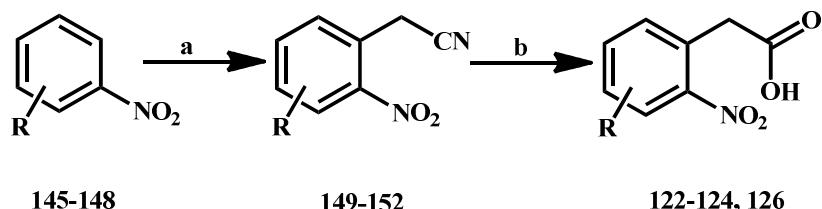
Die Darstellung der unterschiedlichen Indolderivate konnte in drei Syntheseschritten, ausgehend von verschiedenen substituierten Nitrophenylessigsäuren **121-126**, realisiert werden (s. Abb. 41).



**Abb. 41:** Darstellung der Indol-2-ylmethylamine **139-144**, ausgehend von den 2-Nitrophenylessigsäuren **121-126**, in drei Syntheseschritten. Die Reaktionen wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt: **a**: 1. CDI, 2. 2-Methylisocyanoacetat; **b**: Pd/C, Cyclohexen, MeOH, MW; **c**: HCl/MeOH (1:1), Rückfluss, 5 h.

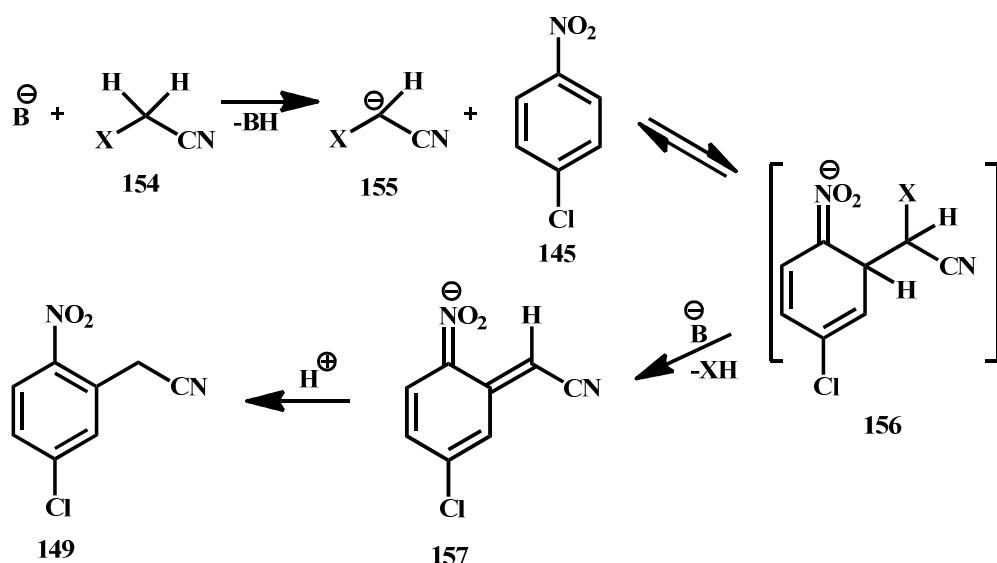
### 4.7.1 Darstellung der Nitrophenylessigsäuren

Die Nitrophenylessigsäuren **121** und **125** wurden kommerziell erworben und direkt für die Darstellung der Oxazolderivate (**127**, **131**) eingesetzt. Die *ortho*-Nitrophenylessigsäuren **122-124** und **126** wurden zunächst in zwei Syntheseschritten nach Makosza et al.<sup>[63]</sup> dargestellt (s. Abb. 42).



**Abb. 42:** Darstellung der *ortho*-Nitrophenylessigsäuren **122-124**, **126** in zwei Syntheseschritten. Die Reaktionen wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt: **a**: 4-Chlorophenoxyacetonitril, Kalium-*tert*-butanolat, -24 °C, DMF; **b**: HCl/AcOH (1:5), Rückfluss 4 h. **145**: R = 4-Cl; **146**: R = 4-Br; **147**: R = 4-OMe; **122/149**: R = 5-Cl; **123/150**: R = 5-Br; **124/151**: R = 5-OMe; **148/152**: 1-Nitronaphthalinderivate; **126**: 1-Nitrobenzo[c]phenylessigäurederivat.

Die Darstellung der *ortho*-Nitrobenzylnitrilderivate **149-152**, ausgehend von den aromatischen Nitroverbindungen **145-148**, wurde durch eine stellvertretende nukleophile Substitution (*vicarious nucleophilic substitution*, VNS) nach Makosza et al.<sup>[63]</sup> durchgeführt. Diese Methode stellt einen Spezialfall der nukleophilen aromatischen Substitution ( $S_NAr$ ) dar. Im Vergleich zur  $S_NAr$  wird bei der VNS anstelle einer Abgangsgruppe (z.B.: ein Halogen) ein Wasserstoffatom substituiert. Der -M-Effekt der Nitrogruppe dirigiert die VNS in die *ortho*- und *para*-Position, wobei die *ortho*-Position bevorzugt ist.<sup>[63]</sup> In der Abbildung 43 ist der Mechanismus dieser Reaktion am Beispiel des Nitrils **149** dargestellt.



**Abb. 43:** Mechanismus einer VNS nach Makosza<sup>[63]</sup> am Beispiel des Nitrils **149**. X = Abgangsgruppe (Cl, OPhCl).

Bei der VNS wird das Nucleophil **154** verwendet, das eine elektronenziehende Gruppe (CN) und eine Abgangsgruppe (X) trägt. Im ersten Schritt wird mittels einer Base ( $B^-$ ) ein Proton an **154** abgespalten. Das dabei entstehende Anion **155** greift nucleophil am Aromaten **145** an. Der -M-Effekt der Nitrogruppe dirigiert den Substituenten in die *ortho*-Position. Dabei entsteht zunächst die Zwischenstufe **156**. Anschließend kommt es in Anwesenheit einer Base zu einer  $\beta$ -Eliminierung und zu einer Ausbildung einer C-C-Doppelbindung (Verbindung **157**). Durch die anschließende Hydrolyse mit einer Säure (HCl) wird das gewünschte Nitril **149** gebildet (s. Abb. 42).

Zu Beginn des Projektes wurde im Rahmen dieser Arbeit für die Synthese des Nitrils Chloroacetonitril als Nucleophil und Natriumhydrid als Base eingesetzt. Die Aufreinigung des Produktes dieser Methode gestaltete sich jedoch als sehr schwierig. Während der Reaktion entstand eine Vielzahl von nicht identifizierten Nebenprodukten in Form eines dunkelbraunen

Niederschlags, der nur schwer durch Extraktion und anschließende säulenchromatographische Aufreinigung zu entfernen war. Im Verlauf der Optimierung der Reaktionsbedingungen wurde ein Austausch der Base ( $\text{NaH}$ ) durch die stärkere, sterisch gehinderte Base Kalium-*tert*-butanolat durchgeführt. Zusätzlich wurde das Nucleophil (Chloracetonitril) durch 4-Chlorphenoxyacetonitril ausgetauscht. Das führte schließlich zu einer höheren Ausbeute und einer einfacheren Aufarbeitung.<sup>[40]</sup> Die anschließende Hydrolyse des Nitrils zu den entsprechenden *o*-Nitrophenylessigsäuren erfolgte unter sauren Bedingungen mit sehr guten Ausbeuten (64-99 %).<sup>[40]</sup>

#### 4.7.2 Synthese des 4-Methoxynitrobenzols

4-Methoxynitrobenzol (**147**) wurde ausgehend von dem 4-Nitrophenol (**158**) mittels einer Methylierung mit Iodmethan und Kaliumcarbonat in guter Ausbeute von 98 % dargestellt (s. Abb. 44).

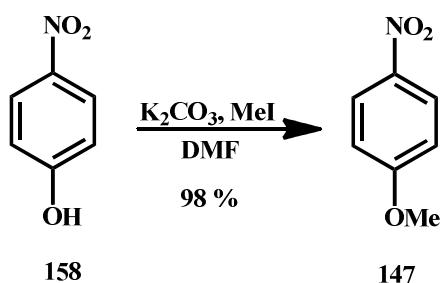
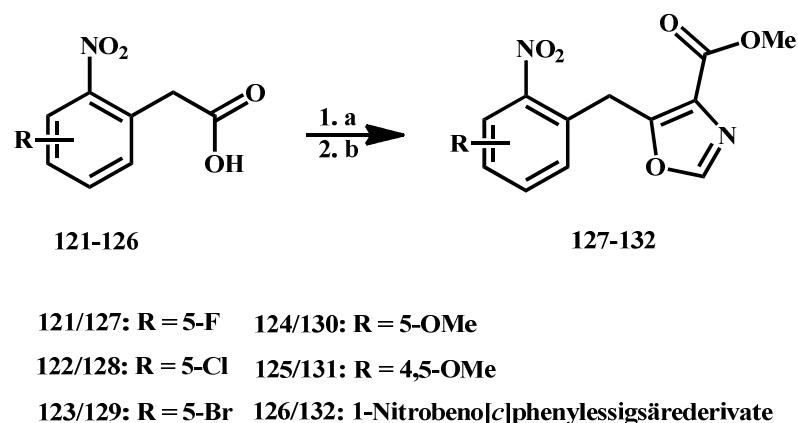


Abb. 44: Synthese des 4-Methoxynitrobenzols (**149**).

#### 4.7.3 Synthese der Oxazolderivate

Der erste Schritt der neuartigen Indolsynthese ist die Darstellung des Oxazols. Dazu wurde die *ortho*-Nitrophenylessigsäuren **121-126** im ersten Syntheseschritt mit CDI aktiviert und anschließend in Anwesenheit einer sterisch anspruchsvollen Base ( $\text{NaHMDS}$ ) und Methylisocyanat zum Oxazol nach Suzuki<sup>[51]</sup> umgesetzt (s. Abb. 45).



**Abb. 45:** Oxazolsynthese ausgehend von den *ortho*-Nitrophenylessigäuren **121-126**. **1. a)**: CDI, abs. THF. **2. b)**: NaHMDS, Methylisocyanat, THF, 20 °C.

Die Darstellung des Oxazols, ausgehend von einer kommerziell erhältlichen 2,4-Dinitrophenylessigäure, konnte nicht erfolgreich durchgeführt werden, da diese Säure in Lösung bei 20 °C decarboxyliert. Das dabei entstehende 2,4-Dinitrotoluol konnte mit Hilfe einer LC-MS- und NMR-Analytik identifiziert werden.

#### 4.7.4 Reduktion der Nitrogruppe zu einem Amin

Der nächste Syntheseschritt ist die Reduktion der Nitrogruppe zu einem Amin. Die Reduktion der Verbindungen **127-132** wurde mit Hilfe von Pd/C als Katalysator und Cyclohexen als Wasserstofflieferant in Methanol bei 90 °C in einer Mikrowelle durchgeführt.<sup>[28][40]</sup> Bei dem Versuch, diese Methode auch zur Reduktion der Chlor- und Brom-substituierten Verbindungen **128** und **129** einzusetzen, kam es wiederholt zunächst zu einer reduktiven Abspaltung des Halogens und anschließend zu einer Reduktion der Nitrogruppe (Versuch 1, Tab. 12). Die Reduktion der Nitrogruppe in Anwesenheit eines *p*-Fluorsubstituenten verlief dagegen ohne Nebenreaktionen in guter Ausbeute (95 %). Daraufhin wurden unterschiedliche milde Reduktionsmethoden getestet. Bei der Reduktion mit Pd/C als Katalysator und H<sub>2</sub>-Gas (1 bar) sowie der Reduktion mit FeCl<sub>3</sub> · 6 H<sub>2</sub>O und Zink unter sauren Bedingungen konnte kein Produkt isoliert werden (Versuch 3, Tab 12).

**Tabelle 12:** Methoden zur Reduktion der Nitrogruppe in Anwesenheit eines Chlor- bzw. Bromsubstituenten.

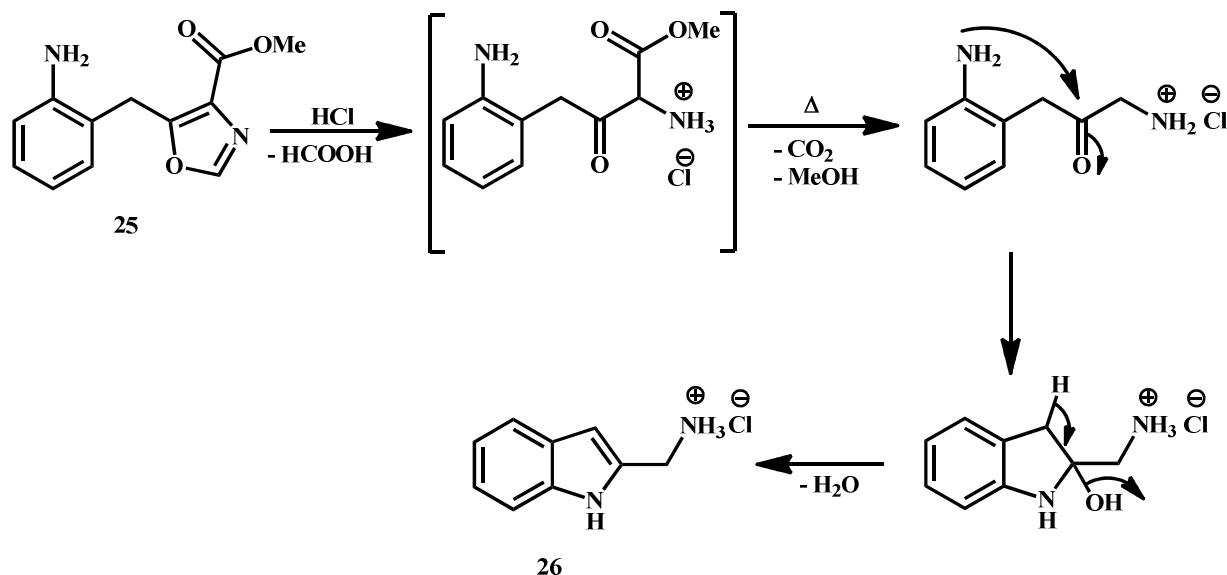
#	Reduktionsmethode	Ausbeute [%]
1	Pd/C, Cyclohexen, MeOH, MW	0
2	Pd/C, H <sub>2</sub> , 1 bar, MeOH, 20 °C	0
3	FeCl <sub>3</sub> *6 · H <sub>2</sub> O, Zn, AcOH, DMF/H <sub>2</sub> O (1:1), Rückfluss	0
4	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O/THF (1:1), N <sub>2</sub>	56 <sup>a</sup> /36 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Das mit Chlor substituierte Oxazol. <sup>b</sup> Das mit Brom substituierte Oxazol.

Erst der Einsatz von Natriumdithionit<sup>[64]</sup> als Reduktionsmittel führte schließlich ohne reduktiven Abspaltung der Halogene Chlor und Brom zu dem gewünschten Produkt. Dabei wurde die in THF gelöste Nitroverbindung **128** und **129** zu einer Lösung aus Natriumdithionit (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) in Wasser gegeben und anschließend für 6 h unter Stickstoff-Atmosphäre gerührt. Da sich das Natriumdithionit durch den Kontakt mit Sauerstoff zersetzt, sollte es möglichst frisch und unter Schutzatmosphäre eingesetzt werden. Mit dieser Methode konnte die Reduktion der Nitrogruppe der Chlor- und Brom-substituierten Oxazole erfolgreich durchgeführt werden.<sup>[40]</sup>

#### 4.7.5 Darstellung der Indol-2-yl-methylamin Hydrochloride **139-144**

Im letzten Schritt der neuartigen Indolsynthese wurden die Oxazole **133-138** unter sauren Bedingungen gespalten und durch den darauf folgenden Ringschluss zu den gewünschten Indolen **139-144** umgesetzt. Der Mechanismus dieser Reaktion kann der Abbildung 46 entnommen werden.



**Abb. 46:** Mechanismus der Ringschlussreaktion zum Indol.

Durch den Einsatz von Salzsäure unter Rückfluss wurde zunächst das Oxazol **25** gespalten, wobei es zu einer Decarboxylierung der Methylestergruppe unter Freisetzung von Ameisensäure, Kohlenstoffdioxid und Methanol kam. Die freie Aminogruppe am Phenylring griff anschließend nucleophil am Carbonylkohlenstoff der gebildeten  $\alpha$ -Ketoamingruppe an, wobei es unter Abspaltung eines Wassermoleküls (Kondensationsreaktion) zu einer Ringschlussreaktion und zur Bildung des Indols **26** kam.

## 5. Methoden der biochemischen Charakterisierung

Die im Rahmen dieser Arbeit bearbeiteten und synthetisierten 3,5-Diarylpyrazin-2-on PDGFR $\beta$ -Inhibitoren (**1**, **2**, **33**, **44**, **50**, **60**, **62**, **66**) sollten biochemisch untersucht werden (s. Tab. 13). Zur biochemischen Charakterisierung der Testsubstanzen wurden unterschiedliche biochemische Methoden wie Proliferationsassay, Kinaseassay oder Western Blot Untersuchungen verwendet. Die drei genannten Assays wurden von Christian Renn im Rahmen seiner Master-Arbeit<sup>[65]</sup> am Pharmazeutischen Institut in Kiel durchgeführt. Anhand dieser Ergebnisse wurde anschließend jeweils die Verbindung mit der stärksten antiproliferativen Wirkung aus der DFG<sub>in</sub>- bzw. der DFG<sub>out</sub>-Serie für externe Untersuchungen zur Bestimmung des jeweiligen Selektivitätsprofils ausgewählt.

**Tabelle 13:** Auswahl der PDGFR $\beta$ -Inhibitoren für biochemische Untersuchungen.

#	R	#	R
1		50	
2		60	
33		62	
44		66	

### 5.1 Proliferationsassay

Die in der Tabelle 13 aufgeführten Inhibitoren wurden in einem Proliferationsassay an der Glioblastomzelllinie U87-MG, bei der der PDGFR $\beta$ -Signalweg autokrin stimuliert ist<sup>[66]</sup>, getestet. Die biochemische Untersuchung wurde wie folgt durchgeführt: eine definierte Anzahl der Zellen wurden in eine 96-Well-Platte ausgesät und für 24 h in einem Zellmedium bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit den Testsubstanzen unter-

schiedlicher Konzentration, gelöst in DMSO, versetzt und weitere 48 h inkubiert. Die Endkonzentration von DMSO betrug 0.5 %. Für die Bestimmung der zellulären Proliferation wurde eine Referenzplatte verwendet, deren Zellzahl ( $T_z$ ) direkt vor Substanzzugabe bestimmt wurde. Zur Bestimmung der Zellkonzentration wurde der Redoxindikator Resazurin verwendet, welcher durch metabolisch aktive Zellen zu dem fluoreszierenden Resorufin reduziert wird. Die mittels eines Fluoreszenz-Spektrometers detektierte Emission korreliert linear mit der Zellkonzentration<sup>[67]</sup>.

### 5.1.1 Auswertung der Daten

Die prozentuale Zellproliferation wurde mit Hilfe folgender Gleichungen berechnet:

$$\text{Zellproliferation [\%]} = \frac{T_i - T_z}{C - T_z} \cdot 100; \text{ wenn } T_i \geq T_z \quad (1)$$

$$\text{Zellproliferation [\%]} = \frac{T_i - T_z}{T_z} \cdot 100; \text{ wenn } T_i \leq T_z \quad (2)$$

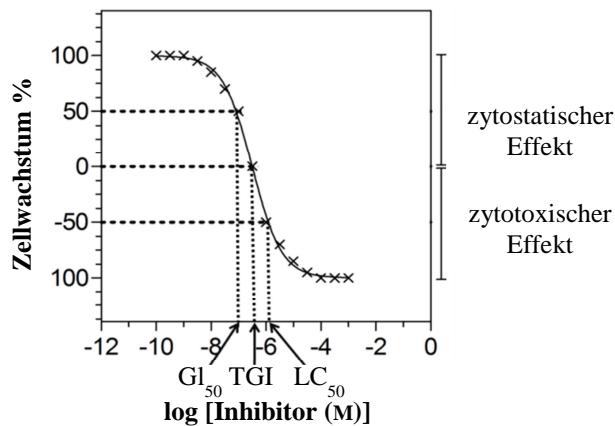
Dabei sind  $T_i$  = Zellzahl der Probe (Testplatte) nach 48 h Inkubation mit Inhibitoren

$T_z$  = Zellzahl bei Inhibitorzugabe (Referenzplatte) bei 0 h Inkubation mit Inhibitoren

$C$  = Zellzahl nach 48 h Inkubation mit 0.5 % DMSO, Kontrolle (Negativkontrolle)

Mit Hilfe der Software GraphPad Prism<sup>5[68]</sup> wurden die bestimmten Zellproliferationswerte in Prozent gegen die logarithmierte Inhibitor-Konzentration graphisch aufgetragen und eine sigmoidale Dosis-Wirkungs-Kurve gefüttet. In der Abbildung 47 ist ein idealisierter Verlauf einer Dosis-Wirkungs-Kurve dargestellt. Die gemessenen Zellwachstumsraten (in %) können in zwei Bereiche eingeteilt werden: im Bereich zwischen 0 und 100 % kann ein zytostatischer Effekt, der von der Inhibitorkonzentration abhängig ist, beobachtet werden. Im Bereich zwischen 0 und -100 % kann ein zytotoxischer Effekt, bei dem die Inhibitorkonzentration zum Absterben der Zellen führt, beobachtet werden. Mit Hilfe des Programms GraphPad Prism<sup>5</sup> können drei Inhibitorkonzentrations-Kennwerte ( $GI_{50}$ , TGI,  $LC_{50}$ ) berechnet werden. Der Kennwert  $GI_{50}$  leitet sich aus dem englischen *Growth Inhibition* ab und steht für eine Inhibitorkonzentration, bei der eine Wachstumsreduktion der Zellen um 50 % erreicht wird. TGI leitet sich aus dem englischen *Total Growth Inhibition* ab und steht für eine Inhibitorkonzentration, bei der eine Wachstumsreduktion der Zellen von 100 % beobachtet wird. Der

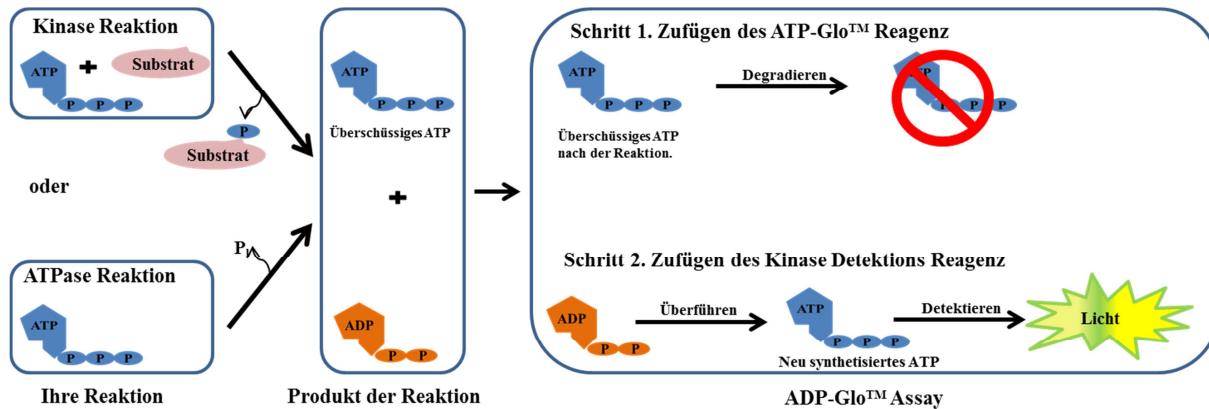
Kennwert  $LC_{50}$  steht für die Konzentration des Inhibitors, die für 50 % der Zellen fatal ist. Dieser Kennwert leitet sich aus dem englischen *Lethal Concentration* ab.



**Abb. 47:** Idealisierter Verlauf einer Dosis-Wirkungs-Kurve. Die aufgenommenen Zellproliferationswerte in Prozent sind gegen die logarithmierte Inhibitorkonzentration aufgetragen. Es sind drei Kennwerte ( $GI_{50}$ , TGI,  $LC_{50}$ ) gekennzeichnet. Außerdem können die Inhibitorkonzentrationen der zytostatische und ein zytotoxische Effekt zugeordnet werden. Verändert nach Pinchuk.<sup>[69]</sup>

## 5.2 Kinaseassay

Zu der Bestimmung von  $IC_{50}$ -Werten der Inhibitoren bezogen auf die Hemmung der Kinaseaktivität wurde ein aktivitätsbasierender PDGFR $\beta$ -Kinaseassay von C. Renn<sup>[65]</sup> durchgeführt. Dabei wurde der „ATP-GLO™ Kinase Assay“ der Fa. Promega verwendet. Die Funktionsweise dieses Assays ist in der Abbildung 48 schematisch dargestellt.



**Abb. 48:** Schematische Darstellung des Detektionsprinzips des Kinaseassays. Adaptiert nach Promega.<sup>[70]</sup>

Im ersten Schritt überträgt die PDGFR $\beta$ -Kinase ein Phosphat vom ATP auf das in diesem Assay eingesetzte Substrat Polypeptid (Glu<sub>4</sub>Tyr<sub>1</sub>). Nach der Zugabe des ADP-Glo-Reagens wird die Reaktion abgebrochen, wobei das überschüssige ATP degradiert wird. Das nach der Reak-

tion mit der Kinase entstandene ADP wird durch die Zugabe eines Detektions-Reagenzes zu ATP phosphoryliert (s. Abb. 48, rechts). Während der Detektion wird das neu gebildete ATP wieder zu ADP und das zugegebene Luciferin zu Oxyluciferin mit Hilfe von Luciferase katalytisch umgesetzt. Die dabei entstehenden Photonen werden mit Hilfe eines Luminometers detektiert<sup>[70]</sup>. Daraus folgt, dass die bei der Reaktion entstehende Lumineszenz mit der Aktivität der Kinase korreliert.

### 5.2.1 Durchführung und Auswertung des Kinaseassays

Die Durchführung des Kinaseassays wurde in 96-Well-Platten unter der Verwendung von unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen realisiert. Alle Messungen wurden zwei Mal durchgeführt. Nach der Zugabe aller Reagenzien wurde 60 min bei Raumtemperatur inkubiert, wobei je nach Fragestellung die ATP-Konzentration im Bereich zwischen 10 und 1000 µM variiert wurde.

Die prozentuale Kinaseaktivität wurde mit folgender Formel (4) berechnet:

$$\text{Aktivität [%]} = 100 \cdot \frac{\text{Signalintensität Inhibitor-Hintergrundsignal}}{\text{Signalintensität ohne Inhibitor-Hintergrundsignal}} \quad (3)$$

Mit Hilfe der Software GraphPad Prism<sup>5[68]</sup> wurde die gemessene Aktivität in Prozent gegen die logarithmierte Inhibitor-Konzentration graphisch dargestellt und die Sigmoidfunktion an die Werte gefittet. Mit Hilfe dieser Funktion wurden die IC<sub>50</sub>-Werte bestimmt.

### 5.2.2 Kinaseassay mit Präinkubationszeiten

Der Kinaseassay mit Präinkubationszeiten wurde analog zu der im Kapitel 5.2 beschriebenen Methode mit dem DFG<sub>out</sub>-Inhibitor **2** durchgeführt. Für die Untersuchung wurde eine ATP-Konzentration von 1000 µM und eine Inhibitorkonzentration von 0.1 bis 5000 nM gewählt. Die unterschiedlichen Konzentrationen der Verbindung **2** wurden zu der PDGFRβ-Kinase gegeben und für 0, 10, 20, 30, 60 und 120 min präinkubiert. Durch die Zugabe von ATP wurde die Kinasereaktion gestartet. Anschließend wurde analog zu der bereits beschriebenen Methode die Lumineszenz gemessen. Zum Vergleich wurden diese Versuche mit Inkubationszeiten von 0, 60 und 120 min mit dem DFG<sub>in</sub>-Inhibitor CP-673451 als Referenz durchgeführt.

### 5.3 Western Blot

Der antiproliferative und zytotoxische Effekt der im Proliferationsassay gemessenen Inhibitoren sollte auf der Signaltransduktionsebene mittels Western Blot verifiziert werden. Dafür wurden zum einen das phosphorylierte PDGFR $\beta$  (p-PDGFR $\beta$ ) und das *total* PDGFR $\beta$  (t-PDGFR $\beta$ ), das als Ladekontrolle diente, mit einem spezifischen Antikörper vermessen. Des Weiteren wurden die phosphorylierten Kinasen ERK (*Extracellular-signal Regulated Kinase*) und AKT, die in der Signalkaskade unterhalb von PDGFR $\beta$  lokalisiert sind, untersucht. ERK reguliert die Zellteilung und führt bei Inhibierung von PDGFR $\beta$  zur Inaktivierung der Zellproliferation. Gleichzeitig sorgt die Inhibierung von PDGFR $\beta$  über AKT für Apoptose der Zelle.<sup>[71][72]</sup>

#### 5.3.1 Durchführung der Western Blot-Analyse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Western Blot-Versuche mit den Zelllinien U87-MG und NIH3T3 durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen 72 h inkubiert und nach der Zugabe von verschiedenen Inhibitor-Konzentrationen die Signaltransduktion untersucht. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Proteinkonzentration bestimmt. Mit Hilfe einer Sodium-dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) wurden die Proteine getrennt und mit spezifischen Antikörpern die phosphorylierten Kinasen (vgl. Kap. 5.3) detektiert. Die Gesamtmengen der entsprechenden Kinasen dienten als Ladekontrolle.

### 5.4 Selektivitätsprofil der Verbindungen 1 und 2

Im Rahmen dieser Arbeit wurden von den zwei Testverbindungen **1** (DFG<sub>in</sub>-Inhibitor) und **2** (DFG<sub>out</sub>-Inhibitor) Selektivitätsprofile mit zwei unterschiedlichen Methoden bestimmt. Die Messungen bei der Fa. ProQinase wurden mit einem aktivitätsbasierten Kinaseassay und bei der Fa. DiscoveRx im bindungsbasierten Kinaseassay durchgeführt.

#### 5.4.1 Aktivitätsbasierter Selektivitätsassay

Für die Aufnahme eines Selektivitätsprofils wurden die oben genannten Substanzen bei einer Konzentration von 1  $\mu$ M an 300 unterschiedlichen Kinasen von der Fa. ProQinase vermessen. Die für das Assay verwendeten Kinasen lagen vorwiegend in der hyperphosphorylierten (aktiven) Form vor. Es handelte sich um einen radioaktiven *in vitro* Kinaseassay, bei dem ein Phosphor im Phosphatrest des ATPs durch das Phosphorisotop <sup>33</sup>P ausgetauscht wurde. Währ-

rend des Assays wird das radioaktiv markierte Phosphat durch die Kinase auf das Substrat übertragen. Danach wird das radioaktive Substrat von dem radioaktiven ATP chromatographisch oder durch Filtration getrennt und die Radioaktivität des Substrats gemessen. Die Radioaktivität ist dabei proportional zu der Kinaseaktivität.

#### 5.4.1.1 Durchführung und Auswertung

Der Kinaseassay der Fa. ProQinase wurde in 96-Well-Platten mit einem Reaktionsvolumen von 50 µl durchgeführt.

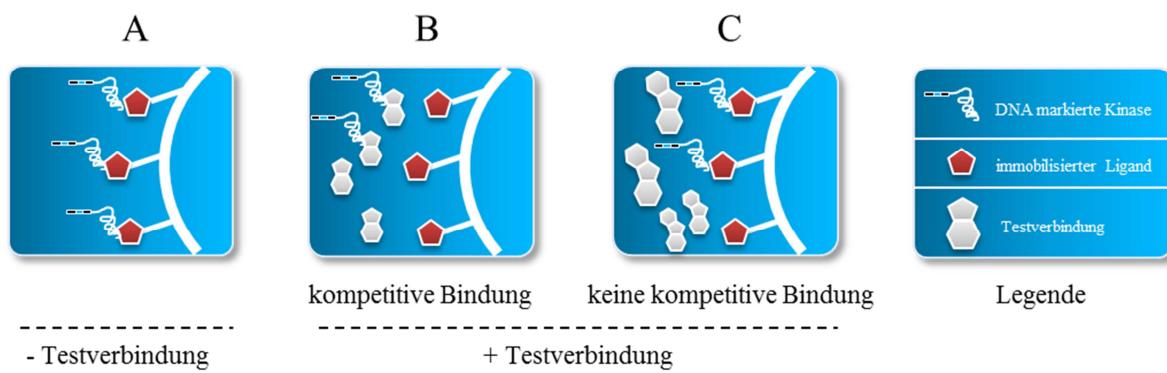
Für die Auswertung des Assays wurden für jede Kinase drei Werte mit Inhibitor, drei ohne Inhibitor (Vergleichswert) und drei Werte ohne Bestandteile (Hintergrundsignal) aufgenommen. Die dabei erhaltenen Messwerte wurden gemittelt und mit Hilfe der Gleichung (4) die Restaktivität bestimmt.

$$\text{Restaktivität [%]} = 100 \cdot \frac{\text{Signalintensität-Hintergrundsignal}}{\text{Signalintensität ohne Inhibitor-Hintergrundsignal}} \quad (4)$$

Die Ergebnisse dieser Messung wurden tabellarisch für alle Kinasen in Form einer *heatmap* dargestellt. Im verwendeten Farbcode steht Rot für niedrige Restaktivität, Weiß für hohe Werte. Weitere experimentelle Details sind in der Masterarbeit von C. Renn<sup>[65]</sup> zu finden.

#### 5.4.2 Bindungsbasierter Selektivitätsassay

Im Gegensatz zu der im Kapitel 5.4.1 beschriebenen Methode verwendet die Fa. DiscoveRx einen bindungsbasierten Kinaseassay zur Bestimmung eines Selektivitätsprofils. Die Testverbindungen 1 und 2 wurden an über 96 Kinasen bei einer Konzentration von 1 µM getestet. Bei dem Assay wird in Abwesenheit von ATP die kompetitive Verdrängung des nicht spezifischen Inhibitors Staurosporin durch die Testsubstanz detektiert. In der Abbildung 49 ist die Funktionsweise dieser Methode schematisch dargestellt. Das Testsystem besteht dabei aus sog. *Beads* (kleinen Kugeln), an denen Staurosporin gebunden ist. Die Kinasen sind mit einem DNA-Fragment versehen und binden zunächst an dem immobilisierten Inhibitor (Abb. 49 A). Bei der Zugabe der Testverbindung verdrängt diese zum Teil das Staurosporin aus der Bindetasche. Die Kinase wird somit von der Festphase freigesetzt (Abb. 49 B). Weist die Testverbindung dagegen eine schwächere Affinität zu einer Kinase auf als der Inhibitor, dann bleibt das System aus Inhibitor und Kinase erhalten (Abb. 49 C).



**Abb. 49:** Bindungsbasierter Assay der Fa. DiscoveRx. Adaptiert nach DiscoveRx.<sup>[73]</sup>

#### 5.4.2.1 Durchführung und Auswertung des Bindungsassays

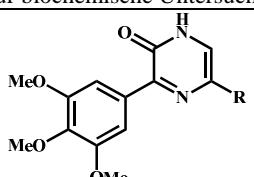
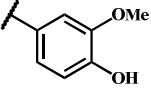
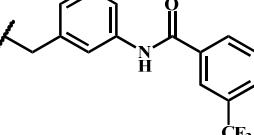
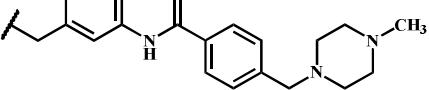
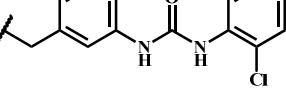
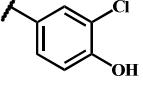
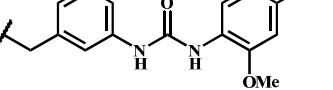
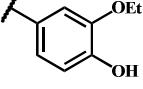
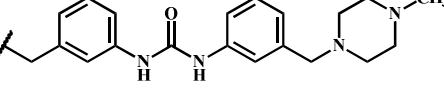
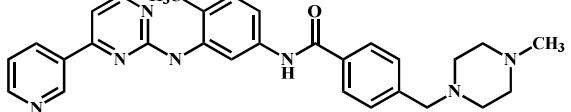
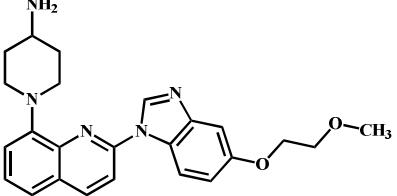
Der Kinaseassay der Fa. DiscoveRx wurde in 384-Well-Platten mit einem Reaktionsvolumen von 40 µl durchgeführt. Die mit Staurosporin beschichteten *Beads* wurden mit der getesteten Kinase inkubiert. Die nicht gebundenen Kinasen wurden durch Waschen entfernt. Nach der anschließenden Inkubation mit der Testverbindung wurden die *Beads* gewaschen und in einem Elutionspuffer suspendiert. Die Restkonzentration der eluierten Kinasen in Lösung wurde mit qPCR bestimmt. Mit der Gleichung (5) wurde die Restbindung in Prozent bestimmt:

$$\text{Restbindung [\%]} = 100 \cdot \frac{\text{Signalintensität Inhibitor-Hintergrundsignal}}{\text{Signalintensität ohne Inhibitor-Hintergrundsignal}} \quad (5)$$

## 6. Ergebnisse der biologischen Untersuchungen

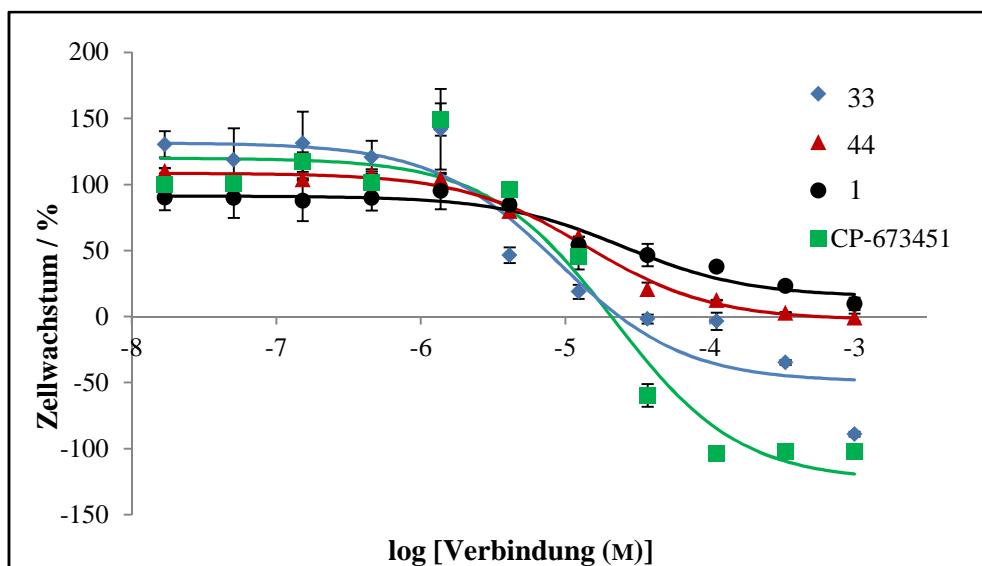
Die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten 3,5-Diarylpyrazin-2-on Inhibitoren ( $\text{DFG}_{\text{in}}$ - und  $\text{DFG}_{\text{out}}$ -Serie) wurden zunächst in einem Proliferationsassay auf ihre Bioaktivität gegenüber der Zelllinie U87-MG, bei der der PDGFR $\beta$ -Signalweg autokrin stimuliert ist,<sup>[66]</sup> untersucht. Für die biochemische Untersuchung der Inhibitoren der  $\text{DFG}_{\text{in}}$ -Serie wurden zwei von D. Schmidt<sup>[47]</sup> im Rahmen seiner Bachelor-Arbeit synthetisierten Inhibitoren **33** und **44**, die von J. Schlosser<sup>[22]</sup> entwickelte Leitstruktur **1** sowie der kommerziell erhältliche  $\text{DFG}_{\text{in}}$ -Inhibitor CP-673451 als Referenz, ausgewählt. Bei der Untersuchung der Inhibitoren der  $\text{DFG}_{\text{out}}$ -Serie wurden fünf synthetisierte Inhibitoren sowie Imatinib als Referenz für die  $\text{DFG}_{\text{out}}$ -Inhibitoren verwendet (s. Tabelle 14).

