

Chancen und Grenzen photopharmakologischer Konzepte für Kinaseinhibitoren



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Theo Rodat

Kiel 2020

Dekan: Prof. Dr. Frank Kempken

Erster Gutachter: Prof. Dr. Christian Peifer

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Uwe Knippschild

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Oktober 2020

Zum Druck genehmigt: 27. Oktober 2020

Titelbild: Nahaufnahme des PamChips mit Peptid-Spots zur Anwendung im Kinom-Profilings

Meiner Familie

Grafische Kurzzusammenfassung

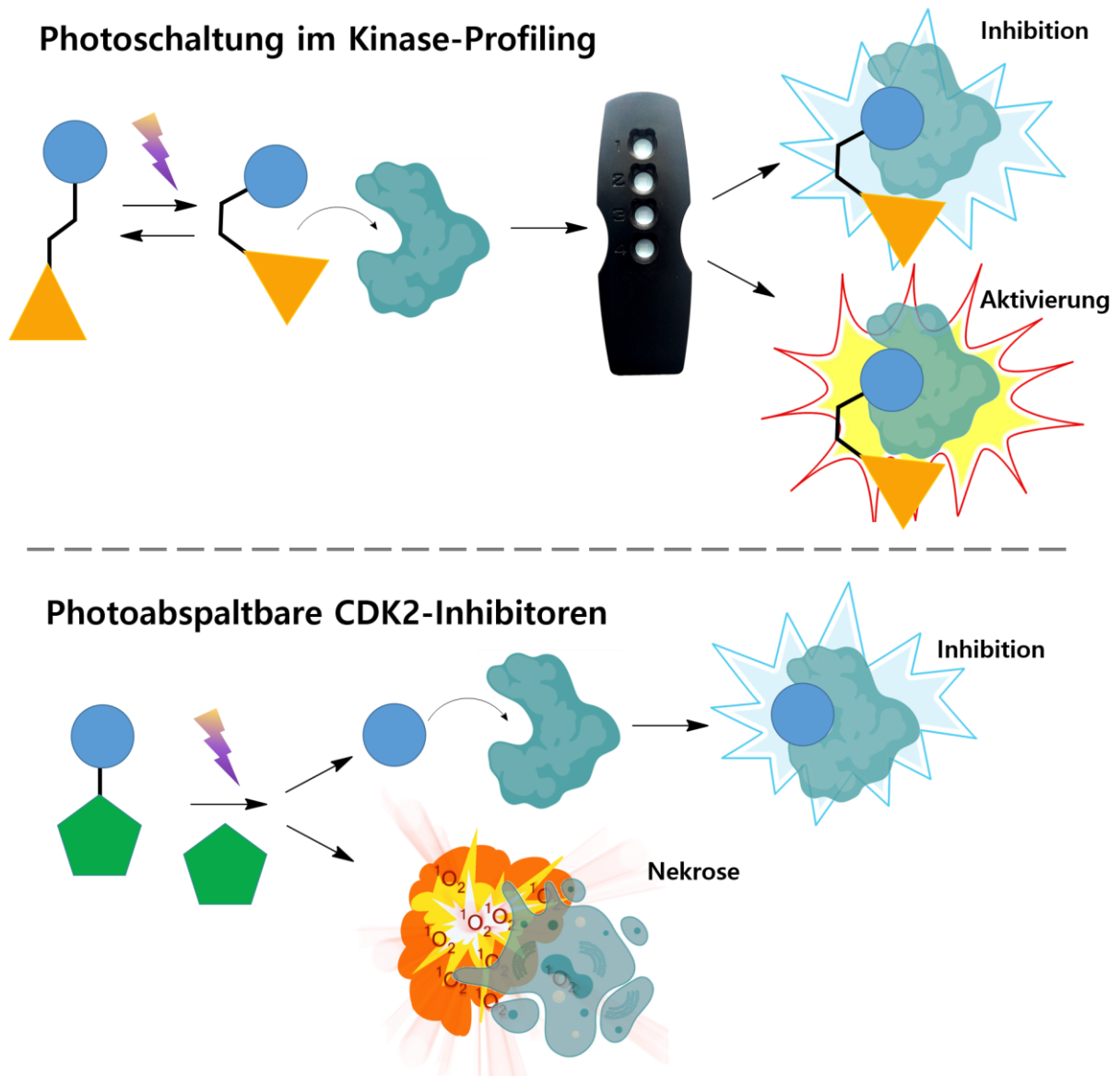


Abbildung I. Chancen und Grenzen photopharmakologischer Konzepte für Kinaseinhibitoren.

Photoschaltung: Durch eine lichtabhängige Konfigurationsänderung konnten Effekte, wie Inhibition und Aktivierung im Kinom-Aktivitäts-Profilung nachgewiesen werden. **Photoabspaltung:** Eine Bestrahlung der untersuchten Verbindungen führt entweder zu einer Freisetzung und somit zu einer Kinasehemmung oder zu einer Singulett-Sauerstoff-vermittelten Zellnekrose.

Kurzzusammenfassung

Die Photopharmakologie bietet die Möglichkeit, Wirkungen von Arzneistoffen räumlich und zeitlich mit Licht zu steuern. Bisher kann auf verschiedene Konzepte wie Photoschaltung, Photoabspaltung oder die photodynamische Therapie zurückgegriffen werden, um photoresponsive Arzneistoffe zu entwickeln. Kinasen eignen sich sehr gut als Zielprotein in diesem Zusammenhang, da sie eine Schlüsselrolle in der menschlichen Zelle übernehmen und so z.B. die Regulierung von Wachstum und Differenzierung steuern. Eine unkontrollierte Überaktivierung von Kinasen kann zu verschiedenen Krebsarten führen, welche mit Kinaseinhibitoren wiederum therapiert werden können. Die Kombination von Kinaseinhibitoren mit photopharmakologischen Konzepten (vorrangig Photoschaltung und Photoabspaltung) könnte die Wirksamkeit der konventionellen Behandlung erhöhen, bei gleichzeitiger Reduzierung systemischer Nebenwirkungen. Diese Arbeit zielt auf eine Weiterentwicklung bestehender Photopharmakologiekonzepte für Kinaseinhibitoren ab, um die mögliche Anwendung in der Klinik voranzutreiben. Außerdem wurden die entwickelten photoschaltbaren Kinaseinhibitoren in einem Kinom-Aktivitäts-Profilings untersucht, um den Einfluss der Wirkstoffe auf das gesamte Kinasenetzwerk zu ermitteln. Die synthetisierten photoresponsiven Inhibitoren wurden photochemisch charakterisiert und anschließend in Form von Kinaseassays, Kinom-Profilings und Zellproliferationsassays biologisch getestet.

Im ersten Teil der Arbeit wurden mehrere Photoschalter biologisch evaluiert. Für den zugelassenen Kinaseinhibitor Axitinib konnte eine isomerenabhängige biologische Wirkung (auf VEGFR2, auf HUVEC und im Kinom-Profilings) gezeigt werden. Jedoch ließ sich das Stilben nicht reversibel in wässrigen Medien schalten. Die darauffolgende Funktionalisierung mit Diazocinen vereinte optimierte photochemische Parameter mit einem ausreichenden pharmakologischen Wirkunterschied. Die eingeschränkte Wirksamkeit eines photoschaltbaren BRAF^{V600E}-Inhibitors durch Kinomüberaktivierung konnte durch das Kinom-Profilings erklärt werden. Während ein Kinom-Profilings der Chronoschalter nicht gelang, konnte ein deutlicher Wirkunterschied im Profiling der RET-Stilben-Schalter festgestellt werden. Die im zweiten Teil untersuchten Photoschutzgruppen DMNB und BODIPY für CDK2-Inhibitoren führten unter Bestrahlung entweder zur erwarteten Abspaltung und CDK2-Hemmung (DMNB) oder zu erheblichen photodynamischen Effekten (BODIPY).

Die untersuchten Verbindungen leisten einen wichtigen Beitrag für die (Weiter-)Entwicklung photoresponsiver Kinaseinhibitoren. Weiterführende Studien im Tiermaßstab erscheinen so wahrscheinlicher (Photoschalter) oder sollten als nächstes durchgeführt werden (Photoabspaltung). Weiterhin wird eine Ergänzung der biologischen Testung von Kinaseinhibitoren um das Kinom-Profilings als sinnvoll erachtet, da es das Portfolio in der Testung sinnvoll erweitert.

Graphical Abstract

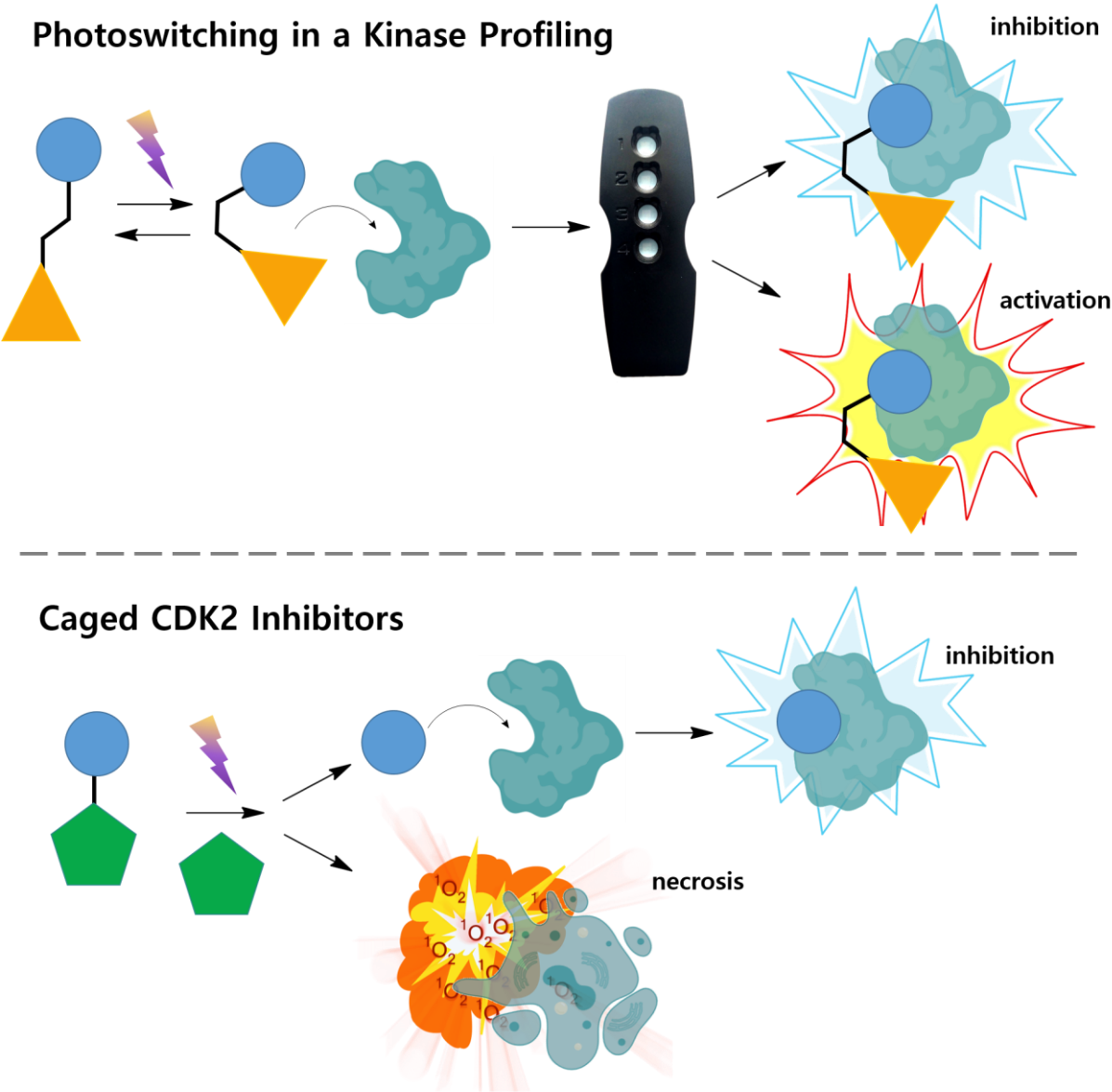


Figure I. Prospects and limitations of photopharmacological concepts for kinase inhibitors.
Photoswitching: By a light-dependent configuration change, effects such as kinase inhibition and activation could be demonstrated in kinome activity profiling. **Caged CDK2 inhibitors:** Irradiation of the investigated compounds leads either to a release and thus to kinase inhibition or to singlet oxygen-mediated cell necrosis.

Abstract

Photopharmacology offers a spatiotemporal control of the effects of drugs using light. Up to now, various concepts such as photoswitching, photocleavage or photodynamic therapy can be used to develop photoresponsive drugs. Kinases are very well suited as target proteins for the following applications, as they fulfil a key role in the human cell and therefore control cell functions, e.g., the regulation of growth and differentiation. Uncontrolled overactivation of kinases can lead to various types of cancer, which can be treated with kinase inhibitors. Combining kinase inhibitors with photopharmacological concepts (preferential photoswitching and photocleavage) could increase the efficacy of treatment while reducing systemic side effects. This work aims at the advancement of existing photopharmacological concepts for kinase inhibitors to improve their potential clinical application. In addition, the developed photoswitchable kinase inhibitors have been investigated in a kinome activity profiling to determine the influence of the drugs on the entire kinase network. The synthesized photoresponsive inhibitors were photochemically characterized and subsequently biologically tested using kinase assays, kinome profiling and cell proliferation assays.

In the first part of the work, several photoswitches were biologically evaluated. For the approved kinase inhibitor axitinib, an isomer-dependent biological effect (on VEGFR2, on HUVEC and in kinome profiling) could be shown. However, stilbenes could not be reversibly switched in aqueous media. The subsequent functionalization with diazocines combined good photochemical parameters with a sufficient difference in effect. The limited effectiveness of the photoswitchable BRAFV600E inhibitor due to kinome overactivation could be explained by kinome profiling. While kinome profiling of the chronoswitches was not successful, a clear difference in effectiveness in the profiling of the RET stilbene switches was observed. In the second part, the photoremovable protecting groups DMNB and BODIPY for CDK2 inhibitors were investigated. Under irradiation, caged inhibitors led either to the expected cleavage and CDK2 inhibition (DMNB) or to significant photodynamic effects (BODIPY).

The investigated compounds contribute significantly to the (further) development of photoresponsive kinase inhibitors. Further studies in animal scale thus seem more likely (photocleavage) or should be carried out next (photoswitching). Furthermore, the addition of kinome profiling to the biological testing of kinase inhibitors is considered useful as it expands the testing portfolio.

Populärwissenschaftliche Zusammenfassung

In nahezu allen wichtigen Prozessen der Zelle sind Kinasen beteiligt. Kinasen sind Enzyme, die für ein gesundes Zellwachstum und ein sicheres Ableben der Zelle sorgen, also die Regulation der menschlichen Zellen steuern. Sind diese Funktionen gestört, können diverse Krankheiten entstehen, vor allem jedoch Krebs. Mittlerweile kann Krebs durch vielfältige Therapien behandelt werden, darunter Chemotherapie mit Kinasehemmern. Da die aktuellen Therapieoptionen noch nicht alle Krebsarten heilen können und durchaus schwere Nebenwirkungen haben, gibt es verschiedene Konzepte, mit denen die Therapie zukünftig verbessert werden soll. Mit Hilfe der sogenannten Photopharmakologie (Licht und Wirkstoffe) sollen unwirksame Medikamente verabreicht werden und anschließend nur mit Hilfe von Licht lokal aktiviert werden. Dazu eignen sich chemische Substanzen, die einmalig mit Licht aktiviert werden können, aber auch Wirkstoffe, die an- und ausschaltbar sind, je nachdem mit welcher Lichtfarbe bestrahlt wird. Auch wenn diese Arbeit nicht das fertige, durch Licht aktivierbare Medikament hervorgebracht hat, so hat sie doch einen wesentlichen Teil zu deren Entwicklung und dem wissenschaftlichen Verständnis beigetragen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Proteinkinasen	1
1.2	Kinaseinhibitoren	5
1.2.1	Strukturelle Einteilung	5
1.2.2	Resistenzmechanismen	8
1.3	Photopharmakologie	10
1.3.1	Photoschaltung	13
1.3.2	Photoabspaltung	18
1.3.3	Photodynamische Therapie	23
2	Zielstellung	25
2.1	Weiterentwicklung bestehender Photopharmakologiekonzepte	25
2.2	Etablierung eines Kinaseprofilings in der Wirkstoffentwicklung	26
3	Ergebnisse und Diskussion	29
3.1	Photoschaltbare Kinaseinhibitoren im Kinaseprofiling	29
3.1.1	VEGFR2-Inhibitoren	29
3.1.2	BRAF ^{V600E} -Inhibitoren	57
3.1.3	CK1-Modulatoren zur Beeinflussung des circadianen Rhythmus	74
3.1.4	RET-DFG- <i>out</i> -Inhibitoren	87
3.2	Photoabspaltbare CDK2-Inhibitoren	99
3.2.1	DMNB-geschützter Inhibitor	100
3.2.2	BODIPY-geschützter Inhibitor	104
4	Zusammenfassung	113
4.1	Photopharmakologische Konzepte	114
4.2	Kinom-Profilung in der Entwicklung von Kinaseinhibitoren	117

5	Ausblick	119
6	Experimenteller Teil	123
6.1	Molecular Modeling	123
6.2	Organische Chemie	124
6.3	Analytische Chemie	125
6.3.1	Lichtquellen	125
6.3.2	HPLC	127
6.3.3	Massenspektrometrie	128
6.3.4	NMR-Spektroskopie	128
6.3.5	ESR-Spektroskopie	128
6.3.6	Singulett-Sauerstoff Assay	128
6.3.7	UV/Vis-Spektroskopie	129
6.3.8	Fluoreszenzspektroskopie	129
6.3.9	Abspaltungsexperimente	129
6.3.10	Stabilitätsuntersuchungen	129
6.4	Molekulare Biologie	130
6.4.1	Kinaseassays	130
6.4.2	Zellkultur	131
6.4.3	Zellproliferationsassays	132
6.4.4	Apoptoseassays	132
6.4.5	Western Blots	133
6.4.6	Fluoreszenzmikroskopie	133
6.4.7	Multi-Kinase-Profilung	134
7	Literaturverzeichnis	136

8 Anhang	148
8.1 Abkürzungsverzeichnis	148
8.2 Emissionsspektrum des Laborlichts	152
8.3 Kinase-Screening der photoschaltbaren Chronomodulatoren	153
8.4 Chargenunterschiede der PamChips	154
Eidesstattliche Erklärung	156
Danksagung	158

1 Einleitung

1.1 Proteinkinasen

In der eukaryotischen Zelle übernehmen Proteinkinasen elementare Funktionen, wie u.a. die Regulierung von Wachstum, Proliferation, Migration, Differenzierung und Apoptose.^[1] Diese Schlüsselfunktionen können bei einer Dysregulation auch zu unerwünschten Kontrollverlusten innerhalb der Zelle und damit Krankheitsbildern im Organismus führen, wie z.B. Krebs, Alzheimer oder Immunsuffizienz.^[2-7]

Erzielt werden diese vielfältigen Funktionen in der eukaryotischen Zelle u.a. in Signaltransduktionskaskaden durch den Phosphatgruppentransfer von ATP (Donor) auf ein Substrat (Akzeptor). Die sogenannte Phosphorylierung von Proteinen stellt eine der wichtigsten posttranslationalen Modifikationen dar, da ca. 30 % der Zellaktivität darüber gesteuert wird.^[8,9] Durch die Übertragung des negativ geladenen Phosphats wird eine Konformationsänderung des Proteins bewirkt und somit auch eine Aktivitätsänderung. Aufgrund des Phosphatgruppenübertrags werden Proteinkinasen den Transferasen zugeteilt (s. Tabelle 1.1). Aufgrund der relativ stabilen Phosphat-Ester-Bindung (an einer Aminosäure) müssen die Phosphatgruppen über Phosphatasen wieder abgespalten werden.^[8] Die Phosphatasen nehmen somit die Rolle des Gegenspielers zu den Kinasen ein.

Tabelle 1.1. EC-Klassifikation der Proteinkinasen nach NC-IUBMB.

Code	Klassifikation
EC 2	Transferasen
EC 2.7	Transfer Phosphor-haltiger Gruppen
EC 2.7.10	Protein-Tyrosinkinasen
EC 2.7.11	Protein-Serin-/Threonin-Kinasen
EC 2.7.12.	duospezifische Kinasen (Tyrosin und Serin/Threonin)
EC 2.7.13	Protein-Histidinkinasen
EC 2.7.14	Protein-Argininkinasen
EC 2.7.99	andere Kinasen (z.B. Aspartat-Glutamat-Kinasen)

Die Gesamtheit der menschlichen Kinasen wird als Kinom bezeichnet und kann phylogenetisch gegliedert werden.^[10] Je nach Sequenzhomologie liegen in dieser Darstellung hohe Sequenzübereinstimmungen nah beieinander, geringe Übereinstimmungen liegen weiter entfernt voneinander (s. Abbildung 1.1).

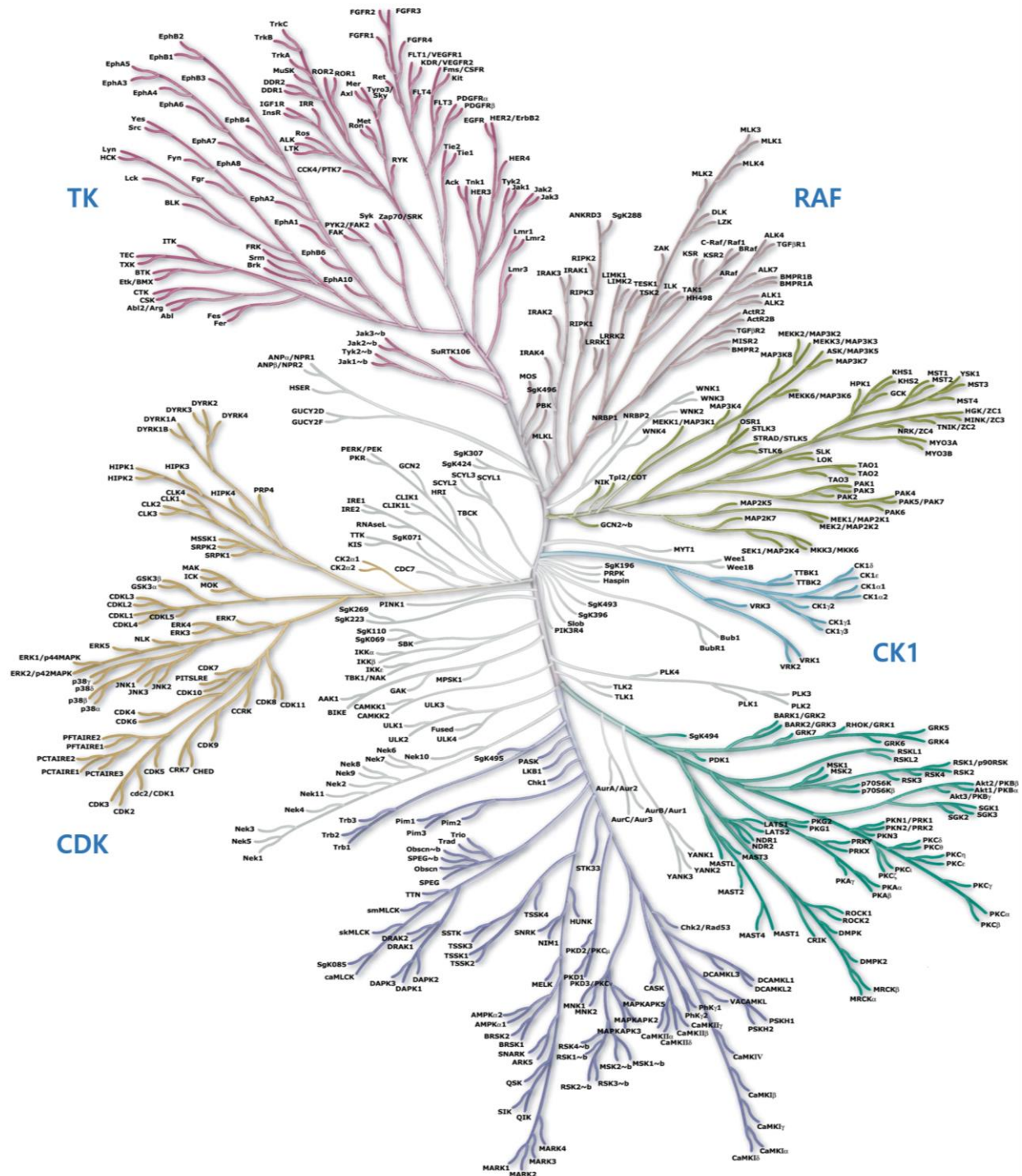


Abbildung 1.1. Grafische Darstellung der Sequenzhomologie des humanen Kinoms.

TK: Tyrosinkinasen, RAF: RAF-Kinasen, CK1: Caseinkinase 1, CDK: cyclinabhängige Kinasen. Abbildung adaptiert von *Cell Signaling Technology*.^[10]

Unter Bildung einer Esterbindung wird das Phosphat hauptsächlich an die Hydroxyl-Gruppe von Aminosäuren wie Tyrosin, Serin oder Threonin transferiert. Je nach Akzeptor leiten sich auch die Familien von Proteinkinasen ab, also Tyrosinkinase oder Serin-/Threonin-Kinasen (s. Tabelle 1.1).^[11,12]

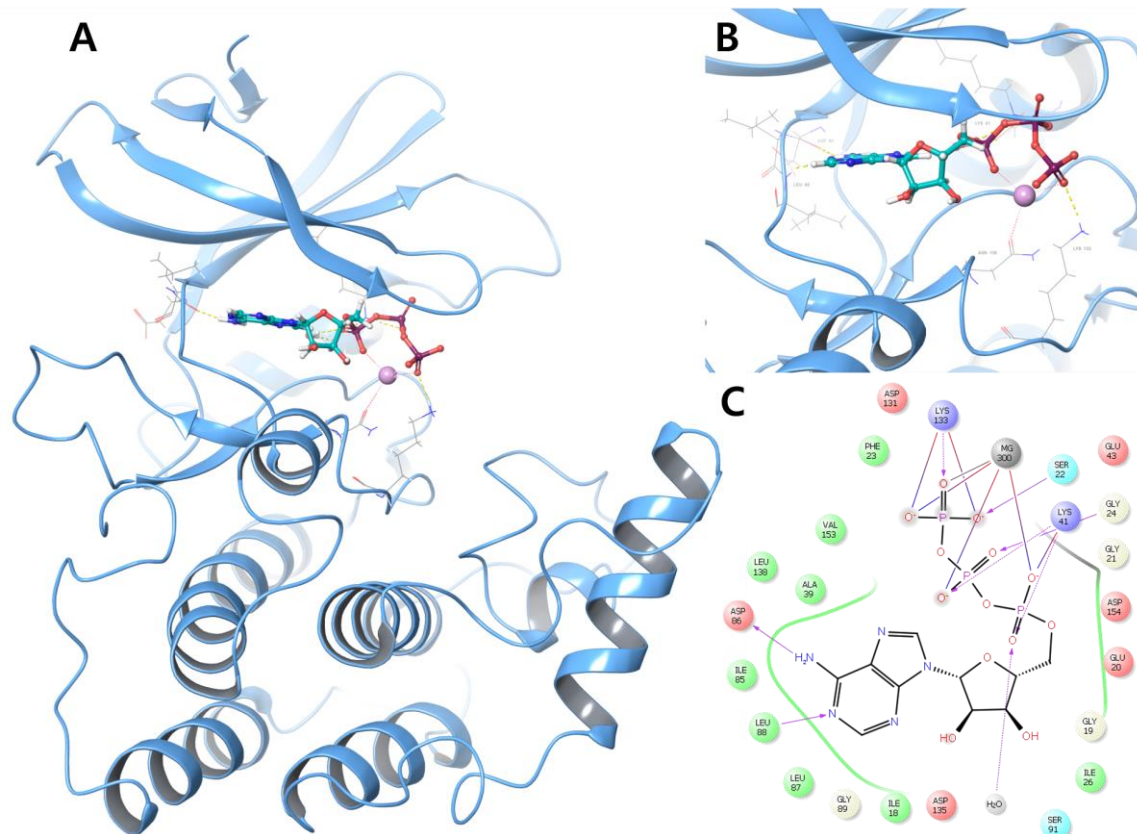


Abbildung 1.2. ATP in Bindetasche von CK1.

A. Komplettsicht der CK1 (PDB: 1CSN) mit gebundenem ATP in der Bindetasche und komplexiertem Magnesium (violett). **B.** Detailansicht der Bindetasche der CK1. Wasserstoffbrückenbindungen wurden in Gelb dargestellt, koordinative Bindungen in Rot. **C.** 2D-Interaktionsdiagramm von ATP in der Bindetasche. Die Affinität zur *hinge region* durch das Adenin findet vielfach Nachahmung in den zugelassenen Kinaseinhibitoren.^[13]

Strukturell setzen sich Proteinkinasen aus der N-terminalen Obereinheit (*lobe*), der C-terminalen Untereinheit, einer Scharnierregion (*hinge*) sowie der sich daraus ergebenden katalytischen Domäne zusammen. In dieser katalytischen Domäne findet der Phosphatgruppen-transfer des γ -Phosphats vom ATP zumeist auf die Hydroxylgruppe der entsprechenden Aminosäure statt. Die katalytische Domäne besteht aus ca. 270 Aminosäuren und ist unter allen Proteinkinasen phylogenetisch hoch konserviert, da ATP für den Phosphatgruppentransfer benötigt wird. Essentiell für die Phosphorylierung ist das Öffnen und Schließen der aktiven Tasche entlang der *hinge*-Region. Auch obligat für die Katalyse des Phosphatgruppentransfers sind noch ein oder zwei Metallionen (zumeist Magnesium) zur Fixierung des γ -Phosphats und

Stabilisierung der negativen Ladungen im Übergangszustand (s. Abbildung 1.2).^[14] Charakteristisch für Proteinkinasen sind in der N-terminalen Untereinheit fünf β -Faltblatt-Strukturen, eine α -Helix (C-Helix) und die Binderegion für ATP enthalten. Die C-terminale Untereinheit enthält die Aktivierungsschleife, katalytische Reste sowie Bindestellen für Peptide und Proteine.^[12,15]

Die Regulation von Kinasen ist für eine physiologische Funktion der Zelle unerlässlich. Die Aktivität der Kinase wird dabei vor allem über die Konformation der Aktivierungsschleife gesteuert. Die Aktivierungsschleife, beginnend mit dem DFG-Motiv und endend mit dem APE-Motiv, ist ca. 20–35 Aminosäuren groß. Eine entscheidende Rolle spielt die Aktivierungsschleife nicht nur bei der Stabilisierung des Magnesiums, sondern auch bei der Regulation von Phosphorylierungsmodulatoren. Je nach Konformation der Aktivierungsschleife liegt die Proteinkinase in einem aktiven oder inaktiven Zustand vor. Proteinkinasen verfügen auch über Autoinhibitions-Sequenzen zur gesteuerten Regulierung der Phosphorylierung. Da diese Sequenzen nicht phosphoryliert werden können, werden sie auch Pseudosubstrate genannt. Eine Inhibition erfolgt durch Einklappen analog zur Aktivierungsschleife und blockiert so Nukleotid- und Peptidsubstrate (z.B. bei der ABL-Kinase).^[11,16]

Entscheidend für die Substraterkennung einer Proteinkinase ist nicht nur ein Tyrosin oder Serin/Threonin, sondern auch analoge Sequenzen passend zur Substratbindestelle. Nur so kann die Phosphorylierung durch die verschiedenen Proteinkinasen spezifisch reguliert werden. Die Substraterkennung von Serin/Threonin- bzw. Tyrosin-Resten erfolgt zwar substratspezifisch, jedoch gibt es Überschneidungen in der Erkennung von Nachbarsequenzen, sodass mehrere Kinasen ähnliche oder gleiche Substrate phosphorylieren können.^[11,12]

Während Serin-/Threonin-Kinasen vor allem cytosolisch anzutreffen sind und dem oben beschriebenen Aufbau entsprechen, liegen Tyrosinkinase vor allem transmembranär gebunden vor und haben strukturelle Modifikationen, die sie von den Serin-/Threonin-Kinasen unterscheiden. Die größte Gruppe der Tyrosinkinase sind die Rezeptortyrosinkinase (RTK). RTKs enthalten sowohl extrazelluläre Rezeptoren als auch eine intrazelluläre Tyrosinkinasedomäne.^[17–19] Die Aktivierung von RTKs erfolgt hauptsächlich durch Dimerisierung zweier Monomere zu einem Homodimer oder Heterodimer unter Ligandenbindung. Anschließend findet eine Autophosphorylierung der beiden Kinasedomänen in *trans* statt, also eine gegenseitige Phosphorylierung beider Dimere. Durch den Phosphatgruppentransfer auf das Rezeptorprotein sind die *downstream*-Kinasen aktiviert und für weitere Signaltransduktionen über beispielsweise eine Bindung von einer SH2-Effektordomäne empfänglich. Am Ende der Signaltransduktionskaskade wird dann der Effekt, wie z.B. die Zellproliferation, ausgelöst.^[11,18]

1.2 Kinaseinhibitoren

Kinaseinhibitoren haben 2001 sowohl der Tumorthherapie als auch in der zielgerichteten Therapie (*molecular targeted therapy*) einen Innovationssprung gebracht. Imatinib als erster Vertreter der neuen Arzneistoffgruppe der *small molecule protein kinase inhibitors* (smKI)^[20] wurde zugelassen zur Behandlung der chronisch myeloischen Leukämie (CML). Gekennzeichnet durch die Produktion von BCR-ABL Fusionsproteinen, einer überregulierten Tyrosinkinase, führt diese zur pathologischen Überproduktion an Leukozyten. Genau diese Tyrosinkinase bzw. dieses Fusionsprotein wird nun von Imatinib kompetitiv inhibiert, wodurch in klinischen Studien die Remission in der Versuchsgruppe bis zu 90 % betrug.^[21–25] Gegenüber konventionellen Therapieansätzen in der Chemotherapie zeichneten sich die Proteinkinaseinhibitoren durch höhere Selektivität und relativ bessere Verträglichkeit durch ein günstiges Nebenwirkungsprofil aus.^[26–28]

Aufgrund des folgenden Booms der zielgerichteten Therapie und der damit verbundenen Zunahme an Zulassungen von Proteinkinaseinhibitoren gibt es zurzeit (Stand Juli 2020) 57 zugelassene Kinaseinhibitoren gegen eine Vielzahl an Indikationen von vor allem Krebserkrankungen, aber auch rheumatoide Arthritis oder Thrombozytopenie, und 161 smKIs in klinischer Testung.^[29]

1.2.1 Strukturelle Einteilung

Abhängig von der adressierten Bindestelle des Inhibitors und der Art der Interaktion werden die Kinaseinhibitoren in mittlerweile sieben verschiedene Klassen unterteilt. Betrachtet wird sowohl die aktive Konformation der Kinase, die Position des DFG-Motivs, als auch die Art der Bindung des Inhibitors (s. Tabelle 1.2).^[30] In der Regel wird die ATP-Bindetasche inhibiert (Typ I, I $\frac{1}{2}$ und II), wobei die Struktur-Wirkungsbeziehungen sehr klar sind. Maßgeblich verantwortlich für die aktive Konformation der Kinase ist die Aktivierungsschleife. Bei Phosphorylierung von Serin, Threonin oder Tyrosin an der Kinase (durch z.B. eine andere Kinase ändert sich die Ladungsverteilung und das Phenylalanin aus dem DFG-Motiv klappt nach innen (DFG-in). Dadurch wird eine Konformationsänderung der Aktivierungsschleife aus der Bindetasche heraus induziert, sodass diese nicht mehr die Bindestelle blockiert (s. Abbildung 1.3). Klappt das Phenylalanin nach außen (DFG-out) legt sich die Aktivierungsschleife in den katalytischen Spalt, sodass eine Ligandenbindung von z.B. MgATP verhindert wird; die Kinase ist inaktiv. Zusätzlich wird durch die Konformationsänderung in DFG-out die *deep pocket* freigelegt. Im Gegensatz zur ATP-Bindetasche ist die *deep pocket* nicht hoch konserviert. Diese ist vor allem bei Tyrosinkinasen häufig vorzufinden und zeigt aufgrund der physiologisch untergeordneten Bedeutung eine stärker ausgeprägte Variabilität.^[11,12,14,31]

Tabelle 1.2. Wesentliche Inhibitortypen nach Roskoski.^[30]

Von einer weiteren Unterteilung aufgrund der Konformation einzelner Proteinschleifen in z.B. IIA (Axitinib) wurde aufgrund der Übersichtlichkeit abgesehen.

Typ	Merkmale	Vertreter
I	ATP-kompetitiv, bei aktiver DFG-in-Konformation	Pazopanib, Palbociclib,
I ^{1/2}	ATP-kompetitiv, bei inaktiver DFG-in-Konformation (inaktiv durch Konformation anderer Proteinschleifen)	Vemurafenib, Lapatinib,
II	Bindung in DFG- <i>out</i> -Konformation, inaktive Kinase	Imatinib, Dabrafenib, Axitinib, Ponatinib
III	allosterische Inhibition neben der ATP-Bindetasche, nicht kompetitiv	Trametinib
IV	allosterische Inhibition <u>nicht</u> neben der ATP-Bindetasche, nicht kompetitiv	Everolimus
V	Bivalente Bindung	lediglich präklinische Kandidaten
VI	irreversible, kovalente Bindung, Suizidinhibitor	Afatinib

Aus der DFG-Konformation lassen sich die Kinaseinhibitoren vom Typ I, I^{1/2} und II ableiten. Naturgemäß ähneln sich Typ-I-Inhibitoren stark, da alle die ATP-Bindetasche adressieren.^[32] Daraus ergibt sich eine hohe Wahrscheinlichkeit für die Inhibition verschiedener Kinasen mit nur einem Inhibitor, also eine (relativ) geringe Selektivität.^[33,34] Aufgrund der variablen DFG-*out*-Konformation von Proteinkinase ergibt sich eine größere Strukturvariabilität von Typ-II-Inhibitoren. Ein Anstieg in der Selektivität kann nach Müller *et al. per se* jedoch nicht gewährleistet werden, da mehr Kinasen eine DFG-*out*-Struktur aufweisen als bisher angenommen.^[16,31] Um tatsächlich eine erhöhte Selektivität aufzuweisen, müssen verschiedene strukturelle Anforderungen erfüllt sein, wie z.B. eine gezielte Adressierung der *deep pocket*.

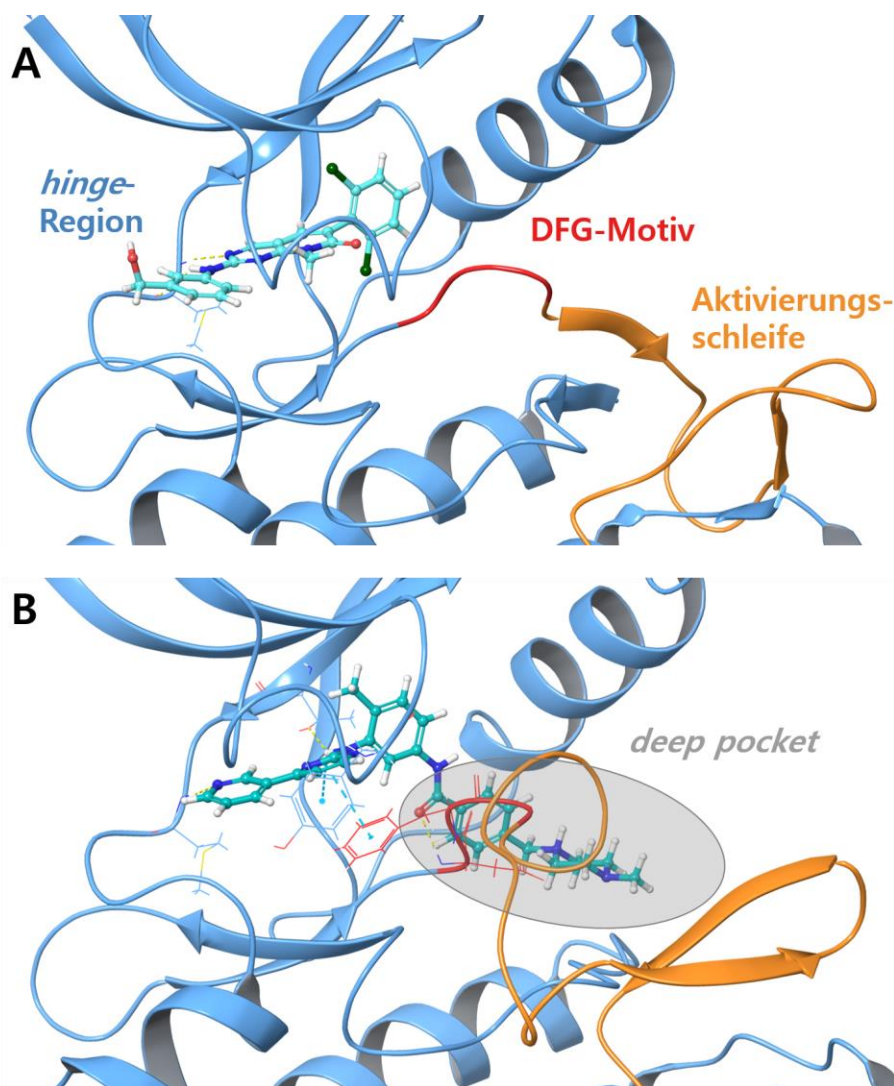


Abbildung 1.3. Vergleich von DFG-in- und DFG-out-Konformation am Beispiel von BCR-ABL.

A. DFG in Konformation der BCR-ABL-Kinase (PDB: 1OPK), d.h. das DFG-Motiv (rot) zeigt in Richtung der Bindetasche, die Aktivierungsschleife (orange) zeigt von der Kinase weg. Kristallisiert wurde die Kinase mit dem Inhibitor PD166326 mit Ausbildung der entscheidenden Wasserstoffbrückenbindungen (gelb) zur *hinge*-Region.

B. In der DFG-out-Konformation von BCR-ABL (PDB: 1IEP) klappt das DFG-Motiv nach vorne und eröffnet durch die Konformationsänderung neuen Raum, die *deep pocket* tritt in Erscheinung. Protein kristallisiert mit Imatinib, welches nur in der DFG-out-Konformation von BCR-ABL bindet.^[35,36]

Hochselektive kompetitive Kinaseinhibitoren, wie Lapatinib (lediglich gegen EGFR und HER2, s. Tabelle 1.2), bilden hier die Ausnahme.^[37,38] Angestrebt werden in der Arzneistoffentwicklung vor allem allosterische Inhibitoren. Die gezielte Adressierung von Substratbindestellen durch Kinaseinhibitoren, anstelle der ATP-Bindetasche, könnte den notwendigen Sprung in der Wirksamkeit für therapeutische Anwendungen bringen, benötigt allerdings noch weitere Forschungsaufwendungen.^[39]

1.2.2 Resistenzmechanismen

Die hohen Erwartungen zum erhofften Therapieerfolg von Krebserkrankungen konnten von den smKIs jedoch nicht erfüllt werden. In einigen Indikationsgebieten wie der CML konnten bereits große Erfolge erzielt werden, allerdings nicht in der Breite an Krebserkrankungen wie dies anfänglich erhofft wurde.

Als Beispiel sei hier der BRAF^{V600E}-Inhibitor Vemurafenib zur Behandlung bei einem malignen Melanom oder der chronisch myelomonozytären Leukämie (CMML) erwähnt.^[40] Nach Therapiebeginn erfolgt eine Verbesserung des Patientenzustands unter Abnahme an Tumoren und Metastasen im ganzen Körper. In Einzelfällen wurde jedoch eine Progression der CMML unter Vemurafenibgabe beobachtet.^[41] Dieses Phänomen ist auch bekannt als „BRAF-Paradox“. Nach heutigem Stand der Wissenschaft gibt es verschiedene Hypothesen für die Ursache der starken Rezidive unter Vemurafenibgabe. Die Ursache eines BRAF^{V600E}-positiven malignen Melanoms liegt in der unkontrollierten Aktivierung von BRAF in der Signaltransduktionskaskade durch eine Mutation (*gain-of-function*-Mutation). Dadurch vermehren sich die Zellen autonom und ungehemmt, es entstehen Tumore (s. Abbildung 1.4). Vemurafenib inhibiert die *gain-of-function*-Mutante BRAF^{V600E}, nicht jedoch den funktionellen Wildtyp BRAF^{wt}, die Remission oder Zustandsverbesserung setzt ein. Des Weiteren wird die Aktivität der BRAF^{wt} gesteigert. Durch den teilweise BRAF-gesättigten Zustand an der Wildtypkinase wird die Autoinhibition verhindert, sodass BRAF^{wt} ungehemmt und autonom analog zu BRAF^{V600E} die Zellproliferation paradoxerweise steigert. Diese Tatsache äußert sich dann in den wiederkehrenden schweren Rezidiven. Neben diesem *kinome reprogramming* spielen noch Ausweichrouten z.B. über den PDGFR-Pfad eine Rolle bei der Resistenzbildung in der Therapie des malignen Melanoms mit Vemurafenib.^[42–45]

Darüber hinaus gibt es eine Vielzahl an Resistenzmechanismen, nach denen Krebszellen auf die Inhibitorgabe reagieren. Zum einen können Zellen über verschiedene Effluxtransporter verfügen, um Substanzen über ABC-Transporter wie MDR1 auszuschleusen. Weiterhin können *target*-Mutationen die Inhibition verhindern, wie z.B. bei der *gatekeeper*-Mutante EGFR-T790M nach Erlotinibbehandlung. Mittels Deregulierung der Apoptose wird es der Zelle ermöglicht DNA Schäden zu reparieren und gestärkt aus dem ruhenden Zellzyklus hervorzugehen. Autophagozytose, d.h. der Abbau von Lysosomen durch sich selbst, wurde bereits sowohl unter klassischer Chemotherapie als auch der zielgerichteten Therapie beobachtet und stellt einen weiteren Resistenzmechanismus dar, da Lysosomen essentiell bei der körpereigenen Tumorbekämpfung unterstützen. Zuletzt gibt es noch weitere Mechanismen, wie gestörte Freisetzung von Prodrugs nach Metabolismusänderungen, erhöhte Expression der Zielkinase, die inhibiert werden soll oder eine Reparatur von entstandenem DNA-Schäden. Auch makrosko-

pisch spielt die unmittelbare Umgebung des Tumors eine Rolle bei der Erfolgchance der Behandlung. Dringt eine subtherapeutische Konzentration an Arzneistoff in den Kern des Tumors, also in die Tumorstammzellen, wirkt der Arzneistoff zwar wachstumshemmend, aber eine Tumorelimination wird nicht erfolgen. Das Konzept der Tumorstammzellen stellt einen Erklärungsansatz für strukturelle Unterschiede im Tumor da und den sich damit ergebenden Resistenzmechanismen während der Therapie dar.^[46–49]

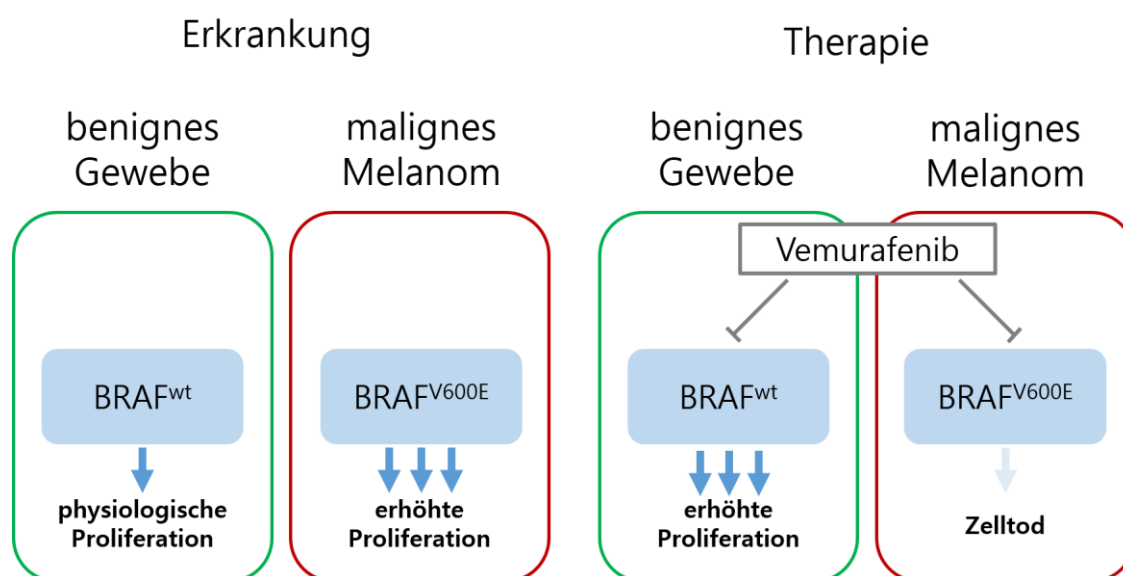


Abbildung 1.4. Schematische Darstellung des BRAF-Paradox.

Links: Veränderte Zellproliferation bei der Erkrankung mit malignen Melanom. Rechts: Die paradoxerweise erhöhte Proliferation unter Gabe des mutationspezifischen Kinaseinhibitors Vemurafenib. Abbildung nach Hoorens *et al.*^[50]

Letztendlich muss der Selektionsdruck zur Entstehung robusterer Krebszellen unterbunden werden, analog zur Bekämpfung von Resistenzmechanismen gegen Antibiotika bei Bakterien. Dies ließe sich z.B. durch den Angriff an verschiedenen Mechanismen^[48] erzielen oder durch Entwicklung neuer Prodrugkonzepte wie der Photopharmakologie.

1.3 Photopharmakologie

Licht ist evolutionär schon früh von elementarer Bedeutung in der Entwicklung biochemischer Prozesse von Organismen gewesen. Nicht nur durch Wärme, sondern auch durch Photonen werden chemische Reaktionen katalysiert.^[51,52] Durch den Fortschritt in der technischen Entwicklung lässt sich Licht mittlerweile ideal zeitlich und räumlich steuern, sodass eine hohe Auflösung in der Kontrolle von lichtabhängigen Reaktionen erzielt werden kann. Licht in der therapeutischen Nutzung zeichnet sich dabei durch hohe Geschwindigkeit, Reversibilität und einfache Handhabung aus. Vor allem ist es jedoch nicht-invasiv und bioorthogonal.^[53–56] Licht selbst wird auch für therapeutische Zwecke verwendet. Bei der Phototherapie von Neugeborenen mit neonataler Hyperbilirubinämie (Gelbsucht) werden die kleinen Patienten mit blauem oder weißem Licht bestrahlt, um die Elimination von Bilirubin zu erhöhen.^[57] Eine der am längsten genutzten Photochemotherapien ist die topische Verabreichung von Psoralen bei Psoriasispatienten in Kombination mit UV-A-Strahlung. Durch die Strahlung erfolgt eine kovalente Interkalation von Psoralen in die DNA, um das Wachstum von übermäßig proliferierenden Hautzellen zu bremsen. Durch die UV-Strahlung erhöht sich allerdings das Hautkrebsrisiko bei einer Langzeittherapie.^[58]

Als Photopharmakologie bezeichnet man chemisch-pharmakologische Konzepte, die genutzt werden, um pharmakodynamische und pharmakokinetische Parameter von Wirk- und Arzneistoffen gezielt mit Licht zu steuern.

Wird in der Literatur häufig lediglich das aktive reversible Schalten von Wirkstoffen als Photopharmakologie bezeichnet,^[55,56,59] greift diese Eingrenzung zu kurz. Die Pharmakologie befasst sich im Allgemeinen mit pharmakodynamischen (Wirkung) und pharmakokinetischen (ADME) Effekten von Wirk- und Arzneistoffen.^[60] Entscheidend ist dabei in der Photopharmakologie, dass die pharmakodynamischen oder pharmakokinetischen Eigenschaften eines Prodrugs durch Licht gezielt gesteuert werden können, also bioorthogonal. Beim reversiblen An- und Ausschalten eines Wirkstoffes werden diese Kriterien erfüllt,^[55,61] wie auch beim einmaligen Aktivieren durch Abspaltung von Photoschutzgruppen^[62,63] oder der Erzeugung von Singulett-Sauerstoff^[64,65] (s. Abbildung 1.5). Deswegen wird der Begriff Photopharmakologie in dieser Arbeit als gesamtheitliches Konzept für durch Licht beeinflussbare Wirk- und Arzneistoffe verwendet.

Darüber hinaus werden in der Optogenetik zelluläre Systeme gentechnisch so verändert, dass sie photoresponsiv (re-)agieren. In Abgrenzung zur Photopharmakologie werden Vektoren und Proteine chemisch modifiziert an Stelle von Wirkstoffen.^[66,67]

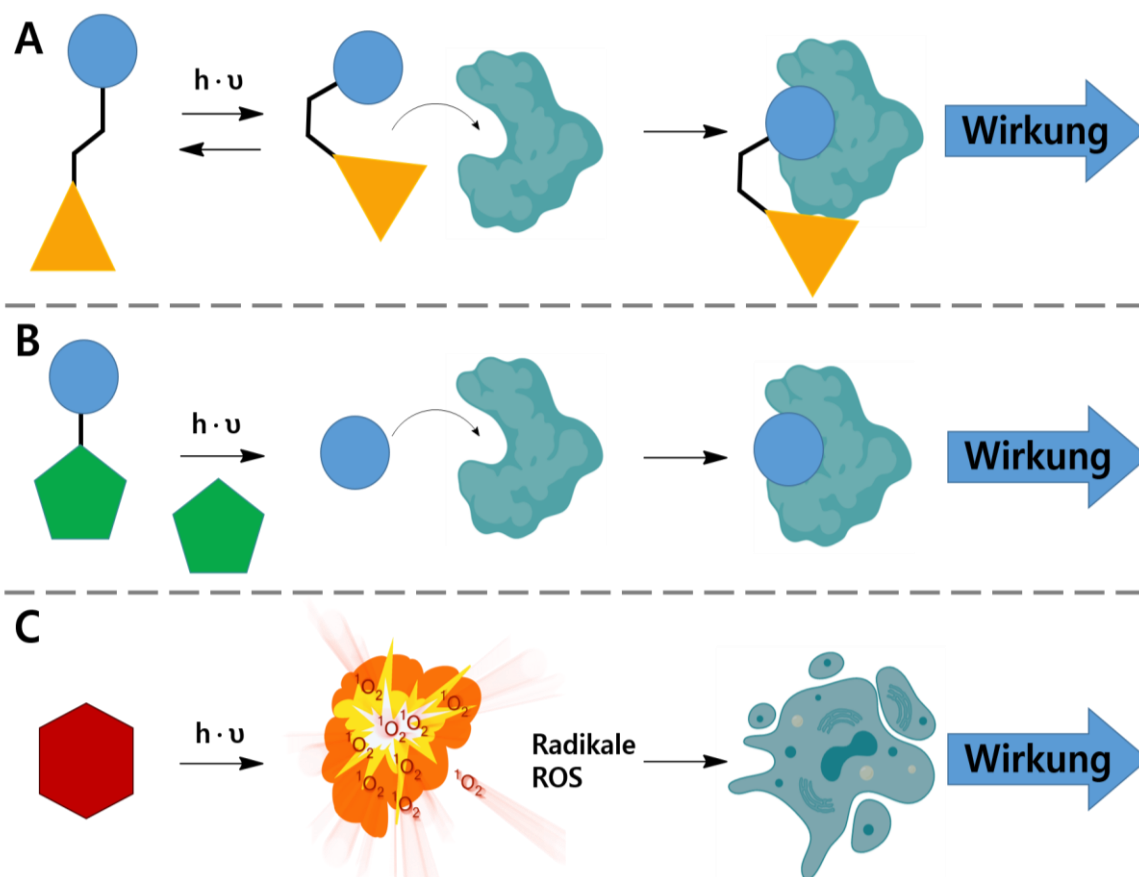


Abbildung 1.5. Konzepte der Photopharmakologie.

A. Photoschaltung: lichtabhängige Konfigurationsänderung des Moleküls führt zu einer Bindung am Zielprotein. **B.** Photoabspaltung: Wirkstoffe werden mit photolabilen Abgangsgruppen (PPG) geschützt, die unter Bestrahlung abgespalten werden. Somit wird eine Ligandenbindung ermöglicht. **C.** Photodynamische Therapie: Photosensibilisatoren setzen unter Bestrahlung reaktive Sauerstoffspezies (ROS) frei, die zum Zelltod führen. Abbildung nach Fuchter,^[68] erstellt mit Biorender.

Der Antrieb für das Verrichten molekularer Arbeit ist die photomotorische Kraft.^[69] Mithilfe der photomotorischen Kraft, also der Arbeit, die durch eingestrahktes Licht (einer bestimmten Wellenlänge) ausgeübt wird, kann z.B. eine Konfigurationsänderung eines Photoschalters bewirkt werden, sofern die Energie ausreichend ist. Noch ist unklar, ob auch Photoschalter direkt gebunden in einer Proteinbindetasche geschaltet werden können und inwiefern dies die Wirksamkeit beeinflusst. Die benötigte Energie bei der Photoschaltung von 16–20 kcal könnte dabei schon ausreichen, um lokal eine Konformationsänderung in der Zielstruktur des Proteins zu erzeugen, jedoch sind weitere Untersuchungen vonnöten.^[70]

Im Fall von Proteinkinasen und photoresponsiven smKIs bedeutet dies, dass die Aktivität nicht nur durch Bindung von Aktivatorpeptiden oder Phosphorylierungen an- und ausgeschaltet werden kann,^[2,11] sondern ferner durch Licht einer bestimmten Wellenlänge die Aktivität der Kinasen gezielt gesteuert werden könnte.^[71] In der Regel werden dazu bereits bekannte

und etablierte Wirkstoffe gewählt und auf Strukturmerkmale untersucht, die sich für eine Funktionalisierung durch photoschaltbare Komponenten eignen.

Der zukünftige Erfolg eines photopharmakologischen Konzepts wird dabei von der möglichen klinischen Anwendbarkeit determiniert. Allen voran hat sich die Anregungswellenlänge als Limitation für biologische Anwendungen erwiesen.^[72] Da unterschiedliche Wellenlängen des sichtbaren Lichts in biologischen Materialien verschieden stark absorbiert werden, ergibt sich ein bio-optisches Fenster, das sich ideal für eine Aktivierung photoresponsiver Substanzen eignet. Während vom UV- bis in den grünen Bereich des Lichtspektrums vor allem Melanosom und Hämoglobin Licht absorbieren, wird die Transmission von Licht jenseits des nahen Infrarot-Bereichs (NIR) vor allem durch Wasser gemindert. Dies eröffnet das bio-optische Fenster vom roten Bereich des Lichts bis hin zum NIR (600-900 nm).^[73-75] Bemerkbar ist dies auch bei der Eindringtiefe von Licht in biologisches Gewebe: Während UV-Strahlung weniger als einen Millimeter eindringen kann, gelangt rotes Licht mehrere millimetertief in die Haut und in darunter liegende Gewebe (s. Abbildung 1.6).^[75,76] Überwunden werden kann diese Limitation durch den Einsatz von Lichtleitern. Solche so genannten Photonennadeln bieten einen minimalinvasiven Ansatz, UV-Strahlung auch in tieferliegende Gewebeschichten zu transportieren.^[77] Jedoch bleibt bisher eine Anregungswellenlänge im bio-optischen Fenster eine Idealeigenschaft, die aktuell in der Wirkstoffentwicklung verfolgt wird.

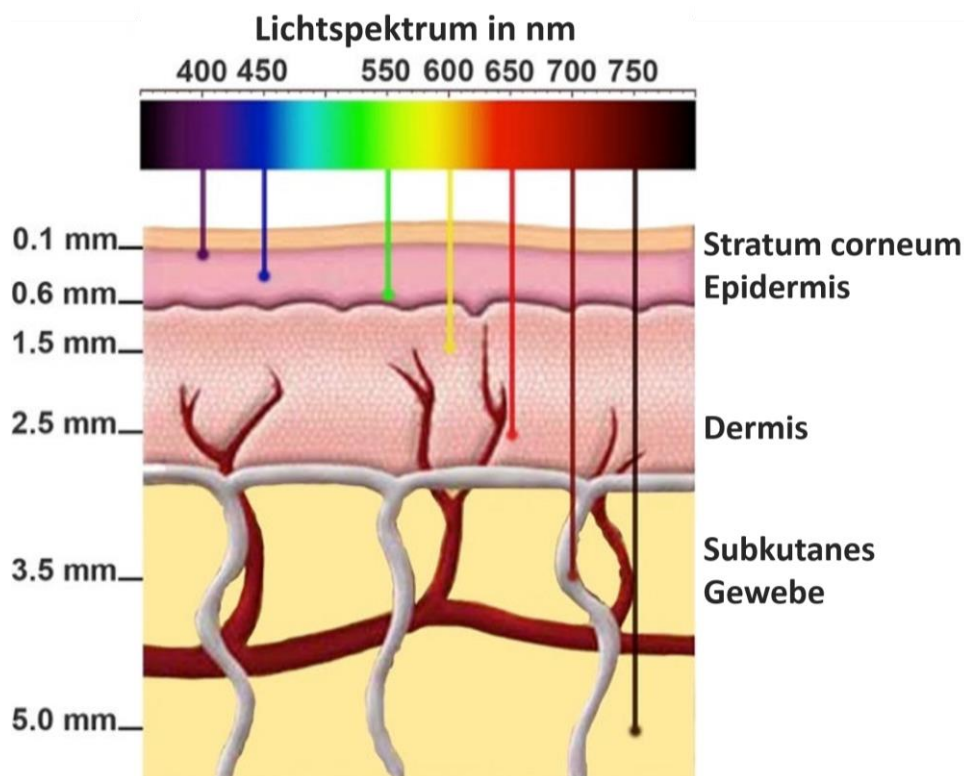


Abbildung 1.6. Eindringtiefe von Licht in biologisches Gewebe nach Wang *et al.*^[76]

1.3.1 Photoschaltung

Die *E/Z*-Konfigurationsänderung eines Moleküls unter Einfluss von Licht (Photochromie) ist schon seit 1954 gezielt untersucht worden.^[78-80] Jedoch ist erst in den letzten Jahren mit dem stetigen technischen Fortschritt das Interesse an Photoschaltern zur Beeinflussung biologischer Prozesse nennenswert gewachsen. Der Umfang an photoschaltbaren Verbindungen hat mittlerweile einen beeindruckenden Umfang angenommen, sodass verschiedene Möglichkeiten zur Auswahl zur Funktionalisierung möglicher Kandidaten stehen (s. Tabelle 1.3). Nicht nur durch Isomerisierung (Stilbene, Hemithioindigos und Azos), sondern auch durch reversible Cyclisierung (Diarylethene) wird das Portfolio an Photoschaltern ergänzt.

Tabelle 1.3. Übersicht ausgewählter Photoschalter (durch Photoisomerisierung oder Photocyclisierung) zur Verwendung im biologischen Kontext.^[55,81,82]

Verbindung	PSS
Stilbene	
heterocyclische Diarylethene nach Matsuda ^[83]	
Hemithioindigos	
Azobenzole (<i>trans/cis</i>)	
Diazocine (<i>cis/trans</i>)	

Die photochemischen Eigenschaften eines Photoschalters, wie z.B. Anregungswellenlänge, PSS (photostationäres Gleichgewicht, *photostationary state*), eine hohe Bandenseparation oder Halbwertszeit, werden nicht nur von der Struktur des Photoschalters bestimmt, sondern sind auch stark abhängig von Temperatur und Lösungsmittel.^[79,84,85] Dies führt insbesondere in der biologischen Testung zu großen Hürden für den Erfolg eines pharmakologisch nutzbaren Photoschalters. Beispielsweise erfolgt die Charakterisierung zumeist in organischen Lösungsmitteln (v.a. DMSO) bei RT wohingegen die biologische Testung in wässrigen Medien mit DMSO-Konzentrationen von vorzugsweise unter 1 % und 37 °C abläuft.^[56]

1.3.1.1 Stilbene und Diarylethene

Die Photoisomerisierung von Stilbenen in organischen und wässrigen Lösungsmitteln gilt als ausführlich untersucht.^[86–88] Die hervorgerufene Konfigurationsänderung durch Bestrahlung soll, eingebaut im Pharmakophor eines Wirkstoffs, dessen gezielte Aktivitätssteuerung ermöglichen. Die Rückschaltung vom *Z*- zum *E*-Isomer erfolgt entweder durch Bestrahlung mit einer zweiten (passenden) Wellenlänge oder thermisch, da das *Z*-Stilben thermisch (relativ) labil ist und die *E*-Konfiguration thermodynamisch begünstigt ist. Stellt sich in der Praxis ein *E*/*Z*-Isomerengleichgewicht ein (PSS), so gilt eine isomerenreine Schaltung in der Photopharmakologie als ideal. In Konkurrenz zur Rückisomerisierung steht oft eine irreversible photoinduzierte [2+2]-Cyclisierung des *Z*-Isomers mit anschließender Oxidation und Aromatisierung zum Phenanthren.^[81,89,90]

Während Stilbene lediglich eine Photoisomerisierung unterliegen, bilden die Diarylethene einen Sonderfall. Unter Einstrahlung einer geeigneten Wellenlänge erfolgt eine Cyclisierung unter der Verknüpfung beider Aryle. Photopharmakologisch interessant ist diese Stoffgruppe deswegen, da die Cyclisierung reversibel verläuft und das ursprüngliche Diarylethen unter Lichteinstrahlung einer anderen Wellenlänge oder durch thermische Rückschaltung wiederhergestellt werden kann. Wilson *et al.* präsentierten mit ihrem Diarylethen den ersten photoresponsiven Kinaseschalter, der nicht auf den Azobenzolen basiert, auf der Proteinkinase C.^[91] Erreicht wurde ein 25-facher Wirkunterschied zwischen ringoffener und geschlossener Form, jedoch konnte eine reversible Schaltung in wässrigen Lösungen nicht gezeigt werden.

Auch bereits zugelassene Kinaseinhibitoren wie Sunitinib (Hemiindigo, Handelsname: Sutent)^[92,93] und Axitinib (Aza-Stilben, Handelsname: Inlyta)^[94] weisen eine Photosensitivität bzw. Photoresponsivität auf. Diese Eigenschaften bilden eine vielversprechende Ausgangslage zur Entwicklung photoschaltbarer Kinaseinhibitoren. Aufgrund der häufig auftretenden Nebenreaktionen der Stilbene konzentrieren sich die wissenschaftlichen Bemühungen aktuell eher auf andere photoresponsive funktionelle Gruppe wie den Azobenzolen.^[56]

1.3.1.2 Azobenzole

Auch bei unsubstituierten Azobenzolen kann beobachtet werden, dass bei UV-Bestrahlung das thermodynamisch stabile *E*-Isomer zum thermodynamisch labilen *Z*-Isomer photoisomerisiert.^[81] In der wissenschaftlichen Praxis werden durch Substituierung der Phenylringe Konversionsraten von über 90 % *Z*-Isomer nach Bestrahlung angestrebt, um einen signifikanten Wirkunterschied zwischen den Isomeren zu erzielen. Die Rückisomerisierung erfolgt in der Regel über blaues Licht oder thermisch aufgrund der im Gegensatz zu den Stilbenen geringeren thermodynamischen Stabilität.^[81]

Die aktuellen wissenschaftlichen Bestrebungen fokussieren sich auf die Verbesserung der photochemischen Parameter, wie Anregungswellenlänge, Halbwertszeit und Konversionsrate. Der ideale Photoschalter zeigt eine vollständige Konversion vom inaktiven zum aktiven Isomer mit ausreichender Stabilität bzw. Halbwertszeit bei einer Anregung mit sichtbarem Licht oder im NIR, um eine biologisch sinnvolle Anwendung zu finden. So berichten Hoorens *et al.* aus der Szymanski-Gruppe vom ersten Azo-Schalter mit einer Bandenseparation von 100 nm.^[95] Die Halbwertszeit lag jedoch nur im Picosekunden-Bereich. Um Azobenzole in der *cis*-Konfiguration zu stabilisieren, ist eine Halogensubstitution in den *ortho*-Positionen zur Azobrücke geläufig. Durch die elektronenziehenden Fluorsubstituenten (-I-Effekt) wird das *cis*-Azobenzol stabilisiert und Halbwertszeiten bis zu 700 Tagen ermöglicht.^[96,97] Die Wooley-Gruppe veröffentlichte die ersten Photoschalter für den *in-vivo*-Gebrauch mit Anregungsmaxima im Bereich von rotem Licht bis zum NIR-Bereich.^[98] Verwendet wurden Azo-Azoniumschalter, die überraschenderweise im Sekundenbereich rückisomerisieren, also sechs Zehnerpotenzen langsamer als üblich für angeregte Azoniumionen (s. Abbildung 1.7).^[70] Obwohl eine Halbwertszeit von Sekunden immer noch unzureichend für derzeitige biologische Testmethoden ist, zeigen die Forschungsbemühungen eine ermutigende Tendenz für besser nutzbare Photoschalter. Darüber hinaus wurden auch Konzeptkombinationen entwickelt. So berichteten Muñoz-Rugeles *et al.* von einem Stilbenyl-Azopyrrol.^[99] Das beschriebene Konzept findet Anwendung in der 2-Photonen-Anregung zur Erhöhung der Anregungswellenlänge.

Wichtig für die Anwendung im biologischen Kontext ist die Verwendung von *cis*-Azobenzolen als biologisch aktive Substanz, damit bei der (thermischen) Rückschaltung das *trans*-Isomer inaktiv ist. Die Wirkung wird somit angeschaltet und die Ausschaltung erfolgt automatisch. Ein überzeugendes Konzept lieferten bereits Volgraf *et al.* aus der Trauner-Gruppe mit einem schaltbaren Ionenkanal.^[100] Wenig überzeugend waren jedoch die geringe biologische Halbwertszeit und die Aktivierung mit 380 nm (UV).

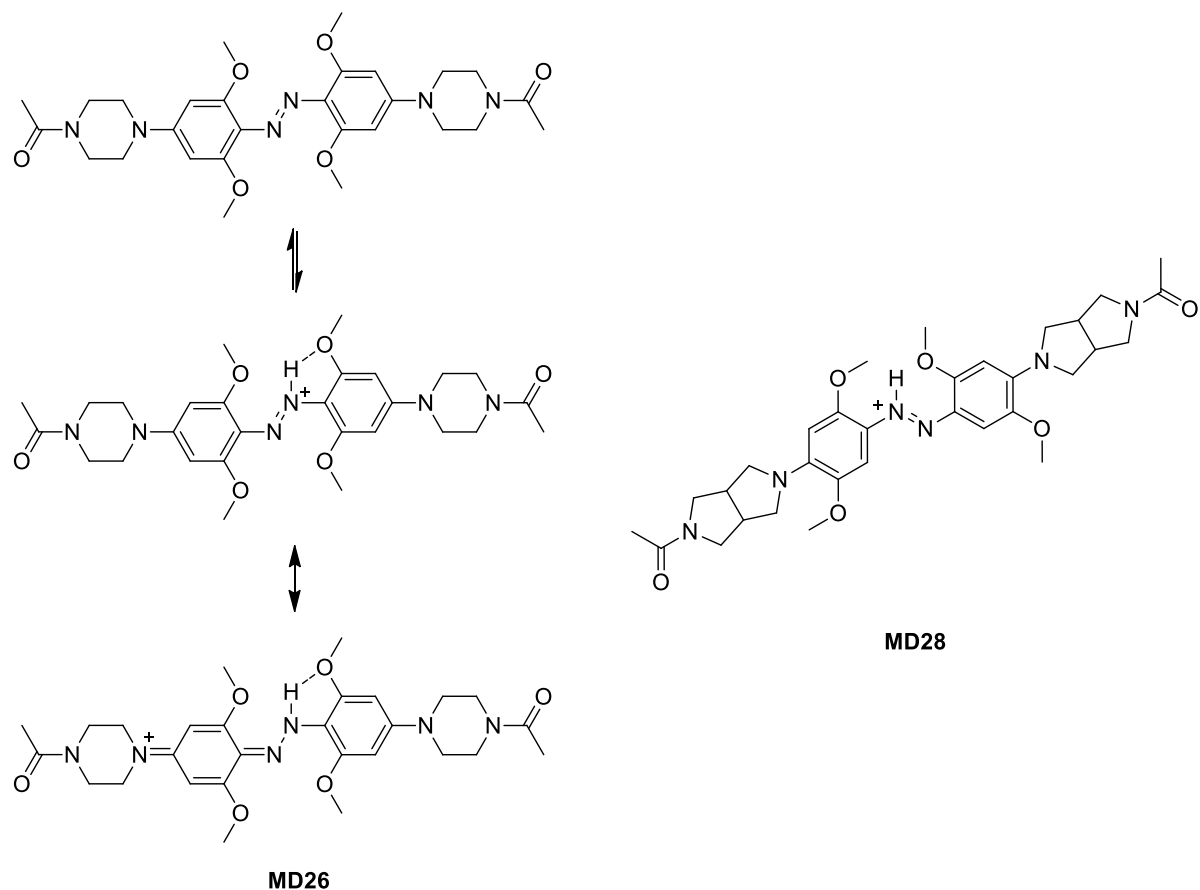


Abbildung 1.7. Azo-Azonium-Schalter von Dong *et al.*

Anhand von Verbindung **MD26** konnte erstmals eine Photoisomerisierung aufgrund der relativ hohen Stabilität des Azonium-Ions gezeigt werden. **MD28** weist sogar ein Absorptionsmaximum im Rotspektrum auf.^[98]

Darüber hinaus gibt es bereits eine Vielzahl Proteinkinaseinhibitoren, die mithilfe von Azobenzolen zur Photoschaltung funktionalisiert wurden (Azologisierung). 2015 veröffentlichten Ferreira *et al.* aus der Grötli-Gruppe den ersten photoschaltbaren Kinaseinhibitor.^[101] Azologisiert wurde ein RET-Inhibitor. Die Anregung fand lediglich im UV-Bereich statt und der Wirkunterschied vom aktiven *E*-Isomer (150 nM) zum thermolabilen *Z*-Isomer (580 nM) war lediglich um den Faktor 3.9 verringert. Auch konzeptionell ist der RET-Schalter von Ferreira *et al.* ungünstig, da das wirksame Isomer mit der Zeit wiederhergestellt werden kann. Kolarski *et al.* veröffentlichten die Synthese eines schaltbaren CK1-Modulators (Heteroaryl-Azo) zur Beeinflussung des circadianen Rhythmus ohne Erwähnung biologischer Daten.^[102] Schehr *et al.* aus der Herges-Gruppe haben in einem umfassenden Beitrag die Testung verschiedener Azobenzol- und Diazocinderivate auf der CK1δ und p38α veröffentlicht.^[103] Zwar wurden nur geringfügige Wirkunterschiede zwischen den Isomeren festgestellt, doch konnte ebenso eine Reduktion der Azobenzole gezeigt werden. Die in der biologischen Testung oft eingesetzten Reagenzien DTT (vermutlich auch Glutathion) reduzierten die Azo-Bindung zu einem Hydrazin und führten in der Studie zu inkonsistenten IC₅₀-Werten sowie dem Verlust der reversiblen Schaltbarkeit.

Bisher neu ist die Kombination photopharmakologischer Konzepte mit auf Proteolyse zielende Chimären (*proteolysis targeting chimeras*, PROTACs). PROTACs greifen in den zellulär regulierten Proteinabbau ein, der lange Zeit als *undrugable*, also nicht durch Wirkstoffe beeinflussbar, galt.^[104] Jin *et al.* beschrieben Funktionalisierung von PROTACs mit einer Azobenzolfunktion.^[105] Dieses Azo-PROTAC ist in der Lage gezielt die Tyrosinkinase BCR-ABL bei Bestrahlung zu internalisieren, und stellt somit einen neuen Ansatz gegen CML dar.

Die bisherigen Anwendungen von Azoschaltern können jedoch lediglich als Konzeptualisierung, also *proof of principle*, verstanden werden, da entweder gute photochemische Eigenschaften oder nennenswerte Wirkunterschiede der Isomere fehlen.

1.3.1.3 Diazocine

Ausgehend von der beschränkten Anwendung von Azoschaltern aufgrund der limitierenden photochemischen Parameter rückten die verbrückten Azobenzole (Diazocine) in den Fokus der photopharmakologischen Entwicklung. Vor allem die Herges-Gruppe hat einen Großteil zur Synthese, photochemischen Charakterisierung und möglichen Anwendungsgebieten beigetragen.^[106–109] Diazocine und Heterodiazocine sind gekennzeichnet durch eine thermodynamisch stabile *cis*-Konfiguration im Gegensatz zu den nicht-verbrückten Azobenzolen (stabile *trans*-Konfiguration). Das Absorptionsmaximum von *cis* liegt bei 400 nm, bei *trans* bei über 500 nm und kann zu 90 % *trans* bzw. ~100 % *cis* angereichert werden.^[106] Ausgehend vom Kohlenstoffdiazocin^[106,107] wurden entweder Sauerstoff oder Schwefel in der Kohlenstoffbrücke substituiert, um die photochemischen Parameter gezielt zu variieren.^[109] Das Sauerstoffdiazocin zeigte bei den Untersuchungen ein besseres PSS von >99 % *cis* zu 80 % *trans*, jedoch nur eine Halbwertszeit von 89 Sekunden. Das Schwefeldiazocin dagegen zeigte zwar ein PSS von >99 % *cis* zu 70 % *trans*, jedoch eine Halbwertszeit von 3–5 Tagen bei 27 °C. Wie schon bei den Azobenzolen werden die photochemischen Parameter bei den Diazocinen von den Substituenten beeinflusst.^[82,108]

Sowohl die Trauner-Gruppe,^[110] als auch Ellis-Davies *et al.*^[111] haben bereits Diazocin-gekoppelte Aminosäuren publizieren können. Während die biologische Testung von schaltbaren Aminosäuren an isolierten Ionenkanälen noch effektvolle Wirkunterschiede zeigen konnte, wurden Zelldaten nicht veröffentlicht. Schehr *et al.* konnten zwar einen Diazocin-gekoppelten CK1δ- bzw. p38α-Inhibitor mit einer Halbwertszeit von über 3 Tagen erfolgreich synthetisieren, hingegen zeigte sich keine messbare Inhibition auf den Kinasen.^[103] Weiterhin wurden in Modelversuchen Proteine^[112] und DNA-Stränge^[113] mit Diazocinen funktionalisiert. Aufgrund der guten photochemischen Eigenschaften wie einer rotverschobenen Anregungswellenlänge, Bandenseparation und einer ausreichend hohen Halbwertszeit, ergeben sich interessante Anwendungsmöglichkeiten für Diazocin-gekoppelte (Kinase-)Inhibitoren, die es zu untersuchen gilt.

1.3.2 Photoabspaltung

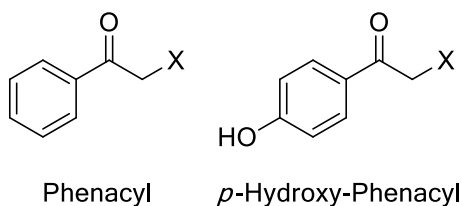
Während der Einsatz photoschaltbarer Verbindungen sich erst in den letzten 10–20 Jahren auf die biologische Anwendung ausdehnte, sind photoabspaltbare Schutzgruppen (*photoremovable protecting group*, PPG) bereits seit 1977 im Einsatz für biologisch aktive Substanzen.^[114,115] Für die Photoabspaltung werden zuerst Zielmoleküle mit PPGs geschützt (*caging*), damit diese photoresponsiv reagieren können. Mittlerweile ist der Umfang an Verbindungen, die durch Photoabspaltung aktivierbar sind, stark angewachsen: kleine anorganische Ionen bzw. Moleküle (Ca^{2+} ,^[116] Cu^{+} ^[117] oder NO ^[118]), Aminosäuren und Peptide,^[119,120] Neurotransmitter,^[121,122] Kinaseinhibitoren,^[71,123,124] Tubulininhibitoren,^[125] DNA^[126] sowie Proteine.^[127]

Üblicherweise werden Ein-Photonen-PPGs verwendet, um Zielverbindungen photoresponsiv zu schützen (s. Abbildung 1.8). Wichtige Eigenschaften für eine PPG sind:^[128]

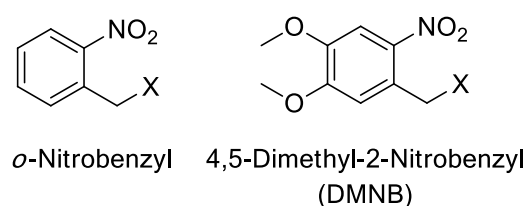
- ▶ klarer eindeutiger Reaktionsverlauf während der Photolyse mit einer ausreichend hohen Quantenausbeute
- ▶ sensitive Detektierung der Abspaltung der geschützten Verbindung und den Produkten nach der Photolyse
- ▶ Absorptionsbande mindestens über 300 nm (vorzugsweise im bio-optischen Fenster, also 500–700 nm)
- ▶ gute Löslichkeit im Zielmedium
- ▶ biologische Inaktivität beim *caging* von Wirkstoffen zur Vermeidung von Interferenzen

Für die unten aufgeführten Arylcarbonylmethyl-, Nitroaryl- und Cumaringruppen werden die eben genannten Kriterien erfüllt, sodass diese sich gut zum Zweck der Photoabspaltung eignen. Eine Anregung der PPGs erfolgt üblicherweise im Bereich von 325–375 nm.^[128–130] Da die Eindringtiefe von UV im biologischen Gewebe begrenzt ist (s. Kapitel 1.3), ist das Ziel in der (Weiter-)Entwicklung von PPGs eine Erhöhung der Anregungswellenlänge. Erfüllt wird dieses Kriterium von den Bor-Dipyrrromethenylgruppen (BODIPY).^[131] Noch nicht gänzlich geklärt ist, ob BODIPY-PPGs alle Kriterien für eine vollumfänglich funktionale PPG bieten.

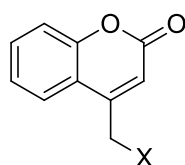
Arylcarbonylmethyl-Gruppen



Nitroaryl-Gruppen



Cumarin-Gruppen



Cumarin-4-ylmethyl

BODIPY-Gruppen

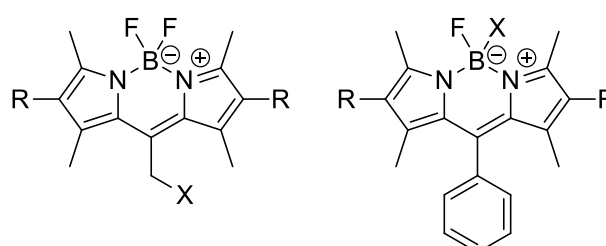
*meso*-Methyl-Bor-Dipyrromethenyl*meso*-Phenyl-Bor-Dipyrromethenyl

Abbildung 1.8. Ausgewählte Photoschutzgruppen.^[128,132,133]

Abgangsgruppen wurden mit „X“ gekennzeichnet

Neben den Ein-Photonen-PPGs gibt es noch PPGs mit einer Singulett-Sauerstoff vermittelten Abspaltung und Zwei-Photonen-PPGs.^[122,134] Mit beiden Konzepten wird eine bathochrome Verschiebung der Anregungswellenlänge erwirkt. Weitere Untersuchungen werden zeigen müssen, inwiefern sich diese PPGs für die *in-vivo*-Testung eignen.

