

Design, Synthese und Charakterisierung photoschaltbarer Kinaseinhibitoren

Dissertation

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

vorgelegt von

Dorian Schmidt

Kiel 2019

Dekan:	Prof. Dr. Frank Kempken
Erster Gutachter:	Prof. Dr. Christian Peifer
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Rainer Herges
Tag der mündlichen Prüfung:	19.12.2019
Zum Druck genehmigt:	19.12.2019

KURZZUSAMMENFASSUNG

Ziel der Photopharmakologie ist die Entwicklung lichtempfindlicher Wirkstoffe, die sich durch Bestrahlung temporär und lokal aktivieren bzw. deaktivieren lassen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden photoschaltbare niedermolekulare Kinaseinhibitoren entwickelt, die eine lichtinduzierte *E/Z*-Isomerisierung eingehen können. Die Inhibitoren sind dabei so konzipiert, dass sie in der *E*-Konfiguration an ihr Target binden können und in der *Z*-Konfiguration idealerweise nicht binden können. Als molekulare Schalter wurden stilbenähnliche Systeme, Azobenzole sowie verbrückte Azobenzole (Diazocine) verwendet.

Zunächst wurde der zugelassene Kinaseinhibitor Axitinib (Inlyta[®], Pfizer) hinsichtlich seiner Eignung als photoschaltbarer Inhibitor untersucht. Axitinib hemmt die Rezeptortyrosinkinase VEGFR2 und ist zur Behandlung des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms zugelassen. Interessanterweise weist die Molekülstruktur einen stilbenähnlichen Rest auf, der bei Bestrahlung mit Licht isomerisieren kann. Diese Isomerisierung kann dazu genutzt werden, die biologische Aktivität von Axitinib zu regulieren. In der *E*-Konfiguration stellt die Verbindung einen potenten VEGFR2-Inhibitor mit einem IC₅₀-Wert von 19 nM dar. In der *Z*-Konfiguration ist die Wirkung hingegen um das 43-fache verringert. In einem *in vitro* VEGFR2 Kinaseassay konnte gezeigt werden, dass durch gezielte Bestrahlung von (*Z*)-Axitinib mit 385 nm die biologische Wirkung von (*E*)-Axitinib zum Großteil wiederhergestellt werden kann. Auch in einem Zellproliferationsassay mit humanen Endothelzellen (HUVECs) konnte eine gezielte Photoaktivierung durch Bestrahlung von (*Z*)-Axitinib demonstriert werden. Allerdings ist diese Photoaktivierung irreversibel, da es bei Bestrahlung des *E*-Isomers in wässriger Lösung zu einer konkurrierenden [2+2]-Cycloaddition kommt.

Um reversibel photoschaltbare Kinaseinhibitoren zu erhalten, wurden daher mit Hilfe von strukturbasiertem Wirkstoffdesign diazocinfunktionalisierte Axitinibderivate entwickelt. Für die Synthese dieser Derivate wurde eine Stannylierung mit anschließender Stille-Kupplung von monohalogenierten Diazocinen etabliert. Auf diese Weise konnten drei diazocinfunktionalisierte Inhibitoren synthetisiert, charakterisiert und biologisch evaluiert werden. Für die beste Verbindung konnte in einem *in vitro* VEGFR2 Kinaseassay ein mehr als 47-facher Wirkunterschied zwischen bestrahlter und unbestrahlter Verbindung demonstriert werden. So wurde in der thermodynamisch stabilen *Z*-Konfiguration keine Kinasehemmung beobachtet, während nach Bestrahlung mit blauem Licht (405 nm) eine starke Inhibition mit einem IC₅₀-Wert von 215 nM nachgewiesen werden konnte. Auf

zellulärer Ebene konnten hingegen nur geringe Wirkunterschiede zwischen unbestrahlter und bestrahlter Verbindung gezeigt werden.

In einem weiteren Projekt wurden photoschaltbare Derivate der zugelassenen Kinaseinhibitoren Imatinib (Glivec®, Novartis) und Nilotinib (Tasigna®, Novartis) synthetisiert. Diese beiden strukturell verwandten Inhibitoren sind zur Behandlung von chronisch myeloischer Leukämie (CML) zugelassen und hemmen u.a. die Tyrosinkinase BCR-ABL sowie PDGFR β . Um die Verbindungen photoschaltbar zu machen, wurde ein *N*-Arylbenzamid-Rest der Moleküle durch einen entsprechenden Azobenzol-Photoschalter ersetzt. Für die so erhaltenen Verbindungen "Azoimatinib" und "Azonilotinib" konnte zwar eine reversible Photoschaltung demonstriert werden, allerdings wurde in verschiedenen *in vitro* Kinaseassays aufgrund der veränderten Molekülstruktur keine nennenswerte Kinasehemmung beobachtet. Für zwei weitere photoschaltbare Derivate, bei denen die genannte *N*-Arylbenzamid-Struktur erhalten wurde, konnte zwar zum Teil eine hohe Kinase-Inhibition gezeigt werden, allerdings konnte keine Photoregulation der Wirkung nachgewiesen werden.

ABSTRACT

The goal of photopharmacology is to develop light responsive active pharmaceutical ingredients (API) that can be spatiotemporally activated and deactivated by light. In this study, photoswitchable small molecule kinase inhibitors (SMKI) have been synthesized and characterized. These molecules can undergo a photoinduced *E/Z* isomerization and are designed to be pharmacologically inactive in the *Z* configuration, but pharmacologically active in the *E* configuration. As molecular switches stilbene-like systems, azobenzenes and bridged azobenzenes (diazocines) have been utilized.

First, the applicability of the approved kinase inhibitor axitinib (Inlyta[®], Pfizer) as a photoswitchable inhibitor has been investigated. Axitinib targets the receptor tyrosine kinase VEGFR2 and is licensed for second-line therapy of advanced renal cell carcinoma (RCC). Interestingly, axitinib possesses a stilbene-like moiety allowing for light-induced *E/Z* isomerization. This feature can be used to control the biological activity of axitinib. In the *E* configuration axitinib is a highly potent VEGFR2 inhibitor with an IC₅₀ value of 19 nM, whereas (*Z*)-axitinib is about 43 times less active. In an *in vitro* VEGFR2 kinase assay it was possible to restore the biological activity of (*E*)-axitinib by irradiating (*Z*)-axitinib with UV light (385 nm). An activation of (*Z*)-axitinib by irradiation could also be demonstrated in a human umbilical vein cell (HUVEC) proliferation assay. However, in aqueous solution this photoactivation is irreversible due to a competing [2+2]-cycloaddition of the *E* isomer.

To obtain reversibly photoswitchable kinase inhibitors diazocine-functionalized derivatives of axitinib have been developed by structure-based drug design. For the synthesis of the target molecules a stannylation and a Stille cross-coupling of mono-halogenated diazocines was established. In total three diazocine-functionalized inhibitors have been synthesized, photochemically characterized and tested in an *in vitro* VEGFR2 kinase assay. For the best compound a 47-fold increase in activity could be demonstrated upon irradiation. While the thermodynamically stable *Z* configuration showed no VEGFR2 inhibition, irradiation of the compound with blue light (405 nm) resulted in high VEGFR2 inhibition with an IC₅₀ value of 215 nM. However, in a cell proliferation assay only minor differences could be observed before and after irradiation.

Moreover, photoswitchable derivatives of the approved kinase inhibitors Imatinib (Gleevec[®], Novartis) und Nilotinib (Tasigna[®], Novartis) have been synthesized and characterized. These inhibitors are licensed for chronic myelogenous leukemia (CML) and target the tyrosine kinases BCR-ABL and PDGFR β . In both cases an *N*-phenylbenzamide moiety has been replaced by a corresponding azobenzene. The resulting derivatives "azoimatinib" and "azonilotinib" are reversibly switchable,

however, no kinase inhibition could be demonstrated in different *in vitro* assays. Two additional photoswitchable derivatives with retained *N*-phenylbenzamide moiety showed high activities in an *in vitro* PDGFR β assay, but no activity differences could be observed upon irradiation.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 Photopharmakologie	1
1.1.1 Photoschalter.....	4
1.1.2 Photoschaltbare Wirkstoffe.....	12
1.2 Proteinkinasen.....	17
1.2.1 Struktureller Aufbau der Kinasedomäne	18
1.2.2 Rezeptortyrosinkinasen	20
1.2.3 <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> Rezeptoren (VEGFRs).....	21
1.2.4 <i>Platelet-derived Growth Factor</i> Rezeptoren (PDGFRs).....	22
1.3 Niedermolekulare Kinaseinhibitoren	23
1.3.1 Klassifizierung von Kinaseinhibitoren	23
1.3.2 Imatinib und Nilotinib.....	28
1.3.3 Axitinib.....	29
2. KONZEPT UND ZIELSTELLUNG	33
3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	36
3.1 Axitinib und stilbenähnliche Axitinibderivate	36
3.1.1 Molecular Modeling	36
3.1.2 Synthese	46
3.1.3 Photochemische Charakterisierung.....	51
3.1.4 Biologische Testung von (<i>E</i>)- und (<i>Z</i>)-Axitinib.....	59
3.1.5 Biologische Testung der stilbenähnlichen Axitinibderivate	70
3.2 Azobenzol- und diazocinfunktionalisierte Axitinibderivate	74
3.2.1 Molecular Modeling	75
3.2.2 Synthesen	85
3.2.3 Photochemische Charakterisierung.....	104

3.2.4	Biologische Testung	109
3.3	Azologisierung von Imatinib und Nilotinib	118
3.3.1	Molecular Modeling	119
3.3.2	Synthesen	128
3.3.3	Photochemische Charakterisierung.....	134
3.3.4	Biologische Testung	138
4.	ZUSAMMENFASSUNG UND FAZIT.....	142
4.1	Axitinib und stilbenähnliche Axitinibderivate	142
4.2	Azobenzol- und diazocinfunktionalisierte Axitinibderivate	147
4.3	Azologisierung von Imatinib und Nilotinib	153
5.	EXPERIMENTELLER TEIL	156
5.1	Geräte und Materialien	156
5.1.1	NMR-Spektroskopie.....	156
5.1.2	Massenspektrometrie.....	157
5.1.3	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	157
5.1.4	UV/VIS-Spektroskopie	157
5.1.5	Röntgenkristallstrukturanalysen	157
5.1.6	Chromatographie.....	158
5.1.7	Lichtquellen	159
5.2	Molecular Modeling	160
5.3	Quantenmechanische Rechnungen	161
5.4	Synthesen	162
5.4.1	Synthesen und Isolierung von (<i>E</i>)-Axitinib, (<i>Z</i>)-Axitinib und des Axitinibdimers	162
5.4.2	Synthese des Axitinibpharmakophors.....	165
5.4.3	Synthesen der stilbenähnlichen Axitinibderivate.....	172
5.4.4	Synthesen der Azobenzole und Diazocine.....	181
5.4.5	Synthesen der azobenzol- und diazocinfunktionalisierten Axitinibderivate.....	198

5.4.6	Synthesen der azofunktionalisierten Imatinib- und Nilotinibderivate	205
5.5	Kinase Assays.....	214
5.6	Zelltestung	215
5.7	Western Blot Analysen	217
5.8	PamGene-Testung	218
6.	LITERATURVERZEICHNIS	219
7.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	235
8.	MOLEKÜLVERZEICHNIS	239
9.	ANHANG.....	246
9.1	UV/VIS-spektroskopische Messungen.....	246
9.1.1	Zyklusmessungen	246
9.1.2	Halbwertszeiten der thermischen Rückisomerisierung	250
9.2	Weitere Ergebnisse biologischer Testungen	256
9.2.1	VEGFR2 Kinaseassays.....	256
9.2.2	ABL1 K _d -Wert Bestimmung (DiscoverX).....	258
9.2.3	HUVEC-Proliferationsassays	259
9.3	Röntgenkristallstrukturanalysen	261
9.3.1	3,3'-Bis[(<i>E</i>)-phenyldiazenyl]-1,1'-biphenyl (91)	261
9.3.2	(<i>Z</i>)-3-Iod-12 <i>H</i> -dibenzo[<i>b,f</i>][1,4,5]thiadiazocin (104a)	264

1. EINLEITUNG

1.1 Photopharmakologie

Ziel der Photopharmakologie ist es, Wirkstoffe zu entwickeln, deren Aktivität sich mit Licht zeitlich und räumlich regulieren lässt. Dazu werden Wirkstoffe mit lichtempfindlichen molekularen Schaltern (Photoschaltern) modifiziert, sodass sie je nach Bestrahlung in zwei unterschiedlichen Zuständen vorliegen können, von denen einer biologisch aktiv und einer idealerweise biologisch inaktiv ist (Abb. 1.1). Auf diese Weise sollen Nachteile und Probleme von klassischer Pharmakotherapie wie unzureichende Selektivität und hohe Nebenwirkungen umgangen werden.^[1-3]

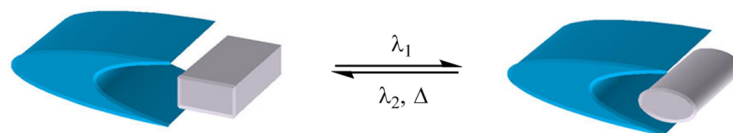


Abb. 1.1. Schematische Darstellung des Konzeptes eines photoschaltbaren Wirkstoffes (grau). Im Ausgangszustand (links) ist keine Bindung des Wirkstoffes in der Proteinbindetasche (blau) möglich. Nach Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge λ_1 kommt es zu einer strukturellen Änderung des Wirkstoffes, sodass eine Bindung in der Bindetasche möglich wird. Durch Bestrahlung mit der Wellenlänge λ_2 oder durch thermische Energie ist die strukturelle Änderung umkehrbar.^[4] Abbildung mit Genehmigung adaptiert aus Quelle [4]. Copyright (2013) American Chemical Society.

Der Ansatz ähnelt dem Prinzip von photoaktivierbaren Prodrugs (sog. *Caging*-Konzept), mit dem Unterschied, dass Photoschalter eine reversible Kontrolle der pharmakologischen Wirkung ermöglichen sollen, während photolabile Prodrugs lediglich eine irreversible Freisetzung des Wirkstoffes ermöglichen.^[5]

Der Begriff der Photopharmakologie wird in der Literatur erst in jüngerer Vergangenheit verstärkt verwendet und ist daher noch nicht klar von verwandten Fachgebieten abgegrenzt. Zu unterscheiden ist die Photopharmakologie jedoch von der verwandten photodynamischen Therapie (PDT) und der Optogenetik. Die PDT nutzt Licht in Kombination mit geeigneten Photosensitizern um reaktive Sauerstoffspezies freizusetzen, welche unspezifisch umgebendes Gewebe und Zellen schädigen. Daher eignet sich die PDT nur für lokale Erkrankungen wie gewisse Krebsarten oder Infektionen, bei denen eine gezielte Schädigung bzw. Zerstörung des betroffenen Gewebes erwünscht ist. Die Optogenetik ist ein gentechnologischer Ansatz, bei dem Rezeptoren oder Ionenkanäle gentechnisch so verändert werden, dass ihre Aktivität, ähnlich wie bei Rhodopsin, mittels Licht reguliert werden kann.^[1-3]

Der Vorteil von Licht als externem Stimulus zur Regulierung der Aktivität von Wirkstoffen besteht in der Bioorthogonalität zu den meisten chemischen und biologischen Systemen, der hohen örtlichen und zeitlichen Präzision sowie der breiten Variabilität bezüglich Wellenlänge und Intensität der Strahlung. Zudem ist Licht im Gegensatz zu parenteralen Applikationen, Kathetern oder endoskopischen Methoden nicht invasiv.^[1]

Die Wellenlänge des Lichtes, das zur Regulation von photoschaltbaren Wirkstoffen benötigt wird, stellt eine kritische Größe in der Photopharmakologie dar. So hat UV-Licht und sichtbares Licht unterhalb einer Wellenlänge von 600 nm aufgrund von Reflexion, Streuung sowie Absorption durch natürliche Chromophore wie Melanin oder Hämoglobin lediglich eine Eindringtiefe von einigen Mikrometern bzw. Millimetern in biologisches Gewebe (Abb. 1.2).^[6-11] Zudem kann energiereiches UV-Licht mitunter eine toxische, mutagene oder karzinogene Wirkung haben, z.B. durch Erzeugung von Quervernetzungen in der DNA.^[12,13] Größer ist die Eindringtiefe hingegen von rotem und nahem infrarotem Licht mit Wellenlängen von ca. 600 - 900 nm.^[14,15] In diesem Bereich, der auch als biooptisches Fenster bezeichnet wird, kann eine Eindringtiefe von einigen Zentimeter erreicht werden, wobei die genaue Eindringtiefe gewebeabhängig ist. Die Verwendung von noch langwelligerem Infrarotlicht wird durch die Schwingungsanregung von Wasser limitiert.^[1,3]

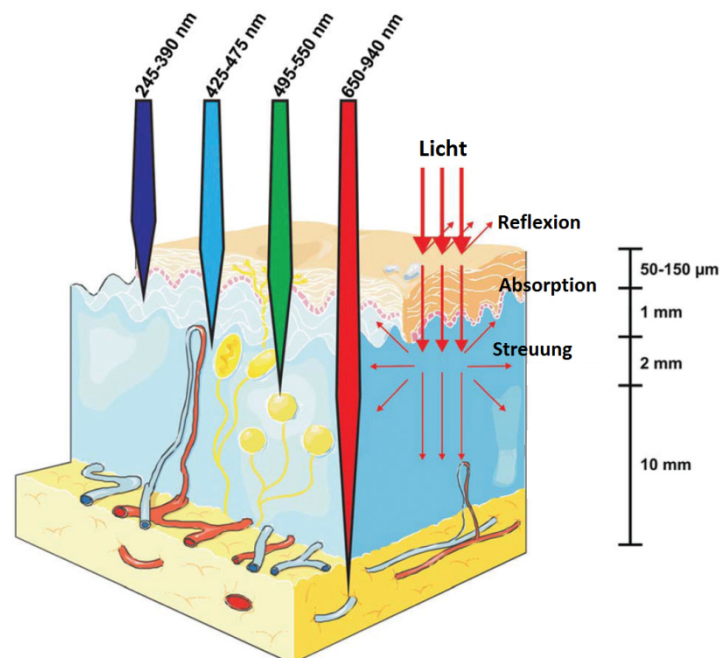


Abb. 1.2 Schematische Darstellung der Eindringtiefe von Licht in die Haut in Abhängigkeit von der Wellenlänge.^[16] Abbildung mit Genehmigung adaptiert aus Quelle [16]. Copyright (2011) Jon Wiley and Sons.

Aufgrund der limitierten Eindringtiefe von Licht ist die Verwendung von photoschaltbaren Wirkstoffen vor allem für lokale Erkrankungen der Haut, der Nägel sowie der Augen naheliegend.^[3] Darüberhinaus ist aber auch der Einsatz von Lichtwellenleitern (*optical fibers*) in Kombination mit endoskopischen Verfahren, Katheter-Techniken oder operativen Eingriffen denkbar, um schwerer zugängliche Organe zu bestrahlen.^[17,18] Allerdings gehen bei dieser Herangehensweise die Vorteile einer nicht-invasiven Applikation verloren.

Neben der örtlichen Kontrolle durch gezielte Bestrahlung ermöglicht ein bistabiler photoschaltbarer Wirkstoff mit einer thermodynamischen und einer metastabilen Form mitunter auch eine zeitliche Kontrolle der biologischen Aktivität (Abb. 1.3). Stellt die metastabile Form gleichzeitig die biologisch aktive Form dar, so folgt nach Bestrahlung der thermodynamisch stabilen Form mit fortschreitender Zeit eine thermische Desaktivierung der Substanz. Bei einer langen Halbwertszeit ist eine einmalige Aktivierung des Wirkstoffs ausreichend, kurze Halbwertszeiten erfordern ggf. eine Nachbestrahlung während des Wirkzeitraums in festgelegten Zeitabständen.

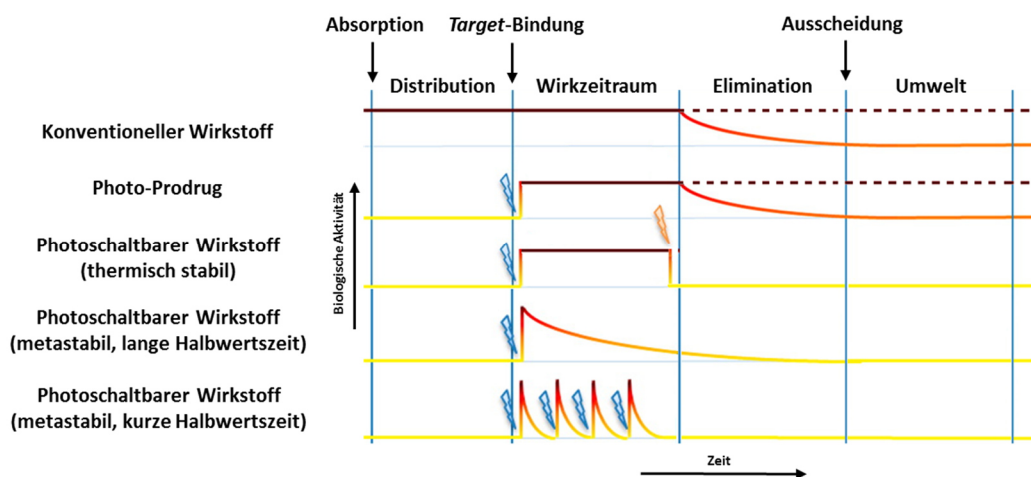
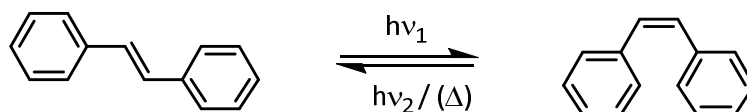


Abb. 1.3 Vereinfachte Darstellung der Wirkdauer eines konventionellen Wirkstoffes im Vergleich zu photoaktivierbaren und photoschaltbaren Wirkstoffen. Ein konventioneller Wirkstoff liegt bereits bei der Absorption in seiner biologisch aktiven Form vor. Ein Photoprodrug kann einmalig am vorgesehenen Wirkort durch Bestrahlung aktiviert werden. Ein photoschaltbarer Wirkstoff kann am vorgesehenen Wirkort durch Bestrahlung aktiviert werden und ggf. außerhalb des Wirkortes wieder deaktiviert werden. Bei einer geeigneten Halbwertszeit der metastabilen Form ist eine einmalige Bestrahlung ausreichend. Bei einer kurzen Halbwertszeit ist eine Mehrfachaktivierung durch gepulste Bestrahlung erforderlich.^[1] Abbildung mit Genehmigung adaptiert aus Quelle [1]. Copyright (2014) American Chemical Society.

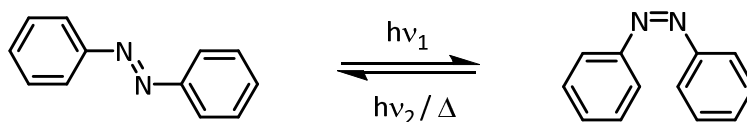
1.1.1 Photoschalter

Als photoschaltbare Moleküle oder molekulare Photoschalter werden in der Literatur allgemein photochrome Molekülstrukturen bezeichnet, die sich durch photochemische Anregung reversibel in zwei oder mehr Zustände überführen lassen. Dazu gehören vor allem photoisomerisierbare Strukturen wie Stilbene, Azobenzole, verbrückte Azobenzole (Diazocine) und Hemithioindigos (Abb. 1.4) sowie photocyclisierbare Strukturen wie Spiropyrane, Diarylethene, Fulgide und Fulgimide (nicht gezeigt).^[4]

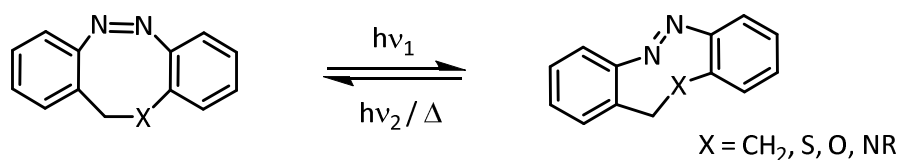
Stilbene



Azobenzole



Diazocine



Hemithioindigos

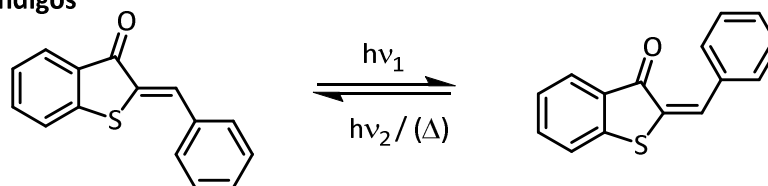


Abb. 1.4 Übersicht photoisomerisierbarer Moleküle (Photoschalter).

Zu den wichtigsten Eigenschaften von photoschaltbaren Molekülen gehört die benötigte Anregungswellenlänge, die Quantenausbeute (bestimmt die benötigte Bestrahlungsdauer und -intensität), die Schalteffizienz bzw. die Zusammensetzung des photostationären Gleichgewichtes (PSS), die thermische Stabilität des metastabilen Zustandes sowie die Reversibilität der Photoschaltung (Photoermüdung).

Stilbene

E-Stilben (*E*-1) stellt ein planares ausgedehntes π -System dar und absorbiert UV-Licht im Bereich von ca. 250 bis 350 nm. Durch Anregung mit UV-Licht der Wellenlänge 313 nm erfolgt eine photoinduzierte *E/Z*-Isomerisierung, wobei sich ein PSS mit einem *Z*-Isomerenanteil von etwa 93 % einstellt.^[19] In der *Z*-Konfiguration bilden die Phenylringe im Gegensatz zum *E*-Isomer kein planares π -System mehr, sondern sind aus sterischen Gründen gegeneinander verdreht. Dies äußert sich in einer deutlich schwächeren $\pi\pi^*$ -Absorptionsbande und einem leicht blauverschobenen Absorptionsmaximum. Durch Bestrahlung mit 254 nm kann das PSS zurück in Richtung des *E*-Isomers verschoben werden. Dabei stellt sich ein Gleichgewicht mit einem *E*-Isomerenanteil von ca. 50 % ein.^[20]

Problematisch bei Stilbenen ist vor allem die Reversibilität bzw. die Robustheit der Photoschaltung. So kann *Z*-Stilben zusätzlich zu einer *E/Z*-Isomerisierung eine 6π -Elektrocyclisierung mit anschließender irreversibler Oxidation zum Phenanthren (**4**) eingehen (Abb. 1.5).^[21] Weiterhin kann bei unzureichender Solvatation der Moleküle bzw. bei Aggregation eine photoinduzierte [2+2]-Cycloaddition zum Cyclobutanderivat **2** auftreten.^[22,23]

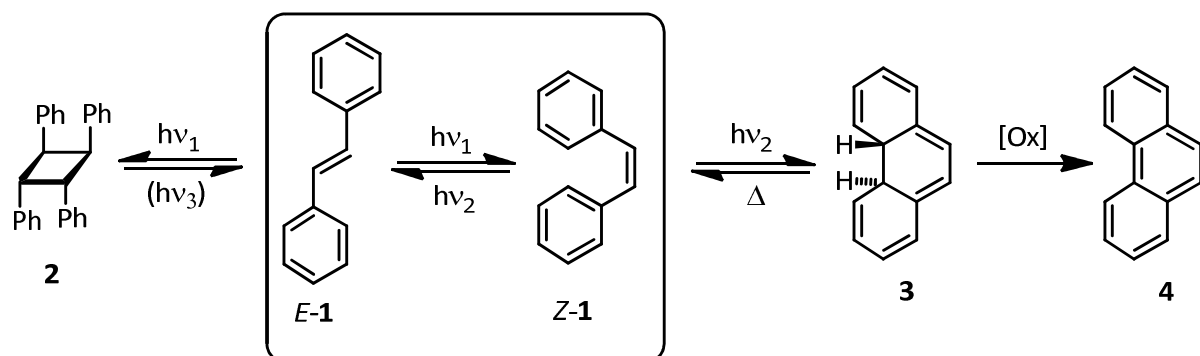


Abb. 1.5 Mögliche photochemische Reaktionen ausgehend von *E*-Stilben (*E*-1).^[21]

Insgesamt sind klassische Stilbene aufgrund der vergleichsweise hohen Anregungsenergien (UV-Licht), der mäßigen *Z* \rightarrow *E* Schalteffizienz und der eingeschränkten Reversibilität nur bedingt als Photoschalter in biologischen Systemen geeignet. Leicht modifizierte Eigenschaften weisen Heterostilbene und stilbenähnliche Systeme auf.^[24,25] Ein Vorteil von ethenyl-basierten Photoschaltern besteht in der höheren Redoxstabilität im Vergleich zu Azobenzolen (siehe nächster Abschnitt). Auch die höhere thermische Stabilität der *Z*-Konfiguration kann mitunter vorteilhaft sein.

Azobenzole

Azobenzole bzw. Azobenzolderivate haben sich mit der Entdeckung der photoinduzierten *E/Z*-Isomerisierung von Azobenzol (**5**) im Jahre 1938^[26] neben Stilbenen zu den am meisten verwendeten und am ausführlichsten charakterisierten Photoschaltern entwickelt.^[27] Das planare und thermodynamisch stabile *E*-Isomer (*E*-**5**) weist analog zu *E*-Stilben (*E*-**1**) im UV-Spektrum eine intensive $\pi\pi^*$ -Absorptionsbande im Bereich von ca. 250 bis 370 nm auf. Zusätzlich zu einer $\pi\pi^*$ -Anregung ermöglichen die Stickstoffatome der Azobindung auch eine $n\pi^*$ -Anregung des Moleküls, also einen elektronischen Übergang von einem nicht-bindenden Molekülorbital in das niedrigste anti-bindende Molekülorbital (LUMO). Der $n\pi^*$ -Übergang ist allerdings aufgrund der planaren Molekülgeometrie von *E*-Azobenzol (*E*-**5**) symmetrieverboten, wodurch die zugehörige Absorptionsbande im Bereich von ca. 400 bis 500 nm nur eine äußerst geringe Intensität aufweist. Beim *Z*-Isomer (*Z*-**5**) ist der $n\pi^*$ -Übergang hingegen aufgrund der niedrigeren Molekülsymmetrie (Abb. 1.6) teilweise erlaubt, wodurch die $n\pi^*$ -Bande intensiver ist als die von *E*-Azobenzol (*E*-**5**).^[28] Die unterschiedlich intensiven und teilweise leicht verschobenen Absorptionsbanden ermöglichen eine gezielte photochemische Anregung der einzelnen Isomere und damit einhergehend eine reversible Photoschaltung mit guter Schalteffizienz. So lassen sich durch Einstrahlung in die $\pi\pi^*$ -Bande mit 365 nm ca. 91 % des *Z*-Isomers (*Z*-**5**) und durch $n\pi^*$ -Anregung etwa 88 % des *E*-Isomers (*E*-**5**) anreichern.^[29] *Z*-Azobenzol (*Z*-**5**) ist metastabil und schaltet in Lösung thermisch mit einer Halbwertszeit von etwa 2 Tagen zurück zum thermodynamisch stabilen *E*-Isomer (*E*-**5**).^[28]

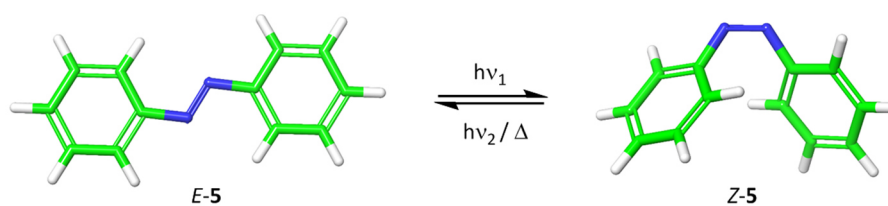


Abb. 1.6 3D-Struktur von *E*-Azobenzol (*E*-**5**) und *Z*-Azobenzol (*Z*-**5**). Das π -System von *E*-Azobenzol (*E*-**5**) ist planar, wodurch sich im UV/VIS-Spektrum eine intensive $\pi\pi^*$ -Bande ergibt. Der $n\pi^*$ -Übergang ist hingegen aufgrund der planaren Molekülgeometrie symmetrieverboten. Die Phenylringe von *Z*-Azobenzol (*Z*-**5**) sind aus sterischen Gründen dihedral gegeneinander verdreht, sodass das π -System nicht planar ist. Folglich ist die $\pi\pi^*$ -Bande weniger intensiv und die $n\pi^*$ -Bande intensiver als bei *E*-Azobenzol (*E*-**5**).

Durch geeignete Ringsubstituenten können die photochemischen Eigenschaften von Azobenzolen zum Teil stark modifiziert werden.^[28] So führen elektronenschiebende Substituenten in *ortho*- oder *para*-Position zu einer leichten Rotverschiebung der $\pi\pi^*$ -Bande vom UV- in den sichtbaren Bereich. Allerdings kann die Verschiebung zu einer teilweisen Überlappung mit der $n\pi^*$ -Bande und folglich zu schlechteren Schalteffizienzen führen. Noch stärker fällt die Rotverschiebung bei sogenannten Push-

Pull-Systemen, also 4- und 4'-substituierten Azobenzolen mit je einer elektronenschiebenden und einer elektronenziehenden Gruppe, aus. Die starke Elektronendelokalisierung führt hier zu einer Verschiebung der $\pi\pi^*$ -Banden weit in den sichtbaren Bereich hinein und ist u.a. die Ursache für die intensive Färbung vieler Azofarbstoffe, wie z.B. Methylorange oder Dispersrot. Gleichzeitig beeinflussen die Ringsubstituenten aber auch die thermische Stabilität des Z-Isomers, wodurch Push-Pull-Azobenzole als Photoschalter für viele Anwendungen unbrauchbar sind, da sie abhängig vom jeweiligen System innerhalb von Sekunden, Millisekunden oder gar Nanosekunden thermisch zurückschalten.^[28,30]

Eine Besonderheit stellen (tetra)-*ortho*-substituierte Azobenzole dar (Abb. 1.7), da *ortho*-Substituenten sowohl eine Separierung der $\pi\pi^*$ -Banden vom *E*- und *Z*-Isomer als auch eine Stabilisierung der *Z*-Konfiguration bewirken können. Dieser Effekt wurde insbesondere von der Arbeitsgruppe Woolley genutzt, um Azobenzolderivate zu entwickeln, die mit sichtbarem Licht schaltbar sind und gleichzeitig akzeptable thermische Rückisomerisierungsraten aufweisen.^[31–33]

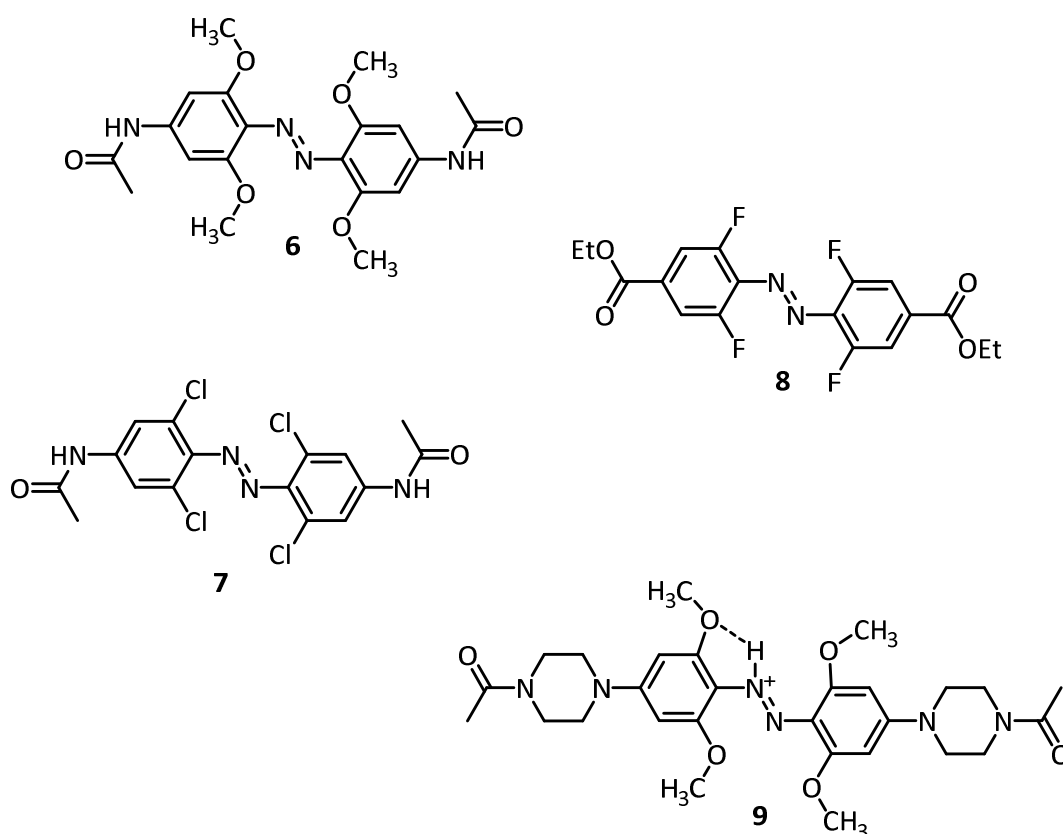


Abb. 1.7 Übersicht über verschiedene literaturbekannte tetra-*ortho*-substituierte Azobenzolderivate.

So lässt sich beispielsweise das tetra-*ortho*-methoxysubstituierte Azobenzolderivat **6** mit grünem Licht zum *Z*-Isomer und mit blauem Licht zum *E*-Isomer schalten. Gleichzeitig weist das *Z*-Isomer mit einer Halbwertszeit von etwa 2 Tagen eine hohe thermische Stabilität in wässriger Lösung auf.^[31] Als Ursache für die starke Verschiebung der $\pi\pi^*$ -Bande des *E*-Isomers wird eine Wechselwirkung der Methoxygruppen mit den Elektronenpaaren der Stickstoffatome der Azobindung diskutiert. Der $\pi\pi^*$ -Übergang des *Z*-Isomers wird aufgrund der Molekülgeometrie hingegen weniger stark beeinflusst. Neben elektronischen Effekten der *ortho*-Substituenten werden auch sterische Effekte wie die Abschirmung der Azobindung vom Lösungsmittel diskutiert.^[30,31,34]

Auch tetra-*ortho*-halogensubstituierte Azobenzole weisen rot-verschobene $\pi\pi^*$ -Übergänge in der *E*-Konfiguration auf und lassen sich folglich mit sichtbarem Licht schalten. Beispiele sind das tetra-*ortho*-chlorsubstituierte Azobenzolderivat **7** sowie das tetra-fluorsubstituierte Azobenzol **8**, das zudem mit einer Halbwertszeit von etwa 2 Jahren eine außergewöhnlich hohe Stabilität in der *Z*-Konfiguration aufweist.^[33,35,36]

Eine noch stärker rotverschobene Absorption weisen tetra-*ortho*-methoxysubstituierte Azonium-Ionen auf, die sich mit rotem oder zum Teil sogar nahem infrarotem Licht schalten lassen. Hierbei wird durch die +M-Effekte der Methoxygruppen und der endständigen Aminosubstituenten die Basizität der Azobindung so stark erhöht, dass diese je nach pH-Wert als Azonium-Ion vorliegt. Dies gilt insbesondere für die *E*-Konfiguration, da hier zusätzlich zu den benachbarten Methoxygruppen eine Wasserstoffbrücke ausgebildet werden kann. Ein großer Nachteil von Azonium-Ionen sind jedoch die äußerst hohen thermischen Rückisomerisierungsraten.^[37–39]

Im Hinblick auf die Verwendung in biologischen Systemen ist die Redoxstabilität von Azoverbindungen zum Teil problematisch. So ist für einige Azobenzolderivate eine Reduktion durch das intrazellulär in hohen Konzentrationen vorliegende Glutathion (GSH) zu den entsprechenden Hydrazobenzolen bekannt.^[40] Auch eine Reduktion durch Dithiothreitol (DTT), das in vielen Assays als proteinstabilisierendes Reagenz eingesetzt wird, wurde in manchen Fällen beobachtet.^[41,42] Die Reduktionsanfälligkeit der Azobindung ist abhängig von etwaig vorhandenen Ringsubstituenten bzw. den elektronischen Eigenschaften der jeweiligen Verbindung. Tendenziell sind elektronenreiche Azoverbindungen reduktionsstabiler, da durch eine höhere Elektronendichte ein nukleophiler Angriff auf eines der Stickstoffatome erschwert wird. Allerdings wurde bei *ortho*-substituierten Azobenzolen teilweise ein gegenläufiger Trend beobachtet.^[34] Grundsätzlich scheint die *Z*-Konfiguration von Azobenzolen labiler zu sein als die *E*-Konfiguration.^[40]

Vor dem Hintergrund einer möglichen klinischen Anwendung ist auch die metabolische Stabilität bzw. eine mögliche Toxizität von azobasierten Wirkstoffen kritisch zu sehen. So kann beispielsweise eine reduktive Spaltung der Azobindung zu aromatischen Aminen und anschließende metabolische Oxidation zu karzinogenen Spezies führen, die u.a. kovalent an die DNA binden können.^[43,44] Der genaue metabolische Abbau und eine potentielle Langzeittoxizität hängt jedoch in hohem Maße von der jeweiligen Molekülstruktur ab und ist im Einzelfall zu prüfen. So sind beispielsweise die Azo-Farbstoffe Tartrazin (E102), Gelborange S (E110) und Allurarot (E129) als Lebensmittelfarbstoffe in der Europäischen Union zugelassen.^[2]

Verbrückte Azobenzole (Diazocine)

Verbrückte Azobenzole bzw. Diazocine lassen sich gewissermaßen als Weiterentwicklung von klassischen Azobenzolen auffassen. Zwar datiert die erstmalige Erwähnung des ethylenverbrückten Azobenzols **10** schon aus dem Jahre 1910^[45], die bemerkenswerten photochemischen Eigenschaften wurden jedoch erst mit der Charakterisierung durch die Arbeitsgruppen Temps und Herges vor etwa 10 Jahren erkannt.^[46] Diazocine zeichnen sich vor allem dadurch aus, dass die *Z*-Konfiguration die thermodynamisch stabile Form darstellt. Damit kehrt sich die Stabilität von *E*- und *Z*-Isomer im Vergleich zu klassischen unverbrückten Azobenzolen um. Weiterhin wurden für das kohlenstoffverbrückte Diazocin **10** außergewöhnlich hohe Quantenausbeuten und damit einhergehend sehr gute Schalteffizienzen beobachtet ($PSS_{385\text{nm}} = 90\%$ *E*-Isomer, $PSS_{520\text{nm}} \approx 100\%$ *Z*-Isomer). Die thermische Halbwertszeit des *E*-Isomers *E*-**10** beträgt 3.1 h bei 28.5 °C.^[46]

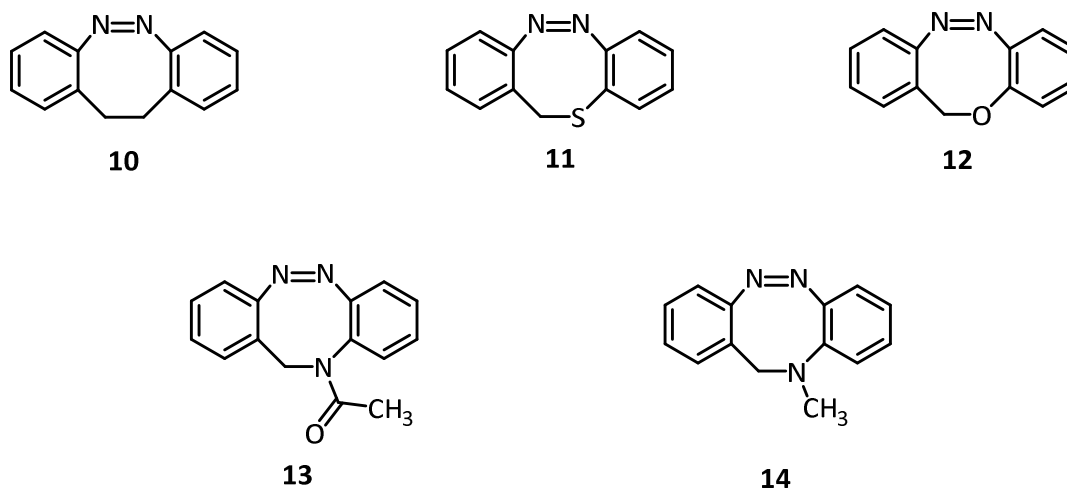


Abb. 1.8 Übersicht über verschiedene (Hetero-)Diazocine.

Trotz der sehr guten photochemischen Eigenschaften wurden Diazocine bisher auffallend selten als Photoschalter in der Grundlagenforschung verwendet. Insbesondere in der biologischen Chemie und der Photopharmakologie fanden Diazocine trotz ihrer vermeintlich besseren Eignung im Vergleich zu klassischen Azobenzolen kaum Anwendung.^[47,48] Als Hauptgrund für diese Beobachtung ist in erster Linie die schwierige synthetische Zugänglichkeit aufgrund niedriger Ausbeuten und zum Teil schlechter Reproduzierbarkeit des Ringschlusses zum Diazocin zu nennen.^[47,49,50] So wurde für die Synthese von **10** anfänglich lediglich eine Ausbeute von 4 % erzielt.^[46] Erst in den letzten Jahren gelang es neue und bessere Syntheserouten für ethylenverbrückte Azobenzole zu etablieren.^[51,52]

Der Zugang zu einer weiteren Klasse von Diazocinen gelang der Arbeitsgruppe Herges im Jahre 2016 mit der Synthese des schwefel- und sauerstoffverbrückten Diazocins **11** und **12** (Abb. 1.8).^[53] Diese Heterodiazocine haben den Vorteil, dass sie unsymmetrisch sind und so die Synthese von monosubstituierten Derivaten erleichtert wird. Das Schwefeldiazocin **10** lässt sich zudem mit rotem Licht vom *E*- zum *Z*-Isomer schalten, bei gleichzeitig guten Schalteffizienzen ($PSS_{405\text{nm}} = 70\%$ *E*-Isomer, $PSS_{530\text{nm}} \approx 100\%$ *Z*-Isomer) und einer praktikablen thermischen Stabilität des *E*-Isomers ($t_{1/2}$ (27 °C, NMR) = 3.5 d). Das Sauerstoffdiazocin ist aufgrund der äußerst schnellen thermischen Rückisomerisierung für photopharmakologische Anwendungen eher ungeeignet.^[53] Kürzlich wurde darüber hinaus eine kleine Serie von stickstoffverbrückten Diazocinen publiziert (Abb. 1.8).^[54] Vor allem das Acetyl-geschützte Stickstoffdiazocin **13** stellt aufgrund der vergleichsweise guten Wasserlöslichkeit einen vielversprechenden Photoschalter in der Photopharmakologie dar.

In der *Z*-Konfiguration nehmen Diazocine eine boot- bzw. wannenförmige Konformation ähnlich der des Cyclooctatetraens ein (Abb. 1.9). Das *E*-Isomer kann in zwei verschiedenen Konformationen vorliegen. Zum einen in einer sesselähnlichen Konformation (*chair*) und zum anderen in einer verdrehten Konformation (*twist*). Die Energieunterschiede zwischen beiden Konformationen variieren je nach Beschaffenheit der Brücke. Während beim Schwefeldiazocin *E*-**11** die *chair*- und *twist*-Konformationen nahezu isoenergetisch sind, liegt das Kohlenstoffdiazocin *E*-**10** bevorzugt in der *twist*-Konformation vor.^[53]

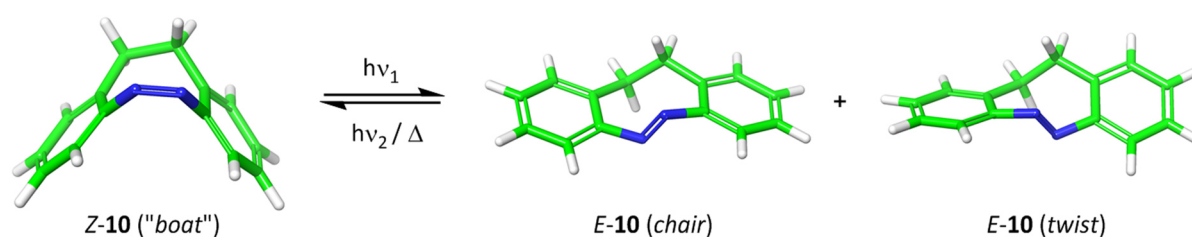


Abb. 1.9 3D-Strukturen des kohlenstoffverbrückten Diazocins **10**. Das *Z*-Isomer (*Z*-**10**) liegt in einer Wanne- bzw. Boot-Konformation (*boat*) vor. Das *E*-Isomer (*E*-**10**) kann in einer sesselähnlichen Konformation (*chair*) oder einer „verdrehten“ Konformation (*twist*) vorliegen.

1.1.2 Photoschaltbare Wirkstoffe

Die ersten Arbeiten zu photoschaltbaren Inhibitoren wurden bereits Ende der 1960er Jahre von Erlanger *et al.* veröffentlicht.^[55–57] Seither wurden über hundert photoschaltbare Wirkstoffe zur Regulierung von Ionenkanälen, Transportern, G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und Enzymen publiziert. Der aktuelle Forschungsstand wurde kürzlich von Hüll und Morstein in einem umfassenden Review zusammengefasst.^[58] Etwas breiter gefächerte Übersichtsartikel zur Photoregulierung von biologischen Systemen wurden in den letzten Jahren von Szymański, Brieke, Mayer und Heckel veröffentlicht.^[4,5,59] Beharry und Woolley haben speziell azobenzolbasierte photoschaltbare Liganden zusammengetragen.^[27]

Zu den bekanntesten und erfolgreichsten Beispielen in der Photopharmakologie gehört die photoschaltbare Hemmung der Mikrotubuluspolymerisation durch „Photostatine“.^[60] Photostatine sind substituierte Azobenzole mit struktureller Ähnlichkeit zu den Zytoskelett-Inhibitoren Combretastatin A-4 und Colchicin. Die Zytotoxizität der Photostatine **15** und **16** ist in der thermodynamisch stabilen *E*-Form nur äußerst gering und kann durch Bestrahlung mit 390 nm um das bis zu 250-fache gesteigert werden. Auf diese Weise konnte u.a. mit hoher räumlicher Präzision die Mitose einzelner Zellen reguliert werden.^[60]

Feringa, Szymański und Mitarbeiter konnten 2013 eine licht-regulierte Kontrolle des Wachstums von Bakterien mit Hilfe des photoschaltbaren Antibiotikums **17** demonstrieren. Das Azobenzolderivat **17** leitet sich strukturell aus dem Fluorchinolin Ciprofloxacin ab und kann mit UV-Licht (365 nm) geschaltet werden. Das metastabile *Z*-Isomer hemmt die DNA Gyrase von *Escherichia coli* (*E. coli*) und *Micrococcus luteus* bis zu achtmal effektiver als das thermodynamisch stabile *E*-Isomer.^[61] Inzwischen sind weitere schaltbare Antibiotika publiziert worden, die sich zum Teil mit rotem Licht schalten lassen.^[62,63] Das Photoschaltungskonzept könnte im Bereich der Antibiotika dahingehend weiterentwickelt werden, dass antibiotische Wirkstoffe vor der Verabreichung temporär aktiviert werden und sich während oder nach der Ausscheidung in die Umwelt wieder thermisch deaktivieren.^[1]

Das Azobenzolderivat **18** ist ein photoschaltbares Derivat des synthetischen Opioids Fentanyl und stellt eine der ersten Verbindungen zur Photokontrolle von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren dar. Das *E*-Isomer ist ein potenter Agonist des μ -Opioidrezeptors MOR, während das *Z*-Isomer wesentlich weniger aktiv ist. Durch Photoschalten der Verbindung mit 360 bzw. 480 nm konnte ein MOR-vermittelter K^+ -Einstrom in transfizierten HEK293t-Zellen optisch reguliert werden.^[64]

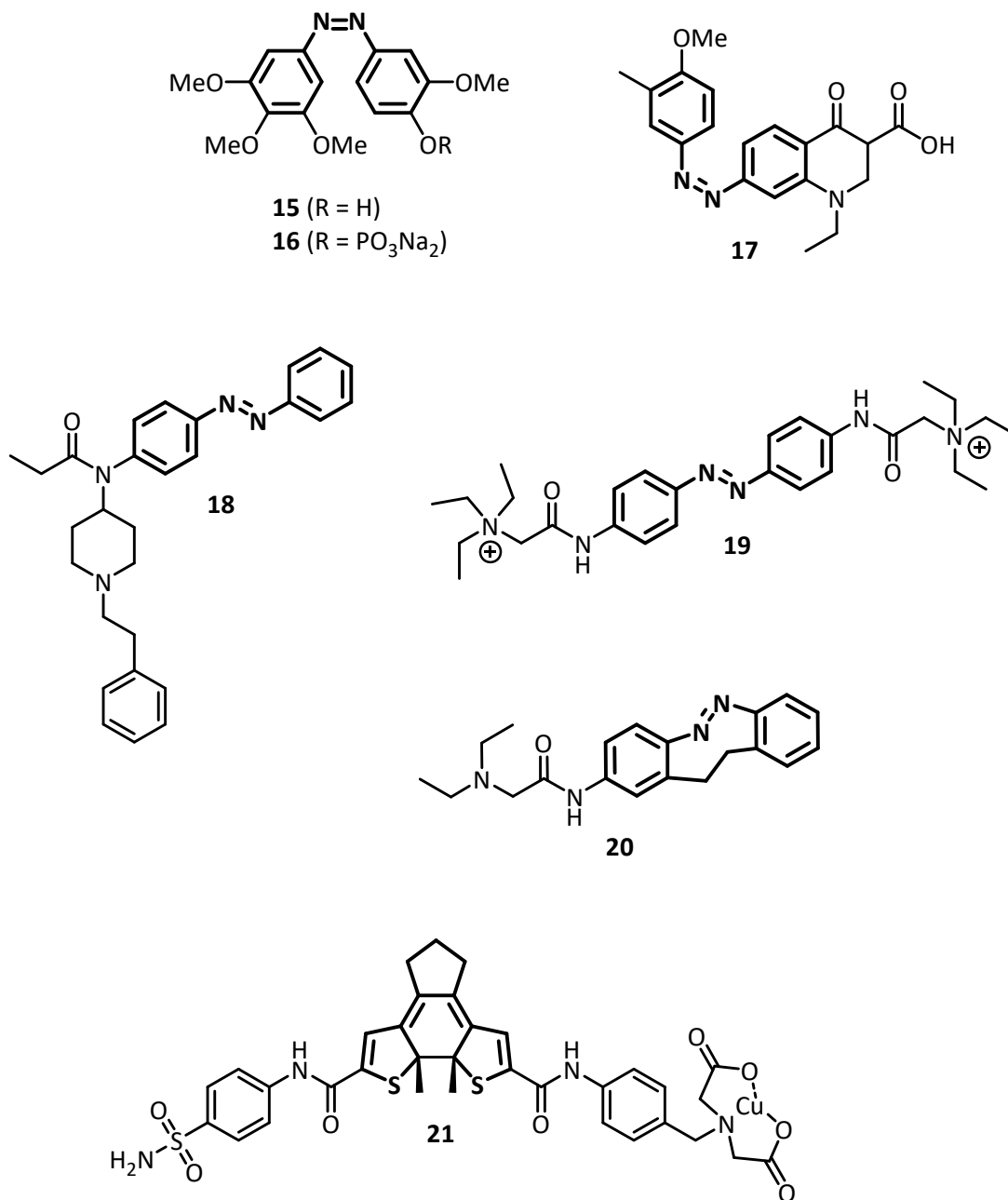


Abb. 1.10 Auswahl publizierter photoschaltbarer Wirkstoffe. Dargestellt ist jeweils die bioaktive Form.

Auch von Lidocain und verwandten anderen Lokalanästhetika wurden azobasierte photoschaltbare Derivate entwickelt.^[65–67] Das 4,4'-substituierte Azobenzol **19** blockiert in der *E*-Konfiguration in verschiedenen Zellen spannungsabhängige Kalium- und Natriumkanäle und führt in Mäusen zu einer anästhetischen Wirkung und einem verminderten nozizeptiven Blinzelreflex.^[66] Durch UV-Bestrahlung kann die Blockade der Kanalpore wieder aufgehoben werden. Die Verbindung **19** hat jedoch wie die allermeisten publizierten azobasierten Kanalblocker den konzeptionellen Nachteil, dass das thermodynamisch stabile *E*-Isomer die aktive Form darstellt. Folgerichtig wurden daher vor kurzem

erste diazocinbasierte Kanalblocker publiziert (u.a. **20**), die in der thermodynamisch stabilen Form inaktiv sind und durch Bestrahlung temporär aktiviert werden können.^[68,69]

Das Diarylethenderivat **21** ist einer von vergleichsweise wenigen nicht azobenzolbasierten Wirkstoffen und ermöglicht die photokontrollierte Inhibition der humanen Carboanhydrase I. Durch den photocyclisierbaren Dithienylethen-Linker kann der Abstand des Sulfanilamid-Pharmakophors und des Kupferkomplexes photochemisch gesteuert werden. In der geschlossenen Form wird der Kupfer-Komplex in eine ideale Position zur Interaktion mit Histidinresten in Nachbarschaft zum aktiven Zentrum gebracht. In der flexibleren offenkettigen Form ist hingegen keine Interaktion möglich, was zu einem 50-fachen Wirkverlust führt.^[70]

Auf dem Gebiet der niedermolekularen Kinaseinhibitoren wurden erst vergleichsweise wenige Arbeiten zu photosensitiven Wirkstoffen publiziert. Der aktuelle Forschungsstand dazu wurde kürzlich von Fleming, Grøtli und Andréasson in einem Minireview zusammengefasst.^[71] So waren bis vor einigen Jahren in der Literatur hauptsächlich photoaktivierbare Prodrugs von einigen Kinaseinhibitoren beschrieben, darunter ein Proteinkinase A Inhibitor, ein Rho-Kinaseinhibitor, ein RET-Kinaseinhibitor sowie ein VEGFR2-Inhibitor.^[72–75] Zudem sind photoaktivierbare Prodrugs der zugelassenen Kinaseinhibitoren Vemurafenib und Imatinib bekannt.^[76,77] Durch Bestrahlung der genannten geschützten Inhibitoren konnten größtenteils große Aktivitätssteigerungen um das bis zu 284-fache erzielt werden. Allerdings erfordern alle bisher verwendeten photolabilen Schutzgruppen UV-Licht im Wellenlängenbereich von 300-365 nm zur Freisetzung der Wirkstoffe. Eine Photoaktivierung eines niedermolekularen Kinaseinhibitors mit sichtbarem Licht ist bisher nicht literaturbekannt.

Der erste photoschaltbare Kinaseinhibitor wurde von Ferreira *et al.* im Jahre 2015 publiziert.^[78] In dieser Studie wurde ein Phenylethynyl-Rest eines literaturbekannten RET-Inhibitors durch einen Phenylazo-Rest ersetzt, um ein photoschaltbares Derivat zu erhalten (Abb. 1.11). Das azologisierte Derivat **22** stellt einen potenten RET-Inhibitor dar, dessen Wirkung durch Bestrahlung mit UV-Licht jedoch lediglich um das drei- bis vierfache reduziert werden konnte.^[78] Eine ähnliche Strategie wurde von Schehr *et al.* mit einem imidazolbasierten CK1δ-Inhibitor durchgeführt. Hier wurde ein Methylthioether durch eine schaltbare Azofunktion ersetzt. Allerdings konnten mit dem Azoimidazol **23** nur äußerst geringe Aktivitätsunterschiede zwischen der unbestrahlten und der bestrahlten Verbindung beobachtet werden. Als Begründung wird von den Autoren u.a. eine hohe Proteinflexibilität in dem Bereich der ATP-Bindetasche, in dem der photoschaltbare Rest bindet, angeführt.^[42] Konzeptionell haben die beiden genannten Arbeiten den Nachteil, dass jeweils das

thermodynamisch stabile Isomer, die biologisch aktivere Form darstellt und diese nicht vollständig geschaltet werden kann. Vor diesem Hintergrund haben Hoorens *et al.* den azobenzolbasierten BRAF^{V600E}-Inhibitor **24** entwickelt, der im thermischen Gleichgewicht biologisch inaktiv ist und durch Bestrahlung in die metastabile, biologisch aktive Z-Form überführt werden kann. Dabei konnte ein etwa 11-facher Aktivitätsunterschied erzielt werden.^[79]

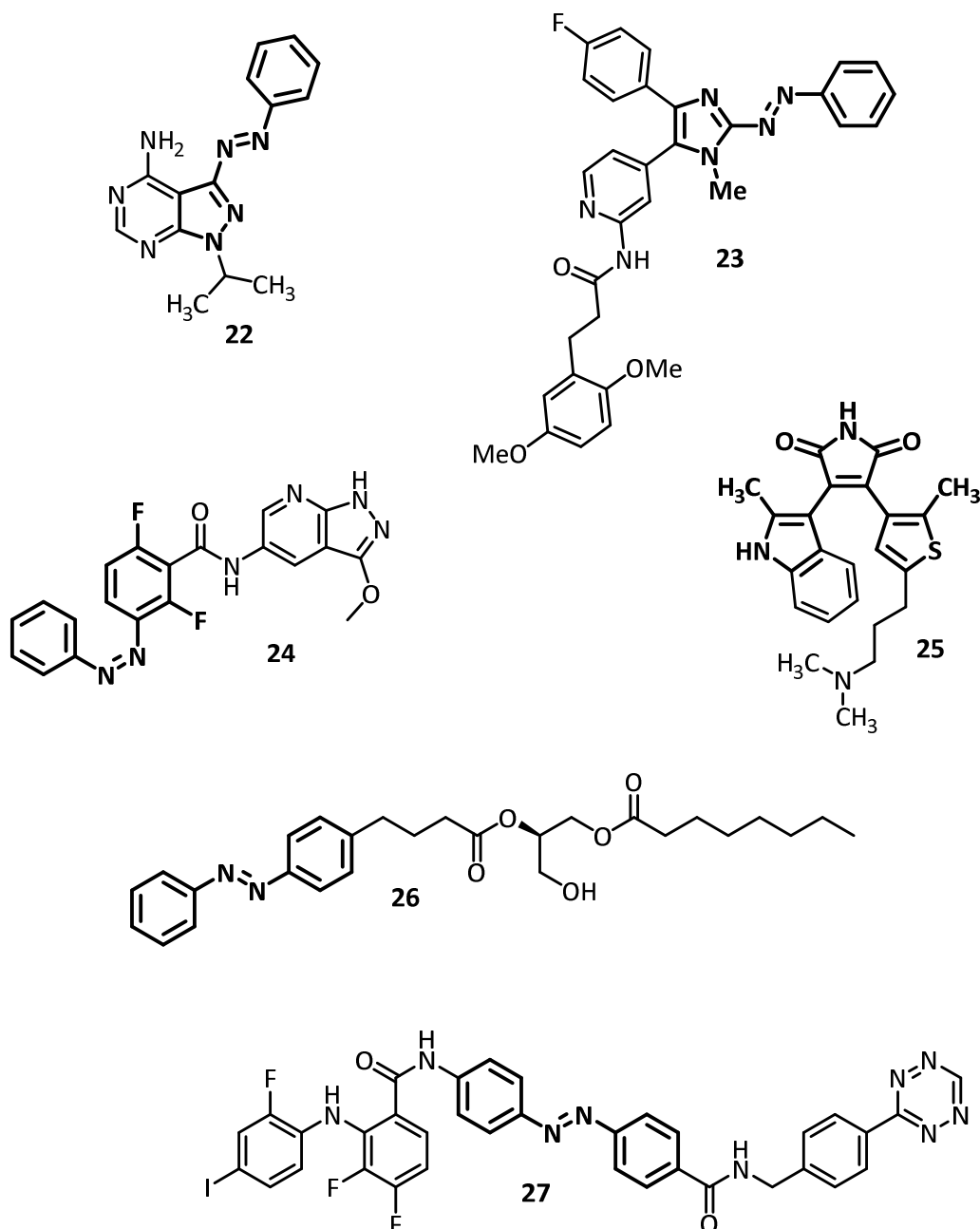


Abb. 1.11 Übersicht publizierter photoschaltbarer Kinasemodulatoren. Dargestellt ist jeweils die bioaktive Form.

Der einzige nicht azobenzolbasierte photoschaltbare Kinaseinhibitor wurde von der Arbeitsgruppe Branda veröffentlicht. Das diarylethen-ähnliche Maleimid **25** ist in der ring-offenen Form ein moderater PKC-Inhibitor, während die zugehörige cyclisierte Verbindung keine PKC-Hemmung aufweist. Der große Nachteil dieses photochromen Systems ist jedoch, dass die Photocyclisierung in polaren Lösungsmitteln wie Wasser nicht reversibel verläuft, sodass *in vitro* nur eine unidirektionale Photoaktivierung demonstriert werden konnte.^[80]

Neben den beschriebenen niedermolekularen Kinaseinhibitoren sind zwei weitere photoschaltbare Kinasemodulatoren literaturbekannt. Zum einen das azobenzolfunktionalisierte *second messenger* Lipid **25**, das in der Z-Konfiguration die Aktivität der Proteinkinase C stimuliert und zum anderen das azobenzolfunktionalisierte Peptid **26**, das mit Hilfe eines Linkers kovalent an MEK bindet und in der E-Konfiguration die Kinase inhibiert.^[81,82]

Tab. 1.1 Vergleich bisher publizierter photoschaltbarer Kinasemodulatoren.

#	Verbindungs- -klasse	Photoschalter	λ_{Exc} (nm)	Target	IC ₅₀ (nM)		Faktor
					unbestrahlt	bestrahlt	
22	SMKI	Hetero- Azobenzol	365	RET	150	580	3.8
23	SMKI	Hetero- Azobenzol	420	CK1 δ	138	218	1.6
24	SMKI	Azobenzol	365	BRAF ^{V600E}	1680	156	11
25	SMKI	Diarylethen	490	PKC	> 15000	580	26
26	<i>Sec. msg.</i> Lipid	Azobenzol	360	PKC	inaktiv	aktiv	-
27	Peptid	Azobenzol	360	MEK	aktiv	inaktiv	-

1.2 Proteinkinasen

Proteinkinasen gehören zur Enzymklasse der Phosphotransferasen und phosphorylieren verschiedenste Substratproteine. Die Phosphorylierung von Proteinen gehört zu den wichtigsten posttranslationalen Modifikationen in Zellen und dient oftmals dazu, Proteinfunktionen zu regulieren. So werden beispielsweise viele zelluläre Signaltransduktionskaskaden durch Phosphorylierungen eingeleitet und aufrechterhalten. Auf diese Weise werden fundamentale zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Apoptose, Fortschritt des Zellzyklus, Transkription, Metabolismus sowie interzelluläre Kommunikation reguliert.^[83]

Auf molekularer Ebene katalysieren Proteinkinasen die Übertragung der endständigen γ -Phosphatgruppe vom Cofaktor ATP auf bestimmte Aminosäureseitenketten. Ein Großteil aller Proteinkinasen sind Serin-/Threonin-Kinasen sowie Tyrosinkinasen. Diese phosphorylieren ihre Substrate an den Hydroxy-Funktionen der namensgebenden Aminosäuren. Darüberhinaus sind auch Asparaginsäure- und Glutaminsäure-Phosphorylierungen sowie N-Phosphorylierungen von Histidin, Lysin und Arginin bekannt, die allerdings in eukaryotischen Organismen weniger häufig auftreten und zum Teil noch nicht ausreichend erforscht sind.^[84]

1.2.1 Struktureller Aufbau der Kinasedomäne

Da nahezu alle Proteinkinasen ATP als Cofaktor nutzen, weisen sowohl Serin-/Threonin-Kinasen als auch Tyrosinkinase eine strukturell sehr ähnliche und hoch konservierte katalytische Domäne auf. Diese Kinasedomäne besteht aus einer C-terminalen und einer N-terminalen Protein-Untereinheit (*lobe*), welche über eine Gelenkregion (*hinge region*) verbunden sind (Abb. 1.12). Die ATP-Bindetasche befindet sich in der Spalte, die durch die beiden *lobes* gebildet wird. Während der C-terminale *lobe* ausschließlich aus α -Helices besteht, wird der N-terminale *lobe* überwiegend von β -Faltblättern sowie einer α -Helix, der sog. C-Helix, gebildet.^[84,85]

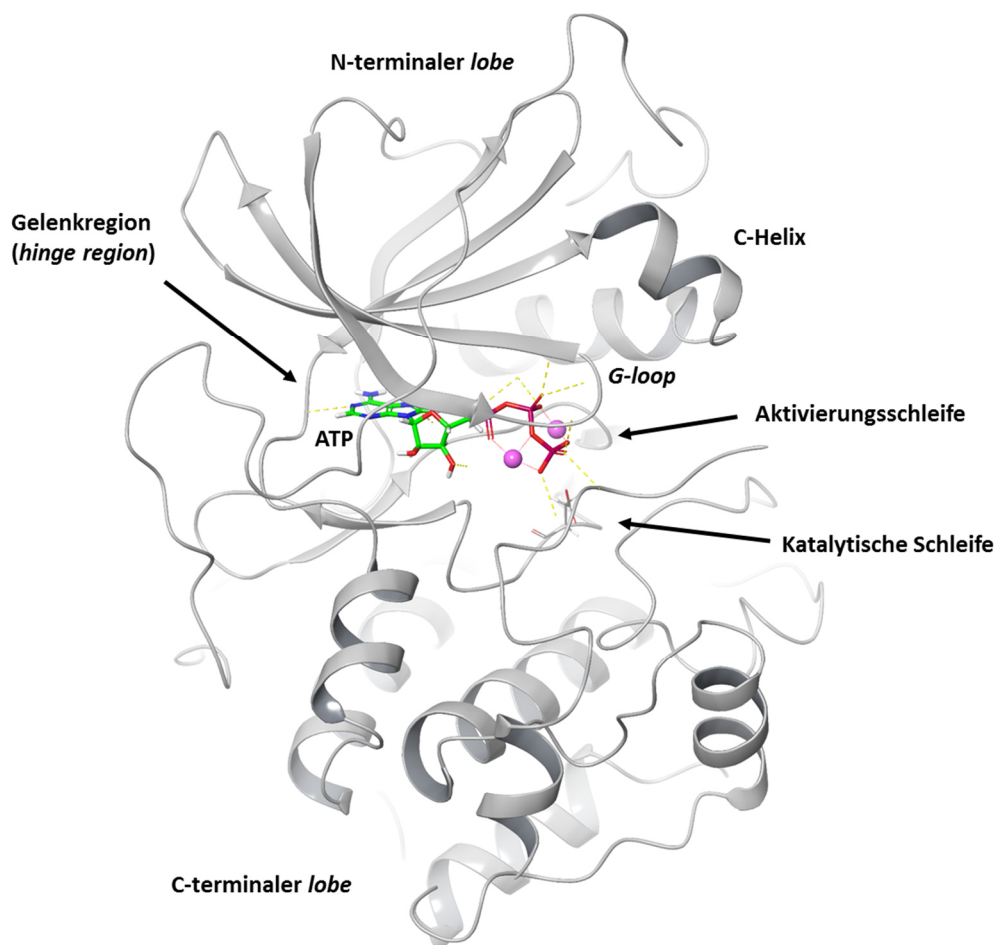


Abb. 1.12 Kristallstruktur der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (grau) mit gebundenem ATP sowie komplexierten Magnesiumionen (PDB: 4WB5).^[86] Gekennzeichnet sind die wichtigsten Strukturelemente der Kinasedomäne.

Die Konformation der C-Helix ist mitentscheidend für die katalytische Aktivität der Kinase und wird daher von verschiedenen Regulationsmechanismen kontrolliert. In der aktiven Konformation bildet sie eine Salzbrücke zu einem essentiellen Lysin-Rest aus, welcher mit seiner positiven Ladung die negativ

geladenen Phosphatgruppen von ATP dirigiert. Von besonderer Wichtigkeit für die ATP-Bindung und die Kinasereaktion ist zudem die katalytische Schleife (*catalytic loop*) und die Aktivierungsschleife (*activation loop*) des C-terminalen *lobes*. Die erstgenannte Proteinschleife enthält einen hochkonservierten Aspartat-Rest, der die zu phosphorylierenden Hydroxy-Funktionen des Substrates deprotoniert. Letztgenannte Proteinschleife komplexiert ein für die Enzymreaktionen benötigtes Magnesiumion mit dem Aspartat-Rest des charakteristischen DFG-Motivs (Asp-Phe-Gly). Zudem ist die Aktivierungsschleife essentiell für die Aktivierung und Deaktivierung der Kinase. Sie setzt sich u.a. aus mehreren Serin-, Threonin- und Tyrosin-Resten zusammen, die selbst als Phosphorylierungsstellen für aktivierende oder deaktivierende regulatorische Proteine dienen. Wird die Aktivierungsschleife phosphoryliert bzw. dephosphoryliert, kommt es zu einer Konformationsänderung der Kinase. In der inaktiven Konformation (DFG_{out}-Konformation) blockiert das DFG-Motiv das aktive Zentrum und verhindert so die Bindung von ATP. Liegt die Aktivierungsschleife hingegen phosphoryliert vor, klappt sie aus der ATP-Bindetasche heraus und ermöglicht eine ATP- und Substrat-Bindung (DFG_{in}-Konformation). Gebundenes ATP bildet mit dem Adenin-Baustein zwei Wasserstoffbrücken zum Proteinrückgrat der *Hinge*-Region aus. Die α - und β -Phosphatgruppen werden von einer glycinreichen Proteinschleife (*G-loop*) des N-terminalen *lobes* fixiert ^[84,85]

Im aktiven Zustand der Kinase wird der C-terminale *lobe* zudem mit dem N-terminalen *lobe* durch eine Art regulatorisches Rückgrat (*regulatory spine*) verbunden. Dieses Rückgrat setzt sich aus vier hydrophoben Aminosäureresten zusammen, die über intermolekulare Wechselwirkungen zusammengehalten werden. Eine Störung bzw. Unterbrechung dieser Wechselwirkungen geht mit einer Inaktivierung der Kinase einher. ^[84,87,88]

1.2.2 Rezeptortyrosinkinasen

Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) nehmen eine Schlüsselrolle bei der Signalweiterleitung interzellulärer Kommunikation ein und regulieren komplexe zelluläre Mechanismen wie Zellwachstum, Differenzierung, Migration sowie Apoptose. Sie bestehen aus einer extrazellulären Domäne zur Bindung von Signalmolekülen (z.B. Wachstumsfaktoren), einer transmembranen Domäne sowie einer intrazellulären Domäne zur Aktivierung von zellulären Signalwegen. Der intrazelluläre Teil weist den typischen Aufbau einer Kinasedomäne auf (vgl. Abschnitt 1.2.1).^[89]

Vor der Bindung eines Wachstumsfaktors liegen RTKs in der Regel als Monomere vor und die Kinasedomäne befindet sich in einem inaktiven Zustand. In Folge einer extrazellulären Ligandbindung kommt es zu einer Dimersierung benachbarter RTKs und zu einer Konformationsänderung der intrazellulären Kinasedomäne. Durch eine Autophosphorylierung werden Bindestellen für Substratproteine aktiviert, welche eine Phosphorylierungskaskade auslösen und so eine zelluläre Antwort auf den externen Reiz in Gang setzen.^[89]

Die Aktivität von RTKs ist unter normalen physiologischen Bedingungen streng reguliert, da eine gestörte RTK-Aktivität zu unkontrolliertem Zellwachstum führen kann. Folglich stellen RTKs einen Großteil bisher bekannter Onkogene dar. Zu den wichtigsten Drug-Targets zählen u.a. die *Vascular Endothelial Growth Factor* Rezeptoren (VEGFRs), die *Platelet-derived Growth Factor* Rezeptoren (PDGFRs), die *Fibroblast Growth Factor* Rezeptoren (FGFRs) sowie die *Epidermal Growth Factor* Rezeptoren (EGFRs).^[90–92]

Auf die für den weiteren Verlauf dieser Arbeit wichtigen RTKs VEGFR und PDGFR wird im Folgenden näher eingegangen.

1.2.3 *Vascular Endothelial Growth Factor* Rezeptoren (VEGFRs)

Vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren (*vascular endothelial growth factors*, VEGFs) sind Signalmoleküle zur Einleitung und Stimulierung der Vaskulogenese, der Angiogenese sowie der Lymphangiogenese. *In vitro* wirken VEGFs als endothelzell-spezifische Mitogene, d.h. sie stimulieren die Zellteilung und Migration von Endothelzellen.^[93] Die VEGF-stimulierte Angiogenese findet in erster Linie während der embryonalen Entwicklung statt. Bei Erwachsenen ist die Angiogenese-Aktivität hingegen unter normalen physiologischen Bedingungen außer bei Wundheilungsprozessen oder während der Menstruation bzw. Ovulation gering. Allerdings kommt der Angiogenese unter pathophysiologischen Bedingungen, insbesondere beim Wachstum von Tumoren, eine besondere Bedeutung zu.^[94]

Erreicht ein Tumor eine kritische Größe, wird er nicht mehr ausreichend vom umliegenden Gewebe mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt. In Folge der Mangelversorgung mit Sauerstoff (Hypoxie) schütten die Tumorzellen verstärkt VEGFs aus, um das Wachstum von nahegelegenen Blutgefäßen in Richtung des Tumors zu induzieren. Die Hemmung der VEGF-induzierten Angiogenese von Tumoren stellt damit ein selektives Angriffsziel in der Krebstherapie dar.^[91]

Die VEGF-Familie umfasst die vier VEGF-Mitglieder A-D und den *placenta-derived growth factor* (PLGF). Die VEGF-Familienmitglieder treten vor allem als Homodimere auf und können extrazellulär an die drei verschiedenen VEGF-Rezeptoren 1-3 binden. Die VEGF-Rezeptoren leiten das empfangene Signal der Wachstumsfaktoren ins Innere der Zelle weiter und induzieren dort komplexe Signaltransduktionskaskaden wie den Raf-MEK-Erk oder den PI3K-Akt-Signalweg, welche schließlich u.a. zur Zellproliferation oder Zellmigration führen.^[95]

VEGFR1 spielt eine wichtige Rolle bei der Hämatopoese (Blutbildung), VEGFR2 ist wichtig für das Zellwachstum von vaskulären Endothelzellen und VEGFR3 reguliert das Zellwachstum von lymphatischen Endothelzellen. Damit kommt VEGFR2 (auch bekannt als *kinase domain region*, KDR) bezüglich der angiogenese-basierten Wachstumshemmung von Tumoren die größte Bedeutung zu.^[93]

Inzwischen ist eine Vielzahl an Kinaseinhibitoren zugelassen, die als Haupt-Target VEGFR2 hemmen. Zugelassen sind VEGFR-Inhibitoren u.a. zur Behandlung des differenzierten Schilddrüsenkarzinoms (Lenvatinib), des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms (Sorafenib, Sunitinib, Axitinib, Pazopanib), des kolorektalen Karzinoms (Regorafenib), des fortgeschrittenen nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms (Nintedanib) und zur Behandlung nicht resezierbarer und/oder metastasierter maligner gastrointestinaler Stromatumoren (Sunitinib).^[96,97]

1.2.4 Platelet-derived Growth Factor Rezeptoren (PDGFRs)

Der PDGF-Signalweg spielt vor allem während der Embryogenese insbesondere bei der Ausbildung der Nieren, der Lunge, der Gonaden, des Darms und des ZNS eine zentrale Rolle. Zudem ist der PDGF-Signalweg ähnlich wie der VEGF-Signalweg auch an der Angiogenese sowie der Hämatopoese beteiligt. Tumore können durch eine verstärkte Ausschüttung von PDGFs Fibroblasten und Perizyten im umliegenden Stroma parakrin stimulieren und so eine Angiogenese auslösen. In Glioblastomen, Sarkomen sowie bei verschiedenen Leukämien wurde eine autokrine Aktivierung des PDGF-Signalweges beobachtet.^[98,99] In Bezug auf seine generelle onkologische Bedeutung lässt sich festhalten, dass der PDGF-Signalweg an drei von sechs charakteristischen Eigenschaften von Krebszellen direkt beteiligt ist: Einem selbstständigen Zellwachstum, an der Angiogenese sowie der Metastase.^[99,100]

Darüber hinaus wird eine Überexprimierung von PDGFs auch mit verschiedenen vaskulären Krankheiten wie Atherosklerose, pulmonaler Hypertonie oder Retinopathie sowie einigen fibrotischen Erkrankungen wie Lungen- und Leberfibrose in Zusammenhang gebracht.^[99]

Es sind vier PDGF-Isoformen (A-D) bekannt, die jeweils als Dimer auftreten. Neben den Homodimeren PDGF-AA, -BB, -CC und -DD wurde auch das Heterodimer PDGF-AB identifiziert. Die PDGF-Dimere binden an die beiden Rezeptortyrosinkinasen PDGFR α und PDGFR β . Eine Ligandbindung führt, wie bereits allgemein für RTKs beschrieben, zu einer Dimersierung zweier Rezeptoren, wodurch es insgesamt zur Bildung von drei Rezeptordimeren kommen kann: PDGFR- $\alpha\alpha$, - $\alpha\beta$ und - $\beta\beta$.^[98]

1.3 Niedermolekulare Kinaseinhibitoren

Proteinkinasen galten aufgrund der zum Teil sehr großen strukturellen Ähnlichkeiten der 518 humanen Kinasen und der damit einhergehenden Selektivitätsproblematik von Kinaseinhibitoren lange Zeit als *undruggable* Targets. Beispielhaft dafür steht das bereits seit den 1970er Jahren bekannte Alkaloid Staurosporin, das zwar einen potenten Kinasehemmer darstellt, aufgrund fehlender Selektivität jedoch hochtoxisch ist und therapeutisch daher nicht eingesetzt werden kann.^[101] Mit fortschreitender struktureller Aufklärung von Kinasen und strukturbasiertem Wirkstoffdesign gelang es in den letzten 20 Jahren jedoch wirksame und zugleich selektivere Inhibitoren zu entwickeln und in die klinische Anwendung zu bringen. Stand heute sind 48 niedermolekulare Kinaseinhibitoren von der Food and Drug Administration (FDA) zugelassen.^[102]

1.3.1 Klassifizierung von Kinaseinhibitoren

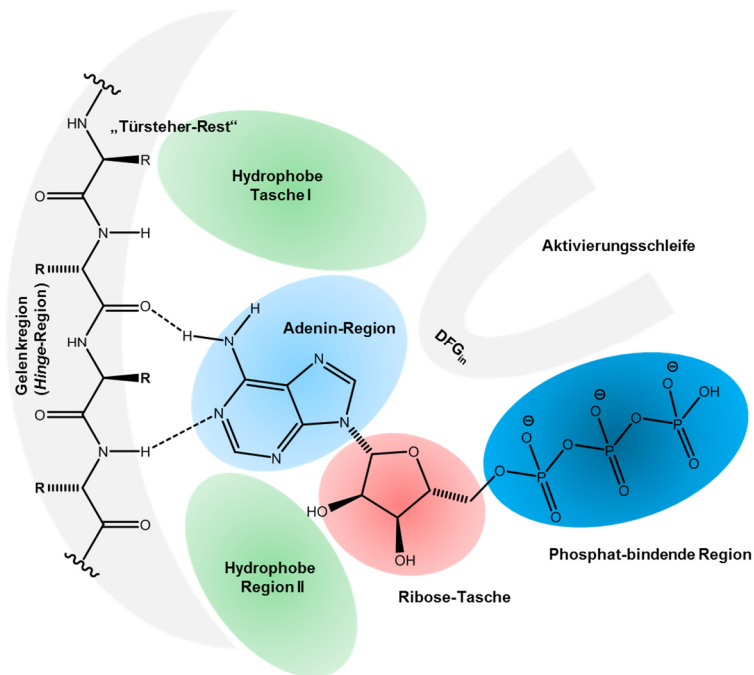
Niedermolekulare Kinaseinhibitoren lassen sich basierend auf ihrem Bindemodus bzw. dem zugrundeliegenden Hemmmechanismus in verschiedene Typen einteilen. In der Literatur werden verschiedene Klassifizierungssysteme zur Einteilung von Kinaseinhibitoren vorgeschlagen, die sich zum Teil in der Anzahl der Inhibitor-Typen unterscheiden.^[87,103–107] Im Folgenden wird die kürzlich von Roskoski vorgeschlagene Einteilung in sechs verschiedene Inhibitortypen beschrieben (Tab. 1.2).^[107]

Typ-I Inhibitoren sind ATP-kompetitive Inhibitoren und binden an der aktiven, d.h. phosphorylierten, Kinase (DFG_{in}-Konformation). In diesem Fall lässt sich die ATP-Bindetasche vereinfacht mit dem sog. Traxler-Pharmakophormodell beschreiben (Abb. 1.13a). Demnach ist die Bindetasche in fünf Regionen unterteilbar. Zum einen die Adenin-Region, die Ribose-Tasche und die Phosphat-bindende Region, die allesamt von ATP genutzt werden und zum anderen die benachbarte hydrophobe Tasche I sowie die hydrophobe Region II, die nicht von ATP besetzt werden. Die Größe und der Zugang der hydrophoben Tasche I ist abhängig von der sterischen Ausdehnung des sog. Türsteher-Aminosäurerestes (*gate keeper*).^[108] Typ-I-Inhibitoren zeichnen sich folglich durch einen wasserstoffbrückenbildenden Heterozyklus aus, der anstelle des Adenin-Bausteins von ATP an die *Hinge*-Region der Kinase bindet. Zur Erhöhung der Selektivität nutzen Typ-I Inhibitoren meist zusätzlich die benachbarte hydrophobe Tasche I und die hydrophobe Region II. Da Typ-I Inhibitoren mit dem natürlichen Cofaktor ATP um die Bindetasche konkurrieren, müssen die Verbindungen idealerweise eine sehr hohe Bindeaffinität aufweisen.^[87]

Typ-II Inhibitoren binden an die inaktive DFG_{out}-Konformation der Kinase. Diese Inhibitoren binden zwar grundsätzlich im aktiven Zentrum der Kinase, ein Teil der ATP-Bindetasche wird jedoch durch die Aktivierungsschleife blockiert und ist weder für den Inhibitor noch für ATP zugänglich (Abb. 1.13b). Folglich stellen Typ-II Inhibitoren streng genommen keine reinen kompetitiven Inhibitoren, sondern eher „indirekt“- oder „gemischt“-ATP-kompetitive Inhibitoren dar. Die Verbindungen adressieren typischerweise die nur in der DFG_{out}-Konformation zugängliche tiefe Bindetasche (*deep pocket*) und werden daher auch als *deep pocket binder* bezeichnet. Darüber hinaus sind aber auch Typ-II Inhibitoren bekannt, die nicht die tiefe Bindetasche adressieren (z.B. Axitinib). Die meisten Typ-II Inhibitoren bilden eine oder zwei Wasserstoffbrückenbindungen zur *Hinge*-Region aus. *Hinge*-Interaktionen sind aber im Gegensatz zu Typ-I Inhibitoren nicht essentiell.^[87,107]

Da viele Kinasen in der DFG_{out}-Konformation größere strukturelle Unterschiede aufweisen als in der DFG_{in}-Konformation, sind Typ-II Inhibitoren tendenziell selektiver als Typ-I Inhibitoren.^[109] Weiterhin unterschieden sich Typ-I und Typ-II Inhibitoren auch in der zugrundeliegenden Bindungskinetik. Typ-I Inhibitoren zeigen eine schnelle Bindung und eine vergleichsweise schnelle Dissoziation, während Typ-II Inhibitoren eine langsame Bindung und eine sehr langsame Dissoziation zeigen.^[87]

a



b

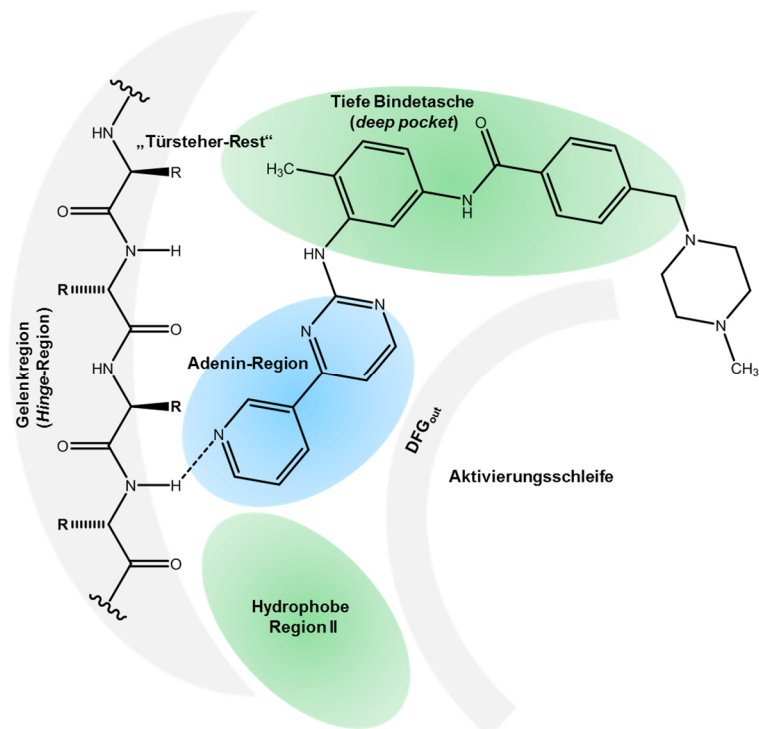


Abb. 1.13 a) Schematische Darstellung der ATP-Bindetasche in der DFG_{in}-Konformation nach dem Traxler-Pharmakophormodell. ATP besetzt die Adenin-Region, die Ribose-Tasche und die Phosphat-bindende Region. Die hydrophobe Tasche I und die hydrophobe Region II können von Typ-I Inhibitoren adressiert werden, um die Selektivität zu erhöhen. **b)** Schematische Darstellung der ATP-Bindetasche in der DFG_{out}-Konformation. Der Typ-II Inhibitor Imatinib besetzt die Adenin-Region und die tiefe Bindetasche. Ein Teil der ATP-Bindetasche wird von der DFG-Sequenz der Aktivierungsschleife blockiert.^[108,110]

Typ-I^{1/2} weisen sowohl typische Merkmale von Typ-I Inhibitoren als auch von Typ-II Inhibitoren auf und stellen daher in gewisser Weise Hybrid-Inhibitoren aus beiden Typen dar. Ähnlich wie Typ-I Inhibitoren binden Typ-I^{1/2} Inhibitoren an die DFG_{in}-Konformation der Kinase und interagieren mit der *Hinge*-Region. Allerdings befindet sich die Kinase dabei oft in einem inaktiven Zustand, da die C-Helix nicht in der aktiven Konformation vorliegt und/oder das regulatorische Rückgrat (*regulatory spine*) der Kinase unterbrochen ist. Zudem interagieren Typ-I^{1/2} Inhibitoren typischerweise mit Aminosäureresten im hinteren Bereich der ATP-Bindetasche, die sonst oft von Typ-II Inhibitoren adressiert werden. Viele Typ-I^{1/2} Inhibitoren wurden ursprünglich als Typ-II Inhibitoren entwickelt und erst nach genauerer Charakterisierung als Typ-I^{1/2} Inhibitoren identifiziert.^[107]

Bei allosterischen Kinaseinhibitoren lassen sich Typ-III und Typ-IV Inhibitoren unterscheiden. Erstere binden in unmittelbarer Nachbarschaft zur ATP-Bindetasche, während letztere allosterische Bindestellen an anderen Stellen des Proteins adressieren.^[107] Bivalente Inhibitoren (Typ-V) kombinieren den Ansatz verschiedener Inhibitortypen, indem beispielsweise ein ATP-kompetitiver Molekülbaustein mit einem allosterischen Inhibitor über einen Linker verbunden wird.^[111,112]

Während Typ-I bis -IV Inhibitoren in der Regel reversible Inhibitoren darstellen, binden Typ-VI Inhibitoren kovalent und damit irreversibel an ihr Zielprotein. Typischerweise weisen die Verbindungen Michaelakzeptor-Strukturen auf und binden an Cystein-Reste in der ATP-Bindetasche.^[103,113]

Tab. 1.2 Klassifizierung von niedermolekularen Kinaseinhibitoren nach Roskoski.^[107]

Typ	Typische Merkmale	Beispiele
I	ATP-kompetitiver Inhibitor, Bindung an der aktiven DFG _{in} -Konformation, mehrere H-Brücken zur <i>Hinge</i> -Region	Gefitinib, Vandetanib
II	(indirekt/gemischt) ATP-kompetitiver Inhibitor, Bindung an der inaktiven DFG _{out} -Konformation, meist ein bis zwei <i>Hinge</i> -Interaktionen, oft <i>deep pocket binder</i>	Imatinib, Nilotinib, Axitinib
I ^{1/2}	ATP-kompetitiver Inhibitor, Bindung an der DFG _{in} -Konformation, Störung des regulatorischen Rückgrats (<i>regulatory spine</i>), vereint Merkmale von Typ-I und Typ-II	Lapatinib, Vemurafenib, Lenvatinib
III	allosterischer Inhibitor, Bindung in unmittelbarer Nachbarschaft zur ATP-Bindetasche, z.B. in der <i>deep pocket</i> der DFG _{out} -Konformation, keine <i>Hinge</i> -Interaktionen	Trametinib, TAK-733, PD184352
IV	allosterischer Inhibitor, Bindung an allosterischen Bindestellen außerhalb der ATP- Bindetasche, Bindung an der DFG _{in} - und DFG _{out} -Konformation möglich	GNF-2
V	bivalenter Inhibitor, Bindung an zwei benachbarten Bindestellen, vereint Merkmale verschiedener Inhibitortypen	-
VI	irreversible Inhibitor, meist kovalente Bindung an Cystein-Resten in der ATP-Bindetasche	Afatinib, Ibrutinib

1.3.2 Imatinib und Nilotinib

Imatinib (**28**, Glivec[®], Novartis) ist ein Proteinkinaseinhibitor, der seit 2001 zur Behandlung der chronisch myeloischen Leukämie (CML) zugelassen ist. Die Verbindung stellt damit den ersten zugelassenen Kinaseinhibitor dar und gilt als Meilenstein auf dem Gebiet der Kinaseforschung. Haupt-Target von Imatinib (**28**) ist die mutierte Tyrosinkinase BCR-ABL, die auf einen Gendefekt zurückzuführen ist, der bei einem Großteil der CML-Patienten auftritt. BCR-ABL ist ein Fusionsprotein mit unkontrollierter Kinaseaktivität und wird durch das Fusionsgen BCR-ABL codiert, das in Folge eines verkürzten Chromosoms 22, dem sog. Philadelphia-Chromosom, auftritt. Neben BCR-ABL inhibiert Imatinib (**28**) auch die Rezeptortyrosinkinasen PDGFR β und c-Kit sowie die nicht mutierte ABL1-Kinase.^[114,115]

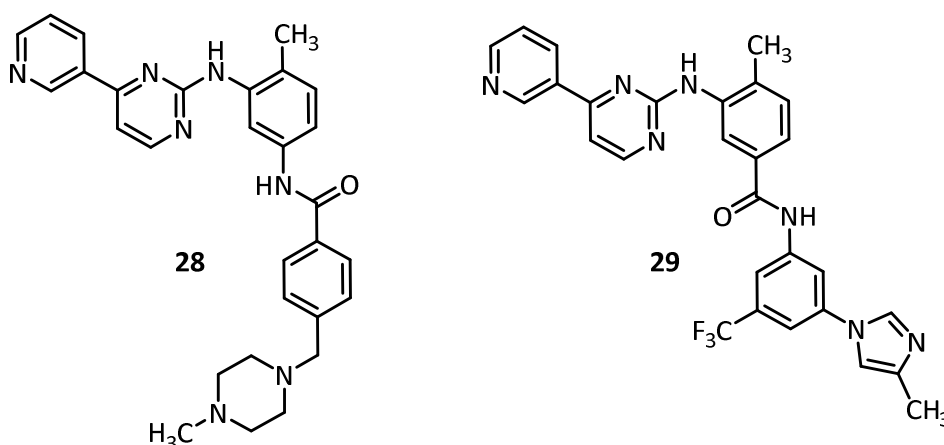


Abb. 1.14 Strukturformeln der BCR-ABL-Inhibitoren Imatinib (**28**) und Nilotinib (**29**)

Imatinib (**28**) hat die Behandlung der CML grundlegend revolutioniert. So konnte bei 90 % der CML-Patienten die Überlebensdauer auf 4.5 Jahre verlängert werden. Problematisch ist allerdings das Auftreten von Resistenzen, beispielsweise durch Punktmutationen in der Kinasedomäne, die eine Bindung von Imatinib verhindern. Aus diesem Grund wurde eine zweite Generation an BCR-ABL-Inhibitoren entwickelt, die zum Teil nicht nur höhere Bindeaffinitäten und bessere Selektivitätsprofile als Imatinib aufweisen, sondern auch bestimmte BCR-ABL-Mutanten effektiv hemmen. Dazu zählen u.a. Nilotinib (**29**), Bafetinib, Dasatinib, Bosutinib und Ponatinib.^[115]

1.3.3 Axitinib

Axitinib (*E-30*, Inlyta[®], Pfizer) ist ein multi-RTK-Inhibitor zur Behandlung des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms. Der Wirkstoff ist seit 2012 als Mittel der zweiten Wahl zugelassen, wenn die Krebserkrankung nach einer Vorbehandlung mit Zytokinen oder Sunitinib progredient ist. Die Haupt-Targets von Axitinib (*E-30*) sind die VEGF-Rezeptoren 1-3 sowie die RTKs PDGFR β und c-Kit (Tab. 1.3).^[116]

In vielen klarzelligen Nierenzellkarzinomen liegt eine Mutation des Von-Hippel-Lindau-Tumorsuppressorgens vor, die zu einer verstärkten Ausschüttung von VEGFs führt. Axitinib blockiert die VEGF-vermittelte Angiogenese-Aktivität des Karzinoms, wodurch es zu einer Unterversorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen kommt. In Mausmodellen wurde eine verminderte Vaskularisation, ein geringerer Blutdurchfluss und ein Schrumpfen von verschiedenen Tumoren nachgewiesen. In einer klinischen Phase-III-Studie zeigten Nierenkrebspatienten mit gescheiterter Vorbehandlung durch Sunitinib oder Zytokine nach einer anschließenden Axitinib-Behandlung ein signifikant längeres progressionsfreies Überleben im Vergleich zur Behandlung mit Sorafenib. Zu den häufigsten Nebenwirkungen von Axitinib zählen Diarrhö, Hypertonie, Müdigkeit, verminderter Appetit, Übelkeit, Gewichtsabnahme, Dysphonie, Hand-Fuß-Syndrom, Hämorrhagie, Hypothyreose, Erbrechen, Proteinurie, Husten und Obstipation.^[117]

Tab. 1.3 IC₅₀-Werte und Dissoziationskonstanten (K_d) von Axitinib gegenüber den Haupt-Targets.

Target	IC ₅₀ (nM) ^[116]	K _d (nM) ^[109,118]
VEGFR1	0.1	n.a.
VEGFR2	0.06 - 0.2	1.1 - 5.9
VEGFR3	0.1 - 0.3	n.a.
PDFGR β	1.6	0.51
c-Kit	1.7	3.2

Axitinib (*E-30*) ist aufgrund seiner stilbenähnlichen Struktur lichtempfindlich (Abb. 1.15). Im festen Zustand hängt die Photostabilität maßgeblich von der vorliegenden polymorphen Form ab.^[119] Im Hinblick auf ein sicheres Inverkehrbringen wurde die Stabilität der unterschiedlichen Axitinibmodifikationen daher von der Firma Pfizer eingehend untersucht.^[120] Im Gegensatz dazu lassen

sich zur Photochemie von Axitinib (*E*-**30**) in Lösung nur wenige Angaben in der Literatur finden.^[119,121,122]

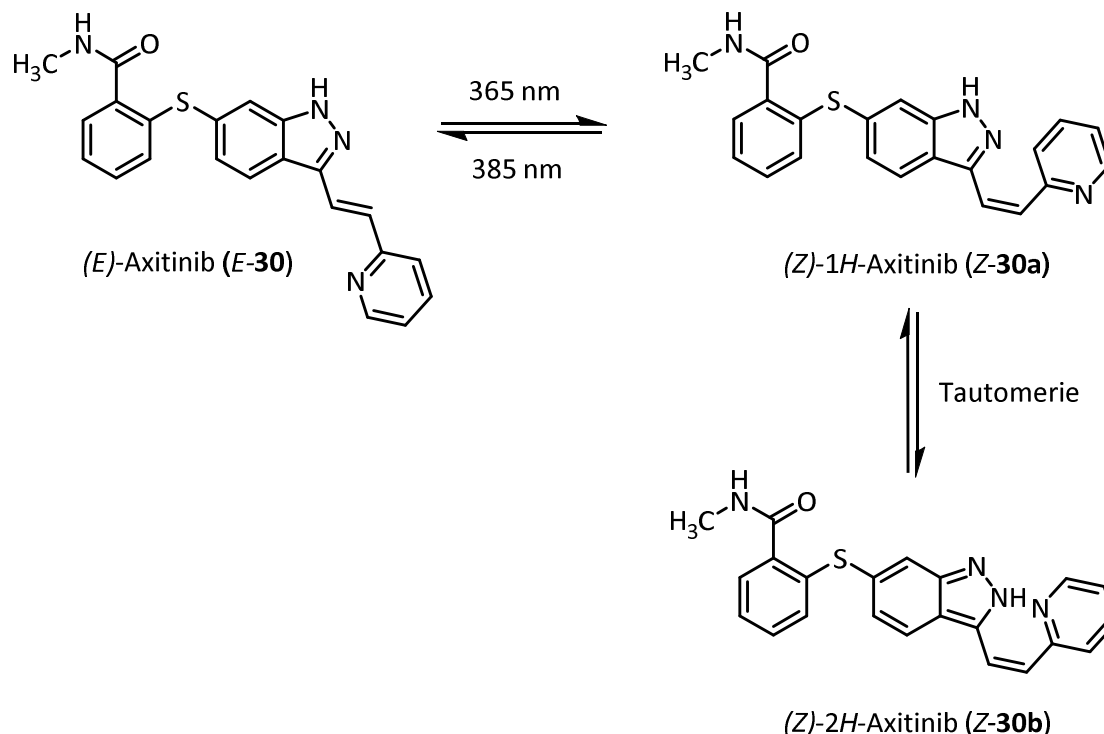


Abb. 1.15 Lichtinduzierte *E/Z*-Isomerisierung von (*E*)-Axitinib (**30**) in DMSO. Das *Z*-Isomer kann sowohl als 1*H*-Tautomer (**30a**) als auch als 2*H*-Tautomer (**30b**) vorliegen.