**Tabelle 14:** Auswahl der PDGFR $\beta$ -Inhibitoren für biochemische Untersuchungen.

		#	R	#	R
1		50			
2		60			
33		62			
44		66			
Imatinib			CP-673451		
					

## 6.1 Ergebnisse der DFG<sub>in</sub>-Inhibitoren

In der Abbildung 50 sind die Ergebnisse des Proliferationsassays der getesteten DFG<sub>in</sub>-Inhibitoren an der U87-MG-Zelllinie dargestellt. Die angegebenen TGI-Werte wurden mit Hilfe der gefitteten Dosis-Wirkungs-Kurven ermittelt. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Verbindungen **1** (*Glidescore*: -11.5) und **44** (*Glidescore*: -11.9, TGI = 552 µM) in dieser Testreihe die schwächsten antiproliferativen Effekte aufweisen: ab einer Inhibitorkonzentration höher als 1 µM zeigen die beiden Verbindungen zwar eine zytostatische, jedoch keine zytotoxische Wirkung (s. Abb. 50).



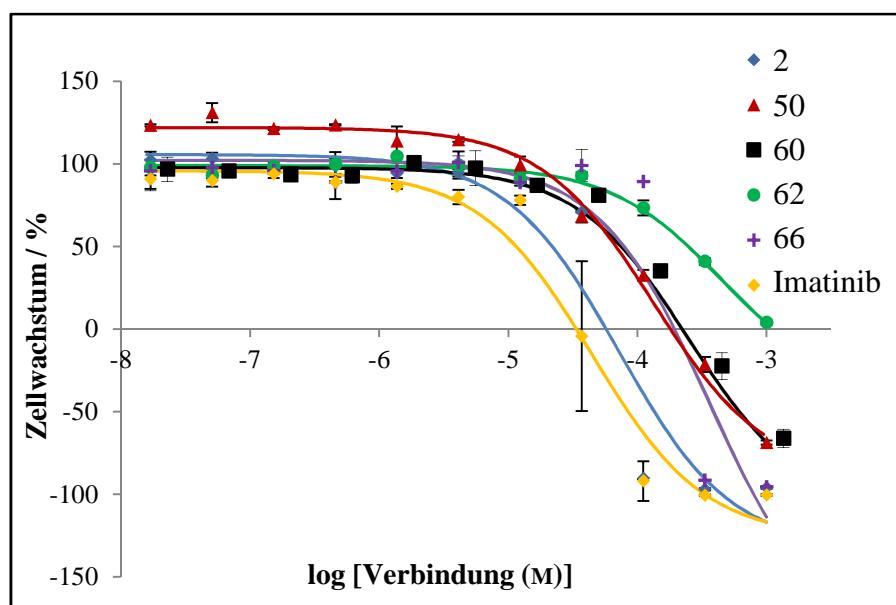
**Abb. 50:** Dosis-Wirkungs-Kurven der DFG<sub>in</sub>-Inhibitoren an der U87-MG-Zelllinie nach 48 h Inkubation der Zellen mit den Inhibitoren. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei Replikaten.

Der Referenz-Inhibitor CP-673451 (TGI = 20 µM) und die Verbindung **33** (*Glidescore* = -10.7, TGI = 35 µM) zeigen den stärksten antiproliferativen Effekt im Zellproliferationsassay (s. Abb. 50), wobei die Dosis-Wirkungskurve der Verbindung **33** im Gegensatz zu dem Referenz-Inhibitor CP-673451 keinen sigmoidalen Verlauf aufweist. Das deutet auf einen komplexen Wirkmechanismus hin. Die Abweichung einiger Datenpunkte (blaue Rauten) von der gefiteten Funktion äußern sich auch in dem niedrigen Korrelationskoeffizienten ( $R^2 \geq 0.92$ ).

## 6.2 Ergebnisse der DFG<sub>out</sub>-Inhibitoren

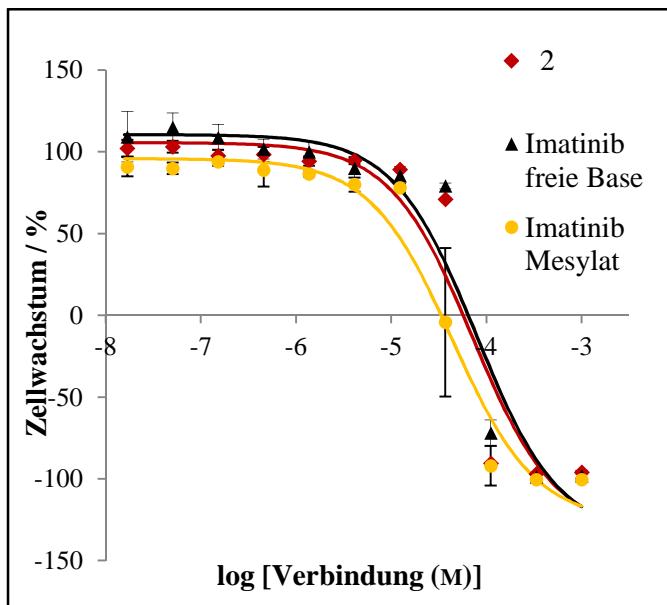
Die Ergebnisse des Proliferationsassays der getesteten DFG<sub>out</sub>-Inhibitoren zeigen, dass die Verbindung **2** und der Referenzinhibitor Imatinib die stärkste antiproliferative Wirkung ge-

genüber der Zelllinie U87-MG aufweisen (s. Abb. 51), wobei Imatinib die stärkste Wirkung zeigt. Die Verbindungen **50**, **60** und **66** weisen ein ähnliches Verhalten auf: zum einen zeigen die drei Verbindungen im Vergleich zu der Verbindung **2** ( $\text{TGI} = 55 \mu\text{M}$ ) eine signifikant schwächere antiproliferative Wirkung. Zum anderen wird auch bei hohen Konzentrationen der Inhibitoren **50** ( $\text{TGI} = 177 \mu\text{M}$ ) und **60** ( $\text{TGI} = 190 \mu\text{M}$ ), mit der Ausnahme der Verbindung **66** ( $\text{TGI} = 189 \mu\text{M}$ ), kein 100 %iger zytotoxischer Effekt erreicht. Der Inhibitor **62** ( $\text{TGI} = 1000 \mu\text{M}$ ) zeigt ab der Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  zwar einen zytostatischen- aber auch bei hohen Konzentrationen keinen zytotoxischen Effekt (s. Abb. 51).



**Abb. 51:** Dosis-Wirkungs-Kurven der  $\text{DFG}_{\text{out}}$ -Inhibitoren an der U87-MG-Zelllinie nach 48 h Inkubation der Zellen mit den Inhibitoren. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei Replikaten.

Im Proliferationsassay wurde Imatinib als Mesylat verwendet. Die Verbindung **2** wurde grundsätzlich als freie Base für die biochemischen Untersuchungen eingesetzt. Für eine bessere Vergleichbarkeit der Inhibitoren **2** und Imatinib wurde das Imatinib-Mesylat in die freie Base überführt. Anschließend wurde der Proliferationsassay mit den Inhibitoren **2**, Imatinib-Mesylat und Imatinib als freie Base wiederholt. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 52 dargestellt.



**Abb. 52:** Dosis-Wirkungs-Kurven von den Inhibitoren **2**, Imatinib-Mesylat und Imatinib als freie Base an der U87-MG-Zelllinie nach 48 h Inkubation der Zellen mit den Inhibitoren. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei Replikaten.

Die Ergebnisse des Zellproliferationsassays deuten darauf hin, dass Imatinib als freie Base ( $TGI = 75 \mu\text{M} \pm 5 \mu\text{M}$ ) aufgrund einer schlechteren Aufnahme in die Zelle einen niedrigeren inhibitorischen Effekt aufweist als Imatinib-Mesylat ( $TGI = 45 \mu\text{M} \pm 13 \mu\text{M}$ ). Die sigmoidale Funktion der Verbindung **2** weist einen ähnlichen Verlauf und einen geringfügig höheren TGI-Wert von  $85 \mu\text{M} \pm 23 \mu\text{M}$  auf (s. Abb. 52).

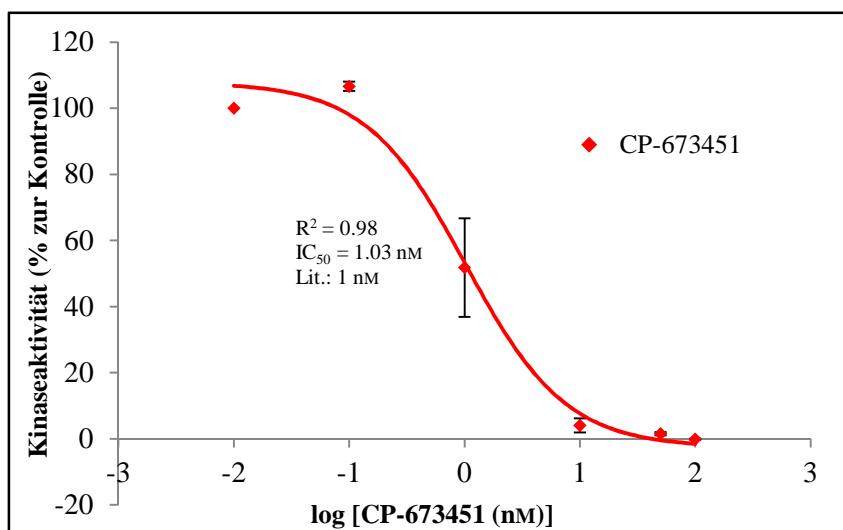
### 6.3 Ergebnisse des PDGFR $\beta$ -Kinaseassays

Mit Hilfe des PDGFR $\beta$  Kinaseassays wurden IC<sub>50</sub>-Werte der Verbindungen **2**, des Imatinibs und des Inhibitors CP-673451 (Positivkontrolle) gegenüber PDGFR $\beta$  bestimmt. Des Weiteren wurde mit der Verbindung **2** eine Testreihe durchgeführt, bei der die Preinkubationszeiten zwischen 0 und 120 min zur Bestimmung des Bindemodus bezüglich der bevorzugten Kinasekonformation (DFG<sub>in/out</sub>) variiert wurden.

#### 6.3.1 Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte des DFG<sub>out</sub>-Inhibitor **2** im PDGFR $\beta$ -Kinaseassay

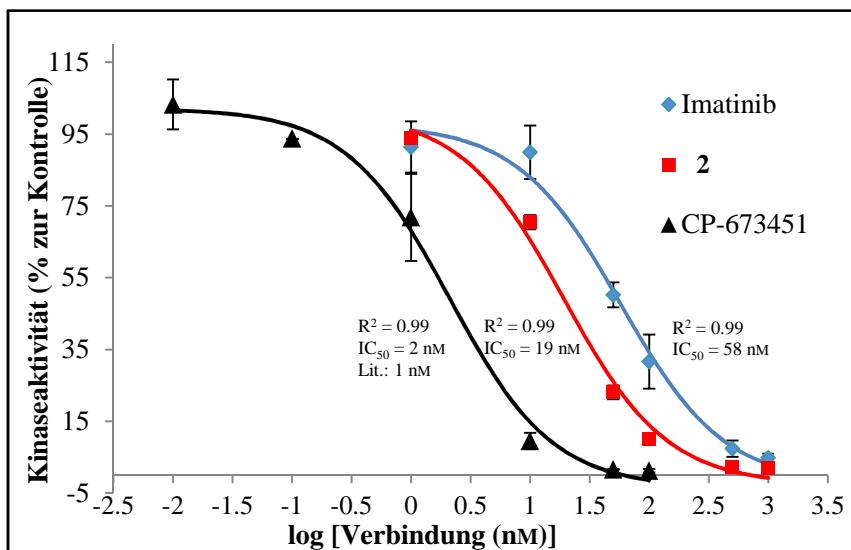
Die Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte mittels PDGFR $\beta$ -Kinaseassay wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. C. Peifer durch C. Renn etabliert. Im Rahmen seiner Masterarbeit zur Validierung des Assays wurden zunächst IC<sub>50</sub>-Werte des DFG<sub>in</sub>-Inhibitors CP-675431 bestimmt und mit dem in der Literatur angegebenen Wert verglichen. Für CP-675431 wurde von Roberts *et al.* eine IC<sub>50</sub> von  $1.5 \mu\text{M}$  angegeben. Die ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte für CP-675431 waren mit  $1.5 \mu\text{M} \pm 0.2 \mu\text{M}$  übereinstimmend. Die ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte für die Verbindung **2** waren mit  $85 \mu\text{M} \pm 23 \mu\text{M}$  vergleichbar.

al. in einem ähnlichen Assay ein  $IC_{50}$ -Wert von 1 nM bei einer ATP-Konzentration von 10  $\mu$ M bestimmt.<sup>[74]</sup>



**Abb. 53:** PDGFR $\beta$  Kinaseassay mit dem Inhibitor CP-673451. Der  $IC_{50}$ -Wert von CP-673451 bei einer ATP-Konzentration von 10  $\mu$ M beträgt 1 nM.

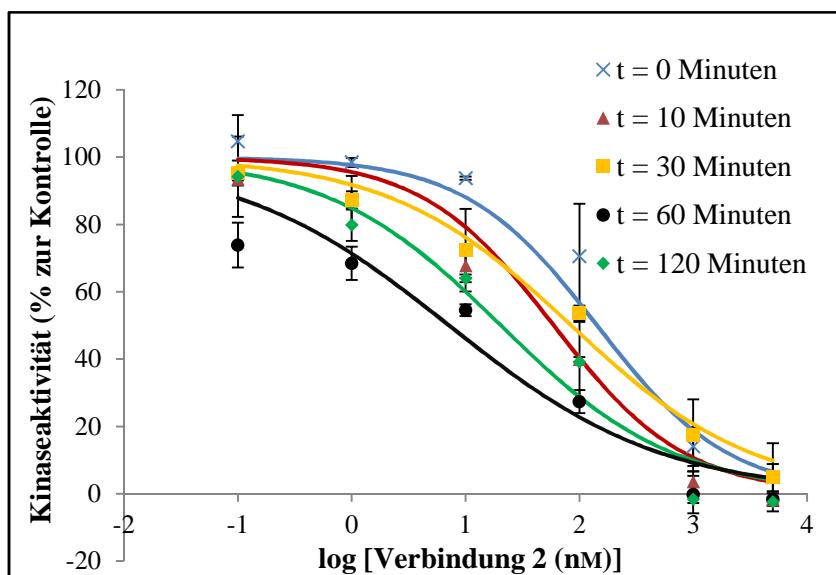
Während der Validierung wurde für CP-673451 ein mit dem Literaturwert (1 nM) identischer  $IC_{50}$ -Wert bei einer ATP-Konzentration von 10  $\mu$ M bestimmt (s. Abb. 53). Anschließend wurden  $IC_{50}$ -Werte der Inhibitoren **2** und Imatinib ermittelt. Die Ergebnisse der PDGFR $\beta$ -Kinaseassays sind in der Abbildung 54 dargestellt: für Imatinib wurde ein  $IC_{50}$ -Wert von 58 nM und für den DFG<sub>out</sub>-Inhibitor **2** ein  $IC_{50}$ -Wert von 19 nM bestimmt (s. Abb. 54).



**Abb. 54:**  $IC_{50}$ -Werte der Inhibitoren **2**, Imatinib und CP-673451 gegenüber PDGFR $\beta$  bei einer ATP-Konzentration von 10  $\mu$ M.

### 6.3.2 Bestimmung des Bindemodus des Inhibitors 2 im PDGFR $\beta$ -Kinaseassay

Basierend auf Arbeiten von Iwata *et al.*<sup>[75]</sup> wurden zur Überprüfung des Bindemodus der Verbindung **2** die Präinkubationszeiten des Kinaseassays variiert. Dabei ging es darum, mit Hilfe des Kinaseassays herauszufinden, ob der am Computer designte DFG<sub>out</sub>-Inhibitor **2** auch tatsächlich in die DFG<sub>out</sub>-Konformation von PDGFR $\beta$  bindet. Die für den Assay verwendete Kinase liegt hyperphosphoryliert, also vorwiegend in der DFG<sub>in</sub>-Konformation, vor. Aufgrund der langsamen Bindekinetik der Typ-II-Inhibitoren wird daher im artifiziellen Kinaseassay die inhibitorische Aktivität dieser Verbindungen möglicherweise falsch abgebildet. Um diesen Effekt zu berücksichtigen, wurde der Inhibitor mit der hyperphosphorylierten PDGFR $\beta$ -Kinase vor der Zugabe von ATP präinkubiert. Zum Vergleich wurde dieser Versuchsansatz auch mit dem DFG<sub>in</sub>-Inhibitor CP-673451 durchgeführt. Es wurde eine Messreihe mit den Präinkubationszeiten von 0, 10, 30, 60 und 120 min für beide Inhibitoren durchgeführt. In der Abbildung 55 sind die Ergebnisse dieser Untersuchung abgebildet.



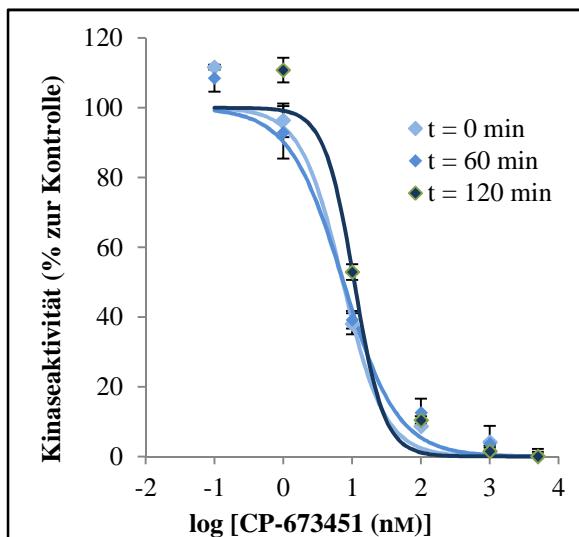
**Abb. 55:** Ergebnisse der Präinkubationszeit-abhängigen IC<sub>50</sub>-Messung: Aufgenommene Messungen der IC<sub>50</sub> bei fünf unterschiedlichen Präinkubationszeiten der Verbindung **2**. Die ATP-Konzentration lag bei 1  $\mu$ M (Kontrolle: DMSO).

Die Ergebnisse der Messung zeigen, dass abhängig von der Präinkubationszeit die Kinaseaktivität nach t = 120 min im Vergleich zu der Aktivität nach t = 0 min stärker von der Verbindung **2** inhibiert wurde (s. Abb. 55). Der bei der Zeit t = 120 min bestimmte IC<sub>50</sub>-Wert liegt bei 20 nM und ist um den Faktor 7 niedriger als der IC<sub>50</sub>-Wert bei der Zeit t = 0 min (143 nM, s. Tab. 14). Das deutet auf eine zeitabhängige Inhibierung (On-/Off-Kinetik, *slow binder*) und somit auf einen DFG<sub>out</sub>-Bindemodus hin. Die Messkurven bei t = 30 und 60 min folgten nicht

dem Trend. Die abweichenden Ergebnisse werden im Kapitel 7.3.1 diskutiert. Die Ergebnisse der Messreihe ( $t = 0, 60$  und  $120$  min) des Inhibitors CP-673451 zeigen hingegen, dass die Präinkubation keinen Einfluss auf die Inhibierung der Kinaseaktivität hat (s. Abb. 56). Auch die bei unterschiedlichen Inkubationszeiten bestimmten  $IC_{50}$ -Werte zeigen kaum Veränderung (s. Tab. 14).

**Tabelle 15:**  $IC_{50}$ -Werte der Verbindungen **2** und CP-673451 bei unterschiedlichen Präinkubationszeiten.

<b>DFG<sub>out</sub>-Inhibitor 2</b>		<b>DFG<sub>in</sub>-Inhibitor CP-673451</b>	
<b>Präinkubationszeit [min]</b>	<b>IC<sub>50</sub> (nM)</b>	<b>Präinkubationszeit [min]</b>	<b>IC<sub>50</sub> (nM)</b>
0	143	0	7
10	60	60	8
120	20	120	11

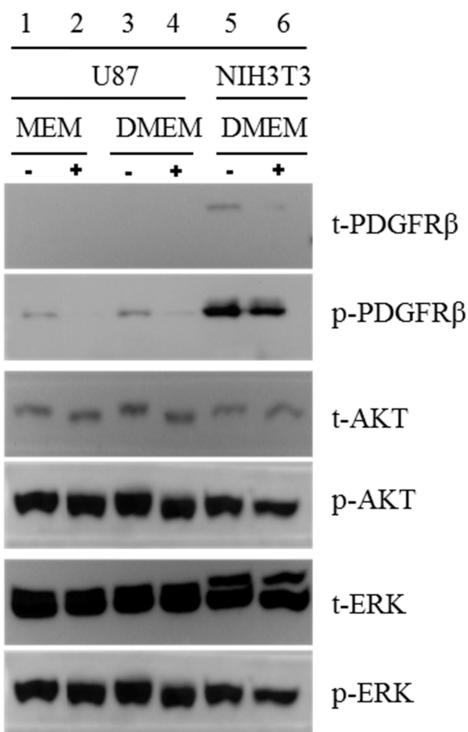


**Abb. 56:** Ergebnisse der Präinkubationszeit-abhängigen  $IC_{50}$ -Messung bei drei unterschiedlichen Präinkubationszeiten des Inhibitors CP-673451 gegenüber PDGFR $\beta$ . Die ATP-Konzentration lag bei  $1\ \mu M$  (Kontrolle: DMSO).

#### 6.4 Validierung der Western Blot-Analyse

Mit Hilfe der Western Blot-Experimente wurde die Hemmung von PDGFR $\beta$  durch die Inhibitoren **1**, **2** und Imatinib auf der Signaltransduktions-Ebene an den *Downstream* Kinasen AKT und ERK *in vitro* untersucht. Die ersten Versuche mit der Zelllinie U87-MG, die bereits beim Zellproliferationsassay verwendet wurde, zeigten eine schwache Ausprägung des Western Blot-Signals (s. Abb. 57, Spalten 1-4). Deshalb wurden Versuche mit der Zelllinie NIH3T3

durchgeführt, deren Signale deutlich ausgeprägter ausfielen (Spalten 5 und 6) als die von U87-MG. Die Messungen wurden von C. Renn im Rahmen seiner Masterarbeit durchgeführt.



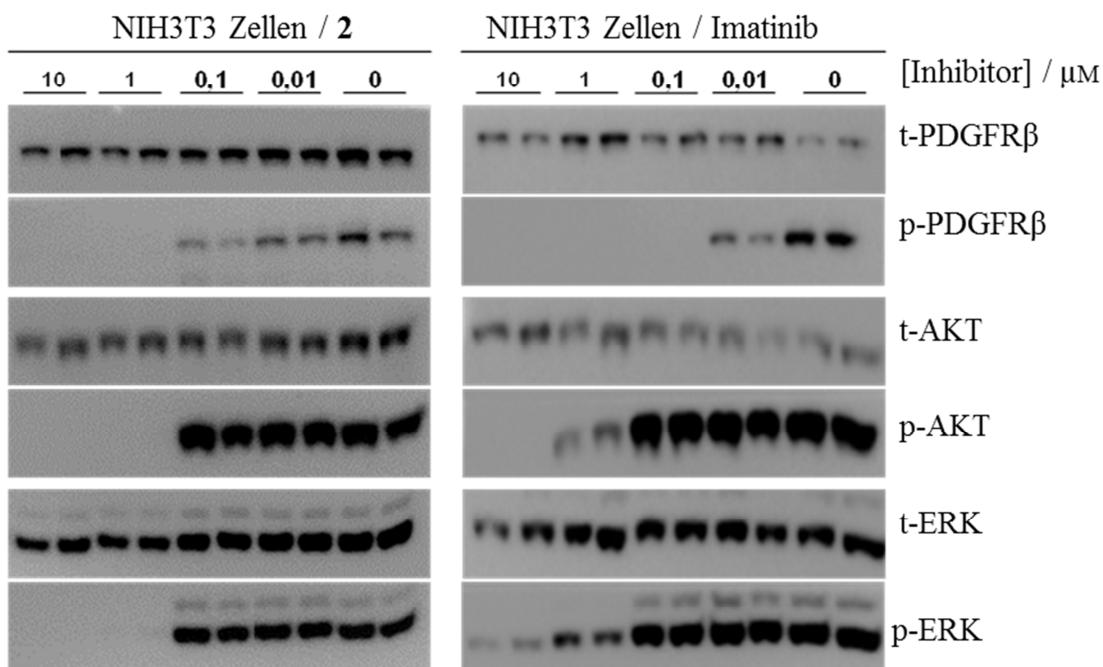
**Abb. 57:** Methodenentwicklung für den Western Blot-Versuch. Getestete Zellen sind U87-MG und NIH3T3. Detektion von t/p-PDGFR $\beta$ , t/p-AKT und t/p-ERK im Zelllysat. „t“ steht für *total*, also gesamte Menge und „p“ steht für phosphoryliert. Spuren die mit (-) markiert sind, zeigen die Signale von Zellen, die 16 bis 20 h ohne FBS im Kulturmedium kultiviert wurden. Signale, die mit (+) markiert sind, zeigen die Signale von Zellen, die durchgehend mit FBS kultiviert wurden. DMEM: Dulbeccos's modifiziertes Eagle Medium. MEM: Modifiziertes Eagle Medium. Die U87-MG-Zellen zeigen kein Signal bei t-PDGFR $\beta$  und nur ein schwaches Signal bei p-PDGFR $\beta$ . Ohne Zusatz von FBS wurden die Signale deutlicher detektiert. Die NIH3T3 Zellen zeigen im Vergleich zu den U87-MG-Zellen ein deutliches Signal bei p-PDGFR $\beta$  und ein schwaches Signal bei t-PDGFR $\beta$ . Im Rahmen seiner Masterarbeit von C. Renn durchgeführt. Adaptiert nach C. Renn.<sup>[65]</sup>

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die NIH3T3 Zelllinie für weitere Western Blot-Versuche ausgewählt.

#### 6.4.1 Western Blot-Versuche der Inhibitoren 1, 2 und Imatinib auf NIH3T3 Zellen

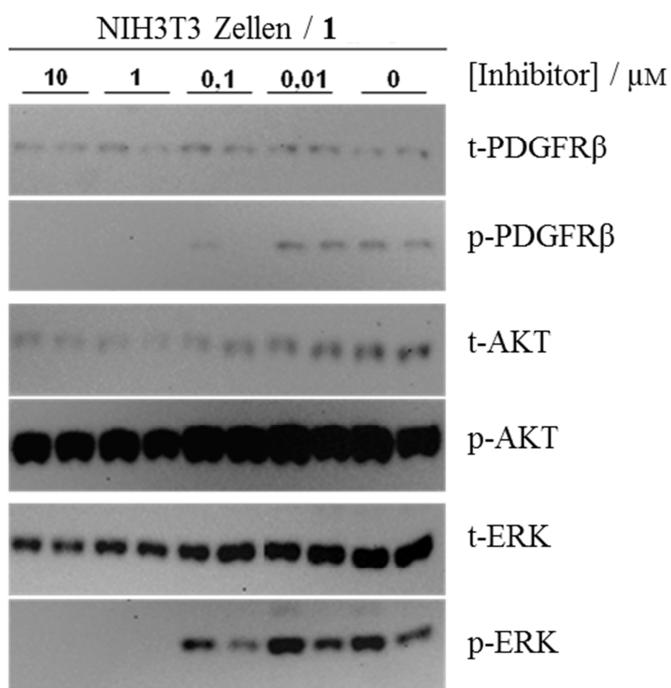
Die Ergebnisse der Western Blot-Versuche sind in der Abbildung 58 dargestellt. Die phosphorylierte Form von PDGFR $\beta$ , AKT und ERK konnte ab einer Inhibitorkonzentration von 1  $\mu$ M der Verbindung **2** nicht mehr detektiert werden. Der Referenzinhibitor Imatinib inhibiert dagegen die Phosphorylierung von PDGFR $\beta$  schon ab einer Konzentration von 0.1  $\mu$ M. Die phosphorylierte Form von AKT und ERK hingegen kann noch schwach bei einer Konzentration von 1  $\mu$ M von Imatinib detektiert werden. Erst bei einer Inhibitorkonzentration von

10  $\mu\text{M}$  gibt es keine Detektion des Signals für p-AKT mehr (s. Abb. 58). Die phosphorylierte Kinase ERK wird auch bei einer Imatinib-Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  schwach detektiert. Das deutet auf einen unterschiedlichen Wirkmechanismus hin.



**Abb. 58:** Western Blot-Versuch: konzentrationsabhängiger inhibitorischer Effekt der Verbindung **2** und Imatinib auf die Signalkaskade des PDGFR $\beta$  in den NIH3T3 Zellen.

Der Konzentrations-abhängige Western Blot-Versuch der Verbindung **1** zeigt ab einer Inhibitorkonzentration von 100  $\mu\text{M}$  kein Signal der phosphorylierten Form von PDGFR $\beta$  mehr. Im Vergleich dazu werden sowohl die phosphorylierte als auch die nicht phosphorylierte Form von AKT-Konzentrations-unabhängig detektiert. Die im *Downstream Signaling* PDGFR $\beta$  liegende Kinase ERK wird ab einer Inhibitorkonzentration der Verbindung **1** von 1  $\mu\text{M}$  nicht in der phosphorylierten Form detektiert (s. Abb. 59).

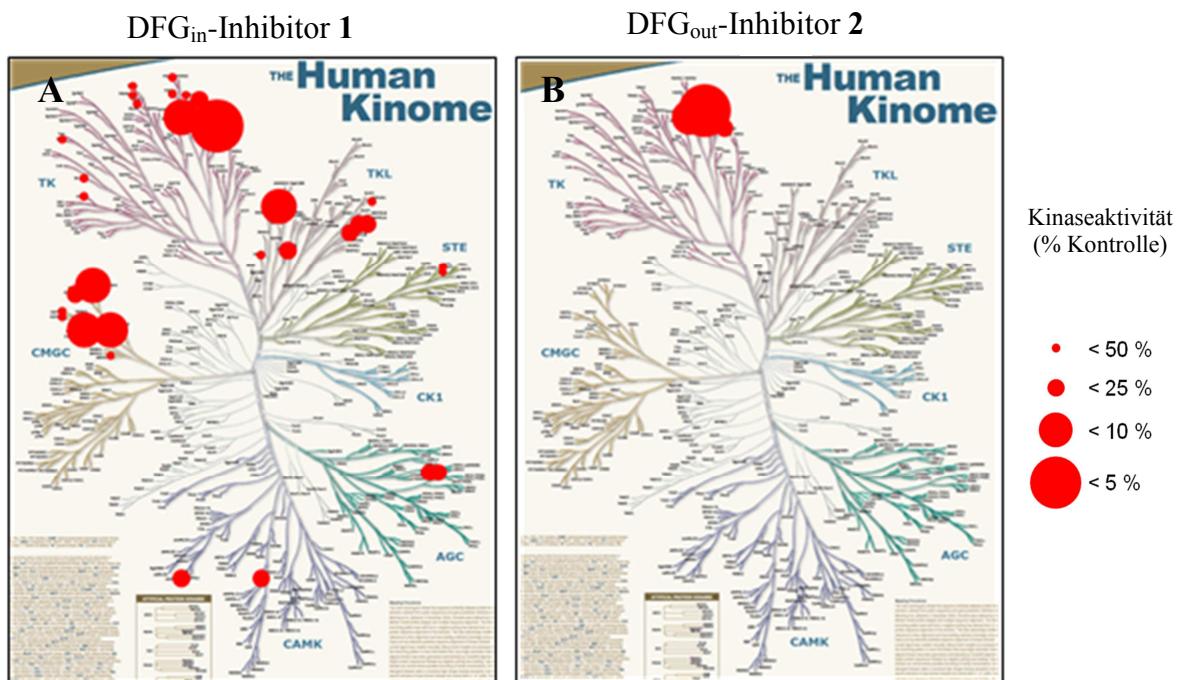


**Abb. 59:** Western Blot-Versuch: konzentrationsabhängiger inhibitorischer Effekt der Verbindung **1** auf eine Signalkaskade der NIH3T3 Zellen.

## 6.5 Selektivitätsprofile der Verbindungen **1** und **2**

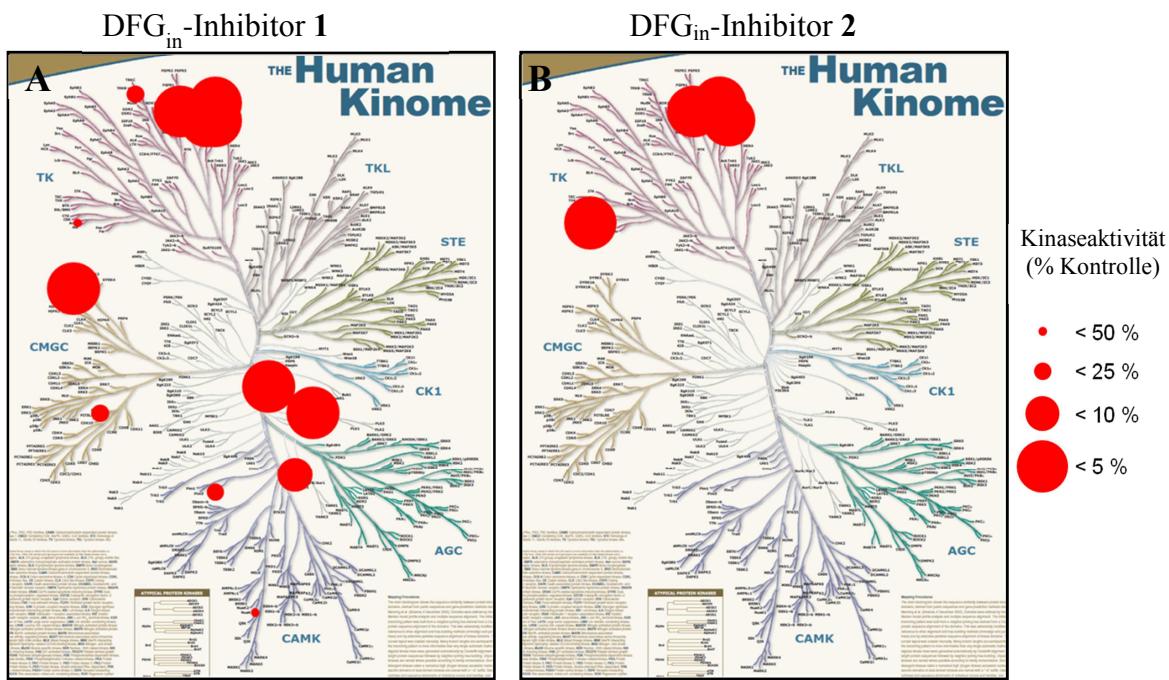
Im Rahmen dieser Arbeit wurden Selektivitätsprofile des DFG<sub>in</sub>-Inhibitors **1** und des DFG<sub>out</sub>-Inhibitors **2** bei zwei unterschiedlichen Unternehmen (ProQinase und DiscoveRx) aufgenommen. Bei der Fa. ProQinase wurde ein aktivitätsbasierter Kinaseassay mit einer Inhibitorkonzentration von 1  $\mu\text{M}$  an 300 Kinasen aufgenommen. Das Selektivitätsprofil der Verbindung **1** zeigt eine Restaktivität von unter 50 % für insgesamt 48 von 300 Kinasen, wobei 16 von diesen 48 Kinasen zu der Familie der Rezeptortyrosinkinasen gehören. Daraus ergibt sich ein Selektivitätswert von  $S_{50} = 0.16$ . Besonders hervorzuheben ist die Restaktivität der Zielkinase PDGFR $\beta$ , die bei 1 % liegt (vgl. Abb. 60 A).

Das Selektivitätsprofil des DFG<sub>out</sub>-Inhibitors **2** zeigt, dass bei einer Inhibitorkonzentration von 1  $\mu\text{M}$  insgesamt nur 4 von 300 Kinasen eine Restaktivität von max. 50 % aufweisen. Das deutet auf eine hohe Selektivität hin ( $S_{50} = 0.013$ ). Die Zielkinase PDGFR $\beta$  (18 %) und die nah verwandten Tyrosinkinasen RET (10 %) und VEGFR2 (5 %) zeigen eine sehr niedrige Restaktivität auf (s. Abb. 60 B). Das vollständige Selektivitätsprofil der beiden Verbindungen in Form einer Tabelle ist im Anhang auf Seite 162 eingefügt.



**Abb. 60:** Selektivitätsprofile der Verbindungen **1** und **2**. Ergebnisse des aktivitätsbasierten Kinaseassay der Fa. ProQinase. Adaptiert nach Manning.<sup>[2]</sup>

Es wurden Selektivitätsprofile der beiden Verbindungen **1** und **2** bei der Fa. DiscoveRx in Auftrag gegeben. Dabei handelt es sich um einen bindungsbasierten Selektivitätsassay, bei dem die kompetitive Verdrängung des nicht spezifischen Inhibitoren Staurosporin detektiert wird (vgl. Kap. 5.4.2). Der Selektivitätsassay wurde mit einer Inhibitorkonzentration von  $1 \mu\text{M}$  an 97 Kinasen durchgeführt. In der Abbildung 61 sind die Ergebnisse des Selektivitätsassays dargestellt. Analog zu der Darstellung in der Abbildung 60 werden Kinasen mit einer Restbindung von Staurosporin von unter 50 % in Form von roten Kreisen gezeigt. Die Verbindung **2** führt bei 11 von 97 Kinasen zu einer Restbindung von unter 50 % des Staurosporins, wobei die 11 genannten Kinasen alle zu der Familie der Rezeptortyrosinkinasen gehören ( $S_{50} = 0.11$ ). Die Zielkinase PDGFR $\beta$  wird dabei vollständig von der Verbindung **2** besetzt. Im Vergleich zu dem aktivitätsbasierten Kinaseassay zeigen die Kinasen PDGFR $\alpha$ , RET und VEGFR2 eine Restbindung von Staurosporin von 0 %. Des Weiteren erkennt man, dass die Kinase ABL1, die bei diesem Testsystem sowohl in der phosphorylierten als auch in nicht phosphorylierten Form vorlag, unterschiedlich stark von der Verbindung **2** kompetitiv gebunden wurde. Die nicht phosphorylierte Form (Restbindung von 0.6 %) wurde viel stärker gebunden als die phosphorylierte Form (Restbindung von 67 %). Das ist ein weiteres Indiz für einen DFG<sub>out</sub>-Bindemechanismus der Verbindung **2**.



**Abb. 61:** Selektivitätsprofile der Verbindungen 1 und 2. Ergebnisse des bindungsbasierten Selektivitätsassay der Fa. DiscoveRx. Adaptiert nach Manning.<sup>[2]</sup>

Die Verbindung **1** zeigt eine hohe Bindeaffinität (Restbindung von < 50 %) gegenüber 21 von 97 Kinasen ( $S_{50} = 0.22$ ). Dieses Ergebnis entspricht in etwa dem des aktivitätsbasierten Assays. Besonders hohe Affinität zeigt die Verbindung **1** gegenüber PDGFR $\beta$  (0.7 %), RET (2 %) und KIT (2.6 %). Das vollständige Selektivitätsprofil der beiden Verbindungen in Form einer Tabelle ist im Anhang auf Seite 169 hinterlegt.