1.3.2.1 DMNB

Die Nitroarylgruppen, wie die 4,5-Dimethyl-2-Nitrobenzyl-Schutzgruppe (DMNB), stellen die gängigsten PPGs aufgrund zahlreicher Publikationen dar.^[135–138] Gründe dafür sind die Abspaltung im Millisekunden-Bereich, eine gute Wasserlöslichkeit und ein guter synthetischer Zugang bei der Kupplung. Jedoch überlagert sich der Absorptionsbereich der PPG mit dem der geschützten Verbindung und es können bei der Abspaltung über einen cyclischen Übergangszustand potenziell toxische Metabolite wie *o*-Nitrosoaldehyde entstehen (s. Abbildung 1.9).^[128]

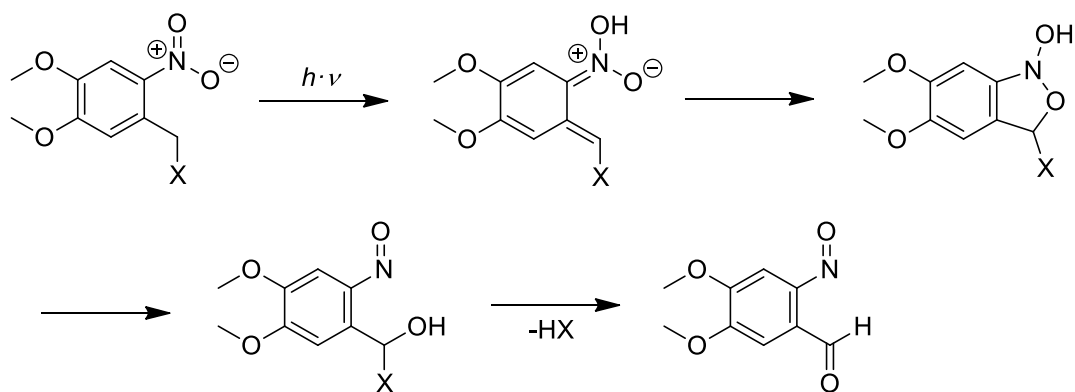


Abbildung 1.9. Mechanismus der lichtinduzierten Photoabsplattung der DMNB-PPG.^[128,129]

Auch auf Proteinkinaseinhibitoren wurde das Konzept der Photoabsplattung schon angewendet. Bereits 1998 wurde ein PKC-Peptidinhibitor mit der DMNB-PPG geschützt.^[124] 2012 folgte die Veröffentlichung eines Nitroaryl-geschützten RHO-Kinase-Inhibitors.^[123] Mit der Veröffentlichung des *caged*-Vemurafenib konnten Horbert und Pinchuk *et al.* erstmalig das Konzept der Photoabsplattung auf einen zugelassenen Kinaseinhibitor anwenden.^[139] Das Konzept konnte im Folgenden zwar auch auf andere zugelassenen Inhibitoren wie Vemurafenib angewandt werden,^[140] jedoch spielt die UV-Stabilität dabei eine entscheidende Rolle. Bei dem Versuch der Anwendung des *caging*-Konzepts auf den Kinaseinhibitor Dabrafenib konnte eine erhebliche Photosensibilität des smKI von Pinchuk *et al.* festgestellt werden.^[141] Weiterhin konnte eine lichtinduzierte Hemmung der RET-Kinase durch die Grötli-Gruppe erreicht werden.^[142] Es ist inzwischen gelungen, eine Beeinflussung des circadianen Rhythmus (an dem auch Kinasen beteiligt sind) mit Hilfe von DMNB-geschützten Chronomodulatoren vorzunehmen.^[143] Die DMNB-Gruppe war auch schon Gegenstand von Untersuchungen, die eine Kombination verschiedener Photopharmakologiekonzepte vereint. In der Studie von Flemming *et al.* wurde eine Stilben-Gruppe mit einem Spiropyran-Schalter und einer DMNB-Gruppe verknüpft.^[144] Weitere Untersuchungen müssen den Mehrwert dieser Verbindung unter Beweis stellen.

Die Toxizität der abgesplatteten PPG (*o*-Nitrosobenzaldehyd) ist aktuell noch wenig untersucht. Zwar konnte ein antiproliferativer Effekt in der Zellkultur durch Horbert *et al.* nachgewiesen werden, allerdings erst ab einer Wirkstoffkonzentration von über 10 μM .^[139] Es wurden aktuell erst einige Nitroaryl-geschützte Verbindungen in *in-vivo*-Studien getestet.^[123,142,145] Weitere Untersuchungen werden benötigt, um zu zeigen ob, andere bereits publizierte Konzepte, wie eines photoaktivierbaren Vemurafenibs, auch im Mausmodell anwendbar sind.

1.3.2.2 BODIPY

Um bioaktive Substanzen mit Licht höherer Wellenlänge freizusetzen, erfreuen sich BODIPY-Derivate (**Bo**r-**Di**pyrromethen, formal ein halbes Porphyrin-Derivat) zunehmender Beliebtheit. Bereits 2014 wurde BODIPY als PPG beschrieben.^[132] Die Schutzgruppe eignet sich scheinbar sehr gut für die Photoabspaltung, da sie vielseitig variierbar ist und ein Absorptionsmaximum von 500–600 nm aufweist. Bevor das BODIPY-Molekül in den Fokus zur Photoabspaltung rückte, wurde es schon vorher als Farbstoff^[146], Fluoreszenzmarker^[147,148] oder Photosensibilisator^[148–152] veröffentlicht.

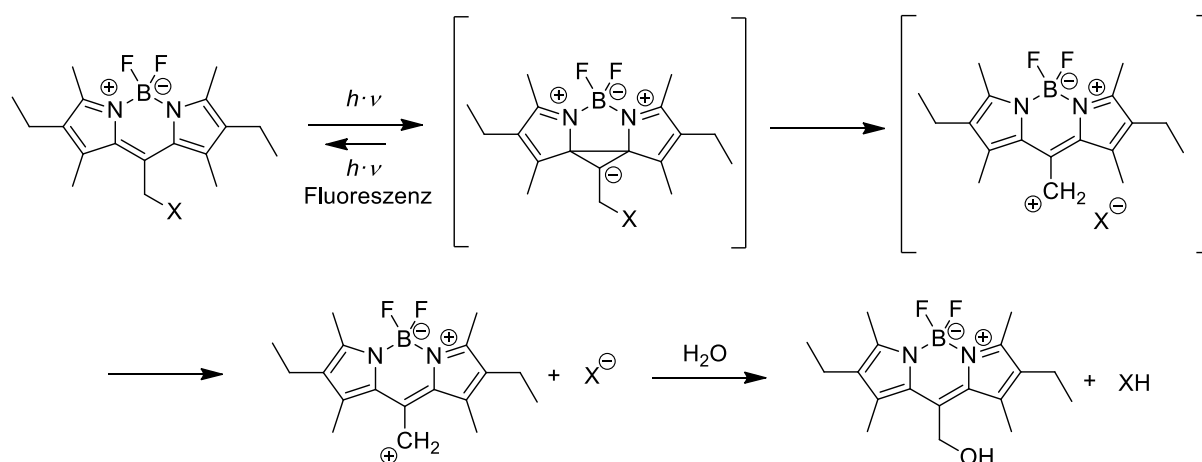


Abbildung 1.10. Postulierter Mechanismus der lichtinduzierten Photoabspaltung der *meso*-Methyl-BODIPY-PPG.^[133,153] Die Abgangsgruppe wurde mit „X“ gekennzeichnet

Der Abspaltungsmechanismus der BODIPY-PPG ist aktuell noch nicht abschließend aufgeklärt. Dem postulierten Mechanismus zufolge (s. Abbildung 1.10) geht das BODIPY-Molekül in einen angeregten Zustand über, analog zur Cumarin-PPG.^[128,154] Das System kann entweder durch Lichtemittierung in Form von Fluoreszenz zum Grundzustand zurückkehren oder unter Bildung eines Ionenpaares weiter reagieren. Nachdem sich die Abgangsgruppe („X“) gelöst hat, kann das kationische Intermediat mit dem Lösungsmittel reagieren. Bei der Abspaltung in wässrigen Medien sollte so ein Hydroxyl-BODIPY entstehen, welches sich chromatografisch nachweisen ließe. Bisher wurden in Abspaltungsexperimenten hingegen nur die Abnahme der geschützten Verbindung und die Wiederfindung der freigesetzten Abgangsgruppe gezeigt. Die Darstellung der abgespaltenen Schutzgruppe wurde aktuell noch nicht veröffentlicht.^[131–133,153,155–161] Weiterhin berichteten Takeda *et al.* von photoinstabilen BODIPY-Derivaten, die unter Bestrahlung in verschiedene Reaktionsprodukte zerfallen.^[162] Dadurch könnte die Anwendbarkeit limitiert werden, da eindeutige Reaktionsverläufe für die Verwendung von PPGs benötigt werden.

Erwähnenswert ist, dass seit 2002 bekannt ist, dass (Aza-)BODIPY-Derivate Singulett-Sauerstoff bei Bestrahlung erzeugen^[163] bzw., dass sie für photodynamische Anwendungen genutzt werden können (2004).^[164] Seit 2014 wurden regelmäßig Wirkstoffe mit BODIPY-PPGs geschützt, photochemisch charakterisiert und biologisch evaluiert.^[132] Bis ins Jahr 2019 blieb dennoch der Einfluss von Singulett-Sauerstoff auf die biologische Testung beim *Caging*-Konzept von bioaktiven Molekülen vollkommen unbeachtet (s. Tabelle 1.4). Erstmalig stellten Toupin *et al.* eine Erzeugung von Singulett-Sauerstoff bei Bestrahlung von BODIPY-geschützten Inhibitoren fest.^[158] Die Untersuchungen konnten jedoch nicht zeigen, inwiefern eine Hemmung des Zellwachstums auf die Freisetzung des Inhibitors oder auf die Erzeugung von Singulett-Sauerstoff zurückzuführen ist. Weitere Untersuchungen werden zeigen müssen, inwieweit sich photoresponsive BODIPY-Schutzgruppen im biologischen Kontext eignen, oder ob die photodynamischen Effekte sogar überwiegen.

Tabelle 1.4. Veröffentlichte Publikationen zur biologischen Testung von *caged*-BODIPY.

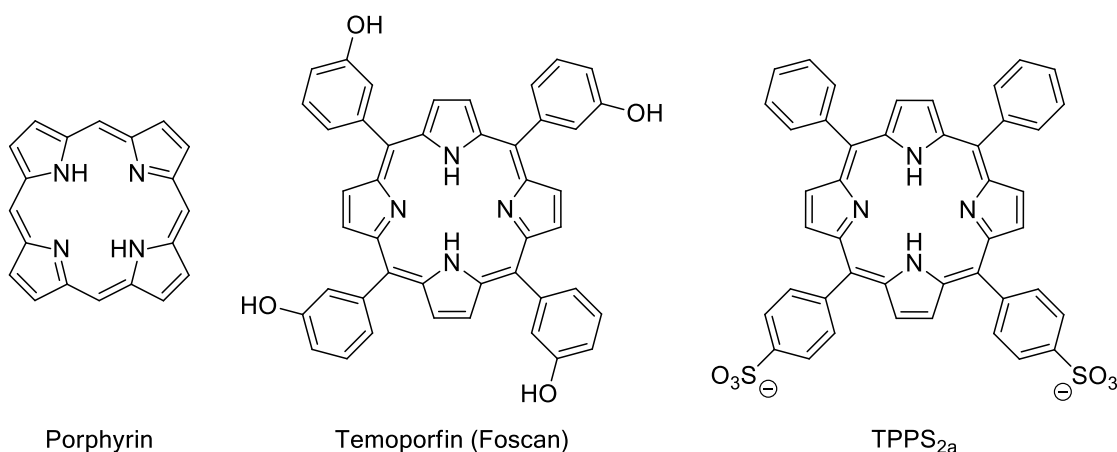
Referenz	Linker	Aktivierungswellenlänge [nm]	Untersuchung auf photodynamische Eigenschaften
Umeda <i>et al.</i> ^[132]	Bor	500	nein
Rubinstein <i>et al.</i> ^[133]	Carbamat	530/540	nein
Goswami <i>et al.</i> ^[155]	Ester	500	nein
Slanina <i>et al.</i> ^[131]	v.a. Ester	507	nein
Kawatani <i>et al.</i> ^[157]	Bor	500	nein
Toupin <i>et al.</i> ^[158]	Ester	532	ja
Kand <i>et al.</i> ^[159]	Carbamat	545	nein
Sitkowska <i>et al.</i> ^[160] (2020)	Carbamat	646–665	nein
Rodat <i>et al.</i> ^[165] (s. S. 104)	Methylamin	519/525	ja

1.3.3 Photodynamische Therapie

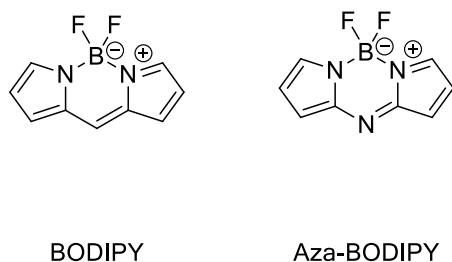
Der photodynamische Effekt wurde erstmalig von Raab (1900)^[166] und von Tappeiner (1904)^[167] beschrieben. Bei photodynamischen Prozessen wird durch Bestrahlung der Photosensibilisator (PS) angeregt und die Energie auf molekularen Sauerstoff übertragen. In Phase-1- (Elektronenübertrag) und Phase-2-Reaktionen (Energieübertrag) entstehen so nachfolgend reaktive Sauerstoffspezies (ROS), wie z.B. Singulett-Sauerstoff (1O_2). Singulett-Sauerstoff übernimmt in der Zelle die Rolle als *messenger* und kann somit die Proliferation anstoßen oder die Signalübertragung zwischen Zellen begünstigen.^[168] Für das Immunsystem sind ROS von hoher Bedeutung, da Makrophagen schneller eine unspezifische Immunantwort abbilden können als die Antikörperproduzierenden B-Zellen.^[169] Hohe Konzentrationen an Singulett-Sauerstoff können jedoch auch zu Schäden an Proteinen, Lipiden oder DNA führen und somit letztlich auch zu Mutationen, Nekrose oder Apoptose.^[149,170] Die photodynamische Therapie (PDT) macht sich diese Eigenschaften zunutze, um mit Licht bioorthogonal die Freisetzung von ROS zu steuern und malignes Gewebe zu zerstören.

Die PDT ist von allen Photopharmakologiekonzepten am längsten Gegenstand von medizinisch-wissenschaftlichen Untersuchungen.^[171] Die bekanntesten PSen in der photodynamischen Therapie sind die Porphyrine (s. Abbildung 1.11). Auch Halbporphyrine wie BODIPY-Derivate (s. Abbildung 1.11) zeigen einen photodynamischen Effekt.^[151,168] Vielfältige Variationen wurden schon veröffentlicht, um die Quantenausbeute zu erhöhen, die Anregungswellenlänge bathochrom zu verschieben, die Wasserlöslichkeit zu verbessern oder Strukturen zu integrieren, die eine zielgerichtete Therapie ermöglichen.^[172–182] Seit der Entdeckung des photodynamischen Effekts bei BODIPY-Derivaten 2004 ist es bereits gelungen die Wirksamkeit in mehreren Studien *in vivo* zu belegen.^[168,183,184] Eine Kombination von photodynamischen Effekten mit einer bildgebenden Funktion aufgrund der Fluoreszenz von BODIPY-Derivaten wurde ebenso veröffentlicht.^[184] Weiterhin werden Porphyrin-Prodrugs verwendet, die vor allem im Tumorgewebe akkumulieren. 5-Aminolävulinsäure (5-ALA, Handelsname: Levulan, s. Abbildung 1.11) beispielsweise reichert sich vor allem in Tumorzellen an und wird zu Protoporphyrin IX metabolisiert. Protoporphyrin IX ist auch ein PS und setzt somit ROS unter Bestrahlung frei, wodurch das Tumorgewebe zerstört werden kann.^[185,186] In klinischen Studien werden aktuell vor allem Porphyrine getestet. Abgeleitet von den Porphyrinen wurde die photochemische Internalisierung entwickelt (PCI).^[187–189] Durch die Funktionalisierung der Porphyrine mit Sulfonsäuregruppen steigt die Affinität der Verbindungen für eine Membraneinlagerung. In kombinierter Gabe mit zytotoxischen Makromolekülen werden die Makromoleküle per Endozytose aufgenommen und die Porphyrine in die Vesikelmembran eingelagert. Bei Bestrahlung wird der Wirkstoff intrazellulär freigesetzt.^[187] Die PCI eignet sich also gut um die Selektivität von Wirkstoffen für eine lokale Behandlung zu erhöhen.

Porphyrine



Halbporphyrine



Porphyrin-Prodrugs

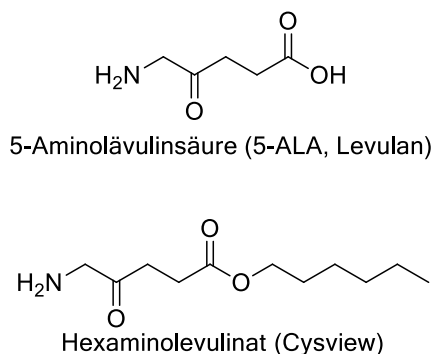


Abbildung 1.11. Ausgewählte Photosensibilisatoren für die photodynamische Therapie.^[151,171,187,190]

Mit dem ersten zugelassenen PS namens Porfimer (Handelsname: Photofrin) 1993 wurde der entscheidende Meilenstein erreicht. Bis heute gibt es über zehn zugelassene PSen in verschiedenen Ländern, die überwiegend zur Behandlung von Tumoren eingesetzt werden, wie z.B. Temoporfin.^[171,191] Interessanterweise setzt unter Behandlung von Patienten mit der PDT auch ein *remodeling* der betroffenen (Haut-)Stellen ein (erwünschte Nebenwirkung), sodass die PDT auch Anwendung in der Wundheilung und der plastischen Chirurgie finden kann.^[192,193]

Es existieren auch gezielte Ansätze, smKIs mit photodynamischen Funktionen zu kombinieren. Huang *et al.* berichteten von einem funktionalisierten Gefitinib, mit dem es möglich ist, bei Bestrahlung Singulett-Sauerstoff zu erzeugen.^[194] *In-vivo*-Studien werden zeigen müssen, wie praktikabel dieser Ansatz ist, da bei einer zielgerichteten Therapie auch Proteinkinasen durch Singulett-Sauerstoff zerstört werden können.

2 Zielstellung

Die Zielstellung dieser Arbeit gliedert sich in zwei Kernbereiche. Zum einen sollen bestehende photopharmakologische Konzepte weiterentwickelt werden, um sie für eine spätere therapeutische Nutzung zugänglicher zu machen. Zum anderen soll ein Breitspektrum-Kinase-Screening unter lichtkontrollierten Bedingungen etabliert werden, um die zellulären Vorgänge besser abbilden zu können.

2.1 Weiterentwicklung bestehender Photopharmakologiekonzepte

Die bestehenden photopharmakologischen Konzepte aus Kapitel 1.3 befinden sich aufgrund ihrer Historie in unterschiedlichen Entwicklungsstadien. Während bereits zugelassene Photosensibilisatoren wie Porfimer (Handelsname: Photofrin, Pinnacle Biologics)^[171] existieren, gibt es für Photoschalter bisher lediglich vereinzelt Studien am Tiermodell wie Maus oder Zebrafisch.^[56] Photoschutzgruppen ordnen sich sowohl historisch als auch im Fortschritt der präklinischen Entwicklung zwischen photodynamischer Therapie und Photoschaltern ein.

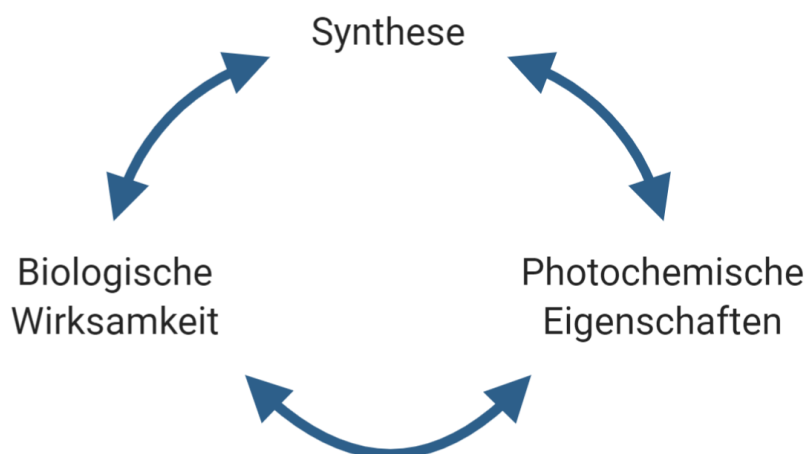


Abbildung 2.1. Kernelemente in der (Weiter-)Entwicklung photopharmakologischer Konzepte.

Wie in Abbildung 2.1 dargestellt, gilt es in der Weiterentwicklung photoresponsiver Wirkstoffe eine durchführbare chemische Synthese mit zufriedenstellenden photochemischen Eigenschaften und einer hohen biologischen Wirksamkeit in Einklang zu bringen. Dafür werden bestehende Kinaseinhibitoren mit photoschaltbaren Strukturen funktionalisiert, erst photochemisch und dann biologisch charakterisiert. Das Augenmerk liegt insbesondere auf den in Tabelle 2.1 beschriebenen Parametern.

Tabelle 2.1. Zu untersuchende Parameter bei der Weiterentwicklung photopharmakologischer Konzepte.

Parameter	Photoschalter	Photoschutzgruppen
Photochemisch	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Anregungswellenlänge ➤ hohe Konversionsrate ➤ Halbwertszeit 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Anregungswellenlänge ➤ Abspaltungskinetik
Biologisch	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Löslichkeit ➤ Wirksamkeitsunterschied der Isomere (>10) 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Löslichkeit ➤ Wirksamkeitsunterschied der Verbindungen (>100) ➤ biologisch inaktive Schutzgruppe

Vor allem eine geringe Anregungswellenlänge ist bisher noch ein Ausschlusskriterium für die praktische therapeutische Anwendung, da eine Aktivierung bisher üblicherweise bei 365 nm erfolgt und somit eine limitierte Eindringtiefe in biologische Materialien aufweist. Die Erhöhung der Anregungswellenlänge von photoresponsiven Wirkstoffen stellt somit ein wichtiges Entwicklungsziel dar. Für Photoschalter bietet sich dafür z.B. eine Diazocin-Funktionalisierung an, bei den PPGs eine Verwendung von BODIPY-Derivaten. Vor allem bei den Photoschaltern ist bisher in der Literatur ein zu geringer Unterschied in der Wirksamkeit von aktivem und inaktivem Isomer erreicht worden. Die Wirksamkeit sollte weniger in einem Faktor ausgedrückt werden, sondern viel mehr in logarithmischen Stufen, also Zehnerpotenzen, wie in der Arzneimittelentwicklung üblich.

Ziel dieser Arbeit soll es auch sein, bestehende Lücken zwischen photopharmakologischen Konzepten zu schließen, wie z.B. dem Einfluss von Singulett-Sauerstoff auf die biologische Testung bei der Photoabspaltung einer *caged*-BODIPY-Schutzgruppe.

2.2 Etablierung eines Kinaseprofilings in der Wirkstoffentwicklung

Die Vielzahl an Kinasen mit ähnlichen molekularen Zielstrukturen hat eine bedingte Selektivität bereits genutzter Kinaseinhibitoren zur Folge. In der biologischen Testung werden Inhibitoren jedoch vor allem an ihren Hauptzielen (*main targets*) getestet. Da Kinasen im zellulären Kontext in den seltensten Fällen für sich agieren, sondern häufig in ein Netzwerk aus mehreren Kinasen eingebettet sind, bleibt der Gesamteindruck der Kinomaktivität in *in-vitro* oder *in-vivo*-Studien verwehrt (s. Abbildung 2.2). Das Kinase-Screening eignet sich für eine Vielzahl von Anwendungen, von der Untersuchung der Signaltransduktionskaskade, über die

Identifizierung von Biomarkern bis hin zur patientenindividualisierten Tumorthherapie mit Kinaseinhibitoren aufgrund ermittelter Kinomprofile. Auch in Bezug auf Wirkstoffresistenzen durch Ausweichrouten oder Überaktivierung bestehender oder benachbarter Kinasen (s. Kapitel 1.2.2) sowie der Wirkstoffentwicklung von smKIs ist die Betrachtung des Kinasenetzwerks in der Zelle von Vorteil.

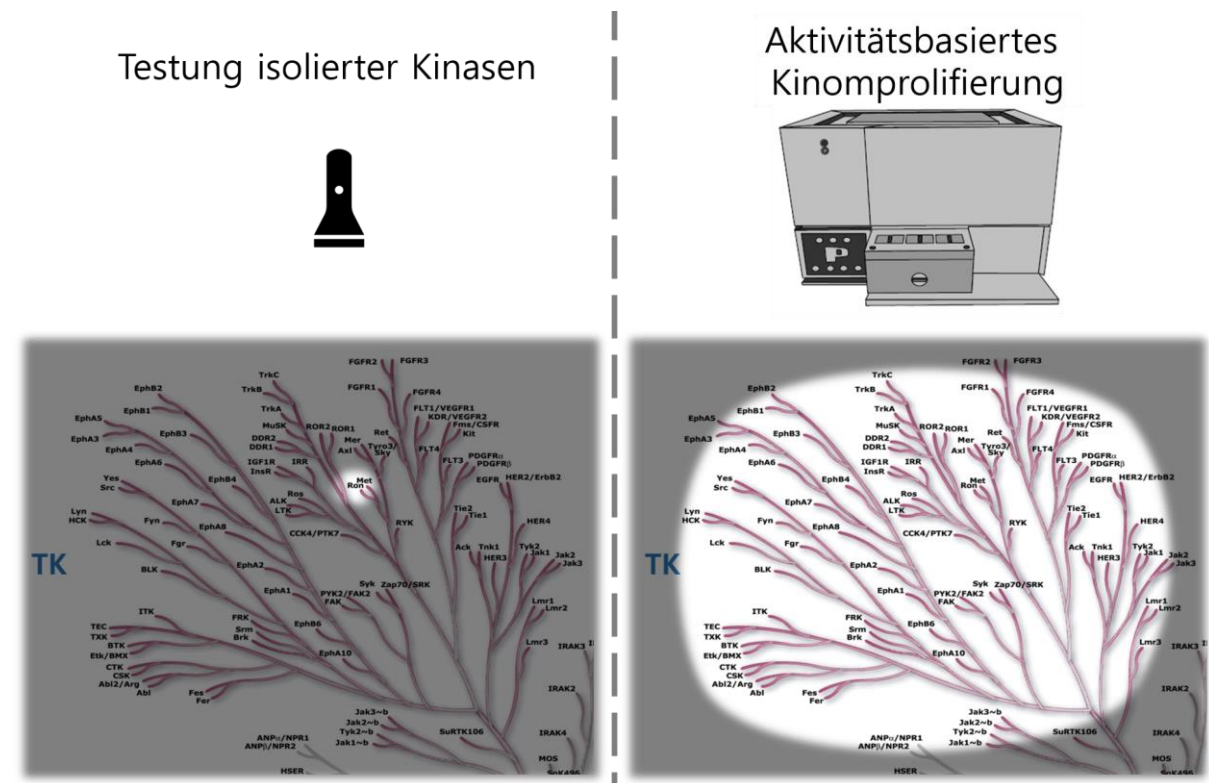


Abbildung 2.2. Herkömmliche Kinaseassays in Gegenüberstellung zu Breitspektrum-Kinase-Screenings.

Übliche Kinaseassays bilden die Aktivität einer isolierten Kinase ab (links). Aktivitätsbasierte Screenings messen die Aktivität vieler Kinasen (einer Familie) parallel bzw. im Kinasenetzwerk (rechts).

Kommerzielle Anbieter von Kinase-Screenings wie z.B. ProQinase führen *in vitro* Aktivitätsmessungen von Substanzen auf dem gesamten Kinom durch. Zur Testung von photosensitiven Wirkstoffen sind die kommerziellen Tests dennoch nicht geeignet, da ein Ausschluss von Labor- und Umgebungslicht nicht gewährleistet werden kann (s. Kapitel 3.1.1.1). Im Falle von Photoschaltern würde so bei isomerenreinen Proben eine Gleichgewichtseinstellung beider Proben im Laborlicht erfolgen und somit nur noch das PSS vermessen werden.^[195]

Mit dieser Arbeit soll ein bestehendes *in-vitro*-Kinase-Screening (Pamgene) auf seine Eignung für die Testung von photoresponsiven Wirkstoffen wie den photoschaltbaren Kinaseinhibitoren untersucht werden. Es wird geprüft, ob eine Visualisierung der Kinomaktivität bei Inhibitorgabe möglich ist. Des Weiteren wird untersucht, inwieweit sich die erhaltenen Messwerte dafür eignen, Rückschlüsse auf inhibierte Kinasen, *escape*-Routen oder *off-targets* zu identifizieren.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Photoschaltbare Kinaseinhibitoren im Kinaseprofiling

3.1.1 VEGFR2-Inhibitoren

Kinase-Kurzporträt	VEGFR2
Name	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>
Familie	Rezeptortyrosinkinase
Funktion	Vaskulogenese und Angiogenese ^[196]
Therapeutische Relevanz	Angiogenesehemmung von Tumoren ^[197]
Inhibition	zahlreiche smKIs wie z.B. Axitinib, Pazopanib, Ponatinib aber auch monoklonale Antikörper und Fusionsproteine ^[29,197,198]

Mithilfe der Ausbildung von Gefäßen und Gefäßneubildungen kann der menschliche Organismus sich auf wechselnde Begebenheiten anpassen (Embryogenese, Organwachstum, Wundheilung), um die Blutversorgung bedarfsgerecht zu erhöhen.^[196,199] Durch die gezielte Ausschüttung von Wachstumsfaktoren wie VEGF migrieren Endothelzellen, knüpfen Zell-Zell-Kontakte, proliferieren und bilden somit neue Gefäße.^[197,200–202] Vermittelt wird die VEGF-Wirkung über den VEGFR. Die Aktivierung der Tyrosinkinase hat eine netzwerkartige Signaltransduktionskaskade (p38MAPK, RAF/ERK usw.) zur Folge, an deren Ende die vermittelten Funktionen von der Zelle ausgeführt werden. Auch bei der Sekundärversorgung wachsender Tumore ist die Angiogenese von hoher Bedeutung, da bei Überschreiten einer gewissen Größe der Tumor auf eine zusätzliche Sauerstoffversorgung angewiesen ist.^[197] Auch wird der Anschluss an den Blutkreislauf neben dem lymphatischen System vom Tumor genutzt, um erfolgreich zu metastasieren. Eine Blockade der Sauerstoffzufuhr kann zu Unterversorgung führen und damit zum Untergang des Tumors. Deshalb eignet sich die VEGFRs (1–3), insbesondere VEGFR2, nicht nur gut als *target* für smKIs, sondern auch als Modell für den Einsatz photoschaltbarer Kinaseinhibitoren, da VEGFRs relativ leicht adressierbar sind und zahlreiche biologische Modelle zur Verfügung stehen.

3.1.1.1 *Axitinib – Ein photoschaltbarer zugelassener Tyrosinkinaseinhibitor*

D. Schmidt, T. Rodat, L. Heintze, J. Weber, R. Horbert, U. Girreser, T. Raeker, L. Bußmann, M. Kriegs, B. Hartke, C. Peifer

ChemMedChem **2018**, *13*, 2415

DOI: 10.1002/cmdc.201800531

Axitinib ist ein zugelassener Kinaseinhibitor zur Behandlung des kleinzelligen Nierenkarzinoms. Bekannt war zwar bereits die Photochromie aufgrund der Heteroaryl-Stilbenbindung, jedoch wurde die Photoschaltung noch nicht im biologischen Zusammenhang untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst die verschiedenen Konfigurationen von Axitinib in der VEGFR2-Bindetasche berechnet. Der vermutete Wirkverlust von der (*E*)- zur (*Z*)-Konfiguration konnte mittels Kinaseassay und Zellproliferationsassay bestätigt werden. Auf der isolierten VEGFR2-Kinase war das (*E*)-Isomer 43-mal wirksamer als das (*Z*)-Isomer und auch im HUVEC-Proliferationsassay wies das (*E*)-Axitinib eine 31-mal höhere Aktivität auf. Entscheidend ist jedoch, dass eine reversible Schaltung im Wässrigen nicht mehr möglich ist. Bei Bestrahlung mit 365 nm (*E*→*Z*) wird nur ein geringer Anteil an (*E*)-Isomer zum (*Z*)-Axitinib umgesetzt, da die Reaktion mit einer [2+2]-Cycloaddition von zwei (*E*)-Axitinibmolekülen konkurriert (s. Abbildung 3.1). Das daraus entstehende Dimer zeigte keine biologische Wirksamkeit. Eine Profilierung beider Isomere bei dem kommerziellen Anbieter ProQinase wurde angestoßen, um die Restaktivität des (*Z*)-Isomers zu erklären. Die Resultate des kommerziellen Anbieters zeigten wider Erwarten keinen signifikanten Aktivitätsunterschied beider Isomere. Der entscheidende Schritt zur erfolgreichen Messung der Wirkunterschiede lag dabei in dem Ausschluss von Labor- und Umgebungslicht in unserem Labor. Schon eine geringe Exposition von Lösungen im Laborlicht reichen aus, um eine Photoisomerisierung zum PSS zu verursachen, da die Laborlampen selbst Licht mit einer Wellenlänge von 365 nm emittieren (s. Anhang Abbildung 8.1). Mit den gewonnenen Erkenntnissen konnte erfolgreich ein Kinase-Screening für photoschaltbare Kinaseinhibitoren etabliert werden, indem die Messungen mittels Pamgene-Technologie (s. Methoden, Kapitel 6.4.7 Multi-Kinase-Profilung, S. 134) in Kooperation mit dem UKE, Hamburg unter kontrollierten Lichtbedingungen durchgeführt wurden. Die Kinom-Profile unterschieden sich in Abhängigkeit zur Behandlung der Isomere (unbestrahltes (*Z*)-Axitinib: kaum Inhibition, bestrahltes (*Z*)-Axitinib äquivalent zum (*E*)-Axitinib, also deutliche Inhibition).

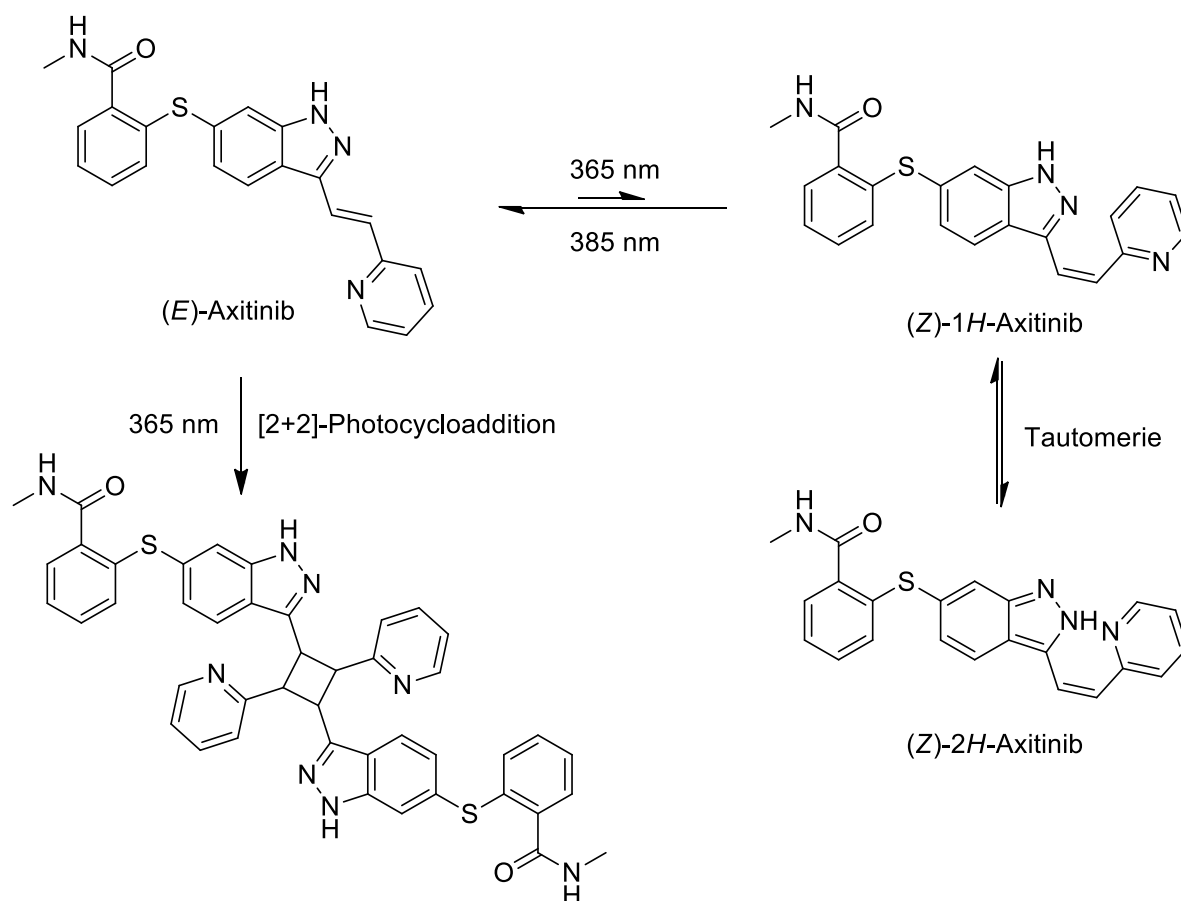


Abbildung 3.1. Semireversible Photoisomerisierung von Axitinib im wässrigen Medium.^[195]

Aufgrund der limitierten Schaltbarkeit im Wässrigen erweist sich das Stilbenkonzept als nicht wirkungsvoll für einen reversiblen Photoschalter. Weitere Funktionalisierungen der Axitinibstruktur sollten zeigen, ob sich das Molekül dennoch grundsätzlich zur Entwicklung eines photoschaltbaren Kinaseinhibitors eignet. Für klinische Studien mit Axitinib ist zu beachten, dass gelöstes Axitinib unter Raumlicht an Wirksamkeit einbüßt aufgrund einer geringen Schaltung zum inaktiven (*Z*)-Axitinib.

Das Kinom-Profilung wurde ursprünglich zur Identifizierung möglicher aktivierter Ausweichrouten im Kinasenetzwerk oder *off targets* von (*Z*)-Axitinib etabliert. Im durchgeführten Kinase-Screening konnten jedoch keine überaktiven Signaltransduktionswege ermittelt werden. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die Restaktivität vom (*Z*)-Axitinib entweder von einer nicht 100 % isomerenreinen Auftrennung bzw. einer geringen Rückschaltung zum aktiven (*E*)-Axitinib herrührt oder von einer Zytotoxizität aufgrund von ausgefallenem (*Z*)-Axitinib.

Axitinib: A Photoswitchable Approved Tyrosine Kinase Inhibitor

Dorian Schmidt⁺,^[a] Theo Rodat⁺,^[a] Linda Heintze,^[a] Jantje Weber,^[a] Rebecca Horbert,^[a] Ulrich Girreser,^[a] Tim Raeker,^[b] Lara Bußmann,^[c, d] Malte Kriegs,^[d] Bernd Hartke,^[b] and Christian Peifer^{*[a]}

The goal of photopharmacology is to develop photoswitchable enzyme modulators as tunable (pro-)drugs that can be spatially and temporally controlled by light. In this context, the tyrosine kinase inhibitor axitinib, which contains a photosensitive stilbene-like moiety that allows for *E/Z* isomerization, is of interest. Axitinib is an approved drug that targets the vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) and is licensed for second-line therapy of renal cell carcinoma. The photoinduced *E/Z* isomerization of axitinib has been investigated to explore if its inhibitory effect can be turned “on” and “off”, as triggered by light. Under controlled light conditions, (*Z*)-axiti-

nib is 43 times less active than that of the *E* isomer in an VEGFR2 assay. Furthermore, it was proven that kinase activity in human umbilical vein cells (HUVECs) was decreased by (*E*)-axitinib, but only weakly affected by (*Z*)-axitinib. By irradiating (*Z*)-axitinib in vitro with UV light ($\lambda = 385$ nm), it is possible to switch it almost quantitatively into the *E* isomer and to completely restore the biological activity of (*E*)-axitinib. However, switching the biological activity off from (*E*)- to (*Z*)-axitinib was not possible in aqueous solution due to a competing irreversible [2+2]-photocycloaddition, which yielded a biologically inactive axitinib dimer.

Introduction

Controlling the biological activity of proteins, such as cellular enzymes or receptors, by targeted irradiation with light is a fascinating and promising approach in photopharmacology and chemical biology.^[1–4] In general, photoresponsive compounds can be used to translate the focused effect of the external stimulus, “light,” into biological systems. Such photochromic compounds can be designed as molecular switches that are either covalently linked to biomolecules or act as photosensitive ligands/modulators of the desired protein.^[2,4] Photoswitchable ligands are powerful tools to investigate and elucidate complex biological systems because they enable precise spatial and temporal control of the targeted protein from out-

side (biorthogonal). Ideally, this photomodulation is reversible, which is in contrast to nonswitchable “caged” approaches. Beyond their relevance as pharmacological tools in basic research, the use of photoswitchable enzyme modulators as tunable (pro-)drugs in therapeutic applications is the vision of photopharmacology. Potential advantages of photopharmacology, relative to classical pharmacotherapy, include highly focused treatment, decreased side effects, preventing environmental contamination, and lowering emergence of resistance.^[5,6] Photoswitchable enzyme modulators reported so far are often azo-functionalized compounds and comprise, among others, inhibitors of acetylcholinesterase,^[7–10] antibacterial agents,^[11,12] microtubule targeting agents,^[13,14] modulators of GABA_A receptors,^[15,16] and agonists for μ -opioid receptors.^[17]

Regarding the field of protein kinases, only a few photosensitive small-molecule compounds have been reported. Most of these inhibitors are caged prodrugs, that is, kinase inhibitors modified with a photoremovable protecting group that can be irreversibly cleaved by light.^[18–20] In line with this notion, our group has published photoactivatable prodrugs of the approved kinase inhibitors vemurafenib^[21] and imatinib^[22] in the past few years. A drawback of the caging approach is that activation remains irreversible and involves the release of a by-product upon uncaging. Reversibly photoswitchable kinase inhibitors could overcome these limitations, but the development of such compounds seems to be challenging. On one hand, Ferreira et al.^[23] and Wilson et al.^[24] published the first promising examples, including a photoswitchable azo-functionalized RET kinase inhibitor and a diarylethene-based protein kinase C inhibitor. On the other hand, these compounds

[a] D. Schmidt,⁺ T. Rodat,⁺ L. Heintze, J. Weber, Dr. R. Horbert, Dr. U. Girreser, Prof. C. Peifer
Institute of Pharmacy, Christian Albrechts University of Kiel,
Gutenbergstraße 76, 24116 Kiel (Germany)
E-mail: cpeifer@pharmazie.uni-kiel.de

[b] Dr. T. Raeker, Prof. B. Hartke
Institute for Physical Chemistry, Christian Albrechts University of Kiel, Max-Eyth-Strasse 1, 24118 Kiel (Germany)

[c] Dr. L. Bußmann
University Cancer Center Hamburg, University Medical Center Hamburg–Eppendorf, Department of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery, Martinistrasse 52, 20246 Hamburg (Germany)

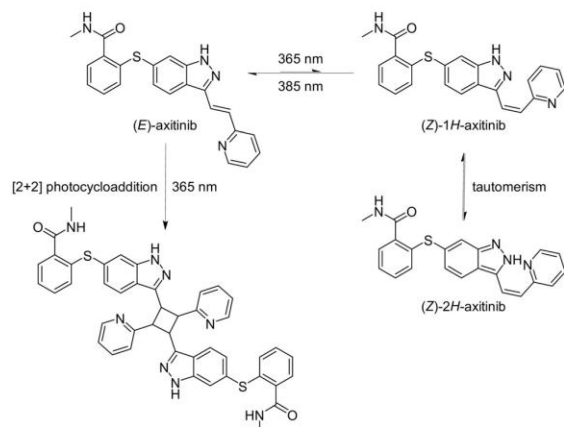
[d] Dr. L. Bußmann, Dr. M. Kriegs
Laboratory of Radiobiology & Experimental Radiooncology and UCCH Kinomics Core Facility, University Medical Center Hamburg–Eppendorf, Martinistrasse 52, 20246 Hamburg (Germany)

[*] These authors contributed equally to this work.

Supporting information and the ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under:
<https://doi.org/10.1002/cmdc.201800531>.

show only small activity differences between both configurations or the activity of the bioactive configuration is rather low.

In this study, we became interested in the approved kinase inhibitor axitinib, which exhibits a photosensitive stilbene-like moiety that allows for *E/Z* isomerization (Scheme 1).



Scheme 1. Photoinduced *E-Z* isomerization of axitinib and the formation of 1*H*- and 2*H*-indazole annular tautomers in DMSO. In an aqueous solution, irradiation of (*E*)-axitinib at $\lambda = 365$ nm leads to a [2+2]-photocycloaddition that competes with *E-Z* isomerization.

Axitinib is an indazole-based small-molecule tyrosine kinase inhibitor that was approved in 2012 for second-line therapy of advanced renal cell carcinoma (RCC).^[25,26] Its antiangiogenic effect is based on the inhibition of vascular endothelial growth factor receptors 1–3 (VEGFR1–3) and further related kinases, such as the platelet-derived growth factor receptor beta (PDGFR β) or the receptor tyrosine kinase KIT (c-Kit).^[27] Furthermore, axitinib was discovered to effectively inhibit a mutant of BCR-ABL1 that is often responsible for acquired drug resistance in chronic myeloid leukemia (CML).^[28] In addition to a decisive role in cancer therapy, axitinib has been instrumental in numerous *in vitro* and *in vivo* experiments.^[27,29,30] The approved active pharmaceutical ingredient (API) axitinib (Inlyta[®] from Pfizer) is available as light-stable tablets; however, the photostability of axitinib in the solid state is strongly dependent on the particular polymorphic form.^[31,32] Light-mediated *E/Z* isomerization of axitinib in solution has been reported rudimentarily.^[31,33,34] To our surprise, the *Z* isomer is only briefly characterized in associated patents,^[35,36] and, to the best of our knowledge, there are no reports in the literature on the bioactivity of (*Z*)-axitinib.

Results and Discussion

Molecular modeling

To explore if axitinib might be suitable as a photoswitchable kinase inhibitor, we initially performed molecular modeling studies for both (*E*)- and (*Z*)-axitinib. The binding mode of (*E*)-axitinib in the adenosine triphosphate (ATP) pocket of VEGFR2

was elucidated by X-ray crystallography in 2012 (Figure 1).^[27] Axitinib is an ATP competitive kinase inhibitor and binds to the inactive DFG_{out} conformation of the kinase (type II inhibitor^[37]). Compared with other type II inhibitors, axitinib does not ad-

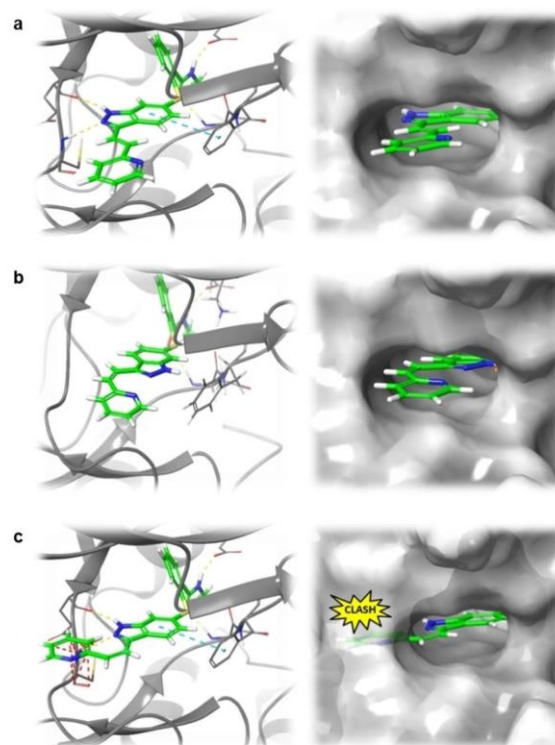


Figure 1. Binding modes of (*E*)- and (*Z*)-axitinib in the ATP pocket of VEGFR2. a) X-ray crystal structure of (*E*)-axitinib with VEGFR2 (PDB ID: 4AG8^[27]). Yellow dotted lines represent hydrogen bonds between the ligand and protein, light blue dotted lines indicate π - π stacking. b) Calculated binding mode of (*Z*)-axitinib in the ATP pocket of VEGFR2. Herein, hydrogen bonding to the hinge region is not possible in the *Z* configuration. c) Illustrative superposition of (*Z*)-axitinib with the hinge binding motif of (*E*)-axitinib in VEGFR2 resulted in significant steric clashes with the protein (Figure 1 c). Thus, our modeling suggests (*E*)-axitinib to be the biologically active isomer, whereas (*Z*)-axitinib is considered to be inactive against VEGFR2. Motivated by these results, we set out to prove this hypothesis experimentally.

dress the deep pocket of the DFG_{out} conformation. The indazole core is placed in the adenine-binding region and forms two key hydrogen bonds to the hinge region. The benzamide moiety addresses two buried hydrogen bonds deep in the ATP pocket (Figure 1 a). In contrast, docking of (*Z*)-axitinib into the ATP binding pocket of VEGFR2 revealed only implausible binding modes without hinge interactions because hydrogen bonding to the hinge region was not possible in the *Z* configuration (Figure 1 b). In line with this notion, an illustrative superposition of (*Z*)-axitinib with the hinge binding motif of (*E*)-axitinib in VEGFR2 resulted in significant steric clashes with the protein (Figure 1 c). Thus, our modeling suggests (*E*)-axitinib to be the biologically active isomer, whereas (*Z*)-axitinib is considered to be inactive against VEGFR2. Motivated by these results, we set out to prove this hypothesis experimentally.

Photochemistry

(*Z*)-Axitinib is either synthetically accessible through Sonogashira^[38] coupling of 2-ethynylpyridine with the appropriate 3-iodoindazole derivative as a starting material and subsequent hydrogenation by using the Lindlar catalyst,^[39] or photochemically through isomerization of (*E*)-axitinib.^[35,36] In this study, we enriched (*Z*)-axitinib straightforwardly by irradiating a solution of commercially available (*E*)-axitinib in DMSO at $\lambda = 365$ nm for 30 min, and subsequently separated both isomers by chromatography. Surprisingly, NMR spectroscopy analysis of the isolated *Z* isomer indicated the existence of two different (*Z*)-axitinib species in a ratio of 60/40. Both spectra sets showed the characteristic smaller H–C–H coupling constant of 12.8 Hz for a (*Z*)-alkene, in contrast to 16.4 Hz for (*E*)-axitinib. Because indazoles are known to show NH tautomerism,^[40–42] we hypothesized that two (*Z*)-axitinib tautomers have formed, namely, the 1*H* and 2*H* tautomers (Scheme 1).

Indeed, X-ray crystallography proved the existence of the 2*H* tautomer, which was stabilized by an intramolecular hydrogen bond between the 2*H*-indazole and the pyridine nitrogen atom (Figure 2 and Table 3 in the Supporting Information). Therefore, hereafter the term (*Z*)-axitinib essentially describes a mixture of both tautomers.

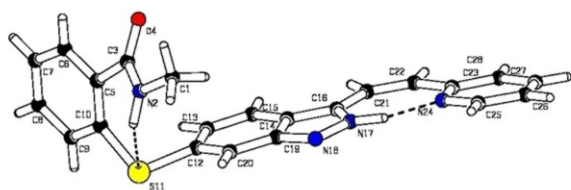


Figure 2. X-ray crystal structure of the 2*H* tautomer of (*Z*)-axitinib. (CCDC 1419085 contains the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge from The Cambridge Crystallographic Data Centre.) In the solid state, only the 2*H* tautomer was detected by X-ray analysis; this tautomer was stabilized by an intramolecular hydrogen bond between the 2*H*-indazole (N17) and the pyridine nitrogen atom (N24).

Having the purified *E* and *Z* isomers in hand, we further investigated the photoinduced *E/Z* isomerization of axitinib. First, we recorded the absorption spectra of both isolated isomers in DMSO (Figure 3a) and water (Figure 3b). (*E*)-Axitinib shows an intense absorption band between $\lambda = 280$ and 370 nm with a maximum at $\lambda = 335$ nm and a very low intense shoulder between $\lambda = 380$ and 400 nm. In contrast, (*Z*)-axitinib was measured to have a less intense and broader absorption band, but showed a higher absorption in the range between 375 and 420 nm, relative to that of (*E*)-axitinib. PSSs were determined by HPLC analysis and ¹H NMR spectroscopy (Table 1 and Figure 1 in the Supporting Information). In DMSO, irradiation at $\lambda = 365$ nm causes *E*→*Z* isomerization, resulting in a PSS of *E/Z* = 40/60%. Irradiation at $\lambda = 330$ nm resulted in a similar PSS (Figure 2a in the Supporting Information). Reverse *Z*→*E* switching can be achieved at $\lambda = 385$ nm, leading to a PSS of *E/Z* = 78/22%.

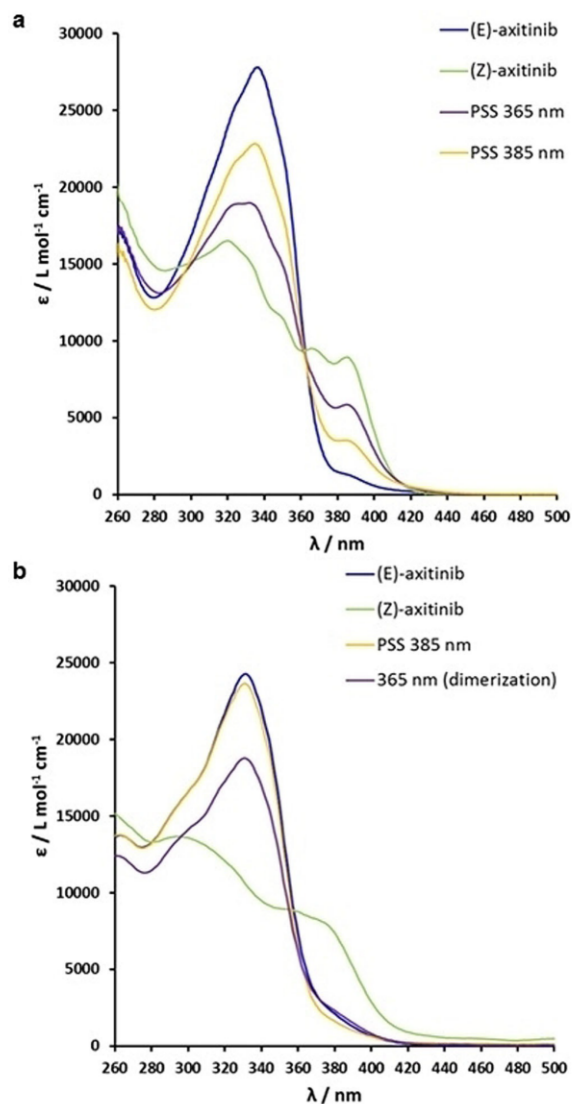


Figure 3. UV/Vis spectra of (*E*)- and (*Z*)-axitinib, as well as photostationary states (PSSs), at different wavelengths in a) DMSO and b) water (with 5% DMSO).

Table 1. PSSs of axitinib at $\lambda = 365$ and 385 nm in DMSO and water determined by HPLC analysis.

Isomer	PSS _{365 nm} [%] ^[a] in DMSO	PSS _{385 nm} [%] ^[a] in DMSO	PSS _{385 nm} [%] ^[a] in water
(<i>E</i>)-axitinib	40 (51)	78 (88)	96 (n.d.)
(<i>Z</i>)-axitinib	60 (49)	22 (12)	4 (n.d.)

[a] Values in parentheses are those of PSSs determined by ¹H NMR spectroscopy; n.d.: not determined.

In contrast to stilbene or stilbene-like systems, we did not observe significant photofatigue in DMSO after ten switching

cycles (Figure 2b in the Supporting Information). On the other hand, irradiation of an aqueous solution of (*E*)-axitinib at $\lambda = 365$ nm leads to a [2+2]-cyclophotoaddition that competes with *E/Z* isomerization (Scheme 1). Dimerization of axitinib was also observed by Sluggett in another study.^[31] However, irradiation of (*Z*)-axitinib at $\lambda = 385$ nm in water does not result in a [2+2]-cyclophotoaddition, but yields (*E*)-axitinib almost quantitatively. Similar photochemical behavior in water has been reported for several alkenes and stilbene-like systems.^[43–45] In aqueous solution, hydrophobic molecules tend to aggregate, and consequently, facilitate [2+2]-cyclophotoadditions, but photoaddition is presumed to occur only from the excited singlet state of the *E* isomer.^[44] NMR spectroscopy analysis of the isolated photoproduct indicated that mainly a centrosymmetric cyclobutane derivative was formed.

Regarding biological assay conditions, under light protection, both axitinib isomers are thermally stable at 37 °C in aqueous solution (Figure 3 in the Supporting Information). In summary, in DMSO, photoswitching is reversible, but incomplete, whereas in water *Z*→*E* switching is irreversible, but almost quantitative.

The redshifted absorption band of (*Z*)-axitinib is unusual, relative to stilbene or other stilbene-like systems. Typically, the absorption band of the *Z* isomer is hidden under the more intense band of the *E* isomer, which often makes selective excitation of the *Z* isomer difficult.^[46] In the case of axitinib, we attribute the redshift to interactions between 2*H*-indazole and the pyridine nitrogen atom in the *Z* configuration, as observed in the small-molecule X-ray structure (Figure 2). Similar observations have been reported for related indole- and quinoline-based systems.^[47,48] To provide further evidence for our hypothesis, we calculated vertical excitation energies for optimized (*E*)-axitinib, as well as for both (*Z*)-axitinib tautomers at the B3LYP-D3BJ/def2-TZVP level of theory (Table 2). Data show

Isomer	Δ [eV] ^[a]	$S_0 \rightarrow S_1$ [eV]	$S_0 \rightarrow S_2$ [eV]
(<i>E</i>)-axitinib	0	3.53	3.70
(<i>Z</i>)-1 <i>H</i> -axitinib	0.26 (0.25)	3.63	3.73
(<i>Z</i>)-2 <i>H</i> -axitinib	0.10 (0.08)	3.01	3.45

[a] Values in parentheses include the zero-point vibrational energy.

that (*Z*)-2*H*-axitinib is favored over (*Z*)-1*H*-axitinib in the ground state due to the intramolecular hydrogen bond. Also, the S_1 and S_2 states of the 2*H*-tautomer are lower in energy, resulting in a redshifted UV/Vis absorption spectrum compared with that of (*E*)-axitinib (Figure 4 in the Supporting Information). We also calculated relative energies and vertical excitation energies for an *N*-methylated axitinib derivative, as well as an *N*-phenyl-substituted axitinib derivative, to suppress intramolecular hydrogen bonding. In both cases, the 1*H*- or 1*Me* tautomer, respectively, is lower in energy and no redshifts can be observed in the calculated UV/Vis spectra (Table 1 in the Supporting Information).

Kinase assays

First, we submitted both separated isomers to an in vitro IC_{50} VEGFR2 kinase assay determination and selectivity profiling in a panel of 300 kinases, as offered by the commercial provider ProQinase (Figure 4). To our surprise and in contrast to our

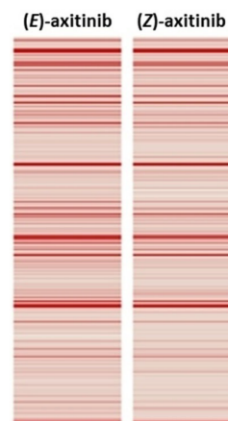


Figure 4. Selectivity profiles of (*E*)- and (*Z*)-axitinib in a panel of 300 kinases at an assay concentration of 1 μ M, as determined by the commercial provider ProQinase (Freiburg, Germany) under ambient light conditions. The inhibitory effects of (*E*)- and (*Z*)-axitinib were tested by determination of the residual kinase activity; these results are shown as heat maps. Every bar represents a single kinase with a color code ranging from red (low residual activity) to white (high residual activity). For (*E*)-axitinib, a selectivity score (number of kinases with residual activity < 50%/total number of tested kinases) of 0.117 was determined. Profiling of (*Z*)-axitinib resulted in a similar selectivity score of 0.083.

modeling data, only negligible differences between both isomers could be observed in the VEGFR2 kinase assay with IC_{50} values of 25 nM for (*E*)-axitinib and 65 nM for (*Z*)-axitinib (Figure 5 in the Supporting Information). In line with these results, both isomers showed almost identical selectivity profiles in the 300 kinase panels (Table 2 in the Supporting Information). However, these experiments were performed as automated high-throughput screenings under ambient laboratory light conditions. Taking the very low test concentration of 1 μ M into account, we hypothesized that PSSs were reached for both isomers under the present assay conditions; thus leading to similar results for both test solutions. Consequently, we set up an in-house ADP-Glo™ VEGFR2 kinase assay and performed the experiments under controlled light conditions by using weak red light-emitting diodes (LEDs) as light sources in our darkened laboratory. Indeed, in these experiments, we could demonstrate that (*Z*)-axitinib was 43 times less active than that of (*E*)-axitinib under controlled light conditions (Table 3 and Figure 5a). To make sure that no isomerization took place during the in vitro experiments, we double-checked all test solutions after assay incubation by HPLC analysis. To verify the ProQinase results mentioned above, we also repeated our in-house experiments under ambient light conditions. Herein, we achieved similar results to those of the ProQinase screenings, with IC_{50}

Table 3. IC₅₀ values of (*E*)-axitinib, (*Z*)-axitinib, or PSSs in an in vitro non-radiometric ADP-Glo™ VEGFR2 assay under various light conditions.

Light condition	IC ₅₀ [nM]	[IC ₅₀ (<i>Z</i>)]/[IC ₅₀ (<i>E</i>)]
ambient light	<i>E</i> = 56 <i>Z</i> = 59	1.1
red light	<i>E</i> = 19 <i>Z</i> = 817	43
λ = 385 nm	PSS = 29	–

values of 56 and 59 nM for (*E*)- and (*Z*)-axitinib, respectively, in their appropriate PSS mixtures (Figure 6c in the Supporting Information). In addition, we also tested both isolated axitinib isomers in an in vitro PDGFRβ kinase assay and observed similar activity differences to those in the VEGFR2 assay (Figure 6f in the Supporting Information).

Next, we wanted to control the biological activity of axitinib in the VEGFR2 kinase assays by irradiation with UV light. For this purpose, we irradiated the kinase assay at λ = 385 nm after the addition of (*Z*)-axitinib. In this case, an IC₅₀ value of 29 nM was determined, which suggested an almost quantitative conversion of (*Z*)-axitinib into (*E*)-axitinib in vitro (Figure 5b).

We then repeated the experiment with (*E*)-axitinib, but irradiated at λ = 365 nm. In this case, an IC₅₀ value of 44 nM was obtained (Figure 6d in the Supporting Information). Due to our previous irradiation experiments in water, we suspected a [2 + 2]-photocycloaddition at λ = 365 nm in the kinase assay, but assumed that dimerization might be suppressed due to solvated buffer components (e.g., BSA) in the assay mixture.^[45] In

fact, we analyzed the assay solution after irradiation at λ = 365 nm by means of LC–MS and detected a mixture of (*E*)-axitinib, (*Z*)-axitinib, and [2 + 2]-dimer (Scheme 1 and Figure 7 in the Supporting Information). Hence, the photochemical process in aqueous systems is more complex than that in DMSO. Notably, the isolated [2 + 2]-dimer itself showed no significant activity in the VEGFR2 assay (Figure 6e in the Supporting Information).

Cellular assays

Motivated by the enzymatic assay data, we investigated if the results from the in vitro kinase assays could be transferred to a cellular system under controlled light conditions. For this purpose, we set up a HUVEC proliferation assay. HUVECs are VEGFR2-dependent and represent a well-studied model system for angiogenesis.^[49] Furthermore, we have chosen this cell line in particular because it has been used in several axitinib studies previously.^[30,50,51] Dose–response curves for both separated axitinib isomers in the dark are shown in Figure 5c. For (*E*)-axitinib, an IC₅₀ value of 0.83 μM was determined, which was in good agreement with literature results.^[50] In contrast, (*Z*)-axitinib was 31 times less active, with an IC₅₀ value of 26 μM. In HUVEC cells, (*E*)-axitinib is cytostatic above a concentration of 15 nM and cytotoxic above 1 μM, whereas (*Z*)-axitinib is not cytotoxic up to a concentration of 30 μM. These results corroborate the differing activities of both axitinib isomers in our in vitro kinase assays. The cytotoxic effect of (*Z*)-axitinib at high

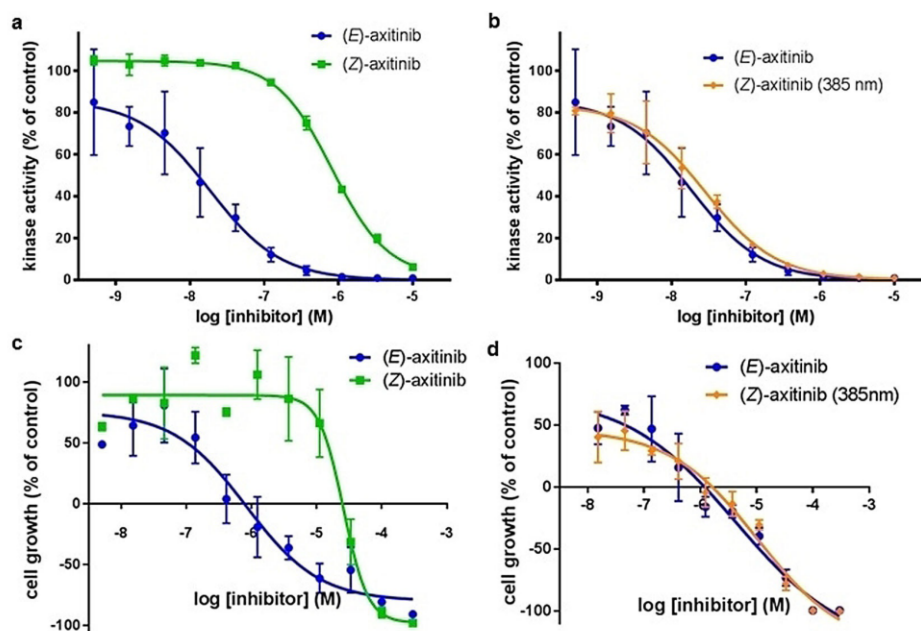


Figure 5. a) Dose–response curve of (*E*)- (blue circles, IC₅₀ = 19 nM) and (*Z*)-axitinib (green squares, IC₅₀ = 817 nM) in an in vitro VEGFR2 kinase assay under red light. b) Dose–response curve of (*Z*)-axitinib irradiated at λ = 385 nm (orange diamonds, IC₅₀ = 29 nM) in an in vitro VEGFR2 kinase assay, compared with (*E*)-axitinib (blue circles, IC₅₀ = 19 nM). c) Dose–response curves of (*E*)- (blue circles, IC₅₀ = 0.83 μM) and (*Z*)-axitinib (green squares, IC₅₀ = 26 μM) in a human umbilical vein cell (HUVEC) proliferation assay. d) Dose–response curve of (*Z*)-axitinib irradiated at λ = 385 nm (orange diamonds, IC₅₀ = 10 μM), compared with (*E*)-axitinib (blue circles, IC₅₀ = 4.3 μM), in a HUVEC proliferation assay. Data points are means of two measurements with standard deviations as error bars.

concentrations could be explained by the inhibition of other kinases and/or off-targets, but might also be due to potential precipitation at high concentrations in the cell assay ((*Z*)-axitinib is poorly soluble in water). In the cellular assays, we also tried to restore the biological activity of (*Z*)-axitinib by irradiating the assay mixture at $\lambda = 385$ nm. As a control, we checked if the HUVECs suffered from comparable irradiation with UV light, but without compound incubation. Fortunately, the endothelial cells tolerated irradiation at $\lambda = 385$ nm for 5 min quite well, without any significant decrease in the number of cells (Figure 8 in the Supporting Information). Upon irradiation of the treated cells at $\lambda = 385$ nm, the inhibition curve of irradiated (*Z*)-axitinib coincided with the inhibition curve of (*E*)-axitinib, so that similar IC_{50} values for (*E*)-axitinib ($IC_{50} = 4.3 \mu\text{M}$) and irradiated (*Z*)-axitinib ($IC_{50} = 10 \mu\text{M}$) could be determined. These results also suggest a high *Z*→*E* switching efficiency in the cellular assay system. Because irradiation of the *E* isomer at $\lambda = 365$ nm in an aqueous medium resulted in a more complex mixture in the in vitro kinase assay (low *E*→*Z* conversion, irreversible dimerization), we did not irradiate (*E*)-axitinib in cellular assays.

Western blots

In addition to proliferation assays, we aimed to investigate the particular impact of (*E*)- and (*Z*)-axitinib on VEGFR2 and PDGFR β signaling under controlled light conditions in endothelial cells (HUVECs) and fibroblast cells (NIH/3T3).^[52,53] In HUVECs, (*E*)-axitinib inhibits the phosphorylation of VEGFR2 and decreases phosphorylation of the downstream kinase AKT (Figure 6). In contrast, phosphorylation of VEGFR2 and AKT is less affected by (*Z*)-axitinib. Through irradiation of (*Z*)-axitinib at $\lambda = 385$ nm, the activity could be restored.

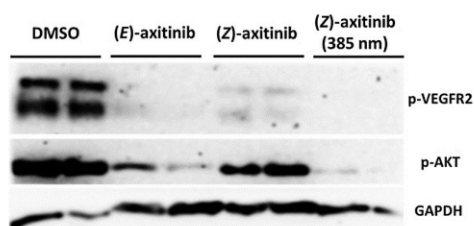


Figure 6. Western blot analyses of HUVECs treated with (*E*)-axitinib, (*Z*)-axitinib, or (*Z*)-axitinib irradiated at $\lambda = 385$ nm. The amounts of phosphorylated VEGFR2 (p-VEGFR2) and phosphorylated AKT (p-AKT) are shown. GAPDH has been used as a loading control. Experiments were performed in duplicate and yielded similar results.

Western blot analyses in lysed and immunoblotted NIH/3T3 cells show the inhibition of the phosphorylation of PDGFR β (Figure 7). By comparing the impact of both axitinib isomers on the phosphorylation of PDGFR β , (*E*)-axitinib inhibits phosphorylation at concentrations higher than $0.01 \mu\text{M}$, whereas (*Z*)-axitinib is not active below a concentration of $10 \mu\text{M}$.

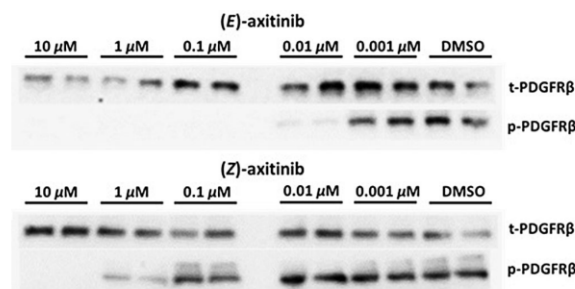


Figure 7. Western blot analyses of NIH/3T3 cells treated with (*E*)- or (*Z*)-axitinib. The total amount of PDGFR β (t-PDGFR β) versus the phosphorylated amount of PDGFR β (p-PDGFR β) is shown. Experiments were performed in duplicate and yielded similar results.

Kinase activity profiling

On the basis of the cellular assay results, we wanted to elucidate which further protein kinases and associated signal pathways were affected by (*E*)- and (*Z*)-axitinib. As outlined earlier, kinase selectivity profiling is mostly performed by commercial providers in a high-throughput screening mode under ambient light conditions; it is not possible to retain control over the light conditions during these experiments or the light conditions are unclear (cf. Figure 4). Accordingly, expanded selectivity profiling of light-sensitive inhibitors is a general issue in the field of photopharmacology.

We therefore aimed to use a kinase activity profiling technique that can be set up under controlled light conditions. In this context, we investigated the kinase activity of HUVECs after treatment with (*E*)- or (*Z*)-axitinib by using the PamGene Pamstation[®] and PamChip[®] technology.^[54–57] The advantage of this method, with regard to photosensitive compounds, is that the experiments can be performed in the dark or under controlled light conditions. Furthermore, different excitation wavelengths, ranging from $\lambda = 460$ to 650 nm, are available for read-out. Figure 8a shows the recorded phosphorylation profiles of HUVEC lysates treated with (*E*)- or (*Z*)-axitinib. The overall degree of phosphorylation is highly reduced in the presence of (*E*)-axitinib or VEGFR2 inhibitor pazopanib^[58] as a positive control, relative to DMSO. In contrast, phosphorylation of most substrate peptides is clearly less affected by treatment with (*Z*)-axitinib. If (*Z*)-axitinib is irradiated at $\lambda = 385$ nm, the phosphorylation levels are diminished and the appearance of the corresponding heat map changes toward that generated by (*E*)-axitinib (Figure 8b). By taking a closer look at the particular peptides on the microarrays, (*E*)-axitinib and irradiated (*Z*)-axitinib lead to a significantly reduced phosphorylation of more than 50 peptides, whereas in the case of (*Z*)-axitinib only six peptides are significantly less phosphorylated (Figure 8c).

Performing upstream kinase analysis based on the peptide phosphorylation pattern, by using the PamGene Bionavigator software, it is generally possible to predict specific kinases that are responsible for the appropriate substrate phosphorylation. Thus, in the presence of compounds blocking kinase activities, characteristic inhibitor profiles can be determined. In the case

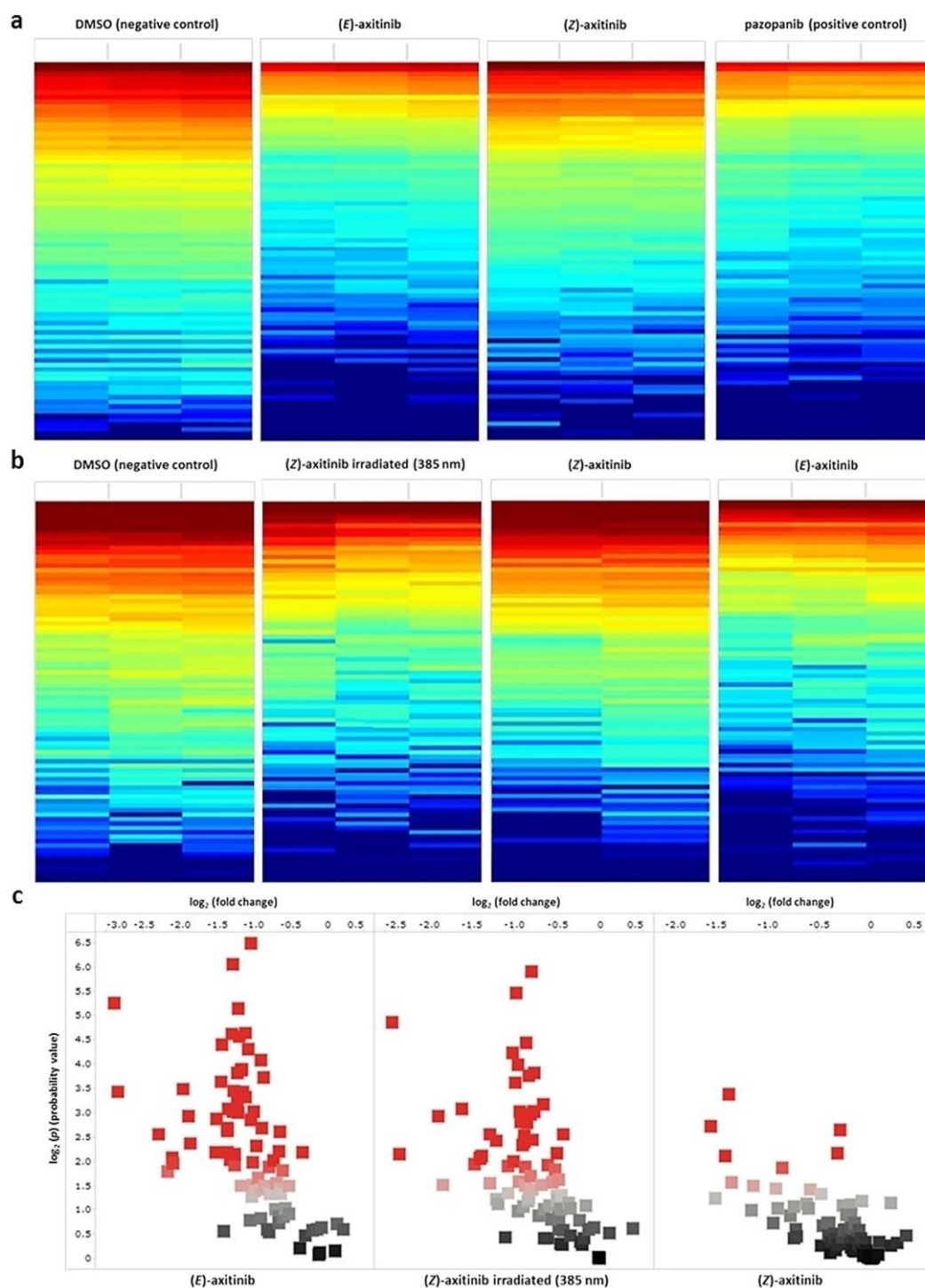


Figure 8. a) Phosphorylation profiles of HUVEC lysates treated with (E)- or (Z)-axitinib, compared with DMSO (negative control) and pazopanib (positive control). Results are presented as heat maps; each bar represents a specific phosphorylation site. The color code ranges from red (high degree of phosphorylation) to blue (low degree of phosphorylation). b) Heat map for (Z)-axitinib after irradiation with $\lambda = 385$ nm, compared with DMSO (negative control) and (E)- and (Z)-axitinib. c) Volcano plots of HUVEC lysates treated with (E)- and (Z)-axitinib after irradiation at $\lambda = 385$ nm, and (Z)-axitinib without irradiation. Red squares show substrate peptides that are significantly less phosphorylated than those of DMSO. Gray and black squares represent nonsignificant results ($\log_2 p < 1.3$).

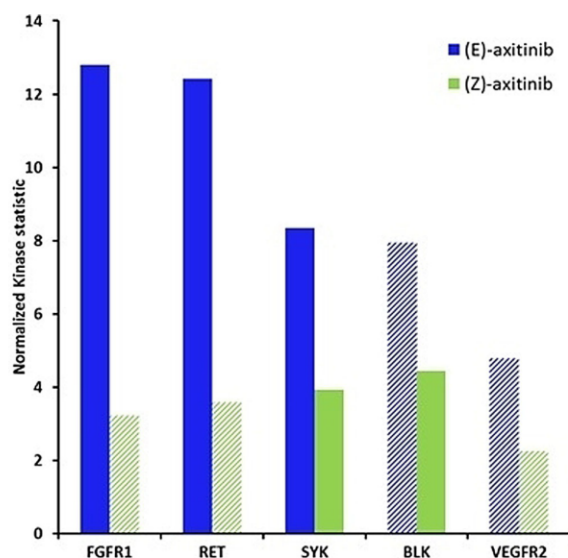


Figure 9. Upstream kinase analysis of the phosphorylation profiles of HUVEC lysates treated with (*E*- and (*Z*-axitinib by using the PamGene technique. The length of the bars represents the absolute value of the reduced kinase activity relative to DMSO. Solid bars are based on results with a specificity score ($\log_2 p > 1.3$). Striped bars indicate nonsignificant results (specificity score < 1.3). Results with a high specificity score are based on distinct phosphorylation motifs. Low specificity scores are caused by ambiguous phosphorylation motifs.

of (*E*-axitinib, three eligible tyrosine kinases could be identified: FGFR1, RET, and SYK (Figure 9). FGFR1 and RET are known targets of (*E*-axitinib and have also been found in the ProQinase selectivity screening (Table 2 in the Supporting Information).^[59] SYK is known to play a critical role in endothelial cell growth, but has not been specifically reported as a target of (*E*-axitinib.^[60] Assignments for the main target, VEGFR2 (KDR), of axitinib are less significant due to ambiguous phosphorylation motifs. For (*Z*-axitinib, a significant effect on the tyrosine kinases SYK and BLK could be predicted. However, in line with our previous results, treatment with (*Z*-axitinib affected SYK and other relevant kinases to a lesser extent than that of (*E*-axitinib.

Conclusions

We could show that the approved drug, (*E*-axitinib, displayed an interesting photochromic system involving an intramolecular hydrogen bond in the *Z* configuration, which caused slightly shifted absorption spectra relative to that of the *E* isomer. In DMSO, axitinib undergoes reversible photoisomerization, whereas in aqueous solution unidirectional, but almost quantitative *Z*→*E* switching could be observed. Under controlled light conditions, we could demonstrate that (*Z*-axitinib was 43 times less active in an *in vitro* VEGFR2 kinase assay and 31 times less active in a HUVEC proliferation assay, relative to (*E*-axitinib. Upon irradiation of (*Z*-axitinib at $\lambda = 385$ nm, the biological activity of (*E*-axitinib could be completely restored

in vitro. Furthermore, the differing activities of both axitinib isomers in HUVECs and NIH/3T3 cells could be verified by western blotting. By using the PamGene Pamstation® and PamChip® technology, we could demonstrate an alternative method to measure broad kinase activities of light-sensitive compounds in the dark.

Compared with previously reported photoswitchable kinase inhibitors, axitinib showed a remarkable activity difference between *E/Z* configurations. An advantage of the present photochromic system in axitinib is that both isomers are thermally stable at 37 °C. Hence, the *Z* isomer does not show uncontrolled thermal reactivation, in contrast to widely used azo-functionalized compounds, which are often bioactive in the thermodynamically stable *E* configuration and bio-inactive in the metastable *Z* configuration. Furthermore, the thermal and chemical stability of both axitinib isomers allows chromatographic separation, which makes a distinct biological evaluation of each isomer much easier than that of photostationary distributions (PSD), which often lead to complex results. Another feature of axitinib is the high *Z*→*E* conversion, which results in an instantaneous concentration jump of active (*E*-axitinib at the site of irradiation. On the other hand, once activated, (*E*-axitinib cannot be turned off again, neither photochemically nor thermally.