Die Eignung von Axitinib (**30**) als photoschaltbarer Inhibitor wurde erstmals von Horbert^[123] und Weber^[124] untersucht. In DMSO konnte eine partielle *E/Z*-Isomerisierung durch Bestrahlung mit 365 nm bzw. 385 nm demonstriert werden. Weiterhin gelang Weber die Isolierung von (*Z*)-Axitinib (**30a**) und der Nachweis eines zweiten Indazoltautomers in der *Z*-Konfiguration. Das (*Z*)-2*H*-Tautomer (**30b**) zeichnet sich durch eine intramolekulare Wasserstoffbrücke aus, die sowohl NMR-spektroskopisch in Lösung als auch mittels Röntgenkristallstrukturanalyse beobachtet werden kann (Abb. 1.16).

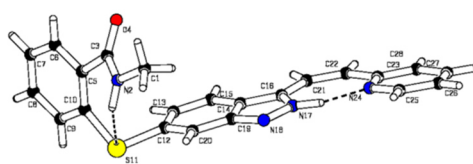


Abb. 1.16 Röntgenkristallstruktur von (*Z*)-2*H*-Axitinib (**Z-30b**).^[124]

Die biologische Charakterisierung der isolierten Axitinibisomere *E*-**30** und *Z*-**30** lieferte zunächst keine einheitlichen Ergebnisse im Hinblick auf eine Eignung als photoschaltbaren Inhibitor. So konnten *in vitro* in verschiedenen VEGFR2-Kinaseassays nur geringe Affinitätsunterschiede zwischen beiden Isomeren gemessen werden, während in einem PDGFR β -Assay ein etwa 20-facher Wirkunterschied zwischen (*E*)-Axitinib (*E*-**30**) und (*Z*)-Axitinib (*Z*-**30**) demonstriert werden konnte. Weiterhin wurden für beide Axitinibisomere in einem kommerziellen Hochdurchsatz-Screening (ProQinase GmbH) nahezu identische Selektivitätsprofile an 300 verschiedenen Kinasen bestimmt. Auf zellulärer Ebene konnte weder in einem NIH/3T3- noch in einem PC3-Proliferationsassay ein eindeutiger Wirkunterschied zwischen beiden Axitinibisomeren nachgewiesen werden.^[123]

Um die photochemischen Eigenschaften von Axitinib zu verbessern, wurde weiterhin im Jahre 2015 von Kuhl eine „Azologisierung“ von Axitinib durchgeführt.^[125] Dabei wurde die CC-Doppelbindung des stilbenähnlichen Systems durch eine Azobindung ersetzt. Nach photochemischer Charakterisierung stellte sich jedoch heraus, dass die entsprechende Azoverbindung nicht als photoschaltbarer Kinaseinhibitor verwendet werden kann. Zwar ist „Azoaxitinib“ (**31**) mit einem IC₅₀-Wert von 415 nM ein moderater VEGFR2-Inhibitor, das *Z*-Isomere *Z*-**31a** ist jedoch aufgrund der vorliegenden Azo-Hydrason-Tautomerie und der damit einhergehenden schnellen thermischen Rückisomerisierung sehr instabil (Abb. 1.17).^[126–128]

Darüber hinaus ist eine direkte Azologisierung von Axitinib auch konzeptionell nur bedingt sinnvoll, da das thermodynamisch stabile *E*-Isomere (*E*-**31a**) den bioaktiven Zustand darstellt und durch Photoschaltung nur anteilig und temporär in den vermeintlich bioinaktiven Zustand *Z*-**31a** geschaltet werden könnte.

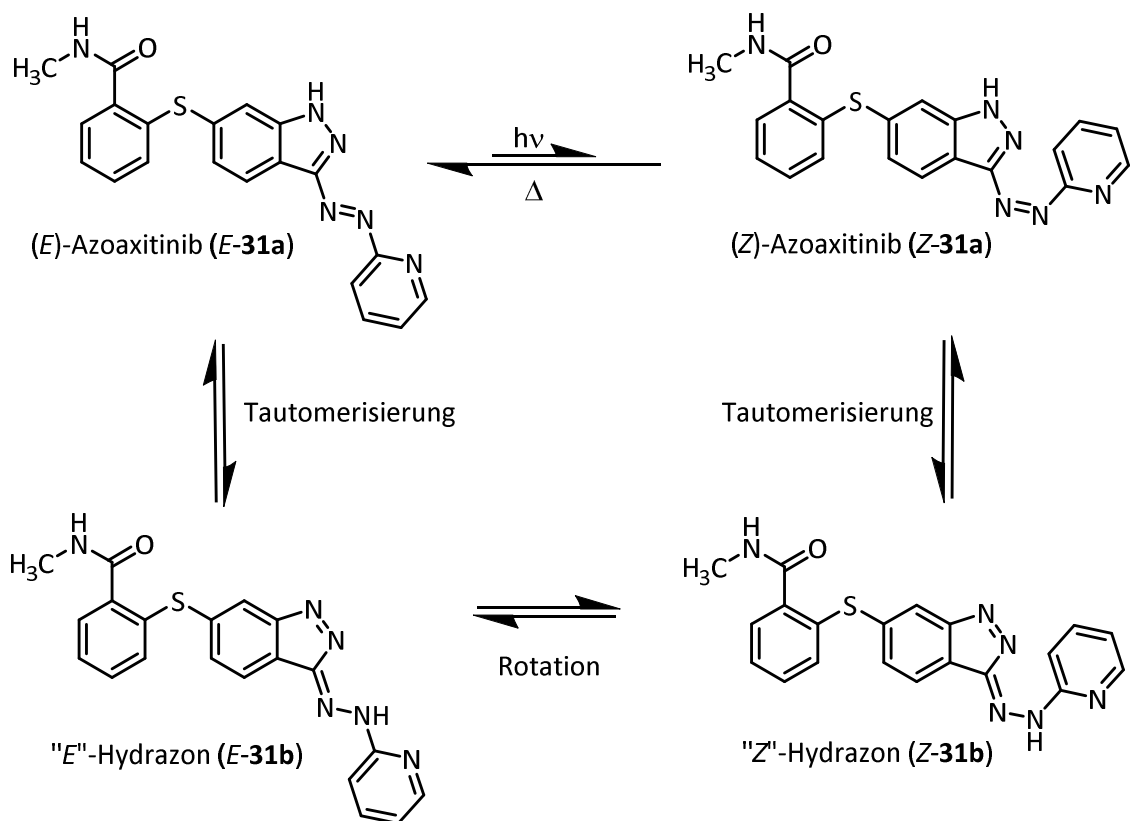


Abb. 1.17 Azo-Hydrazon-Tautomerie von Azoaxitinib (**31**). Durch das vorliegende Tautomerengleichgewicht wird die Doppelbindung der Azofunktion temporär zu einer frei drehbaren Einfachbindung. Durch Rotation und anschließende Rücktautomerisierung kann das *Z*-Isomer **Z-31a** folglich schnell zurück ins thermodynamisch stabile *E*-Isomer **E-31a** übergehen.^[125,127,128]

2. KONZEPT UND ZIELSTELLUNG

Allgemeine Zielstellung dieser Arbeit ist die Entwicklung photoschaltbarer Kinaseinhibitoren, deren biologische Aktivität sich durch gezielte Bestrahlung mit Licht regulieren lässt. Die Inhibitoren sind dabei so konzipiert, dass sie sich photochemisch zwischen zwei Zuständen reversibel schalten lassen, von denen ein Zustand idealerweise biologisch aktiv und ein Zustand biologisch inaktiv ist. Auf molekularer Ebene dienen dabei photo-isomerisierbare Strukturen wie (Hetero-)Stilbene, Azobenzole oder Diazocine als photoschaltbare Einheiten.

Photoschaltbare Inhibitoren stellen vielversprechende pharmakologische Werkzeuge in der chemisch-biologischen Forschung dar, da sie eine bioorthogonale sowie räumlich und zeitlich kontrollierte Regulation von Proteinen und biologischen Funktionen ermöglichen. So können photoschaltbare Kinaseinhibitoren u.a. einen Beitrag zur Aufklärung von komplexen Signaltransduktionskaskaden oder zellulären *escape pathways* leisten, da sie z.B. im Gegensatz zu gentechnologischen Ansätzen (Gen-*Knockouts*) keine dauerhafte und irreversible Abschaltung bestimmter Proteinfunktionen herbeiführen.^[78] Darüber hinaus können photoschaltbare Inhibitoren Teil von innovativen Therapiekonzepten auf dem Gebiet der Photopharmakologie sein. Ziel der Photopharmakologie ist es, neuartige Medikamente und Behandlungsmethoden zu entwickeln, die eine gezielte Freisetzung des Wirkstoffs nur am vorgesehenen Wirkort ermöglichen. Auf diese Weise könnten Therapien effektiver und selektiver gemacht werden und zudem unerwünschte Nebenwirkungen verringert werden. Auch im Hinblick auf Resistenzbildung und zunehmende Kontaminierung der Umwelt mit nicht abbaubaren Wirkstoffen könnten photopharmakologische Konzepte eine Anwendung finden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden im Wesentlichen drei Teilprojekte bearbeitet. Im ersten Teilprojekt sollte, basierend auf den Vorarbeiten von Horbert, der zugelassene Kinaseinhibitor Axitinib (**E-30**) im Hinblick auf seine Eignung als photoschaltbarer Kinaseinhibitor weitergehend untersucht werden. Dabei sollte insbesondere das photochrome System von Axitinib (**E-30**) genauer charakterisiert und die photochemischen Eigenschaften in wässriger Lösung untersucht werden. Weiterhin sollten Axitinibderivate mit modifizierten stilbenähnlichen Photoschaltern synthetisiert werden (Abb. 2.1 *oben*), mit dem Ziel, möglichst große Wirkunterschiede zwischen *E*- und *Z*-Isomer zu erzielen.

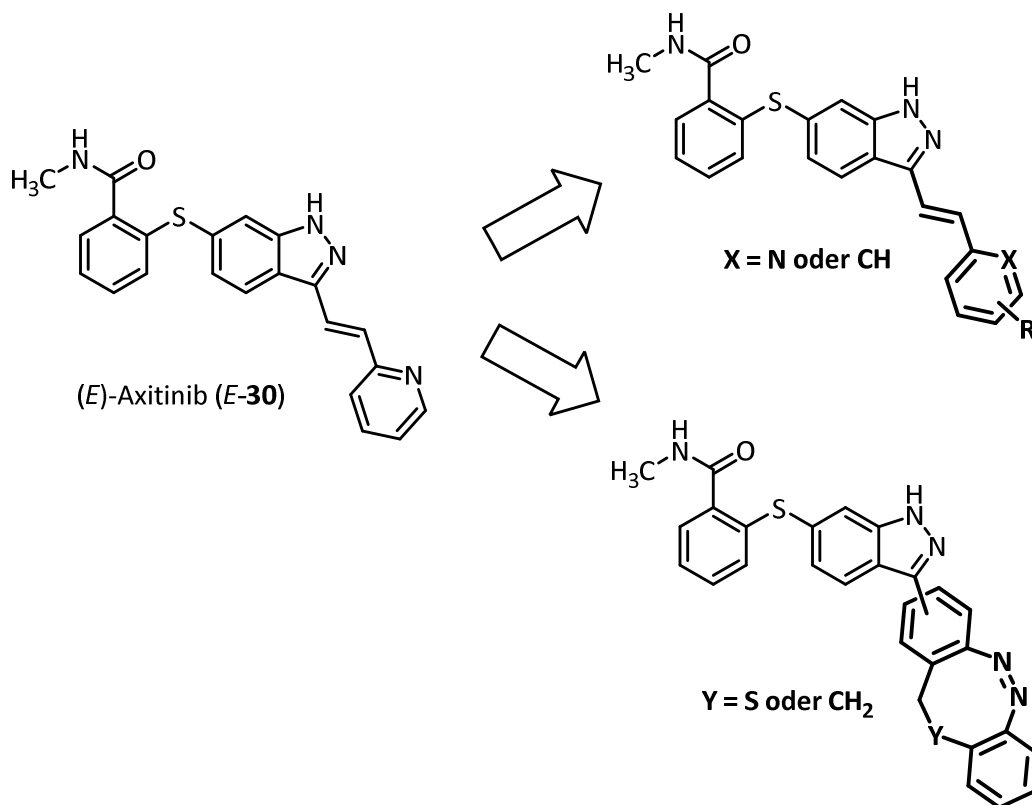


Abb. 2.1 Strategien zur Entwicklung photoschaltbarer Axitinibderivate.

Ziel des zweiten Teilprojektes war es, das Axitinibpharmakophor mit verbrückten Azobenzolen (Diazocinen) zu funktionalisieren (Abb. 2.1 unten). Diazocine zeichnen sich vor allem durch ihre hohe Schalteffizienz und gute Photostabilität aus und haben gegenüber den weitverbreiteten klassischen Azobenzolen den Vorteil, dass sie in der Z-Konfiguration thermodynamisch stabil sind. Dies prädestiniert sie für eine potentielle photopharmakologische Anwendung. Dazu sollten zunächst Strategien zur Verknüpfung des Pharmakophors mit geeigneten substituierten Diazocinen erarbeitet werden und die Eignung der erstellten Verbindungen als photoschaltbare VEGFR2-Inhibitoren mit Hilfe von Molecular Modeling evaluiert werden. Anschließend sollten die dafür benötigten funktionalisierten Diazocine synthetisiert und eine Syntheseroute zur Kupplung mit dem Axitinibpharmakophor entwickelt werden. Synthetisierte Kandidaten sollten schließlich photochemisch charakterisiert und in einem *in vitro* VEGFR2-Kinaseassay sowie in geeigneten Zellassays auf ihre biologische Aktivität hin untersucht werden.

In einem dritten Teilprojekt sollte das Photoschaltungskonzept auf weitere geeignete Kinaseinhibitoren angewendet werden. Dazu sollten geeignete literaturbekannte Kinaseinhibitoren mit „azologen“ Molekülstrukturen identifiziert werden und eine potentielle Azofunktionalisierung mittels Molecular Modeling untersucht werden. Vielversprechende Kandidaten sollten synthetisiert und photochemisch sowie biologisch charakterisiert werden. Im oberen Teil von Abb. 2.2 ist beispielhaft die „Azologisierung“ des Pharmakophors des zugelassenen Kinaseinhibitors Imatinib gezeigt. Dabei wird die Amidfunktion durch eine photoschaltbare Azofunktion ersetzt.

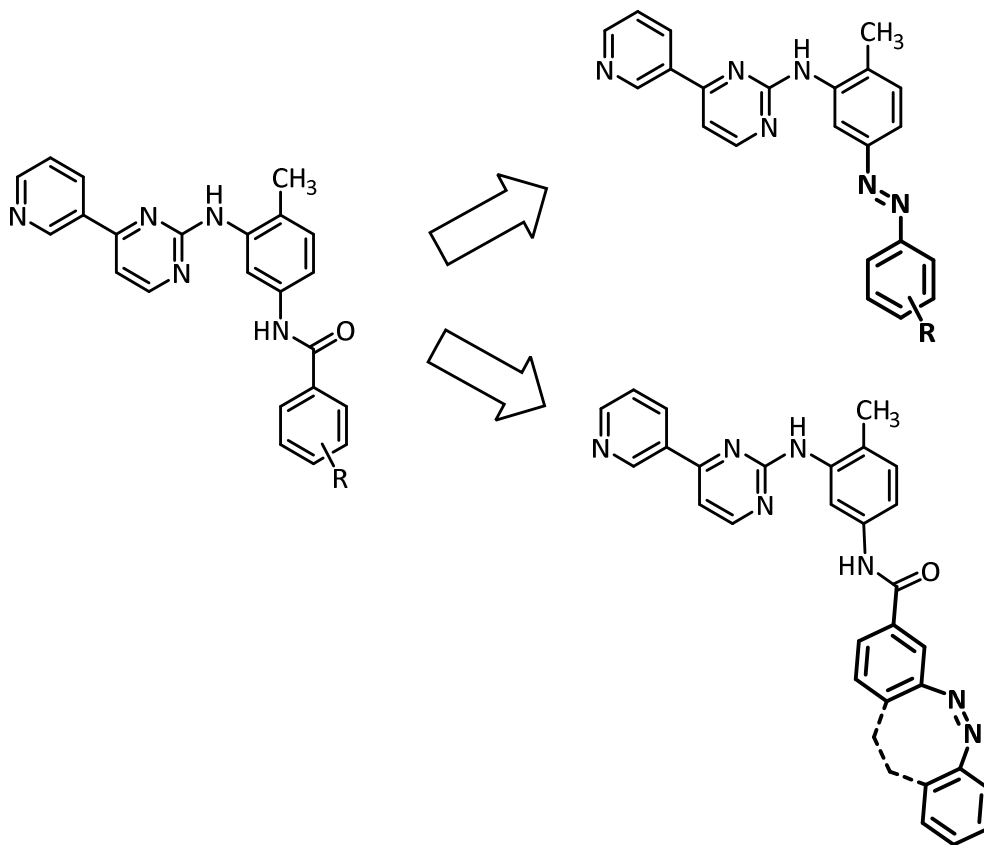


Abb. 2.2 *Oben:* Azologisierung des Pharmakophors von Imatinib. Um die Verbindung photoschaltbar zu machen, wird die Amid-Funktion durch eine Azo-Funktion ersetzt. In der *E*-Konfiguration weist die Azobindung eine ähnliche Geometrie wie die Amidbindung auf. In der *Z*-Konfiguration ändert sich die Molekülgeometrie hingegen, sodass eine Bindung an das Target erschwert wird. *Unten:* Azofunktionalisierung des Pharmakophors von Imatinib unter Erhalt der Amid-Bindung.

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1 Axitinib und stilbenähnliche Axitinibderivate

3.1.1 Molecular Modeling

(*E*)-Axitinib (*E-30*) bindet an die inaktive DFG_{out}-Konformation von VEGFR2 und gehört damit grundsätzlich zur Klasse der Typ-II Kinaseinhibitoren. Allerdings besetzt (*E*)-Axitinib (*E-30*) im Gegensatz zu den meisten Typ-II Inhibitoren nicht die charakteristische tiefe Bindetasche (*deep pocket*), die nur in der DFG_{out}-Konformation zugänglich ist. Der genaue Bindemodus von (*E*)-Axitinib (*E-30*) an VEGFR2 konnte bereits im Jahre 2012 von McTigue *et al.*^[129] mittels Röntgenkristallstrukturanalyse aufgeklärt werden (Abb. 3.1). Demnach bildet das zentrale Indazol zwei Wasserstoffbrückenbindungen zur *Hinge*-Region der Kinase aus. Die Amid-Funktion bildet zwei weitere Wasserstoffbrücken im hinteren Bereich der ATP-Bindetasche aus. Der Pyridin-Rest besetzt die zum Solvens hin geöffnete hydrophobe Region II im vorderen Bereich der ATP-Bindetasche.

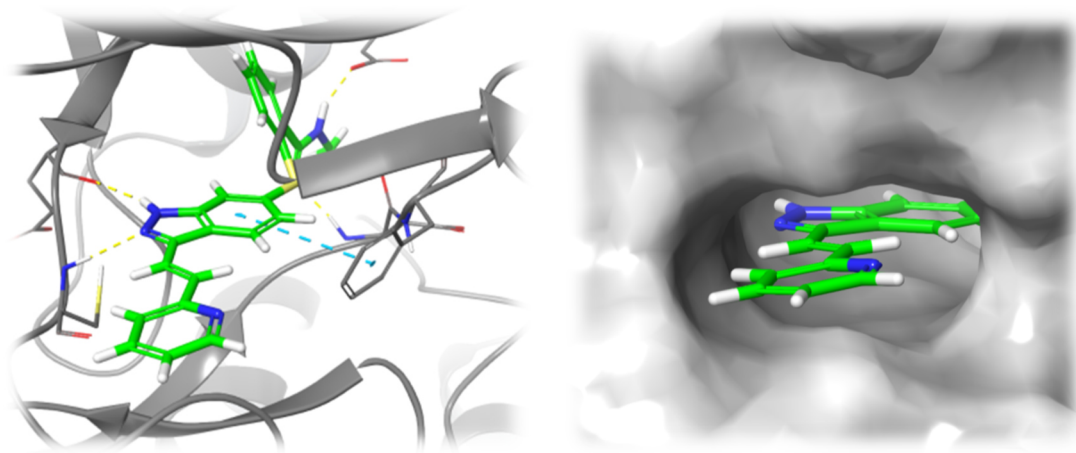


Abb. 3.1 Kristallstruktur von (*E*)-Axitinib (*E-30*, hellgrün) und der Rezeptortyrosinkinase VEGFR2 (PDB: 4AG8).^[129] Gelb-gestrichelte Linien: Wasserstoffbrückenbindungen; hellblau-gestrichelte Linien: π - π -Wechselwirkungen. Ein Redocking des Liganden in die ATP-Bindetasche liefert einen Docking Score von -15.6. *Links*: Kartoon-Darstellung des Proteins (grau), *rechts*: Darstellung der molekularen Proteinoberfläche (grau).

Um die Eignung von Axitinib als photoschaltbaren Inhibitor abzuschätzen, wurden mit der Software Schrödinger *Glide* mögliche Bindemodi von (*Z*)-Axitinib (**Z-30**) berechnet und mit dem Bindemodus von (*E*)-Axitinib (**E-30**) verglichen. Zwar wird für (*Z*)-Axitinib (**Z-30**) beim *Glide*-Docking ein Bindemodus in der ATP-Bindetasche gefunden, dabei gehen jedoch alle Wasserstoffbrückenbindungen zur *Hinge*-Region verloren, da der Indazolrest im Vergleich zu (*E*)-Axitinib (**E-30**) um 180° verdreht in der Bindetasche vorliegt (Abb. 3.2a). Da *Hinge*-Interaktionen mit zu den charakteristischsten Eigenschaften von Kinaseinhibitoren zählen, ist eine tatsächliche Bindung von (*Z*)-Axitinib (**Z-30**) nach dem berechneten Bindemodus eher fraglich, bzw. es ist von keiner hohen Bindeaffinität auszugehen. Ein Bindemodus unter Beibehaltung des bidentaten Wasserstoffbrückenmusters des Indazols wird in der *Z*-Konfiguration beim *Glide*-Docking nicht gefunden. Dies wird in Abb. 3.2b veranschaulicht. Legt man den Bindemodus von (*E*)-Axitinib (**E-30**) zugrunde aber isomerisiert die Doppelbindung zwischen Indazol- und Pyridinrest, so kommt es zu einer sterischen Kollision des Pyridinrestes mit dem Protein. Eine Bindung des (*Z*)-2*H*-Tautomers (**Z-30a**) wird im Vergleich zum 1*H*-Tautomer zusätzlich erschwert, da hier Wasserstoffbrückendonator und -akzeptor des Indazols vertauscht sind und dieses Motiv nicht mit der *Hinge*-Region interagieren kann.

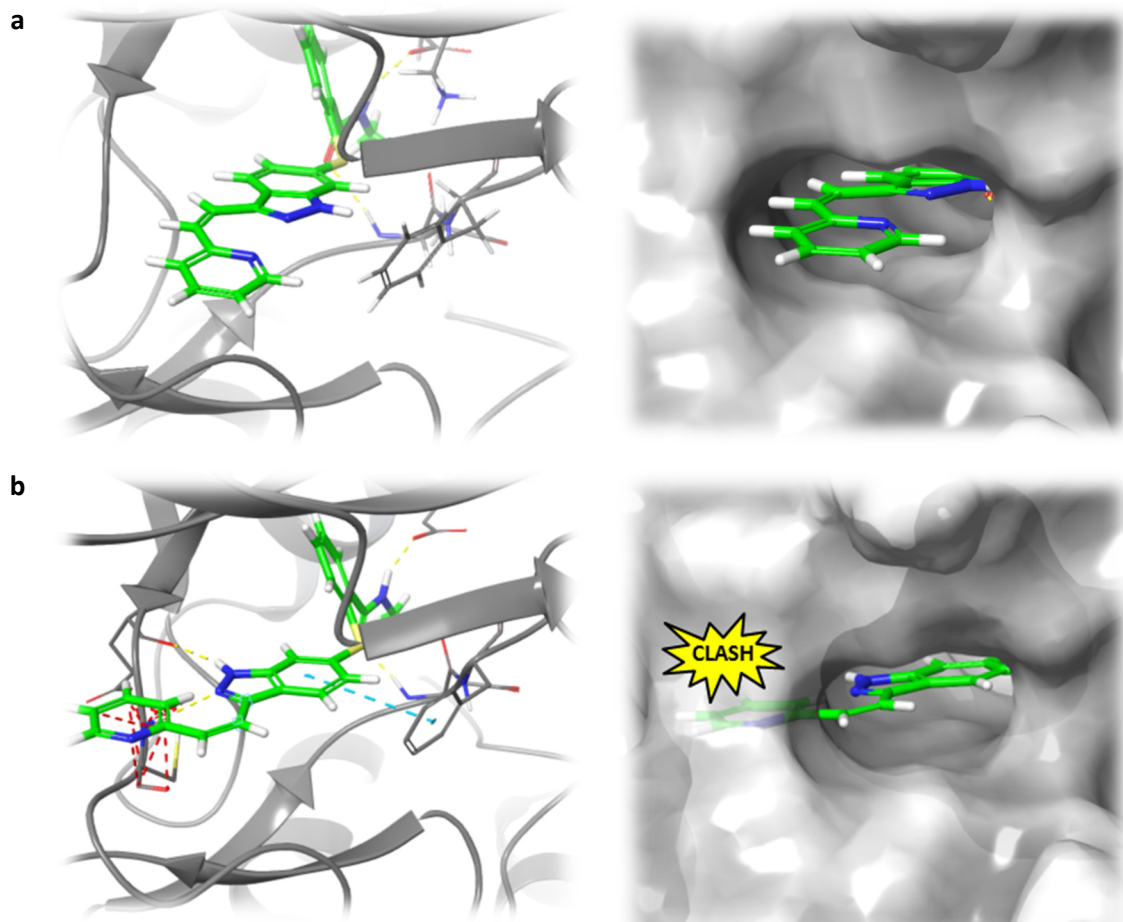


Abb. 3.2 a) Berechneter Bindemodus von (Z)-Axitinib (Z-30a, hellgrün) an VEGFR2 (PDB: 4AG8).^[129] In der Z-Konfiguration werden keine Wasserstoffbrückenbindungen zur *Hinge*-Region vorausgesagt. **b)** Illustrative Überlagerung von (Z)-Axitinib (Z-30a) und VEGFR2. Unter Beibehaltung der charakteristischen Interaktionen von (E)-Axitinib (E-30) kommt es in der Z-Konfiguration zu einer Kollision des Pyridinrestes mit dem Protein (rot-gestrichelte Linien). Jeweils *links*: Kartoon-Darstellung des Proteins (grau), jeweils *rechts*: Darstellung der molekularen Proteinoberfläche (grau). Gelb-gestrichelte Linien: Wasserstoffbrückenbindungen; hellblau-gestrichelte Linien: π - π -Wechselwirkungen.

Die berechneten Bindemodi entsprechen den bereits von Horbert erhobenen Modeling-Daten, stehen allerdings im Widerspruch zu bisher vorliegenden biologischen Testdaten, bei denen eine vermeintlich hohe biologische Aktivität von (Z)-Axitinib (Z-30) festgestellt wurde.^[123] Aus diesem Grund wurde ergänzend zum standardmäßigen *Glide*-Docking, bei dem das Protein als starr und nur der Ligand als flexibel behandelt wird, ein sog. *Induced-Fit-Docking* durchgeführt. Bei diesem Verfahren wird einem sterisch unpassenden Liganden zunächst durch reduzierte van-der-Waals-Radien und verkürzte Aminosäureseitenketten eine Bindung in der Proteinbindetasche ermöglicht und anschließend die Geometrie der Seitenketten so optimiert, dass Kollisionen mit dem Liganden vermieden werden. Im vorliegenden Fall wurden die Aminosäureseitenketten Leu-840, Glu-850, Thr-864 und Phe-918 im vorderen Bereich der ATP-Bindetasche optimiert. Weitere Aminosäuren wurden nicht angepasst.

Unter Verwendung des *Induced-Fit*-Verfahrens wird, im Gegensatz zum *Glide*-Docking, in der Tat auch bei vorgegebenem Wasserstoffbrückenmuster ein Bindemodus für (*Z*)-Axitinib (**Z-30a**) gefunden (Abb. 3.3a). Die Bindung des Liganden wird dabei durch Adaptierung der Aminosäureseitenkette Phe-918 ermöglicht. Mit einem *Induced-Fit*-Docking Score von -14.3 wird für das *Z*-Isomer jedoch eine etwas geringere Bindeaffinität vorausgesagt als für das *E*-Isomer (Docking Score = -15.1, vgl. Tab. 3.1). Für das (*Z*)-2*H*-Tautomer (**Z-30b**) wird hingegen auch beim *Induced-Fit*-Docking kein Bindemodus gefunden, da das stilbenähnliche π -System hier nahezu planar ist und daher nicht in die Bindetasche passt (Abb. 3.3b). Zudem weist das 2*H*-Indazol ein ungeeignetes *Hinge-binding* Motiv auf.

Die erhaltenen *Induced-Fit*-Dockingergebnisse deuten darauf hin, dass eine Bindung von (*Z*)-Axitinib (**Z-30a**) durch geringe Adaptierung des Proteins grundsätzlich möglich ist und könnten die im Vorfeld dieser Arbeit erhobenen biologischen Daten für (*Z*)-Axitinib (**Z-30**) teilweise erklären (vgl. Kapitel 1.3.3).

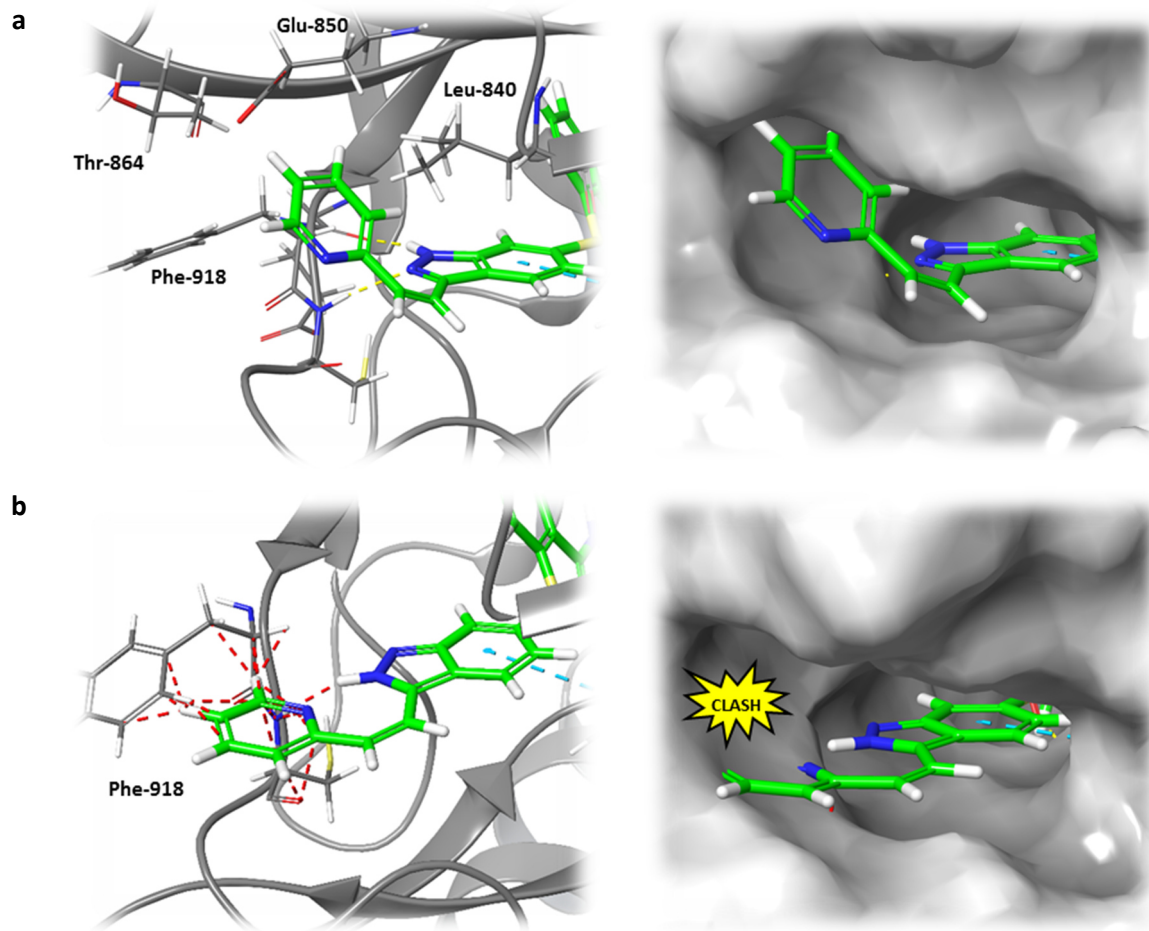


Abb. 3.3 a) Mittels *Induced-Fit-Docking* berechneter Bindemodus von (*Z*)-Axitinib (**Z-30a**, hellgrün) an VEGFR2 (PDB: 4AG8).^[129] Durch geringe Adaptierung des Proteins wird auch in der *Z*-Konfiguration ein Bindemodus gefunden, bei dem die *Hinge*-Interaktionen erhalten bleiben. Docking Score: -14.3. **b)** Illustrative Überlagerung von (*Z*)-2*H*-Axitinib (**Z-30b**) und VEGFR2. Für das *Z*-2*H*-Tautomer (**Z-30b**) wird im *Induced-Fit*-Modus kein Bindemodus gefunden, da das stilbenähnliche π -System hier planar ist und infolgedessen mit dem Protein kollidieren würde (rot-gestrichelte Linien). Jeweils *links*: Kartoon-Darstellung des Proteins (grau), jeweils *rechts*: Darstellung der molekularen Proteinoberfläche (grau). Gelb-gestrichelte Linien: Wasserstoffbrückenbindungen; hellblau-gestrichelte Linien: π - π -Wechselwirkungen.

Auf Grundlage der für (*Z*)-Axitinib (**Z-30a**) erhaltenen Modelingdaten wurde eine Serie von modifizierten Axitinibderivaten mit sterisch anspruchsvolleren Arylresten erstellt und ein *in silico* Screening durchgeführt. Dabei bestand das Ziel, Arylreste zu identifizieren, die in der *E*-Konfiguration eine ähnlich hohe Bindeaffinität wie (*E*)-Axitinib (**E-30a**) aufweisen, in der *Z*-Konfiguration hingegen zu größeren sterischen Kollisionen mit dem Protein führen. In diesem Zusammenhang wurde zunächst eine Literaturrecherche zu publizierten und strukturell verwandten Kinaseinhibitoren durchgeführt, um potentielle Arylreste zu identifizieren. Ein in verschiedenen Studien wiederkehrendes Strukturmerkmal von VEGFR2- und PDFGR β -Inhibitoren ist ein methoxysubstituierter Arylrest, der die hydrophobe Region II der ATP Bindetasche besetzt. Beispiele sind das Maleimid **32** (Abb. 3.4) sowie ein trimethoxysubstituiertes Derivat des zugelassenen VEGFR2-Inhibitors Pazopanib (nicht

abgebildet).^[130–132] Auch methoxysubstituierte Chinoline und Chinazoline finden sich in einigen VEGFR2-aktiven Substanzen wieder.^[133] Folglich wurde der Pyridinrest von Axitinib u.a. durch verschiedene methoxysubstituierte Arylreste ersetzt (Tab. 3.1, **33–35**).

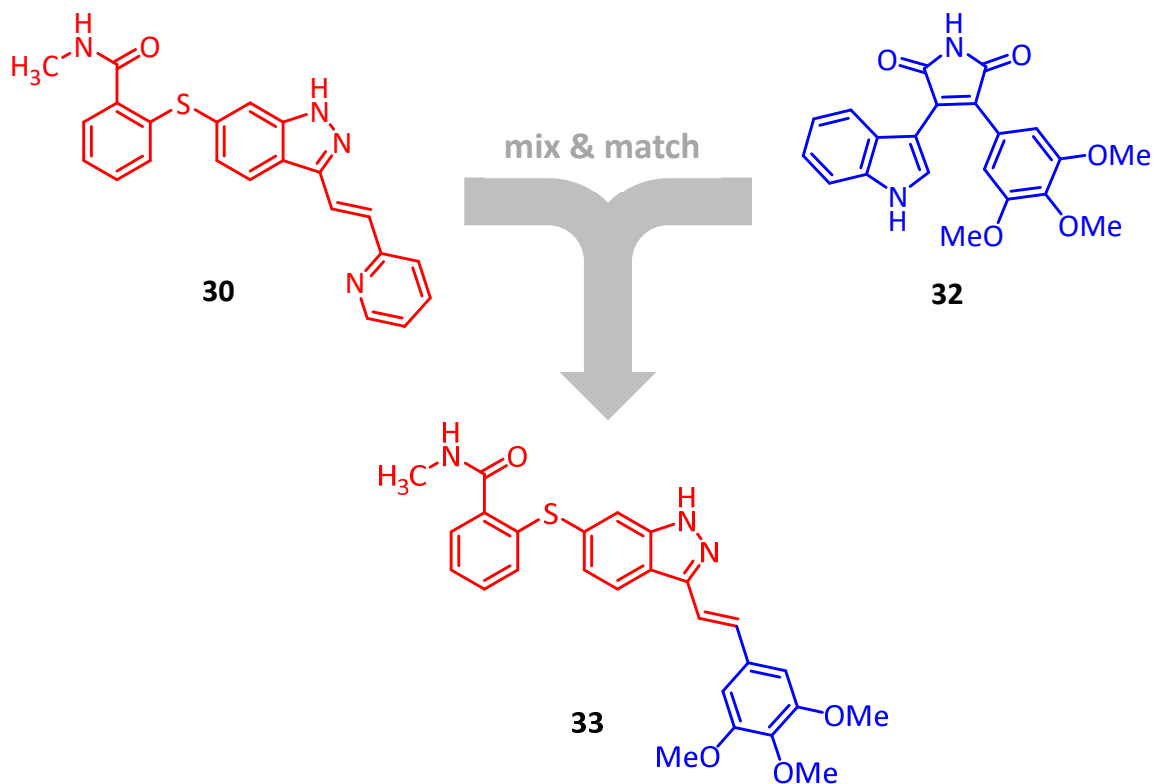
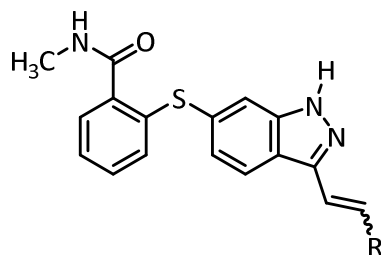


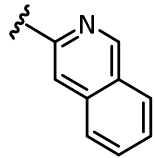
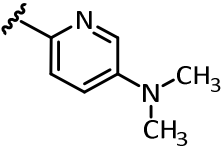
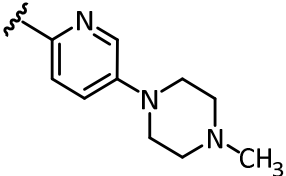
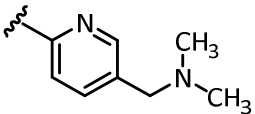
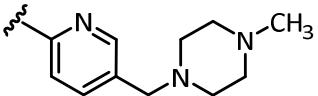
Abb. 3.4 „Mix & match“-Strategie zum Design des trimethoxyphenylsubstituierten Axitinibderivates **33**. Axitinib (*E*-**30**): IC₅₀ (VEGFR2) = 0.2 nM^[116]; Maleimid **32**: IC₅₀ (VEGFR2) = 3 nM.^[131]

Erweitert wurde die Serie um Derivate mit unterschiedlich verknüpften Chinolin- und Isochinolinresten (Tab. 3.1, **36–38**). Diese Reste sind nicht nur größer als Pyridin, sondern erweitern auch das π -System der stilbenähnlichen Struktur und sollten Einfluss auf die photochemischen Eigenschaften nehmen.^[134,25] Weiterhin wurden verschiedene Derivate mit *para*-substituierten Pyridinresten generiert (Tab. 3.1, **39–42**). Diese Reste wurden u.a. bei der Entwicklung von axitinibverwandten Polylke Kinase 4 (PLK4) Inhibitoren verwendet und lieferten hochpotente Inhibitoren.^[135,136] Zudem könnte durch die *N,N*-Dimethylamin- bzw. *N*-Methylpiperazinreste die schlechte Wasserlöslichkeit der Verbindungen verbessert werden. Von den generierten Verbindungen wurde jeweils für das *E*- und *Z*-Isomer zunächst ein Bindemodus mittels *Glide*-Docking berechnet. Anschließend wurde zusätzlich ein *Induced-Fit*-Docking durchgeführt, da beim *Glide*-Docking für die *Z*-Isomere keine Bindemodi gefunden werden konnten. Eine Übersicht aller Derivate und die dazugehörigen berechneten Docking Scores sind in Tab. 3.1 zusammengestellt.

Tab. 3.1 Übersicht der generierten stilbenähnlichen Axitinibderivate und berechnete Docking Scores des *E*- und *Z*-Isomers. Es wurde jeweils sowohl ein standardmäßiges *Glide*-Docking als auch ein *Induced-Fit*-Docking durchgeführt. Als notwendiges Kriterium für einen plausiblen Bindemodus wurden alle vier Wasserstoffbrückenbindungen des Axitinibpharmakophores definiert. Beim *Induced-Fit*-Docking wurden die Aminosäureseitenketten Leu-840, Glu-850, Thr-864 und Phe-918 an den jeweiligen Liganden angepasst. ✖: Kein Bindemodus gefunden.



#	Rest (R)	Docking Score (<i>Glide</i>)		Docking Score (<i>Induced-Fit</i>)	
		<i>E</i> -Isomer	<i>Z</i> -Isomer	<i>E</i> -Isomer	<i>Z</i> -Isomer
30		-15.6	✖	-15.1	-14.3
33		-15.3	✖	-15.6	✖
34		-15.4	✖	-15.5	✖
35		-15.5	✖	-15.6	-14.2
36		-15.0	✖	-15.0	✖
37		-15.2	✖	-14.8	-14.8

38		-15.1	×	-15.0	-13.9
39		-15.3	×	-15.4	-15.6
40		-15.2	×	-15.3	×
41		-15.5	×	-15.4	-13.8
42		-15.6	×	-15.8	-14.6

Die Ergebnisse des *Glide*-Dockings zeigen ein eindeutiges Bild. Während für alle *E*-Isomere durchweg hohe Docking Scores zwischen -15 und -16 vorausgesagt werden, wird bei vorgegebenem Wasserstoffbrückenmuster des Pharamkophors (4 von 4 *H-bond constraints*) für keines der *Z*-Isomere ein Bindemodus gefunden. Beim *Induced-Fit*-Docking wird dieses einseitige Bild etwas relativiert. So werden für einige Derivate auch in der *Z*-Konfiguration plausible Bindemodi gefunden. Dabei ist jedoch größtenteils der Trend erkennbar, dass die berechnete Bindeaffinität des *Z*-Isomers jeweils betragsmäßig niedriger ist, als die des zugehörigen *E*-Isomers. Bedingung für eine Bindung der *Z*-Isomere ist, wie bereits für *Z*-Axitinib (*Z*-**30a**) diskutiert, eine Anpassung der Aminosäureseitenketten Leu-840, Glu-850, Thr-864 und Phe-918.

Für die Verbindungen **33**, **34**, **36** und **40** wird auch im *Induced-Fit*-Modus, trotz Anpassung der genannten Aminosäureseitenketten, aufgrund der sterisch anspruchsvollen Arylreste kein Bindemodus für das jeweilige *Z*-Isomer gefunden. In Abb. 3.5 ist jeweils die mittels *Induced-Fit*-Docking an den Liganden *Z*-**30a** angepasste Proteinstruktur gezeigt. Während der Pyridinrest von *Z*-Axitinib (*Z*-**30a**) genügend Platz im vorderen Bereich der ATP-Bindetasche hat (Abb. 3.5a), ist eine

gleichartige Bindung des sterisch anspruchsvolleren Trimethoxyphenylrestes sowie des Chinolinrestes nicht möglich (Abb. 3.5b/c).

Folglich wurden die Verbindungen **33**, **34**, **36** und **40** als potentiell geeignete photoschaltbare Axitinibderivate identifiziert und bei der Syntheseauswahl berücksichtigt.

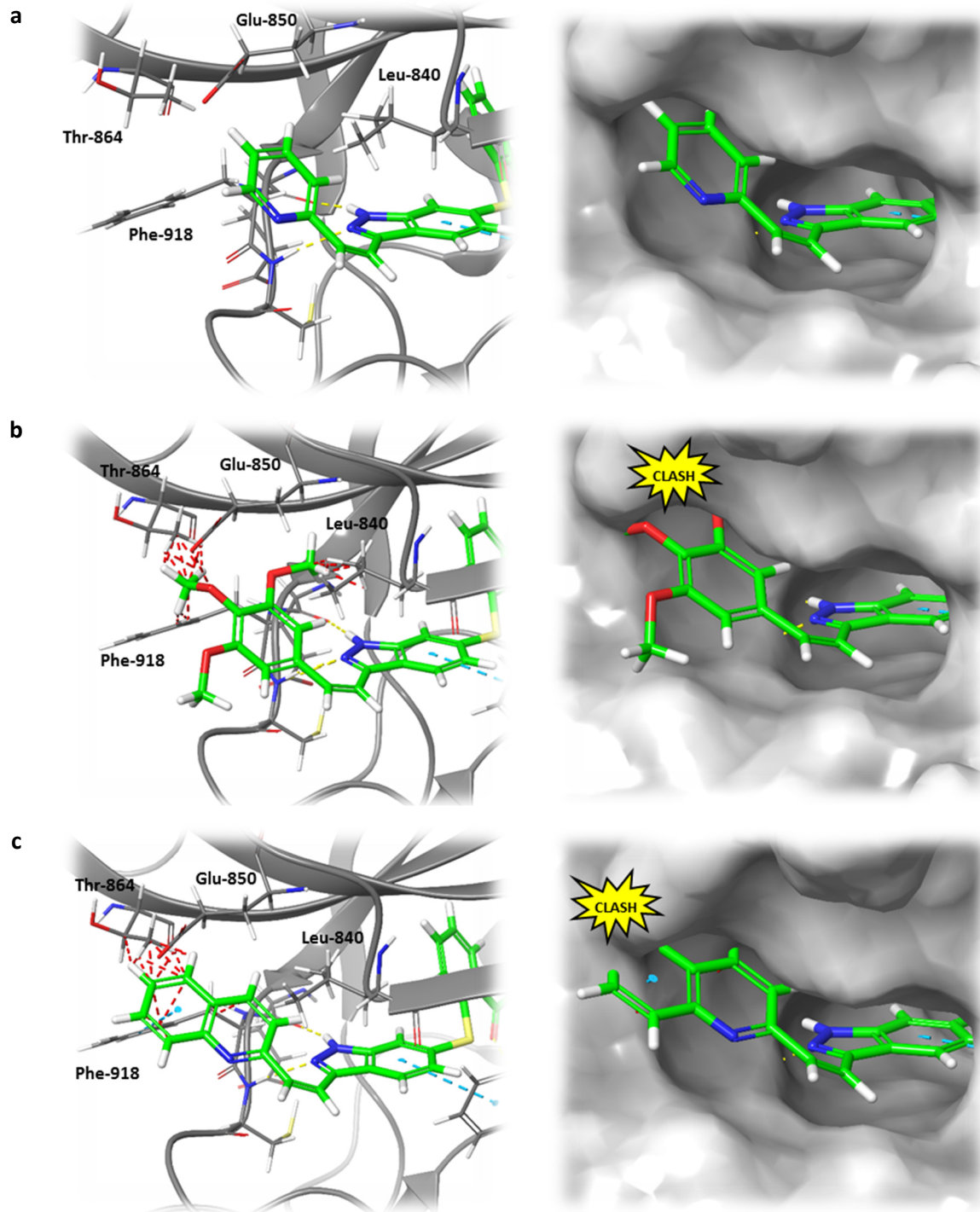


Abb. 3.5 a) Mittels *Induced-Fit-Docking* berechneter Bindemodus von (Z)-Axitinib (Z-30a, hellgrün) an VEGFR2 (PDB: 4AG8).^[129] Durch Adaption der gekennzeichneten Aminosäureseitenketten ergibt sich auch in Z-Konfiguration genügend Platz für den Pyridinrest. Docking Score: -14.3. **b)** Illustrative Überlagerung des Axitinibderivates Z-33 und der an (Z)-Axitinib (Z-30a) angepassten Proteinstruktur. Eine Bindung ist nicht möglich, da die Methoxygruppen mit dem Protein kollidieren würden (rot-gestrichelte Linien). **c)** Illustrative Überlagerung des Axitinibderivates Z-36 und VEGFR2. Auch hier wird im *Induced-Fit-Docking* kein Bindemodus gefunden, da der Chinolinrest mit dem Protein kollidieren würde (rot-gestrichelte Linien). Jeweils *links*: Kartoon-Darstellung des Proteins (grau), jeweils *rechts*: Darstellung der molekularen Proteinoberfläche (grau). Gelb-gestrichelte Linien: Wasserstoffbrückenbindungen; hellblau-gestrichelte Linien: π - π -Wechselwirkungen.

3.1.2 Synthese

Für die Synthese von (*E*)-Axitinib (*E*-**30**) sind in der Literatur verschiedene Syntheserouten beschrieben, die sich in der Abfolge und Anzahl der Syntheseschritte leicht unterscheiden.^[137–140] Grundsätzlich lässt sich (*E*)-Axitinib (*E*-**30**) retrosynthetisch in die drei kommerziell erhältlichen Bausteine 2-Sulfanylbenzoesäuremethylester (**43**), 6-Iodindazol (**44**) und 2-Vinylpyridin (**45**) zerlegen (Abb. 3.6). Die Schlüsselschritte zum Verknüpfen der Bausteine sind eine Migita-Kupplung zur Bildung des Thioethers und eine Heck-Kupplung zur Bildung der stilbenähnlichen Struktur.^[139]

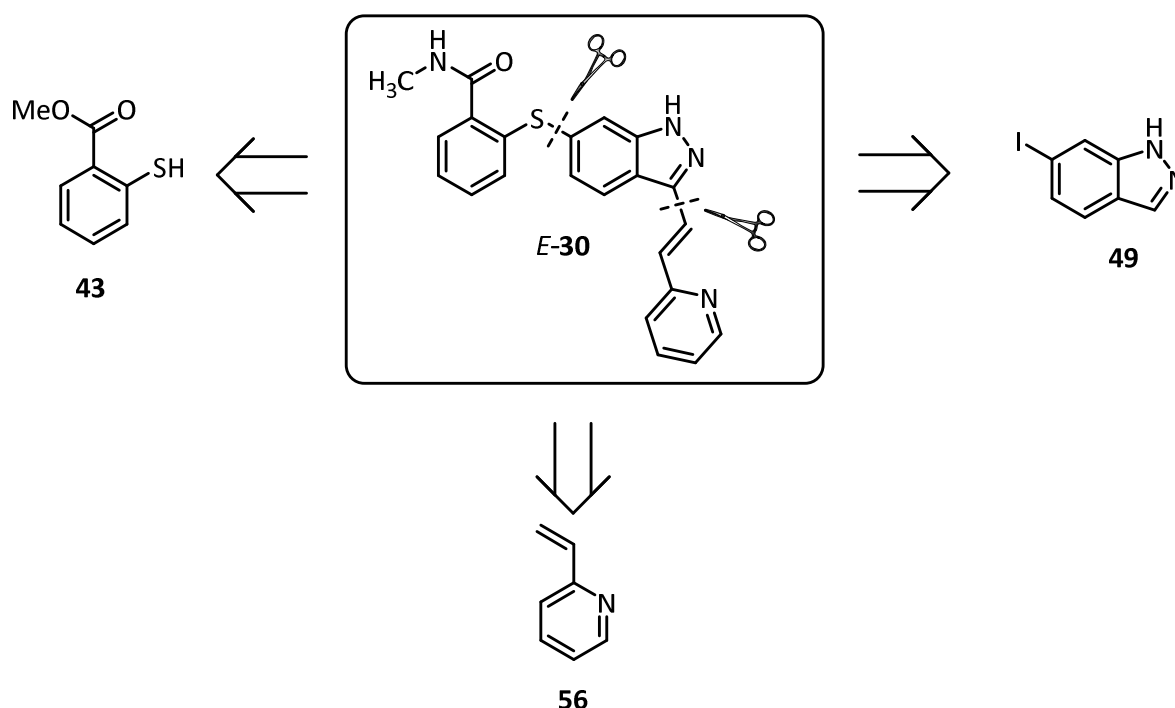


Abb. 3.6 Retrosynthetische Zerlegung von (*E*)-Axitinib (*E*-**30**). Der zugelassene Kinaseinhibitor lässt sich synthetisch aus den drei Bausteinen 2-Sulfanylbenzoesäuremethylester (**43**), 6-Iodindazol (**49**) und 2-Vinylpyridin (**56**) darstellen.

Während in der industriell durchgeführten Syntheseroute der ersten Generation zunächst die stilbenähnliche Struktur gebildet wird und anschließend der Thioether, kehrt sich die Reihenfolge in den modifizierten Syntheserouten der zweiten und dritten Generation um.^[139] Da ein Ziel der vorliegenden Arbeit darin bestand, Axitinibderivate mit modifizierter Stilbenstruktur zu synthetisieren, wurde die Synthese an die letztgenannten Syntheserouten angelehnt (Abb. 3.9). Diese Strategie ermöglicht es, für die Synthese der Zielmoleküle den gemeinsamen Baustein **52a** zu nutzen und erlaubt die konvergente Darstellung einer Serie von Derivaten im letzten Syntheseschritt durch Kupplung verschiedener 2-Vinylaryle via Heck-Kupplung (Tab. 3.2).

Zur Darstellung von *N*-Methyl-2-sulfanylbenzamid (**44**) wurden zwei alternative Synthesewege verfolgt. Ausgehend von kommerziell erhältlichem 2-Sulfanylbenzoesäuremethylester (**43**) wurde zunächst eine direkte Aminolyse unter Verwendung von Trimethylaluminium durchgeführt (Abb. 3.7).^[141–143] Dabei konnten in Übereinstimmung mit der Literatur gute Ausbeuten von $\geq 70\%$ erzielt werden.^[141] Allerdings wurden insbesondere bei größeren Ansätzen im Gramm-Maßstab erhebliche Ausbeuteschwankungen beobachtet, die vermutlich auf die Oxidationsempfindlichkeit des eingesetzten Thiols und die Luft- sowie Feuchtigkeitsempfindlichkeit des Trimethylaluminiums zurückzuführen sind.^[144]

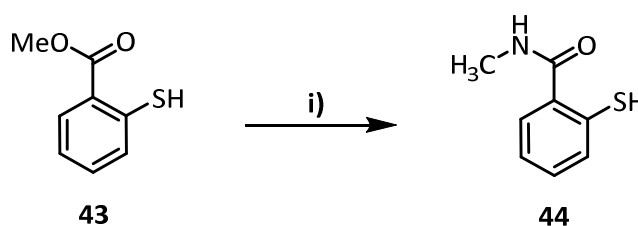


Abb. 3.7 Trimethylaluminium-vermittelte Aminolyse von 2-Sulfanylbenzoesäuremethylester (**43**). i) $\text{CH}_3\text{NH}_2\text{Cl}$, AlMe_3 , DCM, 15 h 50°C , 69 %.

Aus diesem Grund wurde bei größeren Ansätzen auf eine alternative Syntheseroute nach Sengar *et al.* zurückgegriffen (Abb. 3.8).^[145] Dabei wurde zunächst 2,2'-Disulfandiylbenzoesäure (**45**) mit Oxalylchlorid in das entsprechende Säurechlorid **46** überführt und dieses anschließend mit Methylaminhydrochlorid zum Benzamid **47** umgesetzt. Die Verwendung von Thionylchlorid zur Darstellung des Säurechlorids nach Zhai *et al.* gelang hingegen nicht.^[140] Der Vorteil dieses Reaktionsweges besteht zum einen in der Oxidationsstabilität der Verbindungen **45** und **47**, da diese als Disulfid vorliegen und zum anderen kann die Verwendung des pyrophoren Trimethylaluminiums in größeren Mengen vermieden werden. Im letzten Reaktionsschritt erfolgt schließlich die reduktive Spaltung des Disulfids mit Hilfe von Natriumborhydrid.

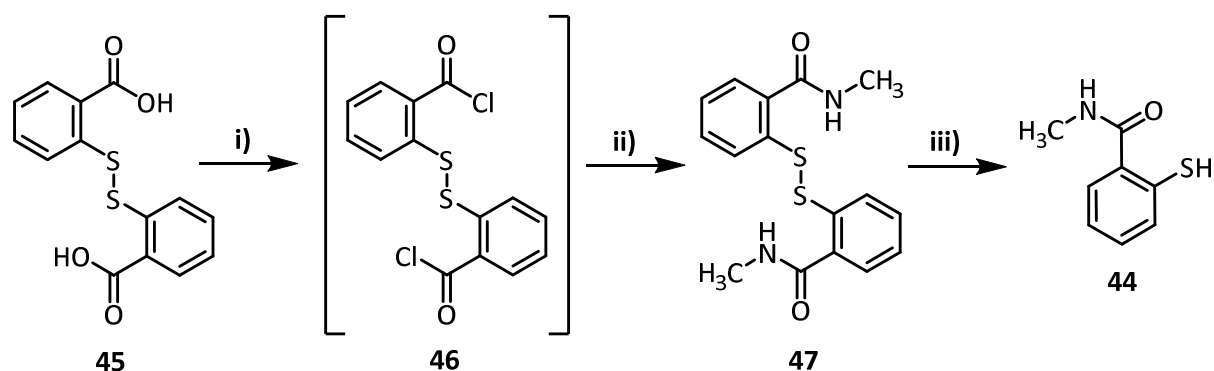


Abb. 3.8 Alternative Syntheseroute zur Darstellung von *N*-Methyl-2-sulfanylbenzamid (**44**). i) Oxalylchlorid, DMF (kat.), THF, 4 h Raumtemp. ii) CH₃NH₃Cl, TEA, Chloroform, 24 h Raumtemp., 59 %. iii) NaBH₄, THF, 2 h 50 °C, 84 %.

Da das Disulfid **47** in der nachfolgenden Migita-Kupplung durch Inhibition des Palladium-Katalysators störend wirkt und auch bei längeren Reaktionszeiten keine quantitative Spaltung erzielt werden konnte, musste das Thiol **44** von nicht umgesetztem Disulfid säulenchromatographisch getrennt werden.^[139]

Das für die Migita-Kupplung weiterhin benötigte 6-Iodindazol (**49**) wurde aus dem entsprechenden Aminoindazol **48** via Sandmeyer-Reaktion in einer Ausbeute von 73 % erhalten (Abb. 3.9).^[146] Die Kupplung des iodierten Indazols **49** und des Thiols **44** wurde in Anlehnung an das Verfahren von Chekal *et al.* unter Verwendung von Pd₂(dba)₃, Xantphos und Natriumhydrogencarbonat als Base durchgeführt.^[139] Durch tropfenweise Zugabe des Thiols und Reduzierung des Thiolat-Anteils (Verwendung einer milden Base) wurde versucht, einer Inhibition des Palladiumkatalysators vorzubeugen.^[139] Anschließend wurde der Indazol-Baustein **50** durch Umsetzung mit elementarem Iod und Kaliumcarbonat (57 % Ausbeute) oder Kaliumhydroxid (72 % Ausbeute) selektiv in 3-Position iodiert. Durch den Einsatz der Base wird dabei temporär ein Indazolylanion erzeugt und dieses schließlich mit Iod abgefangen. Die entsprechende Bromierung gelingt analog (vgl Kapitel 3.2). Im Hinblick auf eine nachfolgende Heck-Kupplung wurde die NH-Funktion des Indazols **51** mit einer Acetylgruppe geschützt, um eine Addition an dem eingesetzten Styrolerivat zu verhindern.^[139,140] Dazu wurde das iodierte Indazol **51** erneut mit Kaliumcarbonat in DMF behandelt und mit Essigsäureanhydrid bei 60 °C umgesetzt. Der Vorteil der Acetyl-Schutzgruppe gegenüber anderen gängigen Indazol-Schutzgruppen wie der SEM- oder THP-Schutzgruppe liegt, neben der leichten Einführung und Abspaltung, in dem elektronenziehenden Effekt, der eine oxidative Insertion des relativ elektronenreichen Indazolsystems am Palladium-Katalysator erleichtern kann.^[139]

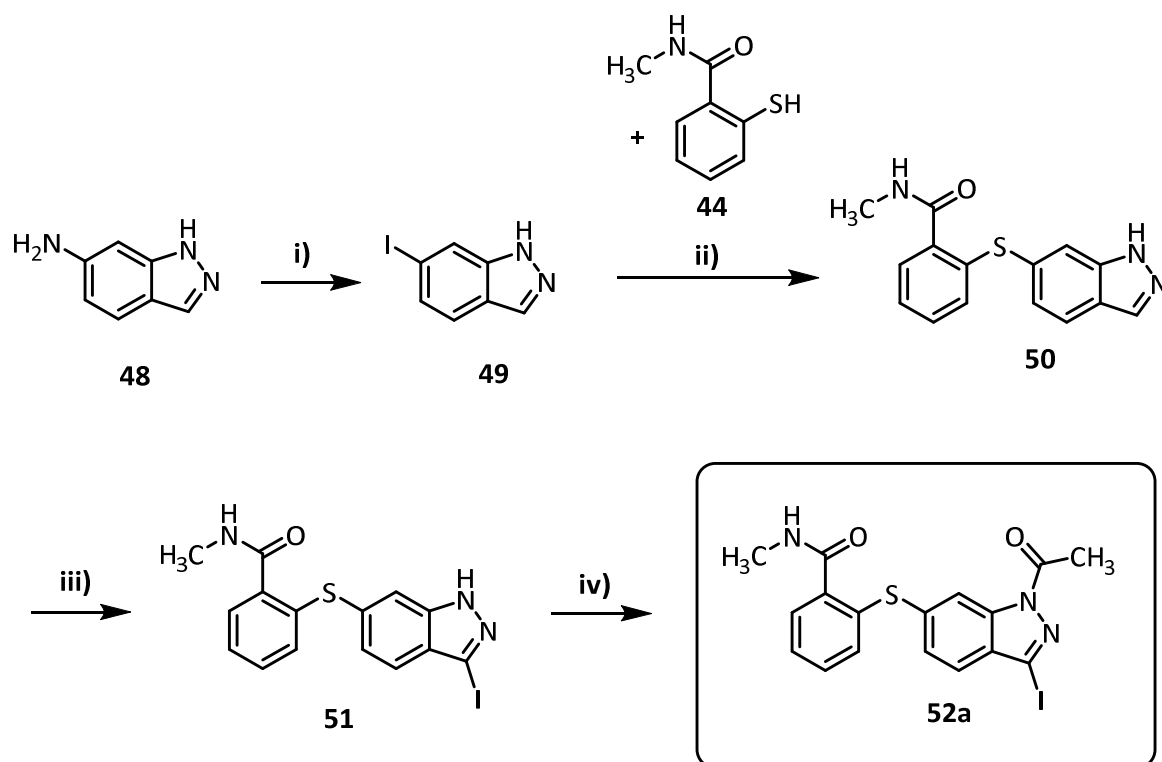
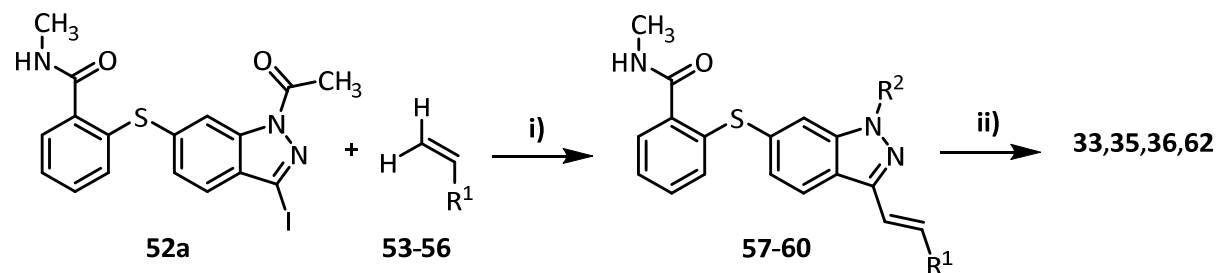


Abb. 3.9 Syntheseroute zur Darstellung des zentralen Indazol-Bausteins **52a**. **i)** 1. H_2SO_4 , NaNO_2 , 1 h 0°C , 2. KI , 18 h Raumtemp., 73 %. **ii)** 1. $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$, Xantphos, NaHCO_3 , DMF, 10 h 50°C , 61 %. **iii)** K_2CO_3 , I_2 , DMF, 18 h Raumtemp., 59 %. **iv)** Ac_2O , K_2CO_3 , DMF, 3 h 60°C , 88 %.

Die für die Heck-Kupplung benötigten 2-Vinylaryle **53-56** wurden entweder kommerziell erworben oder nach literaturbekannten Vorschriften mittels Wittig-Olefinierung aus den entsprechenden Benzaldehyden dargestellt.^[147-149] Die Heck-Kupplung der 2-Vinylaryle mit dem geschützten Indazol-Baustein **52a** wurde in Anlehnung an die Vorschrift von Chekal *et al.* unter Verwendung von Palladiumacetat, Xantphos und Diisopropylamin durchgeführt.^[139] Nach saurer Hydrolyse der Acetylschutzgruppe wurden schließlich die entsprechenden Axitinibderivate **33**, **35**, **36** sowie **62** erhalten (Tab. 3.2).

Tab. 3.2 Übersicht der durchgeführten Heck-Kupplungen zur Darstellung der Axitinibderivate **33**, **35**, **36** und **62**. **i)** Pd(OAc)₂, Xantphos, DIPEA, DMF, 18-24 h 90 °C; **ii)** MeOH, 4 M HCl in Dioxan, 2-4 h Raumtemp.



#	R ¹	#	R ²	Ausbeute (%)	#	R ²	Ausbeute (%)
53, 57, 33		57	Ac	61	33	H	77
54, 58, 35		58	Ac	24	35	H	64
55, 59, 36		59	Ac	71	36	H	88
56, 60, 62		60	Ac	44	62	H	92

(*E*)-Axitinib (*E*-**30**) ist kommerziell erhältlich und wurde daher nicht über die beschriebene Syntheseroute dargestellt sondern von LC Laboratories (Woburn, MA, USA), bezogen. (*Z*)-Axitinib (*Z*-**30**) wurde nach dem von Horbert^[123] beschriebenen Verfahren photochemisch aus (*E*)-Axitinib (*E*-**30**) generiert. Dazu wurde eine Lösung von (*E*)-Axitinib (*E*-**30**) in DMSO mit einem 365 nm LED-Reaktor bestrahlt und beide Isomere nach wässriger Aufarbeitung säulenchromatographisch getrennt. Durch Verwendung eines Dichlormethan/Methanol-Gradienten konnte dabei Trennung beider Isomere deutlich verbessert werden. Alternativ lässt sich (*Z*)-Axitinib (*Z*-**30**) auch stereoselektiv über eine Sonogashira-Kupplung von 2-Ethynylpyridin mit dem Indazol-Baustein **51** und anschließender Hydrierung mittels Lindlar-Katalysator darstellen.^[137,138]

3.1.3 Photochemische Charakterisierung

Die photochemischen Eigenschaften beider Axitinibisomere wurden zunächst mittels UV/VIS-Spektroskopie untersucht. (*E*)-Axitinib (*E-30*) weist eine intensive $\pi\pi^*$ -Absorptionsbande im Bereich zwischen 280 nm und 370 nm auf, mit einem Absorptionsmaximum bei 335 nm (Abb. 3.10a). (*Z*)-Axitinib (*Z-30*) absorbiert weniger stark in diesem Bereich, weist jedoch eine zusätzliche Absorptionsbande zwischen 375 nm und 410 nm auf, die eine gezielte photochemische Anregung von (*Z*)-Axitinib (*Z-30*) ermöglicht. In DMSO lässt sich durch Bestrahlung mit 365 nm das photostationäre Gleichgewicht in Richtung von (*Z*)-Axitinib (*Z-30*) verschieben, durch Bestrahlung mit 385 nm wird (*E*)-Axitinib (*E-30*) angereichert (PSS-Bestimmung siehe unten). Die Verwendung von 330 nm und 405 nm liefert vergleichbare photostationäre Gleichgewichte. Die photoinduzierte *E/Z*-Isomerisierung ist in DMSO vollständig reversibel. So ist nach alternierender Bestrahlung mit 365 nm und 385 nm nach zehn Schaltzyklen keine Photoermüdung beobachtbar (Abb. 3.10b). Damit unterscheidet sich das Schaltverhalten von klassischen Stilbenen, bei denen als unerwünschte Nebenreaktion oftmals eine Photocyclisierung und anschließende Oxidation zum entsprechenden Phenanthren beobachtet wird (vgl. Kapitel 1.1.1).^[20]

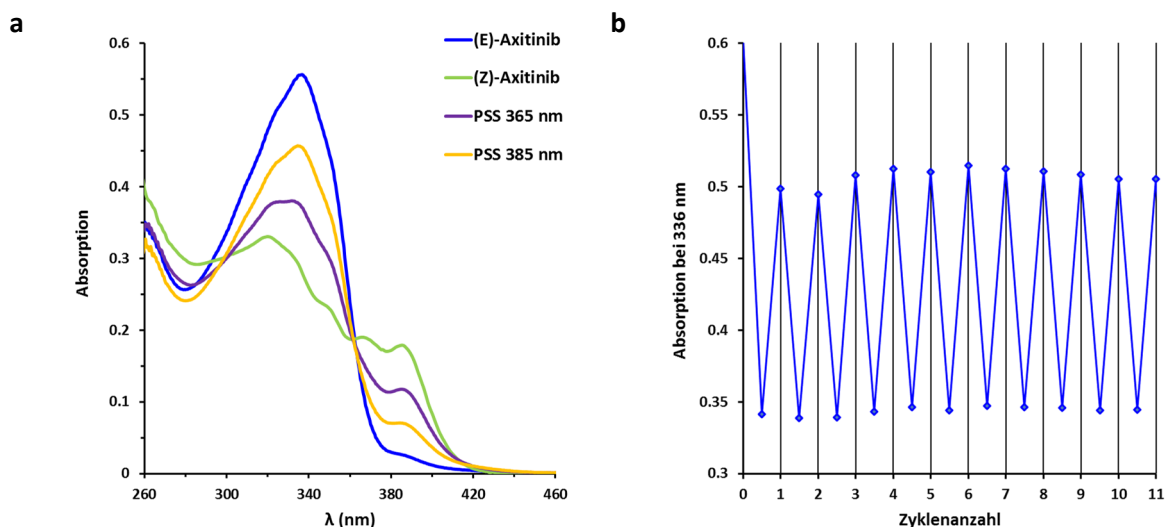


Abb. 3.10 a) UV/VIS-Spektren von reinem (*E*)-Axitinib (*E-30*, blau) und (*Z*)-Axitinib (*Z-30*, grün) sowie PSS nach Bestrahlung mit 365 nm (lila) und 385 nm (orange) in DMSO. **b)** Reversible Photoschaltung von Axitinib (**30**) durch alternierende Bestrahlung mit 365 nm und 385 nm in DMSO. Nach zehn Schaltzyklen ist keine Photoermüdung beobachtbar.

Die Photochemie von (*E*)-Axitinib (*E-30*) in wässriger Lösung unterscheidet sich maßgeblich von der Photochemie in DMSO. So ist zwar grundsätzlich die bereits für DMSO beschriebene Verschiebung beider Absorptionsspektren zueinander zu beobachten, eine Bestrahlung mit 365 nm führt jedoch nicht nur zu einer Isomerisierung sondern auch zu einer unerwünschten [2+2]-Cycloaddition, d.h. einer

Dimersierung zweier Axitinibmoleküle (Abb. 3.11). Das Cycloadditionsprodukt wird dem photochemischen Gleichgewicht entzogen, sodass das Absorptionsspektrum nach Bestrahlung mit 365 nm nicht mehr die isosbestischen Punkte der anderen Spektren schneidet (Abb. 3.12).

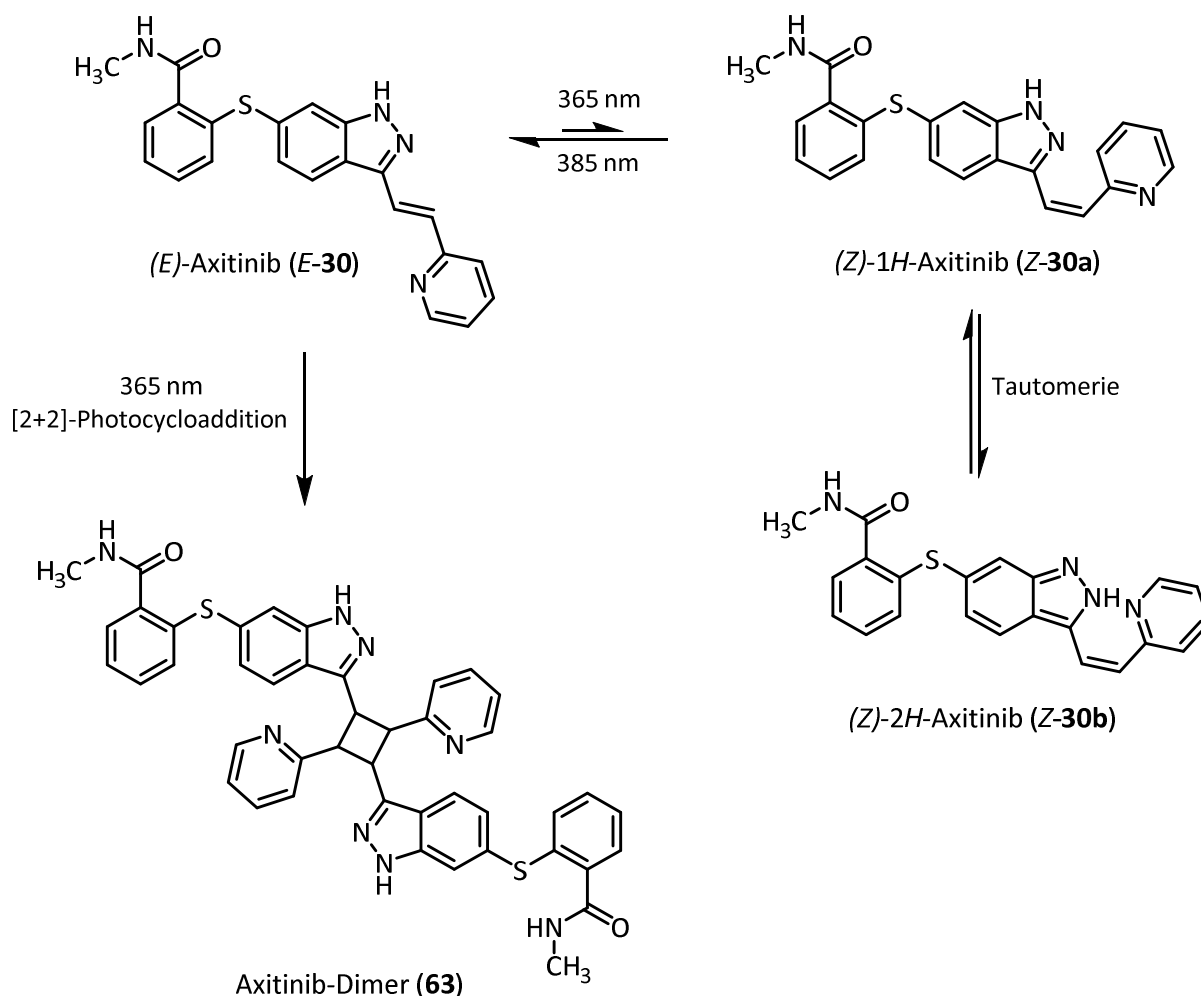


Abb. 3.11 Photochemische Reaktionen von Axitinib in Wasser (5 % DMSO). In Konkurrenz zur photoinduzierten *E/Z*-Isomerisierung erfolgt im Wässrigen bei Bestrahlung von *(E)*-Axitinib (**E-30**) eine irreversible [2+2]-Cycloaddition zum Axitinib-Dimer (**63**).

Eine [2+2]-Cycloaddition von *(E)*-Axitinib (**E-30**) wird auch von Sluggett *et al.*^[119] beschrieben. Wahrscheinlich kommt es aufgrund der schlechten Löslichkeit von Axitinib in Wasser, anders als in DMSO, zu einer Aggregation der Moleküle, sodass eine Cycloaddition begünstigt wird. Ein ähnliches Verhalten wird in der Literatur unter anderem für verschiedene Zimtsäurederivate sowie Chinoxaline beschrieben.^[150–152] Die Photocyclisierung erfolgt dabei ausgehend vom angeregten Zustand des *E*-Isomers **30**.^[151] Die Aufspaltung der NMR-Signale deutet auf die Bildung eines zentrosymmetrischen Cyclobutanderivates hin. Bei Bestrahlung von *(Z)*-Axitinib (**Z-30**) mit 385 nm im Wässrigen wird keine

Photocyclisierung beobachtet sondern ausschließlich $Z \rightarrow E$ Isomerisierung. Bemerkenswerterweise erfolgt die Umsetzung hier im Vergleich zu DMSO fast quantitativ (Abb. 3.12 und 3.13d).

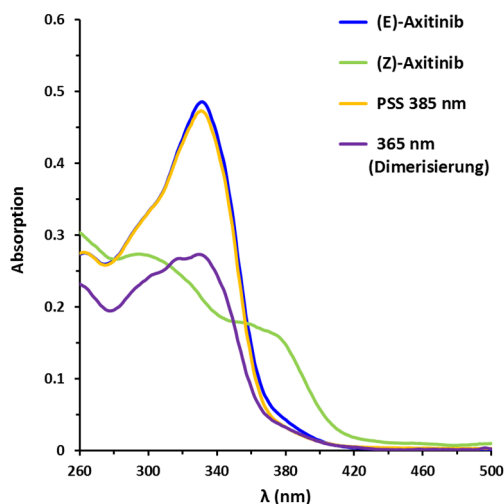


Abb. 3.12 UV/VIS-Spektren von (*E*)-Axitinib (*E-30*) sowie (*Z*)-Axitinib (*Z-30*) in Wasser (5 % DMSO). Durch Bestrahlung von (*Z*)-Axitinib (*Z-30*) mit 385 nm erfolgt eine nahezu vollständige Umsetzung zu (*E*)-Axitinib (*E-30*). Durch Bestrahlung von (*E*)-Axitinib (*E-30*) mit 365 nm kommt es hingegen in Konkurrenz zur Isomerisierung zu einer [2+2]-Cycloaddition und zur Bildung des Axitinib-Dimers (**63**).

Weiterhin wurde im Hinblick auf eine Verwendung in biologischen Systemen die thermische Stabilität beider Isomere in Wasser bei 37 °C mittels UV/VIS-Spektroskopie untersucht (Anhang Abb. 9.9). Beide Isomere zeigen im Messzeitraum von 12 h keine thermische Isomerisierung und weisen damit eine deutlich höhere thermische Stabilität auf als azo-basierte Systeme. Dadurch ergibt sich der Vorteil, dass (*Z*)-Axitinib (*Z-30*) isoliert werden kann und beide Isomere zunächst in Reinform biochemisch charakterisiert werden können.

Die genaue Zusammensetzung der photostationären Gleichgewichte nach Bestrahlung mit 365 nm bzw. 385 nm wurde sowohl mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie als auch mittels HPLC bestimmt, da aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit beider Axitinibisomere die NMR-Spektroskopie für wässrige Lösungen nicht geeignet ist. Die HPLC-Messungen zum Reaktionsverlauf nach Bestrahlung in DMSO und Wasser sind in Abb. 3.13 zusammengefasst. In Übereinstimmung mit den UV-spektroskopischen Messungen wird bei Bestrahlung in DMSO reine *E/Z*-Isomerisierung beobachtet, ohne das Auftreten von Nebenprodukten. Nach Bestrahlung von (*E*)-Axitinib (*E-30*) mit 365 nm stellt sich in DMSO ein PSS von *E/Z* = 40/60 % ein. Bestrahlung von (*Z*)-Axitinib (*Z-30*) in DMSO mit 385 nm führt zu einem PSS von *E/Z* = 78/22 %. Bestrahlung von (*E*)-Axitinib (*E-30*) in Wasser führt nur in geringem Maße zur Bildung

von (Z)-Axitinib (**Z-30**), da die [2+2]-Cycloaddition überwiegt. Die $Z \rightarrow E$ Isomerisierung in Wasser weist hingegen mit einem PSS von $E/Z = 96/4$ % die größte Umsetzung auf.

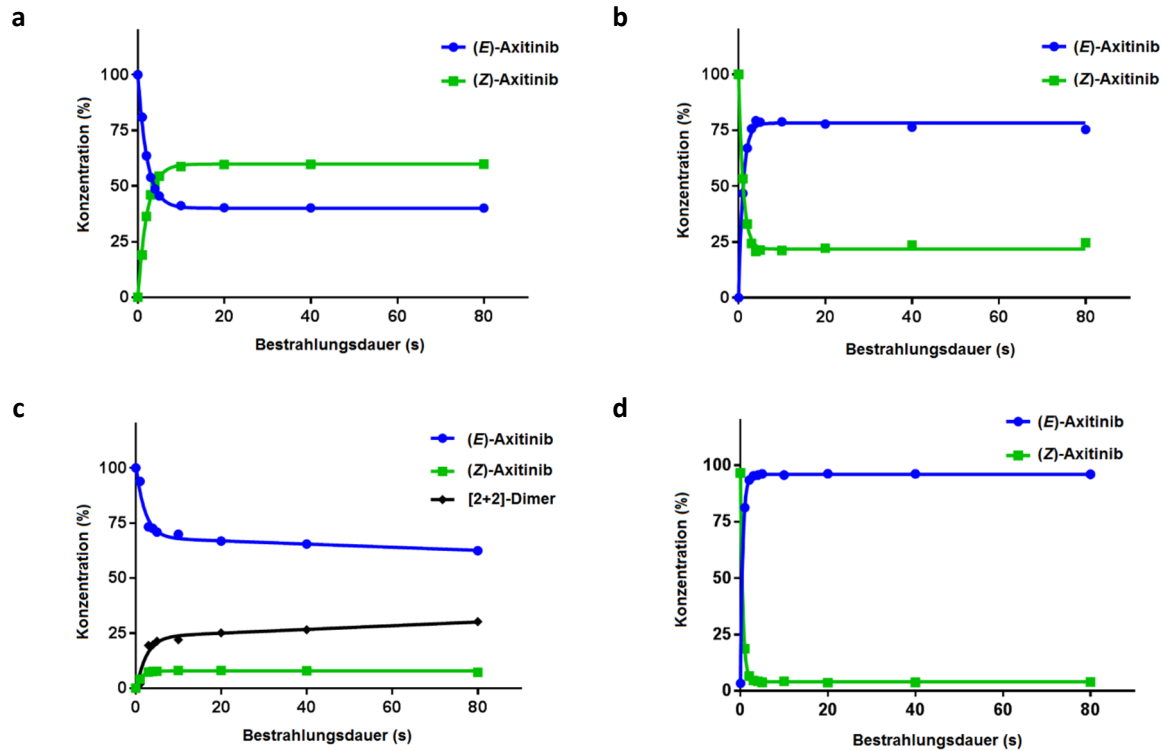


Abb. 3.13 HPLC-Analyse der photoinduzierten E/Z -Isomerisierung von Axitinib in DMSO und Wasser (5 % DMSO) **a)** Bestrahlung von (*E*)-Axitinib (**E-30**) in DMSO (100 μ M) mit 365 nm. PSS_{365 nm}: $E/Z = 40/60$ %. **b)** Bestrahlung von (*Z*)-Axitinib (**Z-30**) in DMSO (100 μ M) mit 385 nm. PSS_{385 nm}: $E/Z = 78/22$ %. **c)** Bestrahlung von (*E*)-Axitinib (**E-30**) in Wasser (20 μ M, 5 % DMSO) mit 365 nm. Die Bestrahlung führt zusätzlich zur Isomerisierung zu einer irreversiblen [2+2]-Cycloaddition von (*E*)-Axitinib (**E-30**). **d)** Bestrahlung von (*Z*)-Axitinib (**Z-30**) in Wasser (20 μ M, 5 % DMSO) mit 385 nm. PSS_{385 nm}: $E/Z = 96/4$ %. Die Datenpunkte der reinen E/Z -Isomerisierungen wurden jeweils mit einer Exponentialfunktion erster Ordnung angepasst und das photostationäre Gleichgewicht aus dem erhaltenen Plateau bestimmt.

Die relativ hohe $Z \rightarrow E$ Umsetzung bei Bestrahlung mit 385 nm, insbesondere in Wasser, wird durch die leichte Verschiebung des Spektrums von (*Z*)-Axitinib (**Z-30**) relativ zu (*E*)-Axitinib (**E-30**) ermöglicht. Diese Rotverschiebung des *Z*-Isomers ist ungewöhnlich für Stilbene und stilbenähnliche Systeme. So wird das Absorptionsspektrum von (*Z*)-Stilben beispielsweise vollständig von (*E*)-Stilben überlagert, sodass eine selektive photochemische Anregung des *Z*-Isomes nicht möglich ist. Infolgedessen wird für Stilben bei Bestrahlung mit UV-Licht zwar eine hohe $E \rightarrow Z$ Umsetzung beobachtet, aus dem PSS heraus lässt sich jedoch kaum mehr das *Z*-Isomer anreichern.^[153]

Die Isomere des chinolinbasierten Axitinibderivates **36** weisen jeweils ähnliche Absorptionsspektren wie (*E*)- bzw. (*Z*)-Axitinib (**30**) auf, wobei die Spektren insgesamt aufgrund des größeren π -Systems leicht rotverschoben (vgl. Abb. 3.14a vs. Abb. 3.10a). *E*-**36** zeigt in DMSO bei Bestrahlung mit 385 nm eine hohe *E* \rightarrow *Z* Umsetzung (PSS_{385 nm}: *E/Z* = 10/90 %). *Z*-**36** weist zwar ebenso wie (*Z*)-Axitinib (*Z*-**30**) ein leicht verschobenes Spektrum im Vergleich zu *E*-**36** auf, allerdings kann durch Bestrahlung mit 420 nm nur eine geringe Verschiebung des PSS in Richtung des *E*-Isomers erzielt werden (PSS_{420 nm}: *E/Z* = 46/54 %). Auch in Wasser erfolgt nur eine geringfügige Umsetzung des *Z*-Isomers durch Bestrahlung mit 420 nm (Abb. 3.14b). Eine Bestrahlung von *E*-**36** mit 385 nm in Wasser führt analog zu Bestrahlung von (*E*)-Axitinib (*E*-**30**) zu einem Verlust des isosbestischen Punktes in Folge einer [2+2]-Cycloaddition.

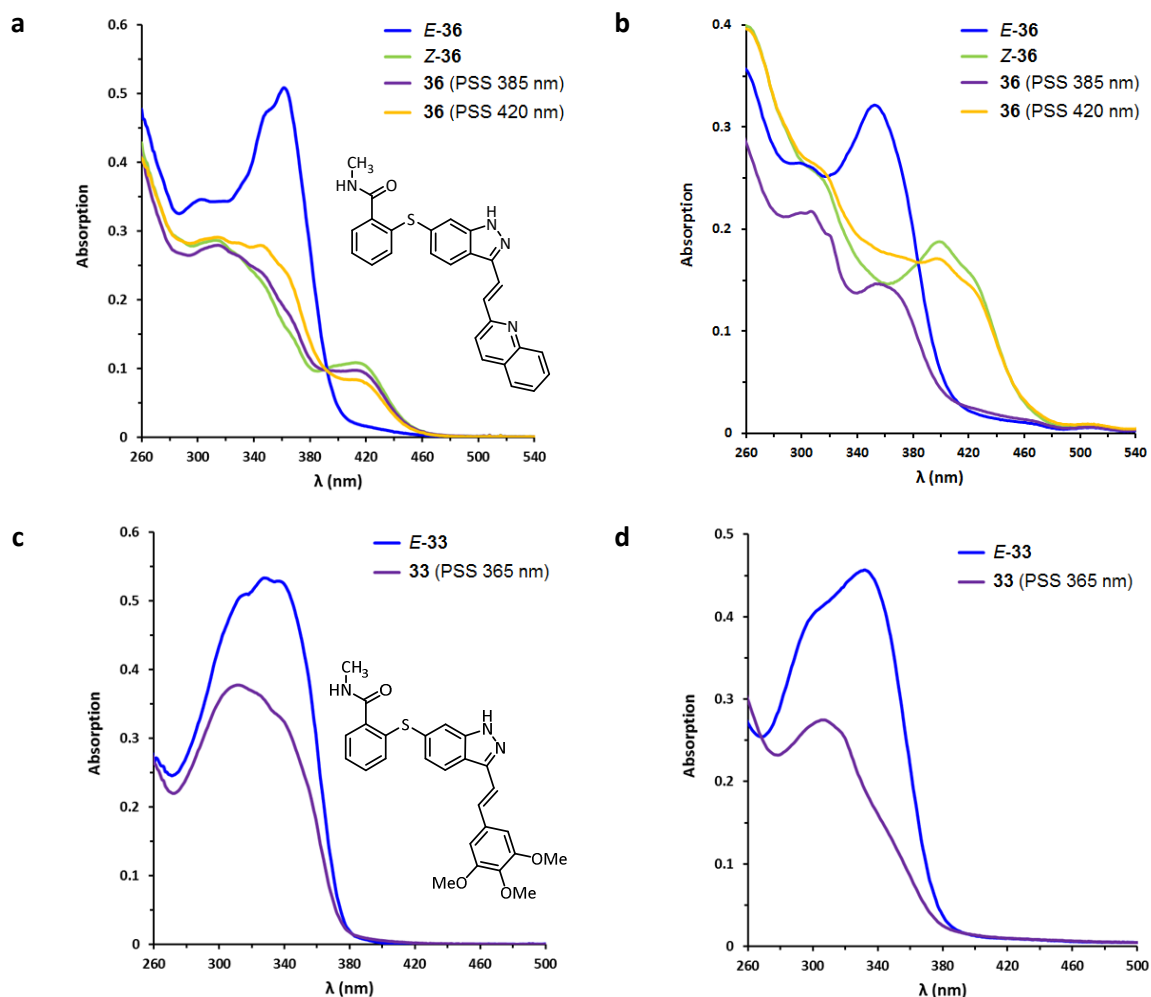


Abb. 3.14 UV/VIS-Spektren der Axitinibderivate **36** und **33** in DMSO bzw. Wasser. Während das Spektrum von *Z*-**36** eine zusätzliche rotverschobene Bande aufweist, wird das Spektrum von *Z*-**33** vollständig von *E*-**33** überlagert. Eine gezielte Photoanregung von *Z*-**33** ist somit nicht möglich. **a)** UV/VIS-Spektren von **36** in DMSO. **b)** UV/VIS-Spektren von **36** in Wasser (5 % DMSO). **c)** UV/VIS-Spektren von **33** in DMSO. **d)** UV/VIS-Spektren von **33** in Wasser (5 % DMSO).

Das Spektrum von **E-33** ist vergleichbar mit dem von (*E*)-Axitinib (**E-30**). Analog kann durch Bestrahlung mit 365 nm auch hier das PSS in Richtung des *Z*-Isomers verschoben werden (PSS_{365 nm}: *E/Z* = 51/49 %). Allerdings zeigt sich, dass das Spektrum von **Z-33** keine rotverschobene Bande aufweist, sondern vom Spektrum des *E*-Isomers vollständig überlagert wird. Damit zeigt Verbindung **33** im Gegensatz zu Axitinib (**30**) eher ein stilbentypisches Absorptionsspektrum. Vergleicht man die Struktur der Verbindung **33** mit der von Axitinib (**30**) oder der des Axitinibderivates **36**, so fällt auf, dass das Stickstoffatom des Pyridin- bzw. Chinolinrestes durch eine CH-Einheit ersetzt ist. Offenbar ist also das Stickstoffatom essentiell für eine Verschiebung der Absorptionsspektren von *E*- und *Z*-Isomer zueinander.

Tab. 3.3 Photostationäre Gleichgewichte (PSS) von Axitinib (**30**) und den stilbenähnlichen Axitinibderivaten **36** sowie **33** in DMSO bzw. Wasser (5 % DMSO).

#	λ_{exc} (nm)	PSS (<i>E/Z</i> %)		
		DMSO (NMR)	DMSO (HPLC)	Wasser ^a (HPLC)
E-30	365	51/49	40/60	n.a. ^b
Z-30	385	88/12	78/22	96/4
E-36	385	22/78	10/90	n.a. ^b
Z-36	420	38/62	46/54	n.a.
E-33	365	56/44	51/49	n.a. ^b
Z-33	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

^a 5 % DMSO

^b neben *E/Z*-Isomerisierung auch [2+2]-Cycloaddition

Um das photochrome System von Axitinib genauer zu charakterisieren, wurden von Raeker quantenmechanische Berechnungen (B3LYP-D3BJ/def2-TZVP) durchgeführt.^[154] Demnach ist das stilbenähnliche System des (*Z*)-2*H*-Tautomers **30b** aufgrund der intramolekularen Wasserstoffbrücke zwischen dem Indazol- und dem Pyridin-Rest planar und energetisch günstiger als das entsprechende 1*H*-Tautomer. Aus der Berechnung der elektronischen Übergänge von (*E*)-Axitinib (*E*-**30**), (*Z*)-1*H*-Axitinib (*Z*-**30a**) und (*Z*)-2*H*-Axitinib (*Z*-**30b**) geht weiterhin hervor, dass das (*Z*)-2*H*-Tautomer **30b** die geringste Anregungsenergie aufweist (Tab. 3.4 und Abb. 3.15). Daher ist die experimentell messbare Rotverschiebung des UV-Spektrums von (*Z*)-Axitinib (*Z*-**30**) wahrscheinlich im Wesentlichen dem 2*H*-Tautomer zuzuschreiben. Ähnliche Eigenschaften sind in der Literatur für verwandte Indol- und Chinolin-Systeme beschrieben.^[155,156]

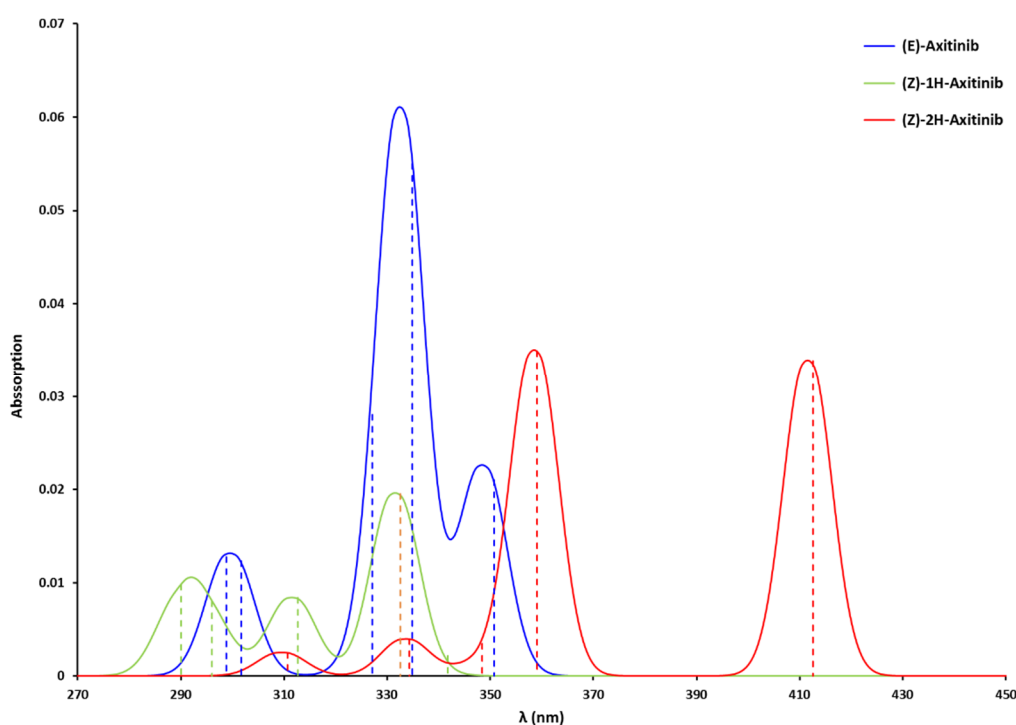
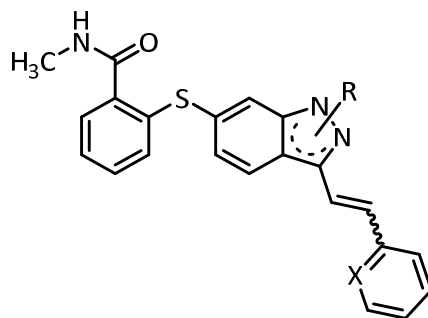


Abb. 3.15 Berechnete UV/VIS-Spektren von B3LYP-D3BJ/def2-TZVP-optimiertem (*E*)-Axitinib (*E*-**30**), (*Z*)-1*H*-Axitinib (*Z*-**30a**) and (*Z*)-2*H*-Axitinib (*Z*-**30b**).

Um diese Hypothese zu bekräftigen, wurden zusätzlich die Energien und elektronischen Übergänge zweier Axitinibderivate berechnet, bei denen die Ausbildung einer intramolekularen Wasserstoffbrücke nicht möglich ist. Zum einen das Axitinibderivat **64**, bei dem die NH-Funktion des Indazols methyliert vorliegt und zum anderen das Axitinibderivat **65**, bei dem der Pyridinrest durch einen Phenylrest ersetzt wurde. In beiden Fällen ist, im Gegensatz zu Axitinib (**30**), das 1*H*- bzw. 1*Me*-Tautomer in der *Z*-Konfiguration gegenüber dem 2*H*-Tautomer energetisch begünstigt.

Tab. 3.4 Relative Energien und vertikale Anregungsenergien von B3LYP-D3BJ/def2-TZVP optimiertem (*E*)-Axitinib (*E*-**30**), (*Z*)-1*H*-Axitinib (*Z*-**30a**) und (*Z*)-2*H*-Axitinib (*Z*-**30b**) im Vergleich zu den entsprechenden methylierten und phenylsubstituierten Derivaten **64** sowie **65**. Die Werte in den Klammern berücksichtigen zusätzlich die Nullpunktschwingungen.



#	R/X	Tautomer	Δ	Energie (eV)	
				$S_0 \rightarrow S_1$	$S_0 \rightarrow S_2$
<i>E</i> - 30		<i>E</i> -1 <i>H</i>	0	3.53	3.70
<i>Z</i> - 30a	R = H	<i>Z</i> -1 <i>H</i>	0.26 (0.25)	3.63	3.73
<i>Z</i> - 30b	X = N	<i>Z</i> -2 <i>H</i>	0.10 (0.08)	3.01	3.45
<i>E</i> - 64		<i>E</i> -1 <i>Me</i>	0	3.38	3.60
<i>Z</i> - 64a	R = Me	<i>Z</i> -1 <i>Me</i>	0.26 (0.26)	3.46	3.62
<i>Z</i> - 64b	X = N	<i>Z</i> -2 <i>Me</i>	0.37 (0.38)	2.96	3.48
<i>E</i> - 65		<i>E</i> -1 <i>H</i>	0	3.47	3.68
<i>Z</i> - 65a	R = H	<i>Z</i> -1 <i>H</i>	0.16 (0.18)	3.54	3.74
<i>Z</i> - 65b	X = CH	<i>Z</i> -2 <i>H</i>	0.26 (0.28)	3.25	3.66

3.1.4 Biologische Testung von (*E*)- und (*Z*)-Axitinib

Die im Vorfeld dieser Arbeit von Horbert und Pinchuk erhobenen Daten zur biologischen Aktivität von (*E*)-Axitinib (***E-30***) und (*Z*)-Axitinib (***Z-30***) sind in Kapitel 1.3 zusammengefasst. Zur Verifizierung bzw. Falsifizierung dieser Daten wurden von Heintze zunächst *in vitro* VEGFR2-Assays unter kontrollierten Lichtbedingungen durchgeführt. Bei dem verwendeten Assay wird eine hyperphosphorylierte VEGFR2-Kinasedomäne eingesetzt, die ein spezifisches Substrat unter ATP-Verbrauch phosphoryliert. Bei Zugabe eines Inhibitors wird die im Vergleich zu DMSO verminderte ATP-Umsetzung gemessen.