## 7. Diskussion

### 7.1 Diskussion der biologischen und computergestützten Ergebnisse der DFG<sub>in</sub>-Serie

Ein Ziel dieser Arbeit war es, mittels einer computergestützten Optimierung die Bindeaffinität der Leitstruktur **1** (DFG<sub>in</sub>-Serie) gegenüber PDGFR $\beta$  zu verbessern. Zu Beginn der *Docking*-Studien wurde der elektronische Einfluss des *meta*-Substituenten auf die Bindeaffinität der *para*-ständigen Hydroxygruppe untersucht (vgl. Kap. 3.2). Zusätzlich zu den *Docking*-Studien wurden mit Hilfe des Programms „Epik“ pKa-Werte der *para*-ständigen Hydroxygruppe berechnet. Dabei konnte ein Zusammenhang zwischen dem induktiven und dem mesomeren Effekt der Substituenten und der berechneten Acidität der phenolischen Hydroxygruppe in *para*-Stellung festgestellt werden. *Meta*-Substituenten mit einem -I/M- bzw. einem +I/+M-Effekt sollten je nach Ausprägung des Effektes unterschiedlich stark den pKa-Wert im Vergleich zu der Leitstruktur **1** erhöhen bzw. senken. Den stärksten +I/+M-Effekt zeigte der *meta*-Dimethylamin-Substituent durch eine Steigerung des pKa-Wertes der *para*-Hydroxygruppe von 9.8 (Verbindung **1**) auf 12 (Verbindung **30**). Neben dem negativen induktiven Effekt der Halogene (Cl, F) sorgten vor allem Substituenten mit einem -M-Effekt ( $\text{NO}_2$ ) für eine Senkung des phenolischen pKa-Wertes. Theoretisch sollte der elektronenziehende Einfluss der *meta*-Substituenten für eine stärkere Polarisierbarkeit der *para*-ständigen Hydroxygruppe und somit zu einer Stärkung der H-Brückenbindungen zwischen dem Liganden und dem Protein führen und damit die Bindeaffinität verstärken. Vor allem sollte durch die stärkere Polarisierung der Hydroxygruppe die Acidität soweit erhöht werden, dass in Abhängigkeit von dem pH-Wert ein Phenolat-Ion gebildet werden könnte. Das Ausbilden eines Phenolat-Ions würde die Bildung einer ionischen Bindung zwischen dem Anion und der Aminogruppe des Lys634 ermöglichen, wodurch die Bindeaffinität weiter steigen sollte. Die Ergebnisse der *Docking*-Studien lieferten entgegen den Erwartungen keine Korrelation zwischen den berechneten pKa-Werten und den *Glidescores* (vgl. Kap. 3.2, Tab. 4). Die Variation der *meta*-Substituenten mit unterschiedlichen elektronischen Eigenschaften zeigte keine signifikante Senkung oder Steigerung der berechneten Bindeaffinitäten der Liganden im PDGFR $\beta$ -Homologiemodell. Ein Grund für dieses Ergebnis könnte die in den *Docking*-Studien verwendete starre Kristallstruktur des Proteins sein. Unter natürlichen Bedingungen gibt es eine gegenseitige konformelle Anpassung zwischen der Kinase und dem Liganden. Die bei den *Docking*-Studien verwendete Kristallstruktur stellt dagegen eine starre Momentaufnahme des Proteins dar. Während des *Dockings* wird die Konformation des Liganden, aber nicht die des Proteins variiert.

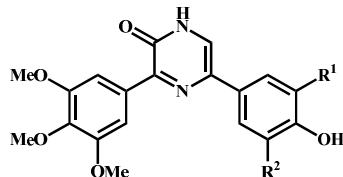
## Diskussion

---

Zur Berücksichtigung der konformellen Veränderung des Proteins könnte das Programm *Induced fit Docking* verwendet werden.<sup>[76]</sup> Dabei werden der Inhibitor und das Protein dynamisch aneinander gedockt. Diese Berechnungen sind sehr zeitaufwendig und eignen sich daher nur bedingt für ein *Screening*. Da anhand der *Docking*-Ergebnisse keine eindeutige Aussage bezüglich des elektronischen Einflusses der *meta*-Substituenten getroffen werden konnte, sollten ausgewählte Verbindungen synthetisiert und biochemisch auf den jeweiligen Einfluss untersucht werden.

Des Weiteren wurde neben dem elektronischen auch der sterische Einfluss der *meta*-Substituenten bezüglich einer besseren Anpassung des Liganden an die Bindetasche des Proteins (PDGFR $\beta$ ) durch Veränderung der Größe der Substituenten untersucht. Die computergestützten Ergebnisse der Variation der sterisch anspruchsvollen *meta*-Substituenten zeigten einen Zusammenhang zwischen der Länge der *meta*-Substituenten (Methoxy, Ethoxy, Propoxy) und dem Anstieg der berechneten Bindeaffinität: je länger der Substituent, desto höher die Bindeaffinität (vgl. Tab. 5). Die Ursache für die Steigerung der berechneten Bindeaffinität gegenüber dem PDGFR $\beta$ -Homologiemodell durch den Einsatz eines sterisch anspruchsvolleren *meta*-Substituenten liegt in der besseren Anpassung des Liganden an die hydrophobe Tasche I. Neben den Alkylethern wurden auch Alkylreste in ihrer Länge variiert, wobei die erstgenannten den zweitgenannten in den *Docking*-Ergebnissen überlegen waren. Zum einen könnte diese Differenz der berechneten *Glidescores* aufgrund der konformellen Unterschiede, bezogen auf den Bindungswinkel, zustande kommen. Zum anderen könnte es an den elektronischen Eigenschaften des Alkylethers liegen. Somit sollte der Austausch der Methoxygruppe durch einen sterisch anspruchsvolleren Alkyletherrest zu einer Steigerung der biologischen Aktivität des DFG<sub>in</sub>-Inhibitors gegenüber PDGFR $\beta$  führen.

Basierend auf den *Docking*-Ergebnissen wurden die Verbindungen **27**, **33**, **37**, **44**, **48** und **49**, die sowohl den elektronischen als auch den sterischen Einfluss berücksichtigen, synthetisiert (s. Tab. 16).

**Tabelle 16:** Übersicht der synthetisierten Moleküle.

#	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Glidescore
27	-OMe	-OMe	-11.5
33	-Cl	-H	-10.6
37	-Cl	-Cl	-10.1
44	-OEt	-H	-11.9
48	-OMe	-Cl	-11.4
49	-OEt	-Cl	-11.7

Aus dieser Reihe wurden die zwei Verbindungen **33** und **44** in einem Proliferationsassay an der U87-MG-Zelllinie untersucht. Mit Hilfe der Verbindung **33** wurde der elektronische und mittels der Verbindung **44** der sterische Einfluss verifiziert. Die Ergebnisse des Proliferationsassays zeigten, dass die Einführung eines sterisch anspruchsvoller Restes (OEt) im Vergleich zu der Methoxygruppe der Verbindung **1** zu keiner signifikanten Steigerung der Bioaktivität führte (vgl. Kap. 6.1, Abb. 50). Die Verbindung **44** zeigte analog zu der Leitstruktur **1** zwar einen zytostatischen, jedoch keinen zytotoxischen Effekt. Im Vergleich dazu wies die durch Chlor substituierte Verbindung **33** neben der zytostatischen auch eine zytotoxische Wirkung auf. Dabei wies die gefittete Dosis-Wirkungs-Kurve keinen sigmoidalen Verlauf und somit auch keinen 100 %igen zytotoxischen Effekt auf. Der Grund für das Fehlen der zytotoxischen Wirkung könnte unter anderem an pharmakokinetischen Eigenschaften wie Absorption, Distribution, Metabolismus und Elimination (ADME) der Verbindungen **1** und **44** liegen. Die Betrachtung dieser Eigenschaften und weiterer Gründe werden im Kapitel 7.3 am Beispiel der Verbindung **1** ausführlich beschrieben.

Die Hemmaktivitäten der Leitstruktur **1** und den Verbindungen **33** und **44** unterscheiden sich bezüglich der *Docking*-Untersuchungen und der Bioaktivität im Proliferationsassay nur geringfügig voneinander. Aufgrund der geringen Unterschiede und der Tatsache, dass bereits Testdaten zu der Verbindung **1** vorhanden waren, wurde die potente Verbindung **1** für weitere biochemische Charakterisierung wie Kinaseassay, Western Blot und Bestimmung des Selektivitätsprofils für den Vergleich zwischen DFG<sub>in</sub>- und DFG<sub>out</sub>-Inhibitoren ausgewählt.

## 7.2 Diskussion der biologischen und computergestützten Ergebnisse der DFG<sub>out</sub>-Serie

Mit Hilfe der computergestützten Optimierung sollte die Bioaktivität und die Selektivität der Leitstruktur **12** (DFG<sub>out</sub>-Inhibitor) gegenüber PDGFR $\beta$  verbessert werden. Im Rahmen der Optimierung wurden unterschiedlich substituierte Benzoe- bzw. Nikotinsäuren zu einer besseren Adressierung des lipophilen Bereichs der tiefen Tasche variiert. Zusätzlich zu den Benzamiden wurden auch Harnstoffderivate designt (vgl. Kap. 3.3). Besondere Aufmerksamkeit wurde dem Substituenten 4-(4-Methylpiperazin-1-yl)methylbenzoësäure (**107**), der von Imatinib abgeleitet wurde, gewidmet. Die *Docking*-Ergebnisse der DFG<sub>out</sub>-Serie zeigten, dass die Verbindungen **2** (*Glidescore* = -15.1) und **50** (*Glidescore* = -14.7) die höchste Affinitätssteigerung gegenüber dem Homologiemodell von PDGFR $\beta$  im Vergleich zu der Leitstruktur **12** (*Glidescore* = -13.4) hatten. Der berechnete Bindemodus der Verbindung **2** zeigte außerdem, dass der eingeführte 4-Methylpiperazinrest den hydrophoben Bereich der tiefen Tasche adressiert und zusätzlich eine weitere H-Brückenbindung zu dem Protein am Ausgang der tiefen Tasche ausbildet (vgl. Kap. 3.3). Basierend auf den *Docking*-Ergebnissen wurden die Verbindungen **2**, **50**, **60**, **62** und **66** synthetisiert und biochemisch untersucht.

Die Ergebnisse des Proliferationsassays zeigten, dass alle getesteten DFG<sub>out</sub>-Inhibitoren, mit Ausnahme der Verbindung **62**, konzentrationsabhängig einen zytostatischen bzw. zytotoxischen Effekt gegenüber der U87-MG-Zelllinie haben. Auch bei hohen Inhibitorkonzentrationen der Verbindung **62** konnte keine zytotoxische Wirkung im Proliferationsassay erreicht werden. Die Verbindungen **2** und **44** zeigten den stärksten antiproliferativen Effekt gegenüber den U87-MG-Zellen, wobei der Inhibitor **2** neben dem Referenzinhibitor Imatinib die stärkste Hemmwirkung zeigte. Mit Hilfe dieser Ergebnisse konnten die von der Software berechneten Affinitäts-Tendenzen auch biochemisch bestätigt werden. Basierend auf den Ergebnissen des Proliferationsassays wurde die am besten wirkende Testverbindung **2** (DFG<sub>out</sub>-Serie) für die weitere biochemische Charakterisierung und den Vergleich mit dem DFG<sub>in</sub>-Inhibitor **1** ausgewählt.

### 7.3 Gegenüberstellung der DFG<sub>in</sub>- (Typ-I) und DFG<sub>out</sub>-Inhibitoren (Typ-II) bezüglich ihrer Affinität und Selektivität gegenüber PDGFRβ

Eines der zentralen Ziele dieser Arbeit war eine Gegenüberstellung der DFG<sub>in</sub>- (Typ-I) und der DFG<sub>out</sub>-Inhibitoren (Typ-II) bezüglich ihrer Affinität und Selektivität gegenüber PDGFRβ. Für die genannte Gegenüberstellung wurde aus der DFG<sub>out</sub>-Serie die potenteste Verbindung **2** und aus der DFG<sub>in</sub>-Serie die bereits entwickelte Verbindung **1**, aufgrund der potenteren Wirkung und einer bereits zum Teil durchgeföhrten Charakterisierung,<sup>[29]</sup> ausgewählt. Die Ergebnisse der biologischen Testungen (Proliferationsassay, Western Blot, Kinaseassay) der beiden Verbindungen **1** und **2** sind in der Tabelle 17 gegenübergestellt.

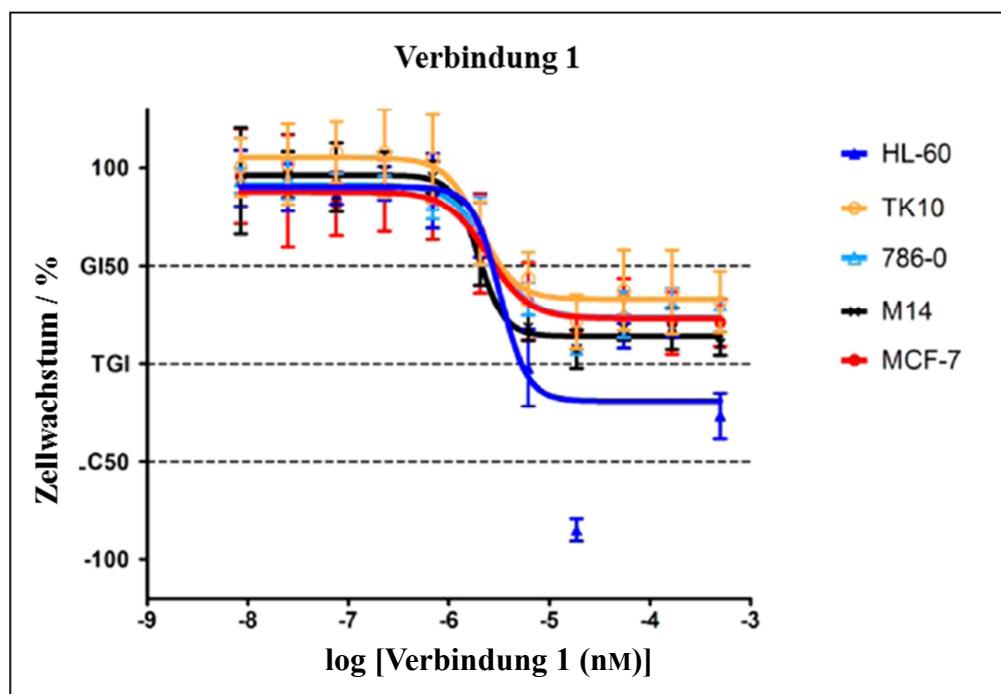
**Tabelle 17:** Ergebnisse der biochemischen Charakterisierung der Verbindungen **1** und **2**. IC<sub>50</sub>-Wert: Inhibitorkonzentration, bei der PDGFRβ zu 50 % inhibiert wurde (ATP-Konzentration 10 μM). IC<sub>ND</sub>: Inhibitorkonzentration, bei der im Western Blot das jeweilige phosphorylierte Protein nicht mit dem Antikörper detektiert werden konnte. S<sub>50</sub>: Quotient zwischen der Anzahl der inhibierten Kinasen, die eine Restaktivität bzw. Restbindung zu < 50 % aufweisen, gegen die Gesamtzahl der getesteten Kinasen. Je kleiner der Wert, desto selektiver die Verbindung. \* Aufgrund von schwacher inhibitorischer Wirkung im analysierten Bereich konnte der TGI-Wert nicht ermittelt werden.

Testsystem	Verbindung 1	Verbindung 2
<i>Glidescore</i>	- 11.5	- 15.1
IC <sub>50</sub> (PDGFRβ, 10 μM ATP)	20 nM <sup>[29]</sup>	19 nM
TGI (U87-MG, 48 h, Resazurin)	- *	85 ± 23 μM
IC <sub>ND</sub> (NIH3T3, 45 min, Western Blot PDGF-Rβ)	1 μM	1 μM
IC <sub>ND</sub> (NIH3T3, 45 min, Western Blot AKT)	keine Inhibition	1 μM
IC <sub>ND</sub> (NIH3T3, 45 min, Western Blot ERK)	1 μM	1 μM
S <sub>50</sub> (1 μM, aktivitätsbasiert, 300 Kinasen, ProQinase)	0.16 <sup>[29]</sup>	0.013
S <sub>50</sub> (1 μM, bindungsbasiert, 97 Kinasen, DiscoveRx)	0.22	0.11

Die beiden Verbindungen **1** und **2** inhibieren die Zielkinase PDGFRβ im niedrigen nM-Bereich (s. Tab. 17). Obwohl die Hemmwirkung der beiden Inhibitoren im Kinaseassay in einem ähnlichen Bereich liegt, unterscheidet sich ihre zelluläre Wirkung deutlich voneinander. Der DFG<sub>in</sub>-Inhibitor **1** zeigt im Proliferationsassay an der U87-MG-Zelllinie bei den getesteten Inhibitorkonzentrationen zwar einen zytostatischen jedoch keinen zytotoxischen Effekt (vgl. Kap. 6.1.1). Das Fehlen der zytotoxischen Wirkung konnte bis auf die Zelllinie HL-60

## Diskussion

auch in einem weiteren Proliferationsassay, in dem fünf verschiedene Zelllinien (HL-60, TK 10, 786-0, M14, MCF-7) verwendet wurden, beobachtet werden. Der Inhibitor **1** zeigte somit bei vier von fünf Zelllinien nur einen zytostatischen Effekt. Bei HL-60, einer humanen Myeloblasten-Leukämie-Zelllinie (PDGF-Signal-abhängig)<sup>[77]</sup>, zeigte der getestete Inhibitor **1** einen schwachen zytotoxischen Effekt (Abb. 62).<sup>[29]</sup>



**Abb. 62:** Dosis-Wirkungs-Kurven des DFG<sub>in</sub>-Inhibitors **1** an fünf unterschiedlichen Zelllinien. Verändert nach Horbert.<sup>[29]</sup>

Im Vergleich zu der Verbindung **1** zeigte der DFG<sub>out</sub>-Inhibitor **2** einen ähnlich starken anti-proliferativen Effekt gegenüber der U87-MG-Zelllinie ( $TGI = 85 \mu\text{M} \pm 23 \mu\text{M}$ ) wie die freie Base des Referenzinhibitors Imatinib ( $TGI = 75 \mu\text{M} \pm 5 \mu\text{M}$ , vgl. Kap. 6.1.2). Neben der freien Base wurde auch das Mesylat des Imatinibs, das im Handelspräparat (Glivec<sup>®</sup>) enthalten ist, an der U87-MG-Zelllinie getestet. Dieses zeigte eine stärkere antiproliferative Wirkung im Vergleich zu der freien Base, was in der besseren Bioverfügbarkeit des Salzes begründet ist.<sup>[7]</sup> Deshalb wäre es für weitere biochemische Untersuchungen interessant, die Verbindung **2** in einen Mesylat zu überführen und die Hemmaktivität im Vergleich zu der freien Base zu überprüfen.

Für die Unterschiede der inhibitorischen Wirkung der beiden Verbindungen **1** und **2** auf zellulärer Ebene im Vergleich zu dem Kinasesassay könnte es mehrere Gründe geben. Zum einen kann es an den pharmakokinetischen Eigenschaften (ADME) der Verbindung **1** liegen. ADME steht für Absorption (Aufnahme in den Blutkreislauf), Distribution (Verteilung im Körper),

Metabolismus (Stoffwechsel zu einer aktiven bzw. inaktiven Verbindung) und Elimination (Ausscheidung). Auf die Zelle übertragen steht Absorption für die Aufnahme des Inhibitors in die Zelle (intrazelluläre Bioverfügbarkeit). Damit der Wirkstoff seine Wirkung in der Zelle entfalten kann, muss dieser zunächst die Zellmembran passieren. Die Membrangängigkeit der Wirkstoffe hängt von ihrer Lipophilie ab. Die mittels QikProp (Version 4.2) der *Schrödinger*-Software berechnete Lipophilie der Verbindung **2** ( $\log p$  für Octanol/Wasser = 4.0) ist fast 1.5-mal höher als die der Verbindung **1** ( $\log p$  für Octanol/Wasser = 2.8) und korreliert mit der schwächeren Bioaktivität im Zellassay. Des Weiteren könnte auch die unspezifische Bindung an Proteine der Zelle zu einer Herabsenkung der antiproliferativen Wirkung führen. Ein Hinweis darauf könnte das weniger spezifische Selektivitätsprofil der Verbindung **1** im Vergleich zu der Verbindung **2** darstellen (s. Kap. 6.3). Außerdem könnte die für die Bindung wichtige Hydroxygruppe des Inhibitors nach der Aufnahme in die Zelle mittels der zelleigenen Enzyme zu einer inaktiven Form in einer Phase-II-Reaktion metabolisiert und aus der Zelle ausgeschieden werden.<sup>[3][29]</sup> Auch die Elimination in Form eines aktiven Transports des Wirkstoffes entgegen dem Konzentrationsgefälle durch Membrantransporter aus der Zelle heraus kommt als mögliche Ursache in Frage. Es ist bekannt, dass Krebszellen Fremdstoffe (Xenobiotika) aktiv mit Hilfe von Membrantransportern (z.B. P-Glycoprotein) aus der Zelle befördern und somit Resistenzen gegen den eingesetzten Wirkstoff ausbilden können.<sup>[78][79]</sup> Aus diesem Grund wurden Aufnahmestudien von dem Inhibitor **1** mit Caco-2-Zellen durchgeführt.<sup>[29]</sup> Die maximale intrazelluläre Inhibitorkonzentration von 40 % wurde nach 60 min Inkubationszeit erreicht. Die gemessene intrazelluläre Inhibitorkonzentration entsprach dabei der gemessenen Konzentration im Medium. Diese Aufnahmerate sollte bei einer Inkubationszeit von 48 h für eine ausreichend hohe Inhibitorkonzentration intrazellulär sorgen. Für eine genauere Untersuchung dieses Phänomens sind Metabolismusstudien und weitere Permeabilitätstests an Caco-2-Monolayern der beiden Verbindungen **1** und **2** im Vergleich denkbar.

Eine weitere These bezüglich der unterschiedlichen antiproliferativen Wirkung der beiden Inhibitoren **1** und **2** betrachtet den Bindemodus dieser Verbindungen. Das 3,5-Diarylpyrazin-2-on **1** gehört zu den Typ-I-Inhibitoren und bindet kompetitiv zu ATP in der aktiven Form ( $DFG_{in}$ ) der Kinase. Die physiologische ATP-Konzentration in der Zelle beträgt 1-10 mM.<sup>[80]</sup> Der Kinaseassay wurde dagegen mit einer ATP-Konzentration von nur 10  $\mu$ M durchgeführt. Die vergleichsweise hohe intrazelluläre ATP-Konzentration könnte dazu führen, dass die inhibitorische Wirkung des Inhibitors **1** gegenüber PDGFR $\beta$  herabgesetzt wird. Zur Klärung dieses Phänomens wurden zunächst Western Blot-Versuche zur Untersuchung der Phosphorylierung der in der PDGFR-Signalkaskade nachgeschalteten Kinasen ERK und AKT an der U87-MG-

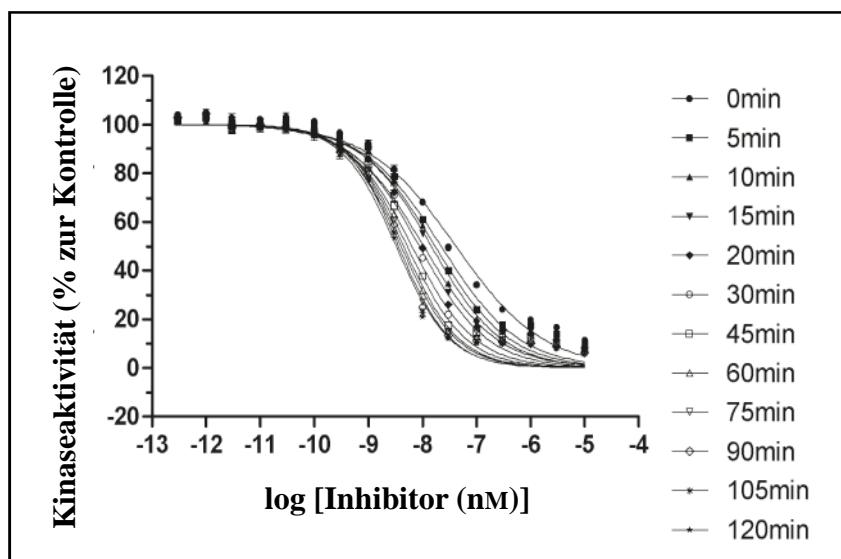
Zelllinie durchgeführt.<sup>[29]</sup> Aufgrund der schwachen Exprimierung von PDGFR $\beta$  seitens der U87-MG-Zelllinie konnte nur bedingt ein Einfluss des Inhibitors **1** auf die Phosphorylierung des PDGF-Signalweges nachgewiesen werden. Deshalb wurde die U87-MG durch die PDGFR $\beta$ -abhängige NIH3T3-Zelllinie ersetzt. Wie bereits in dem Kapitel 6.3.1 beschrieben, konnte der DGF<sub>out</sub>-Inhibitor **2** im Western Blot-Versuch die Phosphorylierung von PDFGR $\beta$  und den beiden im Signalweg nachfolgenden Kinassen AKT und ERK bei einer Inhibitorkonzentration  $\geq 1 \mu\text{M}$  inhibieren (vgl. Abb. 59, S. 73). Im Vergleich dazu hemmt der DFG<sub>in</sub>-Inhibitor **1** nur die Phosphorylierung von PDFGR $\beta$  und ERK ab einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$ . Durch die Inhibition der Signaltransduktion von ERK wird die Zellproliferation von NIH3T3 reduziert. Im Vergleich zu dem DGF<sub>out</sub>-Inhibitor **2** weist der DFG<sub>in</sub>-Inhibitor **1** aber bei der Phosphorylierung von AKT keinen inhibitorischen Effekt auf (vgl. Abb. 59, S. 74). Da AKT ein negativer Regulator für Apoptose ist, kommt es durch dessen Nichtinhibition zu keiner Induzierung der Apoptose.<sup>[72]</sup> Diese Ergebnisse stimmen mit denen von dem Proliferationsassay überein, bei dem für die Verbindung **1** nur ein zytostatischer Effekt beobachtet werden konnte (vgl. Kap. 6.1.1). Das bedeutet, dass obwohl die Kinase PDGFR $\beta$  durch die Verbindung **1** inhibiert wurde, die im Signalweg nachgeschaltete Kinase AKT trotzdem aktiv blieb. Das aufgenommene Selektivitätsprofil der beiden Verbindungen **1** und **2** im Vergleich könnte einen möglichen Erklärungsansatz für dieses Ergebnis liefern. Obwohl die Zielkinase (PDGFR $\beta$ ) durch die Verbindung **1** potent inhibiert wird (Restaktivität 1 %), werden noch weitere 47 von 300 getesteten Kinassen deutlich gehemmt (Restaktivität unter 50 %). Der intrazelluläre Signalweg ist ein komplex verzweigtes Netzwerk aus unterschiedlichen Kinassen, wobei die *Downstream* Kinase AKT von mehreren *Upstream* Kinassen aktiviert werden kann. Die schlechtere Bioverfügbarkeit der Verbindung **1** im Vergleich zu der Verbindung **2** könnte dazu führen, dass einige aufwärts liegende Kinassen nicht von dem Inhibitor **1** in ihrer Bioaktivität gehemmt werden, weshalb es zur Phosphorylierung von AKT kommt.

### 7.3.1 Kinetische Untersuchung des DGF<sub>out</sub>-Inhibitors **2** im PDGFR $\beta$ Kinaseassay

Die Verbindung **2** ( $S_{50} = 0.013$ ) zeigt im Selektivitätsprofil der Fa. ProQinase eine 10-mal so hohe Selektivität wie die Verbindung **1** ( $S_{50} = 0.16$ ). Dieses Ergebnis muss aber kritisch betrachtet werden, da in den aktivitätsbasierten Kinaseassays hyperphosphorylierte Kinassen verwendet wurden, bei denen das Gleichgewicht auf der Seite der aktiven DFG<sub>in</sub>-Konformation liegt. Bei der Verbindung **2** handelt es sich um einen Typ-II-Inhibitor, der bevorzugt die inaktive Konformation (DFG<sub>out</sub>) der Kinase bindet. Wie bereits im Kapitel 1.4 beschrieben, binden die Typ-II-Inhibitoren zwar nicht kompetitiv zu ATP, weisen aber eine lang-

samere On-/Off-Kinetik im Vergleich zu den Inhibitoren des Typ-I auf. Dadurch werden die Typ-II-Inhibitoren in dem aktivitätsbasierten Assay oft negativ detektiert. Diese Hypothese könnte durch die Ergebnisse des bindungsbasierten Assays untermauert werden. Die Konformation der Kinase spielt im bindungsbasierten Kinaseassay der Fa. DiscoveRx eine geringe Rolle. Dies spiegelt sich auch im Selektivitätsprofil der getesteten Verbindungen **1** und **2** wider. Der  $S_{50}$ -Wert der Verbindung **1** (0.22) ist doppelt so hoch wie der der Verbindung **2** (0.11). Das heißt, dass die Verbindung **2** in dem bindungsbasierten Kinaseassay eine deutlich niedrigere Selektivität als im aktivitätsbasierten Assay hat.

Zur Überprüfung des Bindemodus und der On-/Off-Kinetik der Verbindung **2** wurde eine Messreihe mit unterschiedlichen Präinkubationszeiten im PDGFR $\beta$ -Kinaseassay durchgeführt. Wie ähnliche Arbeiten von Iwata *et al.* zeigten, kommt es bei einer längeren Präinkubation des DFG<sub>out</sub>-Inhibitors mit der Kinase und damit verbundener Bindung des Inhibitors in die inaktive Form der Kinase zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes von der aktiven zu der inaktiven Form. Da die DFG<sub>out</sub>-Inhibitoren zwar eine langsame On-Bindungs-Kinetik aber auch eine deutlich langsamere Off-Dissoziations-Kinetik aufweisen, kommt es nach einer Präinkubationszeit von 120 min zu einer Erniedrigung des IC<sub>50</sub>-Wertes des Inhibitors TAK-593 im Vergleich zu dem Wert bei t = 0 min um den Faktor 6.5 (s. Abb. 63).<sup>[75]</sup>



**Abb. 63:** IC<sub>50</sub>-Bestimmung (PDGFR $\beta$ ) von dem DFG<sub>out</sub>-Inhibitor TAK-593 bei unterschiedlichen Präinkubationszeiten. IC<sub>50</sub>-Wert bei t = 0 min: 15 nM  $\pm$  2.7 nM, IC<sub>50</sub>-Wert bei t = 120 min: 2.3 nM  $\pm$  0.36 nM. Verändert nach Iwata.<sup>[75]</sup>

Dieser Effekt konnte auch für die Verbindung **2** bei unterschiedlichen Präinkubationszeiten beobachtet werden (vgl. Kap. 6.2.2). Dabei wurde eine Messreihe mit Präinkubationszeiten zwischen 0 und 120 min und einer ATP-Konzentration von 1  $\mu$ M durchgeführt. Der dabei ge-

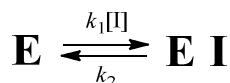
## Diskussion

---

messene IC<sub>50</sub>-Wert zum Zeitpunkt t = 0 min von 143 nM wurde nach einer Präinkubationszeit von 120 min um den Faktor 7 auf einen IC<sub>50</sub>-Wert von 20 nM gesenkt. Die gefitteten Sigmoidfunktionen nach 30 und 60 min Präinkubation wurden bei der Auswertung vernachlässigt (vgl. Abb. 55). Diese Kurven sind nicht repräsentativ, da sie bei niedrigen Inhibitorkonzentrationen keine 100 %ige und bei hohen Inhibitorkonzentrationen keine 0 %ige Kinaseaktivität erreichen. Der Grund für die Abweichung könnte ein Artefakt aufgrund des manuellen Pipettierens sein. Da dieses sehr zeitaufwendig ist, kann es zu Abweichungen der Inkubationszeiten innerhalb des Assays kommen (Platteneffekt). Ein Pipettierroboter würde die Genauigkeit bei den kleinen Volumina und der Zeit erhöhen. Des Weiteren konnte die Raumtemperatur nicht in allen Räumen konstant gehalten werden, so dass es zu Schwankungen von mind. 4 °C gekommen ist.

Grundsätzlich lässt sich anhand der Ergebnisse der kinetischen Untersuchungen feststellen, dass der DFG<sub>out</sub>-Inhibitor **2** eine langsamere On-/Off-Kinetik als der DFG<sub>in</sub>-Inhibitor CP-673451 zeigt und somit die Verbindung **2** einen Typ-II-Bindemodus aufweist. Eine langsame Bindegeschwindigkeit und eine gleichzeitig viel langsamere Dissoziationsgeschwindigkeit, die bei Inhibitoren des Typ-II vorgefunden wird, hat eine höhere Selektivität zur Folge. Dabei gibt es zwei gängige Mechanismen, die die langsame On-/Off-Bindekinetik beschreiben.<sup>[75]</sup>

*One-step*-Bindemechanismus:



*Two-step*-Bindemechanismus:



Eine langsame Bindungskonstante ( $k_1$ ) und eine noch langsamere Dissoziationskonstante ( $k_2$ ), die bei dem *One-step* Bindemechanismus beobachtet wird, führen zu einem langsamen Anfang der Hemmung. Ein Beispiel für den *One-step*-Ablauf stellt der *angiotensin-converting* Enzym (ACE) Hemmer Captopril dar.<sup>[81]</sup> Bei dem *Two-step*-Bindungsmechanismus gibt es zwei Schritte, bis sich ein Gleichgewicht der Inhibierung eingestellt hat. Die Bildung des Enzym-Inhibitor-Komplexes (EI) im ersten Schritt hat dabei einen schnellen Verlauf. Die darauf folgende Bildung eines stabileren Enzym-Inhibitor-Komplexes (E\*I) verläuft dagegen lang-

samer. Dadurch kommt es zu einer optimierten konformellen Anpassung zwischen dem Liganden und dem Protein, wodurch die Dissoziationsgeschwindigkeit verlangsamt wird. Im Fall des DFG<sub>out</sub>-Inhibitors **2** kommt es während der Präinkubationszeit zu einer konformellen Änderung des PDGFR $\beta$  von der aktiven in die inaktive Form. Dabei kommt es zur Bindung des Inhibitors und zur Bildung des stabilen Enzym-Inhibitor-Komplexes. Die Bildung des Komplexes sorgt für eine langsame Off-Dissoziationsgeschwindigkeit und somit für eine höhere Selektivität. Da es sich sowohl bei der Verbindung **1** als auch dem Referenzinhibitor CP-673451 um einen Typ-I-Inhibitor handelt, sollte auch die Verbindung **1** eine Präinkubationszeiten-unabhängige Hemmung im Kinaseassay zeigen (vgl. Kap. 6.3.2). Für das Bindungsverhalten der Verbindung **1** würde das bedeuten, dass der Inhibitor eine schnelle On-Bindekinetik aber auch eine schnelle Off-Dissoziationsgeschwindigkeit zeigt. Dies sollte für eine niedrigere Selektivität sorgen. Zur Überprüfung dieser These sollte der Kinaseassay mit den unterschiedlichen Präinkubationszeiten auch mit der Verbindung **1** durchgeführt werden.

## 7.4 Untersuchung der UV-Stabilität der Verbindungen **1** und **2**

In der Gruppe von Prof. Dr. C. Peifer konnten bereits erfolgreich mehrere photoaktivierbare *Prodrugs* von Kinaseinhibitoren hergestellt werden.<sup>[82][83]</sup> Durch Einbringen einer photolabilen Schutzgruppe (PPG) werden dabei zunächst inaktive Verbindungen (*caged compounds*) geschaffen.<sup>[84]</sup> Dabei wird das Pharmakophor durch eine kovalente Bindung zur photolabilen Schutzgruppe blockiert. Die biologisch inaktiven Verbindungen können dann durch Bestrahlung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge wieder aktiviert werden. Durch die lokal und zeitlich induzierte Aktivierung des *caged compounds* ist eine lokal erhöhte Freisetzung des Wirkstoffs im Zielgewebe und eine gleichzeitige Verminderung von Nebenwirkungen denkbar. Des Weiteren könnten photoaktivierbare *Prodrugs* auch als pharmakologische *Tools* für kinetische und mechanistische Untersuchungen dienen.

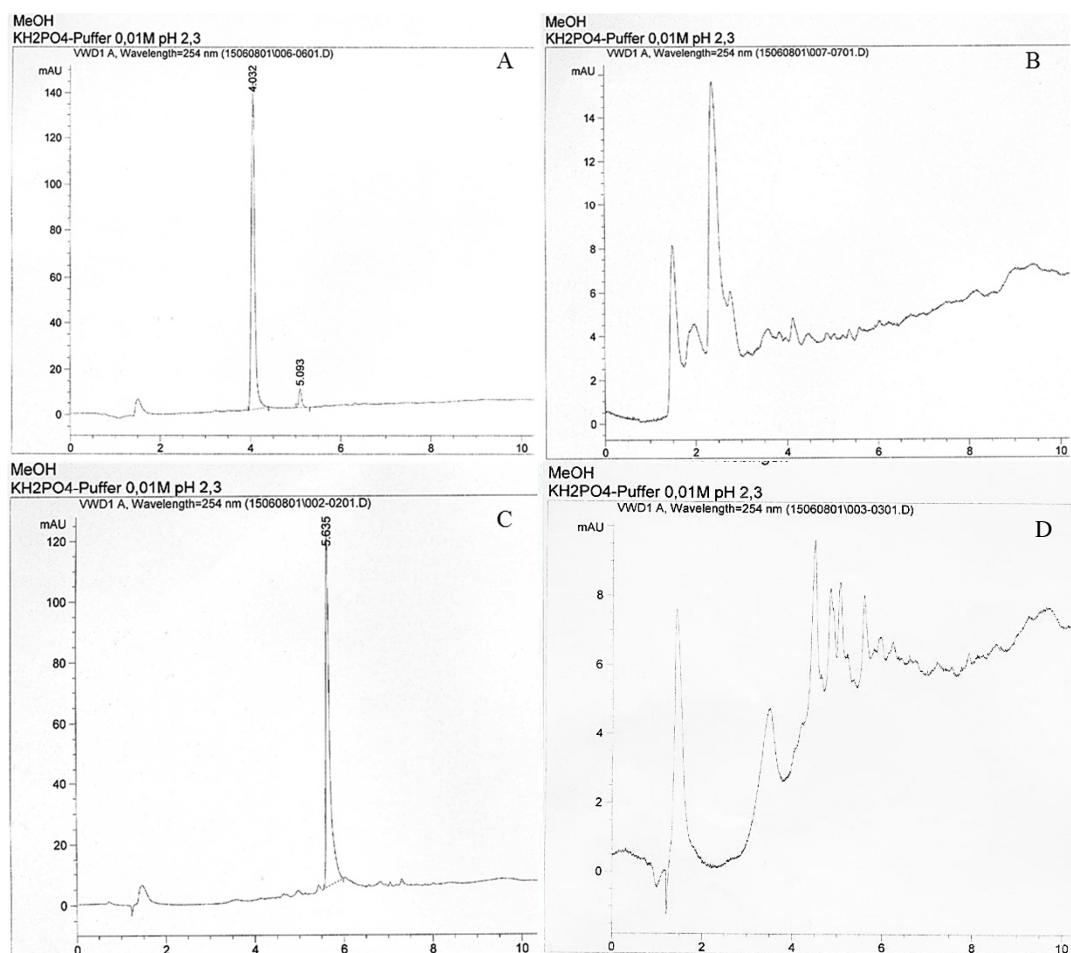
Bevor ein Inhibitor für das Photo-*Prodrug*-Projekt eingesetzt werden kann, sollten Bestrahlungsversuche bezüglich der UV-Stabilität der ausgewählten Verbindung durchgeführt werden. Deshalb wurden die Verbindungen **1** und **2** mit einer LED-UV-Lampe der Wellenlänge 365 nm für 5 min mit 5.4 Watt bestrahlt. Anschließend wurden die Proben mittels HPLC untersucht (s. Abb. 64).