Although (*E*-axitinib is an approved drug, we do not assume immediate clinical implications of the presented results. However, the spatiotemporal activation of (*E*-axitinib will be a powerful and valuable tool in the field of kinase signal transduction and angiogenesis research, especially with regard to the high number of axitinib-related publications. In this context, the limited penetration depth of the used UV irradiation into blood-supported tissue is negligible.^[61] In fact, the used wavelengths might even be beneficial in many experimental setups, as they do not overlap with widely used chromophores and fluorophores, such as fluorescein, cyanines, green fluorescent proteins, and boron-dipyrromethene.^[62]

If used under ambient light conditions, our data suggest that several published results involving axitinib are based on measurements of (*E/Z*-axitinib mixtures. Therefore, we recommend performing biological tests by using (*E*-axitinib as a (reference) inhibitor strictly in the dark or under red-light conditions to avoid uncontrolled photoisomerization.

Experimental Section

Computational chemistry: Molecular modeling was performed on a DELL Precision T3610 four-core workstation with Schrödinger Maestro, version 11.3, 2017, Schrödinger, LLC, New York, NY, USA. The RCSB Protein Data Bank (PDB) crystal structure PDB ID: 4AG8^[27] was used for VEGFR2 modeling studies. The protein structure was initially prepared with the Protein Preparation Wizard 2015-4 (Epik version 2.4, Schrödinger, LLC, 2015; Impact version 5.9, Schrödinger, LLC, 2015; Prime version 3.2, Schrödinger, LLC, 2015).^[63] For energy minimizations of the ligands, MacroModel, version 11.0, Schrödinger, LLC, 2015 was used. Ionization states and tautomers were generated with LigPrep, version 3.6, Schrödinger, LLC, 2015. Ligand docking and receptor grid generation were performed with Glide, version 6.9, Schrödinger, LLC, 2015.^[64–66]

Vertical excitation energies for all axitinib species were calculated by using the Turbomole 7.0 program package, version 7.0 2015, a development of the University of Karlsruhe and Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, 1989–2007 (TURBOMOLE GmbH since 2007), at the DFT level of theory, including the Grimme D3 dispersion correction with Becke–Johnson damping (D3BJ),^[67,68] the B3LYP functional,^[69] and the def2-TZVP basis set.^[70] Excited-state properties were obtained from the random-phase approximation (RPA), as implemented in Turbomole.^[71,72]

General: ¹H, ¹³C, and ¹⁵N NMR spectra were recorded either on a Bruker Avance III 300 instrument with a multinuclear probe head or on a Bruker Avance 600 spectrometer. Spectra were referenced to [D₆]DMSO (¹H NMR: $\delta = 2.50$ ppm, ¹³C NMR: $\delta = 39.5$ ppm) or external nitromethane (¹⁵N NMR: $\delta = 0.0$ ppm). The following abbreviations are used: s (singlet), d (doublet), t (triplet), m (multiplet). NMR assignments were determined by analysis of multidimensional spectra (H,H-COSY, HSQC, HMBC). LC–MS was performed with a Bruker Esquire LC ion trap mass spectrometer (Bremen, Germany) in the positive-ion mode (dry gas 9 L min⁻¹, nebulizer 35 psi, drying temperature 350 °C) after chromatographic separation by using an Agilent 1100 HPLC system (Waldbronn, Germany) with an RP-8 column (Agilent Eclipse XDB-C8, 150 × 4.6 mm, 5 μ m) and a gradient of 0.1% acetic acid/acetonitrile. High-resolution mass spectra were recorded on a Thermo Fisher Q Exactive Plus mass spectrometer (Hybrid Quadrupol Orbitrap) with ESI in the positive-ion mode. HPLC analysis was performed on an Agilent 1100 series instrument with a Phenomenex Kinetex™ C8, 5 μ m (4.6 mm × 150 mm) column. Compounds were eluted with KH₂PO₄ buffer (0.01 M, pH 2.3)/acetonitrile gradient (5% MeCN → 60% MeCN, 1.5 mL min⁻¹, 10 min). The column was warmed to 25 °C. For detection, a wavelength of $\lambda = 320$ nm was used. The injection volume was set to 5 μ L per sample. For PSS determination, compounds were dissolved in DMSO (10 mM) and diluted with DMSO to a concentration of 100 μ M or with water to a concentration of 20 μ M (final DMSO concentration 5%). Solutions were irradiated in a quartz cell at either $\lambda = 365$ nm (4 × 750 mW Nichia NCSU276A LED, 25% intensity) or $\lambda = 385$ nm (1 × 2430 mW Nichia NC4U134 LED). Aliquots were diluted with acetonitrile prior to HPLC analysis. UV/Vis spectra were recorded on an Agilent Varian Cary® 50 Scan UV/Vis spectrophotometer with a Varian Cary PCB 150 water Peltier system at 25 or 37 °C. IR spectra were recorded with a PerkinElmer Spectrum 100 instrument with the universal diamond attenuated total reflection (ATR) accessory; spectra were not ATR corrected. Melting points were determined on a Stuart Scientific SMP3 apparatus and were uncorrected. Column chromatography was performed on a Flash Spot II instrument (Armen Instrument) by using Interchim silica-gel columns (PF-30SIHP, 30 μ m, puriFlash). Prior to flash chromatography, the crude product was loaded on Merck silica gel 60 (15–40 μ m). The following light sources have been used for irradiation experiments: $\lambda = 365$ nm LED reactor (Sahlmann Photochemical Solutions, 12 × 450 mW Nichia NCSU033B LEDs, dimmable), $\lambda = 365$ nm custom-made 96-well plate lamp (Sahlmann Photochemical Solutions, 16 × 750 mW Nichia NCSU276A LEDs, dimmable), $\lambda = 385$ nm LED lamp (Sahlmann Photochemical Solutions, 3 × 2430 mW Nichia NC4U134 LEDs), and a metal halide iron-doped lamp with a $\lambda = 330$ nm filter (UV-P 250C, Panacol-Elosol GmbH, 250 W).

Synthesis of (E)-axitinib: (E)-Axitinib was purchased from LC Laboratories, Woburn, MA, USA; mp: 219 °C; ¹H NMR (300 MHz, [D₆]DMSO): $\delta = 13.37$ (s, 1H; Ind-NH), 8.60 (dd, ³J = 4.8 Hz, ⁴J = 1.8 Hz, 1H; Py-H-6), 8.39 (q, ³J = 4.4 Hz, 1H; NHCH₃), 8.21 (d, ³J = 8.6 Hz, 1H; Ind-H-5), 7.96 (d, ³J = 16.4 Hz, 1H; Ind-CH=CH-Py), 7.81

(ddd, ³J = 7.7 Hz, ³J = 7.6 Hz, ⁴J = 1.8 Hz, 1H; Py-H-4), 7.66 (d, ³J = 7.7 Hz, 1H; Py-H-3), 7.61–7.60 (m (overlapping signal), 1H; Ind-H-8), 7.58 (d, ³J = 16.5 Hz, 1H; Ind-CH=CH-Py), 7.49 (dd, ³J = 7.0 Hz, ⁴J = 2.0 Hz, 1H; Ph-H-6), 7.33 (dd, ³J = 7.4 Hz, ⁴J = 1.9 Hz, 1H; Ph-H-5), 7.30–7.29 (m, 1H; Ph-H-4), 7.25–7.29 (m, 1H; Py-H-5), 7.19 (dd, ³J = 8.5 Hz, ⁴J = 1.4 Hz, 1H; Ind-H-6), 7.06 (dd, ³J = 7.3 Hz, ⁴J = 1.7 Hz, 1H Ph-H-3), 2.78 ppm (d, ³J = 4.6 Hz, 3H; NHCH₃); ¹³C NMR (75 MHz, [D₆]DMSO): $\delta = 167.8$ (CONHCH₃), 154.9 (Py-C-2), 149.5 (Py-C-6), 142.0 (Ind-C-3), 141.8 (Ind-C-9), 137.0 (Ph-C-1), 136.8 (Py-C-4), 135.6 (Ph-C-2), 132.5 (Ind-C-7), 130.3 (Ph-C-4), 130.0 (Ph-C-3), 129.2 (Ind-CH=CH-Py), 127.8 (Ph-C-6), 126.1 (Ph-C-5), 125.5 (Ind-C-6), 123.6 (Ind-CH=CH-Py), 122.6 (Py-C-3), 122.5 (Py-C-5), 121.7 (Ind-C-5), 120.3 (Ind-C-4), 114.7 ppm (Ind-C-8), 26.0 (CH₃); ¹⁵N NMR (30 MHz, [D₆]DMSO): $\delta = -275.2$ (CONHCH₃), -196.6 (Ind-N-1), -75.1 (Py-N), -65.1 ppm (Ind-N-2); HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₂₂H₁₉N₄O₅⁺: 387.12741; found: 387.12675.

Synthesis of (Z)-axitinib: (E)-Axitinib (275 mg, 712 μ mol) was dissolved in DMSO (20 mL) and the solution was stirred and irradiated at $\lambda = 365$ nm (LED, 5.4 W) for 1 h. The solution was diluted with ethyl acetate (200 mL) and washed with deionized water (5 × 50 mL) to remove DMSO. The organic phase was washed with brine (1 × 50 mL) and dried over Na₂SO₄. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was loaded on silica gel. Twofold flash chromatography (Interchim 40 g column, CH₂Cl₂/methanol gradient: 100% CH₂Cl₂ → 90% CH₂Cl₂, 25 mL min⁻¹ over 20 min) afforded (Z)-axitinib as a pale-yellow solid (57 mg, 147 μ mol, 21%); mp: 174 °C; ¹H NMR (300 MHz, [D₆]DMSO): $\delta = 16.96$ (br. s, 0.4H; Ind-H-2), 13.29 (s, 0.6H; Ind-H-1), 8.99 (d, ³J = 4.1 Hz, 0.4H; Py-H-6), 8.52 (d, ³J = 4.7 Hz, 0.6H; Py-H-6), 8.39 (q, ³J = 4.5 Hz, 1H; NHCH₃), 8.07–8.01 (m, 0.8H; Ind-H-5, Py-H-4), 7.90 (s, 0.4H; Ind-H-8), 7.83 (d, ³J = 7.9 Hz, 0.6H; Py-H-3), 7.73 (d, ³J = 8.0 Hz, 0.4H; Py-H-3), 7.64 (ddd, ³J = 7.8 Hz, ³J = 7.6 Hz, ⁴J = 1.5 Hz, 0.6H; Py-H-4), 7.53–7.45 (m, 2H; Ind-H-8, Py-H-5, Ph-H-6), 7.32–7.19 (m, 3.6H; Ph-H-5, Ph-H-4, Ind-H-5, Py-H-5, Ind-CH=CH-Py), 7.10 (d, ³J = 8.0 Hz, 0.4H; Ind-H-6), 7.04 (d, ³J = 12.9 Hz, 0.6H; Ind-CH=CH-Py), 6.99–6.95 (m, 1.6H; Ph-H-3, Ind-H-6), 6.86 (d, ³J = 12.7 Hz, 1H; Ind-CH=CH-Py), 2.76 ppm (d, ³J = 4.6 Hz, 3H; NHCH₃); ¹³C NMR (75 MHz, [D₆]DMSO): $\delta = 167.8$, 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; ¹⁵N NMR (30 MHz, [D₆]DMSO): $\delta = -275.2$ (CONHCH₃), -196.9 (Ind-N-1, 1H tautomer), -152.7 (Ind-N-2, 2H tautomer), -92.1 (Py-N, 2H tautomer), -65.9 (Ind-N-2, 1H tautomer), -65.7 ppm (Py-N, 1H tautomer), not observed (Ind-N-1, 2H tautomer); HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₂₂H₁₉N₄O₅⁺: 387.12741; found: 387.12704.

Synthesis of [2+2]-dimer: (E)-Axitinib (100 mg, 259 μ mol) was dissolved in DMSO (10 mL) and diluted with deionized water (90 mL). The cloudy solution was stirred and irradiated at $\lambda = 365$ nm (LED, 5.4 W) for 1.5 h. Every 15 min, the solution was sonicated to homogenize the suspension. After complete conversion of the starting material, the precipitate was filtered and dried in vacuo. The crude product was dissolved in a mixture of chloroform/methanol and loaded on silica gel. Purification by flash chromatography (Interchim 12 g column, CH₂Cl₂/methanol gradient: 100% CH₂Cl₂ → 85% CH₂Cl₂, 10 mL min⁻¹ over 15 min, then 85% CH₂Cl₂ constant for 15 min) afforded a colorless solid (54 mg, 70 μ mol, 27%). ¹H NMR (600 MHz, [D₆]DMSO): $\delta = 12.64$ (s, 2H; Ind-NH), 8.34–8.31 (m, 4H; NHCH₃, Py-H-6), 7.64 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H; Ind-H-5), 7.45 (d, ³J = 6.4 Hz, 2H; Ph-H-6), 7.39–7.35 (m, 4H; Ind-H-8, Py-H-4), 7.28–7.21 (m, 4H; Ph-H-5, Ph-H-4), 7.1 (d, ³J = 7.8 Hz, 2H; Py-H-3), 6.95

(dd, $^3J=6.9$ Hz, $^3J=5.3$ Hz, 2H; Py-*H*-5), 6.9 (d, $^3J=8.1$ Hz, 2H; Ind-*H*-6), 6.76 (d, $^3J=7.6$ Hz, 2H; Ph-*H*-3), 5.27 (dd, $^3J=8.5$ Hz, $^3J=7.5$ Hz, 2H; CH cyclobutane), 5.17 (dd, $^3J=8.5$ Hz, $^3J=7.5$ Hz, 2H; CH cyclobutane), 2.75 ppm (d, $^3J=4.5$ Hz, 6H; NHCH₃); ¹³C NMR (151 MHz, [D₆]DMSO): $\delta=167.8$ (CONHCH₃), 159.6 (Py-C-2), 148.4 (Py-C-6), 144.4 (Ind-C-3), 141.2 (Ind-C-9), 136.4 (Ph-C-2), 136.3 (Ph-C-1), 135.4 (Py-C-4), 130.8 (Ind-C-7), 130.1 (Ph-C-4), 129.1 (Ph-C-3), 127.6 (Ph-C-6), 125.6 (Ph-C-5), 124.0 (Ind-C-6), 123.2 (Py-C-3), 121.5 (Ind-C-4), 121.3 (Ind-C-5), 121.0 (Py-C-5), 114.6 (Ind-C-8), 46.1 (CH cyclobutane), 38.1 (CH cyclobutane), 26.1 ppm (CH₃); HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₂₂H₁₉N₄O₅⁺, C₂₂H₂₀N₄O₅²⁺: 773.24754, 387.12741; found: 773.24699, 387.12714.

Kinase assays: To determine kinase activity, the luminescence-based ADP-Glo™ kinase assay (Promega) was used and established for VEGFR2 (purified kinase domain, KDR active, Promega) and PDGFR β (purified kinase domain, PDGFR β active, Promega). This assay supplied a luminescence signal that was proportional to the amount of ADP generated during the kinase reaction, and therefore, proportional to the kinase activity. The assay was performed according to the manufacturer's protocol by using white 96-well CulturePlates™ (PerkinElmer) with kinase reaction mixtures of 25 μ L. ATP and kinase concentrations were determined by using standard curves for ATP-to-ADP conversion and kinase titration, respectively. Kinase reactions were run in kinase buffer (40 mM Tris (pH 7.5), 20 mM MgCl₂, 0.1 mg mL⁻¹ BSA, 2 mM DTT, 2 mM MnCl₂, 100 μ M Na₂VO₄, and 0.01% Na₂S₂O₈) with 10 μ M ATP, 0.4 ng μ L⁻¹ kinase, and 0.25 mg mL⁻¹ substrate (poly(4:1 Glu, Tyr)peptide). Inhibitors were dissolved in DMSO and a 1:3 serial dilution was prepared. Before kinase addition started the reaction, compounds were added to the reaction mixture, resulting in final concentrations of 1% DMSO and inhibitor concentrations ranging from 10 μ M to 0.5 nM. Handling of the compounds took place either under ambient light conditions or in a darkened laboratory equipped with red-light LEDs to protect them from UV light. Kinase reactions without inhibitors (DMSO only) were set as 100% kinase activity and signals from samples without kinase and inhibitors were subtracted as background. Luminescence intensities were recorded on a FLUOstar® Omega (BMG Labtech) instrument. Kinase activity was calculated in percent of control without inhibitor and plotted against the logarithm of inhibitor concentration. Data points were means of two measurements with standard deviations as error bars. Sigmoidal fitting (log(inhibitor) vs. response-variable slope) and calculation of IC₅₀ values were performed by using the GraphPad Prism®(5.00) program. Irradiation of the 96-well plate was conducted prior to kinase addition to avoid premature ATP conversion. (*E*)-Axitinib was irradiated at $\lambda=365$ nm by using a dimmable custom-made lamp for 96-well plates, consisting of 16 LEDs (in the distance of the wells). Every well was irradiated for 2 min with 5% power. (*Z*)-Axitinib was irradiated at $\lambda=385$ nm by using a handheld lamp consisting of three LEDs. In this case, the whole plate was irradiated for 5 min.

At ProQinase (Freiburg, Germany), VEGFR2 IC₅₀ values were determined by means of a non-radiometric ADP-Glo™ assay (Promega). The kinase profile was determined by measuring residual activity values of 300 wild-type protein kinases in a 33PanQinase® assay. Experiments were performed under ambient light conditions (PSDs are unknown).

Cellular assays: Pooled HUVEC cells (CLS Cell Lines Service GmbH) were cultured in ECGM-MG, ready-to-use medium (CLS) with 10% FCS and incubated at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. For growth inhibition assays, 10⁴ cells were seeded in 100 μ L per well into white 96-well CulturePlates™ (PerkinElmer). The cell

number was determined previously by means of cell titration. After 24 h of incubation, cell viability of a day zero reference plate was analyzed by means of the CellTiter-Glo® assay (Promega). At the same time, different concentrations of the inhibitor compounds in DMSO were added to a test plate. The final concentration of DMSO in the cell medium was 1%, with compound concentrations between 300 μ M and 5 nM in 1:3 dilution steps, tested in duplicate. To avoid uncontrolled photoisomerization of the compounds during the experiments, ambient light was reduced as far as possible. However, the addition of solutions of the compound to the cells could not be performed in complete darkness. Cell proliferation without inhibitors (DMSO only) was set as maximum cell growth. For background determination, medium containing 1% DMSO was analyzed. The test plate was incubated for a further 48 h. Cell proliferation was quantified by means of the CellTiter-Glo® assay, according to the manufacturer's protocol. The CellTiter-Glo® assay was based on the detection of luminescence, which was proportional to the amount of ATP, and that again was proportional to the number of living cells. Luminescence measurements were performed on a FLUOstar® Omega (BMG Labtech) instrument. Cell growth was calculated as a percentage by using the day zero reference and the maximum proliferation (1% DMSO without compounds). Data points were means of two measurements with standard deviations as error bars. Fitting of dose-response-curves and calculation of IC₅₀ values were performed analogous to that of the kinase assays by using the GraphPad Prism® (5.00) program. To prove the UV tolerance of HUVEC cells, a proliferation assay was performed in an analogous manner. However, cells were not treated with inhibitors, but irradiated at $\lambda=385$ nm for different time periods (0, 5, 10, 20, 40, 60, 120, and 300 s). Cell viability was calculated as a percentage of non-irradiated control. In this case, data points were means of four measurements. For controlled isomerization of (*Z*)-axitinib, the well plate was irradiated at $\lambda=385$ nm for 5 min after compound addition to the cells. Testing of (*E*)-axitinib was performed on the same well plate, but irradiation at $\lambda=385$ nm did not affect (*E*)-axitinib in aqueous solution.

Western blot analyses: NIH3T3 cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FCS and 1 mM pyruvate at 37 °C and 5% CO₂. Cells were seeded in six-well plates at a density of 200 000 cells per well. After 48 h of incubation, NIH cells were incubated with compounds or 1% DMSO for 45 min and stimulated with 20 ng human PDGF per well for 5 min. Cells were lysed and centrifuged as described above. SDS-PAGE and western blot were performed with the following antibodies: t-PDGFR, p-PDGFR, and antirabbit (Cell Signaling Technology, 12651T). Signals were visualized with a Lumi Imager F1 (Roche) instrument.

HUVECs were seeded in T75 culture flasks and incubated with compounds or DMSO (negative control) for 2 h. Cells were stimulated with hVEGF (Cell Signaling Technology, 8065) for 15 min. For lysis, cells were washed with ice-cold Dulbecco's PBS (Gibco) and lysed with mammalian protein extraction reagent (M-PER) containing 1% Halt phosphatase and protease inhibitor cocktail (both Thermo Fisher Scientific). Lysates were centrifuged at 15 000 *g* and 4 °C and supernatants were snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C. For detection, the following antibodies were used: p-VEGFR Tyr1175, p-AKT, and GAPDH (Cell Signaling Technology, 3770, 4060, 2118).

Kinase selectivity profiling (PamGene): HUVECs (PromoCell) were cultured in endothelial cell growth medium 2 (PromoCell) and incubated at 37 °C with 5% CO₂. HUVECs were seeded in 25 cm² cell culture flasks and incubated for 48 h to accomplish cell viability of 80–90%. Afterward, cells were lysed and treated as described

above. Protein concentrations of the lysates were evaluated by means of the Bradford assay (Thermo Fisher Scientific). Kinome profiling was performed with Tyrosine Kinase PamChip® arrays (PamGene) by using a Pamstation®12 instrument. Each chip contained four arrays. The surface of every array was made of porous silica comprising 144 peptides. The peptides mimicked the phosphorylation sites of more than 100 kinase substrates. Kinase activity profiling was performed with 5 µg protein per array and a final concentration of 100 µM ATP, 1% DMSO, and 10 µM inhibitor, according to the manufacturer's protocol. In one measurement, three PamChips (12 arrays in total) were run simultaneously to compare two different inhibitors with DMSO (negative control) and a reference inhibitor (positive control). For every compound, three technical replicates were used. In the irradiation experiment, the reaction mixture containing (Z)-axitinib was irradiated at $\lambda = 385$ nm for 30 s prior to addition to the PamChip®. For nonirradiated (Z)-axitinib (Figure 6b), one of three data sets was neglected due to clear outliers. Data analysis was performed as described by Labots et al.^[55] For signal evaluation, Bionavigator 6 software (PamGene) was used according to the manufacturer's protocol.

Acknowledgements

This research project was supported by the DFG (German Research Society) grant Collaborative Research Centre 677 "Function by Switching". We thank Martin Schütt (Institute of Pharmacy, Kiel University) and Konstantin Hoffer (University Medical Center Hamburg) for excellent technical assistance and support. We gratefully acknowledge the support of Dr. Dieter Schollmeyer (Institute for Organic Chemistry, University of Mainz, Germany) for X-ray analysis of small-molecule compounds.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Keywords: angiogenesis · inhibitors · isomerization · kinases · photochemistry

- [1] W. A. Velema, W. Szymanski, B. L. Feringa, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 2178–2191.
- [2] W. Szymański, J. M. Beierle, H. A. V. Kistemaker, W. A. Velema, B. L. Feringa, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 6114–6178.
- [3] G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4900–4921; *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5020–5042.
- [4] K. Hüll, J. Morstein, D. Trauner, *Chem. Rev.* **2018**, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00037>.
- [5] J. Broichhagen, J. A. Frank, D. Trauner, *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 1947–1960.
- [6] M. M. Lerch, M. J. Hansen, G. M. van Dam, W. Szymanski, B. L. Feringa, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 10978–10999; *Angew. Chem.* **2016**, *128*, 11140–11163.
- [7] J. Bieth, S. M. Vratsanos, N. Wassermann, B. F. Erlanger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1969**, *64*, 1103–1106.
- [8] W. J. Deal, B. F. Erlanger, D. Nachmansohn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1969**, *64*, 1230–1234.
- [9] J. Bieth, N. Wassermann, S. M. Vratsanos, B. F. Erlanger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1970**, *66*, 850–854.
- [10] J. Broichhagen, I. Jurastow, K. Iwan, W. Kummer, D. Trauner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 7657–7660; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 7788–7792.

- [11] W. A. Velema, J. P. van der Berg, M. J. Hansen, W. Szymanski, A. J. M. Driessen, B. L. Feringa, *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 924–928.
- [12] W. A. Velema, M. J. Hansen, M. M. Lerch, A. J. M. Driessen, W. Szymanski, B. L. Feringa, *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26*, 2592–2597.
- [13] M. Borowiak, W. Nahaboo, M. Reynders, K. Nekolla, P. Jalinet, J. Hasseroth, M. Rehberg, M. Delattre, S. Zahler, A. Vollmar, D. Trauner, O. Thorn-Seshold, *Cell* **2015**, *162*, 403–411.
- [14] A. J. Engdahl, E. A. Torres, S. E. Lock, T. B. Engdahl, P. S. Mertz, C. N. Streu, *Org. Lett.* **2015**, *17*, 4546–4549.
- [15] M. Stein, S. J. Middendorp, V. Carta, E. Pejo, D. E. Raines, S. A. Forman, E. Sigel, D. Trauner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10500–10504; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 10652–10656.
- [16] L. Yue, M. Pawlowski, S. S. Dellal, A. Xie, F. Feng, T. S. Otis, K. S. Bruzik, H. Qian, D. R. Pepperberg, *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 1095.
- [17] M. Schönberger, D. Trauner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 3264–3267; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 3329–3332.
- [18] K. Curley, D. S. Lawrence, *Pharmacol. Ther.* **1999**, *82*, 347–354.
- [19] A. R. Morckel, H. Lusic, L. Farzana, J. A. Yoder, A. Deiters, N. M. Nascone-Yoder, *Development* **2012**, *139*, 437–442.
- [20] H. Li, J.-M. Hah, D. S. Lawrence, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10474–10475.
- [21] R. Horbert, B. Pinchuk, P. Davies, D. Alessi, C. Peifer, *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 2099–2107.
- [22] M. Zindler, B. Pinchuk, C. Renn, R. Horbert, A. Döbber, C. Peifer, *ChemMedChem* **2015**, *10*, 1335–1338.
- [23] R. Ferreira, J. R. Nilsson, C. Solano, J. Andréasson, M. Grøtli, *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 9769.
- [24] D. Wilson, J. W. Li, N. R. Branda, *ChemMedChem* **2017**, *12*, 284–287.
- [25] B. Escudier, M. Gore, *Drugs R&D* **2011**, *11*, 113–126.
- [26] K. Mittal, L. S. Wood, B. I. Rini, *Biol. Ther.* **2012**, *2*, 5.
- [27] M. McTigue, B. W. Murray, J. H. Chen, Y.-L. Deng, J. Solowiej, R. S. Kania, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 18281–18289.
- [28] T. Pemovska, E. Johnson, M. Kontro, G. A. Repasky, J. Chen, P. Wells, C. N. Cronin, M. McTigue, O. Kallioniemi, K. Porkka, B. W. Murray, K. Wennerberg, *Nature* **2015**, *519*, 102–105.
- [29] R. J. Kelly, O. Rixe, *Target. Oncol.* **2009**, *4*, 297–305.
- [30] D. D. Hu-Lowe, H. Y. Zou, M. L. Grazzini, M. E. Hallin, G. R. Wickman, K. Amundson, J. H. Chen, D. A. Rewolinski, S. Yamazaki, E. Y. Wu, M. A. McTigue, B. W. Murray, R. S. Kania, P. O'Connor, D. R. Shalinsky, S. L. Bender, *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 7272–7283.
- [31] G. Sluggett, *Conference on Small Molecule Science*, Williamsburg, VA (USA), August 11–13, 2014.
- [32] A. M. Campeta, B. P. Chekal, Y. A. Abramov, P. A. Meenan, M. J. Henson, B. Shi, R. A. Singer, K. R. Horspool, *J. Pharm. Sci.* **2010**, *99*, 3874–3886.
- [33] R. W. Sparidans, D. Iusuf, A. H. Schinkel, J. H. M. Schellens, J. H. Beijnen, *J. Chromatogr. B* **2009**, *877*, 4090–4096.
- [34] Y. K. Pithavala, W. Tong, J. Mount, S. V. Rahavendran, M. Garrett, B. Hee, P. Selaru, N. Sarapa, K. J. Klamerus, *Invest. New Drugs* **2012**, *30*, 273–281.
- [35] B. L. Ewanicki, E. J. Flahive, A. J. Kasparian, M. B. Mitchell, M. D. Perry, S. A. O'Neill-Slawecki, N. W. Sach, J. E. Saenz, B. Shi, N. S. Stankovic (Agouron Pharmaceuticals Inc., San Diego, CA, USA), US Pat. No. US7232910 B2, **2007**.
- [36] B. L. Ewanicki, E. J. Flahive, A. J. Kasparian, M. B. Mitchell, M. D. Perry, S. A. O'Neill-Slawecki, N. W. Sach, J. E. Saenz, B. Shi, N. S. Stankovic, J. K. Srirangam, Q. Tian, S. Yu (Pfizer Inc., New York, NY, USA), Eur. Pat. No. EP2163544 A1, **2010**.
- [37] J. Zhang, P. L. Yang, N. S. Gray, *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9*, 28–39.
- [38] K. Sonogashira, Y. Tohda, N. Hagihara, *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 4467–4470.
- [39] H. Lindlar, R. Dubuis, *Org. Synth.* **1966**, 89.
- [40] I. Alkorta, J. Elguero, *J. Phys. Org. Chem.* **2005**, *18*, 719–724.
- [41] J. Catalán, G. J. L. de Paz, J. Elguero, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1996**, 57–60.
- [42] V. I. Minkin, A. D. Garnovskii, J. Elguero, A. R. Katritzky, O. V. Denisko, *Adv. Heterocycl. Chem.* **2000**, *76*, 157–323.
- [43] Y. Ito, T. Kajita, K. Kunimoto, T. Matsuura, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 587–591.
- [44] M. S. Syamala, V. Ramamurthy, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 3712–3715.
- [45] S. Devanathan, V. Ramamurthy, *J. Photochem.* **1987**, *40*, 67–77.

- [46] H. Görner, H. J. Kuhn in *Advances in Photochemistry, Vol. 19* (Eds.: D. C. Neckers, D. H. Volman, G. von Bunau), Wiley, Hoboken, **1995**.
- [47] F. D. Lewis, B. A. Yoon, T. Arai, T. Iwasaki, K. Tokumaru, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3029–3036.
- [48] T. Arai, M. Moriyama, K. Tokumaru, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3171–3172.
- [49] H.-J. Park, Y. Zhang, S. P. Georgescu, K. L. Johnson, D. Kong, J. B. Galper, *Stem. Cell Rev.* **2006**, *2*, 93–101.
- [50] J. Rössler, Y. Monnet, F. Farace, P. Opolon, Daudigeos-E. Dubus, A. Bourredjem, G. Vassal, B. Geoerger, *Int. J. Cancer* **2011**, *128*, 2748–2758.
- [51] J. Ma, D. J. Waxman, *Mol. Cancer Ther.* **2008**, *7*, 79–89.
- [52] J. Yu, A. Moon, H.-R. C. Kim, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *282*, 697–700.
- [53] M. Ohshima, Y. Yamaguchi, K. Kappert, P. Micke, K. Otsuka, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *381*, 165–170.
- [54] R. Hilhorst, L. Houkes, M. Mommersteeg, J. Musch, A. van den Berg, R. Ruijtenbeek, *Methods Mol. Biol.* **2013**, *977*, 259–271.
- [55] M. Labots, K. J. Gotink, H. Dekker, K. Azijli, J. C. van der Mijn, C. M. Huijts, S. R. Piersma, C. R. Jiménez, H. M. W. Verheul, *Exp. Mol. Med.* **2016**, *48*, e279.
- [56] M. L. Kuijter, B. E. van den Akker, R. Hilhorst, M. Mommersteeg, E. P. Budingh, M. Serra, H. Bürger, P. C. W. Hogendoorn, A.-M. Cleton-Jansen, *BMC Med. Genomics* **2014**, *7*, 4.
- [57] A. Tahiri, K. Røe, A. H. Ree, Wijn, R. K. de Risberg, C. Busch, P. E. Lønning, V. Kristensen, J. Geisler, *PLoS One* **2013**, *8*, e72692.
- [58] G. Sonpavde, T. E. Hutson, *Curr. Oncol. Rep.* **2007**, *9*, 115–119.
- [59] M. I. Davis, J. P. Hunt, S. Herrgard, P. Ciceri, L. M. Wodicka, G. Pallares, M. Hocker, D. K. Treiber, P. P. Zarrinkar, *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29*, 1046–1051.
- [60] R. Inatome, S. Yanagi, T. Takano, H. Yamamura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *286*, 195–199.
- [61] M. Dong, A. Babalhavaejji, S. Samanta, A. A. Beharry, G. A. Woolley, *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 2662–2670.
- [62] B. N. G. Giepmans, S. R. Adams, M. H. Ellisman, R. Y. Tsien, *Science* **2006**, *312*, 217–224.
- [63] G. Madhavi Sastry, M. Adzhigirey, T. Day, R. Annabhimoju, W. Sherman, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2013**, *27*, 221–234.
- [64] T. A. Halgren, R. B. Murphy, R. A. Friesner, H. S. Beard, L. L. Frye, W. T. Pol-lard, J. L. Banks, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1750–1759.
- [65] R. A. Friesner, J. L. Banks, R. B. Murphy, T. A. Halgren, J. J. Klicic, D. T. Mainz, M. P. Repasky, E. H. Knoll, M. Shelley, J. K. Perry, D. E. Shaw, P. Francis, P. S. Shenkin, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1739–1749.
- [66] R. A. Friesner, R. B. Murphy, M. P. Repasky, L. L. Frye, J. R. Greenwood, T. A. Halgren, P. C. Sanschagrin, D. T. Mainz, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6177–6196.
- [67] S. Grimme, J. Antony, S. Ehrlich, H. Krieg, *J. Chem. Phys.* **2010**, *132*, 154104.
- [68] S. Grimme, S. Ehrlich, L. Goerigk, *J. Comput. Chem.* **2011**, *32*, 1456–1465.
- [69] A. D. Becke, *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648–5652.
- [70] F. Weigend, R. Ahlrichs, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2005**, *7*, 3297–3305.
- [71] R. Bauernschmitt, R. Ahlrichs, *Chem. Phys. Lett.* **1996**, *256*, 454–464.
- [72] R. Bauernschmitt, M. Häser, O. Treutler, R. Ahlrichs, *Chem. Phys. Lett.* **1997**, *264*, 573–578.

Manuscript received: August 7, 2018

Accepted manuscript online: September 10, 2018

Version of record online: November 5, 2018

3.1.1.2 Zusätzliche Ergebnisse zur Axitinib-Publikation

Im Anschluss der Publikation von Schmidt *et al.* wurden die experimentellen Daten aus dem Profiling noch für weitere Analyse Zwecke verwendet. Nachdem die *up-stream*-Analyse zur Bestimmung der beeinflussten Kinasen aus dem Pamgene-Experiment einen lediglich nicht-signifikanten Einfluss von (*E*)-Axitinib auf VEGFR2 gezeigt hatte (s. Seite 39, Abbildung 9), konnte mittels Netzwerkanalyse von GeneGo doch noch eine Inhibition der VEGFR2 gezeigt werden (s. Abbildung 3.2). Eine signifikante Wiederfindung bereits in der *up-stream*-Analyse wäre hingegen wünschenswert gewesen.

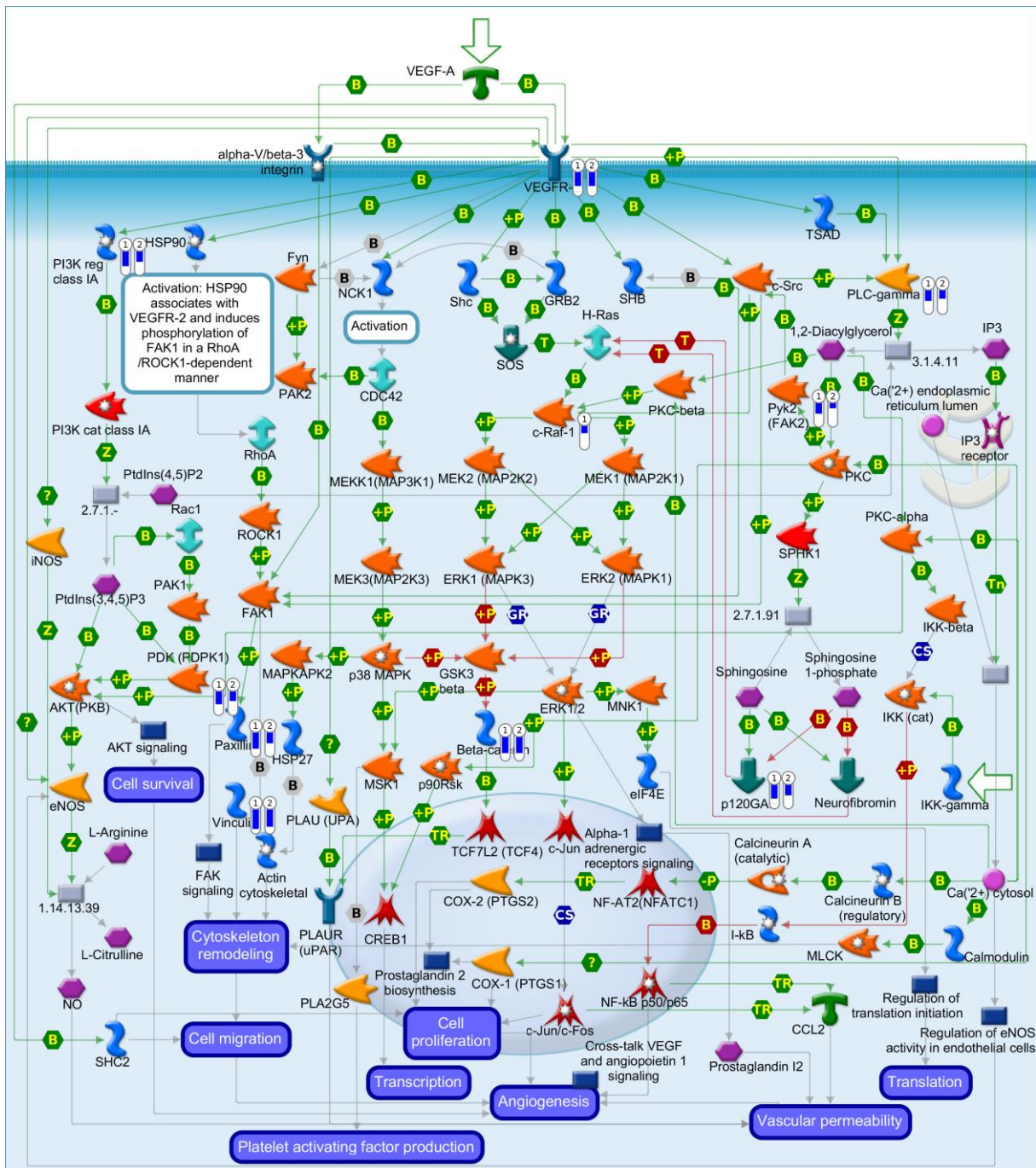


Abbildung 3.2. Einfluss von (E)-Axitinib auf das VEGFR2-Netzwerk.

Netzwerkanalyse mit Hilfe der aus dem Kinase-Screening gewonnenen Ergebnisse. Blaue Reagenzgläser kennzeichnen eine verringerte Aktivität der markierten Faktoren. Die Länge der blauen Balken gibt die Intensität der verringerten Aktivität bzw. Inhibition an. Die Netzwerkanalyse wurde erstellt mit GeneGo.

3.1.1.3 Diazocin-Axitinib

Ausgehend vom Axitinib (**1**) wurde die Stilbenbindung von Kuhl azoligisiert (s. Abbildung 3.3).^[203] Eine biologische Testung von **2** konnte aufgrund der sehr schnellen Tautomerisierung und Rückschaltung von *cis* zu *trans* nicht etabliert werden (s. Tabelle 3.1). Die nachfolgenden Azobenzol-Derivate **3** und **4** wiesen zwar für photopharmakologische Anwendungen potenziell annehmbare photochemische Eigenschaften auf (100 % *trans* → 80 % *cis*, $t_{1/2} = 43.1$ h), jedoch unter Verlust der Inhibition der VEGFR2-Kinase bezüglich beider Konfigurationen (*cis* und *trans*). Zuletzt wurde das Axitinib-Grundgerüst mit einem Diazocin oder Heterodiazocinen durch Schmidt funktionalisiert, um die biologischen Wirkung zu verbessern, unter Erhalt günstiger photochemischer Eigenschaften (Verbindung **5**, **6**, **7**).

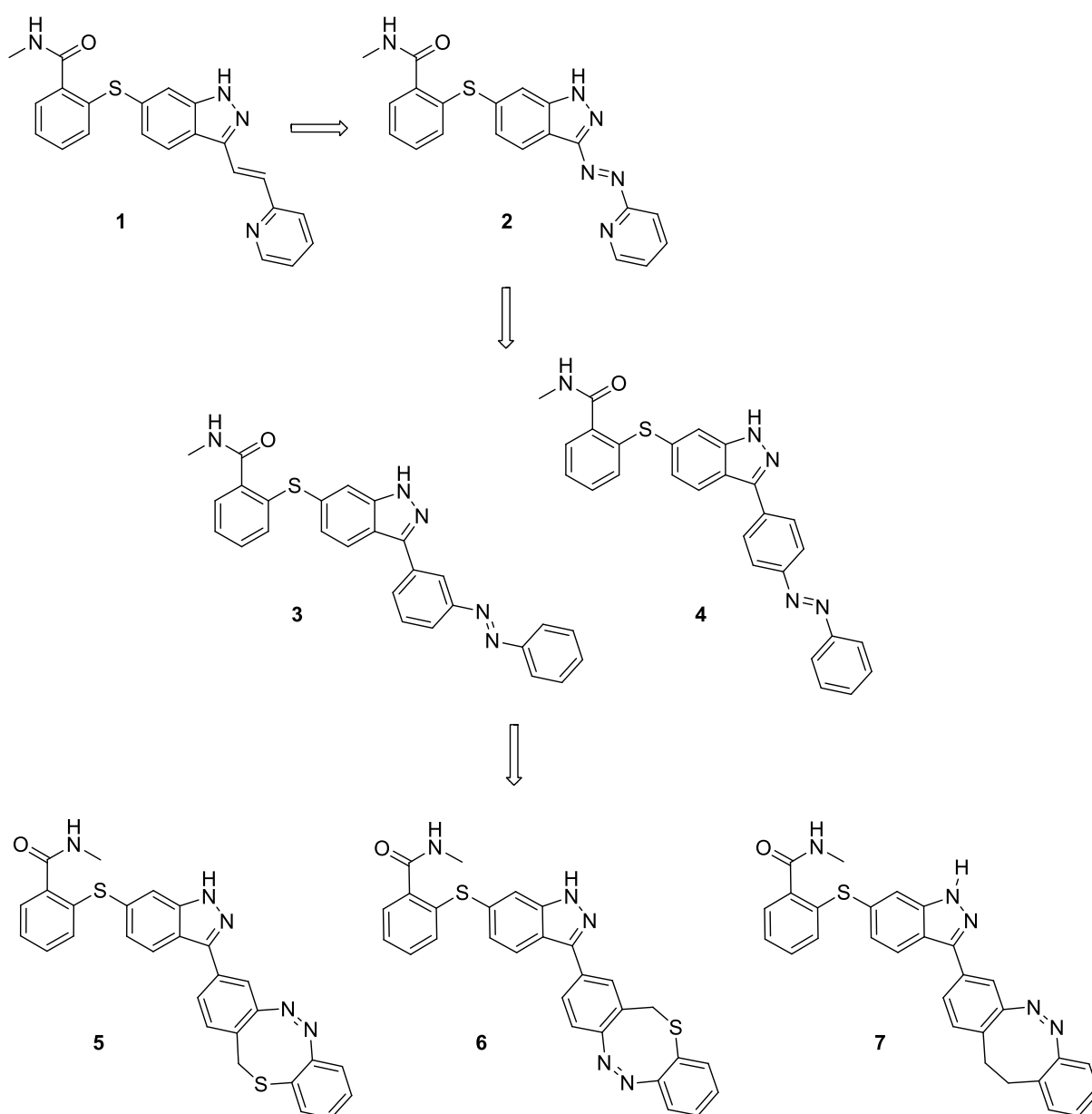


Abbildung 3.3. Übersicht der getesteten Verbindungen ausgehend vom Axitinib (**1**) basierend auf den Arbeiten von Kuhl^[203], Schmidt^[204] und Heintze.^[205]

Tabelle 3.1. Photochemische und biologische Eigenschaften verschiedener Axitinib-Photoschalter.^[195,203-205]

	#	λ_{exc} (nm)	PSS (<i>E/Z</i> %), DMSO (NMR)	$t_{1/2}$ (h), DMSO, 37 °C	Besonderheit	IC ₅₀ (nM) VEGFR2
Axitinib	1	385 (<i>Z</i> → <i>E</i>) 365 (<i>E</i> → <i>Z</i>)	88/12 (385 nm) 51/49 (365 nm)	>> 12*	[2+2]-Cycloaddition in wässrigen Lösungen	<i>E</i> : 72 <i>Z</i> : 1355
Azo-	2	365	n/a	n/a	Schnelle Azo-Hydrazon-Tautomerie	n/a
Azo-Benzol-	3	365	17/83	43.1	-	<i>E</i> : 1077** PSS _{365 nm} : 1289
	4	385	20/80	5.7	-	<i>E</i> : 1020** PSS _{385 nm} : 1435
	5	405	47/53	7.3	-	<i>Z</i> : > 10000 PSS _{405 nm} : 215
Diazocin-	6	405	25/75	3.7	-	<i>Z</i> : > 10000 PSS _{405 nm} : 251
	7	405	60/40	1.5	-	<i>Z</i> : > 399** PSS _{405 nm} : 470

* über 12 h thermisch stabil

** Restaktivität > 33 %

Da Diazocine im Gegensatz zu den Azobenzolen thermodynamisch stabil in der *cis*-Konfiguration vorliegen, profitiert das ganze Konzept der Photoschalter mit einer möglichen klinischen Anwendung davon. Während sowohl für die Azobenzol- als auch die Diazocin-Derivate die *trans*-Konfiguration als die aktive Form vermutet wird, liegen die Azobenzole in der *trans*-Konfiguration thermisch stabil vor. Bei Bestrahlung würden die Azobenzole somit lediglich „ausgeschaltet“, die Diazocin-Derivate hingegen „angeschaltet“ werden. Für eine therapeutische Nutzung werden das Konzept der unwirksamen thermodynamisch stabilen Form sowie eine Aktivierung zur wirksamen thermodynamisch labilen Konfiguration angestrebt.

Molecular Modeling

Im *molecular modeling* zeigte sich eine effektvolle Konfigurationsänderung von *trans* zu *cis*, die mit einem Wirkverlust einhergehen sollte, da die *cis*-Diazocine nicht mehr innerhalb der Bindetasche binden sollten (s. Abbildung 3.4 stellvertretend für die Diazocine **5**, **6**, **7**).

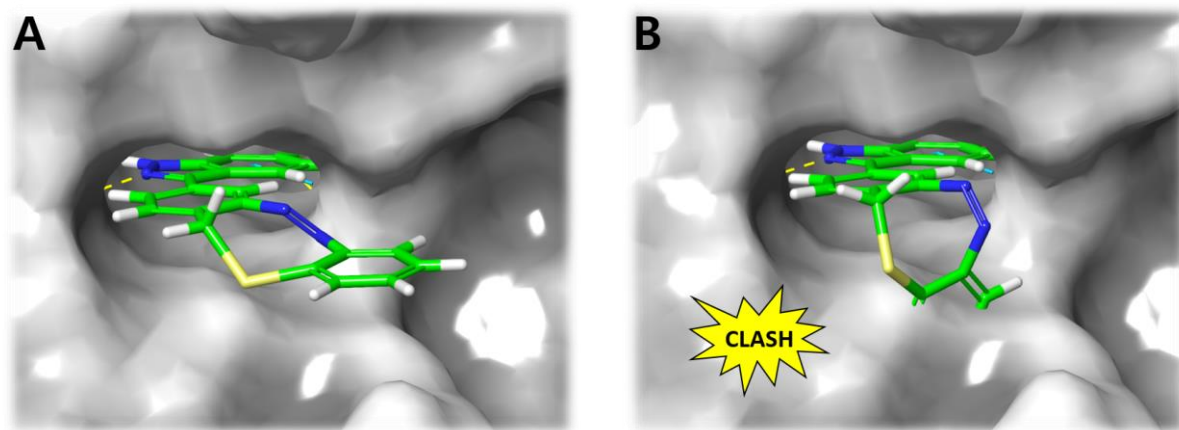


Abbildung 3.4. *Molecular modeling* von Verbindung 5 im VEGFR2.

A. *Trans*-Konfiguration von Verbindung **5** in der VEGFR2-Bindetasche mit Wasserstoffbrückenbindung zur *hinge*-Region (gelb). **B.** Darstellung der Bindungskonflikte (*clash*) bei *cis*-Konfiguration von **5** in der VEGFR2-Kinase. *Molecular modeling* erstellt von Schmidt.^[204]

Da Proteine wie Kinasen auch in ihrer Bindetasche eingeschränkt flexibel sind, können geringfügige Molekül-Änderungen ausschlaggebend für die Wirkung sein. Im Falle des Kohlenstoffdiazocins **7** wurde im *induced fit modeling* eine Bindung in der *cis*-Konfiguration gefunden, im Gegensatz zu den schwefelverbrückten Diazocinen **5** und **6** (s. Abbildung 3.5). Der Bindungswinkel der *cis*-Schwefeldiazocine beträgt 76.1° , der Winkel der *cis*-Kohlenstoffdiazocine 85.8° . Im Falle der VEGFR2-Inhibition reicht dieser Unterschied aus, um eine Bindung in der Kinasedomäne zu verhindern bzw. zu ermöglichen.

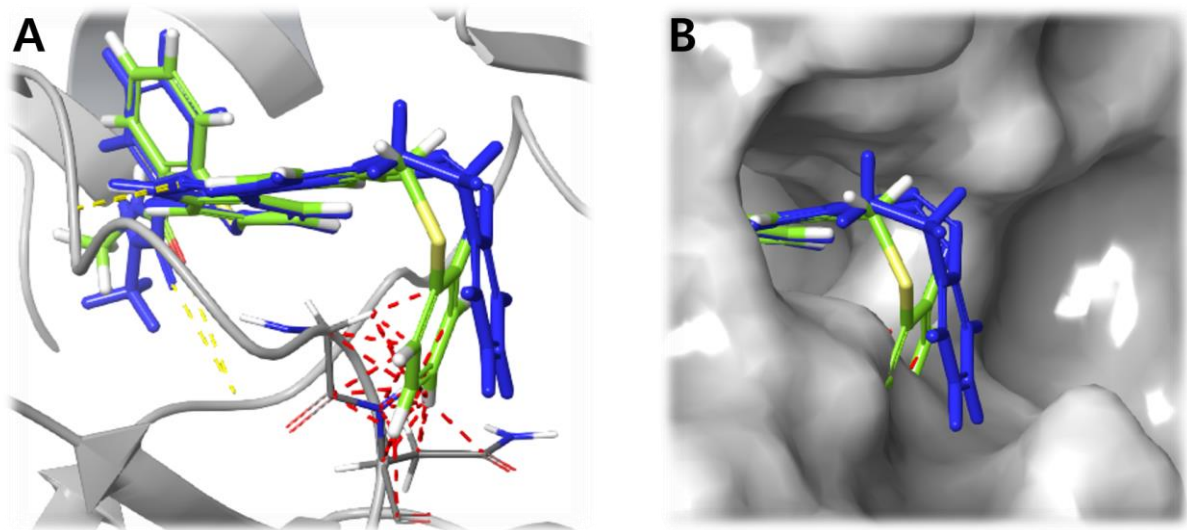


Abbildung 3.5. Darstellung der Bindungswinkel vom Schwefel- und Kohlenstoff-Diazocin im VEGFR2.

A. *Induced fit modeling* von Verbindung *cis-5* (grün) und *cis-7* (blau) in Überlagerung in der VEGFR2-Bindetasche mit Wasserstoffbrücken (gelb) und sterischen Konflikten mit dem Protein (rot). **B.** Darstellung aus **A** mit Proteinoberfläche. *Molecular modeling* erstellt von Schmidt.^[204]

Biologische Testung

Zunächst wurden die synthetisierten Diazocin-Axitinib-Derivate **5**, **6** und **7** nach photochemischer Charakterisierung (s. Tabelle 3.1) auf der isolierten VEGFR2-Kinase getestet. Die Kinaseaktivität wurde über den ATP-Verbrauch durch die Phosphorylierung eines Substrats ermittelt und über Biolumineszenz ausgelesen (ADP-Glo von Promega). Für die Heterodiazocine **5** und **6** wurden dabei ein 47-facher Wirkunterschied (215 nM vs. >10000 nM) bzw. ein 40-facher Wirkunterschied (251 nM vs. >10000 nM) von *cis* zum PSS bei 405 nm gemessen (s. Abbildung 3.6). Der tatsächliche Wirkunterschied liegt wahrscheinlich noch höher, da (*Z*)-**5** und (*Z*)-**6** mit einem IC₅₀ von über 10 µM nicht wirksam auf der VEGFR2-Kinase sind. Die nahezu identische Wirksamkeit vom Kohlenstoffdiazocin **7** bei Rotlicht oder Bestrahlung ist mit dem größeren Bindungswinkel des *cis*-Diazocins zu begründen, wodurch eine Bindung in (*Z*)-Konfiguration ermöglicht wird (s. Abbildung 3.5). Aufgrund der schlechten Löslichkeit der Verbindungen wurden 10 % DMSO im Kinaseassay eingesetzt. In der weiteren biologischen Testung wirkt sich ein hoher DMSO-Anteil (> 2 %) allerdings nachteilig auf das Zellwachstum aus.^[206]

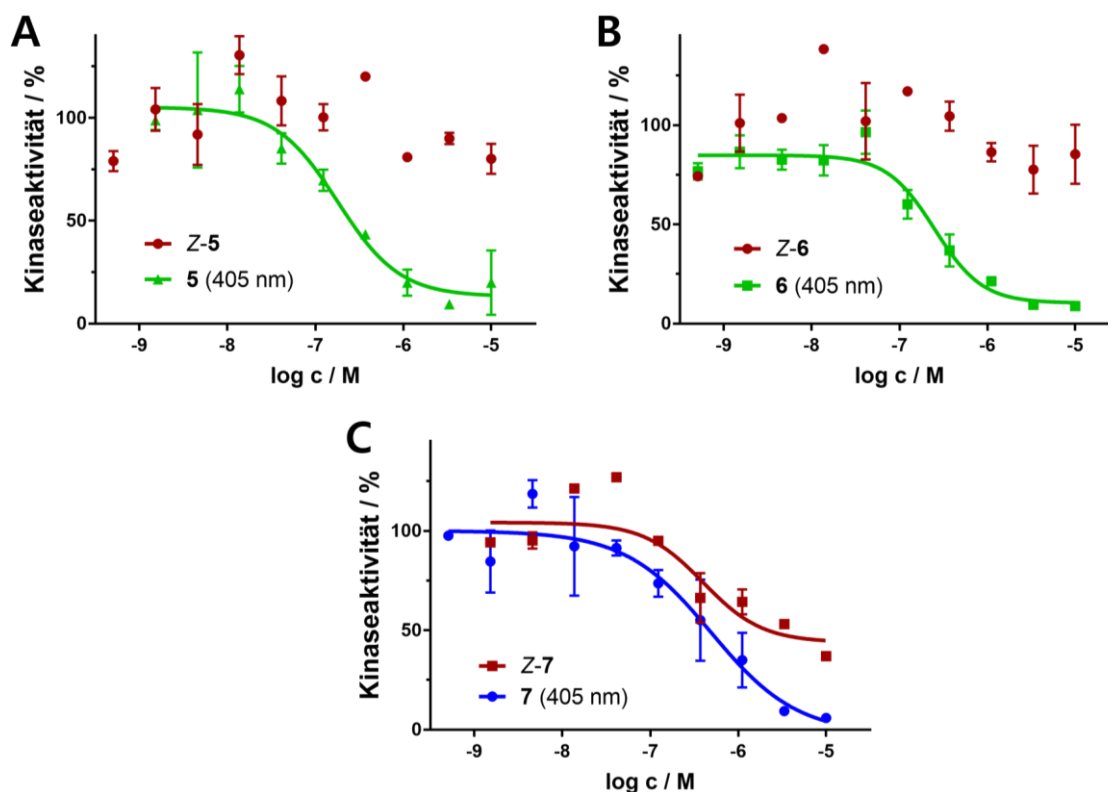


Abbildung 3.6. VEGFR2-Kinaseassays der Diazocin-Axitinib-Derivate.

A. Verbindung **5** unter kontrollierten Lichtbedingungen/Rotlicht (rot, IC₅₀ = >10000 nM) und unter Bestrahlung von 405 nm (grün, IC₅₀ = 215 nM) **B.** Kinaseaktivität nach Behandlung mit Verbindung **6** unter Lichtausschluss/Rotlicht (rot, IC₅₀ = >10000 nM) und Bestrahlung mit 405 nm (grün, IC₅₀ = 251 nM) **C.** Kohlenstoffdiazocin **7** unter kontrollierten Lichtbedingungen (rot, IC₅₀ = 399 nM bei 40 % Restaktivität) und nach Bestrahlung mit 405 nm (blau, IC₅₀ = 470 nM). Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt von Heintze mit einer finalen ATP-Konzentration von 10 µM und 10 % DMSO.^[204,205]

Um den Einfluss der Testverbindungen auf das Humankinom bzw. auf eventuell andere adressierte Kinasen abzuschätzen, wurde Verbindung **5** als erfolgreichster Kandidat aus dem Kinaseassay im Pamgene-Kinase-Screening (s. Kapitel 6.4.7, S. 134) untersucht. Verwendet wurde HUVEC-Zelllysate, da HUVEC-Zellen ein gutes Modell für Angiogenesehemmer wie Axitinib darstellen.^[207]

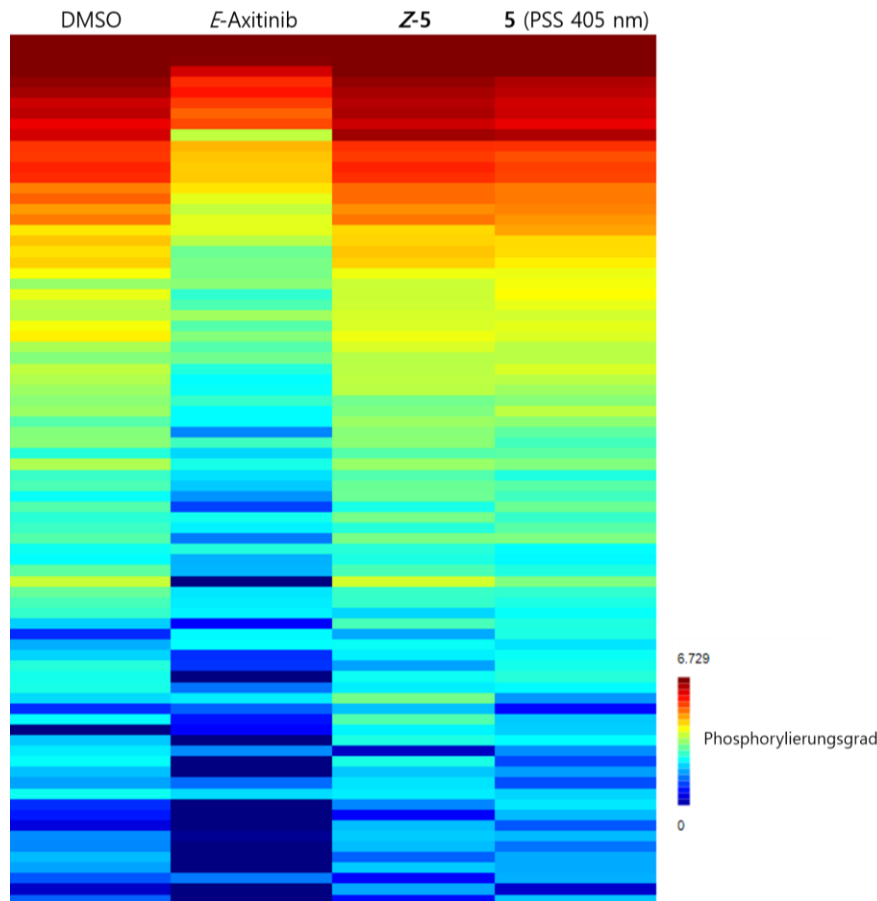


Abbildung 3.7. Phosphorylierungsaktivität von HUVEC-Zelllysate als *heat map*.

Phosphorylierungsprofil des HUVEC-Kinoms auf PTK-Chips dargestellt als *heat map*. Die Peptide wurden nach Phosphorylierungsgrad von hoch (rot) zu niedrig (blau) sortiert. Lysate wurden behandelt mit entweder 10 % DMSO (Negativkontrolle), (*E*)-Axitinib (Positivkontrolle), (*Z*)-5 oder dem PSS von **5** (erhalten nach Bestrahlung von (*Z*)-5 mit 405 nm). Die Wirkstoffkonzentration betrug 10 μM bei 10 % DMSO und $n = 3$.

Im Kinom-Profiling von Pamgene (s. Abbildung 3.7) konnte im Gegensatz zu den VEGFR2-Kinaseassays keine deutliche Inhibition von *trans*-**5** (bzw. dem PSS) repliziert werden. Es besteht zwar ein geringer Unterschied im Phosphorylierungsprofil zwischen *cis* und *trans*, jedoch nicht annähernd so groß wie zwischen Positiv- (Axitinib) und Negativkontrolle (DMSO). In der *box-plot*-Darstellung (s. Abbildung 3.8) ist eine Kinomaktivität ähnlich zur DMSO-Kontrolle erkennbar (unbestrahlt und PSS). Im *volcano plot* (s. Abbildung 3.9) setzt sich ein geringer Aktivitätsunterschied fort, bei allerdings wenig signifikant beeinflussten Peptiden. Aufgrund der geringen Anzahl signifikant phosphorylierter Peptide wurde auf eine *up-stream*-Analyse verzichtet und ein erneutes Kinase-Screening mit erhöhter Wirkstoff- und DMSO-Konzentration durchgeführt.

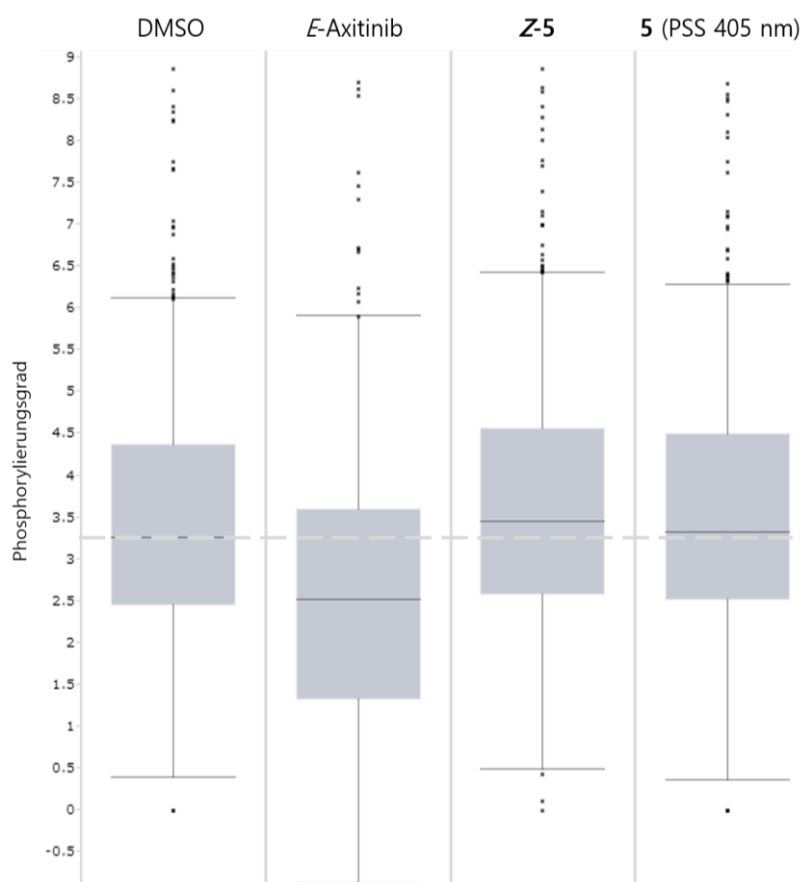


Abbildung 3.8. *Box-plot*-Darstellung des Phosphorylierungsgrades aus Abb. 3.7 durch HUVEC Zelllysate. Waagerechte Linie auf Höhe des Medians der DMSO-Kontrolle zur besseren Vergleichbarkeit. Wirkstoffkonzentration je 10 μ M. n = 3

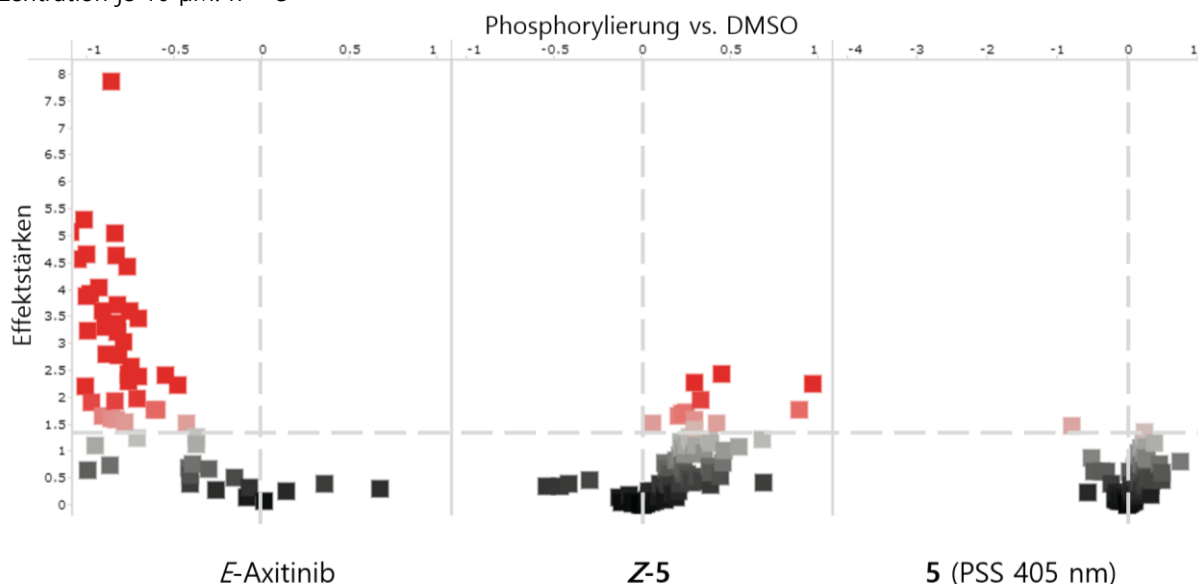


Abbildung 3.9. Signifikant beeinflusste Peptide im *volcano plot*.

Peptidphosphorylierungen aufgetragen nach Effektstärken gegen den Phosphorylierungsgrad im Vergleich zur DMSO-Kontrolle im *volcano plot*. Effektstärken über 1.4 (entspricht dem Signifikanzniveau von $p = 0.05$) werden in Rot dargestellt. Negative Werte auf der Abszisse zeigen einen geringeren Phosphorylierungsgrad im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, positive Werte einen höheren Phosphorylierungsgrad.

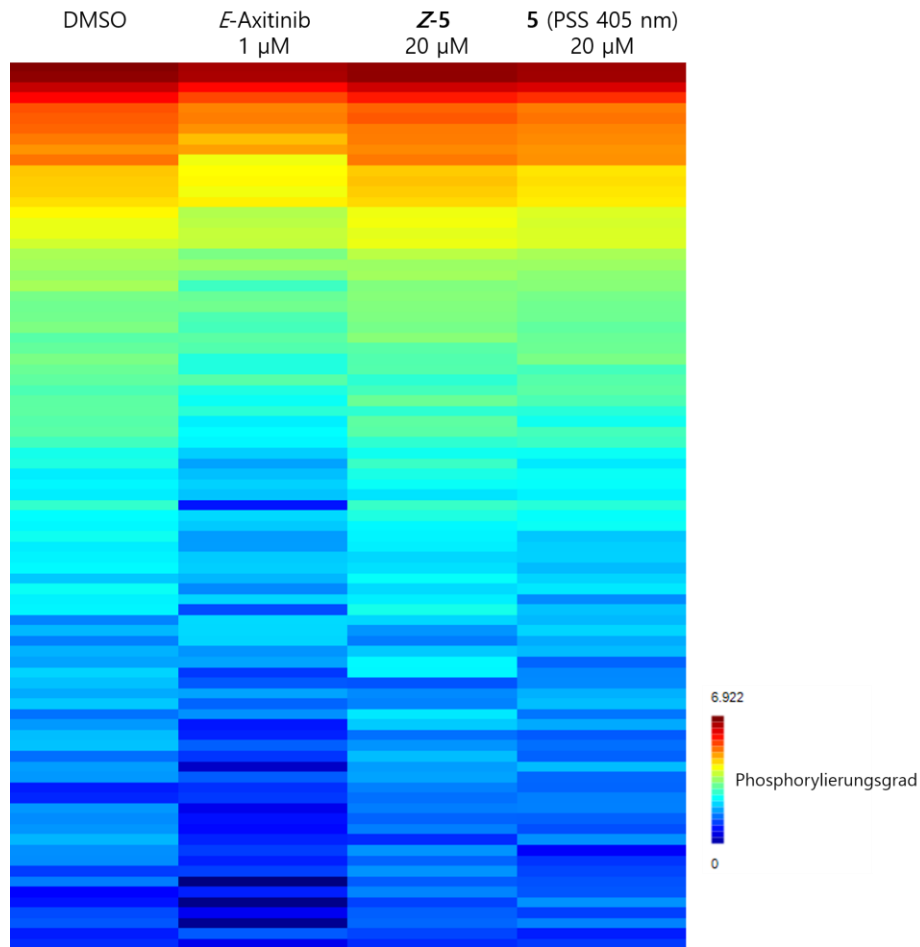


Abbildung 3.10. Kinase Profiling mit erhöhter DMSO-Konzentration.

A. Phosphorylierungsprofil des HUVEC-Kinoms auf PTK-Chips dargestellt als *heat map*. Die Peptide wurden nach Phosphorylierungsgrad von hoch (rot) zu niedrig (blau) sortiert. Zelllysate wurden behandelt mit entweder 10 % DMSO (Negativkontrolle), (*E*)-Axitinib (Positivkontrolle), (*Z*)-**5** oder dem PSS von **5** (erhalten nach Bestrahlung von (*Z*)-**5** mit 405 nm) bei einer DMSO-Konzentration von 10 % und $n = 2$.

Im zweiten Kinase-Screening wurden 20 µM Diazocin **5** eingesetzt, bei 10 % DMSO, um eine Ausfällung der Verbindungen zu vermeiden. Die Erhöhung der Konzentration hatte zwar auf der einen Seite eine leichte Erhöhung der Hemmwirkung der Diazocine auf das HUVEC-Zelllysate zur Folge (s. Abbildung 3.10 und Abbildung 3.11). Auf der anderen Seite konnten auch mit der maximal möglichen Konzentration keine starken Effekte von bestrahltem *Z*-**5** gezeigt werden und es war nur eine geringe Differenz in der Kinomaktivität von *Z*-**5** zu **5** (PSS) zu beobachten. Die Qualitätskontrolle mittels *volcano plot* ließ auch bei erhöhter Diazocinkonzentration keine *up-stream*-Analyse zu, da die beobachteten Effekte zu schwach waren (s. Abbildung 3.12).

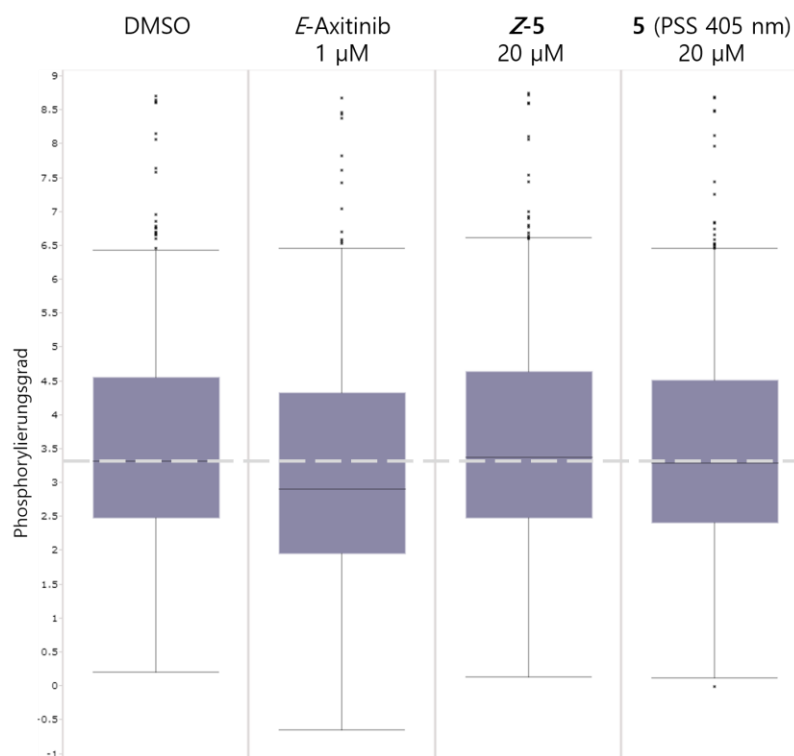


Abbildung 3.11. *Box-plot*-Darstellung des Phosphorylierungsgrades aus Abb. 3.10 durch HUVEC-Lysate bei 10 % DMSO.

Waagerechte Linie auf Höhe des Medians der DMSO-Kontrolle zur besseren Vergleichbarkeit.

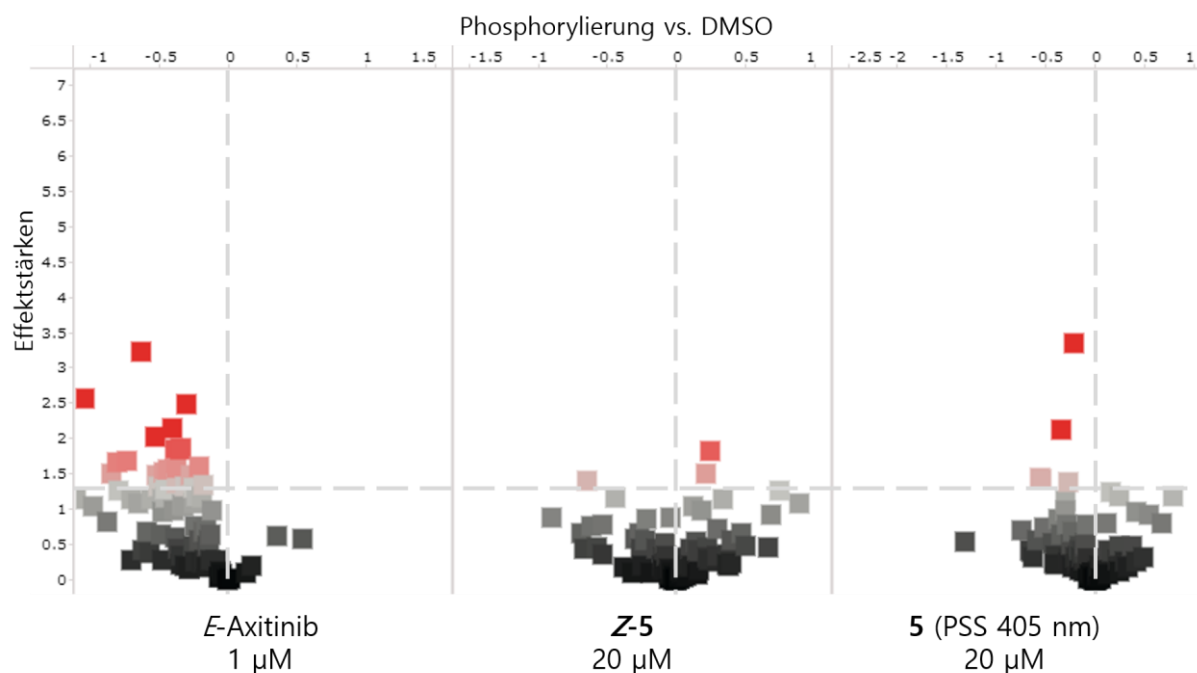


Abbildung 3.12. Signifikant beeinflusste Peptide bei erhöhter DMSO-Konzentration.

Peptidphosphorylierungen aufgetragen nach Effektstärken gegen den Phosphorylierungsgrad im Vergleich zur DMSO-Kontrolle im *volcano plot*. Effektstärken über 1.4 (entspricht dem Signifikanzniveau von $p = 0.05$) werden in Rot dargestellt. Negative Werte auf der Abszisse zeigen einen geringeren Phosphorylierungsgrad im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, positive Werte einen höheren Phosphorylierungsgrad.

Zusammenfassend lässt sich aus den bisherigen Experimentaldaten schlussfolgern, dass die Diazocin-Axitinib-Derivate bisher den größtmöglichen Kompromiss aus günstigen photochemischen Eigenschaften und Wirksamkeit für photoschaltbare Kinaseinhibitoren bilden. Mit den Ergebnissen aus dem Kinom-Profilung von Pamgene bleiben jedoch Zweifel, ob die Diazocinderivate ihre Wirksamkeit über den Kinaseassay hinaus in zellulären *in-vitro*-Systemen beibehalten können. Das Diazocin **5** konnte unter Bestrahlung mit 405 nm nicht zur Wirkung der Positivkontrolle Axitinib aufschließen. Zwar könnte eine rein selektive Wirkung gegenüber VEGFR2 die Inkonsistenz von Kinaseassay zum Profiling erklären, nur fehlen für eine valide *up-stream*-Analyse die entscheidenden signifikant phosphorylierten Peptide (s. Abbildung 3.9 und Abbildung 3.12).

Auf den ersten Blick erscheinen Diazocine als ideale Verbindungen zur Integration einer Photoschaltbarkeit in biologische Wirkstoffkandidaten. Dem gegenüber bestehen bei näherer Betrachtung zum einen eine schlechte Löslichkeit der Verbindungen (in Abhängigkeit zu den Substituenten) in wässrigen Medien. Daraus resultiert auch eine schlechte Anwendbarkeit der Substanzen im Zellassay und weiteren biologischen Testungen. Zum anderen gibt es inzwischen erste Indizien für Diazocin-Protein-Addukte nach Bestrahlung.^[208] Schwefelverbrückte Diazocine könnten nach ersten NMR-Untersuchungen dazu neigen, Disulfidbrücken zu schwefelhaltigen Aminosäuren, wie z.B. Cystein, auszubilden. Kohlenstoffdiazocine wurden dahingehend noch nicht untersucht. Eine Aktivierung analog zu den Suizidinhibitoren könnte zwar ein neues Feld der Photopharmakologie eröffnen, sofern der kovalenten Bindung ein Wirkverlust des *targets* folgt, die reversible Photoschaltbarkeit wäre dadurch jedoch nicht mehr gewährleistet. Die Diazocine bereichern den Bestand der photoschaltbaren Systeme für biologische Wirkstoffe sinnvoll, bedürfen allerdings noch einer Optimierung und eindeutigen Anwendungsbeispielen, um in dem Gebiet der Photopharmakologie überzeugen zu können.

3.1.2 BRAF^{V600E}-Inhibitoren

Kinase-Kurzporträt	BRAF ^{V600E}
Name	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i> bzw. <i>v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B</i>
Familie	Serin-/Threonin-Kinase
Funktion	Phosphorylierung von MEK, ^[44] ferner Wachstum und Differenzierung ^[45]
Therapeutische Relevanz	malignes Melanom, chronisch myelomonozytäre Leukämie ^[40,41]
Inhibition	Dabrafenib, Vemurafenib ^[29,40]

Die BRAF^{V600E}-Kinase stellt in dieser Arbeit einen Sonderfall dar. Es handelt sich dabei nicht um eine extrinsisch überaktivierte Kinase, sondern um eine *gain-of-function*-Mutante.^[45] Ausgelöst durch eine Punktmutation ist die BRAF^{V600E} nicht mehr auf eine Phosphorylierung der übergeordneten RAS-Kinase angewiesen, um aktiviert zu werden. In der Konsequenz löst die BRAF^{V600E} eine Daueraktivierung der nachfolgenden Signaltransduktionskaskade aus: das Zellwachstum wird stimuliert, die Zellen vermehren sich ungehemmt – Krebs entsteht.^[209] Dadurch, dass sich die Mutante strukturell vom Wildtyp unterscheidet, kann eine selektive Inhibition für therapeutische Zwecke genutzt werden. BRAF^{V600E}-Inhibitoren wie z.B. Vemurafenib überzeugen konzeptionell durch eine höhere Affinität zur Mutante gegenüber der Wildtyp-Kinase und sollten somit zu einer annehmbaren Verträglichkeit führen.^[42,43]

Die Licht-kontrollierte Inhibition der BRAF^{V600E}-Kinase

M. W.H. Hoorens, M. E. Ourailidou, T. Rodat, P. E. van der Wouden, P. Kobauri, M. Kriegs, C. Peifer, B. L. Feringa, F. J. Dekker, W. Szymanski

European Journal of Medicinal Chemistry 2019, 179, 133.

DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.06.042

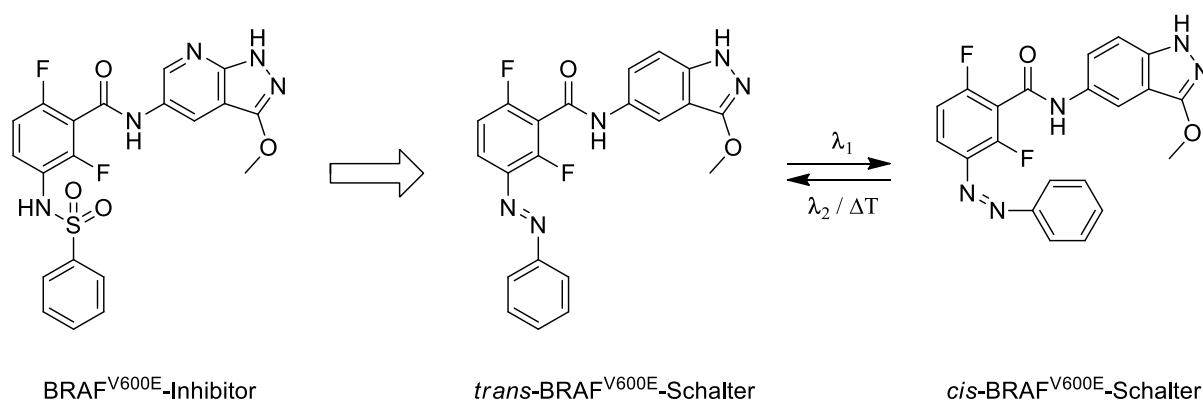


Abbildung 3.13. Azologisierung eines von Vemurafenib abgeleiteten Kinaseinhibitors.