Bei der Testung von (*E*)-Axitinib (***E-30***) und (*Z*)-Axitinib (***Z-30***) konnte eine bemerkenswerte Abhängigkeit der Resultate von den vorherrschenden Laborlichtbedingungen demonstriert werden (Abb. 3.16a vs. 3.16b). Während im Dunkeln, d.h. unter Ausschluss von Tageslicht und Deckenbeleuchtung, VEGFR2 von (*E*)-Axitinib (***E-30***, $IC_{50} = 19 \text{ nM}$) etwa 31-fach stärker inhibiert wird als von (*Z*)-Axitinib (***Z-30***, $IC_{50} = 817 \text{ nM}$), ist unter gängigen Laborlichtbedingungen nahezu kein Aktivitätsunterschied messbar ($IC_{50}(\text{E-30}) \approx IC_{50}(\text{Z-30}) \approx 56\text{-}59 \text{ nM}$). Als Laborlichtquelle wurden handelsübliche rote LEDs verwendet.^[157]

Damit können die von Horbert und Pinchuk erhobenen Daten bzw. die extern gemessenen Kinaseaktivitäten und -Profile erklärt werden, die zum Teil uneinheitliche oder gar widersprüchliche Erkenntnisse lieferten. Als Gründe für die hohe Lichtempfindlichkeit der durchgeführten Kinaseassays sind in erster Linie die zum Teil sehr geringen Inhibitorkonzentrationen zu nennen. Im mikro- bis nanomolaren Konzentrationsbereich reichen schon geringe UV-Anteile bzw. UV-Intensitäten im Umgebungslicht aus, um eine unkontrollierte *E/Z*-Isomerisierung zu induzieren. Dieses Erkenntnis ist aus zweierlei Gründen erwähnenswert. Zum einen, da eine derartig hohe Empfindlichkeit bei bisher untersuchten lichtsensitiven Verbindungen, z.B. verschiedenen photogeschützten („*caged*“) Kinaseinhibitoren, nicht beobachtet wurde und zum anderen, da Axitinib in vielen Experimenten und präklinischen Studien unter normalen Lichtbedingungen als Referenzinhibitor genutzt wird. Es liegt daher nahe, dass viele dieser publizierten Daten eher auf dem jeweils vorliegenden PSS beruhen, als auf vermeintlich verwendetem reinen (*E*)-Axitinib (***E-30***).

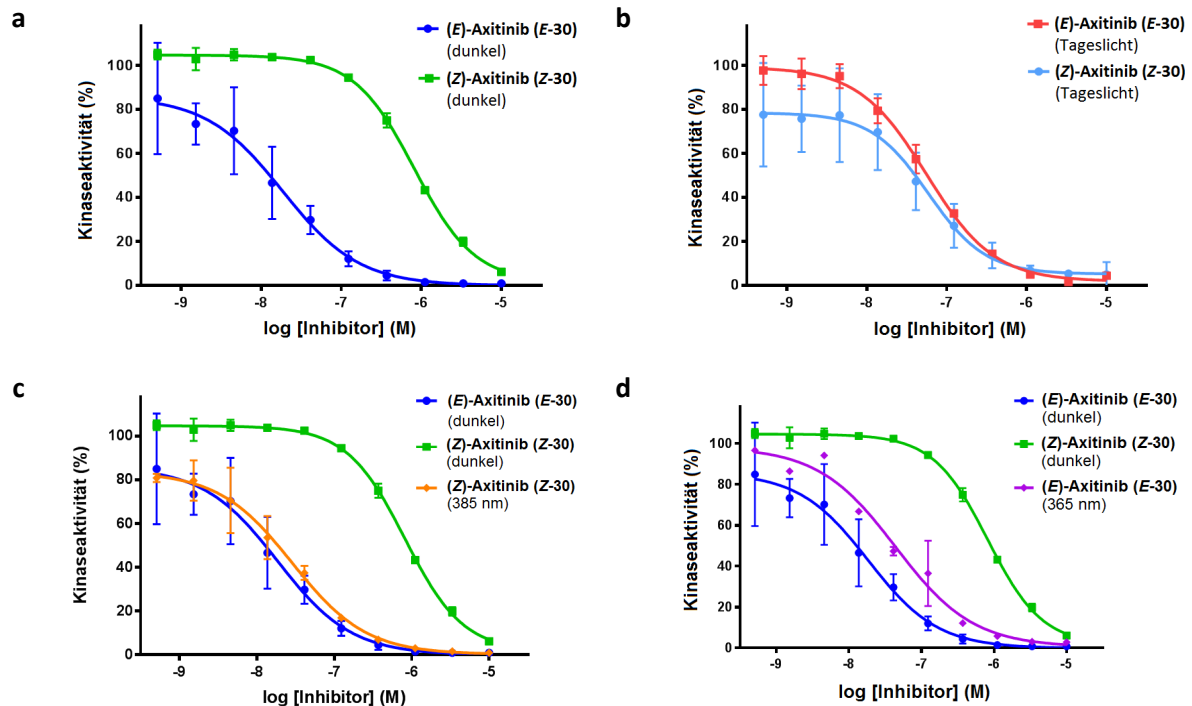


Abb. 3.16 Dosis-Wirkungs-Kurven von (*E*)-Axitinib (*E*-30) und (*Z*)-Axitinib (*Z*-30) in einem *in vitro* VEGFR2-Kinaseassay unter verschiedenen Lichtbedingungen. Die Datenpunkte stellen jeweils Mittelwerte aus Doppelbestimmungen mit zugehörigen Standardabweichungen als Fehlerbalken dar. **a)** (*E*)-Axitinib (*E*-30, blau, IC₅₀ = 19 nM, R² = 0.93) und (*Z*)-Axitinib (*Z*-30, grün, IC₅₀ = 817 nM, R² = 0.99) im Dunkeln. **b)** (*E*)-Axitinib (*E*-30, rot, IC₅₀ = 56 nM, R² = 0.99) und (*Z*)-Axitinib (*Z*-30, hellblau, IC₅₀ = 59 nM, R² = 0.91) unter normalen Laborlichtbedingungen. **c)** (*Z*)-Axitinib (*Z*-30) nach Bestrahlung mit 385 nm (orange, IC₅₀ = 29 nM, R² = 0.93) im Vergleich zu (*E*)-Axitinib (*E*-30, blau) bzw. (*Z*)-Axitinib (*Z*-30, grün). **d)** (*E*)-Axitinib (*E*-30) nach Bestrahlung mit 365 nm (lila, IC₅₀ = 44 nM, R² = 0.98) im Vergleich zu (*E*)-Axitinib (*E*-30, blau) bzw. (*Z*)-Axitinib (*Z*-30, grün).^[157]

Nachdem unter kontrollierten Lichtbedingungen ein vergleichsweise hoher Aktivitätsunterschied zwischen beiden Axitinibisomeren gegenüber VEGFR2 demonstriert werden konnte, wurde die *E/Z*-Isomerisierung im Kinaseassay durch gezielte Bestrahlung mit UV-Licht untersucht. Nach Bestrahlung von (*Z*)-Axitinib (*Z*-30) mit UV-Licht der Wellenlänge 385 nm zu Beginn der Kinaseassay wurde ein IC₅₀-Wert von 29 nM bestimmt. Ein Vergleich mit unbestrahltem (*E*)-Axitinib (*E*-30) zeigt, dass beide Dosis-Wirkungs-Kurven fast deckungsgleich sind (Abb. 3.16c). Damit konnte, in Übereinstimmung mit dem in Wasser bestimmten PSS, eine nahezu vollständige Isomerisierung von (*Z*)-Axitinib (*Z*-30) im Kinaseassay demonstriert werden. Die Bestrahlung von (*E*)-Axitinib (*E*-30) mit UV-Licht der Wellenlänge 365 nm führt hingegen nur zu einer geringen Verschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve (IC₅₀ = 44 nM, Abb. 3.16d).^[157] Auch dies spiegelt die zuvor im Wässrigen untersuchte Schaltung von (*E*)-Axitinib (*E*-30) wider, bei der nur eine geringe Umsetzung des *E*-Isomers bei gleichzeitiger [2+2]-Cycloaddition beobachtet wurde (vgl. Kapitel 3.1.3). Um eine mögliche Unterdrückung der Dimersierung durch andere solvatisierte Komponenten und Biomoleküle zu überprüfen, wurde von Heintze zusätzlich eine bestrahlte Lösung von (*E*)-Axitinib (*E*-30) im verwendeten Kinasepuffer mittels

LC-MS untersucht. Dabei konnte jedoch kein nennenswerter Einfluss der Pufferkomponenten auf die [2+2]-Cycloaddition nachgewiesen werden. Für das isolierte Axitinibdimer **63** wurde im VEGFR2-Kinaseassay keine nennenswerte Aktivität beobachtet (Anhang Abb. 9.20).^[157] Allerdings ist einschränkend hinzuzufügen, dass die Verbindung äußerst schlecht löslich ist und in den höheren Testkonzentrationen vermutlich nicht vollständig solvatisiert vorliegt. Die gemessene Inaktivität des Axitinibdimers steht jedoch im Einklang mit Molecular Modeling Untersuchungen, nach denen eine Bindung des sterisch sehr anspruchsvollen Cyclobutanderivates in der ATP-Bindetasche von VEGFR2 nicht möglich ist.

Zusätzlich zu den durchgeführten VEGFR2-Assays wurde auch die Aktivität beider Axitinibisomere an der verwandten Rezeptortyrosinkinase PDGFR β bestimmt (Abb. 3.17). Hier zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei VEGFR2. Zwar ist (*E*)-Axitinib (*E-30*) an PDGFR β mit einem IC₅₀-Wert von 72 nM etwas weniger potent als an VEGFR2, aber auch hier ist ein großer Wirkunterschied zwischen beiden Isomeren beobachtbar. So ist (*Z*)-Axitinib (*Z-30*) mit einem IC₅₀-Wert von 1355 nM etwa 19 mal weniger aktiv.^[157]

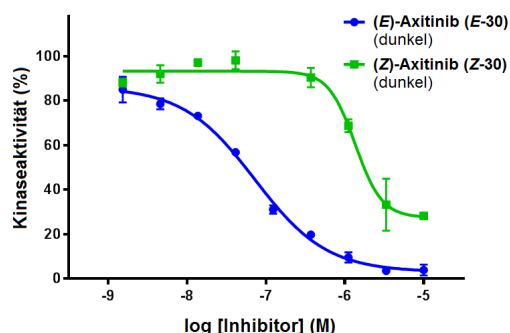


Abb. 3.17 Dosis-Wirkungs-Kurven von (*E*)-Axitinib (*E-30*, blau, IC₅₀ = 72 nM, R² = 0.99) und (*Z*)-Axitinib (*Z-30*, grün, IC₅₀ = 1355 nM, Restaktivität (Plateau): 26 %, R² = 0.96) in einem *in vitro* PDGFR β -Kinaseassay im Dunkeln. Die Datenpunkte stellen jeweils Mittelwerte aus Doppelbestimmungen mit zugehörigen Standardabweichungen als Fehlerbalken dar.^[157]

Nachdem die grundsätzliche Eignung von Axitinib als photoschaltbarer Inhibitor im Kinaseassay demonstriert werden konnte, wurde versucht, dies auf ein geeignetes zelluläres System zu übertragen. Dafür wurden zunächst beide Axitinibisomere jeweils auf ihre zytostatische bzw. zytotoxische Wirkung auf Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen (engl. *human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) hin untersucht. Da das Wachstum von HUVECs in hohem Maße durch den Wachstumsfaktor VEGF stimuliert wird, stellen HUVECs eine geeignete Zelllinie zur Untersuchung von VEGFR-Inhibitoren dar.^[116,158] Darüber hinaus sind HUVECs auch ein gängiges Modellsystem für die Angiogenese.^[159]

Im HUVEC-Proliferationsassay zeigt (*E*)-Axitinib (***E-30***) bereits im nanomolaren Konzentrationsbereich eine zytostatische Wirkung. In Konzentrationen größer als 1 μM wirkt es zytotoxisch (Abb. 3.18a). Aus der Dosis-Wirkungs-Kurve konnte in guter Übereinstimmung mit Literaturwerten ein IC_{50} -Wert von 0.83 μM ermittelt werden.^[158] Für (*Z*)-Axitinib (***Z-30***) kann hingegen erst ab einer Konzentration von etwa 10 μM ein leichter zytostatischer Effekt beobachtet werden. In höheren Konzentration kommt es schließlich sprunghaft zu einer zytotoxischen Wirkung. Mit einem IC_{50} -Wert von 26 μM ist (*Z*)-Axitinib (***Z-30***) damit etwa 31-fach weniger potent als (*E*)-Axitinib (***E-30***).^[157] Auffällig ist dabei jedoch der steile Abfall der Dosis-Wirkungs-Kurve, der vermutlich nicht oder nur zum Teil auf einer spezifischen VEGFR2-Hemmung beruht. Vielmehr ist davon auszugehen, dass (*Z*)-Axitinib (***Z-30***) aufgrund seiner schlechten Wasserlöslichkeit in hohen Konzentrationen teilweise ausfällt und dies zu einer Zellschädigung oder zu einer Störung der Signalauslesung führt. Diese Hypothese konnte in einem Kontrollexperiment (Wechselwirkungsassay) bekräftigt werden, bei dem ab Inhibitorkonzentrationen größer als 10 μM ein störender Einfluss auf die Signalauslesung des Assays beobachtet wurde (Anhang Abb. 9.24). Daher ist das gemessene Zellwachstum bei den drei höchsten Inhibitorkonzentrationen fehlerbehaftet und der tatsächliche IC_{50} -Wert von (*Z*)-Axitinib (***Z-30***) ist vermutlich größer als der ermittelte Wert von 26 μM .

Nach Bestrahlung von (*Z*)-Axitinib (***Z-30***) mit UV-Licht der Wellenlänge 385 nm sind die Dosis-Wirkungs-Kurven beider Isomere, analog zu den Beobachtungen im VEGFR2-Assay, fast deckungsgleich (Abb. 3.18b). Für bestrahltes (*Z*)-Axitinib (***Z-30***) wurde ein IC_{50} -Wert von 10 μM ermittelt, während (*E*)-Axitinib (***E-30***) im bestrahlten Assay einen IC_{50} -Wert von 4 μM aufweist. Damit konnte auch auf zellulärer Ebene demonstriert werden, dass die Wirkung von (*E*)-Axitinib (***E-30***) durch gezielte UV-Bestrahlung von (*Z*)-Axitinib (***Z-30***) unidirektional freigesetzt werden kann. Da die Bestrahlung von (*E*)-Axitinib (***E-30***) im Wässrigen nur zu einer unzureichenden *E/Z*-Isomerisierung führt und es zudem zur beschriebenen irreversiblen Cycloaddition kommen kann, wurde eine Bestrahlung von (*E*)-Axitinib (***E-30***) mit 365 nm im Zellassay nicht durchgeführt.

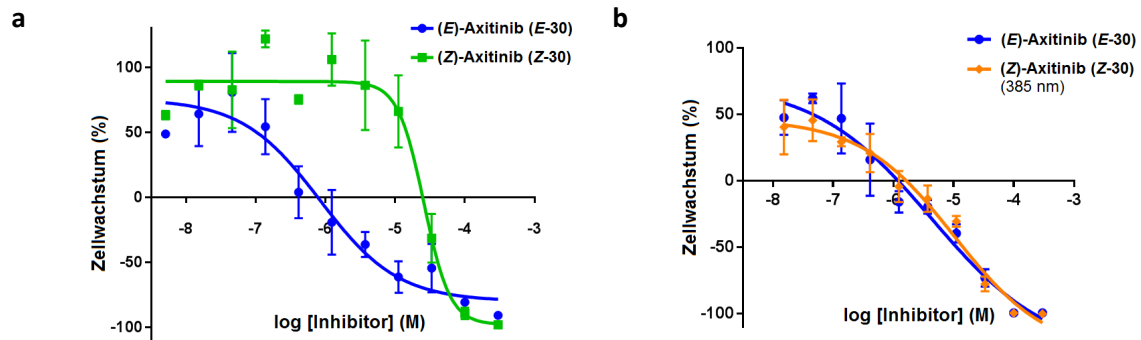


Abb. 3.18 Dosis-Wirkungs-Kurven von (*E*)-Axitinib (*E-30*) und (*Z*)-Axitinib (*Z-30*) in einem HUVEC-Proliferationsassay mit und ohne UV-Bestrahlung. Die Datenpunkte stellen jeweils Mittelwerte aus Doppelbestimmungen mit zugehörigen Standardabweichungen als Fehlerbalken dar. **a)** (*E*)-Axitinib (*E-30*, blau, $IC_{50} = 0.83 \mu\text{M}$, $R^2 = 0.91$) und (*Z*)-Axitinib (*Z-30*, grün, $IC_{50} = 26 \mu\text{M}$, $R^2 = 0.93$) im Dunkeln. **b)** (*Z*)-Axitinib (*Z-30*) nach Bestrahlung mit 385 nm (orange, $IC_{50} = 10 \mu\text{M}$, $R^2 = 0.96$) im Vergleich zu (*E*)-Axitinib (*E-30*, blau, $IC_{50} = 4.3 \mu\text{M}$, $R^2 = 0.94$).^[157]

Als weiteres Kontrollexperiment wurde die Viabilität von HUVECs ohne Inhibitorzugabe in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer bei einer Wellenlänge von 385 nm untersucht (Anhang Abb. 9.23). Dabei konnte auch bei einer Bestrahlung von bis zu 5 min keine Abnahme der Zellviabilität beobachtet werden. Somit kann von einer hinreichenden UV-Toleranz der Zellen unter den Assaybedingungen ausgegangen werden.^[157]

Zusätzlich zu den Zellproliferationsassays wurden von Rodat Western-Blot-Analysen von mit (*E*)- und (*Z*)-Axitinib behandelten HUVECs durchgeführt. Dabei wurde zum einen der unmittelbare Effekt auf VEGFR2 und darüber hinaus die Auswirkungen auf die Phosphorylierung der *Downstream*-Kinase AKT untersucht (Abb. 3.19). Nach Behandlung mit (*E*)-Axitinib (*E-30*) bzw. bestrahltem (*Z*)-Axitinib (*Z-30*) ist keine Bande mit phosphoryliertem VEGFR2 nachweisbar. Auch das Signal des phosphorylierten AKT ist im Vergleich zur Behandlung mit DMSO (Negativkontrolle) deutlich reduziert. Bei Behandlung mit (*Z*)-Axitinib (*Z-30*) ist das Signal an phosphoryliertem VEGFR2 zwar ebenfalls reduziert, dennoch ist jeweils eine Bande erkennbar. Dies spiegelt sich auch auf der Ebene von AKT wider. Hier ist bei Behandlung mit (*Z*)-Axitinib (*Z-30*) im Gegensatz zur Behandlung mit (*E*)-Axitinib (*E-30*) nur eine sehr leicht verminderte Phosphorylierung im Vergleich zu DMSO erkennbar.

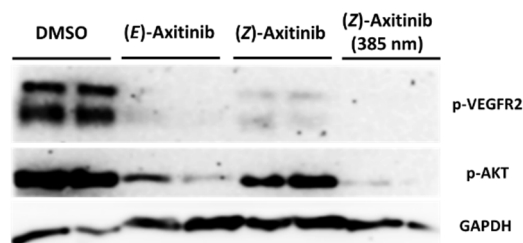


Abb. 3.19 Western-Blot Analyse von HUVECs nach Behandlung mit (*E*)-Axitinib (*E-30*), (*Z*)-Axitinib (*Z-30*) sowie mit 385 nm bestrahltem (*Z*)-Axitinib (*Z-30*) im Vergleich zu DMSO. Nach Behandlung mit (*E*)-Axitinib (*E-30*) bzw. bestrahltem (*Z*)-Axitinib (*Z-30*) ist kein phosphorylierter VEGFR2 (p-VEGFR2) nachweisbar. Nach Behandlung mit (*Z*)-Axitinib (*Z-30*) sind hingegen schwache Banden erkennbar. Für phosphoryliertes AKT (p-AKT) ergibt sich ein vergleichbares Bild. GAPDH wurde jeweils als Ladekontrolle verwendet.^[160]

Auch in Fibroblasten (NIH/3T3-Zellen) konnte mittels Western-Blotting ein deutlicher Wirkunterschied zwischen (*E*)-Axitinib (*E-30*) und (*Z*)-Axitinib (*Z-30*) nachgewiesen werden. Dabei wurde die Phosphorylierung von PDGFR β mit steigender InhibitorKonzentration untersucht (Abb. 3.20). Bei Behandlung mit (*E*)-Axitinib (*E-30*) ist die Proteinmenge an phosphoryliertem PDGFR β bereits ab einer Konzentration von 0.01 μ M deutlich vermindert, wohingegen (*Z*)-Axitinib (*Z-30*) erst ab einer InhibitorKonzentration von 1 μ M einen deutlichen Effekt zeigt.^[160]

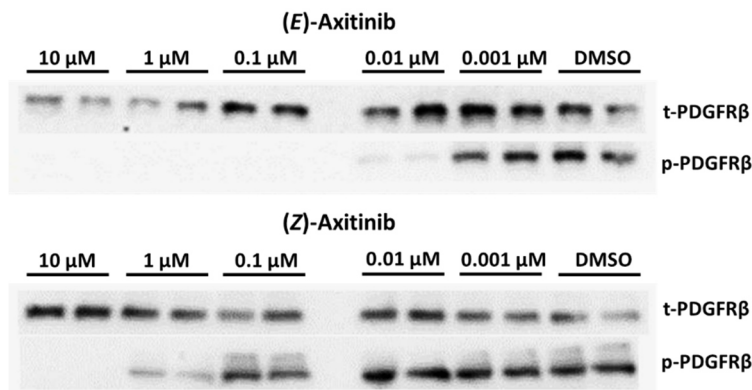


Abb. 3.20 Western-Blot Analyse von NIH/3T3-Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen an (*E*)-Axitinib (*E-30*) bzw. (*Z*)-Axitinib (*Z-30*). Aufgetragen ist jeweils die Gesamtmenge an PDGFR β (t-PDGFR β) im Vergleich zur Menge an phosphoryliertem PDGFR β (p-PDGFR β). Bei (*E*)-Axitinib (*E-30*) zeigt sich eine verminderte Phosphorylierung bereits ab einer Konzentration von 0.01 μ M, wohingegen (*Z*)-Axitinib (*Z-30*) erst ab einer Konzentration von 1 μ M einen leichten Effekt zeigt.^[160]

Um mögliche Off-Targets von (*Z*)-Axitinib (*Z-30*) zu identifizieren, insbesondere Kinasen, die nicht zu den Haupt-Targets von (*E*)-Axitinib (*E-30*) zählen, wurde auf die Pamstation®- bzw. PamChip®-Technologie der Firma PamGene zurückgegriffen. Mit dieser Technik kann die Aktivität von Kinasen in Zelllysaten mit und ohne Inhibitorzugabe analysiert werden. Das System basiert auf verschiedenen Microarrays, die aus einer porösen Membran aufgebaut sind. Diese Membran ist mit 144 charakteristischen Peptiden funktionalisiert. Die Peptide stellen spezifische Phosphorylierungsstellen von mehr als 100 Kinasesubstraten dar und können von zugehörigen Kinasen erkannt und phosphoryliert werden. Phosphorylierte Peptide können am Ende der Reaktion mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern ausgelesen werden. Die Technik hat im Vergleich zu gängigen kommerziellen Kinaseprofiling-Plattformen den Vorteil, dass die Reaktionen im Dunkeln bzw. unter kontrollierten Lichtbedingungen durchgeführt werden können. Kinaseprofile von kommerziellen Anbietern werden hingegen oft im Hochdurchsatzverfahren unter gängigen Laborlichtbedingungen durchgeführt und sind für photosensitive Verbindungen nur eingeschränkt geeignet (vgl. Kapitel 1.3.3). In Abb. 3.21 sind die in HUVEC-Lysaten gemessenen Phosphorylierungsmuster, mit bzw. ohne Inhibitorzugabe, als sog. Heatmaps dargestellt. Jeder Streifen steht für eine der 144 Phosphorylierungsstellen. Rot bedeutet eine starke Phosphorylierung, blau steht für wenig bis nicht-phosphorylierte Peptide.

Gibt man zum HUVEC-Lysat (*E*)-Axitinib (*E-30*) oder Pazopanib (Positivkontrolle) in einer Konzentration von 10 μ M hinzu, kommt es zu einer deutlichen Zunahme an wenig phosphorylierten Peptiden (blau) und zu einer Abnahme an stark phosphorylierten Stellen (rot) im Vergleich zu DMSO. Setzt man hingegen (*Z*)-Axitinib (*Z-30*) in gleicher Konzentration ein, führt dies nur zu geringen

Phosphorylierungsunterschieden in Bezug auf DMSO. Diese Tendenzen korrelieren mit den im VEGFR2-Assay und HUVEC-Proliferationsassay erzielten Ergebnissen. Wiederholung des Experimentes bei gleichzeitiger Bestrahlung von (Z)-Axitinib (Z-30) mit UV-Licht der Wellenlänge 385 nm zu Beginn der Reaktion zeigt, dass sich die Heatmaps von bestrahltem (Z)-Axitinib (Z-30) und unbestrahltem (E)-Axitinib (E-30) stark ähneln, während die Heatmap von unbestrahltem (Z)-Axitinib (Z-30) tendenziell eher dem Phosphorylierungsmuster der Negativkontrolle entspricht.

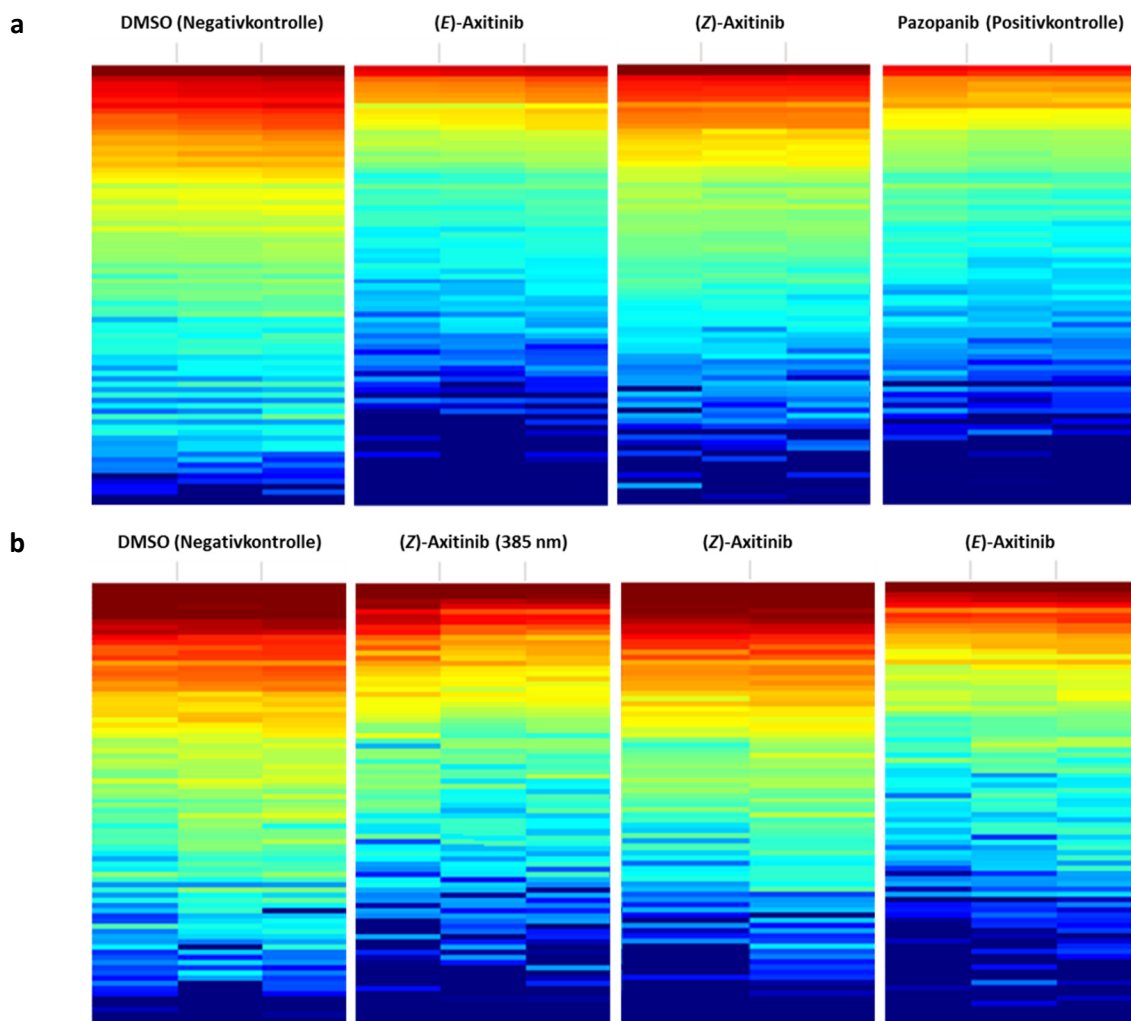


Abb. 3.21 Mittels PamGene-Technik gemessene Phosphorylierungsmuster von HUVEC-Lysaten nach Inkubation mit den jeweils angegebenen Kinaseinhibitoren. Jeder Balken der Heatmaps steht für eine spezifische Phosphorylierungsstelle. Rote Balken zeigen einen hohen Phosphorylierungsgrad, blaue Streifen einen niedrigen. **a)** Behandlung der HUVEC-Lysate mit (E)-Axitinib (E-30) bzw. Pazopanib (Positivkontrolle) führt zu einer deutlichen Zunahme an wenig phosphorylierten Peptiden (blau) und zu einer Abnahme an stark phosphorylierten Stellen (rot) im Vergleich zu DMSO. Behandlung mit (Z)-Axitinib (Z-30) führt hingegen zu geringeren Phosphorylierungsunterschieden in Bezug auf DMSO. **b)** Nach Bestrahlung von (Z)-Axitinib (Z-30) mit 385 nm verändert sich das Phosphorylierungsmusters in Richtung von (E)-Axitinib (E-30). Unbestrahltes (Z)-Axitinib (Z-30) hingegen resultiert erneut in einer Heatmap, die eher der von DMSO ähnelt.^[160]

Die Darstellung der Ergebnisse als Volcano-Plot verdeutlicht die gemessenen Unterschiede zwischen den eingesetzten Inhibitoren nochmals (Abb. 3.22). Aufgetragen ist hier der Logarithmus des p-Wertes (Überschreitungswahrscheinlichkeit) zur Basis 2 gegen den Logarithmus der x-fachen Änderung (*fold change*) zur Basis 2. Rote Quadrate stehen für signifikant weniger phosphorylierte Peptide ($\log_2(p\text{-Wert}) > 1.3$) im Vergleich zu DMSO. Graue und schwarze Quadrate stehen für nicht-signifikant veränderte Phosphorylierungen ($\log_2(p\text{-Wert}) < 1.3$). Die Zugabe von (*E*)-Axitinib (***E-30***) bzw. Pazopanib (Positivkontrolle) führt zu einer Vielzahl an signifikant weniger phosphorylierten Peptiden (rot) im Vergleich zu DMSO, während die Zugabe von (*Z*)-Axitinib (***Z-30***) insgesamt zu weniger und zu betragsmäßig kleineren Phosphorylierungsunterschieden in Bezug auf DMSO führt. Noch deutlicher sind die Unterschiede im zweiten Experiment. Hier führt die Zugabe von (*E*)-Axitinib (***E-30***) bei mehr als 50 Peptiden zu einer signifikant reduzierten Phosphorylierung, in Anwesenheit von (*Z*)-Axitinib (***Z-30***) hingegen nur bei sechs Peptiden. Bei Bestrahlung erhöht sich die Zahl der signifikant weniger phosphorylierten Peptide erneut merklich. Ein Vergleich beider Experimente (Abb. 3.22a vs. Abb. 3.22b) zeigt aber auch, dass die Ergebnisse beider unabhängigen Experimente gewissen Schwankungen unterliegen und nur zum Teil reproduzierbar sind. Dies könnte zum einen an unterschiedlichen Kinaseaktivitäten der verwendeten Lysate und zum anderen an uneinheitlichen Chips liegen. Quantitative Vergleiche sollten daher nur innerhalb eines Experimentes gezogen werden, das auf demselben PamChip[®] gemessen wurde.

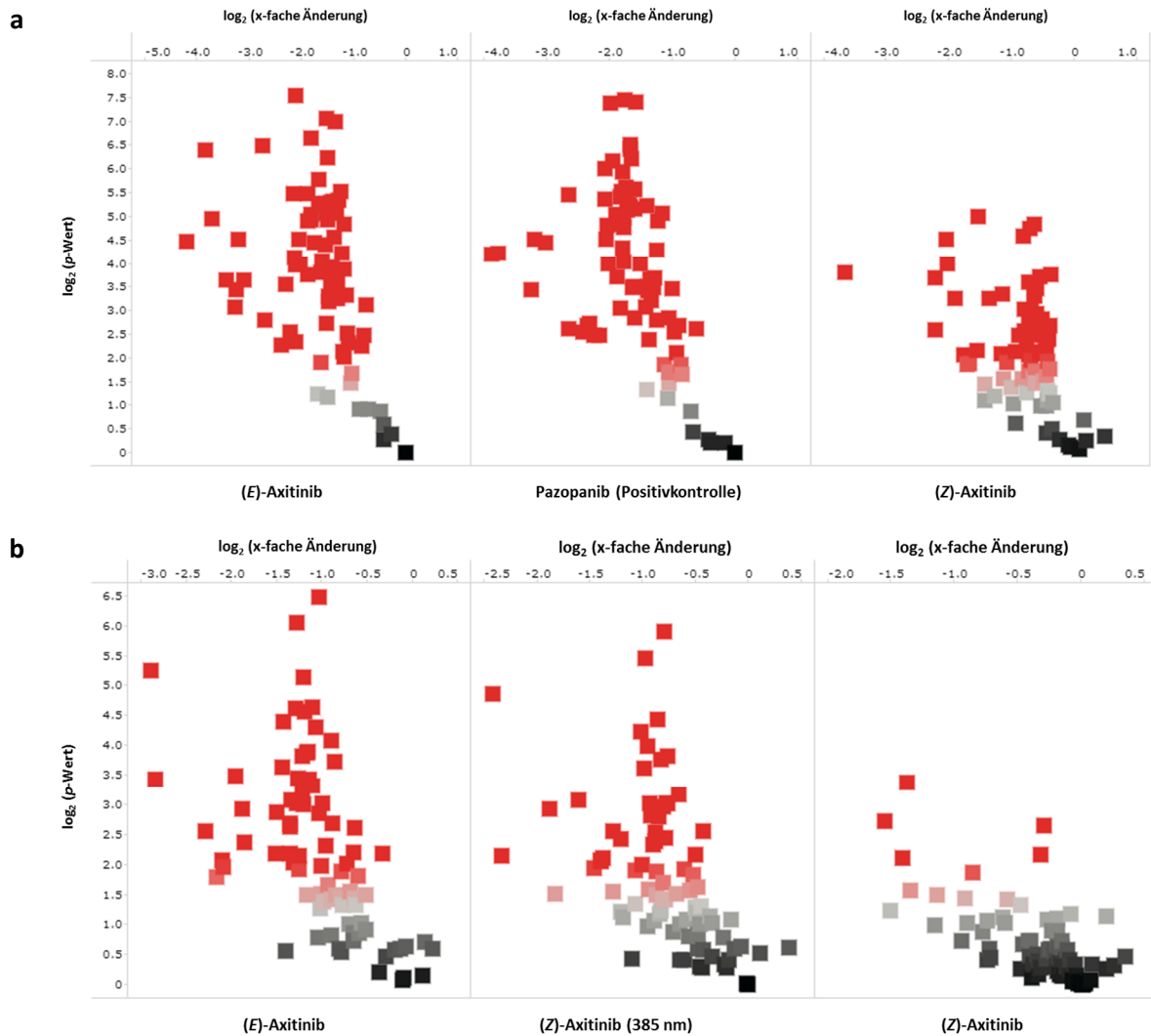


Abb. 3.22. Darstellung der mittels PamGene-Technik gemessene Phosphorylierungsaktivität von HUVEC-Lysaten als Volcano-Plots. Rote Quadrate stehen für signifikant weniger phosphorylierte Peptide nach Behandlung mit dem jeweiligen Inhibitor im Vergleich zu DMSO. Graue und schwarze Quadrate stehen für nicht-signifikant veränderte Phosphorylierungen ($\log_2(p\text{-Wert}) < 1.3$). **a)** Behandlung der HUVEC-Lysate mit (E)-Axitinib (E-30) bzw. Pazopanib (Positivkontrolle) führt zu einer Vielzahl an signifikant weniger phosphorylierten Peptiden (rot) im Vergleich zu DMSO. Behandlung mit (Z)-Axitinib (Z-30) führt hingegen insgesamt zu weniger und zu betragsmäßig kleineren Phosphorylierungsunterschieden in Bezug auf DMSO. **b)** Nach Bestrahlung von (Z)-Axitinib (Z-30) mit 385 nm wird ein ähnlicher Volcano-Plot wie für (E)-Axitinib (E-30) mit über 50 signifikant veränderten Phosphorylierungen erhalten. Für unbestrahltes (Z)-Axitinib (Z-30) hingegen werden insgesamt nur sechs signifikant veränderte Phosphorylierungen detektiert.^[160]

Auf Basis der gemessenen Phosphorylierungsmuster ist es möglich, eine sog. Upstream-Kinase-Analyse durchzuführen, um Kinasen zu identifizieren, die für entsprechende Phosphorylierungen verantwortlich sind. Durch Zugabe von Kinaseinhibitoren, die charakteristische Phosphorylierungen inhibieren, ist es folglich möglich, Inhibitor-Selektivitätsprofile zu berechnen. Eindeutige Zuordnungen werden jedoch dadurch eingeschränkt, dass viele Kinasesubstrate von mehreren Kinasen gleichzeitig phosphoryliert werden, sodass es zu Überschneidungen kommt. Die signifikanten Ergebnisse ($\log_2(p\text{-Wert}) > 1.3$) sind in Abb. 3.23 zusammengefasst. Demnach werden für (*E*)-Axitinib (*E-30*) die Tyrosinkinasen FGFR1, RET und SYK als mögliche Targets identifiziert. Dies steht im Einklang mit publizierten Selektivitätsprofilen von (*E*)-Axitinib (*E-30*), bei denen FGFR1 und RET ebenfalls als Hits gefunden wurden.^[109] Die Tyrosinkinase SYK ist hingegen kein literaturbekanntes Target von (*E*)-Axitinib (*E-30*), spielt aber eine wichtige Rolle beim Wachstum von Endothelzellen. Für (*Z*)-Axitinib (*Z-30*) werden die Tyrosinkinasen SYK und BLK als mögliche Targets vorausgesagt. Um diese Hypothese zu stützen, sind jedoch weitere Untersuchungen wie z.B. eine IC_{50} -Bestimmung an den isolierten Kinasen nötig. Die Ergebnisse für das Haupt-Target VEGFR2 sind für beide Axitinibisomere aufgrund von uneindeutigen Phosphorylierungsmustern nicht signifikant ($\log_2(p\text{-Wert}) < 1.3$), sodass VEGFR2 von der Methode nicht als Target erkannt wird.

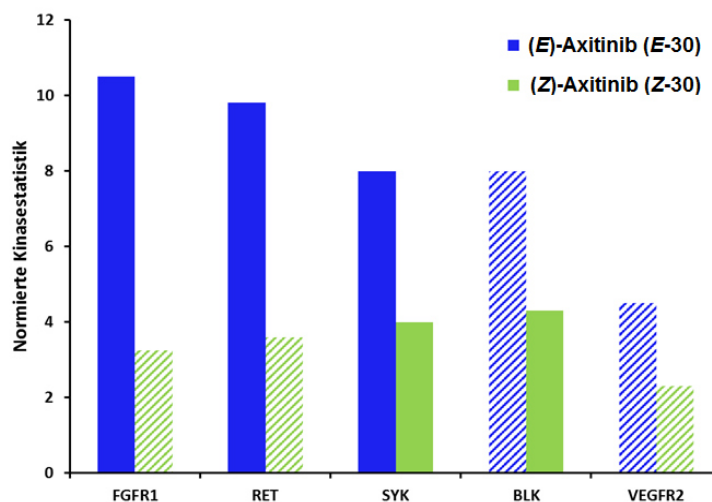


Abb. 3.23 Upstream-Kinase-Analyse der Phosphorylierungsprofile von HUVEC-Lysaten nach Behandlung mit (*E*)-Axitinib (*E-30*) bzw. (*Z*)-Axitinib (*Z-30*). Die Höhe der Balken gibt jeweils die betragsmäßige Änderung der Kinaseaktivität im Vergleich zu DMSO an. Gestrichelte Balken beruhen auf nicht signifikanten Ergebnissen ($\log_2(p\text{-Wert}) < 1.3$).^[160]

3.1.5 Biologische Testung der stilbenähnlichen Axitinibderivate

Die stilbenähnlichen Axitinibderivate **33** und **36** wurden analog zu den beiden Axitinibisomeren in dem bereits etablierten *in vitro* VEGFR2-Kinaseassay getestet. Da die Isomere des Axitinibderivates **36** säulenchromatographisch getrennt werden konnten, wurden zu Beginn beide isolierten Isomere im Dunkeln getestet (Abb. 3.24). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Aktivität des Z-Isomers Z-**36** mit einem IC_{50} -Wert von 1045 nM im Vergleich zu (Z)-Axitinib (Z-**30**, IC_{50} = 817 nM) leicht gesenkt werden konnte. Allerdings ist auch das E-Isomer E-**36** mit einem IC_{50} -Wert von 173 nM deutlich weniger potent als (E)-Axitinib (E-**30**, IC_{50} = 19 nM), sodass sich insgesamt lediglich ein sechsfacher Wirkunterschied zwischen E-**36** und Z-**36** ergibt. Damit ist der Wirkunterschied deutlich geringer als zwischen (E)-Axitinib (E-**30**) und (Z)-Axitinib (Z-**30**), bei denen ein 43-facher Wirkunterschied gemessen wurde.^[157]

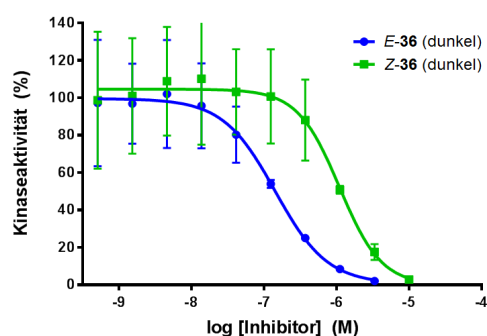


Abb. 3.24. Dosis-Wirkungs-Kurven von E-**36** (blau, IC_{50} = 173 nM) und Z-**36** (grün, IC_{50} = 1045 nM) in einem *in vitro* VEGFR2-Kinaseassay im Dunkeln.^[157]

Auch bei der Aktivierung bzw. Deaktivierung der Isomere durch Bestrahlung konnte keine Verbesserung im Vergleich zu Axitinib (**30**) erzielt werden. Wie bereits bei der photochemischen Charakterisierung beobachtet, ist die Schalteffizienz des Isomers Z-**36** im wässrigen Milieu gering. Entsprechend konnte durch Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 420 nm nur eine leichte Verschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve im VEGFR2-Assay erzielt werden (Abb. 3.25a). Für das PSS bei 420 nm wurde ein IC_{50} -Wert von 323 nM ermittelt. Durch Bestrahlung des Isomers E-**36** mit 365 nm kann zwar ebenfalls eine Veränderung des IC_{50} -Wert von 173 nM auf 486 nM beobachtet werden, wahrscheinlich kommt es aber neben der E/Z-Isomerisierung auch zum Teil zu einer unerwünschten [2+2]-Cycloaddition (Abb. 3.25b).

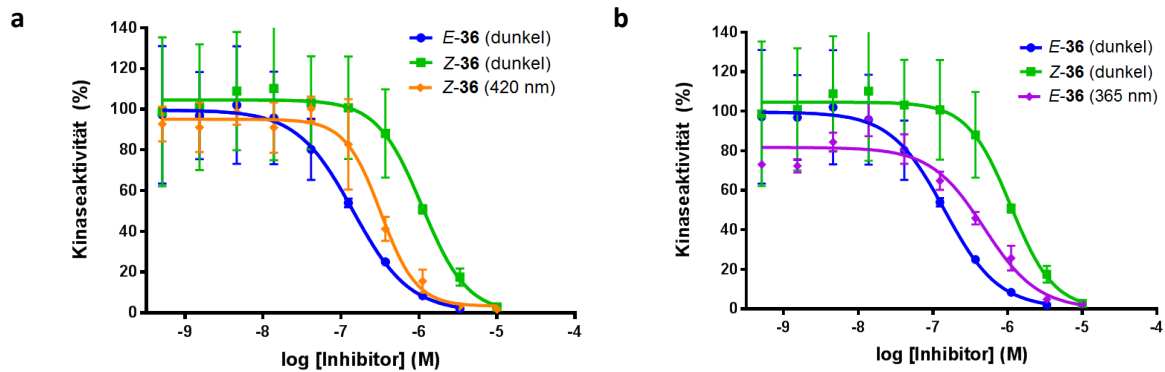


Abb. 3.25 Dosis-Wirkungs-Kurven der Axitinibderivate *E-36* und *Z-36* in einem *in vitro* VEGFR2-Kinaseassay mit und ohne Bestrahlung. **a)** *Z-36* nach Bestrahlung mit 420 nm (orange, $IC_{50} = 323$ nM) im Vergleich zu *E-36* (blau, $IC_{50} = 173$ nM) und *Z-36* (grün, $IC_{50} = 1045$ nM) im Dunkeln. **b)** *E-36* nach Bestrahlung mit 365 nm (lila, $IC_{50} = 486$ nM) im Vergleich zu *E-36* (blau, $IC_{50} = 173$ nM) und *Z-36* (grün, $IC_{50} = 1045$ nM) im Dunkeln.^[157]

Das Axitinibderivat *E-33* stellt mit einem IC_{50} -Wert von 59 nM ebenfalls einen potenten VEGFR2 Inhibitor dar (Abb. 3.26). Da jedoch die Isolierung des *Z*-Isomers *Z-33* säulenchromatographisch nicht gelang, konnte kein IC_{50} -Wert für das isolierte *Z*-Isomer bestimmt werden. Durch Bestrahlung von *E-33* mit 365 nm kommt es zu einer Erhöhung des IC_{50} -Wertes auf 270 nM. Allerdings ist hierbei, unter Berücksichtigung der photochemischen Charakterisierung in Wasser, ebenfalls davon auszugehen, dass es neben der *E/Z*-Isomerisierung auch zu einer Dimerisierung der Verbindung kommt.

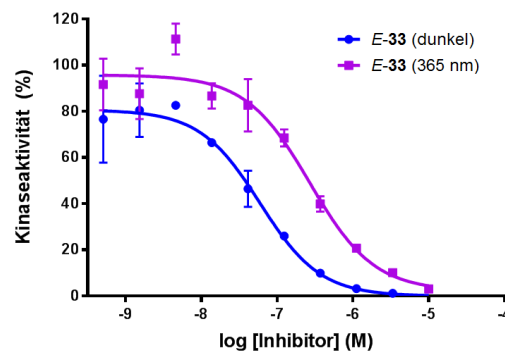


Abb. 3.26 Dosis-Wirkungs-Kurven des Axitinibderivates *E-33* im Dunkeln (blau, $IC_{50} = 59$ nM) und nach Bestrahlung mit 365 nm (lila, $IC_{50} = 270$ nM) in einem *in vitro* VEGFR2-Kinaseassay.^[157]

Tab. 3.5 IC₅₀-Werte der stilbenähnlichen Axitinibderivate **36** und **33** im Vergleich zu Axitinib (**30**) im VEGFR2 Kinaseassay.

#	IC ₅₀ (nM) dunkel	$\frac{\text{IC}_{50}(\text{Z, dunkel})}{\text{IC}_{50}(\text{E, dunkel})}$	λ_{Exc} (nm)	IC ₅₀ (nM) bestrahlt	$\frac{\text{IC}_{50}(\text{Z, dunkel})}{\text{IC}_{50}(\text{Z, bestrahlt})}$
<i>E-30</i>	19	43	365	44 ^a	28
<i>Z-30</i>	817		385	29	
<i>E-36</i>	173	6	365	486 ^a	3
<i>Z-36</i>	1045		420	323	
<i>E-33</i>	59	> 5 ^b	365	270 ^a	n.a.
<i>Z-33</i>	n.a.		n.a.	n.a.	

^a vermutlich teilweise Dimerisierung (2+2-Cycloaddition)

^b Zur Berechnung wurde der IC₅₀-Wert des PSS bei 365 nm herangezogen

Über die VEGFR2-Kinaseassays hinaus wurden ebenfalls HUVEC-Proliferationsassays durchgeführt. Dabei wurden die isolierten Isomere *E*-36, *Z*-36 sowie *E*-33 getestet. Eine Bestrahlung der Zellexperimente wurde aufgrund der schlechten Photoeigenschaften und der geringen Aktivitätsunterschiede im Kinaseassay nicht durchgeführt. Die im Dunkeln aufgenommenen Dosis-Wirkungs-Kurven sind in Abb. 3.27 zusammengestellt.

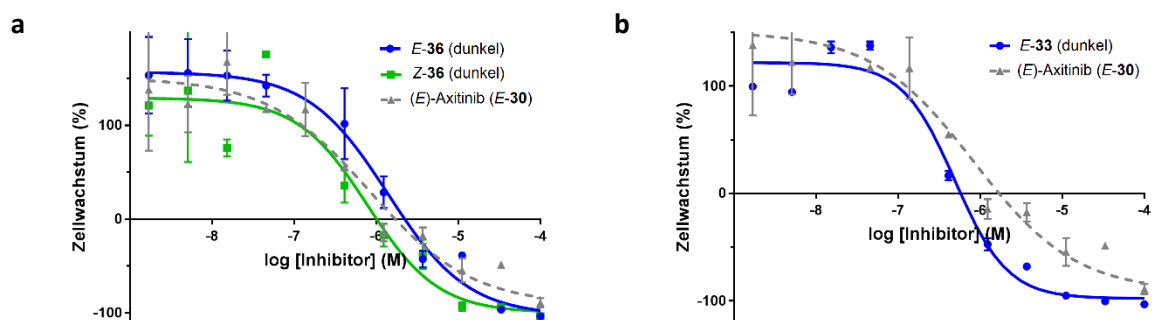


Abb. 3.27 Dosis-Wirkungs-Kurven der Axitinibderivate **36** und **33** in einem HUVEC-Proliferationsassay im Vergleich zu (*E*)-Axitinib (*E*-30, grau, IC₅₀ = 0.84 µM). **a**) *E*-36 (blau, IC₅₀ = 1.4 µM) und *Z*-36 (grün, IC₅₀ = 0.79 µM) im Dunkeln. **b**) *E*-33 (blau, IC₅₀ = 0.48 µM) im Dunkeln. Die Datenpunkte stellen jeweils Mittelwerte aus Doppelbestimmungen dar. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.^[126]

Die *E*-Isomere *E*-36 und *E*-33 zeigen jeweils einen starken antiproliferativen Effekt mit IC₅₀-Werten im Bereich um 1 µM. *E*-36 ist mit einem IC₅₀-Wert von 1.39 µM etwas weniger potent als (*E*)-Axitinib (*E*-30, IC₅₀ = 0.83 µM). *E*-33 weist hingegen mit einem IC₅₀-Wert von 0.48 µM eine höhere Zellaktivität als (*E*)-Axitinib (*E*-30) auf. Diese Werte korrelieren gut mit der zuvor bestimmten Inhibition von VEGFR2, die für *E*-36 ebenfalls am geringsten ausfällt. Auffällig ist hingegen der starke antiproliferative Effekt von *Z*-36, der mit einem IC₅₀-Wert von 0.79 µM sogar stärker ausfällt als für *E*-36 und in dem Bereich von (*E*)-Axitinib (*E*-30) liegt. Dies steht im Widerspruch zur geringen VEGFR2-Hemmung, die für *Z*-36 im Kinaseassay ermittelt wurde. Mögliche Erklärungen für die hohe zelluläre Wirkung von *Z*-36 könnten eine bessere Aufnahme in die Zelle oder ein bisher nicht geklärter Off-Target-Effekt sein.

3.2 Azobenzol- und diazocinfunktionalisierte Axitinibderivate

Ein gängiges Konzept zur Entwicklung photoschaltbarer Inhibitoren ist die sog. Azologisierung von bioaktiven Wirkstoffen. Dabei werden „azologe“ Strukturen, also azoähnliche funktionelle Gruppen oder azobenzolähnliche Molekülreste, durch eine Azofunktion bzw. durch Azobenzolderivate ersetzt. Um ein reversibel schaltbares Axitinibderivat zu erhalten, liegt daher eine unmittelbare Azologisierung der CC-Doppelbindung von Axitinib (**30**) auf der Hand. Dieses Konzept wurde bereits im Jahre 2015 von Kuhl realisiert, ist jedoch aufgrund der sehr schnellen thermischen Rückisomerisierung des *Z*-Isomers nicht zielführend (vgl. Kapitel 1.3.3).^[125]

Zweckmäßiger für photopharmakologische Anwendungen als klassische Azobenzole sind verbrückte Azobenzole (Diazocine), da diese als *Z*-Isomer thermodynamisch stabil sind und durch Bestrahlung temporär in die metastabile *E*-Konfiguration übergehen.^[46,53] Im folgenden Kapitel wurde daher das Pharmakophor des VEGFR2-Inhibitors Axitinib mit verschiedenen Diazocin-Bausteinen funktionalisiert und die Verbindungen photochemisch sowie biologisch charakterisiert. Weiterhin wurden vergleichbare azobenzolfunktionalisierte Derivate synthetisiert und mit den entsprechenden Diazocinen in Bezug auf photochemische und biologische Eigenschaften verglichen.

3.2.1 Molecular Modeling

Um eine geeignete Verknüpfung der Diazocin-Bausteine mit dem Axitinibpharmakophor zu identifizieren, wurden zunächst Molecular Modeling Studien durchgeführt. Dazu wurden 3D-Molekülstrukturen generiert, wobei die Diazocine über unterschiedliche Linker mit dem Indazol-Baustein verbunden wurden (Tab. 3.6). Als Linker wurden u.a. eine Aminofunktion, eine Amidbindung sowie verschieden hybridisierte Kohlenstoffbrücken gewählt. Jede Verbindung wurde sowohl in *E*- als auch in *Z*-Konfiguration erstellt. Da Diazocine mit dem verwendeten OPLS3-Kraftfeld nicht adäquat behandelt werden können, wurden jeweils quantenmechanisch optimierte Diazocinstrukturen verwendet und die Diederwinkel der Diazocine „eingefroren“. Die generierten Strukturen wurden anschließend mit Hilfe des Software Schrödinger *Glide* in die ATP-Bindetasche der Rezeptortyrosinkinase VEGFR2 gedockt. Ziel dabei war es, Verbindungen zu identifizieren, bei denen eine *E/Z*-Isomerisierung des Diazocins zu einem großen Affinitätsunterschied der Liganden an VEGFR2 führt. Da der Bindemodus des Axitinibpharmakophors bekannt ist, wurde das zugrundeliegende Wasserstoffbrückenmuster des Indazol- bzw. *N*-Methyl-benzamidrestes als notwendiges Kriterium für einen plausiblen Bindemodus definiert (sog. *H-bond constraints*).

Für die erstellten diazocinfunktionalisierten Axitinibderivate wurden jeweils Bindemodi in *E*-Konfiguration (*chair*- und *twist*-Konformation) sowie in *Z*-Konfiguration berechnet. Die berechneten Docking Scores der ersten Serie sind in Tab. 3.6 zusammengefasst. Vergleicht man jeweils die Docking-Scores des *E*- und *Z*-Isomers, so fällt auf, dass sich kaum Affinitätsunterschiede ergeben. Offensichtlich hat eine *E/Z*-Isomerisierung der Azobindung bei den generierten Verbindungen keinen (z.B. **67**) oder nur einen sehr geringen Effekt (z.B. **69**) auf den berechneten Bindemodus und den daraus abgeleiteten Docking Score. Im Falle des amidverknüpften Derivates **68** wird für das *Z*-Isomer sogar ein marginal höherer Docking Score berechnet als für das *E*-Isomer. In Abb. 3.28 sind exemplarisch die berechneten Bindemodi des amidverknüpften Diazocin-Axitinibderivates **68** in *E*- sowie *Z*-Konfiguration dargestellt. Es zeigt sich, dass der Diazocin-Baustein aufgrund des Amid-Linkers so weit aus der Bindetasche in das umgebene Lösungsmittel herausragt, dass die Isomerisierung größtenteils frei außerhalb der Bindetasche erfolgt. Folglich nimmt die Geometrieänderung des Moleküls keinen Einfluss auf die Bindung bzw. Affinität des Pharmakophors innerhalb der Bindetasche.

Tab. 3.6 Übersicht verschieden verknüpfter Diazocin-Axitinibderivate sowie berechnete Docking-Scores des jeweiligen *E*- und *Z*-Isomers.

#	Rest (R)	Docking Score (Glide)	
		<i>E</i> -Isomer ^a	<i>Z</i> -Isomer
66		-13.8	-13.3
67		-14.9	-14.9
68		-13.9	-14.5
69		-11.6	-12.3
70		-14.1	-12.8
71		-12.3	-12.4
72		-14.5	-14.4

^a angegeben ist jeweils der Docking Score der *chair*-Konformation

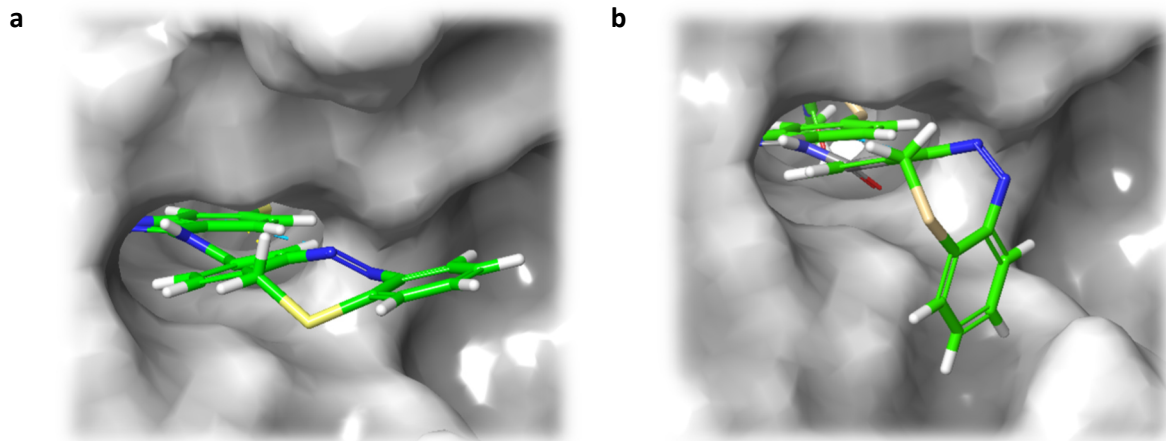


Abb. 3.28 Berechneter Bindemodus des amidverknüpften Diazocin-Axitinibderivates **68** (grün) in der Bindetasche von VEGFR2 (PDB: 4AG8).^[129] Darstellung der molekularen Proteinoberfläche (grau). Sowohl in *E*- als auch in *Z*-Konfiguration wird ein plausibler Bindemodus gefunden, sodass eine Photoisomerisierung vermutlich keinen maßgeblichen Einfluss auf die Bindeaffinität hat. **a)** Diazocin in *E*-Konfiguration (*chair*). Docking Score: -13.9. **b)** Diazocin in *Z*-Konfiguration. Docking-Score: -14.5.

Unter Berücksichtigung der gewonnenen Erkenntnisse wurde eine zweite Serie an diazocinfunktionalisierten Axitinibderivaten erstellt und die Diazocine dabei unmittelbar, d.h. ohne Linker, an den Indazol-Baustein des Axitinibpharmakophors geknüpft (Tab. 3.7). Durch die direkte CC-Verknüpfung sitzt der Diazocin-Baustein tiefer in der ATP-Bindetasche und besetzt dort die zum Solvens hin geöffnete hydrophobe Region II (vgl. Kapitel 1.13). Wie Tab. 3.7 zu entnehmen ist, ergeben sich für diese Serie erhebliche Unterschiede beim *Glide*-Docking zwischen dem jeweiligen *E*- und *Z*-Isomer. So wird für das in *meta*-Position zur Azobindung verknüpfte Diazocin **73** in *E*-Konfiguration (*chair*) ein Docking Score von -14.1 berechnet, während in *Z*-Konfiguration kein Bindemodus gefunden werden kann. Auch bei diesem Docking wurden die vier charakteristischen Wasserstoffbrückenbindungen des Axitinibpharmakophors als notwendiges Kriterium für einen erlaubten Bindemodus definiert. Ohne diese Restriktion werden in *Z*-Konfiguration zwar andere Bindemodi gefunden, diese sind jedoch aufgrund gänzlich fehlender Wasserstoffbrückenbindungen als nicht realistisch anzusehen.

Tab. 3.7 Übersicht verschiedener CC-verknüpfter Diazocin-Axitinibderivate sowie berechnete Docking Scores des jeweiligen *E*- und *Z*-Isomers. Es wurde jeweils sowohl ein standardmäßiges *Glide*-Docking als auch ein *Induced-Fit*-Docking durchgeführt. Als notwendiges Kriterium für einen erlaubten Bindemodus wurden alle vier Wasserstoffbrückenbindungen des Axitinibpharmakophores definiert. Beim *Induced-Fit*-Docking wurden alle Aminosäuren mit einem Abstand von 5 Å zum Liganden als flexibel behandelt. ✖: Kein plausibler Bindemodus gefunden.

#	Rest (R)	Docking Score (<i>Glide</i>)		Docking Score (<i>Induced-Fit</i>)	
		<i>E</i> -Isomer	<i>Z</i> -Isomer	<i>E</i> -Isomer	<i>Z</i> -Isomer
73		-14.1 ^a	✖	-16.2 ^a	✖
74		-14.0 ^a	✖	-15.5 ^a	✖
75		-14.3 ^a	✖	-16.4 ^a	-16.0
76		-14.3 ^a	✖	-15.4 ^a	-15.3
77		-13.9	-14.0	n.a.	n.a.
78		-13.7	-13.8	n.a.	n.a.

^a angegeben ist jeweils der Docking Score der *chair*-Konformation

In Abb. 3.29a ist der vorausgesagte Bindemodus des diazocinfunktionalisierten Axitinibderivates **E-73** gezeigt. In der *E*-Konfiguration ähnelt der Bindemodus dem von (*E*)-Axitinib (**E-30**), wobei mit einem Docking-Score von -14.1 ein leicht niedrigerer Wert berechnet wurde als für (*E*)-Axitinib (-15.6). Der Diazocin-Baustein füllt den vorhandenen Platz in der hydrophoben Region II der ATP-Bindetasche sowohl in *chair*-Konformation (Abb. 3.29a) als auch in *twist*-Konformation (nicht gezeigt) sehr gut aus. Ausgehend von diesem Bindemodus ist weder eine Isomerisierung des Diazocins nach „unten“ (Abb. 3.29b) noch nach „oben“ (Abb. 3.29c) möglich, da dies zu einer Kollision mit dem Protein führen würde. Anders als die stilbenähnlichen Axitinibderivate (Kapitel 3.1) würde der Diazocin-Baustein hier nicht nur mit Aminosäureseitenketten, sondern mit dem Rückgrat des Proteins kollidieren.

Für das in *para*-Position zur Azobindung verknüpfte Derivat **E-74** wird ebenfalls eine hohe Bindeaffinität vorausgesagt (Docking Score -14.0). Zwar liegt der Diazocin-Baustein im Vergleich zum *meta*-verknüpften Derivat **E-73** um 180 °C verdreht in der ATP-Bindetasche vor, für das entsprechende *Z*-Isomer **Z-74** wird aber auch hier kein Bindemodus gefunden, bei dem die charakteristischen Wasserstoffbrückenbindungen erhalten bleiben.

Für die kohlenstoffverbrückten Diazocine **75** und **76** lassen sich tendenziell die gleichen Rückschlüsse wie für die schwefelverbrückten Verbindungen **73** und **74** ziehen. Auch hier werden jeweils für die *E*-Isomere Bindemodi mit hohen Docking Scores von -14.3 erhalten, während eine Bindung der *Z*-Isomere nicht möglich ist (Tab. 3.7 und Abb. 3.30).

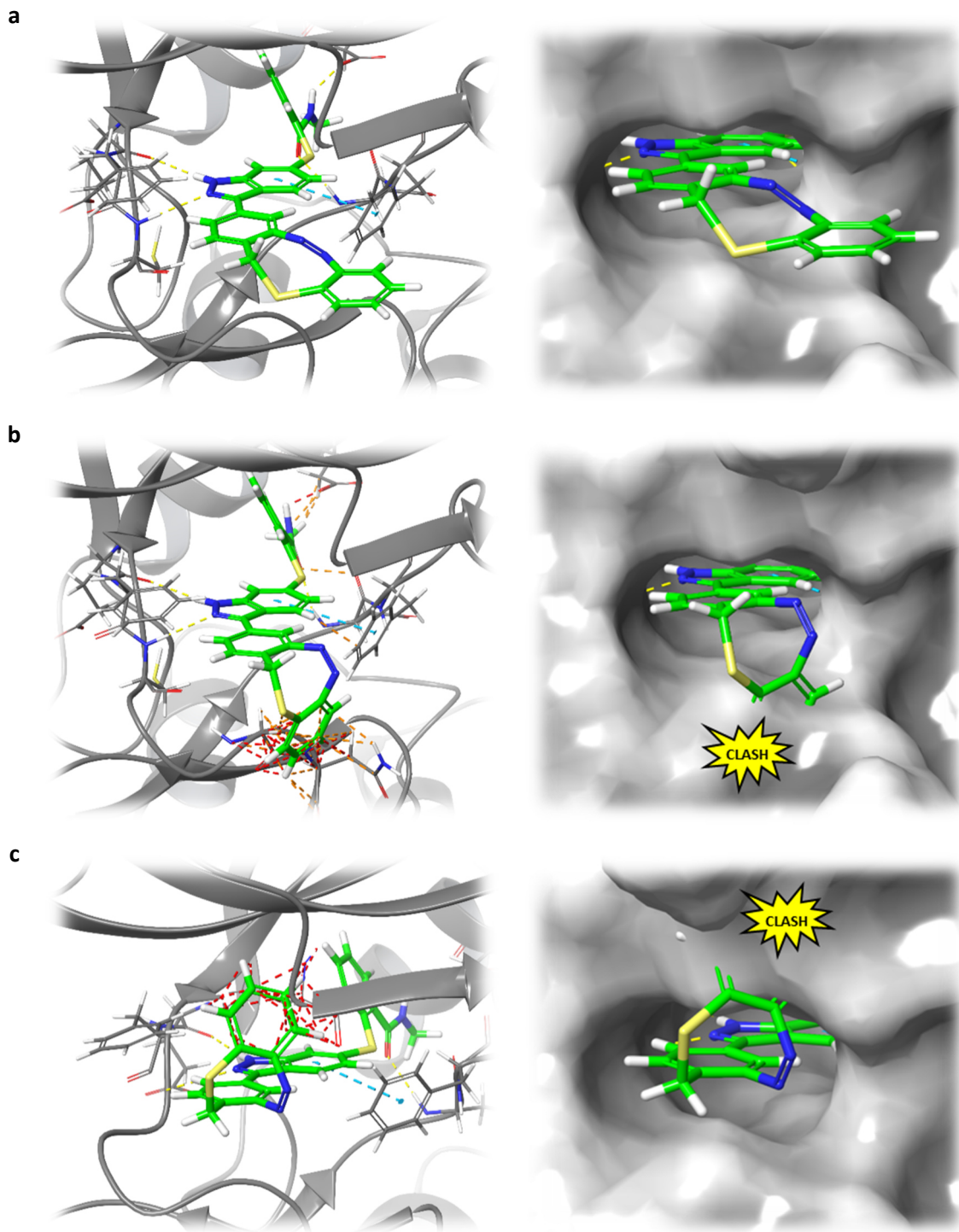


Abb. 3.29 a) Berechneter Bindemodus des Diazocin-Axitinibderivates *E-73* in der Bindetasche von VEGFR2 (PDB: 4AG8).^[129] In der *E*-Konfiguration (*chair*) wird ein Bindemodus gefunden, bei dem die Schlüsselinteraktionen des Pharmakophors aufrechterhalten bleiben. Docking Score: -14.1. **b)** Illustrative Überlagerung von *Z-73* (Enantiomer 1) mit der Kristallstruktur von VEGFR2. Unter Beibehaltung der Wasserstoffbrückenbindungen des Pharmakophors kommt es zu einer Kollision des Diazocins mit dem Proteinrückgrat (rot-gestrichelte Linien). **c)** Illustrative Überlagerung von *Z-73* (Enantiomer 2) mit der Kristallstruktur von VEGFR2. Jeweils *links*: Kartoon-Darstellung des Proteins, *rechts*: Darstellung der molekularen Proteinoberfläche (grau). Gelb-gestrichelte Linien: Wasserstoffbrückenbindungen; hellblau-gestrichelte Linien: π - π -Wechselwirkungen.

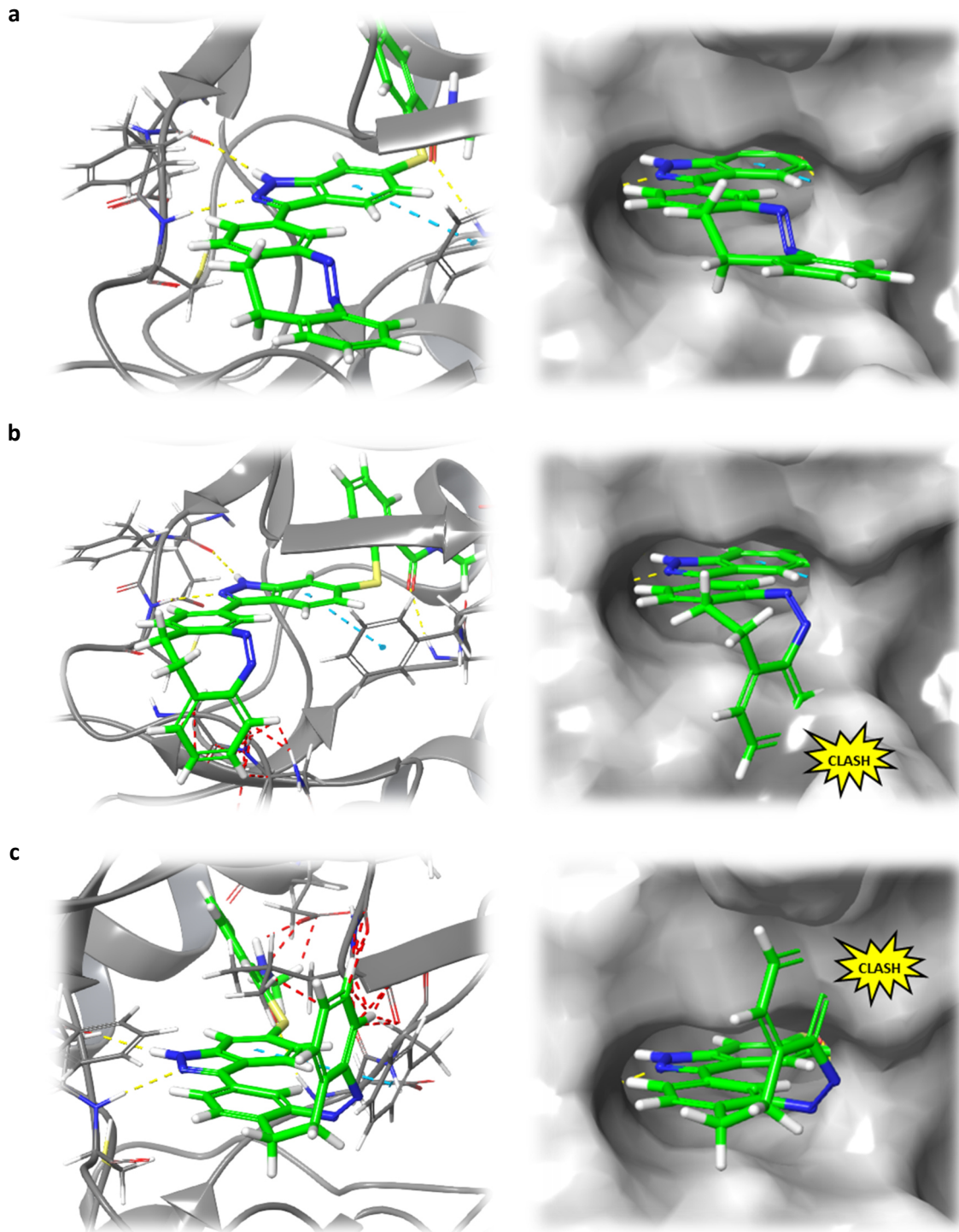


Abb. 3.30 a) Berechneter Bindemodus des Diazocin-Axitinibderivates *E*-**75** in der Bindetasche von VEGFR2 (PDB: 4AG8).^[129] In der *E*-Konfiguration (*chair*) wird ein Bindemodus gefunden, bei dem die Schlüsselinteraktionen des Pharmakophors aufrechterhalten bleiben. Docking Score: -14.3. **b)** Illustrative Überlagerung von *Z*-**75** (Enantiomer 1) mit der Kristallstruktur von VEGFR2. Unter Beibehaltung der Wasserstoffbrückenbindungen des Pharmakophors kommt es zu einer Kollision des Diazocins mit dem Proteinerückgrat (rot-gestrichelte Linien). **c)** Illustrative Überlagerung von *Z*-**75** (Enantiomer 2) mit der Kristallstruktur von VEGFR2. Jeweils *links*: Cartoon-Darstellung des Proteins, *rechts*: Darstellung der molekularen Proteinoberfläche (grau). Gelb-gestrichelte Linien: Wasserstoffbrückenbindungen; hellblau-gestrichelte Linien: π - π -Wechselwirkungen.

Bei genauerem Vergleich des schwefelverbrückten Diazocins **Z-73** (Abb. 3.29b/c) und des kohlenstoffverbrückten Diazocins **Z-75** (Abb. 3.30b/c) fällt jedoch auf, dass bei letztgenanntem die sterischen Kollisionen bei Überlagerung mit dem Protein geringer ausfallen. Dies ist auf die etwas unterschiedlichen Molekülgeometrien der beiden Diazocinsysteme zurückzuführen. Während die Ringebenen des Kohlenstoffdiazocins in *Z*-Konfiguration einen Winkel von 85.8° aufspannen, ergibt sich beim Schwefeldiazocin ein Winkel von lediglich 76.1° (Abb. 3.31). Röntgenkristallstrukturanalysen deuten daraufhin, dass der Winkel zwischen den Phenylringen des Schwefeldiazocins mit etwa 72° sogar noch etwas kleiner ist (vgl. Kapitel 9.3.2).

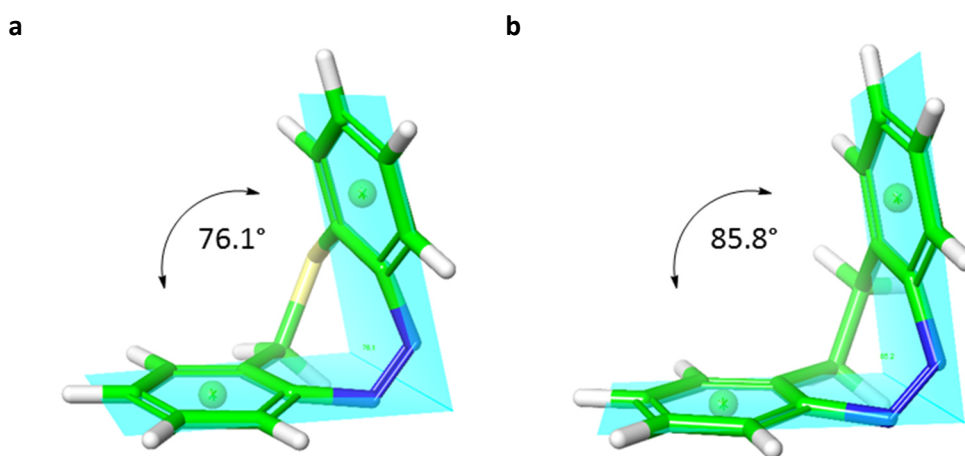


Abb. 3.31 a) B3LYP-631G*-optimierte Struktur des schwefelverbrückten Diazocins **11**. Die beiden Ebenen, die durch die Phenylringe aufgespannt werden, stehen in einem Winkel von 76.1° zueinander. b) B3LYP-631G*-optimierte Struktur des kohlenstoffverbrückten Diazocins **10**. Die beiden Ringebenen bilden einen Winkel von 85.8° zueinander.

Um eine mögliche Anpassung des Proteins an die Liganden in *Z*-Konfiguration zu simulieren, wurde für die Diazocine **73-76** zusätzlich zum standardmäßigen *Glide*-Docking mit starrer Proteinstruktur auch ein *Induced-Fit*-Docking durchgeführt. Dabei wurden alle Aminosäuren in einem Radius von 5 \AA um die Liganden als flexibel behandelt. Interessanterweise konnten hierbei für die kohlenstoffverbrückten Diazocine **75** und **76** nach geringer Adaption der *hinge region* auch in *Z*-Konfiguration plausible Bindemodi gefunden werden, während für die entsprechenden Schwefeldiazocine **Z-73** und **Z-74** auch im *Induced-Fit*-Modus keine Bindung vorausgesagt wurde (Tab. 3.7). Damit bestätigen sich die Erkenntnisse, dass die Kohlenstoffdiazocine in *Z*-Konfiguration nur zu vergleichsweise kleinen sterischen Konflikten mit dem Protein führen und eine Bindung durch geringe Anpassung des Proteins möglich ist (Abb. 3.32).

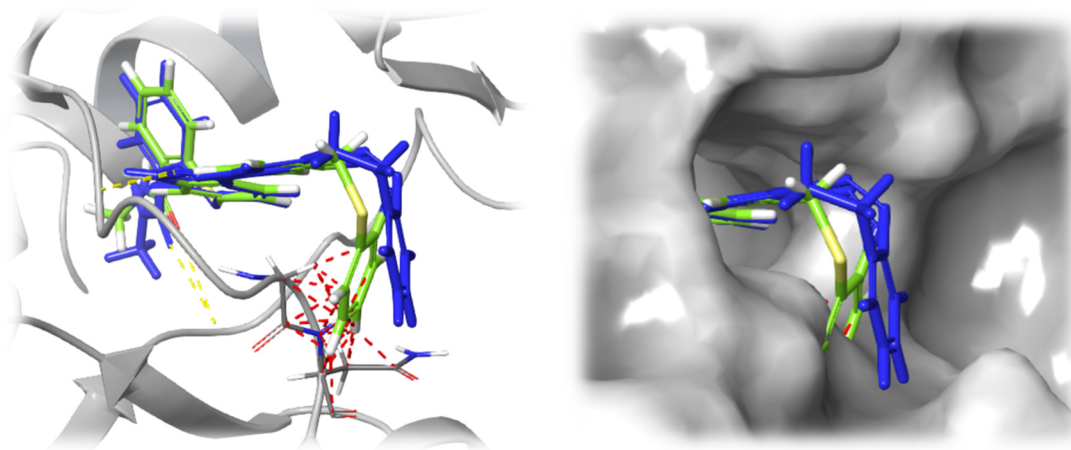


Abb. 3.32 Mittels *Induced-Fit-Docking* berechneter Bindemodus des kohlenstoffverbrückten Diazocins **Z-75** (blau) in der Bindetasche von VEGFR2 (PDB: 4AG8).^[129] Durch geringe Adaption der *hinge region* ist eine Bindung des Liganden auch in *Z*-Konfiguration möglich. Eine Überlagerung mit dem entsprechenden Schwefeldiazocin **Z-73** (grün) verdeutlicht, dass dieses auch an das angepasste Protein nicht binden kann. *Links*: Kartoon-Darstellung des Proteins, *rechts*: Darstellung der molekularen Proteinoberfläche (grau). Gelb-gestrichelte Linien: Wasserstoffbrückenbindungen; rot-gestrichelte Linien: Sterische Kollisionen.

Zum Vergleich mit den Diazocinen wurden darüber hinaus auch die entsprechenden azobenzolfunktionalisierten Derivate **77** und **78** einem *Glide-Docking* unterzogen. Hier zeigt sich, dass sowohl in *E*- als auch in *Z*-Konfiguration ein Bindemodus gefunden wird (Abb. 3.33). Die daraus abgeleiteten Docking Scores weisen nahezu keinen Unterschied auf und liegen im gleichen Bereich wie die der entsprechenden Diazocine (Tab. 3.7). Es ist daher vermutlich kein nennenswerter Aktivitätsunterschied am Enzym zu erwarten. An dieser Stelle verdeutlicht sich ein weiterer Vorteil der Diazocine gegenüber unverbrückten Azobenzolen an. Durch die fehlende Verbrückung sind klassische Azobenzole weniger starr (Rotation um die C-N-Einfachbindung), sodass sich bei *E/Z*-Isomerisierung eine geringere Geometrieänderung des Moleküls ergibt. Weiterhin erfolgt bei unverbrückten Azobenzolen das „Umklappen“ des Phenylrings eher in der Ringebene, während bei Diazocinen der fixierte Phenylrest senkrecht zur Ringebene nach oben oder unten „klappt“.

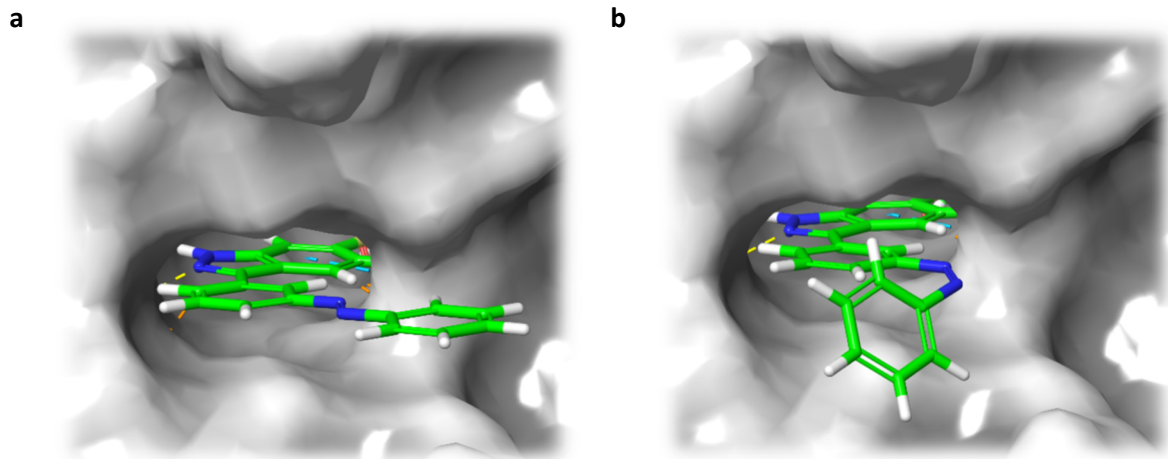


Abb. 3.33 Berechneter Bindemodus des azofunktionalisierten Axitinibderivates **77** in der ATP-Bindetasche von VEGFR2 (PDB: 4AG8).^[129] Darstellung der molekularen Proteinoberfläche (grau). Sowohl in *E*- als auch in *Z*-Konfiguration wird ein plausibler Bindemodus gefunden, sodass eine Photoisomerisierung vermutlich keinen maßgeblichen Einfluss auf die Bindeaffinität hat. **a)** Azobenzolrest in *E*-Konfiguration, berechneter Docking Score: -13.9. **b)** Azobenzolrest in *Z*-Konfiguration, berechneter Docking Score: -14.0.

Auf der Grundlage der erhaltenen Molecular Modeling Ergebnisse wurden die diazocin-funktionalisierten Axitinibderivate **73** und **74** als vielversprechendste Kandidaten identifiziert. Für die kohlenstoffverbrückten Diazocinderivate **75** und **76** wurden ebenfalls vielversprechende Ergebnisse im Modeling erhalten. Allerdings konnte hier mittels *Induced-Fit*-Docking auch für die *Z*-Isomere ein Bindemodus gefunden werden. Die diazocin-funktionalisierten Axitinibderivate **66-72** erwiesen sich als ungeeignet, da der Photoschalter bei diesen Verbindungen zu weit aus der Bindetasche herausragt und sich daher die Photoschaltung nicht maßgeblich auf die Bindeaffinität auswirken würde.

3.2.2 Synthesen

Zur Synthese der diazocinfunktionalisierten Axitinibderivate **73-75** wurde versucht, ausgehend vom Indazol-Baustein **52a** einen Syntheseweg unter Verwendung einer geeigneten Kreuzkupplungsreaktion zu etablieren. Als Kupplungspartner sollten *mono*-halogenierte Diazocine dienen und diese entweder unmittelbar als Elektrophile oder nach entsprechender Metallierung als Nukleophile in der Kreuzkupplung eingesetzt werden.

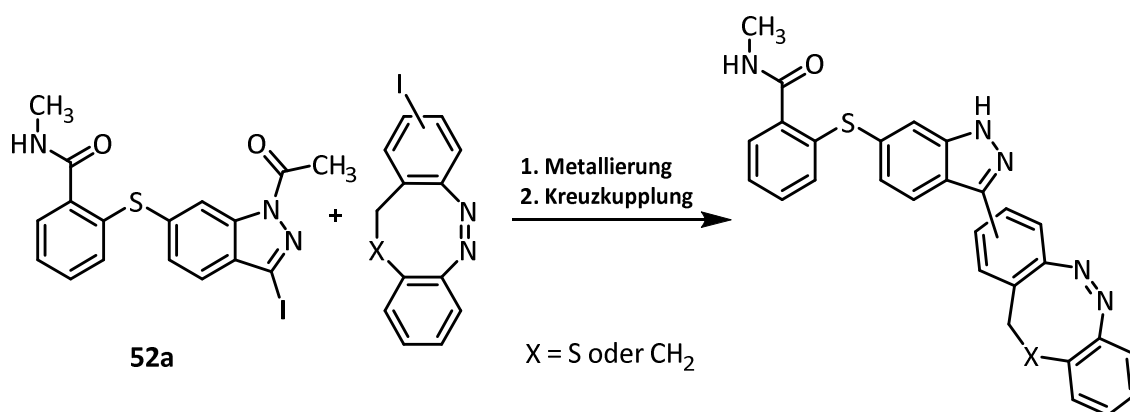


Abb. 3.34 Strategie zur Synthese diazocinfunktionalisierter Axitinibderivate. Ausgehend von den jeweils halogenierten Kupplungspartnern, sind theoretisch verschiedene Metallierungen bzw. Kreuzkupplungen möglich.

Übersicht azokompatibler Kreuzkupplungen

Aufgrund der Reduktionsanfälligkeit der Azobindung von Azobenzolen und Diazocinen ist die Auswahl an geeigneten Kreuzkupplungsmethoden bzw. Metallierungen beschränkt. Am weitesten verbreitet ist die Verwendung halogenierter und pseudohalogenierter Azobenzole als Elektrophile in Kreuzkupplungen.^[161] So sind beispielsweise zahlreiche Sonogashira-Kupplungen bromierter und iodierter Azobenzole beschrieben.^[162–167] Auch die Kupplung von Boronsäuren und Boronsäureestern mit halogenierten Azobenzolen im Sinne einer Suzuki-Miyaura-Kupplung ist literaturbekannt.^[167–172] Kürzlich wurden außerdem einige Stille-Kupplungen mit bromierten Azobenzolderivaten beschrieben.^[173,174] Eine erfolgreiche Kreuzkupplung halogenierter Azobenzole mit Lithium-, Zink- oder Magnesiumorganen ist hingegen kaum beschrieben, da diese Reagenzien leicht zu einer Reduktion der Azobindung führen können. In der Literatur findet sich lediglich eine palladiumkatalysierte Kreuzkupplung eines bromierten Azobenzolderivates mit *n*-Butylmagnesiumchlorid bei -80 °C .^[175]

Analog ist auch eine Metallierung von Azobenzolen beispielsweise durch Halogen-Metall-Austausch oder *ortho*-Metallierung nicht unproblematisch und oftmals mit geringen Ausbeuten verbunden oder führt ebenfalls zur Hydrazinbildung. Zwar werden in der Literatur einige erfolgreiche Metallierungen

bei tiefen Temperaturen oder durch Verwendung eines Durchflussreaktors beschrieben, diese Intermediate werden jedoch unmittelbar mit Elektrophilen gequench und nicht in Kreuzkupplungen eingesetzt.^[176–182]

Als vielversprechende Alternative zu Zink- oder Magnesiumorganylen wird in der Literatur von Strueben *et al.*^[161] eine Stannylierung verschieden substituierter Iod-Azobenzole beschrieben. Diese stannylierten Azobenzole können sowohl in Stille-Kupplungen mit bromierten Arylderivaten umgesetzt als auch einem Zinn-Lithium-Austausch bei tiefen Temperaturen unterzogen werden.^[161,183] Ein Nachteil von Stille-Kupplungen ist jedoch die hohe Toxizität von Zinnorganylen.^[184,185] Eine weitere Möglichkeit stellt die Borylierung von Azobenzolen dar. Beschrieben sind sowohl Reaktionswege über lithiierte Intermediate^[186,187] als auch Miyaura-Borylierungen von halogenierten Azobenzolen.^[63,172,188–192] Ein weiterer Zugang zu borylierten Azobenzolen besteht in der Synthese dieser Azobenzolderivate ausgehend von borylierten Anilinen via Azokupplung oder Baeyer-Mills-Reaktion.^[193–195]

Die Metallierung oder Kreuzkupplung von Diazocinen war bis vor kurzem nicht literaturbekannt. Beschrieben war lange Zeit lediglich eine Sonogashira-Kupplung einer Diazocinvorstufe mit anschließendem Ringschluss zum Diazocin.^[196,197] Kürzlich wurde darüber hinaus eine Stille-Kupplung von einem bromierten Diazocin mit einem stannylierten Olefin publiziert.^[69]

Vor dem Hintergrund des geschilderten Forschungsstandes bzgl. Kreuzkupplungen von Azobenzolderivaten, wurden in diesem Projekt eine Suzuki-(Miyaura)-Kupplung und eine Stille-Kupplung als vielversprechendste Methoden für die Realisierung einer Kreuzkupplung gemäß Abb. 3.34 angesehen. Im Hinblick auf den Indazol-Baustein **52a** ist für diesen sowohl eine Verwendung als Elektrophil als auch nach vorheriger Borylierung bzw. Stannylierung der Einsatz als Nukleophil denkbar. Da sich jedoch die Verwendung des halogenierten Indazol-Bausteins **52a** sowie weiterer verwandter Indazol- und Indolderivate als Elektrophil in zahlreichen Kreuzkupplungen bewährt hat, wurde in erster Linie eine Borylierung bzw. Stannylierung der entsprechenden Azobenzole bzw. Diazocine verfolgt.^[135,136,139,140,198–200]

Synthese und Metallierung mono-substituierter Diazocine

Für die geplante Kreuzkupplung wurde zunächst ein bromsubstituiertes Diazocin synthetisiert. Als Diazocin wurde dazu das schwefelverbrückte System gewählt, da in diesem Fall eine mono-Substitution synthetisch leichter realisiert werden kann. Bei der Synthese wurde die von Hammerich *et al.* beschriebene Syntheseroute für das unsubstituierte Schwefeldiazocin adaptiert.^[53] Dabei wurde zunächst das *ortho*-Nitrobenzylderivat **80** nach der Methode von Conrad *et al.* durch radikalische Bromierung aus dem Toluolderivat **79** generiert (Abb. 3.35).^[201] Anschließend wurde dieses mit *ortho*-Nitrobenzolphiolat in einer nukleophilen Substitution umgesetzt. Der Ringschluss zum Diazocin **85** bzw. zu den entsprechenden Azoxyverbindungen **83/84** erfolgte mit Hilfe von Blei-Pulver im Ultraschallbad. Als Reaktionslösung wurde ein Methanol/Wasser/Triethylamin-Gemisch verwendet und der pH-Wert mit Ameisensäure auf ca. pH = 9.7 eingestellt.^[53,50] Das bromierte Diazocin **85** konnte mit 14 % in einer ähnlichen Ausbeute wie das unsubstituierte Schwefeldiazocin (12 %) isoliert werden.^[53] Die isolierten Azoxyverbindungen **83** und **84** konnten zudem durch Umsetzung mit Blei in einer Kugelmühle bei 40 Hz zusätzlich zu 40 % zum Diazocin reduziert werden. Die Syntheseroute gemäß Abb. 3.35 wurde in etwa zeitgleich auch von Schehr in vergleichbaren Ausbeuten durchgeführt.^[202] Zudem konnte Schehr die Synthese auf ein chlor- sowie iodsubstituiertes Diazocin übertragen. In beiden Fällen konnten jedoch beim abschließenden Ringschluss mit 5 % bzw. <2 % nur sehr schlechte Ausbeuten erzielt werden.^[202,203]

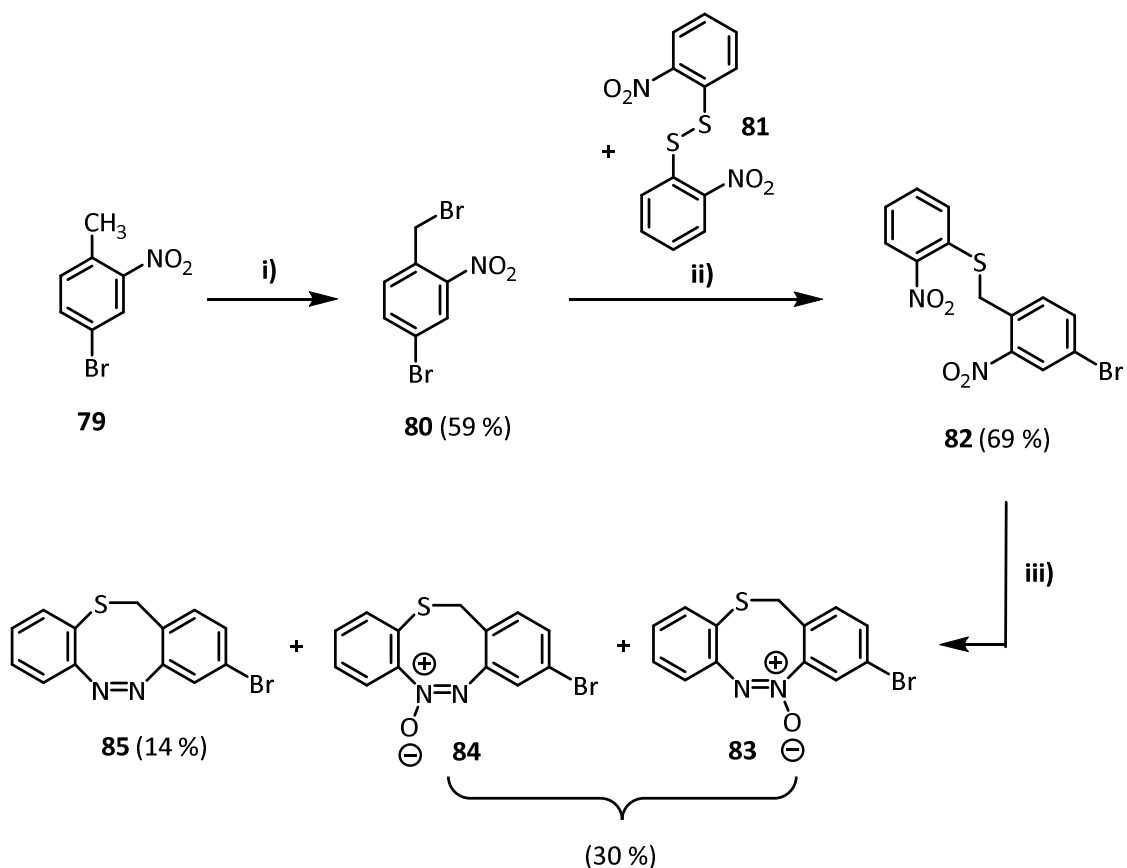


Abb. 3.35 Syntheseroute zur Darstellung des bromsubstituierten Schwefeldiazocins **85**. **i)** NBS, DBPO, CCl_4 , 8 h Rückfluss. **ii)** 1. 1,2-Bis(2-nitrophenyl)disulfan (**81**), NaBH_4 , THF, 3 h Raumtemp.; 2. 4-Brom-1-(brommethyl)-2-nitrobenzen (**80**) 1.5 h Raumtemp. **iii)** Blei, TEA, HCOOH , MeOH, H_2O , pH = 9.7, 5 h Ultraschallbad.

Nach erfolgreicher Synthese des bromierten Diazocins **85** wurde zunächst versucht, dieses zu borylieren. Dazu wurde auf die Methode von Dommaschk *et. al* zur Miyaura-Borylierung von Phenylazopyridin **86** zurückgegriffen (Abb. 3.36).^[191] Bei dieser Variante erfolgt die Borylierung durch Kupplung des Arylbromids mit Bis(pinacolato)diboron unter Verwendung von $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ als Katalysator sowie Kaliumacetat als Base. Nach analoger Umsetzung des Bromdiazocins **85** bei 100 °C in Dioxan konnte jedoch lediglich Umsetzung/Zersetzung des Eduktes beobachtet aber kein Produkt isoliert werden. Schehr testete analog weiterhin verschiedene Reaktionsbedingungen zur Borylierung der Dinitrovorstufe **82**, konnte jedoch ebenfalls nicht die Bildung des entsprechenden Boronsäureesters nachweisen.^[202]

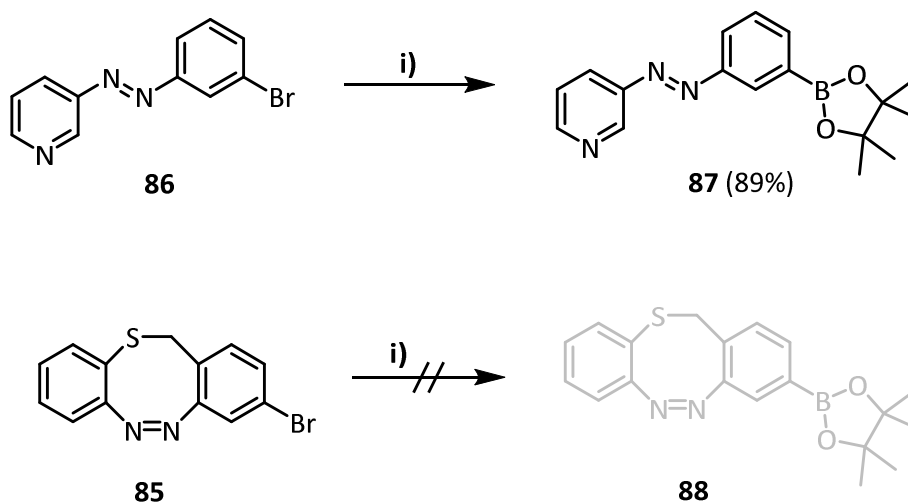


Abb. 3.36 Miyaura-Borylierung von 3-[(3-Bromphenyl)diazenyl]pyridin (**86**) nach Dommaschk *et al.*^[191] Die Reaktionsbedingungen konnten nicht erfolgreich auf das entsprechende bromsubstituierte Schwefeldiazocin **85** übertragen werden. i) B_2pin_2 , $Pd(PPh_3)_2Cl_2$, CH_3COOK , Dioxan, 24 h 100 °C.

Da eine Borylierung des bromierten Schwefeldiazocins **85** nicht realisiert werden konnte, wurde alternativ versucht, eine Stannylierung nach der Methode von Strueben *et al.* durchzuführen.^[161] Aufgrund der geringen Diazocinausbeute und der damit verbundenen limitierten Verfügbarkeit des bromierten Diazocins **85** wurden zunächst Testreaktionen mit 3-Bromazobenzol (**89**) durchgeführt. Dazu wurde dieses mit Hexamethyldistannan (Sn_2Me_6) und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium ($Pd(PPh_3)_4$) in DMF bei 80 °C umgesetzt (Abb. 3.37). Nach 16 h wurde aufgrund unvollständigen Reaktionsumsatzes die Temperatur auf 110 °C erhöht und weitere 16 h erhitzt. Es konnte jedoch nicht das gewünschte stannylierte Produkt **90** sondern lediglich das entsprechende Biphenylderivat **91** sowie 3-Methylazobenzol (**92**) isoliert werden.