Die Verbindungen **1** und **2** wurden während der Bestrahlung unspezifisch zersetzt (s. Abb. 64 B und C), sodass die dabei entstandenen Produkte nicht isoliert werden konnten. Daraus folgt,

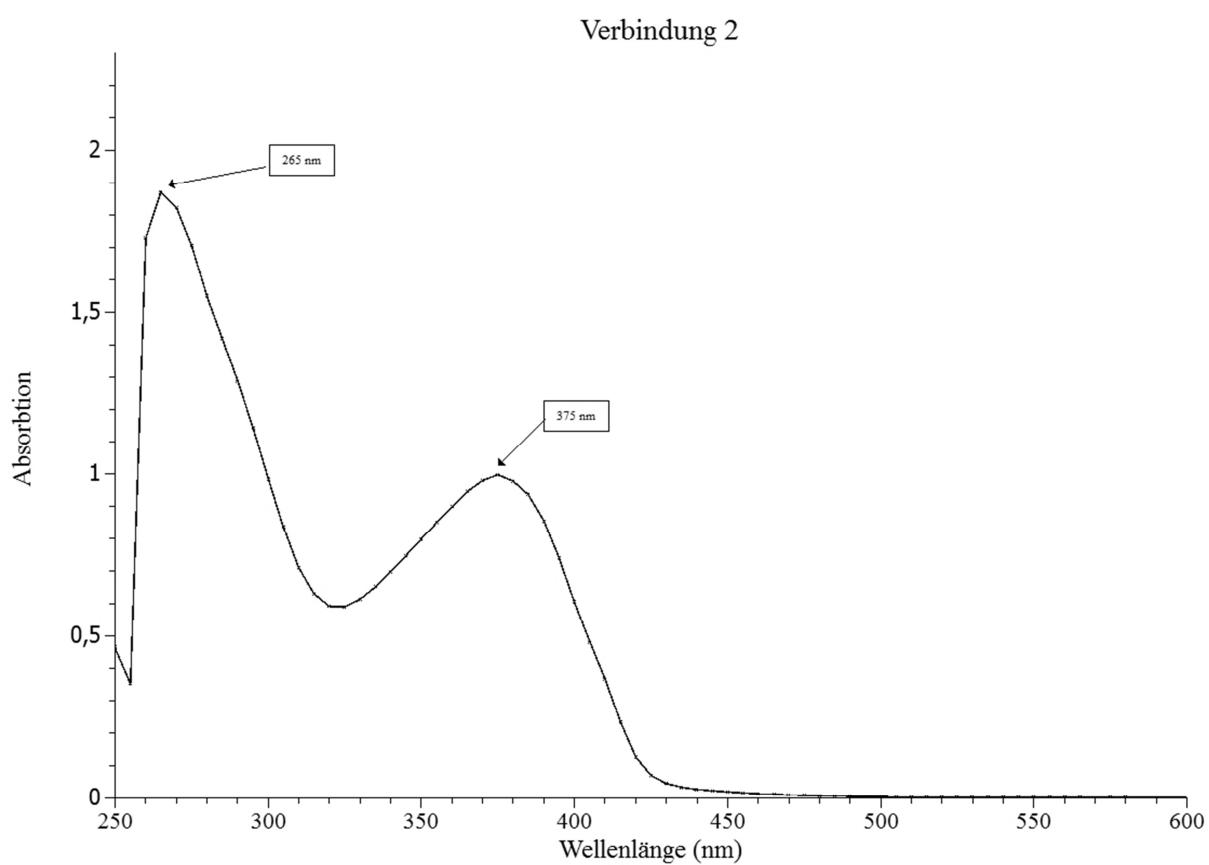
## Diskussion

dass die 3,5-Diarylpyrazin-2-one nur bedingt als Ausgangspunkt für das PPG-Projekt geeignet sind. Es wäre aber denkbar, eine geeignete Schutzgruppe zu finden, die mit Licht einer längeren Wellenlänge, bei der die Pyrazin-2-one stabil bleiben, abgespalten werden kann. Das UV-Absorptionsspektrum der Verbindung **2** zeigt, dass **2** UV-Licht oberhalb der Wellenlänge von 450 nm nicht mehr absorbiert (s. Abb. 65). Somit sollte der Inhibitor **2** bei höheren Wellenlängen chemisch stabil bleiben.

3,5-Diarylpyrazin-2-one, deren PPG mit Licht einer Wellenlänge > 450 nm abgespalten werden kann, sollten sich für das PPG-Projekt eignen. Zum Zeitpunkt der angefertigten Arbeit konnte noch keine entsprechend geeignete Schutzgruppe in dem PPG-Projekt etabliert werden.



**Abb. 64:** UV-Stabilitätsuntersuchungen der Verbindungen **1** und **2**. Verbindung **1**: **A)** Vor der Bestrahlung. **B)** Nach der Bestrahlung der Probe in DMSO mit der Wellenlänge von 365 nm für 5 min und einer Leistung von 5.4 W. Verbindung **2**: **C)** Vor der Bestrahlung. **D)** Nach der Bestrahlung der Probe in DMSO mit der Wellenlänge von 365 nm für 5 min und einer Leistung von 5.4 W.



**Abb. 65:** UV-Absorptionsspektrum am Beispiel der Verbindung 2.

## 8. Zusammenfassung und Ausblick

Allein in Europa gab es im Jahr 2012 3.5 Millionen Neuerkrankungen an Krebs. Für das Jahr 2015 prognostizierte die Weltgesundheitsorganisation (WHO), dass die Zahl der Neuerkrankungen ansteigen wird.<sup>[85]</sup> Deshalb ist die Entwicklung von neuen Wirkstoffen gegen die verschiedenen Krebsarten von großem Interesse, sowohl für die Wissenschaft, die klinische Anwendung als auch für die Gesellschaft. Seit der Zulassung von Imatinib<sup>[7]</sup> im Jahr 2001 werden in der Krebstherapie neben den klassischen Zytostatika vermehrt Kinaseinhibitoren als Chemotherapeutika gegen unterschiedliche Zielkinasen eingesetzt. Bei der Mehrheit der aktuell zugelassenen Kinaseinhibitoren handelt es sich um ATP-kompetitive Typ-I-Inhibitoren, weshalb es aufgrund von strukturellen Ähnlichkeiten in der ATP-Binderegion der unterschiedlichen Kinasen während der Behandlung mit Kinaseinhibitoren zu schweren Nebenwirkungen, bedingt durch geringe Selektivität, kommen kann (vgl. Kap. 1.4).<sup>[20]</sup> Deshalb spielt neben der Affinität auch die Selektivität bei der Entwicklung von neuen Kinaseinhibitoren eine wichtige Rolle.<sup>[75]</sup>

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 3,5-Diarylpyrazin-2-on DFG<sub>in</sub>- und DFG<sub>out</sub>-Inhibitoren hinsichtlich der Affinität und Selektivität gegenüber PDGFR $\beta$  mittels *Molecular Modeling*-Studien optimiert. Sie wurden anschließend synthetisiert und biochemisch verifiziert. Basierend auf den Ergebnissen der biochemischen Untersuchungen wurden die DFG<sub>in</sub>- und DFG<sub>out</sub>-Inhibitoren miteinander verglichen.

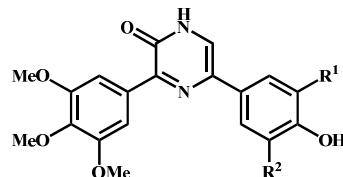
### 8.1 Ergebnisse der Optimierung der DFG<sub>in</sub>-Serie

Im Rahmen der Optimierung der 3,5-Diarylpyrazin-2-on DFG<sub>in</sub>-Serie wurde zunächst virtuell im PDGFR $\beta$  Homologiemodell der elektronische Einfluss der verschiedenen *meta*-Substituenten auf die Polarisierbarkeit und somit auf die Bindeaffinität der *para*-ständigen Hydroxygruppe zu den Aminosäuren Lys634 und Asp844 untersucht. Parallel dazu wurden sterisch anspruchsvolle *meta*-Substituenten bezüglich der Anpassung des Inhibitors an die Bindetasche variiert. Die *Docking*-Ergebnisse hinsichtlich des elektronischen Einflusses des *meta*-Substituenten lieferten keinen eindeutigen Hinweis auf eine mögliche Steigerung bzw. Senkung der Bindeaffinität des Inhibitors bezüglich PDGFR $\beta$  (vgl. Kap. 3.2.1). Die Änderung der sterisch anspruchsvollen *meta*-Substituenten in ihrer Größe, insbesondere der Austausch der Methoxy- durch eine Ethoxy-, Propoxy- sowie Butoxygruppe, sorgte in den *Docking*-

Studien abhängig von der Länge der Alkylkette für eine Steigerung der berechneten Bindefinität (vgl. Kap. 3.2.2).

Basierend auf den *Molecular Docking*-Studien wurden Kandidaten für die anschließende biologische Untersuchung ausgesucht und von D. Schmidt im Rahmen seiner Bachelorarbeit unter meiner Anleitung erfolgreich synthetisiert. Die Synthese der in der Tabelle 18 dargestellten Verbindungen konnte in einer von J. Schlosser<sup>[22][28]</sup> entwickelten Syntheseroute in sechs Syntheseschritten realisiert werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die etablierte Syntheseroute optimiert und die Zielmoleküle in guten Ausbeuten erhalten werden konnten (vgl. Kap. 4).

**Tabelle 18:** Übersicht der Zielmoleküle.



#	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>
<b>1</b>	-OMe	H
<b>27</b>	-OMe	-OMe
<b>33</b>	-Cl	-H
<b>37</b>	-Cl	-Cl
<b>44</b>	-OEt	-H
<b>48</b>	-OMe	-Cl
<b>49</b>	-OEt	-Cl

Die synthetisierten Verbindungen **33** und **44** wurden anschließend auf ihre biologische Aktivität in einem Proliferationsassay an der U87-MG-Zelllinie untersucht. Dabei zeigte die Verbindung **44** im Proliferationsassay analog zu der Leitstruktur **1** zwar einen zytostatischen aber keinen zytotoxischen Effekt. Im Vergleich dazu konnte im Proliferationsassay für die Verbindung **33** sowohl eine zytostatische als auch eine schwach zytotoxische Wirkung gegenüber der U87-MG Zelllinie detektiert werden. Somit zeigt die Verbindung **33** eine höhere Bioaktivität im Proliferationsassay als die Verbindung **1**.

Für den Vergleich der 3,5-Diarylpyrazin-2-on DFG<sub>in</sub>- mit den DFG<sub>out</sub>-Inhibitoren wurde trotz der geringfügig höheren Hemmwirkung der Verbindung **33** im Proliferationsassay die Verbindung **1** ausgewählt, da bereits biochemische Daten zu dieser Verbindung vorgelegt haben.

Zusätzlich sollte überprüft werden, ob die Verbindung **1** durch eine Schützung der *para*-ständigen Hydroxygruppe mit einer photolabilen Schutzgruppe als *Prodrug* im Rahmen des

Photo-*Prodrug*-Projektes eingesetzt werden kann. Die UV-Stabilitätsversuche, die in DMSO durchgeführt wurden, zeigten jedoch, dass die 3,5-Diarylpyrazin-2-one beim Bestrahlen mit Licht einer Wellenlänge von 365 nm zersetzt werden, sodass sich die Pyrazin-2-one unter diesen Bedingungen nicht für die beschriebene Anwendung eignen. Das aufgenommene UV-Spektrum am Beispiel der Verbindung **2** zeigt, dass die Verbindung oberhalb der Wellenlänge von 450 nm kein UV-Licht mehr absorbiert. Durch die Wahl einer geeigneten PPG, wie z.B. Bodipy,<sup>[86][87]</sup> die mit einer Wellenlänge > 450 nm abgespalten werden kann, wäre die Verwendung der 3,5-Diarylpyrazin-2-one als PPG-geschützte *Prodrugs* denkbar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich der Einsatz eines PDGFR $\beta$  Homologiemodells in der DFG<sub>in</sub>-Konformation für eine strukturbasierte Entwicklung der 3,5-Diarylpyrazin-2-on Inhibitoren eignet. Im Rahmen der computerbasierten Optimierung bezüglich des elektronischen Einflusses der *meta*-Substituenten stieß das Modell jedoch an seine Grenzen. Es konnte keine Korrelation zwischen der Ausprägung des elektronischen Einflusses und dem *Glide score* gefunden werden. Die SAR können an dieser Stelle nur mit Hilfe von biochemischen Untersuchungen verifiziert werden. Um eine fundierte Aussage bezüglich der SAR treffen zu können, sollten die synthetisierten DFG<sub>in</sub>-Inhibitoren in einem Kinaseassay auf ihre Hemmaktivität gegenüber PDGFR $\beta$  untersucht werden.

## 8.2 Ergebnisse der Optimierung der DFG<sub>out</sub>-Serie

Bei der Optimierung der 3,5-Diarylpyrazin-2-on DFG<sub>out</sub>-Serie wurden unterschiedlich substituierte Benzoe- bzw. Nikotinsäurederivate für eine bessere Adressierung des lipophilen Bereichs der tiefen Tasche variiert. Zusätzlich zu den Benzamiden **2**, **50-58** wurden auch die Harnstoffderivate **59-66** designt und anschließend gedockt. Die *Docking*-Ergebnisse ergaben, dass die Verbindungen **2** und **50** die höchste Bindefähigkeit gegenüber dem PDGFR $\beta$  Homologiemodell aufwiesen (*Glide score*: **2** = -15.1; **50** = -14.7). Der Einsatz des Benzyl-4-methylpiperazin-Rests in der Verbindung **2** sorgte in den *Molecular Modeling*-Studien für die höchste Steigerung der Bindefähigkeit gegenüber dem PDGFR $\beta$  Homologiemodell. Diese Steigerung beruht auf der besseren Adressierung der lipophilen tiefen Tasche und der zusätzlichen Ausbildung einer Wasserstoffbrücke der Verbindung **2** zum Protein im Vergleich zu der Ausgangsverbindung **12**.

Die Darstellung der DFG<sub>out</sub>-Inhibitoren konnte mit Hilfe der abgewandelten DFG<sub>in</sub>-Syntheseroute nach Schlosser<sup>[22]</sup> erfolgreich in 7 Syntheseschritten realisiert werden. Dabei

konnten einige Syntheseschritte optimiert werden. Zunächst konnte der *Building Block* **11**, ausgehend von der Glyoxyl- und 3-Nitrophenylessigsäure, in 6 Schritten dargestellt werden. Anschließend konnten die Benzamide **2** und **50** durch Amidkupplung synthetisiert werden. Nach anfänglichen Schwierigkeiten bei der Synthese der Verbindung **2** konnte durch Variierung der Kupplungsreagenzien eine geeignete Darstellungsmethode durch Umsetzung mit HATU und DIPEA als Base in der Mikrowelle bei 90 °C gefunden werden. Die Ausbeute des gewünschten Produkts **2** wurde von 1 % auf 43 % gesteigert. Deshalb wäre es sinnvoll, die veränderten Reaktionsbedingungen auch auf die Darstellung des Inhibitors **50** zu adaptieren, um dadurch gegebenenfalls die Ausbeute der Verbindung **50** (65 %) zu erhöhen. Zusätzlich konnten alternativ zu den Benzamiden **2** und **50** durch eine Umsetzung des *Building Blocks* **11** mit Isocyanaten die Harnstoffderivate **60**, **62** und **66** erfolgreich dargestellt werden.

Eine neue Syntheseroute zur Darstellung der Indol-2-ylmethylaminderivate, die J. Schlosser im Rahmen seiner Doktorarbeit<sup>[22]</sup> während der Oxazolsynthese (DFG<sub>out</sub>-Serie) entdeckte, wurde auf ihre Robustheit untersucht. Mittels dieser Syntheseroute konnten die unterschiedlich substituierten Indolderivate in drei Syntheseschritten, ausgehend von den 2-Nitrophenylessigsäuren, realisiert werden. Die für die Synthese benötigten Ausgangsverbindungen konnten erfolgreich in zwei Syntheseschritten durch eine VNS-Reaktion nach Makosza<sup>[63]</sup> und anschließender Hydrolyse des Nitrils dargestellt werden. Die Reaktionsbedingungen der Oxazolsynthese konnten erfolgreich optimiert und auf die Synthese der DFG<sub>in/out</sub>-Serien adaptiert werden. Des Weiteren wurde eine milde Methode zur Reduktion der Nitrogruppe in Anwesenheit von Chlor- und Bromsubstituenten der Oxazole **130** und **131** unter der Verwendung des Natriumdithionits<sup>[64]</sup> gefunden. Im letzten Syntheseschritt konnten sieben unterschiedlich substituierte Indol-2-ylmethylaminderivate **138-144** erfolgreich durch Oxazolspaltung und anschließender Ringschlussreaktion in guten Ausbeuten dargestellt werden.<sup>[40]</sup> Somit wurde die Robustheit dieser neuen Darstellungsmethode gezeigt. Als Erweiterung der vorgestellten Syntheseroute wäre es denkbar, neben den Indol- bzw. Benzofuranderivaten auch die Benzo thiophen- bzw. Heteroaryl-2-ylmethylaminderivate darzustellen.

Die synthetisierten DFG<sub>out</sub>-Inhibitoren **2**, **50**, **60**, **62** und **66** wurden anschließend in einem Proliferationsassay gegenüber der U87-MG-Zelllinie auf ihre antiproliferative Wirkung untersucht. Dabei wiesen alle getesteten DFG<sub>out</sub>-Inhibitoren (mit Ausnahme der Verbindung **62**) sowohl eine zytostatische als auch zytotoxische Wirkung gegenüber der U87-MG Zelllinie auf. Im Verlauf der antiproliferativen Zelltestung hat sich gezeigt, dass die Harnstoffderivate im Vergleich zu den Benzamiden schlechter im verwendeten wässrigen Medium löslich wa-

ren. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass die Verbindungen **60** und **66** auch bei hohen Inhibitorkonzentrationen keine 100 %ige zytotoxische Wirkung in den U87-MG-Zellen zeigten. Der Unterschied in der Löslichkeit zwischen den Benzamiden und den Harnstoffderivaten konnte am Beispiel der Verbindungen **2** und **66** mit Hilfe des Programms QikProp bestätigt werden: der log s-Wert für Wasserlöslichkeit der Verbindung **2** beträgt -5.28 und der Wert der Verbindung **66** beträgt -5.95. Deshalb sollte die Löslichkeit der Testverbindungen mittels HPLC bestimmt und mit den berechneten Werten verglichen werden. Die Verbindungen **2** und **50** zeigten im Vergleich zu den Harnstoffderivaten die stärkste antiproliferative Wirkung gegenüber der U87-MG-Zelllinie, wobei die Verbindung **2** die höchste Zytotoxizität besaß. Aus diesem Grund wurde aus der DFG<sub>out</sub>-Serie die Verbindung **2** für weitere biochemische Untersuchungen und für den Vergleich mit dem DFG<sub>in</sub>-Inhibitor **1** ausgewählt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die gezielte, strukturbasierte Weiterentwicklung eines 3,5-Diarylpyrazin-2-on DFG<sub>out</sub>-Inhibitors unter der Verwendung des PDGFR $\beta$  Homologiemodells in der DFG<sub>out</sub>-Konformation erfolgreich durchgeführt werden konnte. Die mittels der *Schrödinger* Software berechneten Affinitäts-Tendenzen korrelierten mit der biologischen Aktivität im zellulären Assay (vgl. Kap. 7.2).

### 8.3 Vergleich der DFG<sub>in</sub>- bzw. DFG<sub>out</sub>-Inhibitoren **1** und **2**

Obwohl die beiden Verbindungen **1** (IC<sub>50</sub>-Wert = 19 nM) und **2** (IC<sub>50</sub>-Wert = 20 nM) in dem Kinaseassay gegenüber PDGFR $\beta$  eine hohe Hemmaktivität im nM-Bereich zeigen, unterscheidet sich ihre inhibitorische Wirkung auf zellulärer Ebene. Der Grund für diesen Unterschied könnte die Adressierung des nicht konservierten lipophilen Bereichs (*deep pocket*) des PDGFR $\beta$  seitens der Verbindung **2** sein. Während der DFG<sub>out</sub>-Inhibitor **2** neben dem zytostatischen auch einen zytotoxischen Effekt aufweist, zeigt der DFG<sub>in</sub>-Inhibitor **1** ausschließlich den zytostatischen Effekt gegenüber der U87-MG-Zelllinie (vgl. Kap. 7.3). Ein ähnliches Ergebnis konnte auch in den Western Blot-Versuchen beobachtet werden. Dort zeigte die Verbindung **2** eine konzentrationsabhängige Hemmung der Phosphorylierung der Kinasen PDGFR $\beta$ , AKT und ERK ab einer Inhibitorkonzentration von 1  $\mu$ M. Dagegen zeigte die Verbindung **1** in dem Western Blot-Experiment keine Hemmaktivität gegenüber der Phosphorylierung der *Downstream* Kinase AKT. Aufgrund einer besseren Bioverfügbarkeit hemmt die Verbindung **2** wahrscheinlich die *Upstream* Rezeptortyrosinkinasen von AKT. Der im bindungsbasierten Selektivitätsassay der Fa. DiscoveRx bestimmte Selektivitätswert ( $S_{50} = 0.22$ )

war um den Faktor 2 schlechter als der Selektivitätswert der Verbindung **2** ( $S_{50} = 0.11$ ). Der Unterschied der Selektivitätsprofile der beiden Inhibitoren **1** ( $S_{50} = 0.16$ ) und **2** ( $S_{50} = 0.013$ ) im aktivitätsbasierten Kinaseassay der Fa. ProQinase war noch deutlicher, wobei dieser kritisch betrachtet werden muss. Beim aktivitätsbasierten Assay wird eine hyperphosphorylierte PDGFR $\beta$ -Kinase verwendet, bei der das Gleichgewicht auf der Seite der DFG<sub>in</sub>-Konformation liegt. Da es sich bei der Verbindung **2** aber um einen Inhibitor des Typs-II handelt, der bevorzugt in die inaktive DFG<sub>out</sub>-Konformation der Kinase bindet, wird die Hemmwirkung dieser Verbindung oft negativ detektiert. Zur Berücksichtigung dieses Effektes und zur Untersuchung des Bindeverhaltens der Verbindung **2** wurden kinetische Untersuchungen im Kinaseassay (PDGFR $\beta$ ) durch Variierung der Präinkubationszeit durchgeführt. Anhand der Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Verbindung **2** tatsächlich um einen Typ-II-Inhibitor handelt, der eine langsame On-/Off-Kinetik aufweist (vgl. Kap. 7.3.1).

Im Vergleich zu der Verbindung **2** zeigte der DFG<sub>in</sub>-Inhibitor **1** in der U87-MG-Zelllinie keine Hemmaktivität gegenüber der Phosphorylierung der *downstream*-Kinase AKT und induzierte damit keine Apoptose der Krebszellen. Das Fehlen des zytotoxischen Effektes sollte zusätzlich an anderen Zelllinien, wie z.B. NHI3T3, mittels eines Proliferationsassays untersucht werden, damit zellspezifische Effekte analysiert werden können.

Aufgrund der gleichzeitigen Inhibierung der zu PDGFR $\beta$  nah verwandten Tyrosinkinasen (c-kit, VEGFR2 und ABL) sollte der im Kinaseassay im nM-Bereich wirkende, hochselektive DFG<sub>out</sub>-Inhibitor **2** außerdem an weiteren Zelllinien auf seine antiproliferative Wirkung getestet werden, um herauszufinden, für welche Krebszelllinie sich der Inhibitor **2** als Wirkstoff am besten eignet.

Bei der Behandlung von CML mit Imatinib traten bei einigen Patienten als Folge einer Mutation der *gatekeeper*-Aminosäure der BCR-ABL-Kinase Imatinib-Resistenzen auf.<sup>[7]</sup> Laut der Docking-Studien sollte die Verbindung **2** nicht durch Mutation des *gatekeepers* in ihrer Bindeaffinität gehindert werden. Zur Überprüfung dieser These sollten antiproliferative Untersuchungen mit Zelllinien durchgeführt werden, die die mutierte und nicht mutierte BCR-ABL-Kinase überexprimieren. Sollte sich diese These bestätigen, könnte die Verbindung **2** als eine Alternative zu Imatinib zur Behandlung von CML weiterentwickelt werden.

## Zusammenfassung und Ausblick

---

Für eine weitere biochemische Charakterisierung und den Vergleich mit der Verbindung **1** wäre es wichtig, toxikologische und pharmakokinetische Untersuchungen, wie Metabolismus, Bioverfügbarkeit und weitere Aspekte für die Inhibitoren **1** und **2**, durchzuführen.

Zusammenfassend konnte am Beispiel der 3,5-Diarylpyrazin-2-on DFG<sub>in/out</sub>-Inhibitoren gezeigt werden, dass DFG<sub>out</sub>-Inhibitoren im Vergleich zu DFG<sub>in</sub>-Inhibitoren eine höhere Selektivität und eine stärkere zelluläre Hemmaktivität aufweisen. Da DFG<sub>out</sub>-Inhibitoren nicht competitiv zu ATP binden und eine langsame On-/Off-Kinetik zeigen, könnte dies eine Dosisreduktion im Vergleich zu ähnlich potenten Typ-I-Inhibitoren ermöglichen. Unerwünschte Arzneimittelwirkungen könnten somit gemindert bzw. vermieden werden. Es wäre daher sinnvoll, den in dieser Arbeit entwickelten hoch-potenten DFG<sub>out</sub>-Inhibitor **2** als *lead structure* bezüglich einer besseren Bioverfügbarkeit weiter zu optimieren, um die Bioaktivität in ersten Tierversuchen zu testen.

## 9. Experimenteller Teil

### 9.1 Allgemeine Methoden

Die zur Synthese und Analytik verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen ABCR, Acros, Fluka, Merck, Sigma-Aldrich und VWR bezogen. Sie wurden ohne vorherige Aufreinigung verwendet. Folgende Geräte wurden zur Aufreinigung und Charakterisierung der synthetisierten Substanzen verwendet:

#### **Mikrowellensynthese:**

Die Synthese wurde mittels Mikrowellensynthesizer Discover der Fa. CEM durchgeführt. Die Synthesen wurden mit einer max. Leistung von 100 W in Reaktionsgefäßen (5 mL) und anschließender Luftkühlung durchgeführt.

#### **Säulenchromatographie:** La Flash, VWR

#### Säulenmaterial:

- LiChroprep Si 60 (25–40 µm), Merck KGaA
- LiChroprep RP-18 (25–40 µm), Merck KGaA

#### **Lichtquelle:**

Die UV-Stabilitätsversuche wurden mit einer LED-Lampe der Firma Sahlmann Photochemical Solution eingesetzt:

365 nm: 12x Nichia NCSU033B, 100 % 5.4 W

**NMR-Spektroskopie:**

Die **NMR-Spektren** wurden mit den folgenden Geräten der Firma Bruker bei 300 K gemessen: ARX 300 (1H-NMR bei 300 MHz, 13C-NMR bei 75 MHz) und ARX 500 (1H-NMR bei 500 MHz, 13C-NMR bei 125.8 MHz). Zur besseren Zuordnung der Signale wurden zweidimensionale Spektren (1H-1H-COSY, HSQC und HMBC) aufgenommen.

Als interner Standard diente das Restsignal des jeweiligen deuterierten Lösemittels:

CDCl<sub>3</sub>                  1H 7.26 ppm (s)

                            13C 77.00 ppm (t)

DMSO-d<sub>6</sub>                  1H 2.504 ppm (s)

                            13C 39.52 ppm (t)

**Massenspektrometrie:**

Agilent 1100 HPLC System

Esquire-LC Mass Spectrometer, Fa. Bruker.

EI/CI: MAT 8200, Finnigan

MALDI-TOF: BiflexTM III, Bruker

**IR:**

FTIR-Spektralphotometer: IRAffinity-1S der Fa. Shimadzu

**HPLC:**

Hewlett Packard 1050 Series, UV-Detector

**HPLC Methoden:****Methode 1**

Fließmittel 1: Methanol

Fließmittel 2: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer 0,01 M, pH 2,3

Säule: ZORBAX EclipseXDB-C8, 5 µm (150 x 46 mm)

Flussrate: 1,5 ml/min

Zeit (min)	Fließmittel 1 (%)	Fließmittel 2 (%)
0	40	60
8,00	85	15
13,00	85	15
14,00	40	60
16,00	40	60

**Methode 2**

Fließmittel 1: Methanol

Fließmittel 2: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer 0,01 M, pH 2,3

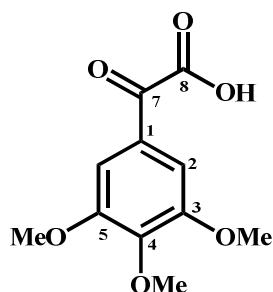
Säule: ZORBAX EclipseXDB-C8, 5 µm (150 x 46 mm)

Flussrate: 1,5 ml/min

Zeit (min)	Fließmittel 1 (%)	Fließmittel 2 (%)
0	20	80
8,00	85	15
13,00	85	15
14,00	20	80
15,00	20	80

## 9.2 Einzelvorschriften

### 9.2.1 Synthese von 2-(3,4,5-Trimethoxyphenyl)glyoxylsäure (7)



1.00 g (4.73 mmol) 3,4,5-Trimethoxyacetophenon **6** und 0.79 g (7.14 mmol) Selendioxid wurden in 15 mL Pyridin gelöst und 3 h unter Rückfluss erhitzt. Die Lösung verfärbte sich gelb. Anschließend wurde Selen (schwarz) abfiltriert und mit Pyridin gewaschen. Das Lösungsmittel wurde mit Hilfe von Toluol kdestilliert. Der Rückstand wurde in 50 mL 1 M Natriumcarbonat-Lösung aufgenommen und dreimal mit je 50 mL DCM gewaschen. Die wässr. Phase wurde so lange mit konz. Salzsäure versetzt, bis sich ein farbloser Niederschlag bildete. Die Suspension wurde dreimal mit je 50 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten org. Extrakte wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Es wurde ein hellgelber Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 1.04 g (4.40 mmol, 91 %).

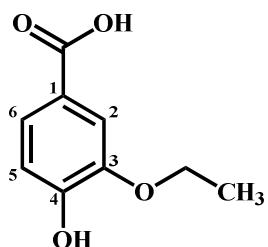
**1H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 3.79 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 3.85 (s, 6 H, OCH<sub>3</sub>), 7.21 (s, 2 H, 2-H) ppm.

**13C-NMR** (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 56.1 (OCH<sub>3</sub>), 60.3 (OCH<sub>3</sub>), 106.8 (4-C), 126.9 (3-C), 143.5 (6-C), 153.0 (5-C), 166.0 (1-C), 187.5 (2-C) ppm.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 2938, 1721, 1683, 1643, 1588, 1505, 1453, 1419, 1328, 1239, 1156, 1126, 983, 669, 774, 691.

**LC-MS:** *m/z* = 241 [MH]<sup>+</sup>, (ber. *m/z* = 240.2 für C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>).

## 9.2.2 Synthese von 3-Ethoxy-4-hydroxybenzoesäure (89)



4.79 g (120 mmol) Natriumhydroxid wurden in 80 mL Wasser gelöst und 2.79 g (12.0 mmol) Silber(I)oxid zugegeben. Unter Rühren wurde es auf 55 °C erhitzt und 2.0 g (12 mmol) 3-Ethoxy-4-hydroxybenzaldehyd zugegeben. Anschließend wurde 1.5 h ohne weitere Hitzezufuhr gerührt. Es fiel ein flockiger, silbriger Niederschlag aus, der abfiltriert wurde. Das Filtrat wurde mit konz. Schwefelsäure versetzt, woraufhin ein gelber Niederschlag ausfiel. Der Niederschlag wurde abgesaugt, mit Wasser gewaschen und i. Vak. getrocknet.

Im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert durch Schmidt.<sup>[47]</sup>

**Ausbeute:** 1.35 g (7.41 mmol, 61 %).

**Schmelzpunkt:** 161 °C.

**1H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 1.34 (t, <sub>3</sub>J = 6.9 Hz, 3 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.05 (q, <sub>3</sub>J = 6.9 Hz, 2 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 6.85 (d, <sub>3</sub>J = 8.4 Hz, 1 H, 5-H), 7.41-7.45 (m, 2 H, 2,6-H), 9.76 (br. s, 1 H, OH), 12.43 (br. s, 1 H, COOH) ppm.

**13C-NMR** (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 14.7 (CH<sub>3</sub>), 63.9 (CH<sub>2</sub>), 114.0 (5-C), 115.1 (2-C), 121.6 (1-C), 123.5 (6-C), 146.3 (3-C), 151.4 (4-C), 167.2 (COOH) ppm.

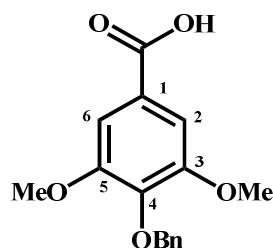
**LC-MS** (EI, 70 eV): *m/z* = 183 [MH]<sup>+</sup>. (ber. *m/z* = 182.1 für C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>).

### 9.2.3 Benzylschützung der 4-Hydroxybenzoësäurederivate 67-71

#### Synthesevorschrift zur Schützung der 4-Hydroxybenzoësäurederivate in zwei Schritten:

1 eq. der 4-Hydroxybenzoësäure, 5 eq. Natriumcarbonat und 5 eq. Benzylbromid wurden in abs. DMF gelöst und 15 h bei 20 °C gerührt. Die Reaktionslösung wurde auf Wasser gegossen und dreimal mit EA extrahiert. Die org. Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel i. Vak entfernt. Das zweifach geschützte Rohprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung für die nächste Stufe eingesetzt. Der entsprechende Benzoësäurebenzylester wurde in einer Lsg. aus H<sub>2</sub>O/EtOH (1:4) gelöst und mit 5 eq. Kaliumhydroxid versetzt. Es wurde 2 h unter Rückfluss gerührt. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen. Die Lösung wurde mit konz. Schwefelsäure versetzt, bis sich ein farbloser Niederschlag bildete. Es wurde dreimal mit EA extrahiert und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt.

#### 4-Benzylxyloxy-3,5-dimethoxybenzoësäure (67)

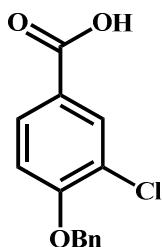


**Ausbeute:** 1.25 g (4.34 mmol, 86 %).

**1H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 9.35 (br. s, 1 H, COOH), 7.46-7.43 (m, 2 H, Ar-H), 7.39-7.28 (m, 3 H, Ar-H), 7.24 (s, 2 H, 2,6-H), 4.99 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 3.82 (s, 6 H, OCH<sub>3</sub>) ppm.

**13C-NMR** (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 56.0 (OCH<sub>3</sub>), 73.9 (CH<sub>2</sub>), 106.5 (2,6-C), 126.0 (1-C), 127.8 (Ar-C), 127.9 (Ar-C), 128.1 (Ar-C), 137.5 (q-C), 140.1 (4-C), 152.8 (3-C), 166.9 (COOH) ppm.

**LC-MS** (EI, 70 eV): *m/z* = 289 [MH]<sup>+</sup>, (ber. *m/z* = 288.3 für C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>O<sub>5</sub>).

**4-Benzylxy-3-chlorbenzoësäure (68)**

Im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert durch Schmidt.<sup>[47]</sup>

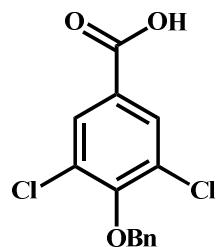
**Ausbeute:** farbloser Feststoff, 2.96 g (11.3 mmol, 97 %).

**Schmelzpunkt:** 211 °C.

**1H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 5.30 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 7.51-7.31 (m, 6 H, 5-*H*), 7.88 (dd, <sub>4</sub>*J = 2.1 Hz, <sub>3</sub>*J = 8.6 Hz, 1 H, 6-*H*), 7.93 (d, <sub>4</sub>*J = 2.1 Hz, 1 H, 2-*H*), 12.97 (br. s, 1 H, COOH), ppm.***

**13C-NMR** (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 70.3 (CH<sub>2</sub>), 113.7 (5-*C*), 121.4 (3-*C*), 124.2 (1-*C*), 127.5 (Ar-*C*), 128.1 (Ar-*C*), 128.5 (Ar-*C*), 129.9 (6-*C*), 130.8 (2-*C*), 136.0 (Ar-*C*), 157.0 (4-*C*), 165.9 (COOH), ppm.

**LC-MS** (EI, 70 eV): *m/z* = 265, 263 [MH]<sup>+</sup>, (ber. *m/z* = 262.0 für C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>ClO<sub>3</sub>).

**4-Benzylxy-3,5-dichlorbenzoësäure (69)**

Im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert durch Schmidt.<sup>[47]</sup>

**Ausbeute:** farbloser Feststoff, 2.66 g (8.95 mmol, 92 %).

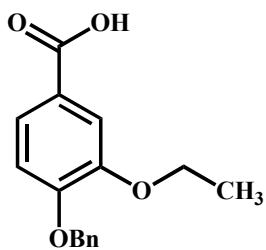
**Schmelzpunkt:** 211 °C.

**1H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta = 5.10$  (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 7.45-7.38 (m, 3 H, Ar-H), 7.53 (dd, <sub>4</sub>J = 1.8 Hz, <sub>3</sub>J = 7.8 Hz, 2 H, Ar-H), 7.94 (s, 2 H, 2-H), 13.53 (br. s, 1 H, COOH) ppm.

**13C-NMR** (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta = 74.91$  (CH<sub>2</sub>), 128.4 (Ar-C), 128.5 (Ar-C), 128.7 (1-C), 129.0 (3-C), 129.9 (2-C), 135.7 (Ar-C), 153.8 (4-C), 164.8 (COOH) ppm.

**LC-MS** (EI, 70 eV): *m/z* = 299, 297 [MH]<sup>+</sup>, (ber. *m/z* = 296.0 für C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>3</sub>).

#### 4- Benzyloxy-3-ethoxybenzoësäure (70)



Im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert durch Schmidt.<sup>[47]</sup>

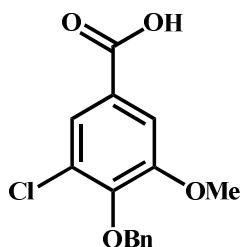
**Ausbeute:** gelber Feststoff, 1.41 g (5.18 mmol, 79 %).

**Schmelzpunkt:** 169 °C.

**1H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta = 1.34$  (t, <sub>3</sub>J = 6.9 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>), 4.07 (q, <sub>3</sub>J = 6.9 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 5.18 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 7.12 (d, <sub>3</sub>J = 8.4 Hz, 1 H, 5-H), 7.46 (d, <sub>4</sub>J = 2.0 Hz, 1 H, 2-H), 7.30-7.47 (m, 5 H, Ar-H), 7.53 (dd, <sub>4</sub>J = 2.0 Hz, <sub>3</sub>J = 8.4 Hz, 1 H, 6-H), 12.61 (br. s, 1 H, COOH) ppm.

**13C-NMR** (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta = 14.7$  (CH<sub>3</sub>), 63.9 (CH<sub>2</sub>), 69.8 (CH<sub>2</sub>), 112.9 (5-C), 113.6 (2-C), 123.0 (6-C), 123.3 (1-C), 127.6 (Ar-C), 127.9 (Ar-C), 128.5 (Ar-C), 136.7 (Ar-C), 147.8 (3-C), 151.8 (4-C), 167.0 (COOH) ppm.