Mit der Zulassung von Vemurafenib begann ein weiteres Kapitel der Erfolgsgeschichte der smKIs.^[43] Jedoch führte die gezielte Inhibition der BRAF^{V600E}-Mutante zu einer teilweisen Ab-sättigung der Heterodimere am BRAF-Wildtyp. Dies hatte eine paradoxe Aktivierung der Wildtypkinase und dadurch Rezidive in der Therapie zur Folge (s. Kapitel 1.2.2). Zur Überwindung des BRAF-Paradoxes werden u.a. Strategien zur Erhöhung der Selektivität an BRAF^{V600E} genutzt.^[210] Abgeleitet von einem hochselektiven Kinaseinhibitor wurde in der folgenden Publikation die Sulfonamidfunktion unter Variation der Benzolsubstitution durch Hoorens azologisiert (s. Abbildung 3.13). Strukturell weist die *cis*-Konfiguration des BRAF-Schalters zur Konfiguration der Vorlage eine hohe Homologie auf. Für das *trans*-Isomer dagegen wurde eine sterische Behinderung in der Kinasebindetasche aufgrund des erhöhten räumlichen Anspruchs vermutet. In der nachfolgenden Testung an der isolierten Kinase konnte ein 11-facher Unterschied von der *cis*-Konfiguration (0.16 μM) im Vergleich zu *trans* (1.68 μM) ermittelt werden. Überraschenderweise setzte sich der Wirkunterschied im Zellexperiment auf BRAF^{V600E}-positiven A375-Zellen nicht fort. Im Gegensatz zur Kontrolle wurde die Zellviabilität nicht wesentlich herabgesetzt und auch ein Wirkunterschied der beiden Isomere konnte nicht nachgewiesen werden. Das anschließende Pamgene-Kinase-Screening zeigte zwar einen Aktivitätsunterschied von *trans* (erhöht) zu *cis* (verringert) im Kinom von BRAF^{V600E}-positiven SK-MEL-28-Zellen, jedoch auch eine stark erhöhte Kinomaktivität unter Einfluss der BRAF-Schalter (*cis* und *trans*) im Vergleich zur Negativkontrolle DMSO. Die

stark erhöhte Phosphorylierung im Kinom-Profilung liefert einen möglichen Erklärungsansatz für die verringerte Zelltoxizität auf Melanomzellen, indem wahrscheinlich kompensative Ausweichrouten im Kinasenetzwerk eine erhöhte Phosphorylierungsaktivität verursacht haben.^[211,212] Eine paradoxe Aktivierung der BRAF^{WT} erscheint unwahrscheinlich, da beide Zelllinien die *gain-of-function*-Mutante BRAF^{V600E} enthalten und nicht den für das BRAF-Paradox benötigten Wildtyp. Im nachfolgenden *molecular modeling* konnte der gemessene Wirkunterschied beider Isomere an der Kinase durch die sterisch anspruchsvolle *trans*-Konfiguration verifiziert werden.

Im Falle der photoaktivierbaren BRAF-Schalter lieferte das Pamgene-Kinase-Screening entscheidende Hinweise für die Inkongruenz von der Testung auf der isolierten Kinase (mäßige Wirksamkeit, jedoch 11-facher Isomere-Wirkunterschied) und der Testung im Zellsay (keine Wirksamkeit, kein Wirkunterschied). Eine *off-target*-Identifizierung über eine *upstream*-Analyse konnte aufgrund schlechter Signalintensitäten mittels Kinom-Profilung jedoch nicht etabliert werden.



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmech>

Research paper

Light-controlled inhibition of BRAFV600E kinase

Mark W.H. Hoorens^{a,b}, Maria E. Ourailidou^c, Theo Rodat^d, Petra E. van der Wouden^c, Piermichele Kobauri^b, Malte Kriegs^e, Christian Peifer^d, Ben L. Feringa^b, Frank J. Dekker^c, Wiktor Szymanski^{a,b,*}

^a University Medical Center Groningen, Department of Radiology, Medical Imaging Center, University of Groningen, Hanzeplein 1, 9713 GZ Groningen, Netherlands

^b Stratingh Institute for Chemistry, Faculty of Science and Engineering, University of Groningen, Nijenborgh 7, 9747 AG Groningen, Netherlands

^c Department of Chemical and Pharmaceutical Biology, University of Groningen, Antonius Deusinglaan 1, 9713 AV Groningen, Netherlands

^d Institute of Pharmacy, Christian-Albrechts-University of Kiel, Gutenbergstr. 76, 24118 Kiel, Germany

^e Laboratory of Radiobiology & Experimental Radiooncology and UCCH Kinomics Core Facility, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistr. 52, 20246 Hamburg, Germany



ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 February 2019

Received in revised form

22 May 2019

Accepted 15 June 2019

Available online 18 June 2019

Keywords:

BRAF^{V600E}

Photopharmacology

Photocontrolled inhibitor

Metastatic melanoma

Azobenzene

ABSTRACT

Metastatic melanoma is amongst the most difficult types of cancer to treat, with current therapies mainly relying on the inhibition of the BRAF^{V600E} mutant kinase. However, systemic inhibition of BRAF by small molecule drugs in cancer patients results – paradoxically – in increased wild-type BRAF activity in healthy tissue, causing side-effects and even the formation of new tumors. Here we show the development of BRAF^{V600E} kinase inhibitors of which the activity can be switched on and off reversibly with light, offering the possibility to overcome problems of systemic drug activity by selectively activating the drug at the desired site of action. Based on a known inhibitor, eight photoswitchable effectors containing an azobenzene photoswitch were designed, synthesized and evaluated. The most promising inhibitor showed an approximately 10-fold increase in activity upon light-activation. This research offers inspiration for the development of therapies for metastatic melanoma in which tumor tissue is treated with an active BRAF^{V600E} inhibitor with high spatial and temporal resolution, thus limiting the damage to other tissues.

© 2019 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Skin cancer is one of the most frequently occurring types of cancer [1]. Of all skin cancers, melanoma has been reported to be the most deadly and challenging to treat [2]. Approximately 40–50% of melanomas harbor a mutation in the BRAF kinase [3], which is a cytosolic serine/threonine kinase belonging to the family of Rapidly Accelerated Fibrosarcoma (RAF) kinases. RAF kinases are part of the RAS/RAF/MEK/ERK signal transduction pathway which is involved in regulation of cell proliferation [4]. Increased activity of this pathway is often involved in the formation of cancer (Fig. 1). Due to the high frequency of the mutations and its role in the formation of cancer, the BRAF kinase became of clinical interest [3].

* Corresponding author. University Medical Center Groningen, Department of Radiology, Medical Imaging Center, University of Groningen, Hanzeplein 1, 9713 GZ Groningen, Netherlands.

E-mail address: w.szymanski@umcg.nl (W. Szymanski).

<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.06.042>

0223-5234/© 2019 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

The activity of BRAF in cells is tightly regulated to prevent too extreme proliferation. Current hypothesis is that BRAF can be activated by dimerization and subsequent binding to RAS. While in the homo-dimeric state, it can also inactivate its binding partner through phosphorylation [5,6]. A single point mutation is believed to abolish the requirement of dimerization and binding to RAS for activation, resulting in elevated BRAF kinase activity in its monomeric form [7]. The most common BRAF mutation is V600E, which results in an about 500 times increased activity of the BRAF kinase compared to the wild-type [8]. Since a single mutation of the BRAF kinase drives the formation of a melanoma, BRAF^{V600E} has become a therapeutic target. Currently two FDA-approved BRAF^{V600E}-selective ATP-competitive inhibitors are of use in the clinical practice. Vemurafenib (whose name is derived from V600E mutated BRAF inhibitor) has selectivity for BRAF^{V600E} over wtBRAF and is clinically used for the treatment of metastatic melanoma [9], alongside the second FDA approved BRAF^{V600E} inhibitor, Dabrafenib (Fig. 2.) [10]. Unfortunately, BRAF^{V600E} inhibitors Vemurafenib and

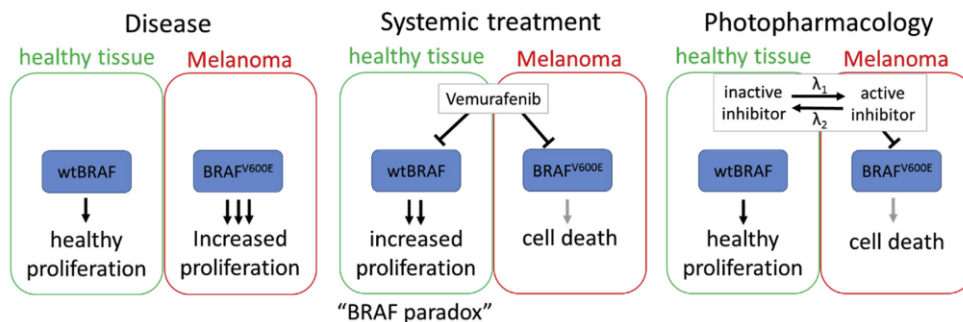


Fig. 1. Conceptual description of the comparison between the disease (left), the systemic Vemurafenib treatment of Melanoma (middle) and the photopharmacological approach (right). Left: The BRAF^{V600E} mutation drives the cell proliferation, resulting in cancer. Middle: For the treatment of Melanoma, Vemurafenib is active in both healthy and cancerous tissue, where in healthy tissue it can paradoxically increase the activity of the downstream pathway resulting in increased proliferation and potentially in the formation of new tumors. In melanoma, Vemurafenib induces cell death. Right: The photopharmacological approach aims to use an inactive inhibitor in healthy tissue that does not affect proliferation, while in melanoma the BRAF^{V600E} inhibitor can be locally switched on with light, inducing cell death.

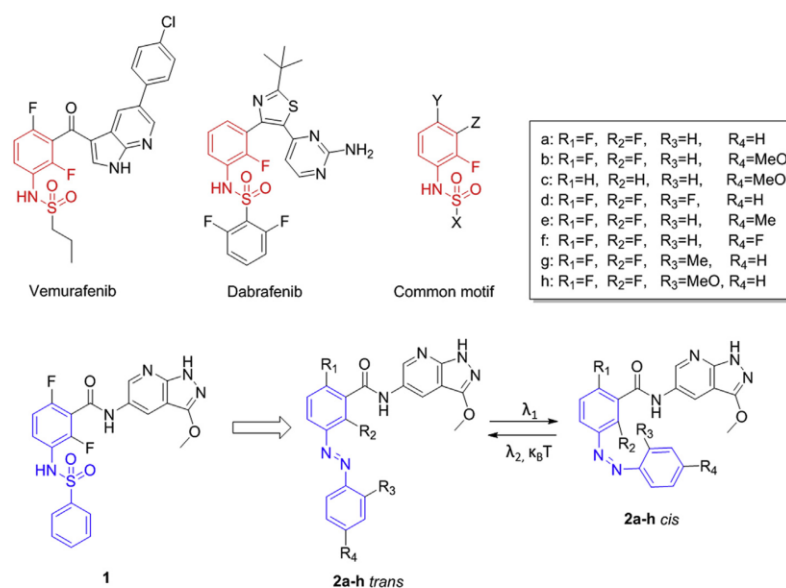


Fig. 2. Top: structure of Vemurafenib, Dabrafenib and a common motif found in many BRAF^{V600E} inhibitors. Bottom: Compound 1 has been reported as an improved Vemurafenib analog. Inspired by compound 1, eight photoswitchable BRAF^{V600E} inhibitors 2a-h were designed. Upon irradiation with light of wavelength λ₁, trans-2a-h can be switched to cis-2a-h. This isomerization can be reversed by irradiation with light of wavelength λ₂ or in a thermal relaxation process.

Dabrafenib, used systemically, have several disadvantages. BRAF^{V600E} inhibitors can increase the activity of the wild-type BRAF kinase in healthy cells, an effect known as “BRAF paradox” (See Fig. 1). This paradoxical activation is hypothesized to be caused by sub-saturated state of BRAF as a homo-dimer, in which the auto-inactivation mechanism is partially inhibited, resulting in a net increase of BRAF activity [10–12]. In healthy cells, increased activity of the RAS/RAF/MEK/ERK pathway promotes proliferation and development of new cancers, a fact that has been observed in some melanoma patients treated with BRAF^{V600E} inhibitors [10,13]. The side effects observed with these kinase inhibitors illustrate that systemic exposure to chemotherapeutic agents can tremendously increase the disease burden. This highlights the importance of developing new concepts for spatial and temporal control over the exposure to, or activity of, chemotherapeutic agents.

The disadvantages of systemically used chemotherapeutic agents inspire, amongst others, the development of innovative solutions for local drug activation/inactivation by external control. Such approaches have the potential to improve the exposure of diseased tissue and to reduce the exposure of healthy tissue to active chemotherapeutic agents, whereas the disease tissue can be treated with higher doses. The emerging field of photopharmacology [14–17] offers a technology that enables local activation of chemotherapeutic agents by using light to control drug activity (see Fig. 1). Irreversible control can be acquired by the introduction of a photocleavable protecting group, which will result in a pro-drug that can be light-activated [18]. This has been successfully achieved for many chemotherapeutic agents [19], including BRAF^{V600E} inhibitor Vemurafenib [20]. Reversible photocontrol over drug activity is being achieved through the

introduction of a photoswitchable functional group, such as the frequently used azobenzene, into the structure of bioactive compounds. Azobenzene (See Fig. 2, highlighted in blue) is stable in the *trans* isomer and, upon irradiation with UV light, can be switched to the *cis* isomer [21]. This process can be reversed thermally or *via* irradiation with visible light. The two photoisomers of azobenzene differ in structure, polarity and solubility [22] and these differences can be employed to design molecules with photoswitchable biological activity. Since isomerization from *trans* to *cis* can only be achieved photochemically, while re-isomerization from *cis* to *trans* occurs both photochemically and thermally, the fraction of *cis* isomer is more easily regulated. Therefore, it is preferred to carefully design molecules in which the *cis* isomer is more active than the *trans* isomer [15].

The photopharmacology approach has been successfully applied for molecules inspired by anti-cancer drugs such as Vorinostat [23], Bortezomib [24,25] and Combretastatin A4 [26–29]. Also for kinases, several photocontrolled inhibitors have been reported. For example, the group of Grøtli acquired control over the activity of the RET kinase [30], the group of Branda over the activity of Protein Kinase C [31] and the group of Peifer of the activity of vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) [32]. This sets the stage to apply this concept to develop molecules that enable reversible, spatial and temporal control over the activity of BRAF^{V600E} using light. Yet, the development of kinase inhibitors with photocontrolled activity has been shown to be challenging [33]. This is supported by a review of Hüll *et al.*, which reports 123 photoswitchable bioactive compounds [17], with only three of them targeting a kinase [30–32], even though kinase inhibitors are of high clinical interest. More recently, the groups of Peifer and Herges reported photo-switchable kinase inhibitors for the p38 α MAPK and CK1 β kinases. For these photo-switchable kinase inhibitors, small differences in activity between photo-isomers was observed, probably due to conformational adaptation of the kinase to either one of the photo-isomers of the ligand and/or irreversible reduction of diazo as the key causes for small differences in activity between photo-isomers [34].

Here we describe the design, synthesis and evaluation of BRAF^{V600E} inhibitors with photocontrolled activity, whose structure was inspired by an analog of Vemurafenib. In total, eight BRAF^{V600E} inhibitors were synthesized and their photochemical properties were determined. Subsequently, the activities of both their respective *trans* and *cis* isomers were determined in a cell-free BRAF^{V600E} Western-blot-based activity assay, followed by cell cytotoxicity studies and kinase off-target screening for the most promising inhibitor.

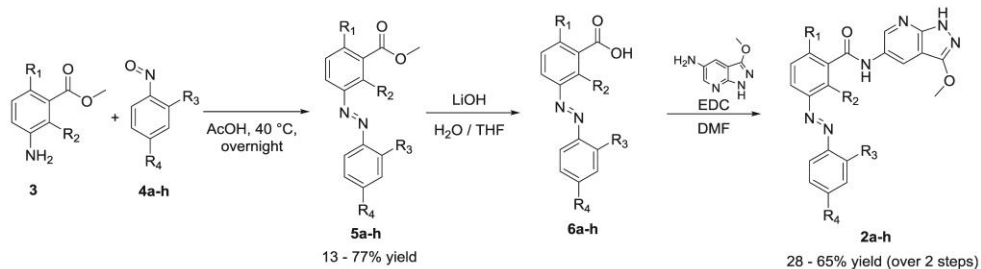
2. Results and discussion

Numerous inhibitors for the BRAF^{V600E} kinase, including the FDA-approved drugs Vemurafenib and Dabrafenib, harbor a common motif (Fig. 2, red), which consists of a benzene ring with a sulfonamide and a fluorine substituents. Group X on the sulfonamide is generally a propyl or aryl group, while the Y group is usually hydrogen or fluorine and the Z group consists of heterocycles, coupled either directly (such as in Dabrafenib) or by a carbonyl linker (such as in Vemurafenib) on an amide [35–40]. As demonstrated by co-crystal structures of BRAF^{V600E} bound to its inhibitors [36–39], the common motif and the Z group are flat or under a small angle in the ATP binding pocket, where the heterocycles of the Z group form hydrogen bonds with Cys532. In contrast to the rest of the inhibitor, which is planar, the sulfonamide is bent, resulting in an approximate 90° angle between the common motif and the X group. This X group binds in a small pocket, stabilized by interactions between the sulfonamide and Gly596, Phe595 and Asp594.

A straightforward choice for the design of a photoswitchable BRAF^{V600E} inhibitor would be the replacement of the sulfonamide of Dabrafenib by a diazo group, introducing a photoswitchable azobenzene, along the principles of azologization [41]. However, Dabrafenib itself is already photochemically unstable. Upon UV light irradiation, a side-product is irreversibly formed, which is biologically less active [42]. This process might compete with photoisomerization, which makes Dabrafenib unsuitable as a starting point for a photoswitchable inhibitor. Our design of a photoswitchable BRAF^{V600E} inhibitor was instead based on compound 1 (Fig. 2), which was found upon optimization of Vemurafenib [43]. We selected compound 1 as a starting point to design photoswitchable analogs. This compound contains three aromatic moieties coupled by either an amide or a sulfonamide linker. Both linkers provides a site for replacement by a diazo group to generate inhibitors with an azobenzene photoswitch. Yet, when comparing into the binding mode of inhibitors in co-crystals with the BRAF^{V600E} mutant, it became apparent to us that the two aromatic rings coupled by the amide are in one plane or deviate only slightly from this plane. Replacement of this amide by a *trans* isomer of the azobenzene functionality would provide inhibitors that retain the orientation of these rings. In crystal structures, the two aromatic rings coupled by the sulfonamide adopt a bent conformation. Therefore we anticipate that replacement of the sulfonamide by the *cis* isomer of the azobenzene functionality would retain the bioactive conformation. Since the concept of photo-activation requires activity of the *cis* isomer and inactivity of the *trans* isomer (*vide supra*), we chose to replace the sulfonamide functionality of 1 by a diazo group. We note, however, that the sulfonamide is involved in binding to the BRAF^{V600E} kinase and we, therefore, anticipate a decrease of activity.

For bio-active compounds with photocontrolled activity, every chemical modification to the structure potentially changes both the biological and photochemical properties such as the position of the absorption band, the rate of thermal relaxation of the *cis* isomer back to the *trans* isomer and the highest ratio between *trans* and *cis* that can be achieved upon irradiation at photo-stationary state (PSS). Optimizing photocontrolled inhibitors with respect to all the parameters proved to be challenging, because a maximal difference in biological activity between both photo-isomers had to be achieved, while retaining optimal *trans-cis* ratios at PSS and half-life of the *cis* isomer. First, compound 2a was designed to determine the effect of replacing the sulfonamide group with a diazo linker. While the percentages of the *cis* isomer at PSS of unsubstituted azobenzenes are usually relatively low, installing a *p*-MeO group enable improvement to more than 95% of the *cis* isomer upon isomerization [44]. This idea inspired the design of compound 2b with a *p*-MeO on the azobenzene photoswitch. The MeO group was moved to the *ortho* position in compound 2h, with the idea that this can also improve the ratio of isomers at PSS. Compound 2c was designed to determine the effect of both the fluorine atoms at the R₁ and R₂ position. Compounds 2d and 2f were inspired by the SAR described by Wengłowski *et al.* [43], where fluorine at R₃ increase the activity of the inhibitor, while at R₄ it showed opposite effects. To increase the steric bulk, compound 2e and 2g were designed with a methyl substituent at either the *ortho* or *para* position.

Photoswitchable BRAF^{V600E} inhibitors 2a-h were synthesized (Scheme 1) by condensing anilines 3 and nitrosobenzenes 4a-h under standard Mills reaction conditions (see Supporting Information). Subsequently, the methyl ester of 5a-h was hydrolyzed using LiOH and the resulting acid was coupled to a previously reported [35] 3-methoxy-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-5-amine, giving the final compounds 2a-h. Thus we generated eight photoswitchable BRAF^{V600E} inhibitors.

Scheme 1. Synthesis of BRAF^{V600E} inhibitors with photocontrolled activity.

3. Photochemical properties of compounds 2a-h

Next, the photochemical properties of these eight photo-switchable BRAF^{V600E} inhibitors were determined and the results are shown in Table 1. Compounds 2b and 2c containing a *p*-MeO

substituent have absorption maxima in DMSO at $\lambda = 357$ nm and 352 nm, respectively. All other inhibitors have absorption maxima at λ 's ranging from 332 to 340 nm. When recording absorption spectra in the more biologically relevant BRAF assay buffer, the absorption bands show small hypsochromic shifts, yet all retain

Table 1
Photochemical properties.

compound	structure	$\lambda_{\max,trans}$ DMSO	$t_{1/2}$ <i>cis</i> At rt DMSO	% <i>cis</i> at PSS	$\lambda_{\max,trans}$ BRAF assay buffer	$t_{1/2}$ <i>cis</i> ²
2a		332 nm	>10 h	55%	328 nm	5.4 h
2b		357 nm	>10 h	92%	341 nm	>24 h *
2c		352 nm	>10 h	94%	345 nm	>10 h
2d		336 nm	>20 h	71%	331 nm	-5 h *
2e		340 nm	>20 h	84%	338 nm	>24 h *
2f		335 nm	>20 h	62%	338 nm	>24 h *
2g		335 nm	>70 h	77%	334 nm	>24 h *
2h		334 nm	>24 h	88%	327 nm	>24 h *

¹ in DMSO, ² At room temperature in BRAF assay buffer * (50% ACN).

their maxima between 328 and 345 nm.

Using NMR spectroscopy, the distribution of isomers at the photo-stationary state (PSS) upon irradiation with 365 nm light was determined, to quantify the efficiency of photochemical *trans-cis* isomerization. Unsubstituted compound 2a can only reach 55% *cis* at PSS. Methoxy substituents at the R₃ and R₄ positions of 2b, 2c and 2 h resulted in near-quantitative switching. Methyl and fluorine substituents (compound 2d–g) result in a PSS of between 61 and 84%.

To determine the rate of thermal *cis-trans* relaxation, the half-lives of the *cis* isomers were determined in both DMSO and the BRAF assay buffer at room temperature. In DMSO, for all compounds relatively long half-lives were observed. The half-life of the *cis* isomer of compounds 2a and 2c was determined in BRAF assay buffer to be shorter than in DMSO, yet the half-lives are still in the hour range. Of all other compounds, the half-lives of the respective *cis* isomers were determined in a 1:1 mixture of BRAF assay buffer and acetonitrile, for solubility reasons. In this mixture, long half-lives of over a day were observed at room temperature. From the measured half-lives we concluded that the extend of thermal relaxation from *cis* to *trans* during the 1 h reaction time used in the Western blot BRAF^{V600E} activity assay (*vide infra*) is very limited.

4. Biological evaluation

The activity of the BRAF^{V600E} inhibitors was determined using an assay [45] with purified recombinant BRAF^{V600E} with inactive MEK-1 as a substrate, and the enzymatic activity was determined by quantifying the phosphorylated-MEK-1 product using Western Blot. Prior to the assay, the inhibitor was either heated for 30 min at 60 °C to fully thermally adapt to the *trans* isomer or irradiated with 365 nm light for 45 min to reach PSS (see Table 1).

First, the IC₅₀ values of the reference compounds Vemurafenib and compound 1 were determined to be 9.6 ± 3.3 nM and 22 ± 10 nM, respectively (Fig. 3A). Compound 2a, with H as substituents at R₃ and R₄, showed an IC₅₀ in the dark of 1.68 ± 0.62 μM, which decreased to 156 ± 47 nM upon light-induced switching to the *cis* isomer, resulting in an approximately 10-fold increase in activity upon irradiation, as shown in Fig. 3B. Furthermore, the reversibility of this activation was determined, as demonstrated in Fig. 3C: going through a cycle of switching to *cis* with UV light and thermal re-isomerization, the original activity was recovered, indicating that the irradiation leads to reversible isomerization of the azobenzene moiety and does not result in an irreversible photodegradation. We have observed that, as compared to 1,

compound 2a lost some of the potency, likely due to the loss of the beneficial interactions of the sulfonamide within the active site. Unfortunately, the photochemical properties of compound 2a are suboptimal, with only 55% of the active *cis* isomer at PSS.

Compared to compound 2a, installing a para-alkoxy substituent on azobenzenes usually results in near quantitative isomerization from *trans* to *cis*, as was also observed for compounds 2b and 2c, bearing a MeO substituent at the R₄ position. Even though 2b and 2c show improved photo-isomerization compared to 2a, no statistically significant difference in kinase inhibitory activity between the dark and irradiated state was observed for either compound. The difference between 2b and 2c is the presence of two fluorine substituents at the R₁ and R₂ position of compound 2b. However, having the two fluorines replaced by hydrogen in compound 2c did not affect the biological activity.

Additional fluorine substituents were placed at the R₃ position in compound 2d and at the R₄ position of compound 2f. Both for compound 2d and 2f no statistically significant difference in activity between the dark and irradiated state was observed and the fluorine substituents resulted in less active inhibitors. In contrast to placing a small fluorine substituent at the R₄ position – surprisingly – a methyl substituent on this position of compound 2e resulted in improved activity. Even though no difference in activity between the dark and irradiated state of 2e was observed, the inhibitor has an IC₅₀ value comparable to reference compound 1 and Vemurafenib. Furthermore, the influence of *ortho* substituents was further determined with compound 2g with a methyl at the R₃ position and compound 2h with a methoxy substituent at the R₃ position, again showing no statistically significant difference between the dark and irradiated state a further loss of potency.

In the enzymatic assay, the activity of compound 2a increased approximately 10-fold upon irradiation. To determine if the observed difference in activity from the enzyme assay could be translated to a difference in cytotoxicity, cell viability experiments were performed in A375 cells, a melanoma cell line - harboring the BRAF^{V600E} mutation – which is commonly used to study the cytotoxicity of BRAF^{V600E} inhibitors [12,38,40,46]. However, upon incubation for 24 h (see Fig. 4a), no cytotoxicity was observed for both 2a in the dark and irradiated state, where both reference compounds resulted in lower cell viability. The inhibition of BRAF^{V600E} by compound 2a in the enzymatic inhibition assay could not be translated to cytotoxicity in A375 cells, possibly due to off-target activity for other kinases or escape routes to the RAS/RAF/MEK/ERK proliferation pathway.

In the development of kinase inhibitors, it has proven to be very challenging to develop inhibitors with high selectivity towards

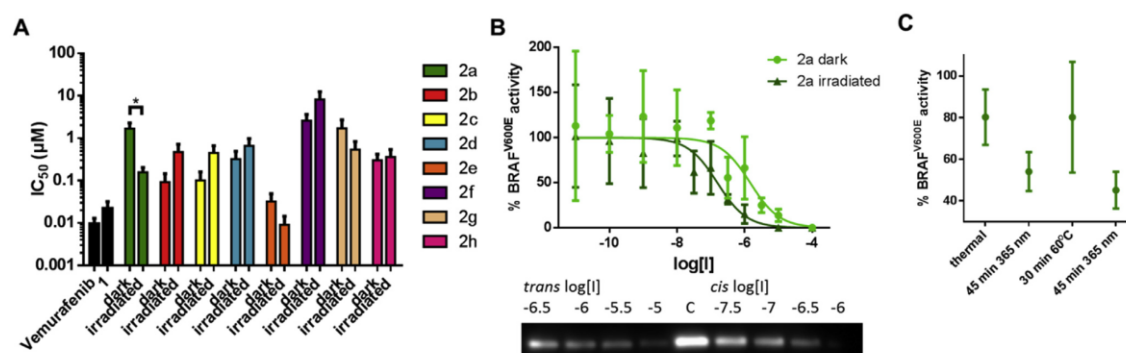


Fig. 3. BRAF^{V600E} activity assay. A: IC₅₀ values as determined using the BRAF^{V600E} assay. B: Top: dose-response curve of 2a in *trans* and *cis*. Bottom: Western Blot detection of p-MEK1. C: Kinase activity after sequential switching, by irradiation from *trans* to *cis*, thermal relaxation to *trans* and irradiation from *trans* to *cis*, at 1 μM of 2a (N = 2, ±S.D.).

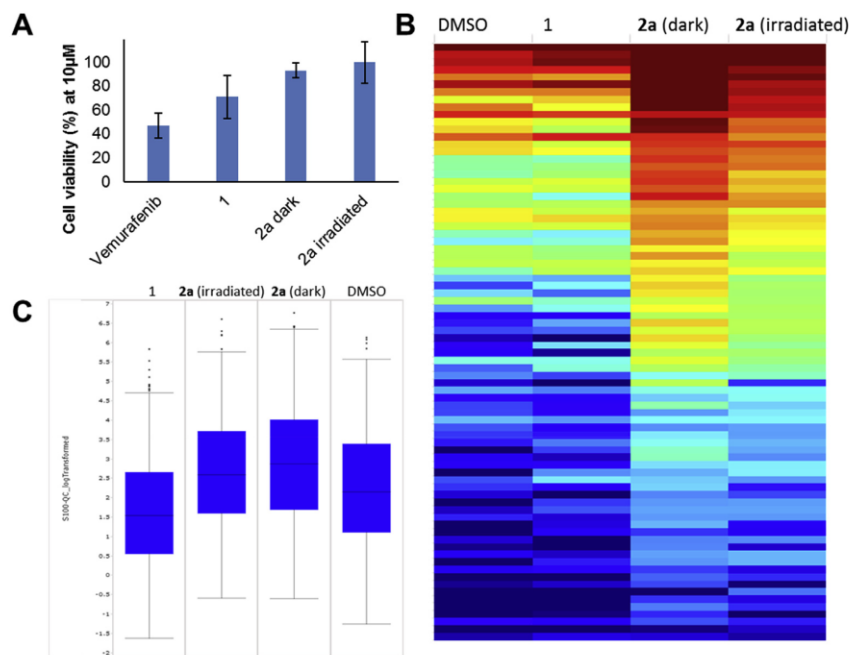


Fig. 4. A: Cell viability MTS assay of A375 cells after 24 h incubation with 10 μM Venurafenib, compound 1, compound 2a thermally adapted and irradiated, all compared to DMSO. B–C: Kinome profiling using cell lysates from SK-Mel-28 cells. The lysates were treated with a DMSO control, reference compound 1, compound 2a dark and compound 2a irradiated with 365 nm light (in vitro inhibition). B: Heatmap showing log₂-transformed signal intensities of the phosphorylated peptides included on the STK arrays. The signals were sorted from high (red) to low (blue) intensity. C: Box plots summarizing the overall peptide phosphorylation levels depicted in C. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

other kinases [47]. This implies that azologization of a selective kinase inhibitor can potentially result in a loss of selectivity among kinase isoenzymes. To acquire a deeper understanding of other effects of the photoswitchable BRAF^{V600E} kinase inhibitor 2a, the kinome inhibition profile was investigated using Pamgene STK Chips, which is a well-established method for target evaluation [48,49]. Cell lysates from SK-Mel-28 cell were treated with DMSO as a control, compound 1 on which the photoswitchable inhibitors were based and compound 2a (both dark and irradiated) (See Fig. 4B). Compared to the DMSO control, compound 1 resulted in a decrease in kinase activity in the cell lysates. Interestingly, treatment with compound 2a (dark) resulted in a general increase in phosphorylation activity (See Fig. 4C). In line with the expectation, treatment of 2a (irradiated) showed a decrease in phosphorylation activity compared to the 2a (dark), which corresponds to increased kinase inhibition upon irradiation. However, compared to the DMSO control, the general phosphorylation level upon 2a (irradiated) treatment is still elevated. This could be explained by the presence of 2a *trans* in the irradiated state, where irradiation with $\lambda = 365$ nm light results in only 55% of the more active *cis* isomer. Yet, the unexpected increased phosphorylation level in lysates SK-MEL28 observed for compound 2a in both the dark and irradiated state fit with the lack of cytotoxicity of compound 2a in A375 cells.

As an important prerequisite for any future in vivo applications, we have further tested the plasma stability of compound 2a. First, photo-isomerization of compound 2a in bovine plasma was studied (see Fig. S7.1). Irradiation with 365 nm results in a decrease of the absorption band of 2a *trans*, however, surprisingly, irradiation with white light does not result in photo-isomerization back to the *trans* isomer. The same photochemical behavior is observed after

incubation of 1 h at 37 °C prior to photo-isomerization (see Fig S7.2), which suggests at least partial preservation of the azobenzene fragment. When compound 2a was pre-irradiated with 365 nm light in DMSO, added to plasma and incubated at 37 °C for 1 h, reversible photo-isomerization was observed (See Fig. S7.3). Finally, compound 2a was incubated for 20 h in bovine plasma at 37 °C, after which by LCMS masses of both isomers (See Fig S7.4 to S7.7) of the fully intact molecules were detected. An additional peak corresponding to an unknown product was observed, of which the mass doesn't match with products of azobenzene reduction. Altogether, this further supports that 20 h of plasma incubation does not fully degrade photoswitchable BRAF^{V600E} inhibitor 2a.

Finally, to rationalize the 10-fold difference in BRAF inhibitory potency between the two isomers of inhibitor 2a, both photo-isomers were docked into the crystal structure of BRAF^{V600E}. As shown in Fig. 5A, compound *cis*-2a shows a nearly perfect overlap with reference compound 1. However, due to the replacing the sulfonamide for a diazo bridge, the interactions with the Asp594, Phe595 and Gly596 backbone are no longer present, which could explain the drop in potency of compound 2a compared to compound 1. Still, *cis*-2a and 1 are spectacularly close in conformation, demonstrating that *cis*-azobenzenes are suitable for mimicking diarylsulfonamide moieties in drugs. Also *trans*-2a was docked into the same crystal structure, as shown in Fig. 5B. Compound *trans*-2a docked into a conformation that is completely different from the original compound 1, thus indicating binding of this isomer to the kinase active site is perturbed. The docking data of 2a *trans* suggest that bulky groups at the R₁ position might disfavor binding of the *trans* isomer and decrease the activity, which could potentially improve the difference in activity between *trans* and *cis* of 2a.

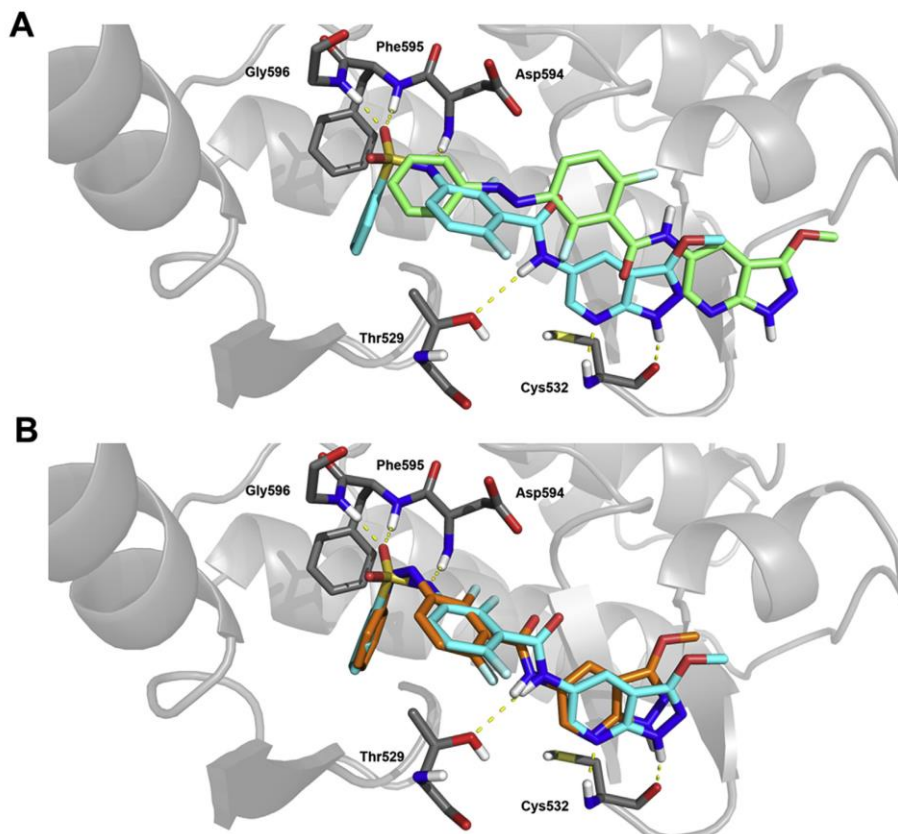


Fig. 5. Binding site of BRAF^{V600E} cocrystallized with compound 1 (PDB ID: 3SKC, protein in grey and ligand in cyan), superimposed on the docking poses of (A) compound 2a *trans* (green) and (B) compound 2a *cis* (orange). Hydrogen bonds are depicted as yellow dashed lines. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

5. Discussion

In the emerging field of photopharmacology, the development of kinase inhibitors has been very challenging and only a few examples have been reported [30–32,34]. Herein, we show a proof of concept for the development of a BRAF^{V600E} inhibitor with photocontrolled activity, which is a reversibly photocontrolled inhibitor for a therapeutically relevant kinase. We have identified compound 2a, which has a difference in activity between the thermal and irradiated state of 10-fold, even though a PSS of only a 55% *cis* was achieved upon irradiation. Using docking studies, we rationalized the binding of both *cis* and *trans*, which indicates how photoisomerization can change activity. Using kinase screening, it was found that azologization of compound 1 to provide compound 2a resulted in increased kinase activity for both dark and irradiated samples, which could explain the observed lack of cytotoxicity for the BRAF^{V600E} inhibitor photo-isomers in A375 cells, despite their 10-fold difference in activity in the ATP-competitive enzyme inhibition studies. This demonstrates the importance of off-target screening in the development of photoswitchable kinase inhibitors.

Selective BRAF^{V600E} inhibitors with light-controlled activity will provide opportunities for local and precise treatment of BRAF^{V600E}-driven tumors, without harming the activity of the RAS/RAF/MEK/ERK pathway in healthy cells and tissues. Selective UV light

irradiation of BRAF^{V600E}-driven tumors activates the inhibitor and can besides that possibly be of additional therapeutic value by inducing phototoxicity. Indeed, UV light irradiation is used for treating other types of skin cancer such as cutaneous T-Cell lymphoma in which irradiation results in apoptosis [50]. Furthermore, in a research setting, a BRAF^{V600E} inhibitor with light-controlled activity will be a powerful research tool [51] to study the kinase and its interplay with other proteins that control the activity of the RAS/RAF/MEK/ERK pathway. Photocontrolled inhibitors allow for short-term BRAF activation and inactivation in a fully reversible manner. Besides that, spatial control allows for local modulation of BRAF activity with high resolution. Such insights are particularly relevant for the BRAF kinase because of the complex mechanisms involved in its regulation, which will contribute to develop better therapies for melanoma in the future.

5.1. Synthetic procedures

5.1.1. 3: Methyl 2,6-difluoro-3-(phenyldiazenyl)benzoate

A solution of methyl 3-amino-2,6-difluorobenzoate (6.60 mmol, 1.23 g, Combi-Blocks) and nitrosobenzene (6.00 mmol, 642 mg) in acetic acid (30 mL) was heated at 40 °C overnight. Afterwards, the reaction mixture was diluted with diethyl ether (200 mL) and washed with 1 N aq. HCl (2 × 150 mL), sat. aq. NaHCO₃ (150 mL) and

brine (150 mL). The organic phase was dried (MgSO₄) and filtered through a plug of silica. The volatiles were removed *in vacuo* and to the residue was added hot pentane (200 mL). The resulting suspension was filtered and the volatiles were removed to provide product as red powder (1.27 g, 77%). *R*_f = 0.50 (pentane/Et₂O, 1:1, v/v); Mp. 78–79 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 4.02 (s, 3H), 7.01–7.06 (m, 1H), 7.50–7.55 (m, 3H), 7.90–7.96 (m, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 53.0, 112.2 (dd, *J*_{C-F} = 4.2 Hz, *J*_{C-F} = 23.2 Hz), 120.8 (dd, *J*_{C-F} = 2.0 Hz, *J*_{C-F} = 10.7 Hz), 123.2, 129.2, 131.8, 137.5 (dd, *J*_{C-F} = 4.1 Hz, *J*_{C-F} = 6.3 Hz), 152.2, 160.0 (dd, *J*_{C-F} = 6.5 Hz, *J*_{C-F} = 268 Hz), 161.5, 161.8 (dd, *J*_{C-F} = 5.7 Hz, *J*_{C-F} = 262 Hz); ¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃): –120.5 (m), –105.9 (m); HRMS (ESI⁺) calc. for [M+H]⁺ (C₁₄H₁₁F₂N₂O₂): 277.0783, found: 277.0783.

5.1.2. 4: 2,6-difluoro-3-(phenyldiazenyl)benzoic acid

To a solution of compound 3 (1.80 mmol, 500 mg) in THF (15 mL) was added sat. aq. LiOH (10 mL). The resulting biphasic mixture was vigorously stirred for 5 h, after which the volatiles were evaporated. 1 N aq. HCl (30 mL) was added to the residue, the resulting precipitate was filtered off and redissolved in AcOEt (60 mL). The solution was dried (MgSO₄) and the volume was reduced. The product was precipitated by addition of pentane, filtered off and washed with pentane to give orange solid (186 mg, 40%). Mp. 175–176 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.36 (t, ³*J* = 8.8 Hz, 1H), 7.56–7.65 (m, 3H), 7.85–7.94 (m, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 113.4 (dd, *J*_{C-F} = 3.8 Hz, *J*_{C-F} = 23.4 Hz), 114.0 (dd, *J*_{C-F} = 20.3 Hz, *J*_{C-F} = 21.1 Hz), 120.8 (d, *J*_{C-F} = 10.9 Hz), 123.3, 130.0, 132.7, 137.3 (dd, *J*_{C-F} = 3.9 Hz, *J*_{C-F} = 7.2 Hz), 152.3, 157.1 (dd, *J*_{C-F} = 7.6 Hz, *J*_{C-F} = 264 Hz), 161.2 (dd, *J*_{C-F} = 6.7 Hz, *J*_{C-F} = 258 Hz), 162.0; ¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO-*d*₆): –123.0 (m), –107.1 (m); HRMS (ESI⁺) calc. for [M+H]⁺ (C₁₃H₉F₂N₂O₂): 263.0627, found: 263.0625.

5.1.3. *Trans*-2a: 2,6-difluoro-*N*-(3-methoxy-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-5-yl)-3-phenyldiazenyl)-benzamide

A solution of compound 4 (0.38 mmol, 100 mg), 3-methoxy-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-5-amine (0.37 mmol, 60 mg, prepared by a published procedure [52]) and EDC (0.42 mmol, 80 mg) in DMF (5 mL) was stirred at rt overnight. Afterwards, the reaction mixture was diluted with ethyl acetate (80 mL) and washed with brine (2 × 60 mL), 1 N aq. HCl (2 × 60 mL), sat. aq. NaHCO₃ (60 mL) and again brine (60 mL). The organic phase was dried (MgSO₄). The volatiles were partially removed *in vacuo* and to the residue was added pentane (200 mL). The resulting precipitate was filtered to provide product as orange powder (65 mg, 43%). *R*_f = 0.62 (pentane/AcOEt, 1:1, v/v); Mp. >250 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 4.01 (s, 3H), 7.44 (t, ³*J* = 8.8 Hz, 1H, ArH), 7.55–7.66 (m, 3H), 7.85–7.97 (m, 3H), 8.52 (d, ⁴*J* = 2.0 Hz, 1H), 8.61 (d, ⁴*J* = 2.0 Hz, 1H), 11.22 (s, 1H), 12.61 (s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 56.1, 102.9, 113.4 (dd, *J*_{C-F} = 3.5 Hz, *J*_{C-F} = 23.3 Hz), 116.7 (dd, *J*_{C-F} = 21.0 Hz, *J*_{C-F} = 23.6 Hz), 119.0, 120.4 (d, *J*_{C-F} = 10.7 Hz), 123.3, 128.4, 130.1, 132.8, 137.3 (dd, *J*_{C-F} = 3.8 Hz, *J*_{C-F} = 7.2 Hz), 143.9, 150.1, 152.4, 155.1, 156.6 (dd, *J*_{C-F} = 8.1 Hz, *J*_{C-F} = 260.4 Hz), 158.1, 160.8 (dd, *J*_{C-F} = 7.1 Hz, *J*_{C-F} = 254.8 Hz); ¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO-*d*₆): –124.0 (m), –108.6 (m); HRMS (ESI⁺) calc. for [M+H]⁺ (C₂₀H₁₅F₂N₆O₂): 409.1219, found: 409.1211.

5.1.4. *Cis*-2a

A solution of compound *trans*-2a in DMSO-*d*₆ (0.5 mL, ~2 mg/mL) was irradiated at λ = 365 nm (distance ~1 cm) to provide a sample of 55% *cis*-2a. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3.99 (s, 3H), 6.94 (d, ³*J* = 8.0 Hz, 2H), 7.08–7.14 (m, 1H), 7.18–7.32 (m, 2H), 7.39 (app t, ³*J* = 8.0 Hz, 2H), 8.42 (d, ⁴*J* = 2.4 Hz, 1H), 8.54 (d, ⁴*J* = 2.0 Hz, 1H), 11.05 (s, 1H), 12.58 (s, 1H); ¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO-*d*₆): –122.4 (m), –114.1 (m).

5.1.5. 5: Methyl 2,6-difluoro-3-((4-hydroxyphenyl)diazenyl)benzoate

Methyl 3-amino-2,6-difluorobenzoate (2.00 mmol, 374 mg) was dissolved in 1 N aq. HCl (5.0 mL) and the solution was cooled in an ice-water bath. A solution of NaNO₂ (2.50 mmol, 173 mg) in water (1.0 mL) was added, and the reaction mixture was stirred for 10 min. A solution of phenol (1.80 mmol, 169 mg) and KOH (3.60 mmol, 202 mg) in MeOH (2.5 mL) was added dropwise and the cooling was removed. After 10 min stirring, the reaction mixture was diluted with AcOEt (80 mL) and washed with 1H HCl (2 × 60 mL) and brine (80 mL). The organic phase was dried (MgSO₄) and the solvent was evaporated. The product was purified by flash chromatography (Silicagel, 40–63 μm, pentane:Et₂O, 9:1 to 1:1, v/v) to give orange powder (123 mg, 23%). *R*_f = 0.60 (pentane/Et₂O, 1:1, v/v). Compound 5 was used in the following step without further characterization.

5.1.6. 6: Methyl 2,6-difluoro-3-((4-methoxyphenyl)diazenyl)benzoate

To a solution of compound 5 (0.34 mmol, 100 mg) and methyl iodide (1.50 mmol, 94 μL) in acetone (5 mL) was added potassium carbonate (0.50 mmol, 69 mg). The resulting suspension was stirred at rt overnight, after which it was diluted with Et₂O (50 mL) and washed with 1H HCl (2 × 40 mL), sat. aq. NaHCO₃ (2 × 40 mL) and brine (40 mL). The organic phase was dried (MgSO₄) and the solvent was evaporated. The product was purified by flash chromatography (Silicagel, 40–63 μm, pentane:Et₂O, 9:1, v/v) to give orange powder (100 mg, 96%). *R*_f = 0.64 (pentane/Et₂O, 7:3, v/v); Mp. 60–62 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3.88 (s, 3H), 4.02 (s, 3H), 6.95–7.05 (m, 3H), 7.84–7.92 (m, 1H), 7.91 (d, ³*J* = 9.2 Hz, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 53.0, 55.6, 112.1 (dd, *J*_{C-F} = 4.1 Hz, *J*_{C-F} = 23.1 Hz), 114.3, 120.8 (dd, *J*_{C-F} = 2.3 Hz, *J*_{C-F} = 10.5 Hz), 125.3, 129.4, 137.7 (dd, *J*_{C-F} = 4.1 Hz, *J*_{C-F} = 7.3 Hz), 147.0, 157.8 (dd, *J*_{C-F} = 6.4 Hz, *J*_{C-F} = 267 Hz), 161.3 (dd, *J*_{C-F} = 5.7 Hz, *J*_{C-F} = 261 Hz), 161.6, 162.7; ¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃): –121.2 (m), –107.2 (m); HRMS (ESI⁺) calc. for [M+H]⁺ (C₁₅H₁₃F₂N₂O₃): 307.0888, found: 307.0885.

5.1.7. 7: 2,6-difluoro-3-((4-methoxyphenyl)diazenyl)benzoic acid

To a solution of compound 6 (0.36 mmol, 110 mg) in THF (3 mL) was added sat. aq. LiOH (2 mL). The resulting biphasic mixture was vigorously stirred for 5 h, after which the volatiles were evaporated. 1 N aq. HCl (30 mL) was added to the residue, the resulting precipitate was filtered off and redissolved in AcOEt (60 mL). The solution was dried (MgSO₄) and the volume was reduced. The product was precipitated by addition of pentane, filtered off and washed with pentane to give compound 7 (51 mg, 48%). Compound 7 was used in the following step without further characterization.

5.1.8. *Trans*-2b: 2,6-difluoro-*N*-(3-methoxy-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-5-yl)-3-((4-methoxyphenyl)diazenyl)benzamide

A solution of compound 7 (0.116 mmol, 34 mg), 3-methoxy-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-5-amine (0.15 mmol, 25 mg, prepared by a published procedure [52]) and EDC (0.16 mmol, 31 mg) in DMF (2 mL) was stirred at rt overnight. Afterwards, the reaction mixture was diluted with ethyl acetate (50 mL) and washed with brine (2 × 40 mL), 1 N aq. HCl (2 × 40 mL), sat. aq. NaHCO₃ (40 mL) and again brine (40 mL). The organic phase was dried (MgSO₄). The volatiles were partially removed *in vacuo* and to the residue was added pentane (50 mL). The resulting precipitate was filtered to provide product as orange powder (14 mg, 28%). *R*_f = 0.72 (pentane/AcOEt, 1:1, v/v); Mp. = 248–250 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3.97 (s, 3H), 4.01 (s, 3H), 7.15 (d, ³*J* = 8.8 Hz, 2H), 7.41 (t, ³*J* = 8.8 Hz, 1H), 7.85–7.95 (m, 3H), 8.51 (d, ⁴*J* = 2.0 Hz, 1H), 8.61 (d, ⁴*J* = 2.0 Hz, 1H), 11.19 (s, 1H), 12.60 (s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆):

δ 56.1, 56.2, 102.9, 113.3 (dd, J_{C-F} = 3.7 Hz, J_{C-F} = 23.0 Hz), 115.3, 116.6 (dd, J_{C-F} = 21.1 Hz, J_{C-F} = 23.6 Hz), 118.9, 120.2 (d, J_{C-F} = 10.3 Hz), 125.5, 128.4, 137.4 (dd, J_{C-F} = 3.8 Hz, J_{C-F} = 7.3 Hz), 143.8, 146.8, 150.1, 155.1, 156.1 (dd, J_{C-F} = 8.0 Hz, J_{C-F} = 258.3 Hz), 158.2, 160.2 (dd, J_{C-F} = 7.1 Hz, J_{C-F} = 254.0 Hz), 163.2; ^{19}F NMR (376 MHz, DMSO- d_6): -124.6 (m), -109.9 (m); HRMS (ESI+) calc. for $[\text{M}+\text{H}]^+$ ($\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{F}_2\text{N}_6\text{O}_3$): 439.1325, found: 439.1318.

5.1.9. Cis-2b

A solution of compound *trans*-2b in DMSO- d_6 (0.5 mL, ~2 mg/mL) was irradiated at λ = 365 nm (distance ~1 cm) to provide a sample of 92% *cis*-2b. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 3.75 (s, 3H), 3.99 (s, 3H), 6.94 (d, 3J = 8.8 Hz, 2H), 7.02 (d, 3J = 8.8 Hz, 2H), 7.12–7.18 (m, 1H), 7.27 (t, 3J = 8.8 Hz, 1H), 8.42 (d, 4J = 2.0 Hz, 1H), 8.54 (d, 4J = 2.0 Hz, 1H), 11.04 (s, 1H), 12.58 (s, 1H); ^{19}F NMR (376 MHz, DMSO- d_6): -123.1 (m), -114.8 (m).

5.1.10. 8: Ethyl (E)-3-((4-hydroxyphenyl)diazenyl)benzoate

Ethyl 3-aminobenzoate (3.0 mL, 2.7 g, 17 mmol) was dissolved in aq. 1 N HCl (50 mL) and NaNO_2 (1.60 g, 23 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 10 min. MeOH (25 mL) was added to the reaction mixture and a solution of PhOH (1.93 g, 14.6 mmol) and KOH (2.14 g, 38.1 mmol) in MeOH (20 mL) was added dropwise. The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. After completion, aq. 1 N HCl (50 mL) and EtOAc (50 mL) were added to the reaction mixture and the water layer was extracted with EtOAc (3 \times 50 mL). The combined organic layers were concentrated *in vacuo*, Et₂O was added (100 mL) and the product was filtered off and washed with pentane. The product was obtained as an orange solid (1.58 g, 5.8 mmol, 34% yield). Mp: 141–146 °C. ^1H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.44 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 4.38–4.48 (m, 2H), 5.65 (s, 1H), 6.98 (d, J = 6.9 Hz, 2H), 7.58 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.91 (d, J = 6.9 Hz, 2H), 8.05 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 8.12 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 8.52 (s, 1H). Compound 8 was used in the following step without further characterization.

5.1.11. 9: Ethyl (E)-3-((4-methoxyphenyl)diazenyl)benzoate

Compound 8 (0.70 g, 2.6 mmol) was dissolved in acetone (20 mL) and MeI (3.0 mL, 1.3 g, 9.3 mmol) and K₂CO₃ (3.7 g, 26.8 mmol) were added. The reaction mixture was stirred at 40 °C overnight. After completion, Et₂O (50 mL) and water (50 mL) were added and the organic layer was separated, dried with MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. The product was purified by flash chromatography (Silicagel 40–63 nm, pentane; 0–10% EtOAc in pentane). The product was obtained as an orange solid (0.62 g, 2.2 mmol, 85% yield). Mp: 40–42 °C. ^1H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.42 (d, J = 14.3 Hz, 3H), 3.85 (s, 3H), 4.42 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 6.99 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.54 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.94 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 8.11 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 8.53 (s, 1H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 14.4, 55.5, 61.2, 76.8, 77.1, 77.4, 114.2, 123.9, 125.0, 126.3, 129.0, 131.0, 131.6, 146.8, 152.7, 162.4, 166.1. HRMS (ESI+) calc. for $[\text{M} + \text{H}]^+$ ($\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_3$): 285.1234, found: 285.1232.

5.1.12. 10: 3-((4-methoxyphenyl)diazenyl)benzoic acid

Compound 9 (3.52 mmol, 1.00 g) was dissolved in a mixture of methanol (40 mL) and tetrahydrofuran (40 mL). Aqueous sodium hydroxide (2 N, 20 mL) was added and the mixture was heated under reflux for 3 h. The volatiles were evaporated, the residue was dissolved in aqueous HCl (1 N, 20 mL) and extracted with ethyl acetate (2 \times 20 mL). Organic phases were collected, dried and the product was purified by precipitation from AcOEt/pentane. Yield: 66%; orange powder. Mp. 171–173 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 3.85 (s, 3H), 7.12 (d, 3J = 9.0 Hz, 2H), 7.68 (t, 3J = 7.8 Hz, 1H), 7.91 (d, 3J = 8.9 Hz, 2H), 8.06 (dd, 3J = 7.9, 4J = 1.6 Hz, 2H), 8.32 (d, 4J = 1.9 Hz, 1H), 13.25 (br s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6)

δ 56.1, 115.1, 122.4, 125.3, 127.5, 130.2, 131.6, 132.5, 146.5, 152.4, 162.8, 167.2. HRMS (ESI+) calc. for $[\text{M}+\text{H}]^+$ ($\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_3$): 257.0921, found: 257.0923.

5.1.13. Trans-2c: trans-N-(3-methoxy-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-5-yl)-3-((4-methoxyphenyl)diazenyl)benzamide

A solution of compound 10 (0.60 mmol, 154 mg), 3-methoxy-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-5-amine (0.55 mmol, 90 mg, prepared by a published procedure [52]) and EDC (0.60 mmol, 115 mg) in DMF (6 mL) was stirred at rt overnight. Afterwards, the reaction mixture was diluted with ethyl acetate (80 mL) and washed with brine (2 \times 60 mL), 1 N aq. HCl (60 mL), sat. aq. NaHCO₃ (60 mL) and again brine (60 mL). The organic phase was dried (MgSO₄). The volatiles were partially removed *in vacuo* and to the residue was added pentane (80 mL). The resulting precipitate was filtered to provide product as orange powder (110 mg, 50%). R_f = 0.38 (pentane/AcOEt, 1:1, v/v); Mp. = 233–235 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 3.87 (s, 3H), 4.01 (s, 3H), 7.15 (d, 3J = 8.9 Hz, 2H), 7.74 (t, 3J = 7.8 Hz, 1H), 7.95 (d, 3J = 8.9 Hz, 2H), 8.04 (d, 3J = 7.9 Hz, 1H), 8.11 (d, 3J = 8.1 Hz, 1H), 8.44 (s, 1H), 8.49 (d, 4J = 2.3 Hz, 1H), 8.74 (d, 4J = 2.3 Hz, 1H), 10.65 (s, 1H), 12.52 (s, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 56.0, 56.1, 102.9, 115.2, 120.1, 121.9, 125.2, 125.5, 128.9, 130.1, 130.2, 136.2, 145.3, 146.6, 150.1, 152.4, 155.0, 162.8, 165.5. HRMS (ESI+) calc. for $[\text{M}+\text{H}]^+$ ($\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{N}_6\text{O}_3$): 403.1513, found: 403.1502.

5.1.14. Cis-2c

A solution of compound *trans*-2c in DMSO- d_6 (0.5 mL, ~1 mg/mL) was irradiated at λ = 365 nm (distance ~1 cm) to provide a sample of 94% *cis*-2c. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 3.71 (s, 3H), 3.99 (s, 3H), 6.78–7.11 (m, 4H), 7.46 (t, 3J = 7.8 Hz, 1H), 7.61 (t, 4J = 1.9 Hz, 1H), 7.79 (d, 3J = 7.4 Hz, 1H), 8.44 (d, 4J = 2.3 Hz, 1H), 8.68 (d, 4J = 2.4 Hz, 1H), 10.48 (s, 1H), 12.51 (s, 1H).

5.1.15. 11: Methyl 2,6-difluoro-3-(2-fluoro-phenyldiazenyl)benzoate

A solution of methyl 3-amino-2,6-difluorobenzoate (5.00 mmol, 935 mg, Combi-Blocks) and 2-fluoro-nitrosobenzene (4.24 mmol, 530 mg, prepared according to a published procedure [53]) in acetic acid (15 mL) was heated at 40 °C overnight. Afterwards, the reaction mixture was diluted with diethyl ether (100 mL) and washed with 1 N aq. HCl (2 \times 80 mL), sat. aq. NaHCO₃ (80 mL) and brine (80 mL). The organic phase was dried (MgSO₄) and filtered through a plug of silica. The volatiles were removed *in vacuo* and to the residue was added pentane (100 mL). The resulting suspension was filtered and the volatiles were removed to provide product as red powder (700 mg, 56%). R_f = 0.66 (pentane/Et₂O, 4:1, v/v); Mp. 92–93 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 4.02 (s, 3H), 7.04 (td, J = 9.0, 1.7 Hz, 1H), 7.18–7.34 (m, 2H), 7.50 (dddd, J = 8.7, 6.9, 5.0, 1.8 Hz, 1H), 7.79 (td, J = 7.8, 1.8 Hz, 1H), 7.96 (ddd, J = 9.2, 8.1, 5.9 Hz, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 53.04, 112.3 (dd, J = 23.3, 4.1 Hz), 117.1 (d, J = 19.7 Hz), 117.7, 121.0 (dd, J = 10.8, 1.9 Hz), 124.4 (d, J = 3.8 Hz), 130.0 (d, J = 7.4 Hz), 133.5 (d, J = 8.4 Hz), 137.7 (dd, J = 7.1, 4.3 Hz), 140.5 (d, J = 6.7 Hz), 158.5 (dd, J = 269.0, 6.7 Hz), 159.2, 161.8, 162.2 (dd, J = 262.7, 5.9 Hz); ^{19}F NMR (376 MHz, CDCl₃): -104.8 (m), -120.1 (m), -123.8 (m); HRMS (ESI+) calc. for $[\text{M}+\text{H}]^+$ ($\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_2$): 295.0689, found: 295.0688.

5.1.16. 12: 2,6-difluoro-3-(2-fluoro-phenyldiazenyl)benzoic acid

To a solution of compound 11 (1.77 mmol, 520 mg) in THF (15 mL) was added sat. aq. LiOH (10 mL). The resulting biphasic mixture was vigorously stirred for 5 h, after which the volatiles were evaporated. 1 N aq. HCl (30 mL) was added to the residue, the resulting precipitate was filtered off and redissolved in AcOEt (60 mL). The solution was dried (MgSO₄) and the volume was

reduced. The product was precipitated by addition of pentane, filtered off and washed with pentane to give product (240 mg, 48%). Mp. 206–208 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.29–7.39 (m, 1H), 7.49 (dd, *J* = 11.0, 8.3 Hz, 1H), 7.66 (td, *J* = 16.3, 7.9, 3.6 Hz, 2H), 7.85 (td, *J* = 8.8, 5.9 Hz, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 113.6 (dd, *J* = 23.5, 3.8 Hz), 117.8, 118.0, 120.9 (d, *J* = 10.9 Hz), 125.6 (d, *J* = 3.7 Hz), 134.9 (d, *J* = 8.5 Hz), 137.6 (d, *J* = 3.9 Hz), 140.2 (d, *J* = 6.9 Hz), 156.9 (*J* = 265.3, 7.5 Hz), 158.7, 161.3, 161.5 (dd, *J* = 258.6, 6.5 Hz), 161.9; ¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO-*d*₆): –106.1 (m), –122.3 (m), –124.0 (m); HRMS (ESI+) calc. for [M+H]⁺ (C₁₃H₈F₃N₂O₂): 281.0532, found: 281.0533.

5.1.17. *Trans-2d*: trans-2,6-difluoro-3-((2-fluorophenyl)diazanyl)-*N*-(3-methoxy-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-5-yl)benzamide

A solution of compound 12 (0.60 mmol, 168 mg), 3-methoxy-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-5-amine (0.42 mmol, 70 mg, prepared by a published procedure [52]) and EDC (0.60 mmol, 115 mg) in DMF (5 mL) was stirred at rt overnight. Afterwards, the reaction mixture was diluted with ethyl acetate (80 mL) and washed with brine (2 × 60 mL), 1 N aq. HCl (2 × 60 mL), sat. aq. NaHCO₃ (60 mL) and again brine (60 mL). The organic phase was dried (MgSO₄). The volatiles were partially removed *in vacuo* and to the residue was added pentane (100 mL). The resulting precipitate was filtered to provide product as orange powder (63 mg, 35%). *R*_f = 0.46 (pentane/AcOEt, 1:1, v/v); Mp. >240 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 4.01 (s, 3H), 7.38 (t, ³*J* = 8.8 Hz, 1H), 7.45 (t, ³*J* = 8.8 Hz, 1H), 7.54 (dd, *J* = 10.9, 8.4 Hz, 1H), 7.64–7.77 (m, 2H), 7.88–7.97 (m, 1H), 8.51 (d, ⁴*J* = 2.3 Hz, 1H), 8.61 (d, ⁴*J* = 2.4 Hz, 1H), 11.23 (s, 1H), 12.61 (s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 56.1, 102.9, 113.6 (d, *J*_{C-F} = 23.0 Hz), 117.8, 118.0, 119.0, 120.5, 125.6, 128.4, 135.0 (d, *J*_{C-F} = 8.3 Hz), 137.5, 140.3 (d, *J*_{C-F} = 6.5 Hz), 143.9, 150.2, 155.1, 156.8 (dd, *J*_{C-F} = 261.7, 7.8 Hz), 157.9, 158.7, 161.1 (dd, *J*_{C-F} = 256.1, 6.7 Hz), 161.3; ¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO-*d*₆): –124.0 (m), –123.5 (m), –107.6 (m); HRMS (ESI+) calc. for [M+H]⁺ (C₂₀H₁₄F₃N₆O₂): 427.1125, found: 427.1116.

5.1.18. *Cis-2d*

A solution of compound *trans-2d* in DMSO-*d*₆ (0.5 mL, ~2 mg/mL) was irradiated at λ = 365 nm (distance ~1 cm) to provide a sample of 70% *cis-2d*. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3.99 (s, 3H), 7.05–7.15 (m, 2H), 7.20–7.30 (m, 3H), 7.31–7.35 (m, 1H), 8.43 (d, ⁴*J* = 2.4 Hz, 1H), 8.54 (d, ⁴*J* = 2.0 Hz, 1H), 11.08 (s, 1H), 12.58 (s, 1H); ¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO-*d*₆): –123.3 (m), –122.5, –112.5 (m).

5.1.19. *13*: Methyl 2,6-difluoro-3-(*p*-tolylidiazanyl)benzoate

A solution of methyl 3-amino-2,6-difluorobenzoate (5.00 mmol, 935 mg, Combi-Blocks) and 4-methyl-nitrosobenzene (4.24 mmol, 517 mg) in acetic acid (15 mL) was heated at 40 °C overnight. Afterwards, the reaction mixture was diluted with diethyl ether (150 mL) and washed with 1 N aq. HCl (2 × 100 mL), sat. aq. NaHCO₃ (100 mL) and brine (100 mL). The organic phase was dried (MgSO₄) and the product was purified by flash chromatography (Silicagel, 40–63 μm, pentane:Et₂O, 9:1, v/v) to give orange powder (770 mg, 63%). *R*_f = 0.66 (pentane/Et₂O, 9:1, v/v); Mp. 98–100 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 2.43 (s, 3H), 4.01 (s, 3H), 7.00 (td, *J* = 9.0, 1.7 Hz, 1H), 7.30 (d, ³*J* = 8.1 Hz, 2H), 7.83 (d, ³*J* = 8.3 Hz, 2H), 7.84–7.92 (m, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 21.5, 53.0, 112.2 (dd, *J*_{C-F} = 23.1, 4.1 Hz), 120.9 (dd, *J*_{C-F} = 10.7, 2.2 Hz), 123.3, 129.8, 137.6 (dd, *J*_{C-F} = 7.3, 4.1 Hz), 142.6, 150.7, 158.0 (dd, *J*_{C-F} = 267.9, 6.6 Hz), 161.6 (d, *J*_{C-F} = 1.4 Hz), 161.6 (dd, *J*_{C-F} = 261.3, 5.8 Hz); ¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃): –120.8 (dd, *J* = 8.7, 4.1 Hz), –106.5 (dd, *J* = 9.2, 4.1 Hz); HRMS (ESI+) calc. for [M+H]⁺ (C₁₅H₁₃F₂N₂O₂): 291.0940, found: 291.0943.

5.1.20. *14*: 2,6-difluoro-3-(*p*-tolylidiazanyl)benzoic acid

To a solution of compound 13 (1.79 mmol, 520 mg) in THF (15 mL) was added sat. aq. LiOH (10 mL). The resulting biphasic mixture was vigorously stirred overnight, after which the volatiles were evaporated. 1 N aq. HCl (30 mL) was added to the residue, the resulting precipitate was filtered off and redissolved in THF (60 mL). The solution was dried (MgSO₄) and the volume was reduced. The product was precipitated by addition of pentane, filtered off and washed with pentane to give orange powder (390 mg, 79%). Mp. 209–211 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2.40 (s, 3H), 7.30–7.38 (m, 1H), 7.41 (d, ³*J* = 6.5 Hz, 2H), 7.81 (d, ³*J* = 6.4 Hz, 2H), 7.88 (td, *J* = 8.8, 6.1, 2.4 Hz, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 21.5, 113.4 (dd, *J*_{C-F} = 23.3, 3.8 Hz), 120.8 (d, *J*_{C-F} = 11.1 Hz), 123.4, 130.5, 136.8–138.2 (m), 143.3, 150.5, 156.9 (dd, *J*_{C-F} = 263.3, 7.6 Hz), 160.9 (dd, *J*_{C-F} = 257.3, 6.7 Hz), 162.0; ¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO-*d*₆): –123.1 (dd, *J* = 8.8, 4.9 Hz), –107.6 (dt, *J* = 9.7, 5.5 Hz); HRMS (ESI+) calc. for [M+H]⁺ (C₁₄H₁₁F₂N₂O₂): 277.0783, found: 277.0784.

5.1.21. *Trans-2e*: trans-2,6-difluoro-*N*-(3-methoxy-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-5-yl)-3-(*p*-tolylidiazanyl)benzamide

A solution of compound 14 (0.60 mmol, 166 mg), 3-methoxy-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-5-amine (0.42 mmol, 70 mg, prepared by a published procedure [52]) and EDC (0.60 mmol, 115 mg) in DMF (4 mL) was stirred at rt overnight. Afterwards, the reaction mixture was diluted with ethyl acetate (80 mL) and washed with brine (60 mL), 1 N aq. HCl (2 × 60 mL), sat. aq. NaHCO₃ (60 mL) and again brine (2 × 60 mL). The organic phase was dried (MgSO₄). The volatiles were partially removed *in vacuo* and to the residue was added pentane (100 mL). The resulting precipitate was filtered to provide product as orange powder (115 mg, 64%). *R*_f = 0.57 (pentane/AcOEt, 1:1, v/v); Mp. >220 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): 2.41 (s, 3H), 4.01 (s, 3H), 7.26–7.52 (m, 3H), 7.83 (dd, *J* = 8.3, 1.5 Hz, 2H), 7.92 (q, *J* = 8.4 Hz, 1H), 8.52 (s, 1H), 8.61 (s, 1H), 11.21 (s, 1H), 12.61 (s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 21.5, 56.1, 102.9, 113.3 (dd, *J*_{C-F} = 23.1, 3.6 Hz), 116.7 (dd, *J*_{C-F} = 23.6, 21.0 Hz), 118.9, 120.3 (d, *J*_{C-F} = 10.6 Hz), 123.4, 128.4, 130.5, 137.3 (dd, *J*_{C-F} = 7.2, 3.8 Hz), 143.3, 143.8, 150.1, 150.6, 155.1, 156.5 (dd, *J*_{C-F} = 260.1, 8.1 Hz), 158.1, 160.6 (dd, *J*_{C-F} = 254.5, 7.2 Hz); ¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO-*d*₆): –124.2 (t, *J* = 6.8 Hz), –109.1 (q, *J* = 7.3, 6.6 Hz); HRMS (ESI+) calc. for [M+H]⁺ (C₂₁H₁₇F₂N₆O₂): 423.1376, found: 423.1331.

5.1.22. *Cis-2e*

A solution of compound *trans-2e* in DMSO-*d*₆ (0.5 mL, ~2 mg/mL) was irradiated at λ = 365 nm (distance ~1 cm) to provide a sample of 84% *cis-2e*. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2.27 (s, 3H), 3.99 (s, 3H), 6.87 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.10 (td, *J* = 8.5, 5.8 Hz, 1H), 7.17–7.28 (m, 3H), 8.43 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 8.55 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 11.05 (s, 1H), 12.58 (s, 1H); ¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO-*d*₆): –122.8 (dd, *J* = 8.5, 3.6 Hz), –114.4 (dq, *J* = 8.9, 3.9 Hz).

5.1.23. *15*: Methyl 2,6-difluoro-3-(4-fluorophenyl)diazanylbenzoate

A solution of methyl 3-amino-2,6-difluorobenzoate (3.96 mmol, 741 mg, Combi-Blocks) and 4-fluoro-nitrosobenzene (3.28 mmol, 410 mg) in acetic acid (10 mL) was heated at 40 °C overnight. Afterwards, the reaction mixture was diluted with diethyl ether (100 mL) and washed with 1 N aq. HCl (2 × 70 mL), sat. aq. NaHCO₃ (70 mL) and brine (70 mL). The organic phase was dried (MgSO₄) and the product was purified by flash chromatography (Silicagel, 40–63 μm, pentane:Et₂O, 9:1, v/v) to give orange powder (382 mg, 40%). *R*_f = 0.42 (pentane/Et₂O, 9:1, v/v); Mp. 68–70 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 4.01 (s, 3H), 6.95–7.06 (m, 1H), 7.13–7.24 (m, 2H), 7.81–7.91 (m, 1H), 7.90–7.97 (m, 2H); ¹³C NMR (100 MHz,

CDCl₃): δ 53.0, 112.2 (dd, J_{C-F} = 23.2, 4.2 Hz), 116.2 (d, J_{C-F} = 23.0 Hz), 120.8 (dd, J_{C-F} = 10.7, 2.1 Hz), 125.3 (d, J_{C-F} = 9.0 Hz), 137.3 (dd, J_{C-F} = 7.2, 4.3 Hz), 149.0 (d, J_{C-F} = 3.1 Hz), 158.2 (dd, J_{C-F} = 268.4, 6.6 Hz), 161.4, 161.8 (dd, J_{C-F} = 262.0, 5.8 Hz), 163.6, 166.1. ¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃): -120.5 (dd, J = 8.2, 4.4 Hz), -107.7, -106.5 to -104.9 (m); HRMS (ESI+) calc. for [M+H]⁺ (C₁₄H₁₀F₃N₂O₂): 295.0689, found: 295.0664.

5.1.24. 16: 2,6-difluoro-3-((4-fluorophenyl)diazanyl)benzoic acid

To a solution of compound 15 (1.23 mmol, 361 mg) in THF (12 mL) was added sat. aq. LiOH (8 mL). The resulting biphasic mixture was vigorously stirred overnight, after which the volatiles were evaporated. 1 N aq. HCl (30 mL) was added to the residue, the resulting precipitate was filtered off and redissolved in THF (60 mL). The solution was dried (MgSO₄) and the volume was reduced. The product was precipitated by addition of pentane, filtered off and washed with pentane to give orange powder (230 mg, 67%). The crude product was used in the next step without further characterization.

5.1.25. Trans-2f: trans-2,6-difluoro-N-(3-methoxy-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-5-yl)-3-((4-fluoro-phenyl)diazanyl)benzamide

A solution of compound 16 (0.60 mmol, 170 mg), 3-methoxy-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-5-amine (0.42 mmol, 70 mg, prepared by a published procedure [52]) and EDC (0.60 mmol, 115 mg) in DMF (4 mL) was stirred at rt overnight. Afterwards, the reaction mixture was diluted with ethyl acetate (80 mL) and washed with brine (60 mL), 1 N aq. HCl (2 × 60 mL), sat. aq. NaHCO₃ (60 mL) and again brine (2 × 60 mL). The organic phase was dried (MgSO₄). The volatiles were partially removed *in vacuo* and to the residue was added pentane (100 mL). The resulting precipitate was filtered to provide product as orange powder (100 mg, 56%). R_f = 0.70 (pentane/AcOEt, 1:1, v/v); Mp. >220 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 4.01 (s, 3H), 7.29–7.54 (m, 3H), 7.73–8.04 (m, 3H), 8.53 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 8.63 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 11.23 (s, 1H), 12.61 (s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 56.1, 102.9, 113.4 (d, J_{C-F} = 20.8 Hz), 117.1 (d, J_{C-F} = 23.2 Hz), 118.9, 120.4 (d, J_{C-F} = 10.6 Hz), 125.8 (d, J_{C-F} = 9.4 Hz), 128.4, 137.2, 143.8, 149.2 (d, J_{C-F} = 2.9 Hz), 150.1, 155.1, 156.6 (dd, J_{C-F} = 260.8, 8.0 Hz), 158.0, 160.8 (dd, J_{C-F} = 255.2, 7.1 Hz), 163.5, 166.0; ¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO-*d*₆): -124.3 to -123.1 (m), -108.4 (d, J = 7.0 Hz), -108.1 to -106.7 (m); HRMS (ESI+) calc. for [M+H]⁺ (C₂₀H₁₃F₃N₆O₂Na): 449.0944, found: 449.0893.

5.1.26. Cis-2f

A solution of compound *trans*-2f in DMSO-*d*₆ (0.5 mL, ~2 mg/mL) was irradiated at λ = 365 nm (distance -1 cm) to provide a sample of 62% *cis*-2f. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): 3.99 (s, 3H), 7.00–7.10 (m, 2H), 7.17 (td, J = 8.5, 5.9 Hz, 1H), 7.25 (t, J = 8.8 Hz, 2H), 7.46 (t, J = 8.7 Hz, 1H), 8.42 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 8.54 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 11.04 (s, 1H), 12.58 (s, 1H); ¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO-*d*₆): -122.2 (dd, J = 8.1, 4.0 Hz), -113.8 (dt, J = 9.0, 4.8 Hz), -112.5 (dt, J = 8.7, 4.1 Hz).

5.1.27. 17: Methyl 2,6-difluoro-3-(*o*-tolylidiazanyl)benzoate

A solution of methyl 3-amino-2,6-difluorobenzoate (5.00 mmol, 935 mg, Combi-Blocks) and 2-methyl-nitrosobenzene (4.24 mmol, 517 mg) in acetic acid (10 mL) was heated at 40 °C overnight. Afterwards, the reaction mixture was diluted with diethyl ether (150 mL) and washed with 1 N aq. HCl (2 × 100 mL), sat. aq. NaHCO₃ (100 mL) and brine (100 mL). The organic phase was dried (MgSO₄) and the product was purified by precipitation from Et₂O/pentane to give red crystals (410 mg, 33%). R_f = 0.80 (pentane/Et₂O, 9:1, v/v); Mp. 87–89 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 2.72 (s, 3H), 4.02 (s, 3H), 7.03 (td, J = 8.9, 1.7 Hz, 1H), 7.24–7.30 (m, 1H), 7.32–7.43 (m, 2H), 7.67 (dd, J = 8.1, 1.3 Hz, 1H), 7.87 (ddd, J = 9.1, 8.2, 6.0 Hz, 1H). ¹⁹F

NMR (376 MHz, CDCl₃) δ -120.8 (dd, J = 8.4, 4.0 Hz), -106.3 (dt, J = 9.5, 5.0 Hz). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 17.5, 53.0, 112.2 (dd, J = 23.2, 4.2 Hz), 115.8, 121.1 (dd, J = 10.7, 2.3 Hz), 126.5, 131.4, 131.8, 137.9 (dd, J = 7.2, 4.2 Hz), 138.8, 150.6, 158.1 (dd, J = 268.2, 6.7 Hz), 161.6 (d, J = 1.2 Hz), 161.7 (dd, J = 261.5, 5.9 Hz). HRMS (ESI+) calc. for [M+H]⁺ (C₁₅H₁₃F₂N₂O₂): 291.0940, found: 291.0916.

5.1.28. 18: 2,6-difluoro-3-(*o*-tolylidiazanyl)benzoic acid

To a solution of compound 17 (1.36 mmol, 375 mg) in THF (12 mL) was added sat. aq. LiOH (8 mL). The resulting biphasic mixture was vigorously stirred overnight, after which the volatiles were evaporated. 1 N aq. HCl (30 mL) was added to the residue, the resulting precipitate was filtered off and redissolved in THF (60 mL). The solution was dried (MgSO₄) and the volume was reduced. The product was precipitated by addition of pentane, filtered off and washed with pentane to give orange powder (230 mg, 61%). Mp. 170–171 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.65 (s, 3H), 7.28–7.37 (m, 2H), 7.38–7.50 (m, 2H), 7.53 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.87 (td, J = 8.8, 6.1 Hz, 1H). ¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO-*d*₆) δ -123.2 (dd, J = 8.4, 5.0 Hz), -107.4 (dt, J = 10.4, 5.4 Hz). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 17.5, 113.4 (dd, J = 23.2, 3.9 Hz), 113.7–114.2 (m), 115.7, 121.2 (d, J = 10.5 Hz), 127.2, 132.0, 132.7, 137.7 (dd, J = 7.1, 3.9 Hz), 138.9, 150.4, 157.0 (dd, J = 263.6, 7.6 Hz), 161.0 (dd, J = 257.6, 6.6 Hz), 162.0. HRMS (ESI+) calc. for [M+H]⁺ (C₁₄H₁₁F₂N₂O₂): 277.0783, found: 277.0761.

5.1.29. Trans-2g: trans-2,6-difluoro-N-(3-methoxy-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-5-yl)-3-(*o*-tolylidiazanyl)benzamide

A solution of compound 18 (0.60 mmol, 166 mg), 3-methoxy-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-5-amine (0.42 mmol, 70 mg, prepared by a published procedure [52]) and EDC (0.60 mmol, 115 mg) in DMF (4 mL) was stirred at rt overnight. Afterwards, the reaction mixture was diluted with ethyl acetate (80 mL) and washed with brine (60 mL), 1 N aq. HCl (2 × 60 mL), sat. aq. NaHCO₃ (60 mL) and again brine (2 × 60 mL). The organic phase was dried (MgSO₄). The volatiles were partially removed *in vacuo* and to the residue was added pentane (100 mL). The resulting precipitate was filtered to provide product as orange powder (116 mg, 65%). R_f = 0.73 (pentane/AcOEt, 1:1, v/v); Mp. >220 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.68 (s, 3H), 4.01 (s, 3H), 7.28–7.38 (m, 1H), 7.38–7.52 (m, 3H), 7.56 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.93 (td, J = 8.4, 5.5 Hz, 1H), 8.53 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 8.63 (d, J = 1.1 Hz, 1H), 11.22 (s, 1H), 12.61 (s, 1H). ¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO-*d*₆) δ -124.3 (dd, J = 8.4, 5.5 Hz), -108.9 (q, J = 7.1, 6.6 Hz); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 17.6, 56.1, 102.9, 113.4 (d, J = 23.0 Hz), 115.7, 116.7 (dd, J = 23.4, 20.9 Hz), 118.9, 120.7 (d, J = 10.5 Hz), 127.2, 128.4, 132.1, 132.7, 137.7 (d, J = 7.1 Hz), 138.9, 143.9, 150.2, 150.5, 155.1, 156.5 (dd, J = 260.7, 8.3 Hz), 158.1, 160.6 (dd, J = 254.4, 7.0 Hz). HRMS (ESI+) calc. for [M+H]⁺ (C₂₁H₁₇F₂N₆O₂): 423.1376, found: 423.1371.