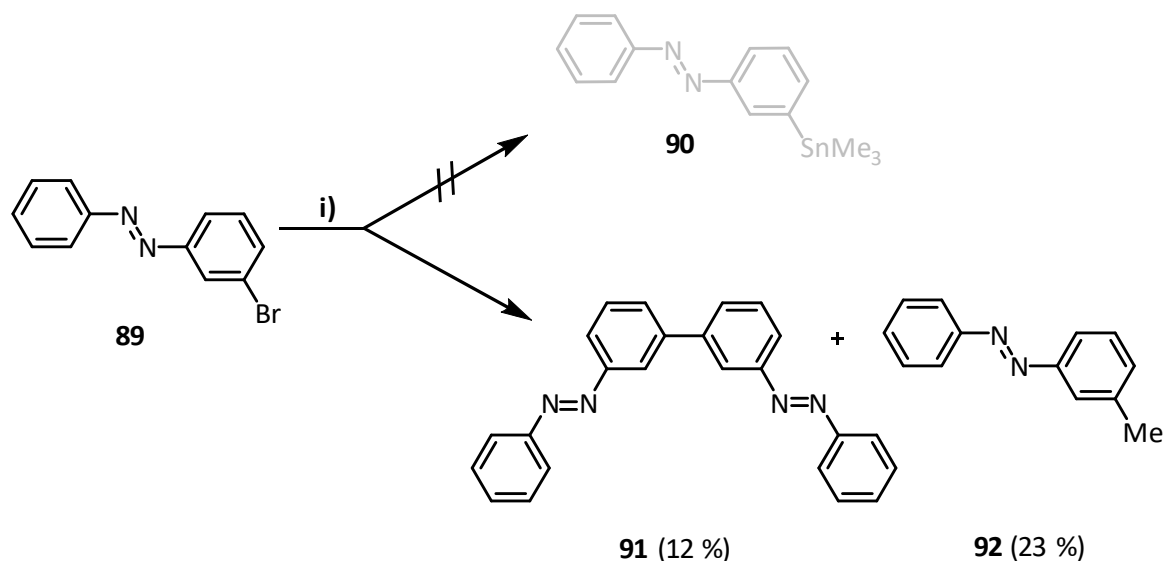


Abb. 3.37 Versuch der Stannylierung von 3-Bromazobenzol (**89**). Anstelle des stannierten Azobenzols **90** wurde das entsprechende Biphenylderivat **91** erhalten. **i)** Sn_2Me_6 , $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, DMF, 32 h 80-110 °C.

Die Reaktion wurde anschließend in Toluol bei 150 °C in der Mikrowelle erneut durchgeführt, wobei ebenfalls lediglich die beschriebenen Reaktionsprodukte erhalten wurden. Die Bildung des entsprechenden Biphenyls **91** konnte zusätzlich durch eine Röntgenkristallstrukturanalyse bestätigt werden (Abb. 3.38). Offenbar wurde das temporär stannierte Produkt **90** *in situ* unmittelbar mit dem noch nicht umgesetzten Edukt im Sinne einer Stille-Reaktion gekuppelt. Dieser Reaktionsverlauf lässt sich wahrscheinlich auf den Bromsubstituenten zurückführen, da die Originalvorschrift nach Strueben *et al.* sich lediglich auf iodierte Azobenzole bezieht.^[161] Zudem ist literaturbekannt, dass Arylbromide schneller und in besseren Ausbeuten Stille-Kupplungen eingehen als Aryliodide, sodass es im vorliegenden Fall zur Biphenylbildung kommt, während beim Einsatz von Aryliodiden überwiegend Stannylierung beobachtet werden kann.^[204,205]

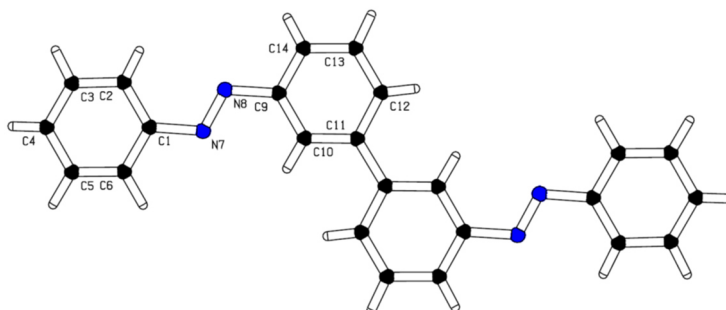


Abb. 3.38 Röntgenkristallstruktur von 3,3'-Bis[(*E*)-phenyldiazenyl]-1,1'-biphenyl (**91**).

Da die verwendete Stannylierungsmethode in der Originalvorschrift für iodierter, jedoch nicht für bromierter Azobenzole beschrieben ist, wurde die Reaktion im Folgenden mit 3-Iod- sowie 4-Iodazobenzol wiederholt. Die iodierten Azobenzole wurden dafür zunächst aus den entsprechenden Anilinen via Baeyer-Mills-Reaktion mit Nitrosobenzol dargestellt und im Anschluss erneut mit Hexamethyldistannan und $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ in Toluol bei $150\text{ }^\circ\text{C}$ in der Mikrowelle umgesetzt.^[161,183,206] In beiden Fällen wurde das stannylierte Azobenzol als Hauptprodukt gebildet und nach Reinigung an Kieselgel in guten Ausbeuten isoliert (Abb. 3.39).

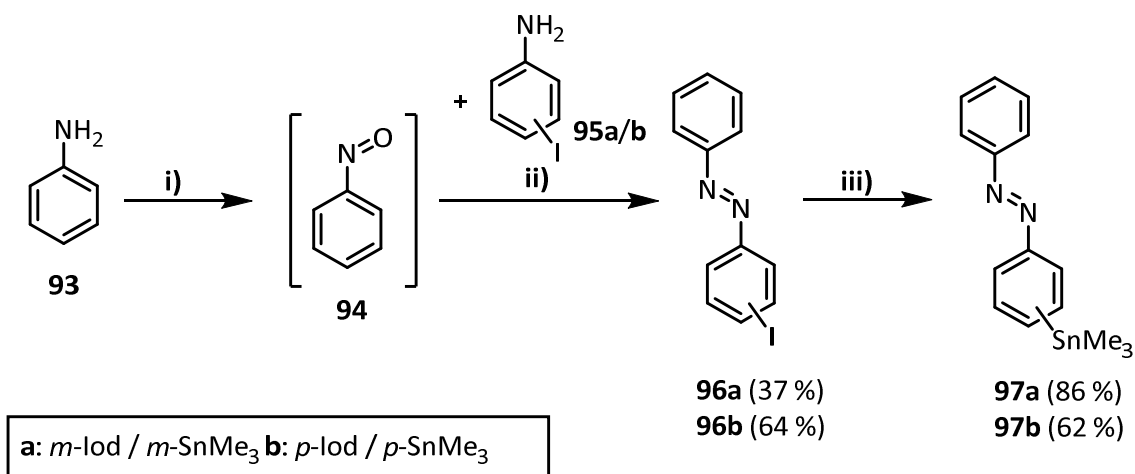


Abb. 3.39 Synthese von 3-Iod- sowie 4-Iodazobenzol und anschließende Stannylierung mit Hexamethyldistannan. **i)** wässr. KHSO_5 -Lsg (Oxon), DCM, 6 h Raumtemp. **ii)** Eisessig, 24 h Raumtemp. **iii)** Sn_2Me_6 , $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, Toluol, 3 h $100\text{ }^\circ\text{C}$ (Mikrowelle).

Im Hinblick auf eine angestrebte Stannylierung der vermeintlich etwas weniger stabilen Schwefeldiazocine wurde anschließend versucht, die drastische Reaktionstemperatur von $150\text{ }^\circ\text{C}$ zu reduzieren und die Reaktionsdauer entsprechend anzupassen. Dazu wurde die Stannylierung der Azobenzole **96a** und **96b** bei $100\text{ }^\circ\text{C}$ wiederholt und nach jeweils einer Stunde der Stoffumsatz kontrolliert. Nach insgesamt 3 h wurde nahezu vollständiger Stoffumsatz beobachtet und zur Sicherheit eine weitere Stunde erhitzt. Die leicht angepassten Stannylierungsbedingungen wurden im weiteren Verlauf für die iodsubstituierten Schwefeldiazocine **104a/b** verwendet.

Wie bereits erwähnt, gelingt die Darstellung iodsubstituierter Schwefeldiazocine nach der Bleimethode (Abb. 3.35) lediglich in sehr schlechten Ausbeuten und ist daher nicht praktikabel.^[202] Aus diesem Grund wurde auf eine Syntheseroute von Schehr genutzt, die den Ringschluss zum Diazocin mittels intramolekularer Baeyer-Mills-Reaktion ermöglicht.^[203] Im Gegensatz zur Bleimethode erfolgt hier der Ringschluss zum Diazocin nicht ausgehend von einer Dinitro-Vorstufe sondern ausgehend von der Vorstufe **102** mit jeweils einer Amino- und einer Nitrofunktion (Abb. 3.40). Schlüsselschritt bei

dieser Synthesevariante ist die schrittweise Reduktion der Nitrofunktion zum Hydroxylamin und anschließende partielle Oxidation zur Nitrosfunktion (Nitrosobenzolderivate **103a/b**) mit Eisen(III)-chlorid. Zwar verläuft die Diazocinbildung ebenfalls nur in mäßigen Ausbeuten, im Vergleich zur bleibasierten Methode kann jedoch ein Großteil des nicht umgesetzten Eduktes **102** zurückgewonnen und erneut eingesetzt werden. Ferner wurde eine bessere Reproduzierbarkeit der Ausbeuten beobachtet.^[203]

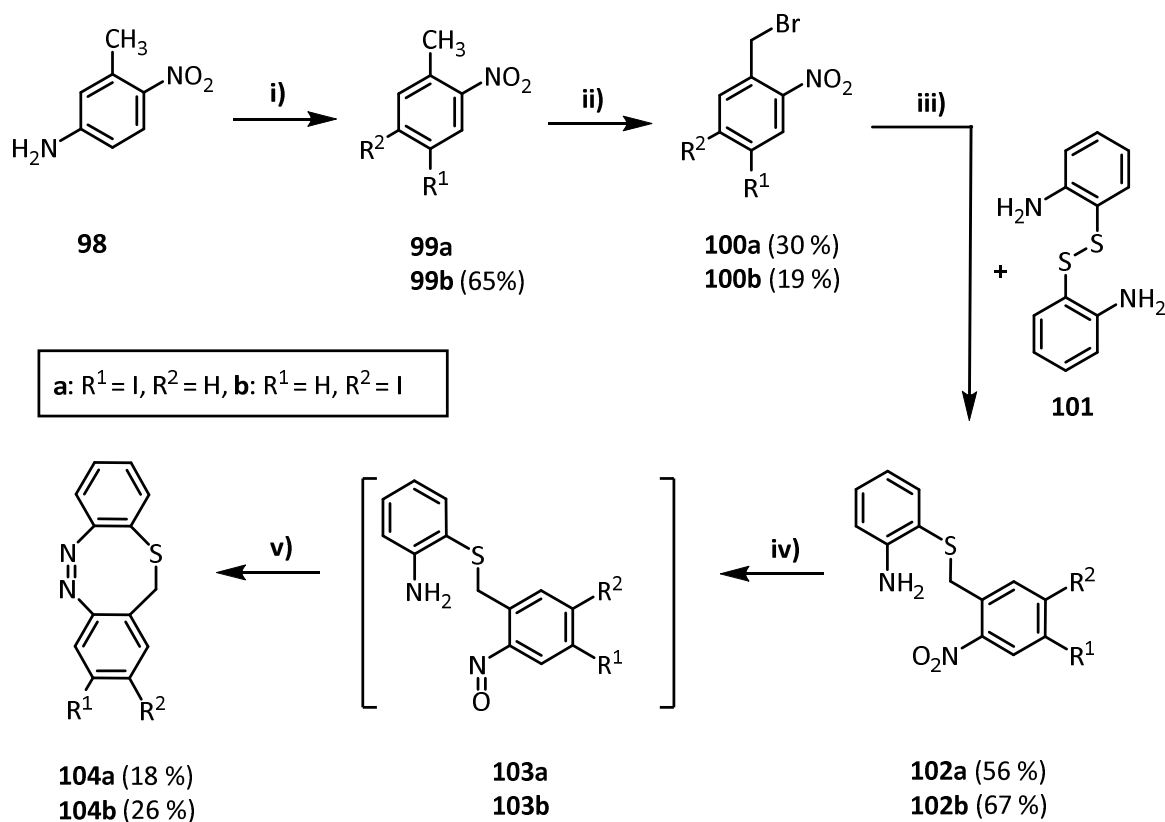
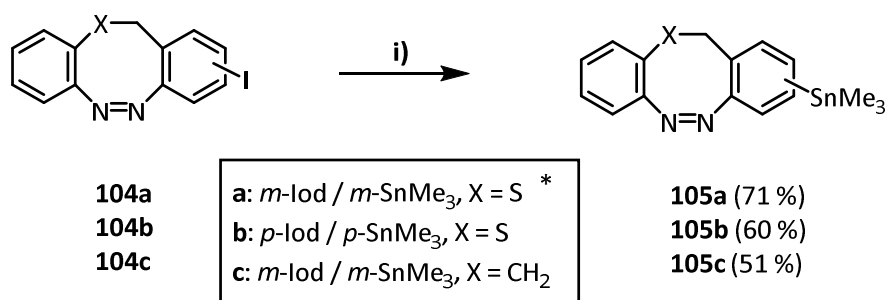


Abb. 3.40 Syntheseroute zur Darstellung der iodsubstituierten Schwefeldiazocine **104a/b** via intramolekularer Baeyer-Mills-Reaktion. **i)** 1. NaNO₂, H₂SO₄, Wasser; 30 min 0 °C; 2. KI, 16 h Raumtemp. **ii)** NBS, DBPO, CCl₄, 16-63 h Rückfluss. **iii)** 1. 2,2'-Disulfandiyldianilin (**101**), NaBH₄, THF, 1.5 h Rückfluss; 2. **100a/b** 3 h 40 °C. **iv)** 1. Zink, NH₄Cl, Wasser/Ethanol, 30 min 60 °C; 2. FeCl₃, Wasser/Ethanol, 30 min 0 °C – Raumtemp. **v)** Eisessig, 16 h Raumtemp.

Nach erfolgreicher Synthese der iodierten Schwefeldiazocine **104a/b** wurde eine Stannylierung in Analogie zu den entsprechenden Azobenzolen **96a/b** durchgeführt. Dazu wurden die Diazocine zusammen mit Hexamethyldistannan und Pd(PPh₃)₄ für 4 h bei 100 °C in der Mikrowelle umgesetzt, wobei mit 60-71 % leicht niedrigere Ausbeuten als bei den Azobenzolen erhalten wurden (Abb. 3.41). Die stannylierten Diazocine sind, wie die entsprechenden Azobenzole auch, vergleichsweise stabil bei Raumtemp. und gegenüber Luftfeuchtigkeit und konnten zudem an Kieselgel gereinigt werden.



*: *meta/para*-Position zur Azofunktion

Abb. 3.41 Stannylierung der iodsubstituierten Diazocine **104a-c**. i) Sn₂Me₆, Pd(PPh₃)₄, Toluol, 4 h 100 °C (Mikrowelle).

Da schwefelverbrückte Diazocine tendenziell eine etwas schlechtere *Z* → *E*-Schalteffizienz aufweisen als kohlenstoffverbrückten Diazocine^[53], wurde nach erfolgreicher Etablierung der Stannylierung zusätzlich ein stannyliertes Kohlenstoffdiazocin synthetisiert. Bei Kohlenstoffdiazocinen ergibt sich die Schwierigkeit, dass eine unsymmetrische Substitution je nach Aufbau der Ethylenbrücke erschwert ist. Zumeist erfolgt der Aufbau der Brücke durch radikalische CC-Verknüpfung, die entweder zu symmetrischen Diarylethanen oder, bei Einsatz verschiedener Toluolderivate, zu statistisch verteilten Produktgemischen führt.^[196,207] Zwar sind auch alternative Synthesemethoden zum Aufbau der Diazocinbrücke bekannt, z.B. via Sonogashira-Kupplung^[68], Heck-Kupplung^[207] oder Wittig-Olefinierung^[47,196], diese Varianten erfordern jedoch eine anschließende Hydrierung der CC-Mehrfachbindung unter Verwendung eines Palladium-Katalysators. Letzterer ist bei Anwesenheit eines Iodsubstituenten insofern problematisch, als dass es zu einer Insertion des Katalysators und zur Dehalogenierung kommen kann. Aus diesem Grund wurde eine radikalische Brückenbildung ausgehend von 1-Methyl-2-nitrobenzen (**106**) und 4-Iod-1-methyl-2-nitrobenzen (**99b**) als Synthesevariante gewählt (Abb. 3.42). Dabei erfolgt zunächst eine Deprotonierung der *o*-Nitrotoluolderivate in Benzylposition durch Kalium-*tert*-butanolat und anschließend durch Zugabe von Brom eine partielle Oxidation zu den entsprechenden Benzylradikalen. Durch Rekombination zweier Benzylradikale kommt es schließlich zur Bildung der Ethylenbrücke. Die Reaktionsbedingungen wurden dabei im Wesentlichen von Moormann *et al.* übernommen.^[51]

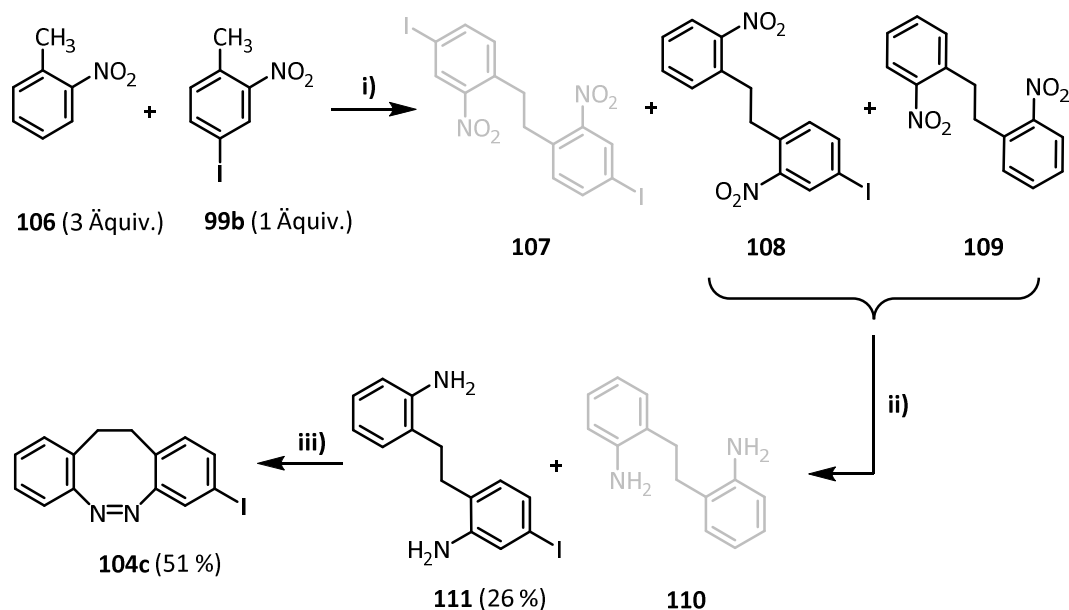


Abb. 3.42 Syntheseroute zur Darstellung des iodsubstituierten Diazocins **104c**. Aufgrund der radikalischen CC-Verknüpfung wird im ersten Reaktionsschritt zunächst ein statistisches Produktgemisch erhalten, welches säulenchromatographisch nicht getrennt werden kann. Erst nach dem zweiten Reaktionsschritt kann das mono-iodierte Produkt **111** isoliert und intramolekular zum entsprechenden Diazocin **104c** cyclisiert werden. **i)** 1. KOtBu, THF, 2 min 0 °C; 2. Br₂, 5 min 0 °C. **ii)** SnCl₂, EA, 4 h Rückfluss. **iii)** mCPBA, Eisessig, 6 h Raumtemp.

Um die Bildung des zweifach iodierten Produktes **108** etwas zurückzudrängen, wurde 1-Methyl-2-nitrobenzen (**106**) in dreifachem Überschuss eingesetzt. Das erhaltene Stoffgemisch aus unsubstituiertem, einfach iodiertem und zweifach iodiertem 1,2-Bis(2-nitrophenyl)ethan konnte säulenchromatographisch nicht getrennt werden und wurde als Stoffgemisch in der nächsten Stufe eingesetzt. Allerdings konnte der Großteil des zweifach iodierten Produktes **107** aufgrund der schlechteren Löslichkeit aus dem Produktgemisch entfernt werden.^[196] Im weiteren Verlauf sind theoretisch zwei Reaktionswege möglich. Zum einen ein direkter reduktiver Ringschluss der beiden Nitrogruppen zum Diazocin und zum anderen eine Reduktion der Nitrogruppen zum Amin mit anschließendem oxidativen Ringschluss.^[51]

Die reduktive Diazocinbildung mittels Bariumhydroxid und Zink nach der Methode von Moormann *et. al* verläuft mechanistisch über die entsprechenden Azoxyverbindungen als Zwischenprodukte, welche im weiteren Reaktionsverlauf zum Diazocin bzw. zum Hydrazinderivat reduziert werden. Das Hydrazinderivat kann anschließend selektiv zum Diazocin oxidiert werden. Diese Synthesevariante konnte jedoch für das Produktgemisch **107**, **108** und **109** nicht erfolgreich angewendet werden. Aus der komplexen Reaktionsmischung, bestehend aus verschiedenen Edukten, Zwischenprodukten und vermeintlichen Endprodukten, konnte weder die Bildung der entsprechenden Hydrazinderivate noch der Diazocine eindeutig nachvollzogen werden. Zudem ist auch eine mögliche

Insertion des Zinks am Iodsubstituenten nicht auszuschließen. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen gelang es auch Tellkamp mit verschiedenen Reduktionsmittel nicht, die zweifach iodierter Nitroverbindung **107** reaktiv zum Diazocin umsetzen.^[196]

Da mit den genannten Reaktionsbedingungen kein Erfolg erzielt werden konnte, wurde der alternative Syntheseweg über die Aminoverbindungen **110** und **111** gewählt und ein oxidativer Ringschluss durchgeführt. Die Reduktion der Nitrogruppen konnte erfolgreich mit Hilfe von Zinn(II)chlorid in Ethylacetat durchgeführt werden (Abb. 3.42). Eine Reduktion mit Zink in Essigsäure hingegen gelang nicht. Die erhaltenen Amine **110** und **111** konnten, im Gegensatz zu den entsprechenden Nitroverbindungen, säulenchromatographisch getrennt werden und das einfach iodierter Produkt **111** wurde schließlich über zwei Stufen in einer Gesamtausbeute von 26 % erhalten. Der Ringschluss zum Diazocin erfolgte durch langsame Zugabe von *m*CPBA zu einer Lösung des Amins **111** in Eisessig in einer vergleichsweise guten Ausbeute von 51 %.^[68,208]

Stille-Kupplung der stanniierten Azobenzole und Diazocine mit dem Indazol-Baustein **52a**

Zur Findung geeigneter Reaktionsbedingungen für die Kupplung der stanniierten Diazocine **105a-c** mit dem Indazol des Axitinibpharmakophors, wurden aufgrund der aufwendigen Synthesen und der schlechten Ausbeuten der Diazocine zunächst Testreaktionen mit dem stanniierten Azobenzol **97a** durchgeführt. Als erstes wurde versucht, die Kupplungsbedingungen der Originalvorschrift nach Strueben *et al.* zu übernehmen. In dieser Synthesevorschrift werden stanniierte Azobenzole mit Arylbromiden unter Verwendung von $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ als Katalysator sowie Kupfer(I)- und Lithiumchlorid als Additive bei 70 °C in DMF umgesetzt.

Aus diesem Grund wurde der Indazol-Baustein **50**, der bereits als Vorstufe für die Darstellung der stilbenähnlichen Axitinibderivate genutzt wurde (vgl. Kapitel 3.1), durch Umsetzung mit Kaliumhydroxid und NBS bromiert und anschließend Acetyl-geschützt (Abb. 3.43).

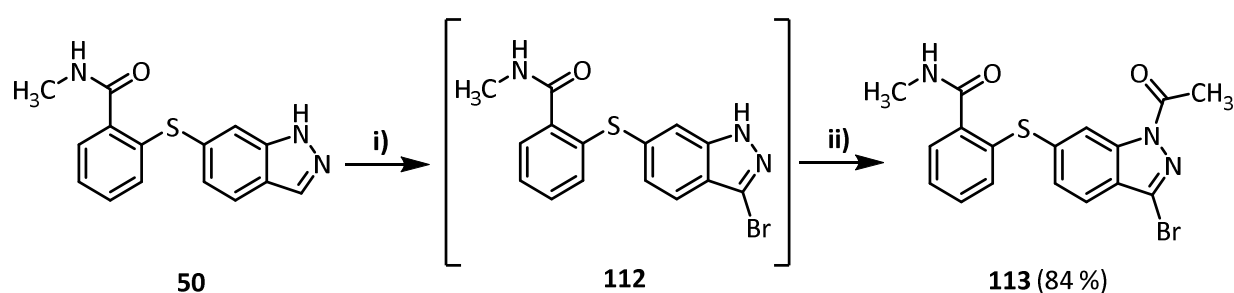
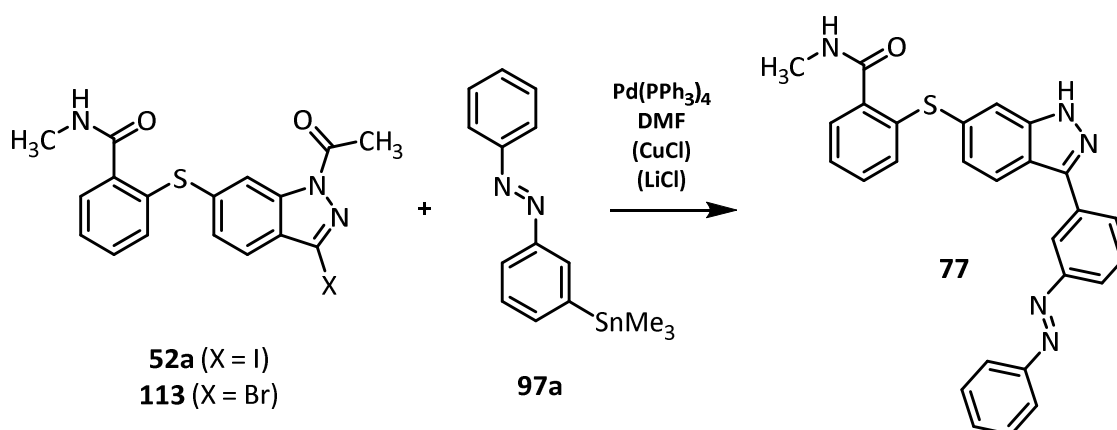


Abb. 3.43 Bromierung und Schützung des Indazol-Bausteins **50**. i) NBS, KOH, DMF, 16 h Raumtemp. ii) Ac_2O , K_2CO_3 , DMF, 13 h Raumtemp.

Bei der anschließenden Stille-Kupplung des bromierten Indazolderivates **113** mit dem stanniierten Azobenzol **97a** nach der Vorschrift von Strueben *et al.* konnte nach 18 h das entsprechende Kupplungsprodukt zunächst nicht in nennenswerter Ausbeute isoliert werden (Tab. 3.8).^[161] Gemäß einer LC-MS-Analyse des Reaktionsansatzes wurde hauptsächlich eine Abspaltung der Acetylenschutzgruppe sowie zum Teil Dehalogenierung des Indazols beobachtet. Zwei Wiederholungen des Experimentes ohne Zusatz von Lithiumchlorid sowie ohne Lithium- und Kupfer(I)chlorid führten zu einer ähnlichen Produktverteilung, bei jeweils unvollständigem Stoffumsatz der Edukte. Erst eine Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 120 °C führte zu einer vollständigen Eduktumsetzung, wobei als Hauptreaktion erneut lediglich die unbeabsichtigte Entschützung des Indazols identifiziert wurde. Das (entschützte) Kreuzkupplungsprodukt **77** konnte jeweils nur massenspektrometrisch nachgewiesen werden.

Da die Verwendung des bromierten Indazols **113** nicht zum gewünschten Erfolg führte, wurde der Bromsubstituent gegen Iod ausgetauscht und der Indazol-Baustein **52a** für die Kreuzkupplung verwendet. Während bei 70 °C und Zusatz von Lithium- sowie Kupfer(I)chlorid erneut überwiegend das entschützte Edukt **51** und lediglich 4 % des – ebenfalls entschützten – Kupplungsproduktes **77** isoliert werden konnten, gelang die Kupplung zum Produkt **77** schließlich bei 120 °C ohne den Zusatz von Additiven in einer moderaten Ausbeute von 52 %.

Tab. 3.8 Übersicht verschiedener Reaktionsbedingungen zur Optimierung der Stille-Kupplung.



X	Additive	Temperatur	Stabilität der Schutzgruppe	Ausbeute (%)
Br	CuCl + LiCl	70 °C	×	n.a.
Br	×	120 °C	×	n.a.
I	CuCl + LiCl	70 °C	×	4 %
I	×	120 °C	×	52 %

Da die Acetyl-Schutzgruppe unter den verwendeten Reaktionsbedingungen labil ist, wurden im Anschluss zur Verbesserung der Reaktionsausbeute alternative Schutzgruppen getestet. Zum Vergleich wurde die Kupplung außerdem mit dem entsprechenden ungeschützten Indazolderivat durchgeführt. Zu beachten ist, dass viele standardmäßig verwendete Amin-Schutzgruppen für eine Indazol-NH-Schätzung aufgrund der relativ geringen Stabilität nur eingeschränkt geeignet sind. Grund für die Hydrolyseanfälligkeit von geschützten Indazolderivaten ist das bei der Hydrolyse entstehende resonanzstabilisierte Indazolylanion.^[209,210] Als Schutzgruppen wurden daher zum einen eine Pivaloyl- und Phenylsulfonyl-Schutzgruppe und zum anderen die SEM- und THP-Schutzgruppe getestet. Die Schätzung des Indazol-Bausteins **51** erfolgte im Fall der erstgenannten Schutzgruppen jeweils mit Kaliumcarbonat in DMF gemäß Abb. 3.44.

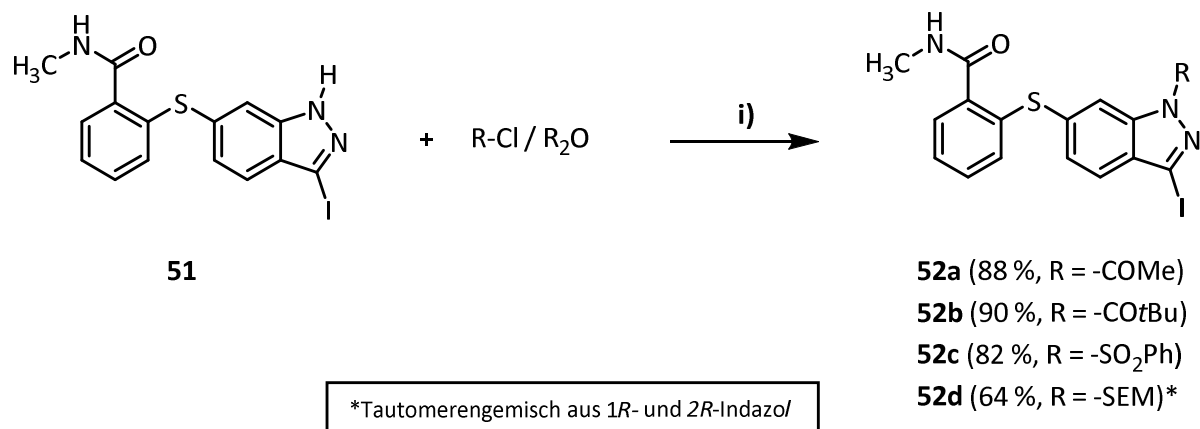


Abb. 3.44 Schätzung des Indazol-Bausteins **51** durch Umsetzung mit verschiedenen (Säure)-Chloriden bzw. Säureanhydriden.
 i) DMF, K₂CO₃, 2-6 h Raumtemp. oder 65 °C.

Für die THP-Schätzung der NH-Funktion des Indazols wurde Dihydropyran sowie katalytische Mengen *p*-Toluolsulfonsäure verwendet (Abb. 3.45).^[211,212] Während die Schätzung von 3-Iodindazol (**115**) in sehr guter Ausbeute von 92 % verläuft, ist die THP-Schätzung des Indazol-Bausteins **51** analog nicht ohne weiteres möglich. Zum einen sind die standardmäßigen Reaktionsbedingungen für eine THP-Schätzung nicht anwendbar, da die Verbindung unlöslich in Dichlormethan und Ethylacetat ist und zum anderen wird bei Raumtemp. keine Produktbildung beobachtet. Durch Umsetzung in THF unter Rückfluss nach der Methode von Thai *et al.* konnte das geschützte Produkt zwar in einer Ausbeute von 45 % erhalten werden, allerdings kommt es dabei teilweise auch zur Schätzung des Amids.^[140] Weiterhin wurde als Nebenreaktion eine Oxidation des Thioethers zum Sulfoxid beobachtet.

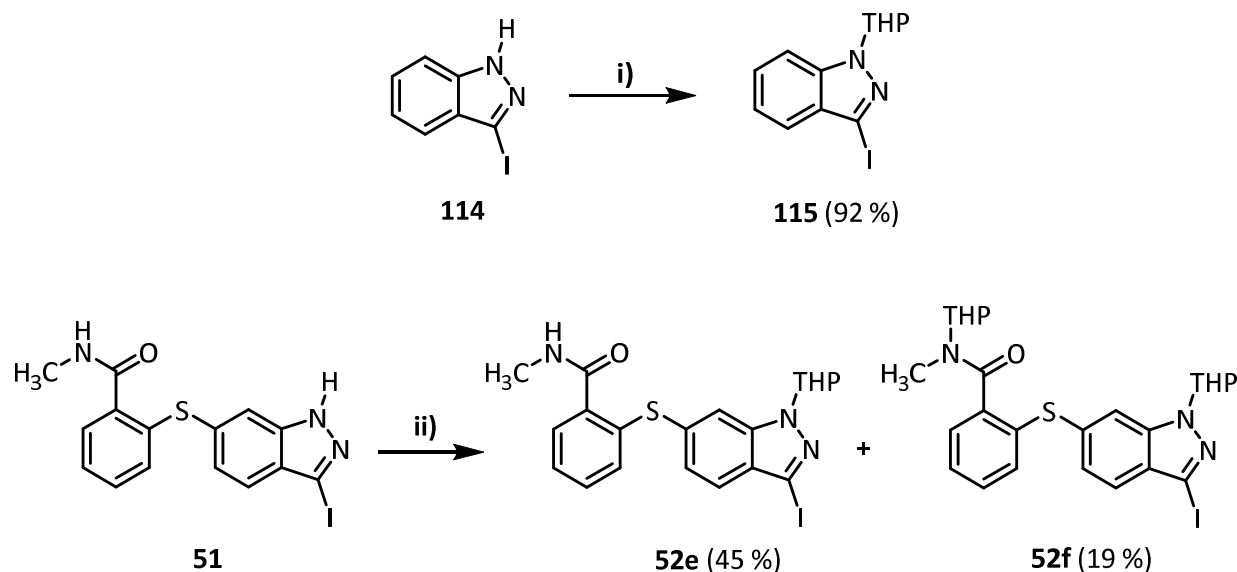
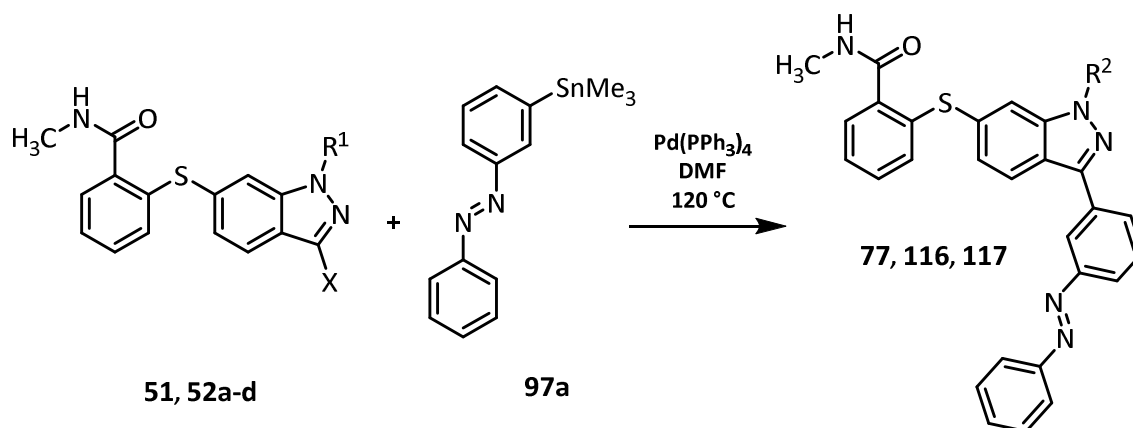


Abb. 3.45 THP-Schützung der Indazolderivate **115** und **51**. i) DHP, *p*TSA, DCM, 17 h Raumtemp., ii) DHP, *p*TSA, THF, 10 h Rückfluss.

Die durchgeführten Kreuzkupplungen der verschieden geschützten Indazolderivate mit dem stannylierten Azobenzol **97a** sind in Tab. 3.9 zusammengefasst. Ohne Schützung der NH-Funktion des Indazols, wurde das Kupplungsprodukt **77** lediglich in einer Ausbeute von 28 % erhalten. Damit liegt die Ausbeute deutlich unter dem Wert, der für das Acetyl-geschützte Indazol **52** ermittelt wurde (52 %), obwohl die Acetyl-Schutzgruppe unter den Kupplungsbedingungen labil ist. Beim Pivaloyl-geschützten Indazolderivat **114** wurde keine unkontrollierte Abspaltung der Schutzgruppe während der Kupplung mit dem stannylierten Azobenzol beobachtet. Allerdings wurde nach 24 h kein vollständiger Umsatz erzielt und das Kupplungsprodukt **116** konnte lediglich in einer Ausbeute von 31 % isoliert werden. Die Phenylsulfonyl-Schutzgruppe erwies sich als labil unter den verwendeten Reaktionsbedingungen. Als Hauptreaktion wurde neben der Abspaltung der Schutzgruppe überwiegend Dehalogenierung des Indazols beobachtet. Bei der SEM-Schutzgruppe wurde keine Spaltung während der Kupplungsreaktion beobachtet, allerdings konnten nur 38 % des Kupplungsproduktes isoliert werden. Mögliche Ursache für die geringe Reaktionsausbeute könnte das vorliegende Tautomerengemisch des SEM-geschützten Indazols sein. Möglicherweise ist die Kupplung des in 2-Position geschützten Indazols aus sterischen Gründen erschwert. Die THP-Schutzgruppe erwies sich ebenfalls als stabil unter den verwendeten Reaktionsbedingungen. Die durchgeführte Kupplung verlief in einer Ausbeute von 60 %. Aufgrund der schlechten Ausbeute bei der THP-Schützung wurde jedoch testweise lediglich 3-Iod-1-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-1H-indazol als Kupplungspartner eingesetzt, sodass ein Vergleich zu den anderen Derivaten nur eingeschränkt möglich ist.

Tab. 3.9 Übersicht über durchgeführte Stille-Kupplungen zur Ermittlung einer geeigneten Indazol-Schutzgruppe.


#	R ¹	Stabilität der Schutzgruppe	Produkt	Ausbeute (%)
51	H	entfällt	77 (R ² = H)	28 %
52a		✗	77 (R ² = H)	52 %
52b		✓	116 (R ² = R ¹)	31 %
52c		✓	(Dehalogenierung)	n.a.
52d		✓	117 (R ² = R ¹)	38 %
115*		✓	118* (R ² = R ¹)	60 %*

* Bei dieser Reaktion wurde 3-Iod-1-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-1H-indazol (**115**) als Kupplungspartner eingesetzt

Da sich die meisten der getesteten Schutzgruppen unter den gegebenen Reaktionsbedingungen zwar als stabil erwiesen, jedoch keine Ausbeutensteigerung der Kupplung erzielt werden konnte, wurde die Acetyl-Schutzgruppe für die Stille-Kupplung der stannylierten Diazocine **105a-c** sowie des stannylierten Azobenzols **97b** zunächst beibehalten. Ein Vorteil der Acetyl-Schutzgruppe gegenüber der SEM- oder THP-Schutzgruppe könnte der elektronenziehende Effekt der Carbonylfunktion sein, der eine oxidative Insertion des relativ elektronenreichen Indazolsystems am Palladium-Katalysator erleichtern kann.^[139]

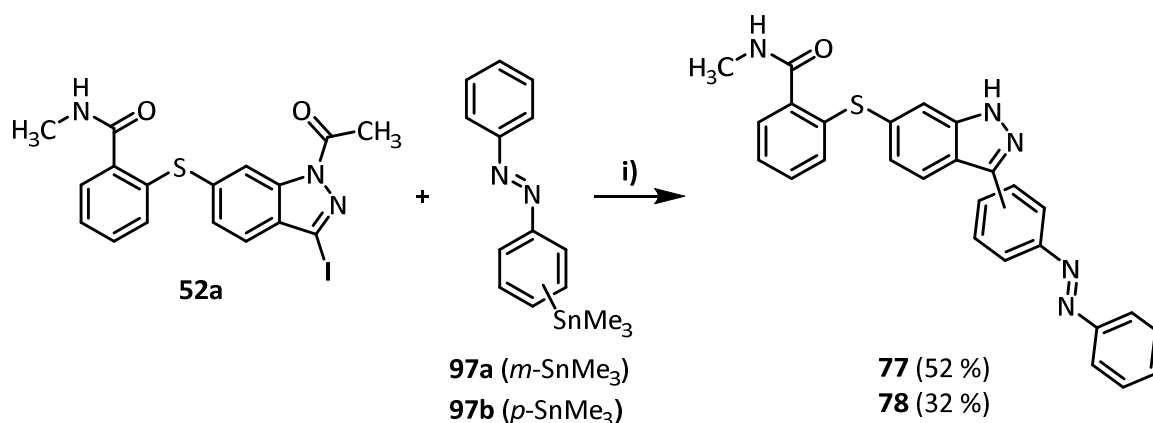


Abb. 3.46 Stille-Kupplung des Acetyl-geschützten Indazol-Bausteins **52a** mit den stannylierten Azobenzolen **97a-b**. Unter den gegebenen Reaktionsbedingungen kommt es neben der Kupplungsreaktion auch zu einer Abspaltung der Acetylschutzgruppe. i) Pd(PPh₃)₄, DMF, 24 h 120 °C.

Bei der Stille-Kupplung des *para*-substituierten Azobenzols **97b** wurde mit 32 % eine etwas schlechtere Ausbeute als für das entsprechende *meta*-substituierte Derivat **97a** erzielt (Abb. 3.46). Bei den Kupplungen der stannylierten Diazocine **105a-c** wurden Ausbeuten von 16-31 % erhalten (Abb. 3.47). Die geringen Ausbeuten sind zum Teil auch auf eine schwierige Reinigung der Produkte zurückzuführen, da in allen Fällen sowohl eine Reinigung an Kieselgel als auch zusätzlich an einer Umkehrphase erforderlich war. Bei der Kupplung des Kohlenstoffdiazocins **105c** ergab sich die Besonderheit, dass die Abspaltung der Acetylschutzgruppe während der Kupplungsreaktion unvollständig verlief. Aus diesem Grund wurde das Kupplungsprodukt nach erfolgter Aufarbeitung und Reinigung zusätzlich 2 h bei Raumtemp. mit methanolischer HCl behandelt.

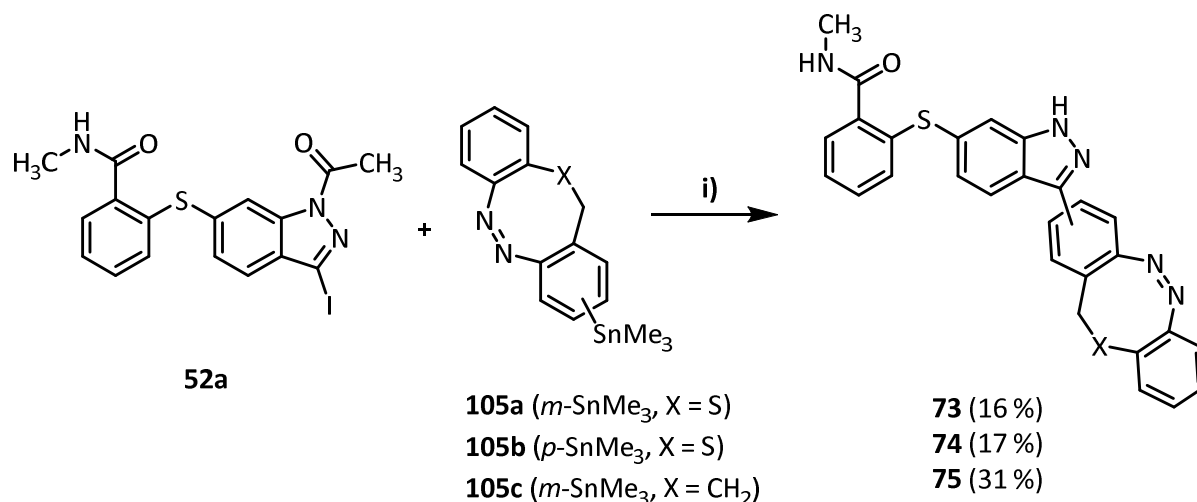


Abb. 3.47 Stille-Kupplung des Acetyl-geschützten Indazol-Bausteins **52a** mit stannylierten Diazocinen **105a-c**. Unter den gegebenen Reaktionsbedingungen kommt es neben der Kupplungsreaktion größtenteils auch zu einer Abspaltung der Acetylschutzgruppe. i) Pd(PPh₃)₄, DMF, 24 h 120 °C.

Als alternative Synthesestrategie wurde neben der Stannylierung der Diazocine auch eine Stannylierung des Indazols getestet. Eine Umsetzung des THP-geschützten Indazol-Bausteins **52e** mit Sn₂Me₆ und Pd(PPh₃)₄ nach der Methode von Strueben *et al.* gelang jedoch zunächst nicht. Erst durch die Verwendung von Pd(PPh₃)₂Cl₂ als Katalysator und Dioxan als Lösungsmittel nach der Vorschrift von Zhang *et al.* konnte der stannylierte Indazol-Baustein **119** mittels LC-MS-Analyse nachgewiesen werden (Abb. 3.48).^[213] Als Nebenprodukt wurde zudem die Bildung des entsprechenden 3,3'-Biindazols beobachtet. Eine Reinigung des stannylierten Indazols an Kieselgel ist nicht möglich, da dies zur teilweisen Zersetzung der Verbindung führt. Aufgrund der beobachteten Instabilität des stannylierten Indazols wurde das erhaltene Rohprodukt daher ohne weitere Aufreinigung mit dem bromsubstituierten Schwefeldiazocin **85** umgesetzt. Zwar konnte eine vollständige Umsetzung des stannylierten Indazols **119** beobachtet werden, der Großteil des Diazocins **85** wurde jedoch nicht umgesetzt und konnte zurückgewonnen werden. Es ist daher davon auszugehen, dass es lediglich zu einer Zersetzung des stannylierten Indazols **119** gekommen ist. Aus diesem Grund wurde eine Stannylierung des Indazols nicht weiterverfolgt.

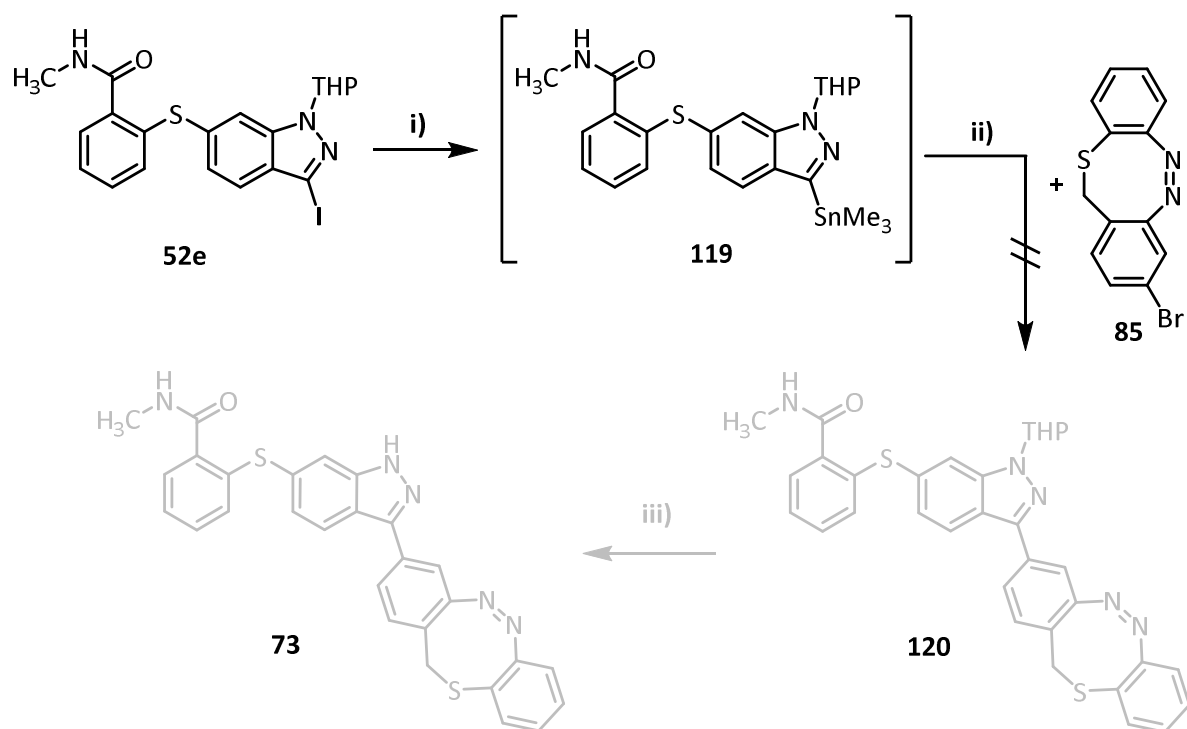


Abb. 3.48 Stannylierung des THP-geschützten Indazol-Bausteins **52e** und anschließender Versuch einer Stille-Kupplung mit dem bromierten Schwefeldiazocin **85**. Anstelle der Kreuzkupplung konnte jedoch nur eine Demetallierung des Indazols beobachtet werden. Das Diazocin wurde bei der Reaktion zum Großteil nicht umgesetzt. **i)** $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$, Dioxan, 6 h 100 °C. **ii)** $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, DMF, 100 °C.

3.2.3 Photochemische Charakterisierung

Um die Schalteffizienz sowie die optimalen Anregungswellenlängen für die *E/Z*-Isomerisierung zu ermitteln, wurden die azobenzol- und diazocinfunktionalisierten Axitinibderivate mittels UV/VIS- und NMR-Spektroskopie charakterisiert. Aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit wurden alle Verbindungen zunächst in DMSO untersucht. Wässrige Lösungen wurden wegen der geringen Löslichkeit und der kleinen Extinktionskoeffizienten der Diazocine mittels HPLC analysiert. Die wichtigsten photochemischen Eigenschaften aller Verbindungen sind in Tab. 3.10 zusammengefasst.

Die UV/VIS-Spektren der diazocinfunktionalisierten Axitinibderivate sind in den Abb. 3.49-3.50 gezeigt. Die in *meta*-Position zur Azobindung verknüpften Derivate **73** und **75** zeigen ein diazocintypisches Schaltverhalten. Als optimale Anregungswellenlänge für das *Z*-Isomer wurde jeweils 405 nm ermittelt. Während für das schwefelverbrückte Diazocin **73** ein PSS mit einem *E*-Anteil von 47 % erreicht werden kann, lassen sich beim kohlenstoffbasierten Diazocin **75** etwa 60 % des *E*-Isomers anreichern. Diese Tendenz korreliert mit den zugehörigen unsubstituierten Diazocinen, bei denen für das kohlenstoffbasierte System ebenfalls eine etwas bessere Schalteffizienz beobachtet wird. Insgesamt ist der *E*-Isomerenanteil im PSS für die Derivate **73** und **75** aber deutlich niedriger als für die entsprechenden unsubstituierten Diazocine, die sich zu 70 % (Schwefeldiazocin) bzw. 90 % (Kohlenstoffdiazocin) zum *E*-Isomer schalten lassen.^[46,51,53] Durch Bestrahlung mit 530 nm lassen sich die beiden Verbindungen **73** und **75** jeweils quantitativ zum *Z*-Isomer zurückschalten. Da die zugehörigen Spektren deckungsgleich mit den Spektren der reinen *Z*-Isomere *Z-73* und *Z-75* sind, werden diese aus Übersichtsgründen nicht gezeigt.

Zur Überprüfung der Reversibilität der Photoschaltung wurden Zyklenmessungen mit 20 Schaltzyklen durchgeführt (vgl. Anhang Abb. 9.1-9.3). Dazu wurden die Verbindungen alternierend für 20 s mit 405 nm und 530 nm bestrahlt und nach jeder Bestrahlung ein UV-Spektrum aufgenommen. Nach 20 Schaltzyklen konnte für keine der untersuchten Verbindungen eine nennenswerte Photoermüdung beobachtet werden.

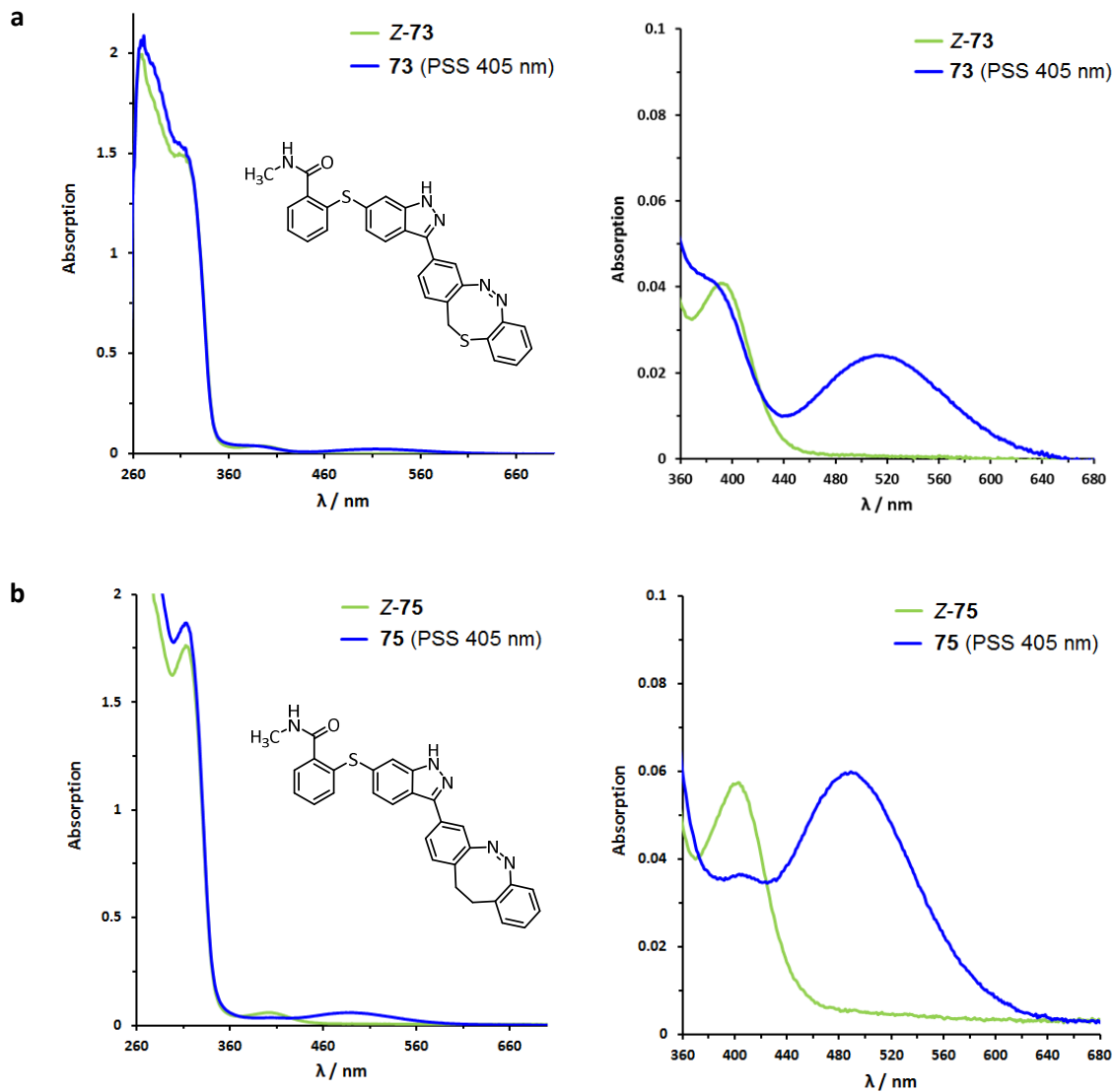


Abb. 3.49 a) UV/VIS-Spektrum von Z-73 in DMSO (100 μM) sowie PSS nach Bestrahlung mit 405 nm. **b)** UV/VIS-Spektrum von Z-75 in DMSO (100 μM) sowie PSS nach Bestrahlung mit 405 nm. Jeweils *links*: Vollständiges Spektrum. Jeweils *rechts*: Vergrößerte Ansicht der $\pi\pi^*$ -Banden. Das Spektrum des PSS nach Bestrahlung mit 530 nm ist jeweils deckungsgleich mit dem Spektrum des reinen Z-Isomers und daher aus Übersichtsgründen nicht gezeigt.

Die im Vergleich zu den unsubstituierten Diazocinen schlechtere $E \rightarrow Z$ Schalteffizienz der Verbindungen **73** und **75** ist wahrscheinlich auf eine elektronische Kopplung der Diazocinbausteine mit dem π -System des Indazols zurückzuführen. Dadurch kommt es zu einer Veränderung der $\pi\pi^*$ -Banden der Diazocine, wodurch die Banden weniger gut separiert sind. Noch stärker ist dieser Effekt bei dem in *para*-Position zur Azobindung verknüpften Derivat **74** zu beobachten. Hier wird die $\pi\pi^*$ -Bande des Z-Isomers vollständig vom Absorptionsspektrum des E-Isomers überlagert, sodass sich durch Bestrahlung mit 405 nm lediglich 25 % des E-Isomer anreichern lassen. Die Rückisomerisierung mit 530 nm verläuft hingegen ebenfalls quantitativ (aus Übersichtsgründen nicht gezeigt).

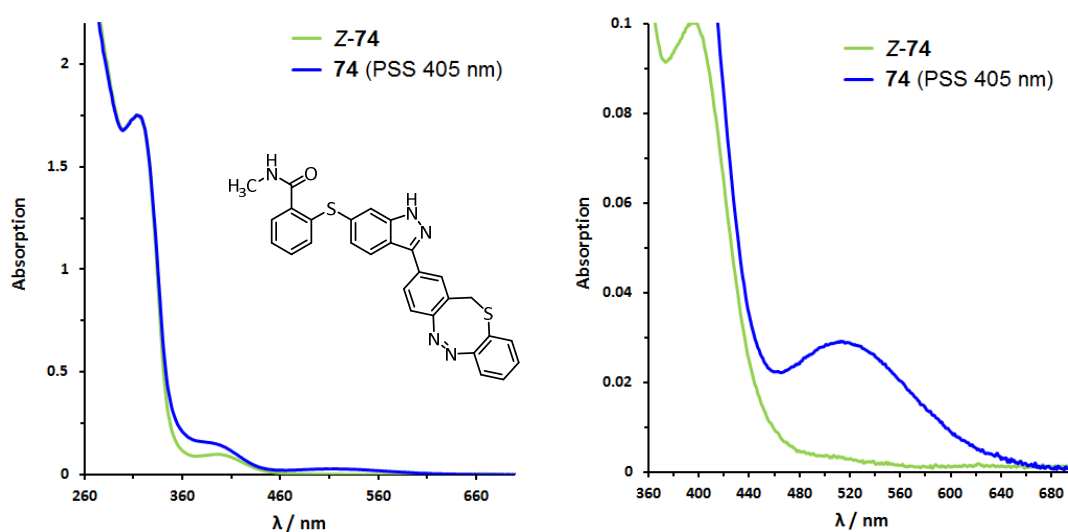


Abb. 3.50 UV/VIS-Spektrum von Z-74 in DMSO (100 μ M) sowie PSS nach Bestrahlung mit 405 nm. *Links*: Vollständiges Spektrum. *Rechts*: Vergrößerte Ansicht der $\pi\pi^*$ -Banden. Das Spektrum des PSS nach Bestrahlung mit 530 nm ist deckungsgleich mit dem Spektrum des reinen Z-Isomers und daher aus Übersichtsgründen nicht gezeigt.

Die UV/VIS-Spektren der azobenzolfunktionalisierten Axitinibderivate **77** und **78** weisen einen für Azobenzole typischen Absorptionsverlauf auf (Abb. 3.51). Das *meta*-verknüpfte Derivat **77** zeigt eine intensive $\pi\pi^*$ -Bande zwischen 270 und 380 nm und eine deutlich weniger intensive $\pi\pi^*$ -Bande zwischen 400 und 500 nm. Durch Bestrahlung mit 365 nm lässt sich das PSS am stärksten in Richtung des Z-Isomers verschieben, wodurch es zu einer Intensitätsabnahme der $\pi\pi^*$ -Bande und zu einer Zunahme der $\pi\pi^*$ -Bande kommt. Mittels NMR-Spektroskopie wurde ein Z-Isomerenanteil von 83 % bestimmt. Das *para*-verknüpfte Derivat **78** weist im Vergleich eine etwas breitere $\pi\pi^*$ -Bande als Verbindung **77** auf. Dadurch kommt es zu einer teilweisen Überlappung mit der $\pi\pi^*$ -Bande, die nur noch als Schulter erkennbar ist. Auch das Maximum der $\pi\pi^*$ -Bande ist leicht rotverschoben, wodurch sich eine optimale Anregungswellenlänge von 385 nm ergibt. Bei dieser Wellenlänge stellt sich ein PSS

mit einem *Z*-Anteil von 80 % ein. Die Rückisomerisierung zum *E*-Isomer ist durch Bestrahlung mit 435 nm (**77**) bzw. 470 nm (**78**) möglich und erfolgt nahezu quantitativ (aus Übersichtsgründen nicht gezeigt).

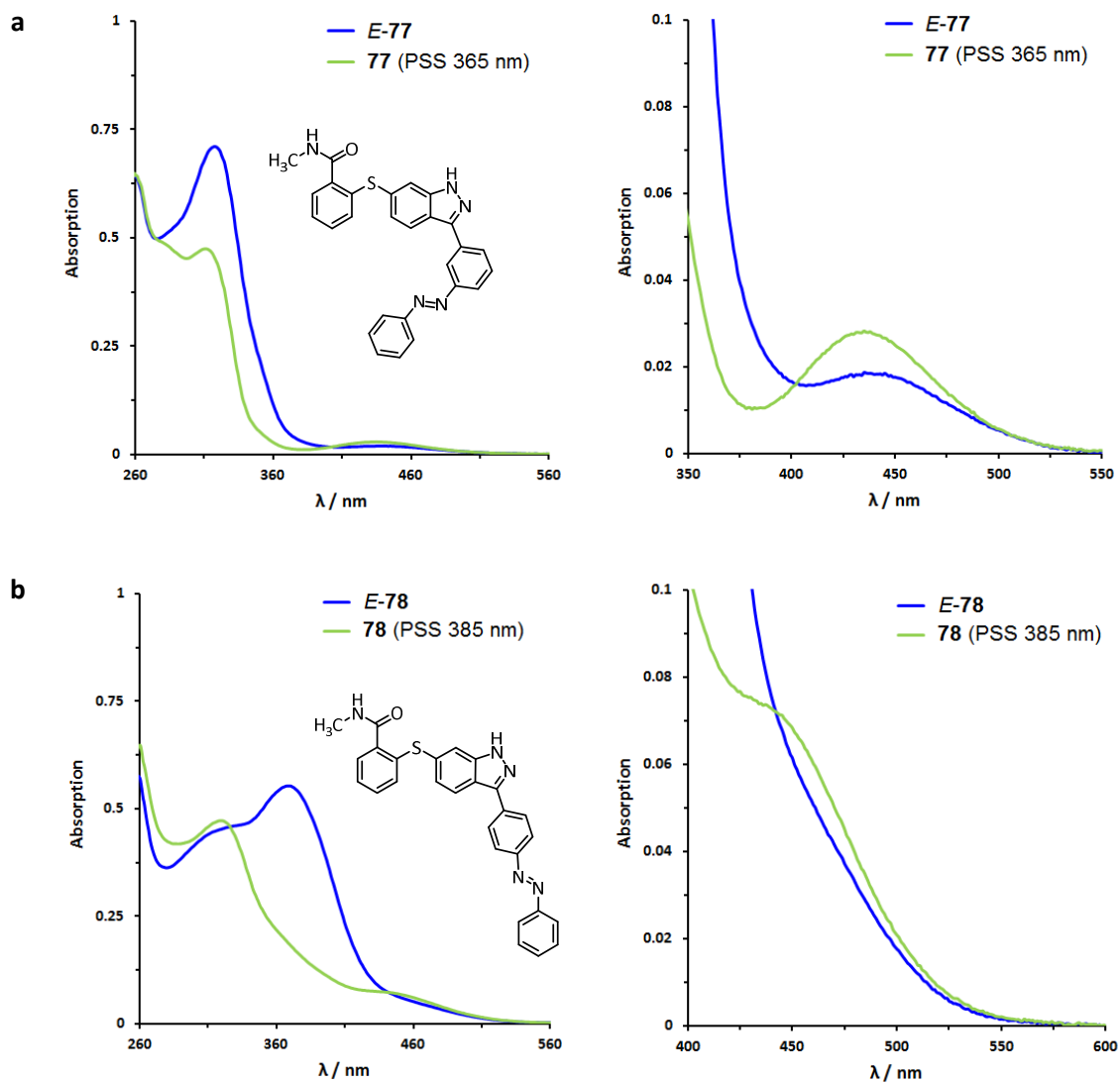


Abb. 3.51 a) UV/VIS-Spektrum von *E*-77 in DMSO (20 μ M) sowie PSS nach Bestrahlung mit 365 nm. **b)** UV/VIS-Spektrum von *E*-78 in DMSO (20 μ M) sowie PSS nach Bestrahlung mit 385 nm. Jeweils *links*: Vollständiges Spektrum. Jeweils *rechts*: Vergrößerte Ansicht der $\pi\pi^*$ -Bande. Das Spektrum des PSS nach Bestrahlung mit 435 nm (**77**) bzw. 470 nm (**78**) ist jeweils deckungsgleich mit dem Spektrum des reinen *E*-Isomers und daher aus Übersichtsgründen nicht gezeigt.

Die bei 37 °C in DMSO ermittelten Halbwertszeiten der diazocin-funktionalisierten Axitinibderivate liegen im Bereich von 1.5 bis 7.3 h, sodass sich grundsätzlich von einer Eignung für biologische Anwendungen sprechen lässt. Für das azobenzolfunktionalisierte Axitinibderivate **77** wurde mit 43.1 h eine deutlich längere Halbwertszeit als für die vergleichbaren diazocin-funktionalisierten Derivate bestimmt. Dieser Trend entspricht der generellen Beobachtung, dass Azobenzole tendenziell längere Halbwertszeit aufweisen als Diazocine. Für das *para*-verknüpfte Azobenzolderivat **78** gilt diese Beobachtung hingegen nicht ($t_{1/2} = 5.7$ h), da hier vermutlich die elektronische Kopplung mit dem Indazol zu einer reduzierten Halbwertszeit führt.

Tab. 3.10 Photostationäre Gleichgewichte (PSS) und Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) der azobenzol- und diazocin-funktionalisierten Axitinibderivate.

#	λ_{exc} (nm)	PSS (E/Z %)			$t_{1/2}$ (h)
		DMSO (NMR)	DMSO (HPLC)	Wasser ^a (HPLC)	DMSO, 37 °C (UV/VIS)
73	405	47/53	49/51	40/60	7.3
74	405	25/75	24/76	23/77	3.7
75	405	60/40	57/43	46/54	1.5
77	365	17/83	n.a.	n.a.	43.1
78	385	20/80	n.a.	n.a.	5.7

^a: 50 % MeCN

Zusätzlich zur NMR-spektroskopischen Bestimmung wurde das PSS der Diazocinderivate **73-75** mittels HPLC bestimmt. Dazu wurden 10 μM Probenlösungen jeweils vor und nach UV-Bestrahlung analysiert. In DMSO konnten dabei die Ergebnisse der NMR-spektroskopischen Messung reproduziert werden. Die Analyse der wässrigen Lösungen erforderte bei der verwendeten Inhibitorkonzentration von 10 μM den Zusatz von 50 % Acetonitril als Cosolvens, um eine Präzipitation der Verbindungen zu vermeiden. Eine Analyse geringerer Konzentrationen war aufgrund der bereits erreichten Bestimmungsgrenze nicht möglich. In den wässrigen Probenlösungen wurde tendenziell ein etwas geringerer *E*-Isomerenanteil im PSS bestimmt, was auf eine leicht schlechtere Schalteffizienz der Diazocine im Wässrigen hindeutet.

3.2.4 Biologische Testung

Zunächst wurden die diazocinfunktionalisierten Axitinibderivate **73** und **74** in *Z*-Konfiguration im Dunkeln in dem bereits für Axitinib (**30**) etablierten *in vitro* VEGFR2-Kinaseassay getestet. Basierend auf den Molecular Modeling Ergebnissen wurde für die reinen *Z*-Isomere keine bzw. nur geringe VEGFR2-Inhibition erwartet. Diese Hypothese konnte experimentell für die schwefelverbrückten Diazocinderivate *Z*-**73** und *Z*-**74** im VEGFR2-Assay bestätigt werden (Abb. 3.52, grüne Messpunkte). Bei einer Inhibitorkonzentration bis 1 μM ist keine Abnahme der Kinaseaktivität zu beobachten. Auch im Konzentrationsbereich von 1-10 μM ist nur eine geringe VEGFR2-Inhibition messbar, die zudem im Bereich der Messschwankungen liegt.

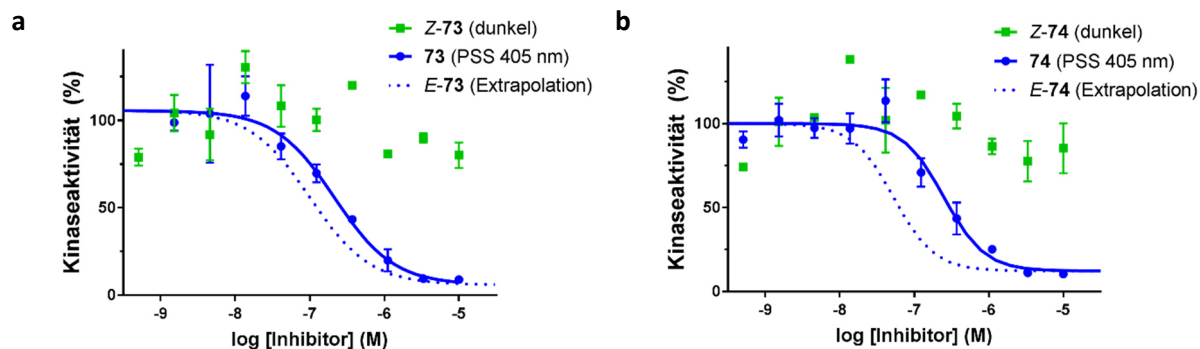


Abb. 3.52 Dosis-Wirkungs-Kurven der diazocinfunktionalisierten Axitinibderivate **73** und **74** in einem *in vitro* VEGFR2-Kinaseassay mit und ohne UV-Bestrahlung bei einer DMSO-Konzentration von 10 %. **a)** *Z*-**73** im Dunkeln (grün, $\text{IC}_{50} > 10000$ nM) sowie nach Bestrahlung mit 405 nm (blau, Restaktivität (Plateau): 6 %, $\text{IC}_{50} = 215$ nM, $R^2 = 0.95$). Die gestrichelte Linie deutet die extrapolierte Aktivität des isolierten Isomers *E*-**73** an ($\text{IC}_{50} = 100$ nM). **b)** *Z*-**74** im Dunkeln (grün, $\text{IC}_{50} > 10000$ nM) sowie nach Bestrahlung mit 405 nm (blau, Restaktivität (Plateau): 12 %, $\text{IC}_{50} = 251$ nM, $R^2 = 0.96$). Die gestrichelte Linie deutet die extrapolierte Aktivität des isolierten Isomers *E*-**74** an ($\text{IC}_{50} = 53$ nM). Die Datenpunkte stellen jeweils Mittelwerte aus Doppelbestimmungen dar. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.^[126]

Bestrahlt man die Inhibitoren **73** und **74** mit 405 nm, kommt es zu einer bemerkenswerten Steigerung der Bindeaffinität an VEGFR2, was sich in einer deutlichen Abnahme der gemessenen Kinaseaktivität äußert (Abb. 3.52, blaue Kurven). Vergleicht man die gemessenen VEGFR2-Aktivitäten bei einer Inhibitorkonzentration von 3.3 μM , so ist in Gegenwart von *Z*-**73** noch nahezu vollständige VEGFR2-Aktivität messbar (90 % Kinaseaktivität), während im PSS nur noch 9 % Restaktivität des Enzyms vorhanden ist. Für Verbindung **73** wurde nach Bestrahlung mit 405 nm ein IC_{50} -Wert von 215 nM bestimmt (Restaktivität/Plateau = 6 % Kinaseaktivität). Vergleicht man diesen Wert mit dem von (*E*)-Axitinib (*E*-**30**, $\text{IC}_{50} = 19$ nM), so scheint Verbindung *E*-**73** auf den ersten Blick nur mäßig potent gegenüber VEGFR2 zu sein. Beachtet man hingegen, dass nach der Bestrahlung nur etwa die Hälfte des Inhibitors in der bioaktiven *E*-Konfiguration vorliegt ($\text{PSS}_{405\text{nm}} \approx 47$ % *E*-Isomer), so ist die isolierte Verbindung *E*-**73** durchaus als potenter Inhibitor anzusehen. Unter der Annahme, dass Verbindung

Z-73 im untersuchten Konzentrationsbereich keinerlei Wirkung auf die VEGFR2-Aktivität hat, lässt sich für die isolierte Verbindung **E-73** ein IC_{50} -Wert von 100 nM abschätzen (Abb. 3.52a, gestrichelte Kurve).

Für das *para*-verknüpfte Diazocinderivat **74** kann nach Bestrahlung ebenfalls eine deutliche Affinitätssteigerung beobachtet werden. Vergleicht man wiederum die Kinaseaktivität bei einer Inhibitorkonzentration von 3.3 μ M vor und nach Bestrahlung, so ist in Anwesenheit von **Z-74** noch eine Kinaseaktivität von 78 % vorhanden, während im PSS nur noch eine Restaktivität von 11 % messbar ist. Insgesamt resultiert für **74** nach Bestrahlung mit 405 nm ein IC_{50} -Wert von 251 nM (Restaktivität/Plateau = 12 % Kinaseaktivität). Damit ist das *para*-verknüpfte Derivat **74** im PSS etwas weniger potent als die verwandte *meta*-substituierte Verbindung **73**. Zu beachten ist dabei allerdings wiederum, dass im PSS aufgrund der deutlich schlechteren Schalteffizienz nur etwa 24 % des *E*-Isomers vorliegen. Geht man auch hier vereinfacht von einer vollständigen Unwirksamkeit des *Z*-Isomers **Z-74** im betrachteten Konzentrationsbereich aus, lässt sich für die isolierte Verbindung **E-74** ein IC_{50} -Wert von 53 nM abschätzen (Abb. 3.52b, gestrichelte Kurve).

Als Einschränkung ist anzumerken, dass die Inhibitoren **73** und **74** aufgrund ihrer schlechten Wasserlöslichkeit im Kinaseassay eine DMSO-Konzentration von 10 % als Cosolvens erfordern. Führt man den Assay hingegen mit der standardmäßigen DMSO-Konzentration von 1 % durch, weisen die Inhibitoren eine deutlich geringere Potenz auf, da die Verbindungen im mikromolaren Konzentrationsbereich teilweise ausfallen. Der Wirkungsbereich fällt also ungefähr mit der maximal in Wasser löslichen Konzentration der Verbindungen zusammen (vgl. Anhang Abb. 9.21).

Die DMSO- und UV-Toleranz der Kinase VEGFR2 wurde von Heintze in einem Kontrollexperiment untersucht. Dabei wurde bei einer DMSO-Konzentration von bis zu 20 % sowie einer Bestrahlung mit 405 nm kein nennenswerter Einfluss auf die Kinaseaktivität beobachtet.^[126] Weiterhin wurde von Heintze die Stabilität der Verbindungen **Z-73**, **Z-74** und **Z-75** gegenüber dem Reduktionsmittel DTT untersucht, welches im Kinaseassay zur Stabilisierung des Proteins verwendet wird (vgl. Kapitel 5.5). Dabei konnte nach einer assayrelevanten Inkubationszeit weder in DMSO noch in wässriger Pufferlösung eine Reduktion der Diazocine nachgewiesen werden.^[126]

Für das kohlenstoffverbrückte Diazocinderivat **75** fällt die Affinitätssteigerung nach UV-Bestrahlung schwächer aus als für die entsprechenden schwefelverbrückten Diazocinderivate **73** und **74**. Zum einen weist Verbindung **75** auch in der Z-Konfiguration eine gewisse VEGFR2-Hemmung auf (Abb. 3.53, grüne Kurve). So ist bei einer Inhibitorkonzentration von 10 μM nur noch eine VEGFR2-Aktivität von 36 % messbar, während bei den entsprechenden Diazocinderivaten **73** und **74** noch eine Restaktivität von > 80 % vorhanden ist. Zum anderen resultiert nach Bestrahlung mit 405 nm ein IC_{50} -Wert von nur 470 nM, obwohl die Verbindung im PSS im Vergleich zum entsprechenden schwefelverbrückten Diazocinderivat **73** einen größeren E-Anteil aufweist (60 % vs. 47 % E-Isomer).

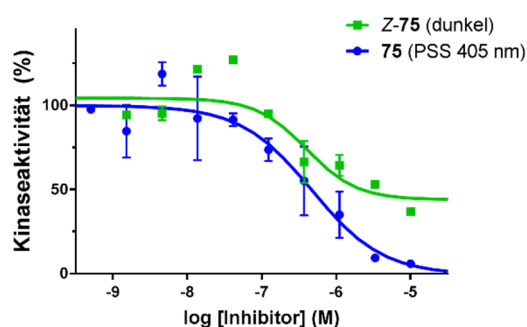


Abb. 3.53 Dosis-Wirkungs-Kurven des diazocinfunktionalisierten Axitinibderivates **75** in einem *in vitro* VEGFR2-Kinaseassay mit und ohne UV-Bestrahlung bei einer DMSO-Konzentration von 10 %. **a)** Z-**75** im Dunkeln (grün, IC_{50} = 399 nM, Restaktivität (Plateau): 44 %, R^2 = 0.82) sowie nach Bestrahlung mit 405 nm (blau, IC_{50} = 470 nM, R^2 = 0.89). Die Datenpunkte stellen jeweils Mittelwerte aus Doppelbestimmungen dar. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.^[126]

Die relativ hohe VEGFR2-Hemmung von Z-**75** steht im Einklang mit dem durchgeführten *Induced-Fit* Modeling der Verbindung (vgl. Abb. 3.32), bei dem im Gegensatz zu den entsprechenden Schwefeldiazocinen Z-**73** und Z-**74** ein günstiger Bindemodus für Z-**75** in der ATP-Bindetasche von VEGFR2 gefunden wurde. Möglicherweise sind die leicht unterschiedlichen Z-Konformationen von Schwefel- und Kohlenstoffdiazocin ausschlaggebend für die messbaren Aktivitätsunterschiede. Darüber hinaus könnte jedoch auch ein elektronischer oder sterischer Effekt des Schwefelatoms im Vergleich zur Methylengruppe eine Rolle spielen.

Die vergleichbaren azobenzolfunktionalisierten Derivate *E-77* und *E-78* zeigen bei einer DMSO-Konzentration von 1 % jeweils eine schwächere VEGFR2-Hemmung mit IC_{50} -Werten von 1077 nM bzw. 1020 nM. Auffällig ist jedoch, dass bei beiden Verbindungen frühzeitig ein Plateau mit einer hohen Restaktivität von 33 % bzw. 43 % erreicht wird. Dies ist wahrscheinlich ebenfalls der schlechten Wasserlöslichkeit der Verbindungen geschuldet, durch die eine vollständige VEGFR2-Hemmung nicht erzielt werden kann. Die Versuche sollten daher idealerweise ebenfalls mit einer erhöhten DMSO-Konzentration wiederholt werden, um eine mögliche Präzipitation zu vermeiden. Eine Bestrahlung der Isomere *E-77* und *E-78* mit 365 nm bzw. 385 nm führt lediglich zu einer geringen Veränderung der Dosis-Wirkungs-Kurven (Abb. 3.54, grüne Kurven). In beiden Fällen ist für das PSS eine marginal höhere Kinasehemmung im mikromolaren Inhibitor Konzentrationsbereich messbar. Ein Vergleich der IC_{50} -Werte ist aufgrund der unterschiedlichen Plateaus der Dosis-Wirkungs-Kurven wenig aussagekräftig. Insgesamt bestätigen sich jedoch die Ergebnisse des Molecular Modelings, bei dem für beide Konfigurationen tendenziell ähnliche Bindeaffinitäten vorausgesagt wurden.

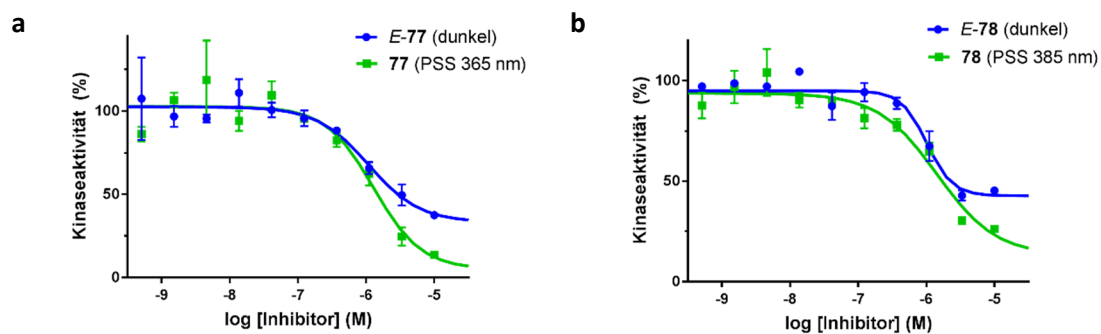


Abb. 3.54 Dosis-Wirkungs-Kurven der azobenzolfunktionalisierten Axitinibderivate **77** und **78** in einem *in vitro* VEGFR2-Kinaseassay mit und ohne UV-Bestrahlung bei einer DMSO-Konzentration von 1 %. **a)** *E-77* im Dunkeln (blau, $IC_{50} = 1077$ nM, Restaktivität (Plateau): 33 %, $R^2 = 0.9$) sowie nach Bestrahlung mit 365 nm (grün, $IC_{50} = 1289$ nM, Restaktivität (Plateau): 5 %, $R^2 = 0.91$). **b)** *E-78* im Dunkeln (blau, $IC_{50} = 1020$ nM, Restaktivität (Plateau): 43 %, $R^2 = 0.95$) sowie nach Bestrahlung mit 385 nm (grün, $IC_{50} = 1435$ nM, Restaktivität (Plateau): 13 %, $R^2 = 0.93$). Die Datenpunkte stellen jeweils Mittelwerte aus Doppelbestimmungen dar. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.^[126]

Die gemessenen IC_{50} -Werte der Verbindungen **73-78** vor und nach Bestrahlung sowie die dazugehörigen photochemischen Eigenschaften sind nochmals in Tab. 3.11 zusammengefasst.

Tab. 3.11 IC₅₀-Werte der diazocin- und azobenzolfunktionalisierten Axitinibderivate **73-78** im VEGFR2 Kinaseassay mit und ohne Bestrahlung.

#	λ_{Exc} (nm)	PSS (E/Z %)	IC ₅₀ (nM)		Restaktivität/ Plateau (%)
73	405	47/53	Z-Isomer	> 10000	> 75
			PSS 405 nm	215	6
74	405	24/76	Z-Isomer	> 10000	> 75
			PSS 405 nm	251	12
75	405	60/40	Z-Isomer	399	44
			PSS 405 nm	470	0
77	365	17/83	E-Isomer	1077	33
			PSS 365 nm	1289	5
78	385	20/80	E-Isomer	1020	43
			PSS 385 nm	1435	13

Ergänzend zur Charakterisierung im VEGFR2-Kinaseassay wurden die Verbindungen **73**, **77** und **78** auch auf ihre antiproliferative Wirkung in einem HUVEC-Proliferationsassay getestet. Das diazocin-funktionalisierte Axitinibderivat **73** zeigt dabei in Z-Konfiguration bis zu einer Konzentration von 33 μM eine schwache zytostatische Wirkung und bei der höchsten Inhibitorkonzentration einen zytotoxischen Effekt (Abb. 3.55a, grüne Kurve). Bestrahlt man Verbindung **73** zu Beginn des Proliferationsassays einmalig mit 405 nm (blaue Kurve), ergibt sich bis zu einer Inhibitorkonzentration von 1 μM keine Veränderung des Dosis-Wirkungs-Kurvenverlaufes. Im Konzentrationsbereich von 1-100 μM zeigt sich jedoch für das PSS tendenziell ein etwas stärkerer antiproliferativer Effekt als für Z-**73**. Während die antiproliferative Wirkung der bestrahlten Verbindung ($\text{IC}_{50} = 5.9 \mu\text{M}$) gut mit der zuvor im Kinaseassay bestimmten VEGFR2-Hemmung korreliert, beruht die beobachtete Wirkung von Z-**73** ($\text{IC}_{50} = 17 \mu\text{M}$) vermutlich eher nicht auf einer spezifischen VEGFR2-Hemmung. Kritisch ist hier erneut die schlechte Wasserlöslichkeit der Verbindungen zu sehen, insbesondere vor dem Hintergrund der im Vergleich zu den durchgeführten VEGFR2-Kinaseassays niedrigeren DMSO-Konzentration. Das gemessene Zellwachstum im mikromolaren Konzentrationsbereich sowie die ermittelten IC_{50} -Werte könnten daher aufgrund einer möglichen Präzipitation der Verbindungen fehlerbehaftet sein (vgl. auch Anhang Abb. 9.25b). Weiterhin könnte die antiproliferative Wirkung von Z-**73** auf eine unspezifische Toxizität der Azofunktion oder einen Off-Target-Effekt zurückzuführen sein.

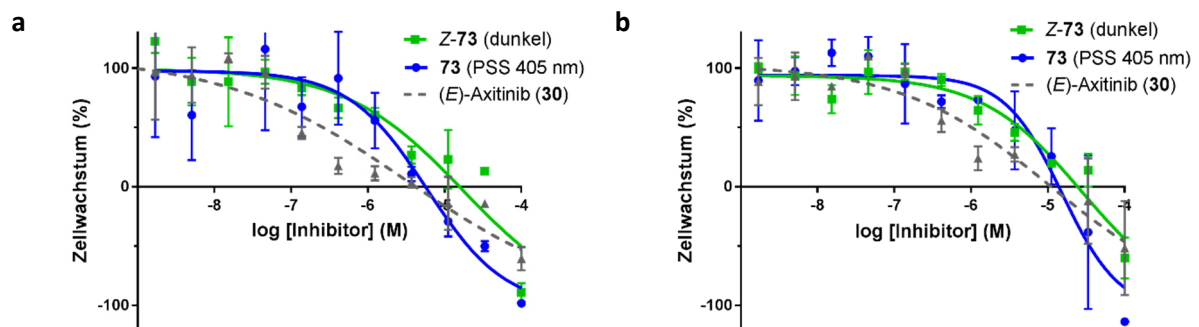


Abb. 3.55 Dosis-Wirkungs-Kurven des diazocin-funktionalisierten Axitinibderivates **73** in einem HUVEC-Proliferationsassay mit und ohne UV-Bestrahlung bei einer DMSO-Konzentration von 1 %. **a**) Z-**73** im Dunkeln (grün, $\text{IC}_{50} = 17 \mu\text{M}$, $R^2 = 0.92$) sowie nach einmaliger Bestrahlung mit 405 nm (blau, $\text{IC}_{50} = 5.9 \mu\text{M}$, $R^2 = 0.88$) im Vergleich zu (*E*)-Axitinib (*E*-**30**, grau, $\text{IC}_{50} = 3.2 \mu\text{M}$, $R^2 = 0.94$). **b**) Z-**73** im Dunkeln (grün, $\text{IC}_{50} = 27 \mu\text{M}$, $R^2 = 0.97$) sowie nach mehrfacher Bestrahlung mit 405 nm (blau, $\text{IC}_{50} = 14 \mu\text{M}$, $R^2 = 0.89$) im Vergleich zu (*E*)-Axitinib (*E*-**30**, grau, $\text{IC}_{50} = 10 \mu\text{M}$, $R^2 = 0.94$). Der Assay wurde ca. alle 6 h manuell bestrahlt. Die Datenpunkte stellen jeweils Mittelwerte aus Doppelbestimmungen dar. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.^[126]

Unter Berücksichtigung der für *E*-**73** ermittelten Halbwertszeit von 7.3 h (DMSO, 37 °C) wurde der dreitägige Proliferationsassay zusätzlich mit mehrfacher UV-Bestrahlung wiederholt (Abb. 3.55b). Dabei wurden die Zellen ca. alle 6 h kurzzeitig mit 405 nm bestrahlt. Ein Vergleich von Abb. 3.55a und

3.55b zeigt jedoch keine Verbesserung der antiproliferativen Wirkung bei mehrfacher Bestrahlung. Folglich wirkt sich die thermische Rückisomerisierung entweder nicht maßgeblich auf die zu beobachtende zelluläre Wirkung des *E*-Isomers aus oder es ist eine noch häufigere und ggf. falls intensivere Bestrahlung nötig, um eindeutige Effekte zu erzielen.

Das azobenzolfunktionalisierte Axitinibderivat *E*-**77** zeigt einen moderaten antiproliferativen Effekt mit einem IC_{50} -Wert von $3.6 \mu\text{M}$. Durch Bestrahlung mit 365 nm ergibt sich keine nennenswerte Verschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve. Dies entspricht den Beobachtungen im VEGFR2-Kinaseassay, wonach beide Isomere ungefähr gleich wirksam sind. Das azobenzolfunktionalisierte Axitinibderivat *E*-**78** zeigt bis zu einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ keinen zytostatischen Effekt. Oberhalb dieser Konzentration kommt es sprunghaft zu einer zytotoxischen Wirkung. Das steile Abfallen der Dosis-Wirkungs-Kurve deutet daraufhin, dass die Verbindung im mikromolaren Konzentrationsbereich ausfällt und es zu einer unspezifischen Zellschädigung oder einer Störung der Signalauslesung kommt (vgl. Anhang Abb. 9.25a). Bei Bestrahlung mit 385 nm wird der gleiche Effekt beobachtet.

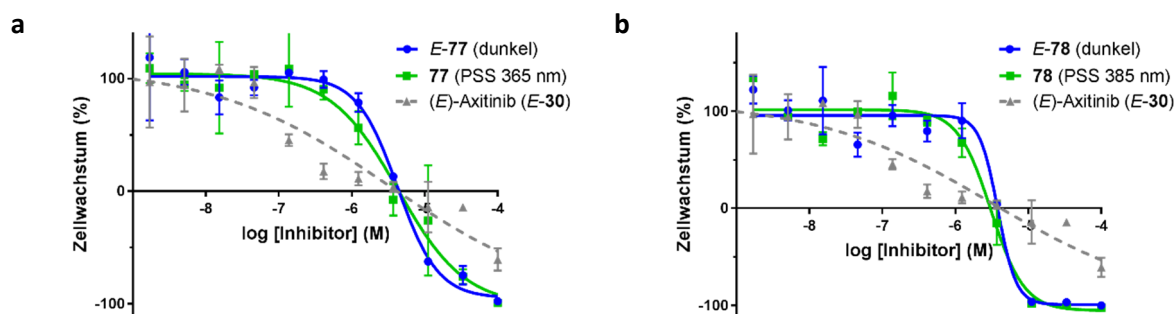


Abb. 3.56 Dosis-Wirkungs-Kurven der azobenzolfunktionalisierten Axitinibderivate **77** und **78** in einem HUVEC-Proliferationsassay mit und ohne UV-Bestrahlung bei einer DMSO-Konzentration von 1%. **a)** *E*-**77** im Dunkeln (blau, $IC_{50} = 4.2 \mu\text{M}$, $R^2 = 0.97$) sowie nach einmaliger Bestrahlung mit 365 nm (grün, $IC_{50} = 4.3 \mu\text{M}$, $R^2 = 0.95$) im Vergleich zu (*E*)-Axitinib (*E*-**30**, grau, $IC_{50} = 3.2 \mu\text{M}$, $R^2 = 0.94$). **b)** *E*-**78** im Dunkeln (blau, $IC_{50} = 3.8 \mu\text{M}$, $R^2 = 0.96$) sowie nach einmaliger Bestrahlung mit 385 nm (grün, $IC_{50} = 3.1 \mu\text{M}$, $R^2 = 0.96$) im Vergleich zu (*E*)-Axitinib (*E*-**30**, grau, $IC_{50} = 3.2 \mu\text{M}$, $R^2 = 0.94$). Die Datenpunkte sind jeweils Mittelwerte aus Doppelbestimmungen mit deren Standardabweichung als Fehlerbalken.^[126]

Neben der Proliferation der HUVECs wurde erneut auch die Phosphorylierungsaktivität des Zelllysates mittels PamGene-Technik untersucht. Dazu wurde das HUVEC-Lysat einmal mit **Z-73** im Dunkeln und einmal mit dem PSS von **73** nach Bestrahlung mit 405 nm behandelt. Als Positivkontrolle wurde (*E*)-Axitinib (**E-30**) verwendet, als Negativkontrolle erfolgte die Behandlung des Zelllysates lediglich mit DMSO ohne Inhibitor. Die Phosphorylierungsaktivität der HUVEC-Lysate nach entsprechender Behandlung ist in Abb. 3.57 in Form einer Heatmap dargestellt.

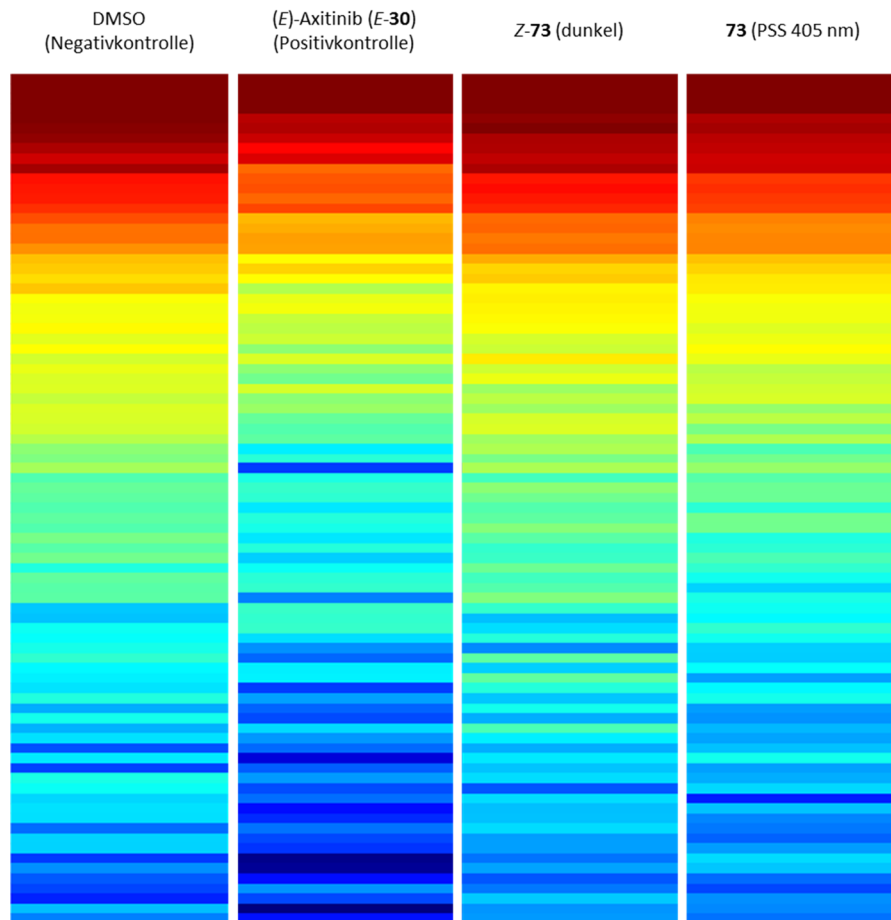


Abb. 3.57 Mittels PamGene-Technik gemessene Phosphorylierungsmuster von HUVEC-Lysaten nach Inkubation mit den jeweils angegebenen Inhibitoren. Jeder Balken der Heatmaps steht für eine spezifische Phosphorylierungsstelle. Rote Balken zeigen einen hohen Phosphorylierungsgrad, blaue Balken einen niedrigen. Die Behandlung des HUVEC-Lysates mit **Z-73** führt zu einer leichten Zunahme an wenig phosphorylierten Peptiden (blau), insgesamt jedoch nur zu geringen Unterschieden im Vergleich zu DMSO. Behandlung mit **73** (PSS 405 nm) führt zu einer stärkeren Zunahme an wenig phosphorylierten Peptiden (blau) und zu einem leichten Rückgang an stark phosphorylierter Peptiden (rot) im Vergleich zu DMSO. Im Verhältnis zu (*E*)-Axitinib (**E-30**, Positivkontrolle) fallen die beschriebenen Effekte jedoch vergleichsweise gering aus.^[160]

Behandlung mit (*E*)-Axitinib (**E-30**) führt im Vergleich zu DMSO zu einer deutlichen Zunahme an wenig phosphorylierten Peptiden (blau) und zu einer Abnahme an stark phosphorylierten Peptiden (rot). Behandelt man das HUVEC-Lysat hingegen mit dem diazocinfunktionalisierte Axitinibderivat **Z-73** im Dunkeln, führt dies nur zu minimalen Phosphorylierungsunterschieden in Bezug auf DMSO. Eine

Wiederholung des Experimentes bei gleichzeitiger Bestrahlung von **73** mit 405 nm vor Beginn der Reaktion resultiert in einer leichten Zunahme an wenig phosphorylierten Peptiden (blau) und einer leichten Abnahme an stark phosphorylierten Peptiden (rot) im Vergleich zu Z-**73** (dunkel) bzw. DMSO. Weiterhin lässt sich beim Vergleich von Z-**73** (dunkel) und **73** (PSS 405 nm) eine geringe Verschiebung des grünen und gelben Bereiches erkennen. Im Vergleich zu dem Bestrahlungsexperiment von (Z)-Axitinib (Kapitel 3.1, Abb. 3.21b) fallen die beschriebenen Unterschiede vor und nach Bestrahlung jedoch gering aus.

Dies verdeutlicht auch die Darstellung der Ergebnisse als Volcano-Plot. So führt die Behandlung des HUVEC-Lysates mit bestrahltem Diazocin **73** insgesamt nur zu fünf signifikant veränderten Phosphorylierungen (rote Quadrate, $\log_2(p\text{-Wert}) > 1.3$) im Vergleich zu DMSO, während die Zugabe von (E)-Axitinib (**E-30**) zu einer Vielzahl an signifikant weniger phosphorylierten Peptiden führt. Für Z-**73** (dunkel) bestätigt sich die qualitative Aussage der Heatmap. So sind in Bezug zur Negativkontrolle (DMSO) keine signifikant veränderten Phosphorylierungen zu beobachten.