**LC-MS** (EI, 70 eV): *m/z* = 273 [MH]<sup>+</sup>, (ber. *m/z* = 272.3 für C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub>).

**4-Benzylxy-3-chlor-5-methoxybenzoësäure (71)**

Im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert durch Schmidt.<sup>[47]</sup>

**Ausbeute:** gelber Feststoff, 2.61 g (8.94 mmol, 90 %).

**Schmelzpunkt:** 147 °C.

**1H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 3.92 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 5.09 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 7.33-7.41 (m, 3 H, Ar-*H*), 7.47 (dd, <sub>4</sub>J = 1.7 Hz, <sub>3</sub>J = 7.9 Hz, 2 H, Ar-*H*), 7.52 (d, <sub>4</sub>J = 1.9 Hz, 1 H, 6-*H*), 7.55 (d, <sub>4</sub>J = 1.9 Hz, 1 H, 2-*H*) ppm.

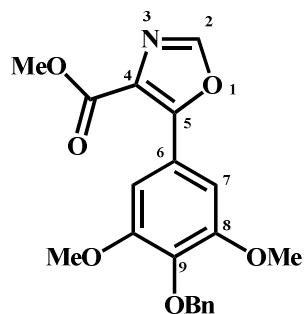
**13C-NMR** (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 56.3 (OCH<sub>3</sub>), 74.3 (CH<sub>2</sub>), 112.3 (6-C), 122.6 (2-C), 127.2 (5-C), 127.4 (1-C), 128.2 (Ar-C), 128.3 (Ar-C), 128.3 (Ar-C), 136.6 (Ar-C), 146.9 (3-C), 153.4 (4-C), 165.9 (COOH) ppm.

**LC-MS** (EI, 70 eV): *m/z* = 295, 293 [MH]<sup>+</sup>, (ber. *m/z* = 292.1 für C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>ClO<sub>4</sub>).

## 9.2.4 Synthesen der 1,3-Oxazol-4-carbonsäuremethylester 74-79

**Synthesevorschrift zur Darstellung des Oxazols, ausgehend von einer Benzoesäure:** 1 eq. 4-Benzyloxybenzoesäure und 1.2 eq. CDI wurden in abs. THF gelöst und so lange bei 20 °C gerührt, bis keine Gasentwicklung mehr beobachtbar war. Danach wurde weitere 2 h bei 50 °C gerührt. Die Lsg. verfärbte sich gelb. Das Reaktionsgemisch wurde langsam zu einer Lsg. aus 1.1 eq. Isocyanoessigsäuremethylester und 0.8 eq. NaHMDS in abs. THF getropft. Es wurde 15 h bei 20 °C gerührt. Die Lösung verfärbte sich dunkelbraun. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde in EA aufgenommen und dreimal mit ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die org. Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt.

### 5-(4-Benzyl-3,5-dimethylphenyl)-1,3-oxazol-4-carbonsäuremethylester (74)

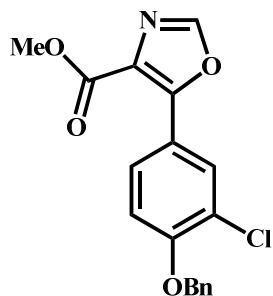


**Ausbeute:** 216 mg (0.59 mmol, 84 %).

**1H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 3.83 (s, 3 H, COOCH<sub>3</sub>), 3.85 (s, 6 H, OCH<sub>3</sub>), 5.00 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 7.32-7.38 (m, 3 H, Ar-H), 7.40 (s, 2 H, 7-H), 7.46-7.49 (m, 2 H, Ar-H), 8.55 (s, 1 H, 2-H) ppm.

**13C-NMR** (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 51.9 (COOCH<sub>3</sub>), 56.1 (OCH<sub>3</sub>) 74.0 (CH<sub>2</sub>), 105.9 (7-C), 121.7 (4-C), 125.7 (5-C), 127.8 (Ar-C), 127.9 (Ar-C), 128.1 (Ar-C), 137.5 (q, Ar-C), 138.2 (9-C), 150.5 (2-C), 152.9 (8-C), 154.1 (5-C), 162.0 (C=O), ppm.

**MS (MALDI-TOF, Cl-CCA):** *m/z* = 370 [MH]<sup>+</sup>, (ber. *m/z* = 369.4 für C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>6</sub>).

**5-(4-Benzylxy-3-chlorphenyl)-1,3-oxazol-4-carbonsäuremethylester (75)**

Im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert durch Schmidt.<sup>[47]</sup>

**Ausbeute:** 1.55 g (4.52 mmol, 59 %).

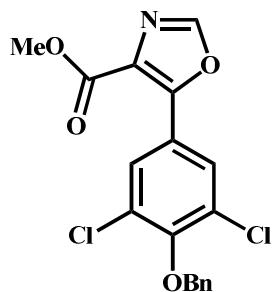
**Schmelzpunkt.:** 109 °C.

**1H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 3.87 (s, 3 H, COOCH<sub>3</sub>), 5.15 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 6.97 (d, <sub>3</sub>J = 8.8 Hz, 1 H, 10-H), 7.22-7.41 (m, 5 H, Ar-H), 7.76 (s, 1 H, 2-H), 7.98 (dd, <sub>3</sub>J = 8.8 Hz, <sub>4</sub>J = 2.2 Hz, 1 H, 11-H), 8.13 (d, <sub>4</sub>J = 2.2 Hz, 1 H, 7-H) ppm.

**13C-NMR** (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 53.0 (COOCH<sub>3</sub>), 71.5 (CH<sub>2</sub>), 113.3 (10-C), 120.1 (8-C), 123.4 (6-C), 125.8 (4-C), 127.0 (Ar-C), 128.2 (Ar-C), 128.2 (7-C), 128.7 (Ar-C), 130.2 (11-C), 135.9 (Ar-C), 148.6 (2-C), 154.4 (6-C), 155.8 (3-C), 162.4 (C=O) ppm.

**LC-MS** (EI, 70 eV): *m/z* = 346, 344 [MH]<sup>+</sup>, 314, 312 [M - OCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, (ber. *m/z* = 343.1 für C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>ClO<sub>4</sub>).

**5-(4-Benzylxy-3,5-dichlorphenyl)-1,3-oxazol-4-carbonsäuremethylester (76)**



Im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert durch Schmidt.<sup>[47]</sup>

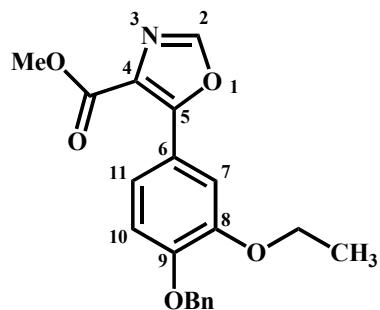
**Ausbeute:** 800 mg (2.09 mmol, 41 %).

**Schmelzpunkt.:** 146 °C.

**1H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 3.90 (s, 3 H, COOCH<sub>3</sub>), 5.04 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 7.26-7.37 (m, 3 H, Ar-H), 7.49 (dd, <sub>4</sub>J = 1.7 Hz, <sub>3</sub>J = 7.9 Hz, 2 H, Ar-H), 7.85 (s, 1 H, 2-H), 8.11 (s, 2 H, 7-H) ppm.

**13C-NMR** (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 52.6 (COOCH<sub>3</sub>), 75.2 (CH<sub>2</sub>), 123.9 (8-C), 127.2 (4-C), 128.5 (7-C), 128.5 (Ar-C) 128.6 (Ar-C), 128.8 (Ar-C), 130.0 (q-C), 135.9 (Ar-C), 149.2 (2-C), 152.7 (9-C), 162.0 (C=O) ppm.

**LC-MS** (EI, 70 eV): *m/z* = 382, 380, 378 [MH]<sup>+</sup>, (ber. *m/z* = 378.2 für C<sub>18</sub>H<sub>13</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>5</sub>).

**5-(4-Benzylxyloxy-3-ethoxyphenyl)-1,3-oxazol-4-carbonsäuremethylester (77)**

Im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert durch Schmidt.<sup>[47]</sup>

**Ausbeute:** 638 mg (1.81 mmol, 49 %).

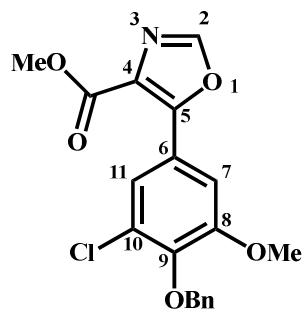
**Schmelzpunkt:** 115 °C.

**1H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.43 (t, <sub>3</sub>J = 7.0 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>), 3.87 (s, 3 H, COOCH<sub>3</sub>), 4.13 (q, <sub>3</sub>J = 7.1 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 5.14 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 6.89 (d, <sub>3</sub>J = 8.5 Hz, 1 H, 10-H), 7.20-7.39 (m, 5 H, Ar-H), 7.57 (dd, <sub>3</sub>J = 8.5 Hz, <sub>4</sub>J = 2.1 Hz, 1 H, 11-H), 7.76 (s, 1 H, 2-H), 7.80 (d, <sub>4</sub>J = 2.1 Hz, 1 H, 7-H) ppm.

**13C-NMR** (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 14.8 (CH<sub>3</sub>), 52.3 (COOCH<sub>3</sub>), 64.7 (CH<sub>2</sub>), 70.9 (CH<sub>2</sub>), 113.5 (7-C), 113.9 (10-C), 119.7 (6-C), 121.5 (11-C), 125.2 (4-C), 127.1 (Ar-C), 127.9 (Ar-C), 128.5 (Ar-C), 136.8 (Ar-C), 148.2 (2-C), 148.7 (q-C), 150.4 (q-C), 155.8 (9-C), 162.6 (C=O) ppm.

**LC-MS** (EI, 70 eV): *m/z* = 354 [MH]<sup>+</sup>, 322 [M - OCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, (ber. *m/z* = 353.4 für C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>5</sub>).

**5-(4-Benzylxy-3-chlor-5-methoxyphenyl)-1,3-oxazol-4-carbonsäuremethylester (78)**



Im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert durch Schmidt.<sup>[47]</sup>

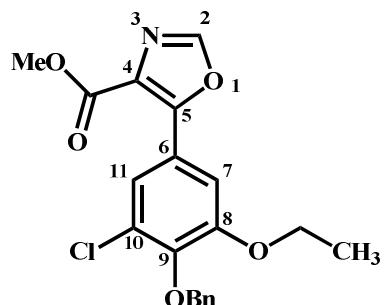
**Ausbeute:** 158 mg (0.423 mmol, 30 %).

**Schmelzpunkt:** 134 °C.

**1H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 3.88 (s, 3 H, COOCH<sub>3</sub>), 3.90 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 5.05 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 7.23-7.34 (m, 3 H, Ar-H), 7.45 (dd, <sub>4</sub>J = 1.6 Hz, <sub>3</sub>J = 8.0 Hz, 2 H, Ar-H), 7.69 (d, <sub>4</sub>J = 2.1 Hz, 1 H, 11-H), 7.82 (s, 1 H, 2-H), 7.86 (d, <sub>4</sub>J = 2.1 Hz, 1 H, 7-H) ppm.

**13C-NMR** (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 53.2 (COOCH<sub>3</sub>), 57.0 (OCH<sub>3</sub>), 75.7 (CH<sub>2</sub>), 112.0 (7-C), 122.6 (10-C), 123.4 (q-C), 126.5 (q-C), 128.2 (Ar-C), 128.3 (Ar-C), 128.4 (Ar-C), 128.8 (11-C), 136.8 (Ar-C), 146.0 (q-C), 148.7 (2-C), 153.7 (8-C), 154.2 (9-C), 162.4 (C=O) ppm.

**LC-MS** (EI, 70 eV): *m/z* = 376, 374 [MH]<sup>+</sup>, 344, 342 [M - OCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, (ber. *m/z* = 373.1 für C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>ClNO<sub>4</sub>).

**5-(4-Benzylxyloxy-3-chloro-5-ethoxyphenyl)-1,3-oxazol-4-carbonsäuremethylester (79)**

Im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert durch Schmidt.<sup>[47]</sup>

**Ausbeute:** 169 mg (0.44 mmol, 68 %).

**Schmelzpunkt:** 95 °C.

**1H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.43 (t, <sub>3</sub>J = 7.0 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>), 3.89 (s, 3 H, COOCH<sub>3</sub>), 4.11 (q, <sub>3</sub>J = 7.0 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 5.07 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 7.23-7.33 (m, 3 H, Ar-H), 7.46 (dd, <sub>4</sub>J = 1.6 Hz, <sub>3</sub>J = 8.0 Hz, 2 H, Ar-H), 7.66 (d, <sub>4</sub>J = 2.1 Hz, 1 H, 11-H), 7.81 (s, 1 H, 2-H), 7.82 (d, <sub>4</sub>J = 2.1 Hz, 1 H, 7-H) ppm.

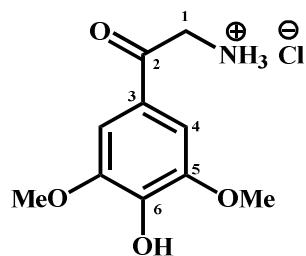
**13C-NMR** (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 14.7 (CH<sub>3</sub>), 52.5 (COOCH<sub>3</sub>), 64.9 (CH<sub>2</sub>), 75.0 (CH<sub>2</sub>), 112.2 (11-C), 121.7 (7-C), 122.6 (10-C), 126.4 (q-C), 128.2 (Ar-C), 128.3 (Ar-C), 128.5 (Ar-C), 128.8 (q-C), 136.9 (Ar-C), 146.2 (q-C), 148.7 (2-C), 153.0 (8-C), 154.2 (9-C), 162.4 (C=O) ppm.

**LC-MS** (EI, 70 eV): *m/z* = 390, 388 [MH]<sup>+</sup>, 358, 356 [M - OCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, (ber. *m/z* = 387.8 für C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>ClNO<sub>5</sub>).

### 9.2.5 Synthesen der $\alpha$ -Ketoamine 80-85

**Synthesevorschrift zur Spaltung der 1,3-Oxazol-4-carbonsäuremethylester:** 1 eq. des Oxazols wurde in einer Lsg. aus MeOH/HCl (1:1) gelöst und 4 h unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand wurde mit Aceton versetzt. Die Suspension wurde filtriert und der Niederschlag wurde mit Et<sub>2</sub>O gewaschen.

#### 2-(3,5-Dichlor-4-hydroxyphenyl)-2-oxoethanammoniumchlorid (80)

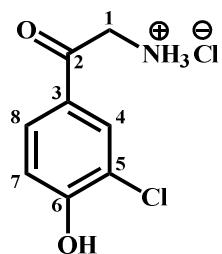


**Ausbeute:** 170 mg (0.69 mmol, 82 %).

**1H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 3.85 (s, 6 H, OCH<sub>3</sub>), 4.52 (s, 2 H, 1-H), 7.28 (s, 2 H, 4-H), 8.46 (br. s, 3 H, NH<sub>3</sub>), 9.62 (br. s, 1 H, OH) ppm.

**13C-NMR** (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 44.3 (1-C), 56.2 (OCH<sub>3</sub>), 106.2 (4-C), 124.0 (3-C), 142.1 (6-C), 147.7 (5-C), 190.9 (2-C), ppm.

**MS** (EI, 70 eV): *m/z* = 212 [M - Cl<sup>-</sup>]<sup>+</sup>, (ber. *m/z* = 247.7 für C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>ClNO<sub>4</sub>).

**2-(3-Chlor-4-hydroxyphenyl)-2-oxoethanammoniumchlorid (81)**

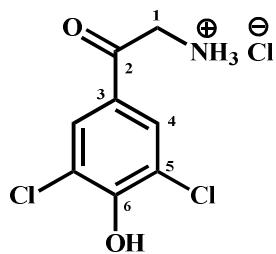
Im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert durch Schmidt.<sup>[47]</sup>

**Ausbeute:** 616 mg (2.79 mmol, 91 %).

**1H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 4.49 (s, 2 H, 1-*H*), 7.24 (d, <sub>3</sub>*J* = 8.6 Hz, 1 H, 7-*H*), 7.84 (dd, <sub>3</sub>*J* = 8.6 Hz, <sub>4</sub>*J* = 2.2 Hz, 1 H, 8-*H*), 8.01 (d, <sub>4</sub>*J* = 2.2 Hz, 1 H, 4-*H*), 8.39 (s, 3 H, NH<sub>3</sub>), 11.73 (s, 1 H, OH) ppm.

**13C-NMR** (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 44.2 (1-*C*), 116.6 (7-*C*), 120.2 (5-*C*), 125.9 (3-*C*), 128.9 (8-*C*), 130.5 (4-*C*), 158.9 (6-*C*), 190.3 (2-*C*) ppm.

**LC-MS** (EI, 70 eV): *m/z* = 188, 186 [M - Cl]<sup>+</sup>, 168, 170 [M - Cl - H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 133 [M - 2 Cl - H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, (ber. *m/z* = 222.3 für C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>2</sub>).

**2-(3,5-Dichlor-4-hydroxyphenyl)-2-oxoethanammoniumchlorid (82)**

Im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert durch Schmidt.<sup>[47]</sup>

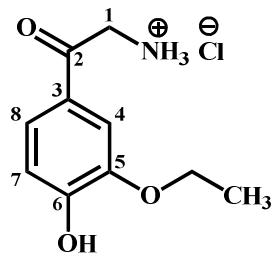
**Ausbeute:** 470 mg (1.83 mmol, 99 %).

**1H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 4.53 (s, 2 H, 1-*H*), 8.01 (s, 2 H, 4-*H*), 8.50 (br. s, 3 H, NH<sub>3</sub>), 11.44 (br. s, 1 H, OH), ppm.

**13C-NMR** (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta = 44.5$  (1-*C*), 122.5 (5-*C*), 126.3 (3-*C*), 129.0 (4-*C*), 154.4 (6-*C*), 190.0 (2-*C*) ppm.

**LC-MS** (EI, 70 eV): *m/z* = 188, 186 [M - Cl]<sup>+</sup>, 168, 170 [M - Cl - H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 133 [M - 2 Cl - H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, (ber. *m/z* = 255.0 für C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>Cl<sub>3</sub>NO<sub>2</sub>).

### 2-(3-Ethoxy-4-hydroxyphenyl)-2-oxoethanammoniumchlorid (83)



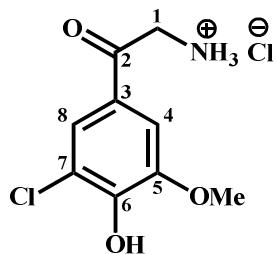
Im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert durch Schmidt.<sup>[47]</sup>

**Ausbeute:** hellgelber Feststoff, 370 mg (1.60 mmol, 94 %).

**1H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta = 1.35$  (t, <sub>3</sub>J = 6.9 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>), 4.09 (q, <sub>3</sub>J = 6.9 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 4.45 (s, 2 H, 1-H), 7.0 (d, <sub>3</sub>J = 8.3 Hz, 1 H, 7-H), 7.46 (d, <sub>4</sub>J = 2.0 Hz, 1 H, 4-H), 7.54 (dd, <sub>3</sub>J = 8.3 Hz, <sub>4</sub>J = 2.0 Hz, 1 H, 8-H), 8.41 (br. s, 3 H, NH<sub>3</sub>), 10.38 (br. s, 1 H, OH) ppm.

**13C-NMR** (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta = 14.6$  (CH<sub>3</sub>), 44.2 (CH<sub>2</sub>), 64.2 (CH<sub>2</sub>), 112.5 (4-C), 115.4 (7-C), 123.3 (8-C), 125.4 (3-C), 146.9 (5-C), 153.4 (6-C), 190.7 (2-C) ppm.

**LC-MS** (EI, 70 eV): *m/z* = 196 [M - Cl]<sup>+</sup>, 178 [M - Cl - H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>. (ber. *m/z* = 231.1 für C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>ClNO<sub>3</sub>).

**2-(3-Chlor-4-hydroxy-5-methoxyphenyl)-2-oxoethanammoniumchlorid (84)**

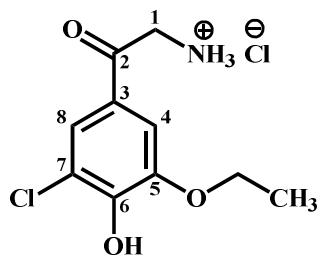
Im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert durch Schmidt.<sup>[47]</sup>

**Ausbeute:** 260 mg (1.03 mmol, 94 %).

**1H-NMR** (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 3.92$  (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.53 (s, 2 H, 1-H), 7.48 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1 H, 8-H), 7.71 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1 H, 4-H), 8.40 (br. s, 3 H,  $\text{NH}_3$ ), 10.72 (br. s, 1 H, OH) ppm.

**13C-NMR** (75.5 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 44.4$  (1-C), 56.5 ( $\text{OCH}_3$ ), 109.7 (8-C), 119.9 (7-C), 123.2 (4-C), 125.1 (3-C), 148.5 (6-C), 148.7 (5-C), 190.5 (2-C) ppm.

**LC-MS** (EI, 70 eV):  $m/z = 218, 216 [\text{M} - \text{Cl}]^+, 200, 198 [\text{M} - \text{Cl} - \text{H}_2\text{O}]^+, 163 [\text{M} - 2 \text{Cl} - \text{H}_2\text{O}]^+$ , (ber.  $m/z = 251.0$  für  $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{Cl}_2\text{NO}_3$ ).

**2-(3-Chlor-5-ethoxy-4-hydroxyphenyl)-2-oxoethanammoniumchlorid (85)**

Im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert durch Schmidt<sup>[47]</sup>

**Ausbeute:** 69 mg (0.259 mmol, 91 %).

**Schmelzpunkt:** 202 °C.

**1H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 1.38 (t, <sub>3</sub>*J* = 7.0 Hz, 3 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.18 (q, <sub>3</sub>*J* = 7.0 Hz, 2 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.52 (s, 2 H, 1-*H*), 7.47 (d, <sub>4</sub>*J* = 1.9 Hz, 1 H, 8-*H*), 7.70 (d, <sub>4</sub>*J* = 1.9 Hz, 1 H, 4-*H*), 8.43 (br. s, 3 H, NH<sub>3</sub>), 10.49 (br. s, 1 H, OH) ppm.

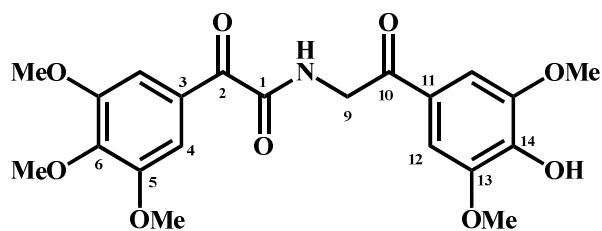
**13C-NMR** (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 14.4 (CH<sub>3</sub>), 44.4 (1-*C*), 64.9 (CH<sub>2</sub>), 110.8 (8-*C*), 120.0 (5-*C*), 123.1 (4-*C*), 125.2 (3-*C*), 147.7 (6-*C*), 148.9 (7-*C*), 190.6 (2-*C*) ppm.

**LC-MS** (EI, 70 eV): *m/z* = 232, 230 [M - Cl]<sup>+</sup>, 214, 212 [M - Cl - H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, (ber. *m/z* = 266.1 für C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>).

## 9.2.6 Synthesen der Glyoxylsäureamide

**Synthesevorschrift zur Amidkupplung des  $\alpha$ -Ketoamins mit der Glyoxylsäure:** 1.1 eq. 2-(3,4,5-Trimethoxyphenyl)glyoxylsäure (**7**) und 1.2 eq. CDI wurden in abs. DMF gelöst und 3 h bei 20 °C gerührt. Anschließend wurde das entsprechende 2-Aryl-2-oxoethanammoniumchlorid in abs. DMF gelöst und zu der aktivierten Säure zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde 15 h bei 20 °C gerührt. Anschließend wurde Eis zu der Lösung gegeben; es fiel ein Niederschlag aus. Der Niederschlag wurde abgesaugt und mit Wasser, wenig kaltem Methanol sowie Diethylether gewaschen.

### 2-(3,4,5-Trimethoxyphenyl)glyoxylsäure-*N*-2-(3,5-dimethoxy-4-hydroxyphenyl)-2-oxoethylamid (**98**)

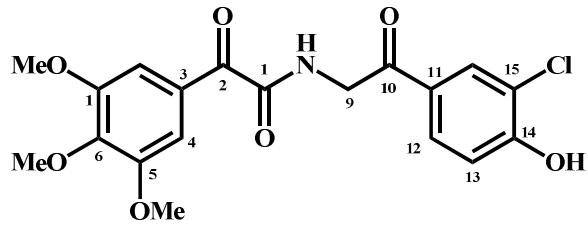


**Ausbeute:** 90 mg (0.2 mmol, 51 %).

**1H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 3.80 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 3.86 (s, 6 H, OCH<sub>3</sub>), 3.90 (s, 6 H, OCH<sub>3</sub>), 4.81 (d, <sub>3</sub>*J* = 5.85 Hz, 2 H, 9-*H*), 7.33 (s, 2 H, 12-*H*), 7.50 (s, 2 H, 4-*H*), 9.22 (t, <sub>3</sub>*J* = 5.8 Hz, 1 H, NH), 9.46 (s, 1 H, OH) ppm.

**13C-NMR** (75.5 MHz, DMSO-*d*6):  $\delta$  = 45.5 ( $\text{CH}_2$ ), 56.1 ( $\text{CH}_3$ ), 56.2 ( $\text{CH}_3$ ), 60.3 ( $\text{CH}_3$ ), 106.0 (12-*C*), 107.5 (4-*C*), 125.0 (11-*C*), 128.1 (3-*C*), 141.4 (6-*C*), 143.4 (14-*C*), 147.7 (13-*C*), 152.9 (5-*C*), 165.9 ( $\text{C}=\text{O}$ ), 189.4 ( $\text{C}=\text{O}$ ), 192.5 ( $\text{C}=\text{O}$ ) ppm.

**2-(3,4,5-Trimethoxyphenyl)glyoxylsäure-*N*-2-(3-chlor-4-hydroxyphenyl)-2-oxoethylamid (99)**



Im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert durch Schmidt.<sup>[47]</sup>

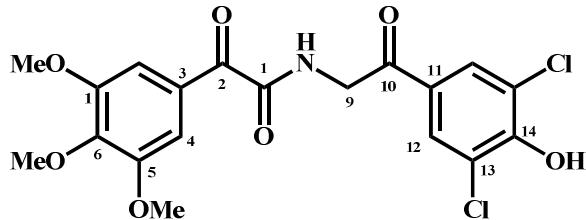
**Ausbeute:** 90 mg (0.22 mmol, 49 %).

**1H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*6):  $\delta$  = 3.80 (s, 3 H, 7-*H*), 3.90 (s, 6 H, 8-*H*), 4.76 (d,  $J$  = 5.8 Hz, 2 H, 9-*H*), 7.10 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1 H, 15-*H*), 7.50 (s, 2 H, 4-*H*), 7.89 (dd,  $J$  = 8.5 Hz,  $J$  = 2.2 Hz, 1 H, 16-*H*), 8.05 (d,  $J$  = 2.2 Hz, 1 H, 12-*H*), 9.23 (t,  $J$  = 5.8 Hz, 1 H, NH), 11.28 (br. s, 1 H, OH) ppm.

**13C-NMR** (75.5 MHz, DMSO-*d*6):  $\delta$  = 44.2 (9-*C*), 56.1 (8-*C*), 60.3 (7-*C*), 107.4 (4-*C*), 116.4 (15-*C*), 120.2 (13-*C*), 127.1 (16-*C*), 128.0 (3-*C*), 128.8 (12-*C*), 130.2 (11-*C*), 143.2 (6-*C*), 152.9 (5-*C*), 158.1 (14-*C*), 166.1 (1-*C*), 189.4 (2-*C*), 191.9 (10-*C*) ppm.

**LC-MS**  $m/z$  = 410, 408 [MH]<sup>+</sup>, (ber.  $m/z$  = 407.8 für C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>ClNO<sub>7</sub>).

**2-(3,4,5-Trimethoxyphenyl)glyoxylsäure-N-2-(3,5-dichlor-4-hydroxyphenyl)-2-oxoethyl-amid (100)**



Im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert durch Schmidt.<sup>[47]</sup>

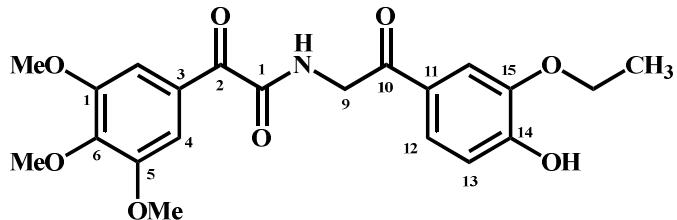
**Ausbeute:** 320 mg (0.723 mmol, 74 %).

**1H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 3.80 (s, 3 H, 7-*H*), 3.90 (s, 6 H, 8-*H*), 4.80 (d, <sub>3</sub>*J = 5.8 Hz, 2 H, 9-*H*), 7.49 (s, 2 H, 4-*H*), 8.05 (s, 2 H, 12-*H*), 9.27 (t, <sub>3</sub>*J = 5.8 Hz, 1 H, NH), 11.29 (br. s, 1 H, OH) ppm.**

**13C-NMR** (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 45.6 (9-*C*), 56.2 (8-*C*), 60.3 (7-*C*), 107.4 (4-*C*), 122.4 (12-*C*), 127.4 (11-*C*), 128.1 (3-*C*), 128.8 (12-*C*), 143.3 (6-*C*), 153.0 (5-*C*), 153.9 (14-*C*), 166.1 (1-*C*), 189.4 (2-*C*), 191.6 (10-*C*) ppm.

**LC-MS** (EI, 70 eV): *m/z* = 444, 443, 442 [MH]<sup>+</sup>, (ber. *m/z* = 442.0 für C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>7</sub>).

**2-(3,4,5-Trimethoxyphenyl)glyoxylsäure-N-2-(3-ethoxy-4-hydroxyphenyl)-2-oxoethyl-amid (101)**



Im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert durch Schmidt.<sup>[47]</sup>

**Ausbeute:** 260 mg (0.623 mmol, 72 %).

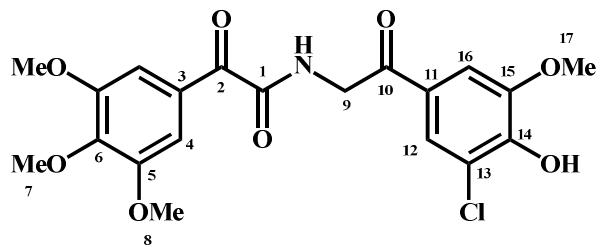
**1H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 1.36 (t, <sub>3</sub>*J = 7.0 Hz, 3 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.90 (s, 6 H, 8-*H*), 3.80 (s, 3 H, 7-*H*), 4.11 (q, <sub>3</sub>*J = 7.0 Hz, 2 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.75 (d, <sub>3</sub>*J = 5.8 Hz, 2 H, 9-*H*), 6.92***

(d,  $_3J = 8.3$  Hz, 1 H, 15-H), 7.50 (s, 2 H, 4-H), 7.52 (d,  $_4J = 2.0$  Hz, 1 H, 12-H), 7.60 (dd,  $_3J = 8.3$  Hz,  $_4J = 2.0$  Hz, 1 H, 16-H), 9.20 (t,  $_3J = 5.8$  Hz, 1 H, NH), 10.02 (br. s, 1 H, OH) ppm.

**13C-NMR** (75.5 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 14.6$  (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 45.4 (9-C), 56.2 (8-C), 60.3 (7-C), 64.1 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 107.5 (4-C), 112.6 (12-C), 115.2 (15-C), 122.9 (16-C), 126.5 (11-C), 128.1 (3-C), 143.2 (6-C), 146.8 (13-C), 152.5 (14-C), 153.0 (5-C), 166.0 (1-C), 189.4 (2-C), 192.4 (10-C) ppm.

**LC-MS** (EI, 70 eV):  $m/z = 418$  [MH]<sup>+</sup>, (ber.  $m/z = 417.4$  für C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>8</sub>).

### 2-(3,4,5-Trimethoxyphenyl)glyoxylsäure-N-2-(3-chlor-4-hydroxy-5-methoxyphenyl)-2-oxoethylamid (102)



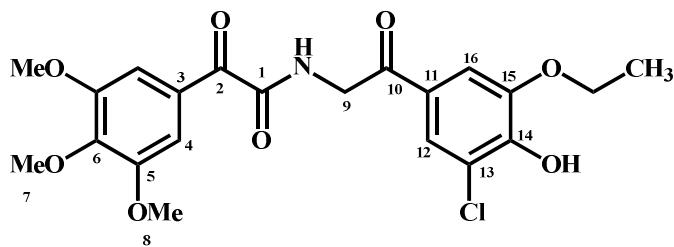
Im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert durch Schmidt.<sup>[47]</sup>

**Ausbeute:** 120 mg (0.274 mmol, 69 %).

**1H-NMR** (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 3.80$  (s, 3 H, 7-H), 3.90 (s, 6 H, 8-H), 3.93 (s, 3 H, 17-H), 4.80 (d,  $_3J = 5.8$  Hz, 2 H, 9-H), 7.49 (s, 2 H, 4-H), 7.53 (d,  $_4J = 1.9$  Hz, 1 H, 16-H), 7.74 (d,  $_4J = 1.9$  Hz, 1 H, 12-H), 9.25 (t,  $_3J = 5.8$  Hz, 1 H, NH), 10.54 (br. s, 1 H, OH) ppm.

**13C-NMR** (75.5 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 45.5$  (9-C), 60.3 (7-C), 56.4 (17-C), 56.2 (8-C), 107.5 (4-C), 109.8 (16-C), 119.9 (13-C), 122.7 (12-C), 126.2 (11-C), 128.1 (3-C), 143.2 (6-C), 148.1 (14-C), 148.5 (15-C), 153.0 (5-C), 166.0 (1-C), 189.4 (2-C), 192.1 (10-C) ppm.

**2-(3,4,5-Trimethoxyphenyl)glyoxylsäure-N-2-(3-chlor-5-ethoxy-4-hydroxyphenyl)-2-oxoethylamid (103)**



Im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert durch Schmidt.<sup>[47]</sup>

**Ausbeute:** 260 mg (0.623 mmol, 72 %).

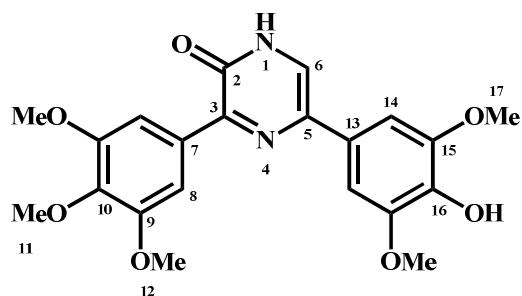
**1H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 1.39 (t, <sub>3</sub>J = 7.0 Hz, 3 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.80 (s, 3 H, 7-H), 3.89 (s, 6 H, 8-H), 4.19 (q, <sub>3</sub>J = 7.0 Hz, 2 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.78 (d, <sub>3</sub>J = 5.8 Hz, 2 H, 9-H), 7.48 (s, 2 H, 4-H), 7.51 (d, <sub>4</sub>J = 1.8 Hz, 1 H, 16-H), 7.72 (d, <sub>4</sub>J = 1.8 Hz, 1 H, 12-H), 9.25 (t, <sub>3</sub>J = 5.6 Hz, 1 H, NH), 10.32 (br. s, 1 H, OH) ppm.

**13C-NMR** (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 14.4 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 45.5 (9-C), 56.2 (8-C), 60.3 (7-C), 64.9 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 107.4 (4-C), 110.9 (16-C), 120.0 (13-C), 122.6 (12-C), 126.3 (11-C), 128.1 (3-C), 143.2 (6-C), 147.6 (14-C), 148.2 (15-C), 152.9 (5-C), 166.0 (1-C), 189.4 (2-C), 192.1 (10-C) ppm.

**LC-MS** (EI, 70 eV): *m/z* = 452, 454 [MH]<sup>+</sup>, (ber. *m/z* = 451.8 für C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>ClNO<sub>8</sub>).

### 9.2.7 Synthesen der (1*H*)-pyrazin-2-one

**Synthesevorschrift zum Ringschluss des Glyoxylsäureamids:** 1 eq. des Glyoxylsäureamids und 10 eq. Ammoniumacetat wurden in 3 mL Eisessig gelöst und 8 min bei 130 °C in der Mikrowelle umgesetzt. Das Reaktionsgemisch färbte sich goldgelb. Anschließend wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und der Rückstand in EA aufgenommen. Es wurde zweimal mit ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen und das Lösungsmittel erneut i. Vak entfernt. Der Rückstand wurde aus EA umkristallisiert.

**5-(3,5-Dimethoxy-4-hydroxyphenyl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-(1*H*)-pyrazin-2-on (27)**

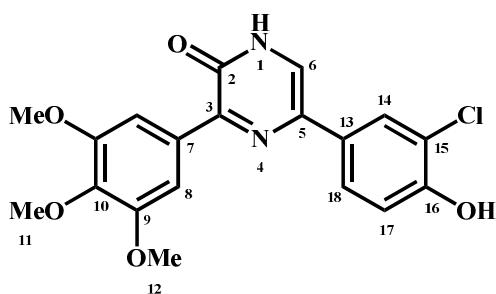
**Ausbeute:** 15 mg (0.04 mmol, 20 %).

**1H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 3.74 (s, 3 H, 11-*H*), 3.85 (s, 6 H, 12-*H*), 3.86 (s, 6 H, 17-*H*), 7.28 (s, 2 H, 14-*H*), 8.00 (s, 2 H, 8-*H*), 8.04 (s, 1 H, NH), 8.44 (s, 1 H, 6-*H*), 12.68 (br. s, 1 H, OH) ppm.

**13C-NMR** (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 55.7 (12-*C*), 55.8 (17-*C*), 60.1 (11-*C*), 102.1 (14-*C*), 105.9 (8-*C*), 126 (5-*C*), 131.5 (6-*C*), 135 (q-*C*), 139.1 (10-*C*), 142.3 (16-*C*), 148.2 (15-*C*), 152.2 (9-*C*), 154.6 (2-*C*) ppm.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 2916, 2848, 1716, 1697, 1683, 1653, 1647, 1506, 1489, 1471, 1456, 1417, 1338, 1217, 1124, 1114, 997, 858

**LC-MS** (EI, 70 eV): *m/z* = 415 [MH]<sup>+</sup>, (ber. *m/z* = 414 für C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>).

**5-(3-Chlor-4-hydroxyphenyl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-(1*H*)-pyrazin-2-on (33)**

Im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert durch Schmidt.<sup>[47]</sup>

**Ausbeute:** 47 mg (0.07 mmol, 31 %).

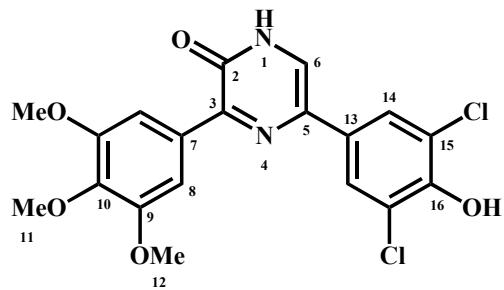
**Schmelzpunkt:** 265 °C.