5.1.30. Cis-2g

A solution of compound *trans*-2g in DMSO-*d*₆ (0.5 mL, ~2 mg/mL) was irradiated at λ = 365 nm (distance -1 cm) to provide a sample of 77% *cis*-2g. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2.28 (s, 3H), 3.99 (s, 3H), 6.26–6.45 (m, 1H), 7.02–7.11 (m, 2H), 7.15–7.25 (m, 2H), 7.31 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 8.43 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 8.55 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 11.06 (s, 1H), 12.58 (s, 1H). ¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO-*d*₆) δ -123.0 (dd, J = 8.2, 4.1 Hz), -113.8 (dq, J = 8.9, 5.1, 4.5 Hz).

5.1.31. 19: Methyl 2,6-difluoro-3-(2-fluorophenyl)diazanylbenzoate

A solution of methyl 3-amino-2,6-difluorobenzoate (6.00 mmol, 1.12 g, Combi-Blocks) and 2-methoxy-nitrosobenzene (5.10 mmol, 700 mg) in acetic acid (16 mL) was heated at 40 °C overnight.

Afterwards, the reaction mixture was diluted with diethyl ether (100 mL) and washed with 1 N aq. HCl (2 × 70 mL), sat. aq. NaHCO₃ (70 mL) and brine (70 mL). The organic phase was dried (MgSO₄) and the product was purified by flash chromatography (Silicagel, 40–63 μm, pentane:Et₂O, 9:1, v/v) to give orange powder (205 mg, 13%), R_f = 0.70 (pentane/Et₂O, 1:1, v/v); Mp. 93–95 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.00 (s, 3H), 4.02 (s, 3H), 6.97–7.04 (m, 2H), 7.09 (dd, J = 8.4, 1.1 Hz, 1H), 7.47 (ddd, J = 8.8, 7.3, 1.7 Hz, 1H), 7.70 (dd, J = 8.0, 1.7 Hz, 1H), 7.89 (ddd, J = 9.1, 8.2, 6.0 Hz, 1H). ¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃) δ -120.8 (ddd, J = 8.2, 4.1, 2.0 Hz), -106.4 (td, J = 5.8, 3.0 Hz). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 53.0, 56.3, 111.9 (d, J = 2.1 Hz), 112.2 (dd, J = 23.0, 4.2 Hz), 112.8, 117.1, 120.8, 121.4 (dd, J = 10.7, 2.2 Hz), 133.5, 138.1 (dd, J = 7.3, 4.2 Hz), 142.1, 157.5, 158.0 (dd, J = 268.0, 6.5 Hz), 161.6 (d, J = 1.3 Hz), 161.6 (dd, J = 261.4, 5.8 Hz). HRMS (ESI+) calc. for [M+H]⁺ (C₁₅H₁₃F₃N₂O₃): 307.0888, found: 307.0888.

5.1.32. 20: 2,6-difluoro-3-((4-fluorophenyl)diazanyl)benzoic acid

To a solution of compound 19 (0.65 mmol, 200 mg) in THF (4 mL) was added sat. aq. LiOH (4 mL). The resulting biphasic mixture was vigorously stirred overnight, after which the volatiles were evaporated. 1 N aq. HCl (30 mL) was added to the residue, the resulting precipitate was filtered off and redissolved in THF (60 mL). The solution was dried (MgSO₄) and the volume was reduced. The product was precipitated by addition of pentane, filtered off and washed with pentane to give orange powder. The crude product was used in the next step without further characterization.

5.1.33. Trans-2h: trans-2,6-difluoro-N-(3-methoxy-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-5-yl)-3-((4-fluoro-phenyl)diazanyl)benzamide

A solution of crude compound 20, 3-methoxy-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-5-amine (0.42 mmol, 70 mg, prepared by a published procedure [52]) and EDC (0.54 mmol, 104 mg) in DMF (4 mL) was stirred at rt overnight. Afterwards, the reaction mixture was diluted with ethyl acetate (80 mL) and washed with brine (60 mL), 1 N aq. HCl (2 × 60 mL), sat. aq. NaHCO₃ (60 mL) and again brine (2 × 60 mL). The organic phase was dried (MgSO₄). The volatiles were partially removed *in vacuo* and to the residue was added pentane (100 mL). The resulting precipitate was filtered to provide product as orange powder (78 mg, 40% from 19). R_f = 0.47 (pentane/AcOEt, 1:1, v/v); Mp. >220 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 3.97 (s, 3H), 4.01 (s, 3H), 7.05 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.29 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.36–7.46 (m, 1H), 7.52–7.61 (m, 2H), 7.84 (td, J = 8.8, 6.1 Hz, 1H), 8.53 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 8.63 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 11.22 (s, 1H), 12.61 (s, 1H). ¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO-d₆) δ -124.4 (dd, J = 8.7, 5.2 Hz), -109.3 (app q, J = 6.2 Hz). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ 56.1, 56.5, 102.9, 113.4 (dd, J = 23.0, 3.6 Hz), 114.1, 116.7 (dd, J = 23.5, 21.2 Hz), 116.8, 118.9, 120.5 (d, J = 10.4 Hz), 121.1, 128.4, 134.6, 137.8 (dd, J = 7.2, 3.8 Hz), 141.8, 143.9, 150.1, 155.1 (d, J = 6.4 Hz), 157.7, 157.8 (dd, J = 258.6, 6.6 Hz), 158.1, 160.4 (dd, J = 254.3, 7.1 Hz). HRMS (ESI+) calc. for [M+H]⁺ (C₂₁H₁₇F₂N₆O₃): 439.1324, found: 439.1319.

5.1.34. Cis-2h

A solution of compound *trans*-2h in DMSO-d₆ (0.5 mL, ~2 mg/mL) was irradiated at λ = 365 nm (distance ~1 cm) to provide a sample of 88% *cis*-2h. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 3.62 (s, 3H), 4.00 (s, 3H), 6.84 (app q, J = 8.1 Hz, 1H), 6.90–7.03 (m, 3H), 7.12 (t, J = 8.7 Hz, 1H), 7.19–7.28 (m, 1H), 8.44 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 8.56 (dd, J = 2.4, 1.0 Hz, 1H), 11.06 (s, 1H), 12.58 (s, 1H). ¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO-d₆) δ -123.3 (dd, J = 8.2, 4.0 Hz), -114.0 (dt, J = 9.1, 4.6 Hz).

5.1.35. 22: 2,6-difluoro-3-(phenylsulfonamido)benzoic acid

To a solution of methyl 3-amino-2,6-difluorobenzoate (3.00 mmol, 561 mg, Combi-Blocks) and benzenesulfonyl chloride

(8.00 mmol, 1.02 mL) in DCM (15 mL) was added DMAP (30 mg) and triethylamine (10.0 mmol, 1.38 mL). The resulting mixture was stirred at rt for 20 h, after which it was diluted with Et₂O (100 mL) and washed with 1 N HCl (2 × 80 mL), sat. aq. NaHCO₃ (80 mL) and brine (80 mL). The organic phase was dried (MgSO₄) and the solvent was partially evaporated *in vacuo*. Addition of pentane resulted in the precipitation of product 21, which was used in the next step without further purification. Compound 21 (1.37 mmol, 640 mg) was stirred at rt for 2 h in a mixture of 2 N aq. KOH (10 mL), THF (24 mL) and methanol (6 mL). The reaction mixture was diluted with AcOEt (80 mL) and 1 N HCl (80 mL). The aqueous phase was separated and extracted with AcOEt (80 mL). The combined organic fractions were washed with brine (100 mL). The organic phase was dried (MgSO₄) and the solvent was partially evaporated *in vacuo*. Addition of pentane resulted in the precipitation of product 22 as a light pink solid (420 mg, 83% over two steps). Mp. 144–145 °C; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.00 (t, J = 9.1, 1H), 7.43–7.64 (m, 4H), 7.73 (d, J = 7.3 Hz, 2H). ¹⁹F NMR (376 MHz, CD₃OD) δ -123.31 (d, J = 8.7 Hz), -115.64 (t, J = 7.3 Hz). ¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ 111.5 (dd, J = 23.0, 4.2 Hz), 121.6 (dd, J = 13.7, 4.0 Hz), 126.7, 128.8, 129.1 (dd, J = 10.1, 2.4 Hz), 132.8, 139.6, 152.0 (d, J = 7.1 Hz), 154.6 (d, J = 7.2 Hz), 156.2 (d, J = 5.8 Hz), 158.7 (d, J = 5.8 Hz), 162.2. HRMS (ESI+) calc. for [M+Na]⁺ (C₁₃H₉F₂NO₄SNa): 336.0113, found: 336.0114.

5.1.36. 1: 2,6-difluoro-N-(3-methoxy-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-5-yl)-3-(phenylsulfonamido)-benzamide [43].

A solution of compound 22 (0.60 mmol, 188 mg), 3-methoxy-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-5-amine (0.42 mmol, 70 mg, prepared by a published procedure [52]), DMAP (10 mg) and EDC (0.60 mmol, 115 mg) in DMF (4 mL) was stirred at rt overnight. Afterwards, the reaction mixture was diluted with ethyl acetate (80 mL) and washed with brine (60 mL), 1 N aq. HCl (2 × 60 mL), sat. aq. NaHCO₃ (60 mL) and again brine (2 × 60 mL). The organic phase was dried (MgSO₄). The volatiles were partially removed *in vacuo* and to the residue was added pentane (100 mL). The resulting precipitate was filtered to provide product as white powder (25 mg, 13%). R_f = 0.20 (pentane/AcOEt, 1:1, v/v); Mp. >200 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 3.99 (s, 3H), 7.19 (t, J = 8.8 Hz, 1H), 7.33 (q, J = 8.2 Hz, 1H), 7.62 (m, 3H), 7.75 (d, J = 7.7 Hz, 2H), 8.42 (s, 1H), 8.53 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 10.34 (s, 1H), 11.00 (s, 1H), 12.57 (s, 1H). ¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO-d₆) δ -122.21, -116.18. HRMS (ESI+) calc. for [M+H]⁺ (C₂₀H₁₆F₂N₅O₄S): 460.8856, found: 460.8816.

Acknowledgements

The support of the Netherlands Organization for Scientific Research (NWO-CW VIDI grants 723.014.001 to W.S. and 723.012.005 to F.D.) is kindly acknowledged. We would like to thank Konstantin Hoffer (UCCH Kinomics Hamburg) for technical support and acknowledge SFB 677 “Function by Switching” (Collaborative Research Center financial Support by DFG) for financial support.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.06.042>.

References

- <https://www.kwf.nl/kanker/Pages/default.aspx>, Dutch Cancer Soc. (2018).
- S. Ugurel, J. Röhm, P.A. Ascierto, K.T. Flaherty, J.J. Grob, A. Hauschild, J. Larkin, G.V. Long, P. Lorigan, G.A. McArthur, A. Ribas, C. Robert, D. Schadendorf, C. Garbe, Survival of patients with advanced metastatic melanoma: the impact of novel therapies, *Eur. J. Cancer* 53 (2016) 125–134, <https://doi.org/10.1016>

- j.ejca.2015.09.013.
- [3] H. Davies, G.R. Bignell, C. Cox, P. Stephens, S. Edkins, S. Clegg, J. Teague, H. Woffendin, M.J. Garnett, W. Bottomley, N. Davis, E. Dicks, R. Ewing, Y. Floyd, K. Gray, S. Hall, R. Hawes, J. Hughes, V. Kosmidou, A. Menzies, C. Mould, A. Parker, C. Stevens, S. Watt, S. Hooper, R. Wilson, H. Jayatilake, B.A. Gusterson, C. Cooper, J. Shipley, D. Hargrave, K. Pritchard-Jones, N. Maitland, G. Chenevix-Trench, G.J. Riggins, D.D. Bigner, G. Palmieri, A. Cossu, A. Flanagan, A. Nicholson, J.W.C. Ho, S.Y. Leung, S.T. Yuen, B.L. Weber, H.F. Seigler, T.L. Darrow, H. Paterson, R. Marais, C.J. Marshall, R. Wooster, M.R. Stratton, P.A. Futreal, 6-Mutations of the BRAF gene in human cancer, *Nature* 417 (2002) 949–954, <https://doi.org/10.1038/nature00766>.
- [4] A.X. Wang, X.Y. Qi, Targeting RAS/RAF/MEK/ERK signaling in metastatic melanoma, *IUBMB Life* 65 (2013) 748–758, <https://doi.org/10.1002/iub.1193>.
- [5] T. Rajakulendran, M. Sahmi, M. Lefrançois, F. Sicheri, M. Therrien, A dimerization-dependent mechanism drives RAF catalytic activation, *Nature* 461 (2009) 542–545, <https://doi.org/10.1038/nature08314>.
- [6] J. Yuan, W.H. Ng, P.Y.P. Lam, Y. Wang, H. Xia, J. Yap, S.P. Guan, A.S.G. Lee, M. Wang, M. Baccarini, J. Hu, The dimer-dependent catalytic activity of RAF family kinases is revealed through characterizing their oncogenic mutants, *Oncogene* (2018) 1–16, <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0365-2>.
- [7] E. Desideri, A.L. Cavallo, M. Baccarini, Alike but different: RAF paralogs and their signaling outputs, *Cell* 161 (2015) 967–970, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.045>.
- [8] P.T.C. Wan, M.J. Garnett, S.M. Roe, S. Lee, D. Niculescu-duvaz, V.M. Good, C.G. Project, C.M. Jones, C.J. Marshall, C.J. Springer, D. Barford, R. Marais, Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF, *Cell* 116 (6) (2004 Mar 19) 855–867.
- [9] G. Kim, A.E. McKee, Y.M. Ning, M. Hazarika, M. Theoret, J.R. Johnson, Q.C. Xu, S. Tang, R. Sridhara, X. Jiang, K. He, D. Roscoe, W. David McGuinn, W.S. Helms, A.M. Russell, S.P. Miksinski, J.F. Zirkelbach, J. Earp, Q. Liu, A. Ibrahim, R. Justice, R. Pazdur, FDA approval summary: vemurafenib for treatment of unresectable or metastatic melanoma with the BRAFV600E mutation mutation, *Clin. Cancer Res.* 20 (2014) 4994–5000, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0776>.
- [10] P. Rutkowski, C. Blank, Dabrafenib for the treatment of BRAF V600-positive melanoma: a safety evaluation, *Expert Opin. Drug Saf.* 13 (2014) 1249–1258, <https://doi.org/10.1517/14740338.2014.939954>.
- [11] J.M. Chalovich, E. Eisenberg, Targeting raf kinases for cancer therapy, *Magn. Reson. Imaging* 31 (2013) 477–479, <https://doi.org/10.1016/j.mri.2010.12.017>.
- [12] C.H. Adelmann, G. Ching, L. Du, R.C. Saporito, V. Bansal, L.J. Pence, R. Liang, W. Lee, K.Y. Tsai, Comparative profiles of BRAF inhibitors: the paradox index as a predictor of clinical toxicity, *Oncotarget* 7 (2016), <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8351>.
- [13] S.F. Chandrakumar, J. Yeung, Cutaneous adverse events during vemurafenib therapy, *J. Cutan. Med. Surg.* 18 (2014) 223–228, <https://doi.org/10.2310/7750.2013.13120>.
- [14] W.A. Velema, W. Szymanski, B.L. Feringa, Photopharmacology: beyond proof of principle, *J. Am. Chem. Soc.* 136 (2014) 2178–2191.
- [15] J. Broichhagen, J.A. Frank, D. Trauner, A roadmap to success in photopharmacology, *Acc. Chem. Res.* 48 (2015) 1947–1960.
- [16] M.M. Lerch, M.J. Hansen, G.M. Van Dam, W. Szymanski, B.L. Feringa, Emerging targets in photopharmacology, *Angew. Chem. Int. Ed.* 55 (2016) 10978–10999.
- [17] K. Hüll, J. Morstein, D. Trauner, *Vivo photopharmacology*, *Chem. Rev.* 118 (2018) 10710–10747.
- [18] M.J. Hansen, W.A. Velema, M.M. Lerch, W. Szymanski, B.L. Feringa, Wavelength-selective cleavage of photoprotecting groups: strategies and applications in dynamic systems, *Chem. Soc. Rev.* 44 (2015) 3358–3377, <https://doi.org/10.1039/C5CS00118H>.
- [19] F. Reessing, W. Szymanski, Beyond photodynamic therapy: light-activated cancer chemotherapy, *Curr. Med. Chem.* 24 (2017) 4905–4950.
- [20] R. Horbert, B. Pinchuk, P. Davies, D. Alessi, C. Peifer, Photoactivatable prodrugs of antimelanoma agent vemurafenib, *ACS Chem. Biol.* 10 (2015) 2099–2107, <https://doi.org/10.1021/acschembio.5b00174>.
- [21] W. Szymanski, J.M. Beierle, H.A. V. Kistemaker, W.A. Velema, B.L. Feringa, Reversible photocontrol of biological systems by the incorporation of molecular photoswitches, *Chem. Rev.* 113 (2013) 6114–6178, <https://doi.org/10.1021/cr300179f>.
- [22] C. Brown, S.K. Rastogi, S.L. Barrett, H.E. Anderson, E. Twichell, S. Gralinski, A. McDonald, W.J. Brittain, Journal of Photochemistry and Photobiology A: chemistry Differential azobenzene solubility increases equilibrium cis/trans ratio in water, *J. Photochem. Photobiol. A* 336 (2017) 140–145.
- [23] W. Szymanski, M.E. Ourailidou, W.A. Velema, F.J. Dekker, B.L. Feringa, Light-controlled histone deacetylase (HDAC) inhibitors: towards photopharmacological chemotherapy, *Chem. Eur. J.* 21 (2015) 16517–16524.
- [24] M.J. Hansen, W.A. Velema, G. de Bruin, H.S. Overkleef, W. Szymanski, B.L. Feringa, Proteasome inhibitors with photocontrolled activity, *ChemBiochem* 15 (2014) 2053–2057, <https://doi.org/10.1002/cbic.201402237>.
- [25] B. Blanco, K.A. Palasis, A. Adwal, D.F. Callen, A.D. Abell, Azobenzene-containing photoswitchable proteasome inhibitors with selective activity and cellular toxicity, *Bioorg. Med. Chem.* 25 (2017) 5050–5054, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.06.011>.
- [26] A.J. Engdahl, E.A. Torres, S.E. Lock, T.B. Engdahl, P.S. Mertz, C.N. Streu, Synthesis, characterization, and bioactivity of the photoisomerizable tubulin polymerization inhibitor azo-combretastatin A4, *Org. Lett.* 4 (2015) 4546–4549.
- [27] M. Borowiak, W. Nahaboo, M. Reyniers, K. Nekolla, P. Jalinet, J. Hasserodt, M. Rehberg, M. Delattre, S. Zahler, A. Vollmar, D. Trauner, O. Thorn-seshold, Photoswitchable inhibitors of microtubule dynamics optically control mitosis and cell death, *Cell* 162 (2015) 403–411.
- [28] J.E. Sheldon, M.M. Deona, C.E. Lyons, J.C. Hackett, M.C.T. Hartman, Photoswitchable anticancer activity via trans-cis isomerization of a combretastatin A-4 analog, *Org. Biomol. Chem.* 14 (2016) 40–49.
- [29] S.K. Rastogi, Z. Zhao, S.L. Barrett, S.D. Shelton, M. Zafferani, H.E. Anderson, M.O. Blumenthal, L.R. Jones, L. Wang, X. Li, C.N. Streu, L. Du, W.J. Brittain, Photoresponsive azo-combretastatin A-4 analogues, *Eur. J. Med. Chem.* 143 (2018) 1–7, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.11.012>.
- [30] R. Ferreira, J.R. Nilsson, C. Solano, J. Andréasson, M. Grötl, Design, synthesis and inhibitory activity of photoswitchable RET kinase inhibitors, *Sci. Rep.* 5 (2015) 9769.
- [31] D. Wilson, J.W. Li, N.R. Branda, Visible-Light-Triggered Activation of a Protein Kinase Inhibitor, *ChemMedChem* 20 (2017) 284–287, <https://doi.org/10.1002/cmdc.201600632>.
- [32] D. Schmidt, T. Rodat, L. Heintze, J. Weber, R. Horbert, U. Girreser, T. Raeker, L. Bußmann, M. Kriegs, B. Hartke, C. Peifer, Axitinib - a photoswitchable approved tyrosine kinase inhibitor, *ChemMedChem* 20 (2018) 2415–2426, <https://doi.org/10.1002/cmdc.201800531>.
- [33] C.L. Fleming, M. Grötl, J. Andréasson, On-command regulation of kinase activity using photonic stimuli, *ChemPhotoChem* (2019), <https://doi.org/10.1002/cptc.201800253>.
- [34] M. Schehr, C. Ianes, J. Weisner, L. Heintze, M.P. Müller, C. Pichlo, J. Charl, E. Brunstein, J. Ewert, M. Lehr, U. Baumann, D. Rauh, U. Knippschild, C. Peifer, R. Herges, 2-Azo-, 2-diazocine-thiazoles and 2-azo-imidazoles as photoswitchable kinase inhibitors: limitations and pitfalls of the photoswitchable inhibitor approach, *Photochem. Photobiol. Sci.* 18 (2019) 1398–1407, <https://doi.org/10.1039/c9pp00010k>.
- [35] S. Wenglowsky, D. Moreno, E.R. Laird, S.L. Gloor, L. Ren, T. Risom, J. Rudolph, H.L. Sturgis, W.C. Voegtli, Pyrazolopyridine inhibitors of B-RafV600E. Part 4: rational design and kinase selectivity profile of cell potent type II inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22 (2012) 6237–6241, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.08.007>.
- [36] B.J. Newhouse, S. Wenglowsky, J. Grina, E.R. Laird, W.C. Voegtli, L. Ren, K. Ahrendt, A. Buckmelter, S.L. Gloor, N. Klopfenstein, J. Rudolph, Z. Wen, X. Li, B. Feng, Imidazo[4,5-b]pyridine inhibitors of B-Raf kinase, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23 (2013) 5896–5899, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.08.086>.
- [37] S. Wenglowsky, L. Ren, J. Grina, J.D. Hansen, E.R. Laird, D. Moreno, V. Dinkel, S.L. Gloor, G. Hastings, S. Rana, K. Raser, H.L. Sturgis, W.C. Voegtli, G. Vigers, B. Willis, S. Mathieu, J. Rudolph, Highly potent and selective 3-N-methylquinazoline-4(3H)-one based inhibitors of B-RafV600Ekinase, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24 (2014) 1923–1927, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.03.007>.
- [38] M. Pulici, G. Traquandi, C. Marchionni, M. Modugno, R. Lupi, N. Amboldi, E. Casale, N. Colombo, L. Corti, M. Fasolini, F. Gasparri, W. Pastori, A. Scolaro, D. Donati, E. Felder, A. Galvani, A. Isacchi, E. Pesenti, M. Ciomei, Optimization of diarylthiazole B-Raf inhibitors: identification of a compound endowed with high oral antitumor activity, mitigated hERG inhibition, and low paradoxical effect, *ChemMedChem* 10 (2015) 276–295, <https://doi.org/10.1002/cmdc.201402424>.
- [39] L. Liu, M.R. Lee, J.L. Kim, D.A. Whittington, H. Bregman, Z. Hua, R.T. Lewis, M.W. Martin, N. Nishimura, M. Potashman, K. Yang, S. Yi, K.R. Vaida, L.F. Epstein, C. Babij, M. Fernando, J. Carnahan, M.H. Norman, Purinylpyridylamino-based DFG-in/ α C-helix-out B-Raf inhibitors: applying mutant versus wild-type B-Raf selectivity indices for compound profiling, *Bioorg. Med. Chem.* 24 (2016) 2215–2234, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.03.055>.
- [40] I.C. Waizenegger, A. Baum, S. Steurer, H. Stadtmüller, G. Bader, O. Schaaf, P. Garin-Chesa, A. Schlattl, N. Schweifer, C. Haslinger, F. Colbatzky, S. Mousa, A. Kalkuhl, N. Kraut, G.R. Adolf, A novel RAF kinase inhibitor with DFG-out-binding mode: high efficacy in BRAF-mutant tumor xenograft models in the absence of normal tissue hyperproliferation, *Mol. Cancer Ther.* 15 (2016) 354–365, <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0617>.
- [41] M. Schoenberger, A. Damijonaitis, Z. Zhang, D. Nagel, D. Trauner, Development of a new photochromic ion channel blocker via azologization of foscarnine, *ACS Chem. Neurosci.* 5 (2014) 514–518.
- [42] B. Pinchuk, T. Von Drathen, V. Opel, C. Peifer, Photoinduced conversion of antimelanoma agent Dabrafenib to a novel fluorescent BRAFV600E inhibitor, *ACS Med. Chem. Lett.* 7 (2016) 962–966, <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.6b00340>.
- [43] S. Wenglowsky, K.A. Ahrendt, A.J. Buckmelter, B. Feng, S.L. Gloor, S. Gradl, J. Grina, J.D. Hansen, E.R. Laird, P. Lunghofer, S. Mathieu, D. Moreno, B. Newhouse, L. Ren, T. Risom, J. Rudolph, J. Seo, H.L. Sturgis, W.C. Voegtli, Z. Wen, Pyrazolopyridine inhibitors of B-RafV600E. Part 2: structure-activity relationships, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21 (2011) 5533–5537, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.06.097>.
- [44] W. Szymanski, B. Wu, C. Poloni, D.B. Janssen, B.L. Feringa, Azobenzene photoswitches for staudinger-bertozzi ligation, *Angew. Chem. Int. Ed.* 52 (2013) 2068–2072.
- [45] M. Matsuse, N. Mitsutake, S. Tanimura, T. Ogi, E. Nishihara, M. Hirokawa, C.S. Fuziawara, V.A. Saenko, K. Suzuki, A. Miyachi, S. Yamashita, Functional characterization of the novel BRAF complex mutation, BRAFV600delinsYM, identified in papillary thyroid carcinoma, *Int. J. Cancer* 132 (2013) 738–743,

- <https://doi.org/10.1002/ijc.27709>.
- [46] M. Hatanaka, Y. Higashi, K. Kawai, J. Su, W. Zeng, X. Chen, T. Kanekura, CD147-targeted siRNA in A375 malignant melanoma cells induces the phosphorylation of EGFR and downregulates CDC25C and MEK phosphorylation, *Oncol. Lett.* 11 (2016) 2424–2428, <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4267>.
- [47] O. Hantschel, Unexpected off-targets and paradoxical pathway activation by kinase inhibitors, *ACS Chem. Biol.* 10 (2015) 234–245, <https://doi.org/10.1021/cb500886n>.
- [48] A. Ter Elst, S.H. Diks, K.R. Kampen, P.M. Hoogerbrugge, R. Ruijtenbeek, P.J. Boender, A.H. Sikkema, F.J.G. Scherpen, W.A. Kamps, M.P. Peppelenbosch, E.S.J.M. De Bont, Identification of new possible targets for leukemia treatment by kinase activity profiling, *Leuk. Lymphoma* 52 (2011) 122–130, <https://doi.org/10.3109/10428194.2010.535181>.
- [49] A.H. Ree, K. Flatmark, M.G. Saalen, S. Folkvord, S. Dueland, J. Geisler, K.R. Redalen, Tumor phosphatidylinositol 3-kinase signaling in therapy resistance and metastatic dissemination of rectal cancer: opportunities for signaling-adapted therapies, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 95 (2015) 114–124, <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.01.003>.
- [50] E. Baron, S. Stevens, Phototherapy for cutaneous T-cell lymphoma, *Dermatol. Ther.* 16 (2003) 303–310.
- [51] M.W.H. Hoorens, W. Szymanski, Reversible, spatial and temporal control over protein activity using light, *Trends Biochem. Sci.* 43 (2018) 567–575, <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.05.004>.
- [52] M. Wang, M. Gao, K.D. Miller, Q. Zheng, Synthesis of 2,6-difluoro-N-(3-[¹¹C]methoxy-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-5-yl)-3-(propylsulfonamido)benzamide as a new potential PET agent for imaging of B-RAFV600E in cancers, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23 (2013) 1017–1021, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.12.027>.
- [53] A. Jankowiak, E. Obijalska, P. Kaszynski, A. Pieczonka, V.G. Young, Synthesis and structural, spectroscopic, and electrochemical characterization of benzo[c]quinolininium and its 5-aza, 6-aza, and 5, 6-diaza analogues, *Tetrahedron* 67 (2011) 3317–3327, <https://doi.org/10.1016/j.tet.2011.03.023>.

3.1.3 CK1-Modulatoren zur Beeinflussung des circadianen Rhythmus

Kinase-Kurzporträt	CK1
Name	Caseinkinase 1 (verschiedener Isoformen, z.B. α , δ oder ϵ)
Familie	Serin-/Threonin-Kinase
Funktion	Aufrechterhaltung der DNA-Replikation, ^[213] Zellzyklus, ^[214] Zellproliferation, ^[215,216] Regulierung des Estrogenrezeptors α ^[217] , Circadianer Rhythmus, ^[218,219] und weitere ^[220,221]
Therapeutische Relevanz	verschiedene Krebserkrankungen, Schlafstörungen, neurodegenerative Erkrankungen ^[219,221,222]
Inhibition	verschiedene Kandidaten, bisher ohne Zulassung ^[29,223]

Die CK1 übernimmt eine zentrale Rolle im Kinasenetzwerk einer menschlichen Zelle und ist somit an vielen verschiedenen physiologischen Prozessen beteiligt: von grundlegenden Aufgaben wie der Aufrechterhaltung der DNA-Replikation, über die WNT-vermittelte Zellproliferation bis hin zu spezifischen Prozessen, wie der Regulierung des Estrogenrezeptors α (s. Kinase-Kurzporträt).

Derzeitige Entwicklungen in unserer Arbeitsgruppe konzentrieren sich auf eine selektive Inhibition der δ - bzw. ϵ -Isoform. Bisher ist es aufgrund der großen Sequenzhomologie zwischen den beiden Isoformen noch nicht gelungen, mögliche Kandidaten in weiterführende *in-vivo*-Studien einzubringen.^[224,225]

Im Fokus der im Folgenden untersuchten Photoschalter stehen Modulatoren des circadianen Rhythmus (CR), auch Chronomodulatoren genannt. Der CR ist maßgeblich abhängig von oszillierender Proteintranskription von CLOCK und BMAL1, welche wiederum die Transkription von CRY- und PER1-Proteinen (CRY-PER1) steuern.^[226,227] Weiterhin unterliegt die Expression von CRY-PER1-Proteinen zum einen einer Autoinhibition durch CRY-PER1-Expression und zum anderen einem CK1-katalysierten Abbau von PER1. Sowohl für CK1 α als auch CK1 δ konnte der PER1-Abbau beschrieben werden.^[228,229] Hirota *et al.* konnten zeigen, dass Longdaysin (**8**) die Phasen des circadianen Rhythmus verlängert, sowohl *in vitro* auf Zelllinien und Organgeweben als auch *in vivo* in Zebrafischlarven. Der Wirkmechanismus von Longdaysin wurde noch nicht gänzlich aufgeklärt, jedoch wird eine Phasenverlängerung aufgrund des verringerten PER1-Abbaus durch CK1-Inhibition diskutiert.^[229] Deswegen wird im weiteren Verlauf auch nicht der Begriff der photoschaltbaren CK1-Inhibitoren verwendet, sondern der der photoschaltbaren Chronomodulatoren, da diese Bezeichnung treffender ist. Weiterhin wird der CR durch ERK1/2 MAPK reguliert, welche auch von Longdaysin beeinflusst werden.^[226,229] Additive Knockdowns vom CK1 α , CK1 δ und ERK2 verstärken die Phasenverlängerung. Obwohl Longdaysin mit relativ schlechten IC₅₀-Werten auf den isolierten Kinasen nicht als potenter Inhibitor bezeichnet werden kann (CK1 α : 5.6 μ M, CK1 δ : 8.8 μ M, ERK2: 52 μ M), könnte eine gleichzeitige Blockade dieser Kinasen die entscheidende Rolle bei der Phasenverlängerung spielen. Das Netzwerk aus Kinasen könnte nicht den Ausfall einer Kinase kompensieren, da an mehreren Stellen gleichzeitig eine Inhibition induziert worden wäre.

Auf Basis des Chronomodulators Longdaysin sollte eine photoschaltbare Beeinflussung des circadianen Rhythmus ermöglicht werden. Dazu wurde der Longdaysin-Grundkörper (*N*-Benzyl-9-isopropyl-9*H*-purin-6-amin) von Kolarski mit verschiedenen Azobenzolen sowie Arylazopyrazolen funktionalisiert (s. Abbildung 3.14).^[230] Nach erfolgter initialer biologischer Testung wurden die Verbindungen im Pamgene-Kinom-Profilung untersucht. Zusätzlich wurden noch hoch potente CK1 δ -Inhibitoren (Verbindung **11** und **12**) im Kinase Screening als Kontrolle getestet, um zu prüfen, inwiefern eine CK1 δ -Inhibition sich auf das Kinomprofil bzw. auf den circadianen Rhythmus auswirkt.

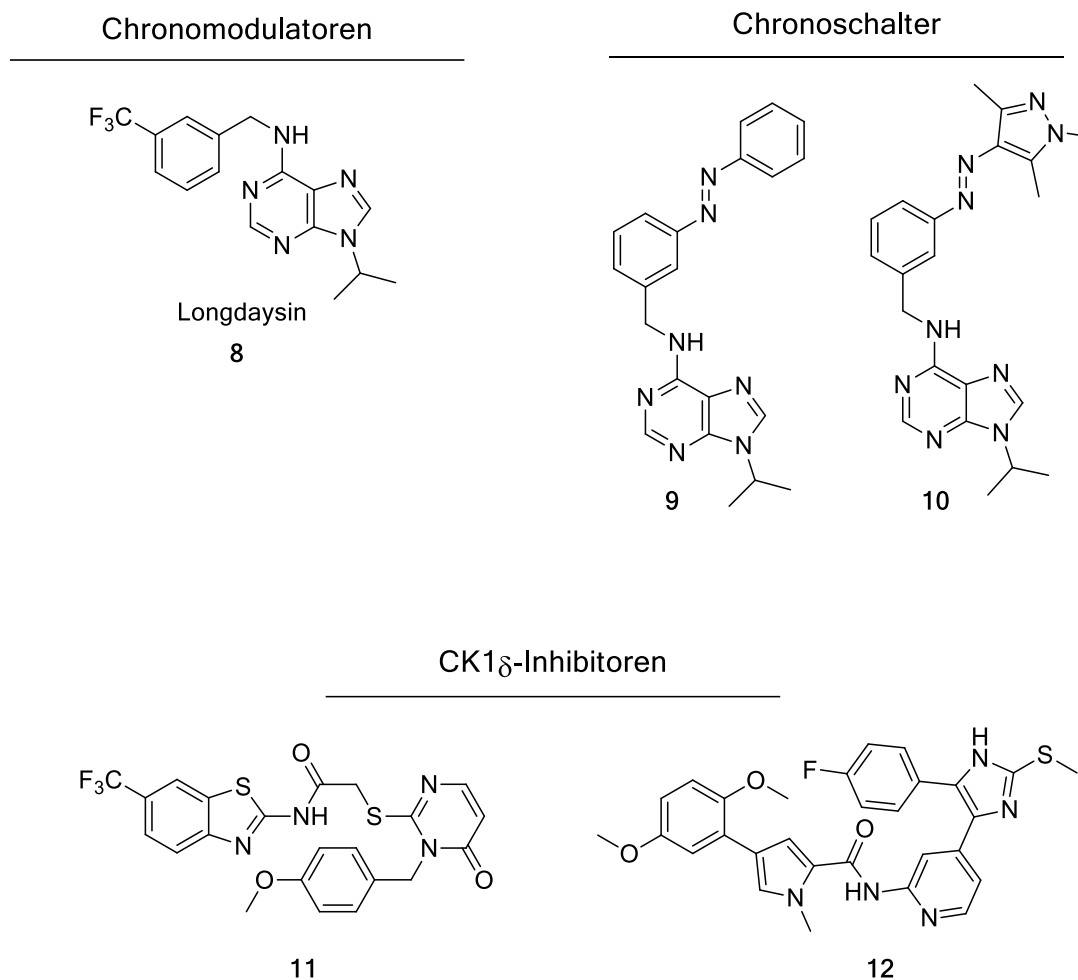


Abbildung 3.14. Übersicht verwendeter Chronomodulatoren und CK1-Inhibitoren.

Longdaysin als bereits beschriebener Chronomodulator.^[229] Chronoschalter **9** und **10** von Kolarski.^[230] Potente CK1 δ -Inhibitoren **11** von Baier^[231] und **12** von Halekotte.^[232]

Photochemische und biologische Evaluierung

Die Chronoschalter **9** und **10** wiesen in der photochemischen Charakterisierung günstige Parameter für eine anschließende biologische Testung auf (s. Abbildung 3.15). Das *cis*-Isomer konnte im PSS zu 87 % (**9**) oder 97 % (**10**) angereichert werden, bei einer Halbwertszeit in DMSO von über 95 h (**9**) bzw. 26 h (**10**). In der Testung auf der isolierten CK1 α wurden leicht verbesserte IC₅₀-Werte erzielt (**9**: 1.9 μ M, **10**: 3.0 μ M, Longdaysin: 5.6 μ M) sowie eine geringe aber unzureichende Photoschaltbarkeit von *trans* (wirksam) zu *cis* (unwirksam) um den Faktor 4.5 (**9**) bzw. 8 (**10**). Zuletzt wurden die Verbindungen auf transfizierten U2OS-Zellen getestet (U2OS^{Bmal1-dLuc}). Mit Hilfe von U2OS^{Bmal1-dLuc} lässt sich die phasenweise Aktivierung von BMAL1 durch eine gekoppelte Luciferaseaktivität mittels Biolumineszenz auslesen. Nach fünf Tagen wurden die Phasenunterschiede zu der nicht behandelten Negativkontrolle gemessen. Sowohl Verbindung **9** als auch Verbindung **10** wiesen eine positive Phasenveränderung auf (**9**:

9 h und **10**: 19 h) genauso wie Longdaysin (14 h). Im Gegensatz zu Verbindung **9** (keine Schaltwirkung) konnte für Verbindung **10** eine photoschaltbare Beeinflussung des CR in der Zellkultur gemessen werden (*trans*: 19 h vs. *cis*: 12 h).

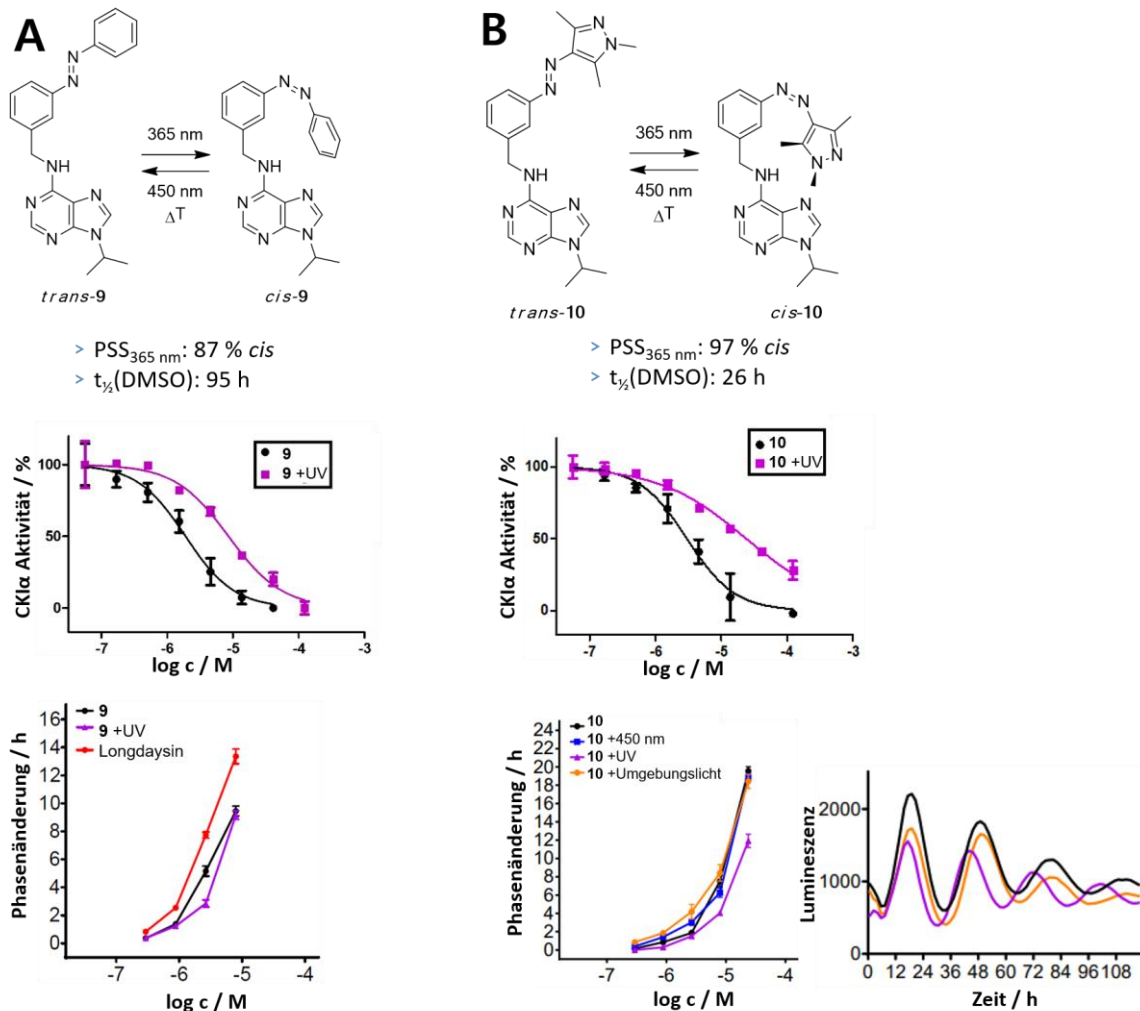


Abbildung 3.15. Biologische Testung der photoschaltbaren Chronomodulatoren.

A. Isomerenanreicherung unter Bestrahlung mit 365 nm von bis zu 87 % *cis*-**9**. 4.5-facher Wirkunterschied im CK1α-Assay zwischen **9** ohne UV (1.91 μM) und mit UV (8.57 μM). Die Phasenänderung auf U2OS^{Bmal1-dLuc} ist verringert bei Verbindung **9** mit UV-Bestrahlung (9 h vs. 14 h). **B.** Isomerenanreicherung unter Bestrahlung mit 365 nm von bis zu 97 % *cis*-**10**. 8-facher Wirkunterschied im CK1α-Assay zwischen **10** ohne UV (3.0 μM) und mit UV (24.0 μM). Die Phasenänderung auf U2OS^{Bmal1-dLuc} ist verringert bei Verbindung **10** mit UV-Bestrahlung (12 h vs. 19 h). Die Testung wurde durchgeführt von Kolarski.^[230]

Kinom-Profiling

Als nächstes wurde ein Pamgene-Kinom-Profiling (s. Methoden, Kapitel 6.4.7, S. 134) von den Verbindungen **9** und **10** unter kontrollierten Lichtbedingungen durchgeführt, um eventuelle Wirkmechanismen der Chronoschalter auf weitere Kinasen des menschlichen Kinoms zu entschlüsseln. Dazu wurde U2OS-Zellysat mit den Inhibitoren inkubiert (*spike-in*), ggf. bestrahlt und auf STK-Chips vermessen.

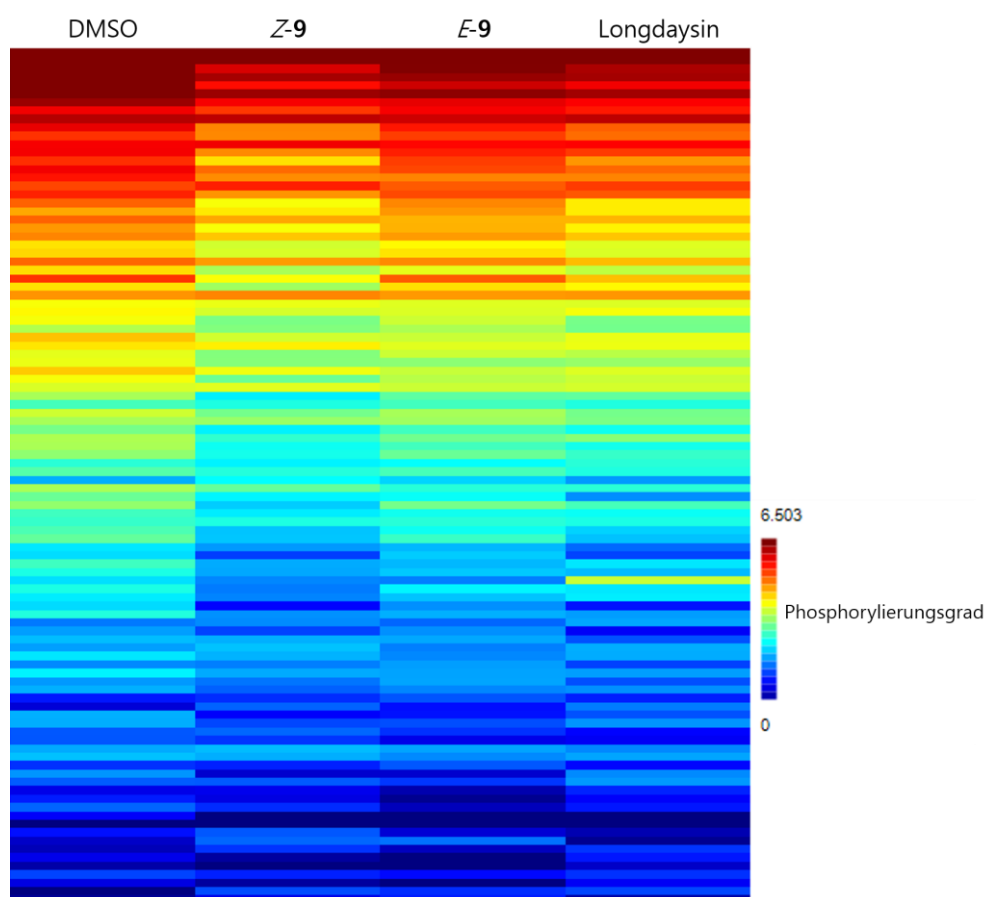


Abbildung 3.16. Kinase-Screening von U2OS-Lysat und Verbindung 9.

Phosphorylierungsprofil des U2OS-Kinoms auf STK-Chips dargestellt als *heat map*. Die Peptide wurden nach Phosphorylierungsgrad von hoch (rot) zu niedrig (blau) sortiert. Lysate wurden behandelt mit entweder 2 % DMSO (Negativkontrolle), Longdaysin (Positivkontrolle), (*Z*)-**9** (erhalten nach Bestrahlung von (*E*)-**14** mit 365 nm) oder (*E*)-**14**. Substanzkonzentration: 10 μ M, n = 3.

Die scheinbar vielversprechenden Ergebnisse aus dem ersten Experiment mit Verbindung **9** (s. Abbildung 3.16) zeigten eine Abhängigkeit der Kinomphosphorylierung zur Bestrahlung. Durch Bestrahlung mit 365 nm (*cis*-**9**) konnte ein Kinom-Profil erzeugt werden, äquivalent zum Longdaysin-Profil. Ohne Bestrahlung (*trans*-**9**) ähnelt das Kinaseprofil der Behandlung dem der DMSO-Negativkontrolle. Zu beachten ist, dass die Einzelprofile dieses Versuchslaufs eine hohe Heterogenität aufwiesen (s. Anhang, Abbildung 8.2). Durch die große Streuung sind die Unterschiede mit einer größeren Unsicherheit belegt. Zur Qualitätssicherung wurden

die Phosphorylierungsgrade der behandelten Proben mit der DMSO-Kontrolle verglichen und gegen die Effektstärken aufgetragen (s. Abbildung 3.17). Während bei der Longdaysin-Probe Peptide sowohl mehr als auch weniger phosphoryliert vorlagen, wurden Peptide bei Behandlung mit dem Chronoschalter **9** überwiegend mehr phosphoryliert. Bedeutend dabei ist, dass die Peptidphosphorylierung bis auf eine Ausnahme nicht signifikant erfolgte (bei $p = 0.05$). Die Anforderungen zur Qualitätssicherung der Signale konnten nicht erfüllt werden, womit die Ergebnisse dieses Versuchslaufes als nicht valide angesehen werden.

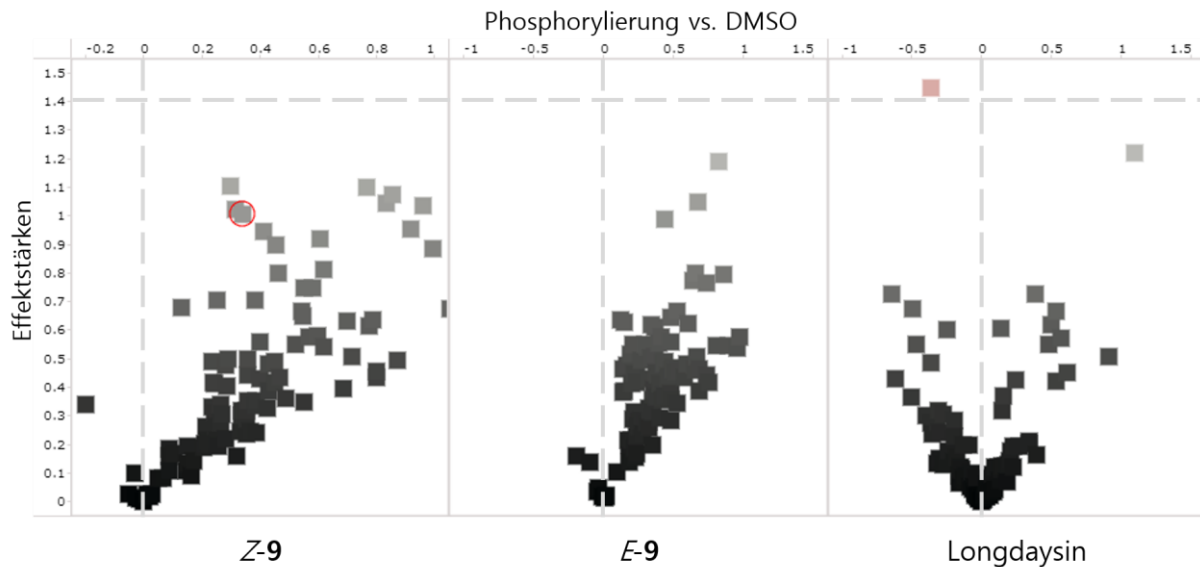


Abbildung 3.17. Volcano plot vom U2OS-Profilung mit Verbindung 9.

Peptidphosphorylierungen aufgetragen nach Effektstärken gegen den Phosphorylierungsgrad im Vergleich zur DMSO-Kontrolle im *volcano plot*. Effektstärken über 1.4 (entspricht logarithmiert zur Basis 2 dem Signifikanzniveau von $p = 0.05$) werden in Rot dargestellt. Negative Werte auf der Abszisse zeigen einen geringeren Phosphorylierungsgrad im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, positive Werte einen höheren Phosphorylierungsgrad.
n = 3

Obwohl im Vergleich zur DMSO-Kontrolle keine signifikanten Peptidphosphorylierungsunterschiede durch Verbindung **9** detektierbar waren, wurde Chronoschalter **10** unter kontrollierten Lichtbedingungen im Kinase-Screening aufgrund der besseren biologischen Eigenschaften auf den U2OS^{Bmal1-dLuc} getestet. In der *heat map* des Kinom-Profilings (s. Abbildung 3.18) sind auch hier keine wesentlichen Unterschiede von U2OS-Lysat mit DMSO über Verbindung **10** mit und ohne 365 nm-Bestrahlung bis zur Positivkontrolle Longdaysin erkennbar.

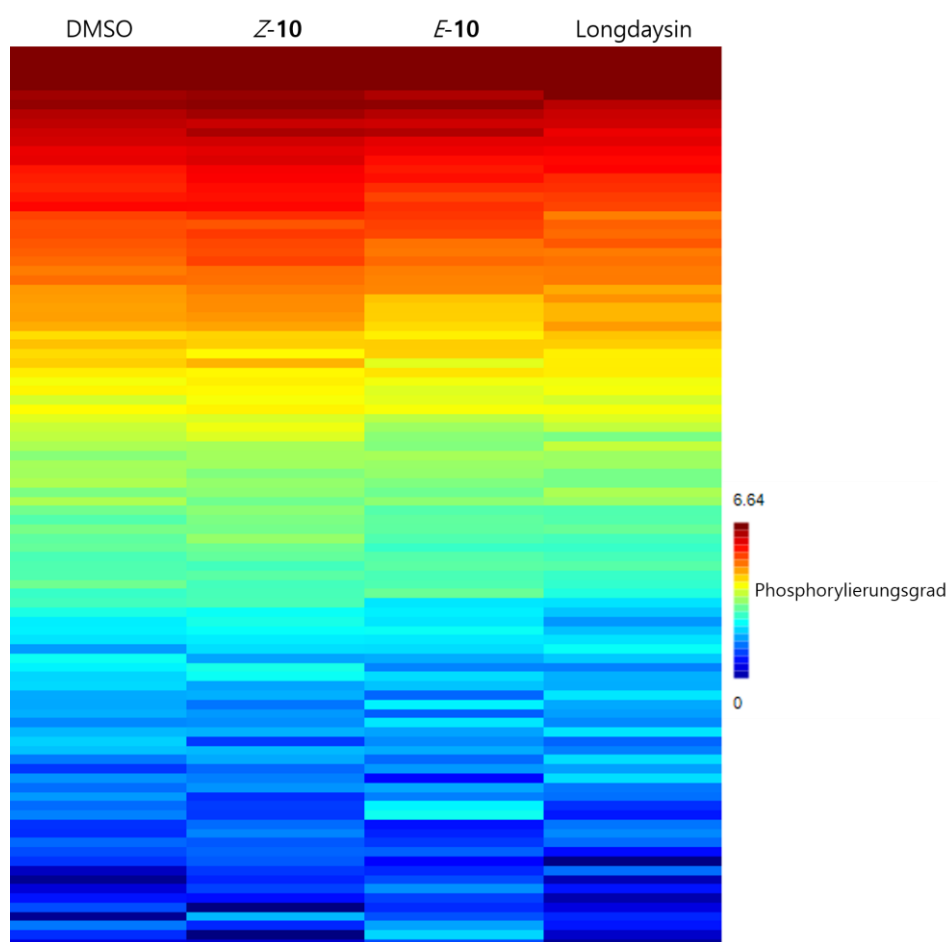


Abbildung 3.18. Kinase-Screening von U2OS-Lysat und Verbindung 10.

Phosphorylierungsprofil des U2OS-Kinoms auf STK-Chips dargestellt als *heat map*. Die Peptide wurden nach Phosphorylierungsgrad von hoch (rot) zu niedrig (blau) sortiert. Lysate wurden behandelt mit entweder 2 % DMSO (Negativkontrolle), Longdaysin (Positivkontrolle), (*Z*)-**10** (erhalten nach Bestrahlung von (*E*)-**10** mit 365 nm) oder (*E*)-**10**. Substanzkonzentration: 10 μ M, n = 3

Die Darstellung im *volcano plot* (s. Abbildung 3.19) zeigt, dass die Mehrheit der Peptide im Vergleich zur DMSO-Kontrolle nicht signifikant modifiziert wurden. Da auch die vermeintliche Positivkontrolle Longdaysin in den Kinomprofilierungen von den Verbindungen **9** und **10** lediglich nicht signifikante Ergebnisse erzielte, stand zur Frage, ob in diesem Versuchsmodell bei einer Konzentration von 10 μM Longdaysin überhaupt messbare Ergebnisse erzielt werden können.

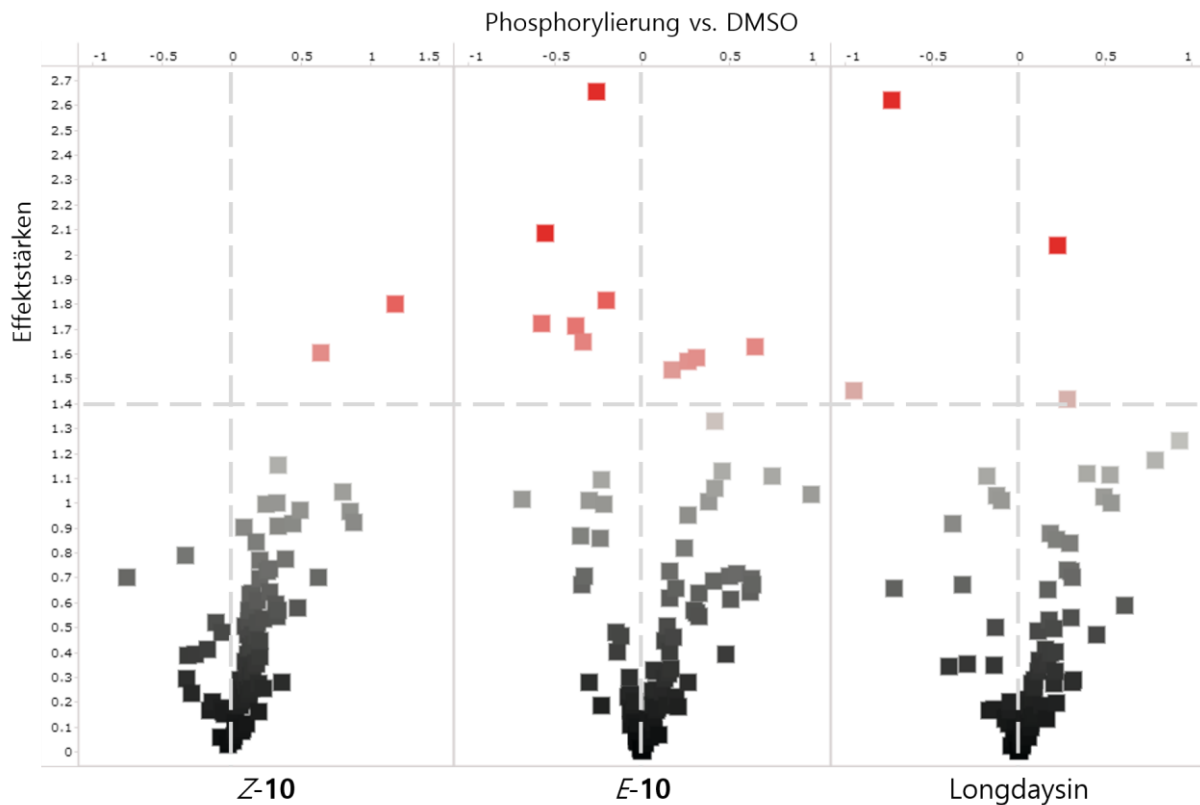


Abbildung 3.19. Volcano plot vom U2OS-Screening mit Verbindung 10.

Peptidphosphorylierungen aufgetragen nach Effektstärken gegen den Phosphorylierungsgrad im Vergleich zur DMSO-Kontrolle im *volcano plot*. Effektstärken über 1.4 (entspricht logarithmiert zur Basis 2 dem Signifikanzniveau von $p = 0.05$) werden in Rot dargestellt. Negative Werte auf der Abszisse zeigen einen geringeren Phosphorylierungsgrad im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, positive Werte einen höheren Phosphorylierungsgrad. $n = 3$.

Um zu überprüfen, ob die Wirkung auf das U2OS-Kinom konzentrationsabhängig ist, wurden Longdaysin-Konzentrationen im Rahmen von 1–100 μM auf U2OS-Lysat gegeben und profiliert (s. Abbildung 3.20). Von 1 bis 50 μM zeigt sich eine tendenziell steigende Peptidphosphorylierung, also möglicherweise eine erhöhte Kinomaktivität. Bei 100 μM Substanzkonzentration fällt der Phosphorylierungsgrad entgegen des Trends auf DMSO-Niveau. Mögliche Erklärungsversuche wurden nicht unternommen, da auch in diesem Fall die Peptidphosphorylierungen überwiegend nicht ausreichend signifikant waren (s. *volcano plot* im Anhang, Abbildung 8.3).

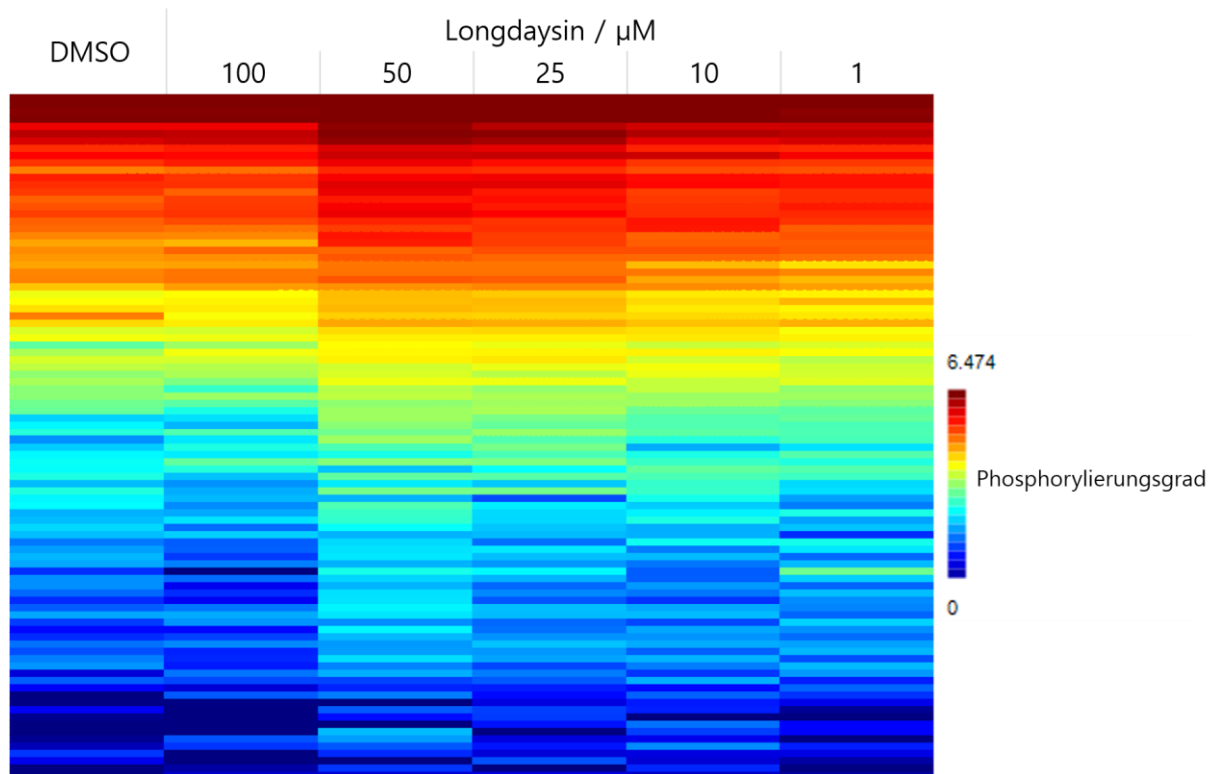


Abbildung 3.20. Kinom-Profilung konzentrationsabhängiger Longdaysin-Effekte auf U2OS-Lysat.

Phosphorylierungsprofil des U2OS-Kinoms auf STK-Chips dargestellt als *heat map*. Die Peptide wurden nach Phosphorylierungsgrad von hoch (rot) zu niedrig (blau) sortiert. Lysate wurden behandelt mit entweder 2 % DMSO (Negativkontrolle) oder Longdaysin in variablen, n = 2.

Bisherige Kinase-Screenings wurden mittels *spike-in*-Methode durchgeführt, d.h. die Zellen wurden vor Substanzbehandlung lysiert. Dies hat den Vorteil, dass keine zusätzlichen biologischen Barrieren wie Membranen überwunden werden müssen und eine bessere Wiederfindung der erwartbaren Effekte von Kinaseinhibitoren erzielt werden kann. Nachteilig dagegen ist, dass die Signaltransduktionskaskade unterbrochen wird und das Netzwerk aus Kinasen nicht mehr physiologisch interagieren kann. So können auch *down-stream*-Kinasen direkt vom Inhibitor angesprochen werden, was unter physiologischen Bedingungen (z.B. im Zellasay) so nicht passieren würde. Der Schluss liegt nahe, dass der CR nur bei intakten zellulären Vorgängen vollfunktional ablaufen kann, denn die phasenweise Transkription, Autoinhibition sowie Abbau von CLOCK-Proteinen und CRY-PER-Proteinen ist maßgeblich abhängig von der Aufrechterhaltung der Kompartimentierung vom Zellkern zur restlichen Zelle.

Als nächstes sollte überprüft werden, ob ein circadianer Modulator wie Longdaysin überhaupt geeignet ist im Kinase-Screening untersucht zu werden bzw. ob sich die erwartbaren Effekte mit dem Profiling darstellen lassen. Dazu wurden U2OS-Zellen über verschiedene Zeiträume mit Longdaysin inkubiert. In Abhängigkeit der Inkubationsdauer wurde ein veränderter Phosphorylierungsgrad erwartet. Den aus Abbildung 3.21 entnehmbaren Ergebnissen lassen sich jedoch keine verwertbaren Aussagen ableiten. In der *heat map* ist ein schwach ausgeprägter zeitabhängiger Phosphorylierungsgrad zu erkennen und der *volcano plot* zeigt, dass es sich um überwiegend nicht-signifikante Veränderungen handelt mit dazu äußerst schwachen Effekten. Die bisherigen Resultate zeigen, dass sich die Longdaysin-vermittelten Effekte nicht in dem getesteten Setting darstellen lassen. Vermutlich eignet sich das Kinase-Screening besser für potente Kinaseinhibitoren, um auswertbare Ergebnisse zu erzielen. Den erhofften Beitrag zu Entschlüsselung des Wirkmechanismus von Longdaysin und den photoschaltbaren Chronomodulatoren konnte das Kinom-Profilung in diesem Fall nicht leisten.

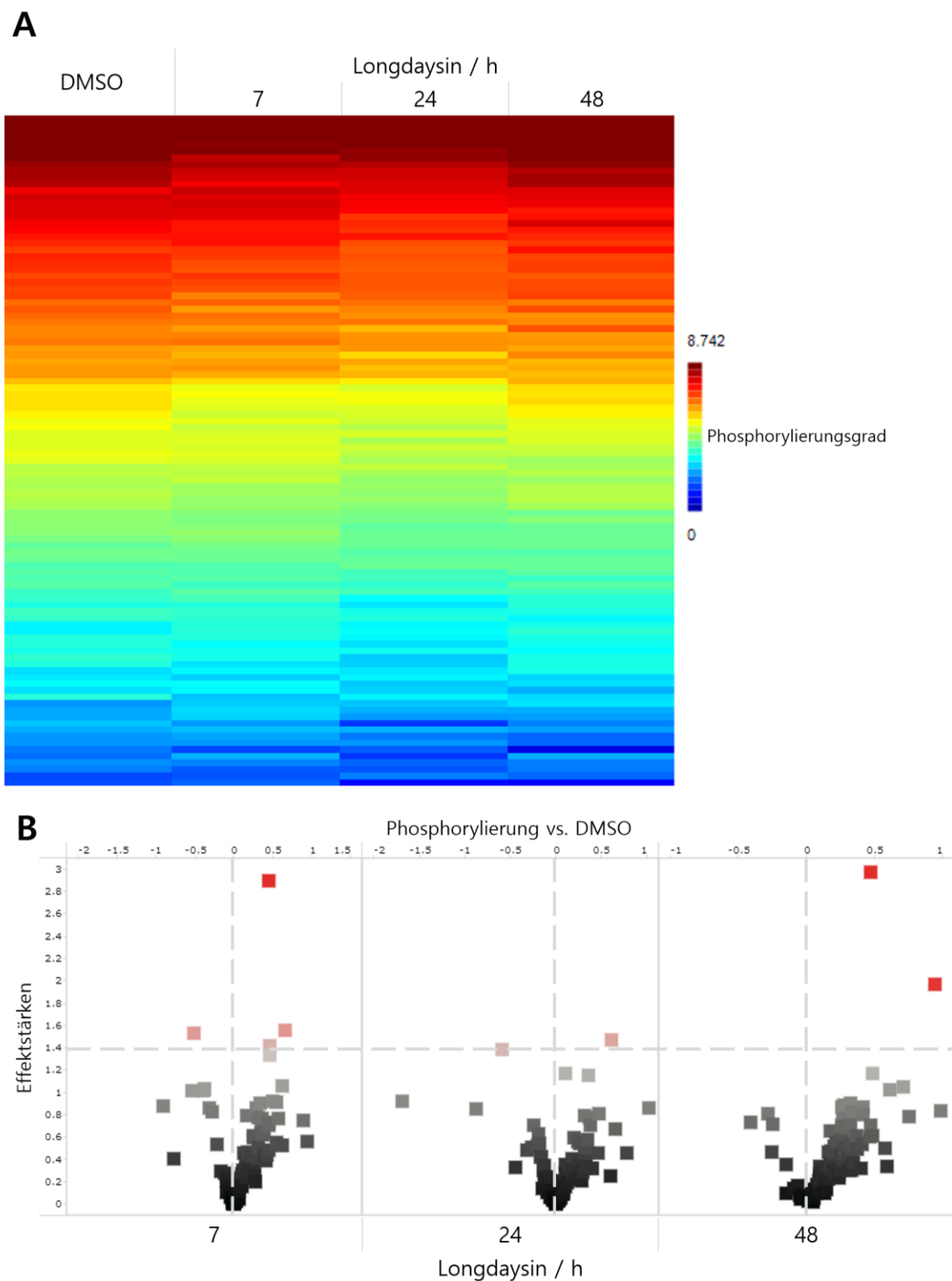


Abbildung 3.21. Screening von U2OS-Lysaten behandelt mit verschiedenen Longdaysininkubationen.

A. Phosphorylierungsprofil des U2OS-Kinoms auf STK-Chips dargestellt als *heat map*. Die Peptide wurden nach Phosphorylierungsgrad von hoch (rot) zu niedrig (blau) sortiert. Zellen wurden behandelt mit entweder 2 % DMSO (Negativkontrolle) oder 10 μ M Longdaysin über verschiedene lange Inkubationszeiten **B.** Peptidphosphorylierungen aufgetragen nach Effektstärken gegen den Phosphorylierungsgrad im Vergleich zur DMSO-Kontrolle im *volcano plot*. Effektstärken über 1.4 (entspricht logarithmiert zur Basis 2 dem Signifikanzniveau von $p = 0.05$) werden in Rot dargestellt. Negative Werte auf der Abszisse zeigen einen geringeren Phosphorylierungsgrad im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, positive Werte einen höheren Phosphorylierungsgrad. $n = 3$.

Zuletzt sollten noch bekannte CK1 δ -Inhibitoren im Zusammenhang mit dem CR untersucht werden. Auch sollte ermittelt werden, ob ein Kinase-Screening von potenten und selektiven CK1-Inhibitoren nützliche Erkenntnisse für weitere Nachforschungen hervorbringt. Als potente CK1 δ -Inhibitoren wurden Verbindung **11** (IC₅₀ = 90 nM)^[231] und **12** (IC₅₀ = 8 nM)^[232] ausgewählt, da sie bereits charakterisiert und auf der CK1 δ getestet wurden. U2OS-Zellen wurden mit den Inhibitoren für 48 h inkubiert (analog zur Zelltestung) und anschließend lysiert. Die Lysate wurden dann gemäß Kapitel 6.4.7 profiliert. U2OS-Lysat zeigte im Kinom-Profilings eine verringerte Kinaseaktivität bei Behandlung mit Verbindung **11** oder (s. Abbildung 3.22. A), wenn auch mit schwach ausgeprägten Effekten. Lesbarer visualisiert sind die Ergebnisse im *volcano plot* (s. Abbildung 3.22. B). Sowohl für Verbindung **11** als auch **12** sind die Peptide überwiegend weniger phosphoryliert im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, wenn auch nicht signifikant. Offen bleibt jedoch, ob die getesteten CK1-Inhibitoren **11** und **12** einen signifikant messbaren Einfluss auf U2OS-Lysat im *spike-in*-Experiment zeigen. Longdaysin behandelte U2OS-Zellen zeigen, wie schon in den vorherigen Kinase-Screenings, eine erhöhte Kinaseaktivität auf (überwiegend nicht signifikant). Die ermittelten Ergebnisse suggerieren, dass Longdaysin nicht als Kinaseinhibitor bezeichnet werden sollte, da Peptide überwiegend höher phosphoryliert vorliegen bzw. Kinasen aktiviert worden sind. Auch die geringen IC₅₀-Werte zwischen 5.6 und 8.8 μ M schließen eine hochaffine Inhibition von CK1 α/δ aus.

Auch nach mehreren Versuchen gelang es nicht den Einfluss von (photoschaltbaren) Chronomodulatoren mit Hilfe des Kinom-Profilings, durch z.B. *spike-in*-Inkubation oder Zellbehandlung, Variation von Substanzkonzentration oder Inkubationsdauer darzustellen. Weder die Verbindungen **9** und **10** noch die vermeintliche Positivkontrolle Longdaysin konnte signifikante Effekte erzielen. Unklar bleibt, ob keine signifikanten Effekte dargestellt werden konnten, weil die Screening-Methode nicht sensitiv genug ist oder sich die vermittelten Effekte quantitativ nicht auf das Kinom auswirken. Zur Darstellung des CR und Screening von CK1-Inhibitoren auf U2OS ist das Kinom-Profilings noch ungeeignet.

Die Photoschaltbaren Chronomodulatoren **9** und **10** weisen annehmbare photochemische Eigenschaften sowie mäßige *in-vitro*-Effekte in der biologischen Testung auf (außerhalb des Kinom-Profilings). Die bisherigen Schalter sollten daher weiter optimiert werden, um eine verbesserte biologische Wirkung zu erreichen.

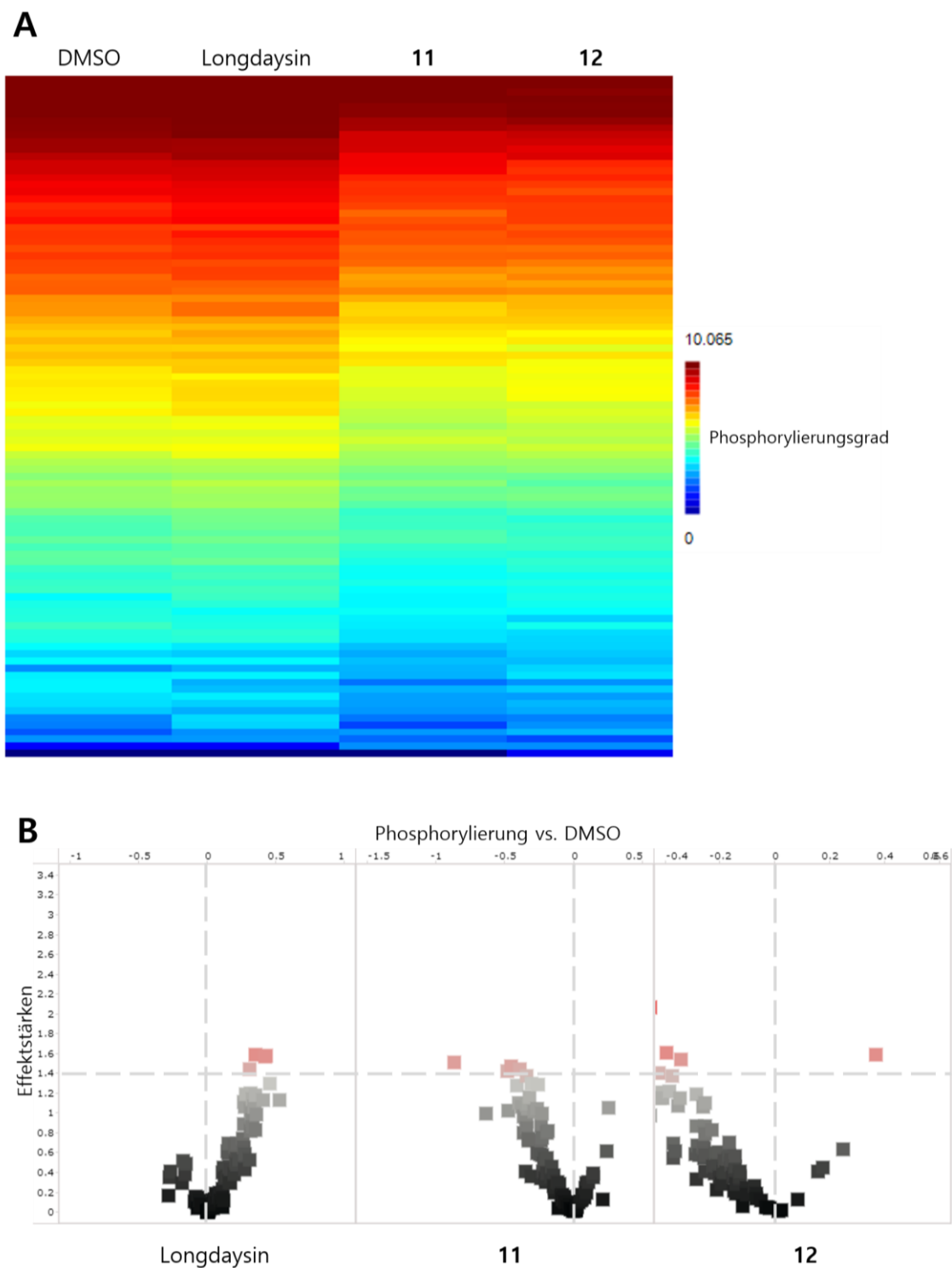


Abbildung 3.22. Vergleich von Longdaysin, Verbindung 11 und 12 im Kinom-Profilung von U2OS.

A. Phosphorylierungsprofil des U2OS-Kinoms auf STK-Chips dargestellt als *heat map*. Die Peptide wurden nach Phosphorylierungsgrad von hoch (rot) zu niedrig (blau) sortiert. Zellen wurden behandelt mit entweder 2 % DMSO (Negativkontrolle), Longdaysin, Verbindung **11** oder **12** und anschließend lysiert. **B.** Peptidphosphorylierungen aufgetragen nach Effektstärken gegen den Phosphorylierungsgrad im Vergleich zur DMSO-Kontrolle im *volcano plot*. Effektstärken über 1.4 (entspricht logarithmiert zur Basis 2 dem Signifikanzniveau von $p = 0.05$) werden in Rot dargestellt. Negative Werte auf der Abszisse zeigen einen geringeren Phosphorylierungsgrad im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, positive Werte einen höheren Phosphorylierungsgrad. Substanzkonzentration: 10 μ M, $n = 3$.

3.1.4 RET-DFG-*out*-Inhibitoren

Kinase-Kurzporträt	RET
Name	<i>rearranged during transfection</i>
Familie	Rezeptortyrosinkinase
Funktion	Zellwachstum und -differenzierung, ^[233] Entwicklung des zentralen und peripheren Nervensystems ^[234]
Therapeutische Relevanz	Morbus Hirschsprung bei Funktionsverlust, ^[234] verschiedene Krebsarten bei Überaktivierung, wie z.B. Schilddrüsenkarzinom oder CML ^[142,235–237]
Inhibition	Imatinib, Ponatinib ^[237]

Die RET-Kinase gehört wie die VEGFR2 zu den Rezeptortyrosinkinasen und ist somit abhängig von externen Stimuli wie extrazellulären Wachstumsfaktoren.^[237] Einmal aktiviert, setzt die RET eine Signaltransduktionskaskade in Gang, an deren Ende überlebenswichtige Funktionen einer menschlichen Zelle stehen wie Zellwachstum und Zelldifferenzierung.^[233] Die RET ist u.a. beteiligt an der Entwicklung des zentralen und peripheren Nervensystems.^[234] Ein erblich bedingter Defekt in der Funktionalität führt zum Morbus Hirschsprung, einer Darmerkrankung von Neugeborenen, die operativ kuriert werden muss.^[238] Nicht nur eine Funktionsminderung kann bei der RET vorliegen, sondern auch eine Überaktivierung durch beispielsweise *gain-of-function*-Mutationen.^[235,236] Eine Überregulierte RET-Kinase äußert sich in diversen Krebsarten, wie im Kinase-Kurzporträt beschrieben. Für das Szenario einer überaktiven RET-Kinase bieten sich smKIs an, wie z.B. Imatinib oder Ponatinib.^[237]

Aufgrund der Beteiligung an kritischen Prozessen wie der motoneuralen Entwicklung^[234] eignet sich die RET-Kinase ideal für Untersuchungen mit Kinaseinhibitoren bzw. Photopharmakologiekonzepten, um die therapeutische Anwendbarkeit zu erhöhen. Auch Tiermodelle wie die Entwicklung von Zebrafischlarven stehen inzwischen für die Testung von RET-Inhibitoren zur Verfügung.^[142]

Bereits 2015 veröffentlichte die Grötli-Gruppe den ersten bekannten photoschaltbaren (RET-)Kinase-Inhibitor.^[101] Der RET-Schalter wies zwar solide photochemische Eigenschaften auf, konnte jedoch in der biologischen Testung nicht überzeugen, da sich die Wirkung nur um den Faktor 3.9 durch Bestrahlung verringern ließ. Nachdem der erste RET-Schalter in der DFG-in-Konformation der Kinase bindet, soll nun ein bekannter DFG-out-Inhibitor photoschaltbar funktionalisiert werden, um die erhöhte Selektivität bzw. Affinität zur DFG-out-Konformation der RET mit den Vorteilen der Photoschaltung zu verknüpfen. In Anlehnung an den bereits zugelassenen (Multi-)Kinaseinhibitor Ponatinib wurde die Ethin-Funktion durch Xu aus der Grötli-Gruppe azologisiert (s. Abbildung 3.23, **14**).^[239] Fluor-Substituenten in *ortho*-Stellung zur Azo-Funktion haben einen elektronenstabilisierenden Effekt, wodurch eine erhöhte Halbwertszeit des metastabilen *cis*-Isomers vermutet wird (**15**).^[96,97] Das Stilbenderivat **16** wurde erzeugt, um die biologische Wirkung isolierter Isomere zu untersuchen, da beide Isomere thermodynamisch stabil sind. Es wird eine ähnliche Wirkung von Azo- und Stilben-Schalter im biologischen Kontext erwartet.