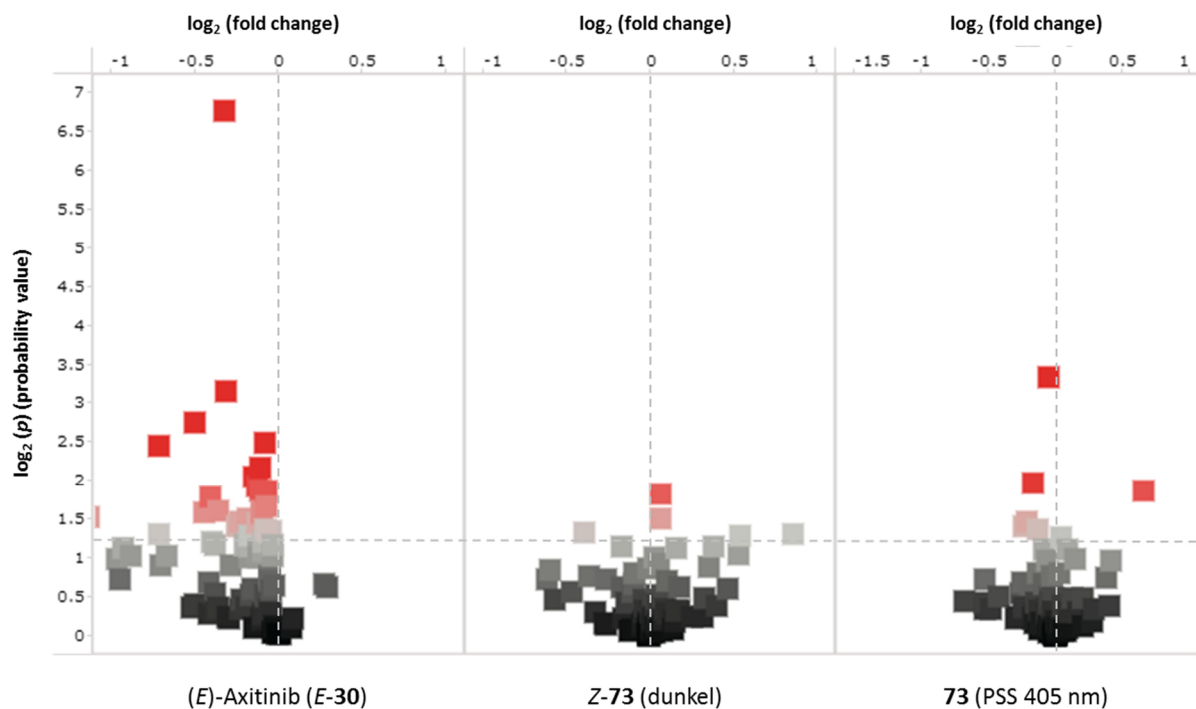


Abb. 3.58. Darstellung der mittels PamGene-Technik gemessene Phosphorylierungsaktivität von HUVEC-Lysaten als Volcano-Plots. Rote Quadrate im linken oberen Quadranten stehen für signifikant weniger phosphorylierte Peptide nach Behandlung mit dem jeweiligen Inhibitor im Vergleich zu DMSO. Graue und schwarze Quadrate unterhalb der gestrichelten Linie stehen für nicht-signifikant veränderte Phosphorylierungen ($\log_2(p\text{-Wert}) < 1.3$). Links: Behandlung des HUVEC-Lysats mit (E)-Axitinib (**E-30**, 1 μM). Mitte: Behandlung mit Z-**73** (20 μM). Rechts: Bestrahlung von **73** mit 405 nm vor der Behandlung (20 μM , ca. 47 % E-Isomer).^[160]

3.3 Azologisierung von Imatinib und Nilotinib

In einem weiteren Teilprojekt wurden die beiden zugelassenen Kinaseinhibitoren Imatinib (**28**) und Nilotinib (**29**) „azologisiert“. Dazu wurde die Amidbindung der *N*-Arylbenzamidstruktur dieser beiden verwandten Inhibitoren durch eine Azobindung ersetzt (vgl. Abb. 2.3). Ziel dabei war es, im Vergleich zu den bisherigen Ansätzen, die photoschaltbare Einheit tiefer in der ATP-Bindetasche zu platzieren, um möglichst große Effekte auf die Bindungsaffinität durch die *E/Z*-Isomerisierung zu erzielen.

Eine biologische Evaluierung photoschaltbarer Imatinibderivate im Rahmen einer wissenschaftlichen Arbeit ist bisher nicht literaturbekannt. Allerdings ist die Synthese einiger azofunktionalisierter Imatinibderivate bereits in einem chinesischen Patent beschrieben.^[214] Photochemische und biologische Daten dieser Verbindungen sind jedoch nicht verfügbar.

3.3.1 Molecular Modeling

Imatinib (**28**) und Nilotinib (**29**) sind klassische Vertreter der Typ-II Kinaseinhibitoren und binden an die inaktive DFG_{out}-Konformation der Zielkinasen. Der Pyridinrest bindet jeweils an die *Hinge*-Region der Kinase, während der Aminopyrimidinrest eine weitere Wasserstoffbrücke im hinteren Bereich der ATP-Bindetasche ausbildet. Die *N*-Arylbenzamidstruktur besetzt die nur in der DFG_{out}-Konformation zugängliche tiefe Bindetasche (*deep pocket*) und bildet dort zwei weitere Wasserstoffbrücken aus. Die sog. „magische“ Methylgruppe des zentralen Phenylringes führt zu einer dihedralen Verdrehung der Aromaten zueinander (Atropisomerie) und ermöglicht so den optimalen Zugang zur tiefen Bindetasche (Abb. 3.59a).

Amide eignen sich aufgrund ihres partiellen Doppelbindungscharakters und der damit einhergehenden Planarität der Amidbindung grundsätzlich sehr gut für eine Azologisierung.^[2] Im Falle von Imatinib und Nilotinib ist jedoch zu beachten, dass durch eine Azologisierung voraussichtlich zwei Wasserstoffbrücken zum Protein verloren gehen. Möglicherweise könnte jedoch die Wasserstoffbrückenakzeptor-Funktion der Amidbindung von der Azobindung übernommen werden. Darüber hinaus ist die NH-Funktion (H-Brücken-Donor) und die Carbonylfunktion (H-Brücken-Akzeptor) der Amidbindung von Nilotinib interessanterweise im Vergleich zu Imatinib vertauscht, sodass von einer gewissen Toleranz in Bezug auf strukturelle Veränderungen in diesem Bereich der Bindetasche ausgegangen werden kann.

Für den Bindemodus von Imatinib (**28**) in der ATP-Bindetasche der Tyrosinkinase ABL1 (PDB: 2HYY) wurde mittels *Glide*-Docking ein Docking Score von -13.9 berechnet (Tab. 3.12). Für das azologisierte Derivat *E*-**81** wird ein sehr ähnlicher Bindemodus berechnet, wobei die beiden Wasserstoffbrücken im Bereich der tiefen Bindetasche erwartungsgemäß verloren gehen (Abb. 3.59b). Eine Wasserstoffbrückenbindung zur Azo-Funktion (H-Brücken-Akzeptor) wird nicht gefunden. Da die Inhibitoren ansonsten in einer sehr ähnlichen Konformation binden, wird der Bindemodus von (*E*)-Azoimatinib (*E*-**81**) trotz des Verlustes der Wasserstoffbrückenbindungen mit einem hohen Docking Score von -13.1 bewertet (Abb. 3.59c). Für *Z*-**81** wird bei vorgegebenem Wasserstoffbrückenmuster des *Hinge-Binders* kein Bindemodus gefunden, da der Azobenzolrest in *Z*-Konfiguration nicht in die schmale tiefe Bindetasche passt (Abb. 3.59d) und so das gesamte Molekül aus der Bindetasche gedrängt wird.

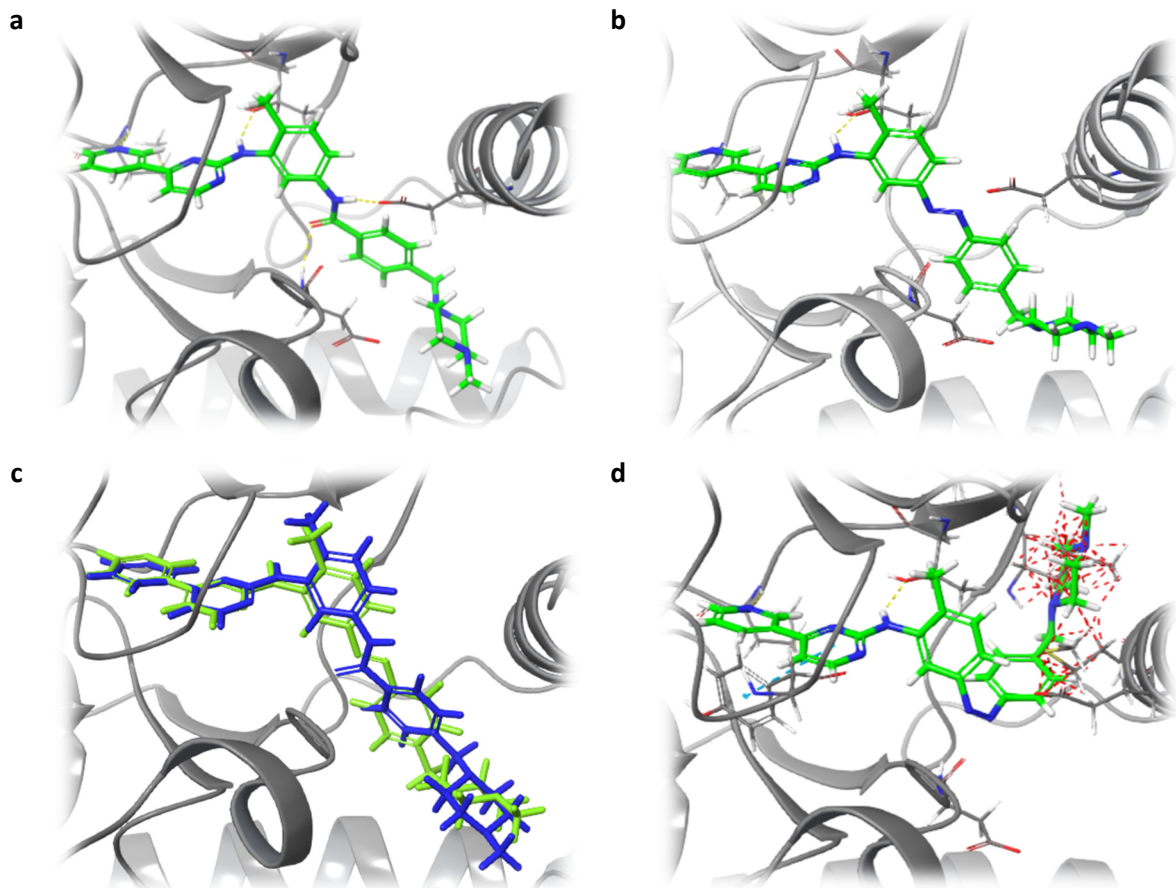


Abb. 3.59 **a)** Bindemodus von Imatinib (**28**) in der DFG_{out}-Konformation der Tyrosinkinase ABL1 (PDB: 2HYY).^[215] Docking Score: -13.9. **b)** Berechneter Bindemodus von (*E*)-Azoimatinib (*E*-**81**) in der Bindetasche von ABL1. Das azologisierte Derivat nimmt grundsätzlich den gleichen Bindemodus ein wie Imatinib (**28**). Durch den Austausch der Amidbindung gehen jedoch die beiden Wasserstoffbrücken zu den Aminosäuren Glu-286 und Asp-381 verloren. Docking Score: -13.1. **c)** Superposition der Bindemodi von Imatinib (**28**, blau) und Azoimatinib (*E*-**81**, grün). **d)** Illustrative Überlagerung von (*Z*)-Azoimatinib (*Z*-**81**) und ABL1. In der *Z*-Konfiguration kann der Azobenzolrest nicht die tiefe Bindetasche der DFG_{out}-Konformation besetzen. Die Überlagerung mit dem Protein führt zu erheblichen sterischen Konflikten (rot-gestrichelte Linien). Beim *Glide*-Docking wird kein Bindemodus gefunden.

Eine Verkürzung von Imatinib um den hydrophilen *N*-Methylpiperazinrest wirkt sich nicht negativ auf den berechneten Docking Score aus (-13.9 vs. -14.0). Für das verkürzte Azoimatinibderivat *E*-**80** wurde hingegen ein betragsmäßig kleinerer Docking Score von nur -12.4 berechnet. Eine Bindung von *Z*-**80** wird trotz des verkürzten Arylrestes nicht vorausgesagt (beim *Glide*-Docking wird kein Bindemodus gefunden).

Für das *Glide*-Docking von Nilotinib (**29**) und Azonilotinib (**82**) wurde die PDB-Kristallstruktur 3CS9 der ABL1-Kinase verwendet, da diese mit Nilotinib als Ligand kristallisiert wurde und somit ein ideales Modell darstellt. Entsprechend wurde für Nilotinib (**29**) ein hoher Docking Score von -15.9 erhalten (Abb. 3.60a). Grundsätzlich lassen sich bzgl. der Azologisierung die gleichen Schlüsse wie für Imatinib ziehen. Das azologisierte Derivat *E*-**82** kann in einer ähnlichen Konformation wie die Stammverbindung **29** binden, wobei die Wasserstoffbrückenbindungen der ersetzten Amidbindung verloren gehen und nicht durch die Azobindung kompensiert werden können (Abb. 3.60b/c). Der Unterschied im Docking Score zwischen Nilotinib (**29**) und dem Azoderivat fällt mit einer Differenz von 2.8 etwas größer aus als im Falle von Imatinib und Azoimatinib (Tab. 3.12). Für *Z*-**82** wird kein Bindemodus gefunden, da der endständige Arylrest in *Z*-Konfiguration nicht in die tiefe Bindetasche passt (Abb. 3.60d).

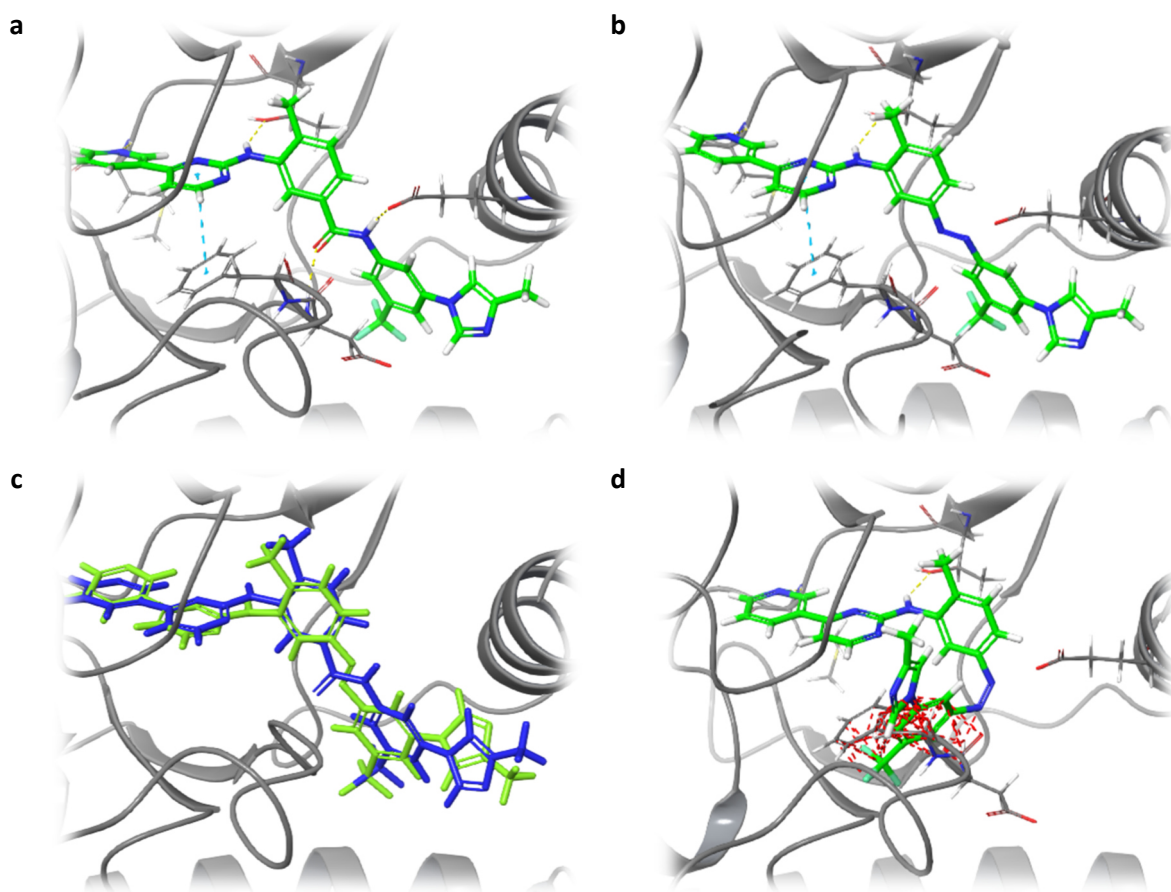


Abb. 3.60 a) Bindemodus von Nilotinib (**29**) in der DFG_{out}-Konformation von ABL1 (PDB: 3CS9).^[216] Docking Score: -15.9 b) Berechneter Bindemodus von (*E*)-Azonilotinib (*E*-**82**) in der Bindetasche von ABL1. Das azologisierte Derivat nimmt grundsätzlich den gleichen Bindemodus wie Nilotinib (**29**) ein. Durch den Austausch der Amidbindung gehen jedoch zwei Wasserstoffbrücken zum Protein verloren. c) Superposition von Nilotinib (**29**, blau) und Azonilotinib (*E*-**82**, grün). Docking Score: -13.1 d) Illustrative Überlagerung von (*Z*)-Azonilotinib (*Z*-**82**) und ABL1. In der *Z*-Konfiguration kann der Azobenzolrest nicht die tiefe Bindetasche der DFG_{out}-Konformation besetzen. Die Überlagerung mit dem Protein führt zu erheblichen sterischen Kollisionen (rot-gestrichelte Linien).

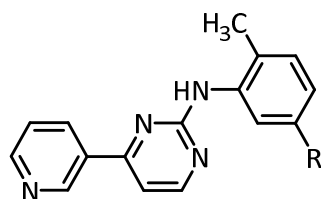
Da eine biologische Testung der photoschaltbaren Inhibitoren zunächst in einem bereits etablierten *in vitro* PDGFR β -Kinaseassay durchgeführt werden sollte, wurde zusätzlich zum Molecular Modeling mit der ABL1 Kinase ein *Glide*-Docking mit einer PDGFR β -Proteinstruktur durchgeführt.

Da die Struktur von humanem PDGFR β bisher jedoch nicht mittels Röntgenkristallographie aufgeklärt werden konnte, wurde für das Molecular Modeling auf ein bestehendes Homologiemodell zurückgegriffen. Dieses Homologiemodell beruht auf der Kristallstruktur der verwandten Rezeptor-tyrosinkinase c-Kit und der PDGFR β -Aminosäuresequenz und wurde von Schlosser im Rahmen seiner Dissertation erstellt.^[217,218]

Beim *Glide*-Docking von Imatinib (**28**) und Nilotinib (**29**) sowie den Azoderivaten **79-82** wurden betragsmäßig etwas niedrigere Docking Scores berechnet als für ABL1 (Tab. 3.12). Tendenziell konnten die Ergebnisse des ABL1-Modelings jedoch weitestgehend für PDGFR β bestätigt werden. So führt auch hier die Azologisierung von Imatinib (**28**) nur zu einer geringfügigen Verschlechterung der berechneten Bindeaffinität. Auffällig ist jedoch, dass für Azonilotinib (**82**) auch in *E*-Konfiguration kein Bindemodus gefunden wird, da sich die tiefe Bindetasche im PDGFR β -Homologiemodell leicht von der im verwendeten ABL-Modell unterscheidet.

Tab. 3.12 Übersicht der azoligierten Imatinib- und Nilotinibderivate sowie berechnete Docking Scores des jeweiligen *E*- und *Z*-Isomers im Vergleich zu Imatinib (**28**) bzw. Nilotinib (**29**). Es wurde ein standardmäßiges *Glide*-Docking sowohl für die ABL1 Kinase (PDB: 2HYY bzw. 3CS9) als auch für PDGFR β (Homologiemodell basierend auf PDB: 1T46) durchgeführt.

*: Kein Bindemodus gefunden.



#	Rest (R)	Docking Score (ABL1)		Docking Score (PDGFR β)	
		<i>E</i> -Isomer	<i>Z</i> -Isomer	<i>E</i> -Isomer	<i>Z</i> -Isomer
28		-13.9 ^a		-12.1	
29		-15.9 ^b		-11.9	
79		-14.0 ^a		-11.9	
80		-12.4 ^a	*	-11.5	*
81		-13.1 ^a	*	-11.6	*
82		-13.1 ^b	*	*	*

^a: basierend auf der Kristallstruktur 2HYY

^b: basierend auf der Kristallstruktur 3CS9

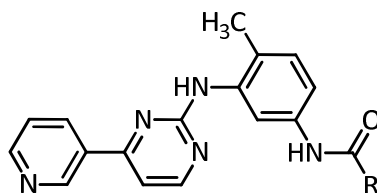
Zusätzlich zur direkten Azologisierung der Amidbindung wurde eine weitere Serie an photoschaltbaren Imatinib- bzw. Nilotinibderivaten unter Erhalt der Amidbindung generiert. Dazu wurde der gemeinsame Grundbaustein **89** formal mit carboxysäurefunktionalisierten Diazocinen und Azobenzolen gekuppelt (Tab. 3.13). Diese Serie hat den Vorteil, dass die Wasserstoffbrückenbindungen in der tiefen Bindetasche erhalten blieben, bringt jedoch den Nachteil mit sich, dass die photoschaltbare Einheit lediglich an der zum Solvens hin gelegenen Öffnung der Bindetasche sitzt und die endständigen Arylreste des Photoschalters zum Teil aus der Bindetasche herausragen.

Das *Glide-Docking* der Verbindungen **83-88** wurde erneut sowohl für die ABL1 Kinase als auch für PDGFR β durchgeführt (Tab. 3.13). Für die in *meta*-Position zur Azobindung verknüpften Derivate **83** und **85** wurde in *E*-Konfiguration jeweils ein plausibler Bindemodus gefunden, während in *Z*-Konfiguration keine Bindung möglich ist. Die Verbindungen *E*-**83** und *E*-**85** weisen dabei ähnlich hohe Docking Scores auf wie die Stammverbindung Imatinib (**28**, Tab. 3.12). Die Beobachtungen gelten gleichermaßen für ABL1 und PDGFR β . Im Gegensatz dazu wurde für das verwandte Azobenzolderivat **84** sowohl in *E*- als auch in *Z*-Konfiguration ein energetisch günstiger Bindemodus gefunden.

Für die in *para*-Position zur Azobindung substituierten Verbindungen **86-88** wird sowohl in *E*- als auch in *Z*-Konfiguration eine Bindung an ABL1 vorausgesagt. Beim Docking der Verbindungen in die Bindetasche von PDGFR β wird hingegen überraschenderweise für *E*-**87** und *E*-**88** kein Bindemodus gefunden, während für die entsprechenden *Z*-Isomere jeweils ein günstiger Bindemodus mit einem hohen Docking Score vorausgesagt wird. Dies lässt sich folgendermaßen erklären: Durch die *para*-Substitution ergibt sich in der *E*-Konfiguration ein relativ starres System aus drei Arylresten, die über die Amid- und Azobindung verbunden sind und nahezu linear die schlauchförmige tiefe Bindetasche besetzen. Der endständige *N*-Methylpiperazinrest kollidiert im Falle von PDGFR β in *E*-Konfiguration am Ausgang der tiefen Bindetasche mit einer Proteinschleife des C-terminalen *lobes* (Abb. 3.61b). In der ABL1 Kristallstruktur ist die genannte Proteinschleife anders gefaltet, sodass hier eine Bindung in *E*-Konfiguration möglich ist (Abb. 3.61b). In *Z*-Konfiguration knickt der Azobenzolrest am Ausgang der tiefen Bindetasche ab und vermeidet so eine Kollision mit der Proteinschleife. Die Verbindungen **87** und **88** stellen damit die bisher einzigen untersuchten Verbindungen dar, die auf Grundlage des Molecular Modelings in der metastabilen *Z*-Konfiguration vermeintlich biologisch aktiv und in der *E*-Konfiguration inaktiv sind.

Tab. 3.13 Übersicht der azobenzol- und diazocinifunktionalisierten Imatinib- und Nilotinibderivate sowie berechnete Docking Scores des jeweiligen *E*- und *Z*-Isomers. Es wurde ein standardmäßiges *Glide*-Docking sowohl für die ABL1 Kinase (PDB: 2HYY) als auch für PDGFR β (Homologiemodell basierend auf PDB: 1T46) durchgeführt. Als notwendiges Kriterium für einen erlaubten Bindemodus wurden alle vier Wasserstoffbrückenbindungen des Imatinibpharmakophors definiert.

✖: Kein Bindemodus gefunden.



#	Rest (R)	Docking Score (<i>Glide</i>)			
		ABL1		PDGFR β	
		<i>E</i> -Isomer	<i>Z</i> -Isomer	<i>E</i> -Isomer	<i>Z</i> -Isomer
83		-14.1	✖	-12.4	✖
84		-12.8	-14.9	-12.1	-12.8
85		-14.0	✖	-12.2	✖
86		-13.6	-11.7	-11.8	-11.2
87		-12.9	-12.6	✖	-12.4
88		-13.3	-14.1	✖	-12.3

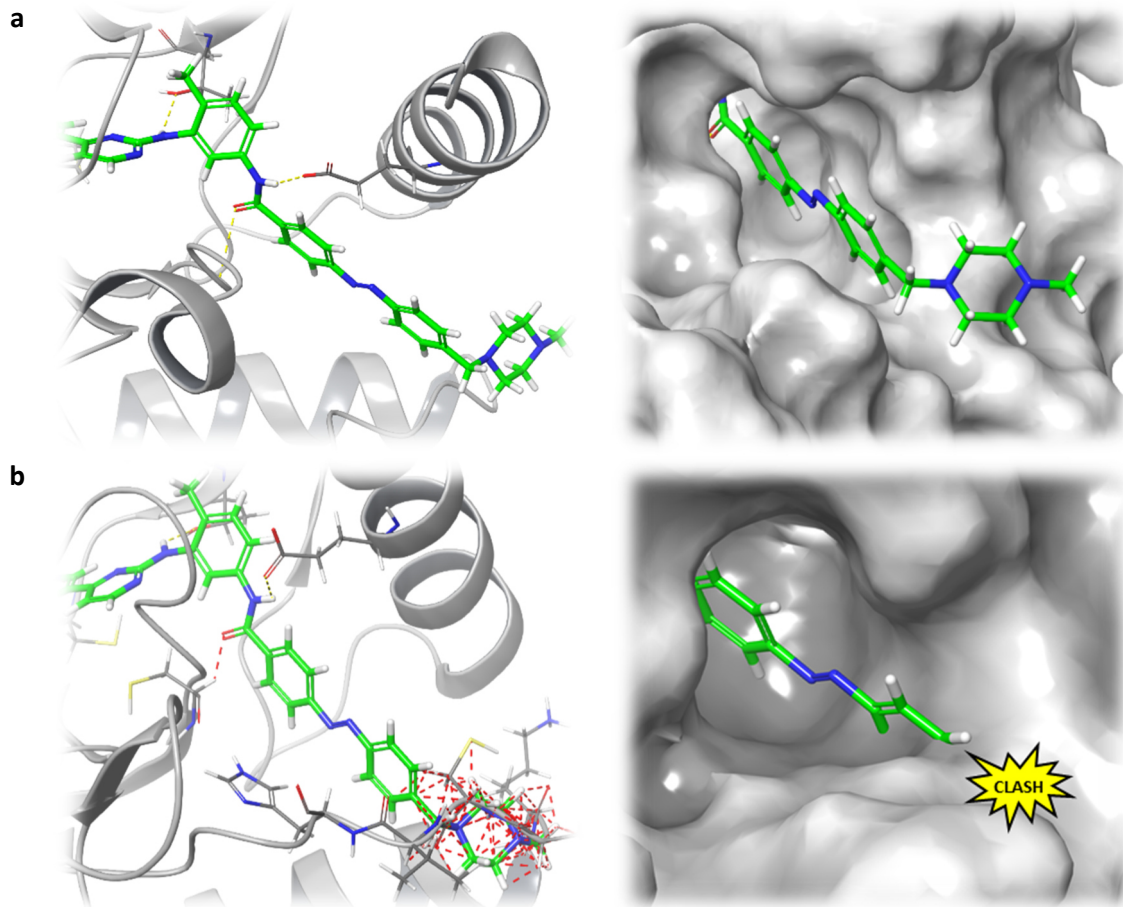


Abb. 3.61 a) Berechneter Bindemodus des azobenzolfunktionalisierten Imatinibderivates **88** in der DFG_{out}-Konformation der ABL1 Kinase (PDB: 2HYY). Gelb-gestrichelte Linien: Wasserstoffbrückenbindungen. Docking Score: -13.3 **b)** Illustrative Überlagerung des azobenzolfunktionalisierten Imatinibderivates **88** mit der DFG_{out}-Konformation von PDGFR β (Homologiemodell basierend auf PDB: 1T46). Der endständige *N*-Methylpiperazinrest kollidiert am Ausgang der tiefen Bindetasche mit einer Proteinschleife des C-terminalen lobes (rot-gestrichelte Linien). Beim *Glide*-Docking wird kein Bindemodus gefunden. Jeweils *links*: Kartoon-Darstellung des Proteins, *rechts*: Darstellung der molekularen Proteinoberfläche (grau).

Für diejenigen Konfigurationen der Verbindungen **83-88**, bei denen mit dem standardmäßigen *Glide*-Docking kein Bindemodus gefunden werden konnte, wurde zusätzlich erneut ein *Induced-Fit*-Docking durchgeführt. Dabei wurden die *Glide*-Docking Ergebnisse für das diazocinfunktionalisierte Imatinibderivat **83** etwas relativiert. Behandelt man die Aminosäuren 380-383 beim *Induced-Fit*-Docking als flexibel, so wird auch für **Z-83** ein Bindemodus mit einem hohen Docking Score von -14.5 gefunden (Abb. 3.62). Für die übrigen Verbindungen **Z-85** sowie **E-87** und **E-88** konnte hingegen auch im *Induced-Fit*-Modus kein Bindemodus gefunden werden.

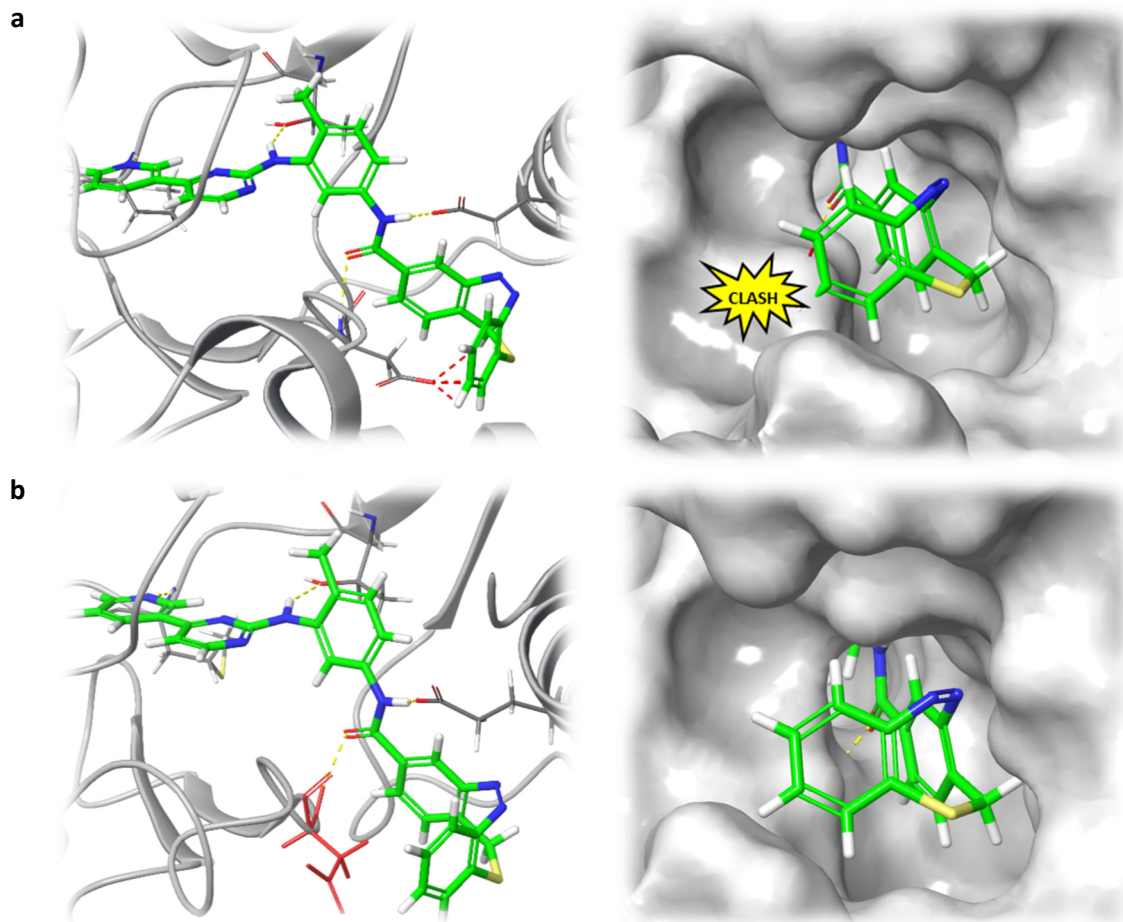


Abb. 3.62 a) Illustrative Überlagerung des diazocinfunktionalisierten Imatinibderivates **Z-83** und ABL1 (PDB: 2HYY). Der Diazocin-Baustein kollidiert mit der Aminosäureseitenkette Asp-381 (rot-gestrichelte Linien). Beim *Glide*-Docking wird kein Bindemodus gefunden. **b)** Mittels *Induced-Fit*-Docking berechneter Bindemodus von **Z-83** in der Bindetasche der ABL1 Kinase. Durch eine Reorientierung der Aminosäureseitenkette Asp-381 (rot) ist eine Bindung des Liganden in Z-Konfiguration möglich. Docking Score: -14.5. Jeweils *links*: Cartoon-Darstellung des Proteins, *rechts*: Darstellung der molekularen Proteinoberfläche (grau). Gelb-gestrichelte Linien: Wasserstoffbrückenbindungen.

3.3.2 Synthesen

Die Synthese von Azoimatinib (**81**) und Azonilotinib (**82**) wurde ausgehend von dem kommerziell erhältlichen Aminopyrimidin-Baustein **89** via Baeyer-Mills-Reaktion realisiert. Dazu wurde zunächst eine Testreaktion mit Nitrosobenzol durchgeführt und das verkürzte Azoimatinibderivat **80** synthetisiert (Abb. 3.63). Bei dieser Baeyer-Mills-Reaktion konnte eine Ausbeute von 70 % erzielt werden. Für eine Einordnung der biologischen Aktivität wurde zusätzlich das entsprechende verkürzte Imatinibderivat **79** via Amidkupplung mit Benzoesäure synthetisiert. Unter Verwendung von Carbonyldiimidazol (CDI) als Kupplungsreagenz konnte hier eine Ausbeute von 79 % erzielt werden.

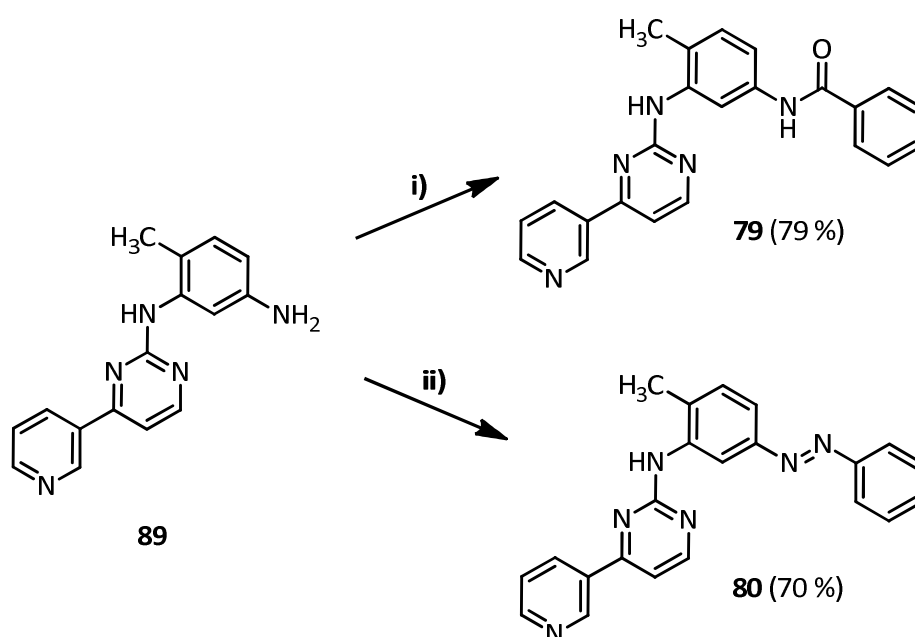


Abb. 3.63 Synthese des verkürzten Imatinibderivates **79** sowie des entsprechenden Azoderivates **80**. i) 1. CDI, DMF, 30 min Raumtemp., 2. Benzoesäure, 17 h 70 °C. ii) Nitrosobenzol, Eisessig, 48 h Raumtemp.

Um analog Azoimatinib (**81**) zu synthetisieren, wird die Nitrosoverbindung 1-Methyl-4-(4-nitrosobenzyl)piperazin (**94**) benötigt. Dazu wurde als erstes die entsprechende Nitroverbindung 1-Methyl-4-(4-nitrobenzyl)piperazin (**92**) nach literaturbekannten Methoden synthetisiert (Abb. 3.64), zum einen über eine reduktive Aminierung ausgehend von 4-Nitrobenzaldehyd (**90a**) und zum anderen über eine nukleophile Substitution unter Verwendung von 1-(Bromomethyl)-4-nitrobenzol (**90b**).^[219] Letztgenannter Weg erwies sich als praktikabler und lieferte mit 70 % eine bessere Ausbeute.

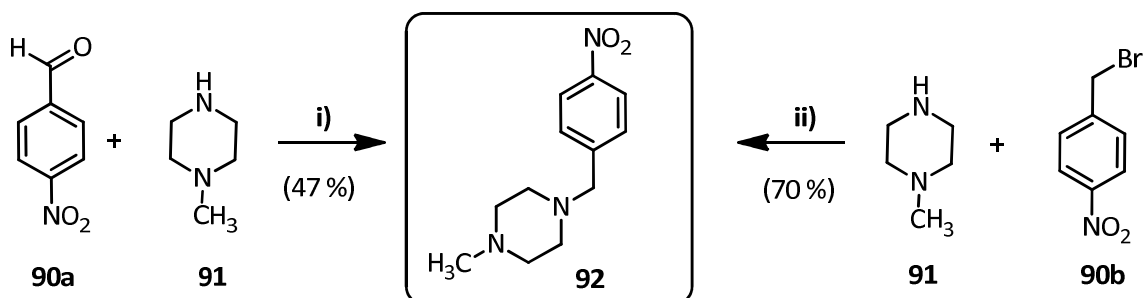


Abb. 3.64 Synthese von 1-Methyl-4-(4-nitrobenzyl)piperazin (**92**). i) 1. Essigsäure, THF, 30 min Raumtemp.; 2. NaBH(OAc)₃, 12 h Raumtemp ii) K₂CO₃, DMF, 12 h Raumtemp.

Die selektive Reduktion der Nitro-Verbindung **92** zum Amin **93** ist aufgrund des zusätzlichen benzylistischen Amins erschwert. Eine standardmäßige Hydrierung führt zur Spaltung der Verbindung in die zwei Bestandteile Methylpiperazin und *p*-Toluidin. Durch Zusatz von konz. Salzsäure und eine verkürzte Reaktionszeit kann jedoch eine Spaltung des Benzylamins unterdrückt werden.^[220] Alternativ konnte die Reduktion auch mit elementarem Eisen realisiert werden.^[219] Beide Reaktionswege liefern das Amin jedoch nur in schlechter Ausbeute.

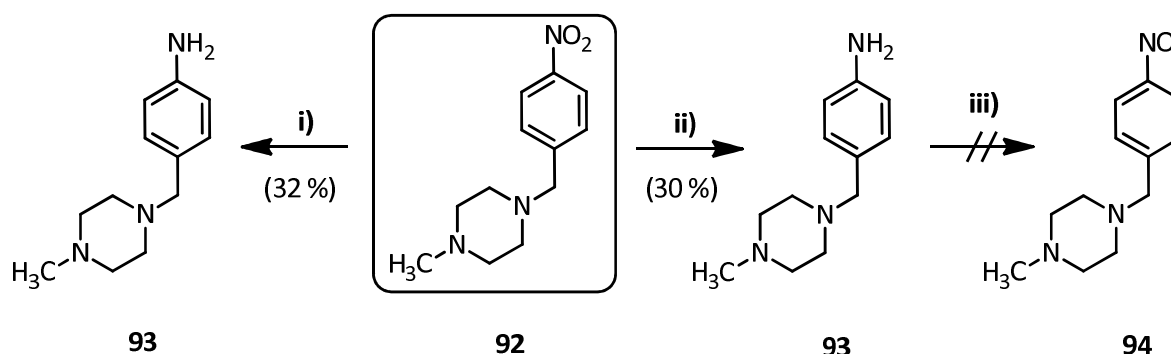


Abb. 3.65 Synthese von 4-[(4-Methylpiperazin-1-yl)methyl]anilin (**93**). i) H₂ (1 atm.), Pd/C, MeOH, konz. HCl, 45 min Raumtemp. ii) Fe, NH₄Cl, THF, MeOH, Wasser, 66 h 90 °C. iii) wässr. KHSO₅-Lsg (Oxon®), DCM, 6 h Raumtemp.

Die anschließende partielle Oxidation des Amins **93** zur entsprechenden Nitrosoverbindung **94** gelang in dem gängigen Zwei-Phasen-System aus wässriger Kaliumperoxomonosulfat-Lösung (Oxon®) und Dichlormethan nicht. Wahrscheinlich weist der (protonierte) Piperazinrest eine zu hohe Wasserlöslichkeit auf, sodass die gebildete Nitrosokomponente nicht in die Dichlormethanphase übergeht und in der wässr. Phase überoxidiert wird.

Da die Nitrosokomponente **94** oxidativ aus dem Amin nicht erhalten werden konnte, wurde stattdessen die Nitroverbindung **92** durch Reduktion mit Zink in das entsprechende Hydroxylamin überführt und anschließend unter Verwendung von Eisen(III)chlorid zum Nitrosobenzol **94** oxidiert

(Abb. 3.66). Die Reinigung und Isolierung der Nitrosoverbindung gelang jedoch nicht. Problematisch ist nicht nur die vermeintlich mäßige Stabilität der Nitrosfunktion, sondern auch die hohe Polarität und Hydrophilie des Piperazinrestes, die eine Reinigung an Kieselgel sowie eine wässr. Aufarbeitung erschwert. Aus diesem Grund wurde die Nitrosokomponente *in situ* mit dem Aminopyrimidin-Baustein **89** umgesetzt. Nachteil dieser Vorgehensweise ist, dass die Nitrosokomponente auch mit dem Hydroxylamin **95** des Rohproduktes reagiert und es zur unerwünschten Bildung des entsprechenden Homo-Azoxyproduktes kommt. Azoimatinib wurde schließlich, bezogen auf die eingesetzte Menge an 1-Methyl-4-(4-nitrobenzyl)piperazin (**92**), über die dreistufige Syntheseroute in einer Ausbeute von 8 % erhalten.

Aufgrund der relativ schlechten Wasserlöslichkeit von Azoimatinib (**81**) wurde ein Teil der Verbindung in das entsprechende Mesylat überführt. Dazu wurde die freie Base **81** in Ethylmethyketon (MEK) gelöst und durch tropfenweise Zugabe von Methansulfonsäure als Mesylat ausgefällt.

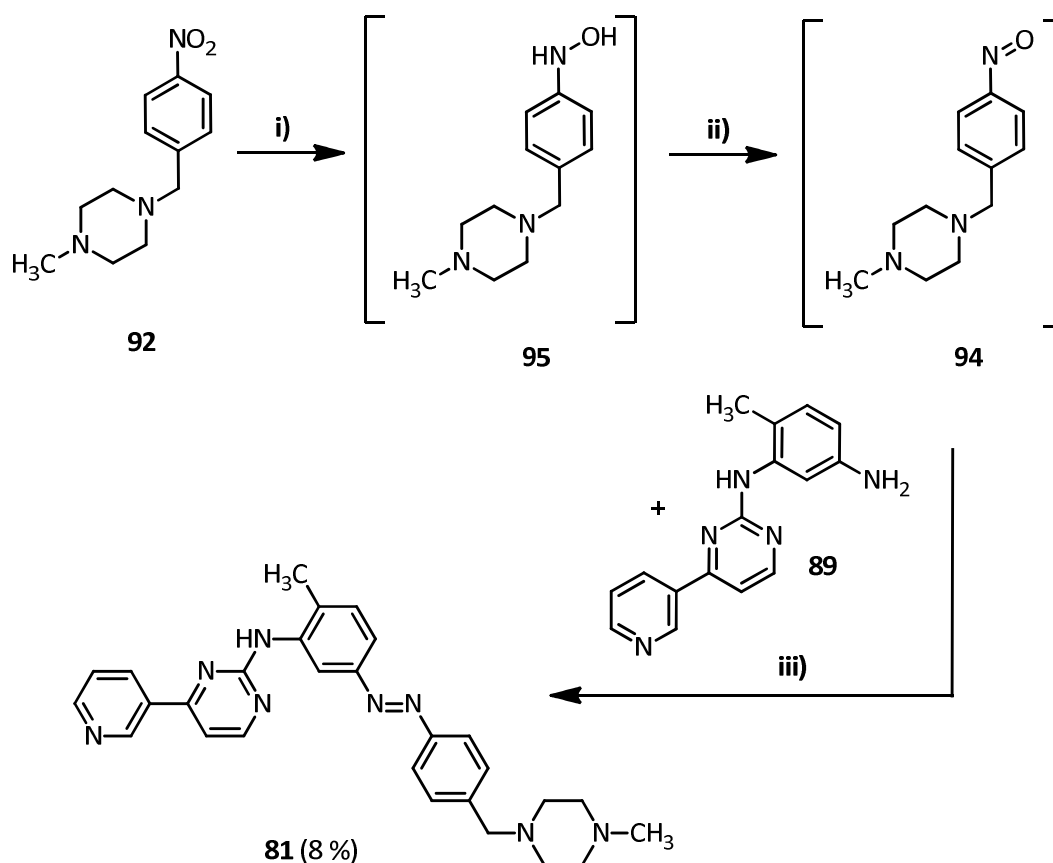


Abb. 3.66 Synthese von Azoimatinib (**81**) via Baeyer-Mills-Reaktion. i) Zink, NH_4Cl , $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$, 3 h 65 °C. ii) FeCl_3 , H_2O , 30 min 0 °C. iii) Eisessig, 36 h Raumtemp.

Für die Synthese von Azonilotinib (**81**) wurde analog zum bereits beschriebenen Weg versucht, die entsprechende Nitrosoverbindung **97** zu erzeugen und mit dem Aminopyrimidin-Baustein **89** im Sinne einer Baeyer-Mills-Reaktion umzusetzen. Die partielle Oxidation des Anilinderivates **96** zur Nitrosokomponente gelang jedoch mit verschiedenen Oxidationsmitteln ebenfalls nicht (Tab. 3.14). Durch Umsatz mit Kaliumperoxomonosulfat (Oxon®) im Zwei-Phasen-System aus Dichlormethan und Wasser konnte massenspektroskopisch lediglich die entsprechende Nitroverbindung **98** und die Azoxyverbindung **99** nachgewiesen werden. Eine Oxidation mit *m*CPBA führte zur gleichen Produktverteilung. Auch bei Verwendung von Wasserstoffperoxid mit Molybdän(VI)-oxid oder Selendioxid als Katalysator konnte lediglich die Nitroverbindung **98** nachgewiesen werden. Eine Oxidation mit Caro'scher Säure führte zu keinem Stoffumsatz.

Tab. 3.14 Übersicht verwendeter Oxidationsmittel zur Darstellung der Nitrosoverbindung **97**.

[Ox.]	Lösungsmittel	Temp.	Reaktionsdauer	Produkt(e)	Vorschrift
Oxon®	DCM/H ₂ O	Raumtemp.	4 h	98, 99	Priewisch <i>et al.</i> ^[206]
<i>m</i> CPBA	DCM	0 °C	4 h	98, 99	Bleasdale <i>et al.</i> ^[221]
H ₂ O ₂ /MbO ₃	MeOH/H ₂ O	Raumtemp.	48 h	98	Defoin ^[222]
H ₂ O ₂ /SeO ₂	DCM	Raumtemp.	48 h	98	Priewisch <i>et al.</i> ^[206]
H ₂ O ₂ /H ₂ SO ₄	H ₂ O	Raumtemp.	48 h	✗	Holmes <i>et al.</i> ^[223]

Da die Synthese und Isolierung der Nitrosoverbindung **97** nicht gelang, wurde das Amin **96** direkt mit dem Aminopyrimidin-Baustein **89** unter Sauerstoffatmosphäre mit CuBr als Katalysator umgesetzt. Da unter diesen Bedingungen auch die beiden symmetrischen Azobenzolderivate sowie weitere Nebenprodukte wie die entsprechenden Azoxyverbindungen gebildet werden, konnte Azonilotinib (**82**) lediglich in einer Ausbeute von 6 % isoliert werden.

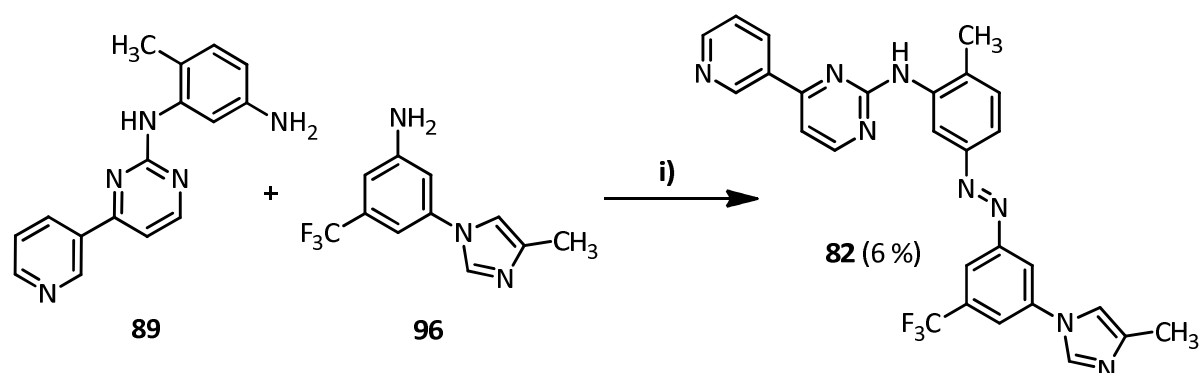


Abb. 3.67 Synthese von Azonilotinib (**82**). i) O₂, CuBr, Pyridin, Toluol, 24 h 60 °C.

Neben Azoimatinib (**81**) und Azonilotinib (**82**) wurden zwei weitere photoschaltbare Derivate unter Erhalt der Amidbindung synthetisiert. Dazu wurde der Aminopyrimidin-Baustein **89** mit dem säurefunktionalisierten Schwefeldiazocin **100** sowie dem säurefunktionalisierten Azobenzolderivat **101** gekuppelt (Abb. 3.68). Die beide Carbonsäuren wurden vom Arbeitskreis Herges zur Verfügung gestellt.^[202,207] Für die Darstellung des diazocinfunktionalisierten Imatinibderivates **83** wurde analog zur Darstellung von Verbindung **79** CDI als Kupplungsreagenz verwendet. Nach 18-stündigem Erhitzen auf 70 °C wurde das Kupplungsprodukt **83** in einer Ausbeute von 65 % erhalten.

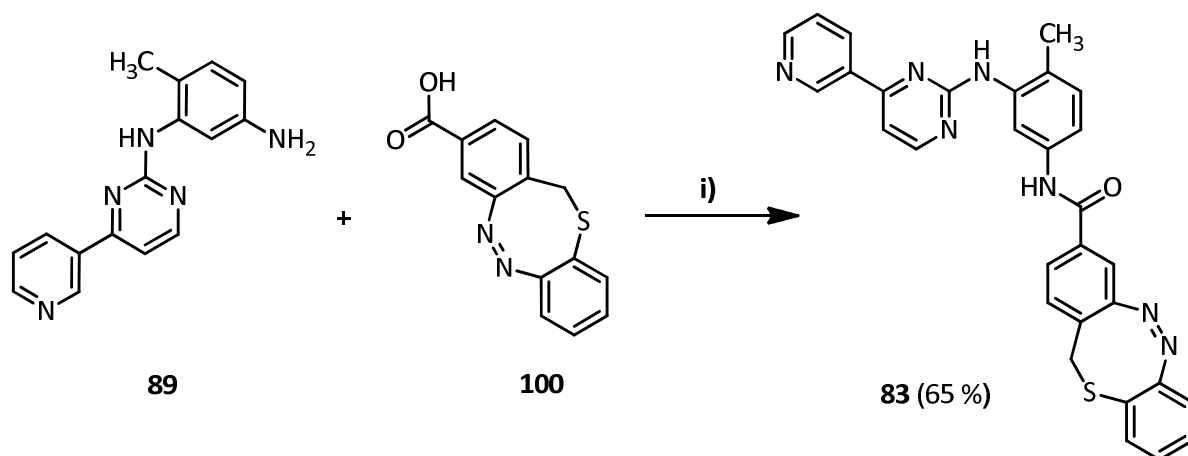


Abb. 3.68 Synthese des diazocinfunktionalisierten Imatinibderivates **83**. i) 1. **100**, CDI, 30 min Raumtemp., 2. **89**, 18 h 70 °C

Da die Kupplung des säurefunktionalisierten Diazocins **100** nur in moderater Ausbeute verlief, wurde für die Kupplung des entsprechenden Azobenzols **101** Propylphosphonsäureanhydrid (T3P) in Ethylacetat als Kupplungsreagenz gewählt (Abb. 3.69). Dabei konnte bei Raumtemp. jedoch ebenfalls nur eine moderate Ausbeute von 52 % erzielt werden. Eine bessere Ausbeute könnte möglicherweise durch Erhöhung der Reaktionstemperatur erzielt werden.

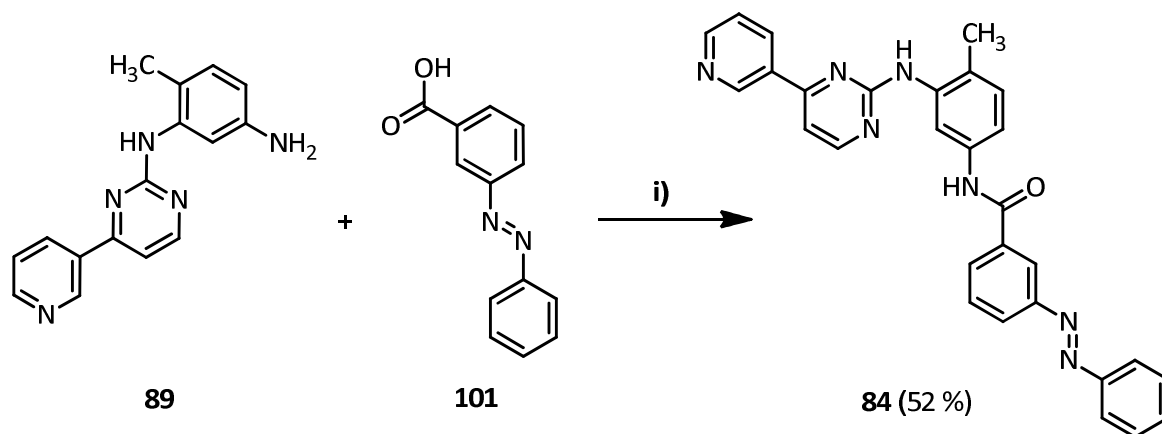


Abb. 3.69 Synthese des azofunktionalisierten Imatinibderivates **84**. i) T3P, DIPEA, EA, 16 h Raumtemp.

3.3.3 Photochemische Charakterisierung

Zur Ermittlung der optimalen Anregungswellenlängen sowie der thermischen Stabilitäten der photoschaltbaren Imatinib- und Nilotinibderivate wurden die synthetisierten Verbindungen UV/VIS-spektroskopisch untersucht. Die Isomerenverteilung im PSS wurde zudem mittels NMR-Spektroskopie bestimmt.

Azoimatinib (**81**) und das um den *N*-Methylpiperazinrest verkürzte Derivat **80** weisen nahezu identische Absorptionsspektren auf. Beide Verbindungen zeigen eine intensive $\pi\pi^*$ -Bande zwischen 300 und 400 nm und lassen sich durch Bestrahlung mit 365 nm zu knapp 70 % in das jeweilige *Z*-Isomer überführen (Abb. 3.70, grüne Kurven). Die mäßige Schalteffizienz ist vermutlich auf den +M-Effekt des Aminosubstituenten zurückzuführen. Elektronenschiebende Substituenten führen oftmals zu einer Erhöhung der π -Orbitalenergie und einer Absenkung der π^* -Orbitalenergie, wodurch es zu einer teilweisen Überlappung der $\pi\pi^*$ -Bande mit der $n\pi^*$ -Bande kommt. Nach UV-Bestrahlung zeigt sich im UV-Spektrum eine schwache $n\pi^*$ -Bande zwischen 420 und 500 nm. Durch Bestrahlung mit 470 nm lässt sich das PSS wieder teilweise in Richtung des *E*-Isomers zurückverschieben (Abb. 3.70, türkise Kurven).

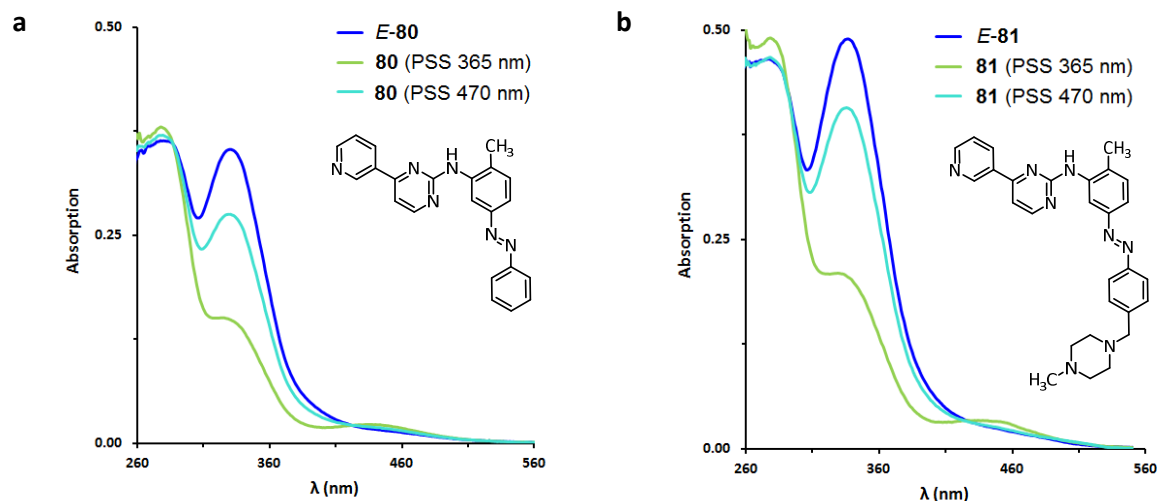


Abb. 3.70 a) UV/VIS-Spektrum von *E*-**80** sowie PSS nach Bestrahlung mit 365 nm und 470 nm in DMSO (20 μ M). **b)** UV/VIS-Spektrum von *E*-**81** sowie PSS nach Bestrahlung mit 365 nm und 470 nm in DMSO (20 μ M).

Durch den Aminosubstituenten lassen sich ebenfalls die im Vergleich zu unsubstituiertem Azobenzol etwas geringeren thermischen Stabilitäten der *Z*-Isomere *Z*-**80** und *Z*-**81** erklären. So wurde mittels UV/VIS-Spektroskopie für Azoimatinib (**81**) in DMSO bei 37 °C eine Halbwertszeit von 10 h ermittelt. Das verkürzte Azoimatinibderivat **80** weist eine Halbwertszeit von 17.4 h auf.

Für Azonilotinib (**82**) wurden ähnliche photochemische Eigenschaften ermittelt wie für die beiden bereits beschriebenen Azoderivate. Durch Bestrahlung mit 365 nm lassen sich 62 % des *Z*-Isomers anreichern. Die optimale Wellenlänge für das Zurückschalten des *Z*-Isomers beträgt ebenfalls 470 nm, wobei auch hier nur eine unvollständige Rückisomerisierung erfolgt (Abb. 3.71). Für die thermische Rückisomerisierung wurde bei 37 °C in DMSO eine Halbwertszeit von 14.3 h ermittelt.

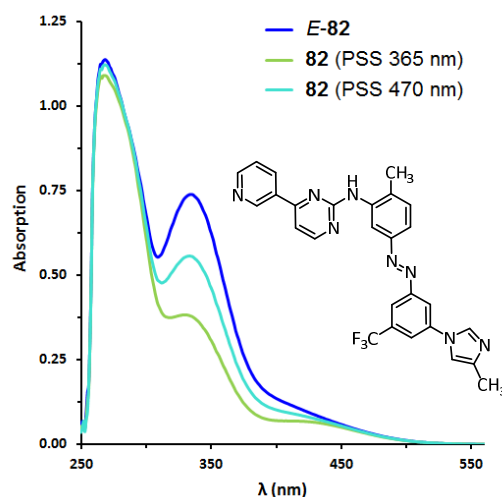


Abb. 3.71 a) UV/VIS-Spektrum von *E*-**82** sowie PSS nach Bestrahlung mit 365 nm und 470 nm in DMSO (40 µM).

Das diazocinfunktionalisierte Imatinibderivat **83** lässt sich analog zu den bereits in Kapitel 3.2 untersuchten Diazocinen mit 405 nm und 530 nm schalten (Abb. 3.72a). Allerdings ist der *E*-Isomerenanteil mit 58 % im PSS nach Bestrahlung mit 405 nm etwas höher als bei den bisher charakterisierten Diazocinen. Bei Bestrahlung mit 530 nm wird auch beim Diazocin **83** quantitative *E* \rightarrow *Z* Isomerisierung erzielt. Die Halbwertszeit liegt mit 6.1 h im gleichen Bereich wie die des diazocinfunktionalisierten Axitinibderivates **73**.

Das entsprechende Azobenzolderivat **84** lässt sich mit 365 nm und 420 nm schalten (Abb. 3.72b). Mit 365 nm können 59 % des *Z*-Isomers angereichert werden. Die Halbwertszeit liegt mit 44.6 h deutlich über der Halbwertszeit der Azobenzolderivate **80-82**.

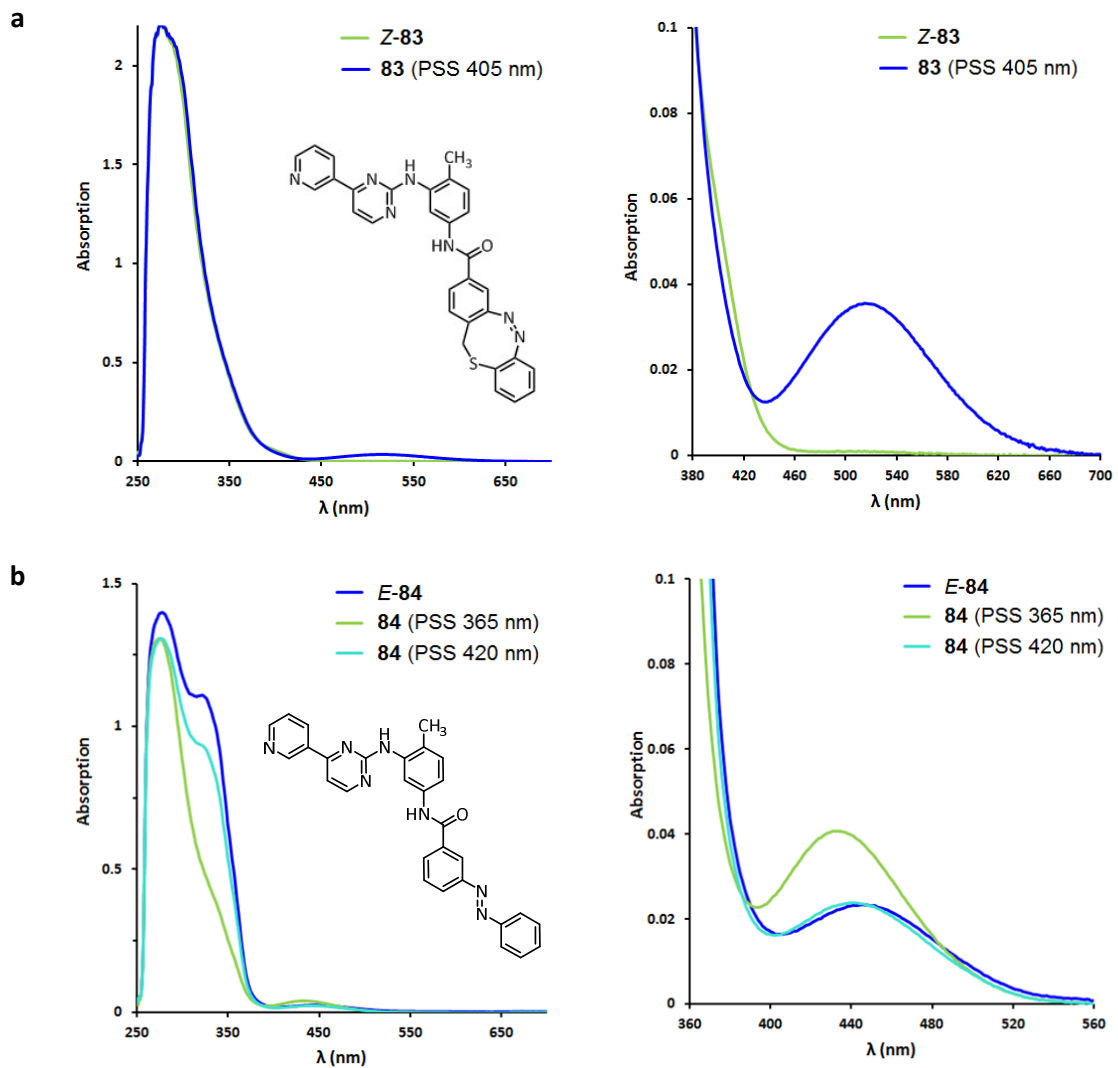


Abb. 3.72 a) UV/VIS-Spektrum von Z-83 in DMSO (100 μ M) sowie PSS nach Bestrahlung mit 405 nm. Das Spektrum nach Bestrahlung mit 530 nm ist deckungsgleich mit dem Spektrum des reinen Z-Isomers und aus Übersichtsgründen nicht gezeigt. **b)** UV/VIS-Spektrum von E-84 in DMSO (40 μ M) sowie PSS nach Bestrahlung mit 365 nm. Jeweils *links*: Vollständiges Spektrum. Jeweils *rechts*: Vergrößerte Ansicht der $n\pi^*$ -Banden.

Die wichtigsten photochemischen Eigenschaften der synthetisierten Verbindungen **80-84** sind nochmals in Tab. 3.15 zusammengefasst.

Tab. 3.15 Photochemische Eigenschaften der azobenzol- und diazocinfunktionalisierten Imatinib- bzw. Nilotinibderivate.

#	λ_{Exc} (nm)	PSS (E/Z %) DMSO, NMR	$t_{1/2}$ (h) DMSO, 37 °C
80	365	31/69	17.4
81	365	32/68	10.0
82	365	38/62	14.3
83	405	58/42	6.1
84	365	41/59	44.6

3.3.4 Biologische Testung

Zur biologischen Charakterisierung der synthetisierten Verbindungen wurde von Heintze ein *in vitro* PDGFR β -Kinaseassay etabliert.^[126] Der verwendete Assay beruht wie der in den vorangegangenen Kapiteln beschriebene VEGFR2-Kinaseassay auf einer hyperphosphorylierten Kinase, die ein spezifisches Substrat unter ATP-Verbrauch phosphoryliert. Bei Zugabe eines Inhibitors wird die im Vergleich zu DMSO verminderte ATP-Umsetzung gemessen.

Die Funktionsweise des Assays ist im Hinblick auf eine Testung von DFG_{out}-Inhibitoren (Typ II, vgl. Kapitel 1.3.1) insofern problematisch, als dass die Kinase dauerhaft in der aktivierten DFG_{in}-Konformation vorliegt und DFG_{out}-Inhibitoren erst nach einer Konformationsänderung der Kinase in der Bindetasche binden können.^[218] Diese generelle Problematik in vielen gängigen Assaysystemen führt dazu, dass DFG_{out}-Inhibitoren gegenüber DFG_{in}-Inhibitoren experimentell bedingt diskriminiert werden und oftmals nur ein Teil der inhibitorischen Wirkung gemessen werden kann. Eine Möglichkeit zur Reduzierung dieser Problematik stellt eine Präinkubation der Kinase mit dem entsprechenden DFG_{out}-Inhibitor vor Beginn der Enzymreaktion dar. Durch die Präinkubation mit dem Inhibitor wird die Konformationsänderung der Kinase induziert und das Gleichgewicht teilweise in Richtung der DFG_{out}-Konformation verschoben. Diese Vorgehensweise wurde von Bethke *et al.* für eine Serie von PDGFR β -Inhibitoren ausführlich untersucht und stellt mittlerweile eine etablierte Methode zur Testung von DFG_{out}-Inhibitoren dar.^[218]

Bei Durchführung einer Präinkubation für die Dauer von 1 h konnten für die Referenzinhibitoren Imatinib und Nilotinib IC₅₀-Werte von 640 nM bzw. 507 nM bestimmt werden. Damit liegt der für Imatinib gemessene IC₅₀-Wert zwar leicht über den in der Literatur angegebenen IC₅₀-Werten (380-607 nM), grundsätzlich kann jedoch von einer Eignung des durchgeführten Kinaseassays für die Testung von DFG_{out}-Inhibitoren ausgegangen werden.^[114,224]

Azoimatinib (**81**) sowie Azonilotinib (**82**) wurden zunächst analog im Dunkeln auf ihre inhibitorische Wirkung gegenüber PDGFR β hin untersucht und mit den entsprechenden Stammverbindung **28** und **29** verglichen. Wie den Dosis-Wirkungskurven aus Abb. 3.73 zu entnehmen ist, zeigt weder **81** noch **82** eine signifikante PDGFR β -Hemmung. Zwar lässt sich für beide Inhibitoren im mikromolaren Konzentrationsbereich eine leichte dosisabhängige Abnahme der Kinaseaktivität beobachten, die gemessene Restaktivität der Kinase liegt jedoch jeweils oberhalb von 50 %. Da experimentell bedingt auch für die Referenzinhibitoren Imatinib (**28**) und Nilotinib (**29**) nur vergleichsweise hohe IC₅₀-Werte

messbar sind, ist davon auszugehen, dass der Wirkungsbereich der azoligisierten Derivate vermutlich oberhalb der höchsten eingesetzten Testkonzentration von 10 μM liegt.

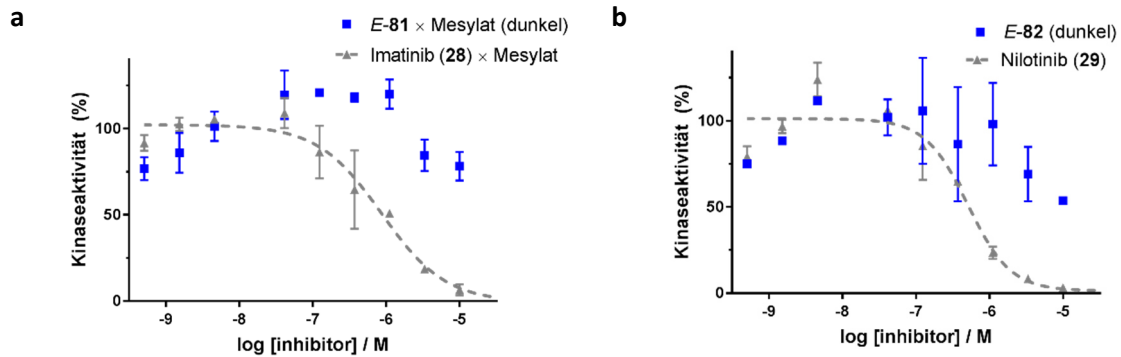


Abb. 3.73 Dosis-Wirkungs-Kurven von Azozimatinib (**81**) und Azonilotinib (**82**) in einem *in vitro* PDGFR β -Kinaseassay bei einer DMSO-Konzentration von 1 %. **a)** E-**81** x Mesylat im Dunkeln (blau, IC₅₀ > 10000 nM) im Vergleich zu Imatinib x Mesylat (**28**, grau-gestrichelt, IC₅₀ = 865 nM, R² = 0.95). **b)** E-**82** im Dunkeln (blau, IC₅₀ > 10000 nM) im Vergleich zu Nilotinib (**29**) (grau-gestrichelt, IC₅₀ = 507 nM, R² = 0.93). Die Datenpunkte stellen jeweils Mittelwerte aus Doppelbestimmungen dar. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.^[126]

Das verkürzte Imatinibderivat **79** zeigt im PDGFR β -Kinaseassay im Vergleich zu Imatinib (**28**) nur eine äußerst schwache Kinasehemmung (Abb. 3.74). Dies steht im Kontrast zum Molecular Modeling, nach dem der *N*-Methylpiperazinrest keinen nennenswerten Beitrag zur Bindeaffinität beisteuert. Nicht auszuschließen ist jedoch, dass durch das Fehlen des hydrophilen Heterozyklus und der daher nicht möglichen Mesylatbildung auch eine begrenzte Löslichkeit zur verminderten Aktivität führt. Demgemäß konnte auch für das verkürzte Azozimatinibderivat **80** keine PDGFR β -Hemmung beobachtet werden.

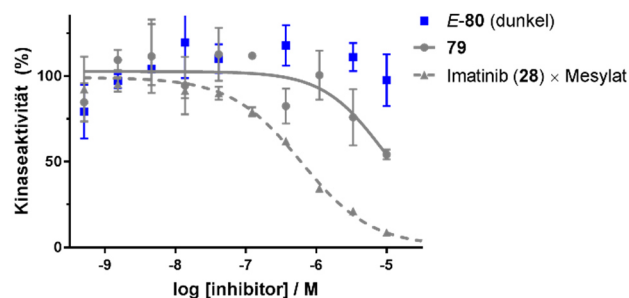


Abb. 3.74 Dosis-Wirkungs-Kurven des verkürzten Azozimatinibderivates (**80**, blau, IC₅₀ > 10000 nM) im Vergleich zum verkürzten Imatinibderivat (**79**, grau, IC₅₀ > 10000 nM) sowie zu Imatinib (**28**, grau gestrichelt, IC₅₀ = 565 nM, Restaktivität (Plateau): 3 %, R² = 0.94) in einem *in vitro* PDGFR β -Kinaseassay bei einer DMSO-Konzentration von 1 %. Die Datenpunkte stellen jeweils Mittelwerte aus Doppelbestimmungen dar. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.^[126]

Das diazocinfunktionalisierte Imatinibderivat **83** wurde ebenfalls zunächst im Dunkeln in Z-Konfiguration auf seine inhibitorische Wirkung gegenüber PDGFR β untersucht (Abb. 3.75a). Dabei wurde eine überraschend hohe PDGFR β -Hemmung gemessen, die im Widerspruch zu den Ergebnissen des Molecular Modelings steht. Wurde beim *Glide*-Docking für Z-**83** noch kein Bindemodus gefunden, so wurde experimentell ein IC₅₀-Wert von 280 nM bestimmt. Damit zeigt Z-**83** eine deutlich höhere Aktivität als Imatinib (IC₅₀ = 640 nM). Durch Bestrahlung mit 405 nm konnte allerdings keine Verschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve erzielt werden (IC₅₀ = 290 nM). Insgesamt bestätigen sich damit die Ergebnisse des *Induced-Fit*-Dockings, bei dem nach geringer Anpassung des Proteins an den Liganden ein hoher Docking Score sowohl für Z-**83** als auch E-**83** berechnet wurde.

Für das vergleichbare azobenzolfunktionalisierte Derivat E-**84** konnte nur eine schwache PDGFR β -Hemmung nachgewiesen werden, wobei bei einer Inhibitorkonzentration von 10 μ M noch eine Restaktivität der Kinase von 54 % messbar ist (Abb. 3.75b). Eine Bestrahlung mit 365 nm führt zu einer leichten Veränderung der Dosis-Wirkungs-Kurve mit einer verbleibenden Restaktivität von 32 %. Die in beiden Fällen verbleibende hohe Restaktivität der Kinase deutet erneut darauf hin, dass für die Verbindungen die maximale Löslichkeit erreicht wird, bevor es zu einer vollständigen Hemmung der Kinase kommt.

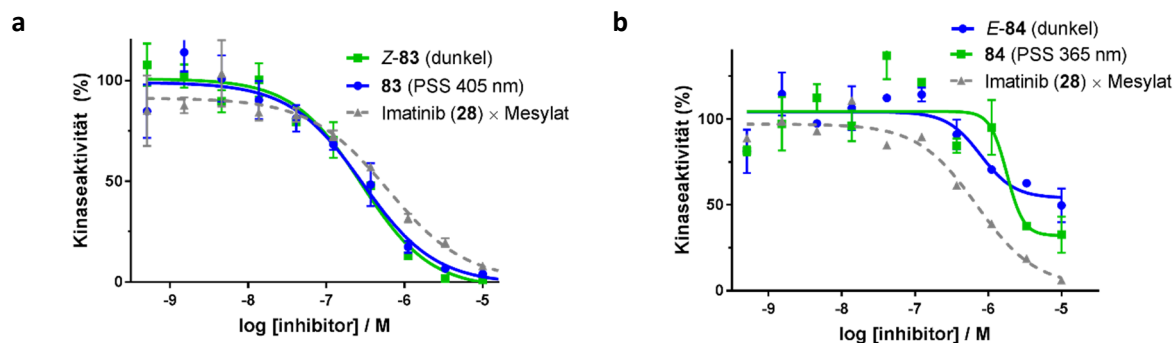


Abb. 3.75 Dosis-Wirkungs-Kurven des diazocinfunktionalisierten Imatinibderivates **83** und des azobenzolfunktionalisierten Imatinibderivates **84** in einem *in vitro* PDGFR β -Kinaseassay bei einer DMSO-Konzentration von 1 %. **a**) Z-**83** im Dunkeln (grün, IC₅₀ = 280 nM, R² = 0.98) sowie nach Bestrahlung mit 405 nm (blau, IC₅₀ = 290 nM, R² = 0.95) im Vergleich zu Imatinib x Mesylat (**28**, grau-gestrichelt, IC₅₀ = 437 nM, R² = 0.95). **b**) E-**84** im Dunkeln (blau, IC₅₀ = 786 nM, Restaktivität (Plateau): 54 %, R² = 0.75) sowie nach Bestrahlung mit 365 nm (grün, IC₅₀ = 1793 nM, Restaktivität (Plateau): 32 %, R² = 0.72) im Vergleich zu Imatinib x Mesylat (**28**, grau-gestrichelt, IC₅₀ = 694 nM, R² = 0.96). Die Datenpunkte stellen jeweils Mittelwerte aus Doppelbestimmungen dar. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.^[126]

Zusätzlich zur Charakterisierung in dem beschriebenen PDGFR β -Kinaseassay wurden für die Verbindungen **81**, **82** und **83** Dissoziationskonstanten (K_d-Werte) an der ABL1-Kinase bestimmt. Zwar stellt nicht ABL1, sondern das Fusionsprotein BCR-ABL das Haupt-Target von Imatinib bzw. Nilotinib dar, die Hemmung von ABL1 kann jedoch als gutes Maß für die Aktivität gegenüber BCR-ABL

herangezogen werden.^[114] Die K_d -Wert-Bestimmung wurde von dem kommerziellen Anbieter DiscoverX (Eurofins, San Diego, USA) in einem affinitätsbasierten Assay durchgeführt. Im Gegensatz zur ATP-kompetitiven IC_{50} -Bestimmung erfolgt hier die Messung der Affinität des Inhibitors an der Kinase unter Ausschluss von ATP. Anstatt des Umsatzes von ATP wird hier die Verdrängung eines immobilisierten Liganden (Staurosporin) aus der ATP-Bindetasche durch den Inhibitor gemessen. Die K_d -Wert-Bestimmung wurde mit nicht-phosphorylierter ABL1-Kinase durchgeführt.

Bei der K_d -Wert-Bestimmung konnten die aus der bereits diskutierten PDGFR β -Testung gewonnenen Erkenntnisse weitestgehend auch für ABL1 bestätigt werden (Tab. 3.16). So führt die Azologisierung von Imatinib (**28**) zu einer mehr als 1000-fach verringerten Bindeaffinität gegenüber ABL1 ($K_d = 1.1$ nM vs $K_d = 1600$ nM). Auch die Azologisierung von Nilotinib (**29**) führt zu einer drastischen Abnahme der Bindeaffinität ($K_d = 10$ nM vs $K_d > 10000$ nM), wobei in dem untersuchten Konzentrationsbereich bis $10 \mu\text{M}$ keinerlei Wirkung von Azonilotinib beobachtet werden konnte. Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass eine Azologisierung der Amidbindung von Imatinib (**28**) und Nilotinib (**29**) nicht toleriert wird, da dies offenbar zum Wegfall zweier enthalpisch wichtiger Wasserstoffbrückenbindungen führt. Damit einhergehend wurde für das diazocinfunktionalisierte Imatinibderivat **83**, bei dem die Amidbindung erhalten bleibt, ein niedriger K_d -Wert von 3.9 nM bestimmt. Die Verbindung weist damit überraschenderweise sogar eine ähnlich hohe ABL1-Affinität auf wie Imatinib (**28**, $K_d = 1.1$ nM).

Tab. 3.16 Übersicht der biologischen Testergebnisse der azobenzol- und diazocinfunktionalisierten Imatinib- bzw. Nilotinibderivate.

#	Promega Aktivitäts-Kinaseassay	DiscoverX Affinitäts-Kinaseassay ^[109]	
	IC_{50} (PDGFR β) ^a / nM	K_d (ABL1) ^b / nM	K_d (PDGFR β) ^a / nM
28	640	1.1	14
29	507	10	73
81	> 10000	1600	n.a.
82	> 10000	> 10000	n.a.
83	280	3.9	n.a.

^a: phosphoryliert

^b: nicht-phosphoryliert

Zu beachten ist, dass die extern in Auftrag gegebenen K_d -Wert-Bestimmungen unter unklaren Lichtbedingungen durchgeführt wurden, sodass davon ausgegangen werden muss, dass jeweils ein Teil der Verbindungen in der metastabilen Konfiguration vorliegt.

4. ZUSAMMENFASSUNG UND FAZIT

4.1 Axitinib und stilbenähnliche Axitinibderivate

Im Rahmen dieses Projektes wurde der zugelassene Kinaseinhibitor Axitinib (**30**) sowie eine Auswahl an synthetisch modifizierten Axitinibderivaten hinsichtlich ihrer photochemischen Eigenschaften und ihrer Eignung als photoschaltbare Inhibitoren untersucht.

Das stilbenähnliche Indazolsystem von Axitinib (**30**) stellt ein interessantes photochromes System dar, da die Absorptionsspektren von (*E*)-Axitinib (*E*-**30**) und (*Z*)-Axitinib (*Z*-**30**), im Gegensatz zu klassischen Stilbenen, leicht gegeneinander verschoben sind. Dies ermöglicht eine gezielte photochemische Anregung der einzelnen Isomere durch UV-Bestrahlung mit 365 bzw. 385 nm. Folglich lässt sich Axitinib (**30**) in DMSO mit guter Schalteffizienz reversibel schalten. In wässriger Lösung ist eine hocheffiziente unidirektionale *Z* → *E* Schaltung möglich, wobei hier die Reversibilität der Schaltung aufgrund einer konkurrierenden [2+2]-Cycloaddition eingeschränkt wird (Abb. 4.1).

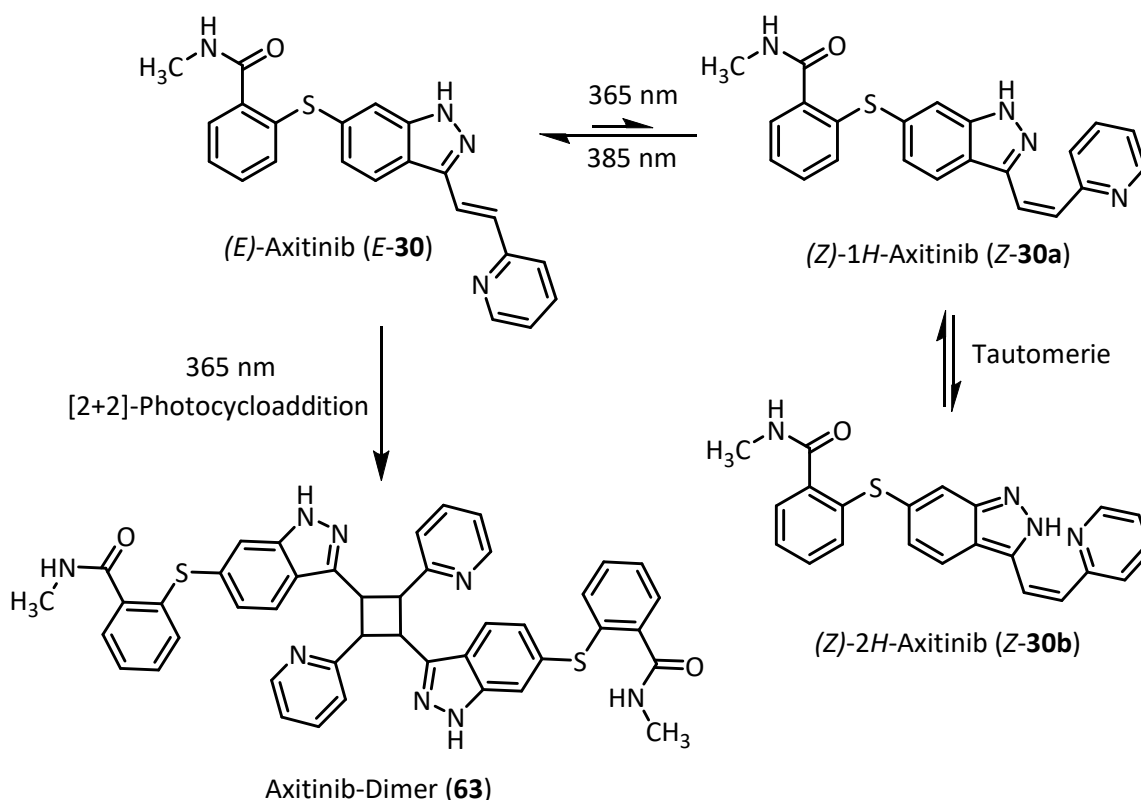
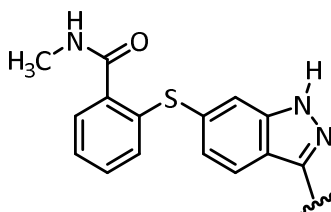


Abb. 4.1 Photochemie von Axitinib (**30**) in wässriger Lösung.

Bei der Charakterisierung der synthetisierten stilbenähnlichen Axitinibderivate **33**, **35**, **36** und **62** stellte sich heraus, dass der Austausch des Pyridinrestes von Axitinib gegen einen Arylrest zu einer erheblichen Verschlechterung der photochemischen Eigenschaften führt. So wird bei Verlust des Pyridinstickstoffes das Absorptionsspektrum des *Z*-Isomers vollständig vom Spektrum des *E*-Isomers überlagert und eine selektive Photoanregung des *Z*-Isomers erschwert (**33**, **35**). Die Verschiebung des Stickstoffatoms innerhalb des Pyridinringes wird ebenfalls nicht toleriert (**62**). Beim Austausch des Pyridin-2-yl-Restes gegen einen Chinolin-2-yl-Rest (**36**) bleibt die Separation der Absorptionsbanden zwar erhalten, die Vergrößerung des π -Systems führt jedoch zu einer deutlich verschlechterten Schalteffizienz.

Zur Erklärung der experimentellen Daten und zum besseren Verständnis des photochromen Systems von Axitinib (**30**) wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Hartke quantenmechanische Rechnungen (B3LYP-D3BJ/def2-TZVP Theorie) durchgeführt. Mit den Berechnungen konnte gezeigt werden, dass das 2*H*-Indazolutautomer von (*Z*)-Axitinib (*Z*-**30**) eine intramolekulare Wasserstoffbrücke zum Stickstoffatom des Pyridinrestes ausbildet und dadurch ein planares π -System entsteht. Die berechneten Anregungsenergien deuten darauf hin, dass das planare (*Z*)-2*H*-Axitinibisomer (*Z*-**30b**) für die experimentell beobachtete Rotverschiebung des Absorptionsspektrums von *Z*-Axitinib (*Z*-**30**) verantwortlich ist. Ohne das Stickstoffatom in Nachbarschaft zur Ethenylbrücke geht die Rotverschiebung des *Z*-Isomers hingegen verloren. Die Daten stehen im Einklang mit NMR- und Röntgenkristallstruktur-Untersuchungen, bei denen das planare (*Z*)-2*H*-Axitinibisomer (*Z*-**30b**) nachgewiesen werden konnte.

Ein weiteres Merkmal des photochromen Systems von Axitinib (**30**) besteht in der thermischen Stabilität des *Z*-Isomers, die eine säulenchromatographische Trennung von (*E*)-Axitinib (*E*-**30**) und (*Z*)-Axitinib (*Z*-**30**) ermöglicht. Folglich konnten beide Axitinibisomere zunächst separat in verschiedenen biologischen Assays charakterisiert werden. In einem *in vitro* VEGFR2-Kinaseassay konnte ein 43-facher Wirkunterschied zwischen beiden Isomeren nachgewiesen werden ($IC_{50}(E) = 19 \text{ nM}$ vs $IC_{50}(Z) = 817 \text{ nM}$). Im Hinblick auf die Vorarbeiten von Horbert^[123] konnte gezeigt werden, dass der konsequente Ausschluss von Tageslicht und konventioneller Laborbeleuchtung zur Vermeidung einer unkontrollierten *E/Z*-Isomerisierung im Kinaseassay unabdingbar ist. Durch gezielte Bestrahlung mit 385 nm konnte (*Z*)-Axitinib (*Z*-**30**) weiterhin *in vitro* nahezu quantitativ in das *E*-Isomer überführt und die biologische Aktivität von (*E*)-Axitinib (*E*-**30**) wiederhergestellt werden (Tab. 4.1).

Tab. 4.1 Photochemische Eigenschaften und IC₅₀-Werte von Axitinib (**30**) sowie der stilbenähnlichen Axitinibderivate **33** und **36** im VEGFR2 Kinaseassay mit und ohne Bestrahlung.

#	Rest (R)	λ_{Exc} (nm)	PSS (E/Z %)	IC ₅₀ VEGFR2 (nM)	
				unbestrahlt	bestrahlt
E-30		365	40/60 ^a n.a. ^{b,c}	19	(44) ^c
Z-30		385	78/22 ^a 96/4 ^b	817	29
E-36		385	10/90 ^a n.a. ^{b,c}	173	(486) ^c
Z-36		420	46/54 ^a n.a. ^b	1045	323
E-33		365	51/49 ^a n.a. ^{b,c}	59	(270) ^c

^a in DMSO^b in Wasser (5 % DMSO)^c neben E/Z-Isomerisierung auch [2+2]-Cycloaddition

Auf zellulärer Ebene konnte in einem HUVEC-Proliferationassay gezeigt werden, dass (*Z*)-Axitinib (**Z-30**) das HUVEC-Wachstum 31-mal schwächer hemmt als (*E*)-Axitinib (**E-30**) ($IC_{50}(E) = 0.83 \mu M$ vs $IC_{50}(Z) = 26 \mu M$). Auch hier konnte durch UV-Bestrahlung von (*Z*)-Axitinib (**Z-30**) *in vitro* ein Großteil der Wirkung des *E*-Isomers wiederhergestellt werden. Auf Proteinebene konnten diese Ergebnisse zusätzlich mittels Westen-Blotting und PamGene®-Zelllysat-Analyse bekräftigt werden.

Neben der Charakterisierung von (*E*)-Axitinib (**E-30**) und (*Z*)-Axitinib (**Z-30**) konnte auch das Cycloadditionsprodukt **31** in präparativen Maßstab synthetisiert und isoliert werden. In einem *in vitro* Kinaseassay wurde demonstriert, dass das Axitinibdimer **31** keine VEGFR2-Hemmung hervorruft.

Bei der biologischen Charakterisierung der synthetisierten stilbenähnlichen Axitinibderivate **33** und **36** in einem VEGFR2-Kinaseassay konnte gezeigt werden, dass ein Austausch des Pyridinrestes von Axitinib (**30**) gegen einen größeren methoxysubstituierten Arylrest toleriert wird, allerdings aufgrund der schlechteren photochemischen Eigenschaften von **33** und **36** aber nicht zielführend ist. Durch den Austausch des Pyridinrestes gegen Chinolin konnte zwar die VEGFR2-Aktivität des *Z*-Isomers **Z-36** im Vergleich zu (*Z*)-Axitinib (**Z-30**) weiter verringert werden, in Relation zum entsprechenden *E*-Isomer konnte jedoch kein größerer Wirkunterschied erreicht werden.

Zusammenfassend konnte insbesondere mit dem zugelassenen Kinaseinhibitor Axitinib (**30**) im Vergleich zu bisher veröffentlichten photoschaltbaren Kinaseinhibitoren eine beachtliche Photoregulation der Kinaseaktivität demonstriert werden. Ein großer Vorteil des photochromen Systems von Axitinib (**30**) gegenüber vielen azofunktionalisierten Wirkstoffen besteht in der thermischen Stabilität des *Z*-Isomers gepaart mit der hohen $Z \rightarrow E$ Schalteffizienz im Wässrigen. Bei entsprechenden Azo-Verbindungen mit bioaktivem *E*-Isomer und bioinaktiven *Z*-Isomer ergibt sich hingegen oftmals die Problematik, dass im PSS immer ein Teil der bioaktiven Komponente vorliegt und daher nur kleinere Wirkunterschiede gezeigt werden können.^[42,78] Zudem ist die Bestimmung der genauen Zusammensetzung des PSS und die Rate der thermischen Rückisomerisierung im biologischen System nicht immer bekannt, was eine Interpretation der biologischen Daten zusätzlich erschwert.

Ein Nachteil von (*E*)-Axitinib (**E-30**) im Vergleich zu azobasierten Systemen besteht in der schlechten $E \rightarrow Z$ Schalteffizienz bzw. der konkurrierenden [2+2]-Cycloaddition in Wasser. Daher konnte die biologische Aktivität *in vitro* nicht reversibel sondern nur unidirektional reguliert werden

Obwohl (*E*)-Axitinib (**E-30**) ein zugelassener Arzneistoff ist, ist die klinische Bedeutung der demonstrierten Photoschaltung u.a. aufgrund der geringen Eindringtiefe des verwendeten UV-Lichts in durchblutetes Gewebe wahrscheinlich gering. Im Bereich der Grundlagenforschung kann die

verwendete kurzwellige UV-Strahlung jedoch sogar von Vorteil sein, da so eine unerwünschte Interaktion mit gängigen Chromophoren und Fluorophoren (z.B. Fluorescein, Cyanine, GFPs, BODIPY etc.) in Experimenten vermieden wird.

Der Fokus weiterführender Arbeiten könnte darauf gelegt werden, die photochemische [2+2]-Cycloaddition von (*E*)-Axitinib (*E*-**30**) im Wässrigen durch geeignete strukturelle Modifizierungen zu unterdrücken. Dies könnte ggf. durch die Einführung endständiger wasserlöslicher Reste realisiert werden, die idealerweise eine Aggregation der Moleküle reduzieren. Mögliche Kandidaten stellen die bereits mittels Molecular Modeling untersuchten Axitinibderivate **39-45** dar (vgl. Tab. 3.1). Auch die Einführung einer dauerhaften Ladung zum Beispiel durch ein quartäres Amin könnte zur Erhöhung der Hydrophilie genutzt werden. Hinsichtlich der weiteren photochemischen Eigenschaften könnte eine Modifizierung des Pyridinrestes untersucht werden. So könnte Pyridin durch substituierte Pyridine oder Pyrimidine ersetzt werden. Denkbar ist beispielsweise eine Erhöhung der Elektronendichte am Pyridinstickstoff durch elektronenschiebende Substituenten. Auf diese Weise könnte die Wasserstoffbrücke zum 2*H*-Indazol in der *Z*-Konfiguration gestärkt werden. Auch die Einführung von α -Substituenten an der Ethenbrücke könnte zu einer drastischen Veränderung der photochemischen Eigenschaften führen.

Aufschlussreich wäre es zudem, VEGFR2 mit (*Z*)-Axitinib (*Z*-**30**) zu kristallisieren, um zum einen die durchgeführten Molecular Modeling Studien zu verifizieren und zum anderen neue Erkenntnisse für eine weitere Optimierung zu erhalten. Auch die UV-Bestrahlung eines (vorhandenen) VEGFR2-Proteinkristalls mit gebundenem (*E*)-Axitinib (*E*-**30**) könnte ggf. in Erwägung gezogen werden, um eine mögliche Anpassung des Proteins zu untersuchen.

4.2 Azobenzol- und diazocinfunktionalisierte Axitinibderivate

Um reversibel schaltbare Axitinibderivate zu erhalten, wurde das Pharmakophor von Axitinib (**30**) mit verschiedenen Diazocinen funktionalisiert. Mit Hilfe von Molecular Modeling wurde dabei zunächst eine geeignete Strategie zur Verknüpfung der Photoschalter mit dem Axitinibpharmakophor ermittelt. Dabei galt es Kandidaten zu identifizieren, die in einer Konfiguration das Zielprotein inhibieren und in der anderen Konfiguration nicht binden können. Als bestes Inhibitor-Design stellte sich dabei eine direkte CC-Verknüpfung zwischen dem Indazol des Axitinibpharmakophors und dem Diazocin-Photoschalter heraus.

Um dieses Design zu realisieren, wurden verschiedene mono-halogenierte Diazocine synthetisiert und eine Stille-Reaktion zur Kupplung mit dem Axitinibpharmakophor etabliert. Über diesen Syntheseweg konnten insgesamt drei diazocinfunktionalisierte Axitinibderivate synthetisiert werden (Tab. 4.2). Zum Vergleich wurden weiterhin zwei Derivate mit klassischen unverbrückten Azobenzolresten synthetisiert.

Für die erhaltenen diazocinfunktionalisierten Inhibitoren **73-75** konnte eine reversible Photoschaltung mit moderater bis guter Schalteffizienz demonstriert werden. Die $E \rightarrow Z$ Photoisomerisierung unter Verwendung von 530 nm verläuft diazocintypisch nahezu quantitativ. Die $Z \rightarrow E$ Schalteffizienz bei Bestrahlung mit 405 nm variiert je nach verwendetem Diazocintyp und vorliegendem Substitutionsmuster zwischen 25 und 60 %. Die thermischen Halbwertszeiten der metastabilen Isomere *E-73*, *E-74* und *E-75* liegen bei einer physiologisch relevanten Temperatur von 37 °C zwischen 1.5 und 7.3 h (DMSO) und sind damit grundsätzlich für eine biologische Anwendung geeignet. Die azobenzolfunktionalisierten Derivate **77-78** zeigen bei Bestrahlung mit 365 bzw. 385 nm eine gute $E \rightarrow Z$ Umsetzung im Bereich von 80-83 %. Die thermische Rückisomerisierung variiert stark mit der jeweiligen Substitutionsposition. Das *meta*-verknüpfte Derivat **77** schaltet azobenzoltypisch mit einer Halbwertszeit von 43.1 h eher langsam zurück, während das *para*-verknüpfte Derivat **78** mit einer Halbwertszeit von 5.7 h vergleichsweise schnell relaxiert.

Tab. 4.2 Photochemische Eigenschaften sowie IC₅₀-Werte der diazocin- und azobenzolfunktionalisierten Axitinibderivate **73-78** im VEGFR2 Kinaseassay mit und ohne Bestrahlung.

#	Rest (R)	λ_{Exc} (nm)	PSS (E/Z %)	$t_{1/2}$ (h)	IC ₅₀ VEGFR2 (nM)	
					unbestrahlt	bestrahlt
73		405	47/53	7.3	> 10000	215
74		405	25/75	3.7	> 10000	251
75		405	60/40	1.5	399	470
77		365	17/83	43.1	1077	1289
78		385	20/80	5.7	1020	1435

Im VEGFR2-Kinaseassay konnte für die Schwefeldiazocine **73** und **74** jeweils ein großer Wirkunterschied zwischen unbestrahlter und bestrahlter Verbindung demonstriert werden. So zeigen die unbestrahlten Z-Isomere Z-**73** und Z-**74** im Kinaseassay in Übereinstimmung mit den Ergebnissen des Molecular Modelings nahezu keine VEGFR2-Hemmung, während nach Bestrahlung mit 405 nm eine starke Kinaseinhibition mit IC₅₀-Werten von 215 bzw. 251 nM messbar ist. Die größten Wirkunterschiede zwischen dem jeweils unbestrahlten Z-Isomer und dem PSS bei 405 nm zeigen sich bei einer Inhibitorkonzentration von 3.3 µM. Hier ist in Anwesenheit von Z-**73** noch eine VEGFR2-Aktivität von etwa 90 % vorhanden, wohingegen das PSS zu einem Rückgang der Kinaseaktivität auf 9 % führt. Bei Verbindung **74** führt eine Bestrahlung mit 405 nm zu einem Rückgang der VEGFR2-Kinaseaktivität von 78 % auf 11 %.