**1H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 3.74 (s, 3 H, 11-*H*), 3.85 (s, 6 H, 12-*H*), 7.04 (d, <sub>3</sub>*J = 8.5 Hz, 1 H, 17-*H*), 7.77 (dd, <sub>3</sub>*J = 8.5 Hz, <sub>4</sub>*J = 2.2 Hz, 1 H, 18-*H*), 7.87 (s, 2 H, 8-*H*), 7.93 (d, <sub>4</sub>*J = 2.2 Hz, 1 H, 14-*H*), 7.95 (s, 1 H, 6-*H*), 10.28 (s, 1 H, NH), 12.68 (br. s, 1 H, OH) ppm.****

**13C-NMR** (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 55.9 (12-C), 60.1 (11-C), 106.3 (8-C), 116.9 (17-C), 120.1 (15-C), 122.6 (6-C), 124.5 (18-C), 126.0 (14-C), 128.4 (7-C), 130.7 (q-C), 131.5 (13-C), 139.3 (10-C), 148.5 (q-C), 152.3 (9-C), 152.6 (16-C), 154.6 (2-C) ppm.

**LC-MS** (EI, 70 eV): *m/z* = 391, 389 [MH]<sup>+</sup>, (ber. *m/z* = 388.8 für C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>).

### 5-(3,5-Dichlor-4-hydroxyphenyl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-(1*H*)-pyrazin-2-on (37)



Im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert durch Schmidt.<sup>[47]</sup>

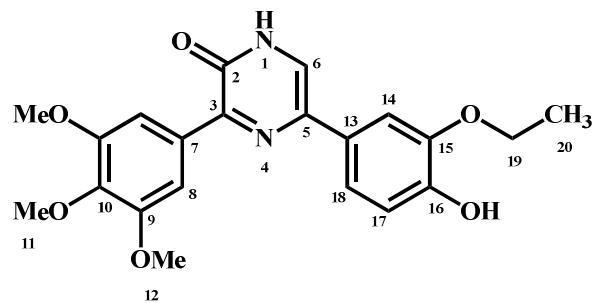
**Ausbeute:** 66 mg (0.16 mmol, 46 %).

**Schmelzpunkt:** 279 °C.

**1H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 3.74 (s, 3 H, 11-*H*), 3.85 (s, 6 H, 12-*H*), 7.84 (s, 2 H, 14-*H*), 7.96 (s, 2 H, 8-*H*), 8.08 (s, 1 H, 6-*H*), 10.22 (br. s, 1 H, NH), 12.76 (br. s, 1 H, OH) ppm.

**13C-NMR** (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 55.9 (12-C), 60.1 (11-C), 106.3 (8-C), 122.8 (15-C), 123.5 (6-C), 124.6 (14-C), 129.0 (q-C), 129.3 (7-C), 131.3 (13-C), 139.4 (10-C), 142.3 (16-C), 148.8 (q-C), 148.3 (17-C), 152.3 (9-C), 154.7 (2-C) ppm.

**LC-MS** (EI, 70 eV): *m/z* = 425, 424, 423 [MH]<sup>+</sup>, (ber. *m/z* = 423.2 für C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>).

**5-(3-Ethoxy-4-hydroxyphenyl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-(1*H*)-pyrazin-2-on (44)**

Im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert durch Schmidt.<sup>[47]</sup>

**Ausbeute:** 93 mg (0.23 mmol, 65 %).

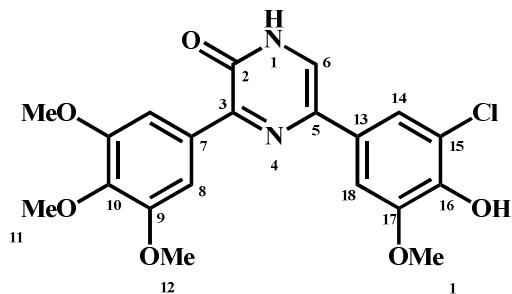
**Schmelzpunkt:** 218 °C.

**1H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 1.36 (t, <sub>3</sub>J = 7.0 Hz, 2 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.74 (s, 3 H, 11-H), 3.85 (s, 6 H, 12-H), 4.13 (q, <sub>3</sub>J = 7.0 Hz, 2 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 6.85 (d, <sub>3</sub>J = 8.2 Hz, 1 H, 17-H), 7.38 (dd, <sub>3</sub>J = 8.2 Hz, <sub>4</sub>J = 2.0 Hz, 1 H, 18-H), 7.55 (d, <sub>4</sub>J = 2.0 Hz, 1 H, 14-H), 7.91 (s, 1 H, NH), 7.94 (s, 2 H, 8-H), 9.0 (s, 1 H, 6-H), 12.63 (br. s, 1 H, OH) ppm.

**13C-NMR** (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 14.8 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 55.9 (12-C), 60.1 (11-C), 63.7 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 106.1 (8-C), 110.0 (14-C), 115.8 (17-C), 117.3 (18-C), 122.0 (6-C), 127.4 (7-C), 131.6 (13-C), 132.1 (q-C), 139.1 (10-C), 146.8 (15-C), 147.0 (16-C), 147.9 (q-C), 152.3 (9-C), 154.6 (2-C) ppm.

**LC-MS** (EI, 70 eV): *m/z* = 399 [MH]<sup>+</sup>. (ber. *m/z* = 398.4 für C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>).

**5-(3-Chlor-4-hydroxy-5-methoxyphenyl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-(1*H*)-pyrazin-2-on  
(48)**



Im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert durch Schmidt.<sup>[47]</sup>

**Ausbeute:** 54 mg (0.13 mmol, 57 %).

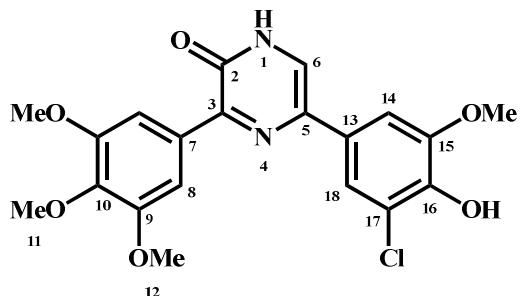
**Schmelzpunkt:** 213 °C

**1H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 3.74 (s, 3 H, 11-*H*), 3.85 (s, 6 H, 12-*H*), 3.92 (s, 3 H, 19-*H*), 7.57 (s, 2 H, 14-*H*, 18-*H*), 7.93 (s, 2 H, 8-*H*), 8.06 (s, 1 H, NH), 9.50 (s, 1 H, 6-*H*), 12.73 (br. s, 1 H, OH) ppm.

**13C-NMR** (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 55.8 (12-*C*), 56.1 (19-*C*), 60.1 (11-*C*), 106.1 (8-*C*), 107.0 (18-*C*), 117.5 (14-*C*), 120.4 (15-*C*), 122.6 (6-*C*), 127.7 (7-*C*), 130.5 (q-*C*), 131.4 (13-*C*), 139.2 (10-*C*), 142.3 (16-*C*), 148.2 (q-*C*), 149.0 (17-*C*), 152.3 (9-*C*), 154.7 (2-*C*) ppm.

**LC-MS** (EI, 70 eV): *m/z* = 421, 419 [MH]<sup>+</sup>, (ber. *m/z* = 418.8 für C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>6</sub>).

**5-(3-Chlor-5-ethoxy-4-hydroxyphenyl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-(1*H*)-pyrazin-2-on  
(49)**



Im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert durch Schmidt.<sup>[47]</sup>

**Ausbeute:** gelbgrüner Feststoff, 19 mg (0.04 mmol, 42 %).

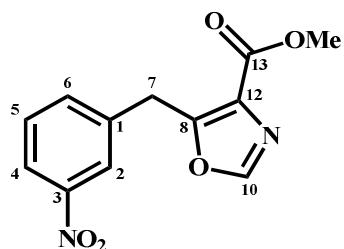
**Schmelzpunkt:** 229 °C

**1H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 1.39 (q, <sub>3</sub>J = 7.0 Hz, 3 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.74 (s, 3 H, 11-H), 3.85 (s, 6 H, 12-H), 4.19 (q, <sub>3</sub>J = 7.0 Hz, 2 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 7.56 (s, 2 H, 14-H, 18-H), 7.92 (s, 2 H, 8-H), 8.05 (s, 1 H, NH), 9.30 (s, 1 H, 6-H), 12.71 (br. s, 1 H, OH) ppm.

**13C-NMR** (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 14.6 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 55.7 (12-C), 60.1 (11-C), 64.4 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 106.1 (8-C), 108.1 (18-C), 117.5 (14-C), 120.4 (15-C), 127.7 (7-C), 131.4 (13-C), 139.2 (10-C), 142.5 (16-C), 148.1 (17-C), 152.3 (9-C), 154.7 (2-C) ppm.

**LC-MS** (EI, 70 eV): *m/z* = 435, 433 [MH]<sup>+</sup>, (ber. *m/z* = 432.8 für C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>6</sub>).

### 9.2.8 Synthese des Methyl-5-(2-nitrobenzyl)-1,3-oxazol-4-carboxylats (73)



**Synthesevorschrift zur Darstellung des Oxazols, ausgehend von einer Phenylessigsäure:**  
 600 mg (3.31 mmol, 1 eq.) 3-Nitrophénylessigsäure und 591 mg (3.64 mmol, 1.1 eq.) CDI wurden in 15 mL abs. THF gelöst und solange bei 20 °C gerührt, bis keine Gasentwicklung mehr beobachtbar war. Danach wurde weitere 2 h bei 50 °C gerührt. Die Lsg. verfärbte sich gelb. Das Reaktionsgemisch wurde langsam zu einer Lsg. aus 331 µL (3.64 mmol, 1.1 eq.) Isocyanoessigsäuremethylester und 550 µL (3.64 mmol, 1.1 eq.) DBU in 10 mL abs. THF zugetropft. Es wurde 15 h bei 20 °C gerührt. Die Lösung verfärbte sich dunkelbraun. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde in EA aufgenommen und dreimal mit ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die org. Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt.

**Ausbeute:** 448 mg (1.71 mmol, 52 %)

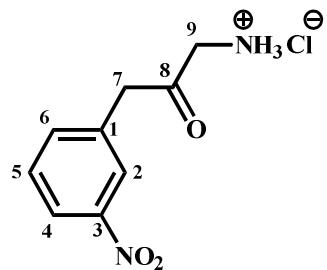
**1H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 3.84 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 4.57 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 7.63 (td, <sub>3</sub>J = 7.8 Hz, <sub>4</sub>J = 0.7 Hz, 1 H, 5-H), 7.72 (m, 1 H, 6-H), 8.11-8.16 (m, 2 H, 2,4-H), 8.42 (s, 1 H, 10-H) ppm.

**13C-NMR** (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 30.6 (CH<sub>2</sub>), 51.8 (CH<sub>3</sub>), 122.0 (4-C), 123.3 (2-C), 126.8 (12-C), 130.2 (5-C), 135.4 (6-C), 138.3 (5-C), 147.9 (3-C), 151.3 (10-C), 156.2 (8-C), 161.8 (13-C) ppm.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3233, 1715, 1615, 1526, 1445, 1362, 1344, 1333, 1284, 1205, 1161, 1086, 1052, 932, 848, 815, 804, 791, 721

**LC-MS** (EI, 70 eV): *m/z* = 263,0 [MH]<sup>+</sup>, (ber. *m/z* = 262.2 für C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>).

### 9.2.9 Synthese des 1-Amino-3-(3-nitrophenyl)propan-2-on-Hydrochlorids (14)



**Synthesevorschrift zur Spaltung des Oxazols 73 zum  $\alpha$ -Ketoamin:** 820 mg (2.31 mmol, 1 eq.) des Oxazols wurde in einer Lsg. aus MeOH/HCl (1:1) gelöst und 4 h unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand wurde mit Aceton versetzt. Die Suspension wurde filtriert und der Niederschlag wurde mit  $\text{Et}_2\text{O}$  gewaschen.

**Ausbeute:** 543 mg (2.34 mmol, 75 %)

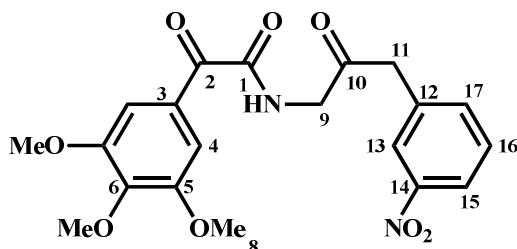
**1H-NMR** (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 4.07$  (d,  ${}_4J = 4.95$  Hz, 2 H, 9-H), 4.14 (s, 2 H, 7-H), 7.62-7.71 (m, 2 H, 5,6-H), 8.13-8.17 (m, 2 H, 2,4-H), 8.41 (bs, 3 H,  $\text{NH}_3$ ) ppm.

**13C-NMR** (75.5 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 44.8$  (7-CH<sub>2</sub>), 46.8 (9-CH<sub>2</sub>), 121.8 (4-C), 124.5 (2-C), 129.7 (5-C), 135.8 (1-C), 136.8 (6-C), 147.6 (3-C), 201.0 (8-C) ppm.

**IR** ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2855, 1729, 1526, 1481, 1335, 1316, 1109, 1014, 864, 796, 741, 703.

**LC-MS** (EI, 70 eV):  $m/z$  195 [MH]<sup>+</sup>, (ber.  $m/z = 195.2$  für C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>).

### 9.2.10 Synthese des *N*-[3-(3-Nitrophenyl)-2-oxopropyl]-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-2-oxoacetamids (15)



7

**Synthesevorschrift zur Amidkupplung des  $\alpha$ -Ketoamins mit der Glyoxylsäure:** 400 mg (1.73 mmol, 1.1 eq.) 2-(3,4,5-Trimethoxyphenyl)glyoxylsäure (**7**) und 337 mg (2.08 mmol, 1.2 eq.) CDI wurden in 15 mL abs. NMP gelöst und 3 h bei 20 °C gerührt. Anschließend wurde das entsprechende  $\alpha$ -Ketoamin in 5 mL abs. NMP gelöst und zu der aktivierten Säure zugeropft. Das Reaktionsgemisch wurde 15 h bei 20 °C gerührt. Anschließend wurde Eis zu der Lösung zugegeben; es fiel ein Niederschlag aus. Der Niederschlag wurde abgesaugt und mit Wasser, wenig kaltem Methanol sowie Et<sub>2</sub>O gewaschen.

**Ausbeute:** 500 mg (1.20 mmol, 69 %)

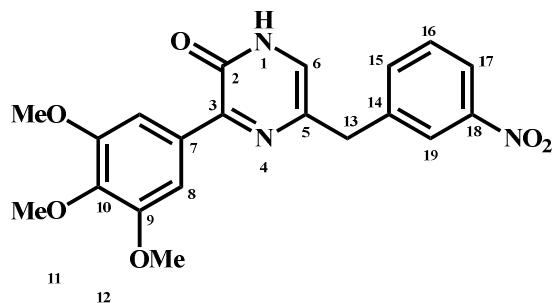
**1H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 3.78 (s, 3 H, 7-CH<sub>3</sub>), 3.84 (s, 6 H, 8-CH<sub>3</sub>), 4.12 (s, 2 H, 11-CH<sub>2</sub>), 4.34 (d, <sub>3</sub>J = 5.82 Hz, 2 H, 9-CH<sub>2</sub>), 7.41 (s, 2 H, 4-H), 7.64 (td, <sub>3</sub>J = 7.58 Hz, <sub>4</sub>J = 0.88 Hz, 1 H, 16-H), 7.70 (dt, <sub>3</sub>J = 7.61 Hz, <sub>4</sub>J = 1.5 Hz, 1 H, 17-H), 8.12-8.16 (m, 2 H, 13,15-H), 9.21 (t, <sub>3</sub>J = 5.76 Hz, 1 H, NH) ppm.

**13C-NMR** (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 45.3 (11-CH<sub>2</sub>), 48.7 (9-CH<sub>2</sub>), 56.5 (8-CH<sub>3</sub>), 60.8 (7-CH<sub>3</sub>), 107.9 (4-C), 122.2 (15-C), 124.9 (13-C), 128.4 (3-C), 130.1 (16-C), 137.0 (12-C), 137.2 (17-C), 143.7 (-C), 148.1 (14-C), 153.4 (5-C), 166.2 (1-C), 189.5 (2-C), 203.1 (10-C) ppm.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3286, 3078, 1727, 1664, 1632, 1578, 1535, 1603, 1457, 1415, 1349, 1234, 1167, 1131, 992, 859, 808, 765, 703.

**LC-MS** (EI, 70 eV): *m/z* 417.2 [MH]<sup>+</sup>, (ber. *m/z* = 416.4 für C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>).

### 9.2.11 Synthese von 5-(3-Nitrobenzyl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)pyrazin-2(1H)-on (16)



**Synthesevorschrift zum Ringschluss des Glyoxylsäureamids 15:** 244 mg (0.59 mmol, 1 eq.) des Glyoxylsäureamids **15** und 452 mg (5.86 mmol, 10 eq.) Ammoniumacetat wurden in 3 mL Eisessig gelöst und 20 min bei 90 °C in der Mikrowelle umgesetzt. Das Reaktionsgemisch färbte sich braun. Anschließend wurde Wasser zugegeben. Es bildete sich ein brauner Niederschlag; er wurde filtriert und mit Et<sub>2</sub>O gewaschen. Ein hellbrauner Feststoff wurde erhalten.

**Ausbeute:** 200 mg (0.503 mmol, 86 %)

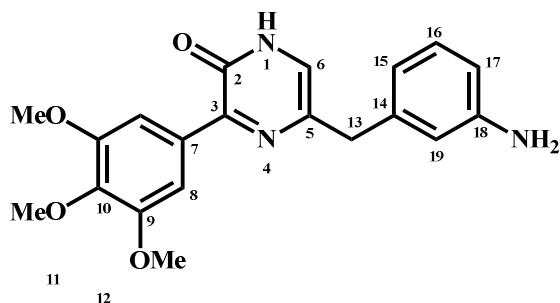
**1H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 3.70 (s, 3 H, 11-CH<sub>3</sub>), 3.79 (s, 6 H, 12-CH<sub>3</sub>), 4.04 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 7.44 (s, 1 H, 6-*H*), 7.61 (t, <sub>3</sub>J = 7.92 Hz, 1 H, 16-*H*), 7.76 (s, 2 H, 8-*H*), 7.83 (d, <sub>3</sub>J = 7.68 Hz, 1 H, 15-*H*), 8.07 (m, 1 H, 17-*H*), 8.27 (m, 1 H, 19-*H*), 12.35 (s, 1 H, NH) ppm.

**13C-NMR** (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 37.9 (13-C), 55.6 (12-C), 60.0 (11-C), 105.9 (8-C), 121.2 (17-C), 123.4 (19-C), 124.4 (6-C), 129.7 (16-C), 131.2 (7-C), 132.6 (5-C), 135.8 (15-C), 139.1 (10-C), 142.2 (18-C), 147.7 (14-C), 149.0 (3-C), 152.1 (9-C), 154.4 (2-C) ppm.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 2837, 1639, 1610, 1584, 1518, 1456, 1414, 1351, 1338, 1325, 1236, 1225, 1128, 995, 862, 765, 702.

**LC-MS** (EI, 70 eV): *m/z* = 398.1 [MH]<sup>+</sup>, (ber. *m/z* = 397.4 für C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>).

### 9.2.12 Synthese von 5-(3-Aminobenzyl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)pyrazin-2(1H)-on (11)



**Synthesevorschrift zur Reduktion der Nitrogruppe:** 80 mg (0.20 mmol) der Nitroverbindung **16**, 100 µL (0.101 mmol, 5 eq.) Cyclohexen, 1 Spatel Pd/C 10 % und 5 mL MeOH wurden in einem (5 mL) Druckbehälter in der Mikrowelle (CEM Discover) 10 min bei 85 °C (max. 100 W) erhitzt. Nach dem Abkühlen auf 20 °C wurde der Ansatz filtriert und i. Vak. eingeengt. Es wurde aus MeOH umkristallisiert. Es bildeten sich gelbe Kristalle, die mit Et<sub>2</sub>O gewaschen wurden.

**Ausbeute:** 48 mg (0.13 mmol, 65 %)

**1H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 3.70 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 3.72 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 3.79 (s, 6 H, OCH<sub>3</sub>), 4.95 (bs, 2 H, NH<sub>2</sub>), 6.37-6.41 (m, 1 H, 17-H), 6.45-6.48 (m, 2 H, 15,19-H), 6.93 (t, <sub>3</sub>J = 7.56 Hz, 1 H, 16-H), 7.24 (s, 1 H, 6-H), 7.77 (s, 2 H, 8-H), 12.28 (bs, 1 H, NH) ppm.

**13C-NMR** (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 39.2 (CH<sub>2</sub>), 55.8 (OCH<sub>3</sub>), 60.1 (OCH<sub>3</sub>), 106.0 (8-C), 111.8 (17-C), 114.3 (19-C), 116.4 (15-C), 124.9 (6-C), 128.7 (16-C), 131.4 (5-C), 134.5 (18-C), 139.0 (10-C), 140.3 (3-C), 148.6 (14-C), 152.2 (9-C), 154.5 (2-C) ppm.

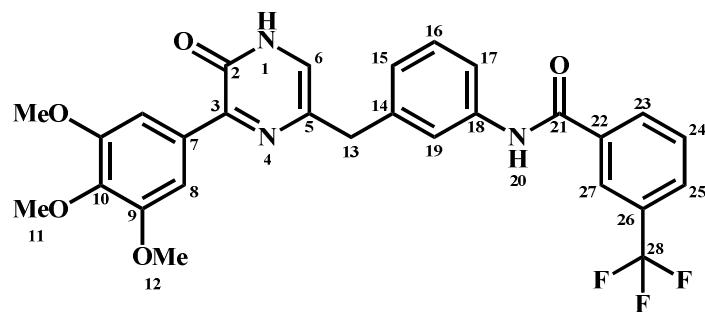
**IR** (cm<sup>-1</sup>): 2934, 2836, 1641, 1584, 1518, 1504, 1456, 1414, 1350, 1338, 1223, 1126, 995, 862, 702, 522.

**LC-MS** (EI, 70 eV): *m/z* = 368.3 [MH]<sup>+</sup>, (ber. *m/z* = 367.4 für C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>).

### 9.2.13 Amidkupplung

**Synthesevorschrift zur Amidkupplung des Building Blocks 11 mit unterschiedlich substituierten Benzoesäuren:** 1.1 eq. der Benzoesäure und 1.2 eq. CDI wurden in abs. DMF gelöst und 3 h bei 20 °C gerührt. Anschließend wurde das 3-Aminobenzol **11** in abs. DMF gelöst und zu der aktivierte Säure zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde 15 h bei 20 °C gerührt. Anschließend wurde Wasser zu der Lösung zugegeben und dreimal mit EA extrahiert. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt.

**N-[3-[(3,4,5-Trimethoxyphenyl)pyrazin-2(1H)-on-5-yl)methyl]phenyl]-3-(trifluormethyl)benzamid (50)**



**Ausbeute:** 48 mg (0.13 mmol, 65 %)

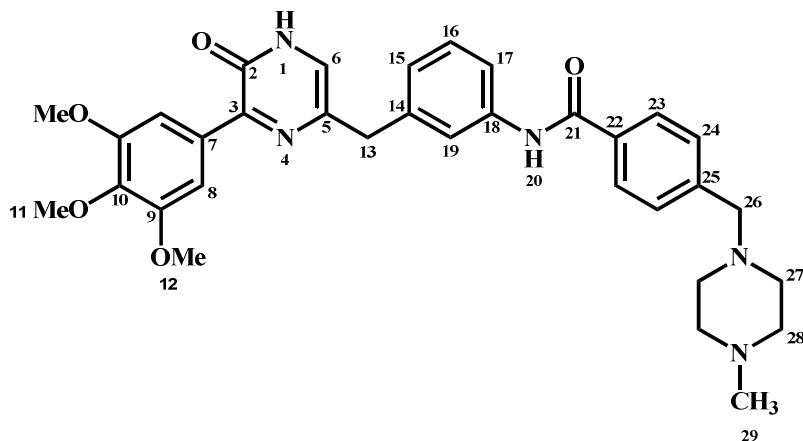
**1H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 3.70 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 3.77 (s, 6 H, OCH<sub>3</sub>), 3.79 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 7.14 (d, <sub>3</sub>J = 7.77 Hz, 1 H, 15-H), 7.31 (t, <sub>3</sub>J = 7.85 Hz, 1 H, 16-H), 7.36 (s, 1 H, 6-H), 7.61 (d, <sub>3</sub>J = 8.10 Hz, 1 H, 17-H), 7.75-7.80 (m, 2 H, 19,24-H), 7.77 (s, 2 H, 8-H), 7.96 (d, <sub>3</sub>J = 8.01 Hz, 1 H, 25-H), 8.24 (d, <sub>3</sub>J = 8.01 Hz, 1 H, 23-H), 8.28 (s, 1 H, 27-H), 10.43 (s, 1 H, NH), 12.33 (br. s, 1 H, NH) ppm.

**13C-NMR** (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 38.9 (CH<sub>2</sub>), 55.7 (OCH<sub>3</sub>), 60.0 (OCH<sub>3</sub>), 106.0 (8-C), 118.5 (17-C), 121.0 (19-C), 123.9 (q, <sub>1</sub>J<sub>CF</sub> = 273.2 Hz, 28-C), 124.1 (6-C), 124.2 (27-C), 124.7 (15-C), 128.1 (25-C), 128.6 (16-C), 129.1 (q, <sub>2</sub>J<sub>CF</sub> = 31.9 Hz, 26-C), 129.7 (24-C), 131.4 (7-C), 131.8 (23-C), 133.9 (14-C), 135.7 (5-C), 138.8 (22-C), 139.0 (10-C), 140.5 (18-C), 149.0 (3-C), 152.1 (9-C), 154.5 (2-C), 163.9 (21-C) ppm.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 1670, 1634, 1603, 1578, 1521, 1506, 1489, 1472, 1456, 1413, 1338, 1325, 1201, 1188, 1169, 1109, 1072, 1007. 866

**HRMS** (EI, 70 eV):  $m/z = 539.1656$  [MH]<sup>+</sup>, (ber.  $m/z = 539.1668$  für C<sub>28</sub>H<sub>24</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>).

**4-((4-Methylpiperazin-1-yl)methyl)-N-{3-[(3,4,5-trimethoxyphenyl)pyrazin-2(1H)-on-5-yl)methyl]phenyl}benzamid (2)**



**Synthesevorschrift zur Amidkupplung des Building Block 11 mit der Benzoësäure 105:**

1.5 eq. der Benzoësäure **105**, 1 eq. *Building Block 11* und 1.6 eq. HATU wurden in abs. DMF gelöst und 30 min bei 20 °C gerührt. Anschließend wurden 5 eq. DIPEA zugetropft und 30 min bei 90 °C in der MW bei max. 100 Watt gerührt. Zu dem Reaktionsgemisch wurden 50 mL einer 1 M NaOH-Lsg. gegeben und dreimal mit EA extrahiert. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt.

**Ausbeute:** 88 mg (0.15 mmol, 43 %)

**1H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 2.15 (s, 3 H, 29-CH<sub>3</sub>), 2.25-2.42 (m, 8 H, 27,28-CH<sub>2</sub>), 3.52 (s, 2 H, 26-CH<sub>2</sub>), 3.69 (s, 3 H, 11-CH<sub>3</sub>), 3.77 (s, 6 H, 12-CH<sub>3</sub>), 3.89 (s, 2 H, 13-CH<sub>2</sub>) 7.09 (d, <sub>3</sub>J = 7.62 Hz, 1 H, 15-*H*), 7.28 (t, <sub>3</sub>J = 7.85 Hz, 1 H, 16-*H*), 7.35 (s, 1 H, 6-*H*), 7.43 (d, <sub>3</sub>J = 8.37 Hz, 1 H, 24-*H*), 7.58 (d, 1 H, <sub>3</sub>J = 9.18 Hz, 17-*H*), 7.77 (s, 2 H, 8-*H*), 7.80 (s, 1 H, 19-*H*), 7.88 (d, <sub>3</sub>J = 8.31 Hz, 2 H, 23-*H*), 10.15 (s, 1 H, NH), 12.34 (br. s, 1 H, NH) ppm.

**13C-NMR** (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 38.9 (13-CH<sub>2</sub>), 45.7 (29-CH<sub>3</sub>), 52.6 (27-CH<sub>2</sub>), 54.7 (28-CH<sub>2</sub>), 55.7 (12-OCH<sub>3</sub>), 60.1 (11-OCH<sub>3</sub>), 61.6 (26-CH<sub>2</sub>), 106.0 (8-C), 118.2 (17-C), 120.8 (19-C), 124.1 (6-C), 124.3 (15-C), 127.5 (23-C), 128.5 (16-C), 128.6 (24-C), 131.4 (26-C), 133.6 (22-C), 134.0 (5-C), 139.0 (10-C), 139.2 (18-C), 140.4 (14-C), 142.2 (25-C), 149.0 (3-C), 152.1 (9-C), 154.5 (2-C), 165.3 (21-C) ppm.

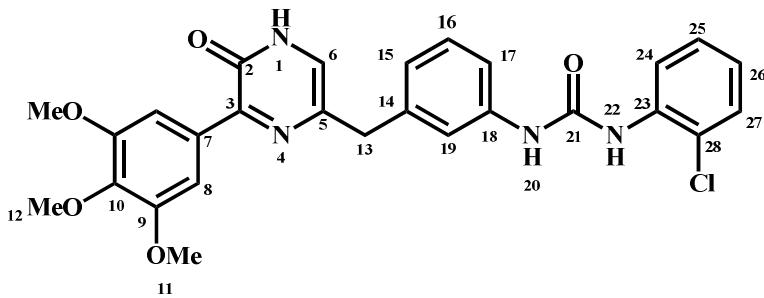
**IR** ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2836, 1641, 1583, 1517, 1504, 1456, 1414, 1350, 1339, 1223, 1126, 995, 862, 702, 522.

**LC-MS** (EI, 70 eV):  $m/z$  584.4 [ $\text{MH}^+$ ], (ber.  $m/z = 583.3$  für  $\text{C}_{33}\text{H}_{37}\text{N}_5\text{O}_5$ ).

### 9.2.14 Darstellung der Harnstoffderivate

**Synthesevorschrift zur Darstellung der Harnstoffderivate durch Umsetzung des *Building Blocks* 11 mit Isocyanaten:** 1.1 eq. des Isocyanats, 1 eq. *Building Block* 11 und 1.6 eq. DIPEA wurden in abs. DMF gelöst und 16 h bei RT gerührt. Zu dem Reaktionsgemisch wurden 50 mL Wasser zugegeben und 3-mal mit EA extrahiert. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt.

### 1-(2-chlorophenyl)-3-((5-oxo-6-(3,4,5-trimethoxycyclohexa-1,3-dien-1-yl)-4,5-dihdropyrazin-2-yl)methyl)phenyl)urea (60)



**Ausbeute:** 30 mg (0.06 mmol, 30 %)

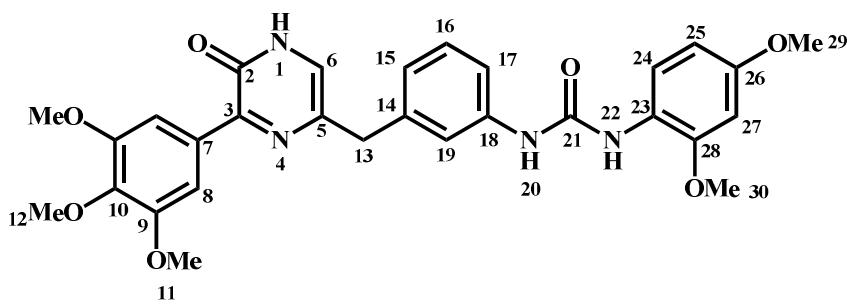
**1H-NMR** (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 3.70$  (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.78 (s, 6 H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.87 (s, 2 H,  $\text{CH}_2$ ), 6.98-7.05 (m, 2 H, 15,17- $H$ ), 7.26-7.34 (m, 4 H, 6,17,25- $H$ ), 7.45 (dd,  $_3J = 7.97$  Hz,  $_4J = 1.30$  Hz, 1 H, 26- $H$ ), 7.52 (s, 1 H, 19- $H$ ), 7.79 (s, 2 H, 8- $H$ ), 8.14 (dd,  $_3J = 8.27$  Hz,  $_4J = 1.22$  Hz, 1 H, 25- $H$ ), 8.26 (s, 1 H, 27- $H$ ), 9.38 (s, 1 H, NH), 12.33 (bs, 1 H, NH) ppm.

**13C-NMR** (75.5 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 38.9$  ( $\text{CH}_2$ ), 55.7 ( $\text{OCH}_3$ ), 60.1 ( $\text{OCH}_3$ ), 106.0 (8-C), 116.1 (17-C), 118.6 (19-C), 121.2 (24-C), 121.8 (28-C), 122.8 (15-C), 123.2 (26-C), 124.1 (6-H) 127.5 (25-C), 128.8 (16-C), 129.2 (27-C), 131.4 (7-C), 135.9 (10-C), 139.0 (q-C), 139.4 (q-C), 140.7 (14-C), 152.0 (21-C), 152.1 (9-C), 154.5 (2-C) ppm.

**IR** ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2940, 1647, 1558, 1539, 1506, 1497, 1489, 1472, 1457, 1436, 1339, 1298, 1123, 1033, 999, 748

**LC-MS** (EI, 70 eV):  $m/z = 523 [\text{MH}]^+$ , (ber.  $m/z = 522.5$  für  $\text{C}_{27}\text{H}_{27}\text{ClN}_4\text{O}_5$ ).

**1-(2,4-dimethoxyphenyl)-3-((5-oxo-6-(3,4,5-trimethoxycyclohexa-1,3-dien-1-yl)-4,5-dihdropyrazin-2-yl)methyl)phenyl)urea (62)**



**Ausbeute:** 35 mg (0.06 mmol, 34 %)

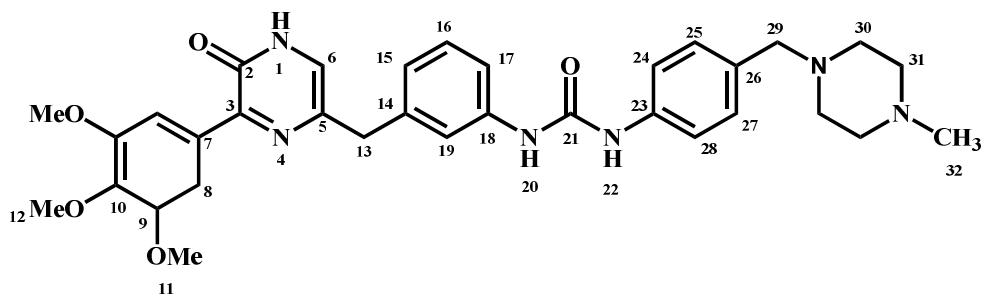
**1H-NMR** (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta = 3.71$  (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.73 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.79 (s, 6 H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.85 (s, 3 ,  $\text{OCH}_3$ ), 3.86 (s, 2 H,  $\text{CH}_2$ ), 6.47 (dd,  $_3J = 8.88$  Hz,  $_4J = 2.68$  Hz, 1 H, 25-H) 6.61 (d,  $_4J = 2.70$  Hz, 1 h, 27-H), 6.93 (d,  $_3J = 7.10$  Hz, 1 H, 15-H), 7.17-7.23 (m, 2 H, 16,17-H), 7.33 (s, 1 H, 6-H), 7.50 (s, 1 H, 19-H), 7.79 (s, 2 H, 8-H), 7.91 (d,  $_3J = 8.80$  Hz, 1 H, 24-H), 7.96 (s, 1 H, NH), 9.16 (s, 1 H, NH), 12.34 (bs, 1 H, NH) ppm.

**13C-NMR** (75.5 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta = 39.4$  ( $\text{CH}_2$ ), 55.7 ( $\text{OCH}_3$ ), 56.2 ( $\text{OCH}_3$ ), 56.3 ( $\text{OCH}_3$ ), 60.5 ( $\text{OCH}_3$ ), 99.2 (27-C), 104.6 (25-C), 106.5 (8-C), 116.2 (17-C), 118.8 (19-C), 120.1 (24-C), 122.2 (23-C), 122.7 (15-C), 123.9 (6-C), 129.2 (16-C), 131.9 (7-C), 134.3 (3-C), 139.5 (10-C), 140.5 (q-C), 141.0 (q-C), 149.6 (3-C), 152.6 (9-C), 153.0 (21-C), 155.0 (2-C), 155.4 (26-C) ppm.

**IR** ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2920, 1647, 1636, 1558, 1541, 1506, 1497, 1489, 472, 1456, 1437, 1339, 1207, 1157, 1126, 1036, 862, 831, 785, 701

**LC-MS** (EI, 70 eV):  $m/z = 547 [\text{MH}]^+$ , (ber.  $m/z = 546.5$  für  $\text{C}_{29}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_7$ ).

**1-(4-((4-Methylpiperazin-1-yl)methyl)phenyl)-3-((5-oxo-6-(3,4,5-trimethoxycyclohexa-1,3-dien-1-yl)-4,5-dihydropyrazin-2-yl)methyl)phenyl)harnstoff (66)**



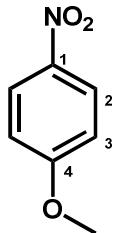
Für die Darstellung des Harnstoffderivates **66** wurde das dafür benötigte Isocyanat **116**, ausgehend von 4-((4-Methylpiperazin-1-yl)methyl)phenylamin (**120**), synthetisiert. 1 eq. des Amins **120**, wurden mit 1.2 eq. CDI in abs. DMSO gelöst und 3 h bei 20 °C gerührt. Anschließend wurde 30 min bei 50 °C gerührt, bis keine Gasentwicklung mehr detektiert werden konnte. Das Isocyanat wurde für die nachfolgende Kupplung ohne Aufarbeitung eingesetzt.

**Ausbeute** 3 mg (0.005 mM, 1 %).

**LC-MS (EI, 70 eV):**  $m/z$  600 [MH]<sup>+</sup>, (ber.  $m/z$  = 599.5 für C<sub>33</sub>H<sub>40</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>).

## Indol-Synthese

### 9.2.15 Synthese von 1-Methoxy-4-nitrobenzol (147)



**Synthesevorschrift für die Methylierung des *p*-Nitrophenols:** 708 mg (5.1 mmol) *p*-Nitrophenol, 1.62 g (11.7 mmol, 2.3 eq.)  $\text{K}_2\text{CO}_3$  und 1.16 g, (11.7 mmol, 2.3 eq.) MeI wurden in 10 mL DMF gelöst. Die Lösung wurde 15 h bei 20 °C gerührt. Nach der Beendigung der Reaktion wurden 200 mL Wasser zugegeben und dreimal mit je 100 mL  $\text{Et}_2\text{O}$  extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und i. Vak. eingeengt. Es wurde ein gelber Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 760 mg (4.97 mmol, 98 %).

**1H-NMR** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 3.91$  (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ), 6.96 (d,  $J = 9.36$  Hz, 2 H, 3-H), 8.21 (d,  $J = 9.41$  Hz, 2 H, 2-H) ppm.

**13C-NMR** (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 55.9 ( $\text{OCH}_3$ ), 114.0 (3-C), 125.9 (2-C), 141.6 (1-C), 164.6 (4-C) ppm.

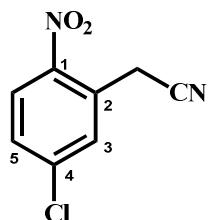
**IR** ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3118, 1607, 1589, 1497, 1456, 1439, 1329, 1260, 1173, 1105, 1020, 862, 845, 750, 690.

**LC-MS** (EI, 70 eV):  $m/z = 154$   $[\text{MH}]^+$ , (ber.  $m/z = 153.0$  für  $\text{C}_7\text{H}_7\text{NO}_3$ ).

### 9.2.16 Synthese von 2-Nitrophenylacetonitrils

**Synthesevorschrift für die Darstellung von Nitrilen:** 1 eq. des Nitrobenzols und 1.2 eq. des 4-Chlorphenoxyacetonitrils wurden in 10 mL abs. DMF gelöst und langsam zu einer Lösung von 2.3 eq. von Kalium-*tert*-butoxid in DMF bei -24 °C getropft. Die Lösung verfärbte sich violett und wurde für weitere 2.5 h bei -24 °C gerührt. Danach wurde die Reaktionsmischung auf eiskalte 5 %ige HCl-Lösung gegeben. Es bildete sich ein brauner Niederschlag. Es wurde dreimal mit je 50 mL (EA) extrahiert und i.Vak. eingeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt.