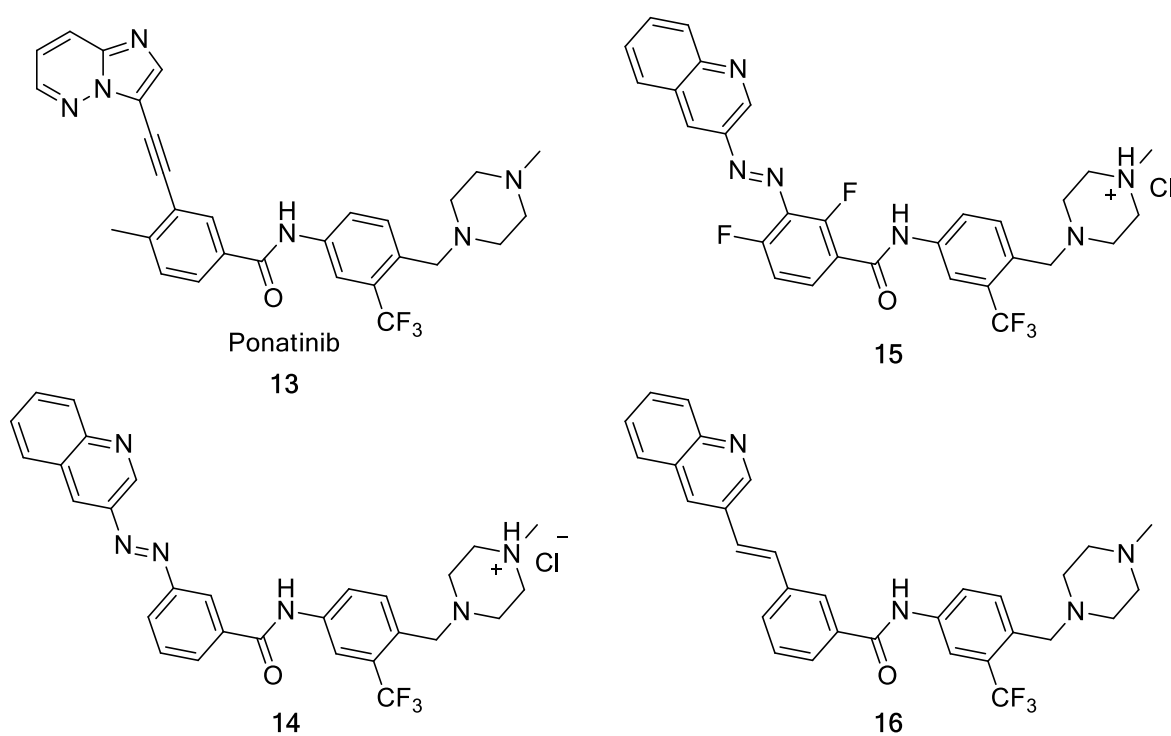


Abbildung 3.23. Getestete RET-Inhibitoren.

Photochemische Evaluierung

In der photochemischen Evaluierung überzeugen die Photoschalter **14** und **15** durch hohe Schalteffizienzen (PSS > 85 %) und eine ausreichende Stabilität (s. Tabelle 3.2). Wie zu erwarten war, hat das *cis*-**16** eine weitaus höhere thermische Stabilität (aufgrund der Stilbenbindung) im Vergleich zu den Heteroaryl-Azos **14** und **15**. Bei Betrachtung der Stabilität der beiden Heteroaryl-Azos fällt auf, dass die Rückschaltung von **15** (2.9 % Zunahme des (*E*)-Isomerenanteils) in DMSO geringer ist als die von **14** (10.8 %). Vermutlich haben die Fluor-Substituenten einen stabilisierenden Effekt auf das *cis*-Isomer, der jedoch nicht im Wässrigen zum Tragen kommt. In der Untersuchung der Rückschaltung im wässrigen Medium zeigt der Fluor-substituierte Azo **15** eine höhere Umsetzung von *cis* zu *trans* (24.0 %) als Verbindung **14** (5.8 % Rückschaltung). Die Anregung der RET-Schalter erfolgte mit einer Wellenlänge von 365 nm.

Tabelle 3.2. Photochemische Charakterisierung der photoschaltbaren Ponatinib-Derivate.^[239]

	#	λ_{exc} (nm)	PSS (<i>E/Z</i> %), DMSO	Rückschaltung (%), DMSO	Rückschaltung (%), H ₂ O
Ponatinib	13	-	-	-	-
Azo-	14	365	10/90	10.8*	5.8*
Azo-	15	365	14/86	2.9**	24.0**
Stilbenyl-	16	365	n.b.	> 3 Monate stabil	n.b.

* Zunahme des (*E*)-Isomerenanteils nach 30 h Inkubation
 ** Zunahme des (*E*)-Isomerenanteils nach 24 h Inkubation
 n.b. nicht bestimmt

Kinom-Profiling

Im Folgenden wurden die synthetisierten Azo-RET-Schalter **14** und **15** im Pamgenekinasase-Screening (s. Methoden, Kapitel 6.4.7, S. 134) profiliert. Weitere biologische Daten zum Abgleich lagen zum Zeitpunkt des Profilings noch nicht vor. Nach der Testung der Azo-Schalter und anschließender Validierung im VEGFR2-Assay wurde zuletzt der Stilben-RET-Schalter **16** profiliert. Getestet wurden die Inhibitoren auf MCF-7-Lysaten aufgrund guter RET-Expressionsraten.^[240]

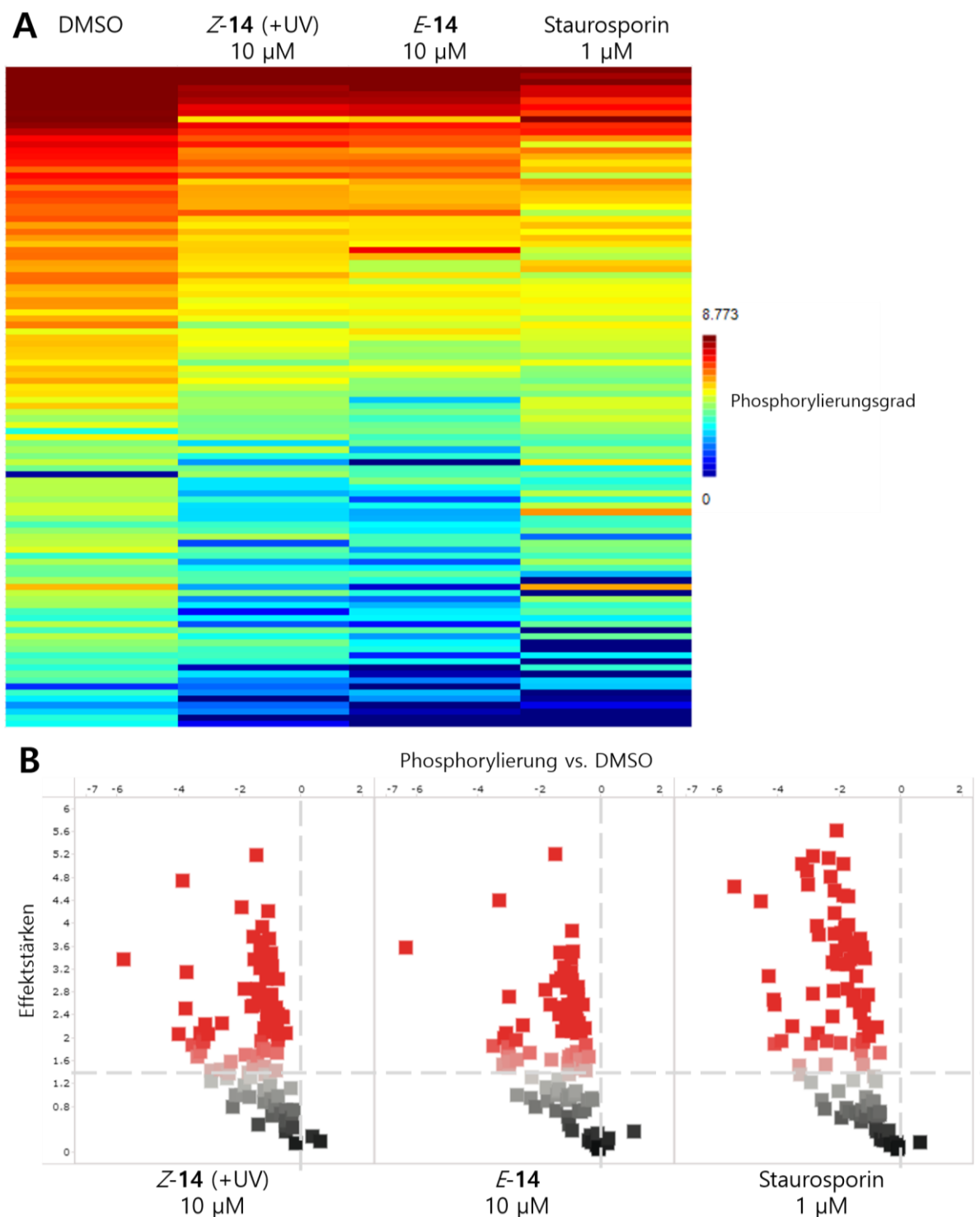


Abbildung 3.24. Kinom-Profilung von RET-Schalter 14.

A. Phosphorylierungsprofil des MCF-7-Kinoms auf PTK-Chips dargestellt als *heat map*. Die Peptide wurden nach Phosphorylierungsgrad von hoch (rot) zu niedrig (blau) sortiert. Lysate wurden behandelt mit entweder 2 % DMSO (Negativkontrolle), Staurosporin (Positivkontrolle), (Z)-14 (erhalten nach Bestrahlung von (E)-14 mit 365 nm) oder (E)-14. **B.** Peptidphosphorylierungen aufgetragen nach Effektstärken gegen den Phosphorylierungsgrad im Vergleich zur DMSO-Kontrolle im *volcano plot*. Effektstärken über 1.4 (entspricht logarithmiert zur Basis 2 dem Signifikanzniveau von $p = 0.05$) werden in Rot dargestellt. Negative Werte auf der Abszisse zeigen einen geringeren Phosphorylierungsgrad im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, positive Werte einen höheren Phosphorylierungsgrad. $n = 3$.

Die erste profilierte Verbindung **14** wies im Pamgene-Kinom-Profilung sowohl in *cis* als auch in *trans* eine ähnliche Aktivitätsminderung wie Staurosporin (Positivkontrolle) auf und setzt sich damit von der Negativkontrolle DMSO ab (s. Abbildung 3.24. A). Es konnte jedoch keine bestrahlungsabhängige Hemmung des Kinoms gezeigt werden. Trotz signifikanter Peptidinhibitionen (s. Abbildung 3.24. B) konnten in der *up-stream*-Analyse keine signifikant beeinflussten Kinasen ermittelt werden. Aufgrund einer besseren Inhibition des MCF-7-Lysats wurde im Folgenden Ponatinib anstelle von Staurosporin als Positivkontrolle verwendet.

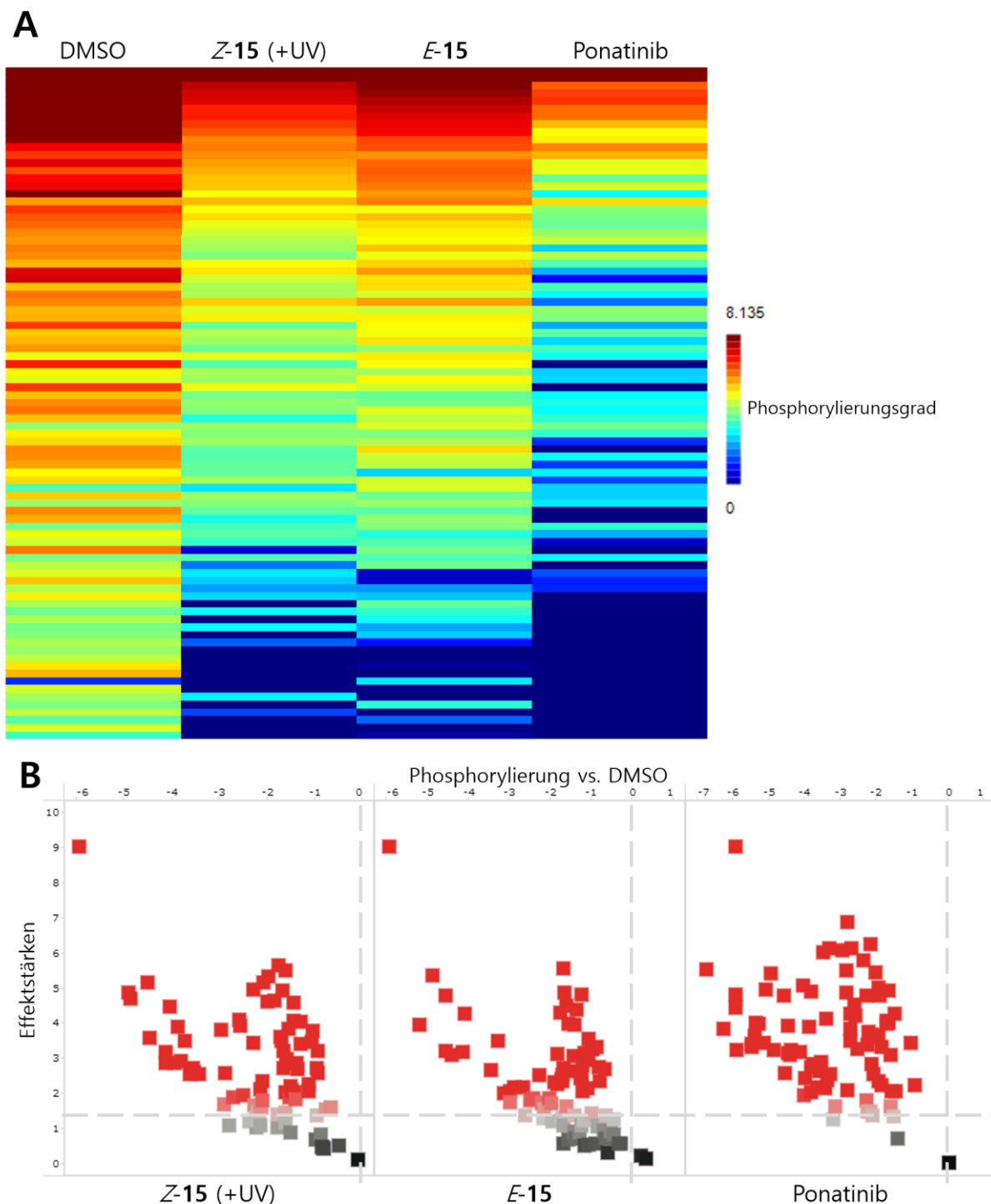


Abbildung 3.25. Kinase-Screening von Verbindung 15 auf MCF-7-Lysat.

A. Phosphorylierungsprofil des MCF-7-Kinoms auf PTK-Chips dargestellt als *heat map*. Die Peptide wurden nach Phosphorylierungsgrad von hoch (rot) zu niedrig (blau) sortiert. Lysate wurden behandelt mit entweder 2 % DMSO (Negativkontrolle), Ponatinib (Positivkontrolle), (*Z*)-**15** (erhalten nach Bestrahlung von (*E*)-**15** mit 365 nm) oder (*E*)-**15**. **B.** Peptidphosphorylierungen aufgetragen nach Effektstärken gegen den Phosphorylierungsgrad im Vergleich zur DMSO-Kontrolle im *volcano plot*. Effektstärken über 1.4 (entspricht logarithmiert zur Basis 2 dem Signifikanzniveau von $p = 0.05$) werden in Rot dargestellt. Negative Werte auf der Abszisse zeigen einen geringeren Phosphorylierungsgrad im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, positive Werte einen höheren Phosphorylierungsgrad. Substanzkonzentration: 10 μM , $n = 3$.

Als nächstes wurde Verbindung **15** (mit und ohne Bestrahlung) der DMSO- (Negativkontrolle) und Ponatinib-Behandlung (Positivkontrolle) im Profiling gegenübergestellt. Wie in der *heat map* (s. Abbildung 3.25. A) gut erkennbar, ist die Peptidphosphorylierung bei Behandlung von (*Z*)-**15** (also nach Bestrahlung mit 365 nm) geringer als bei (*E*)-**15**, dessen Kinomprofil eher dem der DMSO-Kontrolle ähnelt. Die signifikanten Peptidphosphorylierungen im *volcano plot* (s. Abbildung 3.25. B) unterstreichen ein valides Kinase-Screening mit ausreichend starken Effekten und zufriedenstellendem Signifikanzniveau ($p \leq 0.05$). Dies würde entgegen der Erwartung bedeuten, dass das *cis*-Isomer eine höhere Inhibition des MCF-7-Lysats aufweist als das *trans*-Isomer, da das Profil von (*Z*)-**15** mehr Übereinstimmungen mit dem von Ponatinib aufweist (als (*E*)-**15** mit Ponatinib). Mittels *up-stream*-Analyse können aufgrund des Abgleichs der weniger phosphorylierten Peptide und dem Abgleich der PhosphoNet-Datenbank Rückschlüsse auf möglicherweise inhibierte Kinasen gezogen werden.^[241–243] In der durchgeführten Analyse (s. Abbildung 3.26) zeigt die Behandlung mit (*Z*)-**15** eine leicht erhöhte Inhibition der RET und des EGFR. Die VEGFR2 wird 3.6-fach potenter von dem *trans*-Isomer (NKS-Wert = 18) inhibiert als von (*Z*)-**15** (NKS-Wert = 5). Eine vermutlich erhöhte Affinität von (*E*)-**15** auf VEGFR2 gegenüber (*Z*)-**15** wurde anschließend mittels VEGFR2-Kinase-assay validiert.

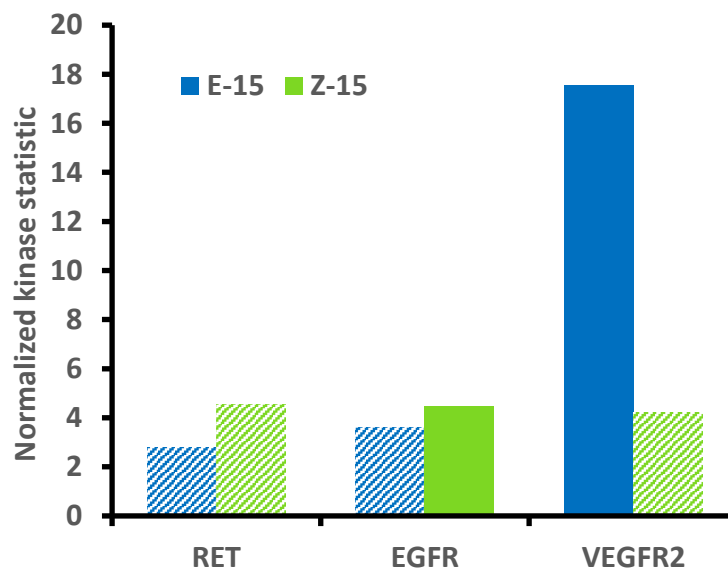


Abbildung 3.26. *Up-stream*-Analyse von Verbindung **15** im Kinase-Screening.

Der *normalized kinase statistic* (NKS-Wert) beschreibt das zur Basis 2 logarithmierte Verhältnis der Probe zur (DMSO-)Kontrolle. Ein hoher NKS-Wert bedeutet eine hohe Inhibition der Kinase im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Verglichen wurden Kinasen, die bei Behandlung eine signifikant (ausgefüllter Balken) verringerte Aktivität zur DMSO-Kontrolle aufwiesen.

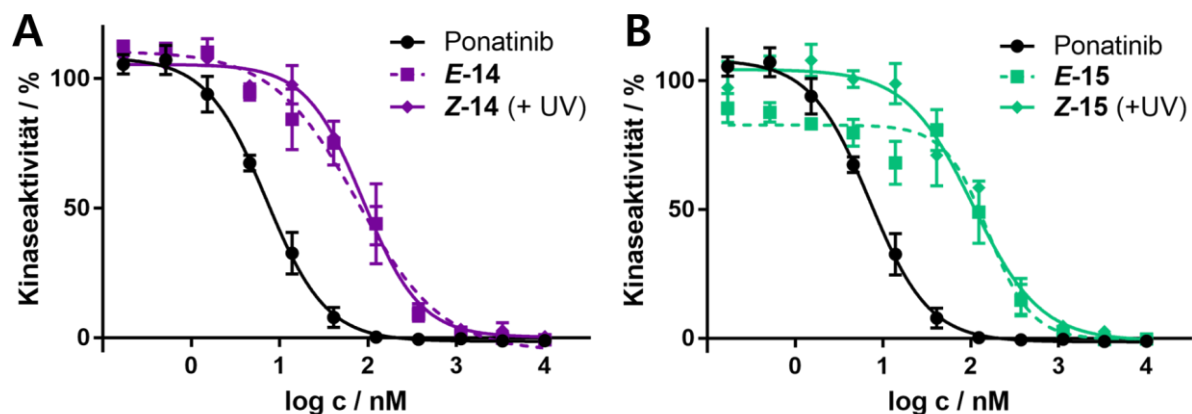


Abbildung 3.27. VEGFR2-Assay der RET-Schalter 14 und 15.

A. Dosis-Wirkungs-Kurven von Ponatinib ($IC_{50} = 7.0$ nM), (*E*)-**14** ($IC_{50} = 75.5$ nM) und (*Z*)-**14** ($IC_{50} = 88.2$ nM) im VEGFR2-Kinase Assay **B.** Dosis-Wirkungs-Kurven von Ponatinib ($IC_{50} = 7.0$ nM), (*E*)-**15** ($IC_{50} = 157.2$ nM) und (*Z*)-**15** ($IC_{50} = 105.4$ nM) im VEGFR2-Kinase Assay. Bestrahlung durchgeführt bei 365 nm, 5 min und 50 mW/well.

Der VEGFR2-Kinaseassay sollte zeigen, ob eine photoresponsive Inhibition der VEGFR2 mit den Azo-RET-Schaltern möglich ist. Weder für Verbindung **14** (s. Abbildung 3.27. A), noch für Verbindung **15** (s. Abbildung 3.27. B) konnte ein licht-induzierter Wirkunterschied zwischen *cis*- und *trans*-Isomeren ermittelt werden. Aufgrund der nicht validierbaren *up-stream*-Analyse und der erhöhten Kinominhibition von (*Z*)-**15** entgegen der Erwartung wurde eine Experimentwiederholung des Kinase-Screenings von Verbindung **15** auf MCF-7-Lysat durchgeführt.

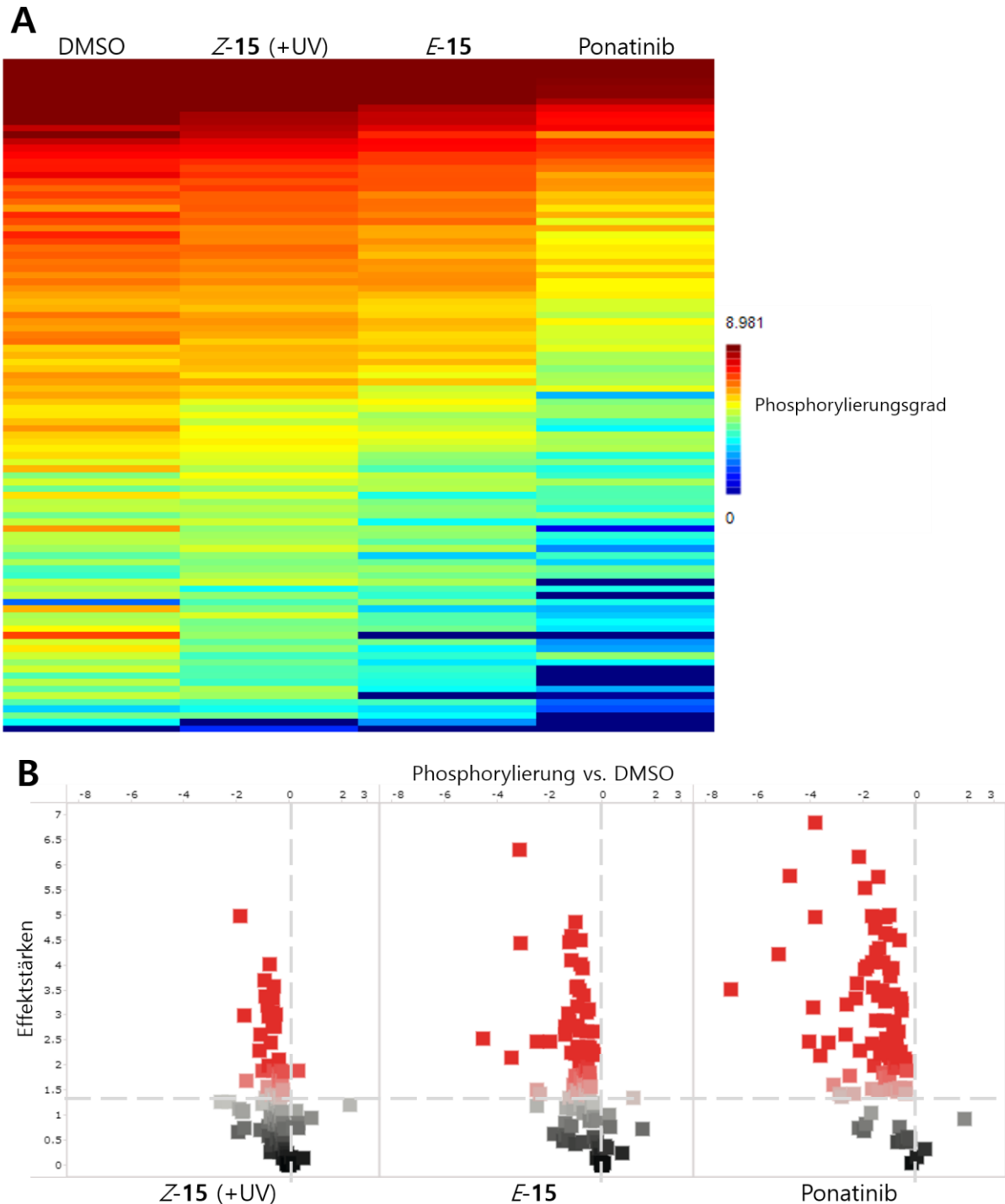


Abbildung 3.28. Wiederholtes Kinom-Profilung des RET-Schalters 15.

A. Phosphorylierungsprofil des MCF-7-Kinoms auf PTK-Chips dargestellt als *heat map*. Die Peptide wurden nach Phosphorylierungsgrad von hoch (rot) zu niedrig (blau) sortiert. Lysate wurden behandelt mit entweder 2 % DMSO (Negativkontrolle), Staurosporin (Positivkontrolle), (Z)-15 (erhalten nach Bestrahlung von (E)-15 mit 365 nm) oder (E)-15. **B.** Peptidphosphorylierungen aufgetragen nach Effektstärken gegen den Phosphorylierungsgrad im Vergleich zur DMSO-Kontrolle im *volcano plot*. Effektstärken über 1.4 (entspricht logarithmiert zur Basis 2 dem Signifikanzniveau von $p = 0.05$) werden in Rot dargestellt. Negative Werte auf der Abszisse zeigen einen geringeren Phosphorylierungsgrad im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, positive Werte einen höheren Phosphorylierungsgrad. Substanzkonzentration: 10 μM , $n = 3$.

Die Experimentwiederholung des Profiling von RET-Schalter **15** auf MCF-7-Lysat erzeugte andere Resultate als der erste Versuch. In der neuen *heat map* (s. Abbildung 3.28. A) lässt sich nun eine geringfügig erhöhte Kinomaktivität bei Lysatinkubation mit (*Z*)-**15** im Vergleich zu (*E*)-**15** beobachten. Im vorangegangenen Experiment waren die Verhältnisse der Isomere noch umgekehrt (*trans* höhere Peptidphosphorylierung als *cis*). Die Qualitätssicherung der Signale mittels *volcano plot* (s. Abbildung 3.28. B) lässt auf einen ebenfalls validen Versuchsverlauf schließen, da genügend Peptide signifikant (weniger) phosphoryliert vorlagen. Die Unterschiede im Kinomprofil werden im *box plot* (s. Abbildung 3.29) nochmals veranschaulicht. Während die Isomerenunterschiede nur gering ausfallen, sind sie doch vom ersten Experiment zur Wiederholung gegensätzlich. Im ersten Versuch zeigt das *trans*-Isomer einen höheren Phosphorylierungsgrad als das *cis*-Isomer auf. In der Wiederholung weist das *trans*-Isomer dagegen einen niedrigeren Phosphorylierungsgrad der Peptide auf. Die unterschiedlichen Phosphorylierungsgrade der DMSO-Kontrollen lassen sich durch verschiedenen Lysatchargen begründen. Der Fortschritt einer Zellkultur, Tageszeit, Zellkonfluenz oder Anzahl der Passagen können Einfluss auf die Aktivität des Kinoms der Zellen haben und somit Schwankungen im Kinom-Profiling erzeugen. Um die gemessenen widersprüchlichen Ergebnisse in Relation zu setzen, wurde als nächstes ein Profiling des Stilben-RET-Schalter **16** durchgeführt.

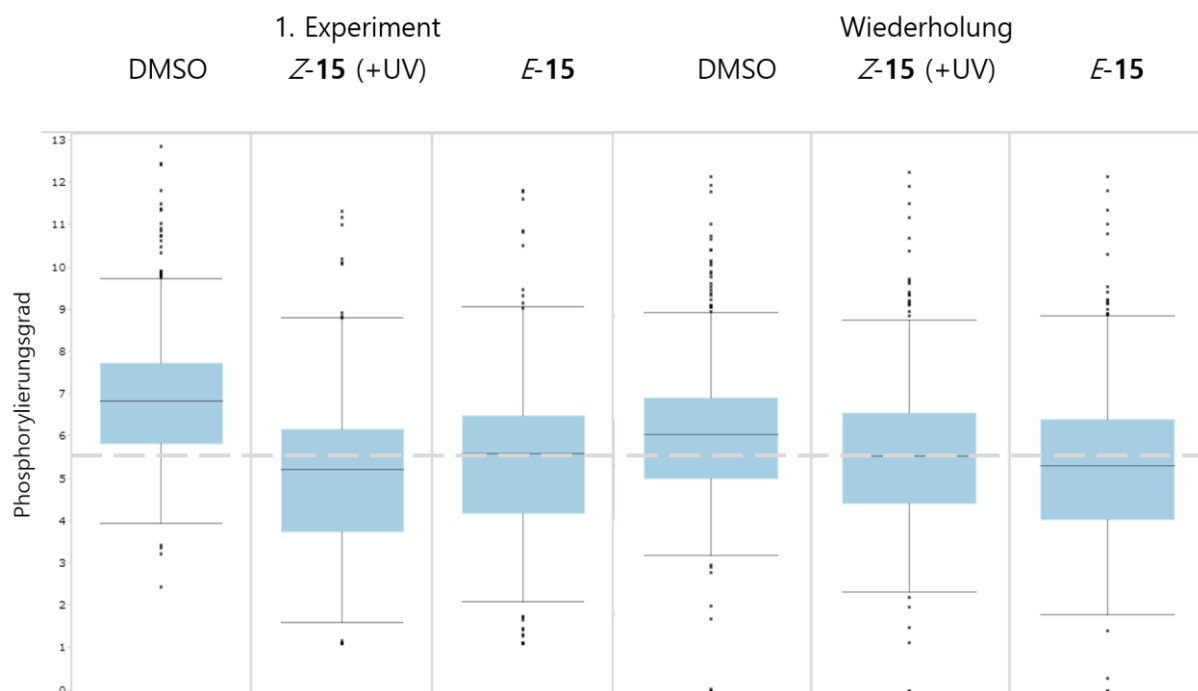


Abbildung 3.29. Vergleich der beiden Kinase Screenings des RET-Schalters 15.

Box Plot-Darstellung beider Kinase-Screenings von Verbindung **15** auf MCF-7-Lysat. Waagerechte Linie auf Höhe des Medians von (*Z*)-**15** (Wiederholung) zur besseren Vergleichbarkeit. Im ersten Experiment weist (*Z*)-**15** eine verringerte Peptidphosphorylierung auf. In der Experimentwiederholung weist dagegen (*E*)-**15** eine verringerte Peptidphosphorylierung auf. Wirkstoffkonzentration je 10 μ M, n = 3.

Wie schon in Kapitel 3.1.1 beschrieben, konnten für den Stilben-Schalter (Axitinib) zwar gute Wirkunterschiede zwischen *cis*- und *trans*-Isomer erzielt werden, jedoch keine reversible Photoschaltung in wässrigen Lösungsmitteln ohne Nebenreaktionen. Die Testung mit dem Stilben-RET-Schalter **16** sollte die Fragestellung klären, ob generell ein Isomerenunterschied von RET-Inhibitoren im Kinase-Screening messbar ist. Überraschenderweise sind die beobachteten Effekte, die bisher am stärksten gemessenen Effekte von Photoschaltern in dieser Arbeit. In der *heat map* (s. Abbildung 3.30. A) ist das Profil von (*E*)-**16** äquivalent zur Positivkontrolle Ponatinib, das Profil von (*Z*)-**16** äquivalent zur Negativkontrolle DMSO.

Dieses Ergebnis stimmt mit der Erwartung eines wirksamen RET-Inhibitors in der *trans*-Konfiguration überein. Im Kinaseassay auf der RET-Kinase konnte ein 84-facher Wirkunterschied von (*E*)-**16** zu (*Z*)-**16** ermittelt werden.^[239] Erwähnenswert ist noch an dieser Stelle, wie wichtig die Verwendung von PamChips einer Charge ist. Bei dem Profiling der Stilbenderivate wurde prozessbedingt ein Mikrochip einer anderen Charge verwendet. Die Streuung zwischen den Chargen (s. Anhang Abbildung 8.4) war so groß, dass der Chip aus der separaten Charge ausgeschlossen wurde. Letztendlich konnte jedoch ein Isomerenunterschied im Kinase-Screening auch bei zwei technischen Replikaten gezeigt werden.

Als Grund für den geringen Wirkunterschied der Azo-Isomere **14** und **15** bzw. eine nicht erbrachte Reproduzierbarkeit der Profiling-Ergebnisse kommt eine mögliche Reduktion von Azobenzolen in Anwesenheit von DTT oder Glutathion in Frage.^[103] Eine Reduktion von Verbindung **14** und **15** konnte experimentell bisher noch nicht beobachtet werden, jedoch fand die Messung lediglich bei RT statt (Reduktionen sind wahrscheinlicher bei erhöhten Temperaturen, z.B. 37 °C).^[239] Setzt man die Ergebnisse aus der vorliegenden Testung in den gesamtlichen Kontext der bisherigen Ergebnisse zu Photoschaltern auf Kinasen, so fällt auf, dass bisher kein hochpotenter Azoschalter publiziert wurde (maximal 11-facher Wirkunterschied^[50]). Mit Axitinib^[195] (43-facher Unterschied an der Kinase), dem Diarylethen von Branda^[91] (25-facher Unterschied) und dem hier gezeigten Stilben-RET-Schalter **16** (84-facher Unterschied)^[239] gibt es dagegen bereits mehrere Beispiele für potente photoresponsive Inhibitoren. Abseits von möglichen Faktoren zur Aktivitätsminderung, wie Tautomerie oder Reduktion, kommt noch eine pH-Abhängigkeit in Frage. Unter Ausbildung chinoider Systeme zeigen Azobenzole eine pH-abhängige Stabilität des *cis*-Isomers.^[244,245] Während pH-abhängige Push-Pull-Systeme schon lange als pH-Indikatoren im Einsatz sind (z.B. Methylorange), wurden pH-abhängige Azo-Photoschalter ohne chinoide Systeme erst kürzlich beschrieben.^[246] Bei direktem Vergleich der Wirksamkeit von Azo- und Stilben-Schaltern könnte eine Protonierung der Azo-Funktion den Wirkverlust erklären. Weitere Untersuchungen sind vonnöten, um den Einfluss des pH auf photoschaltbare Azoverbindungen hinsichtlich photochemischer Charakteristika und biologischer Testung (Aktivitätsminderung im Kinaseassay und der Zelltestung) zu evaluieren.

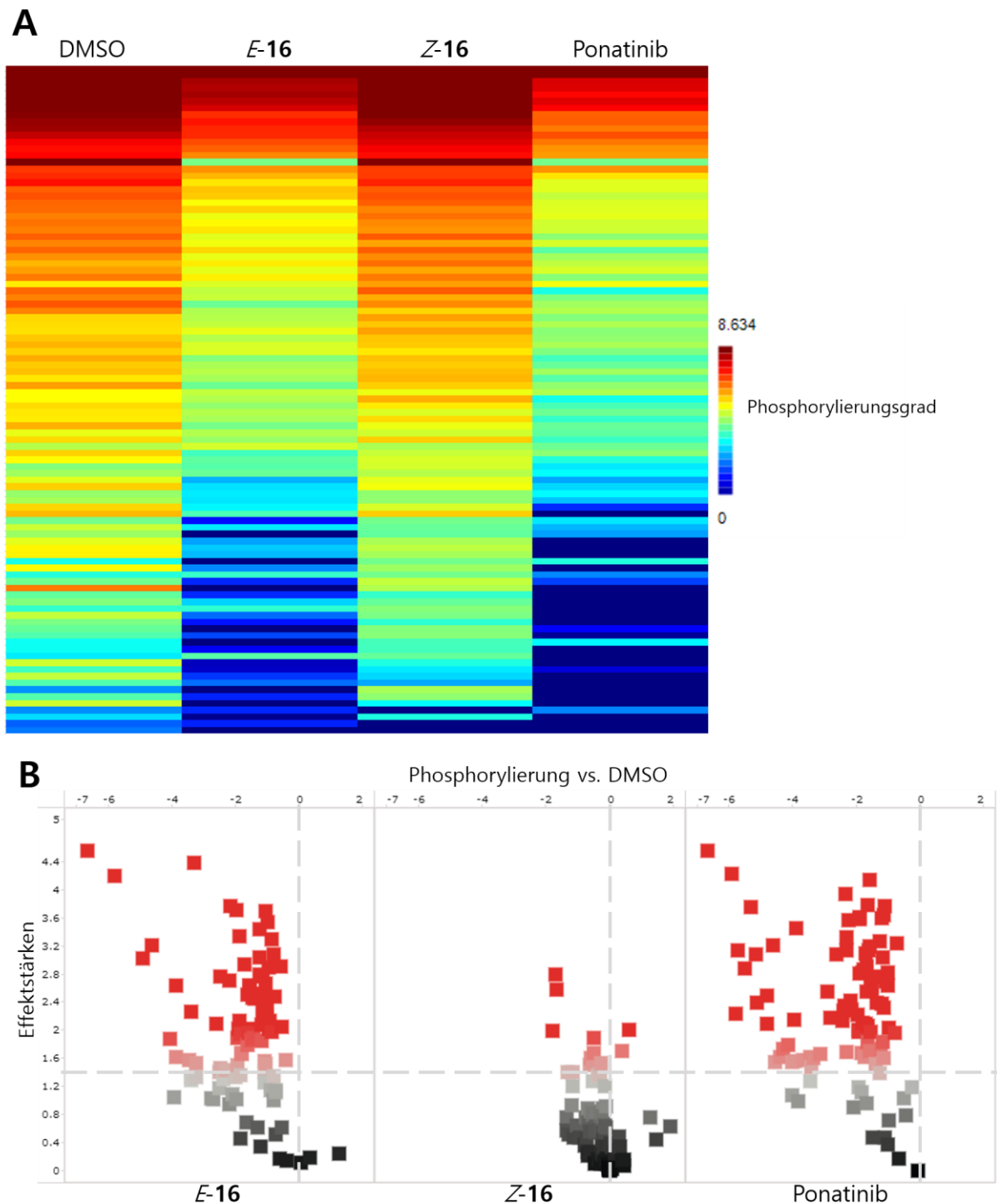


Abbildung 3.30. Kinom-Profilung des Stilben-RET-Schalters 16.

A. Phosphorylierungsprofil des MCF-7-Kinoms auf PTK-Chips dargestellt als *heat map*. Die Peptide wurden nach Phosphorylierungsgrad von hoch (rot) zu niedrig (blau) sortiert. Lysate wurden behandelt mit entweder 2 % DMSO (Negativkontrolle), Staurosporin (Positivkontrolle), (*E*-16 oder (*Z*-16. **B.** Peptidphosphorylierungen aufgetragen nach Effektstärken gegen den Phosphorylierungsgrad im Vergleich zur DMSO-Kontrolle im *volcano plot*. Effektstärken über 1.4 (entspricht logarithmiert zur Basis 2 dem Signifikanzniveau von $p = 0.05$) werden in Rot dargestellt. Negative Werte auf der Abszisse zeigen einen geringeren Phosphorylierungsgrad im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, positive Werte einen höheren Phosphorylierungsgrad. Substanzkonzentration: 10 μM , $n = 2$.

3.2 Photoabspaltbare CDK2-Inhibitoren

Kinase-Kurzporträt	CDK2/Cyclin E1
Name	Cyclinabhängige Kinase 2
Familie	Serin-/Threonin-Kinase
Funktion	Regulation von Zellzyklus und Transkriptionsregulierung, z.B. Übergang von G ₀ zu G ₁ , aber auch Proteinabbau ^[247–249]
Therapeutische Relevanz	verschiedene Krebserkrankungen wie z.B. Lungenkrebs, ^[250] Augenerkrankungen ^[251]
Inhibition	verschiedene Kandidaten, bisher ohne Zulassung ^[250,252,253]

Die Cyclinabhängigen Kinasen sind unmittelbar beteiligt an elementaren Funktionen in der Zellphysiologie, wie z.B. der Regulation des Zellzyklus oder der DNA-Transkription (s. Kinase-Kurzporträt). Wie der Name schon vermuten lässt, ist die Funktion der CDK abhängig von dem jeweiligen Cyclin.^[254,255] Störungen innerhalb dieser Funktion können entweder zum vorzeitigen Ende einer Zelle führen oder zur unkontrollierte Vermehrung (Krebs).^[256] Die therapeutischen Maßnahmen in Form von CDK-Inhibitoren gestalten sich in der Entwicklung schwierig.^[257] Ist die Aktivität eine Kinase mit einer elementaren Bedeutung und Verflechtung im Netzwerk, wie CDK2, gestört, kann das eine sich potenzierende Kettenreaktion in Form von schweren Nebenwirkungen zur Folge haben, wie z.B. starkes Erbrechen oder veränderte hämatologische Parameter. Dennoch gibt es bereits einige zugelassene CDK-Inhibitoren (CDK4 und 6), wie Palbociclib oder Abemaciclib (beide gegen Brustkrebs).^[29,253] Kinaseinhibitoren gegen andere CDKs befinden sich derzeit in Entwicklung und in klinischen Studien.^[258–260]

3.2.1 DMNB-geschützter Inhibitor

Der ausgewählte CDK2-Inhibitor AZD5438 eignet sich ideal zur Anwendung des photopharmakologischen Konzepts mittels PPGs, da der Inhibitor bereits in der präklinischen Testung ein sehr gutes Wirkprofil bewies.^[257,261,262] Die starken Nebenwirkungen in der Therapie führten zum vorzeitigen Ende der Zulassungsverfahren und bilden den Anfang unserer Entwicklung eines photoresponsiven CDK2-Inhibitors. Ein ungünstiges Nebenwirkungsprofil ist dabei kein Hindernis in der Entwicklung, sondern eine Chance, da der hochwirksame Inhibitor geschützt mit einer PPG biologisch bzw. pharmakologisch inaktiv sein soll und seine Wirkung nur bei Bestrahlung am Wirkort, in diesem Fall am Tumor, entfalten soll (s. Abbildung 3.31). Als PPG hat sich in dieser Arbeitsgruppe die 4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyl-Abgangsgruppe (DMNB) etabliert^[125,139,140,263], die den Ausgangspunkt der folgenden Untersuchungen darstellt.

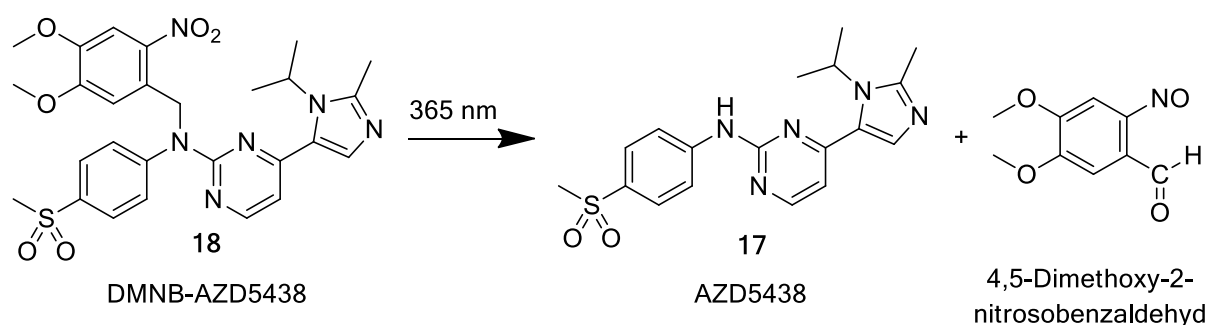


Abbildung 3.31. Photoabspaltung der Verbindung 18 bei Bestrahlung von 365 nm.

Der vorliegende CDK2-Inhibitor AZD5438 wurde von Döbber DMNB-geschützt und photochemisch charakterisiert.^[263]

Molecular modeling

Im *molecular modeling* erwies sich das sekundäre Amin von AZD5438 ideal zum Schützen mittels PPG, da über dieses Amin und dem benachbarten Imidazol die essenziellen Wasserstoffbrückenbindungen zur *hinge*-Region ausgebaut werden (s. Abbildung 3.32. A). Nach einer Kombination von AZD5438 mit der DMNB-PPG, ist der sterische Anspruch zu groß, als dass die Verbindung noch in die Bindetasche passt oder entscheidende Wasserstoffbrücken ausbilden kann (s. Abbildung 3.32. B). Eine Blockade dieser elementaren Bindung über eine DMNB-Schutzgruppe sollte einen Wirkverlust der geschützten Verbindung **18** zur Folge haben, den es im Kinaseassay zu beweisen galt.

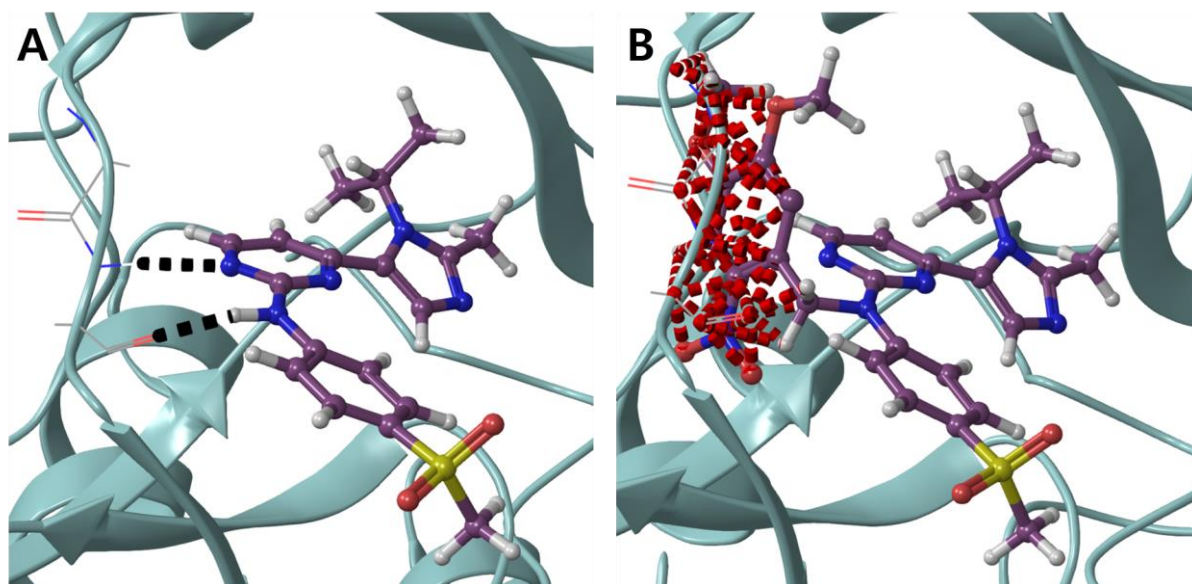


Abbildung 3.32. *Molecular modeling* von AZD5438 (17) und Verbindung 18 in der CDK2/Cyclin E1.

A. AZD5438 in der Bindetasche der CDK2 mit Wasserstoffbrückenbindungen zur *hinge*-Region, dargestellt in Schwarz. **B.** **18** in der Bindetasche von CDK2 mit sterischen Konflikten, dargestellt in Rot. PDB: 4FKO^[264]. *Modeling*-Studien durchgeführt von Döbber.^[263]

Photochemische Untersuchung

Von grundlegender Wichtigkeit für die Anwendbarkeit des genutzten *caging*-Konzepts ist die Abspaltung der PPG mit einer relativ geringen Bestrahlungsintensität, um Zell- und Gewebeschäden zu vermeiden sowie eine ausreichend schnelle Freisetzung zu erhalten. Die DMNB-Schutzgruppe erfüllt die Erwartungen durch eine vollständige Freisetzung des Inhibitors von AZD5438 nach bereits einer Minute bei einer Bestrahlung von 5 % Intensität (50 mW/well, s. Abbildung 3.33). Zusätzlich sind bei Bestrahlung keine Nebenprodukte aufgetreten, die problematisch in der biologischen Testung werden könnten. Weiterhin untersucht wurde die Bestrahlungsstabilität des Inhibitors bei 365 nm (Inhibitor ist stabil über eine Bestrahlungsdauer von 10 min) und die Stabilität der geschützten Verbindung **18** bei 37 °C in DPBS-Puffer (Verbindung ist stabil über eine Dauer von 48 Stunden).^[263]

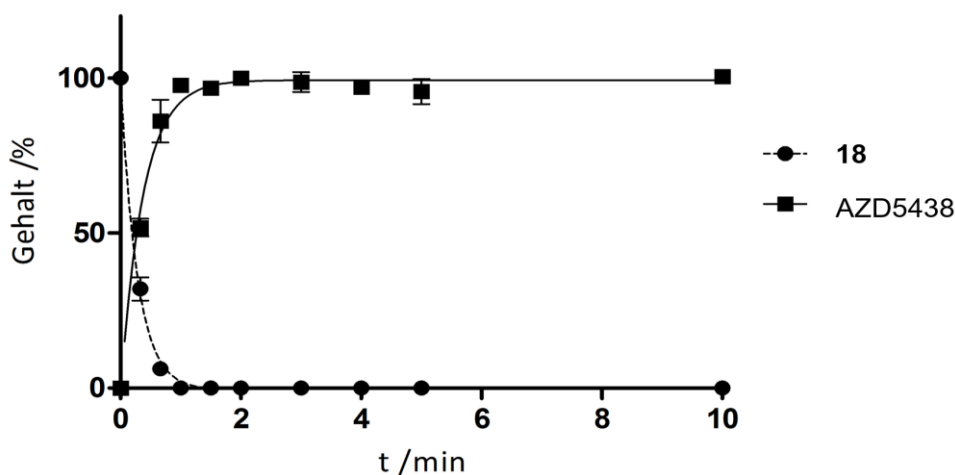


Abbildung 3.33. Photoabspaltung von 1 mM der Verbindung **18** bei Bestrahlung mit 365 nm, 50 mW/well.

Durchgeführt von Döbber, n = 2.^[263]

Biologische Testung

Nach der erfolgreichen photochemischen Charakterisierung konnte der geschützte CDK2-Inhibitor im biologischen Setting getestet werden. Die Kinaseaktivität wird über den ATP-Verbrauch der Kinasereaktion gemessen (Promega).^[265] Für die erfolgreiche Kinasereaktion der CDK2 obligat ist ein Cyclin, wie in diesem Fall Cyclin E1. Der Referenzwert ($IC_{50} = 6$ nM) von AZD5438 konnte im Biolumineszenz-Assay (ADP-Glo) repliziert werden ($IC_{50} = 2.8$ nM).^[261] Durch Bestrahlung mit 365 nm der auf der Kinase inaktiven Verbindung **18** ($IC_{50} = 4798$ nM) konnte die biologische Aktivität auf der CDK2 vollständig wiederhergestellt werden ($IC_{50} = 5.6$ nM, s. Abbildung 3.34). Durch die Kombination von AZD5438 mit DMNB konnte ein Wirkunterschied um den Faktor 850 erzielt werden (unbestrahlt vs. bestrahlt).

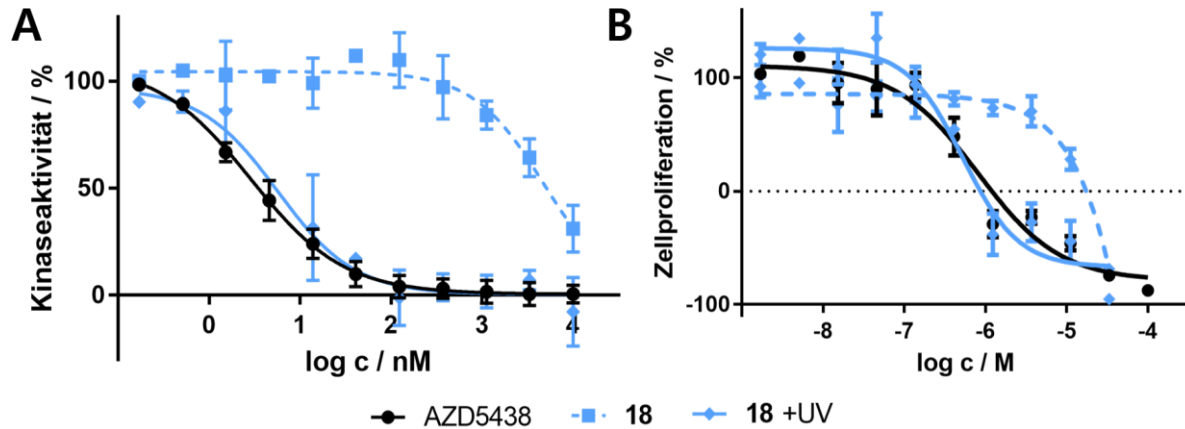


Abbildung 3.34. Biologische Testung von DMNB-AZD5438 mit und ohne Bestrahlung.

A. Kinaseassay mit der CDK2/Cyclin E1. AZD5438 ($IC_{50} = 2.8$ nM), **18** ($IC_{50} = 4798$ nM), **18** mit Bestrahlung ($IC_{50} = 5.6$ nM), ($n = 3$). **B.** Zellproliferationsassay von Panc89 mit Resazurin. AZD5438 ($IC_{50} = 0.8$ μ M), **18** ($IC_{50} = >10$ μ M), **18** mit Bestrahlung ($IC_{50} = 0.5$ μ M), ($n = 3$). Bestrahlung durchgeführt bei 365 nm, 5 min und 50 mW/well.

Da die CDK2 eine Rolle in der Onkogenese spielt^[250,266], wurden die Kandidaten auf der Pankreaskarzinomzelllinie Panc89 getestet. Im Zellproliferationsassay reduzieren die Mitochondrien der Panc89 blaues Resazurin zum violetten Resorufin.^[267] Die Zellproliferation kann dabei von 100 % über 0 % (kein Wachstum) auch bis zu -100 % (Zelltod) betragen. Verbindung **18** kann als biologisch inaktiv angesehen werden mit einem $IC_{50} >10$ μ M. Der Abfall bei hohen Konzentrationen könnte durch Ausfällung der Substanz verursacht worden sein. Nach Bestrahlung mit 365 nm wurde die Potenz um mindestens den Faktor 20 erhöht ($IC_{50} = 0.5$ μ M), vergleichbar mit der Referenz AZD5438 ($IC_{50} = 0.8$ μ M). Der tatsächliche Wirkunterschied könnte tatsächlich noch um einiges höher sein, wenn die Löslichkeit der geschützten Verbindungen keinen limitierenden Faktor darstellen würde. In beiden Fällen (Kinase- und Zellassay) konnte eine eindeutige Wirkminderung durch das Einbringen der DMNB-PPG gezeigt werden und die biologische Aktivität vom Referenzinhibitor nach Bestrahlung wiederhergestellt werden.

Nach den erfolgversprechenden Ergebnissen aus der Testung des DMNB-geschützten CDK2-Inhibitors wurde anschließend die photolabile Schutzgruppe variiert, um die Anregungswellenlänge zur Abspaltung weiter in die Nähe des bio-optischen Fensters zu verschieben.

3.2.2 BODIPY-geschützter Inhibitor

Die eingeschränkte Verwendbarkeit von BODIPY als Photoschutzgruppe in biologischen Anwendungen aufgrund von Singulett-sauerstoffproduktion

T. Rodat, M. Krebs, A. Döbber, B. Jansen, A. Steffen-Heins, K. Schwarz, C. Peifer

Photochemical & photobiological sciences: Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology 2020

DOI: 10.1039/D0PP00097C

Die Erweiterung der Wellenlänge in Richtung des bio-optischen Fensters ist eine der größten Herausforderungen in der Verwendung von Photoschutzgruppen. Typisch für organische Verbindungen steigt die Absorptionswellenlänge mit Zunahme der delokalisierten Elektronenpaare. Soll somit das Absorptionsspektrum ins bio-optische Fenster verschoben werden, wird auch zwangsläufig das Molekulargewicht erhöht, sodass wichtige physikochemische Parameter wie die Löslichkeit verschlechtert und somit wird auch die biologische Anwendbarkeit eingeschränkt werden. Das BODIPY-Molekül eignet sich gut für erste Konzeptstudien in diesem Zusammenhang, da es synthetisch relativ einfach zugänglich und vielseitig variierbar ist.

In der folgenden Publikation wurde AZD5438 mit einem *meso*-Methyl-BODIPY geschützt und sowohl photochemisch als auch biologisch charakterisiert. Die Abspaltung der Verbindung verläuft dabei in DMSO entsprechend den Erwartungen nicht jedoch im wässrigen Medium, da die geschützte Verbindung ohne Wiederfindung von Reaktionsprodukten durch Bestrahlung abgebaut wird. Allem Anschein nach wird im Wässrigen die Substanz umgesetzt, ohne den Inhibitor äquimolar freizusetzen. In der biologischen *in-vitro*-Testung zeigte die geschützte Verbindung auf der isolierten CDK2-Kinase keine Wirkung nach Bestrahlung, jedoch zeigte sich bei der *in-vitro*-Zelltestung ein überraschender Wirksamkeitssprung über die Wirkung des Referenzinhibitors AZD5438 hinaus. Nicht nur die geschützte Verbindung, sondern auch die Schutzgruppe selbst zeigte eine höchstpotente antiproliferative Wirkung. Ein Apoptoseassay deckte einen unterschiedlichen Wirkmechanismus der geschützten Verbindung bzw. Schutzgruppe unter Bestrahlung (Nekrose) im Gegensatz zum Referenzinhibitor (Apoptose) auf. Die BODIPY-Derivate zeigten im ESR-Versuch eine radikalische Aktivität, die sowohl den Abbau der Verbindung, als auch den veränderten Wirkmechanismus im Zellexperiment erklärt. Im Diphenylisobenzofuran-Assay konnte anschließend die Freisetzung von Singulett-sauerstoff unter Bestrahlung nachgewiesen werden, welche typisch für BODIPY-Derivate ist. Singulett-sauerstoff ist maßgeblich wirkverantwortlich in der photodynamischen Therapie und höchstwahrscheinlich auch in diesem Fall für den Wirksamkeitssprung über die Wirkung des Referenzinhibitors hinaus.

Aufgrund nicht-nachweisbarer Reaktionsprodukte aus der Abspaltungsreaktion, Photoabbau, Instabilität im Wässrigen sowie der biologischen Aktivität der Schutzgruppe ohne Inhibitor eignet sich das vorliegende Konzept nicht im Sinne einer Photoabspaltung. Die gewonnenen Erkenntnisse können dennoch genutzt werden, um BODIPY-Derivate weniger als Schutzgruppe zu verwenden, sondern viel mehr als *label*, um gezielt tumorspezifische Strukturen zu adressieren und anschließend bei Bestrahlung zu zerstören (s. Abbildung 3.35).

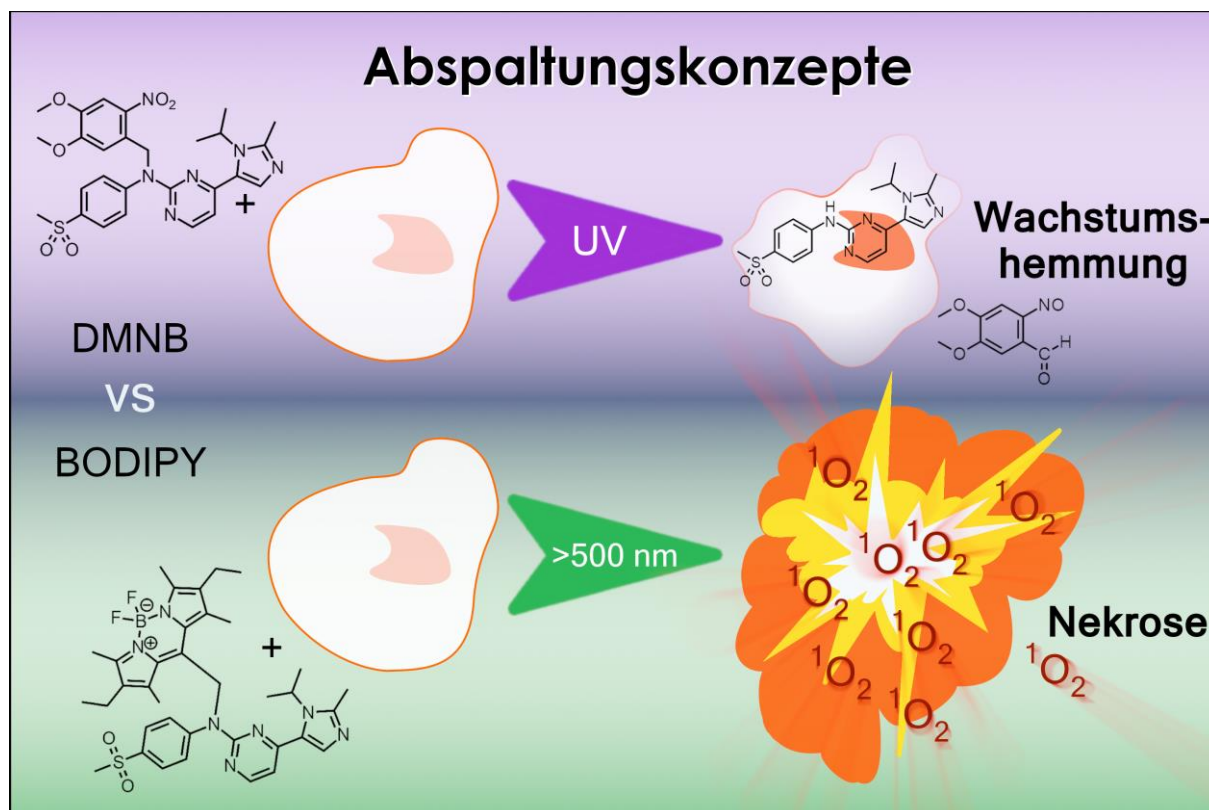


Abbildung 3.35. Abspaltungskonzept mit der DMNB-PPG im Vergleich zur BODIPY-PPG.

Oben: Der Kinaseinhibitor AZD5438, geschützt mit DMNB, wird nach Bestrahlung mit 365 nm freigesetzt und hemmt das Zellwachstum aufgrund der CDK2-Inhibition (s. Kapitel 3.2.1). **Unten:** Die Bestrahlung des BODIPY-geschützten Inhibitors mit >500 nm führt zur Nekrose durch Freisetzung von Singulett-Sauerstoff und weiterhin zum Abbau der Verbindung durch radikalische Prozesse.



Cite this: DOI: 10.1039/d0pp00097c

Restricted suitability of BODIPY for caging in biological applications based on singlet oxygen generation†

 Theo Rodat,[‡] Melanie Krebs,[‡] Alexander Döbber,^a Björn Jansen,^a Anja Steffen-Heins,^b Karin Schwarz^b and Christian Peifer^{‡*}

Recent studies report the boron-dipyrromethene (BODIPY) moiety to be interesting for caging applications in photopharmacology based on its response to irradiation with wavelengths in the biooptical window. Thus, in a model study, we investigated the *meso*-methyl-BODIPY caged CDK2 inhibitor **AZD5438** and aimed to assess the usability of BODIPY as a photoremovable protecting group in photoreversible kinase inhibitor applications. Photochemical analysis and biological characterisation *in vitro* revealed significant limitations of the BODIPY-caged inhibitor concept regarding solubility and uncaging in aqueous solution. Notably, we provide evidence for BODIPY-caged compounds generating singlet oxygen/radicals upon irradiation, followed by photodegradation of the caged compound system. Consequently, instead of caging, a non-specific induction of necrosis in cells suggests the potential usage of BODIPY derivatives for photodynamic approaches.

Received 16th March 2020,
Accepted 23rd July 2020

DOI: 10.1039/d0pp00097c

rsc.li/pps

Introduction

The boron-dipyrromethene (BODIPY) moiety is known for its applications in biological chemistry as dye agents,¹ fluorescence labels^{2,3} or photosensitisers.^{2,4–7} More recently, BODIPY has been investigated in the field of photopharmacology as a photoremovable protecting group (PPG) towards caging approaches (Table 1). The BODIPY moiety responds to wavelengths above 500 nm within the biooptical window, suggesting that it is highly suitable for the caging of inhibitors in biological chemistry. In line with this notion, Umeda *et al.*, in 2014, described a BODIPY-caged histamine that can be photo-released *via* irradiation of 500 nm.⁸ Herein, the histamine leaving group was linked to the boron atom. Further studies connected a *meso*-methylhydroxy-BODIPY either directly or *via* a carbamate linker to a leaving group.^{9,10} In 2017, Slanina *et al.* evaluated the influence of substituents attached to the *meso*-methyl-BODIPY group, but without providing further biological validation.¹¹ Moreover, Sitkowska *et al.* proposed a halide substituted BODIPY linked to the

leaving group *via* a carbamate linker with fast uncaging, but with some stability restrictions in aqueous solution.¹² Similar to this approach, two publications from Kawatani *et al.* (boron-linked leaving group) and Peterson *et al.* (red light single photon PPG) in 2018 were reported.^{13,14} In 2019, Toupin *et al.* published about the use of a photocleavable BODIPY moiety combined with singlet oxygen generation for an increased efficacy in cancer cell apoptosis (Fig. 1).¹⁵

Based on our platform for photoresponsive kinase inhibitors^{16,17} and the abovementioned findings, we became interested in investigating whether BODIPY would be suitable for caging applications using a potent protein kinase inhibitor. Protein kinases mediate key roles in nearly all important processes in eukaryote cells like proliferation, migration or apoptosis. Thus, alterations of kinase activities including gain-of-function in relevant signal transduction cascades are leading to uncontrolled cell proliferation or reduced apoptosis, most importantly in the development of cancer.^{18,19} As an example for highly critical kinases, the cyclin-dependent kinases (CDKs) are essential for a functional cell cycle and transcription regulation.^{20,21} For instance, CDK2 in complex with cyclin E1 regulates the G0 to G1 and G1 to S phase transition.²²

Thus, altering the cell cycle activity *via* kinase inhibitors targeting CDK2 may be a powerful strategy against cancer.^{23,24} However, influencing such essential functions in the cell, such as proliferation, can have a crucial impact on normal cell physiology, and may thus cause fatal side effects in patients. Therefore, actually effective CDK2 inhibitor candidates are

^aInstitute of Pharmacy, Kiel University, Gutenbergstraße 76, 24118 Kiel, Germany. E-mail: cpeifer@pharmazie.uni-kiel.de

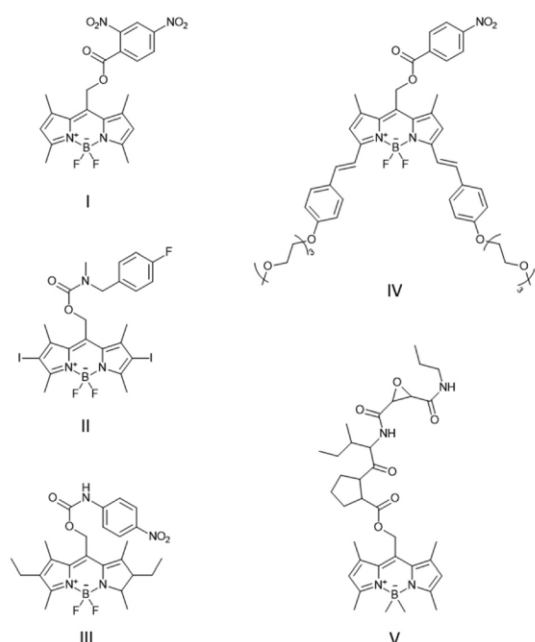
^bInstitute of Human Nutrition and Food Science, Division of Food Technology, Kiel University, Heinrich-Hecht-Platz 10, 24118 Kiel, Germany

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/d0pp00097c

‡ These authors contributed equally to this work.

Table 1 Comparison of current publications evaluating BODIPY as a PPG for caging

Reference	Leaving group	Linker	Activation wavelength	Biological evaluation
Umeda <i>et al.</i> ⁸	Histamine	Boron linked	500 nm	Ca ²⁺ rise in HeLa cells
Rubinstein <i>et al.</i> ⁹	4-Nitro-aniline	Carbamate	530/540 nm	Ca ²⁺ rise in HeLa cells
Goswami <i>et al.</i> ¹⁰	Acetic acids	Ester	500 nm	Compound integration of Drosophila S2 cells
Slanina <i>et al.</i> ¹¹	Different carbon acid analogues	Mostly ester	507 nm	None
Sitkowska <i>et al.</i> ¹²	Amine cargos	Carbamate	520–560 nm	None
Peterson <i>et al.</i> ¹³	Mostly carbon acid analogues	Mostly ester	635 nm	Compound integration of HeLa cells
Kawatani <i>et al.</i> ¹⁴	Capsaicin analogue	Boron linked	500 nm	Intracellular Ca ²⁺ dynamics in CaTM3
Toupin <i>et al.</i> ¹⁵	CTSB inhibitor	Ester	532 nm	CTSB Cell viability and flow cytometry of MDA-MB-231 and MCF-10A
Present work	AZD5438	Methylamine	519/525 nm	CDK2/cyclin E1 kinase Panc89 cell proliferation Caspase 3/7-mediated apoptosis

**Fig. 1** Selected cargos caged with BODIPY moieties at the *meso* position. (I) Goswami *et al.*¹⁰, (II) Sitkowska *et al.*¹², (III) Rubinstein *et al.*⁹, (IV) Peterson *et al.*¹³ and (V) Toupin *et al.*¹⁵

often not being developed further due to issues detected in clinical studies.²¹ Examples include the effective CDK2 inhibitor **AZD5438** of which clinical development was discontinued based on the appearance of severe side effects.^{25–27}

Regarding kinase inhibitors, several approaches of photochemistry and photopharmacology have been reported so far to overcome the lack of specificity of these biologically effective compounds.^{28–32} Besides caging,^{16,17,33–38} further applications use photoswitchable moieties including an azo-

benzene switch introduced in a BRAF_{V600E} inhibitor to manage the BRAF paradox.^{39–41} Another approach for regulating the VEGFR2 activity was achieved by using Axitinib as a photosensitive kinase inhibitor.⁴²

However, the wavelengths used to uncage PPGs are frequently not within the biooptical window.^{35,36} UV light only has a penetration range of millimetres in biological tissues and can additionally cause cellular apoptosis or DNA damage.^{43–47} Against this background, the BODIPY moiety would provide significant advantages towards caging as it responds to higher wavelengths within the biooptical window, thus allowing deeper tissue penetration of light.

In the present study, we aimed to use the actually effective clinical candidate CDK2 inhibitor **AZD5438** *in vivo* for caging with the BODIPY group. Our hypothesis was that the caged compound would be biologically inactive, but the potent activity of the leaving group **AZD5438** could be spatially and temporally controlled by irradiation with light of approximately 500 nm. This approach would probably provide a highly useful caged CDK2 inhibitor system, which could, for example, be employed as a photopharmacological tool.

Results and discussion

Design, synthesis and photochemical characterisation

To determine a suitable position at the inhibitor structure for the functionalisation with BODIPY as a PPG, we initially performed molecular modelling using the X-ray defined ligand complex of **AZD5438** in CDK2 with cyclin E1 (PDB: 4FKO). Herein, the ligand **AZD5438** forms key H-bonds *via* the cyclic guanidine moiety towards LEU83, an amino acid residue located in the hinge region of the kinase (Fig. 2). Thus, the binding mode suggested that the NH function is suitable for caging. In contrast, modelling the BODIPY-caged **AZD5438** into the active site of CDK2 revealed no plausible binding mode basically due to significant steric clashes (Fig. 2C).

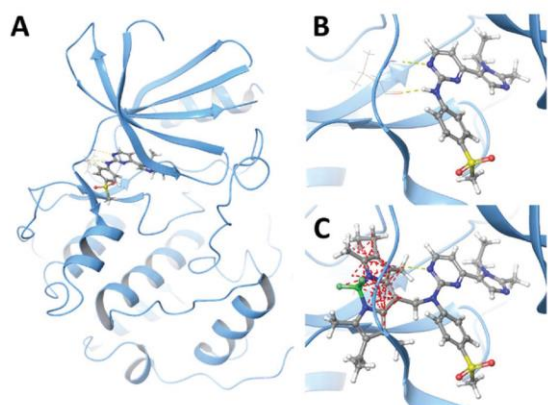
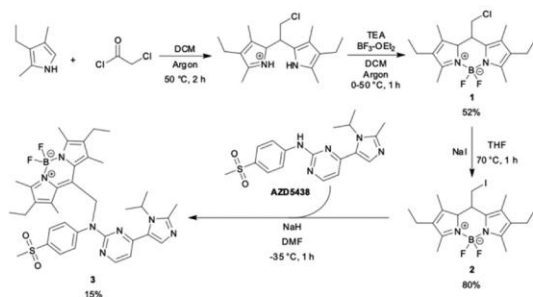


Fig. 2 Molecular modelling of CDK2 inhibitor **AZD5438** and the correspondingly caged compound **3** in the ATP binding pocket of CDK2/cyclin E1 (PDB: 4FKO). (A) Overview of CDK2 kinase structure with **AZD5438** as a ligand bound within the ATP pocket. (B) Binding mode of **AZD5438** addressing H-bonds (yellow dotted lines) to the hinge region LEU83 within the ATP pocket. (C) Superposition of BODIPY-caged **AZD5438** (compound **3**) in the CDK2 ATP binding pocket analogous to the original binding mode of the ligand. Caged compound **3** cannot bind into the binding pocket due to significant steric clashes (red dotted lines).

Furthermore, over the course of our studies towards caged kinase inhibitors, the NH moiety of the **AZD5438** pyrimidine-anilino core structure was found to be a feasible leaving group.⁴⁸

Taken together, our modelling data suggested the BODIPY caged **AZD5438** to be biologically inactive, whereas uncaging by irradiation with light of *ca.* 500 nm wavelength could cleave the BODIPY cage restoring the potent CDK2 inhibition of **AZD5438**. To prove this hypothesis, we set out to synthesise and subsequently perform the photochemical characterisation of the caged compound. Synthesis of the key BODIPY caging group **1** was achieved according to the literature^{49,50} based on a Friedel–Crafts acylation (Scheme 1).



Scheme 1 Convergent synthesis of the caged compound **3**. The BODIPY precursor **1** was synthesized by a Friedel–Crafts acylation.^{49,50} The 8-iodomethyl BODIPY **2** was achieved based on a Finkelstein reaction.⁵⁰

Herein, the starting material 3-ethyl-2,4-dimethylpyrrole as an electron-rich aromatic compound was reacted with 2-chloroacetylchloride in dry dichloromethane. After the addition of dry triethylamine and boron trifluoride diethyl etherate as Lewis acid, the reaction was left stirring for 1 h at 50 °C. A Finkelstein reaction exchanged chloride for iodide, in which sodium iodide was added to a solution of **1** in dry THF and the mixture was refluxed for 45 min to yield **2**, which was used in the following step providing a better leaving group. In turn, using a S_N reaction in dry DMF substitution of the benzylic BODIPY position by the deprotonated NH position of **AZD5438** at -35 °C yielded the key compound **3** (Scheme 1). Notably, all reactions were performed under an argon atmosphere and were protected from light.

Next, we performed photochemical characterisation in terms of the uncaging process of compound **3**. Determination of UV spectra revealed significant absorption of **3** at a wavelength of 525 nm (S_{12}^{\dagger}). Thus, we initially irradiated a 25 μ M solution of **3** in DMSO with light at this wavelength and monitored the uncaging reaction progress by HPLC analysis (Fig. 3).

The BODIPY uncaging reaction was considered to proceed *via* a cationic transition state, analogously to the coumarin caging group, although the detailed mechanism is still under discussion.^{9,12} However, in our experiments, by irradiation of **3** in aprotic DMSO solution, the decline of the BODIPY moiety in compound **3** could be clearly detected *via* adsorption at 544 nm (to avoid artefacts, a higher wavelength was chosen, see S_{13}^{\dagger}). While under the DMSO conditions, uncaging of **3** yielded **AZD5438** as determined by LC/MS analysis, and we could, in contrast, not detect a main BODIPY derivative, neither by UV adsorption nor by LC/MS analysis (S_{17}^{\dagger}). Interestingly, the situation turned out to be different under aqueous uncaging conditions and HPLC quantification could not be realised. Compared to the situation in DMSO, an aqueous solution of caged compound **3** was not quite stable even without irradiation and immediately after irradiation; the caged compound declined under the detection limit while the free inhibitor **AZD5438** was released, but not in an equimolar manner compared to **3**. Instead, irradiation resulted in a

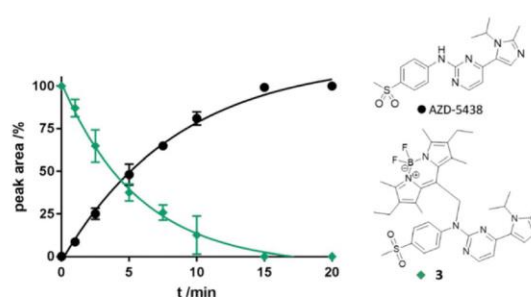


Fig. 3 Uncaging of **3** under irradiation with 525 nm in DMSO solution. 25 μ M of **3** were irradiated with 6.5 mW per cm^2 per well in a white 96-well plate. Concentrations of reaction products were quantified by HPLC. Error bars indicate SD ($N = 3$).

complex product mixture indicating nonspecific degradative reactions.

Biological evaluation

However, since **AZD5438** is partly released under irradiation with 525 nm, we decided to perform further biological *in vitro* evaluation of **3** in an enzymatic CDK2/cyclin E1 assay and CDK2-dependent Panc89 cell assay⁵¹ (Fig. 4). Accordingly to our initial hypothesis, when tested without irradiation in the enzymatic CDK2/cyclin E1 assay, caged **3** proved to be significantly less active compared to **AZD5438**. In contrast, the potent CDK2 inhibitor **AZD5438** was determined with an IC_{50} value of 1.9 nM, which is in accordance with the data from the literature²⁵ (Fig. 4A). A similar situation was detected in our cellular assay, where caged **3** was initially less active without irradiation compared to **AZD5438** (Fig. 4C).

Unexpectedly, when we irradiated the caged compound **3** within the enzymatic assay, the results showed only minor inhibition of CDK2 activity. The biological activity of the irradiated compound **3** was actually comparable to the situation without irradiation and in sharp contrast to the potency of the

native **AZD5438** (Fig. 4A). Potential explanations may again include degradation under the aqueous assay conditions (in contrast to uncaging determined in DMSO, see Fig. 3). However, to our great astonishment, the irradiation of **3** in the cellular Panc89 assay with 525 nm resulted in a very strong biological activity ($IC_{50} = 0.026 \mu\text{M}$). This efficacy is significantly higher compared to the potent CDK2 inhibitor **AZD5438** itself ($IC_{50} = 0.91 \mu\text{M}$, Fig. 4C). Thus, our results indicate a bioactive role of the BODIPY moiety upon irradiation, which is in line with further recent reports.^{6,52,53} This substantial increase in potency could not be explained with additive effects of light or temperature increase due to irradiation (control experiments, S21†). To further investigate this unexpected effect, we synthesised the proposed hydroxylated BODIPY cleavage product **5** without any inhibitor attached (Scheme 2).

Having compound **5** in hand, we next tested its biological activity in the CDK2 kinase assay (no inhibition, Fig. 4B) and cellular Panc89 proliferation assay with and without irradiation by light of 525 nm (Fig. 4D). Interestingly, the inhibition of the Panc89 cells following treatment with **5** and irradiation with light ($IC_{50} = 0.022 \mu\text{M}$) is similar to the results obtained by performing the assay using compound **3** ($IC_{50} = 0.026 \mu\text{M}$). These results suggest the irradiated BODIPY moiety and not the potent inhibitor **AZD5438** to be mainly responsible for the strong inhibition of PANC89 cell proliferation in the assay.

Since obviously the BODIPY moiety mediated a strong bioactivity in combination with the irradiation of light with 525 nm in cells, we next set out to evaluate this effect in greater detail. First, based on the fluorescence of BODIPY, we used fluorescence microscopy to detect cellular localisation of the compound (Fig. 5B). Herein, decent cellular bioavailability was proven for **5**, which is in accordance with further reports from BODIPY derivatives detecting accumulation probably in mitochondria.^{54–56}

Additionally, the induction of apoptosis has been described related to the incubation of cells with BODIPY derivatives under irradiation, suggesting the BODIPY moiety to show a potential for photodynamic approaches.^{57–59} In line with this notion, apoptosis and, respectively, necrosis have been reported to be a common cell death path for photodynamic agents.⁶⁰ Thus, we treated Panc89 cells with compounds **3**, **5**, and **AZD5438** with and without irradiation and determined apoptosis rates *via* a bioluminescence signal of caspase 3/7 activation, respectively (Fig. 5A). Herein, **AZD5438**-treated cells showed a distinct apoptosis according to the mode of action as

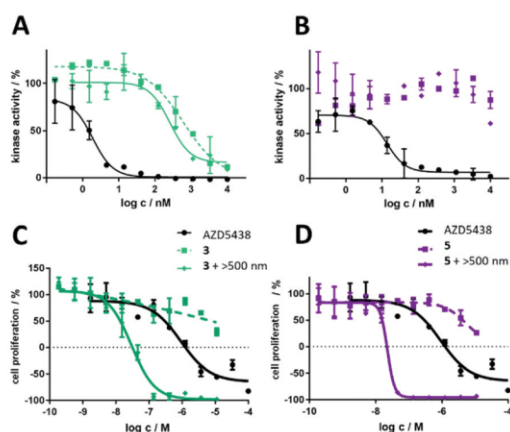
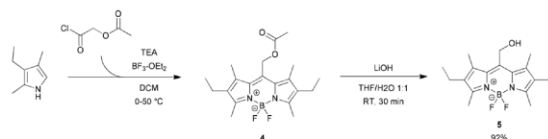


Fig. 4 Kinase assay and cell proliferation assay of CDK2 inhibitor **AZD5438**, caged **3**, and BODIPY derivative **5**. (A) Dose–response curve of **3** without irradiation (squares, green dotted line, $IC_{50} = 398 \text{ nM}$), **3** with 519 nm irradiation (rhomb, green line, $IC_{50} = 258 \text{ nM}$) and **AZD5438** as the positive control (circles, black line, $IC_{50} = 1.9 \text{ nM}$) on a CDK2/cyclin E1 system. (B) Dose–response curve of **5** without irradiation (purple squares), **5** with 519 nm irradiation (purple rhombs) and **AZD5438** as the positive control (circles, black line) on a CDK2/cyclin E1 system. Compounds **5** and **5** upon irradiation followed no dose-dependent inhibition. Kinase assay was performed with a final concentration of $10 \mu\text{M}$ ATP and irradiated for ten minutes, 6.5 mW per cm^2 per well. (C) Dose–response curve of **3** without irradiation (squares, green dotted line, $IC_{50} > 10 \mu\text{M}$), **3** with 525 nm irradiation (rhomb, green line, $IC_{50} = 0.03 \mu\text{M}$) and **AZD5438** as the positive control (circles, black line, $IC_{50} = 0.9 \mu\text{M}$) in a Panc89 cell proliferation assay. (D) Dose–response curve of **5** without irradiation (squares, purple dotted line, $IC_{50} > 10 \mu\text{M}$), **5** with 525 nm irradiation (rhomb, purple line, $IC_{50} = 0.02 \mu\text{M}$) and **AZD5438** as the positive control (circles, black line, $IC_{50} = 0.9 \mu\text{M}$) in a Panc89 cell proliferation assay. Well plate was irradiated for two minutes, 8.9 mW per cm^2 per well.