Für das kohlenstoffverbrückte Diazocin **75** konnte nur ein geringerer Effekt der Photoisomerisierung auf die VEGFR2-Aktivität nachgewiesen werden. Dies ist vor allem darauf zurückzuführen, dass das Z-Isomer Z-**75** anders als die Isomere Z-**73** und Z-**74** auch ohne Bestrahlung zu einem beträchtlichen Rückgang der Kinaseaktivität führt. So ist im Fall von Z-**75** bei einer Inhibitorkonzentration von 10 µM nur noch eine VEGFR2-Restaktivität von 36 % vorhanden. Entsprechend ergibt sich nur ein kleiner Unterschied bei den ermittelten IC₅₀-Werten vor und nach Bestrahlung (399 nM vs. 470 nM). Mit einem IC₅₀-Wert von 470 nM ist das Kohlenstoffdiazocin **75** nach Bestrahlung deutlich weniger potent als die Schwefeldiazocine **73** und **74**, obwohl ersteres von allen Diazocinen die beste Schalteffizienz aufweist. Diese Beobachtungen konnten mit Hilfe eines *Induced-Fit*-Dockings teilweise erklärt werden, bei dem für beide Konfigurationen der Verbindung **73** ein plausibler Bindemodus gefunden wurde. Als Erklärung können die leicht unterschiedlichen Konformationen des Kohlenstoffdiazocins im Vergleich zum Schwefeldiazocin herangezogen werden.

Für die azobenzolbasierten Inhibitoren **77** und **78** konnte sowohl theoretisch mittels Molecular Modeling als auch experimentell im VEGFR2-Kinaseassay gezeigt werden, dass hier die E/Z-Isomerisierung des Photoschalters nur geringfügigen Einfluss auf die Bindeaffinität des Inhibitors hat. Insgesamt lässt sich also festhalten, dass die verwendeten Diazocine im vorliegenden Fall den unverbrückten Azobenzolen deutlich überlegen sind.

Eine Photoregulation der antiproliferativen Wirkung im HUVEC-Proliferationsassay konnte für das diazocinfunktionalisierte Axitinibderivat **73** nur andeutungsweise gezeigt werden, da auch für Z-**73** ein zytostatischer Effekt beobachtet wurde. Lediglich bei hohen Inhibitorkonzentrationen konnte für die bestrahlte Verbindung (PSS_{405 nm}) tendenziell ein etwas stärkerer antiproliferativer Effekt beobachtet

werden als für **Z-73**. Mittels PamaGene®-Analyse des HUVEC-Lysates konnten ebenfalls nur geringe Aktivitätsunterschiede zwischen **Z-73** und dem PSS beobachtet werden.

Zusammenfassend konnte insbesondere mit den diazocinfunktionalisierten Inhibitoren **73** und **74** auf der Ebene eines *in vitro* Kinaseassays eine bemerkenswerte Photoregulation der VEGFR2-Aktivität demonstriert werden. So konnte bezogen auf die ermittelten IC₅₀-Werte für Verbindung **73** ein 47-facher Wirkunterschied und für Verbindung **74** ein 40-facher Wirkunterschied vor und nach Bestrahlung gezeigt werden. Herauszustellen ist dabei vor allem, dass für die *Z*-Isomere **Z-73** und **Z-74** bis zu einer Konzentration von 10 µM nahezu keine VEGFR2-Hemmung beobachtet werden kann, sodass sich trotz der nur moderaten Potenz der jeweiligen *E*-Isomere insgesamt große Wirkunterschiede ergeben.

Kritisch ist die schlechte Wasserlöslichkeit der synthetisierten Verbindungen **73-78** zu beurteilen. So musste in den durchgeführten Kinaseassays die DMSO-Konzentration auf 10 % erhöht werden, um eine Präzipitation zu vermeiden. Die schlechte Wasserlöslichkeit ist zum einen auf die ohnehin nur mäßige Löslichkeit des Axitinibpharmakophors zurückzuführen und zum anderen auf die hohe Lipophilie der Diazocin- bzw. Azobenzolreste. Um die Wasserlöslichkeit zu verbessern sollte daher versucht werden, die Hydrophilie der Diazocine zu erhöhen. Dazu könnte der endständige Phenylrest der Diazocine **73** und **74** mit geeigneten wasserlöslichen Gruppen substituiert werden. Denkbar sind dabei z.B. nicht-aromatische Heterozyklen wie Piperidin, Piperazin oder Morpholin sowie polare Substituenten wie *N*-Alkylamine, Ether, Sulfonate, Sulfonamide oder Aminosäuren. Dabei sollte darauf geachtet werden, einen großen elektronischen Einfluss der Substituenten auf das photochrome System zu vermeiden, um die photochemischen Eigenschaften des Diazocins möglichst nicht negativ zu beeinflussen. Zusätzlich könnte durch die Einführung eines endständigen Restes der Unterschied des Ende-zu-Ende Abstandes (*end-to-end distance*^[27]) zwischen beiden Isomeren vergrößert werden, wodurch die Wirkunterschiede möglicherweise weiter verbessert werden könnten. Eine weitere Möglichkeit zur Optimierung der physiochemischen Eigenschaften besteht in der Einführung von Stickstoffatomen in das Diazocingerüst. So sind beispielsweise pyridinbasierte Diazocine denkbar, wobei die Einführung der Stickstoffatome synthetisch schwierig ist. Zudem könnten die Heteroatome sowohl die Schalteffizienz als auch die thermische Stabilität der Diazocine beeinflussen.

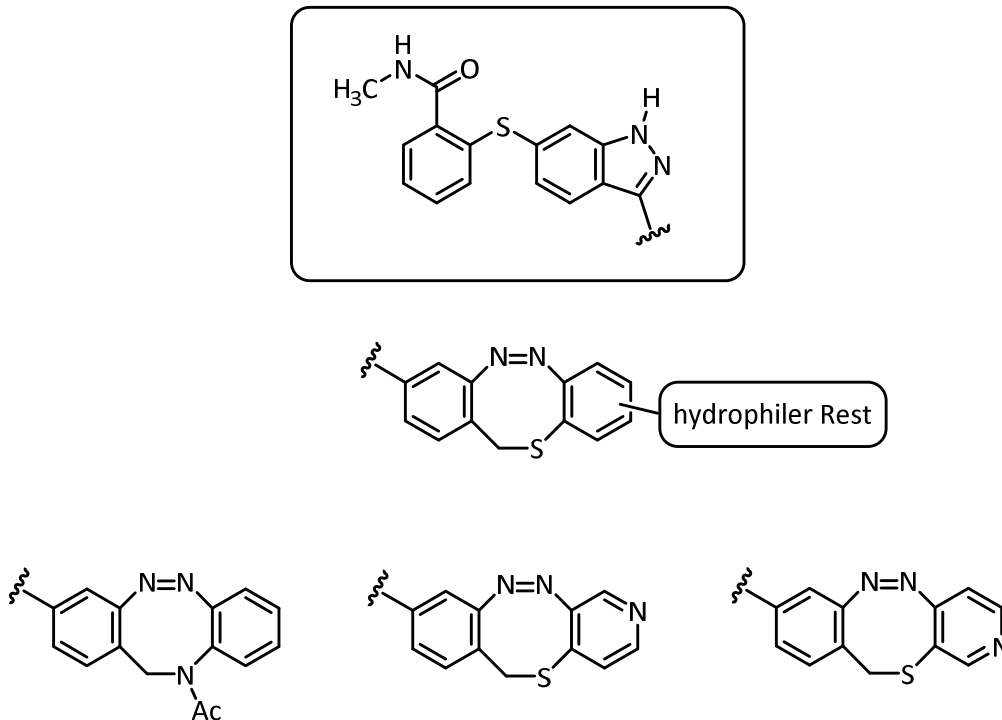


Abb. 4.2 Diazocin-funktionalisierte Axitinibderivate mit potentiell verbesserten physiochemischen Eigenschaften.

Darüber hinaus könnte der Diazocin-Baustein der Inhibitoren **73** und **74** durch ein Stickstoffdiazocin ersetzt werden. Insbesondere das kürzlich von Lentés *et al.* publizierte Stickstoffdiazocin **13** weist gute Photoschaltungseigenschaften sowie eine verbesserte Wasserlöslichkeit auf und stellt damit einen vielversprechenden Photoschalter für photopharmakologische Anwendungen dar.^[54]

Weiterhin sollte versucht werden den Inhibitor *E-73* oder *E-74* mit VEGFR2 zu kristallisieren, um den mittels Molecular Modeling postulierten Bindemodus zu verifizieren. Mit einer Kristallstruktur könnte anschließend ggf. eine weitere Optimierung des Inhibitor-Designs erfolgen.

Im *in vitro* Kinaseassay könnte versucht werden die Reversibilität der Schaltung bzw. die Photostabilität des Protein-Inhibitor-Komplexes nach mehreren Schaltzyklen zu untersuchen. Auf diese Weise könnten mögliche Photoadditionen des Inhibitors am Protein geprüft werden.

Nach einer Optimierung der physiochemischen Eigenschaften sollten weitere Zellexperimente folgen. So könnte der beschriebene HUVEC-Proliferationsassay mit den optimierten Verbindungen erneut durchgeführt werden. Dabei sollte eine automatisierte Bestrahlung der Zellen mit Lichtpulsen in kurzen Zeitabständen einer manuellen Bestrahlung vorgezogen werden. Entsprechende Methoden und Apparaturen sind in der Literatur beschrieben.^[60] Aufgrund der komplexen Prozesse und der Überlagerung von Effekten im Proliferationsassay sollten zusätzlich Western-Blot-Untersuchungen mit

den Z-Isomeren und den bestrahlten Verbindungen in Anlehnung an die in Kapitel 3.1 diskutierten Versuche durchgeführt werden.

4.3 Azologisierung von Imatinib und Nilotinib

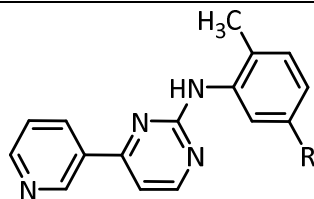
Im dritten Teilprojekt dieser Arbeit wurden die beiden zugelassenen Kinaseinhibitoren Imatinib (**28**) und Nilotinib (**29**) „azologisiert“. Dabei wurde jeweils die Amidbindung der *N*-Arylbenzamid-Struktur durch eine photoschaltbare Azobindung ersetzt.

Während durchgeführte Molecular Modeling Untersuchungen mit Proteinstrukturen der Imatinib-/Nilotinib-Targets ABL1-Kinase und PDGFR β daraufhin deuten, dass eine Azologisierung der Amidbindung toleriert wird, konnte experimentell im Kinaseassay für keine der azologisierten Inhibitoren eine nennenswerte PDGFR β -Inhibition nachgewiesen werden (IC_{50} (PDGFR β) > 10000 nM). Übereinstimmend damit wurden auch im Hinblick auf eine Hemmung der ABL1-Kinase hohe Dissoziationskonstanten von 1600 bzw. > 10000 nM bestimmt.

Hauptursache für den beobachteten Verlust der Bindeaffinitäten ist vermutlich der Wegfall von zwei Wasserstoffbrückenbindungen der ersetzten Amidbindung der beiden DFG_{out}-Inhibitoren. Offenbar leisten die Wasserstoffbrückenbindungen einen hohen enthalpischen Beitrag zur Bindeaffinität, der beim Molecular Modeling in die berechneten Docking-Scores nur unzureichend einfließt.

Neben einer direkten Azologisierung der Amidbindung wurden zwei weitere photoschaltbare Imatinibderivate unter Erhalt der wasserstoffbrückenbindenden Amidbindung synthetisiert. Für das diazocinfunktionalisierte Imatinibderivat **Z-83** wurde dabei im Kinaseassay eine starke PDGFR β -Inhibition mit einem IC_{50} -Wert von 280 nM nachgewiesen. Damit weist die Verbindung überraschenderweise eine höhere PDGFR β -Aktivität als Imatinib auf (IC_{50} = 640 nM). Allerdings konnte für das PSS nach Bestrahlung mit 405 nm kein Aktivitätsunterschied im Vergleich zum unbestrahlten *Z*-Isomer demonstriert werden. Dies steht im Widerspruch zu dem im Vorfeld durchgeführten *Glide*-Docking, bei dem für **Z-83** kein plausibler Bindemodus gefunden wurde, lässt sich jedoch teilweise durch das zusätzlich durchgeführte *Induced-Fit*-Docking erklären, bei dem auch in *Z*-Konfiguration eine Bindung von **83** vorausgesagt wurde.

Für das azobenzolfunktionalisierte Imatinibderivate **E-84** konnte mit einem IC_{50} -Wert von 786 nM nur eine vergleichsweise schwache PDGFR β -Hemmung gezeigt werden, wobei auch hier kein eindeutiger Unterschied zwischen unbestrahlter und bestrahlter Probe demonstriert werden konnte. Der Verlauf der Dosis-Wirkungs-Kurven bzw. die hohe verbleibende Restaktivität der Kinase bei hohen Inhibitorkonzentrationen deuten außerdem eine schlechte Wasserlöslichkeit der Verbindungen an.

Tab. 4.3 Übersicht synthetisierter photoschaltbarer Imatinib- bzw. Nilotinibderivate sowie photochemische Eigenschaften und IC₅₀-Werte im PDGFRβ Kinaseassay.

#	Rest (R)	λ _{Exc} (nm)	PSS (E/Z %)	t _{1/2} (h)	IC ₅₀ PDGFRβ (nM)	
					unbestrahlt	bestrahlt
80		365	31/69	17.4	> 10000	n.a.
81		365	32/68	10.0	> 10000	n.a.
82		365	38/62	14.3	> 10000	n.a.
83		405	58/42	6.1	280	290
84		365	41/59	44.6	786	1793

Die Serie bisher synthetisierter Verbindungen könnte zukünftig noch um die Verbindungen **85**, **87** und **88** ergänzt werden (vgl. Tab. 3.13), da diese zum Teil vielversprechende Ergebnisse im Molecular Modeling gezeigt haben. Insbesondere die Verbindungen **87** und **88** stellen interessante Kandidaten dar, da für diese azobenzolbasierten Inhibitoren in der metastabilen *Z*-Konfiguration ein Bindemodus in der ATP-Bindetasche von PDGFR β gefunden wurde, während die entsprechenden thermodynamisch stabilen *E*-isomere vermutlich nicht binden können. Allerdings deuten die oben diskutierten Ergebnisse der Inhibitoren **83** und **84** an, dass sich eine *E/Z*-Isomerisierung der Azobenzoleinheiten in dem untersuchten Bereich der ATP-Bindetasche ggf. nur geringfügig auf die jeweilige Bindeaffinität auswirken könnte.

Darüber hinaus sollte der diazocinfunktionalisierte Inhibitor **83** weitergehend untersucht werden. Zwar konnte für die Verbindung keine Abhängigkeit der Bindeaffinität von der Konfiguration des Photoschalters nachgewiesen werden, dennoch zeigte sich sowohl im PDGFR β - als auch im ABL1-Assay eine auffällig hohe Kinasehemmung, die zum Teil größer ausfiel als für die Stammverbindung Imatinib (**28**).

5. EXPERIMENTELLER TEIL

5.1 Geräte und Materialien

5.1.1 NMR-Spektroskopie

NMR-Spektren wurden auf folgenden Spektrometern gemessen:

1. Bruker Avance III 300
(^1H -NMR: 300 MHz, ^{13}C -NMR: 75 MHz, ^{15}N -NMR: 30 MHz, ^{119}Sn -NMR: 112 MHz)
2. Bruker Ascend 400
(^1H -NMR: 400 MHz, ^{13}C -NMR: 100 MHz, ^{19}F -NMR: 377 MHz, ^{119}Sn -NMR: 149 MHz)
3. Bruker AV 600
(^1H -NMR: 600 MHz, ^{13}C -NMR: 150 MHz)

Die NMR-Spektren wurden jeweils auf die Restsignale der verwendeten deuterierten Lösungsmittel kalibriert. Die chemischen Verschiebungen der Lösungsmittelsignale sind in Tabelle 5.1 zusammengefasst.

Tab. 5.1 Restsignale der verwendeten deuterierten Lösungsmittel (chemische Verschiebung δ in ppm)

Deuteriertes Lösungsmittel	^1H -NMR	^{13}C -NMR
Aceton- d_6	2.05	29.84
Chloroform	7.26	77.16
DMSO- d_6	2.50	39.52
Methanol- d_4	3.31	49.0

Zur Beschreibung der Multiplizitäten der NMR-Signale werden im Folgenden nachstehende Abkürzungen verwendet: Singulett (s), breites Singulett (bs), Dublett (d), Dublett von Dubletts (dd), Dublett von Dubletts von Dubletts (ddd), Dublett von Triplets (dt), Triplett (t), Triplett von Dubletts (td), Quartett (q), Multiplett (m), zentriertes Multiplett (m_c).

Zur eindeutigen Zuordnung der NMR-Signale wurden zusätzlich 2D-NMR-Spektren (COSY, HSQC, HMBC) hinzugezogen.

5.1.2 Massenspektrometrie

LC-MS-Spektren wurden auf einem Amazon LC Ionenfallen-Massenspektrometer der Firma Bruker (Bremen, Deutschland) im Positiv-Ionen-Modus (Trockengas 6.5 L/min, Nebulizer 25 psi, Ausheiztemperatur 250 °C) nach chromatographischer Auftrennung mit einem Agilent 1260 Infinity HPLC-System (Waldbronn, Deutschland) an einer RP-C8-Säule (Waters Xterra MS C8, 50 x 4.6 mm, 3.5 µm) mit Essigsäure (0.1 %)/Acetonitril-Gradienten aufgenommen.

EI-Massenspektren wurden mit einem Accu TOF 4G Instrument der Firma Joel (Freising, Deutschland) gemessen.

ESI-Massenspektren wurden mit einem Q Exactive Plus Hybrid Quadrupol-Orbitrap Spektrometer der Firma Thermo Fisher (Dreieich, Deutschland) aufgenommen.

5.1.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

HPLC-Messungen wurden an einem Agilent 1100 Series Instrument (Waldbronn, Deutschland) mit einer Kinetex™ RP-C8-Säule (4.6 mm x 150 mm), 5 µm, der Firma Phenomenex (Aschaffenburg, Deutschland) durchgeführt. Als Fließmittel wurde ein Kaliumdihydrogenphosphat-Puffer (0.01 M, pH = 2.3)/Acetonitril-Gemisch mit folgendem Gradienten verwendet: 5 % MeCN → 60 % MeCN, 1.5 mL/min, 10 min. Die HPLC-Säule wurde während der Messungen auf 25 °C temperiert.

5.1.4 UV/VIS-Spektroskopie

UV/VIS-Spektren wurden mit einem Varian Cary® 50 Scan UV/VIS-Spektrophotometer der Firma Agilent (Waldbronn, Deutschland) mit einem Varian Cary PCB 150 Wasser-Umlaufkühler bei 25 °C oder 37 °C gemessen.

5.1.5 Röntgenkristallstrukturanalysen

Röntgenkristallstrukturanalysen wurden mit einem Stoe IPDS 2T Diffraktometer am Institut für Organische Chemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz angefertigt. Die Messungen wurden von Dr. Dieter Schollmeyer durchgeführt.

5.1.6 Chromatographie

Flash-Säulenchromatographie wurde mit Hilfe eines Spot II Ultimate Säulenchromatographie-Automaten der Firma Armen Instruments (Interchim) durchgeführt.

Zur Reinigung an Kieselgel wurden folgende industriell gepackte Säulen der Firma Interchim verwendet:

1. PuriFlash PF-30SIHP, 12 g, Korngröße: 30 μm
2. PuriFlash PF-30SIHP, 40 g, Korngröße: 30 μm
3. PuriFlash PF-50SIHP, 80 g, Korngröße: 50 μm
4. PuriFlash PF-50SIHP, 120 g, Korngröße: 50 μm

Zur Reinigung an RP-Kieselgel (Polymer-Phase) wurde eine PuriFlash PF-302H-Säule, 7 g, Korngröße: 30 μm , verwendet.

Zur Trockenbeladung wurden, falls nicht anders angegeben, Vorsäulen verwendet und die Substanz auf Kieselgel 60 (Korngröße: 0.063 –0.2 mm) der Firma Macherey Nagel (Düren, Deutschland) aufgezogen.

Dünnschichtchromatographie (DC) wurde mit Polygram® Polyester Kieselgel-Fertigfolien (Kieselgel Sil G/UV₂₅₄ 0.2 mm) der Firma Machery Nagel durchgeführt.

5.1.7 Lichtquellen

Für die photochemische Charakterisierung der Verbindungen wurden folgende Lichtquellen verwendet:

1. Eisendotierte Metallhalogenit-Lampe mit 330 nm Filter (Panacol-Elosol GmbH, UV-P 250C, 250 W)
2. 365 nm LED-Reaktor
(Sahlmann Photochemical Solutions, 12 x 450 mW Nichia NCSU033B LEDs, dimmbar auf 25 %, 50 %, 75 % und 100 %)
3. 385 nm LED-Lampe
(Sahlmann Photochemical Solutions, 3 x 2430 mW Nichia NC4U134 LEDs, nicht dimmbar)
4. 405 nm LED-Lampe
(Sahlmann Photochemical Solutions, 3 x 2430 mW Nichia NVSU233A-U405 LEDs, nicht dimmbar)
5. 420 nm LED-Lampe
(Sahlmann Photochemical Solutions, 1 x 2300 mW Marubeni 420-66-60 LED, nicht dimmbar)
6. 530 nm LED-Lampe
(Sahlmann Photochemical Solutions, 8 x 575 mW Nichia NCSG219-V1 LEDs, dimmbar auf 25 %, 50 %, 75 % und 100 %)

Für die Bestrahlung der Kinase- und Zellassays wurden folgende LED-Lampen verwendet:

1. 365 nm LED-Lampe mit Mikrotiterplatten-Aufsatz
(Sahlmann Photochemical Solutions, 16 x 750 mW Nichia NCSU276A LEDs, 1-100 % dimmbar)
2. 385 nm LED-Lampe
(Sahlmann Photochemical Solutions, 3 x 2430 mW Nichia NC4U134 LEDs, nicht dimmbar)
3. 405 nm LED-Lampe mit Mikrotiterplatten-Aufsatz
(Sahlmann Photochemical Solutions, 16 x 980 mW Nichia NVSU233A-U405 LEDs, 1-100 % dimmbar)

5.2 Molecular Modeling

Molecular Modeling Studien wurden mit einem DELL Precision T3610 Rechner unter Verwendung der Software *Maestro* (Version 11.7, Release 2018-03) der Firma Schrödinger LLC (New York, USA) durchgeführt.

Proteinstrukturen wurden der RCSB *protein data bank* (PDB) entnommen. Es wurden folgende Proteinstrukturen verwendet:

1. **4AG8** (VEGFR2, kristallisiert mit (*E*)-Axitinib)^[129]
2. **1T46** (c-KIT, Grundlage für das verwendete PDGFR β -Homologiemodell)^[217,225]
3. **2HYY** (ABL1-Kinase, kristallisiert mit Imatinib)^[215]
4. **3CS9** (ABL1-Kinase, kristallisiert mit Nilotinib)^[216]

Die Proteinkristallstrukturen wurden mit dem *Protein Preparation Wizard* bearbeitet.^[226] Dabei wurde die Bindungsordnung von kovalenten Bindungen angepasst, Wasserstoffatome ergänzt, Disulfidbrücken optimiert, Selenomethionin in Methionin umgewandelt sowie Wassermoleküle mit einem Abstand $> 5 \text{ \AA}$ zu Heteroatomen gelöscht. Darüber hinaus wurden mögliche Protonierungszustände von Heteroatomen in einem pH-Bereich von 7 ± 2 generiert und fehlende Seitenketten sowie Proteinschleifen mit Hilfe des Moduls *Prime* ergänzt. Weiterhin wurden Proteindublikate sowie unwichtige Wassermoleküle manuell gelöscht. Das Wasserstoffbrückennetzwerk des Proteins sowie die Orientierung nicht gelöschter Wassermoleküle wurde unter Verwendung der Standardeinstellungen automatisiert optimiert. Abschließend wurde eine vereinfachte, eingeschränkte Geometrieoptimierung mit Hilfe des OPLS3e-Kraftfeldes durchgeführt. Dabei wurden schwere Atome (*heavy atoms*) bis zu einem RMSD-Bereich von 0.3 \AA konvergiert. *Receptor Grids* wurden mit dem Modul *Glide* erstellt.

Liganden wurden mit dem *Maestro 2D-Sketcher* erstellt und die Geometrie der generierten 3D-Strukturen mit dem Modul *MacroModel* optimiert. Dabei wurde das OPLS3e-Kraftfeld verwendet.^[227] Die Geometrie von (*E*)- und (*Z*)-Azobenzol wurden mit dem Modul *Jaguar* unter Verwendung von DFT-Theorie (B3LYP-D3) und 6-31G** Basissatz optimiert.^[228] Die Geometrie der verwendeten Diazocine wurden ebenfalls mit Hilfe von DFT-Theorie (B3LYP-D3) optimiert und freundlicherweise von Röhricht zur Verfügung gestellt.^[53,229]

Das Docking der Liganden, d.h. die Berechnung potentieller Bindemodi von Liganden sowie die Bewertung der Protein-Ligand-Interaktionen, wurde mit dem Modul *Glide* im *Extra Precision (XP)* Modus durchgeführt.^[230–232] Die Optionen *Canonicalize input conformation* und *post-docking minimization* wurde deaktiviert, um ungewollte Konfigurations- und Konformationsänderungen von quantenmechanisch-optimierten Strukturen zu vermeiden. Quantenmechanisch-optimierte Diazocin- und Azobenzolreste wurden während des *Glide*-Dockings mit Hilfe von Torsionsrestriktionen (*torsional constraints*) eingefroren. Beim Docking der Axitinibderivate **33–37** in die VEGFR2-Kristallstruktur (PDB: 4AG8) wurden Wasser-stoffbrückenbindungen zu den Aminosäuren Cys-919, Asp-1046, Glu-917 und Glu-885 als notwendiges Kriterium für einen Bindemodus definiert (sog. *H-bond constraints*). Beim Docking der azologisierten Imatinibderivate **80** und **81** in die ABL1-Struktur (PDB: 2HYY) wurden Wasserstoffbrücken zu den Aminosäuren Met-318, Thr-315 als *H-bond constraints* definiert. Beim Docking der Derivate **83–88** wurden zusätzlich Wasserstoffbrücken zu den Aminosäuren Glu-286 und Asp-381 vorgegeben.

Induced-Fit-Dockings wurden mit dem Modul *Induced-Fit-Docking (IFD)* nach dem Standard-Protokoll mit OPLS3e Kraftfeld durchgeführt.^[233] Input-Dateien für IFD-Aufträge wurden mit der IFD-Benutzeroberfläche erstellt und anschließend manuell um Torsionsrestriktionen (*torsional constraints*) für Diazocin- und Azobenzolreste erweitert.

5.3 Quantenmechanische Rechnungen

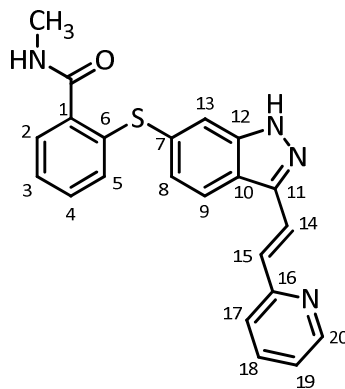
Die in Kapitel 3.1 diskutierten quantenmechanischen Rechnungen wurden von Raeker durchgeführt.^[154]

Vertikale Anregungsenergien der Axitinibderivate **30**, **64** und **65** wurden mit dem Programm Turbomole 7.0, Version 7.0 2015, der Firma Turbomol GmbH (ehemals Universität Karlsruhe und Forschungszentrum Karlsruhe GmbH) berechnet. Dazu wurde DFT-Theorie mit *Grimme's D3 dispersion correction* mit *Becke-Johnson damping (D3BJ)*^[234,235] sowie das B3LYP-Funktional^[236] mit def2-TZVP-Basissatz verwendet.^[237] Die Eigenschaften der angeregten Zustände wurden aus der in Turbomole implementierten *random phase approximation (RPA)* erhalten.^[238,239]

5.4 Synthesen

5.4.1 Synthesen und Isolierung von (*E*)-Axitinib, (*Z*)-Axitinib und des Axitinibdimers

N-Methyl-2-[[3-((*E*)-2-pyridin-2-ylethylenyl)-1*H*-indazol-6-yl]sulfanyl]benzamid - (*E*)-Axitinib (*E*-30)



(*E*)-Axitinib (*E*-30) wurde von LC Laboratories (Woburn, MA, USA) bezogen.

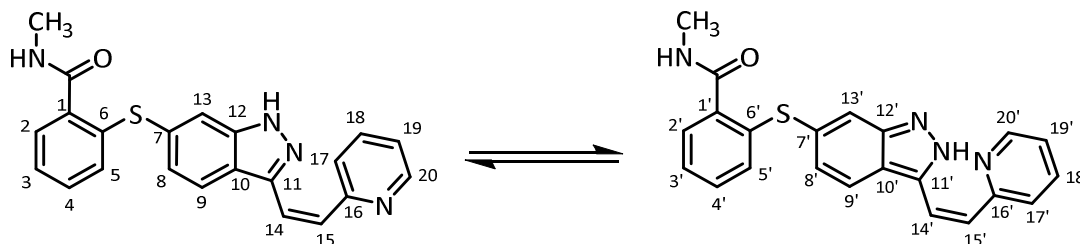
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 13.37 (s, 1 H, NH), 8.60 (dd, ³J = 4.8 Hz, ⁴J = 1.8 Hz, 1 H, H-20), 8.39 (q, ³J = 4.4 Hz, 1 H, CONHCH₃), 8.21 (d, ³J = 8.6 Hz, 1H, H-9), 7.96 (d, ³J = 16.4 Hz, 1 H, H-14), 7.81 (ddd, ³J = 7.7 Hz, ³J = 7.6 Hz, ⁴J = 1.8 Hz, 1 H, H-19), 7.66 (d, ³J = 7.7 Hz, 1 H, H-17), 7.60-7.61 (m, 1 H, H-13), 7.58 (d, ³J = 16.5 Hz, 1 H, H-15), 7.49 (dd, ³J = 7.0 Hz, ⁴J = 2.0 Hz, 1 H, H-2), 7.33 (dd, ³J = 7.4 Hz, ⁴J = 1.9 Hz, 1 H, H-3), 7.29-7.30 (m, 1 H, H-4), 7.25-7.29 (m, 1 H, H-19), 7.19 (dd, ³J = 8.5 Hz, ⁴J = 1.4 Hz, 1 H, H-8), 7.06 (dd, ³J = 7.3 Hz, ⁴J = 1.7 Hz, 1 H, H-5), 2.78 (d, ³J = 4.6 Hz, 3 H, CONHCH₃) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 167.8 (CONHCH₃), 154.9 (C-16), 149.5 (C-20), 142.0 (C-11), 141.8 (C-12), 137.0 (C-1), 136.8 (C-18), 135.6 (C-6), 132.5 (C-7), 130.3 (C-4), 130.0 (C-5), 129.2 (C-15), 127.8 (C-2), 126.1 (C-3), 125.5 (C-8), 123.6 (C-14), 122.6 (C-17), 122.5 (C-19), 121.7 (C-9), 120.3 (C-10), 114.7 (C-13), 26.0 (CONHCH₃) ppm.

¹⁵N-NMR (30 MHz, DMSO-d₆): δ = -275.2 (CONHCH₃), -196.6 (Ind-N-1), -75.1 (Py-N), -65.1 (Ind-N-2) ppm.

LC-MS (ESI): t_R = 5.7 min, m/z (%) = 387.0, 388.0, 389.0, 390.0 (100, 32, 7, 2) [M+H]⁺.

HRMS (ESI): m/z ber. für C₂₂H₁₉N₄OS⁺ 387.1274, gef. 387.1268.

***N*-Methyl-2-[[3-((*Z*)-2-pyridin-2-ylethenyl)-1*H*-indazol-6-yl]sulfanyl]benzamid - (*Z*)-Axitinib (**Z-30**)**

(*E*)-Axitinib (**E-30**) (275 mg, 712 μmol) wurde in DMSO (20 mL) gelöst und die Lösung unter Rühren mit 365 nm (LED, 5.4 W) für 1 h bestrahlt. Die Lösung wurde mit Ethylacetat (200 mL) verdünnt und mit demin. Wasser gewaschen (5 x 50 mL). Die org. Phase wurde mit ges. Natriumchlorid-Lsg. gewaschen (1 x 50 mL) und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand zweifach an Kieselgel gereinigt (40 g Säule, DCM/MeOH-Gradient: 0 % MeOH \rightarrow 10 % MeOH, 20 min, 25 mL/min). (*Z*)-Axitinib (**Z-30**) wurde als gelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 57 mg (147 μmol , 21 %).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 16.96 (bs, 0.4 H, NH'), 13.29 (s, 0.6 H, NH), 8.99 (d, 3J = 4.1 Hz, 0.4 H, $H\text{-}20'$), 8.52 (d, 3J = 4.7 Hz, 0.6 H, $H\text{-}20$), 8.39 (q, 3J = 4.5 Hz, 1 H, CONHCH_3), 8.07-8.01 (m, 0.8 H, $H\text{-}9'$, $H\text{-}18'$), 7.90 (s, 0.4 H, $H\text{-}13'$), 7.83 (d, 3J = 7.9 Hz, 0.6 H, $H\text{-}17$), 7.73 (d, 3J = 8.0 Hz, 0.4 H, $H\text{-}17'$), 7.64 (ddd, 3J = 7.8 Hz, 3J = 7.6 Hz, 4J = 1.5 Hz, 0.6 H, $H\text{-}18$), 7.45-7.53 (m, 2 H, $H\text{-}13$, $H\text{-}19'$, $H\text{-}2$), 7.19-7.32 (m, 3.6 H, $H\text{-}3$, $H\text{-}4$, $H\text{-}9$, $H\text{-}19$, $H\text{-}15'$), 7.1 (d, 3J = 8.0 Hz, 0.4 H, $H\text{-}8'$), 7.04 (d, 3J = 12.9 Hz, 0.6 H, $H\text{-}15$), 6.95-6.99 (m, 1.6 H, $H\text{-}5$, $H\text{-}8$), 6.86 (d, 3J = 12.7 Hz, 1 H, $H\text{-}14$), 2.76 (d, 3J = 4.6 Hz, 3 H, CONHCH_3) ppm.

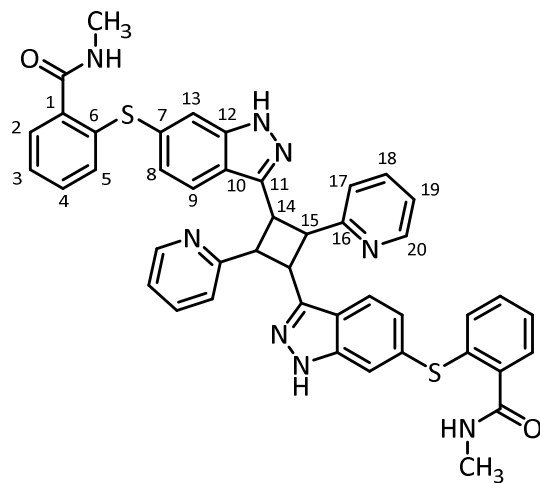
$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 167.8, 155.6, 153.4, 149.1, 148.3, 141.1, 140.9, 138.6, 137.1, 136.5, 136.2, 135.9, 135.4, 132.6, 132.3, 132.0, 131.3, 130.2, 130.1, 129.4, 127.7, 126.9, 126.6, 126.2, 125.8, 124.7, 123.7, 123.1, 123.0, 122.3, 122.0, 121.4, 121.2, 120.6, 116.5, 114.3, 26.0 ppm.

$^{15}\text{N-NMR}$ (30 MHz, DMSO- d_6): δ = -275.2 (CONHCH_3), -196.9 (Ind-*N*-1, 1*H*-Tautomer), -152.7 (Ind-*N*-2, 2*H*-Tautomer), -92.1 (Py-*N*, 2*H*-Tautomer), -65.92 (Ind-*N*-2, 1*H*-Tautomer), -65.7 (Py-*N*, 1*H*-Tautomer) ppm.

LC-MS (ESI): t_R = 5.5 min, m/z (%) = 387.1, 388.1, 389.0, 390.0 (100, 32, 7, 2) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

HRMS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{OS}^+$ 387.12741, gef. 387.12704.

2,2'-([2,4-Di(pyridin-2-yl)cyclobutan-1,3-diyl]bis(1*H*-indazol-3,6-diyl)]bis(sulfandi-yl)]bis(*N*-methylbenzamid) – Axitinibdimer (31)



(*E*)-Axitinib (*E*-**30**) (100 mg, 259 μ mol) wurde in DMSO (10 mL) gelöst und die Lösung mit demin. Wasser (90 mL) verdünnt. Die trübe Lösung wurde unter Rühren für 1.5 h mit 365 nm (LED, 5.4 W) bestrahlt. Zwischenzeitlich wurde die Suspension zur besseren Durchmischung einige Male für 1 min im Ultraschallbad behandelt. Nach vollständigem Umsatz wurde der Niederschlag abfiltriert und i. Vak. getrocknet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (12 g Säule, DCM/MeOH-Gradient: 0 % MeOH \rightarrow 15 % MeOH, 15 min, dann weitere 15 min mit 15 % MeOH, 10 mL/min). Es wurde ein farbloser Feststoff erhalten

Ausbeute: 54 mg (70 μ mol, 27 %).

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.64 (s, 2 H, NH), 8.31-8.34 (m, 4 H, CONHCH₃, *H*-20), 7.64 (d, ³*J* = 8.3 Hz, 2 H, *H*-9), 7.45 (d, ³*J* = 6.4 Hz, 2 H, *H*-2), 7.35-7.39 (m, 4 H, *H*-13, *H*-18), 7.21-7.28 (m, 4 H, *H*-3, *H*-4), 7.1 (d, ³*J* = 7.8 Hz, 2 H, *H*-17), 6.95 (dd, ³*J* = 6.9 Hz, ³*J* = 5.3 Hz, 2 H, *H*-20), 6.9 (d, ³*J* = 8.1 Hz, 2 H, *H*-8), 6.76 (d, ³*J* = 7.6 Hz, 2 H, *H*-5), 5.27 (dd, ³*J* = 8.5 Hz, ³*J* = 7.5 Hz, 2 H, *H*-14), 5.17 (dd, ³*J* = 8.5 Hz, ³*J* = 7.5 Hz, 2 H, *H*-15), 2.75 (d, ³*J* = 4.5 Hz, 6 H, CONHCH₃) ppm.

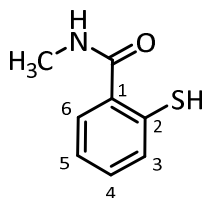
¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 167.8 (CONHCH₃), 159.6 (C-16), 148.4 (C-20), 144.4 (C-11), 141.2 (C-12), 136.4 (C-6), 136.3 (C-1), 135.4 (C-18), 130.8 (C-7), 130.1 (C-4), 129.1 (C-5), 127.6 (C-2), 125.6 (C-3), 124.0 (C-8), 123.2 (C-17), 121.5 (C-10), 121.3 (C-9), 121.0 (C-19), 114.6 (C-13), 46.1 (C-14), 38.1 (C-15), 26.1 (CONHCH₃) ppm.

LC-MS (ESI): *t*_R = 5.8 min, *m/z* (%) = 773.3, 774.3, 775.3, 776.3, 777.3 (100, 50, 21, 7, 3) [M + H]⁺.

HRMS (ESI): *m/z* ber. für C₂₂H₁₉N₄OS⁺ 773.24754, gef. 773.24699.

5.4.2 Synthese des Axitinibpharmakophors

N-Methyl-2-sulfanylbenzamid (44)



Synthesemethode A

Methylamin Hydrochlorid (200 mg, 2.96 mmol) wurde unter Stickstoffatmosphäre in trockenem Dichlormethan suspendiert. Die Suspension wurde auf 0 °C gekühlt und Trimethylaluminium (2 M in Toluol, 1.48 mL, 2.96 mmol) tropfenweise zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemp. erwärmt und 30 min gerührt. Anschließend wurde 2-Mercaptobenzoessäuremethylester (200 µL, 1.48 mmol) tropfenweise zugegeben und 15 h auf 50 °C erhitzt, woraufhin sich die Lösung gelb färbte. Das Reaktionsgemisch wurde auf 0 °C gekühlt und tropfenweise mit 1 M Salzsäure versetzt. Die wässr. Phase wurde mit Dichlormethan extrahiert (3 x 30 mL) und die vereinigten org. Extrakte über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (40 g Säule, PE/EA-Gradient, 0 % EA → 50 % EA, 10 min, anschließend weitere 10 min bei konstant 50 % EA, 25 mL/min). Es wurde ein farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 170 mg (1.02 mmol, 69 %).

Synthesemethode B

2,2'-Disulfandiylbis(*N*-methylbenzamid) (45) (2 g, 6.02 mmol) wurde unter Stickstoffatmosphäre in trockenem THF (60 mL) suspendiert und auf 0 °C gekühlt. Zu dieser Lösung wurde Natriumborhydrid (928 mg, 24.1 mmol) portionsweise zugegeben und die Lösung anschließend auf Raumtemp. erwärmt. Das Reaktionsgemisch wurde 2 h auf 50 °C erhitzt, woraufhin der zunächst ungelöste Teil vollständig in Lösung ging. Anschließend wurde die Lösung i. Vak. konzentriert und der Rückstand tropfenweise auf Eiswasser (200 mL) gegeben. Unter Kühlung wurde mit 25%iger Essigsäure auf pH = 4 angesäuert. Die wässr. Lösung wurde mit Ethylacetat extrahiert (3 x 100 mL). Dabei wurde der Scheidetrichter jeweils mit Stickstoff gespült, um einer Oxidation des Thiols durch Luftsauerstoff vorzubeugen. Die vereinigten org. Extrakte wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde in wenig Dichlormethan aufgenommen und via Flüssiginjektion

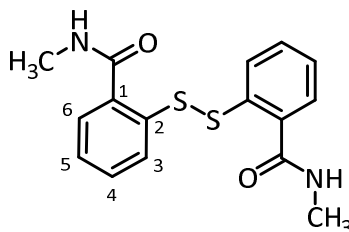
säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (120 g Säule, PE/EA-Gradient, 25 % EA → 50 % EA, 7 min, anschließend weitere 11 min bei 50 % EA, 25 mL/min). Es wurde ein farbloser, leicht gräulicher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 1.68 g (10.1 mmol, 84 %).

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 8.36 (bs, 1 H, N-H), 7.49 (dd, ³J = 7.7 Hz, ⁴J = 1.5 Hz, 1 H, H-6), 7.41 (dd, ³J = 7.8 Hz, ⁴J = 1.1 Hz, 1 H, H-3), 7.28 (td, ³J = 7.6 Hz, ⁴J = 1.5 Hz, 1 H, H-4), 7.16 (td, ³J = 7.5 Hz, ⁴J = 1.2 Hz, 1 H, H-5), 5.4 (s, 1 H, SH), 2.75 (d, ³J = 4.6 Hz, 3 H, CONHCH₃) ppm.

¹³C-NMR (75.5 MHz, DMSO-d₆): δ = 168.1 (CONHCH₃), 133.5 (C-1), 132.9 (C-2), 130.3 (C-3), 130.2 (C-4), 128.2 (C-6), 124.5 (C-5), 26.1 (CONHCH₃) ppm.

LC-MS (ESI): t_R = 5.3 min, m/z (%) = 168.0, 169.0, 169.9 (34, 4, 2) [M+H]⁺; 333.2, 334.2, 335.2 (100, 20, 30) [C₁₆H₁₇N₂O₂S₂]⁺.

2,2'-Disulfandiylbis(*N*-methylbenzamid) (47)

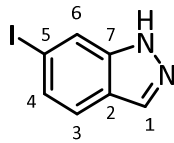
2,2'-Dithiodibenzoesäure (**45**) (5 g, 16.3 mmol) wurde in trockenem THF (40 mL) suspendiert und mit DMF (150 μ L) versetzt. Die Suspension wurde auf 0 °C gekühlt und Oxalylchlorid (14 mL, 163 mmol) tropfenweise zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 4 h bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und der Rückstand in trockenem Chloroform (30 mL) aufgenommen. Methylamin Hydrochlorid (4.41 g, 65.3 mmol) wurde zusammen mit Triethylamin (13.8 mL, 97.9 mmol) in trockenem Chloroform (30 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu diesem Gemisch wurde die 2,2'-Dithiodibenzoesäurechlorid-Lösung tropfenweise zugegeben und anschließend 24 h bei Raumtemp. gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde auf Eiswasser (100 mL) gegeben und der Niederschlag abgesaugt. Nach Trocknung i. Vak. wurde ein farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 3.22 g (9.68 mmol, 59 %).

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 8.57 (q, ³J = 4.3 Hz, 2 H, CONHCH₃), 7.63 (dd, ³J = 7.6 Hz, ⁴J = 1.4 Hz, 2 H, H-6), 7.62 (dd, ³J = 8.1 Hz, ⁴J = 1.0 Hz, 2 H, H-3), 7.44 (ddd, ³J = 8.1 Hz, ³J = 7.4 Hz, ⁴J = 1.4 Hz, 2 H, H-4), 7.29 (td, ³J = 7.5 Hz, ⁴J = 1.1 Hz, 1 H, H-5), 2.81 (d, ³J = 4.6 Hz, 6 H, CONHCH₃) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ = 167.3 (CONHCH₃), 136.7 (C-2), 133.7 (C-1), 131.1 (C-4), 127.9 (C-6), 125.9 (C-5), 125.6 (C-3), 26.3 (CONHCH₃) ppm.

LC-MS (ESI): t_R = 6.5 min, m/z (%) = 333.0, 333.9, 334.9 (100, 22, 10) [M+H]⁺.

6-Iod-1H-indazol (49)

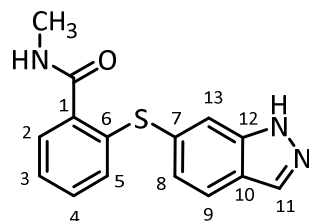
6-Aminoindazol (**48**) (7.97 mL, 77.3 mmol) wurde in einem Gemisch aus demin. Wasser (5 mL) und Aceton (2 mL) suspendiert. Die Suspension wurde auf $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt und tropfenweise mit konz. Schwefelsäure (0.4 mL, 6.76 mmol) versetzt. Anschließend wurde eine wässr. Natriumnitrit-Lsg. (2.5 M, 2.7 mL, 6.76 mmol) tropfenweise zugegeben und die Reaktion für 1 h bei $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Die kalte Lösung wurde zu einer wässr. Kaliumiodid-Lsg. (1.87 g, 11.3 mmol, gelöst in 3 mL demin. Wasser) zutropft. Das Reaktionsgemisch wurde 18 h bei Raumtemp. gerührt. Die wässr. Lösung wurde mit Ethylacetat extrahiert (3 x 30 mL) und die vereinigten org. Phasen mit 30%iger Natriumsulfit-Lsg. gewaschen (2 x 20 mL). Die org. Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (40 g Säule, PE/EA-Gradient, 10 % EA \rightarrow 40 % EA, 11 min, 25 mL/min). Es wurde ein oranger Feststoff erhalten.

Ausbeute: 418 mg (1.71 mmol, 76 %).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 13.12 (s, 1 H, NH), 8.07 (s, 1 H, H-1), 7.95 (s, 1 H, H-6), 7.59 (d, 3J = 8.4 Hz, 1 H, H-3), 7.38 (dd, 3J = 8.4 Hz, 4J = 1.4 Hz, 1 H, H-4) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, DMSO- d_6): δ = 141.2 (C-7), 133.8 (C-1), 128.7 (C-4), 122.4 (C-3), 122.0 (C-6), 118.7 (C-2), 92.0 (C-5) ppm.

LC-MS (ESI): t_R = 7.2 min, m/z (%) = 244.7, 245.7 (100, 7) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2-[(1*H*-Indazol-6-yl)sulfanyl]-*N*-methylbenzamid (50)

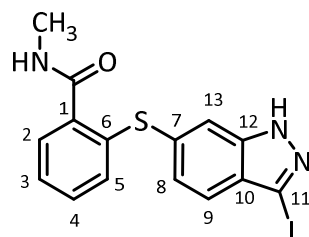
6-Iod-1*H*-indazol (**50**) (1.95 g, 7.98 mmol) wurde unter Stickstoffatmosphäre zusammen mit Pd₂(dba)₃ (73 mg, 1 mol-%), Xantphos (92 mg, 2 mol-%) und Natriumhydrogencarbonat (738 mg, 8.78 mmol) in trockenem, entgastem NMP (30 mL) gelöst und 30 min bei Raumtemp. gerührt. *N*-Methyl-2-sulfanylbenzamid (**44**) (1.34 g, 7.98 mmol) wurde in trockenem, entgastem NMP gelöst und tropfenweise zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 2.5 h auf 50 °C erhitzt. Nach Abkühlung auf Raumtemp. wurde mit Ethylacetat (350 mL) verdünnt und die org. Phase mit demin. Wasser gewaschen (5 x 50 mL). Die vereinigten org. Extrakte wurden mit ges. Natriumchlorid-Lsg. (30 mL) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (120 g Säule, DCM/MeOH-Gradient, 0 % MeOH → 10 % MeOH, 18 min, 50 mL/min). Es wurde ein farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 1.39 g (4.9 mmol, 61 %).

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 13.14 (s, 1 H, Ind-NH), 8.36 (q, ³*J* = 4.6 Hz, 1 H, CONHCH₃), 8.10 (s, 1 H, *H*-11), 7.78 (dd, ³*J* = 8.4 Hz, ⁴*J* = 0.8 Hz, 1 H, *H*-9), 7.60 (s, 1 H, *H*-13), 7.43-7.49 (m, 1 H, *H*-2), 7.27 (m_c, 2 H, *H*-3, *H*-4), 7.08 (dd, ³*J* = 8.4 Hz, ⁴*J* = 1.5 Hz, 1 H, *H*-8), 6.96-6.99 (m, 1 H, *H*-5), 2.77 (d, ³*J* = 4.6 Hz, 3 H, CONHCH₃) ppm.

¹³C-NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 167.8 (CONHCH₃), 140.3 (C-12), 136.8 (C-1), 135.9 (C-6), 133.6 (C-11), 131.7 (C-7), 130.2 (C-4), 129.7 (C-5), 127.7 (C-2), 126.0 (C-3), 124.9 (C-8), 122.4 (C-10), 121.6 (C-9), 114.5 (C-13), 26.1 (CONHCH₃) ppm.

LC-MS (ESI): *t*_R = 6.3 min, *m/z* (%) = 283.9, 285.0, 285.9, 286.8 (6, 1, 0.3, 0.02) [M+H]⁺; 567.1, 568.1, 569.1, 570.1 (100, 41, 18, 4) [C₃₀H₂₇N₆O₂S₂]⁺.

2-[(3-Iod-1*H*-indazol-6-yl)sulfanyl]-*N*-methylbenzamid (51)

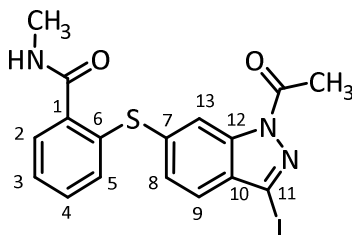
2-[(1*H*-Indazol-6-yl)sulfanyl]-*N*-methylbenzamid (**50**) (400 mg, 1.41 mmol) wurde unter Stickstoffatmosphäre in trockenem DMF (12 mL) gelöst und mit Kaliumhydroxid (780 mg, 5.65 mmol) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min bei Raumtemp. gerührt und Iod (717 g, 2.82 mmol) portionsweise zugegeben. Nach weiteren 2.5 h wurde mit Ethylacetat (200 mL) verdünnt und die org. Phase mit Natriumdisulfit-Lsg. (2 x 50 mL) und demin. Wasser (1 x 50 mL) gewaschen. Die org. Phase wurden über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und das Rohprodukt aus Methanol umkristallisiert. Es wurde ein farbloser kristalliner Feststoff erhalten.

Ausbeute: 362 mg (885 μmol , 63 %).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6): δ = 13.54 (bs, 1 H, Ind-NH), 8.36 (q, 3J = 4.5 Hz, 1 H, CONHCH₃), 7.56-7.57 (m, 1 H, H-13), 7.47-7.50 (m, 1 H, H-2), 7.44 (dd, 3J = 8.5 Hz, 4J = 0.7 Hz, 1 H, H-9), 7.30 (m, 2 H, H-3, H-4), 7.13 (dd, 3J = 8.5 Hz, 4J = 1.4 Hz, 1 H, H-8), 7.0-7.04 (m, 1 H, H-5), 2.75 (d, 3J = 4.6 Hz, 3 H, CONHCH₃) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, DMSO-d_6): δ = 167.8 (CONHCH₃), 140.1 (C-12), 137.3 (C-1), 135.1 (C-6), 133.9 (C-7), 130.3 (C-4), 130.3 (C-5), 127.8 (C-2), 126.4 (C-3), 126.3 (C-10), 125.4 (C-8), 121.5 (C-9), 114.2 (C-13), 93.6 (C-11), 26.1 (CONHCH₃) ppm.

LC-MS (ESI): t_{R} = 7.1 min, m/z (%) = 409.9, 410.0, 411.9, 412.9 (83, 19, 5, 1) $[\text{M}+\text{H}]^+$; 818.9, 819.9, 820.9, 821.9 (100, 42, 17, 6) $[\text{C}_{30}\text{H}_{25}\text{I}_2\text{N}_6\text{O}_2\text{S}_2]^+$.

2-[(1-Acetyl-3-iod-1*H*-indazol-6-yl)sulfanyl]-*N*-methylbenzamid (52a)

2-[(3-Iod-1*H*-indazol-6-yl)sulfanyl]-*N*-methylbenzamid (**51**) (600 mg, 1.47 mmol) wurde unter Stickstoffatmosphäre in trockenem DMF (15 mL) gelöst, mit Kaliumcarbonat (304 mg, 2.20 mmol) versetzt und 30 min bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wurde Essigsäureanhydrid (280 μ L, 2.93 mmol) tropfenweise zugegeben und 3 h auf 60 °C erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde auf Eiswasser (100 mL) gegeben und der Niederschlag abgesaugt. Nach Trocknung i. Vak. wurde ein farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 583 mg (1.29 mmol, 88 %)

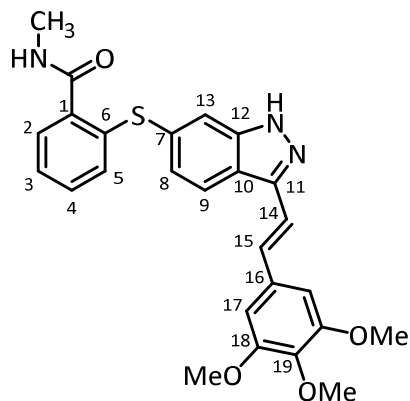
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 8.38 (q, 3J = 4.5 Hz, 1 H, CONHCH $_3$), 8.22-8.23 (m, 1 H, *H*-13), 7.55 (d, 3J = 8.4 Hz, 1 H, *H*-9), 7.49-7.52 (m, 1 H, *H*-2), 7.39 (dd, 3J = 8.4 Hz, 4J = 1.5 Hz, 1 H, *H*-8), 7.36 (m, 2 H, *H*-3, *H*-4), 7.14-7.17 (m, 1 H, *H*-5), 2.74 (d, 3J = 4.6 Hz, 3 H, CONHCH $_3$), 2.67 (s, 3 H, COCH $_3$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, DMSO- d_6): δ = 170.0 (COCH $_3$), 167.7 (CONHCH $_3$), 139.2 (C-12), 138.6 (C-1), 138.3 (C-7), 133.5 (C-6), 131.4 (C-5), 130.4 (C-4), 129.4 (C-10), 128.2 (C-8), 128.0 (C-2), 127.1 (C-3), 122.6 (C-9), 116.8 (C-13), 105.1 (C-11), 26.0 (CONHCH $_3$), 22.8 (COCH $_3$) ppm.

LC-MS (ESI): t_R = 7.8 min, m/z (%) = 451.8, 452.8, 453.8, 454.8 (100, 24, 8, 1) [M+H] $^+$; 902.9, 903.9, 904.9, 905.9 (70, 32, 13, 4) [C $_{34}$ H $_{29}$ I $_2$ N $_6$ O $_4$ S $_2$] $^+$.

5.4.3 Synthesen der stilbenähnlichen Axitinibderivate

(*E*)-*N*-Methyl-2-[[3-(3,4,5-trimethoxystyryl)-1*H*-indazol-6-yl]sulfanyl]benzamid (*E*-33)



2-[[1-Acetyl-3-iod-1*H*-indazol-6-yl]sulfanyl]-*N*-methylbenzamid (**52a**) (100 mg, 222 μ mol) und 1,2,3-Trimethoxy-5-vinylbenzen (**53**) (258 mg, 1.33 mmol) wurden unter Stickstoffatmosphäre zusammen mit Pd(OAc)₂ (4 mg, 8 mol-%) und Xantphos (10 mg, 8 mol-%) in trockenem DMF (6 mL) gelöst und anschließend DIPEA (116 μ L, 665 μ mol) tropfenweise zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 24 h auf 95 °C erhitzt. Nach Abkühlung auf Raumtemp. wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (40 g Säule, PE/EA-Gradient, 33 % EA \rightarrow 70 % EA, 30 min, 25 mL/min). (*E*)-2-[[1-Acetyl-3-(3,4,5-trimethoxystyryl)-1*H*-indazol-6-yl]sulfanyl]-*N*-methylbenzamid (*E*-57) wurde als gelber Feststoff erhalten (70 mg, 135 μ mol, 61 %). Davon wurden 42 mg (81 μ mol) in Methanol (2 mL) suspendiert und mit Salzsäure (4 M in Dioxan, 2 mL, 8.11 mmol) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 2 h bei Raumtemp. gerührt und anschließend auf ges. Natriumhydrogencarbonat-Lsg. (20 mL) gegeben. Die wässr. Phase wurde mit Ethylacetat extrahiert (3 x 20 mL), die vereinigten org. Extrakte mit demin. Wasser gewaschen (1 x 20 mL) und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (12 g Säule, DCM/MeOH-Gradient, 0 % MeOH \rightarrow 5 % MeOH, 15 min, 20 mL/min). Es wurde ein gelber Feststoff erhalten.

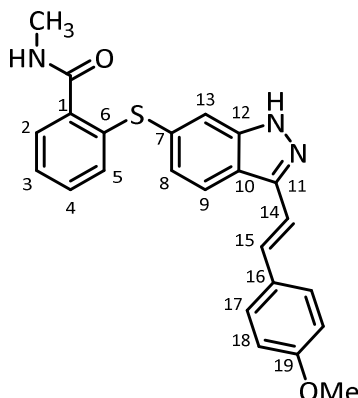
Ausbeute: 29 mg (61 μ mol, 75 %).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 13.22 (s, 1 H, NH), 8.4 (q, ³J = 4.4 Hz, 1 H, NHCH₃), 8.24 (d, ³J = 8.6 Hz, 1H, H-9), 7.57 (s, 1 H, H-13), 7.53 (d, ³J = 16.7 Hz, 1 H, H-14), 7.48-7.50 (überlagertes Signal, 1 H, H-2), 7.47 (d, ³J = 16.5 Hz, 1 H, H-15), 7.30 (m_c, 2 H, H-3, H-4), 7.17 (d, ³J = 8.5 Hz, 1H, H-8), 7.06 (s, 2 H, H-17), 7.03 (dd, ³J = 7.7 Hz, ⁴J = 1.1 Hz, 1 H, H-5), 3.86 (s, 6 H, OCH₃), 3.86 (s, 3 H, OCH₃), 2.77 (d, ³J = 4.6 Hz, 3 H, CONHCH₃) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ = 167.9 (CONHCH₃), 153.1 (C-18), 142.7 (C-11), 141.8 (C-12), 137.4 (C-19), 136.8 (C-1), 135.8 (C-6), 132.8 (C-16), 132.3 (C-7), 130.3 (C-4), 130.2 (C-15), 129.9 (C-5), 127.8 (C-2), 126.1 (C-3), 125.2 (C-8), 122.1 (C-9), 120.1 (C-10), 119.8 (C-14), 114.7 (C-13), 103.9 (C-17), 60.1 (OCH₃), 55.9 (OCH₃), 26.1 (CONHCH₃) ppm.

LC-MS (ESI): t_R = 6.5 min, m/z (%) = 476.1, 477.1, 478.1, 479.1 (100, 33, 11, 2) [M+H]⁺; 951.2, 952.2, 953.2 (4, 3, 1) [C₅₂H₅₁N₆O₈S₂]⁺.

HRMS (ESI): m/z ber. für C₂₆H₂₆N₃O₄S⁺ 476.1639, gef. 476.1638.

(E)-N-Methyl-2-[[3-(4-methoxystyryl)-1H-indazol-6-yl]sulfanyl]benzamid (E-35)

2-[[1-Acetyl-3-iod-1H-indazol-6-yl]sulfanyl]-N-methylbenzamid (**52a**) (100 mg, 222 μmol) und 1-Methoxy-4-vinylbenzen (**54**) (178 mg, 1.33 mmol) wurden unter Stickstoffatmosphäre zusammen mit $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (4 mg, 8 mol-%) und Xantphos (10 mg, 8 mol-%) in trockenem DMF (5 mL) gelöst und anschließend DIPEA (116 μL , 665 μmol) tropfenweise zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 24 h auf 90 °C erhitzt. Nach Abkühlung auf Raumtemp. wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (40 g Säule, PE/EA-Gradient, 33 % EA \rightarrow 70 % EA, 35 min, 25 mL/min). (E)-2-[[1-Acetyl-3-(4-methoxystyryl)-1H-indazol-6-yl]sulfanyl]-N-methylbenzamid (**E-58**) wurde als gelber Feststoff erhalten (24 mg, 52 μmol , 24 %). Davon wurden 24 mg (52 μmol) in Methanol (2 mL) suspendiert und mit Salzsäure (4 M in Dioxan, 2 mL, 8.11 mmol) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 2 h bei Raumtemp. gerührt und anschließend auf ges. Natriumhydrogencarbonat-Lsg. (20 mL) gegeben. Die wässr. Phase wurde mit Ethylacetat extrahiert (3 x 20 mL), die vereinigten org. Extrakte mit demin. Wasser gewaschen (1 x 20 mL) und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (12 g Säule, PE/EA-Gradient, 50 % EA \rightarrow 85 % EA, 16 min, 20 mL/min). Es wurde ein gelber Feststoff erhalten.

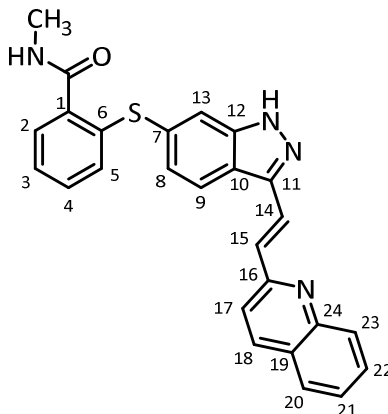
Ausbeute: 29 mg (61 μmol , 96 %).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): δ = 13.16 (s, 1 H, NH), 8.4 (q, 3J = 4.6 Hz, 1 H, NHCH_3), 8.19 (d, 3J = 8.5 Hz, 1H, H-9), 7.65 (d, 3J = 8.8 Hz, 2 H, H-17), 7.57 (s, 1 H, H-13), 7.49 (dd, 3J = 7.4 Hz, 4J = 1.9 Hz, 1 H, H-2), 7.47 (d, 3J = 16.3 Hz, 1 H, H-15), 7.38 (d, 3J = 16.7 Hz, 1 H, H-14), 7.29 (m, 2 H, H-3, H-4), 7.14 (dd, 3J = 8.5 Hz, 4J = 1.4 Hz, 1H, H-8), 7.01 (dd, 3J = 7.8 Hz, 4J = 1.2 Hz, 1 H, H-5), 6.97 (d, 3J = 8.8 Hz, 2 H, H-18), 3.79 (s, 3 H, OCH_3), 2.77 (d, 3J = 4.6 Hz, 3 H, CONHCH_3) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ = 167.9 (CONHCH₃), 159.1 (C-19), 142.8 (C-11), 141.8 (C-12), 136.8 (C-1), 135.9 (C-6), 132.1 (C-7), 130.3 (C-4), 129.8 (C-5), 129.7 (C-2), 129.6 (C-16), 127.9 (C-17), 127.8 (C-15), 126.1 (C-3), 125.2 (C-8), 122.0 (C-9), 120.1 (C-10), 117.9 (C-14), 114.7 (C-13), 114.2 (C-18), 55.2 (OCH₃), 26.1 (CONHCH₃) ppm.

LC-MS (ESI): t_R = 6.7 min, m/z (%) = 416.0, 417.0, 418.0, 418.9 (100, 33, 11, 2) [M+H]⁺; 831.2, 832.2, 833.2, 834.1, 835.1 (81, 46, 19, 7, 2) [C₄₈H₄₃N₆O₄S₂]⁺.

HRMS (ESI): m/z ber. für C₂₄H₂₂N₃O₂S⁺ 416.1427, gef. 416.1425.

(*E*)-*N*-Methyl-2-({3-[2-(chinolin-2-yl)vinyl]-1*H*-indazol-6-yl}sulfanyl)benzamid (*E*-36)

2-[(1-Acetyl-3-iod-1*H*-indazol-6-yl)sulfanyl]-*N*-methylbenzamid (**52a**) (300 mg, 665 μmol) und 2-Vinylchinolin (**55**) (310 mg, 1.99 mmol) wurden unter Stickstoffatmosphäre zusammen mit $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (12 mg, 8 mol-%) und Xantphos (31 mg, 8 mol-%) in trockenem DMF (10 mL) gelöst und anschließend DIPEA (350 μL , 1.99 mmol) tropfenweise zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 24 h auf 95 °C erhitzt. Nach Abkühlung auf Raumtemp. wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (40 g Säule, DCM/MeOH-Gradient, 0 % MeOH \rightarrow 5 % MeOH, 20 min, 25 mL/min). (*E*)-2-({1-Acetyl-3-[2-(chinolin-2-yl)vinyl]-1*H*-indazol-6-yl}sulfanyl)-*N*-methylbenzamid (*E*-**59**) wurde als gelber Feststoff erhalten (208 mg, 435 μmol , 65 %). Davon wurden 156 mg (326 μmol) in Dichlormethan (2 mL) suspendiert und mit Salzsäure (4 M in Dioxan, 5 mL) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 4 h bei Raumtemp. gerührt und anschließend auf ges. Natriumhydrogencarbonat-Lsg. (50 mL) gegeben. Die wässr. Phase wurde mit Dichlormethan extrahiert (3 x 50 mL), die vereinigten org. Extrakte mit demin. Wasser gewaschen (1 x 30 mL) und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (40 g Säule, DCM/MeOH-Gradient, 0 % MeOH \rightarrow 15 % MeOH, 15 min, 25 mL/min). Es wurde ein gelber Feststoff erhalten.

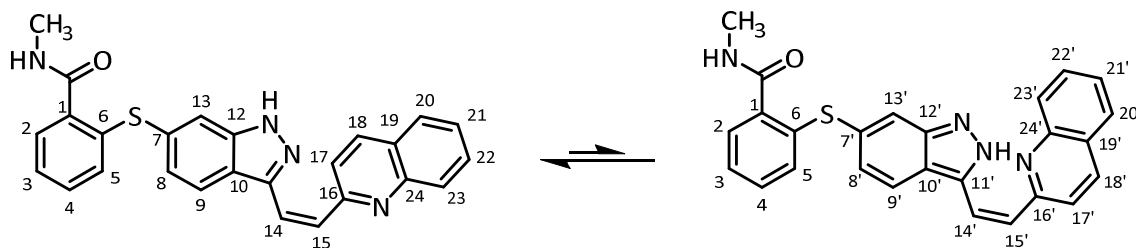
Ausbeute: 125 mg (286 μmol , 88 %).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6): δ = 13.70 (s, 1 H, NH), 8.48 (q, 3J = 4.4 Hz, 1 H, NHCH_3), 8.37 (d, 3J = 8.6 Hz, 1 H, *H*-18), 8.27 (d, 3J = 8.3 Hz, 1H, *H*-9), 8.14 (d, 3J = 16.6 Hz, 1 H, *H*-14), 8.02 (d, 3J = 7.8 Hz, 1 H, *H*-20), 7.99 (d, 3J = 8.5 Hz, 1 H, *H*-17), 7.95 (d, 3J = 8.1 Hz, 1 H, *H*-23), 7.75 (ddd, 3J = 8.4 Hz, 3J = 7.0 Hz, 4J = 1.2 Hz, 1 H, *H*-22), 7.73 (d, 3J = 16.6 Hz, 1 H, *H*-15), 7.66 (s, 1 H, *H*-13), 7.56 (ddd, 3J = 8.06 Hz, 3J = 6.9 Hz, 4J = 1.2 Hz, 1 H, *H*-21), 7.49-7.52 (m, 1 H, *H*-2), 7.26-7.32 (m, 2 H, *H*-3, *H*-4), 7.22 (dd, 3J = 8.4 Hz, 4J = 1.4 Hz, 1 H, *H*-8), 7.01-7.04 (m, 1 H, *H*-5), 2.77 (d, 3J = 4.6 Hz, 3 H, CONHCH_3) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 167.9 (CONHCH₃), 155.6 (C-16), 147.7 (C-24), 141.9 (C-12), 141.8 (C-11), 136.8 (C-1), 136.5 (C-18), 135.8 (C-6), 132.5 (C-7), 130.3 (C-4), 129.9 (C-5), 129.9 (C-22), 129.7 (C-15), 128.7 (C-23), 127.8 (C-2), 127.8 (C-20), 127.1 (C-19), 126.2 (C-21), 126.1 (C-3), 125.8 (C-8), 125.8 (C-14), 121.8 (C-9), 120.3 (C-10), 120.4 (C-17), 115.0 (C-13), 26.1 (CONHCH₃) ppm.

LC-MS (ESI): t_R = 6.9 min, m/z (%) = 437.1, 438.1, 439.1, 440.1 (100, 35, 11, 2) [M+H]⁺.

HRMS (ESI): m/z ber. für C₂₆H₂₁N₄OS⁺ 437.1431, gef. 437.1428.

(Z)-N-Methyl-2-({3-[2-(chinolin-2-yl)vinyl]-1H-indazol-6-yl}sulfanyl)benzamid (Z-36)

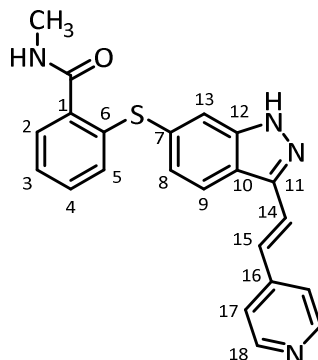
(*E*)-*N*-Methyl-2-({3-[2-(chinolin-2-yl)vinyl]-1*H*-indazol-6-yl}sulfanyl)benzamid (*E*-36) (90 mg, 712 μ mol) wurde in Methanol (20 mL) gelöst und die Lösung unter Rühren mit 365 nm (LED, 5.4 W) für 10 min bestrahlt. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand zweifach an Kieselgel gereinigt (12 g Säule, DCM/MeOH-Gradient: 0 % MeOH \rightarrow 15 % MeOH 20 min, 20 mL/min). *Z*-36 wurde als gelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 39 mg (286 μ mol, 43 %).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 17.97 (bs, 0.33 H, NH'), 13.36 (s, 0.66 H, NH), 8.58 (d, 3J = 8.5 Hz, 0.33 H, H -18'), 8.43 (q, 3J = 4.3 Hz, 0.33 H, $\text{CONH}'\text{CH}_3$), 8.38 (q, 3J = 4.3 Hz, 0.66 H, CONHCH_3), 8.24 (d, 3J = 8.3 Hz, 0.33 H, H -9'), 8.16 (d, 3J = 8.7 Hz, 0.66 H, H -18), 8.06-8.14 (m, 0.66 H, H -23), 7.94-8.02 (m, 1H, H -23), 7.87-7.92 (m, 1.66 H, H -21, H -17'), 7.78 (d, 3J = 8.7 Hz, 0.66 H, H -17), 7.70-7.74 (m, 1 H, H -22), 7.51-7.58 (m, 0.33 H, H -21'), 7.56 (s, 1 H, H -13), 7.41-7.58 (m, 1.66 H, H -2, H -21), 7.36 (d, 3J = 8.4 Hz, 0.66 H, H -9), 7.24-7.33 (m, 2 H, H -3, H -4), 7.22 (d, 3J = 12.8 Hz, 0.6 H, H -15), 7.17 (d, 3J = 8.6 Hz, 0.33 H, H -8'), 7.04 (d, 3J = 12.8 Hz, 1 H, H -14), 7.02-7.08 (m, 1 H, H -5), 6.94 (d, 3J = 8.4 Hz, 0.66 H, H -8), 2.79 (d, 3J = 4.1 Hz, 1 H, CONHCH_3), 2.76 (d, 3J = 4.5 Hz, 2 H, CONHCH_3) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6): δ = 169.1, 167.9, 156.5, 155.4, 154.1, 149.4, 147.6, 147.5, 145.6, 141.0, 138.3, 137.3, 137.0, 136.7, 136.4, 136.3, 135.6, 135.4, 133.9, 133.0, 132.4, 131.3, 130.3, 130.1, 130.0, 129.7, 129.6, 129.4, 128.7, 128.3, 128.2, 127.8, 127.7, 127.4, 127.1, 127.0, 126.7, 126.5, 126.3, 126.2, 126.1, 126.0, 125.8, 125.0, 123.5, 123.3, 122.1, 121.5, 121.3, 120.8, 120.2, 118.9, 114.5, 26.1 ppm.

LC-MS (ESI): t_R = 7.0 min, m/z (%) = 436.9, 437.9, 439.0, 440.0 (100, 29, 10,2) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

(E)-N-Methyl-2-({3-[2-(pyridin-4-yl)vinyl]-1H-indazol-6-yl}sulfanyl)benzamid (E-62)

2-[(1-Acetyl-3-iod-1H-indazol-6-yl)sulfanyl]-N-methylbenzamid (**52a**) (100 mg, 222 μmol) und 4-Vinylpyridin (**56**) (140 mg, 1.99 mmol) wurden unter Stickstoffatmosphäre zusammen mit $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (4 mg, 8 mol-%) und Xantphos (10 mg, 8 mol-%) in trockenem DMF (10 mL) gelöst und anschließend DIPEA (120 μL , 665 μmol) tropfenweise zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 24 h auf 90 °C erhitzt. Nach Abkühlung auf Raumtemp. wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (12 g Säule, DCM/MeOH-Gradient, 0 % MeOH \rightarrow 10 % MeOH, 15 min, 20 mL/min). (E)-2-({1-Acetyl-3-[2-(pyridin-4-yl)vinyl]-1H-indazol-6-yl}sulfanyl)-N-methylbenzamid (**E-60**) wurde als farbloser Feststoff erhalten (42 mg, 98 μmol , 44 %). Davon wurden 42 mg (98 μmol) in Methanol (2 mL) suspendiert und mit Salzsäure (4 M in Dioxan, 2.5 mL) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 2 h bei Raumtemp. gerührt und anschließend auf ges. Natriumhydrogencarbonat-Lsg. (25 mL) gegeben. Die wässr. Phase wurde mit Dichlormethan extrahiert (3 x 25 mL), die vereinigten org. Extrakte mit demin. Wasser gewaschen (1 x 30 mL) und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (12 g Säule, DCM/MeOH-Gradient, 0 % MeOH \rightarrow 10 % MeOH, 17 min, 20 mL/min). Es wurde ein farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 35 mg (91 μmol , 92 %).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6): δ = 13.42 (bs, 1 H, NH), 8.56 (d, 3J = 5.0 Hz, 2 H, H-18), 8.35 (m_c , 1 H, CONHCH₃), 8.24 (d, 3J = 8.6 Hz, 1H, H-9), 7.83 (d, 3J = 16.8 Hz, 1 H, H-14), 7.68 (d, 3J = 5.5 Hz, 2 H, H-17), 7.60 (s, 1 H, H-13), 7.49 (d, 3J = 16 Hz, 1 H, H-15), 7.45-7.50 (m, 1 H, H-2), 7.23-7.30 (m, 2 H, H-3, H-4), 7.19 (d, 3J = 8.5 Hz, 1 H, H-8), 7.04 (d, 3J = 7.5 Hz, 1 H, H-5), 2.77 (d, 3J = 4.6 Hz, 3 H, CONHCH₃) ppm.

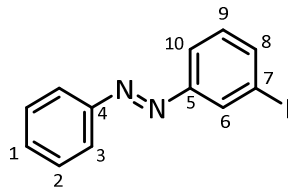
$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, DMSO-d_6): δ = 167.8 (CONHCH₃), 150.0 (C-18), 141.8 (C-11), 141.3 (C-12), 137.0 (C-1), 135.6 (C-6), 132.7 (C-7), 130.2 (C-4), 130.0 (C-5), 127.8 (C-2), 127.1 (C-15), 126.2 (C-3), 125.6 (C-8), 124.7 (C-14), 120.8 (C-17), 121.8 (C-9), 120.3 (C-10), 114.5 (C-13), 26.0 (CONHCH₃) ppm.

LC-MS (ESI): $t_R = 5.2$ min, m/z (%) = 387.1, 388.1, 389.1, 390.1 (100, 29, 7, 2) $[M+H]^+$; 773.1, 774.3, 775.2 (3, 1, 1) $[C_{44}H_{37}N_8O_2S_2^+]$.

HRMS (ESI): m/z ber. für $C_{44}H_{38}N_8O_2S_2^{2+}$ 387.1274, gef. 387.1271.

5.4.4 Synthesen der Azobenzole und Diazocine

(*E*)-1-(3-Iodphenyl)-2-phenyldiazen (96a)



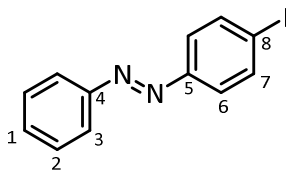
Anilin (**93**) (1.0 g, 10.7 mmol) wurde in Dichlormethan (50 mL) gelöst und Kaliumperoxomonosulfat (Oxon®) (4.9 g, 32.2 mmol), gelöst in demin. Wasser (100 mL), dazugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 6 h bei Raumtemp. gerührt wobei sich die Lösung grün färbte. Die Phasen wurden im Scheidetrichter getrennt und die wässr. Phase mit Dichlormethan extrahiert (3 x 50 mL). Die vereinigten org. Extrakte wurden mit 1 M Salzsäure, ges. Natriumhydrogencarbonat-Lsg. und Wasser gewaschen (je 1 x 35 mL) und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand in Eisessig (100 mL) aufgenommen. Zu dieser Lösung wurde 3-Iodanilin (**95a**) (2.35 g, 10.7 mmol) dazugegeben und das Reaktionsgemisch 24 h bei Raumtemp. gerührt. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (120 g Säule, PE/EA-Gradient, 0 % EA → 20 % EA, 20 min, dann weitere 20 mit 20 % EA, 50 mL/min). Es wurde ein oranger Feststoff erhalten.

Ausbeute: 1.03 g (3.96 mmol, 37 %).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.27 (t, ³J = 1.8 Hz, 1 H, H-6), 7.90-7.95 (m, 3 H, H-10, H-3), 7.80 (ddd, ³J = 7.8 Hz, ⁴J = 1.7 Hz, ⁴J = 1.1 Hz, 1 H, H-8), 7.49-7.56 (m, 3 H, H-2, H-1), 7.26 (t, ³J = 7.9 Hz, 1 H, H-9) ppm.

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ = 153.6 (C-5), 152.3 (C-4), 139.7 (C-8), 131.7 (C-1), 130.8 (C-6), 130.8 (C-9), 129.4 (C-3), 123.8 (C-10), 123.3 (C-2), 94.8 (C-7) ppm.

MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 308.0, 309.0, 310.0 (100, 15, 1) [M]⁺; 230.9 (17) [C₆H₄IN₂]⁺; 202.9 (79) [C₆H₄I]⁺; 105.1 (100) [C₆H₅N₂]⁺.

(E)-1-(4-Iodphenyl)-2-phenyldiazen (96b)

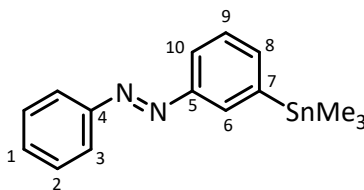
Anilin (**93**) (2.0 g, 10.7 mmol) wurde in Dichlormethan (50 mL) gelöst und Kaliumperoxomonosulfat (Oxon®) (6.54 g, 43.0 mmol), gelöst in demin. Wasser (100 mL), dazugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 2 h bei Raumtemp. gerührt wobei sich die Lösung grün färbte. Die Phasen wurden im Scheidetrichter getrennt und die wässr. Phase mit Dichlormethan (2 x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten org. Extrakte wurden mit 1 M Salzsäure, ges. Natriumhydrogencarbonat-Lsg. und Wasser gewaschen (je 1 x 50 mL) und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand in Eisessig (250 mL) aufgenommen. Zu dieser Lösung wurde 4-Iodanilin (4.23 g, 19.3 mmol) dazugegeben und das Reaktionsgemisch 96 h bei Raumtemp. gerührt. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (120 g Säule, PE/EA-Gradient, 0 % EA → 20 % EA, 20 min, dann weitere 20 min 20 % EA, 50 mL/min). Es wurde ein oranger Feststoff erhalten.

Ausbeute: 4.23 g (13.7 mmol, 64 %).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.90-7.93. (m, 2 H, *H*-3), 7.85-7.89 (AA'BB'-System, 2 H, *H*-7), 7.64-7.68 (AA'BB'-System, 2 H, *H*-6), 7.49-7.54 (m, 3 H, *H*-2, *H*-1) ppm.

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ = 152.6 (*C*-4), 152.1 (*C*-5), 138.5 (*C*-7), 131.5 (*C*-1), 129.3 (*C*-2), 124.6 (*C*-6), 123.1 (*C*-3), 97.8 (*C*-8) ppm.

MS (EI, 70 eV): *m/z* (%) = 308.0, 309.0, 310.0 (86, 11, 1) [M]⁺; 230.9 (39) [C₆H₄IN₂]⁺; 202.9 (100) [C₆H₄I]⁺; 105.1 (55) [C₆H₅N₂]⁺.

(E)-1-Phenyl-2-[3-(trimethylstannyl)phenyl]diazen (97a)

(E)-1-(3-Iodphenyl)-2-phenyldiazen (**96a**) (150 mg, 487 μmol) wurde zusammen mit Hexamethyldistannan (191 mg, 584 μmol) und $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (12 mg, 2 mol-%) unter Stickstoffatmosphäre (Glovebox) in trockenem Toluol (5 mL) gelöst und 15 min in der Mikrowelle auf 150 °C erhitzt. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (40 g Säule, PE/EA-Gradient, 0 % EA \rightarrow 10 % EA, 9 min, 25 mL/min). Es wurde ein oranges Öl erhalten.

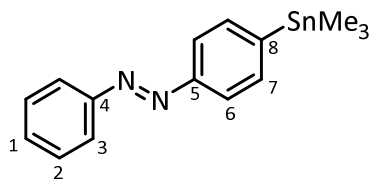
Ausbeute: 144 mg (417 μmol , 86 %).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 8.04-8.05 (m, 1 H, *H*-6), 7.92-7.95 (m, 2 H, *H*-3), 7.84 (ddd, 3J = 7.9 Hz, 4J = 2.1 Hz, 4J = 1.3 Hz, 1 H, *H*-10), 7.60 (ddd, 3J = 7.1 Hz, 4J = 1.3 Hz, 4J = 1.0 Hz, 1 H, *H*-8), 7.47-7.56 (m, 4 H, *H*-2, *H*-1, *H*-9), 0.36 (s, 9 H, SnMe_3) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3): δ = 152.9 (*C*-4), 152.1 (*C*-5), 143.7 (*C*-7), 138.7 (*C*-8), 131.0 (*C*-1), 130.7 (*C*-6), 129.2 (*C*-2), 128.7 (*C*-9), 122.9 (*C*-3), 122.2 (*C*-10), -9.3 (SnMe_3) ppm.

$^{119}\text{Sn-NMR}$ (112 MHz, CDCl_3): δ = -25.14 ppm.

MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 342.1, 343.1, 344.1, 345.1, 346.1, 347.1, 348.1, 350.1 (7, 5, 12, 6, 17, 3, 3, 3) $[\text{M}]^+$; 331.0 (100) $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$.

(E)-1-Phenyl-2-[4-(trimethylstannyl)phenyl]diazen (97b)

(E)-1-(4-Iodphenyl)-2-phenyldiazen (**96b**) (400 mg, 1.30 mmol) wurde zusammen mit Hexamethyldistannan (468 mg, 1.43 mmol) und Pd(PPh₃)₄ (30 mg, 2 mol-%) unter Stickstoffatmosphäre (Glovebox) in trockenem Toluol (5 mL) gelöst und 15 min in der Mikrowelle auf 150 °C erhitzt. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (40 g Säule, PE/EA-Gradient, 0 % EA → 10 % EA, 23 min, 25 mL/min). Es wurde ein oranges Öl erhalten.

Ausbeute: 278 mg (806 μmol, 62 %)

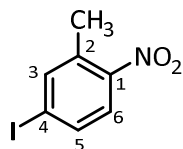
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.90-7.94. (m, 2 H, H-3), 7.86-7.90 (AA'BB'-System, 2 H, H-7), 7.65-7.68 (AA'BB'-System, 2 H, H-6), 7.47-7.55 (m, 3 H, H-2, H-1), 0.35 (s, 9 H, SnMe₃) ppm.

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ = 152.9 (C-4), 152.8 (C-5), 147.3 (C-8), 136.6 (C-7), 131.1 (C-1), 129.2 (C-2), 123.0 (C-3), 122.1 (C-6), -9.3 (SnMe₃) ppm.

¹¹⁹Sn-NMR (112 MHz, CDCl₃): δ = -26.19 ppm.

MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 342.0, 343.1, 344.0, 345.1, 346.0, 347.1, 348.1, 350.1 (0.6, 0.4, 1, 0.5, 1, 0.2, 0.2, 1.5) [M]⁺; 331.0 (100) [M-CH₃]⁺.

HRMS (EI): m/z ber. für C₁₅H₁₈N₂Sn⁺: 346.0494, gef.: 346.0490.

4-Iod-2-methyl-1-nitrobenzen (99b)

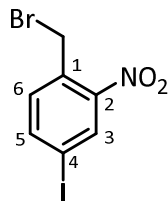
3-Methyl-4-Nitroanilin (**98**) (5.27 g, 34.6 mmol) wurde in einem Gemisch aus demin. Wasser (125 mL) und konz. Schwefelsäure (10.6 mL) suspendiert und mit einem KPG-Rührers auf höchster Stufe gerührt. Die Suspension wurde auf 0 °C gekühlt und tropfenweise mit Natriumnitrit (2.63 g, 38.1 mmol), gelöst in demin. Wasser (12 mL), versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min gerührt und schließlich Kaliumiodid (8.05 g, 48.5 mmol), gelöst in demin. Wasser (25 mL), zugetropft. Es wurde auf Raumtemp. erwärmt und 16 h gerührt. Die wässr. Lösung wurde mit Ethylacetat extrahiert (3 x 100 mL) und die vereinigten org. Phasen mit Natriumthiosulfat-Lsg. (3 x 100 mL), demin Wasser (1 x 100 mL) und ges. Natriumchlorid-Lsg. (1 x 50 mL) gewaschen. Die org. Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und der Rückstand portionsweise säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (120 g Säule, PE/EA-Gradient, 0 % EA → 10 % EA, 10 min, dann weitere 10 min 10 % EA, 50 mL/min). Es wurde ein gelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 5.89 g (22.4 mmol, 65 %).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 7.97 (bs, 1 H, *H*-3), 7.84 (d, ³*J* = 8.5 Hz, 1 H, *H*-5), 7.74 (d, ³*J* = 8.5 Hz, 1 H, *H*-6), 2.48 (s, 3 H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ = 148.5 (C-1), 141.2 (C-3), 136.2 (C-5), 134.9 (C-2), 126.0 (C-6), 102.0 (C-4), 19.0 (CH₃) ppm.

MS (EI, 70 eV): *m/z* (%) = 362.9, 263.9 (61, 5) [M]⁺; 345.9 (100) [M-OH]⁺.

1-(Brommethyl)-4-iod-2-nitrobenzen (100a)

4-Iod-1-methyl-2-nitrobenzen (**99a**) (9.06 g, 34.4 mmol) wurde zusammen mit NBS (9.26 g, 34.4 mmol) in trockenem Tetrachlormethan (24 mL) suspendiert und mit DBPO (166 mg, 684 μ mol) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 4 h zum Rückfluss erhitzt und danach erneut mit der gleichen Menge DBPO versetzt. Daraufhin wurde weitere 16 h zum Rückfluss erhitzt und nach Abkühlen auf Raumtemp. ungelöstes Succinimid abfiltriert. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand in drei Portionen säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (120 g Säule, PE/DCM-Gradient, 5 % DCM \rightarrow 20 % DCM, 30 min, 50 mL/min). Es wurde ein hellgelber Feststoff erhalten.

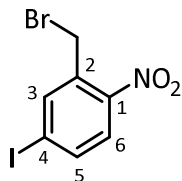
Ausbeute: 3.56 g (10.4 mmol, 30 %), Eduktrückgewinnung: 4.88 g (18.6 mmol, 54 %).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 8.35 (d, 4J = 1.8 Hz, 1 H, *H*-3), 7.93 (dd, 3J = 8.2 Hz, 4J = 1.8 Hz, 1 H, *H*-5), 7.30 (d, 3J = 8.1 Hz, 1 H, *H*-6), 4.75 (s, 2 H, CH_2) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3): δ = 148.2 (*C*-2), 142.8 (*C*-5), 134.3 (*C*-3), 133.9 (*C*-6), 132.26 (*C*-1), 93.6 (*C*-4), 28.2 (CH_2) ppm.

MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 340.9, 341.9, 342.9, 343.9 (12, 1, 11, 1) $[\text{M}]^+$; 261.9, 262.9 (100, 8) $[\text{M}-\text{Br}]^+$.

HRMS (EI): m/z ber. für $\text{C}_7\text{H}_5\text{BrINO}_2^+$: 340.8538, gef.: 340.8548.

2-(Brommethyl)-4-iod-1-nitrobenzen (100b)

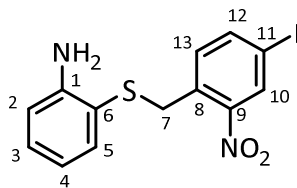
4-Iod-2-methyl-1-nitrobenzen (**99b**) (4.58 g, 17.4 mmol) wurde zusammen mit NBS (3.80 g, 20.9 mmol) in Tetrachlormethan (130 mL) suspendiert und mit DBPO (84 mg, 384 μ mol) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 63 h zum Rückfluss erhitzt und zwischenzeitlich dreimal die gleiche Menge DBPO zugegeben. Nach Abkühlen auf Raumtemp. wurde ungelöstes Succinimid abfiltriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde in drei Portionen säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (120 g Säule, PE/EA-Gradient, 0 % EA \rightarrow 10 % EA, 25 min, 50 mL/min). Es wurde ein hellgelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 1.12 g (3.28 mmol, 19 %), Eduktrückgewinnung: 2.94 g (11.2 mmol, 64 %).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.94 (d, 4J = 1.9 Hz, 1 H, *H*-3), 7.84 (dd, 3J = 8.6 Hz, 4J = 1.9 Hz, 1 H, *H*-5), 7.77 (d, 3J = 8.6 Hz, 1 H, *H*-6), 4.76 (s, 2 H, CH_2) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ = 147.6 (*C*-1), 141.4 (*C*-3), 138.9 (*C*-5), 134.5 (*C*-2), 126.9 (*C*-6), 101.1 (*C*-4), 28.0 (CH_2) ppm.

MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 340.9, 341.9, 342.9, 343.9 (12, 1, 11, 1) $[\text{M}]^+$; 261.9, 262.9 (100, 8) $[\text{M}-\text{Br}]^+$.

2-[(4-Iod-2-nitrobenzyl)sulfanyl]anilin (102a)

2,2'-Disulfandiyldianilin (**101**) (2.61 g, 7.64 mmol) wurde unter Stickstoffatmosphäre in trockenem THF (30 mL) gelöst und mit Natriumborhydrid (469 mg, 12.4 mmol) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 4 h zum Rückfluss erhitzt, wobei die Lösung allmählich trüb wurde. Die Reaktionstemperatur wurde auf 40 °C reduziert und anschließend eine Lösung von 1-(Brommethyl)-4-iod-2-nitro-benzen (**100a**) (2.61 g, 7.64 mmol) in THF (10 mL) zugetropft. Es wurde 3 h bei 40 °C gerührt und anschließend auf Eiswasser (200 mL) gegeben. Nachdem keine Gasentwicklung mehr beobachtbar war, wurde mit Ethylacetat extrahiert (3 x 50 mL) und die ver. org. Extrakte mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lsg. und ges. Natriumchlorid-Lsg. gewaschen (je 1 x 75 mL). Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand in zwei Portionen säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (120 g Säule, PE/EA-Gradient, 5 % EA → 40 % EA über 30 min, 50 mL/min). Es wurde ein oranges Öl erhalten.

Ausbeute: 1.65 g (4.27 mmol, 56 %).

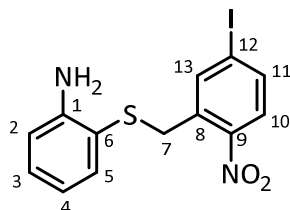
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.25 (d, ⁴*J* = 1.8 Hz, 1 H, *H*-10), 7.87 (dd, ³*J* = 8.1 Hz, ⁴*J* = 1.8 Hz, 1 H, *H*-12), 7.02 (ddd, ³*J* = 8.1 Hz, ³*J* = 7.2 Hz, ⁴*J* = 1.6 Hz, 1 H, *H*-3), 6.92 (d, ³*J* = 8.1 Hz, 1 H, *H*-13), 6.88 (dd, ³*J* = 7.7 Hz, ⁴*J* = 1.5 Hz, 1 H, *H*-5), 6.68 (dd, ³*J* = 8.1 Hz, ⁴*J* = 1.1 Hz, 1 H, *H*-2), 6.38 (ddd, ³*J* = 7.7 Hz, ³*J* = 7.2 Hz, ⁴*J* = 1.4 Hz, 1 H, *H*-4), 5.34 (s, 2 H, NH₂), 4.13 (s, 2 H, *H*-7) ppm.

¹³C-NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 149.9 (*C*-1), 148.7 (*C*-9), 141.5 (*C*-12), 135.9 (*C*-5), 133.7 (*C*-13), 132.8 (*C*-8), 132.7 (*C*-10), 130.2 (*C*-3), 116.2 (*C*-4), 114.4 (*C*-2), 113.4 (*C*-6), 92.8 (*C*-11), 34.1 (*C*-7) ppm.

LC-MS (ESI): *t*_R = 7.1 min, *m/z* (%) = 386.9, 387.9, 388.9, 389.9 (100, 19, 7, 1) [M+H]⁺.

MS (EI, 70 eV): *m/z* (%) = 385.9 (21) [M]⁺; 261.9 (7) [M-C₆H₆NS]⁺; 124 (100) [M-C₇H₆INO₂]⁺.

HRMS (EI): *m/z* ber. für C₁₃H₁₁IN₂O₂S⁺: 385.9586, gef.: 385.9580.

2-[(5-Iod-2-nitrobenzyl)sulfanyl]anilin (102b)

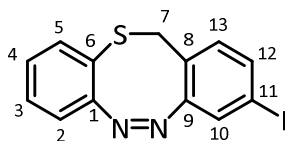
2,2'-Disulfandiyldianilin (**101**) (519 mg, 2.09 mmol) wurde unter Stickstoffatmosphäre in trockenem THF (35 mL) gelöst und mit Natriumborhydrid (198 mg, 5.23 mmol) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 1.5 h zum Rückfluss erhitzt, wobei die Lösung allmählich trüb wurde. Die Reaktionstemperatur wurde auf 40 °C reduziert und anschließend 2-(Brommethyl)-4-iod-1-nitrobenzen (**100b**) (1.1 g, 3.22 mmol), gelöst in THF (5 mL), zugetropft. Es wurde 2.5 h bei 40 °C gerührt und anschließend auf Eiswasser (150 mL) gegeben. Nachdem keine Gasentwicklung mehr beobachtbar war, wurde mit Dichlormethan extrahiert (3 x 70 mL), die ver. org. Extrakte mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lsg. und ges. Natriumchlorid-Lsg. gewaschen (je 1 x 75 mL) und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (120 g Säule, PE/EA-Gradient, 10 % EA → 40 % EA, 30 min, 50 mL/min). Es wurde ein rötlicher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 834 mg (2.16 mmol, 67 %).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.68-7.69 (m, 2 H, H-10, H-11), 7.25 (bs, 1 H, H-13), 7.15 (ddd, ³J = 8.0 Hz, ³J = 7.3 Hz, ⁴J = 1.6 Hz, 1 H, H-3), 7.01 (dd, ³J = 7.7 Hz, ⁴J = 1.5 Hz, 1 H, H-5), 6.72 (dd, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 1.2 Hz, 1 H, H-2), 6.59 (dt, ³J = 7.5 Hz, ⁴J = 1.3 Hz, 1 H, H-4), 4.31 (bs, 2 H, NH₂), 4.16 (s, 2 H, H-7) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 149.1 (C-1), 147.7 (C-9), 141.4 (C-13), 137.4 (C-5), 137.2 (C-11), 135.6 (C-8), 131.2 (C-3), 126.5 (C-10), 118.6 (C-4), 115.3 (C-6), 115.1 (C-2), 100.3 (C-12), 35.9 (C-7) ppm.

LC-MS (ESI): t_R = 10.1 min, m/z (%) = 386.7, 387.8, 388.9 (100, 19, 7) [M+H]⁺.

(Z)-3-Iod-12H-dibenzo[b,f][1,4,5]thiadiazocin (104a)

2-[(4-Iod-2-nitrobenzyl)sulfanyl]anilin (**102a**) (380 mg, 984 μmol) wurde in Ethanol (30 mL) gelöst und mit Ammoniumchlorid (158 mg, 2.95 mmol), gelöst in demin. Wasser (6.5 mL), versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde auf 60 °C erhitzt und Zinkpulver (193 mg, 2.95 mmol) zugegeben. Der Reaktionsverlauf wurde kontinuierlich mittels DC verfolgt und die Reaktion nach 35 min aufgrund zunehmender Bildung des Amino-Nebenproduktes abgebrochen. Dazu wurde das Reaktionsgemisch heiß filtriert und anschließend auf 0 °C abgekühlt. Zur kalten Lösung wurde Eisen(III)chlorid Hexahydrat (456 mg, 1.67 mmol), gelöst in eiskaltem demin. Wasser (2 mL), tropfenweise zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde langsam auf Raumtemp. gebracht und der Umsatz des Nitroso-Zwischenproduktes mittels DC verfolgt. Nach 30 min wurde Eisessig (13 mL) zugegeben und 16 h bei Raumtemp. gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde i. Vak. konzentriert und mit Dichlormethan (100 mL) verdünnt. Die org. Phase wurde mit 1 M Natronlauge (3 x 35 mL) und ges. Natriumchlorid-Lsg. (1 x 35 mL) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (40 g Säule, PE/EA-Gradient, 10 % EA \rightarrow 50 % EA, 25 min, 25 mL/min). Es wurde ein gelber Feststoff erhalten.

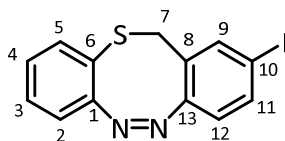
Ausbeute: 63 mg (179 μmol , 18 %), Eduktrückgewinnung: 170 mg (440 μmol , 45 %).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 7.40 (dd, 3J = 8.1 Hz, 4J = 1.8 Hz, 1 H, H-12), 7.20 (ddd, 3J = 7.8 Hz, 3J = 7.4 Hz, 4J = 1.4 Hz, 1 H, H-3), 7.11 (dd, 3J = 7.8 Hz, 4J = 1.4 Hz, 1 H, H-5), 7.04 (d, 4J = 1.7 Hz, 1 H, H-10), 6.98 (ddd, 3J = 7.9 Hz, 3J = 7.4 Hz, 4J = 1.4 Hz, 1 H, H-4), 6.85 (d, 3J = 8.1 Hz, 1 H, H-13), 6.71 (dd, 3J = 7.9 Hz, 4J = 1.4 Hz, 1 H, H-2), 4.02 (d, 2J = 11.7 Hz, 1 H, H-7), 3.62 (d, 2J = 11.7 Hz, 1 H, H-7') ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3): δ = 158.3 (C-9), 157.7 (C-1), 136.7 (C-12), 133.9 (C-5), 131.1 (C-13), 128.4 (C-3), 127.6 (C-4), 125.9 (C-10), 124.2 (C-8), 121.8 (C-6), 119.5 (C-2), 92.9 (C-11), 34.7 (C-7) ppm.

MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 351 (100) $[\text{M}]^+$; 225 (55) $[\text{M}-\text{I}]^+$.

HRMS (EI): m/z ber. für $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{IN}_2\text{S}^+$: 351.9531, gef.: 351.9526.

(Z)-2-Iod-12H-dibenzo[b,f][1,4,5]thiadiazocin (104b)

2-[(5-Iod-2-nitrobenzyl)sulfanyl]anilin (**102b**) (917 mg, 2.37 mmol) wurde in Ethanol (45 mL) gelöst und mit Ammoniumchlorid (381 mg, 7.12 mmol), gelöst in demin. Wasser (10 mL), versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde auf 65 °C erhitzt und Zinkpulver (466 mg, 7.12 mmol) zugegeben. Der Reaktionsverlauf wurde kontinuierlich mittels DC verfolgt und die Reaktion nach 30 min aufgrund zunehmender Bildung des Amino-Nebenproduktes abgebrochen. Dazu wurde das Reaktionsgemisch heiß filtriert und anschließend auf 0 °C abgekühlt. Zur kalten Lösung wurde Eisen(III)chlorid Hexahydrat (1.10 g, 4.04 mmol), gelöst in eiskaltem demin. Wasser (5 mL), tropfenweise zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde langsam auf Raumtemp. gebracht und der Umsatz des Nitroso-Zwischenproduktes mittels DC überprüft. Nach 30 min wurde Eisessig (30 mL) zugegeben und 16 h bei Raumtemp. gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde i. Vak. konzentriert und mit Dichlormethan (200 mL) verdünnt. Die org. Phase wurde mit 1 M Natronlauge (3 x 70 mL) und ges. Natriumchlorid-Lsg. (1 x 50 mL) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (120 g Säule, PE/EA-Gradient, 10 % EA → 40 % EA, 30 min, 50 mL/min). Es wurde ein gelber Feststoff erhalten.

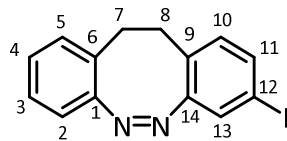
Ausbeute: 219 mg (622 μ mol, 26 %), Eduktrückgewinnung: 405 mg (1.05 mmol, 44 %).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.47 (dd, 3J = 8.5 Hz, 4J = 1.7 Hz, 1 H, *H*-11), 7.04 (s, 1 H, *H*-9), 7.18 (ddd, 3J = 7.7 Hz, 3J = 7.5 Hz, 4J = 1.3 Hz, 1 H, *H*-3), 7.12 (dd, 3J = 7.8 Hz, 4J = 1.1 Hz, 1 H, *H*-5), 6.98 (ddd, 3J = 7.8 Hz, 3J = 7.5 Hz, 4J = 1.4 Hz, 1 H, *H*-4), 6.69 (dd, 3J = 7.9 Hz, 4J = 1.3 Hz, 1 H, *H*-2), 6.46 (d, 3J = 8.4 Hz, 1 H, *H*-12), 4.0 (d, 2J = 11.7 Hz, 1 H, *H*-7), 3.58 (d, 2J = 11.7 Hz, 1 H, *H*-7') ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ = 157.6 (*C*-1), 156.8 (*C*-13), 137.9 (*C*-9), 137.3 (*C*-11), 133.9 (*C*-5), 128.1 (*C*-3), 127.5 (*C*-4), 126.5 (*C*-8), 121.6 (*C*-6), 119.2 (*C*-2), 119.0 (*C*-12), 91.7 (*C*-10), 34.4 (*C*-7) ppm.

MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 352.0, 353.0, 354.0 (100, 20, 5) [*M*]⁺, 225 (35) [*M*-I]⁺.

HRMS (EI): m/z ber. für $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{IN}_2\text{S}^+$: 351.9531, gef.: 351.9532.

(Z)-3-Iod-11,12-dihydrodibenzo[*c,g*][1,2]diazocin (104c)

2-(2-Aminophenethyl)-5-iodanilin (**111**) (240 mg, 710 μmol) wurde in Eisessig (80 mL) gelöst und *m*-CPBA (122 mg, 710 μmol), gelöst in Eisessig (20 mL), langsam tropfenweise zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 3 h bei Raumtemp. gerührt und anschließend ein weiteres Äquivalent *m*-CPBA (122 mg, 710 μmol), gelöst in Eisessig (20 mL), tropfenweise zugegeben. Es wurde weitere 3 h bei Raumtemp. gerührt und die Reaktion nach dieser Zeit aufgrund zunehmender Bildung des Azoxy-Nebenproduktes abgebrochen. Das Reaktionsgemisch wurde i. Vak. konzentriert und der Rückstand mit Ethylacetat (100 mL) verdünnt. Die org. Phase wurde mit 1 M Natronlauge (3 x 50 mL) und ges. Natriumchlorid-Lsg. (1 x 50 mL) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (40 g Säule, PE/EA-Gradient, 0 % EA \rightarrow 70 % EA, 30 min, 25 mL/min). Es wurde ein gelber Feststoff erhalten.

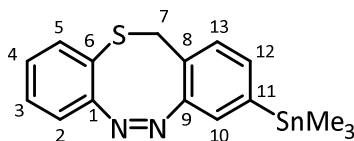
Ausbeute: 120 mg (359 μmol , 51 %)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.32 (dd, 3J = 8.0 Hz, 4J = 1.8 Hz, 1 H, *H*-11), 7.17 (dt, 3J = 7.5 Hz, 4J = 1.3 Hz, 1 H, *H*-3), 7.15 (d, 4J = 1.7 Hz, 1 H, *H*-13), 7.04 (dt, 3J = 7.5 Hz, 4J = 1.3 Hz, 1 H, *H*-4), 6.97 (dd, 3J = 7.6 Hz, 4J = 0.8 Hz, 1 H, *H*-5), 6.85 (dd, 3J = 7.8 Hz, 4J = 1.0 Hz, 1 H, *H*-2), 6.72 (d, 3J = 8.1 Hz, 1 H, *H*-10), 2.95 (m_c , 2 H, *H*-7), 2.72 (m_c , 2 H, *H*-8) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ = 156.4 (C-14), 155.3 (C-1), 136.1 (C-11), 131.5 (C-10), 129.8 (C-5), 128.1 (C-9), 127.7 (C-6), 127.5 (C-13), 127.5 (C-4), 127.1 (C-3), 119.0 (C-2), 91.0 (C-12), 31.6 (C-8), 31.5 (C-7) ppm.

MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 334.0, 335.0, 336.0 (12, 2, 0.3) $[\text{M}]^+$; 178.1 (100) $[\text{C}_{14}\text{H}_{11}]^+$.

HRMS (EI): m/z ber. für $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{IN}_2^+$: 333.9967, gef.: 334.0102

(Z)-3-(Trimethylstannyl)-12H-dibenzo[b,f][1,4,5]thiadiazocin (105a)

(Z)-3-Iod-12H-dibenzo[b,f][1,4,5]thiadiazocin (**104a**) (188 mg, 534 μmol) wurde zusammen mit Hexamethyldistannan (184 mg, 560 μmol) und $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (12 mg, 2 mol-%) unter Stickstoffatmosphäre (Glovebox) in trockenem Toluol (6 mL) gelöst und 4 h in der Mikrowelle auf 100 °C erhitzt. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (40 g Säule, PE/EA-Gradient, 5 % EA \rightarrow 20 % EA, 20 min, 25 mL/min). Es wurde ein oranges Öl erhalten.

Ausbeute: 147 mg (378 μmol , 71 %).

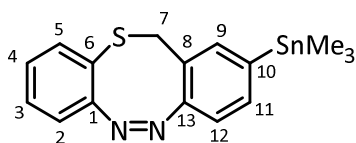
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 7.18 (dd, $^3J = 7.4$ Hz, $^4J = 0.9$ Hz, 1 H, *H*-12), 7.14 (ddd, $^3J = 7.8$ Hz, $^3J = 7.4$ Hz, $^4J = 1.3$ Hz, 1 H, *H*-3), 7.10 (dd, $^3J = 7.8$ Hz, $^4J = 0.9$ Hz, 1 H, *H*-5), 7.06 (d, $^3J = 7.4$ Hz, 1 H, *H*-13), 6.92 (ddd, $^3J = 7.8$ Hz, $^3J = 7.4$ Hz, $^4J = 1.4$ Hz, 1 H, *H*-4), 6.78 (s, 1 H, *H*-10), 6.69 (dd, $^3J = 7.9$ Hz, $^4J = 1.4$ Hz, 1 H, *H*-2), 4.07 (d, $^2J = 11.6$ Hz, 1 H, *H*-7), 3.63 (d, $^2J = 11.6$ Hz, 1 H, *H*-7'), 0.22 (s, 9 H, SnMe_3) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3): δ = 157.9 (*C*-1), 157.1 (*C*-9), 143.5 (*C*-11), 134.9 (*C*-12), 133.7 (*C*-5), 128.6 (*C*-13), 127.7 (*C*-3), 127.0 (*C*-4), 123.9 (*C*-8), 123.6 (*C*-10), 122.2 (*C*-6), 119.3 (*C*-2), 35.1 (*C*-7), -9.3 (SnMe_3) ppm.

$^{119}\text{Sn-NMR}$ (112 MHz, CDCl_3): δ = -23.34 ppm.

MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 390, 388, 386, 389, 387, 391, 392, 394 (4, 3, 2, 2, 1, 1, 1, 1) $[\text{M}]^+$; 375 (100) $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$.

HRMS (EI): m/z ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{SSn}$: 390.0219, gef.: 390.0214.

(Z)-2-(Trimethylstannyl)-12H-dibenzo[b,f][1,4,5]thiadiazocin (105b)

(Z)-2-Iod-12H-dibenzo[b,f][1,4,5]thiadiazocin (**104b**) (150 mg, 426 μmol) wurde zusammen mit Hexamethyldistannan (146 mg, 447 μmol) und $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (10 mg, 2 mol-%) unter Stickstoffatmosphäre (Glovebox) in trockenem Toluol (4 mL) gelöst und 4 h in der Mikrowelle auf 100 °C erhitzt. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (40 g Säule, PE/EA-Gradient, 0 % EA \rightarrow 20 % EA, 25 min, 25 mL/min). Es wurde ein oranges Öl erhalten.

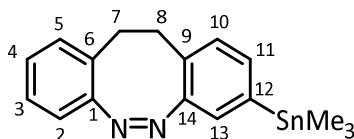
Ausbeute: 99 mg (254 μmol , 60 %).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.27 (dd, 3J = 7.6 Hz, 4J = 0.7 Hz, 1 H, *H*-11), 7.19 (bs, 1 H, *H*-9), 7.15 (ddd, 3J = 7.6 Hz, 3J = 7.5 Hz, 4J = 1.3 Hz, 1 H, *H*-3), 7.12 (dd, 3J = 7.8 Hz, 4J = 1.1 Hz, 1 H, *H*-5), 6.94 (ddd, 3J = 7.8 Hz, 3J = 7.5 Hz, 4J = 1.4 Hz, 1 H, *H*-4), 6.69 (dd, 3J = 7.8 Hz, 4J = 1.3 Hz, 1 H, *H*-2), 6.46 (d, 3J = 7.7 Hz, 1 H, *H*-12), 4.1 (d, 2J = 11.7 Hz, 1 H, *H*-7), 3.65 (d, 2J = 11.7 Hz, 1 H, *H*-7'), 0.23 (s, 9 H, SnMe_3) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ = 157.8 (C-1), 157.5 (C-13), 142.0 (C-10), 136.5 (C-9), 135.7 (C-11), 133.7 (C-5), 127.8 (C-3), 127.1 (C-4), 123.2 (C-8), 122.2 (C-6), 119.3 (C-2), 116.4 (C-12), 35.1 (C-7), -9.3 (SnMe_3) ppm.

MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 394 (1, 1, 2, 1, 3, 0.6, 0.6, 0.5) $[\text{M}]^+$; 375 (100) $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$.

HRMS (EI): m/z ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{SSn}$: 390.0214, gef.: 390.0214.

(Z)-3-(Trimethylstannyl)-11,12-dihydrodibenzo[*c,g*][1,2]diazocin (105c)

(Z)-3-Iod-11,12-dihydrodibenzo[*c,g*][1,2]diazocin (**104c**) (160 mg, 479 μmol) wurde zusammen mit Hexamethyldistannan (165 mg, 503 μmol) und $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (11 mg, 2 mol-%) unter Stickstoffatmosphäre (Glovebox) in trockenem Toluol (4 mL) gelöst und 4 h in der Mikrowelle auf 100 °C erhitzt. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand säulen-chromatographisch an Kieselgel gereinigt (40 g Säule, PE/EA-Gradient, 0 % EA \rightarrow 20 % EA, 25 min, 25 mL/min). Es wurde ein gelber Feststoff erhalten.

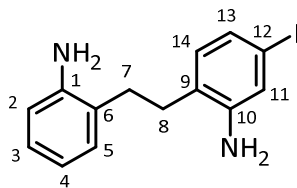
Ausbeute: 120 mg (323 μmol , 68 %).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.14 (ddd, $^3J = 7.8$ Hz, $^3J = 7.7$ Hz, $^4J = 1.9$ Hz, 1 H, *H*-3), 7.12 (dd, $^3J = 7.4$ Hz, $^4J = 1.0$ Hz, 1 H, *H*-11), 7.03 (dt, $^3J = 7.6$ Hz, $^4J = 1.3$ Hz, 1 H, *H*-4), 6.99 (dd, $^3J = 7.6$ Hz, $^4J = 1.8$ Hz, 1 H, *H*-5), 6.94 (d, $^3J = 7.3$ Hz, 1 H, *H*-10), 6.94 (d, $^4J = 0.7$ Hz, 1 H, *H*-13), 6.87 (dd, $^3J = 7.9$ Hz, $^4J = 1.0$ Hz, 1 H, *H*-2), 2.98 (m_c , 2 H, *H*-7), 2.76 (m_c , 2 H, *H*-8), 0.23 (s, 9 H, SnMe_3) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ = 155.6 (C-1), 155.1 (C-14), 140.7 (C-12), 134.6 (C-11), 129.6 (C-5), 129.3 (C-10), 128.2 (C-6), 127.9 (C-9), 127.2 (C-4), 126.8 (C-3), 125.9 (C-13), 119.1 (C-2), 32.1 (C-8), 31.7 (C-7), -9.3 (SnMe_3) ppm.

MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 368.1, 369.1, 370.1, 371.1, 372.1, 373.1, 374.1, 376.1 (6, 5, 11, 6, 14, 3, 2, 2) $[\text{M}]^+$; 329.0 (89) $[\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{Sn}]^+$; 298.9 $[\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{Sn}]^+$ (100), 178.1 (97) $[\text{C}_{14}\text{H}_{11}]^+$.

HRMS (EI): m/z ber. für $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{IN}_2\text{Sn}^+$: 372.0649, gef.: 372.0647.

2-(2-Aminophenethyl)-5-iodanilin (111)

1-Methyl-2-nitrobenzen (**99b**) (4.69 g, 34.2 mmol) wurde zusammen mit 4-Iod-1-methyl-2-nitrobenzen (**106**) (3.0 g, 11.4 mmol) in trockenem THF (210 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu dieser Lösung wurde Kalium-*tert*-butanolat (7.68 g, 68.4 mmol) zugegeben, woraufhin sich die Lösung dunkel verfärbte. Es wurde 2 min bei 0 °C gerührt und anschließend Brom (3.04 mL, 59.3 mmol) tropfenweise zugegeben. Nach 5 min wurde das Reaktionsgemisch auf Eiswasser (1 L) gegeben und die wässr. Phase mit Ethylacetat extrahiert (3 x 500 mL). Die vereinigten org. Extrakte wurden mit Natriumthiosulfat-Lsg. (2 x 300 mL), demin. Wasser (1 x 300 mL) und ges. Natriumchlorid-Lsg. gewaschen (1 x 300 mL). Die Lösung wurde über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und der Rückstand in drei Portionen säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (120 g Säule, PE/EA-Gradient, 5 % EA → 30 % EA, 30 min, 50 mL/min). Es wurde ein Produktgemisch aus 1,2-Bis(2-nitrophenyl)ethan (**109**), 4-Iod-2-nitro-1-(2-nitrophenethyl)benzen (**108**) und 1,2-Bis(4-iod-2-nitrophenyl)ethan (**107**) erhalten. Das zweifach iodierte Produkt **107** konnte anschließend größtenteils aufgrund der vergleichsweise schlechten Löslichkeit in Dichlormethan abgetrennt werden.

Das verbliebene Produktgemisch wurde ohne weitere Aufreinigung in der nächsten Stufe eingesetzt. Dazu wurde das Gemisch (3.49 g) aus 1,2-Bis(2-nitrophenyl)ethan (**109**) und 4-Iod-2-nitro-1-(2-nitrophenethyl)benzen (**108**) in Ethylacetat (300 mL) gelöst und Zinn(II)-chlorid Dihydrat (19.8 g, 87.7 mmol) portionsweise zugegeben. Es wurde 4 h zum Rückfluss erhitzt und das Reaktionsgemisch nach Abkühlen auf Raumtemp. mit Ethylacetat (300 mL) verdünnt. Zu dieser Lösung wurde tropfenweise 5 M Natronlauge zugegeben (3 x 150 mL) und die wässr. Phase jeweils ohne Ausschütteln im Scheidetrichter abgetrennt, um Emulsionsbildung durch kolloidale Zinnhydroxide zu vermeiden. Nach Abtrennung des Großteils der Zinnhydroxide wurde die org. Phase mit 5 M Natronlauge (3 x 150 mL), ges. Natriumhydrogencarbonat-Lsg. (3 x 150 mL) und ges. Natriumchlorid-Lsg. (1 x 150 mL) gewaschen. Die org. Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lsgm. i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde in drei Portionen säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (120 g Säule, PE/EA-Gradient, 25 % EA → 65 % EA, 30 min, 50 mL/min). Es wurde ein farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 1.0 g (2.96 mmol, 26 %).

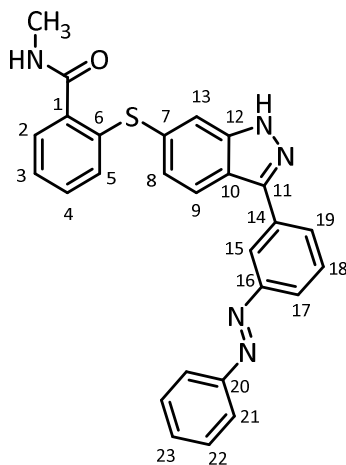
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 6.99 (d, ⁴J = 1.7 Hz, 1 H, H-11), 6.96 (dd, ³J = 7.5 Hz, ⁴J = 1.4 Hz, 1 H, H-5), 6.89 (dt, ³J = 7.6 Hz, ⁴J = 1.6 Hz, 1 H, H-3), 6.80 (dd, ³J = 7.9 Hz, ⁴J = 1.7 Hz, 1 H, H-13), 6.76 (d, ³J = 7.9 Hz, 1 H, H-14), 6.62 (dd, ³J = 7.9 Hz, ⁴J = 1.1 Hz, 1 H, H-2), 6.49 (dt, ³J = 7.4 Hz, ⁴J = 1.2 Hz, 1 H, H-4), 5.12 (s, 2 H, NH₂), 4.84 (s, 2 H, NH₂), 2.62 (m_c, 4 H, H-7, H-8) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ = 148.3 (C-10), 146.1 (C-1), 131.0 (C-14), 128.9 (C-5), 126.5 (C-3), 125.1 (C-9), 125.0 (C-6), 124.3 (C-13), 122.3 (C-11), 116.3 (C-4), 114.6 (C-2), 91.8 (C-12), 29.4 (C-7), 29.2 (C-8) ppm.

LC-MS (ESI): t_R = 7.6 min, m/z (%) = 338.9, 339.9, 340.9 (100, 15, 3) [M+H]⁺.

5.4.5 Synthesen der azobenzol- und diazocin-funktionalisierten Axitinibderivate

N-Methyl-2-({3-[(*E*)-3-(phenyldiazenyl)phenyl]-1*H*-indazol-6-yl}sulfanyl)benzamid (*E*-77)



2-[(1-Acetyl-3-iod-1*H*-indazol-6-yl)sulfanyl]-*N*-methylbenzamid (**52a**) (100 mg, 222 μmol) und (*E*)-1-Phenyl-2-[3-(trimethylstannyl)phenyl]diazon (**97a**) (120 mg, 343 μmol) wurden unter Stickstoffatmosphäre (Glovebox) zusammen mit $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (26 mg, 10 mol-%) in trockenem DMF (6 mL) gelöst und 24 h auf 120 °C erhitzt. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (40 g Säule, PE/EA-Gradient, 50 % EA \rightarrow 100 % EA, 25 min, 25 mL/min). Es wurde ein gelber Feststoff erhalten.

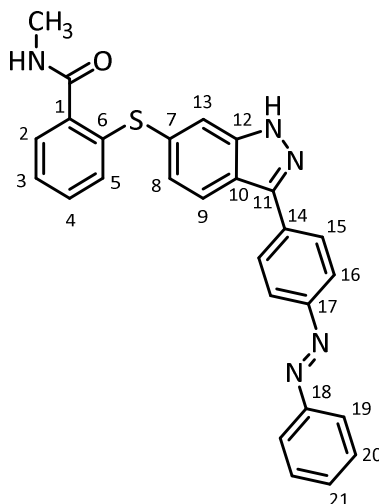
Ausbeute: 53 mg (114 μmol , 52 %).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6): δ = 13.47 (bs, 1 H, Ind-NH), 8.47 (t, 4J = 1.7 Hz, 1 H, *H*-15), 8.39 (q, 3J = 4.6 Hz, 1 H, CONHCH₃), 8.2 (ddd, 3J = 7.7 Hz, 4J = 1.2 Hz, 4J = 1.1 Hz, 1 H, *H*-19), 8.14 (d, 3J = 8.5 Hz, 1 H, *H*-9), 7.93-7.99 (m, 3 H, *H*-17, *H*-21), 7.76 (t, 3J = 7.8 Hz, 1 H, *H*-18), 7.66-7.67 (m, 1 H, *H*-13), 7.59-7.66 (m, 3 H, *H*-22, *H*-23), 7.48-7.51 (m, 1 H, *H*-2), 7.30 (m_c, 2 H, *H*-3, *H*-4), 7.22 (dd, 3J = 8.5 Hz, 4J = 1.5 Hz, 1 H, *H*-8), 7.06-7.09 (m, 1 H, *H*-5), 2.78 (d, 3J = 4.7 Hz, 3 H, CONHCH₃) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, DMSO-d_6): δ = 167.8 (CONHCH₃), 152.4 (C-16), 151.9 (C-20), 142.5 (C-11), 142.2 (C-12), 137.0 (C-1), 135.0 (C-6), 134.6 (C-14), 132.6 (C-7), 131.7 (C-23), 130.3 (C-4), 130.2 (C-18), 130.1 (C-5), 129.5 (C-19), 129.5 (C-22), 127.8 (C-2), 126.2 (C-3), 125.7 (C-8), 122.7 (C-21), 122.2 (C-17), 121.6 (C-9), 120.2 (C-15), 119.5 (C-10), 114.8 (C-13), 26.1 (CONHCH₃) ppm.

LC-MS (ESI): t_R = 8.1 min, m/z (%) = 464.1, 465.1, 466.1, 467.1 (100, 36, 11, 2) $[\text{M}+\text{H}]^+$; 927.3, 928.3, 929.3, 930.9 (9, 7, 2, 1) $[\text{C}_{54}\text{H}_{43}\text{N}_{10}\text{O}_2\text{S}_2]^+$.

HRMS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{27}\text{H}_{22}\text{ON}_5\text{S}^+$: 464.1540, gef.: 464.1536.

***N*-Methyl-2-({3-[(*E*)-4-(phenyldiazenyl)phenyl]-1*H*-indazol-6-yl}sulfanyl)benzamid (*E*-78)**

2-[(1-Acetyl-3-iod-1*H*-indazol-6-yl)sulfanyl]-*N*-methylbenzamid (**52a**) (120 mg, 266 μ mol) und (*E*)-1-Phenyl-2-[4-(trimethylstanny)phenyl]diazon (**97b**) (92 mg, 266 μ mol) wurden unter Stickstoffatmosphäre zusammen mit Pd(PPh₃)₄ (31 mg, 10 mol-%) in trockenem DMF (7 mL) gelöst und 16 h auf 120 °C erhitzt. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (40 g Säule, PE/EA-Gradient, 50 % EA \rightarrow 100 % EA, 23 min, 25 mL/min). Es wurde ein gelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 40 mg (86 μ mol, 32 %).

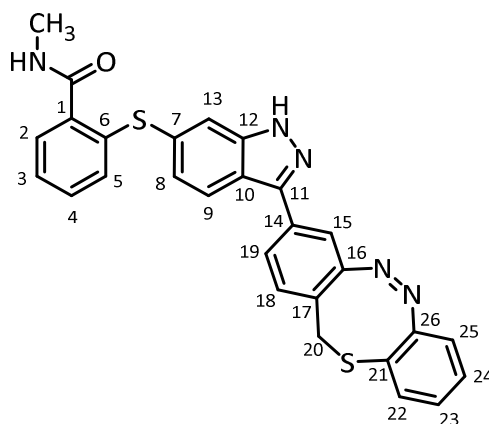
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 13.55 (s, 1 H, Ind-NH), 8.41 (q, ³*J* = 4.4 Hz, 1 H, CONHCH₃), 8.26 (d, ³*J* = 8.5 Hz, 2 H, *H*-15), 8.20 (d, ³*J* = 8.6 Hz, 1 H, *H*-9), 8.05 (d, ³*J* = 8.5 Hz, 2 H, *H*-16), 7.93-7.95 (m, 2 H, *H*-19), 7.67 (s, 1 H, *H*-13), 7.59-7.65 (m, 3 H, *H*-20, *H*-21), 7.50 (dd, ³*J* = 7.4 Hz, ⁴*J* = 1.6 Hz, 1 H, *H*-2), 7.31 (m_c, 2 H, *H*-3, *H*-4), 7.22 (d, ³*J* = 8.5 Hz, 1 H, *H*-8), 7.06 (d, 1 H, ³*J* = 7.5 Hz, *H*-5), 2.78 (d, ³*J* = 4.5 Hz, 3 H, CONHCH₃) ppm.

¹³C-NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 167.9 (CONHCH₃), 152.1 (C-17), 151.2 (C-18), 142.5 (C-11), 142.3 (C-12), 137.1 (C-1), 136.4 (C-14), 135.5 (C-6), 132.7 (C-7), 131.7 (C-21), 130.4 (C-4), 130.2 (C-5), 129.6 (C-20), 127.9 (C-2), 127.6 (C-15), 126.3 (C-3), 125.9 (C-8), 123.4 (C-16), 122.7 (C-19), 121.9 (C-9), 119.7 (C-10), 114.9 (C-13), 26.2 (CONHCH₃) ppm.

LC-MS (ESI): *t*_R = 8.3 min, *m/z* (%) = 464.1, 465.1, 466.1, 467.1 (100, 37, 10, 3) [M+H]⁺.

HRMS (ESI): *m/z* ber. für C₂₇H₂₂ON₅S⁺: 464.1540, gef.: 464.1534.

**(Z)-2-{[3-(12*H*-dibenzo[*b,f*][1,4,5]thiadiazocin-3-yl)-1*H*-indazol-6-yl]sulfanyl}-*N*-methylbenzamid
(Z-73)**



2-[(1-Acetyl-3-iod-1*H*-indazol-6-yl)sulfanyl]-*N*-methylbenzamid (**52a**) 130 mg, 322 μmol) und (Z)-3-(Trimethylstannyl)-12*H*-dibenzo[*b,f*][1,4,5]thiadiazocin (**105a**) (125 mg, 322 μmol) wurden unter Stickstoffatmosphäre zusammen mit $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (37 mg, 10 mol-%) in trockenem DMF (7 mL) gelöst und 24 h auf 120 °C erhitzt. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (40 g Säule, DCM/MeOH-Gradient, 0 % MeOH \rightarrow 20 % MeOH, 34 min, 25 mL/min). Das vorgereinigte Produkt wurde zusätzlich säulenchromatographisch an RP-Kieselgel gereinigt (15 g Säule, Wasser/MeOH-Gradient, 70 % MeOH \rightarrow 100 % MeOH, 15 min, 15 mL/min). Es wurde ein gelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 28 mg (55 μmol , 17 %).

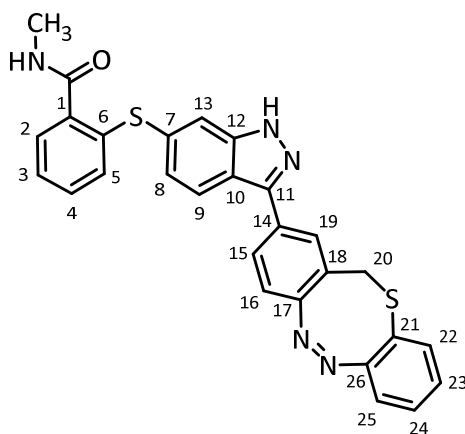
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6): δ = 13.37 (bs, 1 H, Ind-NH), 8.37 (q, 3J = 4.5 Hz, 1 H, CONHCH₃), 8.0 (dd, 3J = 8.6 Hz, 4J = 0.5 Hz, 1 H, H-9), 7.76 (dd, 3J = 8.1 Hz, 4J = 1.7 Hz, 1 H, H-19), 7.61 (d, 4J = 0.5 Hz, 1 H, H-13), 7.47-7.49 (m, 1 H, H-2), 7.38-7.41 (m, 2 H, H-15, H-18), 7.28 (m_c, 2 H, H-3, H-4), 7.22 (td, 3J = 7.6 Hz, 4J = 1.3 Hz, 1 H, H-23), 7.12-7.17 (m, 2 H, H-8, H-25), 6.98-7.03 (m, 2 H, H-5, H-24), 6.91 (dd, 3J = 7.8 Hz, 4J = 1.1 Hz, 1 H, H-22), 4.02 (d, 2J = 11.6 Hz, 1 H, H-20), 3.97 (d, 2J = 11.7 Hz, 1 H, H-20'), 2.76 (d, 3J = 4.6 Hz, 3 H, CONHCH₃) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, DMSO-d_6): δ = 167.8 (CONHCH₃), 157.5 (C-16), 157.3 (C-26), 142.1 (C-11), 142.0 (C-12), 137.0 (C-1), 135.5 (C-6), 133.4 (C-14), 133.3 (C-22), 132.5 (C-7), 130.3 (C-4), 130.3 (C-18), 130.0 (C-5), 128.2 (C-24), 127.8 (C-2), 127.3 (C-23), 126.2 (C-3), 125.7 (C-8), 125.7 (C-19), 123.2 (C-17), 121.7 (C-9), 121.4 (C-21), 119.4 (C-25), 119.3 (C-10), 114.8 (C-13), 114.5 (C-15), 33.7 (C-20), 26.1 (CONHCH₃) ppm.

LC-MS (ESI): $t_R = 8.1$ min, m/z (%) = 508.2, 509.2, 510.1, 511.1 (100, 34, 14, 3) $[M+H]^+$.

HRMS (ESI): m/z ber. für $C_{28}H_{22}ON_5S^+$: 508.1260, gef.: 508.1252.

**(Z)-2-[[3-(12H-Dibenzo[b,f][1,4,5]thiadiazocin-2-yl)-1H-indazol-6-yl]sulfanyl]-N-methylbenzamid
(Z-74)**



2-[(1-Acetyl-3-iodo-1H-indazol-6-yl)sulfanyl]-N-methylbenzamid (**52a**) (100 mg, 247 μ mol) und (Z)-2-(Trimethylstannyl)-12H-dibenzo[b,f][1,4,5]thiadiazocin (**105b**) (96 mg, 247 μ mol) wurden unter Stickstoffatmosphäre zusammen mit $Pd(PPh_3)_4$ (14 mg, 5 mol-%) in trockenem DMF (5 mL) gelöst und 24 h auf 120 °C erhitzt. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (40 g Säule, DCM/MeOH-Gradient, 0 % MeOH \rightarrow 15 % MeOH, 30 min, 25 mL/min). Das vorgereinigte Produkt wurde zusätzlich säulenchromatographisch an RP-Kieselgel gereinigt (15 g Säule, Wasser/MeOH-Gradient, 70 % MeOH \rightarrow 100 % MeOH, 20 min, dann weitere 20 min 100 % MeOH, 15 mL/min). Das stets verunreinigte Produkt wurde ein weiteres Mal säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (12 g Säule, PE/EA-Gradient, 60 % EA \rightarrow 100 % EA, 20 min, 20 mL/min). Es wurde ein gelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 20 mg (39 μ mol, 16 %).

1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): $\delta = 13.92$ (bs, 1 H, Ind-NH), 8.40 (q, $^3J = 4.5$ Hz, 1 H, CONHCH₃), 8.07 (d, $^3J = 8.6$ Hz, 1 H, H-9), 7.93 (d, $^4J = 1.6$ Hz, 1 H, H-19), 7.88 (dd, $^3J = 8.2$ Hz, $^4J = 1.7$ Hz, 1 H, H-15), 7.60 (d, $^4J = 0.8$ Hz, 1 H, H-13), 7.48-7.50 (m, 1 H, H-2), 7.24-7.33 (m, 3 H, H-3, H-4, H-23), 7.14-7.17 (m, 2 H, H-8, H-25), 6.98-7.03 (m, 2 H, H-5, H-24), 6.98 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 1 H, H-16), 6.87 (dd, $^3J = 7.9$ Hz, $^4J = 1.2$ Hz,

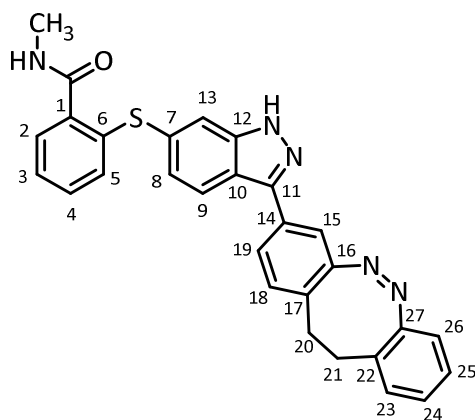
1 H, *H*-22), 4.18 (d, $^2J = 11.6$ Hz, 1 H, *H*-20), 3.97 (d, $^2J = 11.6$ Hz, 1 H, *H*-20'), 2.76 (d, $^3J = 4.6$ Hz, 3 H, CONHCH₃) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 167.8$ (CONHCH₃), 157.3 (C-26), 156.6 (C-17), 142.1 (C-11), 142.1 (C-12), 136.9 (C-1), 135.7 (C-6), 133.2 (C-25), 132.6 (C-14), 132.4 (C-7), 130.3 (C-4), 129.9 (C-5), 128.2 (C-23), 127.8 (C-2), 127.5 (C-19), 127.4 (C-24), 126.6 (C-15), 126.2 (C-3), 125.7 (C-8), 124.6 (C-18), 121.8 (C-9), 121.5 (C-21), 119.4 (C-22), 119.3 (C-10), 117.7 (C-16), 114.8 (C-13), 33.8 (C-20), 26.1 (CONHCH₃) ppm.

LC-MS (ESI): $t_R = 7.8$ min, m/z (%) = 508.1, 509.1, 510.1, 511.1 (100, 39, 15, 4) [M+H]⁺.

HRMS (ESI): m/z ber. für C₂₈H₂₂ON₅S⁺: 508.1260, gef.: 508.1251.

(Z)-2-[[3-(11,12-Dihydrodibenzo[*c,g*][1,2]diazocin-3-yl)-1*H*-indazol-6-yl]sulfanyl]-*N*-methylbenzamid (Z-75)



2-[(1-Acetyl-3-iod-1*H*-indazol-6-yl)sulfanyl]-*N*-methylbenzamid (**52a**) (120 mg, 297 μmol) und (Z)-3-(Trimethylstannyl)-11,12-dihydrodibenzo[*c,g*][1,2]diazocin (**105c**) (105 mg, 282 μmol) wurden unter Stickstoffatmosphäre zusammen mit $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (17 mg, 5 mol-%) in trockenem DMF (6 mL) gelöst und 24 h auf 120 °C erhitzt. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (40 g Säule, DCM/MeOH-Gradient, 0 % MeOH \rightarrow 20 % MeOH, 34 min, 25 mL/min). Es wurde ein Gemisch aus Produkt und Acetyl-geschütztem Produkt erhalten. Dieses Produktgemisch wurde säulenchromatographisch an RP-Kieselgel gereinigt (15 g Säule, PE/EA-Gradient, 50 % EA \rightarrow 100 % EA, 25 min, 30 mL/min). Das isolierte Acetyl-geschützte Produkt wurde in Methanol (4 mL) gelöst und tropfenweise mit konz. Salzsäure (1 mL) versetzt. Die Reaktionslösung wurde 2 h bei Raumtemp. gerührt und anschließend mit Dichlormethan (70 mL) verdünnt. Die Lösung wurde mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lsg. (3 x 25 mL), demin. Wasser (1 x 25 mL) und ges. Natriumchlorid-Lsg. (1 x 25 mL) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (12 g Säule, DCM (0.1 % TEA)/MeOH-Gradient, 0 % MeOH \rightarrow 15 % MeOH, 25 min, 20 mL/min) wurde ein hellgelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 43 mg (88 μmol , 31 %).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): δ = 13.36 (s, 1 H, Ind-NH), 8.40 (q, 3J = 4.6 Hz, 1 H, CONHCH₃), 8.01 (d, 3J = 8.4 Hz, 1 H, H-9), 7.68 (dd, 3J = 7.9 Hz, 4J = 1.8 Hz, 1 H, H-19), 7.61 (d, 4J = 0.7 Hz, 1 H, H-13), 7.47-7.50 (m, 1 H, H-2), 7.39 (d, 1 H, 4J = 1.7 Hz, H-15), 7.28 (m, 2 H, H-3, H-4), 7.23 (d, 3J = 8.0 Hz, 1 H, H-18), 7.17 (td, 3J = 7.7 Hz, 4J = 1.6 Hz, 1 H, H-25), 7.12-7.15 (m, 2 H, H-8, H-23), 7.06 (ddd, 3J = 7.4 Hz,

$^3J = 7.4$ Hz, $^4J = 1.3$ Hz, 1 H, *H*-24), 6.99-7.01 (m, 1 H, *H*-5), 6.92 (dd, $^3J = 7.8$ Hz, $^4J = 1.1$ Hz, 1 H, *H*-26), 2.88 (m_c, 4 H, *H*-20, *H*-21), 2.76 (d, $^3J = 4.6$ Hz, 3 H, CONHCH₃) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ = 167.9 (CONHCH₃), 155.6 (C-16), 155.2 (C-27), 142.3 (C-11), 142.1 (C-12), 136.9 (C-1), 135.7 (C-6), 132.4 (C-7), 131.9 (C-14), 130.7 (C-18), 130.3 (C-4), 129.9 (C-23), 129.8 (C-5), 127.9 (C-22), 127.8 (C-17), 127.8 (C-2), 127.2 (C-24), 126.9 (C-25), 126.2 (C-3), 125.7 (C-8), 125.3 (C-19), 121.7 (C-9), 119.3 (C-10), 118.4 (C-26), 116.1 (C-15), 114.8 (C-13), 30.9 (C-20), 30.8 (C-21), 26.1 (CONHCH₃) ppm.

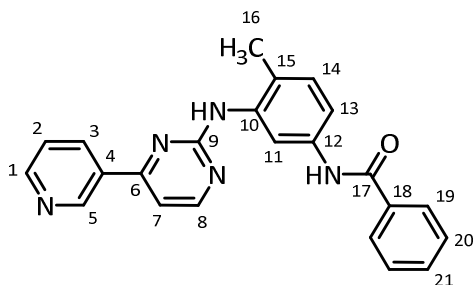
LC-MS (ESI): t_R = 7.8 min, m/z (%) = 490.1, 491.1, 492.1, 493.1 (100, 35, 11, 2) [M+H]⁺.

HRMS (ESI): m/z ber. für C₂₉H₂₄ON₅S⁺: 490.1696, gef.: 490.1692.

5.4.6 Synthesen der azofunktionalisierten Imatinib- und Nilotinibderivate

Die Synthese und Charakterisierung der Verbindungen **80**, **81** und **92** wurde von Herschel durchgeführt.^[240]

N-(4-Methyl-3-[[4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl]amino]phenyl)benzamid (**79**)



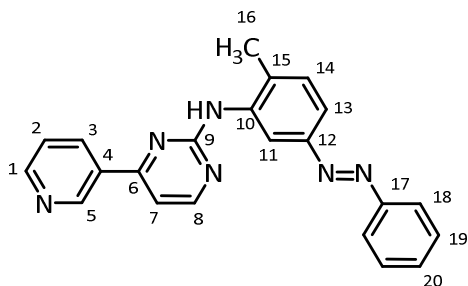
Benzoessäure (44 mg, 361 μmol) wurden zusammen mit CDI (70 mg, 433 μmol) unter Stickstoffatmosphäre in trockenem DMF (6 mL) gelöst und bei Raumtemp. gerührt bis keine Gasentwicklung mehr beobachtbar war (ca. 30 min). Das Reaktionsgemisch wurde 1 h auf 50 °C erhitzt und anschließend 6-Methyl-*N*-[4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl]benzen-1,3-diamin (**89**) (100 mg, 361 μmol) zugegeben. Anschließend wurde weitere 17 h auf 70 °C erhitzt. Nach Abkühlung auf Raumtemp. wurde das Reaktionsgemisch mit Ethylacetat (100 mL) verdünnt und mit demin. Wasser gewaschen (5 x 30 mL). Das Lösungsmittel wurde über Natriumsulfat getrocknet und anschließend i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (40 g Säule, DCM/MeOH-Gradient, 0 % MeOH \rightarrow 10 % MeOH, 25 min, 25 mL/min). Es wurde ein farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 109 mg (286 μmol , 79 %)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.23 (s, 1 H, CONH), 9.28 (d, ⁴*J* = 1.8 Hz, 1 H, *H*-5), 8.99 (s, 1 H, NH), 8.69 (dd, ³*J* = 4.8 Hz, ⁴*J* = 1.6 Hz, 1 H, *H*-1), 8.51 (d, ³*J* = 5.1 Hz, 1 H, *H*-8), 8.48 (dt, ³*J* = 8.3 Hz, ⁴*J* = 2.0 Hz, 1 H, *H*-3), 8.1 (d, ⁴*J* = 2.0 Hz, 1 H, *H*-11), 7.94-7.96 (m, 2 H, *H*-19), 7.50-7.59 (m, 4 H, *H*-2, *H*-20, *H*-21), 7.49 (dd, ³*J* = 8.2 Hz, ⁴*J* = 2.3 Hz, 1 H, *H*-13), 7.43 (d, ⁴*J* = 5.2 Hz, 1 H, *H*-7), 7.22 (d, ³*J* = 8.4 Hz, 1 H, *H*-14), 2.23 (s, 3 H, *H*-16) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 165.5 (*C*-17), 161.7 (*C*-9), 161.2 (*C*-6), 159.6 (*C*-8), 151.5 (*C*-1), 148.3 (*C*-5), 137.9 (*C*-10), 137.2 (*C*-12), 135.1 (*C*-18), 134.5 (*C*-3), 132.3 (*C*-4), 131.6 (*C*-21), 130.2 (*C*-14), 128.5 (*C*-20), 127.8 (*C*-15), 127.7 (*C*-19), 123.9 (*C*-2), 117.3 (*C*-11), 116.8 (*C*-13), 107.6 (*C*-7), 17.7 (*C*-16) ppm.

LC-MS (ESI): t_{R} = 8.2 min, *m/z* (%) = 382.0, 383.0, 384.0 (100, 30, 5) [M+H]⁺.

(E)-N-[2-Methyl-5-(phenyldiazenyl)phenyl]-4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-amin (80)

6-Methyl-*N*-[4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl]benzen-1,3-diamin (**89**) (300 mg, 1.08 mmol) wurde zusammen mit Nitrosobenzen (127 mg, 1.19 mmol) in Eisessig (20 mL) gelöst und 16 h bei Raumtemp. gerührt. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (80 g Säule, DCM/MeOH-Gradient, 0 % MeOH → 15 % MeOH). Es wurde ein dunkelroter Feststoff erhalten.

Ausbeute: 277 mg (760 μ mol, 70 %).

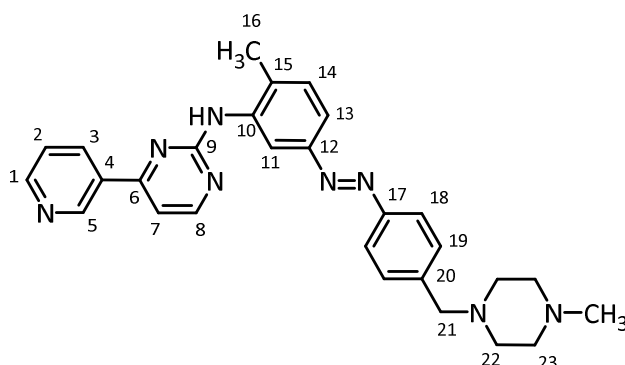
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 9.36 (d, 4J = 1.8 Hz, 1 H, *H*-5), 9.11 (s, 1 H, NH), 8.71 (dd, 3J = 4.8 Hz, 4J = 1.6 Hz, 1 H, *H*-1), 8.58 (d, 3J = 5.1 Hz, 1 H, *H*-8), 8.48 (ddd, 3J = 8.0 Hz, 4J = 1.8 Hz, 4J = 1.7 Hz, 1 H, *H*-3), 8.37 (d, 4J = 1.6 Hz, 1 H, *H*-11), 7.89-7.92 (m, 2 H, *H*-18), 7.67 (dd, 3J = 8.0 Hz, 4J = 2.0 Hz, 1 H, *H*-13), 7.54-7.62 (m, 3 H, *H*-19, *H*-20), 7.51-7.52 (m, 2 H, *H*-2, *H*-7), 7.48 (d, 3J = 8.0 Hz, 1 H, *H*-14), 2.39 (s, 3 H, *H*-16) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6): δ = 161.6 (C-9), 160.8 (C-6), 159.7 (C-8), 152.0 (C-17), 151.6 (C-1), 150.6 (C-12), 148.2 (C-5), 138.8 (C-10), 135.3 (C-15), 134.3 (C-3), 132.1 (C-4), 131.3 (C-14), 131.1 (C-20), 129.5 (C-19), 123.9 (C-2), 122.5 (C-18), 120.1 (C-13), 116.0 (C-11), 108.7 (C-7), 26.1 (C-16) ppm.

LC-MS (ESI): t_R = 7.2 min, m/z (%) = 369, 368, 367 (100, 26, 4) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

HRMS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{N}_6^+$: 367.1666, gef.: 367.1659.

(E)-N-[2-Methyl-5-({4-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl]phenyl}diazenyl)phenyl]pyridin-3-yl)pyrimidin-2-amin (81)



1-Methyl-4-(4-nitrobenzyl)piperazin (**92**) (200 mg, 721 μmol) wurde in Ethanol (9 mL) gelöst und mit Ammoniumchlorid (116 mg, 2.16 mmol), gelöst in demin. Wasser (3 mL), versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde auf 65 °C erhitzt und Zinkpulver (94 mg, 1.44 mmol) zugegeben. Der Reaktionsverlauf wurde kontinuierlich mittels DC verfolgt und die Reaktion nach 45 min abgebrochen. Dazu wurde das Reaktionsgemisch heiß filtriert und anschließend auf 0 °C abgekühlt. Zur kalten Lösung wurde Eisen(III)chlorid Hexahydrat (390 mg, 1.44 mmol), gelöst in eiskaltem demin. Wasser (6 mL), tropfenweise zugegeben und das Reaktionsgemisch bei 0 °C gerührt. Nach 30 min wurde die Lösung auf ges. Natriumhydrogencarbonat-Lsg. (50 mL) gegeben und mit Dichlormethan (3 x 70 mL) extrahiert. Die vereinigten org. Extrakte wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde zusammen mit 6-Methyl-N-[4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl]benzen-1,3-diamin (**89**) (140 mg, 506 μmol) in Eisessig (15 mL) gelöst und 48 h bei Raumtemp. gerührt. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (40 g Säule, DCM/MeOH-Gradient, 0 % MeOH \rightarrow 15 % MeOH, 30 min). Es wurde ein dunkelrotes Öl erhalten.

Ausbeute: 25 mg (54 μmol , 8 %).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): δ = 9.35 (d, 4J = 2.2 Hz, 1 H, *H*-5), 9.09 (s, 1 H, *NH*), 8.72 (dd, 3J = 4.8 Hz, 4J = 1.6 Hz, 1 H, *H*-1), 8.58 (d, 3J = 5.2 Hz, 1 H, *H*-8), 8.47 (ddd, 3J = 8.0 Hz, 4J = 1.8 Hz, 4J = 1.7 Hz, 1 H, *H*-3), 8.33 (d, 4J = 1.7 Hz, 1 H, *H*-11), 7.88 (d, 3J = 8.4 Hz, 2 H, *H*-18), 7.65 (dd, 3J = 8.0 Hz, 4J = 2.0 Hz, 1 H, *H*-13), 7.56-7.45 (m, 4 H, *H*-19, *H*-2, *H*-7), 7.48 (d, 3J = 8.0 Hz, 1 H, *H*-14), 3.60 (s, 2 H, *H*-21), 2.67 (br. s, 8 H, *H*-22, *H*-23), 2.40 (s, 3 H, *H*-24), 2.38 (s, 3 H, *H*-16) ppm.

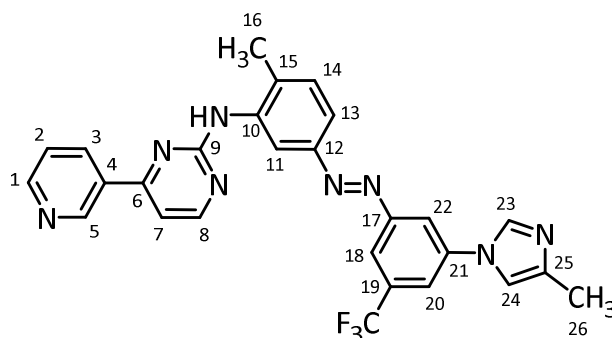
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6): δ = 161.6 (*C*-9), 160.8 (*C*-6), 159.7 (*C*-8), 151.6 (*C*-1), 151.3 (*C*-17), 150.6 (*C*-12), 148.2 (*C*-5), 138.8 (*C*-10), 135.3 (*C*-15), 134.3 (*C*-3), 132.1 (*C*-4), 131.2 (*C*-14), 129.9 (*C*-19), 129.3

(C-20), 123.9 (C-2), 122.5 (C-18), 120.0 (C-13), 116.0 (C-11), 108.3 (C-7), 61.2 (C-21), 54.0 (C-23), 51.4 (C-22), 44.4 (C-24), 18.3 (C-16) ppm.

LC-MS (ESI): $t_R = 5.9$ min, m/z (%) = 479.1, 480.1, 481.1 (100, 35, 7) $[M+H]^+$.

HRMS (ESI): m/z ber. für $C_{28}H_{31}N_8^+$: 479.2672, gef.: 479.2660.

(E)-N-(2-Methyl-5-{[3-(4-methyl-1H-imidazol-1-yl)-5-(trifluormethyl)phenyl]diazenyl}phenyl)-4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-amin (82)



6-Methyl-N-[4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl]benzen-1,3-diamin (**89**) (50 mg, 180 μ mol) wurde zusammen mit 3-(4-Methyl-1H-imidazol-1-yl)-5-(trifluormethyl)anilin (**96**), 217 mg, 901 μ mol) und Kupfer(I)-bromid (13 mg, 90 μ mol) in trockenem Toluol (8 mL) suspendiert und mit Pyridin (22 μ L) versetzt. Die Reaktionsapparatur wurde mit Sauerstoff gespült und das Reaktionsgemisch 24 h auf 60 °C erhitzt. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel vorgereinigt (40 g Säule, DCM/MeOH-Gradient, 0 % MeOH \rightarrow 10 % MeOH, 25 min, 25 mL/min). Die vereinigten Fraktionen wurden anschließend zusätzlich an RP-Kieselgel (25 g C-18-Säule, H₂O/MeOH-Gradient, 50 % MeOH \rightarrow 100 % MeOH, 20 min, 15 mL/min) gereinigt. Es wurde ein gelber Feststoff erhalten.

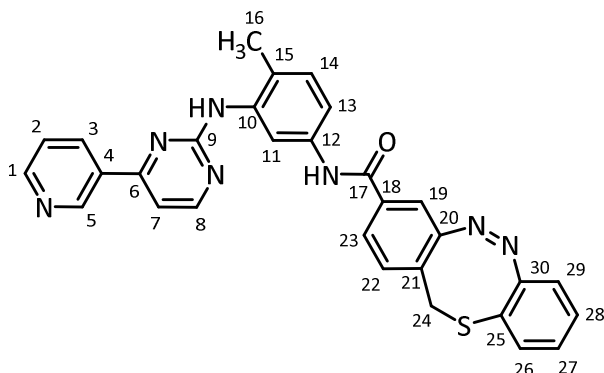
Ausbeute: 5 mg (10 μ mol, 6 %)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 9.30 (bs, 1 H, H-5), 9.07 (s, 1 H, NH), 8.55-8.58 (m, 2 H, H-1, H-8), 8.41-8.43 (m, 2 H, H-3, H-11), 8.33 (s, 1 H, H-20), 8.22 (s, 1 H, H-18), 8.16 (s, 1 H, H-22), 7.80 (s, 1 H, H-23), 7.66 (dd, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 1.9 Hz, 1 H, H-13), 7.51 (s, 1 H, H-24), 7.42-7.48 (m, 4 H, H-2, H-7, H-14), 2.39 (s, 3 H, H-16), 2.20 (s, 3 H, H-26) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ = 161.5 (C-9), 160.8 (C-6), 159.7 (C-8), 151.4 (C-1), 150.7 (C-17), 148.3 (C-12), 148.2 (C-5), 138.8 (C-10), 137.4 (C-25), 135.4 (C-15), 134.8 (C-21), 134.3 (C-3), 132.1 (C-4), 131.2 (C-14), 131.2 (q, ²J_{CF} = 32.0 Hz, C-19), 131.1 (C-23), 124.0 (q, ¹J_{CF} = 272 Hz, CF₃), 123.9 (C-2), 119.7 (C-13), 116.2 (C-11), 115.4 (C-20), 114.3 (C-18), 114.3 (C-24), 108.2 (C-7), 18.3 (C-16), 13.7 (C-26) ppm.

LC-MS (ESI): t_R = 9.9 min, m/z (%) = 515.1, 516.0, 517.0 (100, 36, 4) [M+H]⁺.

(Z)-N-(4-Methyl-3-{[4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl]amino}phenyl)-12H-dibenzo[b,f][1,4,5]thiadiazocin-3-carboxamid (83)



(Z)-12H-Dibenzo[b,f][1,4,5]thiadiazocin-3-carbonsäure (**100**) (44 mg, 162 μmol) wurde zusammen mit CDI (35 mg, 216 μmol) unter Stickstoffatmosphäre in trockenem DMF (5 mL) gelöst und bei Raumtemp. gerührt bis keine Gasentwicklung mehr beobachtbar war (ca. 30 min). Das Reaktionsgemisch wurde 1 h auf 50 °C erhitzt und anschließend 6-Methyl-N-[4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl]benzen-1,3-diamin (**89**, 50 mg, 180 μmol) zugegeben. Es wurde weitere 17 h auf 70 °C erhitzt. Nach Abkühlung auf Raumtemp. wurde das Reaktionsgemisch mit Ethylacetat (100 mL) verdünnt und mit demin. Wasser gewaschen (5 x 30 mL). Das Lösungsmittel wurde über Natriumsulfat getrocknet und anschließend i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (12 g Säule, DCM/MeOH-Gradient, 0 % MeOH \rightarrow 10 % MeOH, 25 min, 20 mL/min). Es wurde ein gelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 81 mg (153 μmol , 65 %).

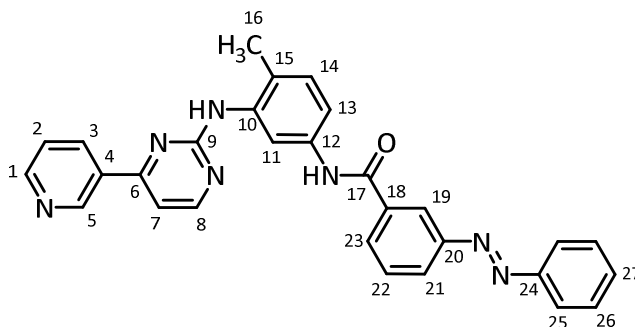
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 10.22 (s, 1 H, CONH), 9.27 (d, 4J = 1.7 Hz, 1 H, H-5), 8.98 (s, 1 H, NH), 8.70 (dd, 3J = 4.8 Hz, 4J = 1.6 Hz, 1 H, H-1), 8.51 (d, 3J = 5.1 Hz, 1 H, H-8), 8.47 (dt, 3J = 8.1 Hz, 4J = 2.1 Hz, 1 H, H-3), 8.02 (d, 4J = 1.9 Hz, 1 H, H-11), 7.72 (dd, 3J = 8.0 Hz, 4J = 1.7 Hz, 1 H, H-22), 7.49-7.52 (m, 1 H, H-2), 7.41-7.45 (m, 4 H, H-7, H-13, H-18, H-21), 7.26 (td, 3J = 7.8 Hz, 4J = 1.2 Hz, 1 H, H-27), 7.19 (d, 3J = 8.4 Hz, 1 H, H-14), 7.15 (dd, 3J = 7.8 Hz, 4J = 1.1 Hz, 1 H, H-25), 7.04 (td, 3J = 7.6 Hz, 4J = 1.2 Hz, 1 H, H-26), 6.88 (dd, 3J = 7.9 Hz, 4J = 1.1 Hz, 1 H, H-28), 4.04 (d, 2J = 11.7 Hz, 1 H, H-23), 3.97 (d, 2J = 11.6 Hz, 1 H, H-23'), 2.21 (s, 3 H, H-16) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6): δ = 163.9 (C-17), 161.6 (C-6), 161.1 (C-9), 159.5 (C-8), 157.0 (C-30), 156.7 (C-20), 151.5 (C-1), 148.2 (C-5), 137.8 (C-10), 136.8 (C-12), 134.9 (C-18), 134.5 (C-3), 133.3 (C-26), 132.2 (C-4), 130.1 (C-14), 129.7 (C-22), 128.4 (C-28), 127.8 (C-15), 127.6 (C-27), 127.4 (C-21), 126.9

(C-23), 123.8 (C-2), 121.1 (C-25), 119.5 (C-29), 117.2 (C-11), 116.7 (C-13), 116.4 (C-19), 107.6 (C-7), 33.6 (C-24), 17.7 (C-16) ppm.

LC-MS (ESI): $t_R = 9.1$ min, m/z (%) = 530.1, 531.1, 532.0, 533.0 (100, 39, 13, 3) $[M+H]^+$.

HRMS (ESI): m/z ber. für $C_{30}H_{24}N_7OS^+$: 530.1758, gef.: 530.1755.

(E)-N-(4-Methyl-3-{[4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl]amino}phenyl)-3-(phenyldiazenyl)benzamid (84)

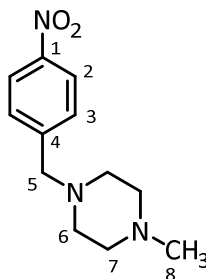
(E)-3-(Phenyldiazenyl)benzoesäure (**101**) (82 mg, 361 μmol) wurde zusammen mit 6-Methyl-N-[4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl]benzen-1,3-diamin (**89**) (100 mg, 361 μmol) unter Stickstoffatmosphäre in trockenem Ethylacetat (15 mL) gelöst und tropfenweise mit T3P-Lsg. (1.7 M in Ethylacetat, 430 μL , 721 μmol) und DIPEA (60 μL , 361 μmol) versetzt. Es wurde weitere 16 h bei Raumtemp. gerührt und anschließend das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (12 g Säule, DCM/MeOH-Gradient, 0 % MeOH \rightarrow 10 % MeOH, 25 min, 20 mL/min). Es wurde ein gelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 91 mg (187 μmol , 52 %).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 10.46 (s, 1 H, CONH), 9.29 (d, 4J = 2.3 Hz, 1 H, H-5), 8.99 (s, 1 H, NH), 8.69 (dd, 3J = 4.8 Hz, 4J = 1.7 Hz, 1 H, H-1), 8.53 (d, 3J = 5.1 Hz, 1 H, H-8), 8.48 (dt, 3J = 8.5 Hz, 4J = 2.0 Hz, 1 H, H-3), 8.47 (t, 4J = 1.9 Hz, H-19), 8.15 (dt, 1 H, H-23), 8.13 (d, 4J = 2.2 Hz, 1 H, H-11), 8.10 (ddd, 3J = 7.9 Hz, 4J = 1.3 Hz, 4J = 1.0 Hz, 1 H, H-21), 7.94-7.97 (m, 2 H, H-25), 7.77 (t, 3J = 8.1 Hz, 1 H, H-22), 7.59-7.66 (m, 3 H, H-26, H-27), 7.52-7.55 (m, 2 H, H-2, H-13), 7.44 (d, 4J = 5.2 Hz, 1 H, H-7), 7.24 (d, 3J = 8.5 Hz, 1 H, H-14), 2.24 (s, 3 H, H-16) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6): δ = 164.6 (C-17), 161.6 (C-9), 161.2 (C-6), 159.2 (C-8), 151.9 (C-24), 151.8 (C-20), 151.4 (C-1), 148.2 (C-5), 137.9 (C-10), 137.0 (C-12), 136.4 (C-18), 134.4 (C-3), 132.2 (C-4), 131.9 (C-27), 130.6 (C-23), 130.1 (C-14), 129.7 (C-22), 129.6 (C-26), 127.8 (C-15), 125.2 (C-21), 123.8 (C-2), 122.7 (C-25), 121.8 (C-19), 117.2 (C-11), 116.8 (C-13), 107.6 (C-7), 17.7 (C-16) ppm.

LC-MS (ESI): t_R = 9.8 min, m/z (%) = 486.1, 487.1, 488.0 (100, 40, 7) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

1-Methyl-4-(4-nitrobenzyl)piperazin (92)

Kaliumcarbonat (190 mg, 1.39 mmol) wurde in DMF (6 mL) suspendiert und 1-Methylpiperazin (**91**) (100 μ L, 930 μ mol) tropfenweise zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min bei Raumtemp. gerührt und anschließend 1-(Bromomethyl)-4-nitrobenzol (**90b**) (200 mg, 930 μ mol), gelöst in DMF (6 mL), zugetropft. Es wurde 16 h bei Raumtemp. gerührt und die Reaktionslösung anschließend auf demin. Wasser (50 mL) gegeben. Die wässr. Phase wurde mit Diethylether (3 x 50 mL) extrahiert, die vereinigten org. Extrakte mit Wasser gewaschen (2 x 50 mL) und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels i. Vak. wurde ein oranger Feststoff erhalten.

Ausbeute: 150 mg (640 μ mol, 69 %).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 8.16 (d, 3J = 8.7 Hz, 2 H, *H*-2), 7.50 (d, 3J = 8.7 Hz, 2 H, *H*-3), 3.59 (s, 2 H, *H*-5), 2.50 (bs, 8 H, *H*-6, *H*-7), 2.31 (s, 3 H, *H*-8) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ = 147.3 (*C*-1), 146.5 (*C*-4), 129.6 (*C*-2), 123.6 (*C*-3), 62.1 (*C*-5), 55.1 (*C*-6), 53.1 (*C*-7), 46.0 (*C*-8) ppm.

LC-MS (ESI): t_R = 2.2 min, m/z (%) = 236, 237 (100, 16) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

5.5 Kinase Assays

Die in Kapitel 3.1-3.3 diskutierten Kinaseassays wurden von Heintze durchgeführt.^[126,157]

Kinaseaktivitäten wurden mit einem Lumineszenz-basierten ADP-Glo® Kinaseassay der Firma Promega (Mannheim, Deutschland) bestimmt. Dabei wird die bei der Kinasereaktion freigesetzte Menge an ADP über ein Lumineszenz-Signal ausgelesen. Folgende Kinasen der Firma Promega (Mannheim, Deutschland) wurden verwendet: VEGFR2 (*purified kinase domain, KDR active*) und PDGFRβ (*purified kinase domain, PDGFRβ active*). Der Assay wurde nach den Vorgaben des Herstellers auf weißen 96-well CulturePlates™ der Firma PerkinElmer (Rodgau, Deutschland) durchgeführt. Die Kinasereaktionen wurden mit 10 μM ATP, 0.4 ng/μL Kinase und 0.25 mg/mL Substrat [Poly(4:1 Glu, Tyr)-Peptid] in folgendem Puffer durchgeführt: 40 mM Tris (pH 7.5), 20 mM MgCl₂, 0.1 mg/mL BSA, 2 mM DTT, 2 mM MnCl₂, 100 μM Na₃VO₄ und 0.01 % NaN₃. Es wurden jeweils 25 μL der Kinase-Reaktionsmischung pro Kavität eingesetzt. Die optimale ATP- und Kinasekonzentration wurde zuvor durch Standardkurven für die ATP- zu ADP-Umsetzung und durch eine Kinasetitration ermittelt.

Die Inhibitoren wurden jeweils in DMSO gelöst und anschließend eine 1:3-Verdünnung durchgeführt. Die unterschiedlich konzentrierten DMSO-Lösungen wurden so zu der Kinase-Reaktionsmischung dazugegeben, dass Inhibitorkonzentrationen im Bereich von 10 μM bis 0.5 nM und standardmäßig eine finale DMSO-Konzentration von 1 % erhalten wurde. Für die Verbindungen **73**, **74** und **75** wurden aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit zusätzlich Kinaseassays mit einer DMSO-Konzentration von 10 % durchgeführt. Um eine unkontrollierte *E/Z*-Isomerisierung zu vermeiden, wurde mit lichtempfindlichen Inhibitoren ausschließlich in einem abgedunkelten Labor gearbeitet. Als Lichtquelle wurden dabei herkömmliche rote LEDs verwendet. Bei der Testung des PSS der Inhibitoren **73**, **74** und **75** wurde eine 405 nm LED als Laborlichtquelle verwendet. Gezielte Photoschaltung der Inhibitoren erfolgte durch Bestrahlung auf einer Mikrotiterplatte vor Kinasezugabe mit den in Kapitel 5.1.6 beschriebenen LEDs. Je nach verwendeter Lampe wurde zwischen 20 s und 120 s bestrahlt.

Als 100 % Kinaseaktivität wurde das Auslesungssignal gesetzt, das nach Zugabe von 1 % DMSO ohne Inhibitor erhalten wurde, abzüglich der Signale ohne Kinase und ohne Inhibitoren (Hintergrundsignal). Das Lumineszenzsignal wurde mit einem FLUOstar® Omega Microplate-Reader der Firma BMG Labtech (Ortenberg, Deutschland) ausgelesen. Es wurde die prozentuale Kinaseaktivität in Relation zur Kontrolle ohne Inhibitor berechnet und gegen den Logarithmus der Inhibitorkonzentration aufgetragen. Abgebildete Datenpunkte geben jeweils den Mittelwert aus Doppelbestimmungen an. Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Zur Bestimmung des IC₅₀-Wertes wurden die

Datenpunkte unter Verwendung der Software Prism (Version 7.03) der Firma GraphPad (San Diego, USA) mit einer Sigmoidfunktion (*log(inhibitor) vs response - variable slope*) gefittet.

5.6 Zelltestung

Die in Kapitel 3.1-3.2 diskutierten Zellproliferationsassays wurden von Heintze durchgeführt.^[126,157]

Für die in Kapitel 3.1 diskutierten Proliferationsassays wurden HUVECs von der Firma CLS Cell Lines Service GmbH (Eppelheim, Deutschland) bezogen. Alle weiteren Zellproliferationsassays wurden mit HUVECs der Firma Promocell (Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Die Zellen wurden in Endothelial Cell Growth Medium mit 10 % FCS kultiviert und bei 37 °C in einer feuchten Atmosphäre mit 5 % CO₂ inkubiert. Für die Zellproliferationsassays wurden 10⁴ Zellen in 100 µL pro Kavität auf einer 96-well CulturePlate™ der Firma PerkinElmer (Rodgau, Deutschland) ausgesät. Diese Zellzahl wurde zuvor durch eine Zelltitration ermittelt. Nach einer Inkubation von 24 h wurde die Zellviabilität einer Referenzplatte analysiert. Zur Auslesung wurde entweder ein CellTiter-Glo® Assay der Firma Promega (Mannheim, Deutschland) oder ein Resazurin-Assay verwendet.

Die Inhibitoren wurden in DMSO gelöst und durch 1:3-Verdünnungsschritte eine Verdünnungsreihe mit unterschiedlich konzentrierten Lösungen angesetzt. Die Lösungen wurden auf die Testplatte gegeben, sodass im Zellmedium Inhibitorkonzentrationen von 300 µM bis 5 nM oder 100 µM bis 1.7 nM erreicht wurden. Die finale DMSO-Konzentration betrug 1 %. Um eine unkontrollierte *E/Z*-Isomerisierung zu vermeiden, wurde mit lichtempfindlichen Inhibitoren ausschließlich in einem abgedunkelten Labor gearbeitet. Zur Schaltung der Inhibitoren wurden die Mikrotiterplatten nach Substanzzugabe mit den in Kapitel 5.1.6 beschriebenen LEDs für 2 min bestrahlt. Bei Assays mit mehrfacher Nachbestrahlung wurden die Zellen alle 6 h für je 1 min bestrahlt.

Die Testplatte wurde nach Inhibitorzugabe für weitere 48 h inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die Viabilität mit einem CellTiter-Glo® Assay der Firma Promega (Mannheim, Deutschland) oder einem Resazurin-Assay bestimmt. Das Lumineszenzsignal wurde mit einem FLUOstar® Omega Microplate-Reader der Firma BMG Labtech (Ortenberg, Deutschland) ausgelesen. Das Zellwachstum mit Inhibitor wurde in Prozent zur 24h-Referenzplatte bzw. zum maximalen Zellwachstum bei 1 % DMSO ohne Inhibitor berechnet. Für jede Inhibitorkonzentration wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Abgebildete Datenpunkte stellen jeweils Mittelwerte aus Doppelbestimmungen dar. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Zur Bestimmung des IC₅₀-Wertes wurden die Datenpunkte unter Verwendung der Software Prism (Version 7.03) der Firma GraphPad (San Diego, USA) mit einer Sigmoidfunktion (*log(inhibitor) vs response - variable slope*) gefittet.

Zur Überprüfung der UV-Toleranz der HUVECs wurde ein Proliferationsassay durchgeführt, wobei die Zellen nicht mit unterschiedlichen Inhibitorkonzentration behandelt wurden, sondern unterschiedlich langen Bestrahlungen mit 385 nm oder 405 nm ausgesetzt wurden. Es wurde die Zellviabilität in Prozent zur unbestrahlten Kontrolle berechnet. In diesem Fall wurde eine Vierfachbestimmung durchgeführt.

5.7 Western Blot Analysen

Die in Kapitel 3.1 diskutierten Western Blots wurden von Rodat angefertigt.^[160]

HUVECs wurden in einer T75 Zellkulturflasche ausgesät und 2 h mit Inhibitoren oder 1 % DMSO (Negativkontrolle) inkubiert. Die Zellen wurden 15 min lang mit hVEGF (8065) der Firma Cell Signaling Technology (Frankfurt a. M., Deutschland) stimuliert. Zum Lysieren der Zellen wurde diese mit eiskaltem Gibco™ Dulbecco's Phosphat-Puffer (PBS) gewaschen und mit Mammalian Protein Extraction Reagent (M-PER) mit 1 % Halt Phosphatase- und Protease-Inhibitor Cocktail der Firma Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland). Das Lysat wurde mit 15000 rpm bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80 °C gelagert. Zur Auslesung wurden folgende Antikörper der Firma Cell Signaling Technology verwendet: p-VEGFR Tyr1175, p-AKT, GAPDH (3770, 4060, 2118).

NIH3T3-Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 10 % FCS and 1 mM Pyruvat bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden auf Mikrotiterplatten mit einer Zellzahl von 200000 Zellen pro Kavität ausgesät. Nach 48 h Inkubationszeit wurden Inhibitor-Lösungen oder 1 % DMSO (Negativkontrolle) zu den Zellen dazugegeben und für weitere 45 min inkubiert. Weiterhin wurden die Zellen 5 min lang mit 20 ng humanem PDGF pro Kavität stimuliert. Die Zellen wurden wie oben beschrieben lysiert und zentrifugiert. SDS-Page und Western-Blot wurden mit folgendem Antikörper-Kit der Firma Cell Signaling Technology (Frankfurt a. M., Deutschland) durchgeführt: PDGF Receptor Activation Antibody Sampler Kit #12651 (t-PDGFRβ, p-PDGFRβ, t-Akt, p-Akt, t-ERK, p-ERK, Anti-rabbit IgG). Die Signale wurden mit einem Lumi Imager F1 der Firma Roche (Mannheim, Deutschland) ausgelesen.

5.8 PamGene-Testung

Die in Kapitel 3.1 und 3.2 diskutierten PamGene-Daten wurden von Rodat erhoben.^[160]

HUVECs wurden in ECGM-2 Medium der Firma Promo Cell (Heidelberg, Deutschland) bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden in einer 25 cm² Zellkulturflasche ausgesät und für 48 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und wie oben beschrieben behandelt. Die Proteinkonzentration des Lysates wurde mit Hilfe des Bradford Assays der Firma Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland) bestimmt. Das Lysat wurde mit Tyrosinkinase PamChip®-Arrays und einer Pamstation®12 der Firma PamGene ('s-Hertogenbosch, Niederlande) analysiert. Dabei wurden 5 µg Protein pro Array sowie eine finale Konzentration von 100 µM ATP, 1 % DMSO und 10 µM Inhibitor verwendet. Es wurden jeweils zwei verschiedene Inhibitoren bzw. zwei verschiedene Lichtbedingungen im Vergleich zu einer Negativkontrolle (nur DMSO) und einer Positivkontrolle (Referenzinhibitor) vermessen. Dazu wurden drei PamChips® mit jeweils vier Arrays simultan analysiert. Reaktionsmischungen mit photoschaltbaren Inhibitoren wurden vor der Zugabe auf den PamChip® für 30 s mit der jeweiligen Wellenlänge bestrahlt. Die Auswertung der Daten erfolgte nach der Methode von Labot *et al.*^[241] Dazu wurde die Software Bionavigator 6 der Firma PamGene verwendet.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Velema, W. A., Szymanski, W., Feringa, B. L., *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 2178-2191.
- [2] Broichhagen, J., Frank, J. A., Trauner, D., *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 1947-1960.
- [3] Lerch, M. M., Hansen, M. J., van Dam, G. M., Szymanski, W., Feringa, B. L., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2016**, *55*, 10978-10999.
- [4] Szymański, W., Beierle, J. M., Kistemaker, H. A. V., Velema, W. A., Feringa, B. L., *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 6114-6178.
- [5] Brieke, C., Rohrbach, F., Gottschalk, A., Mayer, G., Heckel, A., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 8446-8476.
- [6] Sternberg, E. D., Dolphin, D., Brückner, C., *Tetrahedron* **1998**, *54*, 4151-4202.
- [7] Cheong, W. F., Prah, S. A., Welch, A. J., *IEEE J. Quantum Electron.* **1990**, *26*, 2166-2185.
- [8] Dawson, J. B., Barker, D. J., Ellis, D. J., Cotterill, J. A., Grassam, E., Fisher, G. W., Feather, J. W., *Phys. Med. Biol.* **1980**, *25*, 695-709.
- [9] Wolbarsht, M. L., Walsh, A. W., George, G., *Appl. Opt.* **1981**, *20*, 2184-2186.
- [10] Anderson, N. M., Sekelj, P., *Phys. Med. Biol.* **1967**, *12*, 173-184.
- [11] Barun, V. V., Ivanov, A. P., Volotovskaya, A. V., Ulashchik, V. S., *J. Appl. Spectrosc.* **2007**, *74*, 430-439.
- [12] Matsumura, Y., Ananthaswamy, H. N., *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2004**, *195*, 298-308.
- [13] Tornaletti, S., Pfeifer, G. P., *BioEssays* **1996**, *18*, 221-228.
- [14] Smith, A. M., Mancini, M. C., Nie, S., *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 710-711.
- [15] Weissleder, R., *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 316-317.

- [16] Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K. A., Foster, T. H., Girotti, A. W., Gollnick, S. O., Hahn, S. M., Hamblin, M. R., Juzeniene, A., Kessel, D., Korbelik, M., Moan, J., Mroz, P., Nowis, D., Piette, J., Wilson, B. C., Golab, J., *CA: Cancer J. Clin.* **2011**, *61*, 250-281.
- [17] Mallidi, S., Anbil, S., Bulin, A.-L., Obaid, G., Ichikawa, M., Hasan, T., *Theranostics* **2016**, *6*, 2458-2487.
- [18] Yoon, I., Li, J. Z., Shim, Y. K., *Clin. Endosc.* **2013**, *46*, 7-23.
- [19] Hammond, G. S., Saltiel, J., Lamola, A. A., Turro, N. J., Bradshaw, J. S., Cowan, D. O., Counsell, R. C., Vogt, V., Dalton, C., *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 3197-3217.
- [20] Görner, H., Kuhn, H. J., *cis- trans Photoisomerization of Stilbenes and Stilbene-like Molecules in Advances in Photochemistry*, Vol. 19 (Hrsg.: Neckers, D. C., Volman, D. H., and Bunau, G. v.), John Wiley & Sons, Inc., New York (USA) **1995**, S. 5–31.
- [21] Klan, P., Wirz, J., *Photochemistry of Organic Compounds*, 1. Aufl., Wiley, Chichester (UK) **2009**, S. 227-292.
- [22] Ito, Y., Kajita, T., Kunimoto, K., Matsuura, T., *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 587-591.
- [23] Devanathan, S., Ramamurthy, V., *J. Photochem.* **1987**, *40*, 67-77.
- [24] Mazzucato, U., *Pure Appl. Chem.* **1982**, *54*, 1705-1721.
- [25] Arai, T., Moriyama, M., Tokumaru, K., *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3171-3172.
- [26] Hartley, *Nature* **1937**, *140*, 281.
- [27] Beharry, A. A., Woolley, G. A., *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 4422-4437.
- [28] Bandara, H. M. D., Burdette, S. C., *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1809-1825.
- [29] Fischer, E., Frankel, M., Wolovsky, R., *J. Chem. Phys.* **1955**, *23*, 1367.
- [30] Bléger, D., Hecht, S., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 11338-11349.
- [31] Beharry, A. A., Sadovski, O., Woolley, G. A., *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 19684-19687.

- [32] Sadovski, O., Beharry, A. A., Zhang, F., Woolley, G. A., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1484-1486.
- [33] Samanta, S., Beharry, A. A., Sadovski, O., Mc Cormick, T. M., Babalhavaeji, A., Tropepe, V., Woolley, G. A., *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 9777-9784.
- [34] Dong, M., Babalhavaeji, A., Samanta, S., Beharry, A. A., Woolley, G. A., *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 2662-2670.
- [35] Bléger, D., Schwarz, J., Brouwer, A. M., Hecht, S., *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 20597-20600.
- [36] Hansen, M. J., Lerch, M. M., Szymanski, W., Feringa, B. L., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 13514-13518.
- [37] Samanta, S., Babalhavaeji, A., Dong, M., Woolley, G. A., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 14127-14130.
- [38] Dong, M., Babalhavaeji, A., Hansen, M. J., Kálmán, L., Woolley, G. A., *ChemComm* **2015**, *51*, 12981-12984.
- [39] Dong, M., Babalhavaeji, A., Collins, C. V., Jarrah, K., Sadovski, O., Dai, Q., Woolley, G. A., *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 13483-13486.
- [40] Boulègue, C., Löweneck, M., Renner, C., Moroder, L., *ChemBioChem* **2007**, *8*, 591-594.
- [41] Behrendt, R., Schenk, M., Musiol, H.-J., Moroder, L., *J. Pept. Sci.* **1999**, *5*, 519-529.
- [42] Schehr, M., Ianes, C., Weisner, J., Heintze, L., Müller, M. P., Pichlo, C., Charl, J., Brunstein, E., Ewert, J., Lehr, M., Baumann, U., Rauh, D., Knippschild, U., Peifer, C., Herges, R., *Photochem. Photobiol. Sci.* **2019**, *18*, 1398-1407.
- [43] Brown, M. A., Vito, S. C. de, *Crit. Rev. Env. Sci. Tec.* **1993**, *23*, 249-324.
- [44] Levine, W. G., *Drug Metab. Rev.* **1991**, *23*, 253-309.
- [45] Duval, H., *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1910**, 727.
- [46] Siewertsen, R., Neumann, H., Buchheim-Stehn, B., Herges, R., Näther, C., Renth, F., Temps, F., *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15594-15595.

- [47] Samanta, S., Qin, C., Lough, A. J., Woolley, G. A., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *124*, 6558-6561.
- [48] Eljabu, F., Dhruval, J., Yan, H., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 5594-5596.
- [49] Sell, H., Näther, C., Herges, R., *Beilstein J. Org. Chem.* **2013**, *9*, 1-7.
- [50] Joshi, D. K., Mitchell, M. J., Bruce, D., Lough, A. J., Yan, H., *Tetrahedron* **2012**, *68*, 8670-8676.
- [51] Moormann, W., Langbehn, D., Herges, R., *Synthesis* **2017**, *49*, 3471-3475.
- [52] Moormann, W., Langbehn, D., Herges, R., *Beilstein J. Org. Chem.* **2019**, *15*, 727-732.
- [53] Hammerich, M., Schütt, C., Stähler, C., Lentès, P., Röhricht, F., Höppner, R., Herges, R., *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 13111-13114.
- [54] Lentès, P., Stadler, E., Röhricht, F., Brahms, A., Gröbner, J., Sönnichsen, F. D., Gescheidt, G., Herges, R., *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 13592-13600.
- [55] Bieth, J., Vratsanos, S. M., Wassermann, N., Erlanger, B. F., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1969**, *64*, 1103.
- [56] Deal, W. J., Erlanger, B. F., Nachmansohn, D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1969**, *64*, 1230.
- [57] Bieth, J., Wassermann, N., Vratsanos, S. M., Erlanger, B. F., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1970**, *66*, 850-854.
- [58] Hüll, K., Morstein, J., Trauner, D., *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 10710-10747.
- [59] Mayer, G., Heckel, A., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2006**, *45*, 4900-4921.
- [60] Borowiak, M., Nahaboo, W., Reynders, M., Nekolla, K., Jalinot, P., Hasserodt, J., Rehberg, M., Delattre, M., Zahler, S., Vollmar, A., Trauner, D., Thorn-Seshold, O., *Cell* **2015**, *162*, 403-411.
- [61] Velema, W. A., van der Berg, J. P., Hansen, M. J., Szymanski, W., Driessen, A. J. M., Feringa, B. L., *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 924-928.
- [62] Velema, W. A., Hansen, M. J., Lerch, M. M., Driessen, A. J. M., Szymanski, W., Feringa, B. L., *Bioconjug. Chem.* **2015**, *26*, 2592-2597.

- [63] Wegener, M., Hansen, M. J., Driessen, A. J. M., Szymanski, W., Feringa, B. L., *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 17979-17986.
- [64] Schönberger, M., Trauner, D., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 3264-3267.
- [65] Banghart, M. R., Mourot, A., Fortin, D. L., Yao, J. Z., Kramer, R. H., Trauner, D., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9097-9101.
- [66] Mourot, A., Fehrentz, T., Le Feuvre, Y., Smith, C. M., Herold, C., Dalkara, D., Nagy, F., Trauner, D., Kramer, R. H., *Nat. Methods* **2012**, *9*, 396.
- [67] Fehrentz, T., Kuttruff, C. A., Huber, F. M. E., Kienzler, M. A., Mayer, P., Trauner, D., *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1746-1749.
- [68] Trads, J. B., Hüll, K., Matsuura, B. S., Laprell, L., Fehrentz, T., Görlidt, N., Kozek, K. A., Weaver, C. D., Klöcker, N., Barber, D. M., Trauner, D., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 15421-15428.
- [69] Thapaliya, E. R., Zhao, J., Ellis-Davies, G. C. R., *ACS Chem. Neurosci.* **2019**, *10*, 2481-2488.
- [70] Vomasta, D., Högner, C., Branda, N. R., König, B., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7644-7647.
- [71] Fleming, C. L., Grøtli, M., Andréasson, J., *ChemPhotoChem* **2019**, *3*, 318-326.
- [72] Wood, J. S., Koszelak, M., Liu, J., Lawrence, D. S., *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 7145-7146.
- [73] Morckel, A. R., Lusic, H., Farzana, L., Yoder, J. A., Deiters, A., Nascone-Yoder, N. M., *Development* **2012**, *139*, 437.
- [74] Bliman, D., Nilsson, J. R., Kettunen, P., Andréasson, J., Grøtli, M., *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 13109.
- [75] Pinchuk, B., Horbert, R., Döbber, A., Kuhl, L., Peifer, C., *Molecules* **2016**, *21*, 517.
- [76] Horbert, R., Pinchuk, B., Davies, P., Alessi, D., Peifer, C., *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 2099-2107.
- [77] Zindler, M., Pinchuk, B., Renn, C., Horbert, R., Döbber, A., Peifer, C., *ChemMedChem* **2015**, *10*, 1335-1338.
- [78] Ferreira, R., Nilsson, J. R., Solano, C., Andréasson, J., Grøtli, M., *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 9769.

- [79] Hoorens, M. W.H., Ourailidou, M. E., Rodat, T., van der Wouden, P. E., Kobauri, P., Kriegs, M., Peifer, C., Feringa, B. L., Dekker, F. J., Szymanski, W., *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *179*, 133-146.
- [80] Wilson, D., Li, J. W., Branda, N. R., *ChemMedChem* **2017**, *12*, 284-287.
- [81] Frank, J. A., Yushchenko, D. A., Hodson, D. J., Lipstein, N., Nagpal, J., Rutter, G. A., Rhee, J.-S., Gottschalk, A., Brose, N., Schultz, C., Trauner, D., *Nat. Chem. Biol.* **2016**, *12*, 755-762.
- [82] Tsai, Y.-H., Essig, S., James, J. R., Lang, K., Chin, J. W., *Nat. Chem.* **2015**, *7*, 554-561.
- [83] Johnson, L. N., *Biochem. Soc. Trans.* **2009**, *37*, 627.
- [84] Schwartz, P. A., Murray, B. W., *Bioorg. Chem.* **2011**, *39*, 192-210.
- [85] Krauss, G., *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*, 5. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim **2014**, S. 420-431.
- [86] Cheung, J., Ginter, C., Cassidy, M., Franklin, M. C., Rudolph, M. J., Robine, N., Darnell, R. B., Hendrickson, W. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2015**, *112*, 1374.
- [87] Freitag, A., Laufer, S., *Nachr. Chem.* **2015**, *63*, 420-425.
- [88] Kornev, A. P., Taylor, S. S., Eyck, L. F. ten, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 14377.
- [89] Krauss, G., *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*, 5. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim **2014**, S. 473-483.
- [90] Blume-Jensen, P., Hunter, T., *Nature* **2001**, *411*, 355-365.
- [91] Holm, M., Lehmann, F., Laufer, S., *Pharm. Unserer Zeit* **2008**, *37*, 382-392.
- [92] Zwick, E., Bange, J., Ullrich, A., *Endocr. Relat. Cancer* **2001**, *8*, 161-173.
- [93] Holmes, K., Roberts, O. L., Thomas, A. M., Cross, M. J., *Cell. Signal.* **2007**, *19*, 2003-2012.
- [94] Cristofanilli, M., Charnsangavej, C., Hortobagyi, G. N., *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 415-426.
- [95] Ferrara, N., Gerber, H.-P., LeCouter, J., *Nat. Med.* **2003**, *9*, 669-676.

- [96] Musumeci, F., Radi, M., Brullo, C., Schenone, S., *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 10797-10822.
- [97] Sousa Moreira, I., Alexandrino Fernandes, P., Joao Ramos, M., *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2007**, *7*, 223-245.
- [98] Heldin, C.-H., *Cell Commun. Signal.* **2013**, *11*, 97.
- [99] Appelmann, I., Liersch, R., Kessler, T., Mesters, R. M., Berdel, W. E., *Angiogenesis Inhibition in Cancer Therapy in Angiogenesis Inhibition*, Vol. 1 (Hrsg.: Liersch, R., Berdel, W. E., and Kessler, T.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg **2010**, S. 59–67.
- [100] Hanahan, D., Weinberg, R. A., *Cell* **2000**, *100*, 57-70.
- [101] Gani, O. A. B. S. M., Engh, R. A., *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 489-498.
- [102] Roskoski, R., *Pharmacol. Res.* **2019**, *144*, 19-50.
- [103] Zhang, J., Yang, P. L., Gray, N. S., *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9*, 28-39.
- [104] Zuccotto, F., Ardini, E., Casale, E., Angiolini, M., *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 2681-2694.
- [105] Dar, A. C., Shokat, K. M., *Annu. Rev. Biochem.* **2011**, *80*, 769-795.
- [106] Wu, P., Nielsen, T. E., Clausen, M. H., *Trends Pharmacol. Sci.* **2015**, *36*, 422-439.
- [107] Roskoski, R., *Pharmacol. Res.* **2016**, *103*, 26-48.
- [108] Traxler, P., Furet, P., *Pharmacol. Ther.* **1999**, *82*, 195-206.
- [109] Davis, M. I., Hunt, J. P., Herrgard, S., Ciceri, P., Wodicka, L. M., Pallares, G., Hocker, M., Treiber, D. K., Zarrinkar, P. P., *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29*, 1046-1051.
- [110] Backes, A. C., Müller, G., Sennhenn, P. C., *Design Principles of Deep Pocket-Targeting Protein Kinase Inhibitors in Protein Kinases as Drug Targets*, Vol. 49 (Hrsg.: Klebl, B., and Müller, Gerhard, Hamacher, Michael), Wiley VCH, Weinheim **2011**, S. 145-154.
- [111] Cox, K. J., Shomin, C. D., Ghosh, I., *Future Med. Chem.* **2010**, *3*, 29-43.
- [112] Lamba, V., Ghosh, I., *Curr. Pharm. Des.* **2012**, *18*, 2936-2945.

- [113] Cohen, M. S., Zhang, C., Shokat, K. M., Taunton, J., *Science* **2005**, *308*, 1318.
- [114] Deininger, M. W.N., *Haematol. Rep.* **2005**, *1*, 20-27.
- [115] Muller, B. A., *Curr. Pharm. Des.* **2009**, *15*, 120-133.
- [116] Hu-Lowe, D. D., Zou, H. Y., Grazzini, M. L., Hallin, M. E., Wickman, G. R., Amundson, K., Chen, J. H., Rewolinski, D. A., Yamazaki, S., Wu, E. Y., McTigue, M. A., Murray, B. W., Kania, R. S., O'Connor, P., Shalinsky, D. R., Bender, S. L., *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 7272-7283.
- [117] Escudier, B., Gore, M., *Drugs R&D* **2011**, *11*, 113-126.
- [118] Solowiej, J., Bergqvist, S., McTigue, M. A., Marrone, T., Quenzer, T., Cobbs, M., Ryan, K., Kania, R. S., Diehl, W., Murray, B. W., *Biochemistry* **2009**, *48*, 7019-7031.
- [119] Sluggett, G., *Application of Structure Elucidation Techniques and Topochemical Principles to Understand Solid-State Photoreactivity*, Conference on Small Molecule Science, Williamsburg (USA) **2014**.
- [120] Campeta, A. M., Chekal, B. P., Abramov, Y. A., Meenan, P. A., Henson, M. J., Shi, B., Singer, R. A., Horspool, K. R., *J. Pharm. Sci.* **2010**, *99*, 3874-3886.
- [121] Sparidans, R. W., Iusuf, D., Schinkel, A. H., Schellens, J. H. M., Beijnen, J. H., *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2009**, *877*, 4090-4096.
- [122] Pithavala, Y. K., Tong, W., Mount, J., Rahavendran, S. V., Garrett, M., Hee, B., Selaru, P., Sarapa, N., Klamerus, K. J., *Invest. New Drugs* **2012**, *30*, 273-281.
- [123] Horbert, R., *Dissertation*, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel **2015**.
- [124] Weber, J., *Bachelorarbeit*, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel **2014**.
- [125] Kuhl, L., *Masterarbeit*, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel **2015**.
- [126] Heintze, L., *Aktuelle Arbeiten*, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel **2019**.
- [127] Simeth, N. A., Crespi, S., Fagnoni, M., König, B., *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 2940-2946.
- [128] Otsuki, J., Suwa, K., Sarker, K. K., Sinha, C., *J. Phy. Chem. A* **2007**, *111*, 1403-1409.

- [129] McTigue, M., Murray, B. W., Chen, J. H., Deng, Y.-L., Solowiej, J., Kania, R. S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012**, *109*, 18281-18289.
- [130] Harris, P. A., Bolor, A., Cheung, M., Kumar, R., Crosby, R. M., Davis-Ward, R. G., Epperly, A. H., Hinkle, K. W., Hunter, R. N., Johnson, J. H., Knick, V. B., Laudeman, C. P., Luttrell, D. K., Mook, R. A., Nolte, R. T., Rudolph, S. K., Szewczyk, J. R., Truesdale, A. T., Veal, J. M., Wang, L., Stafford, J. A., *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4632-4640.
- [131] Peifer, C., Selig, R., Kinkel, K., Ott, D., Totzke, F., Schächtele, C., Heidenreich, R., Röcken, M., Schollmeyer, D., Laufer, S., *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 3814-3824.
- [132] Horbert, R., Pinchuk, B., Johannes, E., Schlosser, J., Schmidt, D., Cappel, D., Totzke, F., Schächtele, C., Peifer, C., *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 170-182.
- [133] Musumeci, F., Radi, M., Brullo, C., Schenone, S., *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 10797-10822.
- [134] Ciorba, S., Fontana, F., Ciancaleoni, G., Caronna, T., Mazzucato, U., Spalletti, A., *J. Fluoresc.* **2009**, *19*, 759-768.
- [135] Laufer, R., Forrest, B., Li, S.-W., Liu, Y., Sampson, P., Edwards, L., Lang, Y., Awrey, D. E., Mao, G., Plotnikova, O., Leung, G., Hodgson, R., Beletskaya, I., Mason, J. M., Luo, X., Wei, X., Yao, Y., Feher, M., Ban, F., Kiarash, R., Green, E., Mak, T. W., Pan, G., Pauls, H. W., *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 6069-6087.
- [136] Sampson, P. B., Liu, Y., Forrest, B., Cumming, G., Li, S.-W., Patel, N. K., Edwards, L., Laufer, R., Feher, M., Ban, F., Awrey, D. E., Mao, G., Plotnikova, O., Hodgson, R., Beletskaya, I., Mason, J. M., Luo, X., Nadeem, V., Wei, X., Kiarash, R., Madeira, B., Huang, P., Mak, T. W., Pan, G., Pauls, H. W., *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 147-169.
- [137] Ewanicki, B. L., Flahive, E. J., Kasparian, A. J., Mitchell, M. B., Perry, M. D., O'Neill-Slawecki, S. A., Sach, N. W., Saenz, J. E., Shi, B., Stankovic, N. S., Srirangam, J. K., Tian, Q., Yu, S. (Pfizer, Inc., New York, USA), Eur. Pat. Appl. No. EP 2163544 A1, **2010**.
- [138] Ewanicki, B. L., Flahive, E. J., Kasparian, A. J., Mitchell, M. B., Perry, M. D., O'Neill-Slawecki, S. A., Sach, N. W., Saenz, J. E., Shi, B., Stankovic, N. S. (Agouron Pharmaceuticals, Inc., San Diego, USA), US Patent No. US7232910B2, **2007**.

- [139] Chekal, B. P., Guinness, S. M., Lillie, B. M., McLaughlin, R. W., Palmer, C. W., Post, R. J., Sieser, J. E., Singer, R. A., Sluggett, G. W., Vaidyanathan, R., Withbroe, G. J., *Org. Process Res. Dev.* **2014**, *18*, 266-274.
- [140] Zhai, L.-H., Guo, L.-H., Luo, Y.-H., Ling, Y., Sun, B.-W., *Org. Process Res. Dev.* **2015**, *19*, 849-857.
- [141] Correa, A., Tellitu, I., Domínguez, E., SanMartin, R., *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4811-4813.
- [142] Levin, J. I., Turos, E., Weinreb, S. M., *Syn. Commun.* **1982**, *12*, 989-993.
- [143] Basha, A., Lipton, M., Weinreb, S. M., *Tetrahedron Lett.* **1977**, *18*, 4171-4172.
- [144] Novak, A., Humphreys, L. D., Walker, M. D., Woodward, S., *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 5767-5769.
- [145] Sengar, R. S., Miller, J. J., Basu, P., *Dalton Trans.* **2008**, 2569-2577.
- [146] Boulouard, M., Schumann-Bard, P., Butt-Gueulle, S., Lohou, E., Stiebing, S., Collot, V., Rault, S., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 3177-3180.
- [147] Flores-Noria, R., Vázquez, R., Arias, E., Moggio, I., Rodríguez, M., Ziolo, R. F., Rodríguez, O., Evans, D. R., Liebig, C., *New J. Chem.* **2014**, *38*, 974-984.
- [148] Simoni, D., Grisolia, G., Giannini, G., Roberti, M., Rondanin, R., Piccagli, L., Baruchello, R., Rossi, M., Romagnoli, R., Invidiata, F. P., Grimaudo, S., Jung, M. K., Hamel, E., Gebbia, N., Crosta, L., Abbadessa, V., Di Cristina, A., Dusonchet, L., Meli, M., Tolomeo, M., *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 723-736.
- [149] Faler, C. A., Joullié, M. M., *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1987-1990.
- [150] Ito, Y., Kajita, T., Kunimoto, K., Matsuura, T., *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 587-591.
- [151] Syamala, M. S., Ramamurthy, V., *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 3712-3715.
- [152] Devanathan, S., Ramamurthy, V., *J. Photochem.* **1987**, *40*, 67-77.
- [153] Wardle, B., *Principles and Applications of Photochemistry*, 1. Aufl., Wiley, Chichester (UK) **2009**, S. 147-148.

- [154] Raeker, T., *Dissertation*, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel **2018**.
- [155] Lewis, F. D., Yoon, B. A., Arai, T., Iwasaki, T., Tokumaru, K., *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3029-3036.
- [156] Arai, T., Moriyama, M., Tokumaru, K., *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3171-3172.
- [157] Heintze, L., *Masterarbeit*, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel **2016**.
- [158] Rössler, J., Monnet, Y., Farace, F., Opolon, P., Daudigeos-Dubus, E., Bourredjem, A., Vassal, G., Georger, B., *Int. J. Cancer* **2010**, *128*, 2748-2758.
- [159] Park, H.-J., Zhang, Y., Georgescu, S. P., Johnson, K. L., Kong, D., Galper, J. B., *Stem Cell Rev.* **2006**, *2*, 93-101.
- [160] Rodat, T., *Aktuelle Arbeiten*, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel **2018**.
- [161] Strueben, J., Gates, P. J., Staubitz, A., *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 1719-1728.
- [162] Khan, A., Hecht, S., *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 4764-4774.
- [163] Sasaki, T., Tour, J. M., *Org. Lett.* **2008**, *10*, 897-900.
- [164] Shirai, Y., Sasaki, T., Guerrero, J. M., Yu, B.-C., Hodge, P., Tour, J. M., *ACS Nano* **2008**, *2*, 97-106.
- [165] Zeitouny, J., Belbakra, A., Llanes-Pallas, A., Barbieri, A., Armaroli, N., Bonifazi, D., *ChemComm* **2011**, *47*, 451-453.
- [166] Yu, B.-C., Shirai, Y., Tour, J. M., *Tetrahedron* **2006**, *62*, 10303-10310.
- [167] Lutz, T., Wein, T., Höfner, G., Pabel, J., Eder, M., Dine, J., Wanner, K. T., *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 6211-6235.
- [168] Yamamoto, T., Nakamura, D., Liu, G., Nishinaka, K., Tsuda, A., *J. Photochem. Photobiol. A* **2016**, *331*, 66-75.
- [169] Heitmann, G., Dommaschk, M., Löw, R., Herges, R., *Org. Lett.* **2016**, *18*, 5228-5231.
- [170] Köhl, I., Lüning, U., *Synthesis* **2014**, *46*, 2376-2382.