#### 2-(5-Chlor-2-nitrophenyl)acetonitril (145)



**Ausbeute:** 600 mg (3.05 mmol, 48 %).

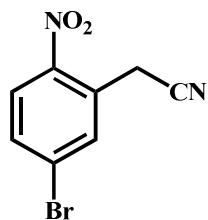
**1H-NMR** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 4.22$  (s, 2 H,  $\text{CH}_2$ ), 7.55 (dd,  $_3J = 8.76$  Hz,  $_4J = 2.25$  Hz, 1 H, 5-H), 7.75 (d,  $_4J = 2.24$  Hz, 1 H, 3-H), 8.1 (d,  $_3J = 8.79$  Hz, 1 H, 6-H) ppm.

**13C-NMR** (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 22.7$  ( $\text{CH}_2$ ), 115.7 ( $\text{CN}$ ), 127.3 (6-C), 127.7 (5-C), 129.8 (3-C), 131.1 (4-C), 141.2 (2-C), 145.7 (1-C) ppm.

**IR** ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2320, 1605, 1568, 1518, 1474, 1340, 1179, 1111, 937, 889, 841, 750.

**LC-MS** (EI, 70 eV):  $m/z = 197$  [ $\text{MH}^+$ ], (ber.  $m/z = 196.6$  für  $\text{C}_8\text{H}_5\text{ClN}_2\text{O}_2$ ).

**2-(5-Brom-2-nitrophenyl)acetonitril (146)**



**Ausbeute:** 970 mg (4.02 mmol, 81 %).

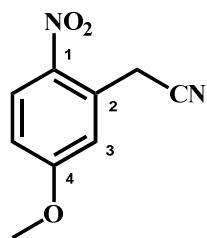
**1H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 4.21 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 7.71 (dd, <sub>3</sub>J = 8.75 Hz, <sub>4</sub>J = 2.12 Hz, 1 H, 5-H), 7.90 (d, <sub>4</sub>J = 2.04 Hz, 1 H, 3-H), 8.1 (d, <sub>3</sub>J = 8.73 Hz, 1 H, 6-H) ppm.

**13C-NMR** (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 22.6 (CH<sub>2</sub>), 115.7 (CN), 127.3 (4-C), 127.6 (6-C), 129.6 (3-C), 132.9 (5-C), 134.1 (3-C), 146.3 (1-C) ppm.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 2956, 2933, 1601, 1564, 1508, 1467, 1404, 1319, 1298, 1178, 1097, 1068, 952, 931, 872, 860, 837

**LC-MS** (EI, 70 eV): *m/z* 241 [MH]<sup>+</sup>, (ber. *m/z* = 241.0 für C<sub>8</sub>H<sub>5</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

**2-(5-Methoxy-2-nitrophenyl)acetonitril (147)**



**Ausbeute:** 430 mg (2.24 mmol, 68 %)

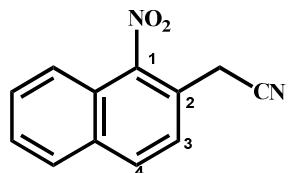
**1H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 3.97 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 4.26 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 6.99 (dd, <sub>3</sub>J = 9.18 Hz, <sub>4</sub>J = 2.76 Hz, 1 H, 5-H), 7.20 (d, <sub>4</sub>J = 2.73 Hz, 1 H, 3-H), 8.27 (d, <sub>3</sub>J = 9.18 Hz, 1 H, 6-H) ppm.

**13C-NMR** (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 23.4 (CH<sub>2</sub>), 55.2 (CH<sub>3</sub>), 113.9 (3-C), 116.3 (5-C), 116.4 (CN), 128.7 (6-C), 140.4 (2-C), 155.7 (1-C), 164.1 (4-C) ppm.

**IR** ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2933, 1587, 1502, 1462, 1411, 1393, 1329, 1306, 1287, 1246, 1163, 1070, 1016, 937, 845, 758, 689, 650, 594.

**LC-MS** (EI, 70 eV):  $m/z$  193 [ $\text{M}+\text{H}]^+$ , (ber.  $m/z$  = 192.2 für  $\text{C}_9\text{H}_5\text{N}_2\text{O}_3$ ).

### 2-(1-Nitronaphthalen-2-yl)acetonitril (148)



**Ausbeute:** 530 mg (2.50 mmol, 87 %).

**1H-NMR** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 3.88 (s, 2 H,  $\text{CH}_2$ ), 7.67 (m, 3 H,  $H$ ), 7.82 (m, 1 H,  $H$ ), 7.94 (m, 1 H,  $H$ ), 8.07 (d,  $J$  = 8.58 Hz, 1 H,  $H$ ) ppm.

**13C-NMR** (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 20.7 ( $\text{CH}_2$ ), 115.9 ( $\text{CN}$ ), 120.1 (q- $C$ ), 121.9 (Ar- $C$ ), 124.6 (q- $C$ ), 125.1 (4- $C$ ), 128.1 (Ar- $C$ ), 128.2 (Ar- $C$ ), 129.5 (3- $C$ ), 132.2 (4- $C$ ), 133.5 (2- $C$ ), 147 (1- $C$ ) ppm.

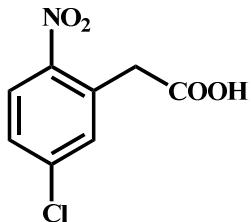
**IR** ( $\text{cm}^{-1}$ ): 1522, 1418, 1354, 1113, 928, 862, 802, 734

**LC-MS** (EI, 70 eV):  $m/z$  213 [ $\text{M}+\text{H}]^+$ , (ber.  $m/z$  = 212.2 für  $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2$ ).

### 9.2.17 Synthese der 2-Nitrophenylessigsäuren

**Synthesevorschrift zur sauren Hydrolyse des Nitrils:** 1 eq. des Nitrils wurde in einer Lösung aus AcOH/HCl (1:5) gelöst und unter Rückfluss 4 h erhitzt. Es wurde drei Mal mit 50 mL EA extrahiert, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und i. Vak. eingeengt.

#### 2-(5-Chlor-2-nitrophenyl)essigsäure (122)



**Ausbeute:** 480 mg (2.23 mmol, 68 %).

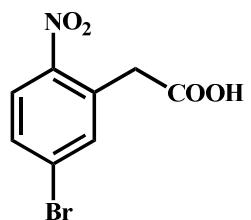
**1H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 4.01 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 7.64 (dd, <sub>3</sub>J = 8.76 Hz, <sub>4</sub>J = 2.40 Hz, 1 H, 5-H), 7.73 (d, <sub>4</sub>J = 2.19 Hz, 1 H, 3-H), 8.11 (d, <sub>3</sub>J = 8.73 Hz, 1 H, 6-H) ppm.

**13C-NMR** (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 39.1 (CH<sub>2</sub>), 127.2 (6-C), 128.9 (5-C), 133.4 (4-C), 133.7 (3-C), 138.7 (2-C), 147.7 (1-C), 171.3 (C=O) ppm.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 2845, 1699, 1609, 1570, 1516, 1418, 1339, 1304, 1283, 1236, 1180, 1111, 883, 831, 129, 689.

**LC-MS** (EI, 70 eV): *m/z* 170.1, 172.1 [M-COOH]<sup>+</sup>, (ber. *m/z* = 215.6 für C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>ClNO<sub>4</sub>).

#### 2-(5-Brom-2-nitrophenyl)essigsäure (123)



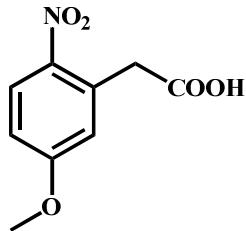
**Ausbeute:** 340 mg (1.31 mmol, 98 %).

**1H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 4.01 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 7.78 (dd, <sub>3</sub>J = 8.72 Hz, <sub>4</sub>J = 2.24 Hz, 1 H, 5-*H*), 7.87 (d, <sub>4</sub>J = 2.22 Hz, 1 H, 3-*H*), 8.03 (d, <sub>3</sub>J = 8.70 Hz, 1 H, 6-*H*), 12.63 (COOH) ppm.

**13C-NMR** (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 38.5 (CH<sub>2</sub>), 126.7 (6-*C*), 127.3 (4-*C*), 131.4 (3-*C*), 132.8 (2-*C*), 136.1 (5-*C*), 147.6 (1-*C*), 170.8 (COOH) ppm.

**MS (EI):** *m/z* 214.1, 216.1 [M-COOH]<sup>+</sup>, (ber. *m/z* = 260.2 für C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>BrNO<sub>4</sub>).

### 2-(5-Methoxy-2-nitrophenyl)essigsäure (124)



**Ausbeute:** 665 mg (3.15 mmol, 88 %).

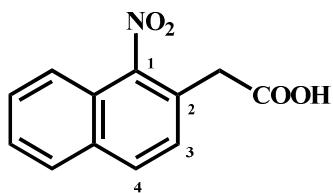
**1H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 3.88 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 3.99 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 7.06 (dd, <sub>3</sub>J = 9.00 Hz, 2.88 Hz, 1 H, 5-*H*), 7.11 (d, <sub>4</sub>J = 2.67 Hz, 1 H, 3-*H*), 8.14 (d, <sub>3</sub>J = 9.03 Hz, 1 H, 6-*H*), 12.46 (bs, 1 H, COOH) ppm.

**13C-NMR** (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 39.7 (CH<sub>2</sub>), 56.1 (OCH<sub>3</sub>), 113.1 (5-*C*), 118.7 (3-*C*), 127.5 (6-*C*), 133.7 (2-*C*), 141.3 (1-*C*), 163.0 (4-*C*), 171.2 (COOH) ppm.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 2976, 2901, 2646, 1703, 1614, 1578, 1502, 1315, 1283, 1258, 1194, 1082, 1030, 945, 827, 750, 706.

**LC-MS (EI, 70 eV):** *m/z* 234 [M+Na<sup>+</sup>], 166 [M-COOH]<sup>+</sup>, (ber. *m/z* = 211.2 für C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>5</sub>).

### 2-(1-Nitronaphthalen-2-yl)-essigsäure (126)



**Ausbeute:** 330 mg (1.43 mmol, 64 %).

**1H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 3.86 (s, 3 H, CH<sub>2</sub>), 7.62 (d, <sub>3</sub>J = 8.52 Hz, 1 H, 3-H), 7.65-7.75 (m, 3 H, Ar-H), 8.11 (m, 1 H, Ar-H), 8.19 (d, <sub>3</sub>J = 8.52 Hz, 1 H, 4-H), 121.70 (s, 1 H, COOH) ppm.

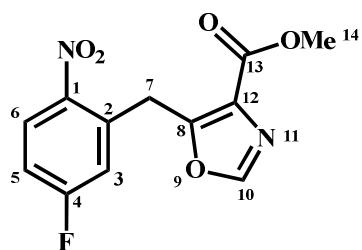
**13C-NMR** (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 37.1 (CH<sub>2</sub>), 121.0 (Ar-C), 123.7 (q-C), 125.8 (q-C), 127.4 (Ar-C), 128.3 (Ar-C), 128.8 (Ar-C), 129.1 (3-C), 131.1(4-C), 132.4 (2-C), 147.0 (1-C), 170.7 (COOH) ppm.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 2900, 1732, 1705, 1508, 1489, 1471, 1456, 1423, 1338, 1330, 1272, 1244, 1209, 1161, 918, 817, 769

**LC-MS** (EI, 70 eV): *m/z* 254 [M+Na<sup>+</sup>], (ber. *m/z* = 231.2 für C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>4</sub>).

### 9.2.18 Synthese der Oxazole

**Synthesevorschrift:** 1 eq. der Nitrophenylessigsäure und 1.2 eq. CDI wurden in abs. THF gelöst und solange bei RT gerührt, bis keine Gasentwicklung mehr zu beobachten war. Danach wurde die Lösung weitere 2 h bei 50 °C gerührt. Die Lsg. verfärbte sich gelb. Das Reaktionsgemisch wurde langsam zu einer Lsg. aus 1.1 eq. Isocyanoessigsäuremethylester und 0.8 eq. NaHMDS in abs. THF zugetropft. Es wurde 15 h bei 20 °C gerührt. Die Lsg. verfärbte sich dunkelbraun. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde in EA aufgenommen und dreimal mit ges. Natriumchlorid-Lsg. gewaschen. Die org. Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt.

**5-(5-Fluor-2-nitrobenzyl)oxazol-4-carbonsäuremethylester (127)**

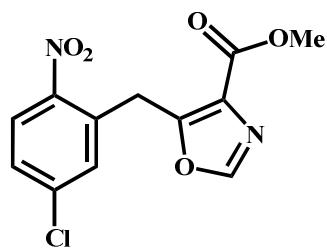
**Ausbeute:** 288 mg (1.03 mmol, 82 %).

**1H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 3.83 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 4.75 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 7.40-7.49 (m, 2 H, 3,5-*H*), 8.17-8.22 (m, 1 H, 6-*H*), 8.37 (s, 1 H, 10-*H*) ppm.

**13C-NMR** (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 29.6 (CH<sub>2</sub>), 52.3, 116.4 (d, *J* = 23.52 Hz, 5-*C*), 119.7 (d, *J* = 24.54 Hz, 3-*C*), 127.3 (12-*C*), 128.7 (d, *J* = 10.31 Hz, 6-*C*), 134.4 (d, *J* = 9.73 Hz, 2-*C*), 145.5 (d, *J* = 2.87 Hz, 1-*C*), 151.5 (10-*C*), 162.1 (8-*C*), 164.4 (d, *J* = 253.74 Hz, 4-*C*), 166.0 (COOH) ppm.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 1715, 1616, 1585, 1526, 1477, 1452, 1350, 1325, 1211, 1165, 1082, 1067, 962, 870, 845, 796, 766, 750.

**LC-MS** (EI, 70 eV): *m/z* 281 [M+H]<sup>+</sup>, (ber. *m/z* = 280.2 für C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>).

**5-(5-Chlor-2-nitrobenzyl)oxazol-4-carbonsäuremethylester (122)**

**Ausbeute:** 50 mg (1.69 mmol, 36 %).

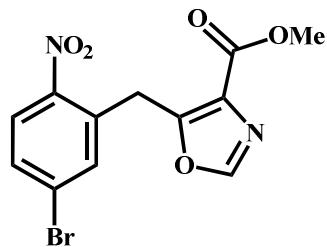
**1H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 3.94 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 4.80 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 7.30 (d, 1 H, 3-*C*), 7.42 (dd, <sub>3</sub>*J* = 8.73 Hz, <sub>4</sub>*J* = 2.28 Hz, 1 H, 5-*H*), 7.79 (s, 1 H, 10-*H*), 8.01 (d, <sub>3</sub>*J* = 8.73 Hz, 1 H, 6-*H*) ppm.

**13C-NMR** (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 28.9 (CH<sub>2</sub>), 52.3 (CH<sub>3</sub>), 126.7 (6-C), 128.32 (12-C), 128.7 (5-C), 131.9 (3-C), 132.6 (2-C), 139.8 (4-C), 147.3 (1-C), 149.8 (10-C), 154.9 (8-C), 162.0 (COOCH<sub>3</sub>) ppm.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 1711, 1616, 1602, 1568, 1558, 1521, 1489, 1471, 1456, 1346, 1325, 1296, 1207, 1178, 1166, 1107, 1080, 1064, 893, 835, 794

**LC-MS** (EI, 70 eV): *m/z* 297 [M+H]<sup>+</sup>, (ber. *m/z* = 296.6 für C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>).

**5-(5-Brom-2-nitrobenzyl)oxazol-4-carbonsäuremethylester (123)**

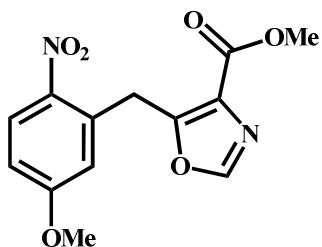


**Ausbeute:** 223 mg (0.654 mmol, 68 %).

**1H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 3.83 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 4.72 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 7.81-7.83 (m, 2 H, 3,5-H), 8.02 (d,  $J$  = 9.21 Hz, 1 H, 6-H), 8.36 (s, 1 H) ppm.

**13C-NMR** (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 28.8 (CH<sub>2</sub>), 51.8 (CH<sub>3</sub>), 126.7 (4-C), 126.9 (6-C), 127.3 (12-C), 131.9 (3-C), 132.4 (2-C), 135.2 (5-C), 147.1 (1-C), 151.0 (10-C), 154.9 (8-C), 161.6 (COOCH<sub>3</sub>) ppm.

**LC-MS** (EI, 70 eV): *m/z* 341 [M+H]<sup>+</sup>, (ber. *m/z* = 341.2 für C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>).

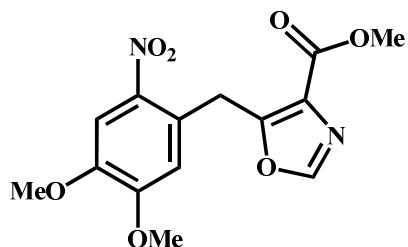
**5-(5-Methoxy-2-nitrobenzyl)oxazol-4-carbonsäuremethylester (124)**

**Ausbeute:** 550 mg (1.88 mmol, 61 %).

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 3.83 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 3.87 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 4.75 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 7.04 (d, <sub>4</sub>J = 2.73 Hz, 1 H, 3-H), 7.11 (dd, <sub>3</sub>J = 9.12 Hz, <sub>4</sub>J = 2.82 Hz, 1 H, 5-H), 8.15 (d, <sub>3</sub>J = 9.09 Hz, 1 H, 6-H), 8.33 (s, 1 H, 10-H) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 29.9 (CH<sub>2</sub>), 51.8 (OCH<sub>3</sub>), 56.1 (OCH<sub>3</sub>), 113.3 (5-C), 118.0 (3-C), 126.5, 127.9 (6-C), 133.3 (2-C), 141.3 (1-C), 150.8 (10-C), 155.6 (8-C), 161.7 (4-C), 163.1 (COOCH<sub>3</sub>) ppm.

**LC-MS** (EI, 70 eV): *m/z* 293 [M+H]<sup>+</sup>, (ber. *m/z* = 292.2 für C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>).

**5-(4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyl)oxazol-4-carbonsäuremethylester (125)**

**Ausbeute:** 246 mg (0.764 mmol, 74 %).

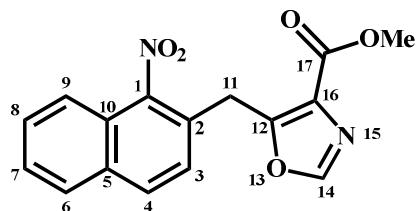
**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz): (CDCl<sub>3</sub>) δ in ppm: 3.91 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 3.94 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 3.95 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 4.83 (CH<sub>2</sub>), 6.80 (s, 1 H, 3-H), 7.67 (s, 1 H, 6-H), 7.73 (s, 1 H, 10-H) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz): (CDCl<sub>3</sub>) δ in ppm: 29.6 (CH<sub>2</sub>), 52.2 (COOCH<sub>3</sub>), 56.4 (OCH<sub>3</sub>), 56.4 (OCH<sub>3</sub>), 108.4 (6-C), 113.5 (3-C), 125.3 (2-C), 127.7 (12-C), 141.2 (1-C), 148.2 (5-C), 149.4 (10-C), 153.6 (4-C), 156.3 (9-C), 162.4 (COOCH<sub>3</sub>) ppm.

**IR** ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3136, 2922, 2852, 1705, 1638, 1609, 1583, 1508, 1445, 1339, 1323, 1273, 1206, 1155, 1128, 1057, 986, 862, 802.

**LC-MS** (EI, 70 eV):  $m/z$  223 [ $\text{M}+\text{H}]^+$ , (ber.  $m/z = 322.3$  für  $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_7$ ).

### 5-((1-Nitronaphthalen-2-yl)-methyl)oxazole-4-carbonsäuremethylester (132)



**Ausbeute:** 290 mg (0.929 mmol, 67 %).

**1H-NMR** (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta = 3.84$  (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.74 (s, 2 H,  $\text{CH}_2$ ), 7.58 (d,  $J = 8.58$  Hz, 1 H, 3-H), 7.66-7.78 (m, 3 H, 6,7,9-H), 8.10 (m, 1 H, 6-H), 8.20 (d,  $J = 8.49$  Hz, 4-H), 8.42 (s, 1 H, 14-H).

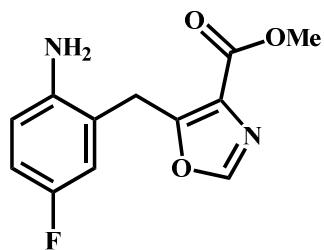
**13C-NMR** (75.5 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta = 27.3$  ( $\text{CH}_2$ ), 51.8 ( $\text{CH}_3$ ), 120.8 (9-C), 123.6 (16-C), 125.4 (Ar-C), 127.1 (7-C), 127.2 (8-C), 127.8 (Ar-C), 128.3 (8-C), 129.4 (4-C), 131.5 (3-C), 132.4 (Ar-C), 147.0 (1-C), 151.4 (14-C), 154.7(12-C), 161.6 ( $\text{COOCH}_3$ ).

**IR** ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3159, 1703, 1610, 1526, 1437, 1358, 1197, 1165, 1085, 1055, 812, 790, 758.

**LC-MS** (EI, 70 eV):  $m/z$  313 [ $\text{M}+\text{H}]^+$ , (ber.  $m/z = 312.3$  für  $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_5$ ).

### 9.2.19 Reduktion der Nitrogruppe der Oxazolderivate (133)

**Methode A:** 1 eq. des Oxazols, 1 Spatel Pd/C 10%, 5 eq. Cyclohexen und 5 mL MeOH wurden in einem (5 mL) Druckbehälter in der Mikrowelle (CEM Discover) 3 min bei 95 °C (max. 100 W) erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde der Ansatz filtriert und i. Vak. eingeengt. Es wurde ein öliges Produkt erhalten.

**5-(2-Amino-5-fluorbenzyl)oxazole-4-carbonsäuremethylester (133)**

**Ausbeute:** 170 mg (0.680 mmol, 95 %).

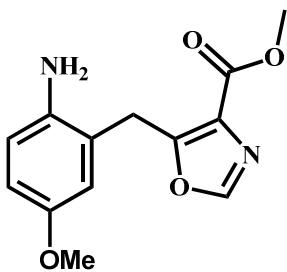
**1H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 3.84 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 4.62 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 4.90 (bs, 2 H, NH<sub>2</sub>) 6.65 (dd, <sub>3</sub>J = 8.72 Hz, <sub>4</sub>J = 5.12 Hz, 1 H, 6-H), 6.69 (dd, <sub>3</sub>J = 9.50 Hz, <sub>4</sub>J = 2.93 Hz, 1 H, 3-H), 6.82 (td, <sub>3</sub>J = 8.62 Hz, <sub>4</sub>J = 3.05 Hz, 1 H, 5-H), 8.39 (s, 1H, 10-H).

**13C-NMR** (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 27.6 (CH<sub>2</sub>), 52.3 (CH<sub>3</sub>), 114.6 (d, *J* = 21.76 Hz, 5-C), 116.0 (d, *J* = 18.51 Hz, 3-C), 116.2 (d, *J* = 3.46 Hz, 6-C), 120.9 (d, *J* = 6.82 Hz, 2-C), 127.3 (12-C), 143.3 (d, *J* = 1.63 Hz, 1-C), 151.5 (10-C), 154.7 (d, *J* = 231.50 Hz, 4-C), 157.0 (8-C), 162.8 (COOCH<sub>3</sub>).

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 2955, 1717, 1607, 1504, 1437, 1360, 1319, 1246, 1199, 1145, 1089, 1047, 954, 821, 771.

**LC-MS** (EI, 70 eV): *m/z* 251 [M+H]<sup>+</sup>, (ber. *m/z* = 250.2 für C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>).

**5-(2-Amino-5-methoxybenzyl)oxazol-4-carbonsäuremethylester (136)**



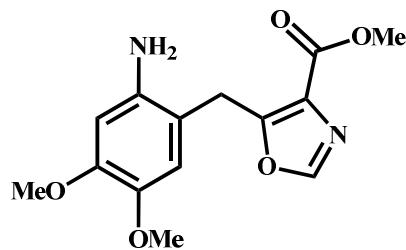
**Ausbeute:** 110 mg (0.420 mmol, 94 %).

**1H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 3.60 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 3.84 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 4.20 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 4.81 (bs, 2 H, NH<sub>2</sub>), 6.49 (t, <sub>4</sub>J = 1.64 Hz, 1 H, 3-H), 6.63 (d, <sub>4</sub>J = 1.62 Hz, 1-H, 6-H), 8.37 (s, 1 H, 10-H) ppm.

**13C-NMR** (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 27.3 (CH<sub>2</sub>), 51.8 (COOCH<sub>3</sub>), 55.8 (OCH<sub>3</sub>), 113.2 (3-C), 115.4 (5-C), 116.2, 120.7, 126.5, 139.5, 150.9, 151.1 (10-C), 157.0, 162.3 (COOCH<sub>3</sub>) ppm.

**LC-MS** (EI, 70 eV): *m/z* 263 [M+H]<sup>+</sup>, (ber. *m/z* = 262.2 für C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>).

**5-(2-Amino-4,5-dimethoxybenzyl)oxazole-4-carbonsäuremethylester (137)**



**Ausbeute:** 131 mg (0.448 mmol, 90 %).

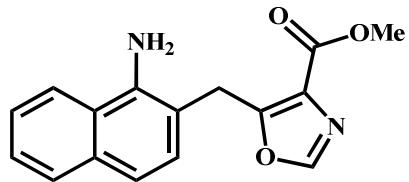
**1H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 3.59 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 3.66 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 3.85 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 4.14 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 4.63 (bs, 2 H, NH<sub>2</sub>), 6.35 (s, 1 H, 6-H), 6.58 (s, 1 H, 3-H), 8.34 (s, 1 H, 10-H) ppm.

**13C-NMR** (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 26.7 (CH<sub>2</sub>), 51.8 (COOCH<sub>3</sub>), 55.2 (OCH<sub>3</sub>), 56.7 (OCH<sub>3</sub>), 100.6 (6-C), 110.1 (3-C), 115.9 (2-C), 126.0 (12-C), 140.2 (1-C), 140.7 (4-C), 149.1 (10-C), 150.7 (5-C), 157.6 (8-C), 162.5 (COOCH<sub>3</sub>) ppm.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3379, 3117, 2920, 1699, 1603, 1516, 1440, 1356, 1325, 1283, 1207, 1170, 1148, 1078, 1049, 1003, 831, 213

**LC-MS** (EI, 70 eV): *m/z* 293 [M+H]<sup>+</sup>, (ber. *m/z* = 292.3 für C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>).

### 5-((1-Aminonaphthalen-2-yl)-methyl)oxazol-4-carbonsäuremethylester (138)



**Ausbeute:** 60 mg (0.21 mmol, 24 %).

**1H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 3.88 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 4.42 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 5.66 (s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 7.10 (s, 1 H), 7.11 (s, 1 H), 7.39 (m, 2 H, Ar-H), 7.71 (m, 1 H, Ar-H), 7.13 (m, 1 H, Ar-H), 8.36 (s, 1 H, 10-H) ppm.

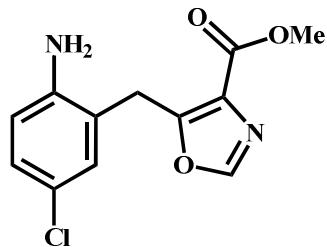
**13C-NMR** (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 27.6 (CH<sub>2</sub>), 51.9 (OCH<sub>3</sub>), 112.1 (Ar-C), 115.8 (Ar-C), 122.2 (Ar-C), 122.8 (Ar-C), 124.2 (Ar-C), 125.2 (Ar-C), 126.3 (Ar-C), 127.7 (Ar-C), 128.4 (Ar-C), 133.3 (Ar-C), 141.4 (Ar-C), 150.9 (10-C), 157.5 (Ar-C), 162.6 (COOCH<sub>3</sub>) ppm.

**LC-MS** (EI, 70 eV): *m/z* 283 [M+H]<sup>+</sup>, (ber. *m/z* = 282.3 für C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>).

**Methode B:**

**Synthesevorschrift zur Reduktion der Nitrogruppe der Oxazolderivate 128 und 129:** 11 eq. Natriumdithionit wurden in 5 mL Wasser gelöst. Zu dieser Mischung wurde eine Lösung aus 1 eq. Oxazol und THF zugegeben. Es wurde 6 h unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre bei 20 °C gerührt. Das Rohprodukt wurde dreimal mit Wasser gewaschen und anschließend säulenchromatographisch gereinigt.

**5-(2-Amino-5-chlorbenzyl)oxazol-4-carbonsäuremethylester (134)**

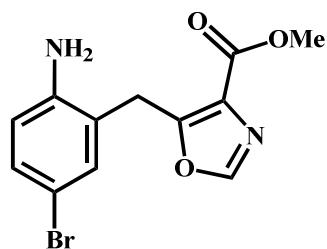


**Ausbeute:** 50 mg (0.19 mmol, 56 %).

**1H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 3.84 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 4.20 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 5.19 (bs, 2 H, NH<sub>2</sub>), 6.66 (d, <sub>3</sub>J = 8.55 Hz, 1 H, 6-H), 6.87 (d, <sub>5</sub>J = 2.52 Hz, 1 H, 3-H), 6.99 (dd, <sub>3</sub>J = 8.55 Hz, <sub>4</sub>J = 2.55 Hz, 1 H, 5-H), 8.39 (s, 1 H, 10-H) ppm.

**13C-NMR** (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 26.9 (CH<sub>2</sub>), 51.9 (CH<sub>3</sub>), 116.2 (6-C), 119.2, 120.8, 126.8, 127.5, 128.9, 145.4, 151.1 (10-C), 156.5 (8-C), 162.4 (COOCH<sub>3</sub>) ppm.

**LC-MS** (EI, 70 eV): *m/z* 267 [M+H]<sup>+</sup>, (ber. *m/z* = 266.7 für C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>).

**5-(2-Amino-5-brombenzyl)oxazole-4-carbonsäuremethylester (135)**

**Ausbeute:** 51 mg (0.16 mmol, 36 %).

**1H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 3.84 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 4.20 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 5.22 (bs, 2 H, NH<sub>2</sub>), 6.61 (d, <sub>3</sub>J = 8.55 Hz, 1 H, 6-H), 6.69 (d, <sub>4</sub>J = 2.37 Hz, 1 H, 3-H), 7.10 (dd, <sub>3</sub>J = 8.57 Hz, <sub>4</sub>J = 2.42 Hz, 1 H, 5-H), 8.39 (s, 1 H, 10-H) ppm.

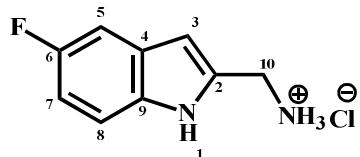
**13C-NMR** (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 26.9 (CH<sub>2</sub>), 51.9 (CH<sub>3</sub>), 106.5 (4-C), 116.7 (6-C), 121.3 (2-C), 126.7, 130.3, 131.6, 145.7, 151.1 (10-C), 156.4 (8-C), 162.3 (COOCH<sub>3</sub>) ppm.

**LC-MS** (EI, 70 eV): *m/z* 311.1 [M]<sup>+</sup>, (ber. *m/z* = 311.1 für C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>).

### 9.2.20 Darstellung der 1*H*-Indol-2-ylmethylamin-Hydrochloride (139 – 144)

**Synthesvorschrift zur Oxazolspaltung und dem Ringschluß zum Indol:** 1 eq. Oxazol wurde in MeOH/HCl (1:1) gelöst und 5 h unter Rückfluss gerührt. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde mit Aceton und Et<sub>2</sub>O gewaschen.

#### 5-Fluor-1*H*-indol-2-ylmethylamine-Hydrochlorid (139)



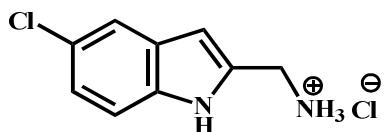
**Ausbeute:** 141 mg (2.54 mmol, 99 %).

**1H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 4.17 (d, <sub>3</sub>*J* = 4.71 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 6.54 (s, 1 H, 3-*H*), 6.96 (m, 1 H, 7-*H*), 7.30 (dd, <sub>3</sub>*J* = 9.96 Hz, <sub>4</sub>*J* = 2.52 Hz, 1 H, 5-*H*), 7.38 (dd, <sub>3</sub>*J* = 8.90 Hz, <sub>3</sub>*J* = 4.67 Hz, 1 H, 8-*H*), 8.68 (bs, 3 H, NH<sub>3</sub>), 11.54 (bs, 1 H, NH) ppm.

**13C-NMR** (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 35.8 (CH<sub>2</sub>), 101.8 (d, <sub>3</sub>*J* = 4.55 Hz, 3-*C*), 104.7 (d, <sub>3</sub>*J* = 23.15 Hz, 5-*C*), 109.8 (d, *J* = 26.13 Hz, 7-*C*), 112.2 (d, *J* = 9.79 Hz, 8-*C*), 127.7 (d, *J* = 10.42 Hz, 4-*C*), 132.6 (2-*C*), 133.8 (9-*C*), 157.0 (d, *J* = 231.41 Hz, 6-*C*) ppm.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3304, 3001, 1595, 1556, 1489, 1454, 1379, 1290, 1182, 995, 952, 871, 862, 802, 765

**HRMS** (EI, 70 eV): *m/z* = 164.07436 [M]<sup>+</sup>, (ber. *m/z* = 164.0750 für C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>FN<sub>2</sub>).

**5-Chlor-1*H*-indol-2-ylmethylamine-Hydrochlorid (140)**

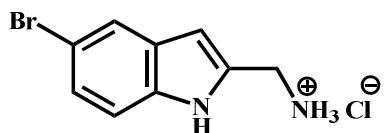
**Ausbeute:** 12 mg (0.05 mmol, 33 %).

**1H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 4.17 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 6.54 (s, 1 H, 3-*H*), 7.10 (dd, <sub>3</sub>*J = 8.67 Hz, <sub>4</sub>*J = 2.10 Hz, 1 H, 7-*H*), 7.41 (d, <sub>3</sub>*J = 8.70 Hz, 1 H, 8-*H*), 7.59 (d, <sub>4</sub>*J = 1.98 Hz, 1 H, 5-*H*), 8.64 (br. s, 3 H, NH<sub>3</sub>), 11.63 (br. s, 1 H, NH) ppm.****

**13C-NMR** (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 36.2 (CH<sub>2</sub>), 101.3, 112.9, 119.3, 121.6, 123.8, 128.6, 133.6, 134.4 (9-*C*) ppm. Aufgrund der geringen Menge der Testsubstanz konnten die 13C-Signale nur mit Hilfe des HMBC-Spektrums detektiert werden. Eine eindeutige Zuordnung der Signale war somit nicht möglich.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 2976, 2887, 1716, 1683, 1635, 1558, 1541, 1506, 1473, 1456, 1379, 1313, 1144, 1066, 935, 879, 798, 785

**HRMS** (EI, 70 eV): *m/z* = 180.0448 [MH]<sup>+</sup>, (ber. *m/z* = 180.0454 für C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>ClN<sub>2</sub>).

**5-Brom-1*H*-indol-2-ylmethylamine-Hydrochlorid (141)**

**Ausbeute:** 18 mg (0.07 mmol, 53 %).

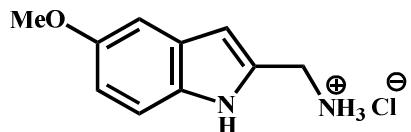
**1H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 4.18 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 6.54 (s, 1 H, 3-*H*), 7.21 (d, <sub>3</sub>*J = 8.04 Hz, 1 H, 8-*H*), 7.37 (d, <sub>3</sub>*J = 8.70 Hz, 1 H, 7-*H*), 7.74 (s, 1 H, 5-*H*), 8.62 (bs, 3 H, NH<sub>3</sub>), 11.63 (bs, 1 H, NH) ppm.**

**13C-NMR** (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 35.7 (CH<sub>2</sub>), 101.2 (3-*C*), 111.7 (8-*C*), 122.3 (6-*C*), 124.1, 129.4, 133.5, 134.6 (9-*C*) ppm.

**IR** ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2997, 2906, 1716, 1683, 1597, 1541, 1496, 1489, 1471, 1456, 1417, 1375, 1338, 1305, 1149, 1051, 993, 906, 879, 700

**HRMS** (EI, 70 eV):  $m/z = 223.9937, 225.9929$   $[\text{MH}]^+$ , (ber.  $m/z = 223.9949, 225.9932$  für  $\text{C}_9\text{H}_9\text{BrN}_2$ ).

### 5-Methoxy-1*H*-indol-2-ylmethylamine-Hydrochlorid (142)



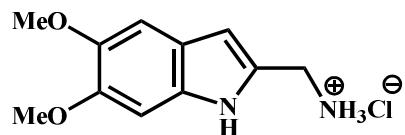
**Ausbeute:** 110 mg (0.420 mmol 99 %).

**1H-NMR** (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 3.74$  (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.14 (d,  $_3J = 5.70$  Hz, 2 H,  $\text{CH}_2$ ), 6.45 (d,  $_4J = 1.29$  Hz, 1 H, 3-*H*), 6.74 (dd,  $_3J = 8.79$  Hz,  $_4J = 2.49$  Hz, 1 H, 7-*H*), 7.03 (d,  $_4J = 2.46$  Hz, 1 H, 5-*H*), 7.27 (d,  $_3J = 8.76$  Hz, 1 H, 8-*H*), 8.58 (bs, 3 H,  $\text{NH}_3$ ), 11.20 (s, 1 H, NH) ppm.

**13C-NMR** (75.5 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 35.9$  ( $\text{CH}_2$ ), 55.2 ( $\text{OCH}_3$ ), 101.5 (3-*C*), 101.7 (5-*C*), 111.8 (7-*C*), 111.9 (8-*C*), 127.9 (4-*C*), 131.1 (2-*C*), 132.1 (9-*C*), 153.4 (6-*C*) ppm.

**IR** ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3003, 1487, 1456, 1379, 1296, 1206, 1175, 1115, 1028, 995, 941, 847, 802, 758

**HRMS** (EI, 70 eV):  $m/z = 176.0951$   $[\text{MH}]^+$ , (ber.  $m/z = 176.0950$  für  $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}$ ).

**5,6-Dimethoxy-1*H*-indol-2-ylmethylamine-Hydrochlorid (143)**

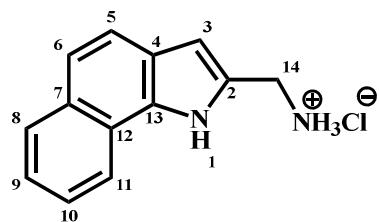
**Ausbeute:** 80 mg (0.33 mmol, 97 %).

**1H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 3.74 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 3.77 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 4.12 (d, <sub>3</sub>J = 5.61 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 6.39 (d, <sub>4</sub>J = 1.41 Hz, 1 H, 3-*H*), 6.92 (s, 3 H, NH<sub>3</sub>), 7.03 (s, 1 H, 8-*H*), 8.52 (s, 1 H, 5-*H*), 11.04 (s, 1 H, NH) ppm.

**13C-NMR** (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 35.9 (CH<sub>2</sub>), 55.6 (OCH<sub>3</sub>), 55.8 (OCH<sub>3</sub>), 94.9 (8-*C*), 101.8 (3-*C*), 102.4 (5-*C*), 120.2 (4-*C*), 129.6 (2-*C*), 130.5 (9-*C*), 144.6 (6-*C*), 146.8 (7-*C*) ppm.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3142, 2999, 1716, 1616, 1556, 1485, 1447, 1338, 1315, 1165, 1136, 1113, 1001, 943, 881, 831.