Scheme 2 Convergent synthesis of the hydroxylated BODIPY (**5**). The synthesis process was adapted from the literature.⁴⁹

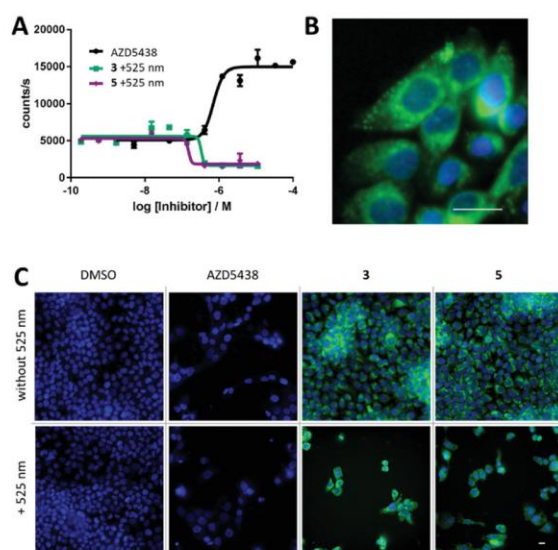


Fig. 5 Biological evaluation of **3** and **5** on Panc89 cells. (A) Caspase 3/7 assay of **3** under irradiation (squares, green line, no caspase activity) and **5** (rhombs, purple line, no caspase activity or necrosis) and **AZD5438** as the positive control (circles, black line, dose-dependent caspase activity). (B) Fluorescence microscopy of Panc89 treated with **5**. Nucleus was stained with Hoechst 33342 (blue) and compound distribution of **5** is coloured in green. Scale bar represents a length of 20 μm . (C) Fluorescence microscopy of Panc89 treated with DMSO, **AZD5438**, **3** or **5** under controlled light conditions. Scale bar at the lower right represents a total length of 70 μm .

CDK2 inhibitor. In contrast, when irradiated with light of 525 nm, Panc89 cells treated with both **3** and **5** resulted in significant necrosis. Notably, the BODIPY bearing compounds **3** and **5** do not show detectable cell death without irradiation. Images from fluorescence microscopy (Fig. 5C) further support these cell proliferation results. Cell density of Panc89 cells is highly decreased after the treatment with **3** (–93%) and **5** (–90%) under irradiation with light of 525 nm, whereas cells treated with DMSO (–14%) were seen as less light-dependent and cells treated with **AZD5438** (+1%) were seen as light-independent, respectively (S21†).

Photodegradation

Having clearly established a significant photodynamic effect of the BODIPY derivatives **3** and **5**, we aimed to elucidate the mechanistical aspects of their supposed mode of action. Further evidence showed BODIPY derivatives are also known for creating reactive oxygen species under irradiation.^{5–7,56} We could demonstrate the considerable formation of short-lived radicals by ESR using the cyclic hydroxylamine TMTH after the irradiation of compound **3** at 525 nm (6A). In another test system, both **3** and **5** decreased the absorption maximum of read-out signal from 1,3-diphenylisobenzofuran under irradiation, providing further evidence for generating singlet oxygen (Fig. 6B). In DMSO, singlet oxygen generation as well

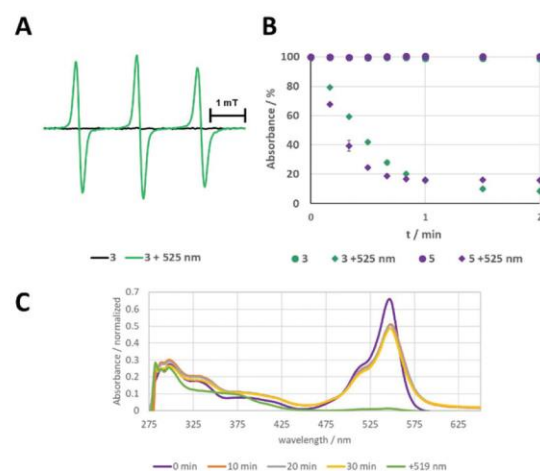


Fig. 6 Photochemical degradation of compounds **3** and **5**. (A) Electron spin resonance spectrum of the spin probe TMT in the presence of **3** without irradiation (black line) and **3** with 525 nm irradiation (green line) in DMSO, for 30 s and at an intensity of 90 mW per cm^2 per well. (B) Singlet oxygen assay. 1,3-Diphenylisobenzofuran (DPBF) and compounds were dissolved in DMSO. Absorption of DPBF decreases due to singlet oxygen production of **3** under irradiation (green rhombs) and **5** under irradiation (purple rhombs). **3** without irradiation (green circles) and **5** without irradiation (purple circles) have not generated singlet oxygen. Singlet oxygen quantum yields of **3** ($\phi = 0.38$) and **5** ($\phi = 0.74$) upon irradiation were determined with methylene blue ($\phi = 0.52$). (C) Absorption spectra of an aqueous solution of 0.1 mM **3** over time and under controlled light conditions. In aqueous solution, maxima decrease over time. Full deletion at 500 nm absorption was achieved at irradiation of 519 nm for 10 minutes, 6.5 mW per cm^2 per well.

as photouncaging appeared instantly upon irradiation with +500 nm (Fig. 6B vs. Fig. 3).

However, compounds **3** and **5** required only one minute of irradiation for a substantial singlet oxygen response in contrast to 15 minutes for uncaging under similar settings. Thus, it seemed that singlet oxygen generation appears preferably during the uncaging process of the BODIPY moiety. By correlating this effect to the observed cytotoxicity in Panc89 cells, we conclude that **3** and **5** produce singlet oxygen upon irradiation, thus severely damaging cells, thereby exceeding the effect of the potent CDK2 inhibitor **AZD5438**.^{61,62} Furthermore, the proposed radical mechanism provides a possible explanation for the observation of non-successful uncaging for **3** upon irradiation in the enzymatic assay (Fig. 3A). According to the production of short-lived radicals detected by ESR, we assume that the molecule decomposes, yielding a mixture of fragments instead of providing the actual CDK2 inhibitor **AZD5438**. Due to the solubility issues of **3**, photochemical characterisation was performed in DMSO yielding the uncaging of **3** without difficulties (Fig. 3). However, biological evaluation is performed in aqueous solutions at μM compound concentrations. Thus, we performed the respective experiments in aqueous solutions for **3** and **5**. Indeed, under irradiation, we observed strong photodegradation of the compounds yielding non-defined

product mixtures providing further evidence for the radical reaction processes (Fig. 5C, S16†).

Photodegradation has already been reported for photosensitisers, e.g. porphyrines and semi-porphyrines.⁶³ Compared to the features of these photosensitisers, solutions of compound 3 and 5 decoloured upon irradiation suggesting a type 2 photobleaching (true photobleaching) behaviour. Interestingly, not only photodegradation prevents proper photochemical characterisation in aqueous solution, but also precipitation occurring in the samples upon irradiation, probably as the result of radical polymerisation reactions. Similar to our observations, Descalzo *et al.* also reported about the aggregation and dimerisation of BODIPY moieties⁶⁴ in aqueous solutions, which are, however, indispensable for biological applications. We also observed the precipitation of 3 and 5 when water was added to a DMSO stock solution (S14†). Accordingly, aggregation of BODIPY moieties has been reported elsewhere to be responsible for precipitation when water was added.^{65,66} Furthermore, NMR experiments employing D₂O to investigate these effects in more detail proved to be non-successful again due to precipitation.

Conclusions

Uncaging of BODIPY-caged compounds is well established in organic solvents and could be also achieved in this work.^{9,11} However, with regard to biological evaluation in aqueous solutions, the situation turned out to be different. In line with recent reports from Sitkowska *et al.* and Takeda *et al.*, we observed unstable storage conditions for BODIPY derivatives.^{12,66} Although the BODIPY moiety is tempting for caging approaches based on its response to green light with a wavelength of >500 nm, we provide evidence for the BODIPY-caging concept being limited in an aqueous environment due to the production of singlet oxygen upon irradiation. Thus, the generated radical species mediate non-selective degradation effects. Accordingly, biological activities of BODIPY containing compounds 3 and 5 in a Panc89 cell proliferation assay turned out to be highly effective. In this assay, due to singlet oxygen generation, 3 as a caged compound is 30 times more active upon irradiation compared to the actually potent CDK2 inhibitor **AZD5438**. Hence, in order to avoid misinterpretation of the results for BODIPY caged compounds in biological applications, we strongly recommend investigation of BODIPY moieties case-by-case towards their potential to produce ROS upon irradiation. Whether BODIPY derivatives will be useful in photodynamic approaches remains to be seen.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

We would like to thank Martin Schütt and Dr Ulrich Girreser from the Pharmaceutical Institute, Kiel, for excellent technical

and analytical assistance. We also kindly acknowledge Till Priegann for the technical support during fluorescence microscopy. Lastly, we gratefully acknowledge the Deutsche Forschungsgesellschaft for financial support (grant PE1605_2_2).

References

- 1 M. Shah, K. Thangaraj, M.-L. Soong, L. T. Wolford, J. H. Boyer, I. R. Politzer and T. G. Pavlopoulos, *Heteroat. Chem.*, 1990, **1**(5), 389.
- 2 X.-F. Zhang, G. Q. Zhang and J. Zhu, *J. Fluoresc.*, 2019, **29**(2), 407.
- 3 R. Ziesel, G. Ulrich and A. Harriman, *New J. Chem.*, 2007, **31**(4), 496.
- 4 J. Zou, Z. Yin, K. Ding, Q. Tang, J. Li, W. Si, J. Shao, Q. Zhang, W. Huang and X. Dong, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2017, **9**(38), 32475.
- 5 A. Kamkaew, S. H. Lim, H. B. Lee, L. V. Kiew, L. Y. Chung and K. Burgess, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**(1), 77.
- 6 W. M. Gallagher, L. T. Allen, C. O'Shea, T. Kenna, M. Hall, A. Gorman, J. Killoran and D. F. O'Shea, *Br. J. Cancer*, 2005, **92**(9), 1702.
- 7 S. G. Awuah, J. Polreis, V. Biradar and Y. You, *Org. Lett.*, 2011, **13**(15), 3884.
- 8 N. Umeda, H. Takahashi, M. Kamiya, T. Ueno, T. Komatsu, T. Terai, K. Hanaoka, T. Nagano and Y. Urano, *ACS Chem. Biol.*, 2014, **9**(10), 2242.
- 9 N. Rubinstein, P. Liu, E. W. Miller and R. Weinstain, *Chem. Commun.*, 2015, **51**(29), 6369.
- 10 P. P. Goswami, A. Syed, C. L. Beck, T. R. Albright, K. M. Mahoney, R. Unash, E. A. Smith and A. H. Winter, *J. Am. Chem. Soc.*, 2015, **137**(11), 3783.
- 11 T. Slanina, P. Shrestha, E. Palao, D. Kand, J. A. Peterson, A. S. Dutton, N. Rubinstein, R. Weinstain, A. H. Winter and P. Klán, *J. Am. Chem. Soc.*, 2017, **139**(42), 15168.
- 12 K. Sitkowska, B. L. Feringa and W. Szymański, *J. Org. Chem.*, 2018, **83**(4), 1819.
- 13 J. A. Peterson, C. Wijesooriya, E. J. Gehrman, K. M. Mahoney, P. P. Goswami, T. R. Albright, A. Syed, A. S. Dutton, E. A. Smith and A. H. Winter, *J. Am. Chem. Soc.*, 2018, **140**(23), 7343.
- 14 M. Kawatani, M. Kamiya, H. Takahashi and Y. Urano, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2018, **28**, 1.
- 15 N. P. Toupin, K. Arora, P. Shrestha, J. A. Peterson, L. J. Fischer, E. Rajagurubandara, I. Podgorski, A. H. Winter and J. J. Kodanko, *ACS Chem. Biol.*, 2019, **14**(12), 2833.
- 16 R. Horbert, B. Pinchuk, P. Davies, D. Alessi and C. Peifer, *ACS Chem. Biol.*, 2015, **10**(9), 2099.
- 17 M. Zindler, B. Pinchuk, C. Renn, R. Horbert, A. Döbber and C. Peifer, *ChemMedChem*, 2015, **10**(8), 1335.
- 18 P. A. Schwartz and B. W. Murray, *Bioorg. Chem.*, 2011, **39**(5–6), 192.

- 19 I. Shchemelinin, L. Sefc and E. Necas, *Folia Biol.*, 2006, **52**(3), 81.
- 20 M. Malumbres, *Genome Biol.*, 2014, **15**(6), 122.
- 21 U. Asghar, A. K. Witkiewicz, N. C. Turner and E. S. Knudsen, *Nat Rev. Drug Discovery*, 2015, **14**(2), 130.
- 22 A. C. Dar and K. M. Shokat, *Annu. Rev. Biochem.*, 2011, **80**(1), 769.
- 23 J. Cicens and M. Valius, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 2011, **137**(10), 1409.
- 24 S. Tadesse, E. C. Caldon, W. Tilley and S. Wang, *J. Med. Chem.*, 2019, **62**(9), 4233.
- 25 K. F. Byth, A. Thomas, G. Hughes, C. Forder, A. McGregor, C. Geh, S. Oakes, C. Green, M. Walker, N. Newcombe, S. Green, J. Growcott, A. Barker and R. W. Wilkinson, *Mol. Cancer Ther.*, 2009, **8**(7), 1856.
- 26 D. R. Camidge, D. Smethurst, J. Growcott, N. C. Barrass, J. R. Foster, S. Febbraro, H. Swaisland and A. Hughes, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2007, **60**(3), 391.
- 27 P. Raghavan, V. Tumati, L. Yu, N. Chan, N. Tomimatsu, S. Burma, R. G. Bristow and D. Saha, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2012, **84**, e507–e514.
- 28 C. Brieke, F. Rohrbach, A. Gottschalk, G. Mayer and A. Heckel, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2012, **51**(34), 8446.
- 29 M. M. Lerch, M. J. Hansen, G. M. van Dam, W. Szymanski and B. L. Feringa, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2016, **55**(37), 10978.
- 30 A. Specht, F. Bolze, Z. Omran, J.-F. Nicoud and M. Goeldner, *HFSP J.*, 2009, **3**(4), 255.
- 31 Y. Yang, J. Mu and B. Xing, *WIREs Nanomed. Nanobiotechnol.*, 2017, **9**(2), e1408.
- 32 H. Yu, J. Li, D. Wu, Z. Qiu and Y. Zhang, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**(2), 464.
- 33 C. L. Fleming, M. Grötl and J. Andréasson, *ChemPhotoChem*, 2019, **45**, 4900.
- 34 A. Deiters, *ChemBioChem*, 2010, **11**(1), 47.
- 35 M. J. Hansen, W. A. Velema, M. M. Lerch, W. Szymanski and B. L. Feringa, *Chem. Soc. Rev.*, 2015, **44**(11), 3358.
- 36 P. Klán, T. Šolomek, C. G. Bochet, A. Blanc, R. Givens, M. Rubina, V. Popik, A. Kostikov and J. Wirz, *Chem. Rev.*, 2013, **113**(1), 119.
- 37 A. Patchornik, B. Amit and R. B. Woodward, *J. Am. Chem. Soc.*, 1970, **92**(21), 6333.
- 38 A. P. Pelliccioli and J. Wirz, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2002, **1**(7), 441.
- 39 W. Szymański, J. M. Beierle, H. A. V. Kistemaker, W. A. Velema and B. L. Feringa, *Chem. Rev.*, 2013, **113**(8), 6114.
- 40 K. Hüll, J. Morstein and D. Trauner, *Chem. Rev.*, 2018, **118**(21), 10710.
- 41 M. W. H. Hoorens, M. E. Ourailidou, T. Rodat, P. E. van der Wouden, P. Kobauri, M. Kriegs, C. Peifer, B. L. Feringa, F. J. Dekker and W. Szymanski, *Eur. J. Med. Chem.*, 2019, **179**, 133.
- 42 D. Schmidt, T. Rodat, L. Heintze, J. Weber, R. Horbert, U. Girreser, T. Raeker, L. Bußmann, M. Kriegs, B. Hartke and C. Peifer, *ChemMedChem*, 2018, **13**(22), 2415.
- 43 W. F. Cheong, S. A. Prah and A. J. Welch, *IEEE J. Quantum Electron.*, 1990, **26**(12), 2166.
- 44 Y. Matsumura and H. N. Ananthaswamy, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2004, **195**(3), 298.
- 45 S. Mallidi, S. Anbil, A.-L. Bulin, G. Obaid, M. Ichikawa and T. Hasan, *Theranostics*, 2016, **6**(13), 2458.
- 46 M. Gentile, *Nucleic Acids Res.*, 2003, **31**(16), 4779.
- 47 J. D'Orazio, S. Jarrett, A. Amaro-Ortiz and T. Scott, *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, **14**(6), 12222.
- 48 S. Kirschner, A. Döbber, M. Krebs, C. Witt, B. Hartke and C. Peifer, *ChemPhotoChem*, 2020, **4**(8), 638.
- 49 F. Amat-Guerri, M. Liras, M. L. Carrascoso and R. Sastre, *Photochem. Photobiol.*, 2003, **77**(6), 577.
- 50 T. Kálai and K. Hideg, *Tetrahedron*, 2006, **62**(44), 10352.
- 51 D. Subramaniam, G. Periyasamy, S. Ponnuram, D. Chakrabarti, A. Sugumar, M. Padigar, S. J. Weir, A. Balakrishnan, S. Sharma and S. Anant, *Mol. Cancer Ther.*, 2012, **11**(7), 1598.
- 52 N. Adarsh, R. R. Avirah and D. Ramaiah, *Org. Lett.*, 2010, **12**(24), 5720.
- 53 T. Yogo, Y. Urano, Y. Ishitsuka, F. Maniwa and T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**(35), 12162.
- 54 E. Ucar, O. Seven, D. Lee, G. Kim, J. Yoon and E. U. Akkaya, *ChemPhotoChem*, 2019, **27**, 1604053.
- 55 O. Karaman, T. Almamnadov, M. Emre Gedik, G. Gunaydin, S. Kolemen and G. Gunbas, *ChemMedChem*, 2019, **14**(22), 1879.
- 56 M. Gorbe, A. M. Costero, F. Sancenón, R. Martínez-Mañez, R. Ballesteros-Cillero, L. E. Ochando, K. Chulvi, R. Gotor and S. Gil, *Dyes Pigm.*, 2019, **160**, 198.
- 57 N. Adarsh, P. S. S. Babu, R. R. Avirah, M. Viji, S. A. Nair and D. Ramaiah, *J. Mater. Chem. B*, 2019, **7**(14), 2372.
- 58 C. Wang and Y. Qian, *Org. Biomol. Chem.*, 2019, **17**(34), 8001.
- 59 R. Priefer, J. R. Griffiths, J. N. Ludwig, G. Skelhorne-Gross and R. S. Greene, *Lett. Org. Chem.*, 2011, **8**(6), 368.
- 60 P. Mroz, A. Yaroslavsky, G. B. Kharkwal and M. R. Hamblin, *Cancers*, 2011, **3**(2), 2516.
- 61 Z. Zhou, J. Song, L. Nie and X. Chen, *Chem. Soc. Rev.*, 2016, **45**(23), 6597.
- 62 M. L. Agazzi, M. B. Ballatore, A. M. Durantini, E. N. Durantini and A. C. Tomé, *J. Photochem. Photobiol., C*, 2019, **40**, 21.
- 63 R. Bonnett and G. Martínez, *Tetrahedron*, 2001, **57**(47), 9513.
- 64 A. B. Descalzo, P. Ashokkumar, Z. Shen and K. Rurack, *ChemPhotoChem*, 2019, **4**(2), 120.
- 65 S. Choi, J. Bouffard and Y. Kim, *Chem. Sci.*, 2014, **5**(2), 751.
- 66 A. Takeda, T. Komatsu, H. Nomura, M. Naka, N. Matsuki, Y. Ikegaya, T. Terai, T. Ueno, K. Hanaoka, T. Nagano and Y. Urano, *ChemBioChem*, 2016, **17**(13), 1233.

4 Zusammenfassung

Auf den ersten Blick ergeben sich innovative Anwendungsszenarien im Einsatz von photoaktivierbaren Arzneistoffen: eine orts- und zeitabhängige Wirkung je nachdem, wo bestrahlt wird, ein verringertes Nebenwirkungspotenzial und bessere Verträglichkeit bei gleichzeitig erhöhter Dosisgabe oder auch eine bessere Umweltverträglichkeit.

Diesen vielfältigen Chancen photopharmakologischer Konzepte, wie Schaltung, Abspaltung oder Photosensibilisatoren, stehen auf den zweiten Blick jedoch eine Reihe von Grenzen gegenüber, die es immer noch zu überwinden gilt. Der aktuelle Forschungsfortschritt jedes einzelnen Konzepts steht dabei im klaren Zusammenhang mit der Historie, also dem Zeitraum der bestehenden wissenschaftlichen Anstrengungen, photoresponsive Moleküle therapeutisch zu nutzen. Während die photodynamische Therapie auf eine relativ lange Historie zurückblicken kann, mit bereits zugelassenen Wirkstoffen wie Porfimer, steckt die Photoschaltung noch in der Grundlagenforschung und zielt auf erste erfolgreiche Tierversuche ab. Die Photoabspaltung ordnet sich zeitlich und im Stand der Entwicklung zwischen den beiden eben genannten Konzepten ein. Hier gibt es bereits erfolgreiche Studien im Tiermodell und die Bestrebungen gehen in Richtung (prä-)klinischer Studien. Als Beispiel sei hier die Ausgründung von Lumento Therapeutics (Groningen, NL) von Feringa genannt. Obwohl die Feringa-Gruppe einen deutlichen Forschungsschwerpunkt auf Photoschaltung legt, werden bei Lumento photoabspaltbare Wirkstoffe präklinisch getestet und auf ihrem Weg durch mögliche Zulassungsverfahren begleitet.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen nicht nur Rückschlüsse auf die Weiterentwicklung von photopharmakologischen Konzepten zu. Es wurde auch das Kinom-Profil von Pamgene näher untersucht und auf eine mögliche Anwendung in der Testung von Kinaseinhibitoren geprüft.

4.1 Photopharmakologische Konzepte

Im Rahmen dieser Arbeit wurden anfänglich die Konzepte von Photoschaltung und Photoabspaltung untersucht, wobei zuletzt im Projekt BODIPY (Kapitel 3.2.2) auch photodynamische Effekte erforscht wurden.

Im ersten Teil wurden zwei Stilben-Derivate, mehrere Azobenzol-Derivate und ein Diazocin-Derivat (im Kinom Profiling) biologisch untersucht. Die Stilben-Schalter waren dabei stets den Azo-Verbindungen in der biologischen Wirksamkeit überlegen, wogegen sich die Azo-Verbindungen durch eine reversible Schaltung in wässrigen Medien auszeichnen. Bisher ist es nur den Diazocin-Kandidaten gelungen, beide Eigenschaften zu vereinen, jedoch mit Einschränkungen in der Löslichkeit in wässrigen Medien.

Der bereits zugelassene Kinaseinhibitor Axitinib wies vielversprechende photochemische Eigenschaften in organischen Lösungsmitteln auf.^[195] In wässrigen Medien kann zwar keine reversible Schaltung ohne Nebenreaktionen mehr ablaufen, dennoch kann das Konzept zur Photoaktivierung genutzt werden. Die [2+2]-Cycloaddition tritt lediglich bei der Bestrahlung von *trans*-Axitinib auf. Wird hingegen das unwirksame *cis*-Axitinib mit 385 nm bestrahlt, kann die vollständige biologische Wirkung von Axitinib sowohl auf der Kinase als auch im Zellassay wiederhergestellt werden. Ermöglicht wurden die biologischen Ergebnisse nur durch den Einsatz unter kontrollierten Lichtbedingungen. Während die Energie aus dem Laborlicht nicht reicht, um PPGs abzuspalten, führt Umgebungslicht schnell zu einer Isomerisierung der Photoschalter, sodass nur noch das PSS getestet wird. Mit den ausgebauten Laborbedingungen konnten nun weitere licht-sensitive Photoschalter biologisch getestet werden.

Die Azologisierung der Stilbenfunktion im Falle des Azo-Axitinibs (**2**) erwies sich nicht als erfolgreich, da eine Azo-Hydrazone-Tautomerie zu einer sehr schnellen Rückisomerisierung führte, die eine biologische Testung verhindert.^[203] Die daraus resultierenden Azobenzol-Derivate **3** und **4** wiesen zwar eine grundlegende VEGFR2-Inhibition auf, allerdings unter Verlust der Schaltwirkung, da die Azo-Funktion außerhalb der Bindetasche frei isomerisieren kann ohne die Bindung des Inhibitors zu beeinflussen.^[204] Mithilfe der verbrückten Azobenzole (Diazocine **5**, **6** und **7**) wurde der photoschaltbare Axitinib-Abkömmling konzeptionell aufgewertet. Während bei Azo-Derivaten **2**, **3** und **4** die thermodynamisch stabile Konfiguration (*trans*) auch die wirksame Form ist, verhält es sich bei den Diazocinen **5**, **6** und **7** umgekehrt, das wirksame *trans*-Isomer ist metastabil.^[204] Die Stilbene (also Axitinib) stellen eine Ausnahme dar, da beide Isomere genügend stabil sind und nicht in einem therapeutisch relevanten Zeitraum rückisomerisieren. Mit überzeugenden photochemischen Eigenschaften, wie einer höheren Anregungswellenlänge, ausreichender Halbwertszeit und gutem PSS, zeigten die Diazocin-Derivate mit Verbindung **5** die bisher größten Wirkunterschiede (40-fach, *cis* zu

trans) auf einer Proteinkinase.^[205] Die überzeugenden Testdaten auf VEGFR2 konnten jedoch nicht im selben Maße im Kinom-Profilings repliziert werden. Die dort gemessenen Effekte waren relativ schwach, sodass auch keine *off-target*-Identifizierung erfolgte. Immerhin: Basierend auf den ermittelten Wirkunterschieden auf der isolierten Kinase stellen die Axitinib-Diazocine die bisher effektivsten Kinaseschalter dar. Begrenzt wird die Anwendbarkeit der Diazocine durch eine schlechte Wasserlöslichkeit, was nachteilig für bevorstehende Zelltestungen oder Tierversuche ist. Auch muss noch geklärt werden, ob uneingeschränkt (Hetero-)Diazocine verwendet werden können oder ob irreversible Reaktionen mit Proteinen zu einer verminderten Wirksamkeit führen können. Da die Diazocine eine noch „junge“ Möglichkeit darstellen, Inhibitoren zu funktionalisieren, sind weitere Forschungsbemühungen vonnöten.

Mithilfe eines photoschaltbaren BRAF^{FV600E}-Inhibitors (s. S. 58) sollte ein nützliches Werkzeug entwickelt werden, um der Problematik des BRAF-Paradoxons gerecht zu werden. Es konnte ein photoschaltbarer BRAF-Inhibitor synthetisiert werden, der einen bis zu 11-fachen Wirkunterschied zwischen den Isomeren an der Kinase aufwies – der bisher höchste publizierte Wirkunterschied eines Azo-funktionalisierten Kinaseinhibitors.^[50] Jedoch ließ sich die Photoschaltbarkeit nicht im Zellmaßstab replizieren. Untersuchungen des Zellkinoms deckten die mangelnde Zytotoxizität auf, wonach eine breite paradoxe Kinomaktivierung über *kinome reprogramming* zum Zellwachstum führt.

Weiterhin wurden in dieser Arbeit Modulatoren und Photoschalter des circadianen Rhythmus (CR) untersucht. Charakteristisch für diese Wirkstoffkandidaten ist eine messbare Verlängerung des CR im Zellmaßstab. Wie bereits in Kapitel 3.1.3 diskutiert, bleibt jedoch ein direkter Zusammenhang der Verlängerung des CR mit einer CK1-Inhibition umstritten. Die getesteten Azobenzol-Schalter **9** und **10** waren in der Lage im geringen Umfang den circadianen Rhythmus je nach Bestrahlung zu verlängern. Ein möglicher Mechanismus auf Kinaseebene konnte mit dem Kinom-Profilings jedoch nicht gezeigt werden. Nicht nur waren die Isomerenunterschiede im Screening nicht messbar, auch die Positivkontrolle erbrachte keine zufriedenstellenden Signale.

Die Testung von RET-Inhibitoren erfolgte auf der Weiterentwicklung bereits bekannter RET-Schalter.^[101] Trotz guter photochemischer Eigenschaften wie einem sehr guten PSS, konnten die Azo-Schalter im Kinom-Profilings nicht die erwarteten Effekte zeigen. Demgegenüber stehen die sehr deutlichen Isomerenunterschiede im Kinase-Screening von der Testung der Stilben-Derivate. So gelang es, einen erheblichen Wirkunterschied von *cis*- (unwirksam) zu *trans*-Stilben (wirksam) zu zeigen. Der zeitgleich absolvierte RET-Kinaseassay verifiziert die Resultate aus dem Profiling mit einem 84-fachen Wirkunterschied beider Isomere.

Der Vorteil von Photoschaltern gegenüber der Abspaltung von PPGs liegt auf der Hand, da bei der einmaligen Aktivierung von inaktiven Schaltern keine Nebenprodukte entstehen (im Gegensatz zu den freigesetzten PPGs, die bei der Photoabspaltung entstehen). Jedoch werden auch weiterhin große Forschungsaufwendungen in die Entwicklung photoschaltbarer Arzneistoffe fließen müssen. Angesichts dieser recht jungen Disziplin innerhalb der Photopharmakologie gibt es hingegen noch genug Potenzial für den Erfolg bis hin zur Zulassung eines photoschaltbaren Arzneimittels, da immer mehr Arbeitsgruppen im Feld der Photoschaltung publizieren.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden photoaktivierbare CDK-Inhibitoren durch Abspaltung einer PPG im biologischen Kontext untersucht. Für den DMNB-geschützten CDK2-Inhibitor **18** konnte eine 850-fache Wirkverstärkung unter Bestrahlung mit 365 nm beobachtet werden. Im Zellassay fiel der Wirkunterschied mit dem Faktor von 20 nicht so deutlich aus, jedoch nur, weil die geschützte Verbindung in der höchsten Konzentration ausgefallen ist. Unter der Annahme einer komplett inaktiven Verbindung limitiert die begrenzte Löslichkeit den tatsächlichen Wirkunterschied, der wahrscheinlich noch über einem Faktor von 20 liegt. Im Gegensatz zu den Photoschaltern liegt in diesem Beispiel ein beachtliches therapeutisches Potenzial, da ein photoaktiverbarer CDK2-Inhibitor bei gezielter Bestrahlung erhebliche Tumorschäden erzielen kann und nicht bestrahlt im restlichen Verteilungsvolumen im Körper inaktiv vorliegen würde. Im Gegensatz zu den Photoschaltern wird bei der Abspaltung der PPG ein zusätzlicher Metabolit freigesetzt, den es zu charakterisieren gilt.

Ein DMNB-geschützter Kinaseinhibitor wird bei 365 nm aktiviert. Um an therapeutischer Relevanz zu gewinnen, sollte die Anregungswellenlänge im bio-optischen Fenster (600–900 nm) liegen oder zumindest rotverschoben sein (~500 nm). Mithilfe eines BODIPY-geschützten CDK2-Inhibitors sollte dieser Ansatz verfolgt werden.^[165] Nach erfolgreicher Synthese und Charakterisierung zeigte der geschützte Inhibitor hingegen keine Aktivität auf der Kinase nach einer Aktivierung von ca. 530 nm. Im anschließenden Zellproliferationsassay dagegen wurde die Wirkung vom Referenzinhibitor um den Faktor 45 übertroffen. In photochemischen Untersuchungen mittels ESR und DPBF-Assay konnte gezeigt werden, dass entstehender Singulett-Sauerstoff nicht nur für die überzeugende biologische Resonanz eine Rolle spielt, sondern auch bei dem Photoabbau der geschützten Verbindung entscheidend ist. In der Regel wurde bei der Testung BODIPY-geschützter Wirkstoffe auf einen Nachweis zur Erzeugung von Singulett-Sauerstoff verzichtet, obwohl über die photodynamische Aktivität von BODIPY-Derivaten bereits ausführlich berichtet wurde.^[151,152,268,269] Diese Arbeit bringt die einzelnen, bereits bekannten Informationen (Photoabspaltung und photodynamische Wirkung) in Einklang, damit in Zukunft eine umfassende Untersuchung bei neuartigen BODIPY-geschützten Inhibitoren erfolgen kann.

4.2 Kinom-Profiling in der Entwicklung von Kinaseinhibitoren

In dieser Arbeit wurden nicht nur photopharmakologische Konzepte weiterentwickelt und biologisch evaluiert, sondern auch die Anwendung eines Kinom-Profiling von Pamgene in der Entwicklung von (photoschaltbaren) Kinaseinhibitoren bearbeitet. Die Vorteile des Kinom-Profiling sind zum einen eine parallele Aktivitätsmessung aller Kinasen aus der ausgesuchten Zelllinie bzw. Gewebe. Im Gegensatz zum Kinaseassay birgt das Kinom-Profiling damit einen enormen Vorteil im Arbeitsaufwand. Auch ließen sich zum anderen *off targets* oder ein *kinome reprogramming* einfacher identifizieren (s. Abbildung 2.2, S. 27). Im Zusammenhang mit photoschaltbaren Kandidaten, die zuweilen eine kurze Halbwertszeit aufweisen, ist ein nicht zu vernachlässigender Faktor die kurze Testdauer von zwei Stunden. Im Falle von verkürzten Halbwertszeiten kann im Kinom-Profiling noch eine Wirkung gemessen werden – anders als im Kinase Assay (ca. 4 h) oder Zellproliferationsassay (ca. 48 h). Dies und eine Messung unter kontrollierten Lichtbedingungen (sofern es die Räumlichkeiten zulassen) macht das Pamgene-Kinom-Profiling zu einer sinnvollen Ergänzung innerhalb biologischer Testmethoden bei Kinaseinhibitoren. Zu beachten ist, dass die richtige Auswahl der zu testenden Zelllinie und den damit variierenden Kinaseexpressionsraten einen erheblichen Einfluss auf die Testergebnisse haben wird. Zum Nachteil wird der Methode der relativ hohe Kostenaufwand pro Messung (ca. 900 €) im Vergleich zur Testung an einer isolierten Kinase (ca. 50 €). Auch die limitierte Aussagekraft einer Messung grenzt die Anwendung des Profiling weiter ein, da stets Validierungen der Messergebnisse durch z.B. Western Blots erfolgen müssen.

In der Testung von zugelassenen Kinaseinhibitoren (Axitinib, Ponatinib) konnte der Einfluss auf das Kinom gut dargestellt werden und es wurde eine genügende Wiederfindung der Hauptziele (z.B. VEGFR2, RET) erbracht. Zum Teil mussten die Daten aus der *up-stream*-Analyse noch prozessiert werden und mit zusätzlicher Software verarbeitet werden (GeneGo), damit der Einfluss auf das Kinase-Netzwerk verdeutlicht werden konnte. Die Methode eignet sich auch dafür, den Einfluss von abgeleiteten Wirkstoffen auf das Kinom mit der Stammverbindung zu vergleichen und zu analysieren (z.B. Axitinib und Analoga oder Ponatinib und Analoga).

Im Falle der BRAF^{V600E}-Schalter konnte mithilfe des Kinase-Screenings der Grund für eine mangelnde Zytotoxizität ermittelt werden: unter Substanzinkubation erfolgte ein *kinome reprogramming*, wodurch die Kinasen überaktiviert wurden. Leider konnte keine spezifische Analyse eventueller *escape pathways* analysiert werden, da die gemessenen Effekte zu schwach für eine *up-stream*-Analyse waren.

Für die Chronomodulatoren konnte kein erfolgreiches Profiling etabliert werden. Zum einen waren wahrscheinlich die biologischen Effekte der Photoschalter mit und ohne Bestrahlung zu schwach dafür. Zum anderen war es grundsätzlich nicht möglich, eine Aktivität von Chronomodulatoren wie Longdaysin im Profiling zu etablieren. Auch eine Zellinkubation mit spezifischen CK1δ-Inhibitoren erbrachte keine signifikanten Phosphorylierungsänderungen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle.

Die Testung der RET-Schalter zeigte, dass eine starke Kinomhemmung mit klaren Kinomprofilen korreliert. Im Umkehrschluss dazu kann das Profiling nicht genutzt werden, um schwache Wirkungen am *main target* besser darzustellen. Das Kinase Screening könnte jedoch dazu genutzt werden, um andere Kinasen als Wirkstoffziele auszuschließen.

Auf Grundlage der ermittelten Resultate ist das Kinom-Profil in der Aussagekraft zwischen der Kinase-Testung und der Zell-Testung einzuordnen. Zwar ergänzt das Profiling den Ablauf innerhalb der biologischen Testung sinnvoll, kann jedoch (noch) nicht für sich alleine stehen.

5 Ausblick

Auf Grundlage der gewonnenen Erkenntnisse in dieser Arbeit eröffnen sich verschiedene wissenschaftliche Wege, welche weiterverfolgt werden können. Die Photoschalter zeigen zum Teil bereits gute Wirkunterschiede zwischen den Isomeren, jedoch sind ebenso vereinzelt konzeptionelle Schwächen zu kritisieren. Konzeptionell gut aufgestellte Schalter sollten in der thermodynamisch stabilen Form (Azos: *trans*-Isomer, Diazocine: *cis*-Isomer) unwirksam sein und nach Konfigurationsänderung unter Bestrahlung zur wirksamen Konfiguration schalten. Je nach Orientierung in der Bindetasche sollten die Wirkstoffe mit dem passenden Photoschalter funktionalisiert werden, damit dieses Konzept erhalten bleibt. Zeitgleich sollten auch die photochemischen Charakteristika, wie z.B. Anregungswellenlänge, Halbwertszeit oder PSS, verbessert werden. Am Beispiel von bereits photoschaltbaren RET-Schaltern soll eine zweite Azo-Funktion eingebracht werden, um die Selektivität weiter zu erhöhen. Mithilfe der zweiten Azo-Funktion soll es nur der *trans/trans*-Konfiguration ermöglicht werden, in der RET-Kinase zu binden und somit einen größeren Wirkunterschied in der biologischen Testung zu erzielen (s. Abbildung 5.1).

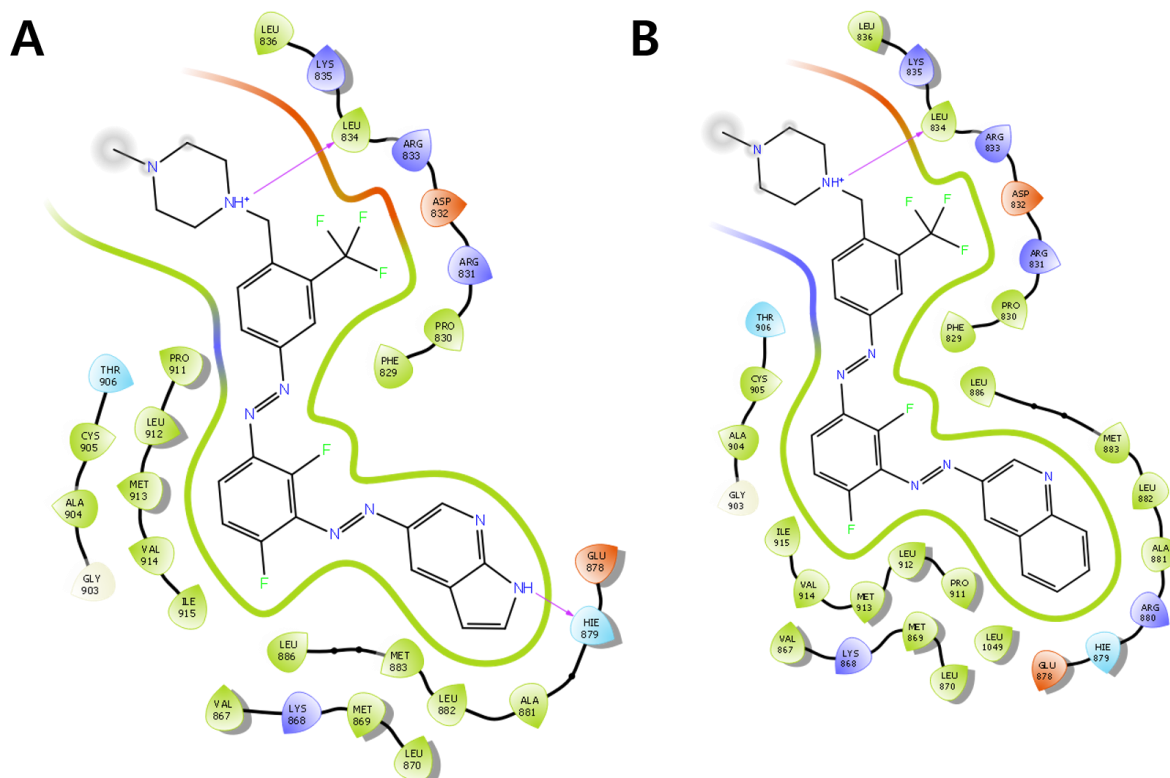


Abbildung 5.1. Liganden-Interaktionsdiagramm von Di-Azos in der RET-Bindetasche.

A. Di-Azo auf Basis von Ponatinib in der RET-Bindetasche. **B.** Di-Azo auf Basis von Verbindung **15** in der RET-Bindetasche. Wasserstoffbrückenbindungen wurden mit Pfeilen (magenta) gekennzeichnet. Diagramme erstellt von Peifer.

In dieser Arbeit konnte anhand der RET-Schalter gezeigt werden, dass die Stilben-Variante eine deutlich erhöhte Wirksamkeit des thermodynamisch stabilen *trans*-Isomers im Gegensatz zu den Azo-Schaltern aufweist. Zukünftige Untersuchungen werden die Gründe für dieses Phänomen beleuchten müssen. Einerseits könnten Reduktionen im Versuchsmedium aufgrund der zugesetzten Reagenzien stattfinden, andererseits ist der Einfluss des pH auf die Stabilität der Isomere noch nicht abschließend geklärt.

Außerdem werden photoresponsive Konzepte nicht nur zur Wirksteigerung von Arzneistoffen angewandt, sondern auch um (später einmal) die Umweltbelastung durch Arzneistoffe zu senken.^[205,208] Über die Grenzen der pharmazeutischen Verwendung hinaus wird in der Zukunft wahrscheinlich auch eine Nutzung der Photoschalter als Energiespeicher^[270] (ebenso wie Photosensibilisatoren^[271]) oder zur komplexen Verschlüsselung^[272] möglich sein.

Für photoabspaltbare PPGs ist weniger der Wirksamkeitsnachweis wegweisend, sondern viel mehr die Anwendbarkeit auf das Tiermodell sowie Metabolismus- bzw. Toxizitätsstudien der Verbindungen. Die DMNB-PPG zeigt in dieser Arbeit (und darüber hinaus^[125,139,140]) überzeugende Resultate sowohl im Kinaseassay als auch im Zellproliferationsassay. Die logische Konsequenz ist die Testung von DMNB-geschützten Kinaseinhibitoren im Mausmodell.

Da die BODIPY-Gruppe als Photoschutzgruppe für (Kinase-)Inhibitoren eher ungeeignet ist, sollte sie nicht als PPG, sondern als Label von zielgerichteten Strukturen verwendet werden. BODIPY-Derivate neigen von selbst bereits dazu, sich in mitochondriale Membranen einzulagern. Eine Kombination mit weiteren zielgerichteten Strukturen (z.B. Peptide und *nano-bodies*, auch Einzeldomänenantikörper genannt) ist daher naheliegend. Hierfür könnten sich PROTACs (s. Kapitel 1.3.1.2), ein selektive Kinaseinhibitoren (z.B. Erlotinib gegen EGFR) oder cyclische RGD-Peptide wie c(RGDIV) eignen, siehe Abbildung 5.2. Der Vorteil von cyclischen RGD-Proteinen ist eine gute Gängigkeit durch die Blut-Hirn-Schranke.^[273-276] So ließe sich z.B. die Therapie des Glioblastoms mithilfe eines photodynamisch aktiven RGD-gekoppelten BODIPY-Derivats und eines LED-Implantats verbessern.^[277]

Mittlerweile gibt es auch andere Ansätze für photopharmakologische Konzepte im Allgemeinen, als nur die Anregungswellenlänge zu erhöhen. Der Einsatz von Photoschaltern und Schutzgruppen, die oftmals bei 365 nm angeregt werden, ist limitiert durch die hohe Absorption im biologischen Gewebe. Ein Phänomen aus der Kernenergie bearbeitet in der Peifer-Gruppe bearbeitet von Döbber^[263] und Krebs^[278] ließe sich möglicherweise nutzen, um auch diese photoresponsiven Wirkstoffe in tieferliegenden Gewebsschichten zu aktivieren. Mit Hilfe der sogenannten, Tscherenkow-Strahlung^[279-281] könnte bei ausreichender Aktivierung diese genutzt werden, um photoresponsive Wirkstoffe zu aktivieren. Erfahrungsgemäß sollten sich

bei therapeutischer Nutzung dieses Effekts Photoschalter einfacher aktivieren lassen als Verbindungen geschützt mit photoresponsiven Schutzgruppen, da die benötigte Energie geringer ist.^[139,195] Auch eine Kombination photopharmakologisch genutzter Verbindungen und pharmazeutischer Technologien wie Nanopartikel sollte in Betracht gezogen werden, um Bioverfügbarkeit und Akkumulation im Zielgewebe zu erhöhen.^[149,183–185,282–285]

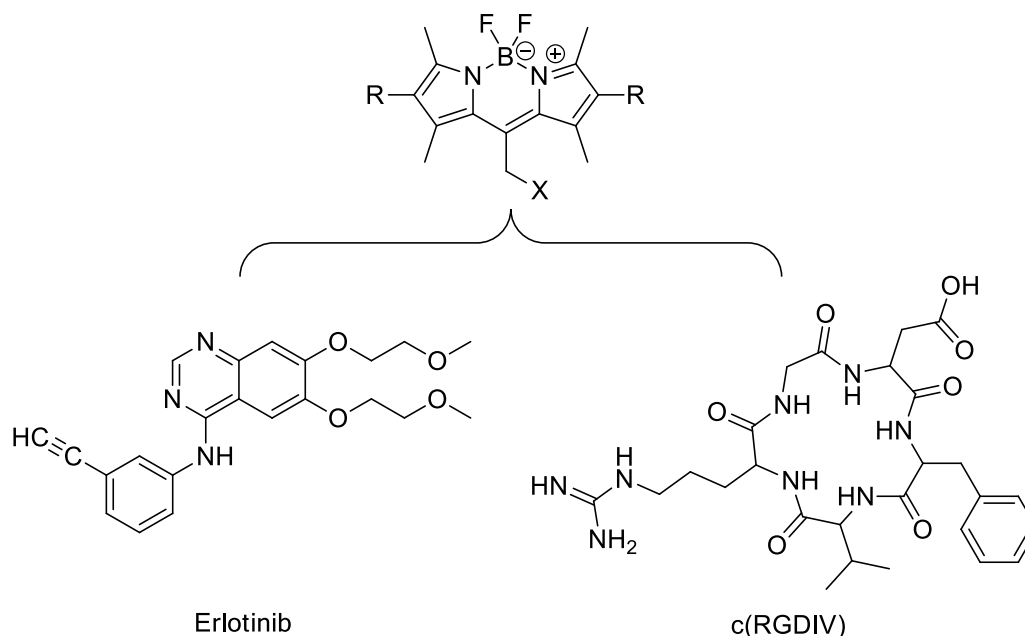


Abbildung 5.2. Mögliche Kombinationen von zielgerichteten Strukturen („X“) mit BODIPY.

Zur Wahl stehen eine Kombination von BODIPY mit Erlotinib (gegen EGFR) oder BODIPY mit c(RGDIV), einem cyclischen Peptid zur Überwindung der Bluthirn-Schranke.

Ein zentraler Aspekt für die Zulassung von Arzneimitteln ist auch die Metabolisierung des Arzneistoffes und die möglicherweise resultierende Toxizität. Bisher richten sich die Forschungsschwerpunkte auf die Wirksamkeit der photoresponsiven Wirkstoffe, doch ist auf dem Weg zum zugelassenen Arzneimittel der evaluierte Metabolismus unerlässlich. Für Azo-Verbindungen gibt es bereits Toxizitätsdaten im umfangreichen Maße, da Azofarbstoffe auch in der Lebensmittelindustrie eingesetzt werden. Jedoch sind die Anforderungen an Lebensmittelzusatzstoffe ungleich niedriger als für die Zulassung von Arzneimitteln. Diaryl-Azo-Derivate können nicht nur selbst akut toxisch oder mutagen sein, sondern auch Hydrazinverbindungen bilden, die nach Reduktion der Azos entstehen und ebenfalls eine hohe Toxizität aufweisen.^[286–290] Die Toxizität von geschützten Verbindungen mit PPGs ist auch nicht zu vernachlässigen. Bei Bestrahlung von DMNB-geschützten Verbindungen entsteht *o*-Nitrosobenzaldehyd, welches ein toxisches Potenzial birgt. Untersuchungen dazu sind immer noch ausstehend, können jedoch vom Nitrobenzaldehyd abgeschätzt werden, welches akut toxisch ist.^[291] Zelluläre Experimente mit einer DMNB-geschützten Aminosäure zeigten einen schwach toxischen Effekt (>10 μM) im Zellmaßstab.^[139] Auch die Metabolisierung von

BODIPY-Derivaten wirft weiterhin zu beantwortende Fragen auf. Während BODIPY-Derivate für *live cell imaging* und als Marker für Metabolismusstudien verwendet werden, bleibt der Einfluss der BODIPY-Gruppe selbst weitestgehend unbeachtet. Im Zellexperiment gibt es Hinweise auf eine geringfügige Toxizität.^[292,293] Untersuchungen im Mausmodell zeigen dagegen eine zu vernachlässigende Toxizität im Dunkeln (also bei Ausbleibender Singulettstauerstoffproduktion).^[294] Außerdem sprechen bereits zugelassene borhaltige Arzneistoffe für die Verwendung.^[295] Die Frage nach der akuten Toxizität kann somit (vorläufig) verneint werden, jedoch sind ausführliche Evaluationen vonnöten.

Das Kinom-Profilung von Pamgene kann weiterhin für die Entwicklung photoresponsiver Kinaseinhibitoren genutzt werden. Für eine abschließende Validierung der Methode sollten jedoch noch weitere Kinaseinhibitoren auf anderen Zelllysaten vermessen werden. So ist eine Validierung des hoch selektiven Kinaseinhibitors Lapatinib eine Variante, die genutzt werden kann, um abschließende Aussagen über die *up-stream*-Analyse zu treffen, denn eine gute Wiederfindung blieb bisher noch aus.^[296] Lapatinib hemmt nur zwei Kinasen, also sollte die *up-stream*-Analyse entsprechend eindeutig ausfallen.

Darüber hinaus kann das Pamgene-Kinom-Profilung genutzt werden, um Tumorproben auf überaktivierte Kinasen zu untersuchen, um dann die Therapieoptionen anzupassen. In der Anwendung würden Patientenproben entnommen werden, mit dem Kinase-Screening untersucht und validiert werden, um dann aus den Ergebnissen Inhibitorempfehlungen für eine individualisierte Tumorthherapie abzuleiten. Die Standortnähe der Pharmazie zum Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (z.B. Institut für Experimentelle Tumorforschung) bietet eine gute Gelegenheit, um Patientenproben nach Entnahme unmittelbar zu untersuchen. Auch wenn es bereits erste Veröffentlichungen für spezielle Tumorarten im Kinom-Profilung zur individualisierten Therapieempfehlung gibt, lohnt sich eine Etablierung, da es bundesweit noch nicht genug Kapazitäten gibt. Die entstehenden Ergebnisse können anschließend genutzt werden, um eine Handlungsempfehlung je nach Erkrankung zu erstellen, welche nach Möglichkeit auch von den Krankenkassen entsprechend monetarisiert werden sollten.

Neben einer Anwendung in der Wirkstoffentwicklung und der Untersuchung von Patientenproben kann das Kinase-Screening noch zur Aufklärung von Signalwegen verwendet werden. Denkbar wäre eine Untersuchung beteiligter Kinasen im TGF β - bzw. BMP-Signalweg.^[297,298] Das Kinome-Profilung kann außerdem methodisch erheblich von Algorithmen mit maschinellem Lernen profitieren, wodurch große Datenmengen einfacher in Zusammenhang gebracht werden können.^[299]

6 Experimenteller Teil

6.1 Molecular Modeling

Berechnungen im Sinne des *Molecular Modeling* wurden auf einem *Dell-PC* mit einem *Intel Xeon E5620 @ 2.40 GHz*, 24 GB RAM sowie 64-bit *Windows 7 Enterprise* durchgeführt. Als Software wurde *Schrödinger Maestro 11.0* verwendet. Für statische *Glide*-Dockingstudien wurden zuerst die gewünschten Proteinstrukturen importiert und bearbeitet mit dem *Protein Preparation Wizard*. Fehlende Seitenketten oder Schleifen wurden mit *Prime 4.6* ergänzt. Die Proteinstruktur wurde vorbereitet (*preprocess*), Wassermoleküle mit weniger als 3 Wasserstoffbrückenbindungen zu Nicht-Wasser-Molekülen wurden entfernt. Mittels *PROPKA* wurde bei pH 7.0 optimiert. Zuletzt wurde die Proteinstruktur mit *OPLS3*-Kraftfeld minimiert. Für Ligandenverarbeitungen und -minimierungen wurden *Macro Model 11.4015*, *OPLS3* (Kraftfeld) sowie *Epik 3.8015* (Zustände bei pH 7.0 ± 2.0 , max. 32 Zustände pro Ligand) benutzt. Zur Generierung der Rezeptorregion (*Grid*) wurde der Ligand ausgewählt (Van-der-Waals-Radius: 1.0; *partial charge cut-off* 0.25). *Grid* und Liganden wurden anschließend im Modul *Ligand Docking* ausgewählt und Konformation im Modus *extra precision* berechnet. Zur Visualisierung wurden Strukturen mit dem Modul *superposition* übereinandergelegt. Falls notwendig, wurden Ligandenstrukturen in ihrer Bewegung um die Stilben- oder Azo-Bindung eingeschränkt, um *Z*-Konfigurationen zu erzwingen. Zur Beurteilung durchgeführter Berechnungen wurden *docking scores* verglichen und ggf. 2D-Interaktionsdiagramme genutzt.

Berechnungen für biologisch relevante ADME-Parameter wie z.B. Wasserlöslichkeit wurden mit *QikProp* Version 4.6 berechnet. Für BODIPY-Derivate erzielte die Rechnung aufgrund des enthaltenen Boratoms keine Ergebnisse.

6.2 Organische Chemie

Reagenzien und Ausgangsstoffe

Reagenzien und Ausgangsstoffe wie z.B. Lösungsmittel wurden, wenn nicht anders angegeben, von folgenden Herstellern bezogen: abcr GmbH, Alfa Aesar, Merck, Roth, Shangdong Shinning Pharm Co. (China), Thermo Fisher Scientific, VWR.

Des Weiteren wurden folgende Verbindungen in dieser Arbeit untersucht:

Tabelle 6.1. Verwendete nicht-kommerzielle Inhibitoren und Prodrugs.

Kapitel	Derivate bzw. Derivatserie	Synthese und Charakterisierung von
3.1.1.1	(<i>Z</i>)-Axitinib	Dorian Schmidt ^[195]
3.1.1.3	Azo-Axitinib	Lydia Witt (geb. Kuhl) ^[203]
3.1.1.3	Azobenzol-Axitinib	Dorian Schmidt ^[204]
3.1.1.3	Diazocin-Axitinib	Dorian Schmidt ^[204]
3.1.2	Schaltbare BRAF ^{V600E} -Inhibitoren	Mark Hoorens ^[50]
3.1.3	Schaltbare Chronomodulatoren	Dusan Kolarski ^[230]
3.1.3	Verbindung 11	Joana Baier ^[231]
3.1.3	Verbindung 12	Jakob Halekotte ^[232]
3.1.4	Schaltbare RET-Inhibitoren	Yongjin Xu ^[239]
3.2.1	DMNB-geschützte CDK2-Inhibitoren	Alexander Döbber ^[263]
3.2.2	BODIPY-geschützte CDK2-Inhibitoren	Alexander Döbber ^[165] , Melanie Krebs ^[278]

6.3 Analytische Chemie

Alle Untersuchungen wurden unter Ausschluss von Umgebungslicht wie Tageslicht durch Fensterscheiben oder Licht von Deckenbeleuchtung durchgeführt. Teilweise wurde auf Rotlicht zurückgegriffen, wenn das Anregungsspektrum der zu untersuchende Substanzen es zuließ.

6.3.1 Lichtquellen

Für Bestrahlungen von Verbindungen wurden verschiedenen Lichtquellen aus Einzelanfertigung (z.T. mit Aufsätzen für Mikrotiterplatten) von Sahlmann Photochemical Solutions verwendet:

Tabelle 6.2. Verwendete Lichtquellen für Bestrahlungsexperimente.

Peakwellenlänge	LED-Typ	LED-Anzahl	bestrahlte wells pro LED	Leistung bei 100 %-Nennleistung
370 nm	Nichia NVSU233A U365	1	kein Aufsatz	1500 mW
369 nm	Nichia NCSU276A U365	16	1	12000 mW
385 nm	Nichia NC4U134 U385	3	kein Aufsatz	7290 mW
409 nm	Nichia NVSU233A-U405	3	kein Aufsatz	7290 mW
409 nm	Nichia NVSU233A-U405	16	1	15680 mW
519 nm	Nichia NCSG219-V1	8	4	4600 mW bzw. 6.5 mW/cm ²
525 nm	Nichia NCSG219B-V1	16	1	6080 mW bzw. 90 mW/cm ²

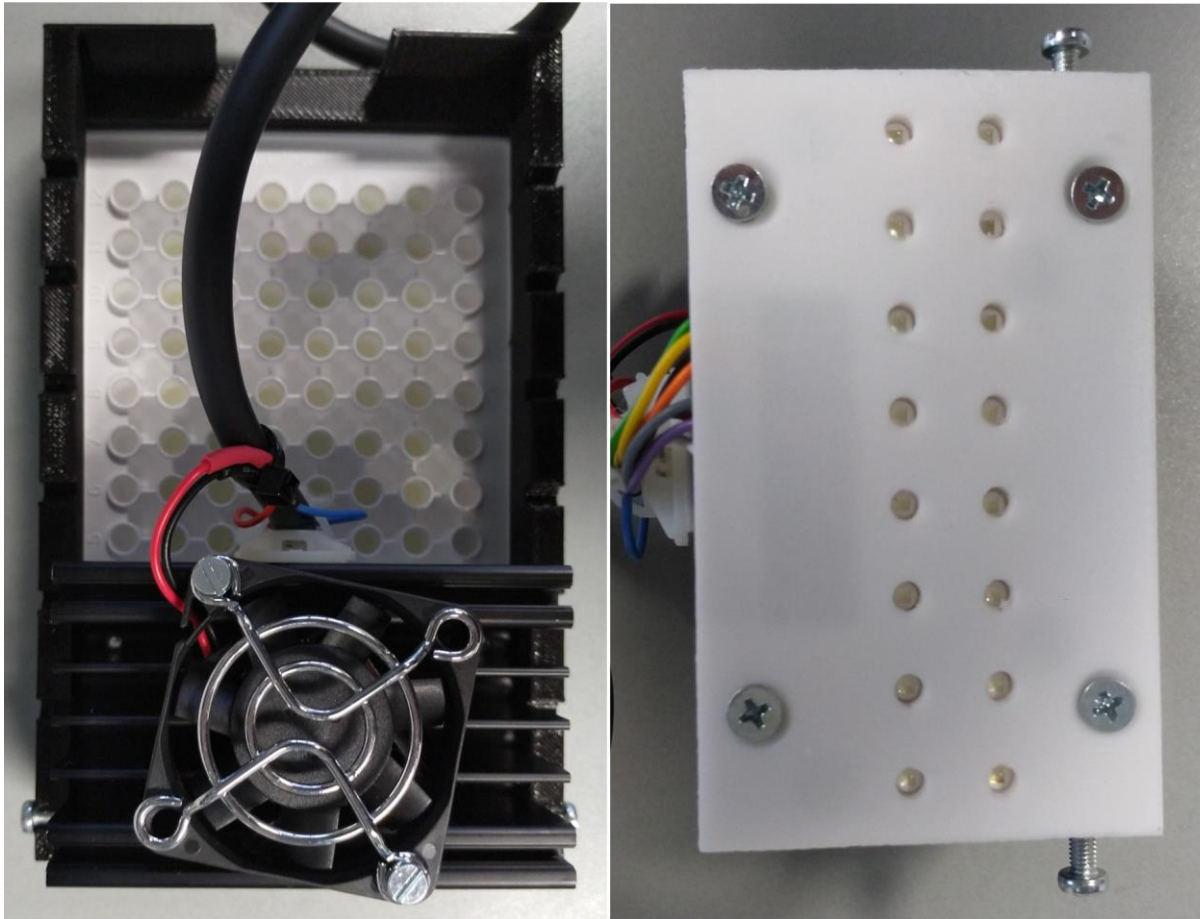


Abbildung 6.1. 525 nm-Lampe zu Bestrahlungszwecken mit Aufsatz für Mikrotiterplatten.

Links: Draufsicht auf eine weiße 96-*well plate* mit Aufsatz und 525 nm-Lampe mit Kühler. Rechts: Untersicht der 525 nm-Lampe.

6.3.2 HPLC

Die analytische Flüssigchromatografie wurde entweder mit einer *Agilent 1100* oder *Hewlett-Packard 1050* (beide Agilent) durchgeführt. Es wurde folgender Aufbau verwendet:

Tabelle 6.3. Aufbauparameter der genutzten HPLC-Anlagen.

Parameter	Agilent 1100	Hewlett Packard 1050
Säule	Phenomenex KinetexQ C8, 5 μm (150 mm · 4.6 mm)	Phenomenex KinetexQ C8, 5 μm (150 mm · 4.6 mm) STAGROMA C18, 5 μm (125 mm · 4 mm)
Betriebstemperatur	25 °C	25 °C
Polare Phase	KH ₂ PO ₄ -Puffer (0.01 M, pH 2.3)	KH ₂ PO ₄ -Puffer (0.01 M, pH 2.3)
Unpolare Phase	Acetonitril (ACN)	Acetonitril (ACN)
Flussrate	1.5 mL/min	1.5 mL/min
Injektionsvolumen	5 μL	5 μL
Elutionsgradient (Azoschalter)	5 % ACN → 60 % ACN, 10 min	-
Detektionswellen- länge (Azoschalter)	320 nm	-
Elutionsgradient (BODIPY)	5 % ACN → 90 % ACN, 14 min	5 % ACN → 90 % ACN, 14 min
Detektionswellen- länge (BODIPY)	254 nm, 535 nm	254 nm, 294 nm, 296 nm, 540 nm

6.3.3 Massenspektrometrie

Massenspektrometrische Untersuchungen wurden an einem *Bruker Esquire LC ion trap* mit Elektronen-Spray-Ionisation (Trockengas 9 L/min, *nebulizer* 35 psi, Ausheiztemperatur von 350 °C, Positiv- und Negativ-Messmodus) durchgeführt. Chromatographische Trennung wurde mit einer RP-8 Säule (*Agilent Eclipse XDB-C8*, 150 mm · 4.6 mm, 5 µm) bei einem Elutionsgradienten von 0.1 % Essigsäure und ACN erzielt. Die Flussrate betrug 1 mL/min.

6.3.4 NMR-Spektroskopie

NMR-Spektren wurden an einem (*Bruker Avance III 300*, temperiert auf 298 K. ^1H (300 MHz) und ^{13}C (75 MHz)) aufgenommen. Für den internen Standard wurden die Spektren auf das jeweilige Lösungsmittelsignal von DMSO- d_6 (δ ^1H NMR: 2.50 ppm, δ ^{13}C NMR: 39.52 ppm) und CDCl_3 (δ ^1H NMR: 7.26 ppm, δ ^{13}C NMR: 77.16 ppm) bezogen.

6.3.5 ESR-Spektroskopie

Für die ESR-Spektren zur qualitativen Untersuchung radikalischer Mechanismen wurden die Verbindungen (in DMSO gelöst, 25 µM) mit der *spin probe* TMTH (in Wasser gelöst, 2.5 mM, unter Zusatz von 1 mM EDTA) in eine weiße *96-well plate* (Perkin Elmer) gegeben. Als Positivkontrolle diente der bekannte *photosensitizer* Methylenblau. Substanzen ohne TMTH oder ohne Bestrahlung wurde als Negativkontrolle verwendet. Proben wurden anschließend mit 525 nm, 90 mW/cm² für 30 s bestrahlt. Zur Spektrenaufnahme wurde ein *ELEXSYS E 500* (Bruker Biospin) benutzt. Dazu wurden die Testlösungen mit einer Kapillarröhre (25 µL, Hirschmann) aufgesogen und zügig vermessen. Die zweifache Messung der Duplikate erfolgte mittels *X-band* und folgender Parameter: Zentralfeld: 3511.35 GHz; Resonanzfrequenz: 9.85 GHz; Mikrowellenleistung: 20 mW; Modulationsamplitude: 1.0 G; Modulationsfrequenz: 100 kHz; Umsetzungszeit: 40 ms; Zeitkonstante: 40.96 ms.

6.3.6 Singulett-Sauerstoff Assay

Sollte bei radikalischen Mechanismen Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) freigesetzt werden, kann die Entfärbung von 1,3-Diphenylisobenzofuran (DPBF) beobachtet werden.^[300] Dabei reagiert das DPBF zum farblosen 1,2-Dibenzoylbenzol unter Abnahme der Absorption bei 410 nm. Die zu untersuchenden Substanzen werden gelöst in DMSO (5 µM) und mit DPBF (90 µM, DMSO), in einer schwarze *96-well plate* mit transparentem Boden (Greiner Bio One) bestrahlt (525 nm, 4.5 mW/cm², 10 - 300 s) und zuletzt mit einem Fluostar Omega (BMG Labtech) bei einer Absorption bei 410 nm vermessen.^[152] Die Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute Φ_{sing} wurde berechnet nach Usui *et al.*^[301] Methylenblau (MB) mit einer Φ_{sing} von 0.52 wurde als interner Standard verwendet. Dazu werden die Differenzen der optischen Dichte bei 410 nm gegen die

Zeit aufgetragen. Im linearen Wertebereich wird eine Regressionsgerade durch die Messwerte gelegt, deren Anstieg (m) in die untenstehende Formel eingesetzt wird.

$$\Phi_{sing.} = \Phi_{1o_2}(Analyt) = \frac{m_{Analyt}}{m_{MB}} * \Phi_{1o_2}(MB)$$

6.3.7 UV/Vis-Spektroskopie

UV/Vis-Spektren der entsprechenden Verbindungen wurden entweder an einem *Varian Cary 50 Scan* (Agilent Technologies) in einer Mikroküvette oder an einem *Fluostar Omega* (BMG Labtech) in einer *96-well plate* mit transparentem Boden gemessen. Die Verbindungen wurden zu 0.1 mM entweder in DMSO oder DMSO/Wasser-Gemischen gelöst.

6.3.8 Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenz-Spektren von BODIPY-Derivaten wurden an einem Fluoreszenzspektrometer LS55 (Perkin Elmer) mit einer eingestellten Spaltbreite von 2.5 nm aufgenommen. Dazu wurden 0.5 μ M Substanz in DMSO gelöst und mit einer Halbmikroküvette (Quarz) vermessen. Ein Blindwert (Blank) wurde abgezogen.

6.3.9 Abspaltungsexperimente

Zur Untersuchung des Abspaltungsverhaltens der Analyten wurden diese zu 25 μ M in DMSO oder DMSO/Wasser gelöst. In einer weißen Mikrotiterplatte wurden diese dann bestrahlt (519 nm, 6.5 mW/cm², 1–30 min). Die Quantifizierung der Analyten sowie der Abspaltungsprodukte erfolgte mittels HPLC.

6.3.10 Stabilitätsuntersuchungen

Die Stabilitätsuntersuchungen erfolgten entweder mikroskopisch oder spektrometrisch unter Messung der Absorption.

Die Mikroskopaufnahmen wurden an einem Olympus *CK2*, verbunden mit einer Canon *EOS 80D*, erstellt. 0.1 mM Substanz wurde dazu in DMSO oder DMSO/Wasser-Gemischen in transparente Mikrotiterplatten überführt. Die Kristallisation entwickelte sich innerhalb von 24 h bei RT.

Spektren wurden mit einem *Fluostar Omega* (BMG Labtech) aufgenommen. Substanzkonzentrationen und Lösungsmitteln wurden wie bei den mikroskopischen Aufnahmen verwendet. Aufgenommen wurde in Zeiträumen von $t = 0$ min, 10 min, 20 min und 30 min. Zusätzlich wurde bestrahlt, um den Endpunkt des Substanzabbaus zu simulieren (519 nm, 6.5 mW/cm², 10 min).

6.4 Molekulare Biologie

Die verwendeten Reagenzien für biologische Versuche und Medien wurden von Life Technologies bezogen. Antikörper und Proteine zur Stimulation wurden von New England Biolabs bzw. Cell Signaling Technology erworben, sofern nicht anders angegeben. Verbrauchsmaterialien wie Pipetten und Mikrotiterplatten wurden von Sarstedt, Perkin Elmer und Greiner Bio-One verwendet. Für aseptische Tätigkeiten wurde an einer Sterilbank *Napflow* von Napco und mit einem Inkubator *function line* von Heraeus gearbeitet.

6.4.1 Kinaseassays

Zur Bestimmung der Kinaseaktivität und Ermittlung von IC_{50} -Werten bei Dosis-Wirkungskurven auf CDK2/Cyclin E1 wurden der *ADP-Glo Kinase Assays* sowie die Kinase von Promega gemäß Herstellerprotokoll verwendet.^[265,302] Mit dem Kinaseassay wird der ATP-Verbrauch bei einer Kinasereaktion proportional zur ATP-abhängigen Luciferasereaktion bestimmt. Je geringer das zu messende Biolumineszenzsignal, desto kleiner ist die Aktivität der Kinase. Der Assay wurde in einer weißen 96-*well plate* durchgeführt. Die Inhibitoren wurden in DMSO gelöst, in 1:3-Schritten verdünnt und zuletzt zu finalen Konzentrationen von max. 10 μ M im *Kinase Reaction Buffer* bereitgestellt. Als nächstes wurden die Verbindungen mit folgenden Einstellungen bestrahlt: 519 nm, 10 min, 6.5 mW/cm². Um einer Denaturierung der Kinase vorzubeugen wurden erst die Verbindungen bestrahlt, bevor Kinase hinzugegeben wurde. Wichtig für valide Messergebnisse mit geringen Abweichungen ist das Vorlegen von 50 μ L Kinasepuffer in jede zu untersuchende Kavität der Assayplatte. Nach Präinkubation mit CDK2/Cyclin E1 (0.4 ng/ μ L) für 10 min wurden ATP (10 μ M) und Histon H1 (0.1 μ g/ μ L) hinzugegeben und weitere 60 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde *ADP-Glo Reagent* hinzugegeben. Nach 30 min Inkubation wurde zuletzt *Detection Reagent* ergänzt und für weitere 30 min bei 30 °C inkubiert. Die Biolumineszenzsignale wurden mit einem *Fluostar Omega* von BMG Labtech detektiert (Intervall von 0.2, *Gain* von 3600). Die Kinaseassays wurden bei einer finalen DMSO-Konzentration von 1 %, sowie 0.05 mM Dithiothreitol (DTT) durchgeführt. Mit Hilfe von *GraphPad Prism* (Version 7, GraphPad Software) wurden IC_{50} -Werte mit folgender Funktion ermittelt:

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{Log}IC_{50} - X) * \text{HillSlope}))}$$

Ausreißer wurden mittels *D'Agostino-Pearson omnibus normality test* ermittelt. Kavitäten mit Kinase sowie 1 % DMSO wurden als 100 %-Kontrolle, *wells* ohne Kinase als 0 %-Kontrolle festgelegt. Die Kinaseassays wurden in Triplikaten durchgeführt.

Die Bestimmung der VEGFR2-Aktivität mit dem Promega ADP-Glo-Kit erfolgte bis auf die aufgeführten Abänderungen wie der CDK2-Assay. Die Verbindungen wurden bereits in der

Verdünnungsplatte mit DMSO mit 369 nm (16-LED-Lampe, 150 mW/*well*) für 1 min bestrahlt. Die finalen Substanzkonzentrationen betragen im Assay max. 10 μM bei Testverbindungen, 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Substrat (*poly(4:1 Glu:Tyr)peptide*), 10 μM ATP und 0.16 $\text{ng}/\mu\text{L}$ VEGFR2-Kinase. Dem Kinasepuffer wurde neben 2 mM DTT noch 2 mM MnCl_2 hinzugefügt. Zur Ermittlung der DFG-*out*-Eigenschaften des Inhibitors im Assay wurde die Kinase mit dem Inhibitor 1 h präinkubiert. Die Kinasereaktion wurde mit ATP- und Substrat-Zugabe gestartet. Nach 1 h Kinasereaktion erfolgte die Inkubation mit ADP-Glo für 40 min und die Inkubation mit Detektionsreagenz für 60 min.

6.4.2 Zellkultur

Die verwendeten Zelllinien und Kulturmedien können Tabelle 6.4 entnommen werden. Die Zellen wurden bei 37 °C, gesättigter Luftfeuchtigkeit und 5 % CO_2 -Sättigung kultiviert und ein Teil bei ca. 95 % Zellkonfluenz nach Trypsinierung in eine neue Zellkulturflasche mit frischem Medium überführt (Passagieren).^[303] Wo es erforderlich war wurden die Zellen entweder mit einem *Cell Scepter* (Merck) oder einer Neubauer-Zählkammer gezählt, um anschließend in der gewünschten Zellzahl ausgesät zu werden. Für spätere Untersuchungen wurden die Zellen mit DMSO-Medium (10 %) eingefroren und in der Gasphase von flüssigem Stickstoff gelagert.

Tabelle 6.4. Verwendete Zelllinien und Medien.

Zelllinie	Bezugsquelle	Kulturmedium
HUVEC	Cell Lines Service GmbH	ECGM2 (Promocell)
NIH3T3	Christian Röder, Institut für Experimentelle Tumorforschung, CAU Kiel	DMEM, 10 % FCS, 1 mM Pyruvat
SK-MEL-28	Cell Lines Service GmbH	DMEM, 10 % FCS, 1 mM Pyruvat
U2OS	Cell Lines Service GmbH	DMEM, 10 % FCS, 1 mM Pyruvat
MCF-7	Cell Lines Service GmbH	DMEM, 10 % FCS, 1 mM Pyruvat
Panc89 (T3M4)	Christian Röder, Institut für Experimentelle Tumorforschung, CAU Kiel	RPMI 1640, 10 % FCS, 1 mM Pyruvat

6.4.3 Zellproliferationsassays

Panc89 wurden in 5000–15000 Zellen/mL ausgesät und unter Kulturbedingungen gehalten. Die Inhibitoren wurden in DMSO gelöst, in 1:3-Schritten verdünnt und zuletzt zu finalen Konzentrationen von max. 100 µM im Zellmedium bereitgestellt. Nach 24 h wurden die Verbindungen hinzugefügt, mit den Zellen bestrahlt (525 nm, 1 min, 90 mW/cm²) und für weitere 48 h inkubiert. Eine Tag-0-Platte wurde zu diesem Zeitpunkt mit Resazurin inkubiert und vermessen, um das Wachstumssignal bei 0 % Zellproliferation nach 2 Tagen festzuhalten. Nach 48 h Inkubation der noch zu detektierenden Platten wird das Medium durch 20 µg/mL Resazurin ersetzt. Mitochondrien in Eukaryonten reduzieren Resazurin (blau) zu Resorufin (violett). Das Fluoreszenzsignal vom Resorufin wurde detektiert mit einem *Fluostar Omega* (Anregung: 544 nm, Emission: 590 nm, 10 *flashes per well*). Die DMSO-Behandlung wurde als 100 %-Kontrolle festgelegt, das Ergebnis der Tag-0-Platte als 0 % Wachstum und die Medienkontrolle ohne Zellen als -100 %-Kontrolle. Hintergrundrauschen (Medienkontrolle) wurde von den zu ermittelnden Werten subtrahiert. Mithilfe von *GraphPad Prism 7* wurden die Dosis-Wirkungskurven mit folgender Funktion dargestellt:

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogIC50} - X) * \text{HillSlope}))}$$

und Ausreißer wie in Kapitel 6.4.1 Kinaseassays detektiert. Die finale DMSO-Konzentration auf den Zellen betrug 1 %. Zellproliferationsassays wurden in Triplikaten durchgeführt.

Die Bestrahlungstoleranz der Zellen wurden in einer vorangegangenen Lichttitration ermittelt, analog zum Zellproliferationsassay. Anstelle von Substanzkonzentrationen wurde die Bestrahlungsdauer variiert.

6.4.4 Apoptoseassays

Zur Untersuchung auf Apoptoseerscheinungen wurde der *APOLive GLO assay* von Promega gemäß Herstellerprotokoll verwendet. Zuerst wurde Panc89 zu 5000-15000 Zellen/mL in eine weiße *96-well plate* ausgesät und unter Kulturbedingungen für 24 h inkubiert. Die Verbindungen wurden in DMSO zu einer Endkonzentration von 100 µM im Assay gelöst und auf die Zellen gegeben. Bestrahlt wurde mit 525 nm, 90 mW/cm² für 60 s. Nach weiteren 48 h Inkubation unter Kulturbedingungen wurde das Medium gegen ein *detection viability reagent* ausgetauscht und für weitere 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde ein Biolumineszenzsignal per *caspase reagent* erzeugt und mit einem *Tecan Spark* von Tecan detektiert. Die grafische Darstellung erfolgte mit *GraphPad Prism 7*. Der Assay wurde in Duplikaten ausgeführt.

6.4.5 Western Blots

NIH3T3-Zellen wurden mit einer Zellzahl von 20000 Zellen/well in *6-well plates* ausgesät. Nach 48 h Inkubation unter Kulturbedingungen wurde die Verbindungen gelöst, in DMSO (finale Konzentration 1 % DMSO) auf die Zellen gegeben, 45 min inkubiert, mit 20 ng humanem PDGF für 5 min stimuliert. Dann wurde das Medium entfernt, mit kaltem DPBS gewaschen und M-PER, versetzt mit einem Phosphatase-Protease-Inhibitor-Cocktail, aufgetragen. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurden die Lysate und Zellreste von den Flaschen abgeschabt und in 1.5-mL-Reaktionsgefäße überführt. Nach Zentrifugation bei 15000 RPM, 4 °C, ggf. nochmaliger Zentrifugation, wurden die Überstände entnommen und bei -80 °C eingefroren oder anschließend vermessen. Die Proteinmenge wurde mit einem Bradford-Assay^[304] gemäß Herstellerprotokoll bestimmt. SDS-PAGE und Western Blot (gemäß Standardprotokoll)^[195,305,306] wurden mit folgenden Antikörpern durchgeführt: t-PDGFR, p-PDGFR, *anti-rabbit*. Signale wurden mit dem *Lumi Imager F1* (Roche) detektiert und visualisiert. Die Durchführung der VEGFR-Western-Blots wurde bis auf folgende Änderungen wie oben beschrieben durchgeführt: HUVEC wurden in T75-Kulturflaschen ausgesät und bis 90% Konfluenz unter oben genannten Bedingungen (6.4.2) kultiviert. Die Substanzen wurden in DMSO gelöst und auf die Zellen pipettiert (finale DMSO-Konzentration: 1 %). Nach 2 h Inkubation erfolgte die Stimulation mit VEGF für 15 min. Zur Detektierung am *Lumi Imager F1* (Roche) wurden folgende Antikörper verwendet: *p-VEGFR Tyr1175*, *p-AKT*, und *GAPDH*. SDS-PAGE und Western Blots wurden in den Laborräumen der Klinischen Pharmazie, CAU Kiel durchgeführt.

6.4.6 Fluoreszenzmikroskopie

Panc89 wurden in schwarze Mikrotiterplatten mit halber Fläche (GeinerBio One) in einer Zellzahl von 10000–20000 Zellen/mL ausgesät und für 24 h unter Kulturbedingungen inkubiert. Die zu testenden Verbindungen wurden in DMSO gelöst zu einer finalen Assaykonzentration von 100 nM und mit Zellen bestrahlt (525 nm, 90 mW/cm², 30 s). Nach Inkubation weiterer 48 h unter Kulturbedingungen wurde das Medium entfernt, mit DPBS gewaschen, Zellen mit 4 % *p*-Formaldehyd (PFA) fixiert und zuletzt mit 5 g/mL Hoechst 33342 für 15 min gefärbt. Bilder wurden mit einem *ImageXpress Micro XL* (Molecular Devices) unter Verwendung einer 10-fach- und 60-fach-Vergrößerung sowie dem Programm *Meta Xpress* aufgenommen. Es wurden folgende Filter verwendet: *DAPI* (Anregung bei 377 nm, Emission bei 543 nm) und *TRITC* (Anregung bei 447 nm, Emission bei 593 nm). Die Finale DMSO-Konzentration betrug 1 %. Die Zellbehandlung erfolgte in Duplikaten, die Bildaufnahme in Quadruplikaten pro Duplikat. Entscheidend ist hier, dass eine Lampe genutzt wird, bei der eine LED ein *well* bestrahlt. Da die *well*-Fläche verkleinert ist, trifft bei anderen Aufsätzen nicht ausreichend Licht auf die *wells*.