- [171] Boz, S., Stöhr, M., Soydaner, U., Mayor, M., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 3179-3183.
- [172] Bléger, D., Dokić, J., Peters, M. V., Grubert, L., Saalfrank, P., Hecht, S., *J. Phy. Chem. B* **2011**, *115*, 9930-9940.
- [173] Gon, M., Tanaka, K., Chujo, Y., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 6546-6551.
- [174] Rasheed, O. K., Quayle, P., *Synthesis* **2018**, *50*, 2608-2616.
- [175] Tsai, B.-K., Chen, C.-H., Hung, C.-H., Hsiao, V. K. S., Chu, C.-C., *J. Mat. Chem.* **2012**, *22*, 20874-20877.
- [176] Yoshino, J., Furuta, A., Kambe, T., Itoi, H., Kano, N., Kawashima, T., Ito, Y., Asashima, M., *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 5026-5035.
- [177] Sridhara, M. B., Srinivasa, G. R., Gowda, D. C., *J. Chem. Res.* **2004**, *1*, 74-75.
- [178] Zhu, H., Zheng, Z., Wang, J., Ren, B., Huang, Y., Wu, D. (Xiamen-Universität, Fujian, China), Chin. Patent-Nr. CN 101880251, **2010**.
- [179] Segarra-Maset, M. D., van Leeuwen, P. W. N. M., Freixa, Z., *Eur. J. Inorg. Chem.* **2010**, 2075-2078.
- [180] Kolecki, T., Syper, L., Wilk, K. A., *Synthesis* **1997**, *1997*, 681-684.
- [181] Garlich-Zschoche, F. A., Dötz, K. H., *Organometallics* **2007**, *26*, 4535-4540.
- [182] Ketels, M., Konrad, D. B., Karaghiosoff, K., Trauner, D., Knochel, P., *Org. Lett.* **2017**, *19*, 1666-1669.
- [183] Strueben, J., Lipfert, M., Springer, J.-O., Gould, C. A., Gates, P. J., Sönnichsen, F. D., Staubitz, A., *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 11165-11173.
- [184] Graceli, J. B., Sena, G. C., Lopes, P. F. I., Zamprogno, G. C., da Costa, M. B., Godoi, A. F. L., dos Santos, D. M., Marchi, M. R. R. de, dos Santos Fernandez, M. A., *Reprod. Toxicol.* **2013**, *36*, 40-52.
- [185] Nath, M., *Appl. Organometal. Chem.* **2008**, *22*, 598-612.

- [186] Telleria, A., Pérez-Miqueo, J., Altube, A., García-Lecina, E., Cózar, A. de, Freixa, Z., *Organometallics* **2015**, *34*, 5513-5529.
- [187] Pérez-Miqueo, J., Telleria, A., Muñoz-Olasagasti, M., Altube, A., García-Lecina, E., Cózar, A. de, Freixa, Z., *Dalton Trans.* **2015**, *44*, 2075-2091.
- [188] Barbero, H., Ferrero, S., Álvarez-Miguel, L., Gómez-Iglesias, P., Miguel, D., Álvarez, C. M., *ChemComm* **2016**, *52*, 12964-12967.
- [189] Burkhart, C., Haberhauer, G., *Eur. J. Org. Chem.* **2017**, *2017*, 1308-1317.
- [190] Sivamani, J., Balasaravanan, R., Duraimurugan, K., Siva, A., *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 211-218.
- [191] Dommaschk, M., Näther, C., Herges, R., *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 8496-8500.
- [192] Hierrezuelo, J., Rico, R., Valpuesta, M., Díaz, A., López-Romero, J. M., Rutkis, M., Kreigberga, J., Kampars, V., Algarra, M., *Tetrahedron* **2013**, *69*, 3465-3474.
- [193] Le, B. H., Koo, J. C., Joo, H. N., Seo, Y. J., *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 3591-3596.
- [194] Hashimoto, T., Yamazaki, M., Ishii, H., Yamada, T., Hayashita, T., *Chem. Lett.* **2013**, *43*, 228-230.
- [195] Harvey, J. H., Butler, B. K., Trauner, D., *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 1661-1664.
- [196] Tellkamp, T., *Dissertation*, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel **2014**.
- [197] Tellkamp, T., Shen, J., Okamoto, Y., Herges, R., *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 5456-5461.
- [198] Wu, B., Wang, H.-L., Cee, V. J., Lanman, B. A., Nixey, T., Pettus, L., Reed, A. B., Wurz, R. P., Guerrero, N., Sastri, C., Winston, J., Lipford, J. R., Lee, M. R., Mohr, C., Andrews, K. L., Tasker, A. S., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 775-780.
- [199] Morera, E., Ortar, G., *Synlett* **1997**, *12*, 1403-1405.
- [200] Fraile, A., Martín, M. R., García Ruano, J. L., Díaz, J. A., Arranz, E., *Tetrahedron* **2011**, *67*, 100-105.

- [201] Conrad, W. E., Rodriguez, K. X., Nguyen, H. H., Fettinger, J. C., Haddadin, M. J., Kurth, M. J., *Org. Lett.* **2012**, *14*, 3870-3873.
- [202] Schehr, M., *Dissertation*, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel **2018**.
- [203] Schehr, M., Hugenbusch, D., Moje, T., Näther, C., Herges, R., *Beilstein J. Org. Chem.* **2018**, *14*, 2799-2804.
- [204] Azizian, H., Eaborn, C., Pidcock, A., *J. Organomet. Chem.* **1981**, *215*, 49-58.
- [205] Farina, V., Krishnamurthy, V., Scott, W. J., *The Stille Reaction in Organic Reactions*, Vol. 50 (Hrsg.: Paquette, L. A.), John Wiley & Sons, Inc., New York (USA) **1997**.
- [206] Priewisch, B., Rück-Braun, K., *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 2350-2352.
- [207] Langbehn, D., *Aktuelle Arbeiten*, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel **2019**.
- [208] Maier, M. S., Hüll, K., Reynders, M., Matsuura, B. S., Leippe, P., Ko, T., Schäffer, L., Trauner, D., *J. Am. Chem. Soc.* **2019**.
- [209] Kocienski, P. J., *Protecting Groups*, 3. Aufl., Thieme, Stuttgart **2005**, S. 621-630.
- [210] Greene, T. W., Wuts, P. W. G., *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3. Aufl., John Wiley & Sons, Inc., New York (USA) **1999**, S. 494-653.
- [211] Kocienski, P. J., *Protecting Groups*, 3. Aufl., Thieme, Stuttgart **2005**, S. 315-320.
- [212] Lohou, E., Collot, V., Stiebing, S., Rault, S., *Synthesis* **2011**, *16*, 2651-2663.
- [213] Zhang, J., Yang, Q., Romero, J. A. C., Cross, J., Wang, B., Poutsiaka, K. M., Epie, F., Bevan, D., Wu, Y., Moy, T., Daniel, A., Chamberlain, B., Carter, N., Shotwell, J., Arya, A., Kumar, V., Silverman, J., Nguyen, K., Metcalf, C. A., Ryan, D., Lippa, B., Dolle, R. E., *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 1080-1085.
- [214] Fu, L., Xiao, J., Liu, W., Zhu, L., Xie, D., Jiang, F., Yang, F. (Jiaotong-Universität Shanghai), Chin. Patent-Nr. CN106008458A, **2016**.

- [215] Cowan-Jacob, S. W., Fendrich, G., Floersheimer, A., Furet, P., Liebetanz, J., Rummel, G., Rheinberger, P., Centeleghe, M., Fabbro, D., Manley, P. W., *Acta. Crystallogr. D.* **2007**, *63*, 80-93.
- [216] Weisberg, E., Manley, P. W., Breitenstein, W., Bruggen, J., Cowan-Jacob, S. W., Ray, A., Huntly, B., Fabbro, D., Fendrich, G., Hall-Meyers, E., Kung, A. L., Mestan, J., Daley, G. Q., Callahan, L., Catley, L., Cavazza, C., Azam, M., Neuberg, D., Wright, R. D., Gilliland, D. G., Griffin, J. D., *Cancer Cell* **2005**, *7*, 129-141.
- [217] Schlosser, J., *Dissertation*, Eberhard Karls Universität Tübingen **2011**.
- [218] Bethke, E., Pinchuk, B., Renn, C., Witt, L., Schlosser, J., Peifer, C., *ChemMedChem* **2016**, *11*, 2664-2674.
- [219] Kaitsiotou, H., Keul, M., Hardick, J., Mühlenberg, T., Ketzner, J., Ehrt, C., Krüll, J., Medda, F., Koch, O., Giordanetto, F., Bauer, S., Rauh, D., *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 8801-8815.
- [220] Cheng, C., Wang, X., Xing, L., Liu, B., Zhu, R., Hu, Y., *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1775-1780.
- [221] Bleasdale, C., Ellis, M. K., Farmer, P. B., Golding, B. T., Handley, K. F., Jones, P., McFarlane, W., *J. Label. Compd. Radiopharm.* **1993**, *33*, 739-746.
- [222] Defoin, A., *Synthesis* **2004**, *2004*, 706-710.
- [223] Holmes, R. R., Bayer, R. P., Errede, L. A., Davis, H. R., Wiesenfeld, A. W., Bergman, P. M., Nicholas, D. L., *J. Org. Chem.* **1965**, *30*, 3837-3840.
- [224] Medarametla, V., Festin, S., Sugarragchaa, C., Eng, A., Naqwi, A., Wiedmann, T., Zisman, L. S., *Pulm. Circ.* **2014**, *4*, 82-102.
- [225] Mol, C. D., Dougan, D. R., Schneider, T. R., Skene, R. J., Kraus, M. L., Scheibe, D. N., Snell, G. P., Zou, H., Sang, B.-C., Wilson, K. P., *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 31655-31663.
- [226] Madhavi Sastry, G., Adzhigirey, M., Day, T., Annabhimoju, R., Sherman, W., *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2013**, *27*, 221-234.

- [227] Harder, E., Damm, W., Maple, J., Wu, C., Reboul, M., Xiang, J. Y., Wang, L., Lupyan, D., Dahlgren, M. K., Knight, J. L., Kaus, J. W., Cerutti, D. S., Krilov, G., Jorgensen, W. L., Abel, R., Friesner, R. A., *J. Chem. Theory Comput.* **2016**, *12*, 281-296.
- [228] Bochevarov, A. D., Harder, E., Hughes, T. F., Greenwood, J. R., Braden, D. A., Philipp, D. M., Rinaldo, D., Halls, M. D., Zhang, J., Friesner, R. A., *Int. J. Quantum Chem.* **2013**, *113*, 2110-2142.
- [229] Röhricht, F., *Aktuelle Arbeiten*, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel **2019**.
- [230] Halgren, T. A., Murphy, R. B., Friesner, R. A., Beard, H. S., Frye, L. L., Pollard, W. T., Banks, J. L., *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1750-1759.
- [231] Friesner, R. A., Banks, J. L., Murphy, R. B., Halgren, T. A., Klicic, J. J., Mainz, D. T., Repasky, M. P., Knoll, E. H., Shelley, M., Perry, J. K., Shaw, D. E., Francis, P., Shenkin, P. S., *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1739-1749.
- [232] Friesner, R. A., Murphy, R. B., Repasky, M. P., Frye, L. L., Greenwood, J. R., Halgren, T. A., Sanschagrín, P. C., Mainz, D. T., *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6177-6196.
- [233] Sherman, W., Day, T., Jacobson, M. P., Friesner, R. A., Farid, R., *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 534-553.
- [234] Grimme, S., Antony, J., Ehrlich, S., Krieg, H., *J. Chem. Phys.* **2010**, *132*, 154104.
- [235] Grimme, S., Ehrlich, S., Goerigk, L., *J. Comput. Chem.* **2011**, *32*, 1456-1465.
- [236] Becke, A. D., *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648-5652.
- [237] Weigend, F., Ahlrichs, R., *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2005**, *7*, 3297-3305.
- [238] Bauernschmitt, R., Ahlrichs, R., *Chem. Phys. Lett.* **1996**, *256*, 454-464.
- [239] Bauernschmitt, R., Häser, M., Treutler, O., Ahlrichs, R., *Chem. Phys. Lett.* **1997**, *264*, 573-578.
- [240] Herschel, S., *Bachelorarbeit*, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel **2018**.
- [241] Labots, M., Gotink, K. J., Dekker, H., Azijli, K., van der Mij, J. C., Huijts, C. M., Piersma, S. R., Jiménez, C. R., Verheul, H. M. W., *Exp. Mol. Med.* **2016**, *48*, 279.

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABL1	Tyrosinkinase ABL1 (engl. <i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>)
Äquiv.	Äquivalent
AIBN	Azobisisobutyronitril
AKT	AKT Kinase (auch Proteinkinase B)
ATP	Adenosintriphosphat
BCR-ABL	BCR-ABL Fusionsprotein, auch Philadelphia-Chromosom (engl. <i>breakpoint cluster region ABL</i>)
BLK	Tyrosinkinase BLK, auch B-Lymphozyt Kinase
<i>n</i> -BuLi	<i>n</i> -Butyllithium
c-KIT	siehe KIT
CDI	Carbonyldiimidazol
CML	chronisch-myeloische Leukämie
dba	Dibenzylidenaceton
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
demin.	demineralisiert
DFG	Asparaginsäure-Phenylalanin-Glycin
DHP	Dihydropyran
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid

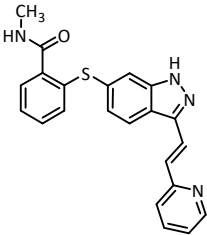
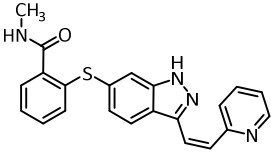
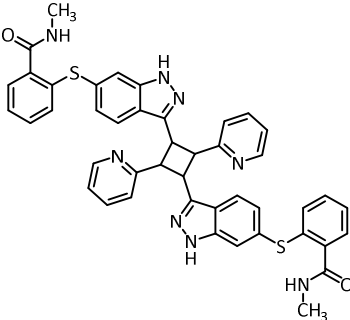
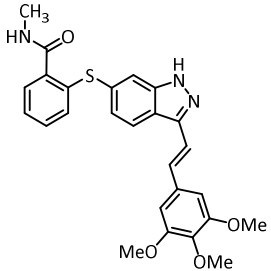
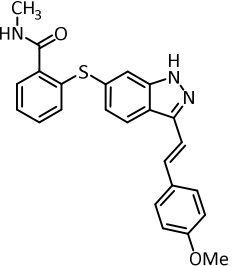
DMNB	4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyl
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EA	Ethylacetat (Essigsäureethylester)
EI	Elektronenstoß-Ionisation
ESI	Elektrospray-Ionisation
Exc	Anregung (engl. <i>excitation</i>)
FDA	Food and Drug Administration (USA)
FGFR	Fibroblast Growth Factor Rezeptor
GADPH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
ges.	gesättigt
GSH	Glutathion
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. <i>high-performance liquid chromatography</i>)
HRMS	Hochauflösende Massenspektrometrie (engl. <i>high-resolution mass spectrometry</i>)
HUVEC	humane Nabelschnur-Endothelzellen (engl. <i>human umbilical vein endothelial cell</i>)
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration (halbmaximale Inhibition)
konz.	konzentriert
KIT	Tyrosinkinase KIT (auch c-KIT oder SCFR)
LED	Leuchtdiode (engl. <i>light-emitting diode</i>)
MS	Massenspektrometrie (engl. <i>mass spectrometry</i>)

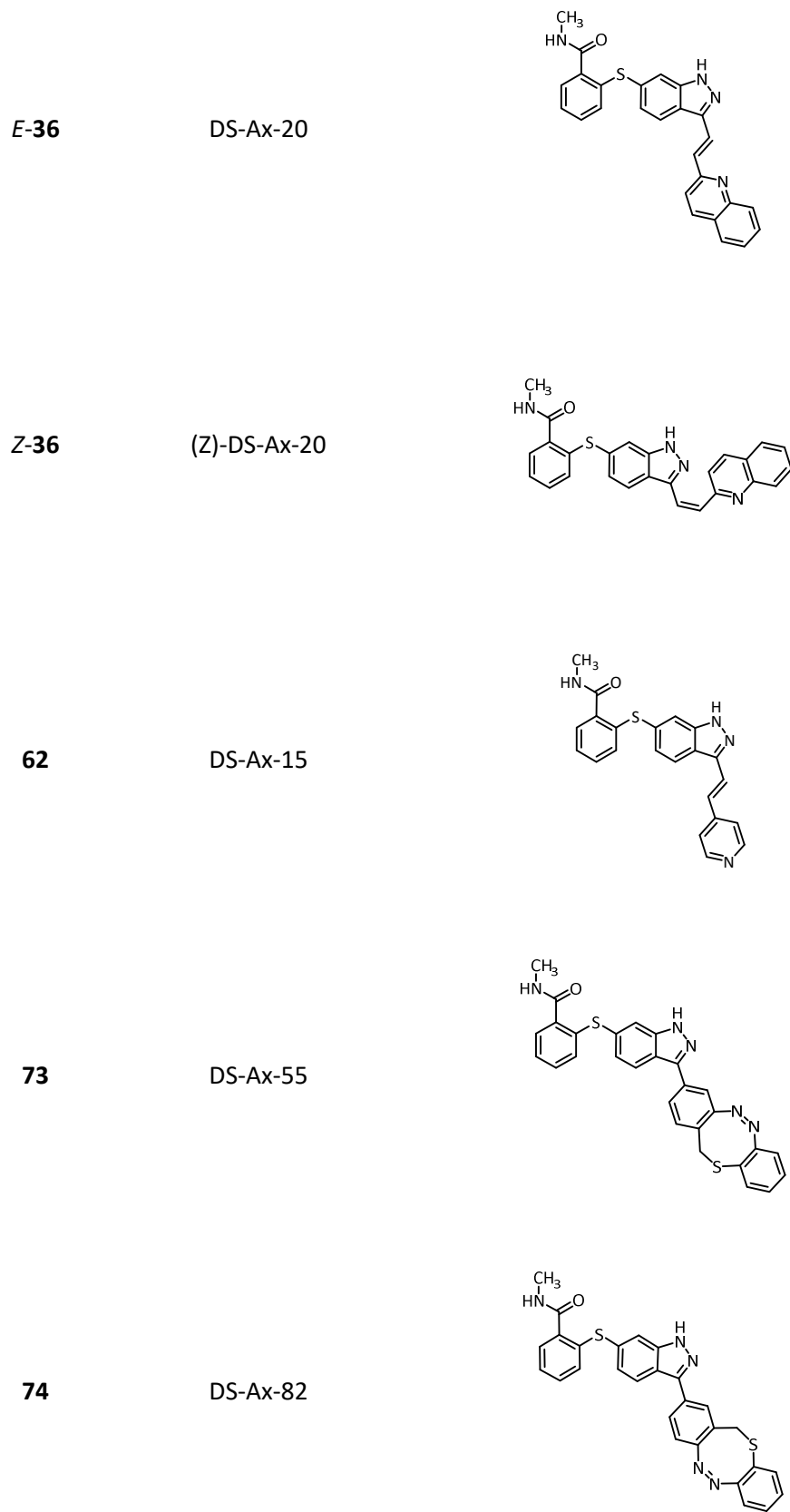
n.a.	nicht verfügbar (engl. <i>not available</i>)
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (engl. <i>nuclear magnetic resonance</i>)
NPOM	6-Nitropiperonyloxymethyl
NVOC	6-Nitroveratryloxycarbonyl
org.	organisch
PDB	Protein-Datenbank (engl. <i>protein data bank</i>)
PDGFR	Platelet-derived Growth Factor Rezeptor
PDT	Photodynamische Therapie
PE	Petrolether
PSS	Photostationäres Gleichgewicht (engl. <i>photostationary state</i>)
Raumtemp.	Raumtemperatur
RET	Rezeptortyrosinkinase RET (engl. <i>rearranged during transfection</i>)
RCC	Nierenzellkarzinom (engl. <i>renal cell carcinoma</i>)
RP	Umkehrphase (engl. <i>reversed phase</i>)
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SEM	2-(Trimethylsilyl)ethoxymethyl
SMKI	Niedermolekularer Kinaseinhibitor (engl. <i>small molecule kinase inhibitor</i>)
SYK	Spleen Tyrosinkinase
T3P	2,4,6-Tripropyl-1,3,5,2,4,6-trioxatriphosphinan-2,4,6-trioxid (Propanphosphonsäureanhydrid)
TEA	Triethylamin

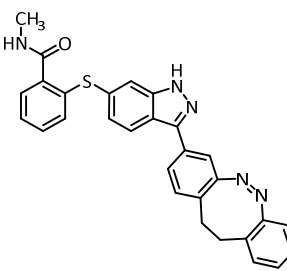
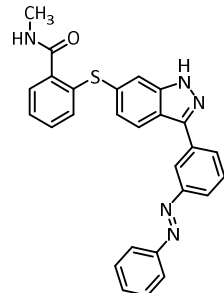
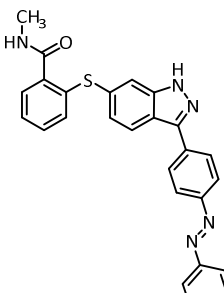
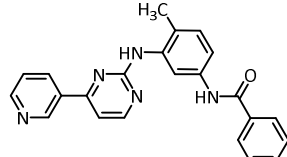
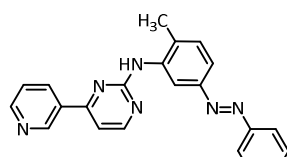
THF	Tetrahydrofuran
THP	Tetrahydropyran
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor
Xantphos	4,5-Bis(diphenylphosphin)-9,9-dimethylxanthen

8. MOLEKÜLVERZEICHNIS

Übersicht wichtiger Verbindungen und Zuordnung der internen Laborjournal-Nummer.

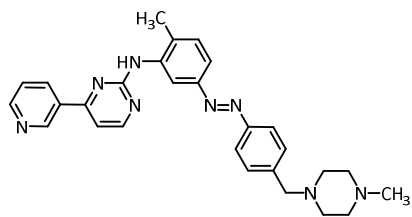
#	Laborcode	Strukturformel
E-30	(E)-Axitinib	
Z-30	(Z)-Axitinib	
31	Axitinibdimer	
33	DS-Ax-25	
35	DS-Ax-17	



75	DS-Ax-86	
77	DS-Ax-47	
78	DS-Ax-62	
79	DS-Im-02	
80	SvH-4	

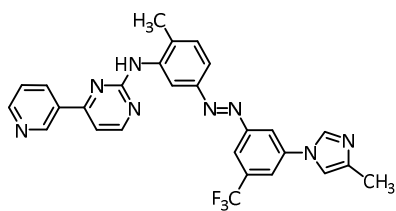
81

SvH-6



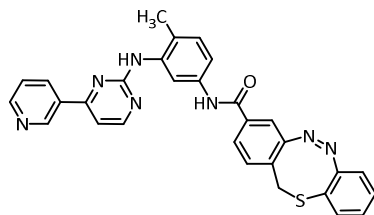
82

DS-Im-01



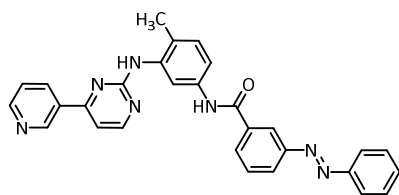
83

DS-Im-03



84

DS-Im-05



EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Christian Peifer im Fachbereich Pharmazeutische und Medizinische Chemie des Pharmazeutischen Institutes der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel im Zeitraum von August 2015 bis Oktober 2019 angefertigt.

Hiermit erkläre ich, Dorian Schmidt, an Eides statt, dass Inhalt und Form dieser Abhandlung, abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer, selbstständig von mir erarbeitet und zusammengestellt wurden. Es wurden keine weiteren Hilfsmittel und Quellen als die angegebenen verwendet. Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) entstanden und hat an keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen. Es handelt sich um meinen ersten Promotionsversuch und mir wurde kein akademischer Grad entzogen.

Kiel, Oktober 2019

(Dorian Schmidt)

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Dorian Schmidt, Theo Rodat, Linda Heintze, Jantje Weber, Rebecca Horbert, Ulrich Girreser, Tim Raeker, Lara Bußmann, Malte Kriegs, Bernd Hartke and Christian Peifer, Axitinib – A Photoswitchable Approved Tyrosine Kinase Inhibitor, *ChemMedChem* **2018**, *13*, 2349-2463.

DANKSAGUNG

Diese Arbeit wäre ohne die gute Zusammenarbeit und großartige Unterstützung von vielen Seiten nicht möglich gewesen. Daher möchte ich mich an dieser Stelle bei zahlreichen Menschen bedanken.

Herrn Prof. Dr. Christian Peifer danke ich für seine Unterstützung, sein großes Vertrauen, sein Verständnis und seine Geduld während der vergangenen Jahre aber auch für alle kreativen und finanziellen Freiheiten in der Forschung. Herrn Prof. Dr. Rainer Herges danke ich für die gute Kooperation sowie die Beratung und vor allem für sein großes Engagement im SFB 677 ohne das dieses Projekt vielleicht nie zustande gekommen wäre.

Ein großes Dankeschön geht an Linda Heintze für die Durchführung unzähliger Kinase- und Zellassays, egal ob bei Tageslicht, im Dunkeln, unter Rotlicht, unter UV-Licht, tagsüber oder nachts. Miriam Schehr und Julia Ewert danke ich für die gute Zusammenarbeit und den wichtigen Erfahrungsaustausch. Bei Theo Rodat möchte ich mich für die durchgeführten PamGene Messungen und diverse Western-Blot-Untersuchungen bedanken. Ebenso gilt mein Dank Dr. Tim Raekers für die Durchführung der quantenmechanischen Rechnungen. Linda Heintze, Theo Rodat und Julia Ewert danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Herrn Dr. Andreas Luxenburger danke ich für die gute Zusammenarbeit sowie viele hilfreiche Ratschläge und wertvolle Tipps. Herrn Dr. Ulrich Girreser danke ich für seine Hilfe bei analytischen Fragen und für seine Mitarbeit an der Axitinib-Publikation. Bei Herrn Dr. Dieter Schollmeyer möchte ich mich für die Röntgenkristallstrukturanalysen bedanken. Bei Melissa Zietz und Martin Schütt möchte ich mich für die zahlreichen Routine-NMR-Messungen aber vielmehr für die vielen Sondermessungen und die erfüllten Extrawünsche bedanken. Sven Wichmann danke ich für die Aufnahme der Massenspektren und für seine Hilfe im Bereich der HPLC-Analytik. Den guten Seelen des Institutes, Susanne Voss und Kalle Bock, danke ich für ihre Hilfe wann immer ich sie gebraucht habe!

Meinen Praktikantinnen und Praktikanten Jantje Weber, Julia Ewert, Arne Brahms, Yassa Bestun, Ahmad Shamshad Hakim, Alice Ferchland und Nathalie Hertrich, meinem Bachelorstudenten Sven Herschel sowie meinen Hiwis Markus Hattwig, Alice Ferchland, Kim Mende, Cornelius Nerlich und Clemens Woitake danke ich für ihren Beitrag und ihre Mithilfe an meinen Forschungsprojekten. Ein großes Dankeschön geht auch an Jan-Ole Springer für seine Hilfe bei den Arbeiten an der Glovebox und der Mikrowelle. Melanie Hammerich, Daniel Langbehn, Widukind Moormann und Pascal Lentès danke ich für diverse Ratschläge und Diskussionen zu Diazocinsynthesen.

Dem gesamten Arbeitskreis Peifer, angefangen bei Rebecca, Eugen, Jakob, Boris, Melanie und Martin sowie bei Alex, Lydia, Theo, Linda, Björn und Melli danke ich für die immer gute Stimmung und die freundschaftliche Atmosphäre. Ich blicke zurück auf viele tolle Erlebnisse wie gemeinsame AK-Dinner, Wine-Tastings, Whisky-Verköstigungen, KiWo-Besuche, Hochzeiten und natürlich unsere Oslo-Reisen.

Andre, Tamara, Lydia, Björn, Martin und Britta danke ich für die unzähligen langen Praktikums- und Klausurtag im zweiten Semester, die ohne euch nur halb so erträglich gewesen wären. Laura sei für ein Jahr royale Herrschaft am Institut gedankt und natürlich für die Notversorgung meiner vernachlässigten Büropflanzen. Meinen Bürokolleginnen und -kollegen Melanie, Jantje, Julia, Alex, Arne und Stefan sowie Britta und Laura im Labor danke ich dafür, dass es im zweiten Stock nie einsam war.

Meinem Buddy Dennis danke ich dafür, dass er sich seit dem ersten Semester mit mir durchs Studium geschlagen hat, dafür, dass er sich jahrelang früh morgens widerwillig ins FiZ geschleppt hat und dafür, dass ich bei den vielen exquisiten SFB Veranstaltungen immer einen *room mate* hatte.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern Hans Walter und Ulrike Schmidt, meinen Brüdern Julian und Roman Schmidt, meinen Großeltern Gerald und Susanne Endres und natürlich Ruth für ihren grenzenlosen Rückhalt, ihre Unterstützung, ihren Rat und ihr Vertrauen in mich. Ohne euch hätte ich es nie so weit geschafft. Danke, dass es euch gibt!

Darüber hinaus danke ich auch der Deutsch-Französischen Hochschule (DFH), der Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh) und der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die Förderung und Teilfinanzierung meiner Konferenzteilnahmen in Cargese, Shanghai und Barcelona.

9. ANHANG

9.1 UV/VIS-spektroskopische Messungen

9.1.1 Zyklenmessungen

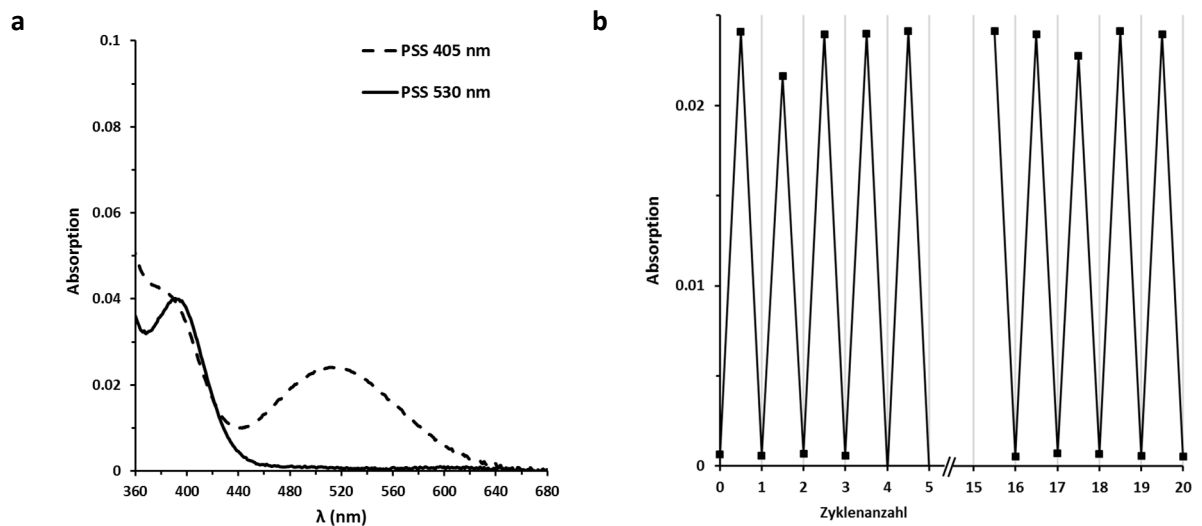


Abb. 9.1 a) UV/VIS-Spektrum von **73** in DMSO nach Bestrahlung mit 405 nm bzw. 530 nm. **b)** Gemessene Absorption bei 515 nm während alternierender Bestrahlung mit 405 nm und 530 nm. Nach 20 Schaltzyklen ist keine Photoermüdung beobachtbar.

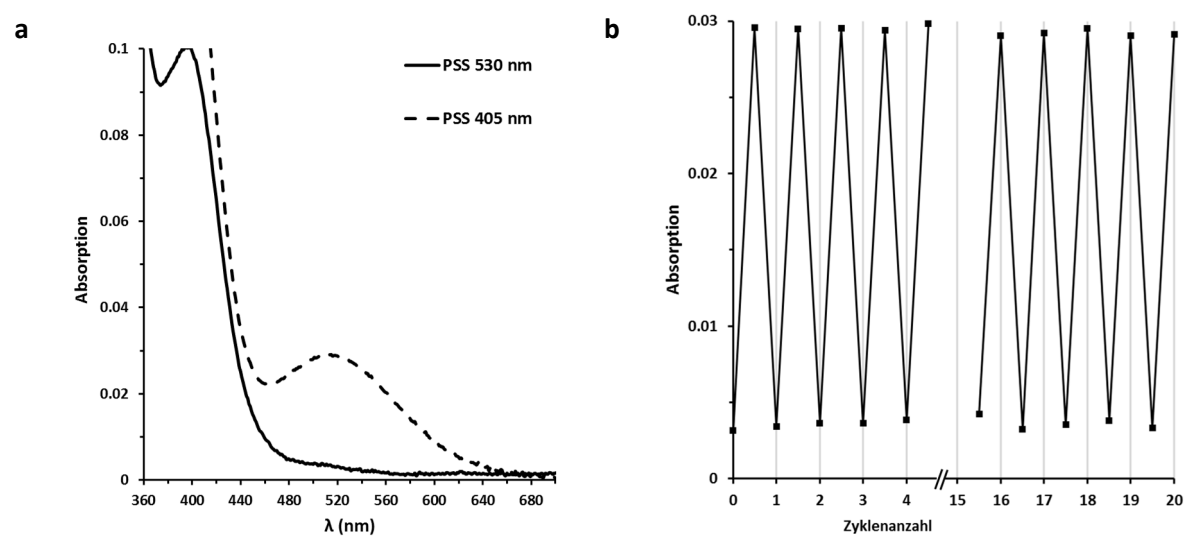


Abb. 9.2 a) UV/VIS-Spektrum von **74** in DMSO nach Bestrahlung mit 405 nm bzw. 530 nm. **b)** Gemessene Absorption bei 516 nm während alternierender Bestrahlung mit 405 nm und 530 nm. Nach 20 Schaltzyklen ist keine Photoermüdung beobachtbar.

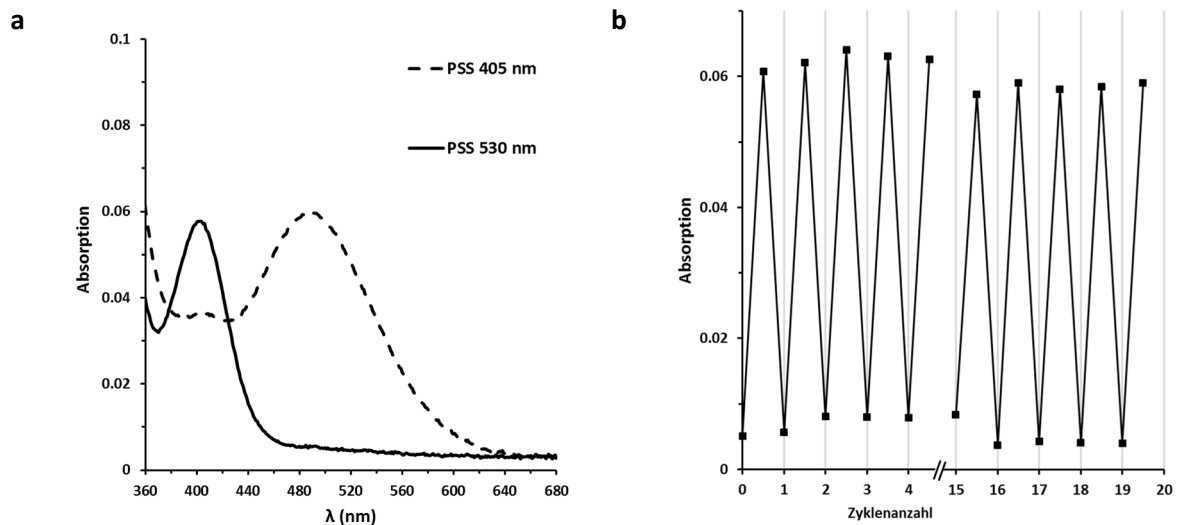


Abb. 9.3 a) UV/VIS-Spektrum von **75** in DMSO nach Bestrahlung mit 405 nm bzw. 530 nm. **b)** Gemessene Absorption bei 489 nm während alternierender Bestrahlung mit 405 nm und 530 nm. Nach 15 Schaltzyklen ist eine leichte Abnahme der Absorption beobachtbar, die auf eine geringe Photoermüdung hindeuten könnte. Allerdings ist kein kontinuierlicher Trend erkennbar.

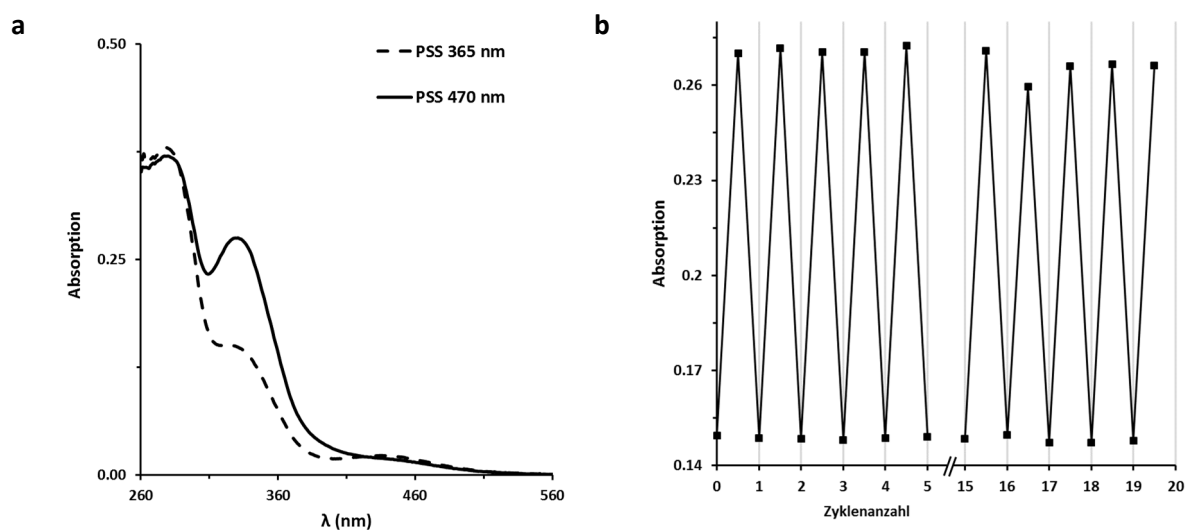


Abb. 9.4 a) UV/VIS-Spektrum von **80** in DMSO nach Bestrahlung mit 365 nm bzw. 470 nm. **b)** Gemessene Absorption bei 330 nm während alternierender Bestrahlung mit 365 nm und 470 nm. Nach 20 Schaltzyklen ist keine Photoermüdung beobachtbar.

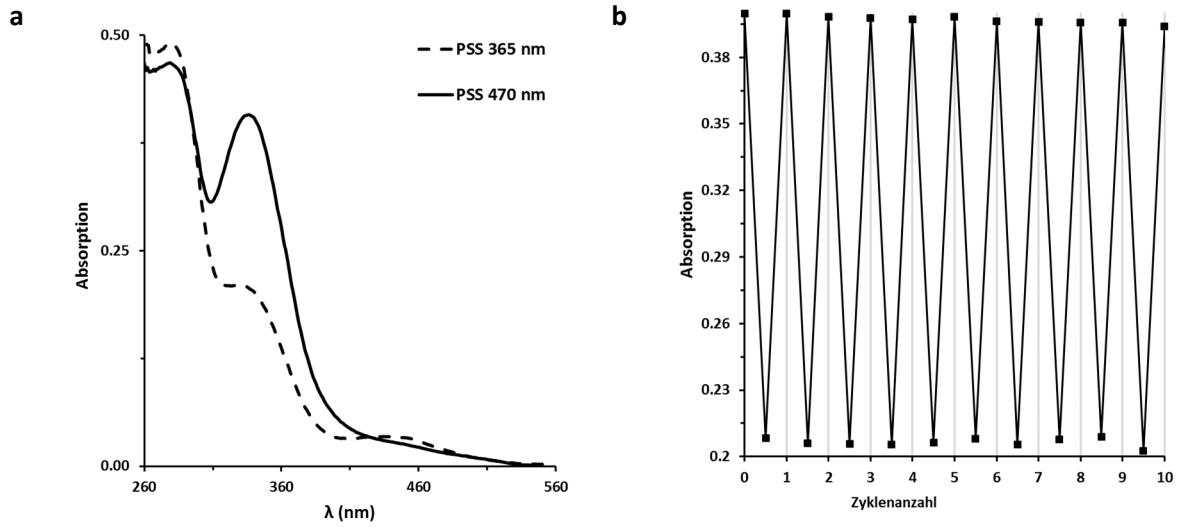


Abb. 9.5 a) UV/VIS-Spektrum von **81** in DMSO nach Bestrahlung mit 365 nm bzw. 470 nm. **b)** Gemessene Absorption bei 330 nm während alternierender Bestrahlung mit 365 nm und 470 nm. Nach 20 Schaltzyklen ist keine Photoermüdung beobachtbar.

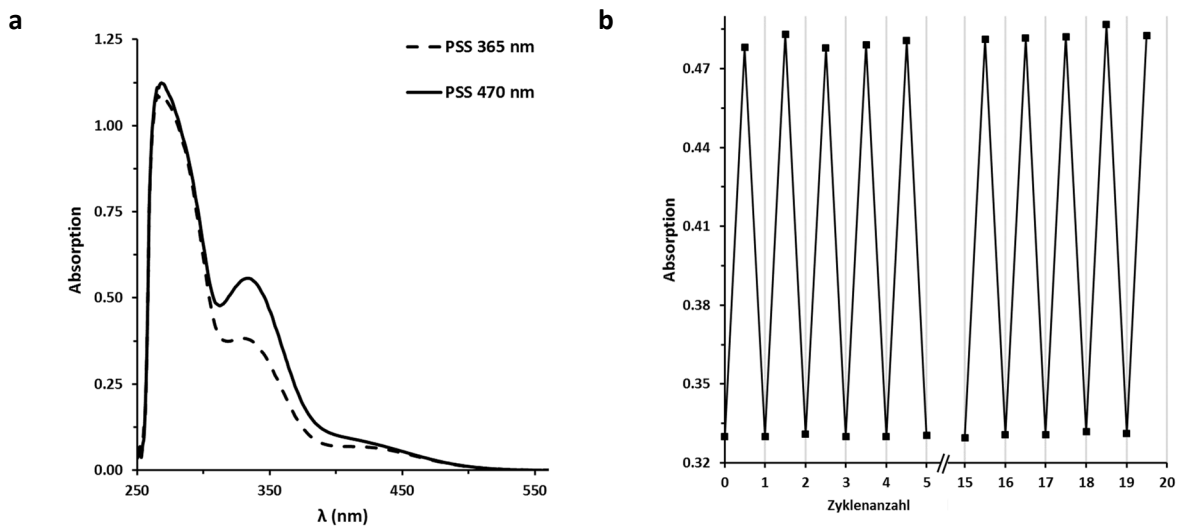


Abb. 9.6 a) UV/VIS-Spektrum von **82** in DMSO nach Bestrahlung mit 365 nm bzw. 470 nm. **b)** Gemessene Absorption bei 330 nm während alternierender Bestrahlung mit 365 nm und 470 nm. Nach 20 Schaltzyklen ist keine Photoermüdung beobachtbar.

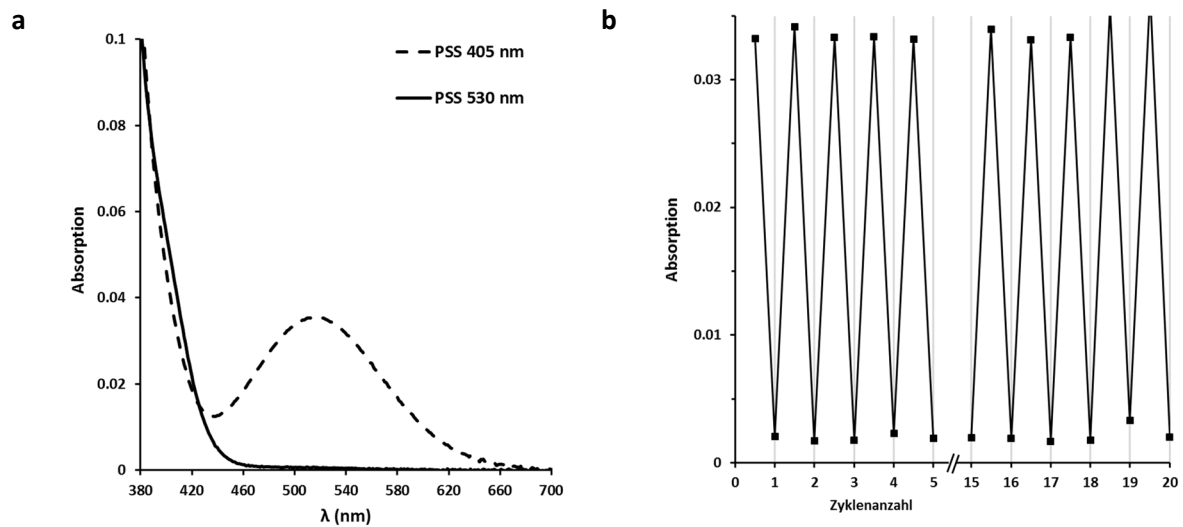


Abb. 9.7 a) UV/VIS-Spektrum von **83** in DMSO nach Bestrahlung mit 405 nm bzw. 530 nm. **b)** Gemessene Absorption bei 515 nm während alternierender Bestrahlung mit 405 nm und 530 nm. Nach 20 Schaltzyklen ist keine Photoermüdung beobachtbar.

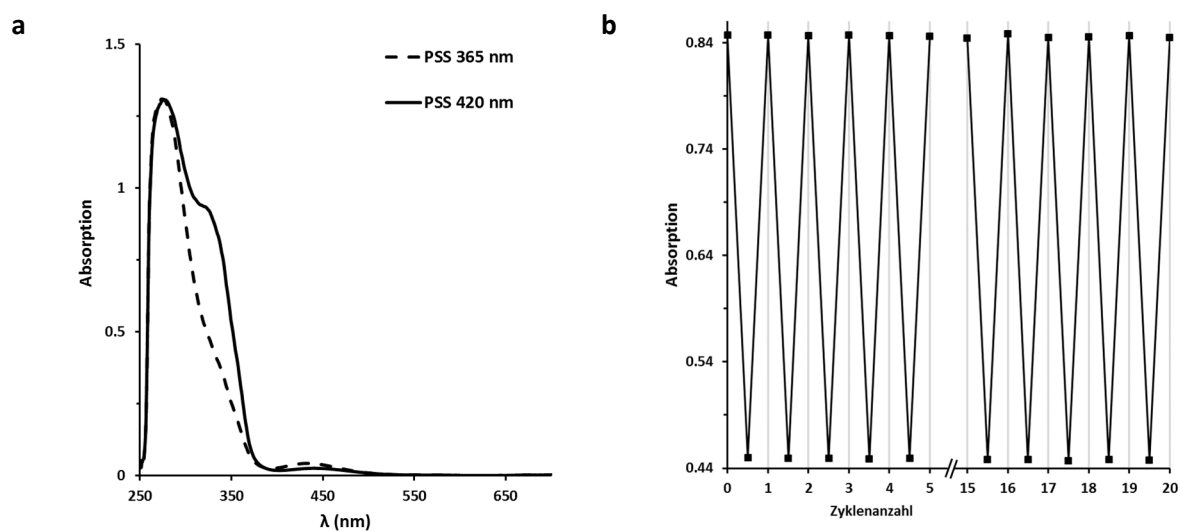


Abb. 9.8 a) UV/VIS-Spektrum von **84** in DMSO nach Bestrahlung mit 365 nm bzw. 420 nm. **b)** Gemessene Absorption bei 323 nm während alternierender Bestrahlung mit 365 nm und 420 nm. Nach 20 Schaltzyklen ist keine Photoermüdung beobachtbar.

9.1.2 Halbwertszeiten der thermischen Rückisomerisierung

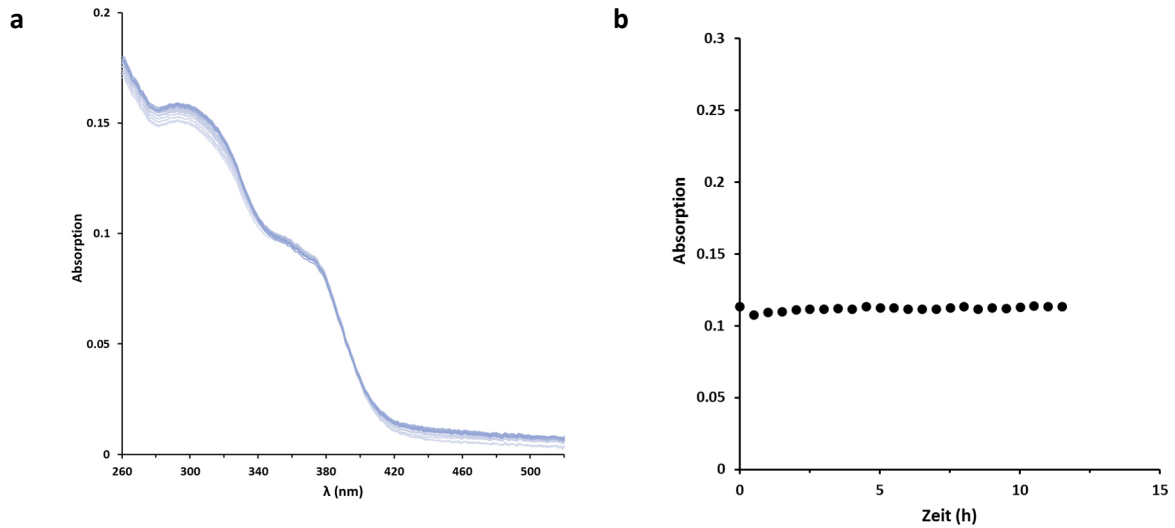


Abb. 9.9 Thermische Stabilität von (Z)-Axitinib (Z-30) in Wasser (5 % DMSO) bei 37 °C. **a)** Gemessene UV/VIS-Spektren im 60 min Intervall. **b)** Gemessene Absorption bei 336 nm. Innerhalb von 12 h ist keine Abnahme der Absorption zu beobachten.

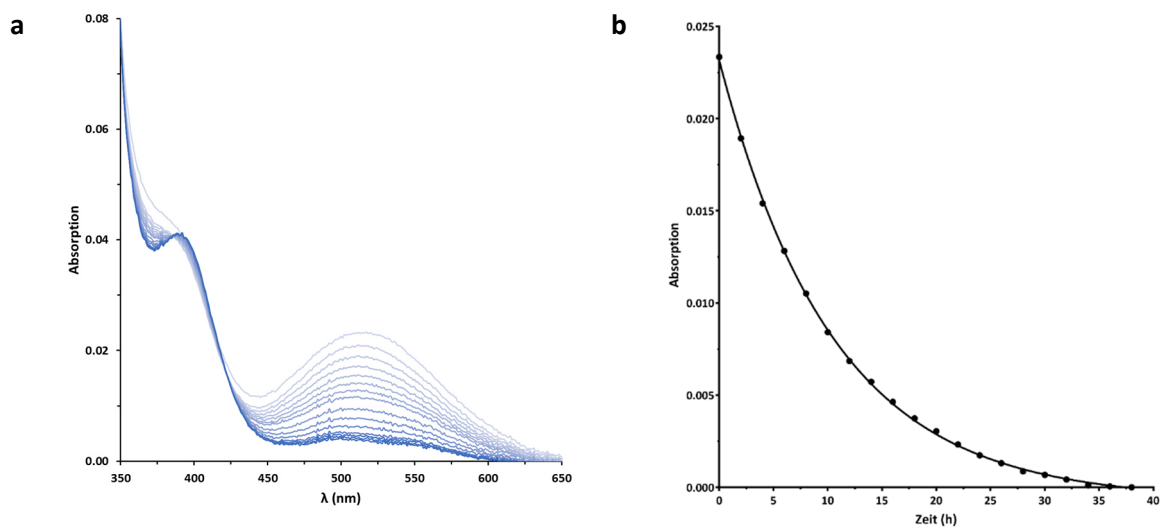


Abb. 9.10 Thermische Rückisomerisierung von **73** in DMSO bei 37 °C nach Bestrahlung mit 405 nm. **a)** Gemessene UV/VIS-Spektren im 60 min Intervall. **b)** Abnahme der Absorption bei 517 nm. Exponentieller Fit: $y = y_0 e^{-kt}$ mit $y_0 = 0.02317$, $k = 0.09514$ und $t_{1/2} = 7.29$ h.

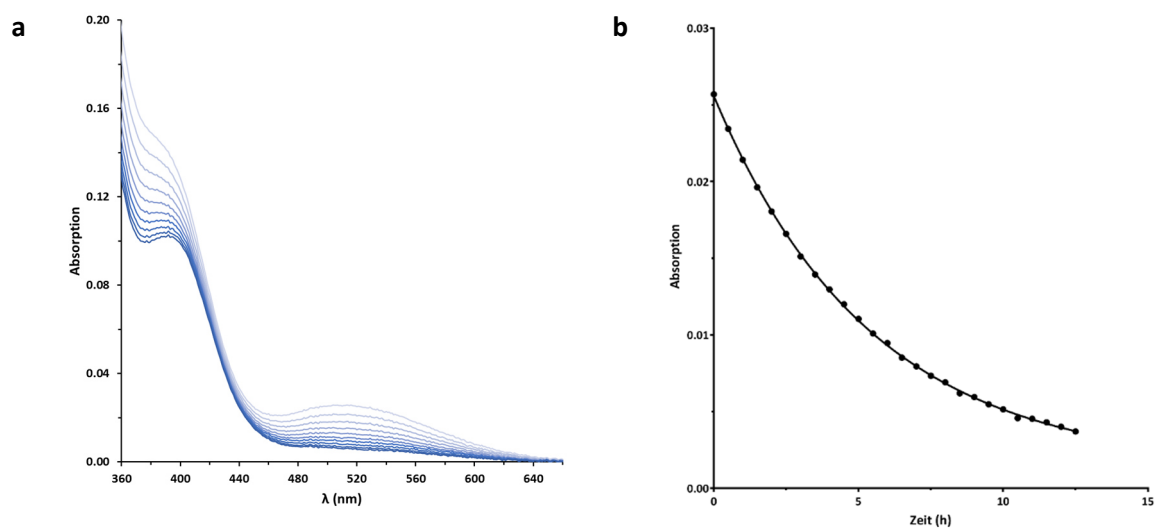


Abb. 9.11 Thermische Rückisomerisierung von **74** in DMSO bei 37 °C nach Bestrahlung mit 405 nm. **a)** Gemessene UV/VIS-Spektren im 60 min Intervall. **b)** Abnahme der Absorption bei 516 nm. Exponentieller Fit: $y = y_0 e^{-kt}$ mit $y_0 = 0.02558$, $k = 0.1853$ und $t_{1/2} = 3.74$ h.

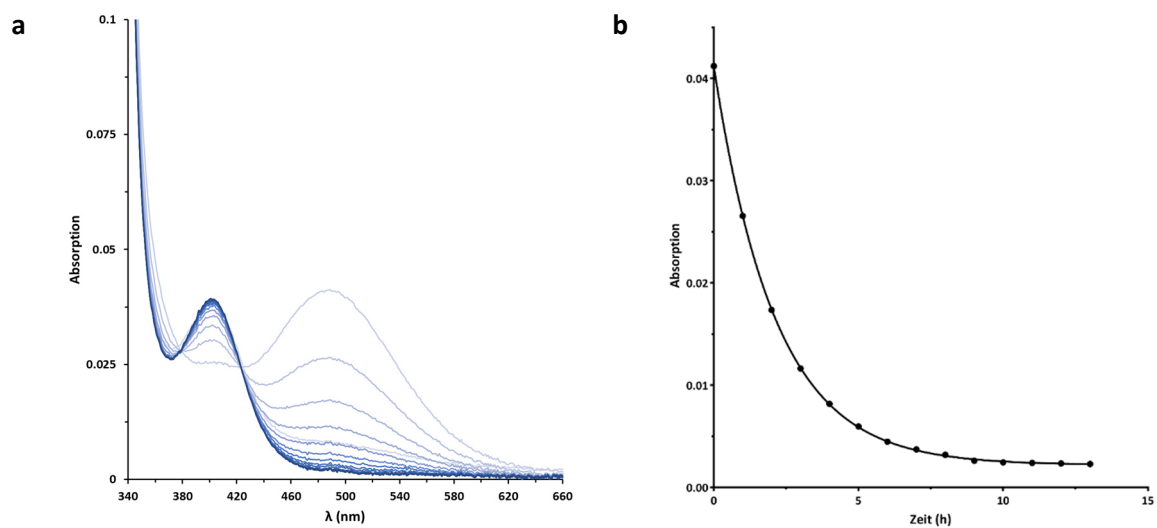


Abb. 9.12 Thermische Rückisomerisierung von **75** in DMSO bei 37 °C nach Bestrahlung mit 405 nm. **a)** Gemessene UV/VIS-Spektren im 60 min Intervall. **b)** Abnahme der Absorption bei 489 nm. Exponentieller Fit: $y = y_0 e^{-kt}$ mit $y_0 = 0.04121$, $k = 0.4711$ und $t_{1/2} = 1.47$ h.

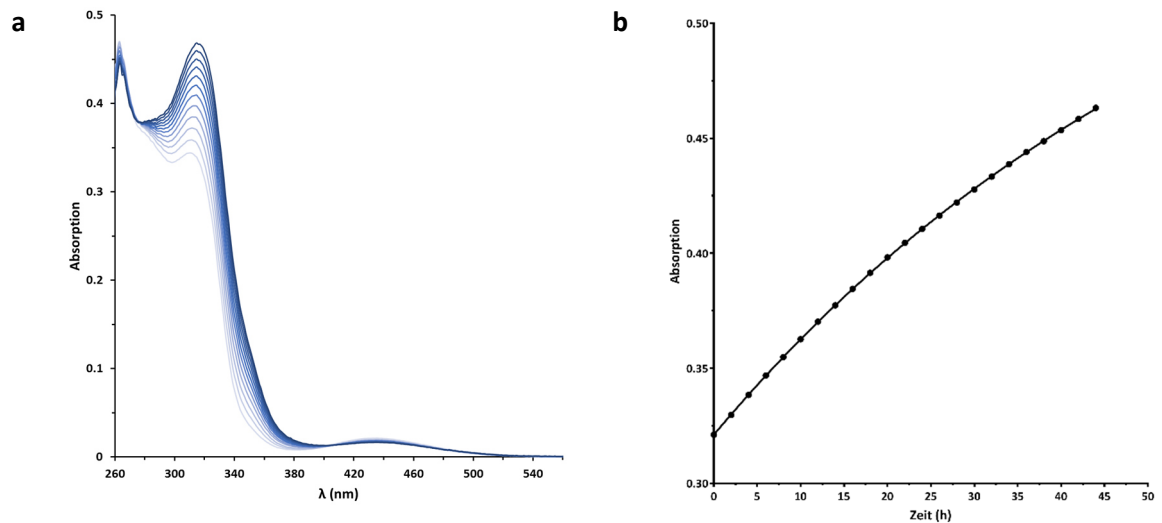


Abb. 9.13 Thermische Rückisomerisierung von **77** in DMSO bei 37 °C nach Bestrahlung mit 365 nm. **a)** Gemessene UV/VIS-Spektren im 240 min Intervall. **b)** Zunahme der Absorption bei 319 nm. Exponentieller Fit: $y = y_0 + (\text{Plateau} - y_0) \cdot (1 - e^{-kt})$ mit $y_0 = 0.3211$, $k = 0.01608$ und $t_{1/2} = 43.1$ h.

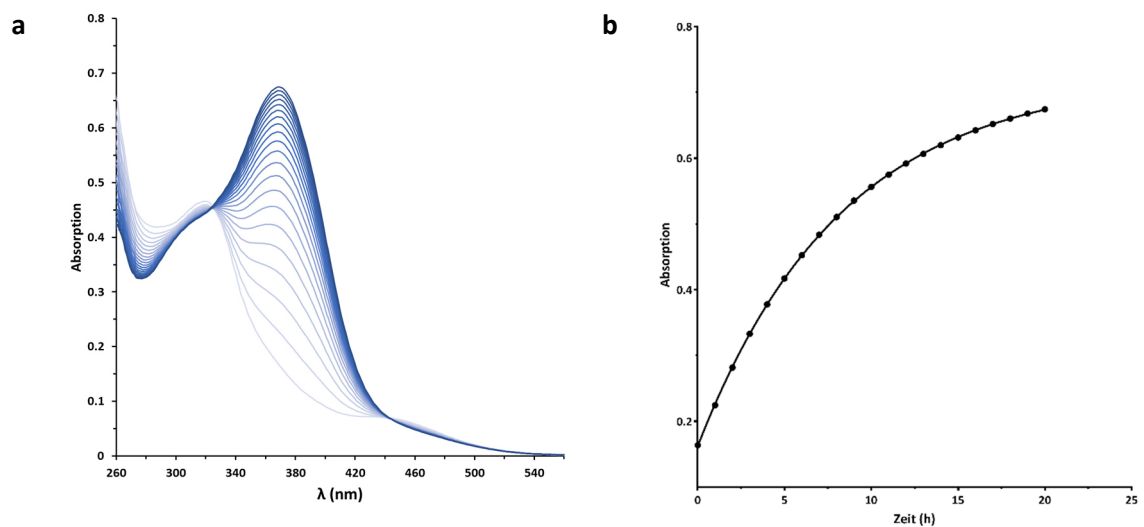


Abb. 9.14 Thermische Rückisomerisierung von **78** in DMSO bei 37 °C nach Bestrahlung mit 385 nm. **a)** Gemessene UV/VIS-Spektren im 60 min Intervall. **b)** Zunahme der Absorption bei 369 nm. Exponentieller Fit: $y = y_0 + (\text{Plateau} - y_0) \cdot (1 - e^{-kt})$ mit $y_0 = 0.1619$, $k = 0.121$ und $t_{1/2} = 5.73$ h.

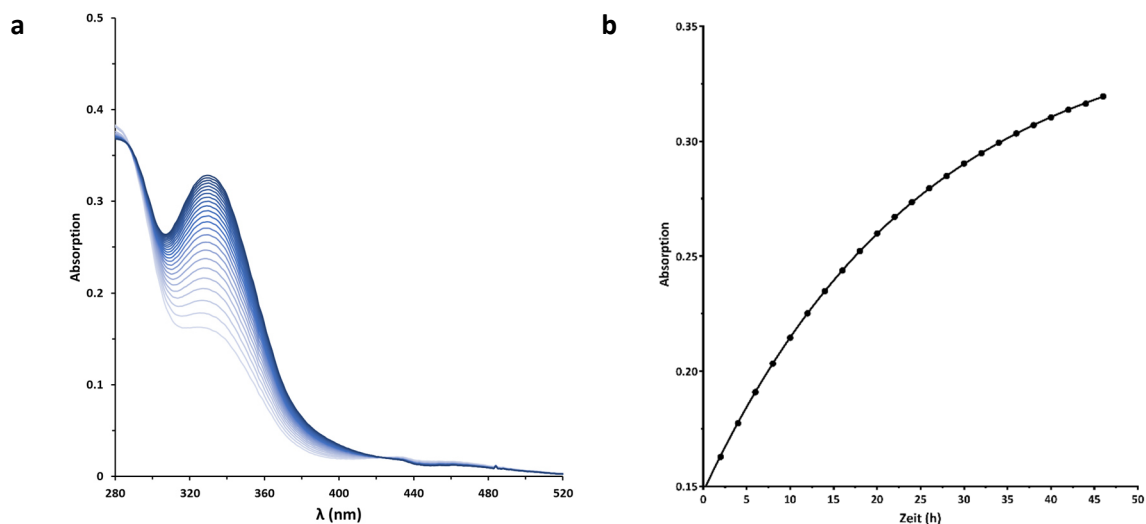


Abb. 9.15 Thermische Rückisomerisierung von **80** in DMSO bei 37 °C nach Bestrahlung mit 365 nm. **a)** Gemessene UV/VIS-Spektren im 60 min Intervall. **b)** Zunahme der Absorption bei 336 nm. Exponentieller Fit: $y = y_0 + (\text{Plateau} - y_0) \cdot (1 - e^{-kt})$ mit $y_0 = 0.1474$, $k = 0.03986$ und $t_{1/2} = 17.4$ h.

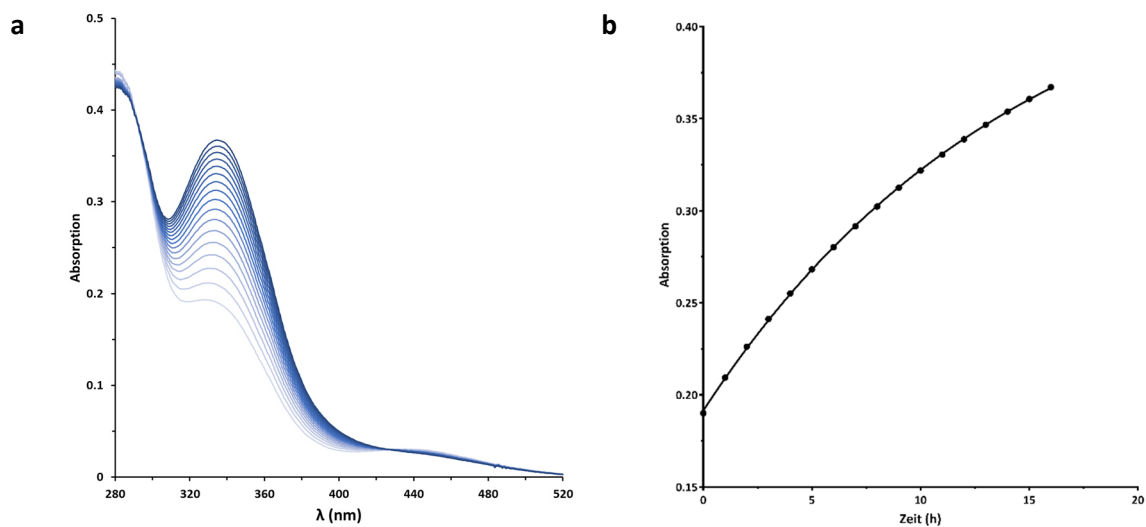


Abb. 9.16 Thermische Rückisomerisierung von **81** in DMSO bei 37 °C nach Bestrahlung mit 365 nm. **a)** Gemessene UV/VIS-Spektren im 60 min Intervall. **b)** Zunahme der Absorption bei 335 nm. Exponentieller Fit: $y = y_0 + (\text{Plateau} - y_0) \cdot (1 - e^{-kt})$ mit $y_0 = 0.1914$, $k = 0.06921$ und $t_{1/2} = 10.0$ h.

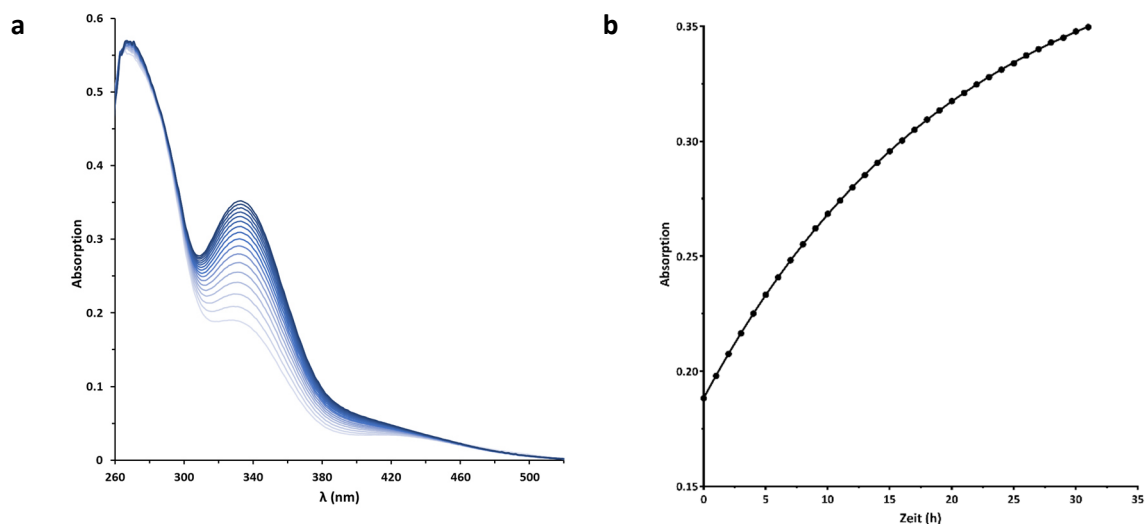


Abb. 9.17 Thermische Rückisomerisierung von **82** in DMSO bei 37 °C nach Bestrahlung mit 365 nm. **a)** Gemessene UV/VIS-Spektren im 120 min Intervall. **b)** Zunahme der Absorption bei 333 nm. Exponentieller Fit: $y = y_0 + (\text{Plateau} - y_0) \cdot (1 - e^{-kt})$ mit $y_0 = 0.1883$, $k = 0.04864$ und $t_{1/2} = 14.3$ h.

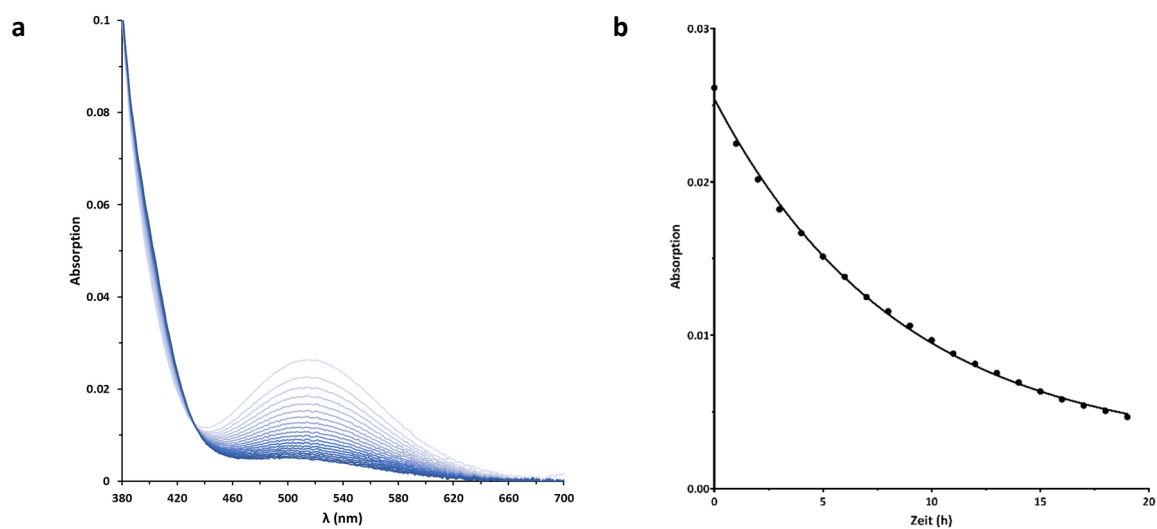


Abb. 9.18 Thermische Rückisomerisierung von **83** in DMSO bei 37 °C nach Bestrahlung mit 405 nm. **a)** Gemessene UV/VIS-Spektren im 60 min Intervall. **b)** Abnahme der Absorption bei 520 nm. Exponentieller Fit: $y = y_0 e^{-kt}$ mit $y_0 = 0.02513$, $k = 0.1141$ und $t_{1/2} = 6.08$ h.

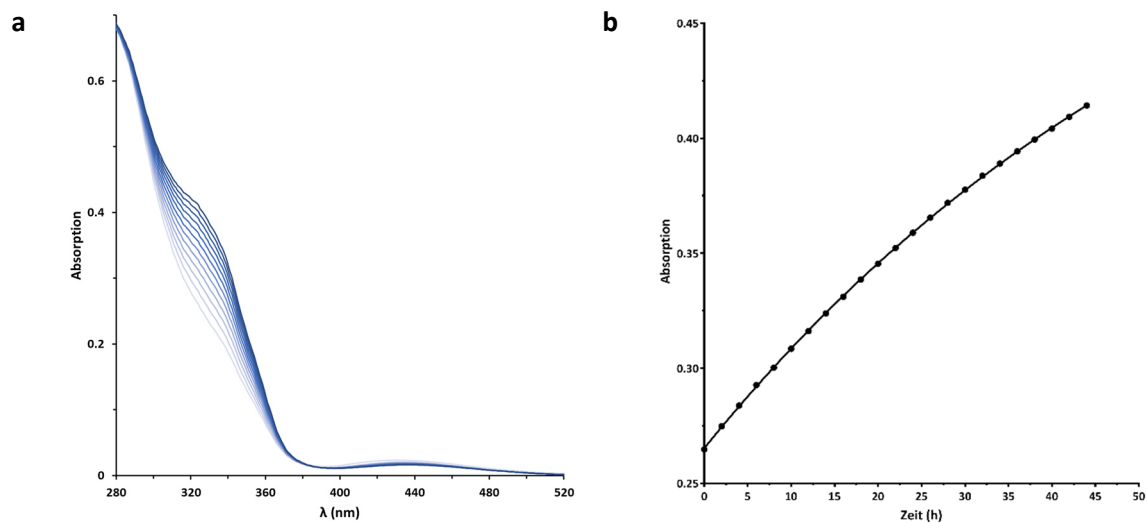


Abb. 9.19 Thermische Rückisomerisierung von **84** in DMSO bei 37 °C nach Bestrahlung mit 365 nm. **a)** Gemessene UV/VIS-Spektren im 60 min Intervall. **b)** Zunahme der Absorption bei 323 nm. Exponentieller Fit: $y = y_0 + (\text{Plateau} - y_0) \cdot (1 - e^{-kt})$ mit $y_0 = 0.2653$, $k = 0.01556$ und $t_{1/2} = 44.6$ h.

9.2 Weitere Ergebnisse biologischer Testungen

9.2.1 VEGFR2 Kinaseassays

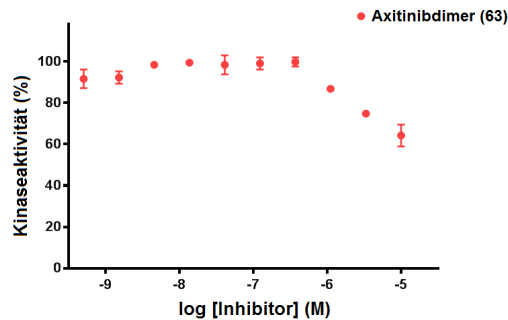


Abb. 9.20. Dosis-Wirkungs-Kurve des isolierten Axitinibdimers **63** in einem *in vitro* VEGFR2-Kinaseassay. Das [2+2]-Cycloadditionsprodukt zeigt keine nennenswerte Inhibition von VEGFR2. Die geringe Abnahme der Kinaseaktivität bei höheren Konzentrationen ist vermutlich auf eine teilweise Präzipitation zurückzuführen, die die Kinasereaktion oder die Signalauslesung stört.^[157]

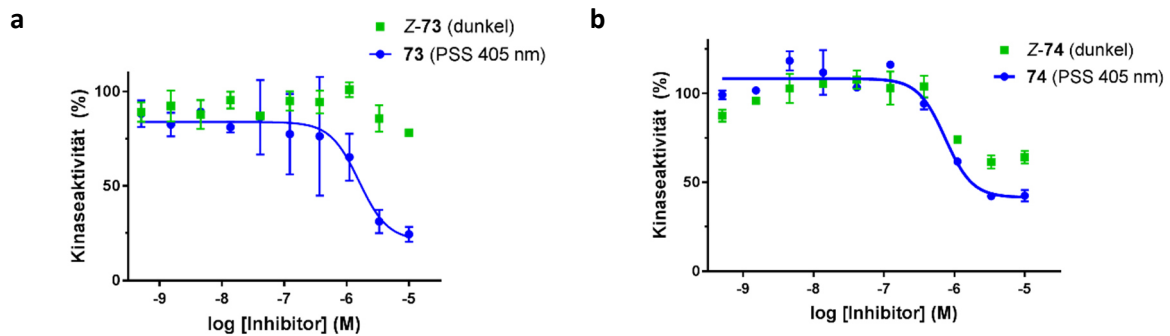


Abb. 9.21 Dosis-Wirkungs-Kurven der diazocin-funktionalisierten Axitinibderivate **73** und **74** in einem *in vitro* VEGFR2-Kinaseassay mit und ohne UV-Bestrahlung bei einer DMSO-Konzentration von 1 %. **a)** **Z-73** im Dunkeln (grün, $IC_{50} > 10000$ nM) sowie nach Bestrahlung mit 405 nm (blau, $IC_{50} = 1583$ nM, Restaktivität (Plateau): 21 %, $R^2 = 0.8$). **b)** **Z-74** im Dunkeln (grün, $IC_{50} > 10000$ nM) sowie nach Bestrahlung mit 405 nm (blau, $IC_{50} = 790$ nM, Restaktivität (Plateau): 42 %, $R^2 = 0.94$). Die Datenpunkte stellen jeweils Mittelwerte aus Doppelbestimmungen dar. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.^[126]

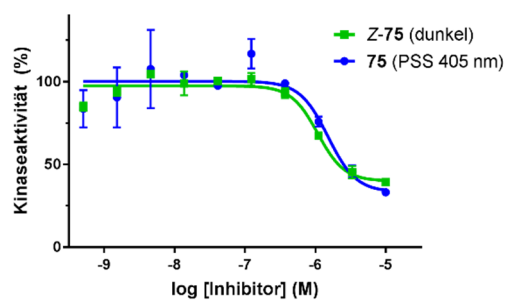


Abb. 9.22 Dosis-Wirkungs-Kurven des diazocinfunktionalisierten Axitinibderivates **75** in einem *in vitro* VEGFR2-Kinaseassay mit und ohne UV-Bestrahlung bei einer **DMSO-Konzentration von 1 %**. **a)** **Z-75** im Dunkeln (grün, IC_{50} = 1083 nM, Restaktivität (Plateau): 40 %, R^2 = 0.94) sowie nach Bestrahlung mit 405 nm (blau, IC_{50} = 1513 nM, Restaktivität (Plateau): 33 %, R^2 = 0.82). Die Datenpunkte stellen jeweils Mittelwerte aus Doppelbestimmungen dar. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.^[126]

9.2.2 ABL1 K_d -Wert Bestimmung (DiscoverX)

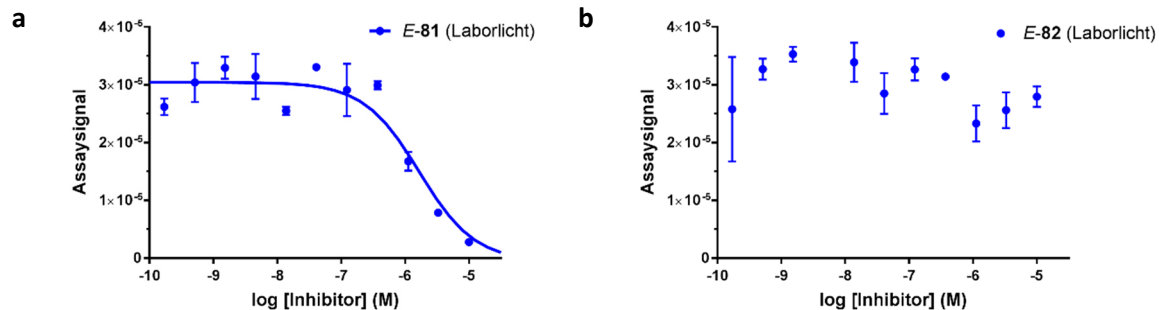


Abb. 9.22 Dosis-Wirkungs-Kurven von Azoimatinib (*E-81*) und Azonilotinib (*E-82*) in einem affinitätsbasierten ABL1-Kinaseassay. Die Messungen wurden von der Firma Eurofins-DiscoverX (San Diego, USA) unter normalen Laborlichtbedingungen durchgeführt. **a)** Für *E-81* wurde ein K_d -Wert von 1600 nM ermittelt. **b)** Für *E-82* konnte kein K_d -Wert ermittelt werden, da dieser größer als 10000 nM ist. Die Datenpunkte stellen jeweils Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen dar. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

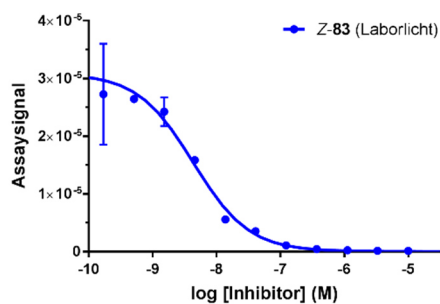


Abb. 9.22 Dosis-Wirkungs-Kurve des diazocinfunktionalisierten Axitinibderivates *Z-83* in einem affinitätsbasierten ABL1-Kinaseassay. Die Messungen wurden von der Firma Eurofins-DiscoverX (San Diego, USA) unter normalen Laborlichtbedingungen durchgeführt. **a)** Für *Z-83* wurde ein K_d -Wert von 3.9 nM ermittelt. Datenpunkte stellen jeweils Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen dar. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

9.2.3 HUVEC-Proliferationsassays

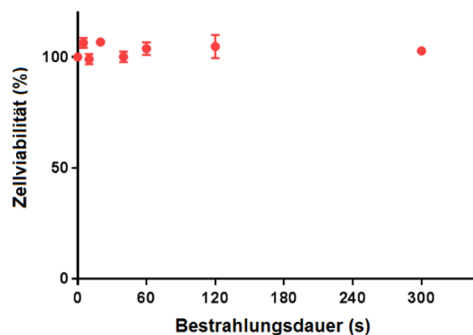


Abb. 9.23. Zellviabilität von HUVECs nach Bestrahlung mit 385 nm. Die Datenpunkte stellen jeweils Mittelwerte aus Vierfachbestimmungen dar. Die Fehlerbalken geben die zugehörige Standardabweichung an.^[157]

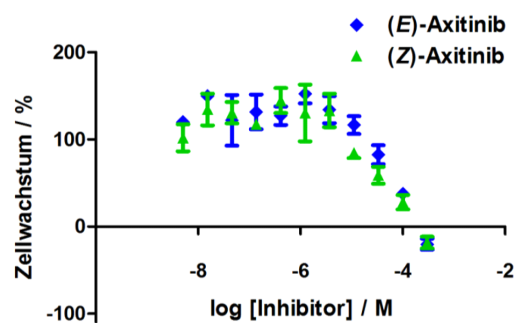


Abb. 9.24 Wechselwirkungen der Inhibitoren (E)-Axitinib (E-30, blau) und (Z)-Axitinib (Z-30, grün) mit dem verwendeten CellTiter-Glo® Assay. Die Inhibitoren wurden nach 72 h Zellproliferation auf die HUVEC Zellen gegeben und unmittelbar anschließend das Zellwachstum mittels CellTiter-Glo® Reagenz ausgelesen. Es zeigt sich, dass die Inhibitoren bis zu einer Konzentration von $10^{-5.5}$ M keinen Einfluss auf das Auslesungssignal haben. In höheren Konzentration wird hingegen aufgrund eines störenden Einflusses der Inhibitoren fälschlicherweise ein niedrigeres Zellwachstum gemessen. Mögliche Ursache könnte eine Präzipitation der Verbindungen sein. Die Datenpunkte sind jeweils Mittelwerte aus Doppelbestimmungen mit deren Standardabweichung als Fehlerbalken.^[157]

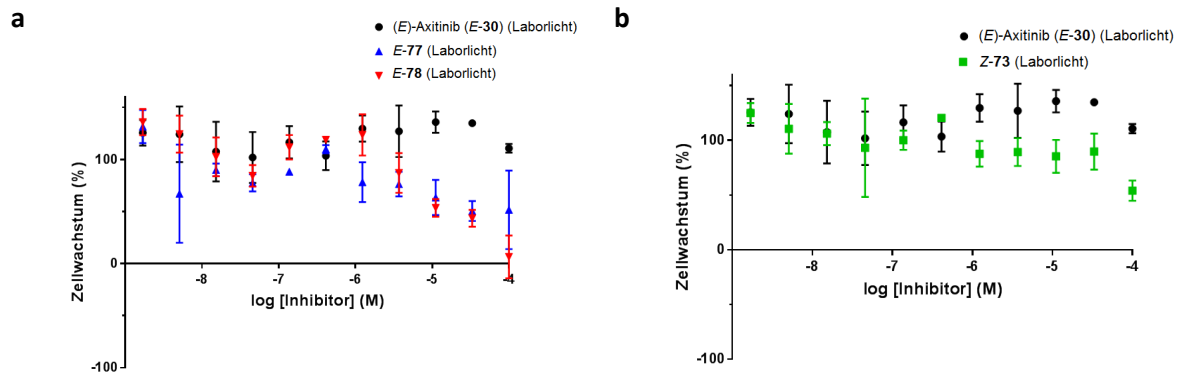


Abb. 9.25 Wechselwirkungen verschiedener Inhibitoren mit dem verwendeten Resazurin-Assay unter normalen Laborlichtbedingungen. Die Inhibitoren wurden nach 72 h Zellproliferation auf die HUVEC Zellen gegeben und unmittelbar anschließend das Zellwachstum mittels Resazurin-Reagenz ausgelesen. **a)** Wechselwirkungen der Inhibitoren *E-77* (blau) und *E-78* (rot) im Vergleich zu (*E*)-Axitinib (*E-30*, schwarz). Bis zu einer Konzentration von $10^{-5.5}$ M haben die Inhibitoren keinen Einfluss auf das Auslesungssignal. In höheren Konzentrationen wird hingegen aufgrund eines störenden Einflusses der Inhibitoren *E-77* (blau) und *E-78* (rot) fälschlicherweise ein zu niedriges Zellwachstum gemessen. Mögliche Ursache könnte eine Präzipitation der Verbindungen sein. **b)** Wechselwirkungen des Inhibitors *Z-73* (grün) im Vergleich zu (*E*)-Axitinib (*E-30*, schwarz). Bis zu einer Konzentration von $10^{-4.5}$ M wird das Auslesungssignal nur gering beeinflusst. In der höchsten Konzentration wird hingegen aufgrund eines störenden Einflusses fälschlicherweise ein zu niedriges Zellwachstum gemessen. Mögliche Ursache könnte auch hier eine Präzipitation der Verbindung sein. Die Datenpunkte sind jeweils Mittelwerte aus Doppelbestimmungen mit deren Standardabweichung als Fehlerbalken.^[126]

9.3 Röntgenkristallstrukturanalysen

9.3.1 3,3'-Bis[(*E*)-phenyldiazenyl]-1,1'-biphenyl (91)

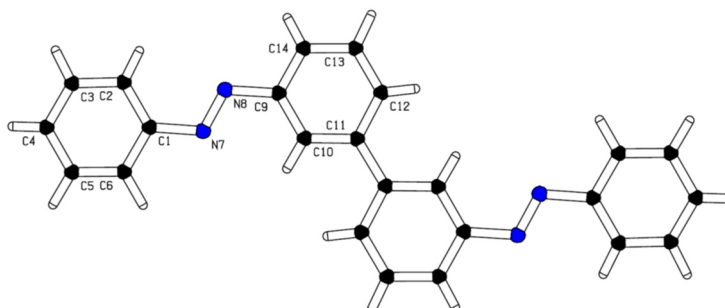


Abb. 9.26 Röntgenkristallstruktur von 3,3'-Bis[(*E*)-phenyldiazenyl]-1,1'-biphenyl (91)

Summenformel	$C_{24}H_{18}N_4$
Molgewicht	$362.42 \text{ g mol}^{-1}$
Raumgruppe	$P 2_1/c$ (monoklin)
Absorption	$\mu = 0.08 \text{ mm}^{-1}$
Kristallgröße	$0.01 \times 0.21 \times 0.34 \text{ mm}^3$ orange Platte
Gitterkonstanten	$a = 16.1938(19) \text{ \AA}$
(berechnet aus	$b = 4.7914(4) \text{ \AA}$ $\beta = 102.217(10)^\circ$
2064 Reflexen mit	$c = 11.6814(14) \text{ \AA}$
$2.6^\circ < \theta < 27.9^\circ$)	$V = 885.85(17) \text{ \AA}^3$ $z = 2$ $F(000) = 380$
Temperatur	-80°C
Dichte	$d_{\text{rön}} = 1.359 \text{ g cm}^{-3}$

Datensammlung

Diffraktometer	STOE IPDS 2T
Strahlung	Mo- K_α Graphitmonochromator
Scan – Typ	ω scans
Scan – Breite	1°
Meßbereich	$2^\circ \leq \theta \leq 28^\circ$ $-21 \leq h \leq 21$ $-6 \leq k \leq 5$ $-15 \leq l \leq 11$
Reflexzahl:	5732
gemessen	2188 ($R_{\text{int}} = 0.1168$)
unabhängige	1113 ($ F /\sigma(F) > 4.0$)
beobachtete	

Datenkorrektur, Strukturlösung und -verfeinerung

Korrekturen	Lorentz- und Polarisationskorrektur.
Lösung	Programm: SHELXT- 2014

Verfeinerung	Programm: SHELXL-2017 (Vollmatrixverfahren). 154 verfeinerte Parameter, gewichtete Verfeinerung: $w=1/[\sigma^2(F_o^2) + (0.0732 * P)^2 + 1.13 * P]$ wobei $P=(\text{Max}(F_o^2, 0) + 2 * F_c^2)/3$. Wasserstoffatome lokalisiert und verfeinert, Nichtwasserstoffatome anisotrop verfeinert.
Diskrepanzfaktor	$wR2 = 0.236$ ($R1 = 0.0838$ für beobachtete Reflexe, 0.1688 für alle Reflexe)
Fitgüte	$S = 1.048$
maximale Änderung der Parameter	0.001 * e.s.d
maximale Peakhöhe in diff. Fouriersynthese	0.28, -0.22 eÅ ⁻³
Bemerkung	Molekül ist zentrosymmetrisch

Endkoordinaten und äquivalente Auslenkungsparameter (Å²)

$$U_{\text{äq}} = (1/3) * \sum_{ij} a_i^* a_j^* \mathbf{a}_i \mathbf{a}_j$$

Atom	X	Y	Z	$U_{\text{äq}}$
C1	0.7993(2)	1.2748(8)	0.5688(3)	0.031(1)
C2	0.8584(2)	1.3343(9)	0.6718(3)	0.035(1)
C3	0.9199(3)	1.5319(9)	0.6680(4)	0.038(1)
C4	0.9240(3)	1.6657(9)	0.5655(4)	0.039(1)
C5	0.8657(3)	1.6064(9)	0.4631(4)	0.039(1)
C6	0.8033(2)	1.4086(8)	0.4650(3)	0.035(1)
C9	0.6641(2)	0.7538(8)	0.6500(3)	0.030(1)
N7	0.7327(2)	1.0736(6)	0.5610(3)	0.0326(10)
N8	0.7313(2)	0.9528(6)	0.6558(3)	0.0325(10)
C10	0.5992(2)	0.7156(8)	0.5513(3)	0.033(1)
C11	0.5355(2)	0.5190(7)	0.5518(3)	0.029(1)
C12	0.5404(2)	0.3600(8)	0.6539(3)	0.034(1)
C13	0.6051(2)	0.3974(8)	0.7512(3)	0.033(1)
C14	0.6671(2)	0.5952(8)	0.7496(3)	0.031(1)

anisotrope Auslenkungsparameter

Atom	U_{11}	U_{22}	U_{33}	U_{12}	U_{13}	U_{23}
C1	0.032(2)	0.025(2)	0.036(2)	0.000(1)	0.008(2)	-0.003(2)
C2	0.042(2)	0.033(2)	0.032(2)	-0.003(2)	0.008(2)	0.001(2)
C3	0.038(2)	0.035(2)	0.039(2)	-0.006(2)	0.002(2)	-0.002(2)
C4	0.036(2)	0.036(2)	0.048(2)	-0.005(2)	0.011(2)	-0.006(2)
C5	0.045(2)	0.030(2)	0.044(2)	0.000(2)	0.015(2)	0.004(2)
C6	0.042(2)	0.030(2)	0.033(2)	0.000(2)	0.007(2)	-0.001(2)
C9	0.032(2)	0.024(2)	0.035(2)	-0.003(1)	0.008(2)	-0.002(2)

N7	0.037(2)	0.025(2)	0.034(2)	-0.001(1)	0.005(1)	-0.003(1)
N8	0.039(2)	0.026(2)	0.031(1)	-0.004(1)	0.007(1)	-0.002(1)
C10	0.039(2)	0.026(2)	0.033(2)	-0.003(2)	0.007(2)	0.001(2)
C11	0.033(2)	0.024(2)	0.031(2)	0.001(1)	0.009(1)	-0.003(1)
C12	0.036(2)	0.029(2)	0.036(2)	-0.005(2)	0.009(2)	-0.001(2)
C13	0.039(2)	0.028(2)	0.031(2)	0.001(2)	0.010(1)	0.005(2)
C14	0.034(2)	0.027(2)	0.032(2)	0.002(2)	0.003(2)	-0.002(2)

Endkoordinaten und isotrope Auslenkungsparameter der Wasserstoffatome(Å²)

Atom	X	Y	Z	U _{iso}
H2	0.854(2)	1.255(9)	0.748(3)	0.042
H3	0.959(3)	1.574(9)	0.734(4)	0.046
H4	0.968(3)	1.79(1)	0.562(3)	0.047
H5	0.872(2)	1.698(9)	0.390(4)	0.046
H6	0.760(2)	1.364(9)	0.385(3)	0.042
H10	0.601(2)	0.826(9)	0.483(3)	0.039
H12	0.498(2)	0.225(9)	0.661(3)	0.040
H13	0.609(2)	0.283(9)	0.823(3)	0.039

9.3.2 (Z)-3-Iod-12H-dibenzo[b,f][1,4,5]thiadiazocin (104a)

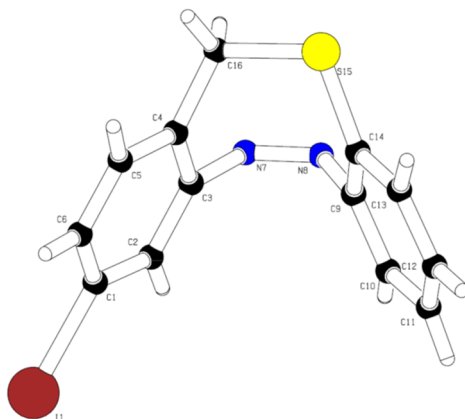


Abb. 9.27 Röntgenkristallstruktur von (Z)-3-Iod-12H-dibenzo[b,f][1,4,5]thiadiazocin (104a)

Summenformel	$C_{13}H_9IN_2S$
Molgewicht	$352.19 \text{ g mol}^{-1}$
Raumgruppe	$P 2_1/c$ (monoklin)
Absorption	$\mu = 2.74 \text{ mm}^{-1}$ Korrektur mit 6 Kristallflächen
Transmission	$T_{\min} = 0.2367, T_{\max} = 0.7623$
Kristallgröße	$0.09 \times 0.31 \times 0.91 \text{ mm}^3$ gelbe Platte
Gitterkonstanten	$a = 11.2250(7) \text{ \AA}$
(berechnet aus	$b = 12.7717(6) \text{ \AA}$ $\beta = 101.052(5)^\circ$
11253 Reflexen mit	$c = 8.7707(6) \text{ \AA}$
$2.44^\circ < \theta < 28.32^\circ$)	$V = 1234.07(13) \text{ \AA}^3$ $z = 4$ $F(000) = 680$
Temperatur	-80°C
Dichte	$d_{\text{rön}} = 1.896 \text{ g cm}^{-3}$

Datensammlung

Diffraktometer	STOE IPDS 2T
Strahlung	Mo-K α Graphitmonochromator
Scan – Typ	ω scans
Scan – Breite	1°
Meßbereich	$2^\circ \leq \theta \leq 28^\circ$ $-14 \leq h \leq 14$ $-14 \leq k \leq 16$ $-11 \leq l \leq 10$
Reflexzahl:	
gemessen	6283
unabhängige	2997 ($R_{\text{int}} = 0.0168$)
beobachtete	2633 ($ F /\sigma(F) > 4.0$)

Datenkorrektur, Strukturlösung und -verfeinerung

Korrekturen	Lorentz- und Polarisationskorrektur.
Lösung	Programm: SHELXT-2014
Verfeinerung	Programm: SHELXL-2017 (Vollmatrixverfahren). 189 verfeinerte Parameter, gewichtete Verfeinerung: $w=1/[\sigma^2(F_o^2) + (0.0326*P)^2+1.63*P]$ wobei $P=(\text{Max}(F_o^2,0)+2*F_c^2)/3$. Wasserstoffatome lokalisiert und isotrop verfeinert, Nichtwasserstoffatome anisotrop verfeinert.
Diskrepanzfaktor	wR2 = 0.065 (R1 = 0.0256 für beobachtete Reflexe, 0.0316 für alle Reflexe)
Fitgüte	S = 1.032
maximale Änderung der Parameter	0.001 * e.s.d
maximale Peakhöhe in diff. Fouriersynthese	0.44, -0.65 eÅ ⁻³

Endkoordinaten und äquivalente Auslenkungsparameter (Å²)

$$U_{\text{äq}} = (1/3) * \sum_{ij} a_i^* a_j^* a_i a_j$$

Atom	X	Y	Z	U _{äq}
I1	0.10358(2)	0.74229(2)	0.60212(2)	0.02966(6)
C1	0.1304(2)	0.6160(2)	0.4621(3)	0.0230(7)
C2	0.2445(2)	0.5703(2)	0.4813(3)	0.0238(7)
C3	0.2599(2)	0.4858(2)	0.3872(3)	0.0226(7)
C4	0.1649(2)	0.4445(2)	0.2787(3)	0.0249(7)
C5	0.0521(2)	0.4932(2)	0.2609(3)	0.0268(7)
C6	0.0340(2)	0.5780(2)	0.3516(3)	0.0266(7)
N7	0.3758(2)	0.4324(2)	0.4118(3)	0.0265(6)
N8	0.4444(2)	0.4457(2)	0.3170(3)	0.0276(6)
C9	0.4109(2)	0.5196(2)	0.1895(3)	0.0232(7)
C10	0.4724(2)	0.6145(2)	0.2040(3)	0.0282(8)
C11	0.4549(3)	0.6836(2)	0.0792(4)	0.0318(8)
C12	0.3779(3)	0.6577(2)	-0.0570(4)	0.0315(8)
C13	0.3155(3)	0.5640(2)	-0.0705(3)	0.0285(8)
C14	0.3305(2)	0.4927(2)	0.0530(3)	0.0239(7)
S15	0.25420(7)	0.37197(6)	0.01863(9)	0.0362(2)
C16	0.1855(3)	0.3483(2)	0.1892(3)	0.0294(8)

anisotrope Auslenkungsparameter

Atom	U ₁₁	U ₂₂	U ₃₃	U ₁₂	U ₁₃	U ₂₃
I1	0.0321(1)	0.0298(1)	0.0280(1)	0.00198(7)	0.00818(7)	-0.00191(7)
C1	0.026(1)	0.023(1)	0.022(1)	-0.0015(9)	0.0084(9)	0.0015(9)
C2	0.023(1)	0.026(1)	0.022(1)	-0.0021(9)	0.0015(9)	0.0021(9)
C3	0.025(1)	0.022(1)	0.020(1)	0.0007(9)	0.0039(9)	0.0047(9)
C4	0.028(1)	0.024(1)	0.023(1)	-0.0050(9)	0.0062(10)	0.0013(9)
C5	0.025(1)	0.030(1)	0.025(1)	-0.0055(10)	0.0036(9)	0.002(1)
C6	0.020(1)	0.032(1)	0.028(1)	0.0009(10)	0.0053(10)	0.004(1)
N7	0.027(1)	0.025(1)	0.025(1)	0.0020(8)	-0.0013(8)	-0.0002(8)
N8	0.026(1)	0.025(1)	0.030(1)	0.0039(8)	0.0008(9)	-0.0015(9)
C9	0.021(1)	0.022(1)	0.027(1)	0.0040(9)	0.0056(9)	-0.0009(9)
C10	0.022(1)	0.028(1)	0.034(1)	-0.0005(10)	0.003(1)	-0.005(1)
C11	0.031(1)	0.023(1)	0.044(2)	-0.002(1)	0.013(1)	0.000(1)
C12	0.033(1)	0.029(1)	0.034(1)	0.004(1)	0.012(1)	0.007(1)
C13	0.029(1)	0.034(1)	0.024(1)	0.000(1)	0.007(1)	-0.002(1)
C14	0.023(1)	0.024(1)	0.026(1)	-0.0005(9)	0.0082(9)	-0.0037(10)
S15	0.0475(4)	0.0307(4)	0.0335(4)	-0.0130(3)	0.0157(3)	-0.0134(3)
C16	0.034(1)	0.024(1)	0.031(1)	-0.006(1)	0.005(1)	-0.003(1)

Endkoordinaten und isotrope Auslenkungsparameter der Wasserstoffatome(Å²)

Atom	X	Y	Z	U _{iso}
H2	0.311(3)	0.594(3)	0.554(4)	0.030(8)
H5	-0.010(3)	0.467(3)	0.182(4)	0.039(9)
H6	-0.038(3)	0.612(3)	0.338(4)	0.044(10)
H10	0.524(3)	0.630(2)	0.293(4)	0.026(8)
H11	0.487(4)	0.748(3)	0.087(5)	0.04(1)
H12	0.367(3)	0.704(3)	-0.138(4)	0.024(7)
H13	0.266(3)	0.545(3)	-0.167(4)	0.040(9)
H16A	0.109(3)	0.318(3)	0.144(4)	0.034(6)
H16B	0.238(3)	0.299(3)	0.253(4)	0.034(6)