**HRMS** (EI, 70 eV): *m/z* = 206.1051 [MH]<sup>+</sup>, (ber. *m/z* = 206.1055 für C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

**1*H*-Benzo[g]indol-2-ylmethylamine-Hydrochlorid (144)**

**Ausbeute:** 40 mg (0.17 mmol, 81 %).

**1H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 4.31 (d, <sub>3</sub>J = 5.25 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 6.69 (d, <sub>4</sub>J = 1.59 Hz, 1 H, 3-*H*), 7.43 (m, 2 H, 5,6-*H*), 7.55 (t, <sub>3</sub>J = 7.20 Hz, 1 H, 9-*H*), 7.66 (d, <sub>3</sub>J = 8.58 Hz, 1 H, 10-*C*), 7.92 (d, <sub>3</sub>J = 7.95 Hz, 1 H, 8-*H*), 8.34 (d, <sub>3</sub>J = 8.07 Hz, 1 H, 11-*H*), 8.76 (bs, 3 H, NH<sub>3</sub>), 12.71 (s, 1 H, NH) ppm.

## Experimenteller Teil

---

**13C-NMR** (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 36.0 (CH<sub>2</sub>), 103.4 (3-C), 119.9 (Ar-C), 120.5 (Ar-C), 120.6 (Ar-C), 121.8 (Ar-C), 123.2 (Ar-C), 123.8 (Ar-C), 125.4 (Ar-C), 128.3 (2-C), 129.8 (13-C), 130.7 (7-C) ppm.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3323, 2953, 2891, 1508, 1481, 1394, 1363, 813, 783, 677

**HRMS** (EI, 70 eV): *m/z* = 196.0999 [MH]<sup>+</sup>, (ber. *m/z* = 196.1001 für C<sub>13</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>2</sub>).

## 10. Literatur

- [1] Z. Fang, C. Grütter, D. Rauh, *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 58–70.
- [2] G. Manning, D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, S. Sudarsanam, *Science* **2002**, *298*, 1912–1934.
- [3] G. Klebe, *Wirkstoffdesign - Entwurf Und Wirkung von Arzneistoffen*, Springer Spektrum, **2009**.
- [4] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Stryer Biochemie*, **2007**.
- [5] R. Bianco, D. Melisi, F. Ciardiello, G. Tortora, *Eur. J. Cancer* **2006**, *42*, 290–294.
- [6] G. L. Johnson, H. G. Dohlman, L. M. Graves, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 325–331.
- [7] M. Deininger, E. Buchdunger, B. J. Druker, *Blood* **2005**, *105*, 2640–2653.
- [8] M. Rabiller, M. Getlik, S. Klüter, A. Richters, S. Tückmantel, J. R. Simard, D. Rauh, *Arch. Pharm. (Weinheim)*. **2010**, *343*, 193–206.
- [9] J. Zhang, P. L. Yang, N. S. Gray, *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9*, 28–39.
- [10] I. Appelmann, R. Liersch, T. Kessler, R. M. Mesters, W. E. Berdel, *Recent Results Cancer Res.* **2010**, *180*, 51–81.
- [11] C.-H. Heldin, B. Westermark, *Physiol Rev* **1999**, *79*, 1283–1316.
- [12] Löffler/Petrides *Biochemie Und Pathobiochemie*, Springer Berlin Heidelberg, **2014**.
- [13] R. Ross, J. Glomset, B. Kariya, L. Harker, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1974**, *71*, 1207–10.
- [14] D. G. Gilbertson, M. E. Duff, J. W. West, J. D. Kelly, P. O. Sheppard, P. D. Hofstrand, Z. Gao, K. Shoemaker, T. R. Bukowski, M. Moore, et al., *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 27406–27414.
- [15] S. Vazquez, U. Anido, M. Lazaro, L. Santome, J. Afonso, O. Fernandez, A. M. Alegria, L. A., in *Oncog. Inflamm. Parasit. Trop. Dis. Lung* (Ed.: J.-M. Kayembe), InTech, **2013**, p. DOI: 10.5772/54309.
- [16] W. Pao, V. Miller, M. Zakowski, J. Doherty, K. Politi, I. Sarkaria, B. Singh, R. Heelan, V. Rusch, L. Fulton, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 13306–11.
- [17] S. Fischer, H. K. Wentsch, S. C. Mayer-Wrangowski, M. Zimmermann, S. M. Bauer, K. Storch, R. Niess, S. C. Koeberle, C. Grütter, F. M. Boeckler, et al., *J. Med. Chem.*

2013, 56, 241–53.

- [18] S. F. Barnett, D. Defeo-Jones, S. Fu, P. J. Hancock, K. M. Haskell, R. E. Jones, J. A. Kahana, A. M. Kral, K. Leander, L. L. Lee, et al., *Biochem. J.* **2005**, 385, 399–408.
- [19] S. K. Rabindran, C. M. Discafani, E. C. Rosfjord, M. Baxter, M. B. Floyd, J. Golas, W. A. Hallett, B. D. Johnson, R. Nilakantan, E. Overbeek, et al., *Cancer Res.* **2004**, 64, 3958–65.
- [20] A. Freitag, S. Laufer, *Nachrichten aus der Chemie* **2015**, 63, 420–425.
- [21] P. Traxler, P. Furet, *Pharmacol. Ther.* **1999**, 82, 195–206.
- [22] J. Schlosser, Dissertation, Tübingen, **2011**.
- [23] L. L. Furge, *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **2008**, 36, 385–385.
- [24] G. Müller, B. Klebl, *Protein Kinases as Drug Targets*, Wiley-VCH, Weinheim; Chichester, **2011**.
- [25] H. S. Meharena, P. Chang, M. M. Keshwani, K. Oruganty, A. K. Nene, N. Kannan, S. S. Taylor, A. P. Kornev, *PLoS Biol.* **2013**, 11, e1001680.
- [26] T. Kouko, K. Matsumura, T. Kawasaki, *Tetrahedron* **2005**, 61, 2309–2318.
- [27] B. Pinchuk, E. Johannes, S. Gul, J. Schlosser, C. Schaechtele, F. Totzke, C. Peifer, *Mar. Drugs* **2013**, 11, 3209–3223.
- [28] E. Johannes, R. Horbert, J. Schlosser, D. Schmidt, C. Peifer, *Tetrahedron Lett.* **2013**, 54, 4067–4072.
- [29] R. Horbert, B. Pinchuk, E. Johannes, J. Schlosser, D. Schmidt, D. Cappel, F. Totzke, C. Schächtele, C. Peifer, *J. Med. Chem.* **2015**, 58, 170–82.
- [30] “kinase.com, Salk Institute, Evolutionary Bioinformatics, Sugen, Inc.” can be found under <http://kinase.com/kinbase>, **2015**.
- [31] K. S. Gajiwala, J. C. Wu, J. Christensen, G. D. Deshmukh, W. Diehl, J. P. DiNitto, J. M. English, M. J. Greig, Y.-A. He, S. L. Jacques, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, 106, 1542–1547.
- [32] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, 46, 3–26.
- [33] V. Sharma, P. Kumar, D. Pathaka, *J. Heterocycl. Chem.* **2010**, 47, 491–502.
- [34] J. Brem, L.-C. Bencze, A. Liljeblad, M. C. Turcu, C. Paizs, F.-D. Irimie, L. T. Kanerva, *European J. Org. Chem.* **2012**, 2012, 3288–3294.

- [35] A. N. Grinev, S. A. Zotova, A. A. Stolyarchuk, V. P. Gaevoi, V. V. Matsak, *Pharm. Chem. J.* **1979**, 13, 44–47.
- [36] D. F. Taber, P. K. Tirunahari, *Tetrahedron* **2011**, 67, 7195–7210.
- [37] M. G. Kadieva, É. T. Oganesyan, *Chem. Heterocycl. Compd.* **1997**, 33, 1245–1258.
- [38] O. Russo, S. Messaoudi, A. Hamze, N. Olivi, J.-F. F. Peyrat, J.-D. D. Brion, S. Sicsic, I. Berque-Bestel, M. Alami, *Tetrahedron* **2007**, 63, 10671–10683.
- [39] X. Chen, S. Zhou, Y. Chen, Z. Dong, Y. Gao, C. Qian, C. He, *Res. Chem. Intermed.* **2012**, 38, 2255–2269.
- [40] J. Schlosser, E. Johannes, M. Zindler, J. Lemmerhirt, B. Sommer, M. Schütt, C. Peifer, *Tetrahedron Lett.* **2015**, 56, 89–94.
- [41] MacroModel, version 10.6, Schrödinger, LLC, New York, NY, **2014**.
- [42] LigPrep, version 3.2, Schrödinger, LLC, New York, NY, **2014**.
- [43] K. S. Watts, P. Dalal, R. B. Murphy, W. Sherman, R. A. Friesner, J. C. Shelley, *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, 50, 534–46.
- [44] R. A. Friesner, J. L. Banks, R. B. Murphy, T. A. Halgren, J. J. Klicic, D. T. Mainz, M. P. Repasky, E. H. Knoll, M. Shelley, J. K. Perry, et al., *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 1739–49.
- [45] R. A. Friesner, R. B. Murphy, M. P. Repasky, L. L. Frye, J. R. Greenwood, T. A. Halgren, P. C. Sanschagrin, D. T. Mainz, *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 6177–96.
- [46] J. R. Greenwood, D. Calkins, A. P. Sullivan, J. C. Shelley, *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2010**, 24, 591–604.
- [47] D. Schmidt, *Bachelorarbeit* **2012**.
- [48] R. Abel, T. Young, R. Farid, B. J. Berne, R. A. Friesner, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 2817–31.
- [49] D. D. Robinson, W. Sherman, R. Farid, *ChemMedChem* **2010**, 5, 618–27.
- [50] H. L. Riley, J. F. Morley, N. A. C. Friend, *J. Chem. Soc.* **1932**, 1875–1883.
- [51] M. Suzuki, T. Iwasaki, K. Matsumoto, K. Okumura, *Synth. Commun.* **1972**, 2, 237–242.
- [52] S. Tranchimand, T. Tron, C. Gaudin, G. Iacazio, *Synth. Commun.* **2006**, 36, 587–597.
- [53] R. Brückner, *Reaktionsmechanismen: Organische Reaktionen, Stereochemie, Moderne Synthesemethoden*, Springer Berlin Heidelberg, **2004**.

- [54] D. T. Davies, *Aromatische Heterocyclen*, VCH, Weinheim; New York; Basel; Cambridge; Tokyo, **1995**.
- [55] F. Y. Miyake, K. Yakushijin, D. A. Horne, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 941–943.
- [56] P. A. Glossop, C. A. L. Lane, *Novel Compounds Active as Muscarinic Receptor Antagonists*, **2010**, WO2010007561.
- [57] J. R. Dunetz, Y. Xiang, A. Baldwin, J. Ringling, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 5048–5051.
- [58] E. Frérot, J. Coste, A. Pantaloni, M.-N. Dufour, P. Jouin, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 259–270.
- [59] L. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397–4398.
- [60] W. Engen, T. E. O'Brien, B. Kelly, J. Do, L. Rillera, L. K. Stapleton, J. F. Youngren, M. O. Anderson, *Bioorganic Med. Chem.* **2010**, *18*, 5995–6005.
- [61] Y. Zhang, M. Anderson, J. L. Weisman, M. Lu, C. J. Choy, V. A. Boyd, J. Price, M. Sigal, J. Clark, M. Connelly, et al., *ACS Med. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 460–465.
- [62] D. Liu, Z. Tian, Z. Yan, L. Wu, Y. Ma, Q. Wang, W. Liu, H. Zhou, C. Yang, *Bioorganic Med. Chem.* **2013**, *21*, 2960–2967.
- [63] M. Makosza, J. Golinski, J. Baran, *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 1488–1494.
- [64] L. Schwarz, U. Girreser, B. Clement, *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 3322–3324.
- [65] C. Renn, *Masterarbeit 2015*.
- [66] P. Guo, B. Hu, W. Gu, L. Xu, D. Wang, H.-J. S. Huang, W. K. Cavenee, S.-Y. Cheng, *Am. J. Pathol.* **2003**, *162*, 1083–1093.
- [67] P. B. Fai, A. Grant, *Chemosphere* **2009**, *74*, 1165–1170.
- [68] H. Motulsky, A. Christopoulos, *Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression*, Oxford University Press, Oxford; New York, **2004**.
- [69] B. Pinchuk, *Masterarbeit 2014*.
- [70] Promega, “Introducing Complete Kinase Activity Assays with ADP-Glo™ Kinase Assay, Online veröffentlicht auf: [www.promega.de](http://www.promega.de),” **2015**.
- [71] J.-C. Chambard, R. Lefloch, J. Pouysségur, P. Lenormand, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **2007**, *1773*, 1299–1310.
- [72] H. Fujiwara, T. Yamakuni, M. Ueno, M. Ishizuka, T. Shinkawa, T. Isobe, Y. Ohizumi, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2004**, *310*, 1288–95.

- [73] “DiscoveRx Corporation. Webpage. Online veröffentlicht: <http://www.discoverx.com/technologies-platforms/competitive-binding-technology/kinomescan-technology-platform>,” **2015**.
- [74] W. G. Roberts, P. M. Whalen, E. Soderstrom, G. Moraski, J. P. Lyssikatos, H.-F. Wang, B. Cooper, D. A. Baker, D. Savage, D. Dalvie, et al., *Cancer Res.* **2005**, *65*, 957–966.
- [75] H. Iwata, S. Imamura, A. Hori, M. S. Hixon, H. Kimura, H. Miki, *Biochemistry* **2011**, *50*, 738–51.
- [76] W. Sherman, T. Day, M. P. Jacobson, R. A. Friesner, R. Farid, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 534–553.
- [77] G. Reiterer, A. Yen, *Cancer Res.* **2007**, *67*, 7765–7772.
- [78] G. Housman, S. Byler, S. Heerboth, K. Lapinska, M. Longacre, N. Snyder, S. Sarkar, *Cancers (Basel)*. **2014**, *6*, 1769–1792.
- [79] S. Modok, H. R. Mellor, R. Callaghan, *Curr. Opin. Pharmacol.* **2006**, *6*, 350–354.
- [80] I. Beis, E. A. Newsholme, *Biochem. J.* **1975**, *152*, 23–32.
- [81] H. G. Bull, N. A. Thornberry, M. H. Cordes, A. A. Patchett, E. H. Cordes, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 2952–2962.
- [82] R. Horbert, B. Pinchuk, P. Davies, D. Alessi, C. Peifer, *ACS Chem. Biol.* **2015**, ASAP DOI: 10.1021/acschembio.5b00174.
- [83] M. Zindler, B. Pinchuk, C. Renn, R. Horbert, A. Döbber, C. Peifer, *ChemMedChem* **2015**, 1335–1338.
- [84] P. Klán, T. Šolomek, C. G. Bochet, A. Blanc, R. Givens, M. Rubina, V. Popik, A. Kostikov, J. Wirz, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 119–191.
- [85] B. W. Stewart, *World Cancer Report*, IARC Press, Lyon France, **2014**.
- [86] A. Loudet, K. Burgess, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4891–4932.
- [87] P. P. Goswami, A. Syed, C. L. Beck, T. R. Albright, K. M. Mahoney, R. Unash, E. a Smith, A. H. Winter, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 3783–3786.
- [88] Destatis, “Pressemitteilung Nr. 034 vom 02.02.2015,” kann gefunden werden unter [https://www.destatis.de/DE/PresseService/Presse/Pressemitteilungen/2015/02/PD15\\_034\\_232.html](https://www.destatis.de/DE/PresseService/Presse/Pressemitteilungen/2015/02/PD15_034_232.html), **2015**.

## 11. Anhang

### 11.1 Selektivitätsprofil der Fa. ProQinase

#	Kinase	Kinase	Verbindung 1	Verbindung 2
	Name	Family		
			1 μM	1 μM
1	ABL1	TK	64	96
2	ABL2	TK	61	108
3	ACK1	TK	84	82
4	ACV-R1	TKL	13	97
5	ACV-R1B	TKL	90	107
6	ACV-R2A	TKL	65	105
7	ACV-R2B	TKL	11	94
8	ACV-RL1	TKL	16	107
9	AKT1	AGC	96	103
10	AKT2	AGC	103	104
11	AKT3	AGC	101	104
12	ALK (GST-HIS-tag)	TK	85	95
13	AMPK-alpha1 aa1-550	CAMK	93	101
14	ARK5	CAMK	41	125
15	ASK1	STE	106	96
16	Aurora-A	OTHER	79	92
17	Aurora-B	OTHER	84	100
18	Aurora-C	OTHER	93	95
19	AXL	TK	57	112
20	BLK	TK	43	133
21	BMPR1A	TKL	61	108
22	BMX	TK	103	110
23	B-RAF	TKL	100	112
24	BRK	TK	92	149
29	CAMK2B	CAMK	79	79
30	CAMK2D	CAMK	86	101
31	CAMK4	CAMK	116	118
32	CAMKK1	OTHER	96	108
33	CAMKK2	OTHER	64	101
34	CDC42BPA	AGC	85	104
35	CDC42BPB	AGC	101	100
36	CDK1/CycA2	CMGC	86	94
37	CDK1/CycB1	CMGC	79	104
38	CDK1/CycE1	CMGC	92	99
39	CDK2/CycA2	CMGC	64	115
40	CDK2/CycE1	CMGC	85	98

#	Kinase	Kinase	Verbindung 1	Verbindung 2
	Name	Family		
			1 μM	1 μM
41	CDK3/CycE1	CMGC	114	140
42	CDK4/CycD1	CMGC	79	105
43	CDK4/CycD3	CMGC	106	115
44	CDK5/p25NCK	CMGC	71	105
45	CDK5/p35NCK	CMGC	49	94
46	CDK6/CycD1	CMGC	88	88
47	CDK7/CycH/MAT1	CMGC	104	107
48	CDK8/CycC	CMGC	79	97
49	CDK9/CycK	CMGC	75	108
50	CDK9/CycT1	CMGC	97	101
51	CHK1	CAMK	110	134
52	CHK2	CAMK	88	100
53	CK1-alpha1	CK1	102	88
54	CK1-delta	CK1	79	85
55	CK1-epsilon	CK1	85	90
56	CK1-gamma1	CK1	86	102
57	CK1-gamma2	CK1	75	95
58	CK1-gamma3	CK1	78	98
59	CK2-alpha1	OTHER	84	95
60	CK2-alpha2	OTHER	87	100
61	CLK1	CMGC	24	99
62	CLK2	CMGC	12	99
63	CLK3	CMGC	80	96
64	CLK4	CMGC	5	94
65	COT	STE	108	105
66	CSF1-R	TK	28	92
67	CSK	TK	99	101
68	DAPK1	CAMK	15	78
69	DAPK2	CAMK	25	97
70	DAPK3	CAMK	21	94
71	DCAMKL2	CAMK	122	93
72	DDR2	TK	82	79
73	DMPK	AGC	98	103
74	DNA-PK	ATYP	74	92
75	DYRK1A	CMGC	43	110
76	DYRK1B	CMGC	16	100
77	DYRK2	CMGC	9	102
78	DYRK3	CMGC	20	93
79	DYRK4	CMGC	50	115
80	EEF2K	ATYPICAL	99	105
81	EGF-R	TK	97	78
82	EIF2AK2	OTHER	84	95

#	Kinase	Kinase	Verbindung 1	Verbindung 2
	Name	Family		
			1 μM	1 μM
83	EIF2AK3	OTHER	107	99
84	EPHA1	TK	106	120
85	EPHA2	TK	103	123
86	EPHA3	TK	104	124
87	EPHA4	TK	104	107
88	EPHA5	TK	97	98
89	EPHA7	TK	92	111
90	EPHA8	TK	104	110
91	EPHB1	TK	97	127
92	EPHB2	TK	86	112
93	EPHB3	TK	107	121
94	EPHB4	TK	80	142
95	ERBB2	TK	96	103
96	ERBB4	TK	88	112
97	ERK1	CMGC	91	98
98	ERK2	CMGC	89	90
99	ERK7	CMGC	71	102
100	FAK aa2-1052	TK	97	96
101	FER	TK	66	116
102	FES	TK	71	119
103	FGF-R1	TK	83	115
104	FGF-R2	TK	39	110
105	FGF-R3	TK	69	135
106	FGF-R4	TK	90	110
107	FGR	TK	36	105
108	FLT3	TK	16	100
109	FRK	TK	65	108
110	FYN	TK	53	130
111	GRK2	AGC	97	98
112	GRK3	AGC	87	91
113	GRK4	AGC	85	100
114	GRK5	AGC	79	95
115	GRK6	AGC	85	86
116	GRK7	AGC	88	89
117	GSG2	OTHER	74	106
118	GSK3-alpha	CMGC	66	99
119	GSK3-beta	CMGC	67	98
120	HCK	TK	56	133
121	HIPK1	CMGC	42	101
122	HIPK2	CMGC	34	112
123	HIPK3	CMGC	51	129
124	HIPK4	CMGC	5	94

#	Kinase	Kinase	Verbindung 1	Verbindung 2
	Name	Family		
			1 μM	1 μM
125	HRI	OTHER	103	106
126	IGF1-R	TK	85	121
127	IKK-alpha	OTHER	66	99
128	IKK-beta	OTHER	104	133
129	IKK-epsilon	OTHER	80	104
130	INS-R	TK	95	113
131	INSR-R	TK	109	111
132	IRAK1	TKL	91	97
133	IRAK4 (untagged)	TKL	43	110
134	ITK	TK	46	106
135	JAK1	TK	103	100
136	JAK2	TK	97	95
137	JAK3	TK	91	101
138	JNK1	CMGC	99	96
139	JNK2	CMGC	99	104
140	JNK3	CMGC	74	88
141	KIT	TK	42	93
142	LCK	TK	53	128
143	LIMK1	TKL	75	108
144	LIMK2	TKL	119	122
145	LRRK2	TKL	12	97
146	LTK	TK	92	113
147	LYN	TK	54	100
148	MAP3K1	STE	95	103
149	MAP3K10	STE	114	91
150	MAP3K11	STE	68	105
151	MAP3K7/MAP3K7IP1	STE	59	110
152	MAP3K9	STE	89	97
153	MAP4K2	STE	74	99
154	MAP4K4	STE	57	96
155	MAP4K5	STE	78	101
156	MAPKAPK2	CAMK	72	86
157	MAPKAPK3	CAMK	103	106
158	MAPKAPK5	CAMK	82	122
159	MARK1	CAMK	115	87
160	MARK2	CAMK	95	111
161	MARK3	CAMK	99	98
162	MARK4	CAMK	96	109
163	MATK	TK	108	144
164	MEK1	STE	69	80
165	MEK2	STE	57	92
166	MEKK2	STE	75	96

#	Kinase	Kinase	Verbindung 1	Verbindung 2
	Name	Family		
			1 μM	1 μM
167	MEKK3	STE	79	90
168	MELK	CAMK	15	97
169	MERTK	TK	44	143
170	MET	TK	101	106
171	MINK1	STE	63	103
172	MKK6 S207D/T211D**	STE	102	97
173	MKNK1	CAMK	65	88
174	MKNK2	CAMK	70	92
175	MST1	STE	38	110
176	MST2	STE	36	104
177	MST3	STE	95	106
178	MST4	STE	112	115
179	mTOR	ATYPICAL	101	101
180	MUSK	TK	78	103
181	MYLK	CAMK	70	67
182	MYLK2	CAMK	83	97
183	MYLK3	CAMK	74	96
184	NEK1	OTHER	99	107
185	NEK11	OTHER	104	119
186	NEK2	OTHER	93	103
187	NEK3	OTHER	87	97
188	NEK4	OTHER	105	98
189	NEK6	OTHER	111	104
190	NEK7	OTHER	82	112
191	NEK9	OTHER	105	106
192	NIK	STE	105	123
193	NLK	CMGC	75	97
194	p38-alpha	CMGC	94	109
195	p38-beta	CMGC	106	103
196	p38-delta	CMGC	93	128
197	p38-gamma	CMGC	99	91
198	PAK1	STE	103	97
199	PAK2	STE	152	97
200	PAK3	STE	97	95
201	PAK4	STE	99	106
202	PAK6	STE	91	91
203	PAK7	STE	72	113
204	PASK	CAMK	73	121
205	PBK	OTHER	93	121
206	PCTAIRE1/CycY	CMGC	88	97
207	PDGFR-alpha	TK	59	46
208	PDGFR-beta	TK	1	18

#	Kinase	Kinase	Verbindung 1	Verbindung 2
	Name	Family		
			1 μM	1 μM
209	PDK1	AGC	89	99
210	PHKG1	CAMK	72	98
211	PHKG2	CAMK	93	91
212	PIM1	CAMK	77	103
213	PIM2	CAMK	78	94
214	PIM3	CAMK	22	93
215	PKA	AGC	103	79
216	PKC-alpha	AGC	103	115
217	PKC-beta1	AGC	96	102
218	PKC-beta2	AGC	97	110
219	PKC-delta	AGC	108	98
220	PKC-epsilon	AGC	103	115
221	PKC-eta	AGC	103	88
222	PKC-gamma	AGC	101	101
223	PKC-iota	AGC	106	104
224	PKC-mu	AGC	101	132
225	PKC-nu	AGC	96	119
226	PKC-theta	AGC	100	108
227	PKC-zeta	AGC	100	99
228	PLK1	OTHER	109	107
229	PLK3	OTHER	98	111
230	PRK1	AGC	97	104
231	PRK2	AGC	91	99
232	PRKD2	CAMK	103	98
233	PRKG1	AGC	100	94
234	PRKG2	AGC	88	93
235	PRKX	AGC	64	84
236	PYK2	TK	86	118
237	RAF1 Y340D/Y341D	TKL	112	97
238	RET	TK	5	10
239	RIPK2	TKL	9	99
240	RIPK5	TKL	99	103
241	ROCK1	AGC	94	96
242	ROCK2	AGC	92	98
243	RON	TK	110	126
244	ROS	TK	91	101
245	RPS6KA1	AGC	42	104
246	RPS6KA2	AGC	33	99
247	RPS6KA3	AGC	27	99
248	RPS6KA4	AGC	101	109
249	RPS6KA5	AGC	104	116
250	RPS6KA6	AGC	16	99

#	Kinase	Kinase	Verbindung 1	Verbindung 2
	Name	Family		
			1 μM	1 μM
251	S6K	AGC	96	117
252	S6K-beta	AGC	113	99
253	SAK	OTHER	58	99
254	SGK1	AGC	71	104
255	SGK2	AGC	109	96
256	SGK3	AGC	113	131
257	SLK	STE	85	103
258	SNARK	CAMK	86	100
259	SNF1LK2	CAMK	43	97
260	SNK	OTHER	97	112
261	SRC (GST-HIS-tag)	TK	49	99
262	SRMS	TK	99	110
263	SRPK1	CMGC	112	113
264	SRPK2	CMGC	120	111
265	STK17A	CAMK	78	116
266	STK23	CAMK	106	107
267	STK25	STE	93	94
268	STK33	CAMK	81	90
269	STK39	STE	100	95
270	SYK aa1-635	TK	110	114
271	TAOK2	STE	91	97
272	TAOK3	STE	92	105
273	TBK1	OTHER	73	107
274	TEC	TK	101	106
275	TGFB-R1	TKL	104	100
276	TGFB-R2	TKL	28	89
277	TIE2	TK	92	115
278	TLK1	AGC	74	93
279	TLK2	AGC	98	88
280	TRK-A	TK	44	104
281	TRK-B	TK	50	142
282	TRK-C	TK	36	111
283	TSF1	OTHER	79	112
284	TSK2	CAMK	104	92
285	TSSK1	CAMK	84	130
286	TTK	OTHER	70	132
287	TXK	TK	71	95
288	TYK2	TK	73	105
289	TYRO3	TK	96	118
290	VEGF-R1	TK	52	65
291	VEGF-R2	TK	21	5
292	VEGF-R3	TK	41	82

#	Kinase	Kinase	Verbindung 1	Verbindung 2
	Name	Family		
			1 μM	1 μM
293	VRK1	CK1	106	106
294	WEE1	OTHER	104	89
295	WNK1	OTHER	103	105
296	WNK2	OTHER	91	96
297	WNK3	OTHER	97	116
298	YES	TK	54	109
299	ZAK	TKL	72	123
300	ZAP70	TK	104	116
			S <sub>50</sub> = 0.16	S <sub>50</sub> = 0.013

## 11.2 Selektivitätsprofil der Fa. DiscoveRx

Target	Verbindung 1 DiscoveRx	Verbindung 2 DiscoveRx
Gene Symbol	% Ctrl 1μM	% Ctrl 1μM
ABL1(E255K)-phosphorylated	20	85
ABL1(T315I)-phosphorylated	53	99
ABL1-nonphosphorylated	30	0,6
ABL1-phosphorylated	30	67
ACVR1B	89	96
ADCK3	98	96
AKT1	100	98
AKT2	100	100
ALK	100	100
AURKA	7	75
AURKB	17	100
AXL	13	33
BMPR2	96	100
BRAF	100	100
BRAF(V600E)	100	100
BTK	100	93
CDK11	77	63
CDK2	93	94
CDK3	94	93
CDK7	25	100
CDK9	92	94
CHEK1	87	77
CSF1R	22	0
CSNK1D	81	93

Target	Verbindung 1 DiscoveRx	Verbindung 2 DiscoveRx
Gene Symbol	% Ctrl 1µM	% Ctrl 1µM
CSNK1G2	61	100
DCLK1	97	94
DYRK1B	0	53
EGFR	90	73
EGFR(L858R)	81	69
EPHA2	95	100
ERBB2	97	79
ERBB4	88	100
ERK1	100	100
FAK	89	94
FGFR2	83	83
FGFR3	100	100
FLT3	1,3	8,2
GSK3B	100	100
IGF1R	99	100
IKK-alpha	90	100
IKK-beta	89	100
INSR	81	88
JAK2(JH1domain-catalytic)	90	96
JAK3(JH1domain-catalytic)	35	100
JNK1	39	85
JNK2	57	85
JNK3	46	100
KIT	2,6	0
KIT(D816V)	0,45	30
KIT(V559D,T670I)	34	6,2
LKB1	89	100
MAP3K4	86	89
MAPKAPK2	100	100
MARK3	99	91
MEK1	100	100
MEK2	100	100
MET	100	100
MKNK1	100	93
MKNK2	59	100
MLK1	100	100
p38-alpha	100	85
p38-beta	75	75
PAK1	70	100

Anhang

Target	Verbindung 1 DiscoveRx	Verbindung 2 DiscoveRx
Gene Symbol	% Ctrl 1μM	% Ctrl 1μM
PAK2	46	96
PAK4	56	95
PCTK1	100	100
PDGFRA	6,3	0
PDGFRB	0,7	0
PDPK1	99	99
PIK3C2B	48	73
PIK3CA	43	90
PIK3CG	0,7	48
PIM1	67	100
PIM2	54	100
PIM3	18	100
PRKACA	100	100
PLK1	88	89
PLK3	100	100
PLK4	4,5	98
PRKCE	95	100
RAF1	100	97
RET	2	0
RIOK2	100	100
ROCK2	89	100
RSK2	35	100
SNARK	26	100
SRC	43	100
SRPK3	100	100
TGFBR1	92	86
TIE2	68	81
TRKA	10	59
TSSK1B	100	100
TYK2	43	100
ULK2	97	95
VEGFR2	55	0,35
YANK3	100	100
ZAP70	100	100
	$S_{50} = 0.22$	$S_{50} = 0.11$



## Zusammenfassung

Laut Statistischem Bundesamt war Krebs im Jahr 2013 nach den Herz-Kreislauferkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland.<sup>[88]</sup> Eine Behandlungsmöglichkeit stellt die Chemotherapie dar, wobei neben den klassischen Zytostatika seit der Erstzulassung von Imatinib (Glivec<sup>®</sup>) im Jahr 2001 auch Kinaseinhibitoren eingesetzt werden. Bei einer Vielzahl der aktuell zugelassenen Kinaseinhibitoren handelt es sich um Typ-I-Inhibitoren, die kompetitiv zu ATP in der Zielkinase binden. Aufgrund der konservierten Struktur der ATP-Bindetasche der unterschiedlichen Kinasen kann es während der Behandlung mit Kinaseinhibitoren, z.B. aus Mangel an Selektivität, zu Nebenwirkungen kommen. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit neben den Typ-I- auch Typ-II-Inhibitoren, die nicht ATP-kompetitiv in die Zielkinase binden, entwickelt.

In der vorliegenden Arbeit wurden 3,5-Diarylpyrazin-2-one als PDGFR $\beta$ -Kinaseinhibitoren ( $DFG_{in/out}$ ) designt, synthetisiert und anschließend biochemisch in einem Proliferationsassay an der U87-MG-Zelllinie untersucht. Anhand der Ergebnisse des Proliferationsassays wurden zwei Verbindungen aufgrund ihrer biologischen Aktivität für weitere biochemische Charakterisierung wie Kinaseassay, Western Blot und Aufnahmen des Selektivitätsprofils ausgewählt. Im Verlauf dieser Untersuchungen erwies sich der ausgewählte  $DFG_{out}$ -Inhibitor als hoch potent und selektiv gegenüber PDGFR $\beta$ . Der Vergleich der beiden Systeme miteinander zeigte, dass der  $DFG_{out}$ -Inhibitor aufgrund der zusätzlichen Adressierung der tiefen Tasche der inaktiven Konformation des PDGFR $\beta$  ( $DFG_{out}$ ) eine stärkere antiproliferative Wirkung, eine höhere Selektivität und eine langsamere On-/Off-Kinetik im Vergleich zu dem  $DFG_{in}$ -Inhibitor aufweist. Somit könnten die Ergebnisse dieser Arbeit dazu beitragen, einen neuartigen, hoch selektiven und potenteren PDGFR $\beta$ -Inhibitor als Wirkstoff gegen Krebs zu entwickeln.

## Abstract

According to the Federal Statistical Office of Germany (Destatis) in 2013, cancer was the second most common cause of death in Germany. Chemotherapy is one option for the treatment of cancer. Since the introduction of Imatinib (Glivec<sup>®</sup>) into cancer therapy in 2001, kinase inhibitors are used in addition to classic cytotoxic drugs. Most of the approved kinase inhibitors are type-I-binders ( $\text{DFG}_{\text{in}}$ ), which bind to the target competitively to ATP. During the treatment, side effects may occur due to small structural differences of the conserved ATP binding pocket, causing low selectivity. With this background the type-I und type-II inhibitors, which are binding to the target noncompetitively to ATP, were developed in this work.

In the present work 3,5-diarylpyrazin-2-ones were designed as PDGFR $\beta$  kinase inhibitors ( $\text{DFG}_{\text{in/out}}$ ), synthesized and biochemically examined in a proliferation assay against U87-MG cells. In light of the results of the biological studies, two compounds were selected for further investigations like kinase assays, western blot analysis and selectivity profiling. Herein, the highly potent and remarkably selective  $\text{DFG}_{\text{out}}$  inhibitor **2** was found. The comparison of both systems showed that in contrast to the  $\text{DFG}_{\text{in}}$  inhibitor, the  $\text{DFG}_{\text{out}}$  inhibitor offered higher selectivity, a stronger cytotoxic effect and slower on/off kinetics caused by an interaction with the deep pocket of the target kinase.

Consequently, the results of this study might provide a basis for the development of novel cancer agents.

## Danksagung

Zuallererst möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. Christian Peifer für die Aufnahme in den Arbeitskreis und die Vergabe des hochinteressanten Themas sowie für die sehr gute Betreuung und Unterstützung während der gesamten Zeit bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Rainer Herges bedanke ich mich für das Übernehmen des Zweitgutachtens.

Herrn Dr. Ulrich Girreser, Prof. Dr. Frank Sönnichsen und deren Team danke ich für die Aufnahme der NMR- und Massenspektren und die Unterstützung bei verschiedensten Fragestellungen.

Mein Dank geht auch an Sven Wichmann, Kalle (Karl Willi Bock) und Dirk Böhme für die Pflege und die Reparaturen der Geräte und Apparaturen.

Ein großes und herzliches Dankeschön geht an Martin Schütt für seine uneingeschränkte Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei chemischen und technischen Fragen. Außerdem möchte ich mich für viele lustige Gespräche und sein immer offenes Ohr für jegliche Probleme bedanken.

Bei meinem gesamten Arbeitskreis (Joe, Sebastian, Rebecca, Jakob, Alex, Boris, Dorian, Lydia, Miri, Melli und natürlich Martin) möchte ich mich herzlich für die sehr gute Zusammenarbeit, eine sehr angenehme Atmosphäre und für eine unvergessliche Zeit bedanken. Ein besonderer Dank geht an Rebecca, Jakob, Boris und Dorian für das schnelle und aufmerksame Korrekturlesen meiner Arbeit. Bei Rebecca und Jakob bedanke ich mich zusätzlich für die lustige und herzliche Atmosphäre in unserem Büro.

Ebenso danke ich Dorian Schmidt, der im Rahmen seiner Bachelorarbeit bei der Optimierung der DFG<sub>in</sub>-Serie mitgearbeitet hat. In dem Sinne möchte ich mich auch bei Christian Renn für die Durchführung der biologischen Untersuchungen bedanken, die er im Rahmen seiner Masterarbeit durchgeführt hat.

Bei Chris, Janis, Martin, Rebecca, Tamara und André möchte ich mich für die tolle, unkomplizierte und amüsante Zeit während der Praktikumsbetreuung des 2. Semesters bedanken.

## Danksagung

---

Bei meinen Kollegen Chris, Birte, Sweta, Julia, Björn, Janis, Tamara, Tineke, Laura, Carmen, Lena und Lukas möchte ich mich für die herzliche Aufnahme am Institut bedanken.

Ich bedanke mich auch bei allen meinen Freunden für die zahlreichen Unternehmungen während der Promotionszeit. Ein besonderer Dank geht an Jan für seine stete Hilfsbereitschaft.

Ein herzliches Dankeschön gilt Klaus für das Korrekturlesen und seine sehr hilfreichen Anmerkungen.

Ich möchte mich auch bei Mirko, Christian und Boris für die zahlreichen Angelausflüge und die schöne Zeit auf dem Wasser bedanken.

Mein allergrößter Dank gilt meinen Eltern, meinem Bruder, meiner lieben Freundin Chrissi und natürlich Gudrun und Klaus, die mich in jeglicher Hinsicht unterstützen und mir mit ihrer Liebe viel Kraft geben.

## Erklärung zu §8 Abs. 1 der Promotionsordnung

Der Inhalt dieser Abhandlung wurde, abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer, selbstständig von mir erarbeitet und in dieser Form zusammengestellt. Die Arbeit hat an keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen. Teilergebnisse dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### Fachzeitschriften:

1. E. Johannes, R. Horbert, J. Schlosser, D. Schmidt, C. Peifer, *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 4067–4072.
2. B. Pinchuk, E. Johannes, S. Gul, J. Schlosser, C. Schaechtele, F. Totzke, C. Peifer, *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 3209–3223.
3. J. Schlosser, E. Johannes, M. Zindler, J. Lemmerhirt, B. Sommer, M. Schütt, C. Peifer, *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 89–94.
4. R. Horbert, B. Pinchuk, E. Johannes, J. Schlosser, D. Schmidt, D. Cappel, F. Totzke, C. Schächtele, C. Peifer, *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 170–82.

### Poster:

1. E. Johannes, J. Schlosser M. Zindler, M. Schütt, C. Peifer „Novel synthesis of benzofuran- and indol-2-yl-methanamine derivatives“, 16<sup>th</sup> Tetrahedron Symposium **2015**, Berlin, Deutschland.

Kiel, 20.08.2015

Eugen Johannes