6.4.7 Multi-Kinase-Profilung

Die Aktivitätsmessung der Kinasengesamtheit (Kinom) steht schon länger im Fokus wissenschaftlicher Bestrebungen.^[307,308] Zur Profilierung der zellulären Lysate wurde das Kinom-Profilung (auch Kinase-Screening) von Pamgene verwendet. Mithilfe der Pamgene-Technologie ist es möglich, die Kinomaktivität von Zell- oder Gewebeproben zu untersuchen und zu vergleichen. Dazu werden Proben auf Mikrochips (PamChip) aufgetragen und mithilfe der PamStation 12 vermessen. Jeder Chip-Array enthält 144 (Phospho-Tyrosinkinase, PTK) oder 196 (Serin-/Threonin-Kinase, STK) Peptide, fest gebunden an poröses Kieselgel, die von den Kinasen der jeweiligen Probe phosphoryliert werden können (s. Abbildung 6.2 A).^[243] Der Nachweis der phosphorylierten Peptide erfolgt über Fluorescein-gekoppelte Antikörper und anschließend dem Auslesen der Fluoreszenzemission. Je nach Kinaseaktivität ergibt sich ein Zelllinienspezifisches Abbild, darstellbar in einer *heat map* oder *box plot* (s. Abbildung 6.2 B). Über ein bis zwei Stunden erfolgt die Signalaufnahme in einem Intervallvorgang von Waschen der Peptidmembranen mit Kinasepuffer und Bildaufnahme mittel CCD-Sensor. Aufgenommen wurden die Bilder bei drei verschiedenen Belichtungszeiten, um bei Verrechnung einen größeren

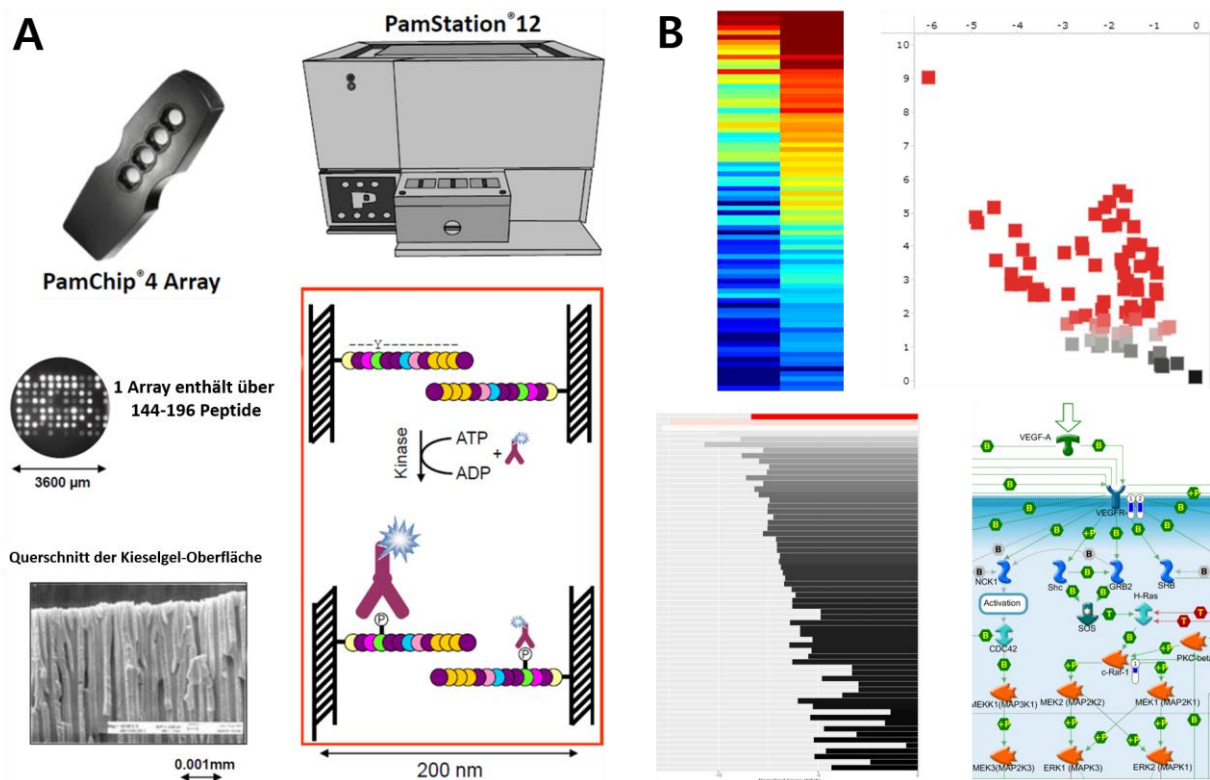


Abbildung 6.2. Kinomprofilierung mit der Pamgene-Methode.

A. Für das Kinase-Screening wird Zellysate auf die Arrays des PamChips aufgetragen. Die dort gebundenen Peptide werden von den zellulären Kinasen phosphoryliert und in der PamStation 12 mittels Fluoreszenzantikörpern detektiert. Abbildung nach Hilhorst *et al.*^[243] **B.** Aus den erhaltenen Daten nach einer Messung mit der PamStation kann die Auswertung in Form von *heat maps* (oben links), *volcano plots* (oben rechts), *up-stream*-Analysen (unten links) oder Netzwerkanalysen mit GeneGo (unten rechts) visualisiert werden.

dynamischen Umfang zu gewährleisten. Zur Analyse wurden nur Signale verwendet, bei denen über den Zeitraum der Messung eine Signalsättigung eintrat. Von den ermittelten Werten wurde der Logarithmus zur Basis 2 berechnet. Beim Vergleich mit z.B. der DMSO Probe wurden die berechneten Werte ins Verhältnis gesetzt und grafisch im *volcano plot* dargestellt. Auf Grundlage des Kinomprofils einer Probe können beim Vergleich mit einer Negativprobe Rückschlüsse auf möglicherweise beeinflusste Kinasen gezogen werden. Die zuvor ermittelten Daten werden dem *t*-Test und mehrfachen Permutationen (LOOCV, *Leave-one-out cross-validation*) unterzogen und mit Datenbanken wie z.B. PosphoNet abgeglichen (*up-stream*-Analyse, s. Abbildung 6.2 B). Eine Validierung mit isolierten Kinasen via Kinaseassay oder Western Blot ist obligat.^[309–315] Das Pamgene-Kinom-Screening wird sowohl für die Evaluierung von Tumorproben und überaktivierten Kinasen^[241] genutzt, als auch für die Entwicklung möglicher Therapiestrategien aufgrund dieser überaktiven Kinasen.^[242]

Das Kinom-Profiling kann entweder verwendet werden, um Zelllysate kurz vor dem Screening mit Inhibitoren zu behandeln (*spike-in*), oder um lebende Zellen mit Testsubstanzen zu behandeln und die anschließend angefertigten Lysate zu vermessen. Die zu untersuchenden Zellen wurden unter Kulturbedingungen (s. Kapitel 6.4.2) bis zu einer Zellkonfluenz von ca. 90 % wachsen gelassen. Die Herstellung der Lysate erfolgte wie im Kapitel 6.4.5 Western Blots beschrieben. Lysate mit einem Proteingehalt über 1 mg/mL wurden für das Kinom-Profiling als angemessen erachtet. Für das Kinom-Profiling wurden Reagenzien, Chips und *PamStation 12* (Pamgene) gemäß Herstellerprotokoll verwendet. Für PTK-Chips wurden 5 µg Protein und für STK-Chips wurden 3 µg Proteinmenge verwendet. Die DMSO-Konzentration im Assay betrug 1 % (bzw. 10 %) die ATP-Konzentration 100 µM. Nach Zugabe der Testsubstanzen wurden die Lysate bestrahlt (385 nm, 7290 mW, 30 s; 405 nm, 784 mW, 1 min bzw. 365 nm, 1500 mW, 1 min). Je Testlauf erfolgte eine Bestimmung des Kinaseprofils in drei technischen Replikaten. Die Analyse erfolgte nach dem Protokoll von Labots *et al.*^[241] Zur Signalauswertung wurde die Software *Bionavigator 6* (Pamgene) gemäß Herstelleranleitung verwendet.^[316]

Das Screening wurden von Konstantin Hoffer und Laura Bußmann im Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg durchgeführt. Die Datenanalyse erfolgte teils im UKE, teils im Pharmazeutischen Institut der CAU, Kiel.

7 Literaturverzeichnis

- [1] I. Shchemelinin, L. Sefc, E. Necas, *Folia biologica* **2006**, *52*, 81.
- [2] L. N. Johnson, *Biochemical Society transactions* **2009**, *37*, 627.
- [3] A. S. Wadajkar, J. G. Dancy, D. S. Hersh, P. Anastasiadis, N. L. Tran, G. F. Woodworth, J. A. Winkles, A. J. Kim, *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology* **2017**, *9*.
- [4] R. A. Weinberg, *The biology of cancer*, Garland Science Taylor & Francis Group, New York, **2014**.
- [5] S. Prabhu, F. Harris, R. Lea, T. J. Snape, *Drug Discovery Today* **2014**, *19*, 1298.
- [6] R. H. Bradbury (Hrsg.) *Topics in medicinal chemistry, Vol. 1*, Springer, Berlin, Heidelberg, **2007**.
- [7] K. R. Aigner, F. O. Stephens (Hrsg.) *Onkologie Basiswissen*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, s.l., **2016**.
- [8] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, D. Morgan, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Molekularbiologie der Zelle*, 6. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim, **2017**.
- [9] G. Klebe (Hrsg.) *Wirkstoffdesign. Entwurf und Wirkung von Arzneistoffen*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2009**.
- [10] G. Manning, D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, S. Sudarsanam, *Science* **2002**, *298*, 1912.
- [11] G. Krauss, *Biochemistry of signal transduction and regulation*, 5. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim, Germany, **2014**.
- [12] P. A. Schwartz, B. W. Murray, *Bioorg. Chem.* **2011**, *39*, 192.
- [13] A. C. Steinmetz, H. U. Demuth, D. Ringe, *Biochemistry* **1994**, *33*, 10535.
- [14] A. Freitag, S. Laufer, *Nachr. Chem.* **2015**, *63*, 420.
- [15] A. P. Kornev, S. S. Taylor, L. F. ten Eyck, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**, *105*, 14377.
- [16] S. Müller, A. Chaikuad, N. S. Gray, S. Knapp, *Nature chemical biology* **2015**, *11*, 818.
- [17] S. Germano (Hrsg.) *Springer protocols, Vol. 1233*, Humana Pr, New York, **2015**.
- [18] A. Levitzki, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2013**, *53*, 161.
- [19] J. T. Hartmann, M. Haap, H.-G. Kopp, H.-P. Lipp, *Current Drug Metabolism* **2009**, *10*, 470.
- [20] P. M. Fischer, *Medicinal research reviews* **2016**, *37*, 314.
- [21] D. Fabbro, *Mol. Pharmacol.* **2015**, *87*, 766.
- [22] Z. Fang, C. Grütter, D. Rauh, *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 58.
- [23] P. Wu, T. E. Nielsen, M. H. Clausen, *Trends Pharmacol. Sci.* **2015**, *36*, 422.
- [24] P. Reichardt, *Oncology research and treatment* **2018**, *41*, 472.
- [25] S. Wong, O. N. Witte, *Annual review of immunology* **2004**, *22*, 247.
- [26] S. C. Sodergren, A. White, F. Efficace, M. Sprangers, D. Fitzsimmons, A. Bottomley, C. D. Johnson, *Critical Reviews in Oncology / Hematology*, *91*, 35.
- [27] D. F. Veber, S. R. Johnson, H.-Y. Cheng, B. R. Smith, K. W. Ward, K. D. Kopple, *Journal of medicinal chemistry* **2002**, *45*, 2615.
- [28] S. N. Westin, A. K. Sood, R. L. Coleman, *Clinical gynecologic oncology*, 8. Aufl., Elsevier/Saunders, Philadelphia, PA, **2012**.
- [29] F. Carles, S. Bourg, C. Meyer, P. Bonnet, *Molecules (Basel, Switzerland)* **2018**, *23*.
- [30] R. Roskoski, *Pharmacological Research* **2016**, *103*, 26.

- [31] Z. Zhao, H. Wu, L. Wang, Y. Liu, S. Knapp, Q. Liu, N. S. Gray, *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 1230.
- [32] B. Kuster (Hrsg.) *Springer protocols, Vol. 795*, Humana Pr, New York, **2012**.
- [33] A. C. Dar, K. M. Shokat, *Annu. Rev. Biochem.* **2011**, *80*, 769.
- [34] R. Morphy, *Journal of medicinal chemistry* **2010**, *53*, 1413.
- [35] B. Nagar, O. Hantschel, M. A. Young, K. Scheffzek, D. Veach, W. Bornmann, B. Clarkson, G. Superti-Furga, J. Kuriyan, *Cell* **2003**, *112*, 859.
- [36] B. Nagar, W. G. Bornmann, P. Pellicena, T. Schindler, D. R. Veach, W. T. Miller, B. Clarkson, J. Kuriyan, *Cancer research* **2002**, *62*, 4236.
- [37] G. E. Konecny, N. Venkatesan, G. Yang, J. Dering, C. Ginther, R. Finn, M. Rahmeh, M. S. Fejzo, D. Toft, S.-W. Jiang et al., *British journal of cancer* **2008**, *98*, 1076.
- [38] Z. A. Wainberg, A. Anghel, A. J. Desai, R. Ayala, T. Luo, B. Safran, M. S. Fejzo, J. R. Hecht, D. J. Slamon, R. S. Finn, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2010**, *16*, 1509.
- [39] S. Klaeger, S. Heinzlmeir, M. Wilhelm, H. Polzer, B. Vick, P.-A. Koenig, M. Reinecke, B. Ruprecht, S. Petzoldt, C. Meng et al., *Science* **2017**, *358*.
- [40] J. N. Sanchez, T. Wang, M. S. Cohen, *Drugs* **2018**, *78*, 549.
- [41] M. K. Callahan, R. Rampal, J. J. Harding, V. M. Klimek, Y. R. Chung, T. Merghoub, J. D. Wolchok, D. B. Solit, N. Rosen, O. Abdel-Wahab et al., *The New England journal of medicine* **2012**, *367*, 2316.
- [42] M. Das Thakur, F. Salangsang, A. S. Landman, W. R. Sellers, N. K. Pryer, M. P. Levesque, R. Dummer, M. McMahon, D. D. Stuart, *Nature* **2013**, *494*, 251–255.
- [43] R. B. Kargbo, *ACS medicinal chemistry letters* **2020**.
- [44] M. Holderfield, M. M. Deuker, F. McCormick, M. McMahon, *Nature Reviews Cancer* **2014**, *14*, 455–467.
- [45] H. Davies, G. R. Bignell, C. Cox, P. Stephens, S. Edkins, S. Clegg, J. Teague, H. Woffendin, M. J. Garnett, W. Bottomley et al., *Nature* **2002**, *417*, 949.
- [46] C. Holohan, S. van Schaeybroeck, D. B. Longley, P. G. Johnston, *Nature reviews. Cancer* **2013**, *13*, 714.
- [47] A. Seluanov, V. N. Gladyshev, J. Vijg, V. Gorbunova, *Nature reviews. Cancer* **2018**, *18*, 433.
- [48] R. Barouch-Bentov, K. Sauer, *Expert opinion on investigational drugs* **2011**, *20*, 153.
- [49] C. M. Lovly, A. T. Shaw, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2014**, *20*, 2249.
- [50] M. W.H. Hoorens, M. E. Ourailidou, T. Rodat, P. E. van der Wouden, P. Kobauri, M. Kriegs, C. Peifer, B. L. Feringa, F. J. Dekker, W. Szymanski et al., *European Journal of Medicinal Chemistry* **2019**, *179*, 133.
- [51] C. Brieke, F. Rohrbach, A. Gottschalk, G. Mayer, A. Heckel, *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2012**, *51*, 8446.
- [52] M. Goeldner, R. Givens, *Dynamic studies in biology. Phototriggers, photoswitches and caged biomolecules*, Wiley-VCH, Weinheim, **2005**.
- [53] D. Wöhrle, *Chemie in unserer Zeit* **2015**, *49*, 386.
- [54] B. Wardle (Hrsg.) *Principles and applications of photochemistry*, Wiley, Chichester, U.K, **2009**.
- [55] W. Szymański, J. M. Beierle, H. A. V. Kistemaker, W. A. Velema, B. L. Feringa, *Chemical Reviews* **2013**, *113*, 6114.
- [56] K. Hüll, J. Morstein, D. Trauner, *Chemical Reviews* **2018**, *118*, 10710.
- [57] A. F. McDonagh, L. A. Palma, D. A. Lightner, *Science* **1980**, *208*, 145.

- [58] R. S. Stern, *The New England journal of medicine* **2007**, *357*, 682.
- [59] M. M. Lerch, M. J. Hansen, G. M. van Dam, W. Szymanski, B. L. Feringa, *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2016**, *55*, 10978.
- [60] R. Buchheim, *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie* **1876**, *5*, 261.
- [61] G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5020.
- [62] J. E.T. Corrie, T. Furuta, R. Givens, Y. A. L, G. Maurice, *Photoremovable Protecting Groups Used for the Caging of Biomolecules*, **2005**.
- [63] G. Ellis-Davies, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 619.
- [64] D. E.J.G.J. Dolmans, D. Fukumura, R. K. Jain, *Nature Reviews Cancer* **2003**, *3*, 380–387.
- [65] T. J. Dougherty, C. J. Gomer, B. W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, J. MOAN, Q. Peng, *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **1998**, *90*, 889.
- [66] G. P. Pathak, J. D. Vrana, C. L. Tucker, *Biology of the cell* **2013**, *105*, 59.
- [67] S. Szobota, P. Gorostiza, F. Del Bene, C. Wyart, D. L. Fortin, K. D. Kolstad, O. Tulyathan, M. Volgraf, R. Numano, H. L. Aaron et al., *Neuron* **2007**, *54*, 535.
- [68] M. J. Fuchter, *Journal of medicinal chemistry* **2020**.
- [69] *Kolloid-Zeitschrift* **1942**, *98*, 368.
- [70] W. A. Sokalski, R. W. Góra, W. Bartkowiak, P. Kobylński, J. Sworakowski, A. Chyla, J. Leszczyński, *The Journal of Chemical Physics* **2001**, *114*, 5504.
- [71] C. L. Fleming, M. Grøtli, J. Andréasson, *ChemPhotoChem* **2019**, *45*, 4900.
- [72] W. F. Cheong, S. A. Prahl, A. J. Welch, *IEEE Journal of Quantum Electronics* **1990**, *26*, 2166.
- [73] S. Mallidi, S. Anbil, A.-L. Bulin, G. Obaid, M. Ichikawa, T. Hasan, *Theranostics* **2016**, *6*, 2458.
- [74] K. R. Byrnes, R. W. Waynant, I. K. Ilev, X. Wu, L. Barna, K. Smith, R. Heckert, H. Gerst, J. J. Anders, *Lasers in surgery and medicine* **2005**, *36*, 171.
- [75] P. Taroni, A. Pifferi, A. Torricelli, D. Comelli, R. Cubeddu, *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* **2003**, *2*, 124.
- [76] Æ. Wang, G. Liu, K. Leung, R. Loffroy, P.-X. Lu, Y.-X. Wáng, *Current pharmaceutical design* **2015**, *21*.
- [77] R. Fain, F. Barbosa, J. Cardenas, M. Lipson, *Scientific reports* **2017**, *7*, 5627.
- [78] R. Steinmetz, D. Elad, M. Pape, E. Fischer (Hrsg.) *Fortschritte der Chemischen Forschung*, Vol. 7, Springer, Berlin, Heidelberg, **1967**.
- [79] D. L. Ross, J. Blanc, *Photochromism by cis-trans Isomerization*, Wiley-Interscience: New York, **1971**.
- [80] Y. Hirshberg, *COMPTEs RENDUS HEBDOMADAIRES DES SEANCES DE L'ACADEMIE DES SCIENCES* **1950**, *231*, 903.
- [81] Z. L. Pianowski, *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2019**, *25*, 5128.
- [82] H. Sell, C. Näther, R. Herges, *Beilstein journal of organic chemistry* **2013**, *9*, 1.
- [83] K. Matsuda, M. Irie, *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* **2004**, *5*, 169.
- [84] T. Yamaguchi, T. Seki, T. Tamaki, K. Ichimura, *BCSJ* **1992**, *65*, 649.
- [85] I. Willner, S. Rubin, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 367.
- [86] C. Bastianelli, V. Caia, G. Cum, R. Gallo, V. Mancini, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1991**, *89*, 679.
- [87] S. Ciorba, F. Fontana, G. Ciancaleoni, T. Caronna, U. Mazzucato, A. Spalletti, *Journal of fluorescence* **2009**, *19*, 759.

- [88] D. H. Waldeck, *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 415.
- [89] M. F. Budyka, N. I. Potashova, T. N. Gavrishova, V. M. Li, *High Energy Chem* **2009**, *43*, 370.
- [90] M. F. Budyka, *Russ. Chem. Rev.* **2012**, *81*, 477.
- [91] D. Wilson, J. W. Li, N. R. Branda, *ChemMedChem* **2017**, *12*, 284.
- [92] P. de Bruijn, S. Sleijfer, M.-H. Lam, R. H. J. Mathijssen, E. A. C. Wiemer, W. J. Loos, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **2010**, *51*, 934.
- [93] M. H. Ngai, C. L. So, M. B. Sullivan, H. K. Ho, C. L. L. Chai, *ChemMedChem* **2016**, *11*, 72.
- [94] R. W. Sparidans, D. Iusuf, A. H. Schinkel, J. H. M. Schellens, J. H. Beijnen, *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* **2009**, *877*, 4090.
- [95] M. W. H. Hoorens, M. Medved', A. D. Laurent, M. Di Donato, S. Fanetti, L. Slappendel, M. Hilbers, B. L. Feringa, W. Jan Buma, W. Szymanski, *Nature communications* **2019**, *10*, 2390.
- [96] D. Bléger, J. Schwarz, A. M. Brouwer, S. Hecht, *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134*, 20597.
- [97] M. Saccone, A. Siiskonen, F. Fernandez-Palacio, A. Priimagi, G. Terraneo, G. Resnati, P. Metrangolo, *Acta crystallographica Section B, Structural science, crystal engineering and materials* **2017**, *73*, 227.
- [98] M. Dong, A. Babalhavaeji, S. Samanta, A. A. Beharry, G. A. Woolley, *Accounts of chemical research* **2015**, *48*, 2662.
- [99] L. Muñoz-Rugeles, D. Gallardo-Rosas, J. Durán-Hernández, R. López-Arteaga, R. A. Toscano, N. Esturau-Escofet, J. G. López-Cortés, J. Peon, M. C. Ortega-Alfaro, L. Muñoz-Rugeles et al., *ChemPhotoChem* **2019**, *113*, 6114.
- [100] M. Volgraf, P. Gorostiza, R. Numano, R. H. Kramer, E. Y. Isacoff, D. Trauner, *Nature chemical biology* **2006**, *2*, 47.
- [101] R. Ferreira, J. R. Nilsson, C. Solano, J. Andréasson, M. Grøtli, *Scientific reports* **2015**, *5*, 9769.
- [102] D. Kolarski, W. Szymanski, B. L. Feringa, *Organic letters* **2017**, *19*, 5090.
- [103] M. Schehr, C. Ianes, J. Weisner, L. Heintze, M. P. Müller, C. Pichlo, J. Charl, E. Brunstein, J. Ewert, M. Lehr et al., *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* **2019**.
- [104] D. Manna, S. Verma, *ChemMedChem* **2020**.
- [105] Y.-H. Jin, M.-C. Lu, Y. Wang, W.-X. Shan, X.-Y. Wang, Q.-D. You, Z.-Y. Jiang, *Journal of medicinal chemistry* **2020**.
- [106] R. Siewertsen, H. Neumann, B. Buchheim-Stehn, R. Herges, C. Näther, F. Renth, F. Temps, *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 15594.
- [107] R. Siewertsen, J. B. Schönborn, B. Hartke, F. Renth, F. Temps, *Physical chemistry chemical physics : PCCP* **2011**, *13*, 1054.
- [108] T. Tellkamp, J. Shen, Y. Okamoto, R. Herges, *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, *2014*, 5456.
- [109] M. Hammerich, C. Schütt, C. Stähler, P. Lentjes, F. Röhricht, R. Höppner, R. Herges, *Journal of the American Chemical Society* **2016**, *138*, 13111.
- [110] J. Trads, K. Hüll, B. Matsuura, L. Laprell, T. Fehrentz, N. Görldt, K. A. Kozek, D. Weaver, N. Klöcker, D. Barber et al., *Sign Inversion in Photopharmacology. Incorporation of Cyclic Azobenzenes in Photoswitchable Potassium Channel Blockers and Openers*, **2019**.

- [111] E. R. Thapaliya, J. Zhao, G. C. R. Ellis-Davies, *ACS chemical neuroscience* **2019**, *10*, 2481.
- [112] N. Preußke, W. Moormann, K. Bamberg, M. Lipfert, R. Herges, F. D. Sönnichsen, *Organic & biomolecular chemistry* **2020**, *18*, 2650.
- [113] F. Eljabu, J. Dhruval, H. Yan, *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2015**, *25*, 5594.
- [114] J. Engels, E. J. Schlaeger, *J. Med. Chem.* **1977**, *20*, 907.
- [115] J. H. Kaplan, B. Forbush, J. F. Hoffman, *Biochemistry* **1978**, *17*, 1929.
- [116] T. M. Gomez, N. C. Spitzer, *Nature* **1999**, *397*, 350.
- [117] H. W. Mbatia, H. M. Dhammika Bandara, S. C. Burdette, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 5331.
- [118] M. J. Rose, P. K. Mascharak, *Coordination Chemistry Reviews* **2008**, *252*, 2093.
- [119] L. Kammari, L. Plístil, J. Wirz, P. Klán, *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* **2007**, *6*, 50.
- [120] J. W. Walker, S. H. Gilbert, R. M. Drummond, M. Yamada, R. Sreekumar, R. E. Carraway, M. Ikebe, F. S. Fay, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1997**, *95*, 1568.
- [121] G. C. R. Ellis-Davies, M. Matsuzaki, M. Paukert, H. Kasai, D. E. Bergles, *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **2007**, *27*, 6601.
- [122] S. Kantevari, M. Matsuzaki, Y. Kanemoto, H. Kasai, G. C. R. Ellis-Davies, *Nat. Methods* **2009**, *7*, 123–125.
- [123] A. R. Morckel, H. Lusic, L. Farzana, J. A. Yoder, A. Deiters, N. M. Nascone-Yoder, *J. Cell Sci.* **2012**, *125*, 437–442.
- [124] J. S. Wood, M. Koszelak, J. Liu, D. S. Lawrence, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 7145.
- [125] A. Döbber, A. F. Phoa, R. H. Abbassi, B. W. Stringer, B. W. Day, T. G. Johns, M. Abadleh, C. Peifer, L. Munoz, *ACS medicinal chemistry letters* **2017**, *8*, 395.
- [126] H. Ando, T. Furuta, R. Y. Tsien, H. Okamoto, *Nature Genetics* **2001**, *28*, 317–325.
- [127] G. Marriott, *Biochemistry* **2002**, *33*, 9092.
- [128] P. Klán, T. Šolomek, C. G. Bochet, A. Blanc, R. Givens, M. Rubina, V. Popik, A. Kostikov, J. Wirz, *Chemical Reviews* **2013**, *113*, 119.
- [129] T. Šolomek, J. Wirz, P. Klán, *Accounts of chemical research* **2015**, *48*, 3064.
- [130] A. P. Pelliccioli, J. Wirz, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1*, 441.
- [131] T. Slanina, P. Shrestha, E. Palao, D. Kand, J. A. Peterson, A. S. Dutton, N. Rubinstein, R. Weinstain, A. H. Winter, P. Klán, *Journal of the American Chemical Society* **2017**, *139*, 15168.
- [132] N. Umeda, H. Takahashi, M. Kamiya, T. Ueno, T. Komatsu, T. Terai, K. Hanaoka, T. Nagano, Y. Urano, *ACS chemical biology* **2014**, *9*, 2242.
- [133] N. Rubinstein, P. Liu, E. W. Miller, R. Weinstain, *Chemical communications (Cambridge, England)* **2015**, *51*, 6369.
- [134] A. Y. Vorobev, A. E. Moskalensky, *Computational and structural biotechnology journal* **2020**, *18*, 27.
- [135] H. Yu, J. Li, D. Wu, Z. Qiu, Y. Zhang, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 464.
- [136] M. J. Hansen, W. A. Velema, M. M. Lerch, W. Szymanski, B. L. Feringa, *Chemical Society reviews* **2015**, *44*, 3358.
- [137] A. Deiters, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 47.
- [138] T. Solomek, S. Mercier, T. Bally, C. G. Bochet, *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* **2012**, *11*, 548.

- [139] R. Horbert, B. Pinchuk, P. Davies, D. Alessi, C. Peifer, *ACS chemical biology* **2015**, *10*, 2099.
- [140] M. Zindler, B. Pinchuk, C. Renn, R. Horbert, A. Döbber, C. Peifer, *ChemMedChem* **2015**, *10*, 1335.
- [141] B. Pinchuk, T. von Drathen, V. Opel, C. Peifer, *ACS medicinal chemistry letters* **2016**, *7*, 962.
- [142] D. Bliman, J. R. Nilsson, P. Kettunen, J. Andréasson, M. Grötli, *Scientific reports* **2015**, *5*, 13109.
- [143] D. Kolarski, A. Sugiyama, G. Breton, C. Rakers, D. Ono, A. Schulte, F. Tama, K. Itami, W. Szymanski, T. Hirota et al., *Journal of the American Chemical Society* **2019**, *141*, 15784.
- [144] C. L. Fleming, S. Li, M. Grötli, J. Andréasson, *Journal of the American Chemical Society* **2018**, *140*, 14069.
- [145] J. G. Arroyo, P. B. Jones, N. A. Porter, D. L. Hatchell, *Thromb Haemost* **2019**, *78*, 791.
- [146] S. Mayur, T. Kannappan, S. Mou-Ling, W. L. T, B. J. H, P. I. R, P. T. G, *Heteroatom Chem.* **1990**, *1*, 389.
- [147] R. Ziessel, G. Ulrich, A. Harriman, *New J. Chem.* **2007**, *31*, 496.
- [148] X.-F. Zhang, G. Q. Zhang, J. Zhu, *Journal of fluorescence* **2019**, *29*, 407.
- [149] J. Zou, Z. Yin, K. Ding, Q. Tang, J. Li, W. Si, J. Shao, Q. Zhang, W. Huang, X. Dong, *ACS applied materials & interfaces* **2017**, *9*, 32475.
- [150] A. Kamkaew, S. H. Lim, H. B. Lee, L. V. Kiew, L. Y. Chung, K. Burgess, *Chemical Society reviews* **2013**, *42*, 77.
- [151] W. M. Gallagher, L. T. Allen, C. O'Shea, T. Kenna, M. Hall, A. Gorman, J. Killoran, D. F. O'Shea, *British journal of cancer* **2005**, *92*, 1702.
- [152] S. G. Awuah, J. Polreis, V. Biradar, Y. You, *Organic letters* **2011**, *13*, 3884.
- [153] K. Sitkowska, B. L. Feringa, W. Szymański, *The Journal of organic chemistry* **2018**, *83*, 1819.
- [154] R. Schmidt, D. Geissler, V. Hagen, J. Bendig, *The Journal of Physical Chemistry A* **2007**, *111*, 5768.
- [155] P. P. Goswami, A. Syed, C. L. Beck, T. R. Albright, K. M. Mahoney, R. Unash, E. A. Smith, A. H. Winter, *Journal of the American Chemical Society* **2015**, *137*, 3783.
- [156] J. A. Peterson, C. Wijesooriya, E. J. Gehrman, K. M. Mahoney, P. P. Goswami, T. R. Albright, A. Syed, A. S. Dutton, E. A. Smith, A. H. Winter, *Journal of the American Chemical Society* **2018**, *140*, 7343.
- [157] M. Kawatani, M. Kamiya, H. Takahashi, Y. Urano, *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2018**, *28*, 1.
- [158] N. P. Toupin, K. Arora, P. Shrestha, J. A. Peterson, L. J. Fischer, E. Rajagurubandara, I. Podgorski, A. H. Winter, J. J. Kodanko, *ACS chemical biology* **2019**, *14*, 2833.
- [159] D. Kand, P. Liu, M. X. Navarro, L. J. Fischer, L. Rousso-Noori, D. Friedmann-Morvinski, A. H. Winter, E. W. Miller, R. Weinstein, *Journal of the American Chemical Society* **2020**, *142*, 4970.
- [160] K. Sitkowska, M. F. Hoes, M. M. Lerch, L. N. Lameijer, P. van der Meer, W. Szymański, B. L. Feringa, *Chemical communications (Cambridge, England)* **2020**, *56*, 5480.
- [161] E. R. Thapaliya, M. M. A. Mazza, J. Cusido, J. D. Baker, F. M. Raymo, *ChemPhotoChem* **2020**, 619251.

- [162] A. Takeda, T. Komatsu, H. Nomura, M. Naka, N. Matsuki, Y. Ikegaya, T. Terai, T. Ueno, K. Hanaoka, T. Nagano et al., *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **2016**, *17*, 1233.
- [163] J. Killoran, L. Allen, J. F. Gallagher, W. M. Gallagher, D. F. O'Shea, *Chemical communications (Cambridge, England)* **2002**, 1862.
- [164] A. Gorman, J. Killoran, C. O'Shea, T. Kenna, W. M. Gallagher, D. F. O'Shea, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 10619.
- [165] T. Rodat, M. Krebs, A. Döbber, B. Jansen, A. Steffen-Heins, K. Schwarz, C. Peifer, *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* **2020**.
- [166] O. Raab, *Z. biol.* **1900**, *39*, 524.
- [167] A. Jodlbauer, H. von Tappeiner, *Münch Med Wochenschr* **1904**, *52*, 1139.
- [168] Z. Zhou, J. Song, L. Nie, X. Chen, *Chemical Society reviews* **2016**, *45*, 6597.
- [169] L. Rink, A. Kruse, H. Haase, *Immunologie für Einsteiger*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2015**.
- [170] P. Mroz, A. Yaroslavsky, G. B. Kharkwal, M. R. Hamblin, *Cancers* **2011**, *3*, 2516.
- [171] Q. Xiao, J. Wu, X. Pang, Y. Jiang, P. Wang, A. W. Leung, L. Gao, S. Jiang, C. Xu, *Current medicinal chemistry* **2018**, *25*, 839.
- [172] X.-F. Zhang, X. Yang, *The journal of physical chemistry. B* **2013**, *117*, 9050.
- [173] T. Yogo, Y. Urano, Y. Ishitsuka, F. Maniwa, T. Nagano, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 12162.
- [174] E. Ucar, O. Seven, D. Lee, G. Kim, J. Yoon, E. U. Akkaya, *ChemPhotoChem* **2019**, *27*, 1604053.
- [175] M. J. Ortiz, A. R. Agarrabeitia, G. Duran-Sampedro, J. Bañuelos Prieto, T. A. Lopez, W. A. Massad, H. A. Montejano, N. A. García, I. Lopez Arbeloa, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 1153.
- [176] D. K. P. Ng, W. Shi, S. Zhao, P.-C. Lo, *ChemPhotoChem* **2019**.
- [177] R. D. Moriarty, A. Martin, K. Adamson, E. O'Reilly, P. Mollard, R. J. Forster, T. E. Keyes, *Journal of microscopy* **2014**, *253*, 204.
- [178] C. S. Kue, S. Y. Ng, S. H. Voon, A. Kamkaew, L. Y. Chung, L. V. Kiew, H. B. Lee, *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* **2018**, *17*, 1691.
- [179] T. Komatsu, D. Oushiki, A. Takeda, M. Miyamura, T. Ueno, T. Terai, K. Hanaoka, Y. Urano, T. Mineno, T. Nagano, *Chemical communications (Cambridge, England)* **2011**, *47*, 10055.
- [180] N. E. M. Kaufman, Q. Meng, K. E. Griffin, S. S. Singh, A. Dahal, Z. Zhou, F. R. Fronczek, J. M. Mathis, S. D. Jois, M. G. H. Vicente, *Journal of medicinal chemistry* **2019**, *62*, 3323.
- [181] O. Karaman, T. Almammadov, E. Gedik, G. Gunaydin, S. Kolemen, G. Gunbas, *ChemMedChem* **2019**.
- [182] A. M. Durantini, L. E. Greene, R. Lincoln, S. R. Martínez, G. Cosa, *Journal of the American Chemical Society* **2016**, *138*, 1215.
- [183] Z. Ruan, W. Miao, P. Yuan, L. Le, L. Jiao, E. Hao, L. Yan, *Bioconjugate chemistry* **2018**, *29*, 3441.
- [184] D. Chen, Q. Tang, J. Zou, X. Yang, W. Huang, Q. Zhang, J. Shao, X. Dong, *Advanced healthcare materials* **2018**, *7*, e1701272.
- [185] D. K. Deda, K. Araki, *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2015**.

- [186] C. Naidoo, C. A. Kruger, H. Abrahamse, *Technology in cancer research & treatment* **2018**, *17*, 1533033818791795.
- [187] W. Jerjes, T. A. Theodossiou, H. Hirschberg, A. Høgset, A. Weyergang, P. K. Selbo, Z. Hamdoon, C. Hopper, K. Berg, *Journal of clinical medicine* **2020**, *9*.
- [188] O.-J. Norum, P. K. Selbo, A. Weyergang, K.-E. Giercksky, K. Berg, *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* **2009**, *96*, 83.
- [189] P. K. Selbo, M. Bostad, C. E. Olsen, V. T. Edwards, A. Høgset, A. Weyergang, K. Berg, *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* **2015**, *14*, 1433.
- [190] M. L. Agazzi, M. B. Ballatore, A. M. Durantini, E. N. Durantini, A. C. Tomé, *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* **2019**, *40*, 21.
- [191] J. Zhang, C. Jiang, J. P. Figueiró Longo, R. B. Azevedo, H. Zhang, L. A. Muehlmann, *Acta pharmaceutica Sinica. B* **2018**, *8*, 137.
- [192] J. Y. Choi, G. T. Park, E. Y. Na, H. S. Wi, S.-C. Lee, J.-B. Lee, *Journal of dermatological science* **2010**, *58*, 198.
- [193] J. Mendoza-Garcia, A. Sebastian, T. Alonso-Rasgado, A. Bayat, *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* **2015**, *23*, 685.
- [194] K. Huang, B. Huo, D. Li, J. Xue, J. Chen, *ChemMedChem* **2020**, *15*, 794.
- [195] D. Schmidt, T. Rodat, L. Heintze, J. Weber, R. Horbert, U. Girreser, T. Raeker, L. Bußmann, M. Kriegs, B. Hartke et al., *ChemMedChem* **2018**, *13*, 2415.
- [196] A. Hoeben, B. Landuyt, M. S. Highley, H. Wildiers, A. T. van Oosterom, E. A. de Bruijn, *Pharmacological reviews* **2004**, *56*, 549.
- [197] F. Musumeci, M. Radi, C. Brullo, S. Schenone, *Journal of medicinal chemistry* **2012**, *55*, 10797.
- [198] J. Rössler, Y. Monnet, F. Farace, P. Opolon, E. Daudigeos-Dubus, A. Bourredjem, G. Vassal, B. Georger, *International journal of cancer* **2011**, *128*, 2748.
- [199] F. A. L. M. Eskens, J. Verweij, *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* **2006**, *42*, 3127.
- [200] S. A. Stacker, C. Caesar, M. E. Baldwin, G. E. Thornton, R. A. Williams, R. Prevo, D. G. Jackson, S. Nishikawa, H. Kubo, M. G. Achen, *Nature medicine* **2001**, *7*, 186.
- [201] J. D. Hood, C. J. Meininger, M. Ziche, H. J. Granger, *The American journal of physiology* **1998**, *274*, H1054-8.
- [202] L. Fiedler (Hrsg.) *Methods in molecular biology, v. 1332*, Humana Press, New York, NY, **2015**.
- [203] L. Kuhl, Masterarbeit, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel **2015**.
- [204] D. Schmidt, Dissertation, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel **2019**.
- [205] L. Heintze, Aktuelle Arbeiten, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel **2020**.
- [206] L. Jamalzadeh, H. Ghafoori, R. Sariri, H. Rabuti, J. Nasirzade, H. Hasani, M. R. Aghamaali, *Avicenna J Med Biochem* **2016**, *In press*.
- [207] D. D. Hu-Lowe, H. Y. Zou, M. L. Grazzini, M. E. Hallin, G. R. Wickman, K. Amundson, J. H. Chen, D. A. Rewolinski, S. Yamazaki, E. Y. Wu et al., *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2008**, *14*, 7272.
- [208] J. Ewert, Aktuelle Arbeiten, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel **2020**.
- [209] C. M. Beneker, M. Rovoli, G. Kontopidis, M. Röring, S. Galda, S. Braun, T. Brummer, C. McInnes, *Journal of medicinal chemistry* **2019**, *62*, 3886.

- [210] S. Wenglow sky, K. A. Ahrendt, A. J. Buckmelter, B. Feng, S. L. Gloor, S. Gradl, J. Grina, J. D. Hansen, E. R. Laird, P. Lunghofer et al., *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2011**, *21*, 5533.
- [211] C. H. Adelm ann, G. Ching, L. Du, R. C. Saporito, V. Bansal, L. J. Pence, R. Liang, W. Lee, K. Y. Tsai, *Oncotarget* **2016**, *7*, 30453.
- [212] A. D. Cox, C. J. Der, *Cancer cell* **2010**, *17*, 221.
- [213] Y. Sugiyama, N. Hatano, N. Sueyoshi, I. Suetake, S. Tajima, E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, T. Koike, I. Kameshita, *The Biochemical journal* **2010**, *427*, 489.
- [214] C. Penas, V. Ramachandran, S. Simanski, C. Lee, F. Madoux, R. J. Rahaim, R. Chauhan, O. Barnaby, S. Schurer, P. Hodder et al., *The Journal of biological chemistry* **2014**, *289*, 18893.
- [215] S. Amit, A. Hatzubai, Y. Birman, J. S. Andersen, E. Ben-Shushan, M. Mann, Y. Ben-Neriah, I. Alkalay, *Genes & development* **2002**, *16*, 1066.
- [216] N. Barker, H. Clevers, *Nature reviews. Drug discovery* **2006**, *5*, 997.
- [217] G. Giamas, L. Castellano, Q. Feng, U. Knippschild, J. Jacob, R. S. Thomas, R. C. Coombes, C. L. Smith, L. R. Jiao, J. Stebbing, *Nucleic acids research* **2009**, *37*, 3110.
- [218] A. Gréchez-Cassiau, C. Feillet, S. Guérin, F. Delaunay, *Chronobiology international* **2015**, *32*, 774.
- [219] H. Lee, J. W. Lee, *Future medicinal chemistry* **2019**, *11*, 2621.
- [220] P. Xu, C. Ianes, F. Gärtner, C. Liu, T. Burster, V. Bakulev, N. Rachidi, U. Knippschild, J. Bischof, *Gene* **2019**, *715*, 144005.
- [221] U. Knippschild, M. Krüger, J. Richter, P. Xu, B. García-Reyes, C. Peifer, J. Halekotte, V. Bakulev, J. Bischof, *Frontiers in oncology* **2014**, *4*, 96.
- [222] A. Yamamoto, A. Friedlein, Y. Imai, R. Takahashi, P. J. Kahle, C. Haass, *The Journal of biological chemistry* **2005**, *280*, 3390.
- [223] Z. Meng, J. Bischof, C. Ianes, D. Henne-Bruns, P. Xu, U. Knippschild, *Amino Acids* **2016**, *48*, 1185.
- [224] A. Puerta, A. R. Galán, M. X. Fernandes, J. M. Padrón, *J. Mol. Clin. Med.* **2018**, *1*.
- [225] G. Cozza, L. A. Pinna, *Expert opinion on therapeutic targets* **2016**, *20*, 319.
- [226] E. A. Mosser, C. N. Chiu, T. K. Tamai, T. Hirota, S. Li, M. Hui, A. Wang, C. Singh, A. Giovanni, S. A. Kay et al., *Scientific reports* **2019**, *9*, 12405.
- [227] J. Bieler, R. Cannavo, K. Gustafson, C. Gobet, D. Gatfield, F. Naef, *Molecular systems biology* **2014**, *10*, 739.
- [228] T. Hirota, S. A. Kay, *Methods in enzymology* **2015**, *551*, 267.
- [229] T. Hirota, J. W. Lee, W. G. Lewis, E. E. Zhang, G. Breton, X. Liu, M. Garcia, E. C. Peters, J.-P. Etchegaray, D. Traver et al., *PLoS biology* **2010**, *8*, e1000559.
- [230] D. Kolarski, Dissertation, Rijksuniversiteit Groningen **2020**.
- [231] L. Witt, Dissertation, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel **2019**.
- [232] J. Halekotte, L. Witt, C. Ianes, M. Krüger, M. Bührmann, D. Rauh, C. Pichlo, E. Brunstein, A. Luxenburger, U. Baumann et al., *Molecules (Basel, Switzerland)* **2017**, *22*.
- [233] M. TAKAHASHI, *International journal of oncology* **1994**.
- [234] L. M. Mulligan, *Nature reviews. Cancer* **2014**, *14*, 173.
- [235] E. Arighi, M. G. Borrello, H. Sariola, *Cytokine & growth factor reviews* **2005**, *16*, 441.
- [236] M. A. Kouvaraki, S. E. Shapiro, N. D. Perrier, G. J. Cote, R. F. Gagel, A. O. Hoff, S. I. Sherman, J. E. Lee, D. B. Evans, *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* **2005**, *15*, 531.
- [237] I. Plaza-Menacho, L. Mologni, N. Q. McDonald, *Cellular signalling* **2014**, *26*, 1743.

- [238] M. Garcia-Barceló, M.-H. Sham, W.-S. Lee, V. C.-H. Lui, B. L.-S. Chen, K. K.-Y. Wong, J. S.-W. Wong, P. K.-H. Tam, *Clinical chemistry* **2004**, *50*, 93.
- [239] Y. Xu, Aktuelle Arbeiten, Göteborgs Universitet **2020**.
- [240] P. Dinér, J. P. Alao, J. Söderlund, P. Sunnerhagen, M. Grötli, *Journal of medicinal chemistry* **2012**, *55*, 4872.
- [241] M. Labots, K. J. Gotink, H. Dekker, K. Azijli, J. C. van der Mijn, C. M. Huijts, S. R. Piersma, C. R. Jiménez, H. M. W. Verheul, *Experimental & molecular medicine* **2016**, *48*, e279.
- [242] M. Labots, J. C. van der Mijn, H. Dekker, R. Ruijter, T. V. Pham, H. J. van der Vliet, J. J. M. van der Hoeven, G. A. Meijer, H. M. W. Verheul, *The Oncologist* **2018**, *23*, 1135-e118.
- [243] R. Hilhorst, L. Houkes, M. Mommersteeg, J. Musch, A. van den Berg, R. Ruijtenbeek in *Gene Regulation: Methods and Protocols* (Hrsg.: M. Bina), Humana Press, Totowa, NJ, **2013**, S. 259–271.
- [244] S. Crespi, N. A. Simeth, B. König, *Nat Rev Chem* **2019**, *3*, 133.
- [245] N. J. Dunn, W. H. Humphries, A. R. Offenbacher, T. L. King, J. A. Gray, *The journal of physical chemistry. A* **2009**, *113*, 13144.
- [246] C. E. Weston, R. D. Richardson, M. J. Fuchter, *Chemical communications (Cambridge, England)* **2016**, *52*, 4521.
- [247] M. Malumbres, *Genome Biol* **2014**, *15*, 122.
- [248] U. Asghar, A. K. Witkiewicz, N. C. Turner, E. S. Knudsen, *Nature reviews. Drug discovery* **2015**, *14*, 130.
- [249] E. Noguchi, M. C. Gadaleta (Hrsg.) *SpringerLink Bücher, Vol. 1170*, Humana Press, New York, NY, **2014**.
- [250] S. Tadesse, E. Caldon, W. Tilley, S. Wang, *Journal of medicinal chemistry* **2018**.
- [251] Z. Zhou, H. Jiang, J. Xia, J. Zhang, *International journal of oncology* **2020**.
- [252] M. Orzáez, M. S. Medina, E. Pérez-Payá (Hrsg.) *Springer protocols, Vol. 1336*, Humana Pr, New York, **2016**.
- [253] J. A. Beaver, L. Amiri-Kordestani, R. Charlab, W. Chen, T. Palmby, A. Tilley, J. F. Zirkelbach, J. Yu, Q. Liu, L. Zhao et al., *Clinical Cancer Research* **2015**, *21*, 4760.
- [254] N. R. Brown, E. D. Lowe, E. Petri, V. Skamnaki, R. Antrobus, L. N. Johnson, *Cell Cycle* **2007**, *6*, 1350.
- [255] R. Honda, E. D. Lowe, E. Dubinina, V. Skamnaki, A. Cook, N. R. Brown, L. N. Johnson, *The EMBO journal* **2005**, *24*, 452.
- [256] Y. Ge, W. Lei, Y. Ma, Y. Wang, B. Wei, X. Chen, G. Ru, X. He, X. Mou, S. Wang, *Molecular Medicine Reports* **2017**, *15*, 3521.
- [257] D. R. Camidge, D. Smethurst, J. Growcott, N. C. Barrass, J. R. Foster, S. Febbraro, H. Swaisland, A. Hughes, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **2007**, *60*, 391.
- [258] David E. MacCallum, Jean Melville, Sheelagh Frame, Kathryn Watt, Sian Anderson.
- [259] S. Diab, M. Yu, S. Wang, *Journal of medicinal chemistry* **2020**.
- [260] C. M. Olson, B. Jiang, M. A. Erb, Y. Liang, Z. M. Doctor, Z. Zhang, T. Zhang, N. Kwiatkowski, M. Boukhali, J. L. Green et al., *Nature chemical biology* **2018**, *14*, 163.
- [261] K. F. Byth, A. Thomas, G. Hughes, C. Forder, A. McGregor, C. Geh, S. Oakes, C. Green, M. Walker, N. Newcombe et al., *Molecular cancer therapeutics* **2009**, *8*, 1856.
- [262] P. Raghavan, V. Tumati, L. Yu, N. Chan, N. Tomimatsu, S. Burma, R. G Bristow, D. Saha, *International journal of radiation oncology, biology, physics* **2012**, *84*, e507-e514.
- [263] A. Döbber, Dissertation, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel **2018**.
- [264] Y. N. Kang, J. A. Stuckey, *PDB* **2013**.

- [265] C. J. Hastie, H. J. McLauchlan, P. Cohen, *Nature Protocols* **2006**, *1*, 968–971.
- [266] J. Cicens, M. Valius, *Journal of cancer research and clinical oncology* **2011**, *137*, 1409.
- [267] R. S. TWIGG, *Nature* **1945**, *155*, 401.
- [268] N. Adarsh, R. R. Avirah, D. Ramaiah, *Organic letters* **2010**, *12*, 5720.
- [269] M. Gorbe, A. M. Costero, F. Sancenón, R. Martínez-Mañez, R. Ballesteros-Cillero, L. E. Ochando, K. Chulvi, R. Gotor, S. Gil, *Dyes and Pigments* **2019**, *160*, 198.
- [270] C.-L. Sun, C. Wang, R. Boulatov, *ChemPhotoChem* **2019**, *82*, 894.
- [271] N. A. Ludin, A. M. Al-Alwani Mahmoud, A. Bakar Mohamad, A. A. H. Kadhum, K. Sopian, N. S. Abdul Karim, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2014**, *31*, 386.
- [272] G. Naren, C.-W. Hsu, S. Li, M. Morimoto, S. Tang, J. Hernando, G. Guirado, M. Irie, F. M. Raymo, H. Sundén et al., *Nature communications* **2019**, *10*, 3996.
- [273] J. Shi, F. Wang, S. Liu, *Biophysics reports* **2016**, *2*, 1.
- [274] M. Ono, H. Watanabe, Y. Ikehata, N. Ding, M. Yoshimura, K. Sano, H. Saji, *Scientific reports* **2017**, *7*, 3337.
- [275] Y. Sun, C. Kang, F. Liu, Y. Zhou, L. Luo, H. Qiao, *Drug development research* **2017**, *78*, 283.
- [276] S. Liras, K. F. McClure, *ACS medicinal chemistry letters* **2019**, *10*, 1026.
- [277] R. E. Kast, A. P. Michael, I. Sardi, T. C. Burns, T. Heiland, G. Karpel-Massler, F. G. Kamar, M.-E. Halatsch, *Brain sciences* **2020**, *10*.
- [278] M. Krebs, Aktuelle Arbeiten, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel **2020**.
- [279] P. A. Čerenkov, *Phys. Rev.* **1937**, *52*, 378.
- [280] J. Axelsson, S. C. Davis, D. J. Gladstone, B. W. Pogue, *Medical physics* **2011**, *38*, 4127.
- [281] R. H. Eldrick, R. P. Parker, *International Journal of Applied Radiation and Isotopes* **1968**, *19*, 264.
- [282] V. Le Joncour, P. Laakkonen, *Bioorganic & medicinal chemistry* **2018**, *26*, 2797.
- [283] X. Feng, J. Yao, X. Gao, Y. Jing, T. Kang, Di Jiang, T. Jiang, J. Feng, Q. Zhu, X. Jiang et al., *ACS applied materials & interfaces* **2015**, *7*, 27885.
- [284] K. K. Jain, *Expert review of neurotherapeutics* **2007**, *7*, 363.
- [285] Y.-C. Tsai, P. Vijayaraghavan, W.-H. Chiang, H.-H. Chen, T.-I. Liu, M.-Y. Shen, A. Omoto, M. Kamimura, K. Soga, H.-C. Chiu, *Theranostics* **2018**, *8*, 1435.
- [286] E. Rinde, W. Troll, *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **1975**, *55*, 181.
- [287] M. A. Brown, S. C. de Vito, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* **1993**, *23*, 249.
- [288] K.-T. Chung, C. E. Cerniglia, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* **1992**, *277*, 201.
- [289] W. G. Levine, *Drug metabolism reviews* **1991**, *23*, 253.
- [290] T. M. Reid, K. C. Morton, C. Y. Wang, C. M. King, *Environmental mutagenesis* **1984**, *6*, 705.
- [291] C. P. Sherwin, W. A. Hynes, *Journal of Biological Chemistry* **1921**, *47*, 297.
- [292] J. Zou, P. Wang, Y. Wang, G. Liu, Y. Zhang, Q. Zhang, J. Shao, W. Si, W. Huang, X. Dong, *Chemical science* **2019**, *10*, 268.
- [293] Z. Li, Q.-Y. Chen, P.-D. Wang, Y. Wu, *RSC Adv.* **2013**, *3*, 5524.
- [294] L. Yang, Y.-J. Ji, J.-F. Yin, Y. Wu, H. Fan, Y. Zhang, G.-C. Kuang, *Soft matter* **2016**, *12*, 8581.
- [295] B. C. Das, P. Thapa, R. Karki, C. Schinke, S. Das, S. Kambhampati, S. K. Banerjee, P. van Veldhuizen, A. Verma, L. M. Weiss et al., *Future medicinal chemistry* **2013**, *5*, 653.

- [296] D. W. Rusnak, K. Lackey, K. Affleck, E. R. Wood, K. J. Alligood, N. Rhodes, B. R. Keith, D. M. Murray, W. B. Knight, R. J. Mullin et al., *Molecular cancer therapeutics* **2001**, *1*, 85.
- [297] D. Längle, F. Wesseler, D. Flötgen, H. Leek, A. T. Plowright, D. Schade, *Chemical communications (Cambridge, England)* **2019**, *55*, 4323.
- [298] D. Längle, T. R. Werner, F. Wesseler, E. Reckzeh, N. Schaumann, L. Drowley, M. Polla, A. T. Plowright, M. N. Hirt, T. Eschenhagen et al., *ChemMedChem* **2019**, *14*, 810.
- [299] X. Li, Z. Li, X. Wu, Z. Xiong, T. Yang, Z. Fu, X. Liu, X. Tan, F. Zhong, X. Wan et al., *Journal of medicinal chemistry* **2019**.
- [300] G. Rio, M.-J. Scholl, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1975**, 474.
- [301] Y. Usui, *Chem. Lett.* **1973**, *2*, 743.
- [302] J. F. Glickman in *Assay Guidance Manual* (Hrsg.: S. Markossian, G. S. Sittampalam, A. Grossman, K. Brimacombe, M. Arkin, D. Auld, C. P. Austin, J. Baell, J. M. M. Caaveiro, T. D. Y. Chung et al.), Bethesda (MD), **2004**.
- [303] C. D. Helgason, C. L. Miller (Hrsg.) *Springer protocols, Vol. 946*, Humana Press; Springer, New York, NY, New York, NY, **2013**.
- [304] M. M. Bradford, *Analytical Biochemistry* **1976**, *72*, 248.
- [305] C. Lee, *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2007**, *362*, 391.
- [306] T. Reinard, *Molekularbiologische Methoden*, 1. Aufl., Ulmer, Stuttgart, **2010**.
- [307] C. Zhang, G. Habets, G. Bollag, *Nature biotechnology* **2011**, *29*, 981.
- [308] T. Anastassiadis, S. W. Deacon, K. Devarajan, H. Ma, J. R. Peterson, *Nature biotechnology* **2011**, *29*, 1039.
- [309] W. P. Janzen (Hrsg.) *Springer protocols, Vol. 1439*, Humana Press, New York, **2016**.
- [310] H. Zegzouti, S. A. Goueli (Hrsg.) *SpringerLink Bücher, Vol. 1360*, Humana Press, New York, NY, **2016**.
- [311] J. C. Anderson, C. D. Willey, A. Mehta, K. Welaya, D. Chen, C. W. Duarte, P. Ghatalia, W. Arafat, A. Madan, S. Sudarshan et al., *PloS one* **2015**, *10*, e0139267.
- [312] J. M. M. J. G. Aarts, S. Wang, R. Houtman, R. M. G. J. van Beuningen, W. M. A. West-erink, B. J. van de Waart, I. M. C. M. Rietjens, T. F. H. Bovee, *Chemical research in toxicology* **2013**, *26*, 336.
- [313] A. Baharani, B. Trost, A. Kusalik, S. Napper, *Biochemical Society transactions* **2017**, *45*, 65.
- [314] A. Tahiri, K. Røe, A. H. Ree, R. de Wijn, K. Risberg, C. Busch, P. E. Lønning, V. Kris-tensen, J. Geisler, *PloS one* **2013**, *8*, e72692.
- [315] S. Arni, T. H. N. Le, R. de Wijn, R. Garcia-Villegas, M. Dankers, W. Weder, S. Hillinger, *Oncotarget* **2017**, *8*, 68599.
- [316] PamGene International B.V., PamStation12 Operator Manual **2009**.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

#	Nummer
%	Prozent
°C	Grad Celsius
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ACN	Acetonitril
ADME	Absorption, Distribution, Metabolismus, Elimination
AKT	Proteinkinase B
APE	Aminosäuresequenz: Alanin, Prolin, Glutaminsäure
ATP	Adenosin-5'-(trihydrogentriphosphat)
BCR-ABL	Fusionsprotein (<i>breakpoint cluster region</i> und <i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>)
BMAL	<i>brain and muscle ARNT-like protein</i>
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
BODIPY	<i>boron-dipyrromethene</i> <i>4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene</i>
BRAF	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i> bzw. <i>v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B</i>
CCD	<i>charge-coupled device</i>
CDK	<i>cyclin-dependent kinase</i>
CLOCK	<i>Circadian Locomotor Output Cycles Kaput</i>
CR	Circadianer Rhythmus

CRY	Cryptochrom
DFG	Aminosäuresequenz: Asparaginsäure, Phenylalanin, Glycin
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMNB	4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyl- bzw. 4,5-Dimethoxy-2-nitrosobenzaldehyd
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOI	<i>digital object identifier</i>
DPBF	1,3-Diphenylisobenzofuran
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>
ECGM2	<i>Endothelial Cell Growth Medium 2</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ESR	Elektronenspinresonanz
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GB	Gigabyte
h	Stunde
HER2	<i>erbB-2, human epidermal growth factor receptor</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
LED	<i>light-emitting diode</i>
M	Molar
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MB	Methylenblau

MDR1	<i>multi drug resistance</i>
MEK	MAPKK, <i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>
mmol, mM	Millimolar
M-PER	<i>Mammalian Protein Extraction Reagent</i>
NC-IUBMB	<i>Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i>
NIR	nahes Infrarot
nM	Nanomolar
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
p-	phospho-
PDB	Protein Data Bank
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PDGFR	<i>platelet derived growth factor receptor</i>
PDT	photodynamische Therapie
PER	period protein
PKA/C/G	Proteinkinase A/C/G
PPG	<i>photoremovable protecting groups</i>
PS	Photosensibilisator (<i>photosensitizer</i>)
PSS	Photostationäres Gleichgewicht, <i>photostationary state</i>
PTK	Phospho-Tyrosin-Kinase
RET	<i>rearranged during transfection</i>
RGD	Aminosäuresequenz: Arginin, Glycin und Asparaginsäure
RHO	<i>RAS homologue</i>

ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RPM	<i>revolutions per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis -</i>
smKI	<i>small molecule kinase inhibitor</i>
STK	Serin-Threonin-Kinase
t-	<i>total-</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
TMTH	2,3,7,8-Tetramethoxythianthren
UKE	Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg
UV/Vis	Licht im ultravioletten bis roten Spektrum
VEGFR	<i>vascular endothelial growth factor receptor</i>
WNT	<i>Wingless</i> und <i>Int-1</i>
μM	Mikromolar

8.2 Emissionsspektrum des Laborlichts

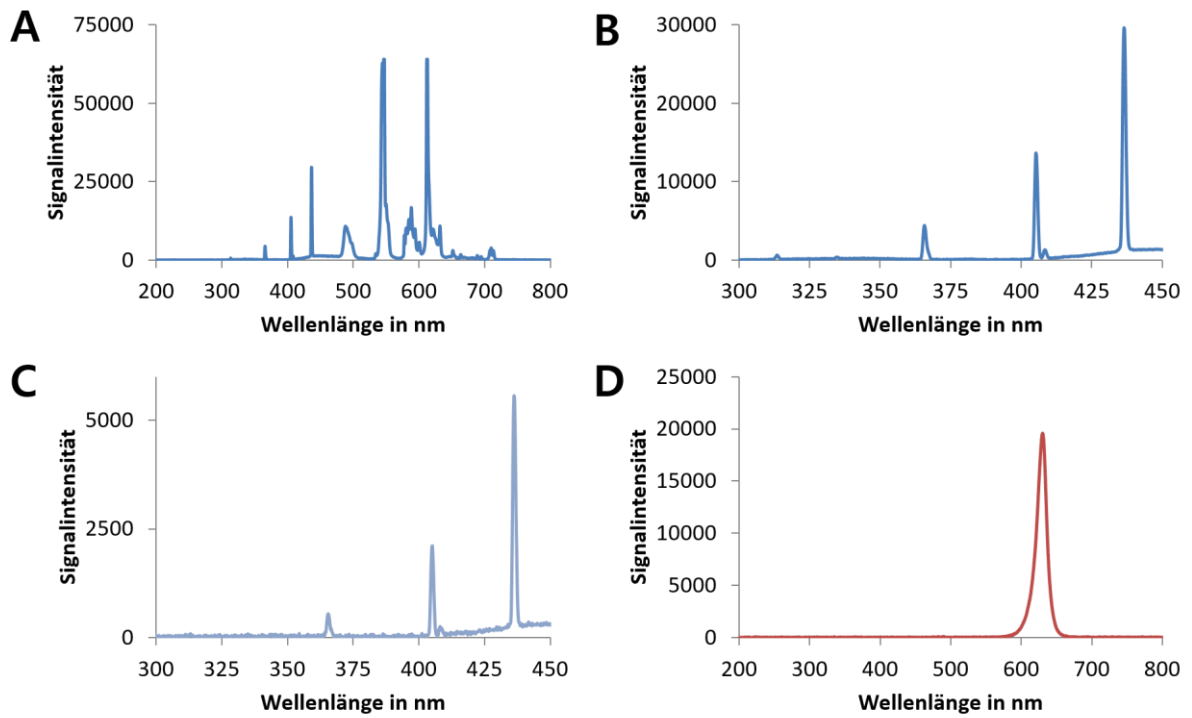


Abbildung 8.1. Emissionsspektren des Laborlichts.

A. Spektrum des normalen Laborlichts. **B.** Ausschnitt von **A** weist ein eindeutiges Emissionsmaximum bei ca. 365 nm auf. **C.** Ausschnitt des Laborlichts im Mikroreaktionsgefäß („Eppi“). Obwohl die Intensität geringer ist, ist immer noch eine Emission bei 365 nm messbar. **D.** Emissionsspektrum des Laborlichts unter kontrollierten Lichtbedingungen (Rotlicht und Ausschluss von Umgebungslicht durch verdunkelte Fenster). Die Intensitäten wurden nicht normiert.

8.3 Kinase-Screening der photoschaltbaren Chronomodulatoren

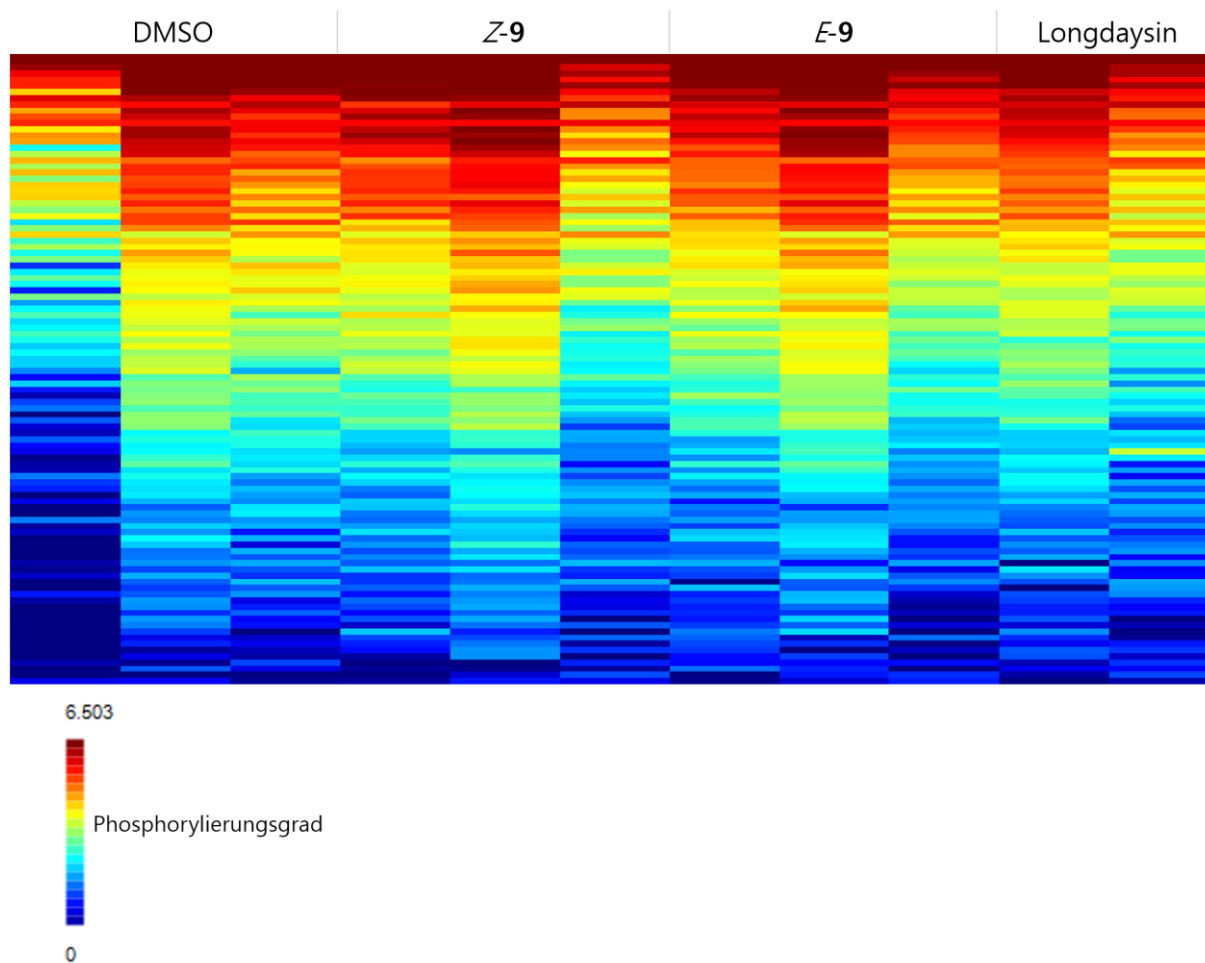


Abbildung 8.2. Hohe Streuung der Kinomaktivität zwischen den einzelnen Chips einer Charge.

Einzelmessungen der Kinomprofilierung von U2OS-Lysat weisen ein ungewöhnlich stark heterogenes Muster auf. Alle Chips wurden aus derselben Charge entnommen. Die Substanzkonzentration betrug 10 μM .

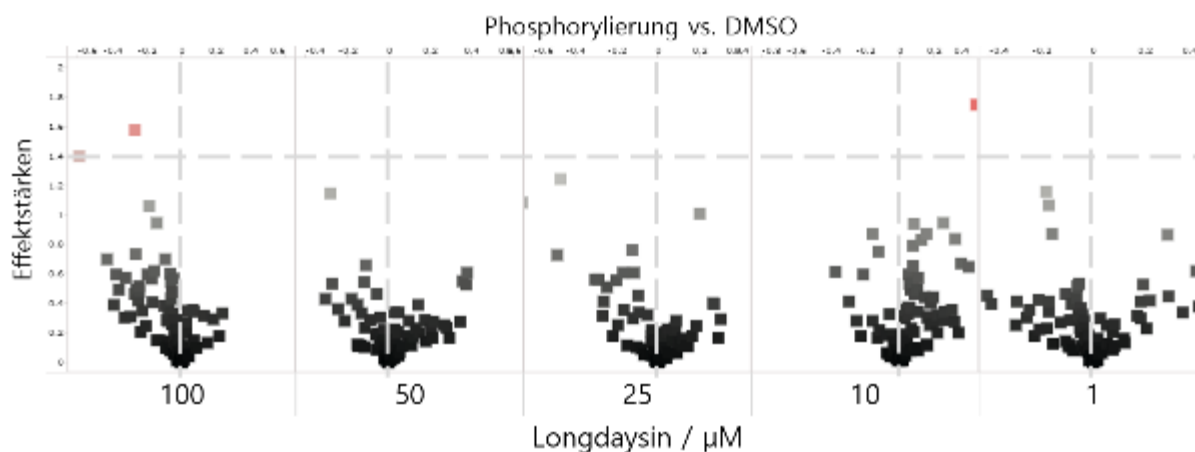


Abbildung 8.3. Kein konzentrationsabhängiger Effekt von Longdaysin auf U2OS Kinaseaktivität.

Peptidphosphorylierung von U2OS-Lysat bei Longdaysinbehandlung dargestellt im *volcano plot*. Kein eindeutiger Trend zu mehr oder weniger phosphorylierten Peptiden im Vergleich zu DMSO. Signifikanzniveau von $p = 0.05$ (Effektstärke = 1.4) wird bis auf zwei Ausnahmen stets unterschritten.

8.4 Chargenunterschiede der PamChips

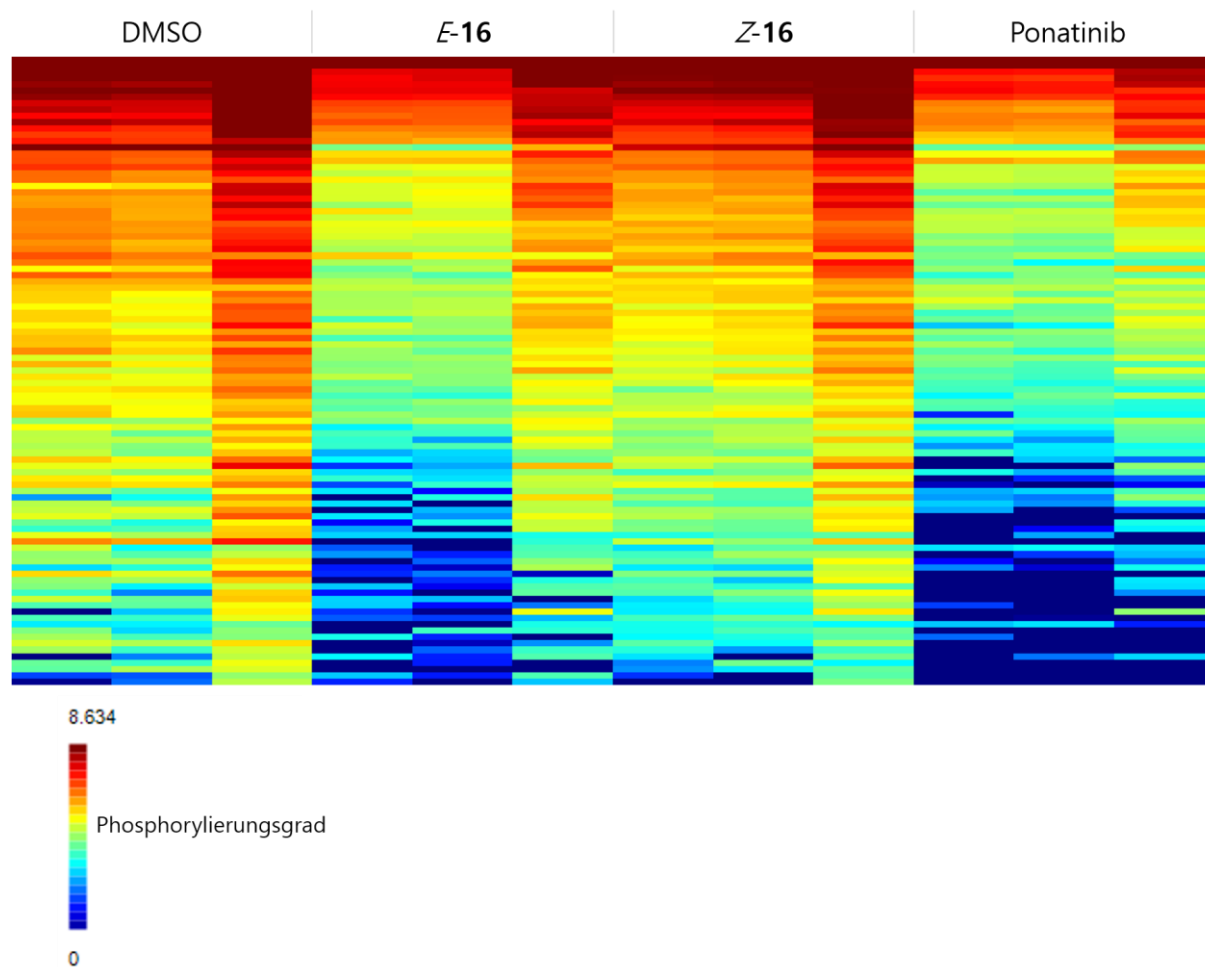


Abbildung 8.4. Kinom-Profilung der einzelnen PamChip-Arrays.

Die hohe Abweichung des Chips aus einer separaten Charge (jeweils dritte Spalte pro Bedingung) führte zum Ausschluss des letzten Chips. Die Substanzkonzentration betrug jeweils 10 μM .

Eidesstattliche Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Christian Peifer im Fachbereich Pharmazeutische und Medizinische Chemie des Pharmazeutischen Instituts der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel im Zeitraum von Februar 2017 bis August 2020 angefertigt.

Hiermit erkläre ich, Theo Rodat, an Eides statt, dass diese Abhandlung, abgesehen von der Beratung durch den Betreuer, nach Inhalt und Form eine eigenständige und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln verfasste Arbeit ist. Die Arbeit ist unter Einhaltung der guten wissenschaftlichen Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden, hat keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen und wurde auch nicht vorher veröffentlicht bzw. zur Veröffentlichung eingereicht. Mir wurde kein akademischer Grad entzogen und dies ist mein erster Promotionsversuch.

Kiel, August 2020

Theo Rodat

Teile dieser Arbeit wurden zum Zeitpunkt der Fertigstellung bereits an folgender Stelle veröffentlicht:

Axitinib: A Photoswitchable Approved Tyrosine Kinase Inhibitor

D. Schmidt, T. Rodat, L. Heintze, J. Weber, R. Horbert, U. Girreser, T. Raeker, L. Bußmann, M. Kriegs, B. Hartke, C. Peifer, *ChemMedChem* **2018**, *13*, 2415.

Light-controlled inhibition of BRAF^{V600E} kinase

M. W.H. Hoorens, M. E. Ourailidou, T. Rodat, P. E. van der Wouden, P. Kobauri, M. Kriegs, C. Peifer, B. L. Feringa, F. J. Dekker, W. Szymanski, *European Journal of Medicinal Chemistry* **2019**.

Restricted suitability of BODIPY for caging in biological applications based on singlet oxygen generation

T. Rodat, M. Krebs, A. Döbber, B. Jansen, A. Steffen-Heins, K. Schwarz, C. Peifer, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2020**.

Reproduced from Ref. ^[165] with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.

Danksagung

Zu aussagekräftigen Ergebnissen gelangt man in der Wissenschaft mittlerweile nicht mehr alleine, sondern nur mit einer Gemeinschaft von verlässlichen Partnern und Freunden. An dieser Stelle möchte ich mich bei einigen Personen bedanken, die mich während der letzten Jahre begleitet haben und ohne die all das nicht möglich gewesen wäre.

Zu aller erst möchte ich mich bei meinem Betreuer für die Gelegenheit bedanken, diese Arbeit zu schreiben. Christian, in der Zeit hast du nicht nur sehr gut meine Eigenständigkeit und Eigeninitiative gefördert, ich habe auch unsere politischen Gespräche über die Zukunft der Pharmazie und der Apothekerschaft genossen. Ich danke dir auch vielmals für die unglaublich vielen Gelegenheiten und Tagungen, die du mir ermöglicht hast, durch die meine Promotion etwas ganz Besonderes wurde. So habe ich dich während meiner Zeit am Institut nicht nur als Chef, sondern auch als Freund schätzen gelernt.

Meinem Schnorchellehrer Uwe möchte ich für die Erstellung des Zweitgutachtens danken. Highlight meines Ulmbesuchs war die Tour mit dir durch die Schwäbische Alb inklusive Blautopf und Höhlenerkundung. Ein Highlight meiner Promotion wiederum war der Athenbesuch mit allem, was dazugehörte. Vielen Dank auch an deine lieben Kollegen und Ehemaligen wie Joachim, Chiara und allen anderen.

Meinen wichtigsten Kooperationspartnern danke ich für die unfassbar ertragreiche Zusammenarbeit über das KCF im UKE. Malte, vielen Dank für die hilfreichen Besprechungen und, dass alles so reibungslos geklappt hat. Konstantin, ein ganz besonders großer Dank gilt dir für deinen Mut, dich mit mir in die (Dunkel-)Kammer des Schreckens zu begeben. Auch du bist während unserer Versuche über dich hinausgewachsen. Gut in Erinnerung bleiben werden mir unsere zahlreichen vielseitigen Gespräche über alle Serien und Probleme dieser Welt.

Wiktor, I would like to thank you firstly for the opportunity for two great collaborations and secondly for teaching me that good science can be only achieved through inspiration and passion. I would also like to thank Dusan and Mark for two great cooperation partners and their compounds.

Furthermore, I would like to thank Morten for establishing an awesome and productive cooperation between Kiel and *Gothenburg*. I also acknowledge Yongjin and Joakim for the compounds and your support. I will never forget our productive but entertaining video conferences.

A big thank you goes to Savi and Eddy from Pamgene for a warm welcome and an extensive training in Den Bosch. I would also like to thank you for the all-day support whenever I needed it.

Während der Zeit der Promotion lernt man so einige Leute kennen und allem voran die Mitglieder der Arbeitsgruppe. Vielen Dank an euch, dass ihr mir so eine schöne Zeit voller AK-Essen, Feiern und Tagungen bereitet habt: Björn für eine unvergessliche Qlimax in Holland und der epischen *welcome reception* (+ Tag danach) auf der (zweiten) Barcelona-Tagung, Melli für eine erlebnisreiche Schnorchelreise in Athen, Linda für die ständige Hilfe und Rat in der Zellkultur und bei sonstigen Arbeitsfragen, sowie einer tollen Tagung in Vic, Barcelona mit Julia. Vielen Dank auch an Lydia, Stefan und Martin. Hervorheben möchte ich zum einen Dorian, ohne dessen Ermutigung bei meiner ersten Konferenz in Vic, Barcelona ich nie den Mut aufgebracht hätte, Wiktor nach einer Kooperation zu fragen. Gefühlt die Hälfte meiner Arbeit beruht auf diesem einen Moment. Zum anderen möchte ich noch Alex danken für die Verbindungen des CDK-Projekts meiner Arbeit und die vielen tiefgründigen und inspirierenden Unterhaltungen zwischendurch. Du warst meine Rettung in der Not, wenn keiner Lust auf Döner hatte. Zuletzt möchte ich noch Boris danken, ohne den ich nie zu dieser Promotion gekommen wäre, wenn er mich nicht schon als Student mit seiner Begeisterung angesteckt hätte. Vielen Dank! Auch unvergessen sind die helfenden Beiträge von meinem Hiwi Malte Eichelbaum und meinen Wahlpflichtlerinnen Maj Seifert und Ylva von Pein. Ihr habt dem BODIPY-Paper den nötigen Input verpasst. Bedanken möchte ich mich außerdem bei meiner klasse Korrekturleserschaft Melli, Björn sowie insbesondere bei Lydia und Linda – und auch Nora für das super schnelle Lektorat.

Meinen Bürokollegen Lydia, Björn und Alex danke ich für die zahlreichen unterhaltsamen Augenblicke voll von interessanten Gesprächen, Foto-Talk, musikalischer Früherziehung jeglicher *colour*, sowie dem allseits geliebten Hardstyle-Freitag. Das Quanti-Praktikum war nicht nur durch die Studierenden mit ihren „kreativen“ Einfällen ein Highlight, sondern auch dadurch, dass ich sie mit euch, Linda, Melli und Alex, teilen konnte. Ich möchte mich auch bei den ganzen Party People aus dem AK und meinem Studium sowie Sophia, Till, Folknand, Carsten, Fredi, Marie, Tobi und den Party Studis, Demo-Buddy Jana, meiner Grünkohlkönigin Alex Baumann inklusive Hofstaat und den netten Gesellschaften aus den Mittagspausen im Institut für die schönen Erinnerungen bedanken und auch, dass ihr mir gerne erzählt habt, was sich alles auf der Party ereignet hat. ⇒)

Ohne Studium keine Promotion: Deshalb möchte ich mich auch noch bei Alina, Frauke, Inken, Barbara, Falk und Sebastian für die schöne Zeit bedanken, insbesondere bei Kai und Patrick für die unzähligen Lernrunden, lustigen Feiern und so manch schönen Urlaub. Und ohne Schule kein Studium: Deswegen möchte ich mich bei dir, Berger, bedanken, dafür, dass du mir stets ein treuer Begleiter geblieben bist und einen epischen JGA bereitet hast. Außerdem möchte ich mich auch bei meinen treuen Freunden Fritz und Franzi bedanken, dafür, dass wir schon so viel gemeinsam erlebt haben und uns quasi blind verstehen.

Zuletzt möchte ich auch meinen Eltern, meiner Schwester und meinen Großeltern danken, die nicht nur den Grundstein dafür gelegt haben, dass ich heute an diesem Punkt angelangt bin, sondern auch, weil ihr mich stets unterstützt habt und an mich geglaubt habt. Auch Nora möchte ich herzlichst danken für die liebevolle Unterstützung und für die zahlreichen unglaublich tollen Momente, die wir zusammen erleben durften. Du hast diese Zeit noch mal mehr zu einer ganz besonderen werden lassen: Egal ob quer über die halbe Welt oder die Elbtalaue oder Kiel – es macht unglaublich viel Spaß mit dir das Leben zu genießen.

Vielen Dank nochmals an alle Genannten und nicht Genannten dafür, dass ihr mir so eine tolle Zeit bereitet habt!